



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İSTANBUL FATİH KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ
GENEL SEKRETERLİĞİ
S.B.Ü İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

Eğitim Sorumlusu: Doç. Dr. Hale ARAL
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Berrin BERÇİK İNAL

PLATELETDEN ZENGİN PLAZMA
(PLATELET RICH PLASMA-PRP)
HAZIRLANMASINDA KULLANILAN FARKLI TÜP,
FARKLI ÇEVİRME SÜRELERİ VE ISININ ELDE
EDİLEN TROMBOSİTLER ÜZERİNE ETKİSİ

Tamer KISAARSLAN
TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2017

ÖNSÖZ

Hastanemizin fiziki koşullarının düzeltilebilmesi, daha kaliteli hizmet verebilmesi için uğraşan ve bizleri her türlü bilimsel yayınlarda destekleyen hastane başhekimimiz Sayın Doç. Dr. Özgür YİĞİT'e,

Laboratuvarımızın geçmişinde çok önemli bir yer tutan ve laboratuvarımızın bu günlere gelmesinde çok büyük katkıları olan, deneyimlerinden hâlâ faydalandığımız emekli hocamız Uzm. Dr. Güvenç Güvenen'e, tezi hazırlama süresince bana destek olan, bilgileriyle, deneyimleriyle beni yönlendiren, ayrıca laboratuvar içinde ve dışında her konuda bana destek olan, çok değerli tez danışmanım Doç. Dr. Berrin Berçik İnal hocama,

Eğitimim konusunda her türlü desteği sağlayan, bilgileriyle bize ışık tutan, tez hazırlama esnasında da desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Hale Aral'a,

Laboratuvarımızın çok değerli uzmanları Dr. Çiğdem Topkaya, Dr. Bağnu Orhan, Dr. Derya Sönmez ve Hümeysra Emre 'ye,

Birlikte zaman geçirmekten keyif aldığım değerli arkadaşlarım Cihan Özer, Turgut Akşoy, Şehide Baz, Mehtap Gökçe, İbrahim Topaç, Hilal Mercan, Sultan Zeynep Erdoğan, Atakan Koro ve AbdulKadir Doğru arkadaşlarıma,

Bana bir işyerinden ziyade aile ortamında olduğumu hissettiren Biyokimya Laboratuvarı ailesinin çalışan ve emekli tüm üyelerine,

Çalışmamda bana destek olan Yeliz Yalçın arkadaşşıma,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, ne yapsam haklarını ödeyemeyeceğim aileme,

İsimlerini hatırlayamadığım, bilmediğim ve buraya yazamadığım ama bana en ufak da olsa desteği olan yüreği iyilikle dolu herkese

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR.....	iv
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. TROMBOSİTLER (PLATELETLER).....	4
2.1.1. TROMBOSİTLER VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ	10
2.1.2. TROMBOSİTLERİN AKTİVE EDİLMESİNİN KLİNİĞE KATKISI.....	11
2.2. PRP-2 / PCP ve TEDAVİDEKİ YERİ.....	13
2.2.1. TAM KAN ve PRP-2/PCP’NİN BÖLÜMLERİ.....	16
2.2.2. PRP TEDAVİSİ.....	17
2.2.3. PRP, PRP-2/PCP HAZIRLANIŞI	19
2.2.4. İYİ BİR PRP ELDE EDEBİLMEK İÇİN GEREKLİ OLANLAR	23
2.2.5. PRP/PCP KULLANIMININ AVANTAJLARI.....	26
3. MATERYAL METOD	28
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA	54
6. KAYNAKLAR	69

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Trombosit granülleri ve içerikleri	8
Tablo 2. Çalışmada kullanılan örnek sayısı, kişilerin yaş bilgileri ve örneklerin tam kan WBC (WBC1, RBC (RBC1), platelet değerleri ise PLT1 olarak gösterilmektedir.....	50
Tablo 3. PCP içerisindeki WBC, RBC ve Platelet değerlerini göstermektedir	51
Tablo 4. Çalışmada kullanılan örneklerin sulandırma oranları.	51
Tablo 5. Örneklerin ilk ve işlem sonrası platelet sonuçları ve artış yüzdesi	52
Tablo 6. Tanımlayıcı İstatistikler.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Plateletlerin şeklinin, organellerinin ve reseptör sinyal aracılığı ile trombinle aktivasyonunun şematik olarak gösterimi 5
- Şekil 2. Hasar sonrası plateletlerin tıkaç oluşturma ve tamir aşamasının şematik gösterimi 6
- Şekil 3. Plateletlerin organel ve granül içerikleri(14) 7
- Şekil 4. Hasar sonrası aktive olan plateletlerin başkalaşım geçirerek psödopodlar oluşturması 9
- Şekil 5. Plateletleri aktive eden bazı maddeler..... 12
- Şekil 6. Çift santrifüj adımı, pellet kısmı ve sulandırılma işlemleri(13) 22
- Şekil 7. Santrifüj sonrası tam kanın görünümü(13)..... 23
- Şekil 8. Sabit başlıklı ve oynar başlıklı santrifüjlerde g kuvvetinin ve parçacıkların hareket yönü 24
- Şekil 9. Yarıçap, g kuvveti ve rpm değerlerinin birbirlerine oranları 25
- Şekil 10. 8 mL hacimli jelli tüpün 300×g'de çevrildikten sonraki görünümü (en altta jel, ortada RBC, üstte plazma) 30
- Şekil 11. 3mL hacimli tüp (solda) ve 5mL hacimli tüp (sağda) 'lerin 300×g'de çevrildikten sonraki plazma hacimleri 30
- Şekil 12. 5mL hacimli tüpün 300×g' de santrifüj edildikten sonra plazmanın tahmini 3'e bölünmüş hali: 1. Kısım üst plazma, 2. Kısım orta plazma, son 3. Kısım; buffy coata dahil edilen kısım..... 31
- Şekil 13. 400×g'de 10 dakika çevrildikten sonra plazmanın en alt yaklaşık 300µL hacimli son kısmı(kırmızı çizginin alt kısmı),PCP olarak alınan kısım, Üst plazma ise PPP kısmıdır..... 33

- Şekil 14. 230×g 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra plazmanın 4 bölüme ayrılmış hali. Üstten ; 1 : Üst PRP, 2: Orta PRP, 3 : Buffy coat'a dahil edilen kısım, 4 : RBC' lerin olduğu kısım. 36
- Şekil 15. 230×g 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra buffy coat sınırlarını belirlemek amacıyla tüp üzerinde plazmanın 1'er mm lik porsiyonlara ayrılmış hali. Sağ taraftaki şekilde siyah çizgilerin her birinin arası 1mm' yi ifade etmektedir. 39
- Şekil 16. Soldaki şekil buffy coat ile birlikte RBC kısmından da bir miktar hacim alındığını gösterir (kırmızı çizgiler arası pipetlenmiştir). Sağdaki resim ise çalışmada kullandığımız kuru tüpü ve içerdiği plazmayı göstermektedir. 39
- Şekil 17. Soldaki resim plazmanın konsantre edildikten sonraki 3 bölgeye ayrılmış halini gösterir, sağdaki resim ise tüpün dip kısmındaki yaklaşık 300 µL hacmindeki PCP kısmını göstermektedir (kırmızı çizginin altında hacim yaklaşık 300µL). 41
- Şekil 18. Santrifüj işleminden sonra (plazmanın konsantre aşaması oluşan pellet kısmı görülmekte (kırmızı yuvarlağın iç kısmı platelet pelletleri içerir) 41
- Şekil 19. Santrifüj işleminden sonra (plazmanın son konsantre aşaması) tüpün dibinde plateletlerin en yoğun olduğu 100µL hacmindeki kısım. Kırmızı çizginin üstü PPP kısmını ifade etmektedir. 44
- Şekil 20. Santrifüj ivmelenmesinin şematik gösterimi. F : Kuvvetin yönünü, v:hızın yönünü, R: Santrifüj yarıçapını, M: maddemizi, W: açısız hızı, X: rotorun merkezini ifade etmektedir. 55

KISALTMALAR

ACD	: Acid Citrate Dextrose
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BD	: Becton Dickinson and Company
bFGF	: Fibroblast growth factor
BTG	: Beta tromboglobulin
cCMP	: Siklik Adenozin monofosfat
cD40	: Cluster of differentiation 40
CJD	: Creutzfeldt–Jakob disease
CTGF	: Connective tissue growth factor
dk	: Dakika
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksi nükleik asid
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
EGF	: Epidermal growth factor
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration
g	: Santrifüjün uyguladığı ivme kuvveti
GP IIb / IIIa	: Glycoprotein IIb/IIIa
IL 1	: Interleukin-1
IP	: İnozitol fosfat
MIP1a	: Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha

mL	: mililitre
μL	: Mikrolitre
OCS	: Open canalicular sysytem
PAI-1	: Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCP	: Platelet consantrated plasma
PDGF-BB	: platelet kaynaklı büyüme faktörü
PF4	: Platelet faktör 4
PLA2	: Phospholipases A2
PRP	: Platelet rich plasma
ORT PLT	: Ortalama platelet sayısı
PLT1	: Tam kan platelet değeri
PLT2-1	: PCP içerisinde yapılan birinci ölçümde elde edilen platelet sayısı
PLT2-2	: PCP içerisinde yapılan ikinci ölçümde elde edilen platelet sayısı
PRGF	: Plasma rich of growth factor
RANTES (CCL5)	: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RBC	: Eritrositler (red blood cell)
RBC1	: Tam kan RBC sayıları
RBC2	: PCP içerisindeki RBC sayıları
RCF	: Rölatif santrifüj kuvveti
RhPDGFBB	: Recombinant human platelet-derived growth factor BB
Rpm	: Revolution per minute
SCD40L	: Lökosit yüzey antijeni
TGFα	: Transforming growth factor alpha

TGFB	: The transforming growth factor beta
TH1	: Yardımcı T hücre
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VWF	: Von Willebrand faktörü
W-PCP	: WBC içeren PCP
W-PRP	: WBC içeren PRP
WB	: Tam kan (whole blood)
WBC	: Beyaz kan hücreleri (white blood cell)
WBC1	: Tam kan WBC sayıları
WBC2	: PCP içerisindeki WBC sayıları

ÖZET

Platelet rich plasma 2 (PRP2) ya da platelet konsantre plazma (PCP); içinde bulunan plateletler sebebiyle büyüme faktörü kokteyli gibi düşünülebilir. PCP/PRP2; ikinci santrifüj işleminden sonra elde edilen platelet açısından konsantre edilmiş PRP'dir. İçerisinde çok çeşitli ve fazla sayıda büyüme faktörü ihtiva eder. En büyük özelliği oldukça küçük hacimlerde çok fazla sayılarda trombosit içermesidir. Bu da uygulama kolaylığı sağlamakta ve tedavi başarısını arttırmaktadır. Bu sebeple klinik olarak oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu kokteyl, yara iyileşmesini, anjiyogenezisi ve doku yenilemesini teşvik eder ve hızlandırır. Bununla birlikte, PCP 'nin terapötik etkileri, kısmen optimize edilmiş ve standardize edilmiş hazırlama protokollerinin olmamasından dolayı tartışmalıdır.

Sıradan protokollerle hazırlanan PCP örnekleri çoğu zaman beyaz kan hücreleri içerir (W-PCP). Biz ise çalışmamızda uyguladığımız protokollerle içerisinde WBC' nin ve RBC'nin en az oranda olduğu en uygun PCP elde etmeyi hedefledik. En iyi protokole ulaşabilmek içinde başta bir dizi deneme çalışması yaptık. Yaptığımız deneme çalışmalarında ilk önce 8 mL hacimli sodyum sitrat içeren jelli tüp kullandık fakat uyguladığımız g kuvvetinde jelin gerektiği gibi hareket etmemesi üzerine bu tüpten vazgeçildi. Yine 3 mL hacimli sodyum sitrat içeren başka bir tüp kullandığımız zaman da elde edilen plazma hacminin yetersiz olması sebebiyle bu tüpten de vazgeçildi. En son 5 mL hacimli sodyum sitrat içeren tüp kullandık ve elde ettiğimiz verilere göre; çalışmamız için her yönüyle uygun olduğuna karar verdik. Birkaç deneme çalışması sonrası, en uygun protokolü elde ettiğimize karar verdiğimizde asıl çalışmamıza geçtik. PCP hazırlama protokollerini optimize etmek için tam kan (WB) örnekleri üzerinde çalıştık. WB örnekleri için 5 mL hacminde sodyum sitratlı tüpleri, ikinci santrifüj işlemi sırasında ise (PCP elde etme aşaması) 3 mL hacimli kuru tüpleri kullandık.

Santrifüj protokolleri iki adımda uygulandı; birinci adımda 230×g 10 dakika (PRP elde edilen kısım) ve ikinci adımda 2000×g 10 dakika (PCP elde edilen kısım). PCP; 2000×g'de PRP'nin santrifüj edilmesiyle plateletlerin çöktürülmesi sonrası üst plazmanın yaklaşık 9/10' luk kısmının uzaklaştırılması sonrası elde edildi. Daha sonra elde edilen

PCP kendi plazmasıyla karıştırılarak çözünmesi sağlandı; PCP'deki trombosit sayısı, WB trombosit ölçümlerinden yaklaşık 20 kat daha fazla bulundu.

Bu sonuçlar, maksimum konsantrasyonlarda platelet kaynaklı büyüme faktörlerin hazırlanmasının optimize edilmesi, geliştirilmesi ve standardize edilmesi konusunda bize ışık tutmaktadır



ABSTRACT

Platelet rich plasma 2 (PRP2) or platelet concentrated plasma (PCP) can be thought of as a growth factor cocktail due to the platelets present in it. PCP/PRP2 is the PRP concentrated platelets obtained after the second centrifugation step. It contains a wide variety of growth factors. The greatest feature is that platelets are contained in very large numbers in very small volumes. It provides ease of application and increases treatment success. For this reason, it is widely used in clinical practise. This cocktail encourages and accelerates wound healing, angiogenesis and tissue regeneration. However, the therapeutic efficacy of PCP is controversial due to the lack of optimized and standardized preparation protocols.

PCP samples prepared using conventional protocols often contain white blood cells (W-PCP). In our study, we aimed to obtain the most suitable PCP in which the WBC is at least in order with the protocols we have used. In order to follow the best protocol, we did a series of trials. In our experiments, we first used a tube containing 8 mL of sodium citrate and gel, but we could not get the gel move enough with respect to the gravity force, as we expected, so this tube was abandoned. When we used another tube containing 3 mL volume of sodium citrate, the plasma volume obtained was inadequate and this tube was also abandoned. We used a tube containing sodium citrate in the final volume of 5 mL, and according to our data retrieved; we decided that it was at all the right tube for us to perform with. After a few trials, we started the original study, as soon as we got the most suitable protocol for our pupose. We studied on whole blood (WB) specimens to optimize PCP preparation protocols. We used 5 mL volume sodium citrate tubes for WB samples, and we used 3 mL volume dry tubes during the second centrifugation process (PCP acquisition phase).

Centrifugation protocols were performed in two steps; in the first step, 230×g for 10 min (PRP obtained), and in the second step, 2000×g for 10 min (PCP obtained portion). PCP was achieved by centrifugation at 2000×g for precipitating the platelets of WB and removal of approximately 9/10 of the supernatant in PRP. And then, the achieved PCP was

resuspended and resolved by its own plasma; platelet counts in PCP were found approximately 20-fold higher than the counts in WB.

These results shed light on optimizing, developing and standardizing platelet-derived growth factors at maximum concentrations.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı bir insanın kanında 150.000 / μ L ile 400.000 / μ L arasında platelet bulunmaktadır. Plateletlerin asıl görevi bilindiği üzere hemostazı yani kanın pıhtılaşmasını sağlamaktır (1,2). Bunun yanında plateletler içerisinde ihtiva ettiği çok sayıda doku büyüme faktörleri sebebiyle son zamanlarda tıp alanında oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (3,4). Bunun sebebi ise plateletlerin içerisinde bulunan ve plateletlerin parçalanmasıyla açığa çıkan büyüme faktörlerinin uygulanan bölgedeki hücre yenilenmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını kat ve kat hızlandırarak iyileşme ve doku onarımını aynı oranda arttırmasına dayanır (3,5). Bunun yanında daha araştırılmakta olan ve hala bilinmeyen bir çok görevinde olduğu söylenmektedir (3,5,6,7).

Büyüme faktörleri ve çalışma mekanizması: Büyüme faktörleri protein yapıdadırlar ve hücreler için bir sinyal görevi görürler. Hücre üzerindeki kendine özgü reseptörlerine bağlanarak hücrenin DNA sına etki ederler. Böylece hücreye mitoz bölünme yönünde uyarı göndererek hücrenin yenilenmesini, bölünmesini ve kollejen sentezini (protein sentezini) hızlandırır (8). Bu uyarılar ve hücrenin çoğalması kontrollü bir şekilde ilerler. Bazı büyüme faktörlerinin ise bazı dokularda büyümeyi hızlandırdığı bazı dokularda ise büyümeyi baskıladığı söylenmektedir. Bu sebeple bu faktörlerin baskılayıcı mı yoksa hızlandırıcı mı olduğu konusunda hala tartışmalar vardır (9,10,11).

Plateletler; yara iyileşmesinde, diş cerrahisinde, hasarlı eklem ve tendonlarda, cerrahi doku ameliyatlarında vb. iyileşmenin hızlandırılması istenilen birçok alanda kullanılabilir (12). Ayrıca kollejen dokunun ve epitel dokunun yenilenmesini

hızlandırdığı için estetik alanında da son zamanlarda oldukça yaygın kullanım alanı bulmuştur. Özellikle yüz kırışıklıkları ve cilt yaşlanmasına karşı kullanılmaktadır (12,3,6)

Uygulama şekline gelince; Öncelikle PRP örneği içerisinde platelet dışındaki hücrelerin en aza indirilmesi gerekir. Plateletlerin tam kandan plazma içersine izole edip kullanılacak platelet sayısını mümkün olduğunca artırıp uygulanacak olan total plazma hacmini ise en aza indirmemiz gerekmektedir. Yani bi bakıma başta eritrositler(RBC)‘lerden mümkün olduğunca ayrıştırılması gerekmektedir. Çünkü eritrositler, (özellikle yüzde olmak üzere) uygulanan bölgede morarmalara ve reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Ayrıca uygulanacak platelet miktarı için total hacmin gereksiz artmasına sebep olmaktadır (13). White blood cell(WBC)’ler ise plateletler ile çok yakın özgül ağırlığa sahip oldukları için plateletlerden çok fazla ayrılamamakta ve genelde yapılan uygulamalarda plazma içerisinde plateletlerin yanında WBC’ler de bulunmaktadır. Fakat uygulanacak plazma içerisinde WBC’lerin fazlaca bulunmasının uygulanan bölgede immun reaksiyonlara yol açabileceği söylenmektedir (13).

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; klinik uygulama kolaylığı sağlamak ve sonucun verimliliğini en iyi hale getirmek için plateletleri ihtiva eden plazma hacmini en aza indirmek ve platelet sayısını mümkün olduğunca arttırmaktır. Başka bir deyişle en yoğun PCP (platelet consantre plasma)’yı elde etmektir. Aynı zamanda, bu çalışmada plazma içerisinde RBC’nin yanısıra WBC’nin de en az oranda olmasını hedefledik. Çünkü öncede bahsettiğimiz gibi, içerisinde WBC’nin en az oranda olduğu PCP rahatlıkla vücudun her bölgesine uygulanabilmekte ve olası bir immun reaksiyon ihtimalini en aza indirmektedir.

Bazı klinik uygulamalar PRP-1 (platelet rich plasma)’yi kullanmaktadır; fakat PRP’nin ikinci kez santrifüj sonrası elde edilen PRP-2 (PCP olarak da tanımlanır), uygulama hacmi PRP-1 den daha azdır. Buna karşın, PRP-2’nin içerdiği platelet sayısı daha fazladır. Bu yüzden çok küçük bir bölgeye oldukça fazla sayıda platelet uygulamak istersek PRP-2 daha uygun bir örnek olmaktadır (13).

Bu çalışmayla, içerisinde RBC ve WBC nin en az oranda olduğu sağlıklı bir PRP-2 (PCP) elde etmek için; soğutmalı santrifüj kullanılmasıyla 21°C’lik sabit sıcaklığın

sağlandığı koşullarda, farklı içerikli ve hacimli tüp, çeşitli santrfüj RCF (Relative Centrifugal Force, *g kuvveti*) kuvvetleri ve protokolleri deneyerek en uygun prosedürü bulmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TROMBOSİTLER (PLATELETLER)

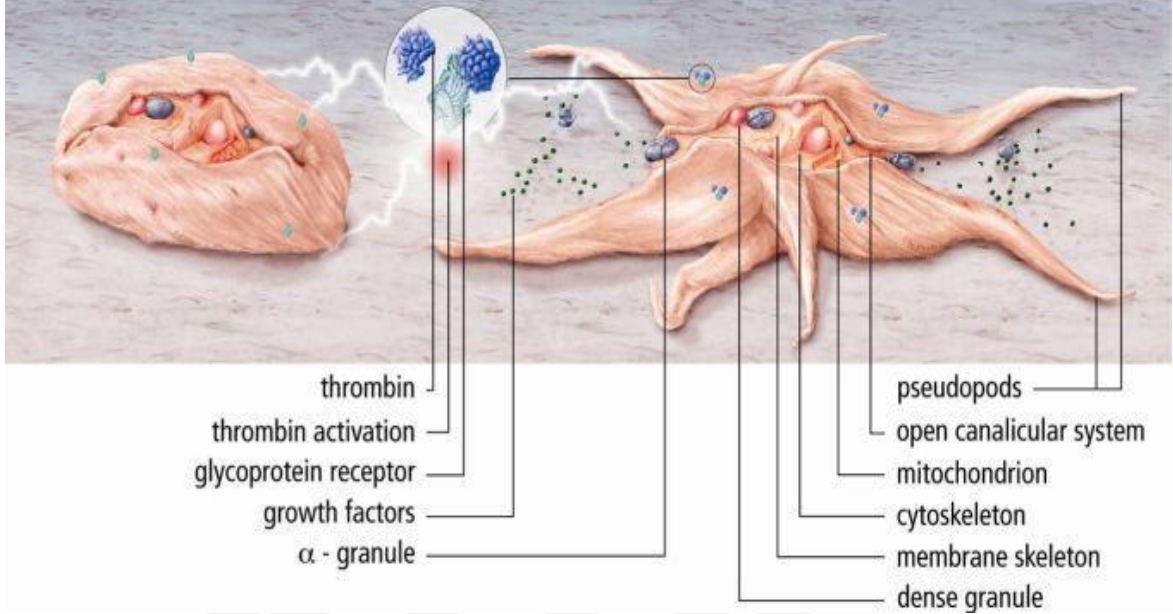
Trombositler (plateletler) 2-5 μ çapında 5-7 μm^3 hacminde kemik iliğinin en büyük hücreleri olan megakaryositlerden meydana gelen ve periferik kandaki en küçük hücreler olduğu için kan pulcukları adı ile de anılan çok fonksiyonlu hücrelerdir. Kısaca trombositler için “kemik iliğinin devleri, periferik kanın cüceleri” diyebiliriz (14,15,16,17,18).

Bir megakaryositten ortalama 1.500-2.000 (500-4.000) trombosit oluşmaktadır. Trombosit eskiden **membran**, **hyalomer** ve **granulomer** adlı üç bölümde incelenirken morfolojik sınıflama artık **fizyolojik fonksiyonlarına** göre üçe ayrılarak incelenmektedir (14,15,16,17,18).

1. Kabuk (sitoskeleton) ya da Periferik Bölüm: Bu bölüm plazma membranı ve açık kanallar sisteminden (OCS, open canalicular system) oluşur.

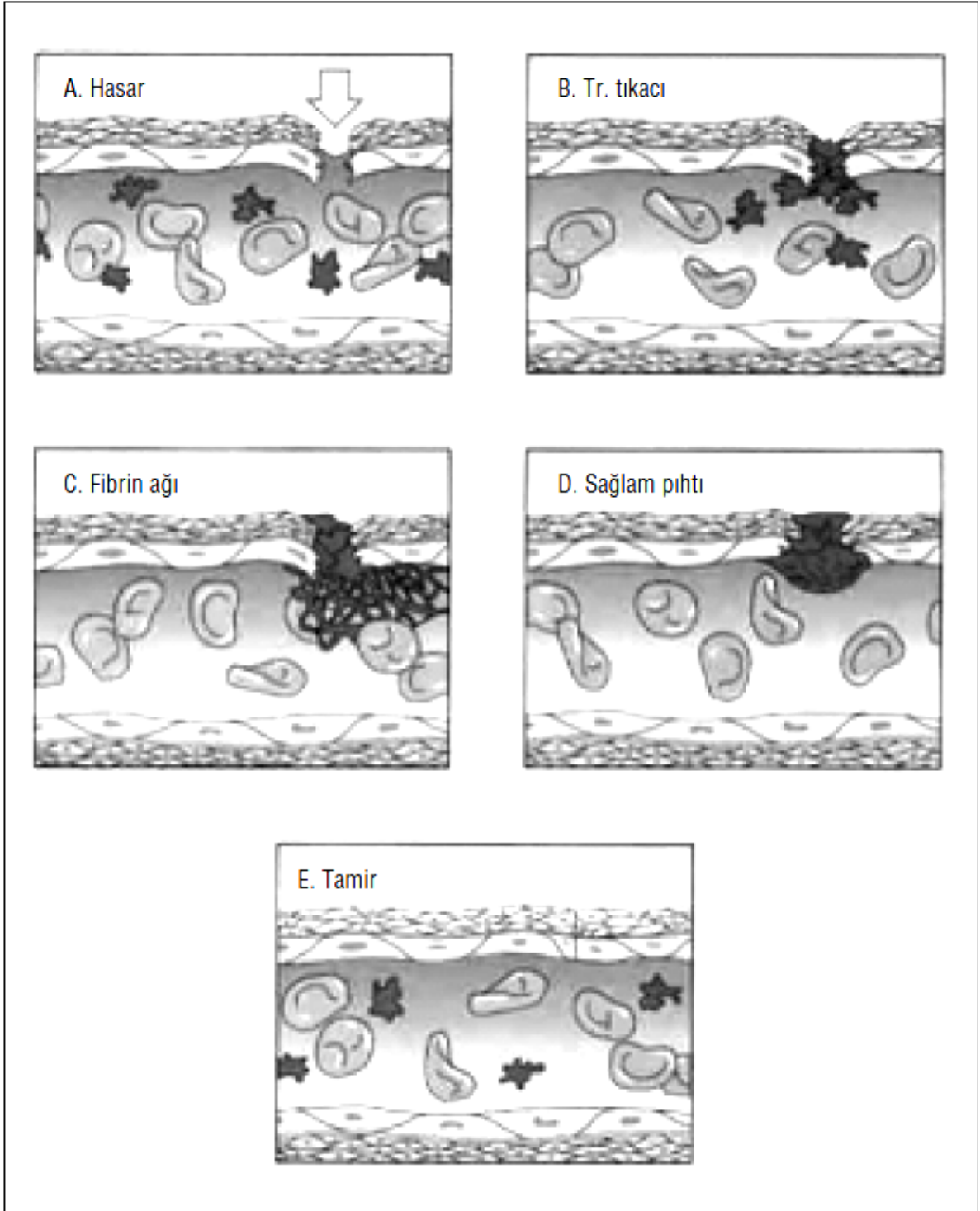
2. Sol-gel Bölümü: Daha merkezde bulunan bu kısım trombosit sitoplazması ve kontraktil protein olan aktin ağından oluşur.

3. Organeller Bölümü: Çeşitli trombosit granülleri, mitokondri, lizozom ve peroksizomlardan oluşur.



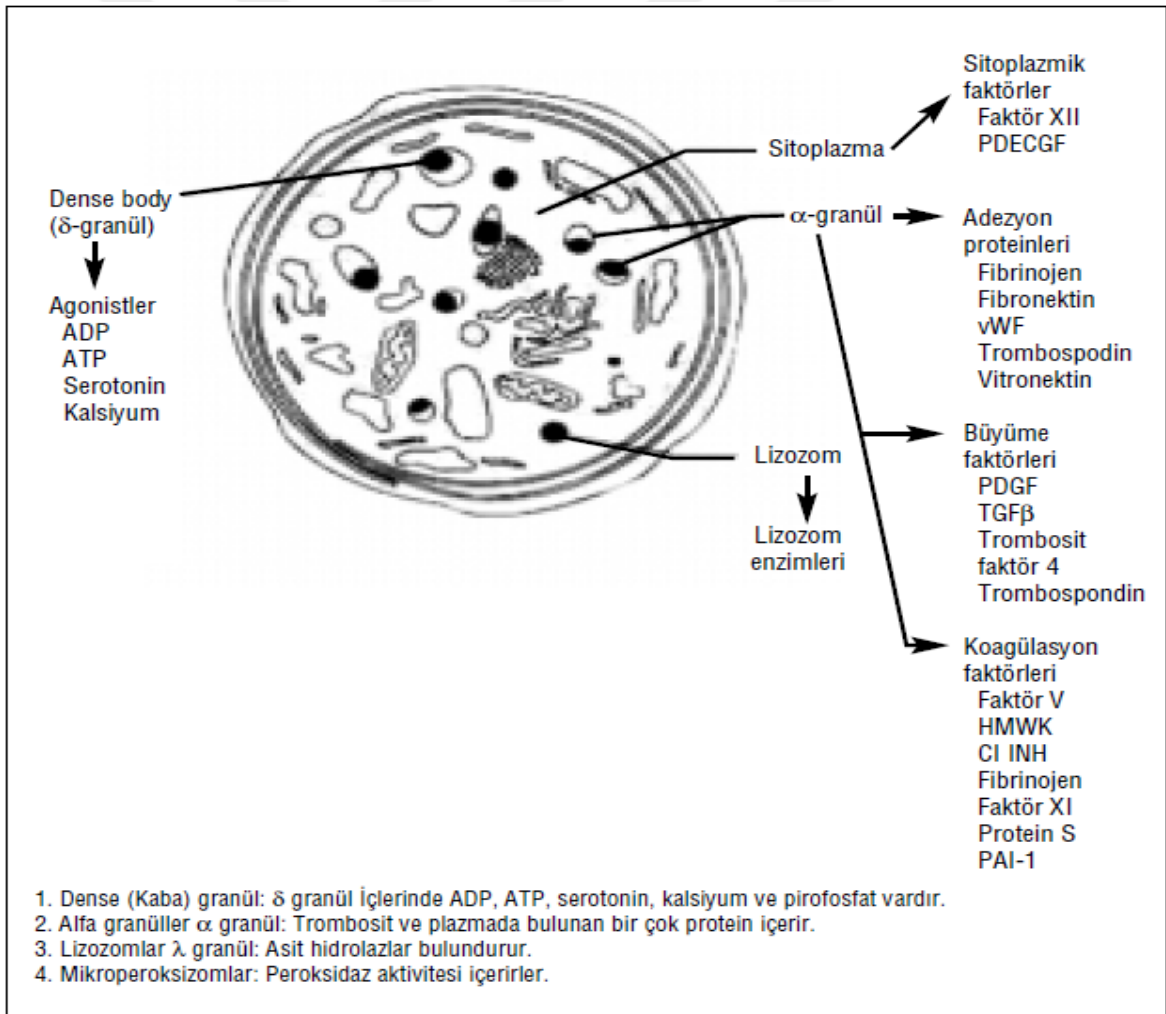
Şekil 1. Plateletlerin şeklinin, organellerinin ve reseptör sinyal aracılığı ile trombinle aktivasyonunun şematik olarak gösterimi

Trombositler içinde **tüm aminoasitler** bulunur. Trombositlerin çekirdeği olmadığı halde bu aminoasitleri kullanarak protein sentezleyebilirler(14,15,16). Protein sentezinin mitokondrial nükleik asitler sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Trombositlerin membranları **sialik asitten** zengindir. Bu trombosit yüzeyine (-) elektrik yük kazandırmaktadır. Yüzeydeki sialik asid nörominidaz gibi enzimlerin etkisiyle azalınca, negatif yükte de azalma sonucunda agregasyon başlar (15,16). Damar endotelinde hasar olduğunda önce damar düz kaslarında vazokontraksiyon olur ve normalde dolaşımında **disk** halinde bulunan trombositler biraraya gelerek **trombosit tıkaçını** oluştururlar; buna **primer hemostaz** denilir (14) (**Şekil 2,4**).



Şekil 2. Hasar sonrası plateletlerin tıkaç oluşturma ve tamir aşamasının şematik gösterimi

Bu olay endoteldeki zedelenme sonucunda subendotelden açığa çıkan adezyon proteinlerine trombositlerin bağlanması ile gerçekleşir. Trombosit yüzeyinde, adezyon molekülleri ailesinden integrinler alt sınıfına dahil olan, çok sayıdaki glikoproteinler reseptör görevi görürler (*Tablo1*) (14). Trombositin GP Ib/IX kompleksi ile subendotel dokuya bağlanması sırasında vWF köprü görevi görür. Önce trombositlerde ki kontraktıl sistem aktive olur ve aktin kasılır, psödopodlarını uzatır, bu sırada hücre içindeki organeller ortaya toplanır (14,15,16,17,18,). Bu sırada aktin demetlerinden oluşan psödopodlar daha da uzar. Aktin trombosit agregatlarını stabilize eder ve adezyonu hızlandırır. Normal trombositler içinde 4 çeşit granül bulunur (*Şekil 3*).



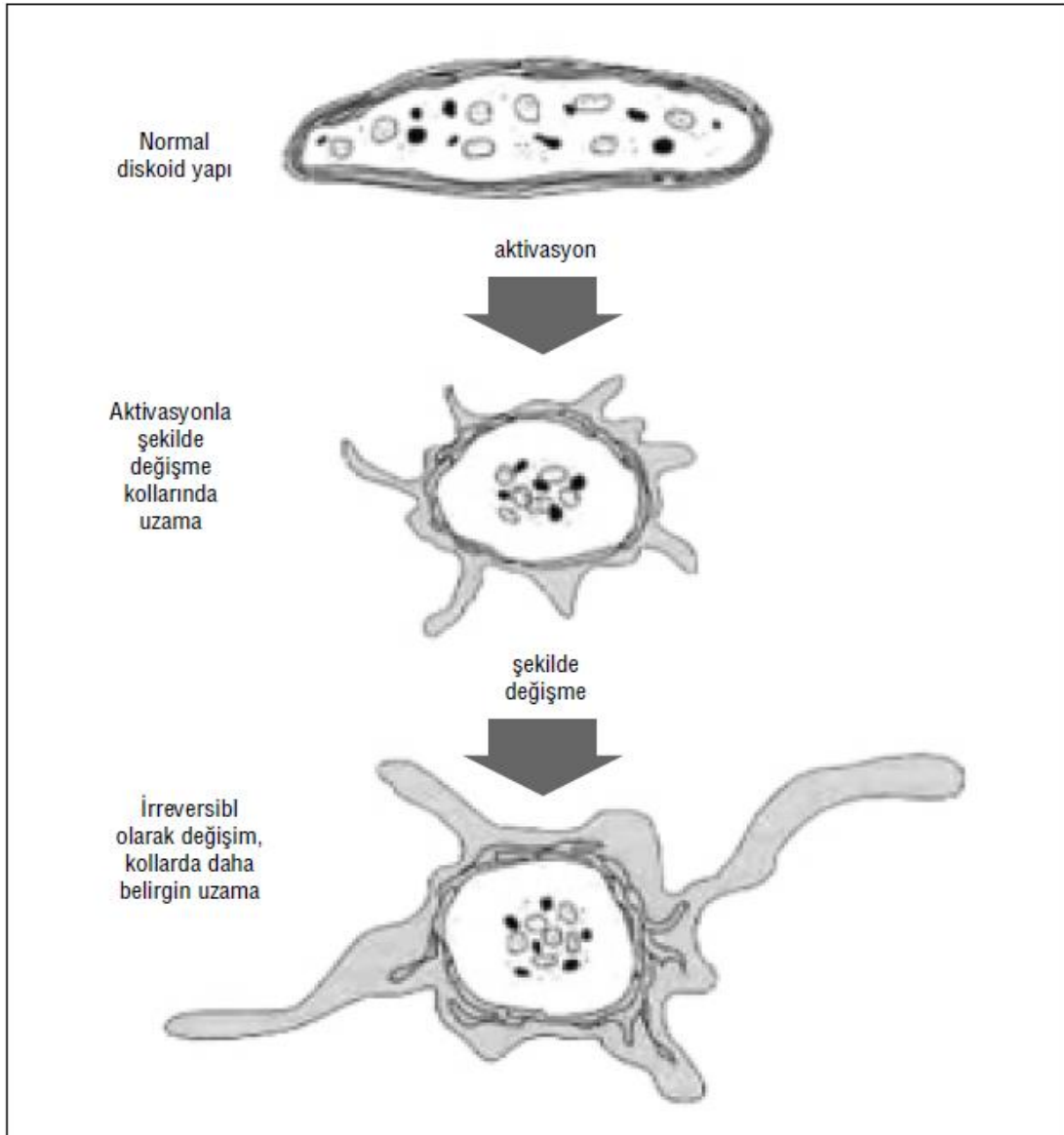
Şekil 3. Plateletlerin organel ve granül içerikleri(14)

Tablo 1. Trombosit granülleri ve içerikleri

1. Dense Body:	ATP, ADP, serotonin, kalsiyum, fosfat, guanin nükleotid
2. Alfa Granüller:	
a. Enzimler:	α 1 antitripsin α 2 makroglobulin α 2 antiplasmin C1-esteraz inhibitörü
b. Adezyon proteinleri:	Fibrinojen Fibronektin VWF Trombospondin Vitronektin GP IIb/IIIa P-Selektin
c. Büyüme faktörleri:	PDGF (Platelet Derived Growth Factor) TGF β (Transforming Growth Factor β) Epidermal Growth Factor Endotelial Growth Factor
d. Sitokin benzeri proteinler:	IL 1 CD 40 Ligand PF4 (Trombosit faktör 4) β -Tromboglobulin (BTG)
e. Koagülasyon faktörleri:	HMWK Plazminojen PAI-1 Faktör V Faktör XI Fibrinojen Pr. S
3. Lizozomlar:	β Galaktosidaz β Glukuronidaz α arabinosid N-asetil glukozamidaz Elastaz Kollejenaz Katepsin

Trombositin uyarılması sonucunda merkezde toplanan bu granüllerin membranları, hücre membranı ile bağlantılı açık kanal sistemi ile birleştikten sonra granül içindeki maddeler ortam dışına atılır (*Şekil 3*). Bu sırada trombosit membranından arşidonik asit, hücre içinden de prostaglandin salınımı da gerçekleşir. Granüllerden salınım sonrasında açığa çıkan **ADP**, **Ca²⁺**, **serotonin**, **pirofosfat**, **lizozom** ve **koagülan protenlerin** etkisi ile çok sayıda trombosit hasar bölgesinde toplanır ve aralarında **çapraz bağlar** oluşturur.(14,18)

Bu sırada en aktif molekül **GP IIb/IIIa** adlı integrindir. Bu kez **köprü** görevini **fibrinojen** üstlenir ama vWF'de reaksiyona katılabilir. Trombositlerin oluşturduğu bu tıkaç güçlü olmadığı için plazmada inaktif şekilde bulunan pıhtılaşma proteinlerinin aktifleşmesi sonucunda oluşan **fibrinle sağlamlaşmalıdır (17,18)**. Faktörlerin aktifleşmesini başlatmak için gerekli olan trombin ve enzim komplekslerinin toplanması yüzey aktive olmuş trombositler tarafından sağlanır. Trombositin bu aktivitesi **Trombosit Faktör III** olarak bilinir(14).



Şekil 4. Hasar sonrası aktive olan plateletlerin başkalaşım geçirerek psödotlar oluşturması

2.1.1. TROMBOSİTLER VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Trombositlerde çok sayıda büyüme faktörleri olduğundan, PRP, hücresele çoğalma, kollajen üretimi, hyalüronik asit üretimi, epidermal hücre büyümesi, anjiyogenez, vb. sistemleri harekete geçirerek farklı tipte tedavilerde kullanılabilir.

1-Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor-beta (TGF- β))

2-Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF))

3-Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor (PDGFa-b))

4-Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor (EGF))

5-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF))

6-Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor (CTGF))

1-Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) ;Trombositler, ekstraselüler kemik matriksi, kırıldak matriksi, aktive TH1 hücreleri ve doğal katil hücreler, makrofajlar/ monositler ve nötrofillerde bulunurlar. *Diferansiye olmayan mezanşimal hücre çoğalmasını uyarır*; endotelial, fibroblastik ve osteoblastik mitogenezi düzenler; kollajen sentezini ve kollajenaz salgısını düzenler; diğer büyüme faktörlerinin mitogenetik etkilerini düzenler; endotelial kemotaksis ve anjiyogenezi uyarır; **makrofajın ve lenfositlerin çoğalmasını engeller.**

2- Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) Trombositler, makrofajlar, mezanşimal hücreler, kondrositler ve osteoblastlarda bulunurlar. Kondrositlerin ve osteoblastların büyümesini ve farklılaşmasını destekler; mezanşimal hücreler, kondrositler ve osteoblastlar için mitogenettir.

3- Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGFa-b); Trombositler, osteoblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar, monositler ve düz kas hücrelerinde bulunurlar. Mezanşimal hücreler ve osteoblastlar için mitogenetik; fibroblast/gliyal/

yumuşak kas hücrelerindeki kemotaksisi ve mitogenezi uyarır; kollagenaz salgılamayı ve kollagen sentezini düzenler; makrofaj ve nötrofil kemotaksisi uyarır.

4- Epidermal Büyüme Faktörü (EGF);Trombositler, makrofajlar ve monositlerde bulunurlar. Endotelial kemotaksis/anjiogenezi uyarır; kollagenaz salgılamayı düzenler; epitelyal/mezanşimal mitogenezi uyarır.

5- Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF); Trombositler ve endotelial hücrelerde bulunurlar. Anjiyogenez ve damar geçirgenliğini artırır, endotelial hücrelerde mitogenezi uyarır.

6- Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF) Kemik iliğindeki hücre dışı ortamdan endositoz yoluyla oluşan trombositlerde bulunurlar. Anjiyogenezi, kıkırdağın yeniden oluşumunu, fibröz ve trombosit adezyonunu destekler.

2.1.2. TROMBOSİTLERİN AKTİVE EDİLMESİNİN KLİNİĞE KATKISI

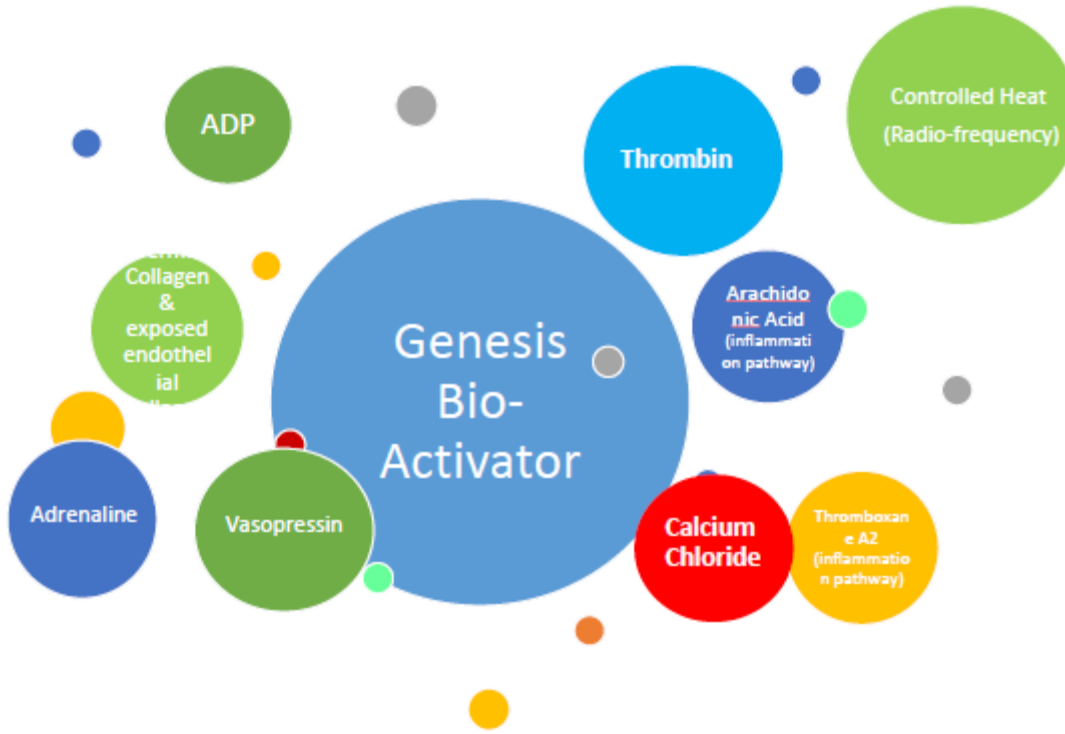
Trombositleri başlıca işlevi öncede belirtildiği gibi hemostazın sağlanmasıdır. Damar duvarının zedelenmesini takip eden milisaniyeler içinde trombositler, açığa çıkan subendotelial kollajene adhere olurlar. Adezyon ve birçok fizyolojik agonist hücreyi aktive ederek bir seri reaksiyonu tetikler.

Trombosit **agonistleri**, membran üzerinde spesifik reseptörlerine bağlanarak trombositleri uyarırlar. Agonist-reseptör kompleksinin aktive ettiği C proteinler ile sinyal membran boyunca iletilir. Fosfoditil inositlerin (İP) fosfolipaz C (PLC) enzimi ile hidrolize ve fosfolipaz A2 <PLA2 > ile araşidonik asit serbestleşmesi, trombositlerin aktivasyonunda rol oynayan önemli hücre içi yollardır. Ayrıca, son yıllarda çeşitli agonistlerin trombositlerde **protein tirozin kinaz** aktivitesini artırdığını gösterilmiştir. Siklik adenozin monofosfat (c-AMP) ve siklik guanidin monofosfat (cCMP) trombosit fonksiyonlarını baskılamaktır.

ADP, trombin, kollajen, epinefrin, trombosit (platelet) aktive edici faktör (PAF) gibi önemli fizyolojik agonistler kısmen farklı yolları kullanarak trombositleri aktivite etmektedir.

Trombositler, aktif olmayan formda küçük düz şekildedir. Fakat aktivasyon ile (örn trombin tarafından), trombositler şekil değiştirirler ve psödopodu geliştirirler. Böylece trombosit agregasyonu ve açık kanalikül sistemi yoluyla (GF, glycoprotein) granüllerin salımı sağlanır. Bu nedenle, **trombosit aktivasyonu PRP tedavisinin etkisini en üst düzeye çıkarmak için tavsiye edilir.**

Trombositler nasıl aktive edilir?



Şekil 5. Plateletleri aktive eden bazı maddeler

Bugüne kadar trombositlerin aktivasyonu kalsiyum **klorür**, **trombin**, **ADP**, **kolajen**, **peptit vb.** gibi kimyasalların kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Kimyasallar kullanılarak aktivasyon sağlanması kanın pıhtılaşması, alerjik reaksiyon ve şiddetli yan etki risklerini de beraberinde getirmektedir.

Trombositler avantaj olarak basitçe eklenen kimyasal agonistlerle aktive edilirken, bu kimyasal agonistlerden kaynaklanan **bazı dezavantajlar** da sözkonusudur:

-Kalsiyumun kıkırdağa enjekte edildiğinde nötralize olmasından dolayı etki gösterememektedir ve ayrıca subkutan yağa enjekte edildiğinde deride döküntü, kızarıklık, ve ağrı görülebilir.

- Trombin ve kollajen trombüs oluşumu için direk uygulanır, bu nedenle enjeksiyon öncesi ayrımları iyi sağlanmazsa potansiyel risk faktörü olabilirler.

- Bazı ülkelerde klinik kullanımı yasaktır.

-Tedavinin verimliliği açısından en ideali fiziksel uyarılmasıdır.

2.2. PRP-2 / PCP ve TEDAVİDEKİ YERİ

PRP-2 / PCP 1970'lerin başında çok bileşimli kan ürünlerinin bir yan ürünü olarak geliştirilmiştir. Zamanla PRP elde etmekle ilgili teknolojilerdeki gelişmeler sonucunda bir çok branşta yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanımı artmaktadır.

Bu konudaki yayınları taradığımızda Otolog trombosit açısından zengin plazma (PRP) enjeksiyonu **İlk olarak 1987'de Ferrari ve arkadaşları** tarafından açık kalp ameliyatlarını takiben **homolog kan ürünlerinin transfüzyonunu azaltmak amacıyla** kullanılmıştır(19). Bugün, PRP enjeksiyonları güvenle spor hekimliği, ortopedi, kozmetik, fasciomaxillar ve üroloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır(20). **PRP= Platelet rich plasma (Trombositten Zengin Plazma)** anlamına gelir. Son zamanlarda PRP yerine PRP-2/PCP uygulamarda kullanılmaktadır(13). PRP-2/PCP; PRP' ninde ilave santrifüç uygulamalarıyla plazma hacmi düşürülüp platelet oranı artırılarak elde edilmektedir. Son teknoloji ürünleri olan 4. nesil kapalı sistem ayırma tüpleri sayesinde hastanın kanı, yan etki riski olmadan alınarak yüksek düzeyde konsantre edilmekte (PCP) ve büyüme faktörleri açısından zengin trombositler ve WBC (white blood cell)' den oluşan **“Buffy Coat”** bir çok klinik branşta 25 den fazla endikasyonda kullanılmaktadır(19,20,12). Ancak WBC'nin en az oranda olduğu PCP olarak kullanmak istersek buffy coat kısmını almadan üst plazmayı kullanmamız gerekmektedir. Bu da çalışmamızda belirtilmiştir.

Kullanım alanlarının başında; **ortopedik cerrahi, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, kardiyovasküler cerrahi, oftalmoloji, yara bakım, dermatoloji ve dental implant cerrahisi, vb.** alanlar gelmektedir. Günümüzde tıpta kullanım alanları daha çok

cerrahi işlemlerle ilgilidir. Ortopedik girişimler, dental ve oral girişimler, travmatik cerrahi işlemler (maksillofasiyal cerrahi, spinal cerrahi, kalp by-pass ameliyatları, angiyojenez gerektiren işlemler, plastik cerrahideki flep kaydırma ameliyatları (12), maküler lezyon, korneal epitelyal defektler gibi. Özellikle ortopedik ve travmatik cerrahide kemik, kartilaj ve doku defektlerinde en fazla gelecek vaad eden teknik olarak görülmektedir.

Dermatolojide, plastik cerrahi ile birlikte daha çok kronik yara, ülserler (5,3,6) ve yanık (21) bakımında kullanılır. Son yıllarda kozmetik dermatoloji alanında kullanılmaya başlanmıştır. Dermatolojide en sık kullanılanı **kronik ülsere** yaralardır. Diğer cerrahi girişimlerde olduğu gibi bu yaralarda da daha çok jel formasyonu kullanılır. Burada plateletten zengin plazmadaki yoğun büyüme faktörlerinin tropik etkisinden, plateletten zengin jelin (PCP) de yapı iskelesi fonksiyonundan yararlanır. Burada yer alan büyüme faktörlerinin hepsi tropik olmayıp, bazı alanlarda sadece protektif özellikleriyle başarılı olur (22). Çalışma sonuçları genelde değişkendir ve PRP ile ilgili kontrollü çalışma sayısı azdır (23,24,25). Çalışmalardaki değişik sonuçların nedeni; kullanılan ekipman, platelet jeli aktive etmek için kullanılan protokol, hasta ve lezyonun kendine özgü karakteristikleri, kullanılan platelet oranı, PCP elde etme protokollerinin farklı olması ve farklı depolama zamanları olabilir.

Ayrıca PRP'ye cevapsız olguların olması kullanımını kısıtlar. Cevapsız olguların sebepleri olarak ise yara iyileşme mekanizmasının kompleksitesi nedeniyle tam anlaşılabilmesi ve platelet biyolojisi ve fonksiyonunun tam olarak bilinmemesi, PRP ile yara iyileşmesi ve osteogenez arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi şeklindeki düşünülmektedir (5).

Normal bir pıhtıda %93 kırmızı kan, **%6 platelet** ve %1 ise beyaz kan hücresi bulunmaktadır. PRP-PCP bu oranı platelet lehine tam tersine çevirir. Yani **platelet %93**, kırmızı kan %6, **beyaz kan hücresi ise %1'dir** (26). ELISA ve immunopresipitasyonla ölçüldüğünde içeriğinde 7 kat artmış TGF- β , 30 kat artmış PDGF ve 10 kat artmış EGF (endotel growth factor) görüldüğü çalışmalar mevcuttur (27). PDGF, hem platelet hem de makrofajda bulunur. Mezenşimal hücreler için mitojen ve kemoatraktandır. Travma

bölgesinde revaskülarizasyona izin verir, kollagen sentezi, kök hücre ve osteoblast mitogenezinde rol alır.

PRP-PCP kullanımının çoklu büyüme faktörü içermesi, otolog olması(özellikle kendi plazmasıyla işlem gördüğü zaman), platelet jel şeklinde verildiğinde yavaş salınma izin vermesi ve hemen ortamdaki geri çekilmemesi ile topikal olarak kullanılan rhPDGFBB (**Recombinant human platelet-derived growth factor BB**)'ye üstünlüğü vardır. Ayrıca PRP'nin rhPDGF-BB'den yarı ömrünün uzun olması, uzun süreli tedavide PRP'nin daha uygun maliyetli olması,yine PRP'nin ihtiyaç duyulduğunda hemen hazırlanıp tatbik edilebilmesi gibi rhPDGF-BB kullanımına karşı üstünlükleri vardır. Ayrıca kronik yaralarda PDGF'nin ekspresyonunun artmasıyla hücrelerde malign transformasyon riskinin arttığı ve rhPDGF-BB'nin 3 tüpten fazla kullanımının malignite hikayesi olan hastalarda artmış mortalite riski ile ilgili olduğuna dair 2008'de FDA tarafından bildirilmiş uyarı mevcuttur (28). Bu yüzden bu hastalarda kullanılması tavsiye edilmemektedir.

Diğer bir büyüme faktörü de TGF- β 'dir. Platelet ve makrofajda bulunur. Fibroblast, farklılaşmamış kemik iliği hücreleri, preosteoblastları uyarır. Remodelizasyon safhasında rol alır. Bunun da proosteoblast farklılaşması ve osteoblast akümüasyonu gibi görevleri vardır. VEGF ve EGF; anjiyogenez,bazal membran formasyonu, endotel farklılaşmasında rol oynar. Bu büyüme faktörleri mezenşimal hücreler üzerindeki reseptöre bağlanırlar. Hücre içine ve hücre nükleuslarına penetre olmadıklarından dolayı tümör formasyonunu indüklemeyiz (29). PRP içeriğindeki maddeler konsantrasyon farkı nedeniyle basit difüzyonla tatbik bölgesindeki mikroçevreye yayılır. **Verildiği bölgede kalması önemlidir.** Jel olarak verildiğinde zaten greft materyali tarafından oluşturulan sınırlayıcı mikroçevre ve yüksek vizkozitesi nedeni kan dolaşımına geçmesi çok zordur. Aksi takdirde istenmeyen yan etkileri olabilir (30).

Doku rejenerasyonu,yeni kapiller oluşumu, epitelizasyonun artırılmasının yanında içerdiği az miktar lökosit ve salgıladığı lökosit atraktan sinyal proteinleriyle immün yanıtta katkıda bulunur. Daha önceki çalışmalarda E. coli,S. aerus, C. albicans ve C. neoformans'a karşı antimikrobiyal ve antifungal özellikleri gösterilmiştir(31,32). PRP ile ilgili

standardizasyonun az olması PRP'nin tam olarak değerlendirilmesini zorlaştırır ve bu da bu yeni teknolojinin hak ettiği değerin tam olarak oluşamamasına neden olmaktadır.

2009 yılında yapılan bir derlemede plasma rich platelet, Medline taramasında 2016 çalışma bulunmuş, bunların 1878 tanesi derleme ile ilişkili bulunmamış, kalan 138 çalışmadan 99 tanesi derlemeye dahil etme kriterlerine uymadığı için çalışmaya alınmamış, kalan 42 klinik çalışmanın ise 20'si randomize kontrollü çalışma olarak derlemeye dahil edilmiştir. Bunların 11'i odontoloji, 7'si deri ülserleri, 2'si ise cerrahi yaralarla ilgili bulunmuştur (33).

Bu çalışmalarda diş eti çekilmesinde gelişme görülürken kronik periodontitte yararı görülmemiş. Kronik deri ülserlerinde çok fazla yararı görülememiştir (33). Fakat özellikle kronik yaralarda başarılı olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bu yöntemin kronik yaralarda kullanımının iyi sonuç verebileceğini düşündüren sebeplerden bir tanesi de kronik yara bölgesindeki büyüme faktörleri konsantrasyonlarının akut yara bölgesindeki oranla çok düşük olmasıdır. Kronik yara ile akut yara bölgesindeki büyüme faktörleri arasındaki farkın sebeplerinden biri de bu bölgedeki bakteriyel ve iltihabi hücre yükünün fazla oluşu, bu sebeple de proteinazlarla büyüme faktörlerinin metabolize edilmesidir (34). Bu yöntem kronik yaralardabir nevi bu büyüme hormonlarını yerine koyma tedavisi de olacaktır.

2.2.1. TAM KAN ve PRP-2/PCP'NİN BÖLÜMLERİ

-Plazma – Toplam Kan Hacminin %55'i (hücresel olmayan komponentler);

Bunun %91'i su (çözücü); %7'si kan proteinleri (Fibrinojen, Albümin, Globülin, vb.), ozmoz dengesi (elektrolitler: sodyum, potasyum, kalsiyum, vb.), pH tamponu, antikoagülan, savunma, %2'si besinler (vitaminler, aminoasitler, karbohidratlar, lipitler vb.), hormonlar (eritropoietin, insülin, vb.).

Elektrolitler (sodyum, potasyum, kalsiyum, vb.) Ozmoz dengesi, pH tamponu, membran geçirgenliğinin kontrolüsen sorumludur.

-Hücresel Bileşenler – Toplam Kan Hacminin %45'i;

Beyaz kan hücreleri katmanı (**%1'den az**); **Buffy Coat:** Trombositler ve WBC'lerden oluşur. **Trombositler (150.000-400.000/µl), WBC'ler (3.000 – 10.000/µl kan).**

Kırmızı Kan Hücreleri (%44) (4.000.000-6.000.000/1µl kan)

PRP-2/PCP nin kısımları ise; plazma içerisindeki WBC, RBC ve plateletlerden oluşur. Bu kısımların sayıları ve oranları PRP-2/PCP'nin hazırlanma protokollerine göre değişiklik göstermektedir. Fakat genel bir sıralama yapacak olursak her zaman; **platelet>WBC>RBC** şeklindedir.

2.2.2. PRP TEDAVİSİ

Trombosit genellikle kan dolaşımı boyunca etkisiz şekilde akan kan ögelerinden biridir. Ancak yara veya doku hasarıyla aktif hale geldiğinde asıl fonksiyonları olan kan pıhtılaşması ve yara iyileşmesini gerçekleştirir. Trombositleri yoğunlaştırıp farklı tedavi alanlarında uygulayarak bu yetenekleri maksimum düzeye çıkararak yöntemine **PRP tedavisi** denir.

Büyüme faktörleri, sitokin, kemokin ve integrin olarak bilinen salgısal moleküller pıhtılaşmadan sonraki yaklaşık **10 dakikalık** süreçte salınırlar. Bu salgısal maddeler plateletlere transfer edilmeden ve fragmentasyona uğramadan önce megakaryositte granül halinde paketlenmiş olarak bulunur. Daha önce sentezlenmiş olan bu büyüme faktörlerinin %95'i histon ve karbonhidrat yan zincirlerinin takılması sonrası **ilk bir saatte salınır** (35). Devamında plateletlerin **7-10** günlük yaşam süreleri boyunca bir miktar salgılanmaya devam ederler (36).

Buradaki önemli nokta ise BF' lerinin salınmadan önce aktiflenmesidir. Hasar görmüş plateletler ve PRP elde etme işlemi sırasındaki plateletlerin yaşamlarını kaybetmesi BF'lerinin aktive olamamasına ve dolayısıyla **PRP uygulamasının başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olur.** Bütünlüklerinin korunması için **asid sitrat dekstroz tip A antikoagulanı** en iyisi olmak üzere EDTA ve sodyum sitrat kullanılabilir ve santrifüj sırasında **düşük yerçekimi kuvvetleri** gereklidir (8,37).

En önemli ve anahtar içerikler **α granüllerinde** bulunur. Her platelet de **50-80** adet arasında **α granül** bulunur. İçeriğinde daha öncede belirttiğimiz 30'dan fazla biyoaktif madde bulunur ; PDGF,TGF- β 1-2, IGF, EGF, VEGF, PDF, PDEGF, PDAF (platelet kökenli anjiogenetik faktör) gibi mitojenik büyüme faktörleri, **osteokalsin, osteonektin, fibrinojen, fibronektin, vitronektin, trombospondin, koagülasyon faktörleri ve diğer bazı adheziv proteinler, fibrinolitik faktörler, anti proteazlar, sitokin (IL-1 β , SCD40L, β tromboglobulin) ve kemokinler (RANTES(CCL5), PF4, MIP1 α), membran glikoproteinleri, anjiyogenez düzenleyici proteinler ve bakterisit proteinler bunlardan bazılarıdır (1,2,5,38,39,40,41). Lizozomal granüller ise proteolitik enzimler ve asit hidrolaz enzimleri içerirler. Yoğun kor granüllerinde ise ADP/ATP, kalsiyum, serotonin, histamin, dopamin, katekolamin gibi platelet agonistleri içerir.**

Plateletler, intravasküler olarak ve dalakta yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Normal kanda yaklaşık **mm³'te 140.000–400.000 platelet bulunur**. Dolaşımdaki yaşam sürelerini tamamladıktan sonra retiküloendotelial sistemde makrofajlarca temizlenir. Eksikliğinde trombositopeni ve sonucunda kanama bozuklukları meydana gelir (1,2). Yara iyileşmesi, evrimsel olarak korunmuş, kompleks, multiselüler bir süreçtir ve bir anlamda bariyer restorasyonunu amaçlar. İçerisinde keratinositlerin, fibroblastların, endotel hücrelerinin, makrofajların ve **platelet** gibi hücrelerin rol alıp, koordineli olarak çalıştığı bir süreçtir. Bu hücrelerin migrasyonu, infiltrasyonu, proliferasyon ve diferansiyasyonu inflamatuvar bir yanıt oluşturarak, devamında yeni doku oluşumunu ve yara kapanmasını sağlar. Klasik bir bilgi olarak inflamasyon, proliferasyon ve remodelling safhalarından oluşur. İşte bu kompleks süreç içerisinde bahsettiğimiz birçok büyüme faktörü, sitokin ve kemokinlerin olduğu kompleks sinyal iletişimleriyle düzenlenir ve başarılıdır (10). Burada görev alan büyüme faktörleri üzerinde çok fazla araştırma yapılmaktadır. Hatta bazı büyüme faktörlerinin klinik olarak uygulaması öncede bahsedildiği gibi mevcuttur.

Bunun haricinde ve birkaç kozmetik içerikli krem haricinde büyüme faktörlerinin direk kullanımı yoktur. PRP-2/PCP tedavi amaçlı kullanılması **fikri de plateletlerin içeriğinde bu yüksek miktardaki büyüme faktörleri bulunması sebebiyle ortaya çıkmıştır**. Çünkü plateletler yara iyileşme sürecinde temel rol oynayan büyüme faktörleri

kompleksinin ana kaynağıdır. PRP-2/PCP; referans hattının üzerinde platelet içeren otolog kandan elde edilen plazma fraksiyonudur (39).

PRP-2 veya PCP, aynı zamanda otolog platelet jel (autologous platelet gel), platelet salıverici (platelet releasate), plazmadan zengin büyüme faktörleri (PRGFs) olarak da tanımlanabilmektedir (2,8,9,11).Sonuçta içerdiği büyüme faktörleri sayesinde büyüme faktörü agonisti gibi davranır (11).

2.2.3. PRP, PRP-2/PCP HAZIRLANIŞI

Şu ana kadar FDA'in onayladığı sayılı miktarda PRP ekstrakte etme ve toplama sistemi mevcuttur. SmartPreP (SmartPREP,Harvest Technologies Corp., Norwell, MA) ve Platelet Concentrating Collection Systems (3i/Implant Innovations, Palm BeachGardens, FL.), Sorin Angel, Arteriocyte Magellan (Medtronic,Minneapolis, MN), BioMet GPSII, Depuy Symphony (59). Bu farklı sistemler **2-8** kat arası artmış platelet konsantrasyonu elde etmemizi sağlamaktadır. Çoğu PRP sistemi ortopedik endikasyonlar için geliştirilse de, sadece **CytoMedixAutoloGel™ FDA** tarafından geliştirilen ürün yara iyileşmesi uygulamalarında onay almıştır. Tabii bunun haricinde pazarlanan birçok PRP elde etme ve toplama cihazı mevcuttur. **Dual veya tekli spin** (çevirme, santrifüjleme) sistemi içerebilirler.

Tekli spin(çevirme) sistemi plazma konsantre etmede daha az etkilidir. Bu aletlerde ekstrakte işlemi yapılırken alınan kan asit fosfat dekstroz gibi antikoagülanlı tüpler içine alınmalıdır ve işleme devam edilmelidir. Elde edilen konsantre sonuçta trombin ve kalsiyum klorid gibi platelet agonistleriyle karıştırılır. Sığır trombini kullanmak immünolojik reaksiyonlara ve faktör (büyüme faktörleri) eksikliğine yol açabilir (33). İşlemler sonunda otolog plazma jeli elde edilmiş olur. Cerrahide uygulanan sistem ise bu karışımın cerrahiden hemen önce, yara bölgesine konulması, hatta ayrı kaniküller ile yara bölgesine fişkırtılarak karıştırılmasıdır.

İdeal olarak PRP (PCP / PRP-2 uygulamalarının genel adı olarak çoğu kaynakta PRP ismi kullanılmaktadır)(13,19,20,12,5,3) uygulamalarında işlem öncesi kan alınır. Antikoagülanlı kan santrifüj edildiğinde **3 kısma ayrılır. Alt kısım saf eritrositlerden**

oluşur, orta kısım buffy coat dediğimiz kısım; platelet ve beyaz kan hücrelerinden oluşur ve en üst kısımda plazma bulunur.

Şekil 7'de antikoagülanlı kanın santrifüj işlemi sonrası klasik görünümü görülmektedir. Bu formlar PRP üretmede şimdiki metodolojinin temelini oluşturur. Çekilen kanın yaklaşık %10 kadarı PRP olarak elde edilir. Fakat bu oran santrifüj gücüne görede değişir. Önemli noktalardan bir tanesi de elde etme sürecinde santrifüjde düşük g gücü kullanılmasıdır (37).

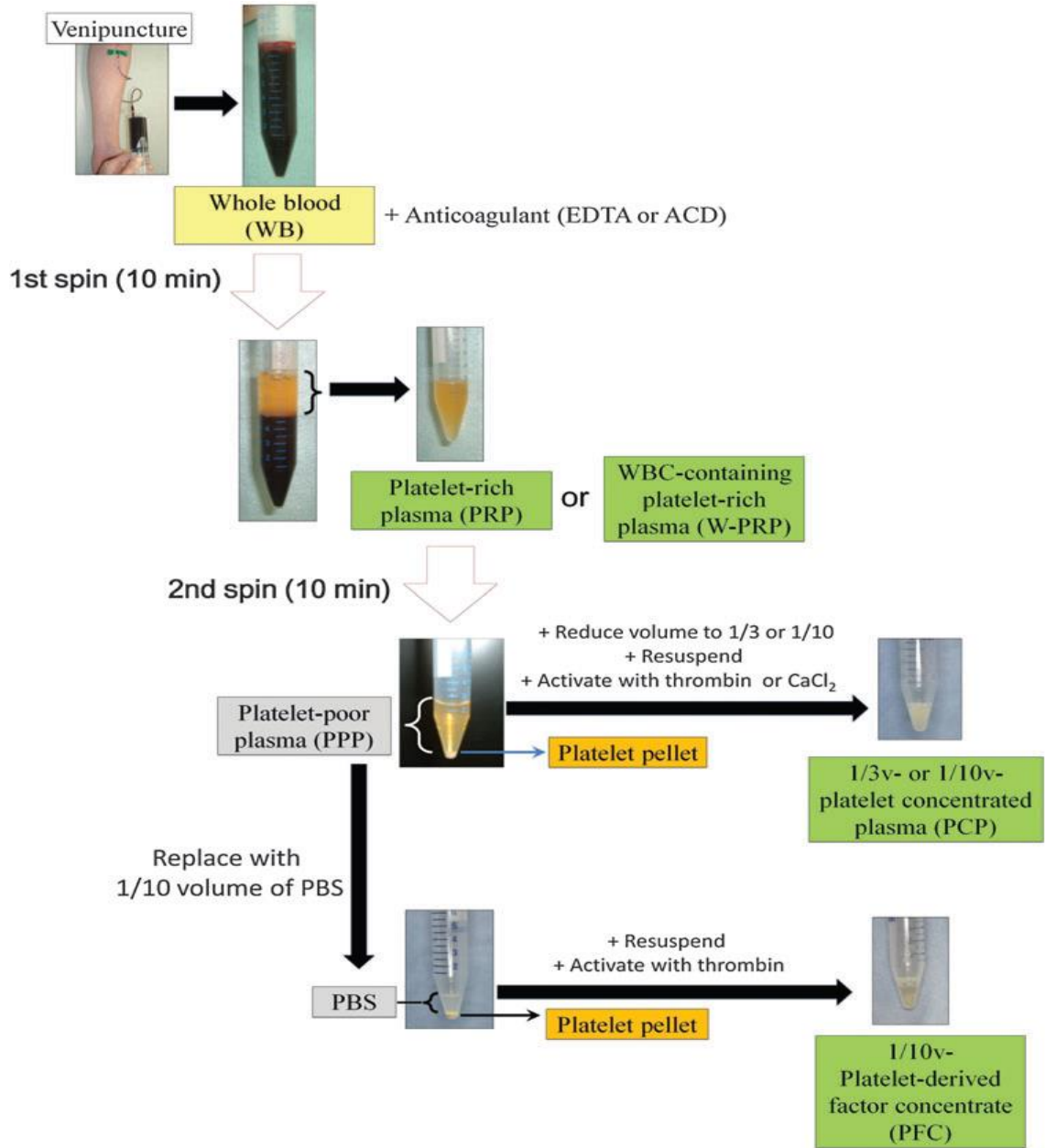
Standart laboratuvar santrifüjü kullanarak da PRP elde edilebilir. Fakat bu süreçte iki defa çevirme gerekir, birçok transfer işlemi gerekir ve sonuçta **sterilitenin korunması zor olabilir**. Dahası, bu gibi teknikler içeriğindeki platelet ve onun da içeriğindeki salgısal anahtar protein miktarları açısından güvenilir değildir. Fakat tek çevirmeninde dezavantajı konsantrasyon eksikliğine bağlı uygulama zorluğu ve sonuçların verimsiz olmasıdır. Sonuç olarak kompakt ofis sistemleri geliştirilmiştir. Bunlarla ortalama 45-60 mL kandan 6 mL PRP elde edilebilmektedir.

Birinci basamakta hastadan kan alınarak santrifüj işlemi yapılır ve bu sayede kırmızı kan hücreleri plazmadan ayrılır, ikinci santrifüj işleminde ise PRP, plateletten fakir plazmadan ayrılır ve pellet (PCP) oluşumu gözlenir(42) *Şekil 6*. Bu konsantre plazma daha sonra **trombin, kalsiyum, batroxobine** (43) ile karıştırılır ve jelatinöz bir platelet jel elde edilir *Şekil 6*. Çalışmalara alınan az miktardaki kanın kişinin hemoglobin, hematokrit ve platelet sayısını etkilemediğini göstermiştir (41). Normalde iyi bir PRP'de en **az 1 milyon platelet olması gerekir fakat konsantrasyon oranı da önemlidir** (8,44). Daha yüksek oranda plateletin elde edilmesinin düşünüldüğü gibi daha iyi sonuç vereceği yapılan bazı çalışmalarla destek bulmamıştır (9). Bilakis daha yüksek konsantrasyonların yara iyileşmesini **negatif yönde** etkilediğini gösteren apoptoza yol açtığını gösteren yayınlar da vardır (45). Bunun için uygulanacak bölgeye verilmeden önce PCP eğer çok yoğunsa bir miktar sulandırılıp verilmesinde fayda vardır.

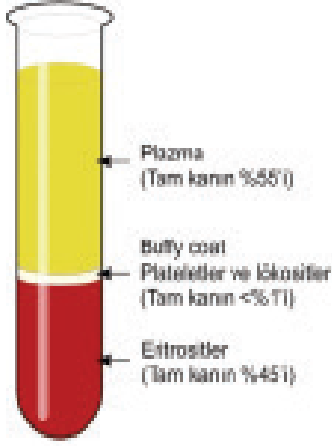
Ayrıca yüksek oranda TGF- β , EGF ve PDGF'nin yara iyileşmesini bozduğu ve skatris dokusunu artırdığı gösterilmiştir (10). Antikoagülanlı **durumda PRP nin ömrü 8 saat** kadardır (20). İşlem sırasında PRP aktive edildikten sonra **sekresyon 10-15 dakikada**

biter. **10. dakikada salınan faktörler yüksek konsantrasyonda bulunurlar.** İşlem yaparken bu özelliğe dikkat etmek gerekir. PRP içeriğindeki TGF α ve β ile neo-kollejenoz, EGF ve VEGF ile neo-vaskülarizasyon, PDGF ile ekstraselüler matriks formasyonu ile sonuçta doku rejenerasyonu ve gençleştirilmesi sağlanır. Fibrin jel (bio-glue) gibi davranarak cerrahi sırasında ve sonrasında homeostazı sağlar ve deri fleplerinde doku yapıştırıcısı görevi görür. Alerjik değildir ve muhtemel infeksiyonlar (HIV, Hepatit B ve C, CJD vb.) açısından güvenlidir. Otolog olduğu için rejeksiyon riski yoktur. Yara iyileşme sürecini içeriğindeki salgısal büyüme faktörleri sayesinde hızlandırır.

Aynı zamanda içeriğindeki az miktardaki lökosit, antikor, proteolitik enzimler sayesinde fizyolojik **antibiyotik** görevi görürler. Plazma içeriğinde ayrıca hormonlar, biyotransforme vitaminler ve diğer besinler bulunur. Dermal ve subdermal enjeksiyonlar şeklinde kullanım kolaylığı olan bir üründür. Plazma toplama işlemi ofis ortamında yapılabildiği için kullanımı son derece uygun bir yöntemdir.



Şekil 6. Çift santrifüj adımı, pellet kısmı ve sulandırılma işlemleri(13)



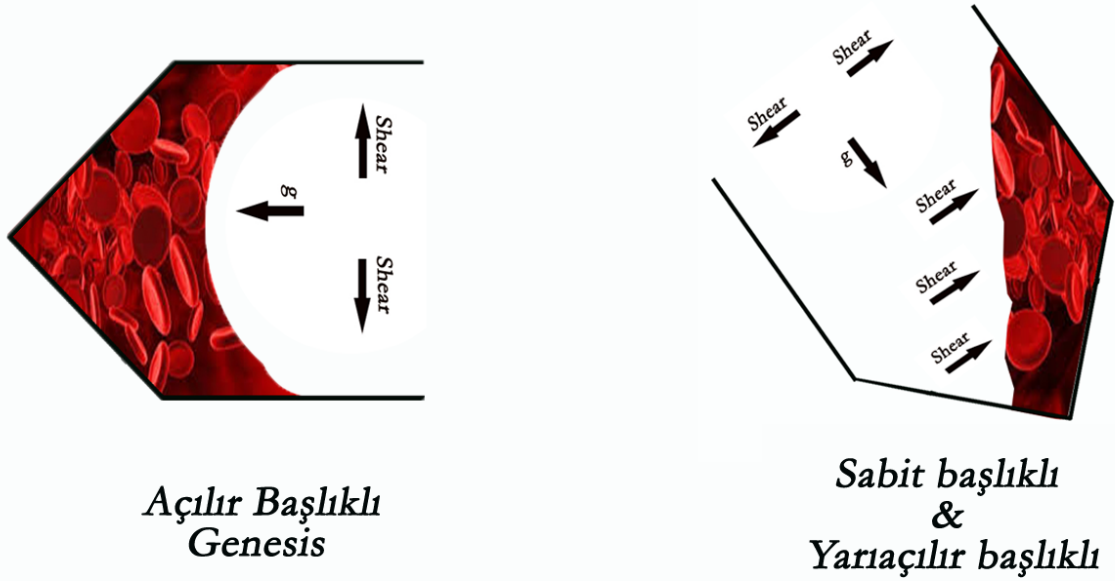
Şekil 7. Santrifüj sonrası tam kanın görünümü(13)

2.2.4. İYİ BİR PRP ELDE EDEBİLMEK İÇİN GEREKLİ OLANLAR

Düşük g gücü uygulayabilen (ivmelenme zamanı durma zamanından küçük olan), sabit olmayan ve dönme anında godeleri açılabilen (horizontal başlıklı; oynar başlık) bir santrifüje ihtiyacınız vardır Şekil 8.

Santrifüj içinde bulunan materyal merkezkaç kuvvetine maruz kaldığı için santrifüj, tüp içindeki sıvıyı büyük bir hızla döndürür ve daha ağır olan parçacıklar dışa doğru savrulur (tüpün dip kısmına doğru). Bu savrulma açısı ne kadar doğrusalsa (oynar başlıklı) otolog materyaldeki farklı ağırlıklardaki hücreler bir arada toplanacak ve kesme kuvvetine daha az maruz kalacaklardır (Şekil 8). Eğer savrulma açısı 0 değilse (sabit başlıklı) otolog materyal kesme kuvvetine maruz kalacağı için aynı ağırlıktaki hücrelerin bir araya toplanması güçleşeceği gibi kesme kuvvetine (çarpışmaya) maruz kalacakları için parçalanacaklardır.

*Açılır Başlıklı Santrifüjde Platelet Üzerine
Etki Eden Shearing Force Hasarı Daha Azdır*



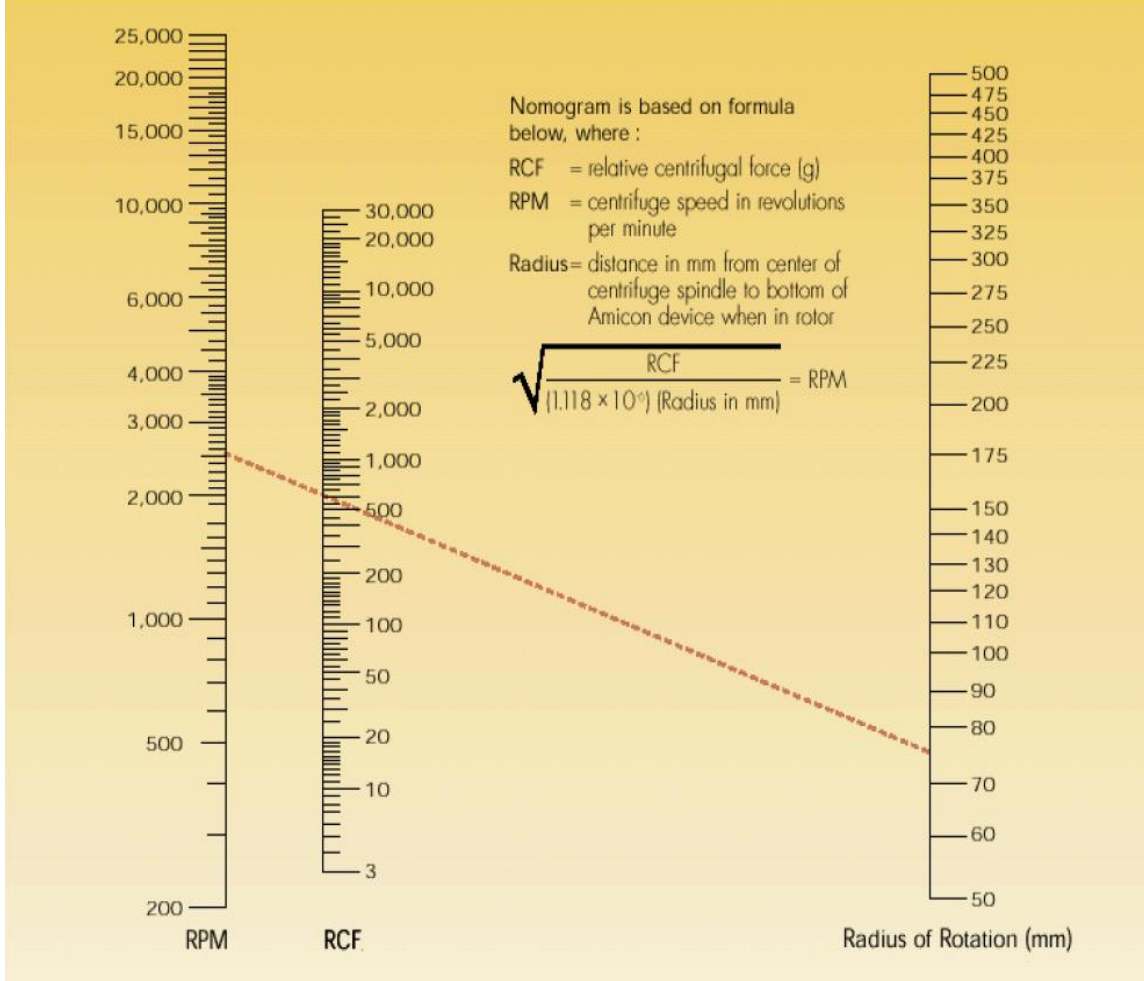
Şekil 8. Sabit başlıklı ve oynar başlıklı santrifüjlerde g kuvvetinin ve parçacıkların hareket yönü

Kaliteli PRP elde etmek için düşük g gücü uygulayabilen ve salınımlı tipte santrifüj kullanılmasının önemi çok büyüktür.

PRP uygulamasında beklenen **medikal başarı**, uygulama esnasında kullanılacak PRP'nin yüksek konsantrasyonda elde edilmesiyle (PCP) birlikte, en az hasar görmüş ve en üst düzeyde büyüme faktörü açığa çıkarabilecek trombositleri elde etmekteki başarıya bağlıdır. Trombositlerin zarar görmemesi; kanın alım şekline, otolog materyalin konduğu tüpün **içeriği ve şekline**, tüpe uygulanan **g gücüne**, tüpün santrifüjde **dönme süresine** ve dönme anında tüpün santrifüjde **durma açısına** bağlıdır.

Santrifüj; Otolog materyalden PRP elde edebilmek için hücre ayırma sisteminin en önemli parçalarından biridir. Santrifüj sırasında, trombositlerin membran stabilizasyonunun korunması ve işlem öncesinde **trombosit degranülasyonunun olmaması** için **düşük g gücü** kullanılması çok önemlidir (12,29,30). Her santrifüj **aynı devirde aynı g kuvvetine sahip değildir**; g kuvveti, santrifüjün dakikada devir/dönme

hızı (revolution per minute: rpm) ve rotor yarıçapına göre farklılık gösterir Şekil 9. Bu nedenle g kuvveti ayarlanabilen santrifüjler kullanılmalıdır. Aksi takdirde,



Şekil 9. Yarıçap, g kuvveti ve rpm değerlerinin birbirlerine oranları

RCF(g) = 1,118 x 10⁻⁵ x r x (rpm)² formülüne göre ;

-Hız, yarıçap veya g (RCF) hesaplamamız,

-Protokolünüzdeki g (RCF) için uygun hızı hesaplamamız, gibi karmaşık işlemleri yaparak santrifüjünüzü **doğru g kuvvetinde** kullanmanız gerekecektir. Kısacası her zaman g kuvvetinin kullanılması standardizasyon için çok önemlidir. Çünkü rpm değişkendir.

Ayrıca kullanılan tüpler ve içerikleride iyi bir PRP-2/PCP elde etmek için oldukça önemlidir.

Birinci nesil ilk tüpler olarak adlandırılan içerisinde sitrat ve **jel** bulunan in vitro laboratuvar kullanımı için üretilmiş olan tüpler PRP elde etmek için uzun yıllar ülkemizde de kullanılmıştır. Bu esnada dünyada 2.3.ve içerisinde hiçbir katkı maddesi olmayan özel şekillere sahip 4. nesil tüpler geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sodyum sitrat, EDTA, heparin, acid citrate dextrose (ACD) kullanılan antikoagulanlardır. Platelet bütünlüğünün korunması için özellikle ACD'nin kullanılmasını öneren çalışmalar mevcuttur (13).

2.2.5. PRP/PCP KULLANIMININ AVANTAJLARI

Avantajları arasında özellikle deri rejenerasyonunda kullanıldığı zaman diğer ürünlere oranla; yüksek düzeyde tolere edilebilmesi, deride üst düzeyde bir canlanma sağlayabilmesi, kullanılan ürün ve sağlanan etkinin uzun soluklu olması, tedavi süreci görece kolay ve güvenli olması, yeni ve doğal kollagen yapımını biyolojik olarak stimüle edebilmesi, iyileşme sürecini hızlandırması, otolog olması sebebiyle hiçbir yan etkisinin olmaması sayılabilir (3,6,7,22). PRP otolog bir kan ürünüdür, bu nedenle HIV, hepatit gibi hastalıklara karşı doğal bir bağışıklığa sahiptir (20). PRP'de yoğunlaşmış bulunan plateletler çok sayıda ancak biyolojik olarak belirlenmiş orandaki büyüme faktörünü hedef dokuya ulaştırır, bu özelliği ile rekombinant büyüme faktörlerinden farklıdır (20,12). PRP-PCP trombositlerden zengin bir solüsyondur, trombosit ve büyüme faktörü konsantrasyonu kandakinden 2 ila 10 bazen 20 kat daha yüksektir (13,4).

Bu arada PRP enjeksiyonu için kullanılan teknikler; uygulama yeri, uygulanan katmanlar, miktarlar yönünden hyalonurik asit ve napaj yoluyla uygulanan mezoterapi ürünleri ile aynı veya benzerdir. Napaj yönteminde temel hedef, orta derinizin içine gelecek şekilde PRP'nin mikroenjeksiyonlar vasıtasıyla verilmesidir. Diğer bir yöntem olan dermaroller de ise cildinizde açılan küçük çaplı kanallardan PRP'ler vücudunuza verilir ve bu sayede vücudunuz tarafından bu PRP'ler emilir. Uygulama sıklığı ile ilgili net protokoller olmamakla birlikte alopesilerde nokta (point by point) tekniği ile 2-4 haftada bir 3 veya 6 seans, cilt yenilemede napaj ve nokta tekniği kombinasyonu ile 2 haftada bir 3

seans, dermal dolgulamada lineer tünel tekniği ile 3 haftada bir 2-3 seans Şeklinde uygulanabilir (6,7,46).

PRP kontrendikasyonları platelet disfonksiyon sendromu bazı problemlere yol açabilir. Kritik trombositopeni, hipofibrinojenemi, hemodinamik dengesizlik, sepsis, antikoagülan tedavisi (dolgu uygulaması için), akut ve kronik infeksiyonlar, fasiyal kanseri veya kronik karaciğer patolojisi olanlarda kullanılmamalıdır. PRP Sonuçlarını deđiŐtiren faktrlerAyrıca hastanın yaŐı, cinsi, ırkı, deri kalitesi, eŐlik eden alta yatan hastalıklar (DM gibi), başlangıç yara bölgesi, yara derinliği,yara süresi, yara lokalizasyonu, PRP içeriğindeki platelet sayısı gibi durumlar PRP uygulama sonuçlarını deđiŐtirir (46,47,21).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışmadaki amacımız içerisinde en az oranda WBC ve RBC olan PRP-2 (PCP) elde etmektir.

PCP (Platelet concentrated plasma) : Genel anlamda içerisinde RBC lerin en az oranda, platelerin ise oldukça yüksek oranda olduğu plazma anlamına gelmektedir. Dikkat edilirse PCP içerisinde WBC (white blood cell) hücrelerinin varlığı hakkında bir sınırlama söz konusu değildir. Bu güne kadar yapılan birçok çalışmaya bakıldığında ise yine elde edilen PCP içerisinde WBC hücrelerinin varlığı oldukça yüksek oranlarda görülmektedir (13,4).

Bizim asıl amacımız ise içerisinde RBC lerin ve aynı zamanda WBC lerinde en düşük oranlarda olduğu PCP elde etmek. **Hedefimiz; PCP içerisinde:**

-WBC lerin $<1000/\mu\text{L}$.

-RBC lerin ise $<50.000/\mu\text{L}$.

-Platelet sayısı ise yaklaşık $1.000.000/\mu\text{L}$ civarında hedeflenmiştir.

Tabii ki burada platelet sayısından çok konsantrasyon oranı (plazma hacmine oranı) daha fazla önemsenmektedir (13). Esas çalışmaya geçmeden önce en uygun PCP' yi elde edebilmemiz için aşağıdaki konular üzerine birçok deneme çalışması yapılmıştır.

1. Uygun tüp hacminin, içeriğinin ve santrifüj işleminden sonra elde edilen plazma miktarının belirlenmesi,
2. Birinci santrifüj işleminde uygun g kuvveti ve santrifüj süresinin saptanması
3. Buffy coat hacminin ve sınırlarının, PRP hacminin ve sınırlarının belirlenmesi.

4. İkinci Santrifüj işleminde uygun g kuvveti ve santrifüj süresinin belirlenmesi
5. PCP ve PPP hacminin ve sınırlarının belirlenmesi.
6. PCP içerisindeki plateletlerin en sağlıklı şekilde sayımı.

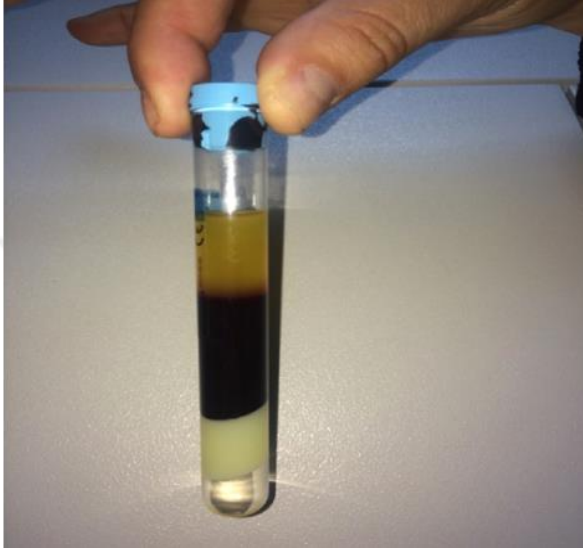
Çalışma süresince toplanacak kan örnekleri için; hastane polikliniğine başvuran hematoloji hastası olmayan özellikle tam kan sayımlarında WBC, RBC ve platelet sayıları açısından patolojik bir düşüklük görülmeyen 20-60 yaş arası erkek bireyler tercih edilmiştir.

1) Uygun içerikli ve hacimli tüpü belirlemek için yapılan çalışma: İlk önce 1.Santrifüj işlemi 300×g kuvvetinde 5 dakika, 2. Santrifüj işlemi ise 700×g kuvvetinde 17 dakika süre olarak belirlendi (48).Bu ikinci aşama PCP elde etme aşamasıdır. Daha sonra 5 adet BD sodyum sitratlı tüplere (8 mL, 16×125 mm jelli tüp) tam kan örnekleri toplandı. Toplanan tam kan örnekleri belirlenen g kuvveti ve sürede 1. Santrifüj işlemine tabi tutuldu. Fakat bu g kuvvetinde eritrositler ile jelin yer değiştirmedeği, jelin eritrositlerle plazmayı ayırma işlemini tam olarak gerçekleştiremediği dolayısıyla g kuvvetinin yetersiz geldiği tespit edildi (*şekil10*). Bu süreçte sağlıklı bir plazma elde edemediğimiz için 700×g kuvvetinde, 17 dakika süreyle yapmamız gereken (48) (PCP elde etme aşaması olan) ikinci santrifüj işlemine geçilemedi. Bu sebeple bu tüplerle çalışmaya devam etmeme kararı aldık.

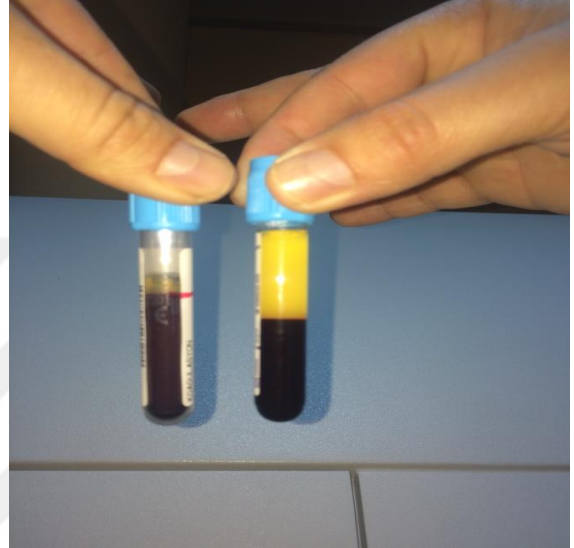
Daha sonra 5 adet 3mL hacimli, 0,3 mL sodyum sitrat içeren mavi kapaklı jelsiz tüplere tam kan örnekleri toplandı ve örneklere yine 300×g de 5 dakikalık santrifüj işlemi uygulandı. Fakat tüp hacminin yetersiz oluşu sebebiyle elde edilen PRP hacminin ikinci santrifüj işlemi ve sonrasındaki işlemler için yeterli miktarda olmadığı (yaklaşık 0,3mL-0,4mL) tespit edildi (*şekil11*). Çünkü yaptığımız 5 deneme çalışmasında ikinci santrifüj işlemi ve sonrasında sağlıklı ve yeterli bir şekilde PCP' nın ayrılabilmesi için 1.Santrifüj işleminden sonra en az 0,5mL-1mL hacminde PRP elde etmenin daha doğru olacağı saptandı.

Daha sonra 5 adet 5mL hacminde 0,5 mL sodyum sitrat içeren mavi kapaklı jelsiz tüplere tam kan örnekleri toplandı ve tekrar 300×g, 5 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulandı. Bu santrifüj işlemi sonrasında yeterli miktarda PRP'nin elde edilebildiği

görüldü (yaklaşık 0,5mL-1,5mL hacminde) (*şekil12*). Bunun üzerine çalışmamıza 5mL hacmindeki 0,5 mLsodyum sitrat içeren mavi kapaklı jelsiz tüplerle devam etmeye karar verdik.



Şekil 10.8 8 mL hacimli jelli tüpün 300×g'de çevrildikten sonraki görünümü (en altta jel, ortada RBC, üstte plazma)



Şekil 11. 3mL hacimli tüp (solda) ve 5mL hacimli tüp (sağda) 'lerin 300×g'de çevrildikten sonraki plazma hacimleri Soldaki tüpte belirlenen kırmızı çizginin üstündeki sarı bölge plazma hacmini göstermektedir; yaklaşık 0.5mL. Sağdaki tüpte sarı renkli bölge yine plazma hacmini göstermektedir (yaklaşık 1.5mL).

2) Her iki santrifüj aşamasında uygun g kuvvetini elde etmek için yapılan çalışma: Daha önce (300×g kuvvetinde 5 dakika süreyle) ; 5mL hacminde 0,5 mL sodyum sitrat içeren tüplerle **5 adet** kan örneğinde yapmış olduğumuz 1. deneme çalışmasında yeterli PRP (PRP-2/PCP'den önceki ilk santrifüj aşamasında elde edilen plateletten zengin plazma) hacmini elde etmeyi başarmıştık. Sonrasında yeniden 5 örnekten aynı yöntemle elde edilen plazma örnekleri göz kararıyla yukarıdan aşağıya 3 kısma ayrıldı (*şekil4-12*).**1.bölge: Üst, 2.bölge: Orta, 3.bölge: En alt kısım (buffy coat olduğu düşünülen kısım)**



Şekil 12. 5mL hacimli tüpün 300×g’ de santrifüj edildikten sonra plazmanın tahmini 3’e bölünmüş hali: 1. Kısım üst plazma, 2. Kısım orta plazma, son 3. Kısım; buffy coata dahil edilen kısım

1. ve 2. Kısım (üst ve orta bölge): PRP olarak belirlenen kısım. Bu bölgeyi 2 kısma ayırmamızın sebebi PRP içerisindeki plateletlerin nerede daha çok yoğunlaştığını saptamak. Yoğunluğun nerede olduğunu ise bu kısımlardan ayrı ayrı platelet sayımları yaparak bulabiliyoruz. Plateletlerin nerede yoğunlaştığını saptamamızın bize **şu faydası olduğu düşünülmektedir:** 1.Santrifüj işleminden sonra tüpün içerisinde PRP yi pipetleme esnasında buffy coat ile PRP yi birbirinden daha sağlıklı bir şekilde ayırabilmek için sınırlarımızı daha iyi belirlememizde bize yardımcı olması düşünülmektedir.

Buffy coat kısmı: Plazmanın RBC bölgesine yakın olan en alt kısmı olarak ele alınmaktadır (tam hacmini ve sınırlarını ilerki çalışmalarımızda belirlemiş bulunmaktayız). RBC plazma sınır çizgisinde dahil bir miktar RBC hacmide içerir. Bu yüzden içerisinde RBC lerde mevcuttur. Ayrıca yüksek oranda WBC, granüllü hücreler ve bir miktarda platelet içerir.

Ayrılan bu kısımlar mikropipet yardımıyla 3mL lik kuru tüplere aktarıldı ve laboratuvarımızdaki ‘‘Sysmex XN5000’’ tam kan sayım cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları yapıldı.

Pipetleme manuel yapıldığı için pipetleme esnasında aşırı ve hızlı vakumlama olmamasına özen gösterildi. Çünkü aksi taktirde belirlediğimiz kısımlar arasında kontaminasyon oranının artması söz konusu olacaktır.

Sonuç olarak Gördük ki 300×g kuvvetinde 5 dakika süreyle yaptığımız 1. santrifüj işleminden elde ettiğimiz PRP örneği üzerinde belirlenen 1. ve 2. Kısımlardan (plazmanın yaklaşık üst 2/3 lük kısmı; üst ve orta bölge) ayrı ayrı Sysmex XN5000 cihazın d aplatelet, WBC ve RBC sayımları yapıldı. 1. Kısımda 2. Kısma oranla daha düşük oranda platelet sayısı tespit edildi. Bu durumdan anlaşıldı ki plateletler bu g kuvvetinde daha çok aşağıya doğru hareket etme eğilimindeydi (buffy coat içine doğru). Bu belirlenen kısımlarda (PRP içerisinde) istenen sayıda ve yoğunlukta plateletin olmadığı tespit edildi. Plateletlerin daha aşağıya doğru hareket ederek boffycoat’ ın ve eritrositlerin olduğu kısma doğru geçtiği yapılan sayımlarda saptanmış oldu.

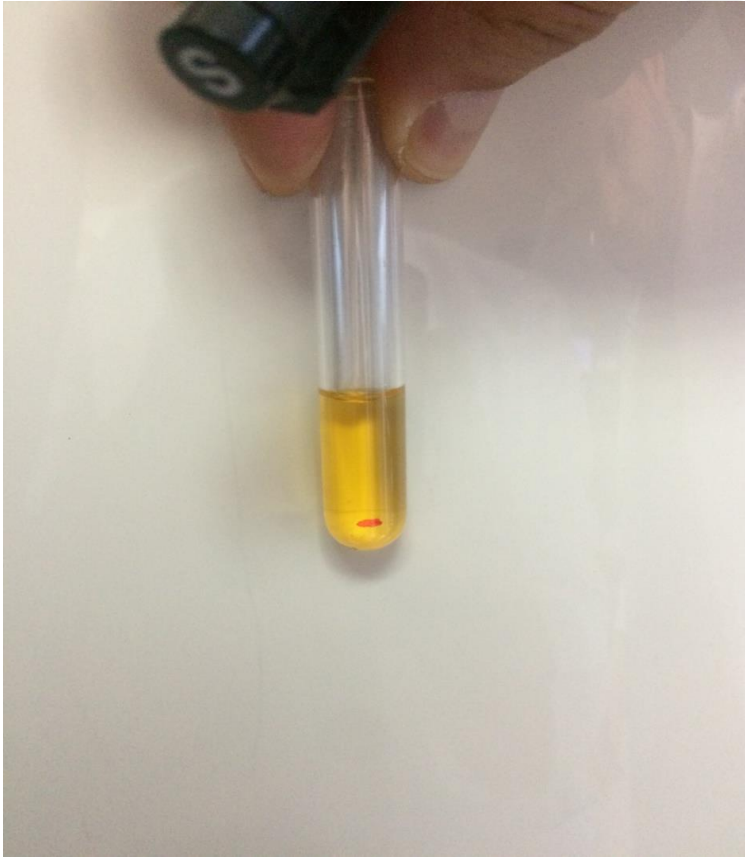
Tüpün en üstünden aşağıya doğru gittikçe plateletlerin yoğunluğunun arttığı ve en son buffy coat kısmında çok yüksek oranda plateletlerin olduğu buffy coat ve RBC kısımlarında ayrı ayrı platelet sayımları yapılarak tespit edildi. Elde edilen platelet sayıları yaklaşık olarak 230000/ μ L-400000/ μ L arasında bulundu.

Buffy coat kısmında ise yüksek oranda WBC varlığı mevcut olması sebebiyle bu kısmı PRP olarak kullanmamız; 2.Santrifüj aşaması olan PCP işlemi sırasında doğru sonuç almamamıza sebep olacaktır. Bu istenilen bir durum değil çünkü 1. santrifüj işleminde içerisinde WBC nin en az oranda olduğu; özellikle WBC <1000/ μ L olmalı, plateletlerin ise en yüksek oranda olduğu PRP yi elde etmeyi amaçlıyoruz. Bunun sebebi ise ikinci santrifüj işlemi sonrası WBC nin en az oranda olduğu plateletlerin ise en yüksek oranda ve yoğunlukta olduğu en sağlıklı PCP yı elde etmek.

Sonuç olarak bizim amacımız mümkün olduğunca fazla sayıda plateletleri üst kısımda plazmanın yaklaşık 2/3 lik kısmında (PRP içerisinde) hapsetmek. WBCleri ise buff ycoat kısmında daha aşağılarda toplamak. Bu en son elde edilen plazma örneğinde

(PRP) henüz bizim istediğimiz PRP yi elde etmiş değiliz. Bunuda aşağıda bahsedilen ikinci adımda yaptığımız PCP işleminde de zaten açıkça görmüş olduk.

İkinci adımda ise 300g de 5 dakika süreyle elde ettiğimiz PRP örneğini mikropipet yardımıyla 3mL hacmindeki kuru tüplere aktararak 400×g de 10 dakika süreyle konsantre işlemine tabi tuttuk. Tüpün alt kısmında elde ettiğimiz PCP örneğinden Sysmex XN5000 cihazında yaptığımız sayımlarda içerisinde istemediğimiz oranlarda WBC varlığı tespit ettik (2.000/μL-3.000/μL) **Şekil 5-4-13**. Platelet değerlerinin ise beklediğimiz oranlarda olmadığı görüldü (200.000/μL-350.000/μL).



Şekil 13. 400×g'de 10 dakika çevrildikten sonra plazmanın en alt yaklaşık 300μL hacimli son kısmı(kırmızı çizginin alt kısmı),PCP olarak alınan kısım, Üst plazma ise PPP kısmıdır.

1. santrifüj işleminde kullandığımız 300×g kuvvetinde 5 dakikalık santrifüj işleminin 2. Santrifüj işleminin sonrası sağlıklı bir PCP elde etmek için doğru bir işlem olmadığı tespit edilmiş oldu.

Bunun üzerine daha sonra yeniden her seferinde 3' er tam kan örneği olmak üzere farklı g kuvvetleri ve çevirme sürelerinde 30 tam kan örneği çalışıldı.

Bunlar; 100×g 10 dk(dakika),150g 10dk, 200×g 10dk,230×g 10dk, 280×g 10 dk, 300×g 3 dk, 300×g 10 dk, 500×g 5 dk, 800×g 5dk,1000×g 5 dk olarak belirlendi. Her çevirme işleminden sonra elde edilen plazma örneği tüp üzerinde göz kararıyla yukarıdan aşağıya tekrar önceki gibi 3 kısma ayrıldı (*Şekil3-12*) .Bu kısımlar yine ayrı ayrı pipetlenerek 3mL hacimli kuru tüplere aktarıldı. Daha sonra bu kısımlardan Sysmex XN5000 cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları yapıldı. Sırasıyla 1. ve 2. Kısımlarda yapılan sayımlarda düşük g kuvvetlerinde plateletlerin 1. Kısımda ikinci kısma oranla daha fazla toplandığı tespit edildi fakat aralarında çok fark olmadığı için 1. Ve 2. Kısım birlikte yine PRP olarak ele alındı.

Ayrıca görüldü ki g kuvveti ve süre arttıkça plateletler daha aşağıya buffy coat'ın içine doğru hareket etmekte olduğu, g kuvveti azaltılıp çevirme süresi kısaldıkça ise plateletler daha yukarılarda plazmanın üst kısımlarında toplanmakta olduğu belirlendi. Bu durumda ise WBC' lerin plateletlerden ayırımı mümkün olmamaktadır Çünkü çok düşük g kuvvetlerinde WBC 'lerde plateletlerle birlikte plazmanın üst kısımlarında asılı kalmaktadırlar. Zaten yapılan sayımlarda 100×g kuvveti ve altı 10 dakika süreyle santrifüj işlemlerinde PRP içerisinde 1500/μL-2200/μL civarında WBC varlığı saptanmış oldu.

Fakat 230×g kuvvetinde 10 dakika süresince (1-13) yapmış olduğumuz santrifüj işleminin sonrasında elde ettiğimiz sonuçlarda plazmanın üst 2/3 lük kısmında (1. Ve 2. Kısım) (*Şekil14*) **PRP nin içerisinde:**

-En fazla sayıda platelet; 230.000/μL-534.000/μL

-En az oranda WBC; 100/μL-300/μL.

-RBC varlığı ise;10.000/μL-50.000/μL arasında saptandı.

Buffy coat kısmından yapılan ölçümlerde ise:

-WBC 30.000/ μ L– 42.000/ μ L arasında

-Plateletler ise 50.000/ μ L-150.000/ μ L arasında ölçüldü.

Burada görülüyor ki buffy coat kısmına bir miktar platelet kaçağımız olmaktadır; fakat WBC nin en az oranda olduğu bir PCP elde etmek için bu durum kaçınılmaz olacaktır. **RBC lerin olduğu en alt kısımda ise:**

-Plateletler çok daha az oranda tespit edildi; 2.000/ μ L -4.800/ μ L arasında.

-WBC ler ise buffy coat'tan daha az olarak yaklaşık; 2.000/ μ L-3.600/ μ L arasında tespit edildi.

Yapılan bu sayımların tümü bize gösterdi ki 230×g kuvveti ve 10 dakikalık santrifüj işlemi; plateletlerin buffy coat ve RBC lerin olduğu kısma kaçmasını büyük oranda engellemişken, WBC lerin ise daha aşağıda bofycot kısmında ve RBC lerin olduğu kısımda toplanmasını bize sağlamış oldu. Böylece birinci santrifüj işleminde plateletlerden WBC ve eritrositleri büyük oranda ayırarak istenilen PRP yi elde etmeyi başarmış olduk. Çalışmaya birinci santrifüj işlemine 230×g kuvvetinde ve 10dk süreyle devam etmeye karar verdik.

3) Buffy coat ve PRP sınırlarının hacminin tam olarak belirlenmesi:

Bundan önceki çalışmalarımızda görüldüğü gibi henüz buffy coat sınırlarımız henüz tam olarak belirlenmiş durumda değil. RBC ve plazma birleşim sınırındaki ince çizgiden itibaren ne kadar bir hacimdeki plazmayı buffy coat olarak tüpte bırakıp ne kadarını PRP olarak pipetlememiz gerektiğini tam olarak bilmeliyiz ki PRP ve buffy coat hacimlerimiz en doğru şekilde belli olsun. Çünkü PRP içerisinde en az WBC varlığını ancak bu şekilde sağlayabiliriz. Bütün bunları tespit etmek ve standardize etmek için 230×g kuvvetinde 10 dakika süreyle olmak üzere bir dizi deneme çalışması daha yaptık.

Bunun üzerine 5mL hacminde sodyum sitrat içeren tüplere 10 adet tam kan örneği daha toplanarak 230×g kuvvetinde 10 dakika süreyle olmak üzere 1. Santrifüj işlemine tabi tutuldu. İlk önce elde edilen örnek tüp üzerinde yukarıdan aşağıya göz kararıyla 4 bölgeye ayrıldı (şekil 6-14).



Şekil 14. 230×g 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra plazmanın 4 bölüme ayrılmış hali. Üstten ; 1 : Üst PRP, 2: Orta PRP, 3 : Buffy coat'a dahil edilen kısım, 4 : RBC' lerin olduğu kısım.

1.bölge: PRPnin en üst kısmı, **2. bölge:** PRP nin orta kısmı. Bu ilk iki kısım göz kararıyla *esit* olarak belirlendi, **3.bölge buffy coat kısmı:** Bu kısım ise şöyle belirlendi; her santrifüj işleminden sonra RBC ler ile PRP arasındaki gözle görünen ince çizgiden (sınırdan) başlayarak tüpün üst kısmına doğru sırayla 1mm 2mm, 3mm, 4mm 5mm'lik mesafeler ölçüldü (*şekil 7-15*) ve bu ölçülen kısımlardaki hacimler buffy coat olarak ele alındı. Bu belirlenen buffy coat kısmını pipetleme işlemi yapılırken RBC ile plazmanın birleşme sınırındaki ince çizgide dahil olmak üzere bir mikar RBC de pipetlenerek buffy coat' ın hacmine dahil edildi (*Şekil8-16*) . Bu belirlemiş olduğumuz mesafeleri ayarlarken amacımız WBC' lerin ne kadar yukarılara kadar plazmanın içerisinde bulunduğunu tespit etmek. **Çünkü PRP'yi tüpün içerisinden pipetlerken bu buffy coat kısmını almamaya**

özen göstererek PRP nin içerisinde WBC varlığını birinci santrifüj işleminden sonra en aza indirmeyi amaçlıyoruz.

Bu şartlar altında her ölçüm için iki örnek denenerek 10 örnek çalışıldı. Her seferinde ölçülen kısım kadar hacim (önce 1mm lik kısım için yapıldı) buffy coat olarak tüpte bırakılıp kalan üst kısım (1.ve 2. Kısım) ayrı ayrı PRP olarak mikropipet yardımıyla pipetlenerek 3mL lik kuru tüplere aktarıldı (*Şekil9-16*). Alınan bu hacimlerden Sysmex XN5000 cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında 1mm lik kısım tüpte buffy coat olarak bırakılıp kalan üst plazma PRP olarak pipetlendiği zaman PRP' örneğinin içerisinde yüksek oranda WBC (2400/ μ L-4100/ μ L) varlığı tespit edildi.

Ayrıca öncede yapıldığı gibi 1. Ve 2. Kısımlarda (üst, orta) yine ayrı ayrı platelet sayımları gerçekleştirildi. 230×g 10 dakika süreyle santrifüj işleminde 1. Ve 2. Kısımlar arasında platelet sayıları açısından çok fark olmamasına rağmen çoğunlukla 2. Kısımda biraz daha fazla platelet sayısı tespit edildi.

Sonrasında Sırasıyla yine 2mm, 3mm, 4mm lik hacimler tüpte bırakılıp pipetlenerek edilen PRP örneklerinden yapılan sayımlarda PRP içerisinde hâlâ bir miktar WBC varlığının olduğu fakat gittikçe azaldığı tespit edildi. En son 5mm lik kısım tüpte bırakılıp kalan üst kısmı PRP olarak aldığımız zaman yaptığımız ölçümlerde PRP içerisinde WBC varlığının 100/ μ L-360/ μ L aralığındaki değerlere kadar düştüğü görüldü. Bu şekilde 5mm lik hacimdeki kısmı buffy coat olarak tüpte bırakıp kalan kısmı PRP olarak pipetlemek suretiyle üst üste 5 örnek daha çalışıldı. Her seferinde yapılan sayımlarda PRP içerisinde yine WBC varlığının en az oldu tespit edildi (100/ μ L-320/ μ L) ve kanıtlanmış oldu.

Böylece buffy coat (içerisinde WBC ve diğer granüllü hücrelerin olduğu) 'ın RBC çizgisinden başlayarak tüp üzerinde yukarı doğru 5mm mesafedeki plazma hacmi olarak standardize edilmesine ve PRP pipetlemesinde bu kısmın buffy coat olarak tüpte bırakılmasına karar verildi (*Şekil.7-15*).

Buffy coat olarak belirlenen kısımlarda mikro pipet yardımıyla kuru tüplere aktarılarak her seferinde ayrı ayrı (Sysmex XN5000) cihazında WBC, RBC ve platelet sayımına tabi tutuldu. **İçerisinde beklenildiği gibi:**

-Yüksek oranda WBC; 5.500/ μ L-12.000/ μ L aralığında

-Plateletler ise 150.000/ μ L-250.000/ μ L oranlarında tespit edildi.

Görüldüğü gibi yine buffy coat içerisine bir miktar platelet kaybı bulunmaktadır ama WBC nin en az olduğu bir PCP elde edebilmek için bu durum daha önce belirtildiği gibi kaçınılmaz olmaktadır.

Buffy coat içerisinden aynı zamanda 2.000.000/ μ L-2.200.000/ μ L oranlarında eritrosit sayımı gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi ise Buffy coat kısmı pipetlenirken RBC ile plazma arasındaki ince çizgide dahil olmak üzere bir miktar RBC kısmındanda pipetleme yapılmasıdır **Şekil.8-16**

4.bölge ise RBC lerin olduğu tüpün en alt kısmı **Şekil 6-14**. Bu kısımda 3mL lik kuru tüplere aktarılarak laboratuvarımızdaki tam kan sayım cihazında (Sysmex XN5000) ayrı ayrı WBC, RBC ve platelet sayımları yapıldı. Bu bölgede yine beklenildiği gibi:

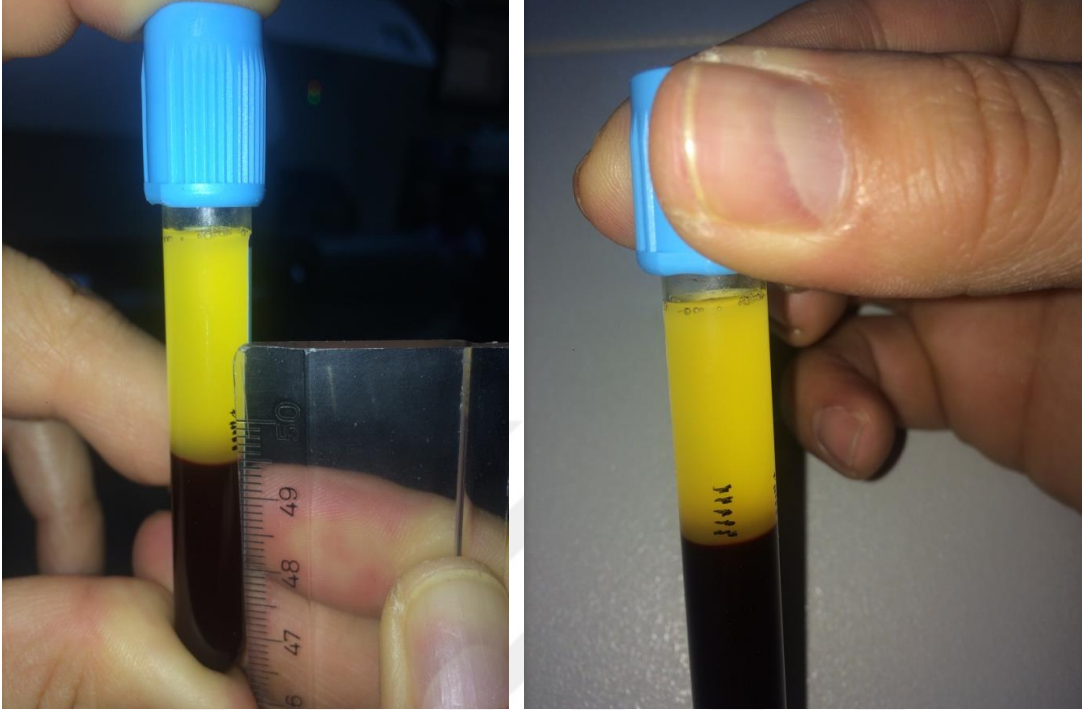
Yüksek oranlarda RBC; 4.000.000/ μ L-9.000.000/ μ L

Bir miktar WBC; 2.000/ μ L,3.000/ μ L

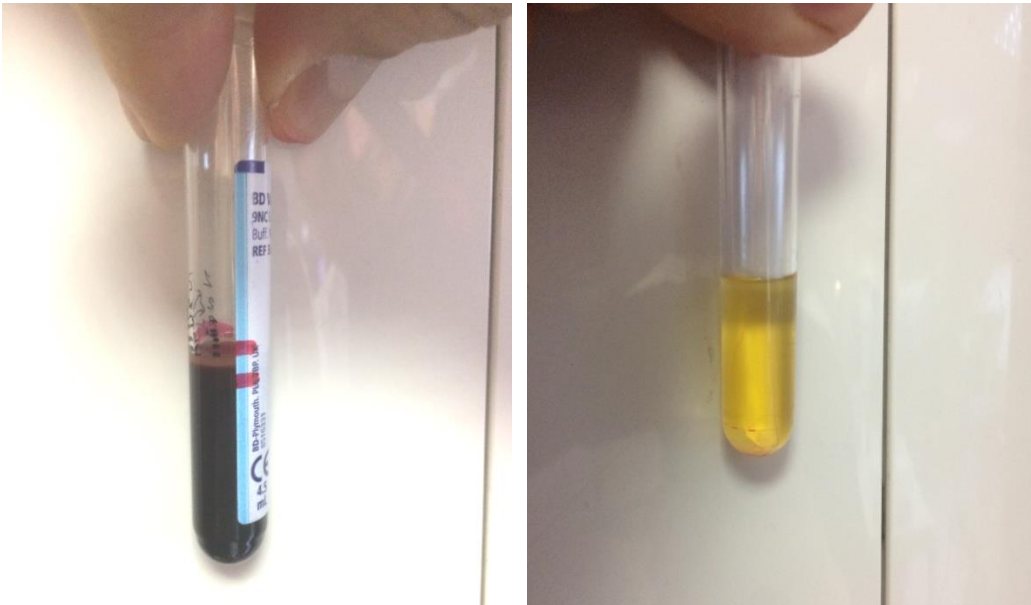
Plateletler ise; 47.000/ μ L -56.000/ μ L oranlarında tespit edildi.

Buradaki platelet kaybı ilk bakışta çok görünebilir fakat WBC lerin olmadığı PCP elde edebilmemiz için bir miktar kaybın olması yine kaçınılmaz olacaktır.

Sonuç olarak 5mm mesafe ölçülerek belirlenen buffy coat (WBC ve diğer granüllü hücrelerin olduğu) tüpte bırakarak pipetlenen 1. ve 2. Kısımın tamamı bizim PRP miz olarak belirlenmiş oldu. PRP' nin içerisinde çok düşük oranlarda WBC, RBC ve yüksek oranlarda platelet mevcut.



Şekil 15. 230×g 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra buffy coat sınırlarını belirlemek amacıyla tüp üzerinde plazmanın 1'er mm lik porsiyonlara ayrılmış hali. Sağ taraftaki şekilde siyah çizgilerin her birinin arası 1mm' yi ifade etmektedir.



Şekil 16. Soldaki şekil buffy coat ile birlikte RBC kısmından da bir miktar hacim alındığını gösterir (kırmızı çizgiler arası pipetlenmiştir). Sağdaki resim ise çalışmada kullandığımız kuru tüpü ve içerdiği plazmayı göstermektedir.

4) 2. Santrifüj işleminde g kuvvetinin belirlenmesi: İlk önce 5 tam kan örneği 230×g de 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra içerisinde yüksek oranda platelet düşük oranda WBC ve RBC içeren PRP mikropipet yardımıyla 3mL hacimli kuru tüplere aktarıldı. Önce 400×g de 10 dakika (13) süreyle **2.santrifüj işlemine tabi tutuldu**. Daha sonra elde edilen PCP örneği göz kararıyla eşit olarak 3 kısma ayrıldı (üst, orta, en alt) (**Şekil10-17**). Bu kısımlar ayrı ayrı 3 adet kuru tüpe aktarılarak bu örneklerden Sysmex XN5000 cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları ayrı ayrı yapıldı. Üst ve orta kısımlarda 5 örnekte yaptığımız platelet ölçümlerinde bir birine yakın değerlerde olacak şekilde 90.000/μL-200.000/μL arasında platelet değerleri sayıldı . Tüpün en alt kısmından ise (yaklaşık 300 μL hacmindeki kısım (**Şekil 11-17**) 200.000/μL-440.000/μL arasında platelet sayımları yapıldı.

Sonuç olarak tüpün üst kısımlarında (üst, orta kısmında) hala plateletlerin mevcut olduğunu yani bizim istediğimiz şekilde tüpün en alt kısmında **pellet** oluşmasını (konsantre etme işlemi) bu g kuvvetinde hala tam sağlayamadığımızı tespit etmiş olduk.

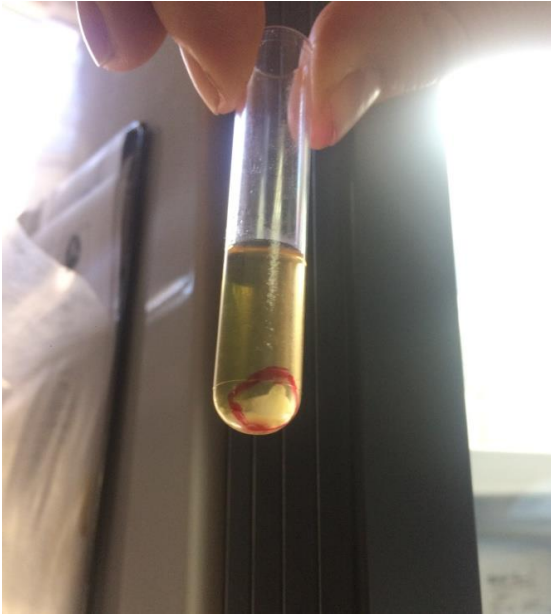
Bunun üzerine tekrar 14 tam kan örneğinden elde edilen (230 ×g de 10 dakika süreyle) PRP örnekleri, 500×g, 800×g, 1000×g, 1500×g, 2000×g, 2500×g, 3000×g kuvvetlerinde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Her g kuvveti için 2 örnek çalışıldı. Her bir örnekten iki kısım elde edildi.

1. **Kısım:** PPP kısmı; PCP haricindeki plateletten fakir olan üst plazmanın tamamı. Önceden yapıldığı gibi **bu kısımda kendi arasında iki kısma ayrıldı, üst ve orta olacak şekilde (Şekil4-13) ve bu kısımlardan ayrı ayrı platelet sayımları yapıldı**
2. **Kısım:** PCP kısmı; yaklaşık 300μL hacmindeki içerisinde pellet bulunan kısım. Pellet oluşumu gözle görülebiliyor durumda. **Şekil12-18**. Bu 300μL lik hacim ise tahmini belirlenmiştir.

Bu kısımlar mikropipet yardımıyla 3mm lık kuru tüplere ayrı ayrı aktarılarak içerlerinden Sysmex XN5000 cihazında pelatelet sayımları yapıldı.



Şekil 17. Soldaki resim plazmanın konsantre edildikten sonraki 3 bölgeye ayrılmış halini gösterir, sağdaki resim ise tüpün dip kısmındaki yaklaşık 300 μ L hacmindeki PCP kısmını göstermektedir (kırmızı çizginin altında hacim yaklaşık 300 μ L).



Şekil 18. Santrifüj işleminden sonra (plazmanın konsantre aşaması oluşan pellet kısmı görülmekte (kırmızı yuvarlağın iç kısmı platelet pelletleri içerir))

PPP'nin ilk iki kısmında yapılan sayımlarda sonuçlar şöyle alındı: Üst kısımlarında (1. Kısım) değişen oranlarda (1.500/ μ L -150.000/ μ L) platelet sayımları elde edildi. Orta kısımlarda ise (2. Kısım) bu oranda önemli bir değişiklik gözlenmedi. Bu küçük farklarında kanın vizkositesinden kaynaklanan ve hücrelere göstermiş olduğu dirençten olduğu düşünülmektedir. Buradaki platelet değerleri 400×g kuvvetinde en fazla olmak üzere (yaklaşık olarak 90.000/ μ L-1.700.000/ μ L arasındaki değerler) 500×g, 800×g, 1000×g, 1500×g,2000×g, 2500×g, 3000×g kuvvetlerinde bu değerlerin gittikçe azaldığı, 1500/ μ L değerine kadar düştüğü ve platelet açısından daha saf PPP elde ettiğimizi tespit ettik. Özellikle 2000g kuvvetinde en sağlıklı değerleri elde ettiğimizi gördük. Sonuç olarak g kuvvetini arttırdıkça üst plazma kısmında(PPP) (*Şekil 4-13*) platelet sayılarını çok düşük oranlara indirmeyi başarmış olduk.

Tüpün dip kısmında (*Şekil5-14*) (yaklaşık 300 μ L lik hacimli kısım) yapılan sayımlarda çok daha yüksek oranda plateletlerin (300.000/ μ L-500.000/ μ L) bu alanda toplamayı başarmış olduğumuzu gördük. Sonuç olarak g kuvveti arttıkça tüpün dip kısmında pellet oluşumunun oldukça arttığı belirlendi. Ancak g kuvvetinin belirli bir noktadan sonra (2500×g ve üstü) (4) plateletlerin *parçalanmasına* sebep olmaktadır. Bu sebeple platelet sayımı mümkün olmayacağından çok yüksek g kuvvetlerini 2.santrifüj işleminde kullanmamaya karar verdik(2-4).

Ayrıca yüksek g kuvvetlerinde elde edilen pellet kısmı çok yoğun bir hal almaktadır. Bu sebeple ölçüm yapan cihazın (Sysmex XN5000) pellet içerisinden platelet sayımını aşırı kümeleşme sebebiyle doğru bir şekilde yapamadığını saptadık. Çünkü Sysmex XN5000 cihazı tek tek hücre boyutu ve granül içeriğini saptama prensibine göre hücre sayımı yapmaktadır. Bu yüzden fazla kümeleşmiş durumdaki plateletleri doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edip sayamamaktadır. Yapılan bu deneme çalışmasında 2000×g kuvvetinde 10 dakika süreyle santrifüj edilen örneklerde yaptığımız ölçümlerde en yüksek oranlarda platelet içeren PCP elde ettiğimizi saptadık (320.000/ μ L-540.000/ μ L) . Bunun üzerine 2000×g kuvvetinde 5 örnek üzerinde yeni bir deneme çalışması daha yaparak sonuçları karşılaştırdık ve burada gördük ki 2000×g kuvveti bize en sağlıklı PCP elde etmemizi sağlamaktadır.

Böylece ikinci santrifüj işleminde kümeleşmenin çok aşırı yoğun olmadığı ve platelet parçalanmasının en az olduğu 2000×g de 10 dakika süreyle örneklerimizi santrifüj etmeye karar verdik.

PCP sınırlarının ve hacminin belirlenmesi: Şimdiye kadar ki yaptığımız çalışmalarda hâlâ İkinci çevirmeden sonra tüpün dip kısmında ne kadarlık bir hacimde platelet pellet oluştuğu, ne kadarlık bir hacimdeki PCP' yı mikropipet yardımıyla çekip almamız gerektiği konusunda tam bir standartizasyon söz konusu değildi. Bu konuları standardize etmek için bir takım deneme çalışmaları daha yaptık.

Öncelikle 10 tam kan örneğinden elde edilen PRP 2000×g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra sırayla 500µL, 400µL, 300µL, 200µL, 100µL hacmindeki kısımlar tüpün dip kısmında kalacak şekilde üst PPP kısmı mikro pipet yardımıyla 3mL lik kuru tüplere aktarıldı (*Şekil9-18*). Tüpün dibinde kalan PCP hacimlerinden Sysmex XN5000 cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları yapıldı. Sonuçlar karşılaştırıldığında görüldü ki en son tüpün dip kısmında bulunan 100µL hacmindeki kısımda en yoğun oranda platelet pellet oluştuğu tespit edildi (*şekil13-19*).

-PLT'ler ; (250.000/µL-470.000/µL).

-**WBC**; değerleri ise (100/µL-400/µL) arasında ölçüldü.

-RBC ler ise; 10.000/µL ile 40.000/µL civarında ölçüldü. Yok denecek kadar az.

Bu pellet kısmı gözle de görülebiliyor durumda. **Ayrıca Her bir hacim için iki örnek çalışılmıştır.**



Şekil 19. Santrifüj işleminden sonra (plazmanın son konsantre aşaması) tüpün dibinde plateletlerin en yoğun olduğu 100 μ L hacmindeki kısım. Kırmızı çizginin üstü PPP kısmını ifade etmektedir.

Her bir örneğin PPP kısımlarında ayrıca platelet, WBC ve RBC sayımları yapıldı. Her örnek için alınan platelet değerleri ise öncedende belirtildiği gibi düşük değerler olarak saptandı:

-PLT ; 2.000/ μ L -5.000/ μ L.

-WBC değerleride yine çok düşük olarak bulundu; 10/ μ L -40/ μ L.

-RBC ler ise yok denecek kadar az olarak ölçüldü; 0/ μ L ile 1.000/ μ L arasında.

Ancak 100 μ L hacmindeki son kısımdan yapılan sayımlarda görüldüğü gibi beklenenin altında platelet sonuçları elde edilmiştir (beklenen 1.000.000/ μ L ve üzeri). Bunun daha öncede belirtildiği gibi santrifüj esnasında plateletlerin hala bir miktar kümeleşmesi (pellet) sebebiyle cihazın yanlış düşük sayım yapmasından kaynaklandığına karar verildi. Çünkü (Sysmex XN5000) cihazı hücre boyutu, hücre şekli ve granül içeriği prensibine göre (empedans) tek tek sayım yaptığı için cihazın kümeleşmiş olan plateletlerin ayrımını sağlıklı ve doğru bir şekilde yapamadığı bu sebeple yanlış düşük

sonuçlar elde edildiği kararına varıldı. Ayrıca cihaz manuel modda iken 150µL rnek hacmiyle çalıştığı için bazen örnek yetersizliğide yaşanmaktadır. Bu yüzden oluşan bu pellet kısmının üzülmesini sağlayarak ölçüm yapılmasının daha doğru sonuçlar vereceği dşnld.

5) PCP içerisindeki plateletlerin en sağlıklı şekilde sayımı: Daha öncede belirtidiği gibi plateletlerin sağlıklı bir şekilde sayılabilmesi için pellet kısmını üzülmesi işlemine karar verildi. Bunun için iki üzücü üzerine deneme çalışması yapıldı. Çalışma için yeniden 5 tam kandan elde dilen PRP rneği 2000×g de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ortaya çıkan pellet kısmı manuel olarak hazırladığımız PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon solüsyonu yardımıyla 1/10 oranında sulandırma işlemine tabi tutuldu.

PBS Tampon hazırlanması: Na₂ HPO₄.H₂O = 3.65gr, KH₂PO₄= 0.13gr, NaCl = 2.17gr alınarak 250ml distile su eklendi.

Daha sonra 2 dakika süreyle mikro pipet yardımıyla mekanik zlme işlemi uygulandı. **Mekanik znme:** Mikropipetin vakum etkisiyle rneği çekip bırakma şeklinde uygulanmaktadır. Elde ettiğimiz örneklerden Sysmex XN5000 cihazında tekrar platelet sayımları gerçekleştirildi. ıkan sonuçlar 10 ile çarpıldı ve 5.00.000/µL – 3.000.000/µL arası ölçümler elde edildi. Sonuçlar diğer znmeden sayılan 10 örnek ile karşılaştırıldığı zaman sulandırma işleminden sonra elde edilen platelet sayılarılarının daha yüksek oranlarda elde edildiği görüldü. Böylece PCP içerisindeki oluşan pellet kısmına zme işlemi uygulayarak plateletleri daha büyük oranlarda saymayı başarmış olduğumuzu gördük.

Ancak sulandırma işlemini neyle ve ne oranda yapacağımızı ve mekanik karıştırma işlemini ne kadar süreyle yapacağımızı standardize etmemiz gerekiyordu. Bunun için bir dizi deneme çalışması daha yaptık. ilk önce 5 tam örneğinden elde edilen PRP 2000×g kuvvetinde 10 dakika santrifüj edildikten sonra sulandırma ve zme işleminde bu sefer örneğin kendi plazmasını (PPP'yi) kullanmaya karar verdik (13). Çünkü elde edilen örneğin invivo kulanımı için sulandırma işleminde plazmayı kullanmanın daha doğru olacağı dşnld. Plazmanın Ph' sının ve bileşiminin platetlerin bütünlüğü için PBS tampon solüsyonuna oranla daha uygun olacağınada ayrıca karar verildi.

Bu 5 örnekten elde ettiğimiz 100µL' lik PCP örnekleri kendi plazmalarını kullanarak 1/5 ,1/6 ,1/7 ,1/8, 1/10 (oranlar plazmanın yeterliliğine göre belirlendi) oranlarında sulandırma işlemine tabi tutularak 2 dakika süreyle mikropipet yardımıyla mekanik çözünme işlemi uygulandı. Sonrasında elde edilen örneklerden Sysmex XN5000 cihazında platelet sayımları yapıldı. Sonuçlara bakıldığı zaman yüksek platelet sayıları elde edildiği görüldü (560.000/µL-3.000.000/µL). Sonuçlar saline solüsyonuyla sulandırma işlemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında aralarında çok fazla farkın olmadığı tespit edildi. Böylece sulandırma işlemine daha sağlıklı olduğu düşünülen örneğin kendi plazmasıyla devam etmeye karar verdik.

Ancak PCP örneğine uygulanacak olan; mikropipet yardımıyla mekanik çözünme işleminin ne kadar süre yapılması gerektiği henüz standardize edilmemişti. Bunun üzerine bir deneme çalışmasının daha yapılmasına karar verildi. Bunun için 12 tam kan örneğinden elde edilen PRP örnekleri 2000×g de 10 dakika santrifüj edilerek her bir örnekten 100µL hacminde PCP elde edildi. Daha sonra elde edilen PCP ler mikropipet yardımıyla kendi plazmalarıyla 1/10 oranında sulandırıldı. Her bir süre için ikişer örnek kullanılmak üzere örneklerle sırasıyla 30 saniye ve 1, 2, 3, 4, 5 dakika sürelerle mekanik çözünme işlemi uygulandı. Çözünme sonrasında PCP örneklerinden Sysmex XN5000 cihazında platelet sayımları gerçekleştirildi ve sonuçlar kaydedildi.

Sonuçlar karşılaştırıldığında görüldü ki düşük çözünme sürelerinde daha az platelet çözünmesinin olduğu, yüksek mekanik çözünme sürelerinde ise plateletlerin parçalandığı ve bunun üzerine her iki durumda da daha düşük sayımlar elde edildiği görüldü. *En yüksek platelet sayımının ise daha öncede kullanmış olduğumuz 2 dakikalık mekanik çözünme işlemi sonrasında gerçekleştirildiği görüldü.* Bu olumlu elde edilen sonuç; sonrasında çalışılan 5 örnekten elde edilen benzer sonuçlarla teyit edilmiştir. **Bunun üzerine çalışmada mikropipet yardımıyla 2 dakikalık mekanik çözünme süresinin kullanılmasına karar verildi.**

Bütün bu çalışmaların ve denemelerin ışığında esas çalışmaya geçilmesine karar verildi. Bunun üzerine hastane polikliniğine gelen hastalar ve hastanedeki çalışanlarımızdan 25 erkek birey seçildi. Bireylerin hematoloji hastası olmaması ve

özellikle WBC, RBC ve PLT değerlerinde patolojik bir düşüklük olmamasına dikkat edilmiştir.

Bireylerin yaş aralıkları 20-60 yaş olarak belirlendi. Belirlenen bireylerden **5mL hacminde sodyum sitratlı (0,5 mL sodium citrate içeren)** tüplere **25 adet tam kan örnekleri** toplandı. Kan alma işlemi sırasında ve sonrasında hemoliz ve pıhtı olmamasına ayrıca tüplerin tam olarak dolmasına özellikle özen gösterildi. Tam kan örneklerinden hızlı bir şekilde zaman kaybetmeden hastane laboratuvarımızdaki Sysmex XN5000 cihazında öncelikle tam kan sayımları yapıldı ve örneklerin WBC, RBC ve PLT değerleri kaydedildi. İki örnekte platelet sayıları 105.000/ μ L ve 110.000/ μ L olarak düşük bulunduğu için bu örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Kalan 23 örnekle çalışmaya devam edildi. Daha sonra bu tam kan örneklerine *allegra x-15r centrifuge Beckman Coulter(soğutmalı)* cihazında önceden belirlemiş olduğumuz 230 \times g de 10 dakika (13) süreyle santrifüj işlemi uygulandı. Tam kan; altta eritrositler üstte plazma (PRP) olacak şekilde iki kısma ayrılmış oldu. Daha sonra yine bekletilmeden önceden belirlenmiş olan tüpün alt 5mm mesafedeki hacimde bulunan buffy coat kısmı (*şekil 15*) tüpte bırakılarak üst plazma (PRP) mikropipet yardımıyla 3mL lik kuru tüplere aktarıldı *Şekil. Bu aşamada daha öncede belirttiğimiz gibi plateletlerden WBC leri büyük oranda ayırmış olduk.*

Buffy coat: RBC ve plazmanın birleşim çizgisinden başlayarak yukarı yönlü 5mm mesafede ölçülen kısım. İçerisinde yüksek oranda WBC, diğer granüllü hücreler ve bir miktarda platelet mevcut (önceden belirlendi).

PRP: WBC ve RBC den fakir plateletten zengin plazma.

Aktarma işlemi yaparken plazmanın tüpünün cidarından akmasını sağlayarak çok azda olsa olası bir mekanik parçalanmayı önlemeyi amaçladık. Tekrar elde edilen bu PRP örnekleri önceden belirlenmiş olan **2000 \times g de 10 dakika(1) sürede** santrifüj edildi. Bu ikinci santrifüj aşaması plateletlerin konsantre edilme aşamasıdır (PCP). Böylece plazmanın iki kısma ayrılması sağlanmış oldu.

Birinci kısım: En altta bulunan PCP (yaklaşık 100 μ l lik kısım önceden belirlendi). İçerisin de pellet haline gelmiş olan plateletler mevcut (gözle görülebilir durumda) (*Şekil12-18*).

İkinci kısım: PCP haricindeki üstteki plateletten fakir plazma; PPP kısmı. İçerisinde çok düşük oranlarda platelet mevcut ($1.000/\mu\text{L}$ – $6.000/\mu\text{L}$)(*şekil13-19*). Bu kısımlar ayrı ayrı mikropipet yardımıyla 3mm lik kuru tüplere aktarıldı. Daha sonra PCP örneği kendi plazmasıyla mikropipet yardımıyla değişen oranlarda sulandırıldı. 3 örneğin plazması yeterli olmadığı için bu 3 örnek 1/5, 1/7, 1/8 oranlarında, kalan 20 örnek 1/10 oranında sulandırıldı. Örnekler yine önceden belirlenmiş olan 2 dakika süreyle mikropipet yardımıyla mekanik çözünme işleminetabi tutuldu (örneği vakum etkisiyle çekip bırakma şeklinde). Daha sonra her bir örnekten (Sysmex XN5000) cihazında WBC, RBC ve platelet sayımları ayrı ayrı yapılarak sonuçlar kaydedildi *Tablo3*. Platelet sayımları ise her bir örnekten çift sayım şeklinde yapıldı ve sonuçların ortalamaları alınarak kaydedildi *Tablo3*.

4. BULGULAR

23 örnekten yapılan tam kan sayımı sonucu elde edilen WBC, RBC, platelet değerleri, örnek sayıları ve yaş dağılımı Tablo 2' de gösterilmiştir. Örneklerin tam kan platelet değerlerine (PLT1) bakıldığında platelet eldesi (PRP) ve platelet konsantresi (PCP) için uygun değerler olduğu görülmektedir. Bu örneklerden öncelikle PRP kısmı elde edilmiş, daha sonra PRP' den ikinci santrifüj işlemi sonrası PCP elde edilmiştir.

PCP içerisinden yapılan WBC, RBC ve platelet sayımları Tablo 3' te gösterilmiştir. Platelet sayımları ise her örnekten iki defa yapıp ortalamaları alınarak kaydedilmiştir, sonuçlar yine Tablo 3 ' te belirtilmiştir. Konsantre işleminden sonra sırasıyla üç örneği 1/8, 1/7, 1/5 oranlarında, kalan 20 örneği ise 1/10 oranında sulandırma işlemine tabi tuttuk Tablo 4. Sulandırma işleminin başarılı olduğu ORT PLT 2 ve PLT2-1, PLT2-2 sonuçlarına bakıldığında görülmektedir. PCP içerisindeki WBC ve RBC değerleri hedeflenen şekilde oldukça düşük değerlerde elde edilmiştir (hedef: WBC<1.000/ μ L, RBC<50.000/ μ L) *Tablo 3.*

PCP içerisindeki platelet değerleri ise toplam 15 örnekte hedeflendiği gibi 1.000.000/ μ L ve üzeri elde edildi. Kalan 8 örnekte ise bu değer altında sonuçlar elde edildi Tablo 3. Elde edilen son platelet değerleri başlangıç değerleriyle karşılaştırılıp çıkan sonuç iki yolla ifade edildi. İlk olarak PCP' dan elde edilen platelet değerinden (ORT PLT) tam kan platelet değeri (PLT1) çıkarılıp aradaki farkı başlangıç değerine oranlayarak *yüzde konsantrasyon artışı* şeklinde ifade edildi. İkinci olarak ise çıkan son platelet değerini (ORT PLT) direk tam kan platelet değerine (PLT1) oranlayarak çıkan sonucu *yüzde konsantrasyon* olarak ifade ettik *Tablo 5.* Sonuçlara baktığımızda esas amacımız

olan içerisinde WBC ve RBC nin en az oranda olduğu fakat platelet açısından mümkün olduğunca konsantre edilmiş olan plazmayı elde etmeyi başardığımızı gördük.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan örnek sayısı, kişilerin yaş bilgileri ve örneklerin tam kan WBC (WBC1, RBC (RBC1), platelet değerleri ise PLT1 olarak gösterilmektedir.

ÖRNEK NO	YAŞ (♂)	WBC1(/ μ L) $\times 10^3$	RBC1 (/ μ L) $\times 10^6$	PLT1 (/ μ L)
1	24	5,96	4,51	202.000
2	42	6,97	4,79	134.000
3	55	4,38	4,21	143.000
4	24	7,1	4,5	212.000
5	43	6,5	4,01	211.000
6	35	6,2	5,02	141.000
7	46	7,01	4,71	302.000
8	36	7,63	4,11	218.000
9	28	6,84	4,18	267.000
10	50	6,08	4,13	162.000
11	46	4,94	4,09	160.000
12	30	6,79	4,14	210.000
14	32	7,03	4,15	173.000
15	51	6,06	4,42	196.000
16	40	8,01	4,7	321.000
17	23	7,69	4,02	227.000
18	51	5,73	4,44	130.000
19	36	5,43	4,33	161.000
20	28	8,01	4,47	179.000
21	26	3,75	3,71	148.000
22	22	7,55	3,97	351.000
23	33	7,09	4,02	219.000

Tablo 3. PCP içerisindeki WBC, RBC ve Platelet değerlerini göstermektedir

ÖRNEK NO	WBC2 (/μL) x10³	RBC2 (/μL) x10⁶	ORT PLT2 (/μL)	PLT2-1(/μL)	PLT2-2 (/μL)
1	0,25	0,02	1.464.000	1.456.000	1.472.000
2	0,1	0,01	661.500	651.000	672.000
3	0,15	0,01	945.000	790.000	1.100.000
4	0,06	0,01	1.415.000	1.410.000	1.420.000
5	0,08	0,01	1.115.000	1.110.000	1.120.000
6	0,6	0,02	795.000	810.000	780.000
7	0,13	0,02	2.465.000	2.480.000	2.450.000
8	0,18	0,02	1.820.000	1.680.000	1.960.000
9	0,07	0,01	955.000	960.000	950.000
10	0,15	0,02	710.000	670.000	750.000
12	0,15	0,02	1.110.000	1.110.000	1.110.000
13	0,17	0,03	1.540.000	1.600.000	1.480.000
14	0,36	0,02	760.000	770.000	750.000
15	0,12	0,03	1.570.000	1.760.000	1.380.000
16	0,46	0,05	2.097.500	2.355.000	1.840.000
17	0,04	0,03	1.605.000	1.640.000	1.570.000
18	0,03	0,01	910.000	890.000	930.000
19	0,02	0,01	1.530.000	1.370.000	1.690.000
20	0,16	0,02	3.360.000	3.340.000	3.380.000
21	0,13	0,02	1.600.000	1.650.000	1.550.000
22	0,13	0,02	2.485.000	2.370.000	2.600.000
23	0,04	0,05	2.630.000	2.810.000	2.450.000

PCP içerisinde ölçülen WBC: WBC2, RBC: RBC2 şeklinde, platelet değerleri ise: PLT2-1; birinci ölçüm, PLT2-2; aynı örnekten ikinci ölçüm şeklinde gösterildi. En son ortalama platelet değerleri: ORT PLT; Birinci ve ikinci ölçümün ortalaması (PLT2-1 ve PLT2-2' nin ortalaması) şeklinde gösterildi.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan örneklerin sulandırma oranları.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/8	1/7	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1/10	1/10	1/10	1/5	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	

Birden yirmi üçe kadar olan rakamlar örnek numaralarının, kesirle ifade edilenler sulandırma oranlarını göstermektedir.

Tablo 5. Örneklerin ilk ve işlem sonrası platelet sonuçları ve artış yüzdesi

ÖRNEK NO	PLT1 (/µL)	ORT PLT2 (/µL)	KONSANTRASYON (%)	KONSANTRASYON ARTIŞI (%)
1	202.000	1.464.000	725	625
2	134.000	651.500	494	394
3	143.000	945.000	661	551
4	212.000	1.415.000	667	567
5	211.000	1.115.000	528	428
6	141.000	795.000	564	464
7	302.000	2.465.000	816	716
8	218.000	1.820.000	835	735
9	267.000	955.000	358	258
10	162.000	710.000	438	338
11	160.000	1.110.000	694	594
12	210.000	1.540.000	733	633
14	173.000	760.000	439	339
15	19.6000	1.570.000	801	701
16	321.000	2.097.500	653	553
17	227.000	1.605.000	707	607
18	130.000	910.000	700	600
19	161.000	1.530.000	950	850
20	179.000	3.360.000	1877	1777
21	148.000	1.600.000	1081	981
22	351.000	2.485.000	708	608
23	219.000	2.630.000	1201	1101

PLT1; tam kan platelet değerlerini göstermektedir. ORT PLT; PCP içerisinde aynı örnekten çift ölçümle elde edilen platelet sonuçlarının ortalaması alınarak elde edilmiştir. KONSANTRASYON(%): PCP'den elde edilen ORT PLT' nin tam kan platelet değerine (PLT1) oranlanmasıyla elde edilen sonuçların yüzde olarak ifadesi. KONSANTRASYON ARTIŞI: ORT PLT' den tam kan platelet değeri çıkarılarak aradaki fark yüzde konsantrasyon artışı şeklinde ifade edilmiştir.

Tablo 6. Tanımlayıcı İstatistikler

n=23	YAŞ	WBC1 (/µL) x10³	RBC1 (/µL) x10⁶	PLT1 (/µL)	WBC2 (/µL) x10³	RBC2 (/µL) x10⁶	ORT PLT2 (/µL)
Ortalama	36	6,49	4,30	203.045	0,14	0,02	1.524.682
Standart Sapma	10	1,11	0,31	59.679	0,10	0,01	698.901
Median	36	6,82	4,20	199.000	0,13	0,02	1.497.000
25th-75th	27-46	5,90-7,21	4,07-4,50	157.000-221.000	0,06-0,16	0,01-0,02	936.250-1.889.375
Minimum	22	3,75	3,71	130.000	0,02	0,01	661.500
Maksimum	55	8,01	5,02	351.000	0,46	0,05	3.360.000

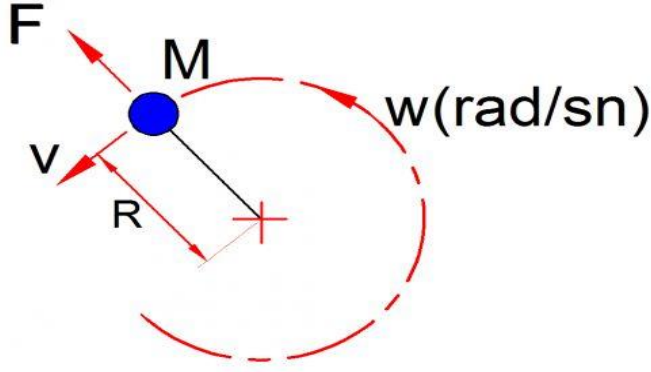
5. TARTIŞMA

Santrifüj işlemi sıvı-sıvı, katı-sıvı fazları ayırmada en önemli ve verimli yoldur. Prensibi ise rölatif santrifüj kuvvetinin (*RCF*, *g*) ayrılacak olan bileşenlerin özgül ağırlığından büyük olmasıyla bileşenlere *g* kuvveti (*RCF*) uygulaması temeline dayanır. Bunun üzerine ayrılacak olan bileşenler belirli bir sırayla (özgül ağırlığına göre ağır olan ilk önce hareket eder) *RCF* kuvveti yönünde hareket etmeye başlar. Yani *RCF* kuvveti bütün partiküllere aynı oranda etki eder fakat partiküller belirli bir sürede aynı mesafeyi katedemez. Özgül ağırlığı fazla olan en çok yol alan partiküldür.

Aynı zamanda partiküllerin bulunduğu ortamın uyguladığı sürtünme kuvvetide (örn; sıvı ortamda sıvının viskozitesi) alınan mesafeyi etkiler. Örneğin büyük partiküllere daha çok direnç uygulanır ve bu yüzden daha geç yol katederler. Sonuç olarak bütün bu şartlar altında partiküller kendi aralarında bir sıralama gösterecek şekilde dizilim gösterirler. Santrifüjlerdeki *RCF(g)* kuvveti rotorun merkezinden uzaklaştıkça (yarı çap arttıkça) artmaktadır. Bu sebeple *g* kuvveti bu şartlara göre ayarlanır ve hesaplanır **Şekil 20** (49,35).

RCF kuvveti hesaplanarak elde edildiği için her zaman sabittir ve santrifüj tipine göre değişiklik göstermez. Bu sebeple santrifüjleme işlemlerinde *g* kuvvetinin kullanılması hem daha doğru sonuç vermekte hemde bir standardizasyon sağlamaktadır. Aynı zamanda çalışmalar arasında kıyaslamayada olanak getirmektedir.

$$RCF(g) = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2$$



Şekil 20. Santrifüj ivmelenmesinin şematik gösterimi. F : Kuvvetin yönünü, v:hızın yönünü, R: Santrifüj yarıçapını, M: maddemizi, W: açısal hızı, X: rotorun merkezini ifade etmektedir.

Bizde yaptığımız çalışmada, 21°C sabit sıcaklıkta, santrifüj işlemlerinde g (RCF) kuvvetini baz aldık; böylelikle hem güvenilir sonuçlara ulaştık hem de diğer çalışmalarla karşılaştırabilme imkanı elde etmiş olduk.

Ayrıca santrifüj cihazları rotorun hareketli olup olmamasına görede farklılık göstermektedirler.

Hareketsiz sabit açılı olanlar: Rotorun dönme eksenine göre 25-45, ya da 90 derece olan haznelere sahiptirler. Partiküller tüpün çeperine çarparak dibe doğru hareket eder yada çeperde birikme gösterir (*Şekil 8*).

Hareketli oynar başlıklı olanlar (horizontal): Dönme esnasında tüpler rotorun dönme eksenine paralel olacak şekilde ivmelenmektedir *Şekil8*. Bu durumda partiküllere daha fazla g kuvveti uygulanmakta ve partiküller muntazam bir şekilde sıralanma ve kümelenme göstermektedir. Parçacıkların hareket doğrultusu g kuvvetinin doğrultusu ile aynı paralellikte olduğu için sürtünme kuvvetide azalmaktadır. Parçacıklar daha kolay hareket etmekte ve fazla bir dirençle karşılaşmadıkları için parçalanma riskleride azalmaktadır. Bu durum özellikle PRP ve PCP eldesi sırasında plateletler için önem arz etmektedir.

Örneğin sabit açılı santrifüjlerde, plateletler önce tüpün duvarına çarptıkları için hem darbeye maruz kalmaktalar hemde yüzeyde kümelendikleri içinde geri kazanımları

oldukça zorlaşmaktadır. Yapılan PRP çalışmalarında separasyon işlemleri için oynar başlıklı santrifüjlerin kullanılmasının her zaman daha iyi sonuçlar verdiği özellikle vurgulanmıştır. Bizde bu sebeplerden dolayı çalışmamızda laboratuvarımızda bulunan oynar başlıklı (horizontal), soğutmalı santrifüj cihazını kullanmayı tercih ettik.

Tam kan (WB) içerisindeki hücreler ve komponentlerinde belirli bir özgül ağırlıkları vardır. Baştan sıralamak gerekirse; RBC (Red Blood Cell) en ağırı 1,095, daha sonra WBC (White Blood Cell) 1,063-1,085, plateletler ise en hafiftir 1,032. Tam kanın özgül ağırlığı erkeklerde 1,055-1,060, kadınlarda 1,050-1,056dır. Plazmanınki 1,025-1,029, serumunki ise 1,024-1,028 dir (**1-13**). Uygulanan santrifüj kuvveti (g); PRP ve PCP hazırlanırken tüp içerisindeki tam kanın bileşenlerine eşit olarak etki eder. Fakat öncede bahsedildiği gibi özgül ağırlık farkından dolayı bileşenler belirli bir sıralama gösterecek şekilde tüpün dibine doğru hareket ederler. Şöyleki; gözle net bir şekilde görülecek durumda RBC en altta, plazma onun üstünde (klasik görünüm) olacak şekilde. Plazma içerisinde ise WBC ler ve granüllü hücreler en altta onun üstündede plateletler mevcuttur. Fakat özgül ağırlıklarının biribine çok yakın olması sebebiyle bu bileşenlerin ayrımı hiçbir zaman %100 olmamaktadır ve bileşenler arasında kontaminasyonlar olmaktadır.

PRP ve PCP elde etmek için yaptığımız çalışmamızda bu kontaminasyonu en aza indirmeyi amaçladık. Bunu da en uygun g kuvvetlerini, süresini ve çift santrifüj tekniğini kullanarak sağladık. Bu yolla WBC, RBC ve plateletleri birbirlerinden mümkün olduğunca ayırmayı amaçladık.

Ayrıca kullandığımız santrifüj soğutmalı santrifüj olduğu için örneklerimiz santrifüj ısı 21°C'ye sabitlenerek ısı artışından kaynaklanan olası hücre deformasyonları ve parçalanmalarının önüne geçilmiş oldu. Bu da bizim çalışmamızın bir avantajı olarak belirlendi. Bu güne kadar yapılan birçok çalışmaya baktığımızda PRP içerisinde WBC varlığının fazla önemsenmediğini, elde edilen PRP ve PCP içerisinde yüksek oranda WBC varlığı olduğunu görmekteyiz (4,50). WBC ile plateletleri birbirlerinden ayırmak oldukça zordur, hatta %100 ayırmak imkansızdır denebilir. Çünkü plateletlerin ve WBC'lerin özgül ağırlıkları birbirlerine çok yakın olduğu için WBC nin olduğu kısma (buffy coat) bir miktar platelet kaybı kaçınılmazdır.

Eğer RBC' siz ve WBC' siz bir PCP elde etmek istersek bu sebeplerden dolayı doğal olarak platelet kaybımız bir miktar olmaktadır. Bunun yanında eğer plateletleri % 100 verimle kullanmak istersek; tam kan örneğinin tamamını (WB) kullanmak gerekecektir. Fakat tam kan içerisindeki oluşan kısmi koagülasyon sebebiyle fibrin ağları oluşmaktadır. Bu fibrin ağlarının içerisinde plateletlerden ortaya çıkan PDGF-BB (Platelet-derived growth factor) kaybı olmaktadır. PDGF-BB' lerin fibrin ağlarının içerisinde hapsediği düşünölmektedir(13). Bu da tedavi verimliliğini kötü yönde etkileyecektir.

PRP ve PCP elde etmek için laboratuvarımızda mevcut olan 5mL hacmindeki sodyum sitrat içeren ve 3mL hacmindeki kuru tüpleri kullandık. Bir başka çalışmada ise 15mL lik EDTA içeren ve 1.5 mL lik kuru tüpler kullanılmıştır (13). EDTA veya sitrat içeren tüplerin kullanımı PRP elde çalışmalarında kullanılmaktadır (13,4). Bizim laboratuvarımızdaki mevcut olan 2mL hacimli EDTA 'lı tüplerin hacimleri yetersiz olduğu için biz sodyum sitrat içeren 5mL hacimli (0.5 mL sodyum sitrat içeren) tüpleri kullanmayı tercih ettik. Çünkü 5mL hacimli tüplerle daha yüksek hacimli PRP elde edilebilmektedir buda geri kazanılan platelet sayısını olumlu yönde etkilemektedir.

Santrifüj işlemlerinde ilk Santrifüj aşamasında uygulanan g kuvveti arttıkça daha fazla plazma hacmi elde edilebilmektedir. Fakat RBC içerisine ve buffy coat kısmına olan platelet kaybıda gittikçe artmaktadır. Bu sebeple 1. Aşamada oluşan PRP içeriği platelet açısından daha fakir olmaktadır. İkinci santrifüj işleminde ise (PCP aşaması) g kuvveti arttıkça platelet kazancı ve pellet oluşumu artmaktadır fakat çok fazla miktardaki g kuvvetlerinde ise plateletler parçalanmakta ve aktive olmaktadır. Bu sebeple PCP içerisindeki platelet sayısında ve verimliliğinde kayıp söz konusu olmaktadır (4).

Örneğin 3000×g ve üzeri çevirmelerde plateletler parçalanmakta, yaşayabilirliği azalmakta ve aktive olmaktadır(4). Bu yüzden çalışmamızda en uygun g kuvvetleri olarak; 1. Santrifüj işleminde 230×g (bu g kuvvetinde plateletlerin RBC ve buffycoat içerisine kaybı en az olmaktadır), 2. Santrifüj işleminde ise 2000×g (bu g kuvvetinde plateletlerin parçalanması ve aktive olması en az oranda olmaktadır) santrifüj kuvvetlerini kullandık(13). Santrifüj süresi ise 10 dakika olarak belirlendi(13).

Kahn ve ark. (1976) 478 mL WB' den (36) en yüksek trombosit konsantrasyonunu elde etmek için en uygun koşulu 4 dakika süreyle 3730×g'lik bir santrifüj ivmesi olarak belirlemişlerdir. Slichter ve Harker (1976) tarafından elde edilen en yüksek trombosit geri kazanım verimi için 250-450 mL WB örneği kullanılmış ve 1000g'de 9 dakika süreyle santrifüje tabi tutulmuştur. Sonrasında % 80 oranında geri kazanım elde edilmişlerdir(51). Fakat dikkat edilirse kullanılan kan hacimleri oldukça fazladır. Bizim çalışmamızda ise 4.5 mL tam kan örneği (WB) kullanılmıştır. Ayrıca aynı çalışmada 3000×g de 20 dakika santrifüj edilen örneklerde yine trombositlerin yaşayabilirliğinin azaldığı kanıtlanmıştır (4). Bu yüzden biz çalışmamızda ikinci santrifüj adımında en optimal g kuvveti olan 2000×g kuvvetini kullanmaya karar verdik.

İki santrifüj işlemi haricinde tek santrifüj işleminde kullanan çalışmalar mevcuttur (52). Fakat bir çok kaynakta sağlıklı bir PCP elde etmek için her zaman çift santrifüjleme önerilmektedir. Bazı çalışmalarda tek santrifüjleme sonrasında alınan PRP hacmine buffy coat' ta dahil edilmiştir. Çünkü tek santrifüjleme yapıldığından ve konsantre etme aşaması olmadığından mümkün olduğunca fazla sayıda platelet içeren PRP elde etmeyi amaçlamışlardır. Başka bir deyişle tek santrifüjleme ile daha konsantre plazma elde etmeyi amaçlanmış denilebilir. Daha konsantre bir plazma elde etmek için ise ilave döndürmeler gerektiğinde ayrıca aynı çalışmada vurgulanmıştır (53,54).

Landesberg ve ark. WB konsantrasyonunun yaklaşık 3,2 katı konsantrasyona sahip PRP örnekleri elde etmeyi başardılar. Uyguladıkları Santrifüj prosedürü ise; döndürme başına 200×g kuvvetinde 10 dakika süre olarak belirlendi. Santrifüj işlemi için ise 5 mL hacminde tam kan örneği kullandılar (54). Bu çalışmaların çoğunda, yazarlar yalnızca geri kazanım etkinliği yerine nihai konsantrasyon faktörü teriminide çokça kullanmaktadırlar. Bizde çalışmamızda konsantrasyon ifadesini kullanmayı tercih ettik.

Ancak bu ifadelerin hangisinin daha doğru olacağının performansında tam olarak ölçülemeyeceği söylenmektedir(4).

Yapılan başka bir çalışmada 3,5 mL WB örneği kullanılmıştır. Bu çalışmada birinci santrifüj işlemi için 100×g 10 dakika süre kullanılarak başlangıç konsantrasyonun yaklaşık iki katı kadar platelet eldesi sağlamışlardır. Ayrıca elde edilen PRP'nin üst hacminin

yaklaşık 1/2 yada 1/3 kadarı uzaklaştırılarak ikinci santrifüj işlemi sonrası başlangıca oranla 3 ile 5 kat daha fazla konsantrasyonda platelet içeren plazma elde edildiği söylenmektedir(13). Bizim çalışmamızda ise buffy coat kısmı bırakılıp üst plazmanın tamamı alınmıştır. Çünkü üst plazmadaki (PRP içerisindeki) bütün plateletleri kayıp olmadan ikinci santrifüj işlemine dahil ederek platelet kaybını en aza indirmeyi amaçladık. Buna rağmen bir kısım plateleti buffycoat içerisinde bıraktığımız için yinede bir miktar platelet kaybımız olmaktadır. İkinci santrifüj işlemi sonrasında başlangıca oranla (tam kan platelet konsantrasyonu) 8 ile 20 kat daha fazla oranda platelet konsantrasyonu elde etmeyi başardık.

Jo ve ark. kullandıkları yöntemle daha iyi bir verim elde ettiklerini belirtmişlerdir (%92). 9mL WB örneği kullanmışlardır. İlk santrifüj işlemi 900 × g kuvveti 5 dakika süre olarak uygulamışlar (9-53). Elde edilen trombosit konsantrasyonu $310.7 \pm 78.5 \times 10^3 / \text{mm}^3$ olarak ölçülmüştür. İkinci adım için 15 dakika süreyle 1500 x g kuvveti uygulandı. İkinci santrifüj basamağı için ise maksimum verimlilik (%84) olarak belirlenmiştir. Trombosit konsantrasyonu ise $633.2 \pm 91.6 \times 10^2 / \text{mm}^3$ olarak ölçülmüştür. Trombositlerin konsantrasyonu başlangıçtaki konsantrasyonundan 4,2 kat daha fazladır. Fakat burada trombositlerin bütünlüğüne ve aktive olmamasına çok dikkat edilmemiştir.

Bizim çalışmamızda ise 1. Ve 2. Santrifüj işlemlerinde sırayla 230g 10 dakika süre, 2000×g 10 dakika süre kullanılarak son konsantrasyonda başlangıca oranla 8 ile 20 kat daha fazla platelet sonuçları elde edildi. Ayrıca plateletlerin bütünlüğü ikinci adımda kullanılan g kuvvetiylede (2000 × g) büyük ölçüde korunmuş oldu. İkinci santrifüj işleminde 400×g kuvvetini kullanarak platelet bütünlüğünü daha iyi sağladığını belirten çalışmalarda vardır(4). Ancak bizim çalışmamızda 400×g 10 dakikalık süreyle yaptığımız örneklerden elde edilen PPP(platelet poor plazma) kısmında yaptığımız platelet sayımlarında PPP içerisinde hala bir miktar platelet bulunduğunu saptadık (120.000/μL-210.000/μL). Bu bizim için fazlaca bir kayıp olmaktadır. Bizim amacımız ise plateletleri parçalamadan ve aktive etmeden tamamıyla PCP kısmında toplamaktı. Bunun için 2000×g kuvveti ve 10 dakika süreli santrifüj işlemi uyguladık. Sonuçlarımıza baktığımızda 8-20 kat daha yoğun platelet konsantrasyonları elde ettiğimizi gördük. PPP kısmında ise az sayıda platelet bulunduğunu saptadık (150/μL-500/μL).

Bausset ve ark.(55) iki santrifüj adımını içeren bir prosedür ele almışlar; 15 dakika süreyle 130×g veya 250×g kuvvetinde bir santrifüj işlemi uygulamışlar. İlk santrifüj sonrası 8,5 mL WB'den 3,47 kat daha yoğun trombosit konsantrasyonu elde etmişlerdir. İkinci santrifüj adımında ise ilk adımdan elde edilen 2mL plazmayı (PRP) kullanmışlarve 2300×g de 9 dakika süreyle santrifüj uygulamışlardır. Sonrasında araştırmacılar PCP içerisindeki trombosit bütünlüğünü ve yoğunluğunu değerlendirmişler sonuçları ise olumlu olarak kaydetmişlerdir. Verilere baktığımızda ise çalışmamızın verileriyle uyumlu olarak değerlendirildi. Fakat bizim sonuçlarımıza göre elde ettiğimiz platelet konsantrasyonu daha yüksek idi.

İlk santrifüj adımını inceleyen Araki ve ark. 10 dakika süreyle 70×g kuvvetinde düşük ivmeler uygulayarak elde ettikleri PRP örneğinde; trombositlerde %70-80 geri kazanım WBC'lerde ise %10-35 oranında bir geri kazanım elde etmişlerdir(56). Antikoagulan olarak ise EDTA kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda başta yaptığımız düşük g kuvvetindeki denemelerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat düşük g kuvvetlerinde PRP içerisinde WBC bulaşının fazla oranda olduğunu saptadık bu yüzden bulaşının en aza indirilmesi için ilk santrifüj adımında en uygun g kuvveti olan 230×g kuvvetini 10 dakika sürede uyguladık. Aynı çalışmada yine 230-270×g'lerde de benzer trombosit geri kazanımı elde etmişlerdir(56) (çalışmamızla en uygun olan g kuvveti aralığı).

Bununla birlikte aynı çalışmada WBC geri kazanımı sadece % 4-6 olarak bulundu. Bu bulaşı bizim çalışmamızda çok daha az olarak görüldü (%1,1-%3). Sonuçlara genel olarak bakıldığında ise bizim çalışmamızı destekler durumda olduğu görüldü. İkinci santrifüj adımı için ise 2300×g'lik bir hızlanma 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Trombosit konsantrasyonu başlangıca oranla 7.4 kat daha fazla bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da yine benzer sonuçlar elde edildi (2000×g, 10 dakika süreyle). Aynı çalışmada antikoagulan olarak ACD kullanıldığı zaman trombosit geri kazanımı sadece %35 olarak ölçüldü. Sodyum sitrat kullanarak yaptığımız bizim çalışmamızda ise trombosit geri kazanımı %70-89 oranında elde edildi. ACD' ye oranla daha iyi sonuçlar elde ettiğimiz görülmektedir. Araştırmacılar bu farkın, numunedeki trombosit bütünlüğünü azaltan antikoagulan etkisinden kaynaklandığını düşünmektedirler. Bu nedenle

çalışmalarda ayrı yeten trombosit bütünlüğünde değerlendirilmesi hem kullanılan antikoagülanlar açısından hemde trombosit verimi açısından önem arz etmektedir.

Mazzocca ve ark(57) farklı kompozisyonlara sahip PRP örnekleri hazırlamak için 3 protokolü analiz etmişlerdir:

İlk çalışmada birinci santrifüj basamağında 5 dakikada süreyle 1500 rpm (Revolution per minute; dakikadaki devir sayısı)'yi kullanmışlardır ve düşük trombosit ($382 \times 10^3 / \text{mm}^3$) ve düşük WBC ($0,6 \times 10^3 / \text{mm}^3$) sayıları elde etmişlerdir (çalışmada 10mL WB kullanmışlardır).

İkinci çalışmada ise 3200 rpm'de 15 dakika süreyle yine tek çevirme kullanıldı ve bu basamakta daha yüksek trombosit ($940 \times 10^3 / \text{mm}^3$) ve WBC ($17 \times 10^3 / \text{mm}^3$) sonuçları elde etmişlerdir. Çalışmada ise 27mL gibi oldukça yüksek bir WB hacmi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise çok daha düşük bir WB hacmiyle çalışıldı (4,5 mL). Platelet açısından bizim çalışmamızla benzer sonuçlar olmasına rağmen WBC oranı bizim sonuçlarımızdan daha yüksek olarak tespit edildi.

Üçüncü çalışmada çift santrifüj işlemleri uygulandı. Bunun için birinci santrifüj adımında 5 dakika süre ve 1500 rpm, ikinci santrifüj adımında ise 20 dakika süre ve 6300 rpm kullanıldı. Sonuç olarak daha yüksek konsantrasyonda platelet ($472.000/\mu\text{L}$) ve daha düşük konsantrasyonda WBC ($1500/\mu\text{L}$) elde edildi.

Bizim çalışmamızda elde edilen platelet konsantrasyonları ise daha yüksek ölçüldü. ($600.000/\mu\text{L}$ - $3.000.000/\mu\text{L}$). WBC'yi ise daha düşük tespit ettik($100/\mu\text{L}$ - $700/\mu\text{L}$). Bazı başka araştırmalarda(58,59) g kuvveti yerine dakikadaki dönme sayısını (rpm)kullanmakta oldukları için sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılması ve değerlendirilmesi zorlaşmış olmaktadır. Bu yüzden bizde çalışmamızda genel kabul gören ve her zaman standart ve sabit olan g kuvvetini (RCF) kullanmaya karar verdik. Çünkü g kuvveti hesaplanarak elde edildiği için santrifüjler farklı olsa bile hesaplanan kuvvet aynı olabilmekte ve böylece standardizasyon sağlanabilmektedir. Rpm'nin ise santrifüj yarıçapına göre uyguladığı kuvvet değişiklik göstermektedir bu yüzden karşılaştırma için güvenilir değildir.

Yapılan bir çalışmada (4) denilmektedir ki; bu güne kadar yapılan bir çok çalışmanın önemle vurgulanan yönlerini tümüyle değerlendirdiğimiz zaman en uygun PRP bileşimini elde etmek son zamanlarda dahada mümkün olmaktadır. Aynı zamanda sonuçlar; güvenilir ölçümler ve bir çok varyasyonun denenmesiyle desteklenmektedir. Bu bilgilerin ışığında trombosit geri kazanımına ilişkin en etkin koşullar; birinci santrifüj işlemi sırasında düşük ivme (yaklaşık 100×g, 10 dakika civarında) ve ikinci santrifüj işlemi sırasında ise plateletleri aktive etmeye yönelik etkileri önlemek için yaklaşık 400 × g 10 dakika süreli santrifüj ivmesi olarak belirtilmektedir.

Bizim yaptığımız bir çok çalışmada ise birinci santrifüj işleminde 100×g kuvvetini kullanarak elde edilen PRP içerisinde WBC bulaşısını engelleyemediğimiz için 100×g kuvveti yerine 230×g kuvvetini tercih ettik ve böylece WBC bulaşısını en aza indirmeyi başardık. İkinci adımda ise 400×g kuvvetinde yaptığımız denemelerde yine plateletleri tam konsantrasyon edemediğimizi; PPPiçerisinde hala platelet varlığı olduğunu yaptığımız ölçümlerde saptadık (90.000/μL -170.000/μL). Bunun üzerine ikinci adımda 2000×g kuvvetini kullanarak daha iyi sonuçlar elde etmeyi başardık (μL’ de 560.000 - 3.000.000 platelet). PPP içerisinde ise 100/μL-400/μL olarak daha düşük platelet sayımları gerçekleştirdik.

PRP hazırlama prosedürlerinin gelecekteki uygulamalarında ISRN Hematology (*International ScholarlyResearchNotices: Hematology*) kriterlerinin de dikkate alınması gerektiği yine aynı çalışmada belirtilmektedir (4). Çünkü trombositlerin plazma proteinlerine nisbi oranı gittikçe bozulmaktadır bu da trombositlerin toplanmasını ve plazma içerisinde ayrışmasını etkilemektedir denilmektedir.

En iyi platelet geri kazanımı için en uygun g kuvveti aslına bakılırsa bireyler arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Bunun temelinde ise öncede belirtildiği gibi bireysel olarak kanın viskozitesinin ve özgül ağırlığının farklı olması yatmaktadır. Aynı zamanda trombosit yapısının ve özgül ağırlığının farklı olmasında aynı sonuca yol açmaktadır. Bu sebeple uygulanacak olan bu protokollerin kişisel olarak belirlenmesinin daha doğru olacağıda söylenmektedir(13). Bu çalışmamızda ise bütün bu farklılara rağmen platelet geri kazanımı ve PCP eldesi için en uygun g kuvvetini bireyler arasında mümkün

olduğunca optimize etmeye çalıştık. Örneğin; sadece erkek bireylerle çalıştık. İlk santrifüj işleminde 230×g ve altı; özellikle 70×g kullanılırsa W-PRP-2/PCP; WBC içeren PRP elde edilmektedir (13). Biz ise çalışmamızda 230×g kuvvetini 10 dakika sürede kullanarak WBC içermeyen PRP elde etmeyi başardık.

Ayrıca optimal platelet geri kazanımı; tp şekli, tp boyutu, tp içeriği (antikoagülan) gibi durumlardan da etkilendiği belirtilmiştir (13). Biz ise çalışmamızda en uygun olan 5mL hacminde konkav tabanlı yuvarlak çeperli sodyum sitrat içeren tüpleri kullandık. Konkav taban plateletlerin daha iyi ve sağlıklı toplanmasına olanak sağlamaktadır. Çünkü keskin kenarlı tüpler plateletlerin toplanması esnasında tüpün dip kısmına hareket ederken dirençle karşılaşmasına sebep olmakta bu da olumsuz sonuçlar doğurmaktadır.

Slichter ve Harker(51) plateletler açısından %86 oranında geri kazanım sağladıkları bir çalışma yaptılar. alışmalarında; WB örneğini yumuşak plastik tüpler içerisinde (250mL-450mL) santrifüj ettiler. Tüpler ACD antikoagülan içeriyordu. **İlk santrifüj** işlemi 1000×g kuvvetinde 9 dakika sürede yapılarak PRP örneklere elde edildi. **İkinci santrifüj** işlemi ise 3000×g kuvvetinde 20 dakika sürede yapılarak plateletler konsantre edildi. Fakat burada g kuvvetlerinin ve sürelerinin yüksek olması sebebiyle platelet kaybı oldukça yüksek olmaktaydı. Buna öncede bahsedildiği gibi plateletlerin parçalanması ve aktive olması sebep olmaktadır. Biz bu durumu aynı zamanda yaptığımız çalışmada da gözlemledik.

Ayrıca ilk santrifüj işleminde g kuvvetinin yüksek olması sebebiyle buffy coatın içerisine çok sayıda platelet kaçağı olmuştur. Buffycoat'ın da PRP içerisine dahil edilmesi sebebiyle WBC kontaminasyonu oldukça fazla olmaktaydı (W-PRP). Bu kontaminasyon PRP içerisindeki growth faktörlerin oranınıda. Ancak WBC içeren PRP ninde (W-PRP) tedavide kullanıldığı alanlar olduğu söylenmektedir. Örneğin direncin düşük olduğu geç iyileşen yaralarda kullanılabilir(60,61).

Lökositten zengin (W-PRP) ya da fakir (PRP) plazma, (60,61) lökosit ve platelet açısından zengin plazma W-PRP2/PCP (62) bu alanda kullanılan tanımlamalardır(60,61).

Biz ise çalışmamızda plateletten zengin plazma (PRP), plateletten fakir plazma (PPP), platelet konsantre plazma (PRP-2/PCP) terimlerini kullandık.

Elde edilen W-PRP nin hacmi (çokça buffycoat'ı içerir) her zaman PRP den küçüktür. Ayrıca öncede belirtildiği gibi ilk santrifüj işleminde kullanılan g kuvvetinin yüksek olması plateletlerin RBC' lerin olduğu kısma kadar geçme oranını artırır. Bu durumda ise eritrositlerin yüzeyine tutunan plateletler sebebiyle ikinci santrifüj işleminde plateletlerin geri kazanımı daha az oranda olacaktır. Bu da PCP içerisindeki platelet konsantrasyonunu etkilemektedir (4). Fakat bazı çalışmalar bunun önüne geçebilmek için; ikinci santrifüj işlemine aktarılan PRP örneğinin içerisine bir miktar RBC de dahil etmişlerdir (4). Sonrasında RBC ile plateletleri birbirinden ayırmak için ikinci santrifüj işlemi öncesi yeniden örneği resuspanse etmek zorunda kalmışlardır. Fakat biz çalışmamızda ilk santrifüj işlemi sonrası sadece platelet içeren plazmayı (PRP) aldığımız için PRP örneğimizde RBC ve WBC bulaşı zaten çok az oranda olmaktadır. Dolayısıyla böyle risklerinde önüne geçmiş olduk.

Yapılan bir çalışmada 7,5 mL tam kandan (WB) 2,31mL-2,95mL arasında PRP hacmi elde edilmiştir(13).Bizim çalışmamızda ise WB hacmi 4,5 mL (daha düşük kan hacmi) olarak ele alınmıştır. PRP hacminide yaklaşık olarak 1.,2mL-1,5mL arasında elde ettik. Yine aynı çalışmada birinci santrifüjden sonra elde edilen PRP hacmi tam kanın yaklaşık üçte biri kadardır. PRP' nin içerisindeki platelet oranı ise tam kanın yaklaşık 3 katı kadar bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda PRP hacmi WB' nin yaklaşık üçte biri; içerisindeki platelet konsantrasyonu ise 3 katına yakın değil daha düşük bulunmuştur; yaklaşık 1,5-2,5 katı olarak. Çünkü biz çalışmamızda; içerisinde WBC nin olmadığı bir platelet pellet elde etmeyi amaçladığımız için buffycoat'ı yani W-PRP yi birinci santrifüjden sonra pipetlediğimiz PRP içerisine dahil etmedik. Ancak deneme amaçlı Buffy coat'ı dahil ettiğimiz zaman W-PRP içerisinden yaptığımız platelet sayımlarında daha yüksek değerler elde ettik. Çünkü neredeyse plateletlerin %90'ına yakını geri kazanmış olduk.

PRP (W-PRP hariç) kısmını ikinci santrifüj işlemine tabi tutarak platelet içeren kısmın hacmini en aza indirmeyi amaçladık (konsantre etme aşaması). Bunu yaparkende

plateletlerin parçalanıp aktive olmasını önlemek için en uygun g kuvvetini kullandık (2000×g)(13). Aynı çalışmada elde edilen PCP hacminin PRP hacminin yaklaşık 1/10'una kadar düşürülebileceği söylenmektedir. Aynı şekilde içindeki platelet konsantrasyonunda PRP den yaklaşık 7 kat yüksek olabilmektedir. Tam kandan ise yaklaşık 20 kat daha yüksek platelet konsantrasyonu içerirebileceği de söylenmektedir. Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

PCP eldesindeki süreçte yaşanan platelet agregasyonu ve aktivasyonu PCP içerisindeki platelet konsantrasyonunu etkileyen en önemli etkidir. Bunda birinci santrifüj haricindeki diğer süreçler etkilidir; özellikle ikinci aşamadaki yüksek g kuvvetleri daha çok etkilidir. Çalışmamızda özellikle platelet aktivasyonu ve agregasyonun en az olduğu ve en iyi platelet eldesinin sağlandığı g kuvvetlerini tercih ettik. Sırasıyla 1. ve 2. Santrifüj işlemlerinde 230×g ve 2000×g.

Bunun yanında tam kan içerisindeki fibrin ağlarının oluşumunda elde edilen platelet oranlarını, büyüme faktörü miktarlarını eksi yönde etkilemektedir. Bu durum PRP ve PCP elde etme proseslerini ve sürecin standardizasyonunu her zaman olumsuz etkilemiştir(13).

Biz çalışmamızda bütün bunları minimize etmeye özen gösterdik. Özellikle tam kan alımından sonra santrifüj aşamasına kadar olan süreyi en aza indirerek daha fazla fibrin ağları oluşmadan plateletleri ayırma ve konsantre etme aşamasına geçtik.

Bunun yanında kullanılan antikoagülan maddede bu süreçte önemli rol oynamaktadır(61). *EDTA(ethylene di-aminetetra-aceticacid)*, *ACD(acid citrate dextrose)*, *sodyum sitrat*, *heparin*, *sodyum florid*; kullanılan antikogulanlardır. EDTA ve sodyum sitrat platelet geri kazanımı için deneysel anlamda en iyi sonuçları vermektedir. EDTA her zaman sodyum sitrata oranla platelet bütünlüğünün korunması ve eldesi açısından azda olsa daha iyi sonuçlar vermektedir(63). ACD kullanıldığı zaman ise elde edilen platelet oranları daha düşük olmaktadır(13), Bunun yanında ACD' nin RBC koruyucu etkilerinin olduğuda ayrıca söylenmektedir ve özellikle kan transfüzyonlarında kullanılmaktadır. Tam kan sayımlarında ise EDTA ACD (63)' ye oranla daha iyi bir şelatör ve antikoagülan etki göstermektedir.

Çalışmamızda laboratuvarımızda mevcut olan 5mL hacimli *sodyum sitrat* içeren tüpler kullanıldı. Çünkü EDTA' lı tüplerimizin hacimleri 3mL olduğu için elde edilen PRP örneğinin hacmi yetersiz olacağından kullanıma uygun görülmedi. Bazı deneysel in vivo çalışmalarda PC'lerin platelet içeriği 1.000.000/ μ L civarında olduğu zaman terapötik açıdan daha iyi sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır(50). Daha az platelet oranının ise tedavide yetersiz kalacağı aynı çalışmalarda belirtilmektedir.

Sağlıklı bireylerin tam kandaki trombositlerin normal aralığı 150.000/ μ l ila 350.000/ μ l. Trombosit konsantre etme çalışmaları genelde; trombositlerin başlangıçtaki konsantrasyonundan 3-5 kat artış şeklinde ortaya çıkmıştır(64,65,66). Bizim çalışmamızda da 1.000.000/ μ L ve üzeri çok sayıda sonuç elde edilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda yine trombosit içeren plazma hacminin en aza indirilmesi (PCP elde etmek) total transfüzyon hacmini azaltmakta olduğu için uygulanan bölgedeki basıncı ve ağrıyı da azaltmaktadır. Ayrıca uygulama kolaylığı da sağlamaktadır(67). Bizim de çalışmamızdaki amacımız mikrolitrede en yoğun plateletleri elde ederek tedavi etkinliğini arttırmak ve uygulamayı kolaylaştırmaktır.

Klinik uygulama tekniği ve plazma içerisindeki trombosit konsantrasyon oranı, PCP nin klinik etkililiğini etkileyen iki önemli değişkendir(68). Öncede bahsedildiği gibi PCP elde ederken temel iki teknik vardır; bunlar tek ve çift santrifüleme teknikleridir. Farklı çalışmaların sınırları dahilinde inceleme yaptığımızda doğru g kuvvetleri ve çevirme sürelerini kullanan çift santrifüj protokollerinin, tekli santrifüj protokolünden daha yüksek trombosit konsantrasyonlarını sağladığı sonucuna varılabilir (69,70,71). Bizim çalışmamızda yine çift santrifüj protokolü uygulanarak içerisinde WBC nin en az oranda olduğu oldukça iyi trombosit konsantrasyonları elde edilmiştir(1.000.000/ μ L-3.000.000/ μ L).

Yine son zamanlarda yapılan çalışmalar içerisinde çift santrifüj tekniğini kullanan Wehrich ve ark. tarafından belirtilen konsantrasyon değerlerine eşit veya daha yüksek konsantrasyonda platelet değerleri sağlanabileceğini doğrulamıştır(67,72,71,73,74).

Yapılan başka bir çalışma(50) yine doğru g-kuvvetleri ve döndürme zamanlarının kullanılmasının etkin bir platelet konsantre plazma (PCP) elde edilmesi için gerekli ve

doğru bir yol olduğunu doğrulamak üzere yapılmıştır. Sonuç olarak plateletlerde %57,31 ile %78,63 arasında bir geri kazanım elde etmişlerdir ve uyguladıkları prosedürler trombosit konsantrasyonunda 4,68 ile 5,59 kat artış sağlamıştır. Ayrıca PCP içerisinde en iyi platelet geri kazanımının %78,63 ve en yüksek platelet konsantrasyonunun ise 5,59 kat olarak elde edildiği bulunmuştur. Çalışmada sırasıyla birinci ve ikinci santrifüj aşamaları için 2100×g 2.30 dakika ve 4150×g 6 dakika süre kullanılmış. Elde edilen sonuçlar konsantrasyon oranları 2 ile 8,5 kat arasından daha küçük olan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında görülmüş ki kullanılan metod kabul edilebilir oranda ve sayıda platelet geri kazanımını sağlamaktadır(75,76).

Bununla birlikte, spesifik PRP protokolleri kullanıldığı zaman bile, elde edilen plazmanın trombosit konsantrasyonu, yalnızca farklı teknikler arasında değil, aynı zamanda belirli bir teknik içinde de değişiklik gösterebilmektedir. Çünkü PCP oranını etkileyen çok fazla sayıda etken vardır bunlar; yaş, cinsiyet, kanın vizkozitesi, trombositlerin yapısı, başlangıç trombosit konsantrasyonu, ısı, kullanılan preparatlar vb. (77). Örneğin son zamanlarda yapılan bir araştırma, belirli bir teknik çerçevesinde bile elde edilen plazma içerisindeki trombosit konsantrasyonlarının% 50 ye kadar değişebileceğini göstermiştir (77).

Yine benzer şekilde trombosit içeren plazmanın nihai trombosit konsantrasyonu, alınan tam kanın başlangıç hacminden etkilendiği gibi diğer taraftan kullanılan tekniğin trombosit geri kazanım verimliliği (PRP eldesi) ve trombositleri konsantre etmek için kullanılan son plazma hacmindende fazla oranda etkilenmektedir. Trombosit konsantrasyonundaki doğal değişikliklerin; örneğin **bireyler arası ve cinsiyetler arası** değişkenlerin yanı sıra bireyler içinde gözlemlenen trombosit parametrelerindeki günlük değişimler bile nihai ürünün tutarlılığını ve etkililiğini oldukça fazla oranda etkileyebilmektedir (78,79). Çalışmamızda sadece erkek bireyler tercih ederek bu farklılığı en azından cinsiyet bazında en aza indirmeyi amaçladık. Platelet eldesi için yapılacak olan araştırmalarda kullanılacak olan tam kan örneklerinin viskozitesi, trombosit şekil ve büyüklüğü birbirine en yakın örneklerden seçilmesi bahsedilen bu sorunların üstesinden gelinmesine yardımcı olacaktır.

Çalışmamızı yaparken bir takım başka sorunlarla da karşılaştık. WB örneğini aldıktan sonra ilk önce tam kan sayım cihazında hücre sayımı yapıp daha sonra santrifüj cihazında ilk santrifüj işlemine sokmamız gerekiyordu. Tam kan sayım cihazı ve santrifüj cihazımız arasındaki mesafenin uzak olmasından dolayı tam kanın santrifüj işlemine girmesinde azda olsa bir gecikme yaşandı. Bu da olabilecek kısmi bir pıhtılaşma (fibrin ağı) ve parçalanma halinde platelet sayımımızı etkileme ihtimalini arttırmaktadır. Yapılacak olan çalışmalarda kan alma işleminin çalışma ortamında yapılıp bekletilmeden işleme konulması daha sağlıklı olacaktır. Aynı zamanda kan sayım cihazı ve santrifüj cihazının birbirlerine yakın bulunması da bu bekleme sürelerini kısaltacaktır. Santrifüj işlemlerinden sonra elde edilen örneği komponentlerine ayırmak için manuel pipetleme işlemi kullandık. Bu işlem esnasında dikkatli olunmadığı takdirde bazen komponentler arasında bulaşma sebep olabilmektedir.

Çalışmalarda otomatik ayırmalı santrifüj enjektörlerinin kullanılması bu bulaşmayı en aza indirme imkanı sağlarken ayrılmak istenen komponentin tamamına yakını ayırma konusunda daha iyi yardımcı olacaktır. Oluşan pellet kısmını çözme işleminde kullandığımız çözücülerin (plazma ve PBS) ne kadar oranda iyi bir çözünme sağladığı ve plateletlerde parçalanmaya yol açıp açmadığı tam kontrol altına alınamamıştır. Ayrıca mekanik karıştırma esnasında platelet bütünlüğünün korunması durumunda tam kontrolümüz altında değildi. İlerde bu konularda tam kontrollü yeni çalışmalar yapılması; en iyi çözme tekniğinin ve çözme solüsyonunun geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak yapılan birçok araştırmayı inceledik ve verilerini değerlendirdik. Kendi deneme çalışmalarımızı yaptık ve verilerimizi diğer çalışmaların verileriyle karşılaştırdık ve sonuçlarını kaydettik. Sonrasında bütün bu bilgiler ışığında çalışmadaki şartlarımızın tümünü optimal düzeyde tutarak, olumsuzlukları en aza indirmeyi hedefledik. Böylece 600.000/ μ L -3.000.000/ μ L arası platelet konsantrasyonları elde etmeyi başardık.

Herşeye rağmen yapılan birçok çalışmada belirttiği gibi PCP eldesinin standardizasyonu oldukça zor ve üzerinde hâlâ çalışılması gereken bir durumdur.

6. KAYNAKLAR

1. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl JMed* 2007; 357: 2482-94.
2. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil* 2007; 9: 227-38.
3. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005; 16: 1043-54.
4. Amanda GM, Lana JF, D. Luzo AC et al. Research Article Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *ISRN Hematology* 2014;2014: 176060.
5. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118: 147.
6. Salemi S, Rinaldi C, Manna F et al. Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61: 1565-7.
7. Ebisawa K, Kato R, Okada M et al. Cell therapy for facial anti-aging. *Med J Malaysia* 2008; 63 Suppl A: 41.
8. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-8.

9. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-96.
10. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585-601.
11. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008; 22: 432-8.
12. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2002; 18: 27-33.
13. Araki J, Jona M, Eto H et al. Optimized Preparation Method of Platelet-Concentrated Plasma and Noncoagulating Platelet-Derived Factor Concentrates: Maximization of Platelet Concentration and Removal of Fibrinogen. *tissue engineering* 2012; 18:3.
14. İ.U. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Surekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyum Dizisi. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları ve Vaskuler Nedenli Kanamalar 2003; 36: 37-60.
15. Coller BS, French DL. Hereditary qualitative platelet disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U eds. *Williams Hematology*. 2001;6: 1551-1581.
16. Shattl SJ, Abrams CS, BennettJS et al. Acquired qualitative platelet disorders due to diseases, drugs and foods. *Williams Hematology*. 2001;6: 1583-1602.
17. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Academic Press. 2000;3: 233-287.
18. Schneiderman PI. The vascular purpuras. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U eds. *Williams Hematology*, McGraw-Hill. 2001;6: 1603-1616.

19. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987;10: 47–50.
20. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008;1:165-74.
21. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C et al. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 2008; 24: 159-67.
22. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J* 2003; 82: 598-602.
23. Bernuzzi G, Tardito S, Bussolati O et al. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. *Blood Transfus*.2010; 8: 237-47.
24. Driver VR, Hanft J, Fylling CP et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52: 68-70.
25. Dougherty EJ. An evidence-based model comparing the cost-effectiveness of platelet-rich plasma gel to alternative therapies for patients with nonhealing diabetic foot ulcers. *Adv Skin Wound Care*.2008; 21:568-75.
26. Carlson NE, Roach RB, Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Asso*. 2002; 133: 1383-6.
27. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 2003; 12: 24-34.
28. Sclafani AP. Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds. *J Cosmet Dermatol*; 9: 66-71.

29. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 1119-21.
30. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, et al. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent* 2009; 18: 303-10.
31. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br.* 2007; 89: 417-20.
32. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70: 6524-33.
33. Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal A, Sola I, et al. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration:a systematic review. *Transfusion* 2009; 49: 44-56.
34. Cooper DM, Yu EZ, Hennessey P, et al. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 1994; 219: 688-91; discussion 91-2.
35. Hunter R J, *Foundations of Colloid Science*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2001.
36. Kahn RA, Cossette I, Friedman LI. Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products. *Transfusion* 1976;16:162–165.
37. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22: 547-57.
38. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2007;16: 156-65.
39. Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med* 2010 ;83: 1-9.

40. Hom DB. New developments in wound healing relevant to facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*. 2008; 10: 402-6.
41. Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 12-23.
42. Gandhi A, Bibbo C, Pinzur M, et al. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 2005; 10: 621-37.
43. Crovetto G, Martinelli G, Issi M, et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci*. 2004; 30: 145-51.
44. Mishra A, Woodall J, Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med* 2009; 28: 113-25.
45. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34:665-71.
46. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, et al. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122: 1352-60.
47. Shen YX, Fan ZH, Zhao JG, et al. The application of platelet-rich plasma may be a novel treatment for central nervous system diseases. *Med Hypotheses*. 2009; 73: 1038-40.
48. Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013; 4:67.
49. Bird B, Steart EV, Lightfoot E, *Transport Phenomena*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2nd edition, 2007.

50. Pourmokhtar M, Salek M E , Abbasi F et al. Comparative Study of Four Platelet-Rich Plasma Methods for Preparing Platelet Concentrates. 2014;6:3
51. Slichter SJ, Harker LA, Preparation and storage of platelet concentrates. I. Factors influencing the harvest of viable platelets from whole blood. *British Journal of Haematology*. 1976; 34: 395–402.
52. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. 2008;84: 415–421.
53. Jo C H, Roh Y H, Kim J E, et al. Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation,” *The Journal of Oral Implantology*. 2013; 39: 525–532,
54. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000 ;58: 297–300.
55. Bausse O, Giraudo L, Veran J, et al. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *Biores Open Access*. 2012; 1: 115–123.
56. Araki J, Jona M, Eto H, et al. Optimized preparation method of platelet concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Engineering C: Methods*. 2012 ;18: 176–185
57. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *The Journal of Bone & Joint Surgery A*. 2012; 94: 308–316.
58. Fern´andez-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Avila-Ortiz G et al. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical Oral Implants Research* 2006; 17: 687–69.

59. Su CY, Kuo YP, Nieh HL, et al. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion* 2008; 48: 2414– 2420.
60. Zimmermann R, Reske S, Metzler P, et al. Preparation of highly concentrated and white cell-poor platelet-rich plasma by plateletpheresis. *Vox Sang* 2008; 95: 20.
61. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med* 2011; 39: 266.
62. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2008; 27: 158.
63. McShine RL, Sibinga S, Brozovic B. Differences between the effects of EDTA and citrate anticoagulants on platelet count and mean platelet volume. *Clin Lab Haematol* 1990; 12: 277
64. Jameson CA. Autologous Platelet Concentrate for the Production of Platelet Gel. *LabMedicine* 2007; 38:39-42.
65. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implants Dental*. 2001; 10:225-8.
66. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34:665-71
67. Mei-Dan O, Mann G, Maffulli N. Platelet-rich plasma: Any substance to it? *Br J Sports Med*. 2010; 44:618-9.
68. Li M, Zhang C, Yuan T, et al. Assessment study on a set of platelet-rich plasma preparation. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011; 25:112-6.

69. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet- rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4:67.
70. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27:158-67.
71. Nagata MJ, Messoria MR, Furlaneto FA, et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet- rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010; 4:395-402.
72. Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, et al. Comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1084-93.
73. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med.* 2011;39:266-71.
74. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17:184-90.
75. Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62: 489-96.
76. Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, et al. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:693-9.
77. Yuan N, Wang C, Wang Y, Yu T, Long Y, Zhang X, et al. Preparation of autologous platelet-rich gel for diabetic refractory dermal ulcer and growth factors analysis from it. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2008; 22 :468-71.

78. Vassallo RR, Murphy SA. critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13:323-30.
79. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What Is Platelet- Rich Plasma? *Oper Tech Sports Med.* 2011; 19:142-8.

