



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**İKİ FARKLI SİSTEM İLE ELDE EDİLMİŞ
TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN
ÖRNEKLERİNİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ
SALINIMI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

GİZEM KÖMÜRLÜ
UZMANLIK TEZİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi EMRE YAPRAK

KOCAELİ-2019



T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**İKİ FARKLI SİSTEM İLE ELDE EDİLMİŞ
TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN
ÖRNEKLERİNİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ
SALINIMI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

GİZEM KÖMÜRLÜ
UZMANLIK TEZİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi EMRE YAPRAK

Bu araştırma, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2019/054 proje numarası ile desteklenmiştir.

KOCAELİ-2019

KABUL VE ONAY

Bu tez Uzmanlık Tezi Standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Esra GÜZELDEMİR AKÇAKANAT

Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

(imza)

Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı uzmanlık öğrencisi Arş. Gör. Dt. Gizem KÖMÜRLÜ'nün hazırladığı "İKİ FARKLI SİSTEM İLE ELDE EDİLMİŞ TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN ÖRNEKLERİNİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ SALINIMI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı tez, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği/oyçokluğu ile Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emre YAPRAK

Uzmanlık Tezi Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

Tarih: 04/12/2019

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Haluk Emre Özel
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu tez çalışmasının Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi uzmanlık tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

04/12/2019

Gizem KÖMÜRLÜ



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca benden derin bilgi, tecrübesini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman gösterdiği sabır ve hoşgörüsüyle mesleki anlamda ilerlememe yardımcı olan, bu uzmanlık tezimin hazırlanması sürecinde büyük katkıları ve emekleri olan saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Emre YAPRAK'a,

Akademik katkılarıyla bana yol gösteren, uzmanlık eğitimim boyunca ikinci danışman hocam olarak gördüğüm, her konuda ilgisini ve desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübesiyle eğitimime katkı sağlayan saygıdeğer Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Esra GÜZELDEMİR AKÇAKANAT'a,

Uzmanlık eğitimim süresince teorik ve pratik anlamda bilgi ve tecrübelerini her daim paylaşmaktan çekinmeyen, anlayışla yol gösteren, saygıdeğer hocalarım başta Doç. Dr. Fatih Mehmet COŞKUNSES olmak üzere, Doç. Dr. Enver Alper SİNANOĞLU, Doç. Dr. Serkan SARIDAĞ, Dr. Öğretim Üyesi Ayşe KOÇAK BÜYÜKDERE ve Dr. Öğretim Üyesi Hatice HOŞGÖR'e,

Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde beraber görev yaptığım, uzmanlık eğitimleri bittikten sonra bile her zaman yanımda olan, çok değerli arkadaşlarım Uzm. Dt. Tuğçe ZEYTİNCİ ve Uzm. Dt. Ceren UĞURLUEL GÜLERYÜZ'e

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, yardımlarını bir an olsun esirgemeyen bölüm arkadaşlarım Meryem Hüsna AKKAYA, Vecihe Merve BALTA, Huriye ÇAKIR, Beyza ÇETİNER ve Damla ERDEM'e, benden yardımlarını, dostluklarını esirgemeyen, birlikte hoş vakitler geçirdiğimiz bölüm personellerimiz Nuray DEREKÖY, Şule AYDEYER, Esranur AKOL, Selda NİLHAN ve Alihan KORAL'a

Eğitim sürecim boyunca hem iyi hem kötü günlerimde yanımda olan, birlikte güzel anılar biriktirdiğimiz, ikinci ailem gibi olan, çok sevgili uzmanlık öğrencisi arkadaşlarım Gül UÇAR, Deniz AKIN, Pelin Ece ÜST, Feyza Nur DÜNDAR, Selen BOZKAYA, Sena KARGI, Sezen ALTINDIŞ, Sinem BAYRAM'a,

Tez çalışmamın deneyleri sürecinde bölüm laboratuvarlarından faydalanmamı sağlayan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Murat KASAP'a ve tezimin biyokimyasal analizleri sırasında değerli vaktini bana ayıran, birlikte çalışma şansı elde ettiğim, bilgi ve içtenliğiyle bana destek olan Sevinç YANAR'a ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım, meslektaşım Şevval BİLGİN'e,

Projemizi desteklediği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan benim bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman bana güvenen ve destek olan, kızları olmaktan gurur duyduğum canım annem Selvi KÖMÜRLÜ ve canım babam Sebahattin KÖMÜRLÜ'ye, varlığı mutlu olmama en büyük neden olan biricik kardeşim Ecem KÖMÜRLÜ'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araş. Gör. Dt. Gizem KÖMÜRLÜ

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK

KABUL VE ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

TABLOLAR DİZİNİ.....	4
RESİMLER DİZİNİ.....	5
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	6
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	7
1.ÖZET	9
2.SUMMARY	10
3.GİRİŞ ve AMAÇ.....	11
4.GENEL BİLGİLER	12
4.1.Kan Kaynaklı Biyomateryallerin Gelişimi	12
4.2 Trombosit Konsantreleri.....	13
4.2.1. Saf Trombositten Zengin Plazma (P-PRP)	20
4.2.2. Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma (L-PRP).....	21
4.2.3 Saf Trombositten Zengin Fibrin (P-PRF).....	21
4.2.4. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin (L-PRF).....	22
4.3. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanışı	23
4.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin İçeriği	26
4.4.1. Trombositler	27
4.4.1.1 Alfa Granüller.....	28
4.4.1.2. Delta Granüller	29
4.4.1.3. Lambda Granüller.....	29
4.4.2. Trombositlerin Alfa Granüllerindeki Büyüme Faktörleri	30
4.4.2.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü	31
4.4.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	31
4.4.2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü beta	32
4.4.2.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü.....	32
4.4.2.5. Trombosit Faktör-4	33
4.4.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü.....	33
4.4.2.7. Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü	34

4.4.2.8. Trombosit Kaynaklı Endotelial Hücre Büyüme Faktörü	34
4.4.2.9. Epitelial Hücre Büyüme Faktörü	34
4.4.3. Lökositler	34
4.4.4. Dolaşımdaki Kök Hücreler	36
4.4.5. Fibrin	36
4.5. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Biyolojik Etkileri.....	37
4.5.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi.....	37
4.5.2. Bağışıklığın Desteklenmesi	38
4.5.3. Yara Örtücülüğü	38
4.5.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transplantasyonu.....	38
4.6. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Avantajları	39
4.7. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Dezavantajları.....	39
4.8 Yakın Zamanda Geliştirilen Trombosit Konsantreleri.....	40
4.8.1. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-PRF)	40
4.8.2. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin + (A-PRF+).....	41
4.8.3. Titanyum Tüplerle Hazırlanmış Trombositten Zengin Fibrin (T-PRF)	41
4.8.4. Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin (I-PRF).....	42
4.8.5. Konsantre Büyüme Faktörü (CGF).....	43
4.8.6. Otojen Fibrin Yapıştırıcı (OFG).....	43
4.8.7. PRF Lizatı (<i>PRF-L</i>)	44
4.9. Santrifüj Cihazları.....	44
5. GEREÇ ve YÖNTEM	49
5.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması	49
5.2 Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	49
5.3 Kan Örneklerinin Toplanması	50
5.4 PRF Hazırlanması.....	52
5.5. Biyokimyasal Analizler.....	55
5.5.1. TGF- β ve VEGF Düzeylerinin ELISA ile Analizi	58
5.5.2. PDGF Düzeylerinin ELISA ile Analizi.....	59
5.6 Verilerin Analizi.....	61
6. BULGULAR	62
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
8. SONUÇLAR.....	77
9. KAYNAKLAR.....	78
10. EKLER	93

10.1. EK-1 ETİK KURUL ONAYI	93
10.2 EK-2 HASTA BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU	96
ÖZGEÇMİŞ	100



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Trombosit konsantrelerinin lökosit ve fibrin içeriğine göre ayrılması

Tablo 2. Santrifüj devir sayıları ve süreleri

Tablo 3. PRF tipleri ve santrifüj protokolleri

Tablo 4. Gönüllülere ait demografik veriler sunulmaktadır. Veriler, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmemektedir. Her veriye ait birim pg/g'dır.

Tablo 5. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım değerleri sunulmaktadır. Veriler, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

Tablo 6. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım seviyelerinin istatistiksel karşılaştırması. Veriler, çeyrek değerler genişliği olarak sunulmaktadır. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

Tablo 7. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım seviyelerinin cinsiyet göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen istatistiksel karşılaştırması sunulmaktadır. Veriler, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

Tablo 8. Herbir gruptaki erkek ve kadınlar arasındaki büyüme faktörü salınım seviyelerinin istatistiksel karşılaştırması sunulmaktadır. Veriler, median ve çeyrek değerler genişliği olarak ifade edilmektedir.

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. A: PRGF süpernatantı. B: Aktif sıvı PRGF. C: PRGF pıhtı. D: Otojen fibrin membran. (1)

Resim 2. PRF'nin santrifüj sonucu doğal görünümü ve membran haline getirilmiş hali

Resim 3. Choukroun tarafından geliştirilen PRF kutusu ve PRF'lerin yerleştirilmesi

Resim 4. PRF'in PRF kutusunda silindir disk haline getirilmesi

Resim 5. Masa üstü santrifüjün yarıçap ve RPM değerleri kullanılarak RCF değerinin bulunmasını sağlayan nomogram

Resim 6. Kullanılan kan alma tüpleri [Sağdaki kontrol grubunda (BD Vacutainer), Soldaki test grubunda (IntraSpin system) kullanılan kan alma tüpü]

Resim 7. Turnike

Resim 8. İğne (BD Vacutainer® Flashback Blood Collection Needle, 21 gauge, 25mm, green, Plymouth PL6 7BP, İngiltere)

Resim 9. Ara tutucu (BD Vacutainer® One Use Holder)

Resim 10. Kontrol grubunda kullanılan santrifüj cihazı [Hettich Mikro 22 R (Tuttlingen, Germany)]

Resim 11. Test grubunda kullanılan santrifüj cihazı [Intra-spin (Intra-Lock International, Boca-Raton, FL, USA)]

Resim 12. İçerisinde 4 ml DMEM bulunan 15 ml hacimli tüp ve PRF membranının elde edilmesinden 24. Saat sonra içerisinde 4 ml DMEM bulunan ikinci tüpe aktarılışı

Resim 13. PRF membranının steril presel aracılığı ile tüpten tüpe aktarımı

Resim 14. Örneklerin saklandığı -80 C°'lik Soğutucu (Sanyo, MDF-U6086S -86°C Ultra-Low Temperature Freezer)

Resim 15. 15 ml'lik tüplerin santrifüj edildiği cihaz [(Sigma 3-18K centrifuge (Sigma, Germany))]

Resim 16: 4 ml DMEM içeriğinin mikrosantrifüj tüplerine bölünmüş halleri

Resim 17. ELİSA kitinin içeriğinin ve çözdürülmüş DMEM örneklerinin santrifüj edildiği cihaz

Resim 18. TGF-β ve VEGF ELISA kitleri

Resim 19. PDGF ELISA kiti içeriği, kullanılan pipetler ve uçları

Resim 20. ELISA mikropate yıkayıcı (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, CA, USA)

Resim 21. ELISA mikropate optik okuyucu. (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific)

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Kondanse tetramoleküler (bilateral) bağlantıların bilgisayar ortamında oluşturulmuş modellemesi
- Şekil 2.** Trimoleküler (equilateral) bağlantıların bilgisayar ortamında oluşturulmuş modellemesi
- Şekil 3.** Tüpe uygulanan santrifüj kuvveti altında kanın bileşenlerine ayrılması
- Şekil 4.** Plazma bazlı sistemlerde santrifüj sonunda kanın parçacık kütlesi ile orantılı olarak bileşenlerine ayrılması
- Şekil 5.** P-PRP, P-PRF, L-PRP ve L-PRF'in matris ve hücre mimarisi şematize edilmiştir
- Şekil 6.** L-PRF protokolünü takiben tüpte oluşan tabakalar
- Şekil 7.** Trombosit hücresinin şematik gösterimi ve granüllerinden salınan maddeler
- Şekil 8.** PRF 'nin polimerizasyonu sonucu oluşan fibrin ağı bilgisayar ortamında oluşturulmuş 3 boyutlu modellemesi
- Şekil 9.** Santrifüjün temel parçaları
- Şekil 10.** Santrifüjleme sırasında tüp içindeki parçacıkların ayrışması ve çökmesi
- Şekil 11.** Farklı yarıçap uzunluklarında RPM ve RCF değerlerinin değişimi.
- Şekil 12.** Sabit açılı santrifüjlerde tüp içindeki örneğin katmanlarının yerleşimi
- Şekil 13.** Çalışma akış şeması yukarıya verilmiştir.
- Şekil 14.** Örneklerin toplandığı tüplerin sayısının şematik gösterimi
- Şekil 15.** Kullanılan ELISA kitlerinin çalışma prensibinin şematik gösterimi

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

ADP	Adenozindifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
A-PRF	Gelişmiş trombosit zengin fibrin
A-PRF +	Gelişmiş trombosit zengin fibrin plus
CE	Conformite European
CGF	Konsantre büyüme faktörleri
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
ECGF	Epitelyal hücre büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi/ U.S. Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FXIII	Faktör XIII
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN-γ	İnterferon gama
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
I-PRF	Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin
L-PRF	Lökosit ve trombosit zengin fibrin
L-PRP	Lökosit ve trombosit zengin plazma
LSCC	Düşük hızla santrifüjleme konsepti
MIP-1α	Makrofaj inflamatuvar protein 1-alfa
MIP-1β	Makrofaj inflamatuvar protein 1-beta
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMP-1	Matriks metalloproteinaz-1
MMP-3	Matriks metalloproteinaz-3

MMP-8	Matriks metalloproteinaz-8
OFG	Otojen fibrin yapıştırıcı
PD-ECGF	Trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörü
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDGF-AA	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü AA izomeri
PDGF-AB	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü AB izomeri
PDGF-BB	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü BB izomeri
PF-4	Trombosit faktör-4
PPP	Trombositten fakir plazma
P-PRF	Saf trombositten zengin fibrin
P-PRP	Saf trombositten zengin plazma
PRF	Trombositten zengin fibrin
PRF-L	PRF Lizatı
PRGF	Büyüme faktörlerinden zengin plazma
PRP	Trombositten zengin plazma
r	Yarıçap
RCF	Göreceli santrifüj kuvveti
rhPDGF	Rekombinant trombosit kaynaklı büyüme faktörü
RPM	Dakikadaki Dönme Sayısı
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa
T-PR	Titanyum ile hazırlanan trombositten zengin fibrin
T-PRF	Titanyum tüplerle hazırlanmış trombositten zengin fibrin
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ÖZET

İki Farklı Sistem İle Elde Edilmiş Trombositten Zengin Fibrin Örneklerinin Büyüme Faktörleri Salınımı Açısından Karşılaştırılması

Trombosit konsantreleri günümüz diş hekimliğinde yaygın olarak uygulanan ürünler arasındadır. Trombositten zengin fibrin (Platelet-rich fibrin-PRF) ortaya koyduğu çeşitli avantajlar nedeni ile en çok kullanılan trombosit konsantrelerindedir. PRF hazırlanış protokolü herkese açık olup, farklı marka santrifüj cihazı ve kan alma tüpleri kullanılarak belirtilen santrifüj parametreleri kullanılarak elde edilebilir. Literatürde, bazı araştırmacılar tarafından ticari bir marka olarak satılan L-PRFTM sisteminin bazı yönlerden üstün olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur. L-PRFTM sistemi ile elde edilen PRF örneklerini, başka marka santrifüj cihazı ve kan alma tüpleri kullanılarak hazırlanan PRF örnekleri ile kıyaslayan çalışmalar sınırlıdır. Bu uzmanlık tez çalışmamızın amacı, L-PRFTM sistemi ile elde edilen PRF örneklerini, Hettich Mikro 22R markalı santrifüj cihazı ve BD Vacutainer marka kan alma tüpleri ile elde edilen PRF örnekleri ile bazı büyüme faktörlerinin *in vitro* salınımı açısından karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, sistemik olarak sağlıklı 12 gönüllüden elde edilen kan örneklerinden hem L-PRFTM sistemi ile (test grubu) hem de diğer marka cihaz ve malzemeler (kontrol grubu) kullanılarak hazırlanan PRF örnekleri elde edildi. Örnekler membran haline getirildikten sonra 4 ml Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM) bulunan falkon tüplere aktararak 1., 24. ve 72. saatlerdeki transforme edici büyüme faktörü β , trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü salınımları açısından ELISA yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, hiçbir zaman diliminde incelenen büyüme faktörlerinin salınımı açısından farklı cihaz ve malzemeler kullanılarak hazırlanan PRF tipleri açısından fark bulunamamıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında; L-PRFTM sistemi ile elde edilen PRF örneklerinin, Hettich Mikro 22R marka santrifüj cihazı ve BD Vacutainer marka kan alma tüpleri ile elde edilen PRF örneklerine göre, çeşitli büyüme faktörlerinin *in vitro* salınımı açısından üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Trombositten zengin fibrin, Santrifüj cihazı, Kan alma tüpü, Transforme edici büyüme faktörü β , Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, Vasküler endotelial büyüme faktörü

SUMMARY

The Comparison of Growth Factor Release Pattern of Two Different Platelet-Rich Fibrin Systems

Among the biomaterials used in dental practice, platelet concentrates became popular in recent decades. Platelet-rich fibrin (PRF) is frequently used due to its clinical advantages. PRF preparation procedure is an open-access protocol which can be conducted using different centrifuge devices and blood collection tubes. In the literature, some researchers reported the superiority of a commercially available PRF preparation system, L-PRF™, within various aspects. There are limited studies comparing the quality of samples obtained by L-PRF™ system with PRF samples prepared with other equipments which are used in laboratory routine. The aim of this thesis was to compare L-PRF™ system with Hettich Mikro 22R centrifuge device and BD Vacutainer blood tubes in terms of *in vitro* release levels of some growth factors. Accordingly, PRF samples were prepared using L-PRF™ system (test group) and other equipment (control group) which were acquired from systemically healthy 12 volunteers. PRF samples in membrane form were placed in falcon tubes containing 4 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium and the release of transforming growth factor- β 1, platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor at 1, 24 and 72 hours were then analyzed by ELISA. According to the results, there is no statistical difference between both PRF types in each time period with respect to the release of any investigated growth factors. Based on the the results of this study, it can be concluded that there is no superiority of PRF samples prepared by L-PRF™ system in terms of *in vitro* release of some growth factors comparing with PRF samples obtained using Hettich Mikro 22R centrifuge device and BD Vacutainer tubes.

Key Words: Platelet-rich fibrin, centrifuge devices, blood collection tubes, transforming growth factor- β , platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Trombosit konsantreleri arasında yer alan trombosit zengin fibrin (Platelet-rich fibrin – PRF) ortaya koyduğu çeşitli avantajlar nedeniyle diş hekimliği ve bazı tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolay ve hızlı elde edilebilmesi, kişinin kendi kanı dışında yabancı herhangi bir ajanın kullanılmaması, biyouyumluğu ve görece maliyetinin düşük olması PRF'in yaygın kullanımının altında yatan sebeplerdir. PRF'in hazırlanış protokolü herkese açıktır. PRF klinik ortamında herhangi bir cam ya da silika kaplı plastik tüplerin belirli devir/dakikada santrifüj edilmesi ile elde edilebilmektedir. Ticari olarak bazı markalar altında PRF elde etme sistemleri mevcuttur. Bu sistemlerin içeriğine bakıldığında, kan alma malzemeleri, silika kaplı plastik tüpler, santrifüj cihazı ve PRF örneklerini membran veya disk formuna dönüştürmek için kullanılan aparatlar dışında başka bir materyal içermediği bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı, ticari bir PRF hazırlama sistemi olan L-PRFTM kullanılarak elde edilen PRF örneklerinin farklı zaman dilimlerindeki *in vitro* büyüme faktörü salınım düzeylerini, rutin laboratuvar malzemesi olarak kullanılan Hettich Mikro 22R markalı santrifüj cihazı ve BD Vacutainer markalı kan alma tüpleri ile elde edilen PRF örnekleri ile kıyaslamaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kan Kaynaklı Biyomateryallerin Gelişimi

Kan dokusu, hem hücresel, hem de plazma bileşenlerine sahip terapötik bir kaynaktır. Hücresel bileşenler bakımından baskın olarak eritrositleri, trombositleri ve lökositleri içerir. Plazma bileşenlerinin %90'lık kısmı sudan, geriye kalan %10'luk kısmı da iyonlar, proteinler, atıklar ve çözünmüş gazlardan oluşur. Kan kaynaklı ürünlerin terapötik amaçlı kullanımı geçmişten günümüze kadar uzanmaktadır.

Günümüzden yaklaşık 50 yıl öncesinde, kan kaynaklı biyomateryaller ilk kez “fibrin yapıştırıcılar” adı altında yara iyileşmesini uyarmak ve yara bölgesinin izolasyonunu sağlamak gibi amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Plazma ürünlerinin (trombin ve fibrinojen) kombinasyonu ilk kez Cronkite ve ark. tarafından 1944'de yanık tedavisinde basınçla beraber deri greftinin adezyonunu artırmak için kullanılmıştır (1,2). Fibrin yapıştırıcılar, hemostazı sağlamanın yanı sıra lökosit, makrofaj ve fibroblastların infiltrasyonu için fiziksel destek sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (3,4) . Matras ve ark. (1972) deneysel çalışmalarının sonucunda ilk biyomateryal olan fibrin yapıştırıcıyı periferik sinir onarımı için kullanmaya başlamıştır (4). Mekanizması, trombin, faktör XIII (FXIII), fibronektin ve iyonize kalsiyum varlığında fibrinojenin fibrine dönüştüğü koagülasyon kaskadının son basamağını taklit etmektir. Allojen ve otojen olarak elde edilebilir. Otojen olanlar, terapötik kullanım için allojenik olanlara kıyasla kontaminasyon riski açısından daha güvenlidirler. Ancak üretim protokollerinin karmaşıklığı ve maliyeti nedeniyle kullanımları çok sınırlı kalmaktadır (5). Otojen kaynaklı fibrin yapıştırıcılarının cerrahi sahada fiziksel streslere (basınç, gerilme vs.) karşı direncinin yetersiz olması, plazmalarındaki fibrinojen yoğunluklarının düşük olmasına bağlanmaktadır. Bu özelliği, cerrahi işlemlerde biyolojik sızdırmazlık sağlama amaçlı kullanımlarını engellemiştir (6). Ayrıca biyomateryalin içeriğinde trombosit bulunmamasının biyolojik ve fiziksel özelliklerini olumsuz etkilediği anlaşılmıştır (7). Bu dezavantajları sebebiyle fibrin yapıştırıcılar klinik olarak sınırlı kullanılmışlardır.

İlerleyen yıllarda trombosit hücrelerinin yara iyileşmesindeki temel etkilerinin anlaşılması ile beraber; ‘Trombosit-Fibrinojen-Trombin Karışımı’ olarak adlandırılan içinde trombositleri de bulunduran fibrin yapıştırıcıları geliştirilmiştir (8,9). Böylece hem fibrinin mekanik yapısı doğal bir yöntemle güçlendirilmiş hem de trombositlerin yara

iyileşmesindeki iyileştirici özelliklerinden faydalanılmıştır. Trombosit konsantreleri son dönemde gündeme gelen kan kaynaklı biyomalzemelerdir.

4.2. Trombosit Konsantreleri

Yıllar boyunca gerçekleştirilen deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen olumlu veriler ışığında, trombosit konsantrelerinin çeşitli amaçlarla kullanımı gündeme gelmiş ve yaygınlaşmıştır. Oral ve maksillofasiyal cerrahi, oftalmoloji, plastik cerrahi alanlarında, cilt lezyonları ve spor hekimliğinde cerrahi prosedürlerde yara iyileşmesini hızlandırmak, doku rejenerasyonunu desteklemek için sıklıkla kullanılmaktadır.

Trombosit konsantreleri iki kuşak olarak ele alınmaktadır (10). Bunlar:

1-Birinci kuşak trombosit konsantreleri:

- Trombositten zengin plazma (Platelet-rich plasma / PRP)
- Büyüme faktörlerinden zengin plazma (Plasma rich in growth factors / PRGF)

2-İkinci kuşak trombosit konsantreleri:

- Trombositten zengin fibrin (Platelet-rich fibrin / PRF)
- Titanyum ile hazırlanan trombosit zengin fibrin (Titanium-prepared platelet-rich fibrin / T-PRF)
- Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (Injectable Platelet-rich fibrin / I-PRF)
- Konsantre büyüme faktörleri (Concentrated growth factors / CGF)

Trombositten zengin kan konsantrelerinin klinik faydaları, çok sayıda mitojenik trombosit kaynaklı büyüme faktörlerini içermeleri ile ilişkilendirilmektedir. Trombositlerin içeriğinde yoğun miktarda bulunan büyüme faktörlerinin hücre büyümesi ve bölünmesi üzerine etkili olduğu 1970'li yıllarda gösterilmesine rağmen, trombosit konsantreleri uzun yıllar boyunca hemostatik ve yapıştırıcı amaç ile kullanılmışlardır (11,12). Ancak, son dönemlerde trombositlerin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu özelliklerinin daha çok ön plana çıkması ile yara iyileşmesi ve dolayısıyla rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında hem *in vitro* çalışmalarda hem de *in vivo* uygulamalara konu olmaktadır (13–15).

Trombosit konsantrelerinin lokal uygulamalarda iyileşmeyi hızlandırdığını gösteren ilk klinik bulgu 1986 yılında Knighton ve ark. tarafından bildirilmiştir (16). İki aşamalı santrifüj prosedürü kullanarak elde ettikleri biyomateryali "Trombosit kaynaklı yara iyileşme faktörü" (Platelet-Derived Wound Healing Factors) olarak tanımlamışlardır. Çalışmalarında iyileşmeyen kronik kütanöz ülserlere sahip 49 hastaya uygulanan bu biyomateryal ile iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (16) .

Whitman ve ark. 1997 yılında oral ve maksilofasiyal uygulamalarda fibrin yapıştırıcısına alternatif olarak elde ettikleri otolog biyomateryale "Trombosit Jeli" (Platelet Gel) adını vermişlerdir. Biyolojik sızdırmazlığı olan bu jel içerisinde trombositlerin aktivasyonu ile büyüme faktörlerinin ortaya çıkmasının, sert ve yumuşak doku iyileşmesini desteklediğini öne sürmüşlerdir (17).

Birinci nesil trombosit konsantreleri, trombosit zengin plazma (PRP) ve büyüme faktöründen zengin plazmayı (PRGF) kapsar. PRP, tam kanın santrifüjüyle elde edilen ve tam kandan daha fazla trombosit konsantrasyonuna sahip olan otojen plazmadır. Her üniteye ortalama $0,5 \times 10^{11}$ trombosit içerdiği rapor edilmiştir (4). Hastanın kendi kanından elde edildiği için kan yoluyla bulaşan hastalıkların bulaşma riskinin ortadan kalkmış olduğu ifade edilmektedir (18). PRP diş hekimliğinde ise ilk olarak 1998 yılında Marx ve ark. tarafından maksillofasiyal rekonstrüksiyon uygulamasında kullanılmıştır (19,20). Transfüzyon tıbbında da lösemi, medullar aplazi veya uzun cerrahi işlemler sonrasında oluşan şiddetli trombositopeninin tedavisi veya engellenmesi amacıyla kullanılmıştır (18,21).

Doğal bir kan pıhtısı % 95 eritrosit, % 5 trombosit, % 1'den daha az lökositten oluşurken, PRP % 95 trombosit, % 4 eritrosit, ve % 1 oranında lökosit ihtiva eder (22). Yüksek oranda pıhtılaşma faktörleri ve büyüme faktörleri de içermektedir. İçeriğindeki yüksek trombosit konsantrasyonu ve hücrel adezyon molekülleri sayesinde biyolojik aktivite gösterebilen bir yapı olduğunu bildirmişlerdir (23). PRP uygulanan cerrahi alanlarda trombosit sayısında % 338 oranında artış saptanmıştır (24). PRP' deki trombositler trombinin eklenmesi ile aktive olduğunda yara iyileşmesini hızlandıran büyüme faktörlerini ve sitokinleri serbestlemeye başlar. Trombosit sayısı ile orantılı olarak, ortama salınan faktörlerin miktarı arttıkça yara bölgesinde travmaya olan fizyolojik yanıt da artmış olur. PRP tek başına osteoindüktif özellik göstermemektedir. Fakat çok az sayıda

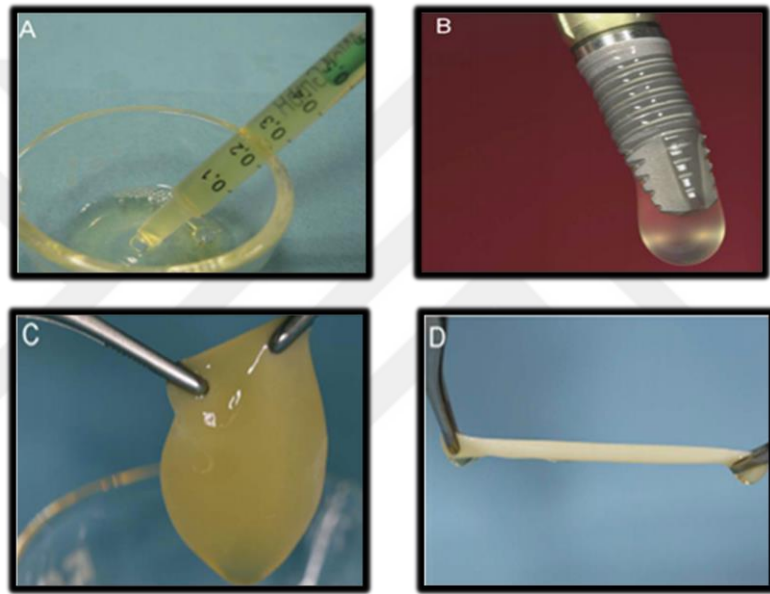
bulunan kök hücrelerin sayısını artırarak ve mitogenezini stimüle ederek kemik rejenerasyonuna etki ettiği ve kemik yapımını hızlandırdığı düşünülmektedir. PRP'nin doku rejenerasyonunu artırıcı etkisi ile ağrı ve enfeksiyonu azalttığı açıklanmıştır (19,25).

PRP'yi hazırlamak amacı ile genellikle iki aşamalı santrifüj prosedürü kullanılmaktadır. Hazırlanışı sırasında dışardan yapay olarak sığır trombini ve kalsiyum klorid ilave edilerek ani fibrin polimerizasyonu başlatılır. Bu durum sitokinler ve fibrin arasındaki sinerjinin kaybına yol açarak, sitokin ve büyüme faktörlerinin kısa ömürlü, hızlı salınımına neden olur (26). Sığır trombinine karşı nadiren oluşan reaksiyonlar sebebiyle biyomateryale daha az miktarlarda trombin eklenmeye başlanmıştır. Fakat bu durum da PRP' nin mekanik özelliklerini olumsuz etkilediği için klinik olarak uygulanmasını güçleştirmiştir (27). Büyüme faktörlerinin salınımının kısa süreli olması, PRP'nin rejeneratif özelliğinin sınırlı kalmasına neden olmuştur (18).

Maliyetinin yüksek olması, hazırlama sürecinin birçok basamaktan oluşması ve dışarıdan yapay kimyasal maddelerin eklenerek elde edilmesi gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve dolayısıyla biyomateryalin etkinliğini artırmak için, birçok araştırmacı farklı santrifüj kuvvetleri (160-3000 g) ve süreleri uygulayarak birbirlerinden farklı protokoller geliştirmiştir. PRP'yi hazırlama aşamasında kullanılan pıhtılaşmayı sağlayıcı maddelerdeki ve miktarlarındaki değişiklikler de çok sayıda PRP metodunun geliştirilmesini beraberinde getirmiştir. Literatürde 30'dan fazla farklı protokol ve kitlerle elde edilmiş trombosit zengin plazma ürünü rapor edilmiştir. Bununla beraber, elde edilen biyomateryallerin, içeriği ve yapısal özellikleri gözetilmeksizin PRP olarak adlandırılması literatürde terminolojik karmaşıklığa sebep olmuştur (28). Hazırlama kitleri ticarileştirilen bu ürünlerin trombosit zenginliğine, uygulama protokolüne, lökosit ve protein içerip içermemesine göre etkinlikleri ve güvenilirlikleri farklılık gösterebilmektedir (29).

Birinci kuşak trombosit konsantrelerinden bir diğeri, 1999 yılında Anitua tarafından "Büyüme faktörlerinden zengin plazma" (PRGF) olarak tanımlanmış olan, kanın tek aşamalı santrifüj prosedürü ile elde edilen, büyüme faktörleri açısından zengin, plazma bazlı olan bir biyomateryaldir (22,23). PRGF'de koagülasyon kaskadını aktive etmek amacıyla kalsiyum klorid kullanılmaktadır. Kalsiyum klorid, trombine göre daha yavaş gelişen bir polimerizasyona neden olarak üç boyutlu fibrin matriks oluşmasını sağlar. Bu polimerizasyon şekli, fibrin matriksten büyüme faktörü salınımının uzun süreli olmasına

neden olmaktadır (31). PRGF'nin içeriğinden lökositlerin eliminasyonu ile, hem ürünün homojenitesi artırılmış, hem de lökositlerin içeriğinde bulunan metalloproteazlar ve asit hidrolazlar gibi inflamasyon önleyici ajanların fibrinin ağ yapısına olumsuz etkilerinin en aza indirildiği belirtilmektedir (32). PRGF'yi diğer trombosit konsantrlerinden farklı kılan diğer bir özellik, biyomateryalin terapötik amaçla kullanılacak fraksiyonlarının çeşitliliğidir (Resim 1). Hastadan alınan örneklerden pıhtılaşma ve aktivasyon seviyelerine göre PRGF'nin dört farklı fraksiyonu elde edilebilir. Bu özellik biyomateryalin geniş yelpazede kullanımına olanak vermektedir (33).



Resim 1. A: PRGF süpernatantı. B: Aktif sıvı PRGF. C: PRGF pıhtı. D: Otojen fibrin membran. (1)

Hazırlık aşamalarındaki pipetlemedeki farklılıklar sebebi ile lökositlerin tam olarak ortadan kaldırılmadığı ve hazırlanan biyomateryalin, PRP'nin lökositten fakir formu olarak tanımlanmasının daha doğru olabileceği görüşü (34,35).

Yukarıda belirtilen trombosit konsantrlerinin gelişimi incelendikten sonra, PRP ve PRGF'nin santrifüj parametrelerindeki ve formülasyonlarındaki tutarsız sonuçlar ve hazırlama aşamalarındaki zorluklarından dolayı, 2001 yılında farklı bir trombosit konsantrisi geliştirilmiştir (36). İkinci nesil trombosit konsantrisi olarak gündeme gelen bu yeni biyomateryal, Fransız araştırmacı Joseph Choukron ve ark. tarafından

“Trombositten Zengin Fibrin (PRF) ” olarak adlandırılmış (2001) ve Dohan ve ark. tarafından 2006 yılında ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (7,26,37).

Trombosit konsantrelerinin en çok kabul gören sınıflandırması Dohan ve ark. (2009) tarafından bildirilmiştir (34). Bu sınıflandırma, materyalleri lökosit ve fibrin içeriğine göre 4 kategoriye ayırmaktadır. Bunlar:

- Saf trombosit zengin plazma (P-PRP)
- Lökosit ve trombosit zengin plazma (L-PRP)
- Saf trombosit zengin fibrin (P-PRF)
- Lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-PRF)

Tablo 1. Trombosit konsantrelerinin lökosit ve fibrin içeriğine göre ayrılması (30).

TROMBOSİT KONSANTRELERİ		
P-PRP	Otomatik Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• Plazmaferez• Vivostat PRF
	Manuel Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• Anitua's PRGF• Nahita PRP
L-PRP	Otomatik Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• PCCS PRP• SmartPReP PRP• Magellan PRP• Angel PRP• GPS PRP
	Manuel Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• Friadent PRP• Curasan PRP• Regen PRP• Plateltext PRP• Ace PRP
P-PRF	Manuel Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• Fibrinet PRFM
L-PRF	Manuel Protokoller	<ul style="list-style-type: none">• Choukroun's PRF

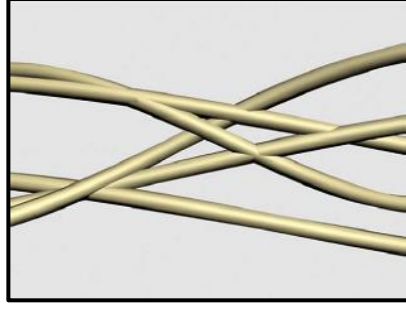
Trombosit konsantreleri sınıflandırılırken 3 ana parametre baz alınarak sınıflandırılmıştır (33). Bunlar:

1. Kullanılan santrifüjler ve hazırlama kiti ile ilgili parametreler: Bu yöntemlerin hali hazırda cerrahi işlemlerde kullanılması için, santrifüjün büyüklüğü, hazırlama süresi, cihazın ve kiti maliyeti kaydedilebilir unsurlardır. Bunların yanında kiti kullanışlılığı ve

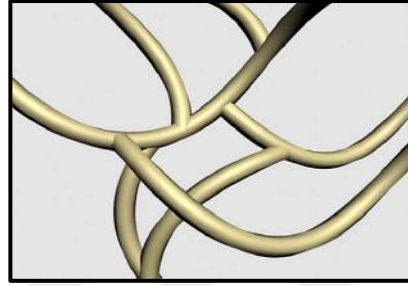
hazırlama sürecinin nr derecede karmaşık olduğu da önem arz eder. Karmaşık ve detaylı hazırlama süreçleri, biyomateryalin elde edilememesi veya yanlış kullanımlarına yol açması sebebiyle farklı sonuçlara yol açabildiği için ticari kitler geliştirilmiştir (34).

2. Konsantrenin içeriği ile ilgili parametreler: Kullanılabilir hacimde trombosit konsantresi elde edilebilmesi yeterli miktarda kanın elde edilmesine bağlıdır. Trombositlerin ve lökositlerin yeterli oranda toplanması ve sürecin tamamında zarar görmeden korunması, trombosit konsantresinin terapötik özelliklerini etkilemektedir (34).

3. Uygulama sırasında lökosit ve trombosit konsantrasyonunu destekleyen fibrin yapı ile ilgili unsurlar: Fibrin ağ yoğunluğu, fibrinojen konsantrasyonu ile belirlenir (39). Birçok protokol düşük yoğunluklu bir fibrin ağ yapısı üretmektedir. Fakat bu özellikteki fibrin ağlar, uygun bir cerrahi uygulamaya izin verse de gerçek bir fibrin desteği sağlayamamaktadır. Buna karşılık, fibrin ağının yüksek yoğunluklu olması, fibrinin potansiyel iyileştirici etkileri olabileceği, trombosit konsantrelerinin bir biyomateryal olarak kabul edilebileceği anlamına gelir (40). Fibrinin polimerizasyon süreci, fibrinojen ve trombin konsantrasyonları ve fibrin ağının son halinin biyomekanik özelliklerini göz önünde bulundurarak değerlendirilmelidir. Fibrinojenin, trombin sayesinde fibrine dönüşümü gerçekleşir ve fibrin ağını oluşturan fibrin lifler iki ayrı biyokimyasal mimari sergileyebilir. Bunlar; kondanse tetramoleküler (bilateral) ve bağlı trimoleküler (equilateral) bağlardır (39). Yüksek trombin konsantrasyonlarında, şiddetli bir aktivasyon ve polimerizasyon sonucunda, fibrilleri arasında tetramoleküler (bilateral) bağlantılar olan fibrin oluşur. Bu fibrin yapısı sitokinlerin ve hücrelerin göçüne uygun olmayan rijit bir monofiber ağ yapısındadır. Yavaş, fizyolojik bir fibrin polimerizasyonu sonucunda ise fibrilleri arasında trimoleküler (equilateral) bağlantılar olan, sitokinlerin ve hücrelerin göçünü destekleyebilen, esnek, multifibriler bir fibrin oluşur (39). PRF elde edilirken, trombin kullanılmadığı için diğer trombosit konsantrelerine göre daha fizyolojik ve yavaş bir fibrin polimerizasyonu meydana gelir. Dolayısıyla, fibrinojen konsantrasyonu, fibrin yoğunluğu ve polimerizasyon türü, trombosit konsantrelerinin biyolojik özelliklerini etkilemektedir (34).

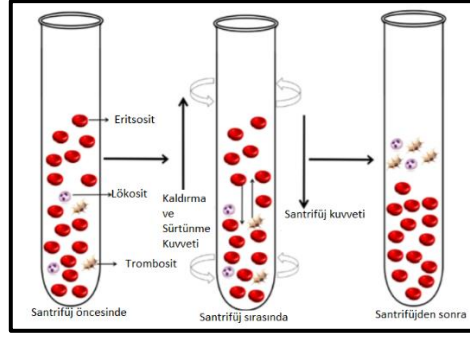


Şekil 1. Kondanse tetramoleküler (bilateral) bağlantıların bilgisayar ortamında oluşturulmuş modellemesi (26).



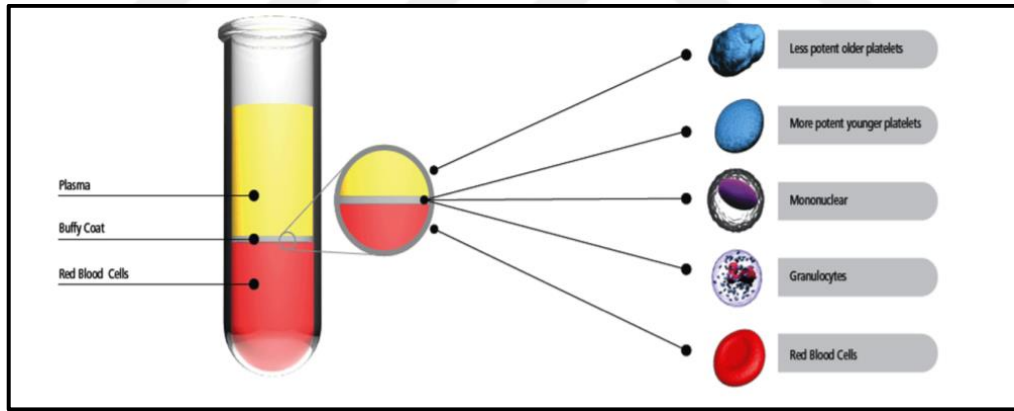
Şekil 2. Trimoleküler (equilateral) bağlantıların bilgisayar ortamında oluşturulmuş modellemesi (26).

Trombosit konsantrelerini elde ederken uygulanan teknik, tam kanın santrifüjleme tekniği ile seçici olarak bileşenlerine ayrılmasıdır (41). Belirli santrifüj kuvvetleri altında kanın bileşenlerine ayrılması Stokes yasası olarak adlandırılan fizik kanununa dayanmaktadır. Bu kanuna göre santrifüj işlemi esnasında tüp içindeki kana etkiyen birkaç kuvvet vardır. Tüpe etkiyen santrifüj kuvveti ile kandaki partiküller tüpün tabanına doğru hareket ederler. Santrifüj kuvvetine ters yönde etkiyen sürtünme ve kaldırma kuvvetleri santrifüj kuvvetini etkisiz hale getirir. Kan belirli bir süre, yüksek devirlerde santrifüje maruz bırakıldığında oluşan santrifüj kuvveti kaldırma ve sürtünme kuvvetlerini aşar. Sonuçta, dönme merkezinden tüpün tabanına doğru etki gösteren net bir santrifüj kuvveti oluşur. Parçacık yoğunluğu sıvı ortamın yoğunluğuna eşit olduğunda sedimentasyon oranı sıfırdır. Partikülün yoğunluğu ile sıvı ortamın yoğunluğu arasındaki farkla orantılı olarak ve merkezkaç kuvveti (g) arttıkça sedimentasyon hızı artar. (42). Santrifüj kuvveti, partiküller üzerinde etkisini partiküllerin boyutları ile orantılı olarak gösterir. Nispeten daha büyük çapa sahip eritrositler ve lökositler, tüpün alt kısmına yerleşirken; trombositler, plazma ile birlikte tüpün üst kısmına doğru itilir. Bu fenomen, trombositlerin kandan seçici olarak ayrılmasına izin verir (Şekil 3) (18,41) .



Şekil 3. Tüpe uygulanan santrifüj kuvveti altında kanın bileşenlerine ayrılması (43).

Hazırlanmak istenen biyomateryalin karakterine bağlı olarak, elde edilen kan örneklerine bir veya iki basamaklı santrifüj işlemi uygulanır (41,44,45). PRF gibi dışarıdan herhangi bir antikoagülan madde eklenmeden elde edilen trombosit konsantrlerinde ise santrifüj sırasında pıhtılaşma ve kan bileşenlerinin ayrılması eş zamanlı meydana gelir (43). Santrifüj sonucunda, kan pıhtısı esas olarak trombositler, lökositler ve fibrin tarafından oluşurken; eritrositler, kan pıhtısından etkili bir şekilde ayrılmış olur (Şekil 4) (23,43).



Şekil 4. Santrifüj sonrasında kanın parçacık kütlesi ile orantılı olarak bileşenlerine ayrılması, en altta eritrositler, orta kısımda lökositler ve en üst kısımda plazma içinde tüpün üst kısmına doğru azalan yoğunlukta dağılmış trombositler bulunmaktadır (46).

4.2.1. Saf Trombosit Zengin Plazma (P-PRP)

Aktivasyonlarından sonra içeriğinde lökosit bulunmayan ve düşük yoğunluklu bir fibrin ağına sahip olan biyomateryallerdir. Bu ürünler, sıvı solüsyon veya aktif jel formunda elde edilebilir. Sıvı formu enjekte edilerek, jel formu da cilt yarası veya suture üzerine yerleştirilerek kullanılabilir. Elde edilmeleri için hücre ayırıcıları (plazmaferez) kullanan

birçok yöntem mevcuttur, fakat bu yöntemler günlük uygulamalarda kolaylıkla kullanılamayacak kadar karışıktır. P-PRP yöntemi, büyük ölçüde PRGF ticari adı ile bilinmektedir (1). P-PRP'nin diğer elde edilme tekniği ise Vivostat PRF ticari ismi ile bilinmektedir. Vivostat PRF, adının PRF olması ancak elde edilen materyalin PRP yapısında olması nedeniyle literatürde karışıklığa neden olmuştur (34).

4.2.2. Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma (L-PRP)

P-PRP gibi bu ailenin tüm ürünleri sıvı solüsyon veya aktive jel formunda kullanılabilir (47). Aktivasyondan sonra içeriğinde lökosit bulunması ve düşük yoğunluklu fibrin ağ yapısında olması ile karakterizedir. Bu kapsamda; ortopedik ve genel cerrahi ile spor tıbbında kullanılan çok sayıda ticari veya deneysel sistem bulunmaktadır. Bunların içinde, maksimum seviyede standardizasyona izin veren çok sayıda spesifik kitlerin kullanılmasını gerektiren, özellikle Harvest Smart-PreP (Harvest Technologies, Plymouth, MA, ABD) ve Biomet GPS III (Biomet Inc., IN, ABD) gibi birçok otomatik protokol bulunmaktadır. Ancak, Plateltex (Prag, Çek Cumhuriyeti) ya da Regen PRP (RegenLab, Le Mont-sur-Lozan, İsviçre) gibi daha fazla işlem gerektiren diğer protokoller de mevcuttur (47,48).

4.2.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (P-PRF)

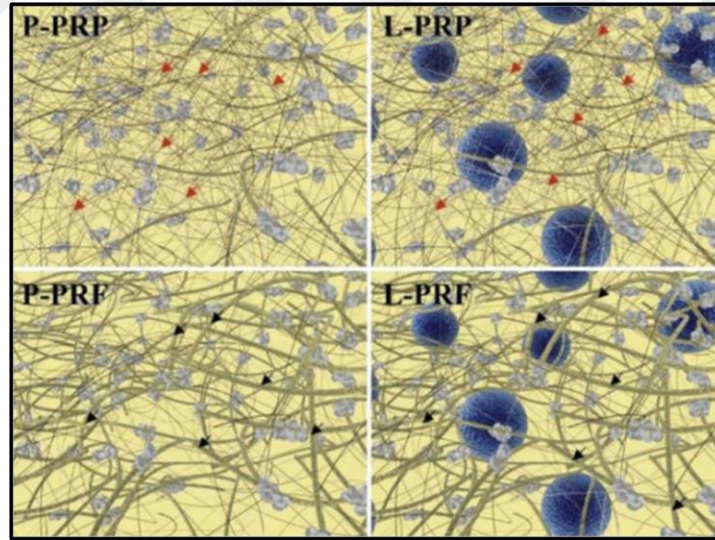
Lökosit içermeyen ve yüksek yoğunluklu bir fibrin ağ yapısında olan preparatlardır. Bu ürünler sadece güçlü bir şekilde aktive edilmiş jel formunda bulunur ve geleneksel fibrin yapıştırıcıları gibi enjekte edilemez. Bununla birlikte, güçlü fibrin matriksi sebebiyle, diğer uygulamalar için gerçek bir katı materyal gibi uygulanabilir. Bu ailede ticari adı Fibrinet PRFM (Trombositten Zengin Fibrin Matriks, Cascade Medical, Wayne, NJ, ABD) olan sadece bir protokol bulunmaktadır. Bu tekniğin önemli bir dezavantajı, lökosit ve trombositten zengin fibrine kıyasla yüksek maliyetli olması ve göreceli olarak daha karışık elde etme protokolüne sahip olmasıdır (48).

Saf trombositten zengin fibrin elde edilme yöntemi, L-PRP elde edilme yöntemi ile benzerlik gösterir. Aralarındaki fark, L-PRP'den daha yoğun bir ürün elde etmek için pıhtılaştırıcı ajanın P-PRF eldesi sırasında ikinci santrifüj gerçekleştirilmeden önce tüpün içine eklenmesidir (30).

4.2.4. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin (L-PRF)

Lökosit içeriği fazla ve yüksek yoğunluklu, güçlü bir fibrin ağa sahip olan materyallerdir (49). Bu biyomateryaller sadece aktive edilmiş jel formunda bulunurlar. L-PRF geleneksel fibrin yapıştırıcıları gibi enjekte edilemez. Bununla birlikte, güçlü fibrin matrikslerinden dolayı, diğer uygulamalar için gerçek bir katı materyal gibi kullanılabilir (48).

L-PRF ile P-PRF'nin santrifüj protokolleri farklıdır. P-PRP, L-PRP ve P-PRF uygulamalarının hepsi iki aşamalı santrifüjle gerçekleştiği ve içeriğine çeşitli antikoagülan maddeler eklendiği için, içeriğindeki trombosit sayısı fizyolojik değerlerden çok fazladır. Yapılan araştırmalar, hücre çoğalmasının uyarabilmesi için kandaki trombosit sayısından 2.5 kat daha fazla trombosit içeriğine sahip kan konsantrelerinin en etkin özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (50). Daha yüksek miktarda trombosit içeriğinin olumsuz etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (30).



Şekil 5. P-PRP, P-PRF, L-PRP ve L-PRF'in matris ve hücre mimarisini şematize edilmiştir (48).

Şekil 5'te lökositler (mavi daireler) ve fibrin ağ yapısı (sarı/açık kahverengi lifler) görülmektedir. Trombosit kümelenmeleri (açık-gri şekiller), daima fibrin lifler üzerinde oluşmaktadır. Tipik P-PRP ve L-PRP preparatlarında, fibrin ağı olgunlaşmamıştır ve bu esasen fibrinin küçük çaplı (kırmızı oklar) basit fiber polimerizasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu fibrin ağı, ameliyat sırasında trombosit uygulamasını

desteklemekle birlikte fibrin yapıştırıcı gibi hızlıca rezorbe olmaktadır. P-PRF ve L-PRF preparatlarında ise fibrin lifleri, çoklu lif birleşimi nedeniyle kalın (siyah oklar) ve bir fibrin biyomateryali olarak düşünüldüğünde dirençli bir matris oluşturmaktadır.

PRF, PRP'nin aksine santrifüj sırasında doğal ve kademeli bir polimerizasyonla oluşur. Böylece oluşan pıhtı daha homojen ve doğal fibrine göre daha yapışkan bir hal alır. *In vivo* fibrin polimerizasyonunu taklit etmesi sebebiyle PRF, PRP'ye göre daha yoğun miktarda fibrin içermektedir ve bu durum degradasyona karşı direncini artırır (45). Polimerizasyon sırasında dolaşan sitokinler esnek fibrin ağ içinde hapsolurlar ve zamanla serbestleşirler. PRP uygulamalarında trombin ve kalsiyum kloridin kullanılması sonucu oluşan ani polimerizasyon fibrin ağ içerisine sitokinlerin tutunmasını zorlaştırırken; PRP nin tersine, PRF deki polimerizasyonun yavaş olması, salınan sitokinlerin fibrin ağ ile bütünleşmesini kolaylaştırır, elastik matriksiyel bir yapı oluşumunu sağlar. Böylelikle PRF'nin fibrin ağlarındaki çözülebilir moleküllerin kontrollü ve daha uzun bir süre boyunca salınabilecekleri iddia edilmiştir (32).

4.3. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanışı

İkinci kuşak trombosit konsantresi olan L-PRF'yi hazırlama protokolü tıbbi bir alete veya özelleşmiş bir makineye bağlı değildir, tüm klinisyenler tarafından kolaylıkla uygulanabilir (51). Her laboratuvar ve ameliyathane şartında kolayca hazırlanabilecek tek basamaklı bir protokol mevcuttur. Bu açık-girişim yöntemi şimdiye kadar geliştirilen uygulaması en basit ve maliyeti en düşük yöntemdir (21,26).

Otojen venöz kanın standart 10 ml'lik herhangi bir antikoagülan olmayan steril cam kaplı plastik tüplere ya da cam tüplere, bekletilmeden alınmasıyla ve düşük hızda (yaklaşık 400g; 3000 rpm-10 dak veya 2700 rpm-12 dak) santrifüj edilmesiyle elde edilir.

Santrifüjün devir sayısı ve süresi ile ilgili farklı kaynaklar da mevcuttur (Tablo 2).

Tablo 2. Santrifüj devir sayıları ve süreleri

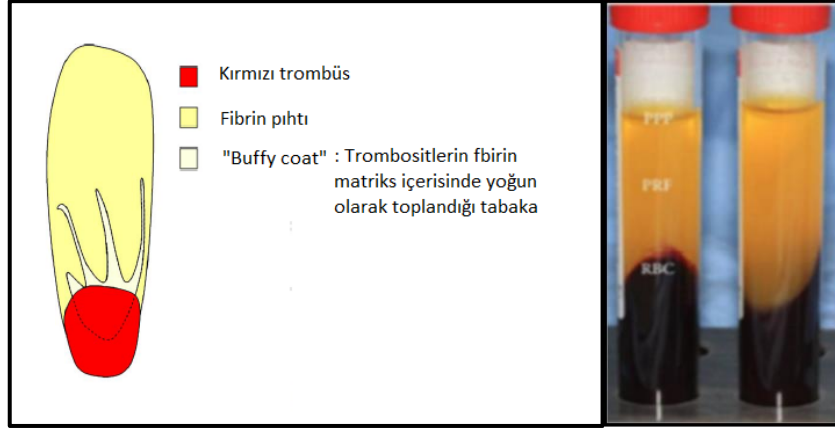
Santrifüj Devir Sayıları (rpm)	Süre (dakika)	Referans
3.000	10	(49)
2.700	12	(7)
2.500	10	(52)

Kana herhangi bir biyokimyasal ajan uygulanmadığı (antikoagülan, trombin veya kalsiyum klorid kullanılmadığı) için diğer fibrin uygulamalarından farklı olarak, kan tüpe temas eder etmez doğal bir koagülasyon süreci başlar (30,40). Trombin kullanılmaması elde edilen fibrin dokusunun doğal fibrin çatısına sahip olmasını ve büyüme faktörlerinin proteolizinin önlenmesini sağlamaktadır.

Tekniğin başarısı kanın alınma ve santrifüj edilme hızına bağlıdır. Kanın alınması için geçen sürenin ve alındıktan sonra santrifüj cihazına transferine kadar geçen sürenin mümkün olduğunca kısa olması gerekmektedir. Bu süre uzar ise, birkaç dakika içinde tüpün ortasında fibrinojen birikir, fibrin dağınık bir şekilde polimerize olmaya başlar ve düzensiz kıvamda az miktarda fibrin pıhtı oluştuğu gözlenir. Sonuçta elde edilen ürün çok düşük miktarda fibrin ağ içerecektir.

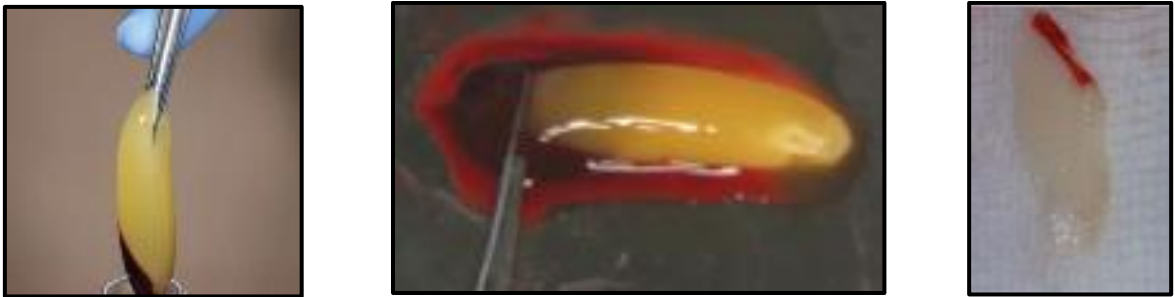
Antikoagülan yokluğunda kan örnekleri tüpün cam yüzeyiyle temas ettiği anda trombosit aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu hemen tetiklenir. Fibrinojen, dolaşımdaki trombin onu bir fibrin ağına dönüştürene kadar tüpün üst kısmında yoğunlaşır. Santrifüjden sonra 3 farklı fraksiyon oluşur. Tüpün alt kısımda kırmızı kan hücreleri tabakası, üst kısmında trombositten fakir asellüler plazma, bu tabakalar arasında, tüpün orta kısmında da fibrin pıhtısı oluşur. Trombositlerin ve lökositlerin teorik olarak bu fibrin ağ içinde hapsediği ve bu durumun PRF'nin degradasyona karşı direncini arttırdığı düşünülmektedir (18).

Santrifüj edilmiş tüpte trombosit dağılımını gösteren çalışmalarda, trombositlerin en çok fibrin pıhtısının alt kısmında, özellikle kırmızı hücrelerle fibrin pıhtı arasındaki bağlantı kısmında toplandığı bildirilmiştir. Ayrıca kırmızı kan hücreleri tabakası ile bağlantı yerinde yoğunlaşan trombositlerin fibrinin üst kısmındaki trombositlerden daha etkili olduğu görüşü öne sürülmektedir (21)



Şekil 6. L-PRF protokolünü takiben tüpte oluşan tabakalar (21).

Şekil 6'da gösterilen kırmızı renkli alt fraksiyon eritrositleri içerir. Orta fraksiyonda pıhtı olarak adlandırılan, kandaki trombositlerin ve lökositlerin yoğunlaştığı üç boyutlu bir mimariye sahip güçlü bir fibrin matrisi oluşur. Açık sarı renkli üst fraksiyon ise asellüler plazma veya trombositten fakir plazma (Platelet-Poor Plasma - PPP) olarak nitelendirilir. Oluşan PRF ve kırmızı kan hücreleri nazik bir şekilde presel yardımıyla tüpten çıkartılır. Bir makas veya bistüri yardımıyla kırmızı kan hücreleri PRF'den kolaylıkla ayrılır (Resim 2).



Resim 2. PRF'nin santrifüj sonucu doğal görünümü ve membran haline getirilmiş hali

İki gazlı bez arasında basınçsız bir şekilde fibrin pıhtının serumu alındığında geriye oldukça dirençli otolog fibrin membran kalacaktır (Resim 2). Ancak gazlı bez yerine PRF kutusu da kullanılabilir. Pıhtıdan membran elde edilmesinde standardizasyonun sağlanabilmesi amacıyla Choukroun tarafından 2007 yılında PRF hazırlama kutusu üretilmiştir (Process Ltd., Nice, Fransa). Pıhtı, bu kutuda bulunan metal ızgaraya yerleştirilerek kapağı kapatılır (Resim 3). PRF kutusu membranları aynı kalınlıkta üretecek ve saklayacak şekilde tasarlanmıştır. PRF kutusunun alt kısmında PRF'nin preslenmesiyle

toplanan serum eksuda, greft materyallerini hidrate etmek, cerrahi sahayı yıkamak veya otolog greftleri saklamak için kullanılabilir (55) .



Resim 3. Choukroun tarafından geliştirilen PRF kutusu ve PRF'lerin yerleştirilmesi

Elde edilen PRF'ler PRF kutusu kullanılarak homojen ölçülerde membran haline getirilebilir. PRF kutusu içinde operasyon süresince bekletilebilir. L-PRF'nin kalın küçük disklerini veya "tıkaçlarını" elde etmek için PRF pıhtı, PRF kutusundaki silindir çukurların içine yerleştirilir ve yavaşça pistonun ağırlığıyla PRF sıkıştırılır (Resim 4). Elde edilen küçük silindirik diskler 1 cm çapındadır ve bunlar çekim bölgelerinde kullanılabilir (55).



Resim 4. PRF'in PRF kutusunda silindir disk haline getirilmesi

Santrifüje edilmiş tüpte trombosit dağılımını gösteren çalışmalarda, trombositlerin tüpün en üst ve en alt tabakasında bulunmadığı, en çok PRF pıhtısının alt kısmında, özellikle kırmızı hücrelerle olan bağlantı kısmında toplandığı bildirilmiştir (12,55.) (Şekil 6).

4.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin İçeriği

Joseph Choukroun'un PRF'si olarak bilinen L-PRF, kan kaynaklı ürünlerin son geliştirilenidir. Lökosit ile trombosit açısından zengin, büyüme faktörlerini, sitokinleri ve

dolaşımda bulunan kök hücreleri üç boyutlu bir fibrin ağ içerisinde toplamış otojen kan kaynaklı bir sikatrisyel bir matrikstir.

4.4.1. Trombositler

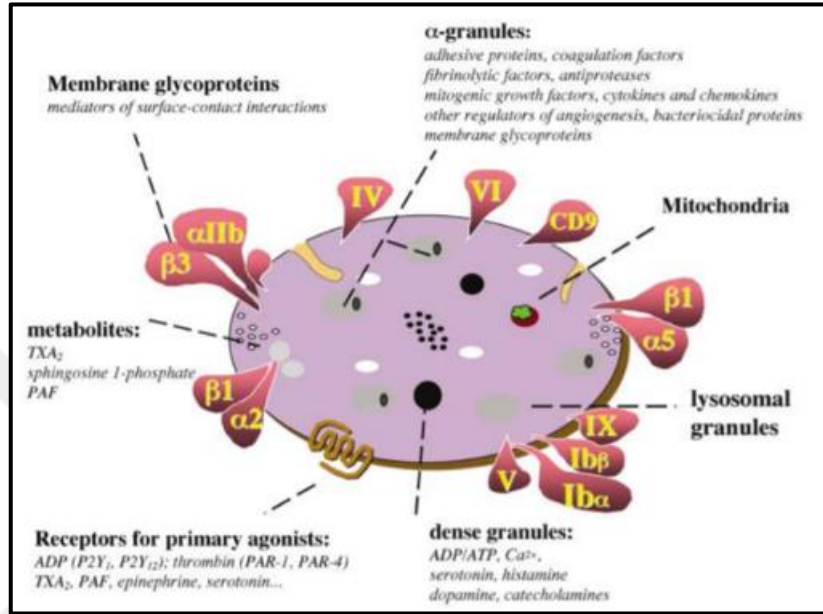
Trombositler, kemik iliğindeki polipoid dev hücreler olan megakaryositlerden köken alan, 1.5-4.0 µm çapında, renksiz, diskoidal ve çekirdeksiz hücrelerdir. Sağlıklı bir bireyin periferik kanında 150.000-450.000/mm³ bulunurlar. Kandaki sayıca fazlalıkları nedeniyle trombositler, vasküler bütünlüğün korunmasında önemli rol oynarlar. Küçük boyutları ve diskoid biçimleri nedeniyle, kan damarlarının çeperine doğru kan akışı tarafından sürekli olarak itilir ve endotel hasarını tanıyacak şekilde optimum şekilde konumlandırılır. Kan dolaşımındaki ömürleri 8-10 gündür ve sitoplazmaları aktifleştiklerinde ortama salınan granüllere sahiptir.

Trombositlerde alfa, delta (dens) ve lambda (lizozom) olmak üzere başlıca 3 tip granül bulunmaktadır (Şekil 7). Trombositler görevlerini hücre içi bu granüllerde sentezlenen, depolanan ve salgılanan ekstraselüler proteinler yardımı ile gerçekleştirirler. Elektron mikroskopu incelemeleri ile birbirinden ayırt edilebilen bu granüllerden ışık mikroskop ile görülebilenlerin büyük çoğunluğu alfa granüllerdir (41).

Trombositlerin başlıca görevi doku hasarı olan bölgede hemostazın sağlanmasıdır. Yaralanma veya cerrahi müdahale sebebiyle vasküler endotel zarar gördükten sonra hemostazı başlatmak ve desteklemek için trombositlerin aktivasyonları, subendotelyal kollajenle teması sonucu gerçekleşir. Hasarlı bölgeye yapışıp kümeleşirler. Hemostazın yanı sıra tıkaç görevi de alırlar. Aktifleşip şekil değiştiren trombositlerin santralinde toplanan granüllerin membran bağlantılı kanal sistemine veya doğrudan membrana füzyonu gerçekleşir (40). Degranülasyonları sonucu ADP (Adenozin difosfat), ATP (Adenozin trifosfat), serotonin, histamin, dopamin ve kalsiyum içeren delta granülleri ile pıhtılaşma faktörlerini ve trombosit büyüme faktörlerini içeren alfa granüllerini fibrin matriks içine serbest bırakır (56,57). Serbest bırakılan protein yapısındaki maddeler hedef hücrelerinin transmembran reseptörlerine bağlanır ve hücre içi sinyal moleküllerini aktifleştirirler. Bu sayede yara iyileşme aşamalarını yönlendiren gen sekanslarının ekspresyonu başlar (58). Yara bölgesinde trombosit konsantrasyonunun artmasıyla daha hızlı ve kaliteli bir iyileşme sağlanabilmektedir. Trombositlerin bu özelliklerinden

faýdalanarak fibrin yapıştırıcılar, PRP ve son olarak ikinci kuşak trombosit konsantrasyonu olan PRF uygulamaları geliştirilmiştir (59).

Alınan kanın içerisindeki trombositlerin %97'sinin, lökositlerin ise % 50'den fazlasının PRF pıhtı içerisinde bulunduğu belirtilmiştir (34).



Şekil 7. Trombosit hücrenin şematik gösterimi ve granüllerinden salınan maddeler (62)

4.4.1.1. Alfa Granüller

Bir trombosit hücreinde yaklaşık 50-80 adet bulunan alfa granüller, hemostaz, inflamasyon, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve hücre-matriks etkileşimi üzerinde önemli çok sayıda molekül içermektedir. Diğerlerine oranla sayıca fazla olan granül formudur. Heterojen bir içeriğe sahip olan bu granüller 300-500 nm çapındadır. Boyutlarının diğer granüllere göre daha büyük ve sayılarının daha fazla olması nedeniyle trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler ve içlerinde hemostaz ve yara iyileşmesinde önemli rolleri olan 30'un üzerinde biyoaktif protein bulundururlar (60). Bu moleküller şunlardır;

- Adeziv proteinler: Fibronektin, vitronektin ve trombospondin başta olmak üzere hücreler arası tutunma, hemostaz, pıhtı ve matriks oluşumunda görevli proteinlerdir.

- Koagülasyon faktörleri ve inhibitörleri: Trombinin farklılaşmasını sağlayan veya inhibisyonuna neden olan moleküllerdir. Hücre çoğalmasında rol oynarlar. (Plazminojen, protein S, kininojenler, faktör V, VII, XI, XIII.)
- Fibrinolitik proteinler ve inhibitörleri: Plazminojen üretimi ve damarsal şekillenmeyi sağlar.
- Proteinazlar ve anti-proteinazlar: Yeniden damarlanma, damarsal yeniden şekillenme, pıhtılaşmanın ve hücresele trafiğin regülasyonunda görevlidirler. C1 inhibitör, plazminojen aktivatör inhibitör-1, doku faktör yolu inhibitörü
- Büyüme ve mitojenik faktörler: Hücrelerin göçünü ve çoğalmasını sağlayan proteinlerdir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) başta gelenlerdir.
- Kemokinler ve sitokinler: Yeniden damarlanma, kemotaksis, damarsal yeniden şekillenme, hücreler arası tutunma ve kemik oluşumunda rol oynarlar.
- Anti-mikrobiyal proteinler: Trombosidin ve kinosidinler bakteriosit ve fungusit etki gösterirler.
- Membran glikoproteinleri: Trombositlerin göçü ve tutunmasını, proteinlerin endositoz ve salgısını, trombinin farklılaşmasını, trombositlerle lökosit ve endotel hücreleri arasındaki tutunmayı sağlarlar (61).

4.4.1.2. Delta Granüller

Alfa granüllerden daha küçüktür ve trombosit içinde daha az sayıdadır. Elektron mikroskopunda ışınları iyi absorbe etmelerinden dolayı yoğun görünürler ve bu nedenle yoğun cisimler olarak adlandırılırlar. Delta granüllerinde, adenin ve guanin gibi nükleotidler, serotonin ve histamin gibi aminler, ATP, ADP, katekolaminler, kalsiyum ve katyonlar bulunmaktadır (62).

4.4.1.3. Lambda Granüller

Lambda Granüller (lizozomlar), alfa granüllerden daha küçük ve genelde trombosit başına 1–3 adet izlenir. 150-250 nm çaplı olan, katepsin D ve E, elastaz, glikozidaz,

proteaz gibi bakterisidal etkili lizozomal enzimler içeren granüllerdir. Tamir fazının ardından plazminin bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırmasına yardımcı olur (63).

4.4.2. Trombositlerin Alfa Granüllerindeki Büyüme Faktörleri

Trombositler, inflamatuvar süreci başlatarak yara iyileşmesini başlatan, bölgede hemostazı sağlayan, diğer hücreleri yara bölgesine toplamaktan sorumlu olan, hücre çoğalmasını, kollajen üretimini artıran, vasküler büyümeyi başlatan ve hücre farklılaşmasını indükleyen önemli büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgırlar (61,64,65). Büyüme faktörleri, hücrelerin büyüme ve fonksiyonlarını kontrol etmek amacıyla sistemik ya da lokal etki gösterebilirler. Kendilerini üreten hücrelerin etkilenmesini sağlayan otokrin yolla etki edebilecekleri gibi, daha sıklıkla, üretildikleri hücre tipinden farklı bir hücre tipini parakrin yolla etkileyebilirler. Büyüme faktörlerinin yara bölgelerine lokal olarak uygulanması ile; yumuşak doku ve sert dokudaki iyileşme hızlandırılabilir. Aynı zamanda hücrelerin fenotipik durumlarını da kontrol ederler. Böylelikle, mezenkimal hücreler gibi öncül hücreler, osteoblast gibi tam olgunlaşmış fonksiyonel hücrelere dönüşürler (66,67). Ayrıca postoperatif ağrı, ödem ve kanamanın azalmasında da etkilidirler. Bu bilgiler ışığında, trombositlerin ve trombosit ürünlerinin yara iyileşmesini hızlandırmak ve iyileştirmek amacıyla kullanılması fikrinin ortaya çıkmıştır (19,23,58). Trombositten zengin fibrin kullanımındaki asıl amaç, trombositlerin alfa granüllerinin zengin içeriklerinin ortama tedavi amaçlı salınımının sağlanmasıdır. Yara iyileşmesini olumlu yönde etkilemek için büyüme faktörlerinin kullanımı oldukça ilgi çekici bulunmuş ve farklı teknikler kullanılarak birçok trombosit konsantresi geliştirilmiştir (48).

Trombositlerin alfa granüllerinden salınan büyüme faktörleri şunlardır:

- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor, PDGF)
- Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor, VEGF)
- Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming growth factor-beta, TGF- β)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor, IGF)
- Trombosit faktör-4 (Platelet factor-4, PF-4)
- Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)

- Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF)
- Trombosit Kaynaklı Endotelial Hücre Büyüme Faktörü (Platelet-derived endothelial growth factor, PD-ECGF)
- Epitelial hücre büyüme faktörü (Epithelial cell growth factor, ECGF)

Trombositler tarafından salınan bu büyüme faktörleri hücre çoğalmasını uyaran sinyaller oluşturarak, bağ dokusu iyileşmesi, kemik rejenerasyonu ve onarımı, fibroblastların mitogenezi ve yara bölgesinin anjiogenezinde artış ile makrofajların aktivasyonu üzerinde etkili olur (19).

4.4.2.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF), başlangıçta trombositlerin α -granüllerinde tanımlanmış olsa bile, endotel hücreleri, monositler, makrofajlar, düz kas hücreleri gibi diğer hücrelerde ve kemik matriksinde de bulunabilmektedir (25,28). Trombositlerin α granüllerinde yoğun şekilde bulunduğu için yara iyileşmesi sırasında ilk olarak ortaya çıkan polipeptid hormondur. Moleküler ağırlığı 30,000 dalton olan, 100°C'ye yakın sıcaklıklarda stabil kalabilen katyonik bir polipeptiddir (68). A ve B isimli 2 amino asit zincirinden oluşan dimerik bir yapıya sahiptir. Bu zincirler % 60 oranında benzerliğe sahiptir; A zinciri 121 amino asitten, B zinciri 125 amino asitten oluşur (69). PDGF, trombositlerin degranulasyonu sonucu ortama salındığında hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörler bağlanarak etkisini gösterir. Güçlü bir kemotaktik ajandır (70). Ayrıca, PDGF hücre çoğalmasını, hücre farklılaşmasını ve hücre dışı matriksin sentezini etkileyerek kemik formasyonunu artırır (71). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (insülin-like growth factor-1, IGF-I) gibi diğer büyüme faktörleri ile birlikte ortamda bulunursa, sinerjistik etki ile hücre bölünmesini çok daha fazla artırır (72). PDGF'ler, mezenkimal kök hücrelerin migrasyonu, proliferasyonunda ve devamlılığında önemli rol oynarlar. Bu büyüme faktörü, fibroblastlar, osteoblastlar ve adipositler gibi mezenkimal hücreler için mitojeniktir. Tip I kollajen oluşumunu uyarır (71,73,74). Aynı zamanda, PDGF yara alanına nötrofillerin ve makrofajların kemotaksisini, doku reepitelizasyonunu ve anjiyogenezisi artırır (19,31).

4.4.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) Trombositler, makrofajlar, endotelyal hücreler, fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri ve keratinositler tarafından sentezlenen, anjiyogenezi uyarmak ve vasküler geçirgenliğini arttırmak için görev yapan anjiyogenik bir büyüme faktörüdür (75). Tüm vücuda dağılmış, vasküler sistem boyunca dizili endotel hücreleri için bilinen en özgül, en güçlü mitojendir. Bu sitokin varlığı bile anjiyogenezisi başlatmak için yeterlidir (76). IGF-I ve IL-1 β (interlökin-1 beta) gibi faktörler, VEGF ekspresyonunu arttırarak, VEGF de nitrik oksit sentezini arttırmak ve matriks metalloproteinaz aktivitesini arttırmak yoluyla indirekt olarak anjiyogenezi düzenler (77,78). VEGF endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlar (54).

4.4.2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü beta

Otuzdan fazla alt tipi bulunan bir büyüme faktörüdür. İlk olarak transformasyona uğramış dokulardan (sarkomlardan) izole edildiği için ‘transforme edici’ ön adını almıştır. 2 alt birimden oluşan 112 amino asidin oluşturduğu dimerik bir yapıya sahiptir. Disülfür köprüleri ile birbirine bağlanmış iki adet 12.500 dalton alt birimden oluşur (79). Transforme edici büyüme faktörü (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) en çok üretilen izoformudur (78). Tüm sitokinler arasında en kuvvetli fibrozis ajanıdır. TGF β 1 ve TGF β 2 %72 oranında benzerlik gösterir. Trombositlerde, makrofajlarda ve osteoblastlarda sentez edilmektedirler. Fibroblastların kemotaksisini, aynı zamanda hücrelerden fibronektin ve kollajen sentezini uyarırlar (78,80). Fibrojenезisi, proteaz inhibitörlerini arttırıp, proteazları azaltarak ve kollajen yıkımını baskılayarak kolaylaştırırlar. TGF-beta 1 ve TGF beta 2'nin en önemli fonksiyonu osteoblast öncü hücrelerinin kemotaksisi ve mitogenezisini sağlaması ayrıca kollajen matriks uyarılmasını, bağ doku rejenerasyonunu ve kemik oluşmasını sağlamasıdır. TGF-beta osteoklast formasyonunu ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eder dolayısıyla kemik yapımının kemik rezorpsiyonundan fazla olmasını sağlar (81). Fibröz iyileşmeyi tetiklediği için inflamatuvar düzenleyici olarak bilinir. Lenfosit proliferasyonunu inhibe eder ve güçlü antiinflamatuvar etkiye sahiptir.

4.4.2.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İnsülin benzeri büyüme faktörü (insulin like growth factor, IGF) iki izoformu bulunan polipeptit yapıda bir büyüme faktörüdür. IGF-1 ve IGF-2 birbiri ile %62 oranında

benzerlik gösteren iki formdur. Fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast gibi pek çok hücre tipini arttırarak büyüme stimüle eder (82). Plazma, kemik, düz kas ve karaciğerden sentezlenirler ve plazmada spesifik bağlayıcı proteinlerine bağlanarak dokulara taşınırlar. Pre-osteoblast hücrelerine mitojenik etki ederek ve osteoblastların farklılaşmasını sağlayarak kemik oluşumunu ve tip I kollajen sentezini başlatır (19). Bu sitokinler hücreler için çoğalma mediatörleri olmalarına rağmen, hücreleri matriksteki birçok apoptotik uyarandan koruyan sinyaller üreterek apoptozu inhibe eden sitokinlerdir (83). Kemik yapının devamlılığının korunmasına da yardımcı olur.

IGF'ler trombositlerden sentezlenmelerine rağmen, dolaşımdaki kanda da yüksek oranda bulunurlar. Bir çalışmada PRF'deki IGF'nin trombosit aktivasyonundan kaynaklanmadığı, IGF'nin en yüksek konsantrasyonunun plazmada bulunduğu gösterilmiştir (84).

4.4.2.5. Trombosit Faktör-4

Trombosit faktör-4 (platelet factor, PF-4), trombositlerin α granüllerinden salınan, kationik özellikte, güçlü bir anti-heparin ajandır. Nötrofiller ve fibroblastlar için bir kemoatraktandır (85). Anjiogenezin negatif düzenleyicisi ve endotelial hücre çoğalmasının kuvvetli bir inhibitörüdür. Endotelyuma yapışarak prostasiklin sekresyonunu önleyebilir. PF-4, hücreleri, yüzeylerindeki proteoglikanlara bağlanarak stimüle eder ve ayrıca büyüme faktörleri ve interlökin-8 (IL-8) arasındaki bağlantıyı sağlar.

4.4.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü

Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), fibroblastlar, trombositler ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir. Deri ve müköz membranların bazal hücreleriyle ilişkili olup, bu hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu ve uyarılmasını indükleyerek bazal membranın oluşturulmasına yardımcı olurlar. EGF, epitel hücreleri ve fibroblastlar üzerinde mitojenik ve kemotaktik bir etkiye sahiptir (86). Hücre farklılaşmasından sorumlu olup reepitelizasyonu ve kollajenazın aktivitesini artırır. Yara iyileşmesi sırasında granülasyon dokusunda, kollajen ve glikozaminoglikan düzeyini artırır. Sonuçta epitelizasyon hızlanır ve yara gerilim kuvveti artar.

4.4.2.7. Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü

Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (fibroblast growth factor / FGF), fibroblastlar başta olmak üzere endotel, osteoblast, kondroblast, kondrosit ve keratinositler üzerindeki mitozu arttırıcı etki gösterirler. Endotelyal hücre göçü ve anjiogeneziste rol oynarlar (87). Anjiogenez için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimini ve kapiller hücrelerin proliferasyonunu desteklerler. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin migrasyonuna ve artışına sebep olarak yara iyileşmesini hızlandırır (88). Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur (89).

4.4.2.8. Trombosit Kaynaklı Endotelyal Hücre Büyüme Faktörü

Trombosit kaynaklı endotelyal hücre büyüme faktörü (platelet-derived endothelial growth factor / PD-ECGF), fibroblastlar ve vasküler düz kas hücreleri tarafından da sentezlenir. PD-ECGF'nin VEGF ve FGF'ye göre endotelyal hücreler üzerindeki mitojenik etkisi daha az olmakla birlikte, endotelyal hücreler üzerinde kemotaktik migrasyonu uyarıcı etkisi vardır. PD-ECGF yeni oluşan kapiller damarların perisitler tarafından sarılmasını ve perisitlerin proliferasyonunu sağlar. Böylece kapiller damar duvar bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur (90).

4.4.2.9. Epitelyal Hücre Büyüme Faktörü

Epitelyal hücre büyüme faktörü (epithelial cell growth factor / ECGF), alfa granüllerinden salınan diğer trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinden farklı olarak, sitoplazmik bir proteindir. Fibroblastlar, keratinosit ve vasküler düz kas hücreleri tarafından da sentezlenir. Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu artırarak reepitelizasyonda görev alır. Anjiyojenik büyüme faktörlerinden biridir. Vasküler endotelyal hücreler ve monositler için kemoatraktandır (91).

Bu büyüme faktörlerinin L-PRF'de 7. güne kadar yavaş salınım gerçekleştirdikleri bildirilmiştir (92).

4.4.3. Lökositler

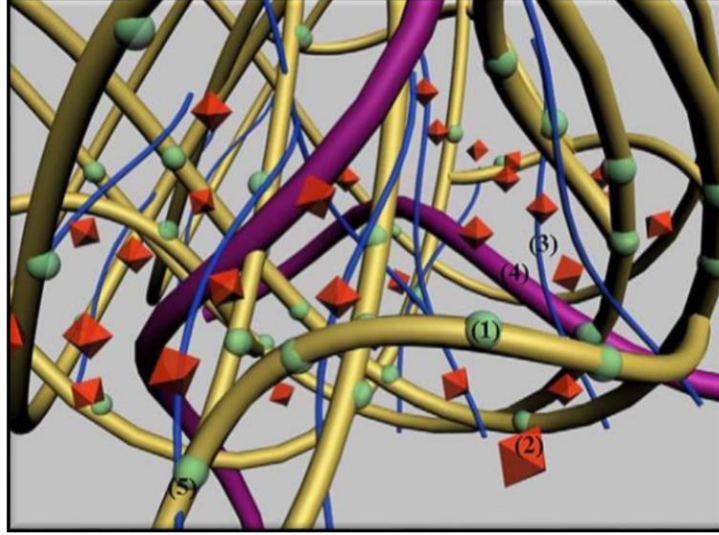
Lökositler yara bölgesine ilk göç eden hücre grubudur. İnflamatuar reaksiyonları ve iyileşmeyi düzenleyen sitokinleri salgırlar (93). İnflamasyonda rol alan en önemli

inflatuar sitokinler interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktor- α (TNF- α)'dır. IL-1 β inflamasyonda kilit role sahip olup, yardımcı-T lenfosit hücrelerinin uyarılmasını sağlar. IL-1 β , TNF- α ile birlikte akut faz proteinlerinin stimülasyonunu, lökosit infiltrasyonu artışını, inflamatuvar hücrelerin fagositozunu ve kemik yıkımını artırır, kemik formasyonunu azaltır (94). TNF- α , inflamatuvar hücrelerin fagositoz kapasitesini, nötrofil sitotoksitesini artırır. IL-1 ve IL-6 gibi temel mediyatörlerin sentezini düzenler (95). IL-6, T lenfositlerin aktivasyonunu gerçekleştirirken, B lenfositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. T lenfositler için aktivatördür. IL-6, antikor salınımını uyarırken, inflamasyon ve doku yıkımında etkilidir (54). IL-1, bakteriyel endotoksinler, TNF- α ve PDGF, IL-6'nın salınımını stimüle ederler. Ayrıca IL-6 da kendi salınımını artırma veya azaltma yeteneğine sahiptir (96).

İyileşmede rol oynayan sitokinlerinden IL-4, fibroblastlardan kollajen sentezini artırarak iyileşmeyi destekler ve matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) ve matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3)'ün sekresyonunu engeller. B hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını artırır. T-lenfosit, mast hücreleri ve hemotopoetik progenitör hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder. IL-1 β aracılı tüm inflamatuvar sinyal yolunu nötralize eder.

Lökositler, TGF- β 1, PDGF, VEGF, EGF, IGF ve FGF de dahil olmak üzere iyileşme için önemli olan birçok büyüme faktörünün, serin ve matriks metalloproteinazların (MMP) salınımında etkilidir (97,98). Trombositlerin ve lenfositlerin aktivasyonu, antimikrobiyal aktiviteler, sitokinlerin aktivasyonu/inaktivasyonu ve fibrin-trombosit tıkaçının oluşumu gibi çok sayıda biyolojik süreçte önemli rolleri vardır. Yara iyileşmesinde ve anjiogenezde önemli rol alan VEGF, lökositlerden fazla miktarda salındığı için anjiogenez başlatmak için yeterli olduğu bildirilmiştir (99,100).

Yavaş bir şekilde polimerize olmuş esnek PRF matriks içerisinde, trombosit sitokinleri ve büyüme faktörlerinin yanı sıra kandaki ve trombositlerdeki heparin ve hyaluronik asit gibi yapısal glikoproteinler ve glikanik zincirler de gömülmüş halde bulunurlar (Şekil 8). Histolojik olarak bu glikanik yapıların fibrinin fibrin yapılarına bağlanmış olduğu görülmektedir. Glikoproteinlerin dolaşımdaki trombosit sitokinleri gibi küçük peptitlere bağlanma kabiliyetleri yüksek olduğu için hücre göçünü ve iyileşme sürecini destekleme kapasiteleri de oldukça yüksektir (101).



Şekil 8. PRF 'nin polimerizasyonu sonucu oluşan fibrin ağın bilgisayar ortamında oluşturulmuş 3 boyutlu modellemesi (21). 1: Fibrin ağı içindeki sitokinler. 2: Fibrin polimerlerinin dışında kalan solüsyondaki trombosit sitokinleri. 3: Fibrin ile ilişkili glikanik zincirler. 4: Dolaşımdaki glikoproteinler (fibronektin). 5: Glikanik zincirler ve sitokinler ile bağlantılı fibriller

4.4.4. Dolaşımdaki Kök Hücreler

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücreler, fibrin ve fibronektin tarafından oluşturulan yara bölgesinde geçici matrikste toplanıp farklı hücre tiplerine dönüşerek birçok dokunun rejenerasyonuna katılır. Bu nedenle bu hücrelerin transplantasyonunda fibrin, özellikle anjiyogenezin arttığı safhada destekleyici matriks olarak görev yapar (102,103).

4.4.5. Fibrin

Fibrinojen hem kan plazmasında hem de trombositlerin α -granüllerinde bulunur. Plazmadaki serbest halde bulunan çözünebilir fibrinojen, trombosit agregasyonu ile açığa çıkan trombin tarafından aktive edilerek kalsiyum iyonlarının varlığında fibrin iplikleri oluşturur. Yani fibrin, plazmada bulunan inaktif fibrinojenin aktive edilmiş formudur. Fibrin iplikleri aralarına kanın şekilli elemanlarını alarak çözünemeyen fibrin ağı oluştururlar. Oluşan fibrin, vasküler defekt üzerinde biyolojik yapıştırıcı olan polimerize fibrin jeli meydana getirerek ilk oluşan trombosit kümelerinin etrafında vasküler defekt boyunca koruyucu duvar oluşturur. Böylece ilk skatrisyel matriks oluşur. Bu matriks

içindeki hücrelerden yara iyileşmesini uyaran büyüme faktörleri ve sitokinler salgılanmaktadır. Bu, normal koagülasyon mekanizmasıdır. Fibrin oluşumu iyileşmenin ilk basamağıdır (21,26).

PRF mikrovaskülarizasyon gelişimini sağlayan ve epitelyal hücre göçünü yönlendiren fibrin bazlı doğal bir biyomateryaldir. Doğal fibrin pıhtıya çok yakın özellikler taşır. PRF'nin yara iyileşmesine olan etkileri, fibrin jelin 3 boyutlu yapısı ve ağda hapsolan büyüme faktörleri ve sitokinlerin aktiviteleri ile açıklanabilir. PRP'ye göre daha yoğun miktarda fibrin içermektedir ve bu durum degradasyona karşı direncini artırır (104).

4.5. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrinin Biyolojik Etkileri

L-PRF iyileşme ve bağışıklık için gerekli olan kanın tüm bileşenlerini tek bir fibrin matriks içinde toplayan terapötik potansiyele sahip bir biyomateryaldir. Lökosit ve trombosit zengin içeriği bu biyomateryalin biyolojisinde önemli rol oynar. (26,52,54). Fibrin matriksin yoğunluğu ve içeriği herhangi bir trombosit konsantrasi için önemli bir parametredir. L-PRF in biyolojik etkileri; anjiyogenezin düzenlenmesi, bağışıklığın desteklenmesi, yara örtücülüğü ve mezenkimal kök hücrelerinin transplantasyonu olarak 4 kategoride incelenir.

4.5.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi

Anjiyogenezis, yara bölgesinde yeni kan damarlarının oluşumudur. Endotel hücrelerinin yara bölgesine göç etmesi, bölünerek çoğalması ve farklılaşması için ekstrasellüler bir matriks gereklidir ve fibrin matriks bunun için elverişli bir yapıdır. Fibrin matriksin anjiyogenez özelliği, üç boyutlu yapıya sahip olmasıyla ve içinde hapsolan sitokinlerin eş zamanlı aktivitesi ile açıklanır. Anjiyogenezis için gerekli büyüme faktörleri (FGF, VEGF, PDGF ve anjiyopoietin) fibrin matriks içinde bulunurlar ve fibrine yüksek afiniteyle bağlanabilirler. Fibrin matriksi, anjiyogenezin düzenlenmesinde önemli bir basamak olan, endotel hücrelerinin fibronektin ve vitronektine bağlanmasını sağlayan integrinlerin sentezini uyarımını sağlar. Ayrıca, bu matriksin rijiditesi sayesinde FGF veya VEGF'nin uyarılması ve buna bağlı olarak endotel hücreleri tarafından neoanjiyogenez düzenlenir. L-PRF'nin bu özelliği sayesinde hızlıca skatrisyel doku iyileşmesi gerçekleşir ve enfeksiyöz olaylar hemen hemen hiç oluşmaz (59).

4.5.2. Bağışıklığın Desteklenmesi

Fibrin ve fibrinojenin yıkım ürünleri, nötrofillerin migrasyonunu uyarır ve membranın CD11c/CD18 reseptör ekspresyonunu artırır. Bu reseptörler, nötrofillerin endotele ve fibrinojene tutunmasını sağlayarak nötrofillerin migrasyona olanak verir (105). Ayrıca bu yıkım ürünleri nötrofillerin fagositozunu ve enzimatik yıkım sürecini kontrol eder (106). Yara bölgesindeki nötrofiller bakterileri, serbest oksijen radikali oluşumu ve fagositoz mekanizmalarıyla ortadan kaldırır. Monositler de nötrofillerden sonra yara bölgesine göç eden hücre grubudur ve yara bölgesine geldiklerinde makrofaj olarak kolonize olurlar. Fibrin matriks içerisinde gömülü bulunan kemotaktik ajanlar vasıtasıyla fibronektin tarafından kontrol edilirler (107). Ayrıca, monosit/makrofajlarla fibrin matriksin etkileşimi, integrin reseptörü Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) aracılığıyla fagositozu düzenler. Dolayısıyla, makrofajlar inflamasyon ile fibrin tarafından düzenlenen tamir aşamaları arasındaki süreçte önemli bir rol üstlenmektedir (78,101).

4.5.3. Yara Örtücülüğü

Fibrin matriks, epitel hücrelerinin ve fibroblastların metabolizmasına etki ederek yara bölgesinin üzerini kapatır. Yara bölgesi sınırlarındaki epitel hücreleri polaritelerini kaybederek yaraya bazal ve yanal uzantılar oluşturur. Hücreler daha sonra, fibronektin, fibrinojen, tenaskin ve vitronektin tarafından oluşturulan geçici matrikse göç eder. Büyüme faktörleri, özellikle PDGF ve TGF- β , matriks proteinleri fibronektin ve fibrin ile birlikte doku fibroblastlarının ekspresyonunu, integrinlerin de yara bölgesine migrasyonunu uyarır (101). Bu yapılar fibrine değişik integrinler sayesinde direkt bağlanırlar. Fibrinin parçalanmasından sonra, fibroblastlar kollajen sentezine başlarlar (108).

4.5.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transplantasyonu

Mezenkimal kaynaklı kök hücreler, birçok dokunun rejenerasyonuna katkıda bulunur. Bu diferansiye olmamış hücreler, kandan yara bölgesine doğru göç ederek farklılaşır. Fibrin ve fibronektin tarafından oluşturulan geçici bir matriks içerisinde ilk farklılaşmaları gerçekleşir. Bu nedenle fibrin, bu hücrelerin transplantasyonu için destek matriksi olarak tercih edilir (103,109).

L-PRF'nin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması üzerine *in vitro* araştırma yapan Dohan ve ark., L-PRF'nin doza bağımlı olarak bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını uyardığını göstermişlerdir (14).

4.6. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Avantajları

- Harici bir madde eklenmeyip, tamamen otojen kaynaklı olduğu için immun ve alerjik reaksiyona sebep olmaz.
- Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riski yoktur.
- Trombosit ve fibrin içeriği sayesinde operasyon bölgesinde vasküler hemostaz ile kanamayı azaltır.
- İçerdiği büyüme faktörleri sayesinde vaskülarizasyonu artırır.
- İçerdiği lökosit kaynaklı sitokinler ile inflamasyon ve enfeksiyonu baskılar.
- Yumuşak ve sert doku iyileşmesini hızlandırır
- Biyouyumludur, kolay ve hızlı hazırlanabilir ve uygulanabilir.
- Toksik değildir.
- Adeziv etkisi sayesinde greft materyalini stabil halde tutabilir.
- Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanır.
- Ek bir malzemeye ihtiyaç duyulmadan hazırlandığı için ekonomiktir.

4.7. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Dezavantajları

- Sınırsız miktarda elde edilememektedir (110).
- Kan numnelerinin elde edilmesinden sonra ivedilikle santrifüj işlemine tabi tutulmalıdır. Hazırlama işlemlerinin prokole uygun yapıp yapılmaması, elde edilen PRF örneklerinin kalitesini etkiler (110).
- PRF'deki boyutsal ve yapısal değişimlere bağlı olarak, uzun süreli saklamaya uygun değildir (111).
- Allojenik bir malzeme olarak kullanılması mümkün değildir (18) .

4.8. Yakın Zamanda Geliştirilen Trombosit Konsantrileri

Santrifüj süresini ve hızını değiştirerek büyüme faktörleri ve hücre miktarı yönünden daha iyi bir otojen biyolojik materyal elde etmeyi amaçlayan araştırmacılar T-PRF, A-PRF, A-PRF +, I-PRF ve CGF ürünlerini geliştirmişlerdir (Tablo 3).

Tablo 3. PRF tipleri ve santrifüj protokolleri

PRF Tipi	Santrifüj Protokolü
PRF (L-PRF)	2700 rpm 12 dk
T-PRF	2700 rpm 12 dk
A-PRF	1500 rpm 14 dk
I-PRF	700-800 rpm 3-4 dk
CGF	2400-2700 rpm 12 dk

4.8.1. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (Advanced Platelet-rich fibrin / A-PRF)

L-PRF, steril cam veya cam ile kaplı plastik tüpler içinde bulunan tam kanın 2700 rpm'de 12 dakika veya 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla elde edilir (112). A-PRF ise, yine steril düz cam tüpler içinde daha yavaş santrifüj hızında (1500 rpm) daha fazla santrifüj süresi (14 dakika) kullanılarak elde edilir. Bu protokolün B ve T lenfositlerin sayıca fazla olmasını ve trombosit dağılımının daha homojen olmasını sağladığı bildirilmiştir (113). A-PRF'nin klinik olarak, daha uzun süre büyüme faktörü ve sitokin salınımı yaptığı öne sürülmüştür (112,114). Öte yandan Pinto ve ark. 2014 yılında A-PRF protokolü ile boyutları daha küçük ve dar bir pıhtı üretilbildiğini ve A-PRF'den salınan büyüme faktörlerinin L-PRF'ninkine kıyasla daha az olduğunu bildirmişlerdir.

A-PRF histolojik olarak incelendiğinde gevşek fibrin yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (113). Fibrinden zengin pıhtıda daha fazla hücre ve daha fazla inter fibröz alanlar gözlenmiştir. PRF'ye kıyasla hücreler daha eşit dağılmıştır. Hücre penetrasyon kantitatif histomorfometrik analizinde santrifüj protokolündeki değişiklik ile A-PRF'de

nötrofilik granülosit hücre dağılım derinliğinin arttığı istatistiksel olarak gösterilmiştir. PRF’de bu hücreler fibrin pıhtının üst 1/3’ünde yoğunlaşırken A-PRF de fibrinin 2/3’lük kesimine dağılmaktadır. Trombositler, T-lenfositler, B-lenfositler, kök hücreler ve monositler kıyaslandığında ise dağılım derinliğinde fark olmadığı saptanmıştır. Her 2 grupta da trombositler diğer hücelere kıyasla daha fazla dağılım derinliği göstermiştir (113).

4.8.2. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin + (Advanced Platelet-Rich Fibrin / A-PRF+)

Fujioka-Kobayashi ve ark. 2017 yılında, A-PRF elde etmekte uygulanan santrifüj parametrelerini modifiye edip, santrifüj süresini 8 dakikaya ve santrifüj hızını 1300 rpm'e düşürdükleri bir protokol geliştirmişlerdir. Yüksek santrifüj hızının trombositler ve lökositleri PRF pıhtısından uzaklaştırdığını savunmuşlardır. Bu protokolda santrifüj hızı düşürülerek, PRF pıhtısı içerisindeki trombosit dağılımının daha homojen ve daha yoğun bir şekilde elde edilmesi hedeflenmiştir. Dolayısıyla santrifüj sonrasında elde edilen PRF matriksinde bulunan hücre sayısının ve salınan büyüme faktörü miktarının artacağı, böylece biyouyumluluğu ve hücrel aktivitesi daha fazla olan bir biyomateryal üretilbileceği savunulmuştur (115)

4.8.3. Titanyum Tüplerle Hazırlanmış Trombositten Zengin Fibrin (Titanium-Prepared Platelet-Rich Fibrin /T-PRF)

PRF ile ilgili başarılı klinik sonuçlar elde edilse de bazı araştırmacılar kanın toplanması sırasında kullanılan cam tüplerin ve cam kaplı plastik tüplerin zararları konusunda şüphe duymaktadır. O’Connell, bu klasik tüplerle hazırlanan PRF sonucu elde edilen fibrin pıhtısının silika ile temasın kaçınılmaz olduğunu belirtmiştir. Silika partükülleri kırmızı kan hücreleri ile sedimente olmasına rağmen, silika partüküllerinin fibrinde ve trombositten fakir tabakada asılı kalabilen ince bir beyaz tabaka oluşturduklarını belirtmiştir. Bu partüküllerin hastaya tedavi esnasında geçtiğini bildirmişlerdir (116). Tunalı ve ark. tarafından silika kaynaklı uzun ya da kısa dönem yan etkilerden kaçınmak amacıyla titanyum tüplerle hazırlanmış trombositten zengin fibrin (T-PRF) geliştirilmiştir. Hazırlanmasında biyouyumluluğu daha fazla olan titanyum tüplerin kullanılmasının nedeni kısa veya uzun dönemde kuru cam veya camla kaplanmış plastik

tüplerin içindeki silikanın herhangi bir yan etkisini engellemek ve cam tüplere kıyasla daha etkin bir trombosit aktivasyonu sağlamaktır. Yapılan çalışmalarda titanyum aracılı trombosit agregasyonu ile oluşan pıhtının cam tüplerde elde edilene benzer histolojik yapıya sahip olmasına rağmen, T-PRF'in fibrin matriksinin daha yoğun oluştuğunu belirtmişlerdir. Silika partikülleri içermediği için de biyouyumluluğunun fazla olduğu tahmin edilmektedir (43,117).

T-PRF protokolü standart PRF protokolü ile aynıdır. T-PRF, geleneksel PRF prosedürüne benzer şekilde, herhangi bir antikoagulan içermeyen 10 ml Grade IV titanyum tüplere alınan venöz kanın vakit kaybetmeden 2800 rpm de 12 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilmektedir. Fibrin pıhtı titanyum tüp içerisinde kırmızı kan hücreleri ile hücresiz plazma arasında bulunmaktadır.

Tunalı ve ark. 2014 yılında yayınladıkları çalışmada, elde ettikleri fibrinin, geleneksel PRF'ye kıyasla daha kalın, daha sıkı ağa ve hücre yapısına sahip olduğunu, dokudaki rezorpsiyon süresinin daha uzun olduğunu bildirmişlerdir (15,118). Yaptıkları histomorfometrik analizlerde ise, T-PRF' nin birim alana düşen fibrin miktarının, cam tüpte hazırlanan PRF'ye göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Titanyum korozyona dirençli, kuvvetlere dayanıklı biyouyumlu bir materyaldir. Titanyum PRF'nin, doku içinde 30 güne kadar rezorbe olmadan kalabildiği görülmüştür.

4.8.4. Enjekte Edilebilen Trombosit Zengin Fibrin (Injectable Platelet-Rich Fibrin / I-PRF)

PRF'in enjekte edilebilir formülasyonunun bulunmaması kullanımını sınırlayan önemli bir dezavantajdı. Trombosit konsantrlerinin sıvı formda kullanılmasının tıbbın birçok alanında ve diş hekimliğinde etkili olacağı görüşü yaygındır. Herhangi bir antikoagulan madde kullanılmadan lökositlerin ve trombositlerin yoğunlaştırılacağı sıvı formlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu I-PRF üretilmiştir (119).

I-PRF nin, diğer prosedürlerle elde edilen PRF çeşitlerine göre fiziksel olarak da akışkan ve enjekte edilebilir bir formu vardır. Sadece beyaz hücreleri ve trombositleri değil, kök hücreleri ve endotel hücreleri de içerdiğine inanılmaktadır. Bu nedenle, sadece bir trombosit konsantresi değil, "kan konsantresi" olarak kabul edilmektedir (119).

I-PRF'nin elde edilebilmesi için kan örneği antikoagülan içermeyen boş tüplere alınır ve tüpler 700 rpm'de 3 dakika (60 g) oda sıcaklığında bir Duo Santrifüj (Nice, Fransa) ile santrifüj edilir (119). Santrifüj işleminden sonra tüpün üst kısmında kolaylıkla seçilebilen turuncu renkte bir yapı (I-PRF) ve tüpün alt kısmında kanın diğer elemanlarının bulunduğu kırmızı renkte bir yapı oluşur. Materyalin homojenizasyonunu önlemek için tüp dikkatli bir şekilde açılır ve en üstte yer alan I-PRF kısmı enjektörün yardımıyla toplanır.

I-PRF'nin diğer bir avantajı, enjeksiyon sonrası hemen pıhtılaşarak bir biyomateryal oluşturmasıdır. Ayrıca herhangi bir biyomateryal ile birleştirilebilir.

Üç dakikalık santrifüjün ardından oluşacak lökosit zengin I-PRF'nin yumuşak dokuya enjeksiyonu ile vaskülarizasyonu artıracığı düşünülmektedir. Ayrıca greft materyalleriyle karıştırılarak da kullanılabilir. Polimerizasyonu için 5-10 dk beklendikten sonra oluşan rijit blok greft benzeri bu yapı 'yapışkan kemik-sticky bone' olarak adlandırılır ve rekonstrüksiyon işlemlerinde kolayca uygulanır (120).

4.8.5. Konsantre Büyüme Faktörü (Concentrated Growth Factors / CGF)

CGF, 2006 yılında Sacco tarafından geliştirilmiştir. Büyüme faktörlerince daha zengin ve daha yoğun olabilecek bir fibrin matriks üretmek için tam kanın kaplanmamış, içinde antikoagülan olmayan test tüplerinde 2400-2700 rpm'de yaklaşık 12 dakika (30 saniye hızlandırma, 2700 rpm'de 4 dakika, 2400 rpm'de 4 dakika, 2700 rpm'de 4 dakika, 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj ve 36 saniye durdurmak için yavaşlatma) santrifüj işlemine tabi tutulması ile elde edilir. Bu prosesin tümü cihazda otomatik olarak ayarlanır. Oluşan süpernatant, konsantre büyüme faktörü olarak adlandırılmıştır (117,121).

4.8.6. Otojen Fibrin Yapıştırıcı (Autologous Fibrin Glue / OFG)

2010 yılında Sohn ve arkadaşları, 20-60 cc venöz kanı özel bir santrifüj cihazında (Medifuge, Silfradent, Sofia, Italy) 2400-2700 rpm de 2 dakika santrifüje etmişler. Enjekte edilebilir bir trombosit konsantresi olan 'Otojen Fibrin Glue' (OFG) elde etmişler ve bunu allogreftle veya ksenogreftle karıştırarak greftin defektlerde daha stabil kalmasını sağlayan sarı renkli yapışkan kemik grefti 'Sticky Bone' kavramını geliştirmişlerdir. Santrifüj

süresinin az olması sonucu, biyomateryalde daha fazla büyüme faktörünün bulunduğu düşünülmektedir (117,121).

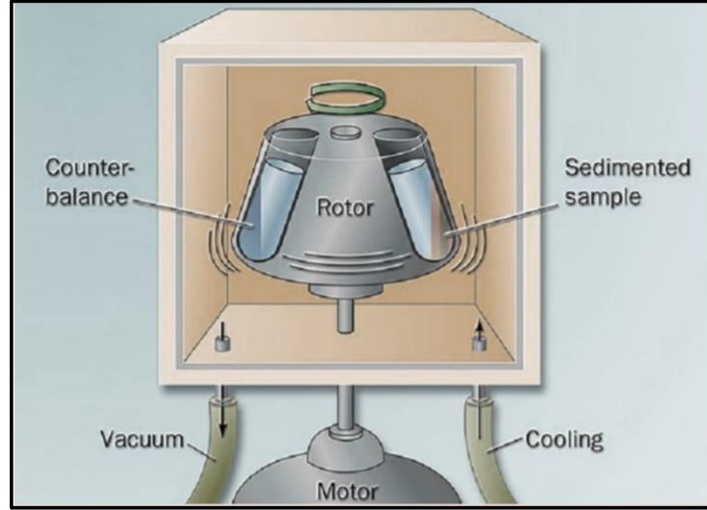
I-PRF ve CGF aynı konsantrenin varyasyonları olarak düşünülebilir. Yani ikisi de aynı prensip ile çalışır. Elde edilme süreleri, diğer iki protokolden (L-PRF ve A-PRF) çok daha kısadır. I-PRF ve CGF'nin hazırlığında ilk 2-4 dakika içinde sadece kan bileşenlerinin ayrılması amaçlanır. Plastik tüpler hidrofobik bir yüzeye sahip olduğu için pıhtılaşma mekanizmasını verimli bir şekilde etkinleştiremezler (122). Dolayısıyla, kaliteli bir trombosit konsantresi oluşturmak için gereken tüm kan bileşenleri, ilk 2-4 dakika içinde santrifüj kuvvetinin etkisinde tüpün içerisinde üst katmanda toplanır. Bu plazma ve trombositten oluşan açık sarı renkli katman hem aktif hem de enjekte edilebilir formdadır. Pıhtılaşma tamamlanmadığından bu kısım, greft parçacıklarıyla karıştırıldığında bir bütün halinde kullanılabilir (120,121).

4.8.7. PRF Lizatı (PRF-L)

PRF bazlı ürünlerin yeni bir uygulaması olan PRF lizatı, PRF hazırlandıktan sonra, % 5 CO₂ / % 95 hava bulunan nemli ortamda 37°C'de inkübe edildikten sonra toplanan eksüda olarak tanımlanır. TGF, PDGF, VEGF, EGF gibi çeşitli büyüme faktörlerince zengin bir kaynak olduğu belirtilmektedir (43,123) .

4.9. Santrifüj Cihazları

Santrifüj cihazları, dönme hareketinden elde edilen merkezkaç kuvveti kullanılarak şekil, büyüklük ve yoğunlukları farklı olan maddelerin yer çekimine bağlı olarak ayrımını sağlayan araçlardır (124). Dönmeyi sağlayan bir motor ile tüplerin konulduğu bir rotordan oluşur. Rotor, kapağı olan bir odada bulunur (Şekil 9). Dönme hareketinin hızı ile orantılı olarak havayla sürtünme sonucu santrifüj içindeki sıcaklık artışı söz konusu olur. Bazı santrifüjler, odadaki ısıyı ayarlamak için soğutucu ile donatılmışlardır.

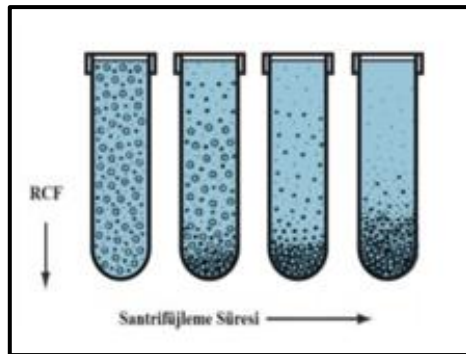


Şekil 9. Santrifüjün temel parçaları

Santrifüj çalıştırıldığında tüpte bulunan partiküller, uygulanan santrifüj alanına (merkezkaç kuvvet), partikülün şekline, yoğunluğuna ve ortamın yoğunluğuna bağlı olarak değişen hızlarda çökerler. Yoğunlukları ve büyüklükleri aynı olan gruplar birlikte çökerler; yoğunluk ve büyüklükleri büyük olandan küçük olana doğru bir çökme sırası izlenir (Şekil 10) (42). Merkezkaç kuvvet, maddeyi rotasyon merkezinden dışa doğru iten güçtür.

RPM (Dakikadaki Dönme Sayısı “Revolution/ Rotation/ Rounds/ Rate Per Minute”); santrifüjün dakikadaki dönme sayısıdır ve santrifüjün hız göstergesidir.(124,125)

RCF (Göreceli Santrifüj Kuvveti “Relative Centrifugal Force/Field”) veya Gravite (g); santrifüje yerleştirilen örneği bileşenlerine ayıran santrifüj kuvveti, fiziksel etkidir. RCF’yi dönen parçacığı etkileyen merkezkaç kuvvetin yönündeki değişim oluşturur ve yerçekimi ivmesinin katları olarak (xg) ifade edilir. Santrifüjleri karşılaştırabilmek için kullanılan bir birimdir.(124,125)



Şekil 10. Santrifüjleme sırasında tüp içindeki parçacıkların ayrışması ve çökmesi (42).

Santrifüj kuvveti kütle, hız ve yarıçap (r) olmak üzere üç değişkene bağlıdır. RCF ve santrifüj hızı arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$$

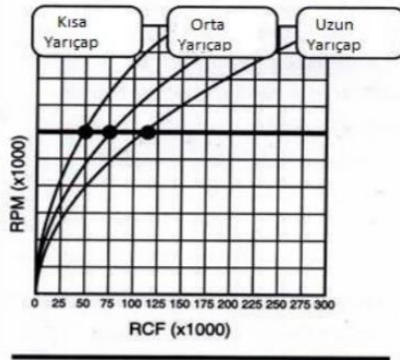
Eşitlikteki 1.118×10^{-5} açısal hızdan hesaplanan bir sabit, r ise cm olarak santrifüj ekseninden test tüpünün yerleştiği bölümün tüp dibiyle temas ettiği noktaya kadar ölçülen yarıçaptır. RCF'nin doğru hesaplanabilmesi için santrifüjün yarıçap değeri doğru bir şekilde ölçülmelidir.

RCF ve RPM genellikle birbirlerinin yerine kullanılan ve karıştırılan kavramlardır. Farklı santrifüjlerin farklı yarıçap uzunlukları olabildiği için aynı RPM değerinde olsalar da çalıştıkları RCF değerleri farklı olacaktır. RCF farklı yarıçap uzunluğundaki santrifüjlerde aynı ivmenin elde edilebilmesini sağlamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız 2 farklı santrifüj cihazının RCF değerleri aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. Cihazların yarıçap uzunlukları farklı olduğu için örnekler, farklı RPM değerlerinde fakat eşit sürelerde santrifüj edilmiştir.

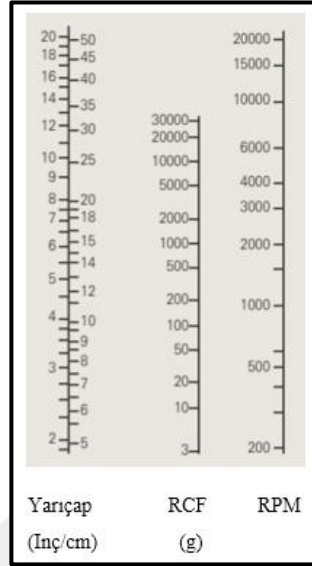
Açıklanan L-PRF protokolünde IntraSpin™ (Intra-Lock International, Boca-Raton, FL, USA) santrifüj cihazının PRF elde etme aşamasında 400 G ile çalıştığı bilinmektedir (112). RCF değerini iki cihazda da eşit tutabilmek için kontrol grubunda kullandığımız santrifüjü [Hettich Mikro 22 R (Tuttlingen, Germany)] 400 G ye ayarladığımızda RPM değerini 1890 rpm olarak gösterdi.

Şekil 11'de aynı RPM değerinde farklı yarıçap uzunluğuna sahip santrifüjlerde RCF değerindeki değişim izlenmektedir.



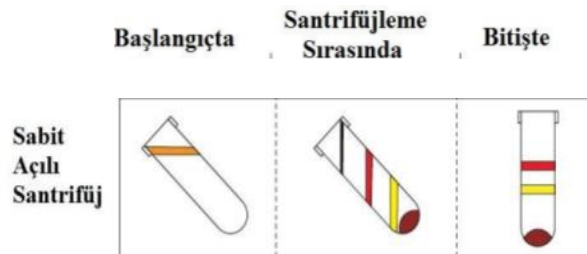
Şekil 11. Farklı yarıçap uzunluklarında RPM ve RCF değerlerinin değişimi.

RCF ve RPM değerlerini formülle birbirlerine çevrilebileceği gibi nomogramlar kullanılarak da dönüştürülebilir (Resim 5).



Resim 5. Masa üstü santrifüjün yarıçap ve RPM değerleri kullanılarak RCF değerinin bulunmasını sağlayan nomogram.

Santrifüjün rotor türü dönen tüplerin konumunu da belirler. Santrifüjde kullanılan rotor çeşitleri tüpün dönme eksenine göre yaptığı açıya bağlı olarak; açılır başlıklı (yatay başlıklı), sabit açılı ve dik açılı olarak sınıflandırılabilir. Rutin laboratuvar çalışmalarında en çok açılır başlıklı ve sabit açılı rotorlar kullanılır. Merkez kaç kuvveti tüplere farklı yönlerden etki ettiği için ayrışan katmanların tüp içinde yerleşimleri de farklı olur. Sabit açılı rotorlarda tüpler vertikal dönüş eksenine göre 25-40 derecelik sabit bir açıyla dönerler. Bu yüzden, merkezkaç kuvvetinin etkisiyle sediment (pellet) tüp kenarına ve dibine doğru çöker (42) (Şekil 12).



Şekil 12. Sabit açılı santrifüjlerde tüp içindeki örneğin katmanlarının yerleşimi

Çalışmamızda test grubundaki santrifüj cihazının rotor tipi sabit açılı olduğu için kontrol grubunda kullanılacak olan santrifüjün de sabit açılı rotora sahip masa üstü santrifüj cihazı olmasına dikkat edilmiştir

Rotorların çapları farklı ise numunenin dönme eksenine olan uzaklığı farklı olmaktadır. Bu nedenle rotorlar aynı dönme hızında çalışsalar bile örnekleri farklı ivmelendirmektedirler. Dolayısıyla santrifüj yönteminde RPM (dakikadaki devir sayısı) ile belirtilen dönme hızı yerine, rölatif santrifüj kuvveti (RCF) ile tanımlanan örneğe uygulanan ivmenin büyüklüğü daha önemli olmaktadır. Buradan yola çıkarak çalışmamızda, standardizasyonu sağlamak için kontrol grubundaki cihazın RCF değeri test grubundakiyle aynı tutularak, bu değere göre kontrol grubundaki santrifüj cihazında uygun dakikada dönme sayısı yani RPM değeri ayarlandı.

Santrifüjlemenin doğru ve güvenli bir şekilde yapılması için dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Kullanılan tüplerin dayanabildikleri en yüksek ivme değerleri üretici firmalar tarafından belirlenmiştir ve bu değerler iyice bilinmelidir. Çünkü bu sınırlar aşılsa tüplerin kırılma olasılığı artar. Santrifüjde kullanılacak tüplerin ortaya çıkacak basınca dayanıklı malzemeden üretildiğinden emin olunmalıdır. Tüp kırıldığı takdirde santrifüj temizliğine dikkat edilmelidir. Bir diğer önemli etken santrifüjleme işlemi sırasında sürtünmeye bağlı oluşan sıcaklıktır ve bu sebeple sıcaklık kontrollü santrifüjlerin kullanılması önerilmektedir. Tüpler ağzı kapalı çevrilmeli, tekrar santrifüjlemeden kaçınılmalıdır. Santrifüjdeki tüpler daima dengede durmalıdır. Tüpler santrifüj keferlerine karşılıklı dengeli olacak şekilde yerleştirilmeli, gerekiyorsa aynı ağırlıkta denge tüpü kullanılmalıdır. Santrifüj kapağı, santrifüj tümüyle durmadan kapatılmamalıdır. Santrifüj asla elle durdurulmaya çalışılmamalıdır. Düzenli aralıklarla bakım hizmetleri verilmelidir.

Klinik laboratuvarlarda santrifügasyonun kullanım amaçları:

- Partikülleri süspansen oldukları solüsyondan ayırma
- Kandan hücreleri ayırma
- Biyolojik sıvıların hücresel elemanlarını ve diğer kısımlarını konsantre etmek
- Örnekten presipite edilmiş proteinleri uzaklaştırmak
- İmmünokimyasal ölçümlerde serbest ligantları ayırmak
- Farklı yoğunluktaki iki likit fazı ayırmak

5. GEREÇ ve YÖNTEM

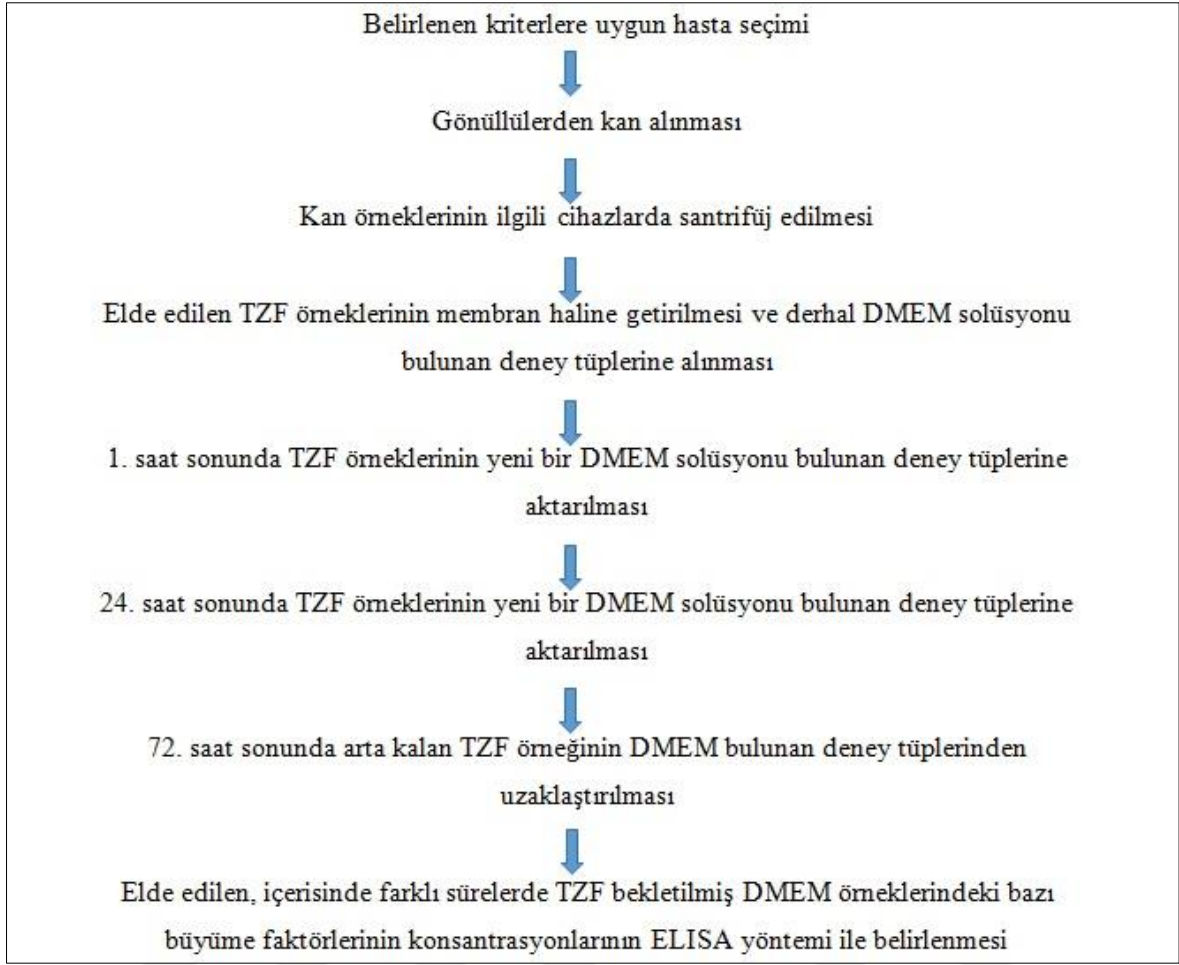
Bu uzmanlık tez projesi, Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26/12/2018 tarih ve KÜ GOKAEK 2018/371 karar numarası ile kabul edilmiş olup, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (2019/054) tarafından desteklenmiştir.

5.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu araştırma, Haziran 2019- Temmuz 2019 tarihleri arasında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Gönüllüler, Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi ve Tıp Fakültesinde görev yapan personelden gönüllülük esasına göre seçilmiştir. Bu bağlamda gönüllülere çalışmanın amacı ve kapsamı ayrıntılı olarak anlatılmış ve oluşabilecek komplikasyonlar hakkında bilgiler verilmiş olup, gönüllü bilgilendirme ve onam formu her bir gönüllü tarafından okunduktan sonra imzalanmıştır. Araştırmaya, yaş ortalaması $29,91 \pm 3,77$ olan; 6 kadın (yaş ortalaması $30,16 \pm 1,72$) ve 6 erkek (yaş ortalaması $29,66 \pm 1,72$) olmak üzere toplam 12 gönüllü dahil edilmiştir. Her bir gönüllüden yaklaşık 10ml olacak şekilde 2 tüp kan örneği alınmıştır. Rastgele bir sıra ile alınan kan örneklerinden biri test grubunu, diğeri ise kontrol grubunu oluşturmak üzere PRF örneklerinin hazırlanması amacı ile kullanıldı.

5.2. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

1. Herhangi bir aktif enfeksiyöz hastalığının (akut hepatit, AIDS, tüberküloz), kronik inflamatuvar bir hastalığının bulunmaması, antibiyotik profilaksisi gerektiren bir durumun olmaması ve kemoterapi veya radyoterapi görmüyor olması,
2. Sigara ve alkol kullanmıyor olması,
3. Hamilelik ve emzirme durumunun bulunmaması,
4. Son bir ay içinde herhangi bir ilaç kullanmamış olması,
5. 18 yaşından büyük olması,
6. Araştırmaya katılmayı gönüllülükle kabul etmesi.

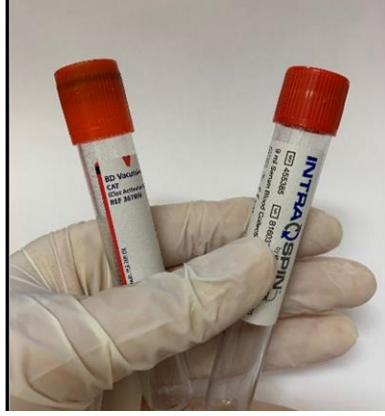


Şekil 13. Çalışma akışı şeması yukarıya verilmiştir.

5.3. Kan Örneklerinin Toplanması

Gönüllülerin demografik verileri kaydedildikten sonra hastalara takip numarası verildi ve PRF örneklerinin toplanacağı tüplere takip numaraları yazıldı. Çalışma kapsamında, her bir gönüllünün ön kol bölgesinden (antekübital ven) toplam 2 tüp venöz kan örneği elde edilmiştir. Her bir gönüllüden elde edilen kan örneklerden birisi ile, L-PRFTM ticari kitine ait ekipman ve cihazlar kullanılarak PRF örneği oluşturuldu. Diğer kan örneğinden ise, genel kullanım amaçlı laboratuvar ekipmanları ve santrifüj cihazı kullanılarak PRF örnekleri elde edildi.

Hastanın kanı alınırken, kanın tüpleri doldurma zamanı kronometre ile ölçülerek kaydedildi. Gönüllülerden kan alma işlemi 25 saniyeyi geçmemiştir. Elde edilen kan örnekleri vakit kaybedilmeden (60 saniye içinde) eş zamanlı olarak santrifüj cihazlarına yerleştirildi.



Resim 6. Kullanılan kan alma tüpleri [Sağdaki kontrol grubunda (Becton Dickinson Vacutainer, Plymouth PL6 7BP, İngiltere). Soldaki test grubunda (Intraspin™ sistem kan alma tüpü, Boca-Raton, Florida, ABD) kullanılan kan alma tüpü

Kan alma işleminde izlediğimiz aşamalar şunlardır:

1) Hasta yapılacak işlem hakkında bilgilendirildikten sonra, hastanın sağ ön kolunun üzerine turnike (Resim 7) uygulandı ve kan alınacak bölge %70 alkollü pamukla silindi.

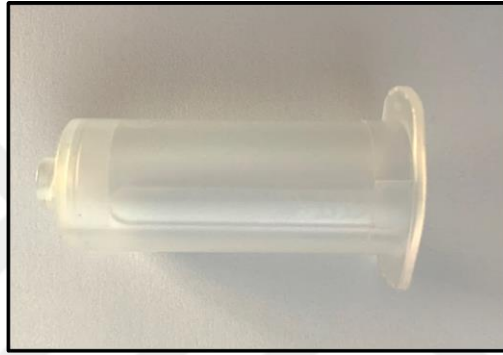


Resim 7. Turnike

2) Hastanın kolunu kıpırdatmadan düz tutması istendi ve ön kolda tespit edilen antekübital vene, steril, tek kullanımlık iğne (BD Vacutainer® Flashback Blood Collection Needle, 21 gauge, 25mm, yeşil, Plymouth PL6 7BP, İngiltere) (Resim 8) ile girildi. Özel ara tutucu (BD Vacutainer® One Use Holder, Plymouth PL6 7BP, İngiltere) (Resim 9) vasıtasıyla 2 adet, içinde antikoagülan olmayan vakumlu tüplere aktarıldı (Resim 6).



Resim 8. İğne (Becton Dickinson Vacutainer® Flashback Blood Collection Needle, 21 gauge, 25mm, yeşil, Plymouth PL6 7BP, İngiltere)



Resim 9. Ara tutucu (Becton Dickinson Vacutainer® One Use Holder Plymouth PL6 7BP, İngiltere)

Hastalara, kanlarının alındığı bölgeye birkaç dakika boyunca bastırmaları istenmiş ve kanama kontrolü sağlandıktan sonra klinikten ayrılmalarına izin verilmiştir.

5.4. PRF Hazırlanması

Kontrol grubu santrifüjü olarak Hettich Mikro 22 R (Tuttlingen, Germany) masa üstü santrifüjü kullanıldı (Resim 10). Test grubunda ise orijinal L-PRF™ santrifüj cihazı olarak piyasaya sürülen ve bu işlem için CE belgesine sahip ve FDA onaylı tek cihaz olan IntraSpin™ (Intra-Lock International, Boca-Raton, Florida, ABD) masa üstü santrifüjü kullanıldı (Resim 11). Literatürde geçen, IntraSpin™ cihazında orijinal L-PRF™ elde etme yönteminde RCF değeri 400 g kullanıldığı için (112), kontrol grubundaki masa üstü santrifüj cihazında da RCF değeri 400 g olarak ayarlandı. Hettich santrifüj cihazının ayarlarına 400 g'lık RCF değeri girildiğinde, cihaz kendi rotor çapını göz önünde

bulundurarak dakikadaki devir sayısını 1890 olarak belirledi. Dolayısıyla, her iki cihaz da 400 g 'lık rölatif santrifüj kuvveti altında 12 dk. boyunca PRF hazırlama işlemini gerçekleştirdi.



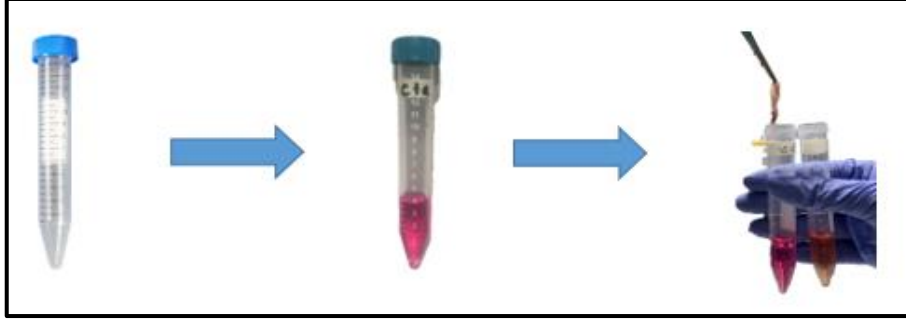
Resim 10. Kontrol grubunda kullanılan santrifüj cihazı [Hettich Mikro 22 R (Tuttlingen, Almanya)]



Resim 11. Test grubunda kullanılan santrifüj cihazı [IntraSpin™ (Intra-Lock International, Boca-Raton, Florida, ABD)]

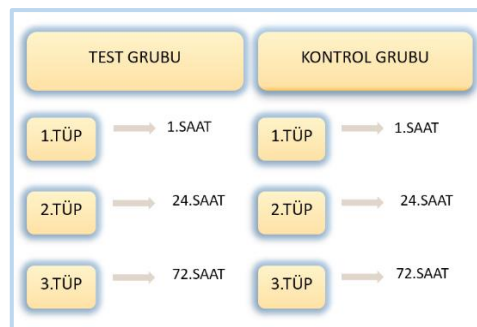
Santrifüj sonrasında tüpler içerisinde oluşan 3 katmandan orta kısımdaki sarı fibrin katman steril penset ile tutulup tüpün uç kısmına doğru çekilerek, en alttaki eritrositlerin yoğun olarak bulunduğu kırmızı katmandan makas ile kesilerek ayrıldı. PRF örneklerini membran haline getirmek amacıyla kontrol grubunda 2 adet siman camı, test grubunda ise IntraSpin™ sisteminin PRF kutusu (Xpression™ Box Kit) kullanıldı. Deneyler öncesinde siman camı seçimi, L-PRF™ sisteminde bulunan metal levha ve kapağın ağırlığına yakın ağırlıkta olacak şekilde temin edilmiştir. İki grupta da, standardizasyonu sağlama adına fibrinlerin membran haline gelmesi için 30 saniye beklenildi. Bekleme boyunca ilave bir kuvvet uygulanmadı. Elde edilen membranlar bekletilmeden, önceden hazırlanmış,

içerisinde 4ml DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri) bulunan 15 ml hacimli sterilize falkon tüplerine konuldu (Resim 12).

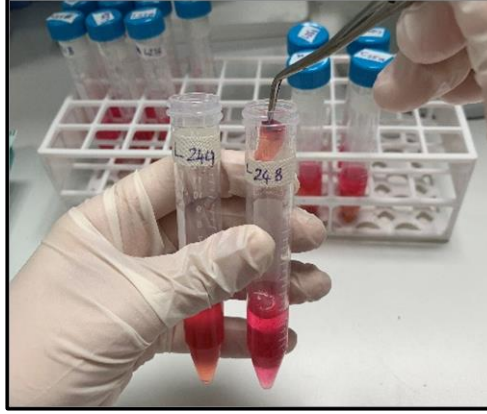


Resim 12. İçerisinde 4 ml DMEM bulunan 15 ml hacimli tüp ve PRF membranın elde edilmişinden 24. saat sonra içerisinde 4 ml DMEM bulunan ikinci tüpe aktarılışı

Oda sıcaklığında her iki grupta da içerisinde 4 ml DMEM bulunan steril tüplerin içerisinde 1 saat bekletilen (1. tüp) membran haline getirilmiş PRF örnekleri, içinde 4 ml DMEM olan ikinci farklı steril tüplere (2. tüp) konuldu. Bu tüplerde, elde edildikten 24 saat sonrasına kadar bekletildikten sonra, steril presel aracılığıyla çıkartılarak içinde 4 ml DMEM olan üçüncü farklı steril tüplere (3. tüp) konuldu (Resim 12 ve 13). Yeni tüplerde membranlar, elde edildikten sonraki 72. saate kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra, PRF membranları DMEM içinden çıkarılarak steril boş tüplere konuldu. Böylece her gönüllüden iki deney grubu için toplamda 6 tüp DMEM örneği elde edilmiş oldu (Şekil 14). İçinden membranın çıkarıldığı bu DMEM örnekleri içeren tüpler vakit kaybetmeden -80°C'lik soğutucuya (Sanyo, MDF-U6086S -86°C Ultra-Low Temperature Freezer, Sanyo Electric Co., Japonya) konuldu ve analiz yapılacağı güne kadar saklandı (Resim 14).



Şekil 14. Örneklerin toplandığı tüp sayısının şematik gösterimi



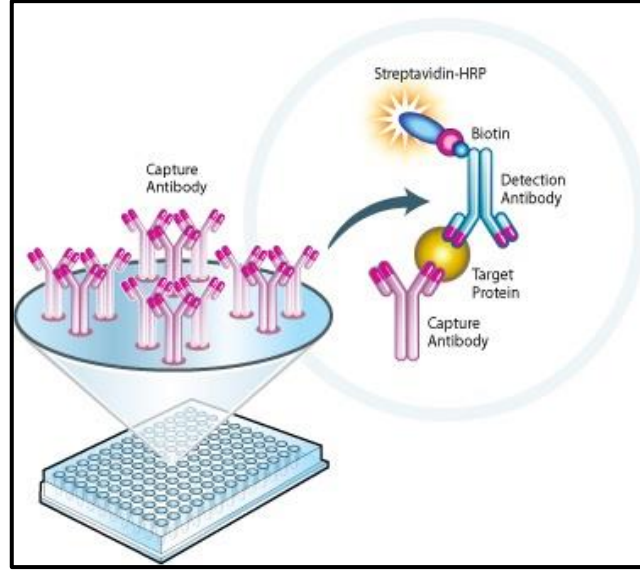
Resim 13. PRF membranının steril presel aracılığı ile tüpten tüpe aktarımı



Resim 14. Örneklerin saklandığı -80 C°'lik Soğutucu (Sanyo, MDF-U6086S -86°C Ultra-Low Temperature Freezer, Sanyo Electric Co., Japonya)

5.5. Biyokimyasal Analizler

Enzim bağlı immünosorbent tetkiki (Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), test edilen örnekte bulunan antijen (protein, peptid, hormon vb.) veya antikor varlığını tespit etmek için, enzim ile işaretli antikorları kullanan ve enzim-bağlı renk değişikliğini izleyebildiğimiz kantitatif bir ölçüm yöntemidir. Bu teknik, bir antijenin kendisine özel antikora bağlandığı basit immünoloji konseptine dayanır (126) (Şekil 15). Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Aynı anda çok miktarda örneği eş zamanlı olarak işlemek üzere tasarlandığından ELISA, hızlı bir test tekniğidir.



Şekil 15. Kullanılan ELISA kitlerinin çalışma prensibinin şematik gösterimi

Bu çalışmada, VEGF, PDGF, TGF- β seviyeleri, uygun kitler kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi. Tetkikler üretici firma tarafından gönderilen prosedüre uygun şekilde yapıldı. $+4^{\circ}\text{C}$ de saklanan kitler, örneklerin çalışılacağı gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra, kullanımları öncesi santrifüj cihazında (Eppendorf 5424 Centrifuge, Hamburg, Almanya) varsa kalıntıların çökeltilmesi amacıyla çevrildi ve tüp standlarına aktararak dik pozisyonda bekletildi (Resim 15). -80°C 'lik soğutucudan çıkarılan DMEM örnekleri de içi buz dolu kap içerisinde sıvı hale gelinceye kadar bekletildi. 4 ml DMEM içeriği bulunan 15ml'lik tüpler, oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra varsa içindeki eritrosit kalıntılarının çökeltilmesi için santrifüj cihazında [(Sigma 3-18K centrifuge (Sigma, Almanya)] çevrildi (Resim 17). Farklı zamanlarda yapılacak olan ELISA testlerinde kullanmak üzere defalarca içeriği çözdüremek adına, DMEM içeriği pipet yardımıyla tüpün tabanına değdirilmeden, 3 farklı büyüme faktörü çalışılacağı için 3 mikrosantrifüj tüpüne bölündü (Resim 16) ve tüp üzerlerine takip numaraları aynı şekilde yazıldı. O an ELISA testinde çalışılmayacak tüpler -80°C lik soğutucu dolabına geri konuldu. Her analizden yarım saat önce inkubatör 37°C ye ayarlandı. ELISA testi için 96 kuyucuk (well) içeren, her teste özgü büyüme faktörleriyle kaplanmış mikropalakalar kullanıldı.



Resim 15. 15 ml'lik tüplerin santrifüj edildiği cihaz [(Sigma 3-18K centrifuge (Sigma, Almanya)]



Resim 16. 4 ml DMEM içeriğinin mikrosantrifüj tüplerine bölünmüş halleri



Resim 17. ELİSA kitinin içeriğinin ve çözdürülmüş DMEM örneklerinin santrifüj edildiği cihaz

5.5.1. TGF- β ve VEGF Düzeylerinin ELISA ile Analizi

TGF- β düzeylerinin belirlenmesi için TGF- β ELISA kiti (Human TGF- β ELISA Kit, Elabscience Biotechnology Co. Ltd, USA) ve VEGF düzeylerinin belirlenmesi için VEGF ELISA kiti (Human VEGF ELISA Kit, Elabscience Biotechnology Co. Ltd, USA) ile çalışıldı (Resim 18). Bu ELISA kitlerinin içeriği ve uygulama basamakları aynı olduğu için tek başlık altında anlatıldı.



Resim 18 : TGF- β ve VEGF ELISA kitleri

Standartlar, ilk iki kolondaki kuyucuklara sistematik olarak artan konsantrasyonlarda (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/mL) 100'er μ l eklendi. Örnekler ve pozitif kontrolleri için de her kuyucuğa DMEM örneklerinden 100'er μ l konuldu. Mikropalakların üzeri kapatılarak 90 dakika 37 °C de karanlıkta inkübe edildi. Her kuyucuktaki sıvı pipetle çekilip atıldıktan sonra kuyucuklara 100'er μ l biyotinlenmiş antikor eklenerek nazikçe sallanarak karıştırıldı ve üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mikroploka, dilüe edilmiş yıkama solüsyonu kullanılarak otomatik mikroploka yıkayıcı (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, CA, USA) yardımıyla 3 kez yıkama işlemi yapıldı (Resim 20). Yıkamadan sonra her bir kuyucuğa, 100 μ l Avidin 'Horseradish Peroxidase' (HRP) konjugat solüsyonu eklendi ve mikroplokanın üzeri tekrar kapatılarak 30 dk. 37 °C de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 5 kez yıkama yapıldı. Sonra bütün kuyucuklara loş ışıkta 90 μ l substrat reaktifi eklendi ve üzeri kapatılarak 37 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda son basamak olarak, her bir kuyucuğa renkleri maviye dönmüş sıvılar üzerine 50 μ l "Stop Solution" eklenerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Sıvıların rengi maviden sarıya döndüğü gözlemlendiğinde mikroploka optik okuyucu (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Termo Fisher Scientific) kullanılarak 450nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür (Resim 21). Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen optik dansite değerleri ile örneklerin optik dansite

değerleri SkanIt Software 2.4.3 (Thermo Scientific, USA) yazılımı kullanılarak kaydedildi. Standartların optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına göre standart eğrisi çizildi. Elde edilen standart eğriye göre tüm örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

5.5.2. PDGF Düzeylerinin ELISA ile Analizi

PDGF düzeyleri enzyime-linked immunosorbent assay (ELISA) (Human PDGF ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, China, Catalog No: E1112HU) kiti ile çalışıldı (Resim 19).



Resim 19. PDGF ELISA kiti içeriği, kullanılan pipetler ve uçları

Tüm örnekler, kontroller ve standartlar PDGF antikoruna ile kaplanmış, 96 kuyucuk içeren mikrotiplere üzerine eklendi. Standartlar, ilk iki kolondaki kuyucuklara sistematik olarak artan konsantrasyonlarda (24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75 ng/mL) 50'şer µl eklendi. Örnekler ve pozitif kontrolleri için de her kuyucuğa DMEM örneklerinden 40'ar µl konuldu. Üstlerine 10 'ar µl biyotininmiş İnsan PDGF antikoruna ve 50'şer µl streptavidin 'Horseradish Peroxidase' (HRP) konjugat solüsyonuna eklendi ve hafifçe sallamak suretiyle karışmaları sağlandı. Mikrotiplerin üzeri kapatılarak 60 dk. 37 °C de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yi uzaklaştırmak için dilüe edilmiş yıkama solüsyonuna kullanılarak otomatik mikrotiplere yıkayıcı (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, CA, USA) yardımıyla 5 kez yıkama işlemi yapıldı (Resim 20). Sonra bütün 50 µl substrat A reaktifi ve 50 µl substrat B reaktifi eklendi ve tekrar üzeri kapatılarak 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 µl "Stop Solution" eklenerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Kuyucuklardaki sıvının renginin sarıya döndüğü gözlemlendikten sonra mikrotiplere optik okuyucu (Multiskan™ FC Microplate

Photometer, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak 450nm’de absorbans değerleri ölçüldü (Resim 21). Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen optik dansite değerleri ile örneklerin optik dansite değerleri SkanIt Software 2.4.3 (Thermo Scientific, USA) yazılımı kullanılarak kaydedildi. Standart eğrideki değerler ng/ml olarak ifade edilmiştir. Elde edilen standart eğriye göre tüm örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.



Resim 20. ELISA mikropate yıkayıcı (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, CA, ABD)



Resim 21. ELISA mikroplate optik okuyucu. (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, İspanya)

5.6. Verilerin Analizi

Bu çalışmaya ait veriler “SPSS for Windows 15.0” (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Verilerin normal dağılıma uygunluğu, Kolmogorov Smirnov normal dağılıma uygunluk testi kullanılarak 0,05 istatistiksel anlamlılık değeri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda tüm verilerin normal dağılım göstermediği belirlenmiştir. Bu bağlamda, gruplar arasında, her bir büyüme faktörünün farklı sürelerde gerçekleştirdiği salınım miktarları Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

6. BULGULAR

Çalışmaya 6 erkek ve 6 kadın olmak üzere toplam 12 gönüllü katılmış olup, yaşları 23 ile 37 arasında değişmektedir. Gönüllülerin yaş ortalaması $29,91 \pm 3,77$ 'dir. Gönüllülere ait demografik veriler Tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 4. Gönüllülere ait demografik veriler sunulmaktadır. Veriler, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait birim pg/g'dır.

	Erkek		Kadın		Genel Yaş
	Kişi sayısı	Yaş	Kişi sayısı	Yaş	
PRF (n=12)	6	$29,66 \pm 1,72$	6	$30,16 \pm 1,72$	$29,91 \pm 3,77$
L-PRF™ (n=12)	6	$29,66 \pm 1,72$	6	$30,16 \pm 1,72$	

Her iki grup, incelenen büyüme faktörlerinin salınımı açısından karşılaştırıldığında, her bir zaman diliminde anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 5. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım değerleri sunulmaktadır. Veriler ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

	PRF	L-PRF™
TGF-β1 1. Saat	52,73 ± 35,31	48,63 ± 42,98
TGF-β1 24. Saat	179,64 ± 224,30	100,53 ± 70,72
TGF-β1 72. Saat	304,3 ± 237,62	159,47 ± 88,34
PDGF 1. Saat	632,74 ± 721,30	740,43 ± 2168,72
PDGF 24. Saat	986,71 ± 975,47	1748,98 ± 3698,91
PDGF 72. Saat	1260,12 ± 1095,56	2021,94 ± 4100,09
VEGF 1. Saat	24,99 ± 30,23	19,16 ± 20,99
VEGF 24. Saat	87,44 ± 63,69	70,08 ± 52,03
VEGF 72. Saat	123,5 ± 58,78	137,75 ± 48,96

Tablo 6. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım seviyelerinin istatistiksel karşılaştırması verileri çeyrek değerler genişliği olarak sunulmaktadır. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

		PRF		L-PRF™		<i>p</i> <i>değeri</i>
		Median	Çeyrek değerler genişliği	Median	Çeyrek değerler genişliği	
TGF-β1	1. Saat	52,22	23,5-73,58	32,25	14,32-14,32	0,478
	24. Saat	118,54	76,57-157,81	117,05	29,15-29,15	0,41
	72. Saat	197,73	151,63-471,05	156,8	112,3-184,95	0,089
PDGF	1. Saat	246	81,32-1188,75	24,15	0,22-338,75	0,078
	24. Saat	617,4	199,4-199,4	76,88	0,45-883,5	0,198
	72. Saat	1010,5	332,05-2348,27	152,5	0,53-1204,62	0,128
VEGF	1. Saat	15,35	10,65-20	8,73	7-21,87	0,266
	24. Saat	89	29-124,75	57,5	33,25-111,25	0,378
	72. Saat	120	77,25-167,5	143,5	88-172,75	0,59

Herbir grup içinde erkek ve kadın gönüllülerden elde edilen PRF örneklerindeki büyüme faktörü salınımları incelenmiştir (Tablo 7). Elde edilen sonuçlara göre cinsiyetin her bir gruptaki incelenen büyüme faktörlerinin salınımına istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).



Tablo 7. Gruplara ait farklı zaman dilimlerindeki büyüme faktörü salınım seviyelerinin cinsiyet göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen istatistiksel karşılaştırması sunulmaktadır. Veriler, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

		TGF-β1			PDGF			VEGF		
		1. Saat	24. Saat	72. Saat	1. Saat	24. Saat	72. Saat	1. Saat	24. Saat	72. Saat
PRF	Erkek	56,45 \pm 19,41	250,01 \pm 307,55	366,63 \pm 289,90	183,36 \pm 292	516,32 \pm 740,66	90,38 \pm 1058,85	11,92 \pm 4,94	53,05 \pm 42,89	99,66 \pm 66,71
	Kadın	49,01 \pm 48,30	109,27 \pm 64,88	241,96 \pm 175,64	1082,13 \pm 758,07	1457,10 \pm 1006,86	1614,86 \pm 1103,34	38,05 \pm 39,70	121,83 \pm 65,17	147,33 \pm 42,30
L-PRFTM	Erkek	57,62 \pm 44,53	116,35 \pm 74,78	187,91 \pm 86,49	18,95 \pm 29,5	56,71 \pm 87,63	154,82 \pm 259,51	12,08 \pm 7,41	54,83 \pm 46,36	140,66 \pm 47,33
	Kadın	39,65 \pm 43,44	84,71 \pm 69,36	131,04 \pm 88,03	1461,91 \pm 3016,17	3441,24 \pm 4818,68	3889,07 \pm 5343,18	26,24 \pm 28,17	85,33 \pm 57	134,83 \pm 54,89

Tablo 8. Herbir gruptaki erkek ve kadınlar arasındaki büyüme faktörü salınım seviyelerinin istatistiksel karşılaştırması sunulmaktadır. Veriler, median ve çeyrek değerler genişliği olarak ifade edilmektedir. Her veriye ait konsantrasyon değerleri pg/g birimindedir.

		TGF-β1			PDGF			VEGF		
		1. Saat	24. Saat	72. Saat	1. Saat	24.Saat	72. Saat	1. Saat	24. Saat	72. Saat
PRF	Erkek (n=6)	61,05 (38,83- 71,25)	140,75 (98,24- 340,91)	225,04 (183,87- 597,91)	86,6500 (0,4050- 311,57)	242, 6 (0,62- 989,85)	505 (2,03- 2070,82)	13,17 (8,62- 15,78)	64 (2,58- 88)	80,5 (55- 162,25)
	Kadın (n=6)	27 (14,68- 90,48)	91,34 (64,67- 155,11)	167,60 (106,95- 427,4)	1137,5 (274,7- 1849,25)	1280,5 (512,4- 2444)	1387,5 (536,8- 2896,75)	20 (10,39- 71,75)	115 (76,75- 190)	129 (116,75- 185,75)
p değeri		0,342	0,59	0,072	0,082	0,235	0,172	0,264	0,357	0,045
L- PRFTM	Erkek (n=6)	32,25 (28- 113,86)	122,81 (37,93- 175,55)	165,3 (138,6- 231,05)	0,35 (,08- 52,17)	1,05 (,14- 160,5)	0,58 (,37- 383,75)	11,01 (5,75- 17,61)	46 (13,75- 101,5)	145,5 (107- 174,75)
	Kadın (n=6)	23,12 (9,69- 69,28)	83,28 (20,72- 146,64)	147,9 (42,22- 186,64)	290,5 (,23- 2342)	722 (1,45- 9158,75)	955,75 (,98- 10229,75)	8,73 (7,75- 60,75)	70 (37,75- 133,75)	135 (79,25- 183,50)
p değeri		0,453	0,43	0,78	0,74	0,166	0,153	0,231	0,410	0,063

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

PRF ilk olarak Fransa'da Choukroun ve arkadaşları tarafından spesifik olarak oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılmak üzere geliştirilmiş ve ikinci nesil trombosit konsantresi olarak sınıflandırılmıştır (36).

Dohan ve ark. (2009), PRF'yi tanımlarken, alınan kan örneğinin içerdiği trombositlerin çoğunu ve lökositlerin yarısını (çoğunlukla lenfositleri) fibrin pıhtı içinde bulundurduğunu ve bu nedenle “Lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-PRF)” olarak adlandırılması gerektiğini ifade etmişlerdir (45). Diğer bir deyişle, başlangıçta Choukroun tarafından tanımlanan PRF terimi, daha sonra ürünü daha iyi tanımladığı düşüncesi ile L-PRF adını almıştır.

L-PRF'nin hazırlanış protokolü açık erişimli bir bilgi olarak herkes tarafından bilinmektedir. Özetle hatırlanacak olur ise, herhangi bir silika kaplı cam tüp ve her hangi bir santrifüj cihazı kullanılarak elde edilen ürünün L-PRF olarak adlandırıldığı ifade eden raporlar mevcuttur (51,127). Bununla beraber, L-PRF'nin elde edilmesinde kullanılan kan alma tüpleri ve santrifüj cihazları bazı firmalar tarafından “L-PRF™” ticari markası altında pazarlanmaktadır. Diğer bir deyişle, L-PRF ilk etapta bir trombosit konsantresi tipi olarak literatürde ifade edilirken, daha sonra aynı ifade bir ticari marka ismi olmuştur.

Bu marka kapsamında L-PRF™ logosu taşıyan paketli kan alma tüpleri (IntraSpin™ sistem, Boca Raton, Florida, ABD) bulunmaktadır. Bu tüplerin, başka herhangi bir kan alma tüpüne göre üstünlüğün olup olmadığı bilimsel olarak ortaya konmamıştır. Bununla beraber, L-PRF™ ticari markası kapsamında IntraSpin™ (Boca Raton, Florida, ABD) markalı santrifüj cihazı da yer almaktadır. Bir PRF tipi olarak L-PRF tanımlaması ilk defa Dohan tarafından ortaya atılmıştır (38). Dohan ve ark. nın (128) yayınladığı sonraki çalışmalarda L-PRF™ markası kapsamında yer alan IntraSpin™ isimli santrifüj cihazının, incelenen diğer cihazlara göre bazı avantajlarının söz konusu olduğu rapor edilmiştir. Bu bağlamda, IntraSpin™ ile elde edilen PRF örneklerinin, aynı rölatif santrifüj kuvveti ve sürelerde, farklı santrifüj cihazları kullanılarak elde edilen örneklerden bazı yönlerden üstün olduğu dokümente edilmiştir (128,129).

Biz bu çalışmamızda, ticari L-PRFTM markasına ait kan alma tüpleri ve santrifüj cihazı ile elde edilen PRF örneklerini, başka bir santrifüj cihazı (Hettich Mikro 22R, Tuttlingen, Almanya) ve kan alma tüpleri (BD Vacutainer, Plymouth PL6 7BP, İngiltere) kullanılarak elde edilen PRF örnekleri ile büyüme faktörü salınım profilleri açısından karşılaştırdık. Elde edilen sonuçlara göre, her iki yaklaşım ile elde edilen PRF örnekleri *in vitro* koşullarda farklı sürelerde aynı düzeylerde büyüme faktörü salınımı yapmıştır.

Çalışmamızda kullanılan deney modeli, daha önce yayınlanan bazı çalışmalarda da uygulanan, *in vitro* büyüme faktörü salınımını test etmede kabul görmüş bir yaklaşımdır (92,130,131). Bu bağlamda, çalışmamızda PRF örnekleri elde edilip membran haline getirildikten sonra, içerisinde DMEM bulunan deney tüplerinde 0-1 saat, 1-24 saat, 24- 72 saat aralıklarındaki büyüme faktörü salınımlarını ölçmek için bekletilmiş, deney sürelerinin bitiminden sonra ELISA analizleri yapılana kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Aynı deney modelini 2009 yılında kullanmış olan Dohan ve ark. (92), PRF membranından salınan 3 önemli büyüme faktörünün (TGFβ-1, PDGF-AB, VEGF) ve thrombospondin-1 (TSP-1) in çeşitli zaman periyodlarında salınım miktarlarına ve salınım profillerine baktıkları *in vitro* çalışmalarında, membran haline getirdikleri PRF fibrinleri, içerisinde 4 ml steril DMEM bulunan 10 ml’lik tüplerde bekletmişlerdir. Beklettikleri DMEM solüsyonlarından 4 ml’lik örnekler alıp, bu örnekleri ELISA analizi yapılana kadar -80°C’de muhafaza etmişlerdir. İnceledikleri büyüme faktörlerinin en az 7 gün boyunca yavaş ve belirgin bir salınım profiline sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, TGFβ-1 ve VEGF’ nin deney sonunda salınan miktarının başlangıçta salınan miktarına göre daha yüksek olmasının, fibrin matriks içerisinde hapsolan lökositlerin bu büyüme faktörlerini yüksek miktarda üretmeye devam etmelerine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada incelenen TSP-1’in ise, matriselüler proteinlerden olduğu için, membranda tespit etmesinin zorluğundan bahsedilmiştir. Fibrin, ne kadar fazla parçalanır ve yeniden düzenlenirse, TSP-1’in de ortama o kadar fazla salınacağı belirtilmiştir. Bu molekülün PRF içerisinde yoğun miktarda salınıyor olması cerrahi bölgelerde hemostatik ajan olarak da kullanılabilceğini de göstermiştir (92).

Eren ve ark. (2016), PRF membranlarından TGFβ-1, PDGF-AB, VEGF, matriks metalloproteinaz (MMP)-1 ve -8 salınım miktarına ve salınım profillerine baktıkları çalışmalarında, Dohan ve ark.’nın çalışmalarında (2009) kullandıkları aynı deney

protokülünü kullanıp 3 gün boyunca ölçümler yapmak üzere örnekler toplamışlardır (130). Santrifüj parametrelerinden RCF ve rpm değerlerini sabit tutup (400 g, 2660 rpm), santrifüj sürelerini değiştirerek (10 dakika ve 12 dakika) aynı santrifüj cihazında elde ettikleri membranları, içeriğindeki büyüme faktörleri, enzimler ve hücre sayısı açısından karşılaştırmışlardır. 12 dakikalık santrifüj işlemi sonrası elde edilen PRF'nin daha yüksek düzeyde VEGF salınımı yaptığını ve santrifüj sürelerinin değiştirilmesinin, TGF- β 1, PDGF-AB, MMP-1, MMP-8 ve hücre sayısı üzerinde farklılığa yol açmadığını göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda 400 g ayarında 10 dk boyunca yapılan santrifüj işlemi sonrasında elde edilen PRF membranların yüksek miktarda trombosit ve lökosit içeriklerine sahip oldukları belirtilmişti (49,131). Eren ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada ise santrifüj süresinin 12 dakikaya çıkartılmasının trombosit ve lökosit sayısı üzerine bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Bu çalışmayla PRF'in MMP-1 ve MMP-8 salınımı yaptığı da saptanmış ve MMP'ler aracılığı ile PRF'nin ekstraselüler matriksin yeniden yapılanmasını hızlandırabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızın sonuçları da Eren ve ark.'nın (130) yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarıyla büyüme faktörü salınımı açısından benzerlik göstermektedir.

Yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamalarından oluşmaktadır (132). Hemostaz aşamasında trombositler, yara bölgesinde plak halinde birikerek primer hemostaz için bir tıkaç oluştururlar. Bu tıkaç zamanla fibrin pıhtı haline gelir. Fibrin pıhtı içerisinde kalan trombositlerden, aktivasyonları sonucu araşidonik asit metabolitlerinin, proteazların ve çeşitli büyüme faktörlerinin salınımı gerçekleşir. Böylece inflamasyon ve proliferasyon fazlarında rol oynayan başta nötrofiller olmak üzere immünolojik hücreler yara bölgesine göç ederler. Bu hücreler salınımını yaptıkları preolitik enzimler (proteazlar), sitokinler ve serbest radikaller ile yara bölgesini temizleyerek yara bölgesini korurlar, enfeksiyon riskini azaltırlar. (133). İyileşmenin erken fazında keratinositler, reepitelizasyonu başlatır. Proliferasyon fazında endotel hücreleri ve fibroblastlar çoğalarak granülasyon dokusu oluşur. Lökositler, makrofajlar ve alt gruplarındaki nötrofil ve monosit gibi hücreler de yeni doku oluşumuna katılıp, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezi desteklerler (134). Son aşama olan yeniden şekillenme aşamasında ise, yara bölgesinde kolajen fibrilleri ve yeni oluşan damarlar organize olur. Trombositler ve lökositler arasındaki çapraz etkileşimin, ayrıca kemik rejenerasyonunu da desteklediği bildirilmiştir (135).

Trombositlerin alfa granüllerinde bulunan büyüme faktörleri, yara iyileşmesini başlatan hücresel olaylardan sorumlu olup iyileşme yanıtını düzenleyen anahtar moleküller olarak bilinmektedir. Yukarıda bahsedilen faktörler yara iyileşmesi safhalarında düzenli bir şekilde birlikte çalışırlar. Aktive olmuş trombositler; yara iyileşmesinde PDGF, TGF- β , VEGF için en önemli kaynaktır. Yara bölgesindeki trombositlerin ortalama ömrü 7-10 gündür. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri, trombositlerin degranülasyonu ve aktivasyonundan trombositlerin yaşam döngüsünün sonuna kadar sürekli salınırlar (136). Buna ek olarak, yara bölgesine göç eden monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler büyüme faktörü salınımı yaparlar. Bu döngü iyileşme süresini azaltıp kalitesini daha da artırır. Bu faktörlerden PDGF, ilk olarak nötrofillerin, daha sonra da sert ve yumuşak doku rejenerasyonunda rol oynayan makrofajların, fibroblastların, osteoblastların ve endotel hücrelerinin yara bölgesine göç etmesini sağlar. Yara iyileşmesinin son aşamalarında PDGF bir kollajenaz aktivatörü gibi işlev görür ve kollajenin yeniden yapılandırılmasını sağlayarak yaranın mukavemetini artırır (130). Yara iyileşmesinin evrelerinde fibroblast göçü, kollajen sentezi ve doku vaskülarizasyonu TGF- β 1 tarafından kontrol edilir (137). EGF, hücre büyümesini, keratinosit göçünü, yaraların re-epitelizasyonunu desteklerken (138,139); VEGF, anjiyogenez ve yeni damar oluşumundan sorumlu büyüme faktörüdür (140). Büyüme faktörlerinin uzun yıllardır iyileşme sürecini hızlandırma ve doku rejenerasyonunu artırma potansiyeline sahip olduğuna inanılmaktadır. Gruber ve ark. (2003), PRF içindeki trombositlerin aktivasyonu sonucu ortama salınan büyüme faktörlerinin insan periosteal hücrelerin de mitojenik aktivitelerini arttırdığı ifade etmişlerdir (141). Yukarıda bahsedilen çalışmanın sonucuna benzer bir şekilde Gassling ve ark. (2013) da yaptıkları *in vitro* çalışmada, PRF membranlarının büyüme faktörleri içerikleri sebebiyle insan osteoblast hücrelerinin metabolik aktivasyonlarını ve proliferasyonlarını stimüle etmekte kollajen membrana göre daha başarılı oldukları gösterilmiştir (142). Teknolojinin de gelişmesiyle hız kazanan doku mühendisliği kapsamında rekombinant trombosit kaynaklı büyüme faktörü (rhPDGF) gibi büyüme faktörlerinin çok çeşitli klinik prosedürlerde kullanılmasının da, doku oluşumunu pozitif yönde etkilediği çalışmalar vardır (143). Gassling ve ark. (2010) yaptıkları *in-vitro* bir çalışmada doku mühendisliğinde kullanılmak üzere PRF membranların etkinliğini hayvan kaynaklı kollajen membranlar (BioGide®) ile karşılaştırmışlar ve PRF membranlarının kollajen membranlara göre daha iyi bir iskelet oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni olarak PRF membranının daha düz bir yüzeyinin olmasına ve PRF'nin içindeki trombositlerden salınan büyüme faktörlerinin varlığına bağlamışlardır (144).

Trombosit konsantrelerin tıp ve diş hekimliği alanlarında kullanımının artmasının en önemli nedeni, yukarıda bahsedildiği gibi yara iyileşmesi sürecinde kilit rollere sahip olan büyüme faktörlerini bünyesinde bulundurmasıdır. Araştırmacıların farklı protokollerle elde ettikleri PRF'lerin yara iyileşmesinde rejenerasyon kapasitelerini değerlendirmek için öncelikle araştırdıkları parametre 'büyüme faktörü salınımı' olmaktadır. Bu çalışmada da farklı protokollerle elde ettiğimiz PRF membranlarını yara iyileşmesi aşamalarında önemli rollere sahip olan 3 büyüme faktörü PDGF, TGF- β , VEGF'nin salınımları incelenmiştir.

Dohan ve ark. (45) ve Everts ve ark. (145), trombosit konsantrelerini sınıflandırırken lökosit varlığının önemini vurgulamışlardır. Konsantrelerdeki lökositlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve lökositlerin biyomateryale dahil edildiği durumlarda istenmeyen bir enflamatuvar reaksiyon gözlemlenmediği, yüksek seviyelerde VEGF içerdiği belirtilmiştir. Bu nedenle lökositlerin varlıklarının rejenerasyon sürecini geliştirebileceğini düşünmektedirler (145,146).

Lökositler, yara iyileşmesi için kritik öneme sahip olan büyüme faktörlerinin yanında (özellikle VEGF) serin ve matriks metalloproteinaz (MMP) gibi çeşitli proteinazları salgılamaktadır. Ayrıca lökositler megakaryositler tarafından üretilen trombositlerin miktarını arttırmaktadır. Lökosit proteinazları, polimorfonükleer lökositlerin yara bölgesine göç etmesine katkıda bulunur ve enflamatuvar olayları kontrol eder. Bunu da, enflamatuvar hücrelerini yara iyileşmesi sırasında, çevre dokulara verdikleri zararları sınırlandırmak için inaktive ederek yaparlar (147). Proteinazların diğer bir önemli rolü de geçici fibrin matriksini parçalamak ve hücre dışı matriksi yara bölgesinde yeniden şekillendirmektir. Matriksin proteazlarla, özellikle de MMP'lerle parçalanması ve yeniden şekillenmesi, lökosit göçü, anjiyogenez, reepitelizasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi gibi yara iyileşmesi basamakları için önemlidir (148). Lökositik proteinazlar TGF- β , PDGF ve FGF gibi büyüme faktörlerinin aktivitesinin kontrolünde rol almaktadır ve proteinazların etkisi ile inaktif formda salınan TGF- β aktif forma dönüşür. Ek olarak, TGF- β ve FGF, hücre dışı matrikse bağlı olarak depolanır. Bu matriksin proteazlarla parçalanmasıyla, büyüme faktörleri yara bölgesine etki edebilmeleri için serbest bırakılır (147). Literatürde, lökositlerin trombosit konsantrelerinde bulunmalarının iyileşme sürecinde doku için faydalı olup olmadığı halen tartışma konusudur. Bazı araştırmacılar biyomateryalde lökositlerin bulunmasının avantaj sağlayacağını vurgularken (149), bazı araştırmacılar biyomateryalden tamamen uzaklaştırılmasını önermektedir (1).

Trombositten zengin ürünlere lökosit eklenmesiyle, esansiyel lökositik proteinazların yara bölgesine direkt olarak uygulanmasına fırsat vermiş olunur. Böylece proteinazların bölgede fonksiyonlarını gösterip, rejenerasyon sürecinde daha etkili olacakları düşünülmektedir (149).

Lökosit içeren ve lökosit içermeyen trombosit konsantrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Zimmerman ve ark., 2003), lökositlerin PRP'ye eklenmesinin büyüme faktörü sentezini arttırdığı ifade edilmiştir. Lökositlerin varlığında PDGF-AA (trombosit kaynaklı büyüme faktörü AA izomeri) , PDGF-BB (trombosit kaynaklı büyüme faktörü BB izomeri), TGF- β miktarları daha yüksek bulunmuştur (150). Bazı araştırmacılar da PRP içine lökosit eklenmesinin, dokuya zararlı etkilerinin olabileceğini bildirmiştir. Yara bölgesine ilk göç eden nötrofiller, reaktif oksidatif ürünleri ve nitrik oksit salgılayarak bölgenin debridmanını ve yabancı cisimlerin ortadan kaldırılmasını sağlar (151). Yaralanmayı takiben ilk saatlerde inflamasyonun, dolayısıyla nötrofillerin etkisinin azaltılması, yapılan tedavilerin terapötik hedefidir. Nötrofillerden salınan reaktif oksidatif ürünlerin yara çevresindeki sağlıklı dokularda hasara sebep olduğu belirtilmiştir (152). Örneğin, kas doku yaralanmalarının tedavisinde, nötrofillerin salgılayacağı reaktif oksidatif ürünlerin oluşturabileceği olası doku hasarı sebebiyle lökositten fakir PRP önerilmektedir (153,154). Bundan dolayı Anitua ve ark. (2006), PRGF içinden lökositlerin uzaklaştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (155).

Makrofajlar ise nötrofil apoptozisini uyararak nötrofillerin potansiyel yıkıcı etkilerinden konak dokunun korunmasını sağlamaktadır (156). Lökositten zengin PRP'de monosit sayısının artırılması ile yara bölgesinde nötrofillerin aktivitesinin kontrol altına alınabileceği ve böylece immün hücrelerin sağlıklı çevre dokudaki olası yan etkilerini azaltılabileceği düşünülmektedir (149). PRF ve lökositten zengin PRP gibi preparatlarda lökositlerin varlığı enfeksiyonu azaltabilmektedir. Passaretti ve ark. (2013) PRF ve PRP'den salınan pro-inflamatuar sitokinleri ve büyüme faktörü miktarlarını karşılaştırmışlardır. PRF' in salgıladığı IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ (interferon gama), MIP-1 α (makrofaj inflamatuvar protein 1-alfa), MIP-1 β (makrofaj inflamatuvar protein 1-beta) ve TNF α (Tümör nekroz faktör alfa) PRP' den daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca PRF, PRP' den 2 kat daha fazla TGF, 15 kat daha fazla VEGF sentezlediğini fakat PRP'nin PRF'den 2 kat daha fazla PDGF sentezlediğini bildirmişlerdir. PRF' in daha fazla pro-inflamatuar sitokin, VEGF ve TGF- β 1 sentezlemesini lökosit içeriğine bağlamışlardır (157). Lundquist ve ark.

(2008) PRF'nin içerdiği büyüme faktörlerine bağlı olarak proteolitik degradasyona karşı dirençli olduğunu ve stabilitesini koruduğunu göstermişlerdir. Tripsin muamelesiyle yara bölgesinde büyüme faktörlerinin degradasyonlarının azaldığını gösteren bu çalışma, TGF- β 1 ve PDGF-AB'nin sınırlı proteolizine yol açabileceğini göstermiştir. Buna istinaden proteinaz aktivitesinin yüksek olduğu kronik yaraların tedavisinde kullanılmasının avantajlı olabileceğini bildirmişlerdir (158).

Literatüre bakıldığında, PRF hazırlama protokolleri dahilinde kullanılan kan alma tüplerinin PRF kalitesini etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmış olduğu ve hatta orijinal protokolün terkedilip hazırlama aşamasında titanyum tüplerin kullanılmasıyla, fibrin yapısı ve dayanıklılığı çok daha fazla olan farklı bir biyomaterialin tanımlanmış olduğu görülmektedir (159,160).

Miron ve ark.'nın çalışmasında ticari PRF hazırlama kitleri kapsamında pazarlanan tüplerin, PRF kalitesi üzerine büyük bir etkiye sahip olduğu gündeme gelmiş, tüplerin özelliklerinin önemli olduğu vurgulanmıştır (161). Santrifüj tüplerinin farklılığının, pıhtıların morfolojik özellikleri üzerine etkisi olduğu ortaya çıkmış ve ayrıca 3 farklı santrifüj cihazında da IntraSpin™ sisteminin tüpleriyle elde edilen pıhtıların diğer santrifüj tüpleriyle elde edilen pıhtılara kıyasla daha büyük ölçülerde üretildiği sonucuna varılmıştır. Tunalı ve ark. (2013) ise yaptıkları bir hayvan çalışmasında antikoagülansız cam tüplerle L-PRF hazırlama protokollerine alternatif olarak Grade IV titanyum tüplerde hazırlanan T-PRF'yi tanımlamışlardır. Titanyum tüplerin cam tüplere kıyasla trombositlerin aktivasyonunda daha etkili olduğu, daha polimerize fibrin elde edilebileceğini ve cam tüplerin içindeki silikanın olası zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı için elde edilen ürünün biyoyumumluluğunun daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (15). Dohan ve ark. (2010)'nın daha önce yaptıkları çalışmada, PRF elde edilirken kullanılan tüplerin çeşidinin (cam veya cam kaplı plastik tüpler) ve membran haline getirmek için yapılan sıkıştırma işleminin biyomateryalin üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Test edilen tüpün ve membran elde etmek amacı ile gerçekleştirilen sıkıştırma işleminin, PRF'nin yapısını etkilemediğini göstermişlerdir (47). Bizim çalışmamızda, kontrol grubundaki PRF örneklerini membran haline getirmek için siman camları kullanılmıştır. Bunun nedeni, amacımızın L-PRF™ sistemine ait herhangi bir malzemeye ihtiyaç duymadan elde edilen PRF örneklerini L-PRF™ ile elde edilenler ile kıyaslamak olduğudur. Deneyler öncesinde siman camı seçimi, L-PRF™ sisteminde bulunan membran oluşturma kutusunda yer alan metal levha ve

kapağın ağırlığı göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiş olup, metal levha ve kapağın ağırlığına yakın ağırlıkta olacak şekilde temin edilmiştir.

Dohan ve ark. (2006), PRF hazırlama aşamalarında başarılı olabilme şartının, öncelikle kanın alınma ve santrifüj cihazına yerleştirme hızına bağlı olduğunu bildirmişlerdir (162). Miron ve ark. da kan alma işleminde kanın tüpü doldurma süresinin elde edilecek fibrin pıhtının kalitesini etkileyebileceğini düşünmüşlerdir ve yaptıkları çalışmada, kan alma aşamasında Salvin sisteminin tüplerini daha uzun sürede doldurulabildikleri için bu tüplerle elde edilen pıhtının, diğer tüplerde elde edilenlere göre daha küçük olmasını bu parametrenin değişkenliğine bağlamışlardır (161). İlgili çalışmada, kan alınmasından santrifüj edilmesine kadar geçen ilk 60 saniye içinde PRF membranlarının boyutlarında çok az değişiklik gözlenmişken, 60-90 saniyelik süre zarfında PRF membranlarının boyutlarında %13'lük azalma, 120 saniye ve sonrasında %23'lük azalma gözlenmiştir. Hastadan alınan kan örneklerinin santrifüj edilmeden önce antikoagülan bulunmayan tüp içinde bekletilmesinin, zamanla pıhtılaşmaya yol açabileceğine ve bu örneklerden elde edilecek PRF pıhtının boyutunun küçülmesine neden olabileceğine değinilmiştir. Araştırmacılar, bu sürenin klinisyenler tarafından dikkat edilmesi gereken bir parametre olması gerektiğini ve PRF membranlarının makroskopik morfolojisinde önemli değişikliklerden kaçınmak için bu sürenin 60 ile 90 saniye aralığında tutulması gerektiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızın amacı 2 farklı sistemin, santrifüj cihazı, kan alma tüpü, PRF hazırlama kutusu, makas içeren hazırlama kitlelerinin, elde edilen biyomateryal üzerine etkisini karşılaştırmak olduğu için gönüllülerden elde edilen 10 ml'lik kan örnekleri, test grubunda IntraSpin™ cihazının tüpleri içerisinde, kontrol grubunda ise antikoagülan içermeyen tüpler (BD Vacutainer®) içinde toplanıp, santrifüj cihazlarına yerleştirilmiştir. Kan alma işlemi sırasında kan örneklerinin antikoagülansız, vakumlu tüpleri doldurma süresi 25 saniyeyi aşmamıştır.

PRF eldesinde önemli olan hususlardan bir tanesi elde edilen kan örneğinin istenilen değerdeki rölatif santrifüj kuvvetine maruz kalmasıdır. Bu santrifüj kuvvetini belirleyen unsurlar, dakikadaki devir sayısı ile santrifüj cihazının rotor yarıçapıdır (124,125). Çalışmamızda kullanılan IntraSpin™ cihazı için belirlenen dakikadaki devir sayısı 2700'dür. Test grubunda L-PRF™, firma talimatları doğrultusunda 2700 rpm'de 12 dakika

santrifüj edilerek elde edilmiştir. Literatürde L-PRF™ hazırlamak için 3000 rpm’de 10 dakika veya 2700 rpm’de 12 dakika boyunca santrifüj uygulamalarının her ikisi de tavsiye edilmektedir (7,21). Bununla birlikte, kontrol grubundaki örneklerin yerleştirildiği Hettich santrifüj cihazının rotor çapı farklı olduğu için, aynı rölatif santrifüj kuvveti elde etmek için gerekli hesaplama yapılmış ve 1890 devir/dakikada PRF hazırlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hazırladığımız PRF örnekleri, kullandığımız her iki cihazda da aynı rölatif santrifüj kuvveti altında elde edilmiştir.

Dohan ve ark (2010,2017,2018) ‘na ait birçok yayında santrifüj cihazının kalitesinin elde edilen PRF örneklerinin kalitesine etki edebileceğini belirtmişlerdir (112,129,163). Bu bağlamda, kontrol amaçlı kullandığımız Hettich marka santrifüj cihazı birçok önemli çalışmada (164–166) kullanılmış, yüksek maliyetli bir cihazdır ve çalışmamızda bu cihaz ile elde edilen PRF örneklerinden salınan büyüme faktörlerinin, L-PRF™’den salınanlara kıyasla miktar açısından bir farkı bulunamamıştır.

Literatürdeki yaş ve cinsiyet parametresinin büyüme faktörü salınımı üzerindeki etkisi olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, Yajamanya ve ark. (2016)’nın gerçekleştirdiği çalışmada (167), farklı yaş gruplarındaki bireylerden elde edilen PRF pıhtılarının, fibrin ağ yapılarının morfolojisini değerlendirilmiştir.. Bu amaç doğrultusunda çalışmaya dahil edilen 95 hastayı üç farklı yaş grubuna [Grup 1: (20-39 yıl); Grup 2: (40-59 yıl); ve Grup 3: (60 yıl ve üzeri)] ayırıp, bu hastalardan alınan kan örneklerinin 3000 rpm de 10 dk santrifüjüyle elde ettikleri, küçük parçalar haline getirdikleri PRF membranlarını, hücre bloğu oluşturma yöntemiyle histolojik incelemeye tabi tutmuşlardır. İlerleyen yaşla birlikte pıhtılardaki fibrin ağın yoğunluğunda belirgin bir azalma görülmüşken; gevşek, düzensiz fibrin yapısında artış olduğunun dolayısıyla fibrin ağına sıkışmış olan trombosit ve lökosit sayısında azalma olduğunun sonucuna varmışlar.

Miron ve ark. (168), yaş ve cinsiyet parametrelerinin elde edilen PRF membranların morfolojik özellikleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kadın ve yaşlı hastalardan elde edilen PRF membranların, erkek ve genç hastalardan elde edilen membranlara göre daha büyük boyutlarda olduğu ölçülmüştür. Kadın ve yaşlı hastalarda daha büyük boyutlarda üretilmesinin sebebi olarak, bu hastaların periferik kanlarında kırmızı kan hücresi sayılarının diğer gruplara göre daha az olmasını göstermişlerdir. Santrifüj protokollerini hasta yaşı ve cinsiyetindeki farklılıklara göre optimize etmenin mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtilen, yaş unsurunun PRF yapısını etkilebileceği argümanı göz önünde bulundurularak, çalışmamıza katılan gönüllülerin yaşlarının mümkün olduğunca birbirine yakın olmasına dikkat edilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda test ve kontrol gruplarında yaş parametresi göz önünde bulundurularak büyüme faktörü salınımı açısından karşılaştırılması yapılmamıştır. İlaveten cinsiyet faktörünün PRF örneklerinden büyüme faktörü salınımına etkisini doğru bir şekilde değerlendirmek amacı ile katılan gönüllülerin kadın erkek sayısının eşit olmasına dikkat edilmiştir. Bununla beraber elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, cinsiyetin her iki PRF elde etme yönteminde de büyüme faktörü salınımı üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur.

Dohan ve ark. (2006)'nın, yaptıkları bir çalışmada kan örneğini 3000 rpm'de (yaklaşık 400g) 10 dk santrifüj ettikten sonra, trombositten fakir plazma ve trombositten zengin fibrinin eksudası içindeki PDGF-BB, TGF β -1 ve IGF-I miktarlarına bakmışlardır. Çalışmada PRF elde etme sürecinde oluşan yavaş fibrin polimerizasyonunun sonucunda, trombosit sitokinlerinin ve glikanik zincirlerin fibrin ağın içine hapsoldüğü belirtilmiş olup, fibrin matrisinin yeniden şekillenmesi sırasında, diğer trombosit konsantrasyonlarının aksine aşamalı olarak sitokin salındığı ortaya konmuştur. Sitokin miktarının zamana bağlı bu artışının, PRF'nin klinik olarak gözlenen iyileştirme kapasitesini açıklayabileceğini belirtmişlerdir (21). Bu çalışmayla PRF'nin kullanılabilir bir iyileşme konsantresi olarak düşünülebileceği bildirilmiştir. Bir sonraki çalışmalarında (2006) ise yine aynı miktarda aynı şekilde elde edilen trombositten fakir plazma ve trombositten zengin fibrinin eksudası içindeki IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α ve VEGF miktarları incelenmiştir. Araştırmacılar, VEGF haricinde bakılan tüm sitokinlerin PRF'de en yüksek miktarda bulunduğunu ve bunların kaynağının sadece lökositler olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu test edilen lökosit kaynaklı sitokinlerin de, önceki çalışmada bahsedilen trombosit kaynaklı büyüme faktörleri gibi fibrin ağı içinde depolanarak yavaş bir şekilde ortama salınım yaptıkları belirtilmiştir. Bu PRF'nin içeriği hakkındaki ilk analizler, PRF'nin, sadece bir trombosit konsantresi değil inflamasyonu kontrol altında tutan, savunma mekanizmalarını stimüle eden, immün sistemi düzenleyici bir özelliğinin olduğunu da ortaya koymuştur. Araştırmacılar bu çalışmaların sonucunda, PRF'nin cerrahi alanda kullanıldığında operasyon sonrasında görülebilecek olası enfeksiyonları azaltacağını öngörmüşlerdir (54). 2009 yılında yaptıkları araştırmada ise PRF membranından salınan 3 önemli büyüme faktörünün (TGF β -1, PDGF-

AB, VEGF) en az 7 gün boyunca yavaş ve belirgin bir salınım profiline sahip olduklarını bildirilmişlerdir (92).

Bunun gibi trombosit konsantrelerinden zamana bağlı büyüme faktörü ve sitokin salınım profilini inceleyen, salınımlarına belirli bir süre devam ettiklerini ifade eden birçok çalışma bulunmaktadır (92,114,130). Leitner ve ark. (2006), inkübe edilen PRF pıhtıların içindeki PDGF-AB seviyelerinin en az 72 saat boyunca sürekli arttığını bildirmiştir (169). Lundquist ve arkadaşlarının (2008), PRF'deki endojen fibrojenik faktörlerin biyoaktivite ve stabilitelerini incelediği *in vitro* çalışmada PRF'deki trombosit sitokin salınımının 72 saat süresince devam ettiği ve PRF'deki trombosit aktivasyonunun endojen proteinazlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (158). Başka bir çalışmada PRF elde edildikten 300 dakika sonrasına kadar büyüme faktörü salınımının devam ettiği gösterilmiştir (170). Omuz çevresi kas zedelenmelerinin iyileşmesine, L-PRF içeriğindeki büyüme faktörlerinin salınımının etkilerinin incelendiği bir çalışmada, bu faktörlerin ilk 7 günde yavaş ama sürekli salınım gösterdiğini, 28 güne kadar salınımlarına devam ettikleri bildirilmiştir (131). He ve ark. da (2009) benzer bir şekilde, TGF-1 ve PDGF-AB seviyelerinin 14. güne kadar belirgin şekilde arttığını, 154. günde en yüksek seviyeye ulaştığını ve sonrasında düşüşe geçip 28. günde salınımların minimuma indiğini bildirmiştir (123).

PRF elde etme yönteminin avantajları olarak, yöntemin düşük maliyetli olması ve trombosit konsantrisinin hızlı ve doğal bir polimerizasyonla, yani kimyasallar kullanılmadan üretilmesine olanak tanınması sayılabilir. Bu nedenle, bu yöntem günlük klinik kullanıma en uygun yöntem gibi görünmektedir (34). Bu protokolü daha da geliştirmek için yapılan çalışmalardan bir kısmı, santrifüj parametrelerinin elde edilecek L-PRF pıhtısı üzerine olan etkilerini anlamak ve bu etkileri optimize etmek amacıyla yapılmıştır.

PRF'nin yaygın kullanımı nedeniyle, birçok şirket önerdikleri protokollerde kullanılabilen santrifüj cihazlarını ticarileştirip patentleme sürecine girmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, otolog bir biyomateryal olan PRF'nin elde edilmesinde standardizasyon olmadığı için, farklı protokollerle elde edilen PRF'lerin biyolojik ve morfolojik özelliklerinin farklı olduğunu göstermiştir (112). Farklı santrifüj cihazlarında aynı devirde santrifüj yapılırsa bile kanın bulunduğu tüpe uygulanan çekim kuvveti farklı olacağından aynı özellikte PRF elde edilmeyebilir. Bu nedenle hangi cihazda PRF hazırlanacaksa,

santrifüj süresi ve devir sayısı o cihazı üreten firmanın kullanım talimatları göz önünde bulundurularak ayarlanması gerektiği belirtilmiştir (10).

Günümüze kadar PRF üretmek için, farklı RCF değerlerinde, farklı tüp rotor arası mesafesi ve açısı, rotor yarıçapı olan birçok santrifüj cihazı piyasaya sürüldü. Tüm bu cihaz özellikleri, PRF'nin 'biyolojik imzası' olarak adlandırılan, elde edilen son halinin biyolojik özelliklerinin anlaşılmasında önemli rol oynar.

Dohan ve ark. (112), dört farklı santrifüj cihazında [orijinal L-PRF santrifüjü IntraSpin™ (Intra-Lock International, Boca-Raton, FL, USA); A-PRF 12 santrifüjü (Advanced PRF, Process for PRF, Nice, France; LW - UPD8 (LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA) Salvin 1310 santrifüjü (Salvin Dental Specialties, Charlotte, NC, USA)] L-PRF üreterek, cihazların mekanik vibrasyonunun ve santrifüj özelliklerinin, üretilen L-PRF pıhtı ve membranlarının hücre ve fibrin yapısı üzerine etkisini incelemeyi amaçladıkları çalışmalarında (2018), aynı zamanda santrifüjün özelliklerinden bağımsız olarak PRF'nin biyolojik özelliklerini etkileyebilecek parametreleri araştırmışlardır. Standardizasyonu sağlamak amacıyla her cihaz 400 g RCF ayarına getirildiği için, RPM değerleri cihazlara göre değişkenlik göstermiştir. PRF pıhtı üretmek için örnekler, 12 dakika boyunca santrifüj edilmiş. Bu makalede, tek CE ve FDA onaylı cihaz olan Intra-Spin cihazını, orijinal L-PRF üretilen santrifüj cihazı olarak tanımlamışlar ve istenmeyen titreşimlerin seviyesinin tüm hızlarda diğer santrifüj cihazlarına göre 4.5 ile 6 kat daha düşük olduğunu ölçmüşlerdir. Böylece bu cihazın bugüne kadarki en stabil santrifüj cihazı olduğu sonucuna varmışlar. A-PRF, LW ve Salvin santrifüjlerinin, orijinal L-PRF™ pıhtı ve membranlarının üretimi için uygun olmadığını, bu cihazların vibrasyonları eşik değerden daha fazla olduğu için, üretilen PRF pıhtılarının da kalitesiz, zarar görmüş hücre içeriğine sahip olduğunu ifade etmişler ve bu cihazlarla elde edilen biyomateryallerin 'L-PRF benzeri materyal' olarak tanımlanmaları gerektiğini vurgulamışlar. Protokolleri geliştirecek, literatüre geçecek çalışmalarda, araştırmacıların da bu cihazı standart kabul etmeleri gerektiğini dile getirmişlerdir. Farklı cihazlarda üretilen pıhtılar membran haline getirilip uzunluk, kalınlık ve ağırlık bakımından incelendiğinde Intraspin ve Salvin gruplarının birbirine yakın değerlere, diğer gruplarla kıyaslandığında ise daha büyük değerlere sahip olduğu görülmüş. Elektron mikroskobu görüntülerinde, orijinal L-PRF™ membranının iyi polimerize, yoğun bir fibrin ağına sahip olduğunu ve içerisinde çok sayıda hücre popülasyonunu barındırdığını; A-PRF, Salvin ve LW ile üretilen PRF benzeri

membranlarının ise, daha ince ve daha düzensiz bir fibrin ağına sahip olduklarını ve içerisinde küçülmüş ve zarar görmüş görünen hücrelerin varlığını göstermişler. Salınımı test edilen üç büyüme faktörünün (TGFβ-1, PDGF-AB ve VEGF) tüm deneysel zamanlarında orijinal L-PRF™ membranlarından yavaş bir şekilde salınımının, A-PRF membranlarından salınımından anlamlı olarak daha fazla olduğunu belirtmişler. 9 ml kan ile üretilen orijinal L-PRF™ pıhtıları ve membranları, 10 mL kan ile üretilen A-PRF pıhtıları ve membranlarından her zaman önemli ölçüde daha büyük olduğunu ve A-PRF membranları 3 günden kısa bir süre sonra *in vitro* olarak çözünmeye/erimeye başlarken,

L-PRF™ membranlarının en az 7 gün boyunca iyi durumda kaldığını gözlemlemişler. Bu sebeple A-PRF üretilirken fibrin pıhtının daha fazla polimerize hale gelmesi için protokolünde santrifüj süresinin uzatılması gerektiğini savunmuşlar (toplamda 14 dk olacak şekilde). Bu çalışmayla, santrifüj özelliklerinin, L-PRF pıhtısının yapısını ve hücre içeriğini doğrudan etkilediği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda da Dohan ve ark. nın (2018) bu çalışmalarında yaptığı gibi, iki farklı santrifüj cihazında RCF değeri eşit, sabit (400g) tutuldu. Çalışmada kullanılan santrifüj cihazlarının vibrasyon yapmadığından emin olunduktan sonra örneklerin santrifüjüne başlanmıştır.

Literatürde bazı araştırmacıların santrifüj parametrelerini sabit tutmayarak (farklı g kuvveti, farklı süreler, farklı devir sayılarında) farklı cihazlarda elde ettikleri PRF pıhtılarının büyüme faktör salınımlarını karşılaştırdıkları çalışmalar da mevcuttur.

Miron ve ark.'nın yaptığı çalışmada (161), 3 farklı ticari markanın santrifüj cihazında [IntraSpin™ (IntraLock, Boca Raton, FL, USA), Duo Quattro (Process for PRF, Nice, France) ve Salvin (Salvin Dental, Charlotte, NC, USA)], 3 farklı tüple, farklı protokollerde PRF hazırlamışlar. Cihazların her birinde farklı RCF ayarında (L-PRF protokolünde 700 g RCF ve 400 g RCF, 12 dk.; A-PRF+ protokolünde 200 g RCF ve 130 g RCF, 8 dk) hem L-PRF hem de A-PRF pıhtısı üretilmiş. Yüksek ve düşük g kuvvetindeki protokollerle elde edilen bu pıhtıları hücre sayıları, büyüme faktörü salınımı, morfolojik farklılıklar ve pıhtı büyüklüğü (ağırlık, uzunluk / genişlik) açısından karşılaştırmışlar. Eşit g kuvveti ve eşit sürelerde fakat düşük santrifüj hızında uygulanan protokollerle üretilen pıhtıların, cihaz farklılığından bağımsız olarak, içerisinde düzgün dağılmış halde daha fazla miktarlarda trombosit ve lökosit bulunduran, 10 gün süreyle daha fazla büyüme faktörü salınımı yapabilen, boyut olarak da daha küçük pıhtılar olduğu görülmüş. Duo Quattro

santrifüjünde üretilen pıhtılar diğer cihazlarda üretilen pıhtılara göre her zaman daha büyük boyutlarda ve ağırlıkta elde edilmiş. Santrifüj hızının fibrin ağ yapısını ve büyüme faktörü salınımı üzerine etkisini incelediklerinde ise; Dohan ve ark.'nın (2018) aksine yüksek santrifüj hızında üretilen pıhtıları elektron mikroskobunda değerlendirdiklerinde daha yoğun fibrin ağına sahip olduğu ve zaman geçtikçe büyüme faktörleri salınım miktarlarının azaldığı sonucuna varmışlardır. Düşük santrifüj hızında üretilen pıhtıların ise büyüme faktörü salınımlarının zamanla artış gösterdiğini fakat bunun cihazlardan bağımsız bir şekilde meydana geldiğini ifade etmişlerdir.

Elde edilen PRF örneklerinin fibrin yapısının mikroskobik olarak karşılaştırılmaması bu çalışmanın limitasyonları arasındadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, santrifüj hızı ve süresinde yapılan değişiklikler sonucu ortaya çıkan düşük hızla santrifüjleme konsepti (LSCC) olarak bilinen protokollerde, daha yüksek konsantrasyonlarda büyüme faktörü salındığı gösterilmiştir (114,115). Bu konseptin geliştirilmesi, A-PRF ve I-PRF hazırlama protokollerinin geliştirilmesi için zemin hazırlamıştır.

2014 yılında, L-PRFTM'nin özelliklerini geliştirmek için standart santrifüj protokolünün (2700rpm, 12 dk.) modifiye edilmesiyle 1500 rpm ve 14 dakikada üretilen fibrin pıhtısına A-PRF adı verilmiş ve yapılan çalışmalar A-PRF bünyesinde bulunan trombositlerin sayılarının arttığı gösterilmiştir (113). Ghanaati ve ark. (2014), yüksek santrifüj hızlarının, santrifüj sırasında tüp içerisindeki hücreleri tüpün tabanına doğru itmesine neden olduğunu belirterek, yavaş santrifüj hızlarında elde edilen PRF matrisinin içinde daha fazla konsantre hücre içeriği ve büyüme faktörleri bulunduğu sonucuna varmışlardır. Choukroun ve ark. (2018) da, RCF değerinin düşürülmesinin, trombosit, lökosit sayısında ve VEGF, TGF- β 1, EGF gibi temel büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarında önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir (171).

A-PRF'nin kırmızı kan hücresi fraksiyonuna bakan distal ucunda bulunan yoğun fibrin yapısının içinde trombosit ve lökositlerin, sayıca fazla ve homojen olmayan bir şekilde dağılmış halde bulunduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin sayıca yüksek olmasının pıhtı içerisinde ve konakta bulunan makrofajların farklılaşmasını etkileyebileceği düşünülmüştür (113). Dohan ise düşük devirli protokollerin

uygulanmasının kan komponentlerinin ayrıştırmasını ve lökositlerin aktivasyonu için yetersiz olduğunu vurgulamaktadır (112). Fakat Ghanaati ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonucuna benzer şekilde, Kubesch ve ark. (172) da çalışmalarında, düşük santrifüjleme hızlarında elde edilen PRF bazlı matrislerin sahip olduğu fibrin yapı içerisine, hücrelerin daha kolay nüfuz etmeleri sayesinde daha hızlı revaskularizasyon gerçekleştiği gösterilmiştir.

Kobayashi ve ark., PRP, L-PRF, ve A-PRF içeriğindeki 7 farklı büyüme faktörünün (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGFB1, VEGF, EGF, ve IGF) 15. dk, 60. dk, 8. sa, 1. gün, 3. gün, ve 10. günlerde *in vitro* salınımlarını karşılaştırdıkları çalışmada (114); erken dönemde (15-60 dk sonrasına kadar) , PRP nin L-PRF ve A-PRF ye oranla daha fazla salınım yaptığını, A-PRF'nin ise 10. güne kadar toplamda diğer gruplara oranla kademeli olarak daha yavaş fakat daha fazla miktarda salınım yaptığını belirtmişlerdir. Ayrıca, A-PRF'nin L-PRF'ye kıyasla daha fazla miktarda progenitör hücre ve trombosit içerdiği için daha fazla büyüme faktörü salınımı yaptığı ifade edilmiş ve klinik uygulamalar için daha avantajlı olabileceği vurgulanmıştır.

Kobayashi ve ark. yaptıkları bir sonraki çalışmalarında, düşük hızla santrifüjleme konsepti kapsamında, A-PRF'in bir başka modifikasyonu olan 1300 rpm ve 8 dakikada hazırladıkları A-PRF+ protokolünü tanıtarak, santrifüj hızını ve süresini azalttıkları bu protokolda elde ettikleri A-PRF+ 'in A-PRF ve L-PRF ' e göre 10.güne kadar toplamda daha fazla büyüme faktörü salınımı yaptığını göstermişlerdir (115). Araştırmacılar bu çalışmada farklı protokollerle elde ettikleri PRF'leri aynı cihazda elde ettikleri için Pinto ve ark. tarafından, L-PRF'i orijinal santrifüj cihazında elde etmedikleri söylenerek eleştirilmişlerdir. Farklı bir cihazda üretmek söz konusu olduğunda ise istenilen rölatif g kuvveti değerinde devir sayısını belirlerken santrifüjün rotor çapı ve angulasyonu gibi özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerektiğini, aksi takdirde orijinalinden farklı bir ürün elde edileceğini ifade etmişlerdir (128). Dohan ve ark. (2017), diş hekimliğinin birçok alanında kullanılan bir biyomateryal olan L-PRF'in biyomedikal cihaz ve malzemelerinin yasal lisanslara (CE ve FDA onayı) sahip olması gerektiğini ve bu lisanslara sahip tek sistemin şu an IntraSpin™ sistemi olduğunu belirtmişlerdir. Pubmed'de bulunan birçok bilimsel makalenin aslında yasal lisansları olmayan ürünleri araştırmış olduğunu ve bu makalelerin de okuyucuların dikkatini çekmek için dergilerin güvenilirliğini kullandıklarını iddia etmişlerdir. Dental implantlar konusundaki gibi bu biyomateryalin de ulusal sağlık kurumları tarafından ciddiyle kontrol edilmesiyle çoğu cihaz ve malzemenin

pazardan çekilmesi gerektiğini, örneğin yakın zamanda A-PRF sisteminin düşük kaliteli cihaz ve tüpleriyle herhangi bir düzenleme izni, CE belgesi, FDA onayı olmadan Kobayashi ve ark. tarafından gündeme getirilmesinin klinisyenler için kafa karışıklığı yarattığını ifade etmişlerdir. Orijinal cihaz ve malzemelerin değiştirilmesiyle elde edilen biyomateryallerin orijinalinden farklı özelliklere sahip olacağını, literatürde orijinal methoda karşılık kafa karıştıran ve tekrarlanmayan klinik sonuçlara yol açacağını ısrarla belirterek, ürettikleri IntraSpin™ sistemin standardizasyonunu bozarak elde edilen malzemelerin bilimsel değerinin olmadığını iddia etmişlerdir (129).

Kobayashi ve ark.'nın bulduğu sonuçları destekler nitelikte çalışma yayınlayan El Bagdadi ve ark. da çalışmalarında , düşük hızla santrifüleme konseptini (LSCC) kanıtlamak amacıyla , üç farklı protokolle hazırlanan PRF pıhtılarında (L-PRF, A-PRF, A-PRF+) trombositlerin dağılımını ve büyüme faktörü (VEGF, TGF-β1, ve EGF) salınımlarını karşılaştırmışlardır (173). Araştırmacılar L-PRF'i, 2400 rpm de 12 dk, 708 g; A-PRF'i, 1300 rpm de 14 dk, 208 g; A-PRF+' i, 1300 rpm de 8 dk, 208 g protokolünde, Kobayashi ve ark gibi yine aynı santrifüj cihazında ve aynı hazırlama kitleriyle hazırlamıştır. Bu protokollerle elde edilen PRF pıhtılarının büyüme faktörü salınımları, 6.sa, 24.sa, 48.sa, 72.sa, 7.gün ve 10.gün deney periyotlarında ELİSA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Pıhtılardan salgılanan VEGF miktarının 10 gün sonunda A-PRF+ grubundaki toplam salınım miktarının da diğer gruplara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Salgılanan TGF-β1 miktarı incelendiğinde tüm gruplarda erken dönemde (6-72 saat) artış görülmüşken, geç dönemde gruplar arası farklılıklar gözlenmiştir. 10 gün sonunda, A-PRF ve A-PRF+, L-PRF ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek (p <0,0001) çıkmıştır ancak A-PRF ile A-PRF+ karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (173). Tüm PRF gruplarından elde edilen büyüme faktörlerinin uzun süreli, sürekli ve yavaş salınımının, hücre göçünü ve hücre çoğalmasını destekleyip yara iyileşme sürecinde avantajlar sağlayabileceği belirtilmiştir. (173).

Çalışmamızda kontrol grubundaki sonuçlarımızı literatürdeki L-PRF™ verileriyle karşılaştırabilmek için, L-PRF™ elde ederken orijinal santrifüj cihazı ve hazırlama kiti tercih edildi. Kontrol grubunda kullanılmak üzere, araştırmalarımıza göre rotor çapı ve açısı L-PRF™'nin orijinal santrifüj cihazı IntraSpin™'e benzer özellikte olan santrifüj cihazı (Hettich Mikro 22 R, Tuttlingen, Almanya) seçilmiştir. Santrifüj cihazlarını

karşılaştırmak için tüplere etkiyen rölatif santrifüj kuvveti (RCF) değeri kullanıldığı için kontrol grubunda kullanılan santrifüj cihazının RCF değeri, IntraSpin™ cihazının kullanım talimatlarında yazan değer (400 g) ile aynı olacak şekilde ayarlandı.

PRF'in tanıtılmasından sonra 2017 yılında Joseph Choukroun'un da aralarında bulunduğu Miron ve ark. (174), yaptıkları çalışmada PRF'nin yapısını geliştirmek ve rejeneratif postansiyelini artırmak amacıyla geliştirdikleri enjekte edilebilir PRF (I-PRF)'i ve elde etme yöntemini tanıtmışlardır. Bu protokolda, standart PRF protokolüne göre santrifüj parametreleri değiştirilmiş, antikoagülansız tüpteki kan örneği 700 rpm'de 3 dk (60 g) santrifüj edilerek I-PRF elde edilmiştir. Bu protokolda RCF değerini, santrifüj süresini azaltarak lökositlerin tutunabilmesi, büyüme faktörlerinin daha kolay salınabilmesi amacıyla daha gözenekli bir fibrin yapısı üretilebileceğini belirtmişlerdir. RCF değerinin azaltılmasıyla, fibrin içinde sadece hücresel dağılımın değil, aynı zamanda, lökosit ve trombositlerin sayılarının da arttığı ifade edilmiştir. (174). Yüksek santrifüj hızlarıyla elde edilen diğer PRF formülasyonlarına göre içeriğinde, büyüme faktörü salınımı yapan daha fazla rejeneratif hücre varlığından bahsedilmiştir.

PRP ve PRF üreimi sırasında tüplere etkiyen yüksek santrifüj kuvvetlerinin, hücresel içeriği tüplerin içinde en üst katmandan en alt katmana doğru yönlendirdiği bilinmektedir (175). Bu I-PRF formülasyonunda g kuvvetinin azaltılmasıyla lökosit sayısındaki toplam artışın en üst katmanda olacağı varsayılmıştır (113). I-PRF formülasyonu tek başına veya farklı biyomateryallerle (partiküler kemik greftleriyle) birleştirilerek kullanıldığı için klinisyenlere kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Wend ve ark. (176), RCF'nin (göreceli santrifüj kuvveti),nin içeriğindeki hücre tipleri sayısı ve büyüme faktörü (PDGF-BB, VEGF, EGF, TGF- β 1) salımı üzerindeki etkisini incelemek istedikleri çalışmalarında, farklı santrifüj hızları fakat aynı santrifüj süreleri kullanarak, 60-966 g RCF aralığında I-PRF üretmişlerdir. Bu çalışmada santrifüj süresi sabit tutulmuş (3 dk.), optimum RCF değerleri araştırılmıştır. 10'ar ml hacimli tüplere (i-PRF, Process for PRF, Nice, France) yaşları 20-60 arasında değişen 3 gönüllüden alınan örnekler, santrifüj edilmiş (Duo Centrifuge, Process for PRF, Nice, France). Yüksek RCF grubu: 2800 rpm de 3 dk. boyunca 966 g ayarında, orta RCF grubu: 1400 rpm de 3 dk. boyunca 241 g ayarında, düşük RCF grubu ise: 700 rpm de 3 dk boyunca 60 g ayarında santrifüj edilmiş. Santrifüjden sonra enjektörlerle toplanan I-PRF, büyüme

faktörü ve sitokin miktarları açısından incelenmiştir. VEGF, TGF- β 1 ve EGF salınımı, düşük RCF gruplarında diğer gruplara göre daha yüksek değerler göstermiştir. Lökosit, lenfosit ve nötrofil granülosit sayıları, düşük RCF grubunda anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur. PDGF-BB salınımı, düşük ve orta değerli RCF gruplarında, yüksek RCF değerli grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek değerler gösterirken ($p < 0,05$), düşük ve orta RCF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Özet olarak, elde edilen bulgular RCF'nin azaltılmasıyla elde edilen I-PRF'te, daha yüksek bir büyüme faktörü salınımı ve inflamatuvar hücre sayısı artışı olduğunu göstererek, düşük hızla santrifüjleme konseptinin (LSCC) etkinliğini desteklemiştir.

Bu bağlamda, özellikle LSCC ye göre hazırlanan I-PRF bazlı matrisler, büyüme faktörü rezervuarı olarak kabul edilmiş, uygulandıkları bölgede yönlendirilmiş kemik ve doku rejenerasyonu potansiyelini arttırdıkları gösterilmiştir (113,171,173)

Miron ve ark. (2017)'nin yapmış olduğu çalışmalarında, PRF nin enjekte edilebilir, likit formu olarak da adlandırabileceğimiz I-PRF'nin ve PRP'nin karşılaştırmalı olarak büyüme faktörü salınımları incelenmiştir (119). Örneklerin salınım yaptıkları büyüme faktörlerinin konsantrasyonları, 15. dakika, 60. dakika., 8. saat, 1. gün ve 10. günlerde (PDGFAA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF, EGF ve IGF-1) ölçülüp karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, 15. dakika sonunda PRP'deki tüm büyüme faktörleri I-PRF ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek oranda salındığı; başlangıçtan 8. Saat sonrasına kadar I-PRF'teki büyüme faktörlerinin salınımının zamana bağlı artış gösterdiği; 10. gün sonuna kadar I-PRF'den salınan PDGF-AA, PDGF-AB, EGF ve IGF-1'in, PRP'ye kıyasla daha yüksek oranda salındığını fakat PDGF-BB, VEGF ve TGF- β 1'in toplam salınım değerinin PRP'de, I-PRF'ye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu ifade edilmiştir.

PRP ve PRF üretimi sırasında tüplere etkiyen yüksek santrifüj kuvvetlerinin, hücresel içeriği tüplerin içinde en üst katmandan en alt katmana doğru yönlendirdiği bilinmektedir (175). Bu I-PRF formülasyonunda g kuvvetinin azaltılmasıyla lökosit sayısındaki toplam artışın en üst katmanda olacağı varsayılmıştır (113). I-PRF formülasyonu tek başına veya farklı biyomateryallerle (partiküler kemik greftleriyle) birleştirilerek kullanıldığı için klinisyenlere kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Büyüme faktörlerinin pıhtı veya membran dışında süpernatant serumda bulunup bulunmadığı da araştırmacılar tarafından merak konusu olmuştur. Su ve ark. (2009) nın yaptıkları *in vitro* bir çalışmada (84), PRF ve supernatant serum içeriğindeki büyüme faktörleri (TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF, IGF-1 ve EGF) konsantrasyonları farklı zaman aralıklarında ölçülmüş. Supernatant serumda 5 günlük çalışma periyodu süresince büyüme faktörü salınımının stabil olduğunu, santrifüj öncesi de IGF-1'in zaten plazmada yüksek oranda bulunması nedeniyle trombositlerin aktivasyonu ve PRF'den salınım sonucunda miktarının artmadığı belirtilmiştir. Zaten önceki yıllarda Dohan ve ark. (2006), IGF-1 in santrifüj işleminin ilk aşamalarında da tüpün üst kısmında, süpernatant serumda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu açıklamışlar ve bunun nedeni olarak IGF-1'in dolaşımında bulunan temel bir molekül olmasını göstermişlerdir (21). Su ve ark. bu çalışmada, büyüme faktörü salınımının ilk dakikalarda başladığını ve bu nedenle başarılı klinik sonuçlar için, PRF membranlarının elde edildikten sonra mümkün olabilecek en hızlı şekilde kullanılması gerektiği sonucuna varmıştır. Kan örneklerinin santrifüjüyle elde edilen üst tabakadaki süpernatant serumun da bir PRF fraksiyonu olup büyüme faktörlerince zengin olduğunu, cerrahi işlemler sırasında kemik greftleriyle karıştırılıp cerrahi sahaya uygulanabileceğini göstermişlerdir.

Kobayashi ve ark. hangi protokollerle ve ticari kitlelerle elde edilen PRF nin daha fazla büyüme faktörü salgıladığı tartışmalarına farklı bir bakış açısı getirmiş. Bu konu kapsamında, büyüme faktörü salınımının dokular üzerine zararı olmayacak optimal miktarının araştırılması gerektiğini söylemişlerdir. Ohshima ve ark. yaptıkları çalışmalarda, TGF- β ve VEGF' nin de dahil olduğu bazı büyüme faktörlerinin sadece doku rejenerasyonunu destekleme kabiliyetine sahip olmadıklarını, aynı zamanda periodontitis gibi patolojilerin bulunduğu durumlarda doku degradasyonunda da rol alabileceğini belirtmişlerdir (177,178). Genel olarak, bu büyüme faktörlerinin her ikisi de rutin olarak doku büyümesi, maturasyonu (TGF- β) ve anjiyogenez (VEGF) ile ilişkilendirilirken, bunların olumsuz etkiler gösterebileceği göz ardı edilmemesi gerektiği ifade edilmiştir. Campbell ve ark., PDGF'in yara iyileşmesinde pozitif etkilerinin yanısıra, hücrelerde metastatik değişikliklere de sebep olabildiğini göstermiştir (179). Dolayısıyla PRF ve fraksiyonlarından salınan optimum büyüme faktörü konsantrasyonlarını araştıran araştırmaların yapılması gerekmektedir.

8.SONUÇLAR

Aynı santrifüj parametreleri kullanılarak elde edilen PRF membranlarından salınan büyüme faktörlerinin değerlerini karşılaştırdığımız araştırmamızın bulgularının ışığında şu sonuca varılmıştır: L-PRF™ ticari markası kullanılarak elde edilen PRF örneklerinin, Hettich Mikro 22R markalı santrifüj cihazı ve BD Vacutainer marka kan alma tüpleri ile elde edilen PRF örneklerine; 1, 24 ve 72 saatteki *in vitro* transforme edici büyüme faktörü β 1, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü salınımı açısından herhangi bir üstünlüğü olmadığı değerlendirilmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007;28:4551–60.
2. Cronkite EP, Lozner EL DJ. Use of Thrombin and Fibrinogen in Skin Grafting. *J Am Med Assoc*. 1944;124:976–8.
3. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg*. Ağustos 2001;182:1S-7S.
4. Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol*. 1970;67:338–59.
5. Gibble J, Ness P. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion*. 1990;30:741–7.
6. Soffer E, Ouhayoun P, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:521–8.
7. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 2008;19:42.
8. Rosenthal AR, Egbert PR, Harbury C, Hopkins JL, Rubenstein E. Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Albr von Graefes Arch für Klin und Exp Ophthalmol*. 1978;207:111–5.
9. Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR RE. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol*. 1975;14:872–5.
10. Kiziltoprak M, Uslu MÖ. Diş hekimliğinde trombosit konsantrasyonlarının tarihsel

- gelişimi ve özellikleri. *Cumhuriyet Dent J.* 2018;21:152–66.
11. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg.* Ağustos 2001;182:1S-7S.
 12. Tawes RL, Sydorak GR, DuVall TB. Autologous fibrin glue: the last step in operative hemostasis. *Am J Surg.* Ağustos 1994;168:120–2.
 13. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *C. 108, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2009. s. 341–52.
 14. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010;55:185–94.
 15. Tunalı M, Özdemir H, Küc Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. 2013;51:438–43.
 16. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204:322–30.
 17. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1294–9.
 18. Arora S, Agnihotri N. Platelet Derived Biomaterials for Therapeutic Use : Review of Technical Aspects. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2016;33:159–67.
 19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638–46.
 20. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, vd. 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.
 21. Dohan SL, Dohan DM, Choukroun J, Gogly B, Mouhyi J, Diss A, vd. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101:45–50.

22. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 19:42–6.
23. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10:225–8.
24. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: A literature review. *Implant Dent.* 2009;18:303–10.
25. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Haziran 1998;85:638–46.
26. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, vd. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101:37–44.
27. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, Tazzari PL, O’Connell SM, Ricci F, vd. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *Eur Cells Mater.* 2010;20:13–23.
28. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, vd. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1131–7.
29. Anitua E, Muruzabal F, Tayebba A, Riestra A, Perez VL, Merayo-Llodes J, vd. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol.* Aralık 2015;93:e605–14.
30. M. Dohan Ehrenfest D, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, vd. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1131–7.
31. Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Oper Tech Orthop.* 2012;22:25–32.
32. Weibrich G, Kleis WKG, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 20:118–23.
33. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Aralık 2002;22:547–57.

34. 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.
35. Jovani-Sancho M del M, Sheth CC, Marqués-Mateo M, Puche-Torres M. Platelet-Rich Plasma: A Study of the Variables that May Influence Its Effect on Bone Regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18:1051–64.
36. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie.* 2001;42:55–62.
37. Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology.* 2015;103:126–35.
38. 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.
39. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Annals of the New York Academy Sciences* 2006;936:11–30.
40. Clark RAF. Fibrin and Wound Healing. *Annals of the New York Academy Sciences.* 2001;936:355–67.
41. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine* 2011;19:142–8.
42. Griffith OM. *Practical Techniques for Centrifugal Separations Application Guide* , Thermo Fisher Scientific Inc. 2010.
43. Shah R, M G T, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2017;25:64–72.
44. Arnoczky SP S-RS. The Basic Science of Platelet-rich Plasma (PRP). *Sports Med Arthrosc.* 2014;22:150.
45. 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.
46. Parrish WR. Physiology of Blood Components in Wound Healing: an Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action. *J Exerc Sport Orthop.* 17 Nisan 2017;4:1–14.

47. Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JPAM, Van Zundert A, vd. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006;16:363–8.
48. 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.
49. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010;81:546–55.
50. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006;1:212–9.
51. Balci H, Toker H. Trombositten zengin fibrin: özellikleri ve diş hekimliğinde kullanımı. *GÜ Diş Hek Fak Derg.* 2012;29:183–92.
52. Dohan SL, Girard M-O, Choukroun J, Dohan DM, Dohan AJJ, Simonpieri A, vd. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101:299–303.
53. Tsai CH, Shen SY, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *J Dent Sci.* 2009;4:130–5.
54. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, vd. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101. e51-5
55. Toffler M, Toscano DDSN, Holtzclaw MSD, Corso M Del, David DIU, Ehrenfest D. Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. *Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry* 2009;21–32.
56. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009;23:177–89.
57. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. *American Journal of Sports Medicine.* 2009;37; 2259–72.
58. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489–96.

59. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, vd. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101:56–60.
60. Harrison P, Martin Cramer E. Platelet α -granules. *Blood Rev*. 1993;7:52–62.
61. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105:13–33.
62. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2004 ;91:4-15. 2004;4–15.
63. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thromb Haemost*. 2000;83:157–64.
64. Laurens N1, Koolwijk P de MM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*. 2006;4:932–9.
65. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: Inflammatory firebugs of vascular walls. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:s5-s10
66. McCauley LK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dent Clin North Am*. Nisan 1998;42:361–87.
67. Carlson NE, Roach RB. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2002;133:1383–6.
68. Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, Baenziger JU, Chang D, Kennedy BB. Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. *J Biol Chem*. 1981;256:8896–9.
69. Antoniades HN, Hunkapiller MW. Human platelet-derived growth factor (PDGF): amino-terminal amino acid sequence. *Science*. 1983;220:963–5.
70. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential Effect of TGF- β 1 and PDGF on Proliferation of Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts. *J Periodontol*. 1994;65:641–8.
71. Janet M. Hock EC. Platelet-Derived but not Differentiated Enhances. *Endocrinology*. 1994;134:1–6.
72. Giannobile W V., Hernandez RA, Finkelman RD, Ryarr S, Kiritsy CP, D'Andrea M, vd. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in

- Macaca fascicularis. *J Periodontal Res.* 1996;31:301–12.
73. Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for Distinct Signaling Properties and Biological A and B Subtypes. *Growth Factors.* 1990;16:201–16.
 74. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, vd. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24:3095–100.
 75. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Physiol.* Haziran 2001;280:C1358–66.
 76. Ruhrberg C. Growing and shaping the vascular tree: Multiple roles for VEGF. *C. 25, BioEssays.* 2003. s. 1052–60.
 77. Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, Poli de Figueiredo JA, Eduardo Nör J, Borba de Araujo F, Christina Medeiros Fossati A. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship With the Dental Pulp. *J Endod.* 2007;33:524–30.
 78. Vinaya Kumar R, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: A new paradigm in periodontal regeneration. *Cell Tissue Bank.* 2013;14:453–63.
 79. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983;258:7155–60.
 80. Epstein FH, Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. *N Engl J Med.* 1994;331:1286–92.
 81. Lind M. Growth factors: Possible new clinical tools: A review. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:407–17.
 82. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent.* 2004;13(4):301–9.
 83. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol.* 1999;77:256–62.
 84. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2009;108:56–61.
 85. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 18:93–103.
 86. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac*

- Surg.2002;31:615–9.
87. Nakamura K, Koshino T, Saito T. Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product–fibrin glue mixture. *Biomaterials*. 01 1998;19:1901–7.
 88. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*. 2000;35:227–31.
 89. Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, Yoshimoto H, Ishihara H, Fujii T, vd. Coadministration of Basic Fibroblast Growth Factor and Sucrose Octasulfate (Sucralfate) Facilitates the Rat Dorsal Flap Survival and Viability. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103:941–8.
 90. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Physiol*. 2002;282:C947–70.
 91. Laato M, Kähäri VM, Niinikoski J, Vuorio E. Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes. *Biochem J*. 1987;247:385–8.
 92. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun’s platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27:63–9.
 93. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005;15:599–607.
 94. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:1403–8.
 95. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *C. 3, Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2003:745–56.
 96. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;149:1–38.
 97. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: Immunological aspects. *Injury*. 2006;37S:S5-S12
 98. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16:585–601.
 99. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1

- beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol.* 1995;23:307–17.
100. Hayashi Y, Kobayashi M, Kuwata H, Atsumi G, Deguchi K, Feng Wei X, vd. Interferon- γ and interleukin 4 inhibit interleukin 1 β -induced delayed prostaglandin e2 generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. *Cytokine.* 2000;12:603–12.
 101. Clark RAF. Fibrin and Wound Healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;936:355–67.
 102. Badiavas E V., Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol.* 2003;196:245–50.
 103. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials.* Haziran 2003;24:2497–502.
 104. Hinsbergh Vwm, Collen A KP. Role of Fibrin Matrix in Angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;936:426–37.
 105. Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, vd. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A α chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad* 1991;88:1044–8.
 106. Kazura JW, Wenger JD, Salata RA, Budzynski AZ, Goldsmith GH. Modulation of polymorphonuclear leukocyte microbicidal activity and oxidative metabolism by fibrinogen degradation products D and E. *J Clin Invest.* 1989;83:1916–24.
 107. Lanir N, Ciano PS, Van de Water L, McDonagh J, Dvorak AM, Dvorak HF. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J Immunol.* 1988;140:2340–9.
 108. Tuan TL, Song A, Chang S, Younai S, Nimni ME. In vitro fibroplasia: Matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res.* 1996;223:127–34.
 109. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K-I, vd. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg.* 2002;13:231–9
 110. Corso M Del, Toffler M. Use of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) membrane in post-avulsion sites : An overview of Choukroun ’ s PRF. *J Implant Adv Clin Dent.* 2010:27–35.
 111. Raaj V, Kutir J, Gautam A, Kumari P. Platelet-Rich Fibrin (PRF): A New

- Generation Platelet Concentrate. C. 1, *Int J Dent Med Res.* 2015;1:164-167
112. Ehrenfest DMD, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M Del, Kang B, vd. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells , growth factors , and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2018;29:171–84.
 113. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, vd. Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *J Oral Implantol.* 2014;40:679–89.
 114. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, vd. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2353–60.
 115. Fujioka-kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol.* 2017;88:112–21.
 116. O’Connell SM. Safety Issues Associated With Platelet-Rich Fibrin Method. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007;103:587.
 117. Pavan Kumar A, Vikram Reddy G, Raja Babu P JRG. Platelet Rich Fibrin -A Second Regeneration Platelet Concentrate and Advances in PRF. *Indian J Dent.* 2015;7:251–4.
 118. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Yaprak E, Toker H. A Novel Platelet Concentrate : Titanium-Prepared Platelet-Rich Fibrin. *Biomed Res Int.* 2014;2014 :209548
 119. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, vd. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.* 2017;21:2619–27.
 120. Mourão CF de AB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir.* 2015;42:421–3.
 121. Sohn D, Huang B, Kim J. Utilization of Autologous Concentrated Growth Factors (CGF) Enriched Bone Graft Matrix (Sticky Bone) and CGF-Enriched. *J Implant Adv Clin Dent.* 2015;11–29.
 122. Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Medica.* 2014;24:31–44.
 123. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin

- (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;108:707–13.
124. Carl A. Burtis DEB. *Tietz Fundamental of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7th edition. Saunders Elsevier; 2015.
 125. Pincus RAM& MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods Elsevier Health Student and Practitioner Medical Books*, ebooks and journals. 23rd edition. 2016.
 126. Patel KR, Gan SD. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Homology Medicines Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Artic J Investig Dermatology*. 2013;(133,):e12.
 127. Dohan DM, Del Corso M, Charrier JB. Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy. *C. 103, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2007;587–93.
 128. Pinto N, Quirynen M. Letter to the editor: RE: Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: Growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol*. 2019;90:119–21.
 129. Dohan Ehrenfest DM, Piattelli A, Sammartino G, Wang H-L. Editorial New Biomaterials and Regenerative Medicine Strategies in Periodontology, Oral Surgery, Esthetic and Implant Dentistry 2016. 2017; 2017: 8209507
 130. Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016;27:427–32.
 131. A. Zumstein M, Berger S, Schober M, Boileau P, W. Nyffeler R, Horn M, vd. Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair: Review, Preliminary Results and Future Directions. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1196–206.
 132. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509–28.
 133. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:254–61.
 134. Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:593–617.

135. Ekström K, Omar O, Granéli C, Wang X, Vaziriani F, Thomsen P. Monocyte Exosomes Stimulate the Osteogenic Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2013;8: e75227
136. Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. C. 19, *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008:12–23.
137. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. C. 24, *Wound Repair and Regeneration*. Blackwell Publishing Inc.; 2016.:215–22.
138. Alexander PB, Yuan L, Yang P, Sun T, Chen R, Xiang H, vd. EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence. C. 25, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2015:135–8.
139. Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care*. 2015;4:213–24.
140. Moens S, Goveia J, Stapor PC, Cantelmo AR, Carmeliet P. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. C. 25, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2014:473–82.
141. Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res*. 2003;21:941–8.
142. Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res*. Mar 2013;24:320–8.
143. Kaigler D, Avila G, Wisner-Lynch L, Nevins ML, Nevins M, Rasperini G, vd. Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11:375–85.
144. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:543–9.
145. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Overdevest EP, vd. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006;38:174–87.
146. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: Significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62:343–50.
147. Barrick B, Campbell EJ, Owen CA. Leukocyte proteinases in wound healing: Roles

- in physiologic and pathologic processes. C. 7, Wound Repair and Regeneration. 1999. s. 410–22.
148. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. C. 17, Wound Repair and Regeneration. 2009. s. 153–62.
 149. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, vd. Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: Platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. C. 40, Journal of Oral Implantology. 2014. s. 511–21.
 150. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, vd. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. Vox Sang. Kasim 2003;85:283–9.
 151. Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. C. 20, Seminars in Cell and Developmental Biology. Elsevier Ltd; 2009. s. 517–27.
 152. Scott A, Khan KM, Roberts CR, Cook JL, Duronio V. What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine. C. 38, British Journal of Sports Medicine. 2004. s. 372–80.
 153. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The Use of Platelet-Rich Plasma in Arthroscopy and Sports Medicine: Optimizing the Healing Environment. C. 26, Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery. 2010. s. 269–78.
 154. Harmon KG. Muscle injuries and PRP: What does the science say? British Journal of Sports Medicine. 2010;44:616–7.
 155. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. Trends Biotechnol. 2006;24:227–34.
 156. Adamson R. Role of macrophages in normal wound healing: an overview. C. 18, Journal of wound care. 2009. s. 349–51.
 157. Passaretti F, Tia M, D’esposito V, De Pascale M, Del Corso M, Sepulveres R, vd. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. Platelets. 2014;25:252–6.
 158. Lundquist R, Dziegiel MH, Ågren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. Wound Repair Regen. 2008;16:356–63.
 159. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Ezirganlı Ş. A novel platelet concentrate for

- guided bone regeneration: Titanium Prepared Platelet-Rich Fibrin (T-PRF). 2015;57:102–6.
160. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51:438–43.
 161. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, vd. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clin Oral Investig*. 2019
 162. Muller E, Ríos P. Pain and Dental Implantology : Sensory Quantification and Affective Aspects . Part I : At the Private Dental Office. 2001;14–22.
 163. Ehrenfest DMD. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun’s technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110:275–8.
 164. Sete MRC, Lira Júnior R, Fischer RG, da Silva Figueredo CM. Serum adipokine levels and their relationship with fatty acids in patients with chronic periodontitis. *Braz Dent J*. 2015;26:169–74.
 165. Hoaglin DR, Lines GK, Carinci F. Prevention of Localized Osteitis in Mandibular Third-Molar Sites Using Platelet-Rich Fibrin. *Int J Dent*. 2013;2013.
 166. Yelamali T, Saikrishna D. Role of Platelet Rich Fibrin and Platelet Rich Plasma in Wound Healing of Extracted Third Molar Sockets: A Comparative Study. *J Maxillofac Oral Surg*.
 167. Raghav Yajamanya S, Chatterjee A, Nischay Babu C, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. 2016;
 168. Miron RJ, Dham A, Dham U, Zhang Y, Pikos MA, Sculean A. The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes. *Clin Oral Investig*. 2019;23(5):2179–85.
 169. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, vd. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma : a comparison of four different systems. 2006;135–9.
 170. Su CY, Kuo P, Tseng H, Su C. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. 2009;(1):56–

- 61.
171. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(1):87–95.
 172. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orłowska A, Booms PF, Sader RA, vd. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets.* 2019;30(3):329–40.
 173. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, vd. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2017;1–13.
 174. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, vd. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.* 2017;2:2619–27.
 175. de Melo BAG, Martins Shimojo AA, Marcelino Perez AG, Duarte Lana JFS, Andrade Santana MH. Distribution, recovery and concentration of platelets and leukocytes in L-PRP prepared by centrifugation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018;161:288–95.
 176. Wend S, Kubesch A, Orłowska A, Zender N, Dias A, Miron RJ, vd. Reduction of the relative centrifugal force in influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. 2017;28:188
 177. Ohshima M, Yamaguchi Y, Ambe K, Horie M, Saito A, Nagase T, vd. Fibroblast VEGF-receptor 1 expression as molecular target in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2016;43:128–37.
 178. Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, vd. TGF- β signaling in gingival fibroblast-epithelial interaction. *J Dent Res.* 2010;89:1315–21.
 179. Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, vd. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad* 2005;102:3389–94.

10. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	İki farklı sistem ile elde edilmiş trombositten zengin fibrin örneklerinin büyüme faktörleri salınımı açısından karşılaştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2018/371			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Dr. Öğretim Üyesi Emre YAPRAK			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Periodontoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD- Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	Destekleyici	KÜ BAPB			
	Araştırmanın Türü	Uzmanlık Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Kan, İdrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle yapılacak araştırma
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	18.10.2017/KOGOEK01.2	1/2

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2018/10.19	Proje No: 2018/371	Tarih: 26/11/2018
	Dr. Öğretim Üyesi Emre YAPRAK sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan,		
<input type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input checked="" type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*			

H.Serhat KIROGLU
Etik Kurul Sekreteri
Uygun
su -

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Prof. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Doç. Dr. Semil Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Dr. Öğretim Üyesi Aslihan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---
Dr. Öğretim Üyesi Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	---

* Gereke ve öneriler:

KU Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	5/5/19
	Onay formu	18.10.2017/KOGGEK01.2	7.2

EK-2 HASTA BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU:

1. Çalışmanın adı:

İki farklı sistem ile elde edilmiş trombositten zengin fibrin örneklerinin büyüme faktörleri salınımı açısından karşılaştırılması

2. Araştırmacıların adları, kurumları ve iletişim numaraları.

Dr. Öğr. Üyesi Emre Yaprak
Kocaeli Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı
0262 344 22 22 / 5114

Arş. Gör. Dt. Gizem Kömürlü
Kocaeli Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Prof. Dr. Murat Kasap
Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi

3. Araştırma amacının anlaşılır ve özet açıklaması:

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir. Lütfen biraz zaman ayırın ve aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun, isterseniz başkalarıyla tartışın. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız lütfen bizi arayın. Ancak araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Bu çalışmamızda kandan elde edilen bir ürün olan "Trombositten zengin fibrin (TZF)"in farklı metodlarla elde edebilmesi sonucu içeriğindeki bazı yararlı unsurların nasıl etkilendiğini incelemek istiyoruz. Bu kapsamda gönüllülerden elde edilen kan örneklerinden 2 farklı yöntem ile TZF örnekleri elde edilip, bazı büyüme faktörlerinin konsantrasyonları kıyaslanacaktır.

4. Neden ben seçildim?

Sizin bu çalışmaya gönüllü olarak dahil edilme sebebiniz; hali hazırda sigara kullanmıyor olmanız, sistemik bir sağlık sorununuzun olmaması ve son bir ay içerisinde herhangi bir ilaç almamış olmanızdır. Çalışmanın sizinle beraber toplam 50 gönüllüden oluşması planlanmaktadır.

5. Araştırmaya katılmak / bir kez katıldıktan sonra sonuna kadar devam etmek zorunda mıyım?

Bu çalışma takip gerektiren bir çalışma değildir. Tek seferde gerekli işlemler tamamlanacaktır. Bunun dışında ileriye dönük olarak sizden herhangi bir şey talep edilmeyecektir. Araştırmaya katılmayı kabul etmez iseniz herhangi bir hak kaybına maruz kalmayacaksınız.

6. Katılmayı kabul edersem bana ne yapılacak?

Size ait olan yaş, cinsiyet, meslek gibi bilgiler ve sistemik sağlık durumunuz ile ilgili veriler kaydedildikten sonra, kolunuzdan toplam 2 tüp (2x10 ml) kan alacağız. Kan örneklerinden 2 farklı yöntem ile TZF örnekleri elde edilip, bazı büyüme faktörlerinin konsantrasyonları ELISA yöntemi ile tespit edilecektir. Bütün bu

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Aydınlatılmış Onam Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No	Sayfa
	Form 5	27/04/2016/KÜGÖK-11	1 / 1



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



işlemler tek bir seferde tamamlanacaktır. Bütün bu işlemler yalnızca bu çalışma amacıyla yapılacak olup, tedavileriniz ile herhangi bir ilgisi yoktur. Sonrasında sizden herhangi bir talebimiz olmayacaktır.

7. Araştırmaya katılmanın olası dezavantajları ve riskleri nelerdir?

Araştırma kapsamında kolunuzdan kan alımı yapılacaktır. Bu durum ağrı eşiği düşük bireylerde konforsuz olabilmektedir. Bazı durumlarda damarın yırtılması ile cilt altına bir miktar kan çıkışı ve kolunuzun buna bağlı olarak morarması söz konusu olabilir. Herhangi bir olumsuz durumda size bilgi verilecektir.

8. Araştırmaya katılmanın olası yararları nelerdir?

Araştırmaya katılmanın size hemen dönecek bir faydası bulunmamakla beraber, araştırma sonuçlarımızın gelecekteki hastalara, kuruma, topluma veya bilime TZF'nin hazırlanışındaki metodolojik üstünlüklerin aydınlatılması noktasında faydalarının olacağı umulmaktadır.

9. Araştırma masrafları: Araştırma amaçlı sizden veya bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kurumundan ücret talep edilmeyecektir. Gerekli malzemeler ve laboratuvar giderleri araştırmacılar tarafından karşılanacaktır.

10. Araştırmada ters giden bir şey olursa?

Bu çalışma kapsamında oluşabilecek en büyük risk, kolunuzdan kan alınırken ortaya çıkabilecek zararlardır. Herhangi bir zarar durumunda size tazminat ödemeyi taahhüt etmiyoruz. Çalışmaya katılıp katılmama noktasında kararınızı buna göre veriniz.

11. Kimlik bilgilerim ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?

Gizlilik: Formda araştırma süresince elde edilen tüm bilgilerin ve kişisel detayların gizli kalacak olup, gizlilik kod numarası kullanımı ile sağlanacaktır.

Bilgilere giriş: Genellikle verilere giriş yalnızca yürütücü Dr. Emre YAPRAK tarafından gerçekleştirilecektir. Başka hiç kimse sizin kimlik bilgilerinize ulaşamayacaktır.

12. Araştırma sonunda bana bilgi verilecek mi?

Eğer arzu ederseniz, araştırma sonunda sonuçlar hakkında sizi bilgilendirebiliriz.

13. Araştırma sonuçlarına ne olacak?

Araştırma sonuçlarının uluslararası/ulusal bilimsel toplantılarda sunu ve uluslararası bilimsel dergilerde makale olarak yayınlaması planlanmaktadır. Her tür yayında ve sunuda size ait kişisel bilgilerinin yayınlanmayacağı konusunda size garanti veriyoruz. Elde edilen bilimsel veriler gerekli görülür ise başka araştırmalarda kullanılabilir.

Daha ayrıntılı bilgi için,

Yrd. Doç. Dr. Emre Yaprak
Kocaeli Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı
0262 344 22 22 / 5114

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Aydınlatılmış Onam Formu

Belgenin 31. Etiler, Tandoz Toprak Sok. No: 10
45110 Kocaeli/İstanbul



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



14. Teşekkür:

Araştırmanıza katıldığınız için teşekkür ederiz.

15. İAEK onayı:

İAEK tarafından onaylandıktan sonra bilgilendirme formlarının "*GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU*" tarafından onaylandığı belirtilmeli ve antetli kağıda karar numarası ile basılmalıdır.

16. Şikâyet için başvuru adresi:

Araştırmaya katılımla ilgili herhangi bir şikâyetiniz varsa Kurula Etik Kurul raportörü Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar (Tel: 02623037450) vasıtasıyla ulaşabilirsiniz. Her tür şikâyetiniz gizlilikle değerlendirilecek, araştırılacak ve sonuç hakkında tarafınıza bilgi verilecektir.

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Aydınlatılmış Onam Formu

Belge No: 31
Form No:

Revizyon: 14
17.04.2016 GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



ONAM FORMU (D²)

(Araştırmacı nüshası ve Katılımcı nüshası olmak üzere iki nüsha halinde basılmalı ve imzalı araştırmacı nüshası saklanmalıdır. Gerekli olduğunda Etik Kurul tarafından onam formları istenebilir)

Araştırmanın Adı: İki farklı sistem ile elde edilmiş trombositten zengin fibrin örneklerinin büyüme faktörleri salınımı açısından karşılaştırılması

	Evet	Hayır
Gönüllü Bilgilendirme Formunu okudunuz mu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma projesi size sözlü olarak da anlatıldı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Size araştırmayla ilgili soru sorma, tartışma fırsatı tanındı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sorduğunuz tüm sorulara tatmin edici yanıtlar alabildiniz mi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma hakkında yeterli bilgi aldınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herhangi bir zamanda herhangi bir nedenle ya da neden göstermeksizin araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğunuzu anladınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma sonuçlarının uygun bir yolla yayınlanacağına katılıyor musunuz?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırmada elde edilen biyolojik örneklerin madde 6'da belirtilen şartlarda gelecekte de kullanılmasına onay veriyor musunuz?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yukarıdaki soruların yanıtları size kim tarafından açıklandı?		

Gönüllü	Araştırmacı
İmza:	İmza:
Adı / Soyadı:	Adı / Soyadı:
Tarih:	Tarih:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için Aydınlatılmış Onam Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No su:	Sayfa
	Form 5	27.04.2016/KOGOEK01. 2	4/4

ÖZGEÇMİŞ

11.08.1988 tarihinde Bakırköy/İstanbul'da doğdu. 2002 yılında Bakırköy İlköğretim Okulu'ndan, 2006 yılında Bahçelievler Adnan Menderes Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Lisans eğitimini 2006-2011 yılları arasında Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde tamamladı. Lisans eğitimi sırasında 2010 yılında ikinci üniversite olarak başladığı Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği bölümünü 2012 yılında tamamladı. Mart-2016 tarihinde Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladı. Uzmanlık eğitimi süresince Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde klinik ve akademik faaliyetlerde bulundu.

İngilizce bilmektedir.

BİLDİRİLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. EMRE YAPRAK, MEHMET SARIHAN, MURAT KASAP, GURLER AKPINAR, GIZEM KOMURLU (2017) Similar proteomic profile among the platelet rich-fibrin and blood serum. 2017 FDI Annual World Dental Congress (Sözlü Sunum)
2. GİZEM KÖMÜRLÜ, EMRE YAPRAK (2018) Acellular dermal matrix graft with coronally advanced flap in multiple mandibular posterior Miller class III gingival recessions: A case series. 9th Congress of European Federation of Periodontology (EFP) - EuroPerio 9 (Poster Sunumu)
3. VECİHE MERVE BALTA, EMRE YAPRAK, GİZEM KÖMÜRLÜ (2018) Complete root coverage following coronally advanced flap with connective tissue graft: A case series. 9th Congress of European Federation of Periodontology (EFP) - EuroPerio 9 (Poster Sunumu)
4. GİZEM KÖMÜRLÜ, TUĞÇE ZEYTİNCİ, ESRA GÜZELDEMİR AKÇAKANAT (2017) Mikrobiyal dental plak birikimine bağlı oluşan lokalize dişeti büyümelerinin

- periodontal tedavisi: Olgu Sunumu. Türk Periodontoloji Derneği 47. Uluslararası Bilimsel Kongresi (Poster Sunumu)
5. TUĞÇE ZEYTİNCİ, GİZEM KÖMÜRLÜ, ESRA GÜZELDEMİR AKÇAKANAT (2017) İlaça Bağlı Dişeti Büyümelerinin Tedavisi: Olgu Sunumu. Türk Periodontoloji Derneği 47. Uluslararası Bilimsel Kongresi (Poster Sunumu)
 6. ZİYA SEFERLİ, SERKAN SARIDAĞ, EMRE YAPRAK, GİZEM KÖMÜRCÜ, ALİ İHYA KARAMAN, GÜL ŞANLITÜRK (2017) Ortodontik Tedavi Sonrası Maksiller Anterior Dişlerin Estetik Rehabilitasyonu. 23rd International dental congress of Turkish Dental Association (Poster Sunumu)
 7. MERYEM HÜSNA AKKAYA, EMRE YAPRAK, GİZEM KÖMÜRLÜ (2019) Bağ Dokusu Grefti İle Diş Eti Çekilmesinin Tedavisi: Olgu Serisi. 25rd International Dental Congress of Turkish Dental Association (Poster Sunumu)