

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PERİODONTOLOĞİ ANABİLİM DALI**

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN HAZIRLANMASINDA FARKLI  
SANTRİFÜJ PARAMETRELERİNİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE  
SİTOKİN DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dt. Mehmet ÖZGÜR**

**Periodontoloji Programı  
UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**

**2018**

**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN HAZIRLANMASINDA  
FARKLI SANTRİFÜJ PARAMETRELERİNİN BÜYÜME  
FAKTÖRLERİ VE SİTOKİN DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dt. Mehmet ÖZGÜR**

**Periodontoloji Programı**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Öğr. Gör. Dr. H. Gencay Keçeli**

**ANKARA**

**2018**

**ONAY SAYFASI**

25/04/2018

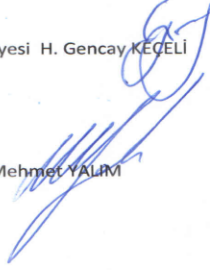
Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığına

Dt Mehmet Özgür'ün 25/04/2018 tarihinde jürimiz önünde yaptığı savunmasında "Trombositten Zengin Fibrin Hazırlanmasında Farklı Santrifüj Parametrelerinin Büyüme Faktörleri ve Sitokin Değerleri Üzerine Etkisi" başlıklı çalışması jürimiz tarafından Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Dilek İLHAN



Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi H. Gencay KEÇELİ



Üye : Prof. Dr. Mehmet YALIM



ONAY : Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi tarafından kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. A. Rüya YAZICI  
Dekan

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Fakültemiz tarafından onaylanan uzmanlık tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

**o Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

**X Tezimin 03/05/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

**o Tezimin ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

**o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

03/05/2018

***Dt. Mehmet ÖZGÜR***

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Öğr. Gör. Dr. Gencay KEÇELİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Dt. Mehmet ÖZGÜR

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmamın yürütülmesinde büyük katkıları olan, her konuda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Dilek İLHAN'a,

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, gerek hayata dair gerekse akademik kariyerimde yaklaşımları ve tavsiyeleriyle beni cesaretlendiren, hocadan çok bir abi gibi her zaman desteğini yanımda hissettiğim, tez danışmanım Öğr. Gör. Dr. Gencay KEÇELİ'ye,

Tez çalışmamın fikir babası ve oluşturulmasında büyük emekleri olan Öğr. Gör. Dr. Becen DEMİR'e,

Tez çalışmamın biyokimyasal analizleri konusunda titizlikle ve özveriyle göstermiş olduğu katkılarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Esra BÜBER'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle her daim paylaşan çok değerli abilerim Öğr. Gör. Dr. Burak KUTLU, Doç. Dr. Abdullah AKMAN, Doç. Dr. Erhan DURSUN'a,

Çok değerli hocalarım Prof. Dr. Kenan ERATALAY, Prof. Dr. Feriha ÇAĞLAYAN, Prof. Dr. Ezel BERKERE, Prof. Dr. Rahime NOHUTÇU, Prof. Dr. Alev AKALIN, Prof. Dr. Nermin YAMALIK, Prof. Dr. Burak DEMİRALP, Prof. Dr. Tolga TÖZÜM, Prof. Dr. Güliz GÜNCÜ, Öğr. Gör. Yağmur İLARSLAN, Dr. Dt. Tuğba DURUEL, Dr. Dt. Buket ACAR'a,

Uzmanlık dönemimde gösterdikleri özveri, hoşgörü ve destekleri dolayısıyla Uzm. Dr. Dt. Burak ŞAHBAZOĞLU, Uzm. Dt. Ezgi DOĞAN'a,

Asistanlığımdaya birlikte akademik ve eğlenceli bir eğitim süreci geçirdiğim Uzm. Dt. Sahand TAHERİ, Uzm. Dt. Bünyamin ÇALIŞAN, Uzm. Dt. Hazel KOCABAŞ, Uzm. Dt. Samir GOYUŞOV, Dt. Buğra ÇAKIN, Dt. Selcen ÖZCAN, Dt. Ege Nadir AYTAÇ, Dt. Tuğrul GÜR ve diğer asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın anlamı olan ve bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan anne, babam ve ablama,

Sevgisi ve anlayışı ile ona sahip olduğum için ne kadar özel olduğumu bana hatırlatan ve uzmanlık hayatımın bana kazandırdığı en değerli hediye olan Uzm. Dt. Hatice ALPAY'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**ÖZGÜR, M. Trombositten zengin fibrin hazırlanmasında farklı santrifüj parametrelerinin büyüme faktörleri ve sitokin değerleri üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Programı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.** Cerrahi periodontal tedavinin arzu edilen hedefi periodontal rejenerasyonu sağlamaktır. Bunun için birçok materyal ve bioaktif ajan geliştirilmiştir. Trombositten Zengin Fibrin (PRF) son yıllarda klinik araştırmacıların ilgisini çeken, hastanın kendi kanında elde edilen, yüksek konsantrasyonlarda platelet içeren biyoaktif bir materyaldir. PRF'nin eldesi ile ilgili birçok çalışma yapılmış ancak g kuvveti ve santrifüj süresi konusunda bir standardizasyon sağlanamamıştır. Bu tezin amacı; L-PRF cihazı ile sıradan bir laboratuvar santrifüjünün g kuvvet değerlerini eşitleyerek elde edilen büyüme faktörü ve sitokin miktarını karşılaştırmak, ayrıca optimum g kuvvet değeri ve santrifüj süresini, büyüme faktörlerinin miktarı üzerinden belirlemektir. Çalışmaya periodontal ve sistemik açıdan sağlıklı 10 birey dahil edilmiştir. Her hastadan; 1 tüp kontrol grubu (L-PRF, 400xg 12 dk), 12 tüp çalışma grubu (200,400,600,800xg; 10, 12, 14 dk) olmak üzere toplam 13 tüp kan alınmıştır. Kanlar belirlenen süre ve g kuvvetlerinde santrifüj edilmiş ve 1., 3., 7. günlerdeki PDGF, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  salımlarına bakılmıştır. Üç molekül için de 1. günde en yüksek salım değerleri kontrol grubunda görülmüştür. Üçüncü ve 7. günlerde ise kontrol grubundan elde edilen salım değerleri azalırken PDGF-AB ve IL-1 $\beta$  için 800xg 14 dk ve 600xg 10 dk, TGF- $\beta$ 1 için ise 400xg 12 dk gruplarında daha yüksek salım değerleri görülmüştür. Bu sonuçlar standart masaüstü santrifüjlerin L-PRF cihazına uygun alternatif olabileceğini ve daha uzun süre ile büyüme faktörü/sitokin salımı sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu etkilerin hücre ve doku düzeyinde incelendiği ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Trombositten zengin fibrin, PRF, büyüme faktörü, sitokin, PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje kodu: THD-2017-15113)

## ABSTRACT

**ÖZGÜR, M. Evaluation of the effects of different centrifuge parameters of Platelet-Rich Fibrin on growth factors and cytokine levels. Hacettepe University Faculty of Dentistry, Specialiation Thesis in Periodontology, Ankara, 2018.** The desired goal of surgical periodontal therapy is to provide periodontal regeneration. Many materials and bioactive agents have been developed for this purpose. Platelet-Rich Fibrin (PRF) is a bioactive material containing platelets in high concentrations obtained from the patient's own blood, which has been of interest to clinical investigators in recent years. A number of studies have been done on the production of PRF but no standardization of g force and centrifugation time has been achieved. The aim of this thesis is; to compare the amount of growth factors and cytokine obtained by equalizing the g values of an ordinary laboratory centrifuge with the L-PRF device, to determine the optimal g force value and the centrifugation time by the amount of the growth factors. Periodontally and systemically healthy 10 subjects were included in the study. From every patient; A total of 13 tubes of blood were collected, including 1 tube control group (L-PRF, 400×g 12 min) and 12 tube study groups (200, 400, 600, 800×g; 10, 12, 14 min). Blood tubes were centrifuged at specified time and g forces and PDGF-AB, TGF-β1, IL-1β release on days 1, 3, 7 were examined. For the three molecules, the highest release values on 1st day were seen in the control group. On the 3th and 7th days, the release values from the control group were decreased, whereas the higher release values were seen in the groups of PDGF-AB and IL-1β at 800×g for 14 min and 600×g for 10 min and for TGF-β1 at 400×g 12 min. These results demonstrate that standard laboratory centrifuges may be an appropriate alternative to L-PRF device and may provide growth factor/cytokine release for longer periods of time. However, there is a need for further investigations of these effects at the level of cell and tissue.

**Keywords:** Platelet-rich fibrin, PRF, growth factor, cytokine, PDGF-AB, TGF-β,

IL-1β

Supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (Project Code: THD-2017-15113)



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLOLAR	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Periodontal Tedavi Yaklaşımları	4
2.1.1. Rezektif Periodontal Tedavi	4
2.1.2. Rejeneratif Periodontal Tedavi	5
2.1.3. Trombositten Zengin Fibrin (Platelet-Rich Fibrin, PRF)	19
2.1.4. PRF ile İlgili Yapılan Klinik Araştırmalar	27
2.1.5. PRF'nin Elde Edilme Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
3.1. Çalışma Dizaynı ve Dahil Edilen Bireyler	36
3.2. Kullanılan Santrifüj Cihazları ve Çalışma Grupları	36
3.3. Bireylerden Kan Alınması	39
3.4. PRF Hazırlanması	39
3.6. Protein Miktarlarının Belirlenmesi	42
3.7. ELISA Yöntemi	44
3.8. Verilerin Analizi	46
<b>4. BULGULAR</b>	<b>47</b>
4.1. PDGF-AB Salım Sonuçları	47
4.2. TGF- $\beta$ 1 Salım Sonuçları	49
4.2. IL-1 $\beta$ Salım Sonuçları	51
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>54</b>

<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>64</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>65</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>80</b>
Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	80
EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi	84



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AFD</b>	Açık Flep Debridmanı
<b>A-PRF</b>	İleri- Trombositten Zengin Fibrin (Advanced-Platelet Rich Fibrin)
<b>BCA</b>	Bicinchoninic Acid
<b>BDG</b>	Bağ Dokusu Grefti
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asid
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
<b>ELİSA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>e-PTFE</b>	Expanded Poly Tetra Fluoro Ethylene
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FGF</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
<b>IGF</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor)
<b>IL</b>	İnterlökin (Interleukin)
<b>I-PRF</b>	Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (Injectable-Platelet Rich Fibrin)
<b>IQR</b>	Çeyrek Değerler Genişliği (Inter-quartile Range)
<b>ISCT</b>	Uluslararası Hücre Tedavi Birliği (International society for Cellular Therapy)
<b>KPF</b>	Koronale Pozisyone flep
<b>L-PRF</b>	Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin
<b>MMP</b>	Mine Matriks Proteini
<b>PDGF</b>	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor)
<b>PDL</b>	Periodontal Ligament
<b>PRF</b>	Trombositten Zengin Fibrin (Platelet-Rich Fibrin)
<b>PRP</b>	Trombositten Zengin Plazma (Platelet-Rich Plasma)
<b>r</b>	Yarıçap
<b>RCF</b>	Rölatif Santrifüj Kuvveti (Relative Centrifuged Force)
<b>RPM</b>	Dakikadaki Devir Sayısı (Rounds Per Minute)
<b>SRP</b>	Scaling and Root Planing
<b>SS</b>	Standart Sapma

<b>TGF</b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrotizan Faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha)
<b>T-PRF</b>	Titanyum-Trombositten Zengin Fibrin (Titanium-Platelet Rich Fibrin)
<b>VEGF</b>	Vasküler-Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular-Endotelial Growth Factor)
<b>YDR</b>	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	Gama



## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b> ALL Centrifuge marka santrifüj cihazı	37
<b>3.2.</b> Intra-spin marka santrifüj cihazı	38
<b>3.3.</b> Çalışmanın yapıldığı hücre kültürü laboratuvarındaki cihazlar	40
<b>3.4.</b> PRF örneklerinin 24-kuyulu plaklara alındıktan sonraki görüntüsü	41
<b>3.5.</b> Besi yeri örneklerinin santrifüj edilmesinde kullanılan cihazlar	41
<b>3.6.</b> PRF örneklerinin homojenizasyonunda kullanılan homojenizatör cihazı	42
<b>3.7.</b> Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, SpectraMax M2 Model)	43
<b>3.8.</b> BCA yöntemi ile protein tayini	43
<b>3.9.</b> Protein tayininde kullanılan standart grafik.	44
<b>3.10.</b> Kullanılan ELISA yönteminin genel prensibinin şematik gösterimi	45
<b>3.11.</b> ELISA ölçümlerinde kullanılan standart grafik	46

**TABLolar**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Farklı kaynaklardan alınan mezenşimal kök hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşma potansiyelleri	17
<b>2.2.</b> Literatürde PRF elde etmek için kullanılan değerler	35
<b>3.1.</b> Test grubu santrifüjünün teknik özellikleri	37
<b>3.2.</b> Kontrol grubu santrifüjünün teknik özellikleri	37
<b>3.3.</b> Çalışma gruplarının g kuvvetleri ve çalışma süreleri	39
<b>4.1.</b> PDGF-AB salım sonuçları	48
<b>4.2.</b> TGF- $\beta$ 1 salım sonuçları	50
<b>4.3.</b> IL-1 $\beta$ salım sonuçları	52

## 1. GİRİŞ

Cerrahi periodontal tedavinin en önemli amacı kaybedilen periodontal dokuları fonksiyon görecek şekilde yeniden elde edebilmektir. Amaçlanan bu rejenerasyonu gerçekleştirebilmek için birçok materyal ve biyoaktif ajanlar geliştirilmiştir. Trombositten Zengin Fibrin (Platelet-rich Fibrin-PRF), son yıllarda klinik araştırmacıların ilgisini çeken, hastanın kendi kanından elde edilen ve yüksek konsantrasyonda platelet içeren biyoaktif bir materyaldir.

Diş hekimliğinde sıkça kullanılmaya başlanan PRF'nin elde edilmesiyle ilgili çok sayıda farklı protokoller önerilmekte, bu durum araştırmacıları ve klinisyenleri protokolleri sınıflandırma, yorumlama ve optimal protokolün hangisi olabileceği konusunda tereddütte bırakmaktadır. PRF, başından beri açık kaynak bir yöntem olarak lanse edilse de, uygulamalar yöntemi önerilen bir makineye bağlı hale getirmiştir. Örneğin A-PRF veya L-PRF için geliştirilen santrifüjlerin kullanılmasının daha iyi olacağı ifade edilmektedir. Ayrıca literatürde değişik santrifüj cihazları ve protokolleri kullanılarak yapılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen tam bir standardizasyondan söz etmek zordur. PRF elde etmenin esası, tam kana belli bir sürede belli sayıda dönme hareketi uygulanarak yaratılan merkezkaç kuvveti sonucu kanın şekilli elemanlarının ve trombositlerin belli bir bölgede yoğunlaştırılması mantığına dayanmaktadır. Araştırmacılar farklı merkezkaç kuvveti uygulayarak maksimum seviyede büyüme faktörleri elde edebilmek için optimum değerleri saptamaya çalışmaktadırlar. Literatürde kullanılan dakikada dönme sayısı (rounding per minute, rpm) ve buna bağlı olarak hesaplanan g kuvvetleri farklı araştırmacılar arasında değişkenlik göstererek uygulamaya konulmuştur. İlk kez Choukroun [1] tarafından ikinci jenerasyon platelet konsantrasyonu olarak tanımlanan PRF, antikoagülan eklenmeden elde edilmektedir. Hastadan alınan kanlar önceden programlanmış santrifüje (PC-02, PROCESS for PRF, Nice, France) 2 farklı protokolle aktarılmaktadır. İlkinde standart PRF steril 9 ml'lik cam kaplı plastik tüplerle 2700 rpm devirde 12 dakika süresince; ikinci olarak A-PRF (Advanced platelet-rich fibrin) protokolünde ise steril, düz, 10 ml'lik cam vakum tüpleriyle 1500 rpm devirde, 14 dakika süreyle santrifüj edilmektedir.

Orijinal L-PRF açık erişim protokolüne uygun olarak Dohan ve arkadaşları [2] spesifik, steril, antikoagülansız 9 ml'lik cam kaplı plastik tüpler kullanarak önceden programlanmış santrifüj cihazında (Intra-Spin, Intra-Lock, Boca-Raton, FL, USA) 2700 rpm devirde, 12 dakikalık süreyi kullanmışlardır. Dört ayrı araştırmacı grup, hastadan aldıkları kanı 4 farklı masaüstü santrifüjü kullanarak 3000 rpm devirde 10 dakika süreyle (yaklaşık 400×g kuvvetinde) santrifüj etmişlerdir [3-6].

Gassling [7] 2700 rpm, Qi Li [8] 2100 rpm, Eren ve arkadaşları [9] yaklaşık 400×g'de 12 dakikalık santrifüj süresini kullanmışlardır. Rpm değerleri farklı olmasına rağmen yaklaşık g değerleri aynıdır. Bu da kullanılan santrifüj yarıçapının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Tunalı ve arkadaşları [10] alınan kanı titanyum tüp içerisinde hazırladıkları için buna T-PRF ismini vermiş ve titanyum tüpü 3500 rpm de 15 dakika santrifüj etmişlerdir. Gürbüzer ve arkadaşlarının [11] yaptığı bir çalışmada 10 ml venöz kan steril, kuru nötral, antikoagülansız cam tüpe alınmış ve 400×g'de (2039rpm) 10 dakika santrifüj edilmiştir. Su ve Burnouf [12] 2700 rpm (yaklaşık 700g) 12 dakika, Lekovic ve arkadaşları [13] ise 1000×g de 10 dakika santrifüj (Labofuge 300; Heraeus GmbH, Hanau, Germany) işlemi uygulamışlardır . Görüldüğü gibi literatürde L-PRF'nin elde edilmesiyle ilgili çok değişik protokoller mevcuttur. Bu değişik protokoller hem rpm değerini hem santrifüj süresini dolayısıyla farklı g kuvvetlerini içermektedir. Aynı zamanda bu çalışmalarda farklı santrifüj cihazları kullanılmıştır. Bu g kuvvetlerinin hangisinde optimum düzeyde büyüme faktörü elde edilebileceği bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda farklı rpm ve zaman sürelerini karşılaştırarak bir standardizasyona ihtiyaç olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

PRF ile ilgili çalışmalarda, periodontal rejenerasyonda PRF'i değerli kılan trombositleri yoğun olarak bünyesinde içermesidir. PRF ile ilgili yapılan çalışmalarda; biyolojik özellikleri belirlenmiş [14], lökositlerin bu konsantrasyon içindeki rolü tartışılmış [15], doku iyileşmesi üzerine etkileri rapor edilmiştir [16]. Ayrıca PRF'nin biyokimyasal analizi bu biyomateryalin Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth factor (TGF), Vasculer Endothelial Growth



Factor (VEGF) ve Insulin-like Growth Factor (IGF) içerdiğini göstermiştir [14]. Konu ile ilgili literatüre bakıldığında, çalışmalarda kullanılan protokollerin geçerliliği genelde bünyesindeki büyüme faktörlerinin değerleri ile anlamlandırılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle PRF ile ilgili protokol çalışmalarında yöntemin etkinliğini açıklayabilmek için büyüme faktörlerinin mevcudiyeti ve düzeyleri üzerinden sonuca ulaşmaya çalışmak daha tutarlı ve kolay gözükmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı;

1. L-PRF cihazı ile sıradan bir laboratuvar santrifüjünün g kuvvet değerlerini eşitleyerek, elde edilen büyüme faktörü ve sitokin miktarlarını karşılaştırmak,
2. Farklı g kuvvet değeri ve santrifüj süresini hesaplamak ve bunu büyüme faktörlerinin miktarı üzerinden belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Periodontitis toplumlarda yaygın olarak görülen, dişlerin destek dokularında yıkıma neden olan ve tedavi edilmezse dişlerin kaybına yol açan progresif, iltihabi bir hastalıktır. Periodontitis tedavi edilmediğinde periodontal dokulardaki yıkım ilerleyerek fizyolojik, estetik ve fonksiyon sorunlarına yol açmaktadır. Yıkımın devamında ise dişlerde sallanma ve diş kayıpları görülmektedir.

### 2.1. Periodontal Tedavi Yaklaşımları

Periodontal tedavinin amacı bu hastalığı önlemek, tedavi etmek, ilerlemesini durdurmak, kişilere sağlıklı ve fonksiyon gören bir dentisyon sağlamaktır. Diğer bir deyişle periodontitisin ilerleyişinin durdurulması ve periodontitisten etkilenmiş dişlerin uzun süre ağızda kalmasını sağlamaktır. Geçmişten günümüze kadar cerrahi olmayan ve cerrahi olan pek çok tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Cerrahi periodontal tedavinin en önemli amacı iltihabi periodontal hastalık nedeniyle kaybedilmiş sert ve yumuşak doku desteklerinin yeniden ve hastalık öncesi seviyesinde elde edilmesidir.

#### 2.1.1. Rezektif Periodontal Tedavi

Rezektif periodontal tedavide, periodontal cep eliminasyonu yapılmakta, kemik morfolojisi düzeltilerek kemiğe pozitif anatomik form verilmekte ve böylece hastaya kolaylıkla ağız hijyenini uygulayabileceği fizyolojik konturlar sağlanmaktadır. Gingivektomi, apikale pozisyone flep, kemik rezeksiyonu yapılan veya yapılmayan modifiye widman flep, geçmişten günümüze karşımıza çıkan rezektif işlemlerdir. Bu işlemlerin uygulamasında etiyolojik faktörler, patolojik periodontal cebin derinliği ve şekli (yalancı ve gerçek periodontal cep), kemik kaybının şiddeti, şekli ve bulunduğu bölgeler göz önünde bulundurulmaktadır. Gingivektomi, kemik kaybının olmadığı ve yalancı ceplerin olduğu durumlarda uygulanır. Kemikle ilgili rezektif uygulamalarda en basit işlem olarak osteoplasti bulunmaktadır. Osteoplasti, alveol kemiğin dişi destekleyen kısımları kaldırılmaksızın şekillendirilmesi işlemidir [17]. Ancak bazı durumlarda osteoplasti yeterli olmayabilir. Alveol kemiği deformatelerinin şekline ve derinliğine bağlı

olarak osteoektomi gerekebilir. Osteoektomi, alveol kemiği deformitelerini ortadan kaldırmak için kemiğin dişi destekleyen kısımlarının uzaklaştırılması işlemidir. Kemik rezeksiyonu işlemleri; el aletleri, düşük veya yüksek devirde dönen aletler kullanılarak uygulanmaktadır. Rezektif tedavinin kısa sürede sonuç vermesi, güvenilir olması ve ağız bakımının kolay yapılabileceği bir anatomik form oluşturması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşılık ataçman kaybı, kök yüzeyinin açığa çıkmasına bağlı olarak estetiğin bozulması, aşırı dentin duyarlılığı oluşma riski ve kök yüzeyi çürükleri görülebilmesi gibi dezavantajları da vardır. Ayrıca diş mobilitesi fazla olduğunda, maksiller sinüsün kemik defektine yakın olduğu durumlarda, 3-4 mm'den fazla olan kemik içi defektlerde ve destek kemik kaldırıldıktan sonra kron-kök oranının kök aleyhine bozulduğu durumlarda uygulanması risklidir. Son yıllarda rejeneratif yöntemlerdeki umut verici gelişmeler, araştırmacıları rejeneratif periodontal cerrahiye yöneltmiştir.

### **2.1.2. Rejeneratif Periodontal Tedavi**

Kaybedilmiş dokuların fonksiyon görebilecek ve sağlıklı bir şekilde ilk haline getirilmesine rejenerasyon denilmektedir. Cerrahi periodontal tedavinin de arzu edilen amacı periodontal rejenerasyonu tesis edebilmektir. Zander ve arkadaşları [18] periodontal hastalığa sebep olabilecek lezyonları periodontal tedaviyle kontrol altına almanın önemini, periodontal hastalığın oluşumunu önlemenin temel amacımız olması gerekliliğini ve hastaya hayatı boyunca kullanabileceği sağlıklı ve konforlu bir dentisyon sunmanın periodontal tedavinin en önemli amacı olduğunu bildirmiştir. Karring ve ark. [19] da cerrahi periodontal tedavinin amacını, periodontal hastalığın oluşumunu ve ilerlemesini durdurmanın yanında periodonsiyumun sert ve yumuşak dokularının hastalıktan önceki durumuna yani dokuların orijinal haline getirilmesini sağlamak olarak belirtmişlerdir. Buradaki rejenerasyondan kasıt; hastalıklı kök yüzeyinde yeni sement oluşumu, bunun içine giren kollajen fibriller ve yeni alveol kemiğinin oluşmasıdır [20].

Periodontal rejenerasyon, periodontal hastalık sebebiyle kaybedilen sement, periodontal ligament ve alveol kemiği gibi farklı dokulardan oluşan kompleks bir yapının rejenerasyonunu içermektedir [21]. Rejenerasyon, iyileşen yarının

fonksiyonel ve mimari olarak tümüyle restorasyonu şeklinde; tamir ise iyileşen yara dokusunun tamamının mimarisinin restore edilmediği, sadece bir kısmının restore edildiği durumlar olarak tanımlanmıştır [22]. Kaybedilmiş periodontal desteğin yerine konması amacıyla yapılan işlemler reataçman ve yeni ataçman gibi terimleri ortaya çıkarmıştır. Patolojik durumlar ve travma gibi mekanik sebeplerle veya periodontal hastalığın bir sonucu olarak kaybedilmiş periodontal ligamentin kök yüzeyinde yeni sement oluşturması ve bu yeni sement içerisine kollajen liflerin gömülmesi yeni ataçman olarak adlandırılmaktadır. Reataçman ise periodontal ligamentin zarar görmediği kök yüzeyi ile periodontal dokuların tekrar birleşimini tarif etmektedir [23]. Hasar görmüş dokuların rejenerasyonla mı ya da tamirle mi iyileşeceği iki kritik etkene bağlıdır; birincisi gerekli olan hücre tiplerinin mevcudiyeti, ikincisi ise bu hücrelerin toplanmasını sağlayacak ve aktive edecek gerekli başlatma sinyallerinin varlığıdır. Rejenerasyondan bahsedebilmemiz için ortamda, periodontal ligament, sement ve alveoler kemik hücrelerinin bulunması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca uygun koşullar altında periodontal defekt bölgesindeki rezidüel hücrelerin kaybedilen dokuları yeniden oluşturma kapasitesine sahip olduğu da gösterilmiştir [24]. Rejenerasyonla ilgili yapılan çalışmalarda, dişeti epitel ve bağ dokusu hücrelerinin yeni ataçmana katkısı olmadığı, defekt bölgesine periodontal ligament ve alveol kemiğinden kaynaklanan hücrelerden önce gelmesinin rejenerasyonun istenen seviyede elde edilmesini engelleyebileceği bildirilmiştir [25]. Bu nedenle dişeti epitel ve bağ dokusu hücrelerinin defekt bölgesine gelmesini engelleyebilmek için bariyer görevi yapan membranlar devreye girmiştir [24, 26]. Rejeneratif işlemler aşağıdaki şekilde sıralanabilir [27]:

1. Diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi ile birlikte yapılan yumuşak doku küretajı
2. Flep kaldırma operasyonu
3. Koronale kaydırılan flep
4. Kök yüzeyi biyomodifikasyonu
5. Greft uygulamaları

- a) Otojen greftler
- b) Allogreftler
- c) Heterogreftler
- d) Alloplastik greftler

#### 6. Büyüme faktörleri

#### 7. Bariyer membranlar

- a) Rezorbe olan membranlar
- b) Rezorbe olmayan membranlar

#### 8. Diğer yönlendirilmiş doku rejenerasyonu teknikleri

Rejenerasyonu gerçekleştirmede günümüze kadar pek çok yöntem geliştirilmiştir. Birçok çalışma ve araştırmaların sonucunda periodontal rejenerasyonun sağlanabileceği sonucuna varılsa da periodonsiyumun karmaşık iyileşme mekanizmasından dolayı rejeneratif periodontal tedavilerin öngörülebilirliği kısıtlı kalmaktadır. Her ne kadar periodontal rejenerasyon gerçek rejenerasyonu ifade etmese de mümkün olan optimum rejenerasyonu elde edebilmek adına bariyer membranlar (rezorbe olan ve olmayan), kemik greftleri (otojen, allograft, ksenograft, alloplast), biyolojik olarak aktif rejeneratif materyaller (büyüme faktörleri, mine matriks türevleri) gibi çeşitli materyaller kullanılmıştır [28]. Bu materyallerle ilgili yapılan gerek in-vivo ve gerek in-vitro çalışmalar sonucu oluşan bilgi birikimleri periodontal araştırmacıları doku mühendisliğine yöneltmiştir.

Bu çalışmalar periodontal rejenerasyonda; hücre repopülasyonu, boşluğun korunması veya yara bölgesinin korunması, pıhtı stabilizasyonu, bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi ve yeni damar oluşumu gibi önemli prensiplerin gerekliliğini vurgulamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda Gottlow ve arkadaşları [29] dişeti bağ dokusu ve epitel hücrelerinin fiziksel bir bariyer yardımıyla engelleyip periodontal ligament ve alveoler kemik hücrelerinin repopülasyonunu sağlayan

‘yönlendirilmiş doku rejenerasyonu’ fikrini ortaya atmışlardır. Biyolojik olarak öncü hücrelerin defektli bölgeye göçünü, oraya tutunmasını ve bölgede çoğalmasını sitokinler, büyüme faktörleri gibi bazı biyolojik moleküller sağlamaktadır [30].

### **Kök Yüzeyi Biyomodifikasyonu**

Periodontitisten etkilenmiş kök yüzeylerinin üzerindeki diş taşlarının, bakteriyel birikintilerin ve endotoksinlerin uzaklaştırılması sağlıklı bağ dokusu ataçmanı elde edebilmek için ana hedef olarak düşünülmektedir [31]. Ayrıca değişik materyaller kök yüzeyi üzerine uygulanarak yüzey demineralizasyonu ve detoksifikasyonu sağlanarak sement oluşumunun kolaylaştırılabileceği bildirilmiştir [32]. Bu uygulamalar, kök yüzeyinden sadece smear tabakasını kaldırmaz, aynı zamanda dentin tübüllerini genişleterek bağ dokusunun iyileşirken bu tübüller içerisine girmesine de olanak tanır. Sitrik asit, tetrasiklin hidroklorit, doksisisiklin hidroklorit, fosforik asit, sodyum hipoklorit, etilen diamin tetra asedik asit (EDTA) , fibronektin, laminin, Cohn’s faktör, stannöz florit gibi kimyasal ajanlar kök yüzeyi uygulamaları için geçmişten günümüze kadar kullanılmışlardır [33]. Kök yüzeyi biyomodifikasyonu için sitrik asit ve tetrasiklin en çok kullanılan materyaller olmuştur [34]. Ancak kök yüzeyinin sitrik asitle biyomodifikasyonunu takiben rejenerasyonu gösteren histolojik bulgulara rağmen, bazı klinik çalışmalarda sitrik asit uygulanmayan kök yüzeyleri ile karşılaştırıldığında klinik açıdan fark olmadığı bildirilmiştir [35]. Diş kök yüzeyine fibrin ağı ve fibroblastların ataçmanının incelendiği in-vitro çalışmada tek başına kök yüzeyi temizliği ve düzleştirilmesi (Scaling and root planning, SRP) ile SRP ve EDTA, SRP ve tetrasiklin kapsül, SRP ve tetrasiklin jel grupları birbirleri arasında karşılaştırılmıştır. Kan pıhtı adezyon skorları açısından tetrasiklinle tedavi edilen kök yüzeylerinde en yüksek değerler bulunmuştur. SRP ile EDTA ve tetrasiklin jel uygulamasının dentin yüzeyinde smear tabakasının kaldırılmasını sağladığı, fibroblastların ataçmanını ve fibrin ağı adezyonunu geliştirdiği görülmüştür [36].

## Kemik Greftleri

Kemik greftleri, periodontal hastalıklara bağılı olarak meydana gelen kemik defektlerinin tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılan en yaygın materyallerdir. Kemik greftleri; osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleriyle periodontal rejenerasyona katkıda bulunmaktadır. *Osteogenez*, greft materyallerinin içerdiği osteoblastik hücrelerle yeni kemik oluşturabilme özelliğidir. Bu sadece otojen kemik greftlerinde bulunan bir özelliktir. Çevre dokulardaki yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerin osteoblastik hücrelere farklılaşmasını sağlaması özelliği ise *osteoindüksiyon* özelliği olarak ifade edilmektedir. *Osteokondüksiyon*, greft materyalinin iskele görevi görerek komşu hücrelerin greft içerisine girerek yeni kemik oluşturmasıdır [37]. Greft materyalleri 1999 yılında; otojen greftler, allojenik greftler, ksenogreftler, sentetik kemik greftleri (alloplastik greftler) şeklinde kategorize edilmişlerdir [38].

Otojen kemik greftleri, kişinin kendisinden elde edilen materyallerdir ve osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptir [39]. İntraoral kaynaklı otojen kemik greftlerinin kullanımı periodontistler tarafından sıklıkla tercih edilse de kemik alınabilecek bölgelerin sınırlı olması, ek bir cerrahi işleme gereksinim duyulması ve greft alınırken potansiyel implant sahalarının ortadan kaldırılması ihtimali otojen kemik kullanımını sınırlamaktadır [40]. Allojenik greftler; aynı türün genetik olarak farklı bireylerinden elde edilip osteoindüktif ve osteokondüktif özelliğe sahiptir. Allogreftler taze, dondurulmuş, taze dondurulmuş kemik, dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti ve demineralize edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti şeklinde gruplara ayrılmaktadır. Allogreftler spongioz, kortikal ya da bunların kombinasyonları halinde hazırlanabilirler. Ayrıca mercan veya yosundan elde edilmiş kemik benzeri materyaller de kullanıma sunulmuştur [41]. Klinik olarak allogreftlerin kullanıldığı kemik defektlerinde kemik dolumu açısından olumlu sonuçlar bulunmasına rağmen hastalık bulaşma riski, immün reaksiyona neden olma ihtimali, finansal nedenlerden dolayı kullanımı kısıtlı kalabilmektedir [42]. Otojen ve allojen kemik greftlerinin dezavantajları ksenogreftler ve sentetik kemik greftlerinin yaygın olarak kullanımını gündeme getirmiştir. Bu gruba dahil olan kemik greftleri osteokondüktif özellik

göstermektedir. Ksenogreftler, hayvan kaynaklı dondurulmuş kemik materyalleri ve mercan veya yosundan elde edilmiş kemik benzeri materyallerden kaynak almaktadır [43]. Sentetik kemik greftleri veya alloplastik greftler; kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat, biyoaktif cam materyaller ve seramik greftler ve polimerleri içermektedir [44].

Yapılan histolojik çalışmalarda otojen kemik greftinin insanlarda periodontal rejenerasyonu desteklediği görülmüştür [45]. İleri kemik kaybı olan çenelerde yapılan bir çalışmada otojen blok greftler uygulanmış ve %95'e yakın başarı oranı elde edilmiştir [46]. Pjetursson ve arkadaşları [47] tarafından yapılan bir çalışmada maksiller sinüs yükseltme operasyonlarında greft materyali olarak kullanılan otojen greftin yapay kemik greftlerine göre daha başarılı olduğu görülmüştür. Bunların yanında ikinci bir cerrahi alanın açılıyor olması araştırmacıları yeni kemik materyalleri kullanmaya yönlendirmektedir [48, 49].

Allogreftin otojen greftlere kıyasla donör morbiditesinin olmaması, miktar olarak kullanım kısıtlılığının olmaması; ksenogreftlere göre de osteokondüktif etkisinin yanısıra osteoindüktif etkiye sahip olması nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir [50, 51]. Allogreft kullanımıyla ilgili yapılan klinik çalışmalara baktığımızda alveoler kemik augmentasyonu ve kemik rejenerasyonunda başarıyla kullanılabileceği görülmektedir [52-54].

Ksenogreftler ile yapılan çalışmalarda, bu materyallerin doğal osteotropik özellikleri nedeniyle doku dostu olduğu, histolojik olarak yeni oluşan kemik ile greft arasında fibröz dokunun yer almadığı tespit edilmiştir [55]. Allogreftlerle karşılaştırıldığında ksenogreftlerin bağ dokusu büyümesini arttırdığı, geç vaskülarize olduğu ve düşük rezorpsiyon oranına sahip olduğu bildirilmiştir [56].

Sentetik kemik greftlerinin periodontal defektlerin tedavisinde kullanıldığı çalışmalarda klinik ataçman kazancı, cep derinliğinde azalma ve kemik dolumu gösterilmesine rağmen her zaman sonuçların öngörülebilir olmayacağı vurgulanmıştır. [57]. Bu nedenle sentetik kemik greftlerinin büyüme faktörleriyle birlikte kullanımı gündeme gelmiş ve bu kombinasyondan başarılı sonuçlar alınmıştır [58]



## Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda bariyer membranların tek başına kullanılmasının yanı sıra, periodontal rejenerasyon potansiyelini arttıracakları düşünülen kemik greftleri ve biyolojik medyatörlerin kullanımı önerilmektedir. Biyolojik medyatörler arasında; mine matriks proteini, rekombinant insan trombosit kaynaklı büyüme faktör-BB ve beta trikalsiyum fosfat, sentetik peptit bağlayıcı protein P-15 ve anorganik sığır kemik matriksi, mezenşimal kök hücreler, kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreleri, periodontal ligament progenitörleri, pluripotent kök hücreleri, embriyonik kök hücreleri, gen, RNA tedavisi bulunmaktadır. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu açık kök yüzeylerinin kapatılmasında, kemik içi defektlerin tedavisinde, furkasyon defektlerinin tamirinde, peri-implant alanlarda kullanılmaktadır [59-62]. YDR prensibi gereğince enfeksiyon kontrolü, pıhtı formasyonu için kapalı alan oluşturulması, yara iyileşme potansiyeli, defektin morfolojisi ve tipi, sigara kullanımı, plak kontrolü ve genetik faktörler başarılı bir rejenerasyonda önem taşımaktadır.

Geçmişten günümüze bariyer membranlar kan pıhtısının stabilizasyonu ve idamesinde başarıyla kullanılmıştır. Bariyer membranların epitel hücrelerinin göçünü engellemesi ve kemik greft materyalini etrafındaki dişeti epiteli ve bağ dokusundan ayırması sayesinde periodontal rejenerasyona izin vermesi prensibine, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu da denilmektedir [24]. Kemik dokularının rejenerasyonu ve *turnover*'ı yumuşak dokulardan daha uzun sürede meydana gelmektedir [63]. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan bariyer membranlar rezorbe olmayan ve rezorbe olabilen membranlar olarak sınıflandırılmaktadır. Rezorbe olmayan membranlar içerisine expanded politetrafloretilen (e-PTFE) membran YDR'de kullanılan birinci jenerasyon materyaldir. Daha sonra yapısına titanyum ilavesiyle mekanik olarak daha stabil hale getirilmiştir. Ancak membranın erken dönemde açığa çıkması, membranın çıkarılırken ikinci bir cerrahi uygulama gerektirmesi ve bu esnada yumuşak doku hasarı riskinin olması rezorbe olmayan membranların dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu dezavantajlardan dolayı rezorbe olabilen membranların kullanımı yaygın hale gelmiştir. Rezorbe olabilen membranlar doğal ve sentetik olmak üzere iki farklı kaynaktan yapılmaktadır. Doğal kaynaklı

olanlar daha çok sığır kaynaklı kollajen membranları içermektedir. Bunun yanısıra polilaktik asit, poliglolik asit, trimetil karbonat ve bunların kopolimerleri olmak üzere rezorbe olabilen sentetik membranlar üretilmiştir [64-66]. Rezorbe olan ve olmayan membranlar birbirleriyle kıyaslandıklarında rezorbe olan membranların rezorbe olmayanlara kıyasla daha düşük klinik başarıya sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [67, 68].

### **Mine Matriks Proteini**

Rejenerasyon yöntemlerinde son yıllarda sıkça kullanılan materyal mine matriks proteini (MMP)'dir. MMP'nin kullanım felsefesi, diş embriyosunun gelişimi esnasında hertwig epitel kök kınındaki hücrelerin sement oluşumundan önce kök yüzeyi üzerine matriks proteinlerini bırakması ve bunların sement oluşumunu tetiklediği görüşüne dayanır [69]. Klinik çalışmalar MMP kullanıldığında daha fazla klinik ataçman ve kemik kazanacı olduğunu desteklemesine rağmen bu konudaki histolojik çalışmalar kısıtlıdır [70]. MMP'nin sınıf 2 furkasyon defektlerinde açık flep debridmanı (AFD) tedavisinin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [71]. MMP kullanımının klinik ataçman kazancı sağladığı ve cep derinliğini azalttığı ancak AFD'ye göre fark yaratmadığını gösteren araştırmalar da mevcuttur [72]. MMP'nin otojen ve allojen kemik greftleriyle beraber kullanımıyla ilgili klinik parametreler bazında yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda; MMP'nin otojen ve allojen kemik greftlerinin etkisine ilave bir katkı sağlamadığı ancak MMP ilave edilen grupta sınıf 2 furka defektlerinin klinik olarak anlamlı seviyede daha fazla kapandığı gözlenmiştir [73]. MMP, osteogenezisi indükleyerek vertikal ve horizontal olarak yeni kemik oluşumunu indükleyebilir. Otojen ve allojen kemik greftleriyle beraber MMP uygulaması osteogenezis açısından sinerjik etki yaratabilir [74]. MMP ile ilgili bilgiler ışığında bu materyalin tek başına kullanımından ziyade kombine kullanımının daha etkili olabileceği kanaati oluşmaktadır.

### **Büyüme Faktörleri**

Periodontal rejenerasyon, ortamda bulunan konak hücreleri tarafından salgılanan büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yönlendirmesiyle düzenlenmektedir.

Biyolojik olarak aktif doğal hormonlar yara iyileşmesi esnasında hücre proliferasyonu, migrasyonu, ekstrasellüler matriks sentezi ve remodelasyonunda önemli rol oynamaktadır. Periodontal rejenerasyonda trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor-PDGF), transforme edici büyüme faktörü (transforming growth factor-TGF), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-FGF), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor-EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor-VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (insülin-like growth factor-IGF) ve kemik morfojenik proteini (bone morphogenetic protein-BMP) rol oynamaktadırlar [75].

***Transforme edici büyüme faktörü (TGF):*** Trombositler ve keratinositler tarafından sentezlenen TGF, yapı ve fonksiyonel açıdan birbirinden farklı olan TGF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  olmak üzere iki üyesi olan bir büyüme hormonudur. TGF- $\beta$ 1 insan vücudunda trombositler, makrofaj/monositler, lenfositler, fibroblastlar, epitel hücreleri ve dendritik hücrelerden sentezlenmektedir [76]. Periodontal rejenerasyon çalışmaları irdelendiğinde daha çok TGF- $\beta$ 1'nin kullanıldığı ve periodontal tamir ve yara iyileşmesinde önemli rol oynadığı görülmektedir [77].

***Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF):*** Bir glikopeptit yapısında olan PDGF, PDGF-A ve PDGF-B olmak üzere iki farklı protein zincirinden meydana gelmektedir [78]. Biyolojik olarak aktif olabilmeleri için kendilerine özgü hücre zarı reseptörüne bağlanmaları ve PDGF-AB heteromeri haline gelmeleri gerekmektedir [79]. Yara iyileşmesi sırasında trombositlerin içerisinde bulunan granülleri açığa çıkar ve pıhtı oluşumunda rol oynamaktadır [80]. PDGF; osteoblastlar, uyarılmış makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından da üretilir [78]. Günümüzde rekombinant teknolojisiyle elde edilen PDGF türevleri diş hekimliğinde yüksek kullanım potansiyeline sahip bir biyomateryal olarak karşımıza çıkmaktadır.

***Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü:*** (VEGF): VEGF, vasküler düz kas hücrelerinden, epitelyal hücrelerden, plateletlerden, lökositlerden ve makrofajlardan sentezlenmektedir [81]. VEGF, anjiyogenezisin düzenlenmesinde en önemli medyatörlerden biridir. Multifonksiyonel, anjiyojenik bir sitokin olan VEGF; mikrovasküler permeabiliteyi artırır, endotelial hücre proliferasyonunu uyarır,

proteolitik enzim ekspresyonunu indükler, endotel hücreler, monositler ve makrofajların migrasyonunda rol oynarlar [82]. VEGF ailesinin bugüne kadar tanımlanan üyeleri arasında VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E bulunmaktadır [83].

**Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ):** IL-1 aktive olmuş makrofajlardan, nötrofillerden, endotel hücrelerden, fibroblastlardan, keratinositlerden ve Langerhans hücrelerinden üretilirler. İnflamasyonun kontrolündeki anahtar medyatördür.  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak adlandırılan iki izoforma sahiptir. IL-1 sentezi; TNF- $\alpha$ , Interferon (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve bakteriyel endotoksinler tarafından gerçekleştirilir. Temel aktivitesi T helper lenfositleri stimüle etmektir [84, 85].

**Fibroblast Büyüme Faktörü: (FGF):** FGF yara tamiri ve anjiyogenezde rol oynayan bir polipeptit ailesidir [57]. Benzer aktivitelere sahip 7 alt grup içermektedir [58]. FGF, yara iyileşmesine katılan endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve kondrositlerin proliferasyonunu stimüle etmektedir [59]. Hayvan modelinde 2 duvarlı defektte kemik grefti ve kemik greftine ek olarak FGF'nin karşılaştırıldığı bir çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular kemik greftiyle beraber uygulanan FGF'nin rejenerasyonun erken fazında periodontal rejenerasyonu geliştirdiğini göstermektedir [86].

**İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF):** Hem sistemik hem de lokal etki oluşturabilen aynı zamanda IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki farklı gen tarafından kodlanan bir büyüme hormonudur. Her ikisi de biyolojik etkilerini hücre zarı reseptörüne bağlanarak gösterirler. Osteoblastlar ve makrofajlar tarafından salgılanırlar ve karaciğerde üretilip kemikte depolanmaktadır [87]. Yapılan çalışmalar sonucunda IGF'nin, PDGF ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur [78]. Yapılan bir hayvan çalışmasında IGF'nin PDGF ile birlikte kullanıldığında periodontal rejenerasyonu geliştirdiği gösterilmiştir [88].

**Epidermal Büyüme Faktörü (EGF):** Hem sistemik hem de lokal etkilere sahip bir büyüme hormonu olan EGF, fibroblastlar üzerine mitojenik etki ederek yara iyileşmesi sırasında hücre çoğalması ve damarlanmanın hızlanmasını

sağlamaktadır [89, 90]. Fare kafatası defektlerinde EGF ile BMP-2 kombinasyonunun erken dönemde kemikleşmeyi hızlandırıcı etkisinin olduğu görülmüştür [91].

***Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP):*** Osteoblastlar, trombositler, osteoprogenitör hücreler ve kondrositler tarafından sentezlenip hücre çoğalması, farklılaşması ve kemotaksiste kritik rol oynamaktadırlar [92, 93]. BMP'nin esas etkisi heterotopik ve ortotopik kemik oluşumunu başlatmasıdır [94]. Yapılan bir çalışmada periodontal defektlerin tedavisinde rekombinant insan BMP'si kullanıldığında anlamlı bir kemik ve sement kazancı görülmüştür [95]. Yapılan bir hayvan çalışmasında BMP-2, VEGF ile birlikte kullanıldığında dental implantlar etrafındaki kemik defektlerinin tedavisinde olumlu etkisi olduğu ifade edilmiştir [96].

### **Kök Hücre Tedavisi**

Periodontal rejenerasyonda, rejeneratif işlemler arasında yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve kök yüzeyine mine matriks proteini uygulanması en başarılı yöntem olarak belirlenmiştir. Ancak mine-matriks proteinlerinin, periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını gerçek anlamda arttırıp arttırmadığı şüphelidir. Periodontal defektlere kemik grefti ve kemik benzeri materyallerin yerleştirilmesi gibi bir tedavinin, periodontal dokularda nasıl bir rejenerasyona yol açtığı açıklanamayan bir biyolojik konsepte dayanmaktadır. Rejenerasyon alanında bu gibi öngörülemez sonuçlar araştırmacıları, periodontal rejeneratif tedavi protokollerinde doku mühendisliğine ve hücre temelli tedavilere yöneltmiştir.

Mezenşimal kök hücreleri, keşfedildiğinden bu yana kök hücre biyolojisinde, rejeneratif tedavide ve doku mühendisliğinde çok önemli noktalara gelmiştir. Hücre kültür yöntemleri son derece önemlidir çünkü kök hücrenin içine konduğu ortam onun hangi hücreye dönüşebileceğine yani tedavi edici etkisine olanak tanımaktadır. Hücre temelli tedaviler; hücre indüksiyonu, hücre enjeksiyonu ve hücre ekilmiş doku iskelesinden meydana gelmektedir [97]. Bu şekilde elde edilmiş kök hücrelerinin transplantasyonu da diğer önemli konulardan biridir.

Erişkin hücre toplulukları mezenşimal kök hücre benzeri olup kendilerini yenileyebilme ve birçok hücre tipine farklılaşma potansiyellerine sahip olan hücrelerdir. Vücutta pek çok dokudan kök hücre elde edilebilmesine rağmen, izole edilmeleri kolay olduğundan oral dokular daha çok tercih edilmektedirler. Kök hücreler pulpa, periodontal ligament, dental follikül, diş germi, apikal papilla, oral mukoza, dişeti ve periost gibi oral dokulardan izole edilebilirler [98].

International Society for Cellular Therapy (Uluslararası Hücre Tedavi Birliği, ISCT), bir grup hücreye mezenşimal kök hücre denilebilmesi için, hücre kültürü koşullarında plastik yüzeylere yapışma, spesifik yüzey antijenlerini ekspres edebilme, farklı hücre tiplerine (en az 3) in vitro olarak farklılaşabilme (osteojenik, nörojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik) gibi bazı özellikler sergilemeleri gerektiğini açıklamışlardır [99]. Diş kaynaklı hücreler postnatal hücre popülasyonudur ve yukarıda bahsedilen kendi kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahiptirler [100-102].

Genellikle in vitro çalışmalar olmasına rağmen, diş kaynaklı kök hücreler, kolay elde edilebilirliği ve multipotansiyel kapasitelerinden dolayı, nörolojik ve karaciğer rahatsızlıkları, angiogenezis, diabetes mellitus, okuler rahatsızlıklar, kemik rekonstrüksiyonu gibi farklı disiplinleri de içeren doku onarımlarında gelecek vaat etmektedirler [103-105].

**Tablo 2.1.** Farklı kaynaklardan alınan mezenşimal kök hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşma potansiyelleri [106].

	<b>Proliferasyon Potansiyeli</b>	<b>Farklılaşma Potansiyeli</b>
Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri	++++	Dentinojenik Osteojenik Nörojenik Kondrojenik Adipojenik Miyojenik
Süt dişi mezenkimal kök hücreleri	+++++++	Dentinojenik Osteojenik Adipojenik Nörojenik Kondrojenik Miyojenik
Apikal papilla mezenkimal kök hücreleri	++++	Dentinojenik Nörojenik Adipojenik
Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreleri	?	Osteojenik Sementojenik Fibrojenik Adipojenik Kondrojenik
Dental folikül projenitör hücreleri	?	Osteojenik Sementojenik
Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri	+++++++	Osteojenik Kondrojenik Adipojenik Nörojenik Miyojenik
Embriyonik kök hücresi	+++	Her üç germ tabakasında yer alan hemen hemen tüm hücrelere farklılaşabilme kapasitesi

Son yıllarda kemik iliği, adipoz doku, PDL ve periost kaynaklı kök hücreler kullanılmış ve etkileri gösterilmiştir [107]. Periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerinin, STRO-1 ve MCAM gibi kök hücre belirteçlerini ekspres ettikleri, klonojenik oldukları, osteoblast, adiposit, kondrosit ve sementoblast gibi değişik hatlardaki hücrelere dönüşebildikleri in-vitro ve in-vivo olarak gösterilmiştir [108]. 2015 yılındaki Amerikan Periodontoloji Akademisi (American Academy of Periodontology) çalıştay raporu, yeni rejeneratif tedavi modellerinde periodonsiyumun fonksiyonel bir organ sistemi olarak ele alınması gerektiğini

bildirmiştir [109]. Çünkü kök hücre ile ilgili bilgiler, yöntemler ve transplantasyon konusundaki teknik gelişmeler sadece kaybedilen periodontal desteğin değil tüm diş organının eldesinin hücre bazlı tedavilerle gelecekte mümkün olabileceğini düşündürmekte ve umut vaat etmektedir.

### **Periodontal Rejenerasyonda Gen Tedavisi**

Doku rejenerasyonunun gerçekleşmesi için uygun sinyallerin, uygun hücrelerin, yeterli kan desteğinin ve uygun bir yapı iskelesinin defekt bölgesinde olması gerekmektedir. Bu 4 temel ihtiyaç periodontal rejenerasyon için de geçerlidir. Rejenerasyonu gerçekleştirecek materyallerin yara bölgesinde uzun süre etkinliklerini göstermeleri gerekir ancak ortamdaki proteazlar nedeniyle istenilen süre kalamadan yıkıma uğrayabilirler. İşte bu çizgide gen tedavisi gündeme gelmiştir. Gen tedavisi, hedef hücrelere genetik bilgiyi aktararak, tedavi edilmesi istenen doku ile ilgili proteinlerin sentezlenmesini ve böylece hücrelerin kaybedilen dokuyu yeniden inşa etme potansiyellerini uzun süre gerçekleştirmesini hedefler [110-114]. Gen tedavisinde tekli veya çoklu gen taşıyan iskelet sistemleri oluşturularak yara bölgesindeki hücrelerin o dokuya özgü hücre tipine farklılaşması sağlanır [115]. Gen tedavisinin önemli avantajlarından biri de biyolojik faktörlerin, zamanlama ve dağılımını kontrol etmek amacıyla doğal iyileşme sürecini taklit edecek şekilde aynı anda veya ardışık salımları gerçekleştirebilmesidir [116]. Gen transferinde viral ve nonviral olmak üzere iki vektör kullanılır [117-120]. Viral vektörlere retrovirüs, lentivirüs, adenovirüs ve adeno ile ilgili virüs sayılabilir. Viral olmayan vektörler plazmidler, DNA polimer kompleksleri, nano ve mikropartikülleri içerir [111]. Gen transfer edildikten sonra genetik olarak değişikliğe uğrayan konak hücresi bölündüğünde oluşan yeni nesil hücreler modifiye DNA'yı içerirler [121]. Periodontal rejenerasyonda da terapötik genin konakla tanışması bizzat konağın kendi dokusunda, kafes matriksle beraber veya bu matriks olmadan direkt hücre bazlı salınım metodu ile veya konak dışında indirekt metod kullanılarak gerçekleştirilir.



### 2.1.3. Trombositten Zengin Fibrin (Platelet-Rich Fibrin, PRF)

1990'lı yıllarda biyomimetik alanında yapılan çalışmalar ışığında vücudumuzda meydana gelen yaralanma sonucunda devreye giren tamir ve rejenerasyon mekanizmasında kanın önemli bir rol üstlendiği görülmüştür. Sert ve yumuşak doku iyileşmesinde kritik öneme sahip otojen bir kaynak olan kanın biyolojik bir materyal olarak kullanılabileceği fikri ilk kez Marx'ın [122] çalışmalarında ortaya çıkmıştır. Son yıllarda yaygınlaşan doku mühendisliği uygulamaları rejeneratif tedavilerde araştırmacıları otolog trombosit konsantrasyonlarına yönlendirmiştir. Buna bağlı olarak biyolojik ajanların diş hekimliği alanında sert ve yumuşak doku rejenerasyonunda kullanımının arttığını görmekteyiz. Rejenerasyon ve tamir amaçlı otolog kan konsantrasyonlarının kullanımı; fibrin doku yapıştırıcıları ile başlayıp günümüzde trombositten zengin plazma (PRP) ve en güncel olarak da trombositten zengin fibrin (PRF) olarak devam etmektedir.

Trombositler, polipeptit büyüme faktörleri içeren alfa ve delta granüllerine sahip olduklarından yara iyileşmesinde önemli rol oynamaktadırlar [122]. Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden farklılaşan küçük, çekirdeksiz, disk şeklindeki hücrelerdir. Kan dolaşımındaki ömürleri ortalama 7-10 gündür [123].

Trombositlerdeki alfa granülleri; IGF1, PDGF, TGF- $\beta$ , Trombosit Faktör-4, fibrinojen, trombospondin, fibronektin gibi protein içeriklerine sahiplerken delta granülleri (yoğun cisimcikler) ise adenin nükleotidleri, kalsiyum, serotonin, histamin ve epinefrin içermektedirler. Trombositlerin agregasyonu, aktive olması ve biraraya gelmesi için bir stimülasyona ihtiyaçları vardır. [124]. Bunun sonucunda trombositlerin kan damarlarına yapışmasıyla birlikte aktive olma süreçleri başlamış olup bu durum her iki granülde sekresyona yol açar. Yapılan çalışmalarda trombositlerin alfa granüllerinden çözünebilir protein salgılandığı görülmüştür [125]. Alfa granüllerinden salgılanan proteinlerin plazma proteinlerine benzerlik göstermesi plazma proteinlerinin yapı ve fonksiyon bakımından tamamlayıcısı olduğunu düşündürmektedir. Trombositler, pıhtı oluşum mekanizmasını gerçekleştirmesinin yanında alfa granüllerinden salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde yumuşak ve sert doku rejenerasyonunda rol oynamaktadırlar [126]. Kan

damarlarında bir hemoraji sonucu trombositler tarafından tromboplastin aktive edilmiş olur. Bunun sonucu olarak protrombini fibrinojenden fibrine dönüştürecek olan trombine çevirir. Böylelikle fibrin ağı meydana getirilir. Fibrin ağı dolaşımdan gelen kök hücreleri de bünyesine çekmektedir. Böylelikle yara bölgesindeki vaskülarizasyon süreci başlamış olur [127]. Trombositlerin degranülasyonu ile birlikte fibrin ağı içerisinde büyüme faktörleri ve sitokinler salınmaya başlar. Trombositlerin alfa granüllerindeki büyüme faktörleri ve sitokinler yara iyileşmesinde önemli rol oynamaktadırlar [126].

Trombositler; kalsiyum klorit ve trombinle aktive olup alfa granüllerinde bulunan büyüme hormonları ve sitokinleri ortama salmaktadırlar [128]. Kan pıhtısında normalde %5 oranında bulunan trombositler, otojen trombosit konsantreleri kullanıldığında %95 düzeylerine çıkmaktadır [129]. Yapılan bir dizi çalışmada, trombosit salımının yara iyileşmesini desteklediği, hücre migrasyonlarını ve proliferasyonunu arttırdığı ve bu sayede doku rejenerasyonunu uyardığı sonucuna varılmıştır [130-133]. Trombositlerin alfa granüllerinden salınan büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinin basamaklarında çeşitli görevleri vardır. PDGF; yara bölgesine ilk ulaşan büyüme faktörü olup trombositler, makrofajlar, fibroblastlar ve kemik matriksinden köken alır, yara iyileşmesi ve rejenerasyonda önemli rol oynar [126]. TGF'nin  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki alt tipi vardır. TGF- $\beta$ , trombosit ve kemikten kaynağını alır ve öncü hücreler üzerinde kemotaktik ve mitojenik özelliğe sahiptir. TGF- $\beta$ 'nın kemik oluşumunu arttırarak rejenerasyonu gerçekleştirdiği bildirilmiştir [134, 135]. VEGF, kemik sentezi için gerekli damarların olgunlaşması ve büyümesinde rol almaktadır ve böylelikle anjiyogenezi uyardığı görülmüştür [136]. IGF, kollajen sentezini arttırarak öncül osteoblastların çoğalmasını ve osteoblastlara dönüşmelerini uyarır. Diğer yandan periodontal ligament hücreleri için kemotaktiktir [137]. Trombositlerden yara bölgesine salınan büyüme faktörleri direkt etkisini beşinci güne kadar göstermektedir. Yumuşak ve sert doku rejenerasyonu, trombositlerden PDGF ve TGF- $\beta$  salgılanmasıyla başlayıp üçüncü günden itibaren kapiller damarların oluşumuyla devam etmektedir. Üçüncü günden sonra trombositlerin yerine makrofajlar gelir ve büyüme faktörlerinin birincil kaynağı olurlar. Dördüncü hafta sonunda makrofajların aktivitesi sona erer ve artık

olgunlaşmamış kemik dokusu oluşmuştur [122] Otojen trombosit konsantrasyonlarının içeriğinde büyüme faktörleri ve sitokinler dışında fibrin, fibronektin ve vitronektin de bulunmaktadır [138, 139]. Yukarıda bahsettiğimiz polipeptit büyüme faktörleri rekombinant DNA teknolojisiyle de elde edilebilmektedir. Ancak bu işlemin maliyetli ve zahmetli oluşu araştırmacıları büyüme faktörlerinin eldesinde ucuz ve kolay olduğu için PRP ve PRF'ye yöneltmiştir.

Son yıllarda trombositlerin yara iyileşmesindeki rolleri anlaşılacak bazı trombosit ürünleri geliştirilmiştir. Koagülasyon zincirinin son ürünü çözünebilir bir protein olan fibrinojen, trombinin etkisiyle çözünemeyen bir form olan fibrin yapısına dönüşür. Fibrin de yara bölgesinin ilk sikatrisyel matrisini oluşturur. Biyolojik bir yapıştırıcı görevi olan bu yapı trombosit kümelerinin etrafında koruyucu bir yapı oluşturur. Fibrinin sağladığı bu özelliklerden dolayı, cerrahide mekanik destek olarak kullanımı düşünülmüştür [16, 140].

PRP, trombosit, büyüme faktörleri ve pıhtılaşma faktörleri içeren birinci jenerasyon otojen kan plazmasıdır [141]. PRP ve PRF, kanın belirli bir protokolde santrifüj edilip hücre ayırma işlemiyle elde edilmektedir. Bu işlem sonucunda plazma hacmindeki konsantrasyon normal konsantrasyonun %300-500 oranına getirilmektedir. Bu yöntemde, laboratuvar santrifüjü veya ticari sistemlerin ürettiği spesifik protokollere göre hazırlanan santrifüj cihazları kullanılmaktadır. Birinci jenerasyon olarak isimlendirilen otojen PRP elde edilmesinde, PRP içeriğindeki polipeptit büyüme faktörlerinin aktivasyonu için otojen olmayan sığır trombinini, kalsiyum klorit ve yapay yapıştırıcılar kullanılmaktadır.

PRP elde edilmesinde alınan kan 2 defa farklı devir ve dakikada santrifüj edilmektedir. Yavaş santrifüj olarak adlandırılan birinci santrifüjde, kan tüpünün içerisinde bulunan sitrik asit veya EDTA pıhtılaşmayı engellemektedir. Birinci santrifüjün amacı eritositlerin çökmesini sağlamaktır. İkinci santrifüjde pıhtılaşma oluşturmak amacıyla plazmanın içerisine sığır trombinini, kalsiyum klorit veya yapay yapıştırıcı ilave edilmektedir [142]. Uygulanan yöntemin dezavantajlarından biri meydana gelen ürünün tamamen otojen olmamasıdır. Yara iyileşmesinin erken döneminde yabancı cisim reaksiyonu nedeniyle doğal enflamasyonu engelleyebilir

[143]. PRF’te gördüğümüz doğal pıhtılaşma ile oluşan fibrin matriks yavaş yavaş, kontrollü bir şekilde salınmaktayken PRP’deki gibi yapay pıhtılaşma ile oluşan fibrin matriksteki büyüme faktörleri ortama kısa süreli ve kontrolsüz salınmaktadır [16].

PRP’den elde edilen ürünlerin bu dezavantajları tamamen otojen olan ikinci jenerasyon trombosit konsantrasyonlarının geliştirilmesine önayak olmuştur. PRF, trombosit ve lökositten zengin yoğun bir fibrin yapısındadır. PRF matriksindeki fibriller eşkenar üçgen şeklinde izlenip bu yapı sitokin ve büyüme faktörlerinin fibrin matriks içerisine hapsolmasını sağlamaktadır [15]. Yara iyileşmesinin hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodeling aşamaları mevcuttur. Hemostaz safhasında oluşan fibrin pıhtı içinde yer alan ve trombositlerden salınan büyüme faktörleri, inflamasyonun ilk safhalarında görev alan nötrofilleri damar dışına çıkararak yara bölgesine gelme konusunda aktive eder. Orada proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasıyla monositler uyarılır ve damar dışına çıkıp makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar yara bölgesine ulaşarak fagositik etkilerini büyüme faktörleri ve matriks metalloproteinazlarla gerçekleştirip yara bölgesini temizler ve doku oluşumuna yardımcı olurlar. Proliferasyon safhasında fibroblast ve endotel hücreleri çoğalıp granülasyon dokusunu oluştururlar. Remodeling aşamasında granülasyon dokusunu oluşturan bağ dokusu fibrilleri ve yeni oluşan damarlar organize olarak olgun bağ dokusunu oluştururlar [144]. Periodontal işlem sonrası yara iyileşmesinde birçok hücre, sinyal proteinleri ve hücrel aktivite ürünleri ekstraselüler matrikse salınmaktadır [145]. Buradan yola çıkarak PRF’nin içeriğindeki büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimlerin doku rejenerasyonuna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [16, 146].

PRF’nin hazırlanmasında herhangi bir antikoagülan madde veya trombin kullanılmamaktadır. Hazırlanma işlemi oldukça kolay, kısa süreli ve ekonomiktir. Büyüme faktörleri sayesinde vaskülarizasyonun hızlandırılması, hastanın kendisinden alındığı için alerjik reaksiyonlara sebep olmaması, hastalık transfer riskinin olmaması, içindeki lökosit ve lökositler tarafından salgılanan sitokinler sayesinde enflamasyonun kontrol edilmesi ve enfeksiyonu baskılaması gibi birçok avantajı vardır [147, 148]. Cam kaplı tüp ya da tamamen cam olan tüp içindeki silika ile temas eden ve aktive olan trombositler sayesinde pıhtılaşma başlamaktadır.

Herhangi bir antikoagülan içermeyen 10 ml'lik boş tüplere venöz kan alınarak hızlıca teknik için özel olarak geliştirilmiş santrifüj cihazında (Process, Nice, Fransa) 2700 devirde 12 dakika veya 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmektedir. 2001 yılında Choukroun tarafından tanımlanan PRF, daha sonraki araştırmalarda lökosit içeriğinden dolayı L-PRF adını almıştır [147, 149]. Santrifüj sonrası tüpte 3 tabaka oluşmaktadır; kalın, olgunlaşmış fibrin lifleri ve arasında eritrositlerin bulunduğu kısım tüpün en alt kısmında; hücre içermeyen, trombosit ve fibrinlerin yoğun olduğu trombositten fakir plazma en üstte ve bunların orta kısmında da trombosit ve lökositlerin yoğun olduğu trombositten zengin fibrin pıhtı (buffy coat) gözlenmektedir. Elde edilen aktive edilmiş PRF sıkı yapıdadır ve enjekte edilemez. İki gaz tampon arasında sıkıştırılarak veya teknik için özel olarak geliştirilmiş kit ile (PRF box, Process, Nice, Fransa) PRF membranları elde edilmektedir. PRF membranları büyüme faktörlerini içeren trombositlerin büyük çoğunluğunu ve lökositlerin %50'den fazlasını içermektedir [150]. Pıhtılaşma, tüpün içindeki silika taneciklerine ortalama 400 g merkezkaç kuvvetle çarpan trombositler aktive olmaya başlamaktadır. Cam tüpe alınan kanın santrifüje geç konulması halinde; trombositten fakir plazma, trombositten zengin fibrin ve eritrosit kısımları birbirlerinden ayrılmadan oluşacağından istenilen sonuç alınamayabilir.

Araştırmacılar PRF uygulamalarında cam veya cam kaplı tüp içerisindeki silikanın fibrin yapısını olumsuz etkisini incelediklerinde silikanın trombositleri aktive etmesi ve trombosit birikmesinde gerekli olan bir madde olacağı sonucuna varıp klinik açıdan herhangi bir dezavantajının bulunmadığı konusunda görüş birliğine varmışlardır [151]. Bu tartışmaların yarattığı soru işaretlerini ortadan kaldırmak amacıyla PRF yönteminde tüplerin yapısını değiştirerek titanyum kaplı tüplerin kullanımı gündeme gelmiştir. Trombosit aktivasyonunda silika yerine titanyumun kullanımıyla daha sıkı ve geç çözünen bir fibrin yapısı elde edilmiştir [151]. Titanyum korozyona dirençli, kuvvetlere dayanıklı biyouyumlu bir materyaldir. Titanyum PRF'nin, doku içinde 30 güne kadar rezorbe olmadan kalabildiği görülmüştür.

Buradan yola çıkılarak rezorpsiyon süresinin uzun olması ve doğal matriks yapısından dolayı vücut içindeki kemik iyileşme mekanizmalarını da harekete geçirdiği gösterilmiştir [152]. Fibrin fizyolojik bir yapıştırıcı olduğundan, fibrin pıhtının membran

içine sıkıştırılması sıkı bir matris sağlamaktadır. Trombosit ve lökositlerin PRF içindeki dağılımları homojen değildir. Trombosit ve lökositlerin yüksek konsantrasyonda olduğu kısım, eritrositler ve fibrin pıhtı arasındaki makroskobik olarak buffy coat diye adlandırılan geçiş bölgesidir [150]. PRF'nin fibrin yapısı büyütme altında incelendiğinde kan pıhtısına ya da PRP'ye göre çok daha kalın ve yoğun görünümde birbirine paralel lifler halinde olduğu görülmektedir. Bu özellik onun rezorpsiyon süresi ve iyileşme özelliklerini geliştirmesini sağlamaktadır [16]. PRP ve PRF ile yapılan çalışmaların çoğunda trombositler, büyüme faktörleri ve lökositler değerlendirilmiştir. Ancak fibrinin morfolojik yapısının da bu süreçte önemli bir katkısı bulunmaktadır. Fibrin matriksin karmaşık yapısı ve yoğunluğu otolog trombosit konsantrasyonlarında en önemli unsurdur. Fibrin yapının yoğunluk oranı ile büyüme faktörlerinin salınımı ve hücre migrasyonuna etkisi korelasyon gösterdiği için güçlü ve sıkı bir fibrin matriks güçlü biyolojik iyileştirme matriksi anlamına da gelebilir [150, 153].

Trombositler, pıhtı oluşumu için gerekli olup yara iyileşmesini başlatmak ve desteklemek için büyüme faktörlerinin salınmasından sorumludur. Cerrahi işlemlerden sonra, trombositler bölgede kalıcı bir kan pıhtısı oluştururlar. İyileşmenin desteklenmesi, artırılması ve doku oluşumu için büyüme faktörlerinin salınımı başlar. Vücudun diğer kemiklerinde olduğu gibi maksillofasiyal bölgenin gelişmesinde hormonların ve büyüme faktörlerinin önemli etkisi vardır. Kemik ve yumuşak doku metabolizması üzerinde sistemik hormonların ve büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Trombositlerdeki büyüme faktörleri etkilerini spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak göstermektedir [154]. PRF membranının içeriğinde trombositlerden salınan sitokinlerin yanısıra lökositler tarafından salgılanıp inflamasyon kontrolünde görev alan antiinflamatuvar sitokinler de saptanmıştır. Antiinflamatuvar sitokinler sayesinde polimorfonükleer lökosit, makrofaj gibi hücreler aktive edilip PRF bölgesinde daha hızlı hücresel aktivitelere sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda membran içindeki sitokinlerin yeniden yapılanma aşamasında yavaş salınım yaparak uzun dönemde etkili oldukları gösterilmiştir [15]. İyileşme sürecinde PRF'nin sağladığı avantajlar içinde barındırdığı trombositler ve lökosit, sitokinlerden ve fibrin matriksten kaynaklanmaktadır. PRF'nin; epitelizasyonu hızlandırma, bağışıklık sisteminin kontrol etme, dolaşımdaki kök hücrelerini bünyesinde bulundurma ve anjiyogeneziste rol alma

gibi birtakım biyolojik etkileri bulunmaktadır. Fibrin, anjiyogenez için doğal bir matrikstir. Fibrin matriksin direkt olarak anjiyogenezi yönlendirdiği gösterilmiştir [155].

Fibrin matriksin bu özelliği fibrin jelin üç boyutlu yapısı ve matriks içinde hapsolan sitokinlerin aktiviteleri ile açıklanabilir. Bağışıklık sisteminin kontrolü PRF matriksinin içerisindeki lökositler, monositler ve lenfositler tarafından gerçekleştirilir. Kemik iliğinden köken alan mezenşimal hücreler olan dolaşımdaki kök hücreler (farklılaşmamış hücreler), yaralanma durumunda ilgili bölgede toplanarak farklı hücre tiplerine dönüşebilir [156]. Epitelizasyon oluşumunda, fibrin matriks epitel hücrelerini ve fibroblastları uyararak yara bölgesini kaplamalarına yardımcı olur. Yara kenarlarında epitel hücreleri bazal ve apikal yönde genişleyerek yara bölgesini kaplar [157]. PRF'nin avantajları arasında;

1. Alıcı ve verici sahada operasyon sırasında ve sonrasında kanama kontrolü sağlanması
2. Yumuşak doku iyileşmesinin hızlanmasına katkıda bulunması
3. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda membran olarak kullanımında yapıştırıcı etkisi sayesinde alıcı sahadaki greft materyalinin stabilitesini artırması
4. İyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunu büyüme faktörleri sayesinde hızlandırması
5. Toksik olmaması
6. Kemik materyalleri ile kombine kullanımında rejenerasyonu artırması
7. İmmün ve alerjik reaksiyonlara sebep olmaması
8. Kısa sürede hazırlanması
9. Dokulara uyumlu olması
10. Enfeksiyöz hastalıkların transfer riskinin olmaması, içindeki lökosit ve onlardan salgılanan sitokinler sayesinde inflamasyon kontrolü sağlanması

11. Enfeksiyonu baskılaması
12. Ekonomik olması sayılabilir [15, 16].

İlk geliştirilen PRF tekniğinde membranların lökosit içeriğinin görülmesi üzerine Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-PRF) olarak sınıflandırılmıştır. L-PRF ile ilgili çalışmalar geliştirilerek İleri Trombositten Zengin Fibrin (Advanced Platelet-Rich fibrin, A-PRF) isimli bir protokol oluşturulmuştur. A-PRF tekniğinde L-PRF tekniğine kıyasla daha düşük hızda 1500 rpm'de 14 dakika süresince santrifüj yapılarak trombosit salınımının artması amaçlanmıştır. L-PRF ve A-PRF kıyaslaması yapılan bir çalışmada büyüme faktörlerinin salınımı ELİSA yöntemi ile karşılaştırılmıştır. A-PRF'nin L-PRF'ye göre daha fazla büyüme faktörü salınımı yaptığı görülmüştür [158]. A-PRF'lerle ilgili yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre A-PRF'de buffy coat'dan uzak distal kısımda daha çok trombosit bulunduğu görülmüştür. A-PRF'de santrifüj zamanı uzatılırken rpm değerinin düşürülmesi plıhtının distal kısmında bulunan nötrofilik granülositlerin de sayısını artırmıştır. Standart PRF'de nötrofiller daha çok buffy coat arayüzünde bulunmaktadır. Nötrofilik granülositler monositlerin makrofajlara farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır. A-PRF'de monosit, makrofaj ve onların büyüme faktörleri sayesinde yumuşak ve sert doku rejenerasyonuna katkı sağlanmaktadır [1]. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin de (Injectable Platelet-Rich Fibrin, I-PRF) Joseph Choukroun'un geliştirdiği trombosit zengin bir fibrin ürünüdür. Partiküler kemik greftleri birleştirilerek (jelöz kemik grefti, sticky bone) veya dişeti ve deri gibi dokuların içerisine enjekte edilerek kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda PRF, L-PRF, T-PRF, A-PRF ve I-PRF elde edebilmek için kullanılacak olan cihazların birtakım özelliklere sahip olması gerekmektedir. İlk olarak yarıçapı daha küçük olan cihazlar daha az g kuvveti oluşturarak santrifüj işlemi sırasında trombositlerin parçalanmasını önler. İşlem sırasında santrifüj cihazının ısınması ve 40°C'nin üzerindeki cihaz içi sıcaklığı fibrinler için zararlı olduğu gibi soğutuculu santrifüjlerin de düşük sıcaklıklarda trombositleri olumsuz etkilediği görülmüştür. Homojen bir fibrin matris elde edilmesi açısından santrifüj cihazının vibrasyon göstermemesi gerekmektedir. Bazı santrifüj cihazlarının



gösterilen rpm ve gerçek rpm değerlerinin farklı olması protokollerin uygulanmasını zorlaştırabilmektedir [159].

#### 2.1.4. PRF ile İlgili Yapılan Klinik Araştırmalar

Elde edilmesi teknik olarak PRP'ye göre daha kolay, ekonomik ve daha yoğun fibrin yapısıyla öne çıkan PRF ilk olarak kemik greftleriyle birlikte sinüs augmentasyonlarında kullanılmıştır [160]. PRF'nin etkinliğinin sinüs augmentasyonunda değerlendirildiği bir histolojik çalışmada bir gruba allogreft diğer gruba PRF ile birlikte allogreft uygulanmıştır. Histomorfometrik incelemeye göre PRF'nin allogreft ile kombine kullanıldığı grubun kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı ve implant üstü protez yüklemesinin süresini azalttığı gösterilmiştir [161]. Osteotom tekniğinde kemik grefti eklenerek sinüs kaldırma işleminin sadece PRF kullanılarak uygulandığı, birinci yıl sonunda radyografi sonuçlarının değerlendirildiği bir çalışmada PRF kullanımının sinüs duvarı altında kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [162]. Osteotom tekniğiyle sinüs augmentasyonunda tek başına PRF kullanımının oluşabilecek membran perforasyonunu tamir edebileceği ve sinüs membranını koruyabileceği rapor edilmiştir. [163]. Lateral yaklaşımla gerçekleştirilen sinüs augmentasyonunda PRF ile birlikte yerleştirilen implantların 6 ay sonunda radyografik incelemesinde implant çevresinde kemik dolumu olduğu ve bölgeden alınan biyopsi sonucunda iyi organize olmuş vital kemik teşekkülü görülmüştür [164]. Sinüs yükseltme operasyonunda PRF etkinliğinin kıyaslandığı bir hayvan çalışmasında histolojik incelemede PRF ve trikalsiyum fosfat grubunun, sadece trikalsiyum fosfat ve trikalsiyum fosfat ile rhBMP-2'nin kullanıldığı gruplara göre daha hızlı kemik iyileşmesi; histomorfometrik incelemedeyse yine bu grupta daha geniş kemik yapım alanları olduğu sonucuna varılmıştır [165].

Çekim soketlerinin PRF ile doldurulduğu bir çalışmada PRF'nin soket iyileşmesini hızlandırmasının yanısıra alveolit ve ağrı gibi enfeksiyon durumlarının yaşanmadığı da gösterilmiştir [161]. Çekim soketinin PRF ile doldurulduğu ve 6 hafta sonra implant uygulandığı başka bir çalışmada kret morfolojisinin korunduğu ve rezorpsiyonun olmadığı gözlenmiştir [166]. Gömülü 20 yaş operasyonunda bir

çekim socketinin boş bırakıldığı diğer socketin ise PRF ile doldurulduğu bir çalışmada PRF uygulanan bölgede kemik dolununun daha fazla olduğu bildirilmiştir [167].

PRF, PRP ve MMP'den daha yoğun bir fibrin yapısında olmasına rağmen osteokondüktif etkisi sınırlı kalmıştır. Bu yüzden geniş ve az duvarlı kemik defektlerinin tedavisinde PRF'nin kemik greftleriyle beraber kullanımı önerilmiştir [13]. PRF'nin allogreft ve ksenogreftlerle beraber kullanıldığı iki ayrı çalışmada sondalama derinliğinde azalma ve ataçman kazancı sağladığı görülmüştür [168, 169]. Klasik flep operasyonu ve PRF'nin etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada PRF kullanımının ataçman kazancı ve kemik içi defekt derinliğinin azalmasını sağladığı görülmüştür [168]. PRF ve PRP'nin kemik içi periodontal defektlerin tedavisindeki etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada sondalamada kanama, ataçman kazancı ve defekt derinliği azalması yönünden iki materyal arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır [170]. Kemik içi periodontal defektlerin tedavisinde bir defekte PRF, diğer defekte kemik grefti ile beraber PRF uygulanan çalışmada sadece PRF uygulanan bölgede daha fazla ataçman kazancı elde edilmiştir [13]. Randomize kontrollü bir çalışmada kemik içi defektlerin tedavisinde, flep operasyonu, PRF+flep operasyonu, PRF + %1,2 Rosuvastatin jel + flep operasyonu grupları karşılaştırılmıştır. PRF + %1,2 Rosuvastatin + flep operasyonu uygulanan grupta periodontal parametrelerde daha iyi sonuçlar görülmüştür [171]. Bariyer membran ve bariyer membranla birlikte PRF'nin karşılaştırıldığı randomize kontrollü bir çalışmada bariyer membranla kombine edilen PRF'nin klinik ataçman kazancı, sondalama derinliğinde azalma ve radyografik defekt derinliği dolumu açısından daha başarılı olduğu bildirilmiştir [172]. Kronik periodontitisli hastaların kemik içi defekt tedavisinde bir defekte MMP diğer defekte PRF ile MMP'nin birlikte kullanıldığı çalışmada klinik ve radyografik bulgulara bakıldığında PRF'nin ek bir faydasının olmadığı sonucuna varılmıştır [173]. Yine kemik içi defektlerde bir tarafa otojen kemik grefti diğer tarafa PRF uygulandığında 9 ay sonunda klinik ve radyografik değerlendirmede otojen kemik greftinin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür [174].

Sınıf 2 furkasyon defektlerinin tedavisinde kontrol grubunda sadece flep operasyonu, test grubunda flep operasyonu ile beraber PRF uygulanmıştır. Dokuz

aylık klinik ve radyografik parametrelerde test grubunda istatistiksel olarak anlamlı kazanç elde edilmiştir [175]. Sınıf 2 furkasyon defektlerinde PRF etkinliğini değerlendiren başka bir çalışmada flep operasyonu, PRF, PRF + %1 Alendronat jel uygulanan gruplar oluşturulmuştur. Dokuz ay sonundaki değerlendirmede PRF + %1 Alendronat jel uygulanan grupta anlamlı derecede daha fazla periodontal parametrelerde artış gözlenmiştir [176].

Yapılan bir in-vitro çalışmada PRF'nin kök hücre çoğalması ve farklılaşmasını doza bağlı olarak arttırdığı gösterilmiştir [177, 178]. Başka bir in vitro çalışmada PRF'nin osteoblast, fibroblast ve periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını arttırırken dişeti epitel hücrelerinin çoğalmasını geçici olarak baskıladığı görülmüştür [179]. PRF'nin büyüme faktörü salımı ve süpernatant serumun klinik kullanımını değerlendiren bir çalışmada PRF membranların kompresi sonrası kalan sıvının büyüme faktörü içerdiği gösterilmiş ve bu sıvının greft materyali ve PRF parçacıkları ile karıştırılarak kullanılabilmesi önerilmiştir [180].

PRF ve ipek fibroinin implant etrafı defektlerin tedavisinde kullanıldığı bir çalışmanın sonucunda PRF ve ipek fibroin kombinasyonunun greft materyali olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir [181]. Köpeklerde yapılan split-mouth bir çalışmada benzer iki defekt bölgesinin bir tarafına PRF diğer bölgeye ise otojen kemik konularak augmented edilmesi amaçlanmıştır. PRF alanında daha iyi bir iyileşme gözlenirken otojen kemik bölgesinde kemikte rezorpsiyon ve fibröz iyileşme gözlenmiştir [182]. Tavşan kafatasında yapılan bir çalışmada bir gruba PRF, diğer gruplara sırasıyla kan pıhtısı, sentetik kemik grefti, ksenogreft konularak augmented edilmesi amaçlanmıştır. PRF'nin diğer gruplara göre daha fazla yeni kemik oluşumu sağladığı görülmüştür [183]. Tavşan tibiasında yapılan başka bir çalışmada implant yapılacak soketlerin yarısına PRF ve implant, diğer yarısına sadece implant uygulanmıştır. Histomorfometrik incelemede PRF uygulanan grupta daha hızlı osseointegrasyon ve daha fazla kemik oluşumu görülmüştür [184]. Tavşan kalvaryasında yapılan bir çalışmada PRF, hidroksiapatit ve hidroksiapatit + PRF grupları oluşturulmuş ve yapılan histolojik ve histomorfometrik incelemelerde PRF'nin YDR'ye bir katkısı olmadığı gösterilmiştir [185]. Yine tavşan kalvaryasında yapılan bir çalışmada PRF, sentetik greft, ksenogreft ve kontrol grubu oluşturulmuş,

histomorfometrik incelemede PRF'nin kemik greftlerine göre yeni kemik oluşumuna bir katkı sağlamadığı bulunmuştur [186].

Periodontal plastik cerrahide PRF kullanımı pek çok araştırmaya konu olmuştur. Yapılan bir çalışmada PRF'nin laterale kaydırılan flep ile beraber kullanımında kök yüzeyi kapanmasına ilave katkısı olduğunu ancak koronale kaydırılan flep ile birlikte kullanımında kök yüzeyi kapanmasına ek bir fayda sağlamadığı ancak doku kalınlığını arttırdığı görülmüştür [187, 188]. Lokalize, Miller sınıf 1 ve sınıf 2 çift taraflı dişeti çekilmesi olan hastalara yapılan koronale pozisyone flep (KPF) ile birlikte MMP ve PRF uygulamasının karşılaştırıldığı bir çalışmada 12. ay sonuçları değerlendirildiğinde kök yüzeyi örtülme oranları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır [189]. KPF ve PRF ile KPF ve bağ dokusu grefti (BDG)'nin kombine uygulandığı karşılaştırmalı çalışmanın 6. aydaki sonuçlarında kök yüzeyi örtülme oranları açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır [9]. KPF ve KPF ile PRF'nin kombine kullanımının karşılaştırıldığı bir çalışmada PRF'nin dahil edildiği grubun rakamsal olarak daha iyi fakat aralarında istatistiksel fark olmadığını bildirmişlerdir [190]. Çoklu dişeti çekilmelerinde PRF ve BDG karşılaştırılmış, BDG uygulanan grupta istatistiksel olarak daha başarılı sonuçlar alınsa da PRF'nin de kullanılabileceği ifade edilmiştir [191]. Bir diğer çalışmada ise çift taraflı, çoklu ve 3 mm'yi geçen dişeti çekilmelerinde PRF ve BDG uygulamalarının kök yüzeyi örtme açısından birbirlerine kıyasla anlamlı bir fark yaratmadıkları gösterilmiştir [192]. PRF'nin MMP ile karşılaştırıldığı 12 aylık takibi olan bir çalışmada keratinize dişeti genişliği açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır [189]. BDG ve PRF'nin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada da 6. ay sonuçlarına göre her iki grupta da keratinize doku artışında anlamlı derecede artış olmuş fakat bu artışın BDG'de daha fazla olduğu görülmüştür [193]. Bilateral Miller sınıf 1 ve sınıf 2 lokalize dişeti çekilmesi olan hastalarda PRF ve BDG uygulamasının karşılaştırıldığı çalışmanın sonucunda her iki grupta da keratinize dişeti genişliğinde artış görülmüşken gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır [9]. Çoklu dişeti çekilmelerinde BDG ile PRF'nin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada 12 aylık takip sonuçlarına göre her iki grupta keratinize dişeti genişliğinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür [194]. BDG'nin tek başına ve PRF ile

beraber kullanıldığı çalışmada her iki grubun da keratinize dişeti genişliğini arttırdığı ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. [195]. Dişeti çekilmelerinde PRF'nin kullanıldığı çalışmalar özetle PRF'nin dişeti kalınlığına olumlu etkisi olduğu gösterilmiş ve bu etkinin PRF'deki fibrin matriksin boşluk sağlayıcı özelliği ve PRF içeriğindeki büyüme faktörlerinin fibroblastlara olumlu etkisi sayesinde olabileceği yorumu yapılmıştır. Ancak PRF kök kapanma sonuçlarına ilave katkı sağlamamıştır [187]. Dişeti kalınlığına etki açısından PRF ve BDG birbiri ile kıyaslandığında her ikisinin de ortalama 1.5 mm kalınlığı arttırdığı gösterilmiştir [196].

### **2.1.5. PRF'nin Elde Edilme Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar**

İnsanlarda tedavi amacıyla kullanılan biyomateryallerde olması gereken bazı özellikler vardır. Bunlardan en önemlisi biyoyumluluğudur. Diğer ise her uygulama esnasında aynı etkinliği aynı düzeyde gösterebilmesidir. Diğer bir deyişle standardizasyonudur. Standardizasyon da biyomateryalin yapısı, içeriği ve elde edilme yöntemleriyle yakından ilişkilidir.

İlk kez Choukroun [149] tarafından ikinci jenerasyon platelet konsantrasyonu olarak tanımlanan PRF, antikoagülan eklenmeden elde edilmektedir. Yapılan bir çalışmada iki farklı protokol kullanmıştır. L-PRF için 2700 rpm, 12 dakika; A-PRF için ise 1500 rpm, 14 dakikalık santrifüj protokolü uygulanmış ve spesifik hücre dağılımları histomorfometrik olarak incelenmiştir. Böylece hız ve zamanın hücre dağılımına olan etkileri açıklanmaya çalışılmıştır. Santrifüj süresi artıp merkezkaç kuvvet azaldıkça elde edilen A-PRF'in distal kısmında nötrofilik granülositlerin daha yoğun olarak bulunduğu görülmüştür. Buna karşılık L-PRF'te hücrelerin eritrositlerin olduğu kısma daha yakın olduğu görülmüştür. Bu bulgulara dayanarak A-PRF'in kemik ve yumuşak doku rejenerasyonunda etkili olabileceği ifade edilmiştir. Ancak bu konuda daha fazla in-vivo çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da belirtilmiştir [1].

L-PRF protokolünü, santrifüj cihazından bağımsız olarak PRF'in biyolojik yapısında ne gibi değişiklikler yaptığını tespit edebilmek için çalışmalar yapılmıştır.

Dohan ve arkadaşları önerilen santrifüj cihazını kullanarak L-PRF için 2700 rpm, 12 dakika, A-PRF için 1500 rpm, 14 dakikalık protokolü uygulamışlar ve TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB, VEGF, BMP-2 düzeyleri üzerinden karşılaştırmışlardır. Sonuçta orijinal L-PRF protokolüyle hem daha fazla miktarda pıhtı ve membran elde edilmiş hem de büyüme faktörleri düzeylerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [197].

Eren ve arkadaşları aynı g kuvvetini kullanarak (400 g, 2660 rpm) 10 dakika ve 12 dakikalık süreleri karşılaştırmışlardır. On iki dakikalık santrifüj süresi sonunda elde edilen PRF'in daha yüksek düzeyde VEGF salgıladığını bulmuşlardır. Diğer büyüme faktörleri (TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB), enzimler (MMP-1 ve MMP-8) ve hücre sayısı açısından santrifüj sürelerinin bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak 12 dakikalık santrifüj süresinin 10 dakikaya göre VEGF salınımı açısından daha faydalı olduğunu belirtmişlerdir [198].

Santrifüj esnasında yüksek santrifüj kuvvetlerinin, hücre popülasyonlarını kan tüpünün dibine çökelttiği gözlenmiştir. Santrifüj hızının azaltılması fibrin matris içerisindeki lökositlerin artmasını sağlamaktadır. Choukroun'un modifiye ettiği düşük santrifüj hızında PRF matris içerisinde daha fazla sayıda lökosit gözlenmiştir [1]. Kobayashi ve arkadaşları standart L-PRF protokolü ile (2700 rpm, 12 dakika) 1300 rpm, 14 dakika (A-PRF) ve 1300 rpm, 8 dakika (A-PRF+) protokollerini hücre aktivitesi ve biyouyumluluğu açısından karşılaştırmışlardır. PDGF, TGF $\beta$ -1, EGF, IGF değerlerinin A-PRF ve A-PRF+ protokollerinde daha yüksek olduğu, A-PRF+'nın ise 3 grup içinde en yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca A-PRF+ grubunda PDGF ve TGF $\beta$ -1'e yönelik mRNA değerlerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak santrifüj hız ve zamanında yapılacak değişikliklerin PRF'den salınan büyüme faktörlerinin salınım düzeylerini etkileyebileceğini belirtmişlerdir [199].

PRF protokolünde cam ya da içi cam kaplı plastik tüpler kullanılmaktadır. Cam tüp içerisindeki silikanın fibrin yapısına etkileri incelendiğinde, trombositleri aktive etmesi ve trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonunda herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı görüşü var ise de Tunalı ve arkadaşları PRF eldesinde titanyum kaplı tüplerin kullanımını gündeme getirmişlerdir. Trombosit aktivasyonunda silika yerine

titanyumun kullanımıyla daha sıkı ve geç çözünen bir fibrin yapısı elde etmişlerdir [151]. PRF eldesinde kullanılan tüplerin materyalin standardizasyonuna etkilerine dair kısıtlı çalışmalar mevcuttur.

PRF eldesini etkileyen olası faktörler içerisinde santrifüj cihazlarının etkilerinin olup olmadığını araştırmak için de çalışmalar yapılmıştır ancak bu çalışmalar çok sınırlı kalmıştır. Dohan ve arkadaşları [197] bu amaçla yaptıkları çalışmada önce santrifüj özelliklerinin L-PRF pıhtı ve membranın fibrin yapısına, büyüme faktörlerine ve hücrelere etkisini araştırmışlardır. Burada test edilen cihazların, radyal ve vertikal mekanik vibrasyonlarıdır. İkinci olarak sadece protokolün tek başına L-PRF membranın biyolojik yapısına etkilerini incelemiştirler. Çalışmanın bu kısmında büyüme faktörlerinin düzeyleri üzerinden orijinal L-PRF membran ile A-PRF membranın protokolleri karşılaştırılmıştır. Birinci kısımda orijinal L-PRF protokolü (400 g, 12 dakika) kullanılmıştır. Orijinal L-PRF santrifüjü ile 3 laboratuvar santrifüjü karşılaştırılmıştır. Her bir santrifüjün içerisine 2 tane akselerometre yerleştirilerek vibrasyonun etkileri incelenmiştir. Sonuçta orijinal L-PRF santrifüj cihazının diğer 3 santrifüj cihazına göre istenmeyen vibrasyon seviyesinin 4.5-6 kere daha düşük olduğu görülmüştür. İkinci aşamasında orijinal L-PRF santrifüjü kullanılarak 2700 rpm, 12 dakika (400 g), A-PRF için de 1500 rpm, 14 dakikalık protokoller uygulanmıştır. Büyüme faktörlerinin salınımı açısından L-PRF ve A-PRF karşılaştırıldığında L-PRF'in daha etkin olduğu görülmüştür.

İlgili literatür incelendiğinde görülmektedir ki PRF pıhtı ve membran eldesiyle ilgili halen tam bir standardizasyon sağlanamamıştır. Çünkü protokolleri etkileyebilecek çok çeşitli faktörler bulunmaktadır. Kullanılan tüplerin yapısı, uygulanan g kuvvetleri, santrifüj süresi, cihaz sıcaklığı, kanın alındıktan ne kadar süre sonra santrifüje yerleştirildiği gibi pek çok faktör standardizasyonu etkilemektedir. Görüldüğü gibi PRF'in standardizasyonuna tam bir açıklık getirilememiştir. Farklı santrifüj cihazlarının vibrasyon özellikleri L-PRF'in yapısına etkinliği makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Ancak farklı santrifüj cihazları kullanıldığında büyüme faktörlerinin düzeylerini inceleyen çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu nedenle çalışmamızda; L-PRF cihazı ile sıradan bir laboratuvar santrifüjünün g kuvvet değerlerini eşitleyerek elde edilen büyüme faktörü ve sitokin

miktarını karşılaştırmak, ayrıca optimum g kuvvet değeri ve santrifüj süresini de büyüme faktörlerinin miktarı üzerinden belirlemek amaçlanmıştır.

Rölatif santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force-RCF), santrifüj içerisine yerleştirilen örneğin merkezkaç kuvvetinde uygulanması olarak tanımlanır. Santrifüj sonucunda uygulanan kuvvet ile örnekteki çeşitli elementlerin ağırlıklarına ve kan separasyon tekniklerine göre laboratuvar santrifüjü tarafından separe edilmektedir. RCF ölçümü, sabit yerçekimi kuvveti, rotorun yarıçapı ve rotorun dönme hızı baz alınarak yapılmaktadır [200]. PRF hazırlama yönteminin temeli, tam kana bir merkezkaç kuvveti uygulayarak, kanın şekilli elemanlarının belli bir bölgede yoğunlaştırılması mantığına dayanır. Böyle bir ayırma işleminde santrifüjden faydalanılır. Başka trombosit ayırıştırma veya yoğunlaştırma yöntemleri olsa da hasta başında hazırlanan PRF, basit bir masa santrifüjü kullanılarak elde edilebilir. Tam kana bir merkezkaç kuvveti uygulandığında, kanın şekilli elemanları ağırlıklarına göre çökelirler. Demir içerikleri nedeniyle en ağır olan eritrositler tüpün en dibine çökerken, diğer şekilli kan elemanları da dereceli olarak dağılırlar. PRF hazırlanmasındaki amaç trombositleri eritrositlerin hemen üzerindeki bölgede

$$RCF=g = 11,18 \times (rpm/1000)^2 \times r$$

biriktirmektir. Bu nedenle uygulanacak merkezkaç kuvveti önemlidir. Herhangi bir santrifüjde merkezkaç kuvveti (g) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir:

g: Merkezkaç kuvveti

rpm: Rounds Per Minute (Dakikadaki Tur Sayısı)

r: Santrifüjün yarıçapı (cm)

Formülden de anlaşılacağı gibi g'nin büyüklüğünde, santrifüjün yarıçapının doğru orantılı bir etkisi vardır.



**Tablo 2.2.** Literatürde PRF elde etmek için kullanılan değerler

<b>Literatür</b>	<b>rpm</b>	<b>Süre (dk)</b>	<b>g değeri</b>	<b>Cihaz</b>	<b>r değeri (mm)</b>	<b>Kaynak No</b>
Dohan	3000	10	400	PC-02, Process	40	[14]
Choukroun	2500	10	280	PC-02, Process	40	[127]
Choukroun, Standart PRF	2700	12	?	PC-02, Process	40	[1]
Choukroun, Advanced PRF	1500	14	?	PC-02, Process	40	[1]
Su	2700	12	700	PC-02, Process	85	[12]
Gassling	3000	10	400		40	[201]
Simonpieri	?	12	400	PC-02, Process Ltd., Nice, France	?	[202]
Inchingolo	3000	10			?	[203]
Gürbüzer	2030		400	Universal 320	86	[11]
Gassling	?	12	400		?	[204]
Thorat	?	12	400	Process	?	[205]
Sharma	3000	10	400	R-4C	?	[175]
Su C. Y.	2700	12	700	PC 02	?	[12]
Lekovic	?	10	1000	Heraus	?	[13]
Jankovic	3000	10	400		?	[189]
Eren	?	12	400	Nüve NF200	?	[9]
Tunalı	2800	12	?	Hettich 320	?	[10]
Kim	3000	10	?	GYRO416	?	[6]
Li	2100	12	400	Beckman	?	[8]
Nacopoulos	3000	12	?	?	?	[206]

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Dizaynı ve Dahil Edilen Bireyler

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu [Ek1. Etik Kurul Onay Belgesi, Karar No: 2017/02- 09 (KA-17016)] onayını takiben çalışmaya başlandı.

Sistemik ve periodontal açıdan sağlıklı, son 1 ayda antiinflamatuvar kullanmamış, sigara kullanmayan, 10 gönüllü birey çalışmaya dahil edildi ve onam formları imzalatıldı. Aspirin ve diğer herhangi bir antikoagülan veya antihipertansif kullanan gönüllüler çalışma dışı bırakıldı.

Planlanan çalışmanın amacı L-PRF için spesifik bir santrifüj ile elde edilen PRF içindeki büyüme faktörleri ve sitokinlerin miktarını, spesifik olmayan bir santrifüj ile elde edilen değerlerle kıyaslamaktır. Bu amaçla, L-PRF'ye özgü santrifüj cihazı ve çalışmaya dahil edilen diğer santrifüj cihazları kullanılarak hazırlanmış PRF örneklerindeki büyüme faktörlerinin miktarı kıyaslanarak arada fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### 3.2. Kullanılan Santrifüj Cihazları ve Çalışma Grupları

Önceki çalışmalarda kullanılan santrifüj cihazlarının rpm değerleri ve buna bağlı olarak hesaplanan  $g$  kuvvetleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Bu tabloda bazı hücrelerin boş olmasının nedeni, çalışmada kullanılmış olan değerlerin belirtilmemiş olması ya da kullanılan santrifüj makinesinin detaylarına ulaşamadığı için hesaplamaların yapılamamış olmasıdır. Test grubu santrifüjü olarak ALL Centrifuge (Made in China) masa üstü santrifüjü kullanıldı (Şekil 3.1).

**Tablo 3.1.** Test grubu santrifüjünün teknik özellikleri

Rotor Tipi	Tüpler	Her rotordaki Tüp Sayısı	Boyut ( $\Phi \times L$ mm)	Adaptörler	Maksimum Hız (rpm)	Yarıçap cm	Maksimum RCF ( $\times g$ )
A12-10P	8.5-10 ml	12	16 $\times$ 107	A10P15	4500	11	2490

**Şekil 3.1.** ALL Centrifuge marka santrifüj cihazı

Kontrol grubu santrifüjü olarak ise yüksek kalite masaüstü santrifüjüyle, spesifik, steril, antikoagülansız 9 ml'lik cam kaplı plastik tüpler kullanarak önceden programlanmış santrifüj cihazında (Intra-Spin, Intra-Lock, Boca-Raton, FL, USA) 700xg (=2700 rpm), 12 dk seçeneği kullanıldı (Şekil 3.2).

**Tablo 3.2.** Kontrol grubu santrifüjünün teknik özellikleri ( $RCF=1.118 \times r \times n^2 \times 10^{-5}$ )

Kapasite (ml)	8,5-10
Boyutlar ( $\Phi \times L$ ) (mm)	16x100
Rotor sayısı	8
Dönme hızı (rpm)	3300
RCF (g)	1047
Yarıçapı (mm)	86



**Şekil 3.2.** Intra-spin marka santrifüj cihazı

Literatürde en çok kullanılan  $g$  değerleri ve santrifüj süreleri olmaları nedeniyle çalışmamızda;  $g$  kuvveti olarak 200, 400, 600, 800 değerlerinin; santrifüj süresi olarak da 10, 12, 14 dakikalık periyot değerlerinin kullanılması uygun görüldü. Buna göre çalışma grupları Tablo 3.3'te gösterildiği gibi oluşturuldu. Kontrol grubu olarak L-PRF santrifüj cihazıyla Intra-Spin L-PRF santrifüj cihazı 2700 rpm'de 12 dk (700xg) protokolü uygulandı.

**Tablo 3.3.** Çalışma gruplarının g kuvvetleri ve çalışma süreleri

<b>Gruplar</b>	<b>g kuvveti</b>	<b>Süre</b>
<b>Kontrol</b>	700×g (2700 rpm)	12 dk (Intra-Spin)
<b>Grup 1</b>	200×g	10 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 2</b>	200×g	12 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 3</b>	200×g	14 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 4</b>	400×g	10 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 5</b>	400×g	12 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 6</b>	400×g	14 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 7</b>	600×g	10 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 8</b>	600×g	12 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 9</b>	600×g	14 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 10</b>	800×g	10 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 11</b>	800×g	12 dk (ALL-Centrifuge)
<b>Grup 12</b>	800×g	14 dk (ALL-Centrifuge)

### 3.3. Bireylerden Kan Alınması

Çalışmamızda kan alımı;son 1 ayda antikoagülan ve antiinflamatuvar kullanmamış, sigara içmeyen, yaşları 20 ile 40 arasında olan 10 sağlıklı gönüllüden gerçekleştirildi. L-PRF karşılaştırması için bir tüp, tam kan sayımı için bir tüp ve farklı g ve zaman süreleri için 12 tüp olmak üzere bir hastadan 13 tüp kan alındı. Kan sayımında trombosit, eritrosit ve lenfosit sayımı yapıldı. Çalışmada 10 ml’lik içi cam kaplı plastik tüpler kullanıldı (BD Vacutainer). Dolayısı ile bir hastadan alınacak kan miktarını toplam 130 ml olarak belirlendi. Çalışmanın tamamı antikoagülan içermeyen tüpte yapılacağından ve kan alınır alınmaz santrifüj edilme ihtiyacı bulunduğundan istenilen miktarda kan alınmaya kadar gönüllülerde damar yolu açık bırakıldı. Kan alımı her bir bireyden eş zamanlı gerçekleştirildi ve alınan kan vakit kaybetmeksizin santrifüje aktarıldı.

### 3.4. PRF Hazırlanması

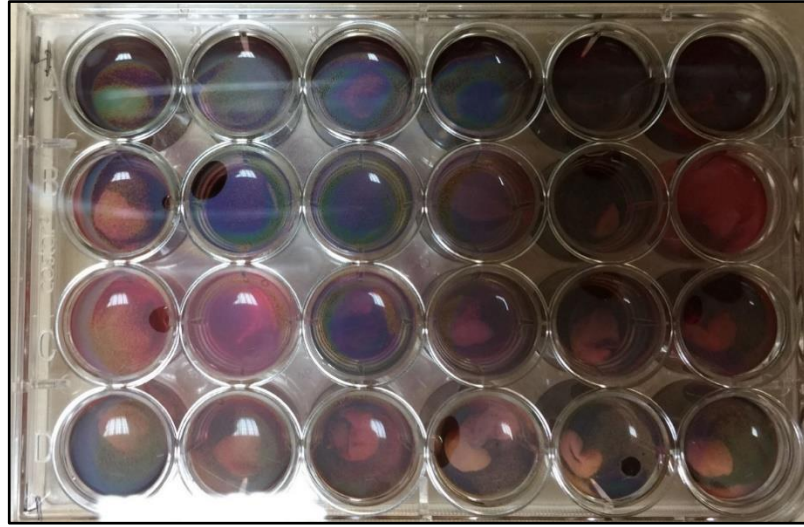
Test grubu santrifüjünde sırasıyla 200, 400, 600 ve 800xg ile 10, 12, 14 dakikalık gruplar oluşturularak toplamda 12 örnek masa üstü santrifüj cihazıyla (ALL Centrifuge, Guangzhou Four E's Scientific Co., Ltd, Çin Halk Cumhuriyeti)

santrifüj edildi. Kontrol grubunda ise örnekler 700xg (=2700 rpm, Intra-Spin L-PRF cihazı) ile 12 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası tüp içerisindeki örnekler süratle H.Ü. Tıbbi Biyokimya AD laboratuvarına transfer edildi ve çalışmanın bu aşaması standart hücre kültürü laboratuvarı şartlarında gerçekleştirildi (Şekil 3.3). Bunun için önce laboratuvara ulaşan tüplerdeki serum uzaklaştırıldı ve sonrasında eritrositlerin yoğun olarak toplandığı bilinen tabaka, sarı jel kısımdan makasla kesilerek ayrıldı. Trombositlerin yoğun olduğu her bir sarı jel, hassas terazi ile tartıldı ve değerler kaydedildi. Devamında PRF; laminar akış kabini (NUAIRE, NU-425-400E Model) içerisinde %10 Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2 mM L-Glutamin eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içeren 24-kuyulu hücre kültürü kuyulu plaka'lere aktarıldı ve aktarılan jelin tamamının besi yeri içerisine gömülmüş olmasına dikkat edildi (Şekil 3.4).



**Şekil 3.3.** Çalışmanın yapıldığı hücre kültürü laboratuvarındaki cihazlar



**Şekil 3.4.** PRF örneklerinin 24-kuyulu plaklara alındıktan sonraki görüntüsü

Kuyulu plaka'ler, %5 karbondioksit içeren 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre (NUAIRE, NU-5510E Model) yerleştirildi. Birinci, 3. ve 7.gün sonunda her bir kuyudaki 2 ml DMEM besi yeri santrifüj tüplerine alındı ve yerine 2 ml taze besi yeri eklendi. Birinci gün sonunda 130, 3. ve 7. gün sonunda da 130'ar örnek olmak üzere toplamda 390 besi yeri örneği elde edilmiş oldu. Santrifüj tüplerine alınan örnekler 3100xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi (Eppendorf 5417R Model Centrifuge; Hettich Zentrifugen, Mikro 22 Model) (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** Besi yeri örneklerinin santrifüj edilmesinde kullanılan cihazlar

Süpernatantlar iki ayrı mikrosantrifüj tüpüne paylaştırılarak çalışılıncaya kadar -80 °C'de (SANYO, MDF-U6086S Model Dondurucu) saklandı. Yedinci gün, en son besi yeri örneği de alındıktan sonra, 24-kuyulu plaklarda kalan PRF doku örnekleri total protein miktarının belirlenmesi ve ELISA analizleri için homojenize

edildi (OMNI, OMNI 5000 Model Homojenizer) (Şekil 3.6). Bu aşamada elde edilen örnekler de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 3.6. PRF örneklerinin homojenizasyonunda kullanılan homojenizatör cihazı

### 3.6. Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Nicel protein tayini, BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi temeline dayalı bir protein ölçüm kiti kullanılarak yapıldı (Thermo Fisher Scientific Pierce Research Products; Product No. 23227). Bu yöntemde  $\text{Cu}^{+2}$ , alkali ortamda proteinler tarafından  $\text{Cu}^{+1}$ 'e indirgenmektedir. İndirgenme miktarı ile protein miktarı doğru orantılıdır. BCA alkali ortamda  $\text{Cu}^{+1}$  ile mor renkli bir kompleks oluşturur. Yöntemin prensibi,  $\text{Cu}^{+1}$ -BCA kompleksinin oluşturduğu mor rengin 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır [207].

Bu çalışmada BCA analizleri, üretici firmanın mikroplakalar için önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Yöntemde kısaca, 10  $\mu\text{l}$  protein içeren örnek, reaktif A ve B (50:1) içeren 200  $\mu\text{l}$  BCA çalışma reaktifi içine eklendi. Reaksiyon karışımı, 30 dakika  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Mikroplakalardaki örneklerin absorbanansı, mikroplaka okuyucuda (Devices, SpectraMax M2 model) 562 nm dalga boyunda okundu (Şekil 3.7). Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı.

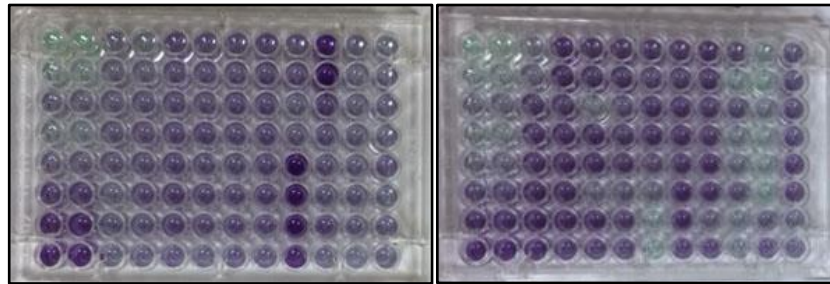




Şekil 3.7. Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, SpectraMax M2 Model)

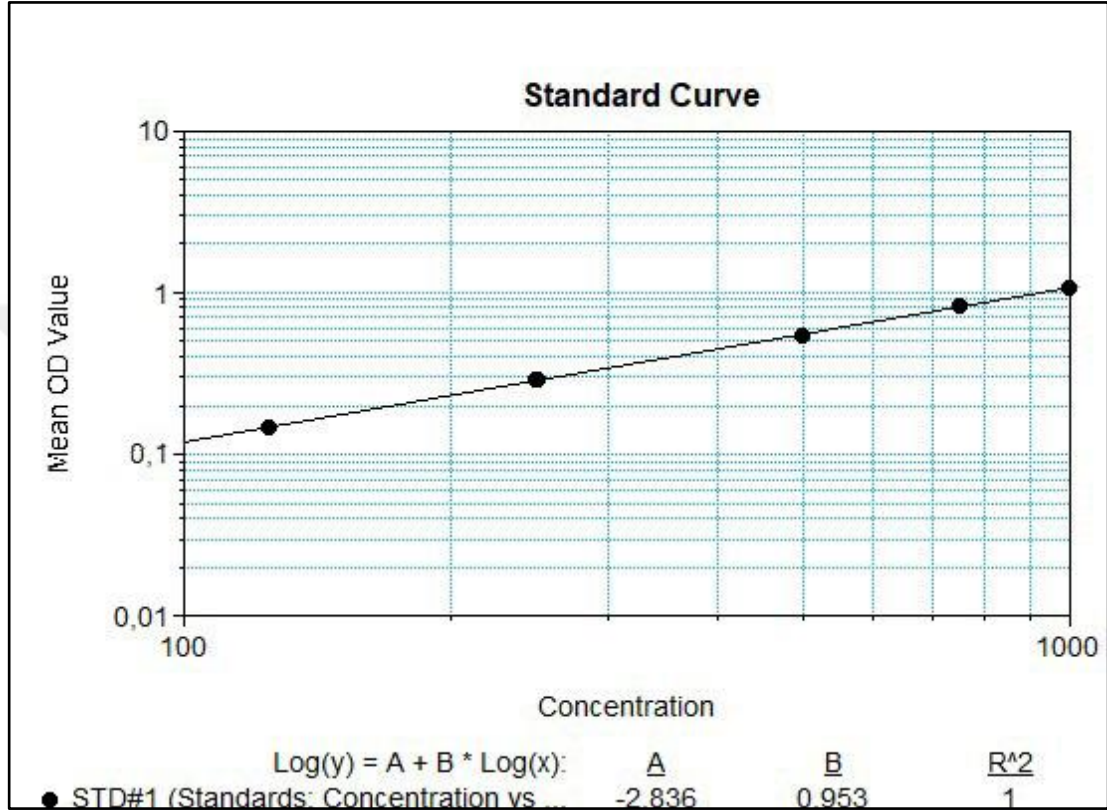
Üretici firmanın protokolüne uygun olarak, mikroplakalar Şekil 3.8’de gösterildiği gibi hazırlandı. Örnekler, farklı dilüsyonlarda hazırlandı ve her bir dilüsyon oranına uygun kör değerleri tespit edilerek örneklerin absorbans değerinden çıkarıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>KÖR</b> Distile su	<b>KÖR</b> Distile su										
B	<b>KÖR</b> Besiyeri (20 kez seyreltik)	<b>KÖR</b> Besiyeri (20 kez seyreltik)										
C	<b>KÖR</b> Besiyeri (100 kez seyreltik)	<b>KÖR</b> Besiyeri (100 kez seyreltik)										
D	<b>Standart 1</b> 125 µg/ml	<b>Standart 1</b> 125 µg/ml										
E	<b>Standart 2</b> 250 µg/ml	<b>Standart 2</b> 250 µg/ml										
F	<b>Standart 3</b> 500 µg/ml	<b>Standart 3</b> 500 µg/ml										
G	<b>Standart 4</b> 750 µg/ml	<b>Standart 4</b> 750 µg/ml										
H	<b>Standart 5</b> 1000 µg/ml	<b>Standart 5</b> 1000 µg/ml										



Şekil 3.8. BCA yöntemi ile protein tayini

Hazırlanan standartların konsantrasyonlarına karşı absorbanans değerlerinden yararlanılarak standart grafik çizildi (Şekil 3.9). Örneklerin protein konsantrasyonu, bu standart grafik üzerinden SpektraMax M2 cihazına ait bir program olan SoftMax Pro 4.8 ile hesaplandı.



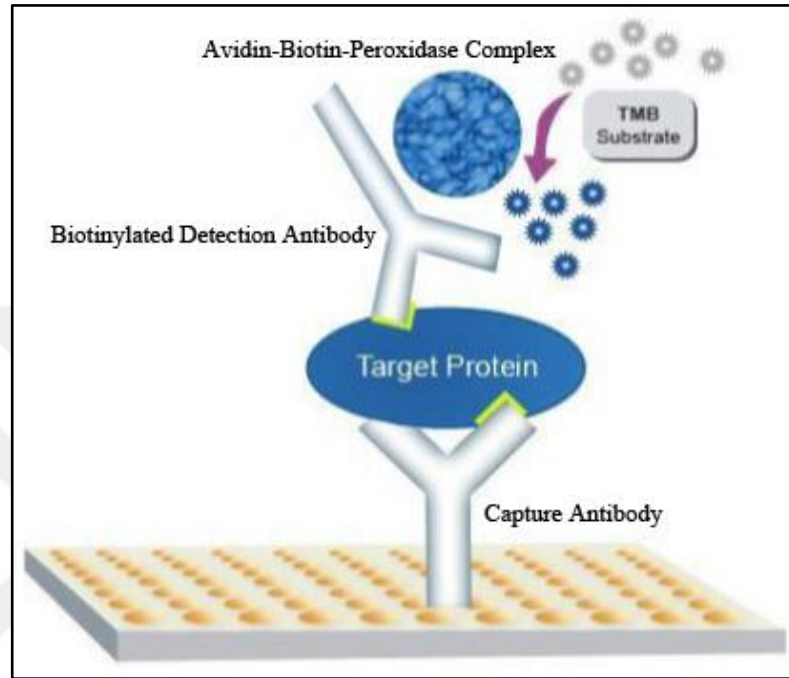
Şekil 3.9. Protein tayininde kullanılan standart grafik.

### 3.7. ELISA Yöntemi

Örneklerdeki IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 ve PDGF-AB miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesinde ticari ELISA kitleri (Boster Biological Technology, CA, ABD) kullanıldı. Her bir kit için tüm analiz aşamaları, üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak yapıldı (IL-1 $\beta$  Katalog No: EK0392, TGF- $\beta$ 1 Katalog No: EK0513 ve PDGF-AB Katalog No: EK0484).

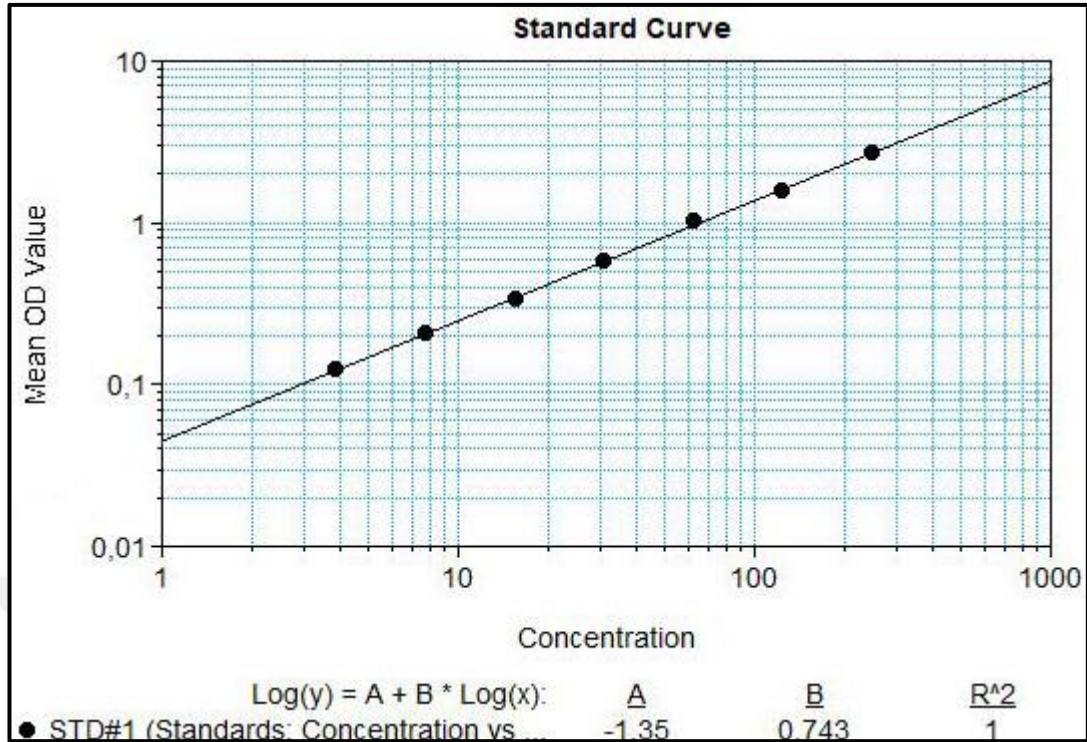
Buna göre, her bir kitin içinde yer alan, ilgili sitokin veya büyüme faktörüne özgü antikor ile kaplanmış 96-kuyulu plaklara, protokole uygun hazırlanmış standart ve örnekler uygulandı. Belirtilen inkübasyon süresinin sonunda, her bir kuyuya biyotinli antikor eklendi. İnkübasyonu takiben kuyular yıkama çözeltisi ile yıkandı

ve Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi eklendi. Bağlanmayan kompleksin uzaklaştırılması için tekrar yıkama işlemi yapıldı. Kompleksteki peroksidaz enziminin substratı olan TMB eklendi ve inkübasyon sonunda her bir kuyuya asidik durdurma çözeltisi pipetlendi (şekil 3.10).



**şekil 3.10.** Kullanılan ELISA yönteminin genel prensibinin şematik gösterimi

Tüm bu reaksiyonların sonunda her bir kuyuda oluşan sarı renkli ürünlerin absorbansları, Molecular Devices (Sunnyvale, CA, ABD) firmasına ait SpectraMax M2 model mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyunda belirlendi. Cihaza ait SoftMax Pro 4.8 yazılımı kullanılarak çizilen standart grafikler yardımıyla her bir örnekteki hedef proteinin miktarı kantitatif olarak tespit edildi (şekil 3.11).



Şekil 3.11. ELISA ölçümlerinde kullanılan standart grafik

### 3.8. Verilerin Analizi

PDGF, TGF ve IL-1 $\beta$  değerlerinin her bir zaman periyodu ve g değerleri hem kendi içinde hem de iki farklı santrifüj açısından kıyaslandı. Gruplararası farklılık Kruskal-Wallis testiyle belirlendi. Değerler normal dağılmadığı için non-parametrik analiz kullanıldı. P<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Araştırmaya katılan 10 adet bireyden venöz kan alımı başarı ile gerçekleştirildi. Alınan kanların laboratuvara transferi ve elde edilen jellerin trombositten zengin olduğu düşünülen kısmı istenen şekilde ayrılıp kuyulu plakalara aktarıldı. PRF ayırma işleminde sarı jel kısmının yanı sıra birleşim hattındaki eritrosit tabakanın da kullanılacak jel ile birlikte tutulması önerildiği için inkübasyon süresince kuyulu plaka'lerin besi yerlerinin eritrositler tarafından aktarılan kırmızı rengi aldığı görüldü ve bu değişim normal kabul edildi. Örneklerin besi yerlerine yerleştirilmesi ile ELISA analizi aşaması arasındaki periyotta herhangi bir örnek kaybı yaşanmadı. Çalışmada hazırlanan örneklerden protein tayini sonrası ELISA yöntemi kullanılarak PDGF-AB, TGF-BETA, IL-1 $\beta$ 'nın 1., 3. ve 7. günlerdeki salım miktarları belirlendi.

### 4.1. PDGF-AB Salım Sonuçları

PDGF-AB için ortalama salım sonuçlarına bakıldığında 1.günde kontrol grubunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Üçüncü günde en yüksek değer grup 12'de iken ( $p<0,05$ ), 7. günde grup 7'de izlendi ( $p<0,05$ ). 1. günde gruplararası salım sonuçları kıyaslamasına baktığımızda Grup 9 ve 10 ile Grup 1, 2, 3 arasında salım miktarları açısından anlamlı fark görüldü ( $p<0,05$ ). Salım miktarları açısından aynı düzeyde anlamlı fark 7. günde Grup 3 ile kontrol grubu arasında da vardı ( $p<0,05$ ). Üçüncü ve 7. günlerde ise diğer gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.1).

Salım miktarlarının günlere göre değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre Grup 1, 2, 3 ve 9'un 1. ve 7. gün değerleri arasında anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). Yine Grup 1, 2, 10 ve 11'in 1. ve 3. gün değerleri arasında anlamlı fark gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Grup 4, 5, 6, 7, 8, 12 ve kontrol grubunda ise anlamlı bir değişim gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.1. PDGF-AB salım sonuçları**

PDGF-AB Grup	Salım 1. gün			Salım 3. gün			Salım 7. gün		
	Ortalama±SS	Median	IQR	Ortalama±SS	Median	IQR	Ortalama±SS	median	IQR
Gr1	1400,52±722,17	1483,39	877,23-1565,51	617,94±516,82	454,85 <sup>a</sup>	364,55-582,56	455,28±349,08	367,66 <sup>a</sup>	222,41-616,66
Gr2	2597,14±2332,34	1273,22	1014,65-2816,96	718,4±546,37	550,16 <sup>a</sup>	337,39-707,76	557,62±438,21	419,74 <sup>a</sup>	240,98-633,79
Gr3	2209,03±2211,56	1151,51	798,19-4113,84	622,25±497,37	418,30	330,88-612,68	303,28±179,42	260,37 <sup>y,a</sup>	199,06-405,05
Gr4	2033,26±2880,54	1123,95	666,18-2030,16	620,49±507,36	362,80	325,4-749,09	785,06±651,19	612,90	213,4-1207,53
Gr5	701,49±601,43	471,86	332,66-563,41	632,51±500,34	404,82	310,96-688,59	774,75±528,23	756,38	244,87-1016,84
Gr6	850,88±990,96	536,34	423,26-742,63	599,23±342,29	562,02	435,65-737,92	473,9±265,76	426,83	235,77-666,81
Gr7	602,67±502,28	394,26	176,03-921,93	572,69±268,02	549,83	405,13-635,14	9384,49±24378,13	647,62	402,39-1501,34
Gr8	511,9±484,83	244,01	131,94-953,18	590,39±207,12	528,38	492,54-834,06	890,84±654,71	553,07	455,1-1494,02
Gr9	696,87±1512,07 <sup>x</sup>	146,32	114,93-215,31	634,49±725,31	338,43	274,61-806,91	1612,48±3029,19	684,55 <sup>a</sup>	518,01-732,5
Gr10	259,47±166,3 <sup>x</sup>	190,55	154,8-411,84	529,29±245,29	487,91 <sup>a</sup>	316,98-731,64	496,6±433,13	358,49	305,75-581,01
Gr11	562,64±752,28	318,2	225,38-506,89	741,43±257,13	664,48 <sup>a</sup>	582,92-887,67	452,49±305,12	272,85	205,02-683,99
Gr12	791,05±831,61	461,48	197,6-953,34	3809,69±10145,4	602,76	458,8-715,43	607,5±423,33	509,10	315,87-953,48

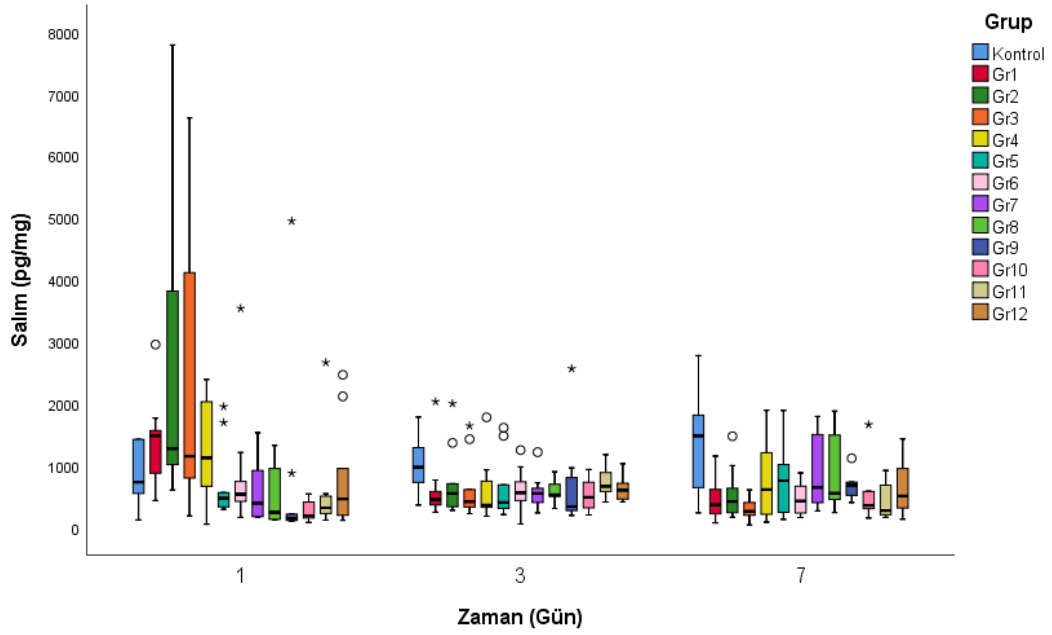
IQR: Inter-Quartile Range (Çeyrek Değerler Genişliği); SS: Standart Sapma; K: kontrol; Gr: grup

x: Gr 1, Gr 2, Gr 3'den 1.günde anlamlı derecede farklı (p<0,05)

y: Kontrol grubundan 7.günde anlamlı derecede farklı (p<0,05)

a: 1.gün ile arasında anlamlı fark vardır (p<0,005)





**Şekil 4.1.** PDGF salım değerlerinin zamana bağlı değişimi

#### 4.2. TGF- $\beta$ 1 Salım Sonuçları

TGF- $\beta$ 1 için ortalama salım sonuçlarına göre 1. günde kontrol grubunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Üçüncü ve 7. günde ise en yüksek değerler grup 5'te izlendi ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.2).

Salım miktarlarının günlere göre değişimi incelendiğinde Grup 1, 2, 3 ve 11'de 1. gün ile 7. gün arasında anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Grup 2 ve 3'de 3. gün ile 7. gün ( $p < 0,05$ ) arasında fark mevcut iken Grup 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ve kontrol grubunda grup içi anlamlı fark görülmedi ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.2).

**Tablo 4.2.TGF-β1 salım sonuçları**

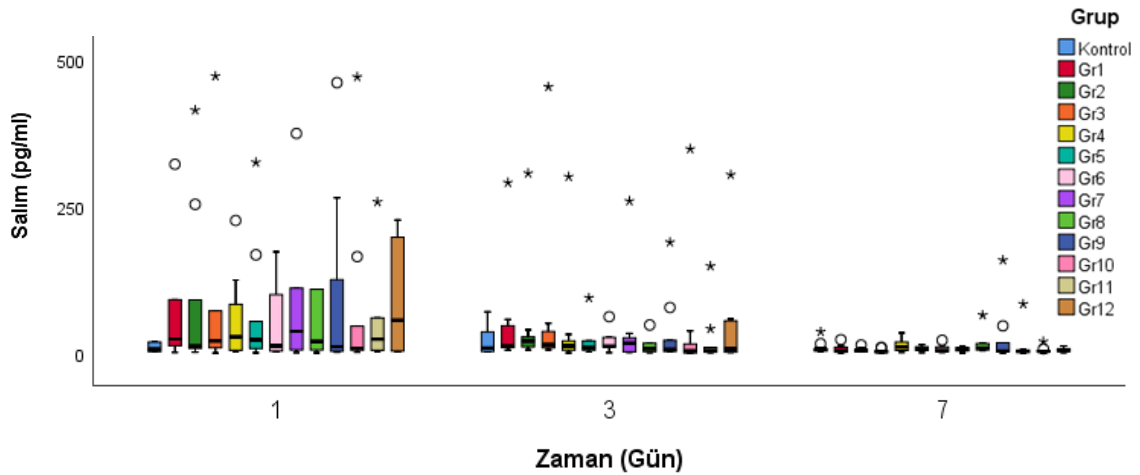
TGF- β1 Grup	Salım 1. Gün			Salım 3. gün			Salım 7. Gün		
	Ortalama±SS	Median	IQR	Ortalama±SS	median	IQR	Ortalama±SS	median	IQR
Kontrol	6969,87±15567,88	6,72	2,71-18,84	19,61±22,23	8,87	2,9-36,06	9,89±10,65	7,08	3,66-7,18
Gr1	126,3±216,73	23,96 <sup>a</sup>	12,62-90,88	46,82±87,54	12,00	9,44-46,72	6,81±7,65	3,53	1,69-10,2
Gr2	97,68±143,82	11,91 <sup>a</sup>	8-90,76	48,02±91,5	20,46 <sup>a</sup>	10,74-27,83	5,37±3,92	4,88	2,52-5,92
Gr3	139,4±238,53	20,69 <sup>a</sup>	9,17-72	63,28±138,14	14,69 <sup>a</sup>	8,94-36,72	3,55±3,17	2,44	1,05-4,01
Gr4	57,09±76,07	27,61	4,94-83,14	44,03±96,85	12,34	5,06-20,77	13,04±10,92	10,28	4,51-18,94
Gr5	69,13±109,31	22,63	7,81-54,06	110,31±272,57	9,40	5,02-20,9	104,61±309,44	6,63	4,6-10,82
Gr6	53,48±72,96	12,44	3,61-99,97	83,85±200,29	11,75	10,24-26,67	6,82±6,68	4,09	2,68-10,31
Gr7	122,73±193,93	37,17	5,57-110,94	43,91±87,83	16,91	2,23-26,07	73,67±191,73	6,88	3,93-9,56
Gr8	171,29±305,54	19,73	5,54-108,98	15,19±19,34	7,50	2,53-16,95	17,25±21,59	8,65	5,03-17,69
Gr9	92,14±154,74	10,91	3,19-125,14	35,02±62,69	6,54	3,02-21,89	24,16±49,26	3,61	2,25-17,53
Gr10	75,68±147,61	8,54	5,07-45,98	42,11±108,2	3,71	0,32-15,53	12,8±28,73	3,06	0,99-5,11
Gr11	99,57±184,42	23,86 <sup>a</sup>	4,81-59,93	24,18±48,3	4,23	1,67-9,65	5±5,83	2,98	2,68-4,21
Gr12	126,39±184,75	56,16	3,54-197,74	44,63±93,86	7,17	1,53-55,13	5,29±3,52	4,94	2,85-7,43

IQR: Inter-quartile Range (Çeyrek Değerler Genişliği) SS:Standart Sapma

a: 7.gün ile aralarında anlamlı fark vardır (p<0,05)

TGF-β1 salım değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p<0,05)





Şekil 4.2. TGF- $\beta$ 1 salım değerlerinin zamana bağlı değişimi

#### 4.2. IL-1 $\beta$ Salım Sonuçları

IL-1 $\beta$  için ortalama salım sonuçlarına göre 1. günde kontrol grubunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Üçüncü günde en yüksek değer grup 12'de iken, 7. günde grup 7'de izlendi. Yedinci günde Grup 3; Grup 7, 10, 11 ve 12'den daha düşük salım gösterdi ( $p < 0,05$ ). Aynı şekilde anlamlı fark 7. günde Grup 1 ile Grup 11 arasında ve Grup 2 ile Grup 10, Grup 11 arasında salım miktarları açısından mevcuttu ( $p < 0,05$ ).

Salım günleri ilerledikçe görülen değişim sürecinde Grup 1, 2, 6 ve 11'de 3.gün ile 7.gün arasında anlamlı fark var iken ( $p < 0,05$ ), Grup 3'de hem 1. gün ile 7. gün arasında ( $p < 0,05$ ) hem de 3. gün ile 7. gün ( $p < 0,05$ ) arasında anlamlı fark görüldü. Grup 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12 ve kontrol grubunda ise zamana bağlı salımda anlamlı fark görülmedi ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.3).

**Tablo 4.3-** IL-1 $\beta$  salım sonuçları

Grup	Ortalama $\pm$ SS	Median	IQR	Ortalama $\pm$ SS	median	IQR	Ortalama $\pm$ SS	median	IQR
Kontrol	789,31 $\pm$ 1709,8	38,39	7,25-48,46	115,75 $\pm$ 130,52	47,69	26,96-235,71	26,25 $\pm$ 33,88	10,64	5,4-37,91
Gr1	106,3 $\pm$ 110	96,11	8,76-210,49	180,96 $\pm$ 165,21 <sup>a</sup>	85,76	68,97-318,55	7,66 $\pm$ 9,05	4,12	1,46-13,23
Gr2	89,13 $\pm$ 133,9	44,4	5,78-109,33	99,56 $\pm$ 142,66 <sup>a</sup>	34,98	19,98-133,4	6,27 $\pm$ 5,05	4,53	2,19-10,85
Gr3	152,35 $\pm$ 250,36	61,39 <sup>a</sup>	21,15-115,38	134,9 $\pm$ 178,8 <sup>a</sup>	70,30	23,48-175,81	4,11 $\pm$ 2,8	3,94	1,71-6,3
Gr4	75,53 $\pm$ 90,32	18,45	13,09-118,77	98,91 $\pm$ 103,73	89,50	16,46-138,21	74,49 $\pm$ 123,84	7,98	3,77-135,62
Gr5	68,47 $\pm$ 76,75	56,31	4,79-95,98	127,95 $\pm$ 136,67	99,96	13,1-135,67	51,17 $\pm$ 73,91	27,77	14,23-49,1
Gr6	37,9 $\pm$ 37,74	24,64	10,59-81,86	110,68 $\pm$ 100,67 <sup>a</sup>	65,91	26,78-226,86	18,14 $\pm$ 15,16	14,51	6,66-25,86
Gr7	118,69 $\pm$ 124,72	52,19	34,75-182,13	375,93 $\pm$ 636,64	152,15	133,15-279,6	507,02 $\pm$ 1265,43	56,97 <sup>z</sup>	21,76-124,54
Gr8	62,63 $\pm$ 57,62	31,51	15,94-118,38	91,8 $\pm$ 85	43,94	30,92-158,81	51,63 $\pm$ 92,53	20,07	7,9-39
Gr9	147,08 $\pm$ 343,17	27,01	4,57-48,23	157 $\pm$ 168,86	106,02	31,3-265,47	67,94 $\pm$ 73	50,83	17,5-59,03
Gr10	79,13 $\pm$ 99,6	41,92	11,38-146,54	231,36 $\pm$ 241,08	133,49	77,32-362,92	76,28 $\pm$ 67,01	57,69 <sup>y,z</sup>	40,94-102,3
Gr11	130,78 $\pm$ 94,13	102,42	58,36-154,97	316,18 $\pm$ 288,84 <sup>a</sup>	244,76	122,98-333,42	79,76 $\pm$ 82,28	41,54 <sup>x,y,z</sup>	34,2-81,34
Gr12	172,6 $\pm$ 167,23	105,41	65,52-249,58	650,61 $\pm$ 1346,35	113,60	88,21-493,73	88,94 $\pm$ 75,76	89,32 <sup>z</sup>	20,29-138,34

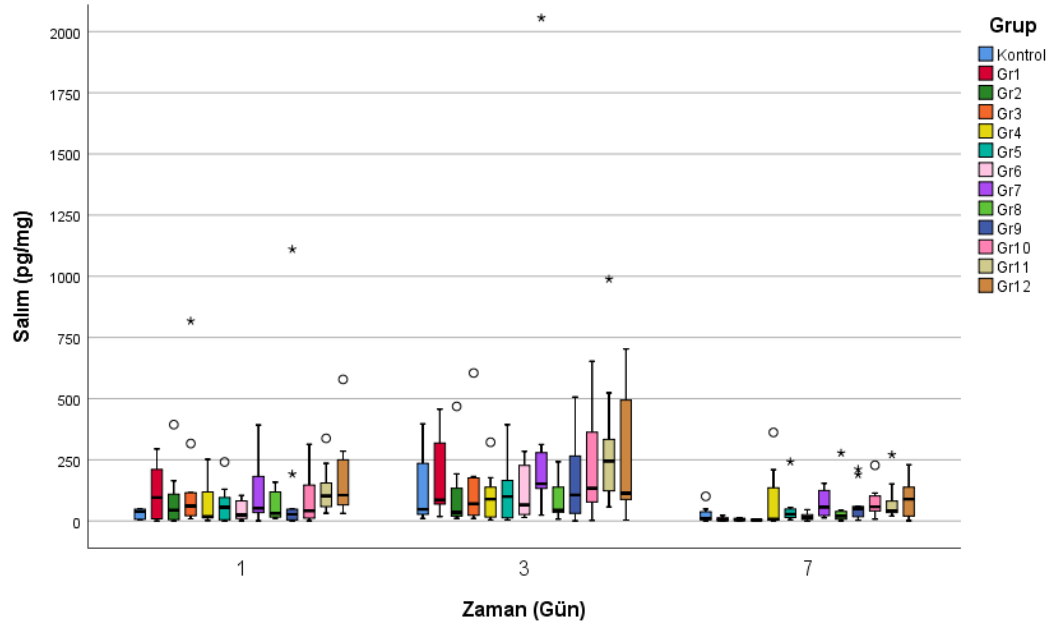
IQR: Inter-quartile Range (Çeyrek Değerler Genişliği) SS: Standart Sapma

x: 7.günde Grup 1 ile aralarında anlamlı fark vardır (p<0,05)

y: 7.günde Grup 2 ile aralarında anlamlı fark vardır (p<0,05)

z: 7.günde Grup 3 ile aralarında anlamlı fark vardır (p<0,05)

a: 7.gün ile aralarında anlamlı fark vardır (p<0,05)



Şekil 4.3 IL-1 $\beta$  değerlerinin zamana bağlı değişimi

## 5. TARTIŞMA

Rejeneratif implant cerrahisi ve periodontolojideki klinik faydalarından dolayı gitgide artmakta olan PRF kullanımı araştırmacıları klinik uygulamalarında santrifüj protokollerini optimize etmeye yönlendirmiştir. L-PRF teknolojisinin gelişimiyle birlikte araştırmacılar santrifüj seçimi ve santrifüj protokolünün etkisini incelemeyi amaçlamışlardır. İkinci jenerasyon otolog trombosit konsantrasyonlarından PRF, hastanın kendi kanından santrifüj ve hücre seperasyonu gibi yöntemler kullanılarak elde edilmektedir. Santrifüj işlemi sayesinde plazma hacmindeki trombosit konsantrasyonu %300 oranlarına ulaşmaktadır. PRF eldesi amacıyla kan fraksiyonu, plazmaforez, *Curasan*, *SmartPRep*, *Platelet Concentrate Collection System* gibi laboratuvar santrifüjleri kullanılmaktadır. PRF'nin içeriğinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin açığa çıkabilmesi için aktivasyonu ve koagülasyon prosesinin başlatılması gerekmektedir. Santrifüj sonucu elde edilen PRF lökosit ve trombosit zengin yoğun bir fibrin yapısındadır. Yapılan birçok çalışmada PRF'nin rejeneratif etkisinin fibrin matrisin büyüme faktörleri ve sitokinleri hapsedmesi ve bunları 300 saat boyunca damla damla defekt bölgesine salım yapması ile açıklanabileceği sonucuna varılmıştır [10, 208]. Son zamanlarda L-PRF teknolojisinin gelişmesiyle birlikte araştırmacılar santrifüj seçiminin ve santrifüj protokolünün, L-PRF pıhtısı ve membranına olan etkilerini optimize etmeyi amaçlamışlardır. Ancak literatürde en başarılı PRF hazırlama protokolü olduğu iddia edilen L-PRF yönteminin standart masaüstü santrifüjlerle hazırlanan PRF ile detaylı olarak kıyaslayan bir araştırma bulunmamaktadır. Bu noktadan hareketle çalışmamızda amacımız, birincil olarak L-PRF cihazı ile sıradan bir laboratuvar santrifüjünden eşit g kuvveti ve eşit süre şartlarında elde edilecek büyüme faktörü ve sitokin miktarlarını karşılaştırmaktır. Ardından farklı g kuvvet değerleri ve santrifüj sürelerini kullanarak optimum g kuvvet değeri ve santrifüj süresini, büyüme faktörlerinin salım miktarı üzerinden belirlemek hedeflenmiştir.

Belirlenen hedef doğrultusunda çalışma gruplarının seçimine karar verilirken Tablo 2.2'de verilmiş olan tüm değerler göz önünde bulundurulmuş ve tabloda yer alan literatürlerdeki araştırmacıların en çok tercih ettiği değerler seçilmiştir. Buna göre başlangıçta 200, 400, 600, 800 ve 1000 x g'den oluşan g değerleri ile 10, 12 ve 14

dk'lık santrifüj sürelerinin oluşturduğu 15 adet grup çalışmanın test gruplarını, PRF hazırlanmasında sıklıkla önerilen L-PRF cihazı protokolü 2700 rpm, 12 dk (700xg) ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Ancak çalışma grubu sayısının araştırma yönteminin uygulamasını gereğinden fazla zorlaştıracak olması, maliyeti çok artırması ve bulgulara da ilave katkısı olmayacağı düşüncesiyle uçta kalan 1000 x g değeri çalışma dışında bırakılmış ve araştırma 12 test ve bir adet kontrol grubu ile sonuçlandırılmıştır. Araştırmaya kan vermek üzere katılan kişilere ait bireysel faktörlerin sonuçlar üzerindeki değiştirici etkisinin asgaride tutulabilmesi için her bir grupta 10 adet örnekle çalışılmış ve bunun için her bir bireyden toplam 130 ml venöz kan alınmıştır. 10 bireyden aynı anda kan alınması, santrifüj ve deney protokollerinin örnekleri bekletmeksizin uygulanması görece zor bir süreçtir. Nitekim protokol bir kez başarısızlığa uğramış ve ikinci denemede süreç tamamlanabilmiştir. Bu açıdan aynı tip santrifüjden fazla sayıda bulundurmamak, fazla sayıda kan alan ve santrifüj protokolü uygulayan personelle çalışmak ve çalışma grubunu oluşturan bireylerin sayısını yedekli olarak hesaplamak faydalı olacaktır.

Dohan ve arkadaşlarının 4 adet santrifüj cihazlarının vibrasyonlarını kıyasladığı bir çalışmada PRF membranlar kanın hızlı bir şekilde tüplere alınmasıyla (ortalama 22 saniyede, tüp başına 25 saniyeden az) ve yine aynı şekilde tüplerin hızlı bir şekilde santrifüj cihazına aktarılmasıyla (1 dakikadan az) elde edilmiştir. PRF membranlar orijinal L-PRF santrifüjü ile (Intra-Spin) 2700 rpm, (ortalama 400xg) santrifüj kuvvetiyle elde edilmiştir. Cihazın vibrasyonu  $0.75 \text{ m.s}^{-2}$  bulunup bu sonuç eşik değeri olan  $1 \text{ m.s}^{-2}$ 'in altında olarak kaydedilmiştir. Diğer 3 cihaz 400 g santrifüj kuvvetiyle kullanılmış ve sırasıyla LW santrifüjü  $2.2 \text{ m.s}^{-2}$ , A-PRF santrifüjü  $3 \text{ m.s}^{-2}$ , Salvin santrifüjü  $4.5 \text{ m.s}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre L-PRF cihazı A-PRF cihazına göre 6 kat daha az vibrasyon göstermektedir. Son 3 cihazda vibrasyonun eşik değeri den fazla olması nedeniyle elde edilen PRF benzeri ürünlerin, içerisindeki hücre içeriklerinin ve fibrin organizasyonunun zarar görebileceği sonucuna varılmıştır. L-PRF'in hücre içeriğini koruduğu ve böylelikle inflamatuvar süreci düzenlediği gözlenirken, diğer 3 cihazda zarar gören hücrelerin proinflamatuvar medyatörleri ortama salgıladığı gözlenmiştir. Artan vibrasyonla zarar gören hücre içeriği ve fibrin organizasyonu sonucu L-PRF, nekrotik hücre

popülasyonu içeriğine sahip olabilir. Bu gözlemlerden yola çıkarak A-PRF, LW, Salvin gibi PRF-benzeri ürünlerin L-PRF ailesinde sınıflandırılmayacağı vurgulanmaktadır [209]. Bu yüzden çalışmamızda kan alımına başlamadan önce santrifüjlerin stabilizasyonundan, vibrasyon yapıp yapmadığından emin olunmuş ve belirli devir-dakika özelliklerinde jel oluşturup oluşturamadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca araştırmada içerisi cam kaplı plastik tüpler kullanılmıştır. Tüp seçimi ile ilgili literatür incelendiğinde; her ne kadar tüplerde silika yerine titanyumun kullanılması biyoyumluluğu arttırmış ve daha sıkı, daha kalın fibrin yapısıyla daha geç rezorbe olması nedeniyle daha başarılı sonuçlar vereceğini iddia eden çalışmalar var ise de [151] cam kaplı plastik tüpler ile standardizasyonun sağlanabileceği ve başarılı sonuç alınabileceği ifade edilmektedir [1]. Ayrıca benzer çalışmalarla kıyaslanabilirliğin yapılabilmesi adına da araştırmamızda ideal tüp seçiminin cam tüp olduğu görülmektedir.

Santrifüj protokolünü takiben tüpler süratle hücre kültürü laboratuvarına ulaştırılmış ve PRF'nin ayrılması kültür kabini altında gerçekleştirilmiştir. Böylece örneklerin transfer sırasında kurumaması önlenmiş ve olası faktör/sitokin salımlarının tüp içerisinde hapsedilmesi hedeflenmiştir. Kabin altında serum ve eritrosit tabakalarından ayrılan PRF jelleri kuyulu plakalarda kendileri için ayrılmış kuyucuklara yerleştirilerek salım süreci başlatılmıştır. Her bir salım sürecinin sonunda her bir kuyucuktan alınan 2 ml besi yeri örneği olası bir tekrar gereksinimi durumuna yönelik olarak birer ml olacak şekilde iki ependorfa bölüştürülmüştür. Nitekim dondurup çözme sonrası örnek renginde bulanıklık görülmesi ve ELISA analizi için örnek hazırlanması sırasında yapılan hatalı pipetlemeler nedeniyle toplam 15 adet örneğin ikinci kez çalışılması gerekmiştir. Ancak dublike edilmiş örnekle çalışma önlemi sayesinde ELISA analizi aşamasına kadar örnek kaybı yaşanmamıştır.

L-PRF herhangi bir antikoagülan içermeyen 10 mL'lik boş tüplere venöz kan alınarak hızlıca teknik için özel olarak geliştirilmiş santrifüj cihazında 2700 rpm'de 12 dakika (700xg) santrifüj edilir. Bu kuvvetin kan içeriklerinin uygun separasyonunu sağladığı, kalın fibrin fibrilleriyle güçlü polimerize fibrin matris oluşturduğu gösterilmiştir [209]. PRF'in özelliklerini geliştirmek amacı ile bulunan,

Choukroun'un geliştirdiği A-PRF ve I-PRF santrifüj süresini ve hızını değiştirerek daha iyi bir otojen biyolojik materyal elde etmeyi amaçlamışlardır. A-PRF, antikoagülan içermeksizin kanın 1500 rpm'de 14 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilmektedir. A-PRF'de 'buffy coat'tan uzak distal kısımda daha çok trombosit bulunduğu ve santrifüj zamanı uzatılırken santrifüj devir hızının düşürülmesi ile pıhtının distal kısmında bulunan nötrofilik granüositlerin de sayısı arttırılmıştır. Nötrofilik granüositler monositlerin makrofajlara farklılaşmasına katkıda bulunmaktadırlar. Böylelikle A-PRF, monosit/makrofajların ve onların büyüme faktörlerinin etkisiyle kemik ve yumuşak doku rejenerasyonuna katkı sunmaktadır [1]. Yine Choukroun'un geliştirdiği enjekte edilebilir özellikli olan (Injectable Platelet-Rich Fibrin-I-PRF) I-PRF partiküler kemik greft materyalleriyle birleştirilerek (jelöz kemik grefti-sticky bone) veya dişeti ve deri gibi dokuların içerisine direk enjekte edilerek kullanılabilir [210]. Tunalı ve arkadaşlarının geliştirdiği T-PRF trombosit aktivasyonunda silika yerine titanyumu kullanarak daha sıkı bir fibrin ađ yapısının oluşmasını sağlamaktadır. Bu sıkı fibrin yapısı da T-PRF membranın doku içindeki rezorpsiyon süresini arttırarak tek başına bir otojen greft materyali olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Protokolde PRF'ye benzer şekilde herhangi bir antikoagülan içermeyen 10 ml titanyum tüplere hemen alınan venöz kanın 2800 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmesiyle oluşur. Elde edilen membranın PRF'ye göre daha kalın, daha belirgin ve daha sıkı ađ yapısında olup, dokudaki rezorpsiyon süresinin ise daha uzun olduğu gösterilmiştir [151].

Choukroun'un geliştirdiği A-PRF ve i-PRF, Dohan'ın geliştirdiği L-PRF ile Tunalı ve arkadaşlarının geliştirdiği T-PRF yöntemlerinin ortak özelliklerinden birisi yarıçapları küçük cihazlar ile daha az g kuvveti oluşturulabilmesidir. Bu sayede trombositlerin santrifüj işlemi sırasında parçalanması önlenerek fibrin matris içinde tutulmalarının sağlandığı ve dolayısıyla trombositlerden faktör salgı süresinin uzadığı iddia edilmektedir. Bu yüzden yarıçapları küçük olan cihazlar ve 400xg'yi geçmeyen merkezkaç kuvvetleri bu araştırmacılar tarafından ideal kabul edilmektedir. Araştırmamızın sonuçları incelendiğinde büyüme faktörü ve sitokin salgısı 7. günde en yüksek olan g değerleri 10 ve 12 dk'lık süre ile çevrilen 400 ve 600xg'dir. Bu sonuç yukarıda önerilen protokoller ile benzer veya yakın değerlerdir.

Santrifüj işlemleri sırasında 40°C üzerindeki cihaz içi sıcaklıklar PRF'nin fibrin yapısını olumsuz etkilemektedir. Soğutuculu santrifüjlerin de trombosit yapısını bozması nedeni ile kullanımı önerilmemektedir. İdeal cihaz içi sıcaklığı, oda sıcaklığıdır. Mevcut araştırmamızda da gerek santrifüj gerek hücre kültür kabini altında yapılan işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ancak PRF jellinin besi yerine aktarılmasını takiben trombositlerin besi yeri içinde yaşayabileceği optimum sıcaklık 37°C olduğu için bu sıcaklıkta çalışan klasik inkübatör tercih edilmiş ve ELISA sonuçları üzerinde olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir.

L-PRF cihazının açık erişim protokolünde olmasıyla birlikte farklı cihazlar ve farklı protokollerle orijinal metodun birçok varyasyonu ortaya çıkmıştır. Ancak bu cihaz ve protokollerin bilimsel altyapısının yetersiz olduğu düşünülmekte ve L-PRF dışındaki cihazların CE/FDA sertifikasına sahip olmaması eleştiri konusu olmaktadır [209]. Yapılan in vitro çalışmalarda L-PRF'nin en önemli özelliklerinden birisi sıkı, güçlü bir membranın 7 gün boyunca yavaş yavaş büyüme faktörü salımı göstermesidir [211]. Orijinal L-PRF cihazı sıkı fibrin fiberleriyle güçlü polimerize fibrin matriks yapısında ve yüzeyinde lökositlerin izlenebildiği membran üretmekteyken diğer cihazların ürettiği PRF-benzeri membranlarda zayıf fibrin fiberleriyle gevşek polimerize fibrin yapısında olup yüzeyindeki hücrelerin zarar gördüğü düşünülmektedir [209]. Oysa araştırma grubumuz temel bir kan ürünü seperasyonu olarak yıllardır yapılagelen bir yöntem olarak gördüğü PRF hazırlama yöntemi klasik bir masaüstü santrifüj ile, doğru devir/dk seçilerek uygulandığında benzer bir fibrin matriks, trombosit sayısı ve büyüme faktörü salımı elde edilebileceğini savunmaktadır. Mevcut araştırmada PRF jel elde edilmesi ve oluşturulan salım deneyi sonunda 1. günde PDGF-AB, TGF-β1 ve IL-1β salımının L-PRF cihazı ile oldukça yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir. Bu sonuç L-PRF cihazının trombositlerden erken bir *burst* (patlayıcı) salım yaptığını göstermektedir. Bu etki kritik rejeneratif bir olay olan erken dönem pıhtı formasyonu için olumlu olarak yorumlanabilir. Ancak 3. ve 7. gün salım sonuçları L-PRF grubunun özellikle 400xg 12dk, 600xg 10 dk ve 800xg 14 dk olmak üzere diğer devir ve dk gruplarının gerisine düştüğünü göstermektedir. Bu sonuç ise L-PRF cihazının salım süresinin beklendiği kadar uzun olmadığını düşündürmektedir.



Choukroun isimli araştırıcı orijinal L-PRF protokolünün düşük santrifüj hızı, uzun santrifüj zamanı ve cam tüpün kullanıldığı bir varyasyon geliştirmiş, bu yöntem ve cihaza A-PRF adını vermiştir [199] A-PRF protokolünde hastadan 10 ml kan cam kaplı plastik tüpe alındıktan sonra 1500 rpm’de 14 dk süreyle santrifüj edilmektedir [199]. Yara iyileşmesi, yumuşak ve sert doku biyolojisinde lökositlerin önemli görevleri olduğu bilinmektedir [211]. Santrifüj hızının azaltılması ve santrifüj süresinin uzatılması ile pıhtının distal kısmında daha fazla platelet konsantrasyonu, lökosit ve inflamasyonda çok önemli rolü olan nötrofik granüositleri barındırdığı görülmüştür. Nötrofilik granüosit başta olmak üzere bu gibi hücrelerin A-PRF pıhtısında yüksek oranda bulunmasıyla birlikte konak makrofaj farklılaşmasını sağlayabileceği düşünülmektedir. Makrofajlar kemik dokusu remodelinginde önemli bir gereksinimdir ve osteoblast farklılaşmasını 23 kat arttırdıkları görülmüştür [130, 212]. Bunun yanısıra makrofajlar biyomateryal entegrasyonunda anahtar role sahip ve materyal entegrasyonunda hücre tipini belirlemekten sorumludur [213]. A-PRF özellikle monosit/makrofaj ve büyüme faktörlerinin varlığıyla kemik ve yumuşak doku rejenerasyonunu sağlayabilmektedir [1]. Choukroun, santrifüj hızlarının yüksek olması lökositlerin santrifüj tüpünün dibine iteceğini ve PRF maktris pıhtısından uzaklaşacağını vurgulamaktadır [199]. Dohan isimli araştırıcı ise düşük devir protokollerinin uygulanmasının kan komponentlerinin ayrıştırılmasını ve lökositlerin aktivasyonu için yetersiz olduğunu vurgulamaktadır. Nitekim A-PRF ve L-PRF yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına bakıldığında L-PRF’nin sıkı fibrin pıhtıya ve minimal interfibröz alana sahip olduğu A-PRF’nin ise gevşek yapıda, daha fazla interfibröz alana ve pıhtı içerisinde hapsolmuş daha fazla hücreye sahip olduğu gösterilmiştir [1]. Ayrıca düşük g kuvvet ve hız 10 ml’lik kan tüpü kullanılmasına rağmen daha küçük, düşük fibrin polimerizasyonu ve zayıf biyolojik özelliklere sahip bir jel oluştuğu görülmüştür. Dolayısıyla ideal kan separasyonunun ve büyük hacimde L-PRF eldesinin 2700 rpm 12 dk (700xg) protokolü ile alınabileceği belirtilmektedir. Araştırmamızda ilişkili bir veri olmamakla birlikte hacimli jel yapısının genelde 400 ve 600xg gruplarında oluştuğu gözlenmiş, 200 ve 800xg gruplarında ise daha küçük jeller elde edilmiştir. Bu bulgu Dohan isimli araştırıcının iddiasını desteklemekte ve ilgili araştırmanın sonuçları ile uyum göstermektedir.

Temel olarak yara iyileşmesi iltihabi faz, proliferatif faz ve yeniden şekillenme (remodeling) fazı olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Büyüme faktörleri bu üç aşamada da önemli fonksiyonlara sahiptir. Doku yaralanmasından sonra ilk olarak iç ve dış kökenli faktörler sayesinde pıhtı formasyonunun oluşumu ile iltihabi faz başlamaktadır. Aktif trombositler; PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF için en önemli kaynaktır. Yara bölgesine komşu diğer hücrelerden PDGF, TGF, IGF gibi faktörler yaralanmadan birkaç saat sonra salınmaya başlamaktadır. Birkaç gün sonra başlayan proliferatif faz ile birlikte yara bölgesine ulaşan makrofajlar, PDGF, TGF gibi faktörlerin bir başka kaynağıdır [212]. Trombositlerin alfa granüllerinde bulunan TGF, PDGF, EGF, IGF-1 ve VEGF gibi büyüme faktörleri ve IL-1, IL-6 gibi sitokinler iyileşme basamaklarında önemli rol oynamaktadırlar [214].

Çalışmamızda salım miktarının ELISA yöntemi ile test edilmesine karar verilen büyüme faktörlerinden PDGF'nin asıl kaynağı trombositlerdeki alfa granülleridir. PDGF hücre proliferasyonunda yeterlilik faktörüdür ve IGF'ler gibi ilerletme faktörleriyle sinerjik etki göstermektedir [213]. PDGF'nin –AB izoformu mezenkimal hücreler için mitojenik ve kemotaktiktir. Fibroblast proliferasyonunu artırarak ekstraselüler matris yapımını artırdığı gösterilmiştir. PDGF, dokunun yeniden yapılanması kısmında matris metalloproteinazları arttırarak kollajen yıkımında rol almaktadır [215]. Kan damarlarının oluşumu ve hücre proliferasyonunu başlatmada VEGF, oluşan damarların yeniden yapılanması ve olgunlaşması görevini de PDGF yapmaktadır [145]. Araştırma bulguları incelendiğinde PDGF salımının günlere göre değişimi incelendiğinde ilk gün burst (patlayıcı) bir protein salımı olduğunu gösterirken bu değerler 3. ve 7.günlere doğru azalma eğilimi göstermiştir. Tüm gruplarda bu seyir benzerdir.

PDGF'nin biyolojik etkinliği incelendiğinde, trombositlerin yara iyileşmesinin erken fazında devreye giren  $\alpha$  granüllerinden bu faktörü özellikle ilk günlerde ortama saldığı bilinmektedir [216] ve dolayısıyla bilinen bu biyolojik gerçek ile çalışma sonucumuz uyumludur. Literatürdeki PRF hazırlanması sonrası PDGF salım değerlerini inceleyen araştırmalara baktığımızda Dohan ve arkadaşlarının PDGF-AB'nin yavaş salım sürecinde fibrin matris içerisine gömülmüş büyüme faktörleri miktarının santrifüj edildiği zaman elde edilen büyüme faktörleri

miktarından daha fazla olduğu gösterilmiştir. PDGF-AB tipik olarak sadece plateletlerden salınır ve PRF membran dışında kaynağı bulunmamaktadır. Çalışmamızda yer alan PDGF-AB salım sonuçlarına baktığımızda ise 600xg 14 dk ve 800xg 10 dk değerlerine sahip gruplarda ilk gün elde edilen salım değerleri özellikle 200xg 10 dk, 200xg 12 dk, 200xg 14 dk değere sahip gruplara kıyasla olmak üzere tüm gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, göreceli yüksek santrifüj devri ile ilk gün ortama daha fazla PDGF-AB salınabileceğini göstermektedir. Üçüncü günde santrifüj protokolleri benzer salım davranışı ortaya koyarken 7. günde 200xg 14 dk'nın salım değeri diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksektir. Yukarıda belirtilen 1. gün sonuçları, Dohan ve arkadaşlarının [209] yapmış olduğu çalışmayla benzerlik gösterirken 7. güne gelindiğinde elde edilen sonuçlar Choukroun ve arkadaşlarının [199] gerçekleştirmiş olduğu çalışma ile uyumludur.

Choukroun ve arkadaşları [1] A-PRF'de 'transizyon zonu olan 'buffy coat'tan uzak distal kısımda daha çok trombosit bulunduğu ve pıhtının distal kısmında bulunan nötrofilik granülositlerin de sayısında görülen artış gibi sebeplerden dolayı düşük santrifüj devirlerinin hücrel aktivite üzerinde avantaj sağlayabileceğini iddia etmektedir. Araştırmamızdaki günler arası PDGF-AB salım miktarlarının değerlendirilmesine baktığımızda ise 200xg 10 dk, 200xg 12 dk, 200xg 14 dk'lık gruplarda 1.günde 7.güne göre anlamlı olarak düşük bulunmuş ve benzer şekilde 600xg 14 dk grubunda ise 1.gündeki salım değeri 7. güne göre anlamlı olarak düşük görülmüştür. İlk günde 200xg 10 dk, 200xg 12 dk'lık protokollerde elde edilen salım değeri 3. günden anlamlı derecede yüksek bulunurken yine ilk gündeki 800xg 10dk, 800xg 12 dk'lık gruptaki salım değeri 3. günden anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar 200xg 10 dk, 200xg 12 dk, 200xg 14 dk gibi düşük devirlerde çalışılan grupların ilk günde ortama daha yüksek sonraki günlerde ise diğer protokollere göre daha düşük salımı yapabileceğini ve böylece ortamdaki PDGF-AB salım sürelerini yukarıda iddia edildiği gibi uzatamayacağını göstermektedir.

TGF- $\beta$ 1 doku tamiri, ekstraselüler matris sentezi, immün cevabın düzenlenmesinde rol oynamakta ve osteoblast benzeri hücrelerin farklılaşmasına yol açmaktadır. TGF- $\beta$ 1, PDGF'nin stimüle ettiği osteoblast hücrelerinin

proliferasyonunu artırmakta ve osteoklast oluşumu ile kemik rezorpsiyonunu engellemektedir [217]. Çalışmamızdaki TGF- $\beta$ 1 sonuçlarına bakıldığında başlangıçta L-PRF yöntemi için yüksek görülen değerler 3. ve 7. günde 400xg 12 dk lehine değişmiştir. Ayrıca 1. günden 7. güne doğru gidildikçe yüksek ve düşük santrifüj devirleri, yaptıkları salım miktarlarını azaltmıştır. Buna göre çalışmamızdaki maksimum ve minimum değerlerdeki merkezkaç kuvvetlerinde elde edilen protein salımı ilk gün artış gösterirken 7. günde bu değer anlamlı bir şekilde düşüşü izlenmektedir. Literatürdeki PRF hazırlanması sonrası TGF- $\beta$ 1 salım değerlerini inceleyen araştırmalara baktığımızda Eren ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, TGF- $\beta$ 1'in salım değerlerinde 1.güne kadar belirgin artış ve ardından 3.günde de hafif bir artıştan sonra 7.gün sonunda hafif bir düşüş gözlenmektedir [198]. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumlu gözlenmektedir.

IL-1 $\beta$ , PRF'ye immün özellik kazandırarak savunmada rol almaktadır [216]. IL-1 $\beta$ , yaralanma ve enfeksiyon durumunda gerekli konak yanıtında önemli bir role sahip olan pro-inflamatuar bir sitokindir. Çalışmaların büyük bir çoğunluğu, monosit ve makrofaj gibi doğal immün sistem hücrelerinden salgılanan IL-1 üzerinde yoğunlaşmıştır. Lökosit kemotaksisi, monosit/makrofaj aktivasyonu, MMP'lerin ve prostoglandinlerin üretimi, T hücresi aktivasyonu gibi enflamatuar ve immunolojik olayların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [218]. IL-1 $\beta$ 'nın araştırmamızda yer alan gruplar arası salım değerlerini değerlendirdiğimizde ilk gün L-PRF lehine olan sonuç devamında 600xg 10 dk ve 800xg 14 dk lehine bozulmuştur. Ayrıca başlangıçta düşük devirler daha çok salım sağlarken devam eden süreçte salım değerleri dengelenmiştir. Schar ve arkadaşlarının [219] PRF hazırlanması sonrası IL-1 $\beta$  salım değerlerini inceleyen araştırmasına baktığımızda 1. günde çarpıcı bir artış, 3. günde bir miktar azalma, 7. günde ise belirgin bir azalma görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise 1. ve 3. günde artış, 7. günde ise belirgin bir düşüş gözlenmektedir. Bu sonuçlara baktığımızda çalışmamızın IL-1 $\beta$  salım sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu düşünülmüştür.

Choukroun'un [210] geliştirdiği enjekte edilebilir PRF yöntemi (Injectable Platelet-Rich Fibrin, I-PRF) sonucunda elde edilen jel içerisinde beyaz kan hücreleri ve trombositlerin yanı sıra dolaşımda yer alan kök hücreleri ve endotel hücreleri de

bulunmaktadır. I-PRF 700 rpm'de 3 dakika (60xg) santrifüj edilerek elde edilmekte ve partiküler kemik greftleriyle birleştirilerek (jelöz kemik grefti-sticky bone) veya dişeti ve deri gibi dokuların içerisine direk enjekte edilerek kullanılabilir. PRP ve I-PRF'nin saldığı büyüme faktörlerinin 15. dakika, 60. Dakika, 8. saat, 1. gün, 3. gün ve 10. günlerde değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre PRP ve I-PRF'nin içerdiği büyüme faktörlerinin fibroblastları uyarak doku rejenerasyonunu sağlayabildiği ve salımı gerçekleşen büyüme faktörlerinin ilk gün çok yüksek değerde izlenip sonraki günlerde keskin bir azalışla 10. güne kadar devam ettiği gözlenmiştir. Bu çalışma sonuçları bizim çalışma gruplarımızdan düşük g kuvvetleriyle ilk günlerde elde ettiğimiz yüksek miktardaki büyüme faktör salımı sonraki günlerde belirgin bir azalmayla 7. güne kadar devam eden sonuçlarla örtüşmektedir.

Çalışmamızdaki PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1 ve IL-1 $\beta$ 'nin gruplar arası genel olarak değerlendirilmesinde; 1.günde düşük g kuvvetlerinin salım değerlerinde belirgin düzeyde artış, 3. günde görece olarak azalma ve 7. günde azalarak devam etme eğilimi görülmektedir. Yüksek g kuvvetlerinin salım değerleri ilk günlerde düşük seyrederken 3. gün ve özellikle 7. günde belirgin artış göstermiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar yukarıdaki belirtilen araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir. Dohan ve ark. artan g değeri ile salınan faktör miktarını ve süresini orantılı bulmuştur [209]. Mevcut çalışmamızda ilk gün oluşan yüksek değerdeki büyüme faktörü ve sitokin salımı da bu araştırmacıların sonuçlarını destekler niteliktedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

PRF hazırlanmasında farklı santrifüj parametrelerinin büyüme faktörleri ve sitokin değerleri üzerindeki etkisini inceleyen araştırmamızın sonucunda elde edilen bulgular ve mevcut literatür bilgisi irdelendiğinde aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir:

- Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre standart masaüstü santrifüjleri L-PRF cihazına uygun alternatif olabilir ve daha uzun süre ile büyüme faktörü/sitokin salımı sağlayabilir.
- Yüksek g kuvvetleri total protein salımı miktarı ve süresi açısından daha iyi sonuçlar vermiştir.
- Maksimum büyüme faktörü/sitokin salımını sağlamak için orijinal L-PRF cihazı ya da standart masaüstü santrifüjünde yüksek g kuvvetleri kullanılabilir.
- Düşük g kuvvetleri ile elde edilen büyüme faktörü/sitokin salımı miktarları ilk günlerde yüksek aktivite gösterip sonraki günlerde belirgin azalma eğilimiyle I-PRF gibi kan konsantrelerine benzer salım profiline sahiptir.
- Elde edilen PRF membranların başarısı kanın damardan hızlı bir şekilde alınıp tüplere aktarılması ve tüplerin yine aynı şekilde hızlıca santrifüj cihazına transfer edilmesi kritik öneme sahiptir.

Gelecekte cihazın mekanik özelliklerinin değerlendirildiği, farklı protokol ve santrifüjlerle hazırlanan jellerin hücresel içeriklerinin, fiziksel dayanıklılıklarının, biyolojik ortamda kalma sürelerinin incelendiği in vitro ve in vivo araştırmalara ihtiyaç vardır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Ghanaati, S., et al., *Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells*. Journal of Oral Implantology, 2014. **40**(6): p. 679-689.
2. Ehrenfest, D.D., et al., *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. Part 1: evaluation of the vibration shocks of 4 models of table centrifuges for L-PRF*. POSEIDO, 2014. **2**(2)): p. 129-39.
3. Joseph, V.R., A. Raghunath, and N. Sharma, *Clinical effectiveness of autologous platelet rich fibrin in the management of infrabony periodontal defects*. Singapore dental journal, 2012. **33**(1): p. 5-12.
4. Jankovic, S., et al., *The coronally advanced flap in combination with platelet-rich fibrin (PRF) and enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: a comparative study*. Eur J Esthet Dent, 2010. **5**(3).
5. Tatullo, M., et al., *Platelet Rich Fibrin (PRF) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations*. International journal of medical sciences, 2012. **9**(10): p. 872.
6. Kim, T.-H., et al., *Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing*. Archives of oral biology, 2014. **59**(5): p. 550-558.
7. Gassling, V., et al., *Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering*. Clinical oral implants research, 2010. **21**(5): p. 543-549.
8. Li, Q., et al., *Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation*. BioMed research international, 2013. **2013**.
9. Eren, G. and G. Atilla, *Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a split-mouth randomized clinical trial*. Clinical oral investigations, 2014. **18**(8): p. 1941-1948.
10. Tunali, M., et al., *In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate*. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2013. **51**(5): p. 438-443.
11. Gürbüz, B., et al., *Scintigraphic evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2010. **68**(5): p. 980-989.
12. Su, C.Y., et al., *In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009. **108**(1): p. 56-61.
13. Lekovic, V., et al., *Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects*. Journal of periodontal research, 2012. **47**(4): p. 409-417.

14. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e45-e50.
15. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e51-e55.
16. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e37-e44.
17. Cortellini, P. and G.M. Bowers, *Periodontal regeneration of intrabony defects: an evidence-based treatment approach*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 1995. **15**(2).
18. Zander, H.A., A.M. Polson, and L.C. Heijl, *Goals of periodontal therapy*. Journal of periodontology, 1976. **47**(5): p. 261-266.
19. Karring, T., et al., *New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament*. Journal of clinical periodontology, 1985. **12**(1): p. 51-60.
20. KARRING, T., et al., *Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies*. Periodontology 2000, 1993. **1**(1): p. 26-35.
21. Giannobile, W.V., *Commentary: treatment of periodontitis: destroyed periodontal tissues can be regenerated under certain conditions*. Journal of periodontology, 2014. **85**(9): p. 1151-1154.
22. Kao, R.T., S. Nares, and M.A. Reynolds, *Periodontal regeneration—intrabony defects: a systematic review from the AAP regeneration workshop*. Journal of periodontology, 2015. **86**(2-s): p. S77-S104.
23. Isidor, F., et al., *New attachment—reattachment following reconstructive periodontal surgery*. Journal of clinical periodontology, 1985. **12**(9): p. 728-735.
24. Nyman, S., et al., *The regenerative potential of the periodontal ligament*. Journal of clinical periodontology, 1982. **9**(3): p. 257-265.
25. Meyer, J.R., *The regenerative potential of the periodontal ligament*. The Journal of prosthetic dentistry, 1986. **55**(2): p. 260-265.
26. Nyman, S., et al., *New attachment following surgical treatment of human periodontal disease*. Journal of clinical periodontology, 1982. **9**(4): p. 290-296.
27. Cortellini, P. and M.S. Tonetti, *Clinical concepts for regenerative therapy in intrabony defects*. Periodontology 2000, 2015. **68**(1): p. 282-307.
28. Sculean, A., et al., *Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review*. Periodontology 2000, 2015. **68**(1): p. 182-216.
29. Gottlow, J., et al., *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports*. Journal of clinical periodontology, 1986. **13**(6): p. 604-616.



30. Ivanovski, S., *Periodontal regeneration*. Australian dental journal, 2009. **54**(s1).
31. Garrett, J.S., *Root planing: A perspective*. Journal of periodontology, 1977. **48**(9): p. 553-557.
32. Boyko, G. and A. Melcher, *Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro*. Journal of Periodontal Research, 1980. **15**(3): p. 297-303.
33. Shetty, B., A. Dinesh, and H. Seshan, *Comparitive effects of tetracyclines and citric acid on dentin root surface of periodontally involved human teeth: A scanning electron microscope study*. Journal of Indian Society of Periodontology, 2008. **12**(1): p. 8.
34. Claffey, N., et al., *Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles*. Acta Odontologica Scandinavica, 1987. **45**(3): p. 141-146.
35. Fuentes, P., et al., *Treatment of periodontal furcation defects*. Journal of clinical periodontology, 1993. **20**(6): p. 425-430.
36. Silva, A.C., et al., *Biological effects of a root conditioning treatment on periodontally affected teeth-An in vitro analysis*. Brazilian dental journal, 2016. **27**(2): p. 160-168.
37. Carranza, F.A. and P. Camargo, *The periodontal pocket*. Clinical Periodontology, 10th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2006: p. 434-451.
38. Nasr, H.F., M.E. Aichelmann-Reidy, and R.A. Yukna, *Bone and bone substitutes*. Periodontology 2000, 1999. **19**(1): p. 74-86.
39. Hoexter, D.L., *Bone regeneration graft materials*. Journal of oral implantology, 2002. **28**(6): p. 290-294.
40. Froum, S.J., M.A. Weinberg, and D. Tarnow, *Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study*. Journal of periodontology, 1998. **69**(6): p. 698-709.
41. Sali, D.D. and J. Pauline George, *Demineralized Freeze Dried Bone Allograft With Amniotic Membrane in the Treatment of Periodontal Intrabony Defects- 12 Month Randomized Controlled Clinical Trial*. Journal of periodontology, 2016(0): p. 1-18.
42. Parikh, S., *Bone graft substitutes: past, present, future*. Journal of postgraduate medicine, 2002. **48**(2): p. 142.
43. Attia, A.M., *CLINICAL AND RADIOGRAPHIC EVALUATION OF CORTICO-CANCELLOUS BONE MIX XENOGRAFT (OSTEOBIOL GEN-OS®) IN THE TREATMENT OF HUMAN PERIODONTAL INTRABONY DEFECTS*. DENTAL JOURNAL, 2017. **63**: p. 1.
44. Hoffmann, T., et al., *Three-year results following regenerative periodontal surgery of advanced intrabony defects with enamel matrix derivative alone or combined with a synthetic bone graft*. Clinical oral investigations, 2016. **20**(2): p. 357-364.
45. Hiatt, W.H., R.G. Schallhorn, and A.J. Aaronian, *The Induction of New Bone and Cementum Formation: IV. Microscopic Examination of the Periodontium Following Human Bone and Marrow Allograft, Autograft and Nongraft Periodontal Regenerative Procedures*. Journal of Periodontology, 1978. **49**(10): p. 495-512.

46. Joos, U. and J. Kleinheinz, *Reconstruction of the severely resorbed (Class VI) jaws: routine or exception?* Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2000. **28**(1): p. 1-4.
47. Pjetursson, B.E., et al., *A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation.* Journal of clinical periodontology, 2008. **35**(s8): p. 216-240.
48. Marchetti, C., et al., *Impact of implant surface and grafting protocol on clinical outcomes of endosseous implants.* International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2007. **22**(3).
49. Nkenke, E., et al., *Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study.* Clinical oral implants research, 2002. **13**(5): p. 514-521.
50. Spin-Neto, R., et al., *Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction.* Clinical implant dentistry and related research, 2013. **15**(4): p. 490-497.
51. Silva, F.M.S., et al., *Complications of intraoral donor site for bone grafting prior to implant placement.* Implant dentistry, 2006. **15**(4): p. 420-426.
52. Monje, A., et al., *On the feasibility of utilizing allogeneic bone blocks for atrophic maxillary augmentation.* BioMed research international, 2014. **2014**.
53. Pereira, E., et al., *Horizontal Resorption of Fresh-Frozen Corticocancellous Bone Blocks in the Reconstruction of the Atrophic Maxilla at 5 Months.* Clinical implant dentistry and related research, 2015. **17**(S2).
54. Deluiz, D., et al., *Time-Dependent Changes in Fresh-Frozen Bone Block Grafts: Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Findings.* Clinical implant dentistry and related research, 2015. **17**(2): p. 296-306.
55. Paknejad, M., et al., *Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: A histological and histomorphometric study of rabbit calvaria.* Journal of dentistry (Tehran, Iran), 2014. **11**(6): p. 687.
56. Carmagnola, D., P. Adriaens, and T. Berglundh, *Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®.* Clinical oral implants research, 2003. **14**(2): p. 137-143.
57. Chacko, N.L., et al., *A clinical and radiographic evaluation of periodontal regenerative potential of PerioGlas®: a synthetic, resorbable material in treating periodontal intrabony defects.* Journal of international oral health: JIOH, 2014. **6**(3): p. 20.
58. Maroo, S. and K.R.V. Murthy, *Treatment of periodontal intrabony defects using  $\beta$ -TCP alone or in combination with rhPDGF-BB: a randomized controlled clinical and radiographic study.* International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2014. **34**(6).
59. Papageorgiou, A., I. Vouros, and A. Konstantinidis, *Treatment outcomes of ligature-induced recession in the dog model using guided tissue regeneration or coronally positioned flap procedures.* Journal of the International Academy of Periodontology, 2009. **11**(2): p. 177-187.
60. Cortellini, P., G.P. Prato, and M.S. Tonetti, *Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial.* Journal of periodontology, 1995. **66**(9): p. 797-803.

61. Pontoriero, R., et al., *Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars*. Journal of Clinical Periodontology, 1988. **15**(4): p. 247-254.
62. Becker, W., et al., *Autogenous Bone Grafting of Bone Defects Adjacent to Implants Placed Into Immediate Extraction Sockets in Patients: A Prospective Study*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 1994. **9**(4).
63. Buser, D., et al., *Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes*. Periodontology 2000, 1999. **19**(1): p. 151-163.
64. Nobréus, N., R. Attström, and A. Linde, *Guided bone regeneration in dental implant treatment using a bioabsorbable membrane*. Clinical oral implants research, 1997. **8**(1): p. 10-17.
65. Donos, N., L. Kostopoulos, and T. Karring, *Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts*. Clinical Oral Implants Research, 2002. **13**(2): p. 203-213.
66. Stavropoulos, F., et al., *A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects*. Clinical oral implants research, 2004. **15**(4): p. 435-442.
67. Caffesse, R.G., et al., *Guided tissue regeneration: comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs*. Journal of periodontology, 1994. **65**(6): p. 583-591.
68. Parrish, L.C., et al., *Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review*. Journal of oral science, 2009. **51**(3): p. 383-400.
69. Gestrelius, S., S. Lyngstadaas, and L. Hammarström, *Emdogain-periodontal regeneration based on biomimicry*. Clinical oral investigations, 2000. **4**(2): p. 120-125.
70. Heden, G., *A case report study of 72 consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after 1 year*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2000. **20**(2).
71. Chitsazi, M.T., et al., *Efficacy of open flap debridement with and without enamel matrix derivatives in the treatment of mandibular degree II furcation involvement*. Clinical oral investigations, 2007. **11**(4): p. 385-389.
72. Casarin, R.C.V., et al., *A double-blind randomized clinical evaluation of enamel matrix derivative proteins for the treatment of proximal class-II furcation involvements*. Journal of clinical periodontology, 2008. **35**(5): p. 429-437.
73. Peres, M.F., et al., *Hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate and enamel matrix derivative for treatment of proximal class II furcation defects: a randomized clinical trial*. Journal of clinical periodontology, 2013. **40**(3): p. 252-259.
74. Masaeli, R., et al., *Using Enamel Matrix Derivative to Improve Treatment Efficacy in Periodontal Furcation Defects*. Journal of Prosthodontics, 2018.
75. Lee, J., et al., *Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors*. Dental Clinics of North America, 2010. **54**(1): p. 93-111.
76. Raja, S., G. Byakod, and P. Pudukalkatti, *Growth factors in periodontal regeneration*. International journal of dental hygiene, 2009. **7**(2): p. 82-89.

77. Parkar, M., et al., *Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells*. Archives of oral biology, 2001. **46**(3): p. 275-284.
78. Graves, D., Y. Kang, and K. Kose, *Growth factors in periodontal regeneration*. Compendium (Newtown, Pa.). Supplement, 1994(18): p. S672-7; quiz S714-7.
79. Graves, D.T. and D.L. Cochran, *Mesenchymal cell growth factors*. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1990. **1**(1): p. 17-36.
80. Adams, P., et al., *Role of platelets in atherogenesis: relevance to coronary arterial restenosis after angioplasty*. Cardiovascular clinics, 1987. **18**(1): p. 49-71.
81. Zachary, I., *Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **280**(6): p. C1375-C1386.
82. Prapulla, D.V., P.B. Sujatha, and A. Pradeep, *Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease*. Journal of periodontology, 2007. **78**(9): p. 1783-1787.
83. Suthin, K., et al., *Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts*. Journal of periodontal research, 2003. **38**(1): p. 90-96.
84. Dinarello, C., *The IL-1 family and inflammatory diseases*. Clinical and experimental rheumatology, 2002. **20**(5; SUPP/27): p. S1-S13.
85. Dinarello, C.A., *Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation*. Current opinion in pharmacology, 2004. **4**(4): p. 378-385.
86. Matsuse, K., et al., *Periodontal regeneration induced by porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor in a canine model of 2-wall periodontal defects*. Medical molecular morphology, 2017: p. 1-9.
87. Shea, B.T. and A.M. Gomez, *Tooth scaling and evolutionary dwarfism: an investigation of allometry in human pygmies*. American Journal of Physical Anthropology, 1988. **77**(1): p. 117-132.
88. Wieman, T.J., J.M. Smiell, and Y. Su, *Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo-controlled double-blind study*. Diabetes care, 1998. **21**(5): p. 822-827.
89. BURSTEIN, N.L., *Growth factor effects on corneal wound healing*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 1987. **3**(3): p. 263-277.
90. Laato, M., et al., *Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes*. Biochemical Journal, 1987. **247**(2): p. 385-388.
91. Lee, J.H., et al., *Synergistic induction of early stage of bone formation by combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and epidermal growth factor*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2015. **9**(4): p. 447-459.

92. Sipe, J.B., et al., *Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2,-4, and-6 within megakaryocytes and platelets*. *Bone*, 2004. **35**(6): p. 1316-1322.
93. Lissenberg-Thunnissen, S.N., et al., *Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing*. *International orthopaedics*, 2011. **35**(9): p. 1271.
94. Wang, E.A., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(6): p. 2220-2224.
95. Sigurdsson, T.J., et al., *Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration*. *Journal of periodontology*, 1995. **66**(2): p. 131-138.
96. Luo, T., et al., *Enhanced bone regeneration around dental implant with bone morphogenetic protein 2 gene and vascular endothelial growth factor protein delivery*. *Clinical oral implants research*, 2012. **23**(4): p. 467-473.
97. Neel, E.A.A., et al., *Tissue engineering in dentistry*. *Journal of dentistry*, 2014. **42**(8): p. 915-928.
98. Egusa, H., et al., *Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources*. *Journal of prosthodontic research*, 2012. **56**(3): p. 151-165.
99. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-317.
100. Nohutcu, R., et al., *Expression of mineral-associated proteins by periodontal ligament cells: in vitro vs. ex vivo*. *Journal of periodontal research*, 1996. **31**(5): p. 369-372.
101. Nohutcu, R.M., et al., *Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro*. *Journal of periodontology*, 1997. **68**(4): p. 320-327.
102. El-Sayed, K.F., et al., *Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field*, in *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. 2012, Springer. p. 89-103.
103. Kanafi, M.M., et al., *Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice*. *Cytotherapy*, 2013. **15**(10): p. 1228-1236.
104. Nakashima, M., K. Iohara, and M. Sugiyama, *Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration*. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009. **20**(5): p. 435-440.
105. Gomes, J.Á.P., et al., *Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2010. **51**(3): p. 1408-1414.
106. Gay, I.C., S. Chen, and M. MacDougall, *Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells*. *Orthodontics & craniofacial research*, 2007. **10**(3): p. 149-160.
107. Ishikawa, I., et al., *Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration*. *Periodontology 2000*, 2009. **51**(1): p. 220-238.
108. Seo, B.-M., et al., *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament*. *The Lancet*, 2004. **364**(9429): p. 149-155.

109. Cochran, D.L., et al., *Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop*. Journal of periodontology, 2015. **86**(2-s): p. S153-S156.
110. Abbayya, K., et al., *Cell-and gene-based therapeutics for periodontal regeneration*. International journal of preventive medicine, 2015. **6**.
111. Ramseier, C.A., et al., *Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine*. Dental Clinics, 2006. **50**(2): p. 245-263.
112. Nakahara, T., *A review of new developments in tissue engineering therapy for periodontitis*. Dental Clinics, 2006. **50**(2): p. 265-276.
113. Chen, F.M., et al., *Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives*. Medicinal Research Reviews, 2009. **29**(3): p. 472-513.
114. Rios, H.F., et al., *Cell-and Gene-Based Therapeutic Strategies for Periodontal Regenerative Medicine*. Journal of periodontology, 2011. **82**(9): p. 1223-1237.
115. Pilipchuk, S.P., et al., *Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity*. Dental Materials, 2015. **31**(4): p. 317-338.
116. Luo, J., et al., *Gene therapy for bone regeneration*. Current gene therapy, 2005. **5**(2): p. 167-179.
117. Stiehler, M., et al., *Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells*, in *Tissue Engineering*. 2006, Springer. p. 31-48.
118. Campos, S.K. and M.A. Barry, *Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting*. Current gene therapy, 2007. **7**(3): p. 189-204.
119. Franceschi, R., *Biological approaches to bone regeneration by gene therapy*. Journal of dental research, 2005. **84**(12): p. 1093-1103.
120. Tai, C.-K. and N. Kasahara, *Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2008. **13**: p. 3083-3095.
121. Sood, S., S. Gupta, and A. Mahendra, *Gene therapy with growth factors for periodontal tissue engineering—A review*. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal, 2012. **17**(2): p. e301.
122. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 1998. **85**(6): p. 638-646.
123. Laurens, N., P. Koolwijk, and M. De Maat, *Fibrin structure and wound healing*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006. **4**(5): p. 932-939.
124. Kumar, V., *Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis*. Pathologic basis of disease, 2005: p. 87-118.
125. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet  $\alpha$ -granules: basic biology and clinical correlates*. Blood reviews, 2009. **23**(4): p. 177-189.
126. Anitua, E., et al., *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. Thrombosis and haemostasis, 2004. **91**(1): p. 4-15.
127. Choukroun, J., et al., *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 Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. 299-303.

128. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiological reviews, 2003. **83**(3): p. 835-870.
129. Carlson, N.E. and R.B. ROACH, *Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry*. The Journal of the American Dental Association, 2002. **133**(10): p. 1383-1386.
130. Nurden, A.T., et al., *Platelets and wound healing*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2008. **13**: p. 3532-3548.
131. Kark, L.R., J.M. Karp, and J.E. Davies, *Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions*. Clinical oral implants research, 2006. **17**(3): p. 321-327.
132. Anitua, E., et al., *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(2): p. 281-286.
133. Nagai, M., et al., *Effects of application of platelet releasate in periodontal regeneration therapy*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2005. **25**(6).
134. Pierce, G., et al., *Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair*. The American journal of pathology, 1992. **140**(6): p. 1375.
135. Okuda, K., et al., *Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro*. Journal of Periodontology, 2003. **74**(6): p. 849-857.
136. Cetinkaya, B.O., et al., *The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease*. Journal of periodontology, 2007. **78**(6): p. 1129-1135.
137. Baylink, D.J., R.D. Finkelman, and S. Mohan, *Growth factors to stimulate bone formation*. Journal of Bone and Mineral Research, 1993. **8**(S2).
138. Feng, X., et al., *Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of  $\alpha v/\beta 3$  mRNA by fibrin1*. Journal of investigative dermatology, 1999. **113**(6): p. 913-919.
139. Jang, E.-S., et al., *Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2010. **109**(6): p. 831-836.
140. Mosesson, M.W., K.R. Siebenlist, and D.A. Meh, *The structure and biological features of fibrinogen and fibrin*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **936**(1): p. 11-30.
141. Carlson, E., *Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein*. The Alpha omegan, 2000. **93**(3): p. 26-30.
142. Ehrenfest, D.D., et al., *Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, or Platelet-Rich Fibrin-PRF): the international classification of the POSEIDO*. Poseido J, 2013. **1**: p. 17-28.

143. Freire, M.O. and T.E. Van Dyke, *Natural resolution of inflammation*. Periodontology 2000, 2013. **63**(1): p. 149-164.
144. Sculean, A., R. Gruber, and D.D. Bosshardt, *Soft tissue wound healing around teeth and dental implants*. Journal of clinical periodontology, 2014. **41**(s15).
145. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound repair and regeneration, 2008. **16**(5): p. 585-601.
146. Miron, R.J., et al., *Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2017. **23**(1): p. 83-99.
147. Ehrenfest, D.M.D., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends in biotechnology, 2009. **27**(3): p. 158-167.
148. Kobayashi, M., et al., *A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use*. Biologicals, 2012. **40**(5): p. 323-329.
149. Choukroun, J., et al., *Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF*. Implantodontie, 2001. **42**(55): p. e62.
150. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane*. Journal of periodontology, 2010. **81**(4): p. 546-555.
151. Tunali, M., et al., *A novel platelet concentrate: Titanium-prepared platelet-rich fibrin*. BioMed research international, 2014. **2014**.
152. Tunali, M., et al., *Titanium Prepared Platelet-rich Fibrin (tprf): A Third-generation Platelet Concentrate: A Pilot Study*. Journal of Clinical Periodontology, 2012. **39**: p. 126.
153. Tunali, M., et al., *A New Centrifugation Method for the Improvement of Platelet-rich Fibrin Products: A Preliminary Study*. 2016.
154. Griffin, T.J., et al., *Postoperative complications following gingival augmentation procedures*. Journal of periodontology, 2006. **77**(12): p. 2070-2079.
155. Hinsbergh, V.W., A. Collen, and P. Koolwijk, *Role of fibrin matrix in angiogenesis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **936**(1): p. 426-437.
156. Badiavas, E.V., et al., *Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing*. Journal of cellular physiology, 2003. **196**(2): p. 245-250.
157. Gray, A.J., et al., *A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts*. Journal of cell science, 1993. **104**(2): p. 409-413.
158. Choukroun, J., et al., *PRF: an opportunity in perio-implantology (in French)*. Implantodontie, 2000. **42**: p. 55-62.
159. KASNAK, G., M. TUNALI, and H.E. FIRATLI, *Gemişten G n m ze Kan Kaynaklı  r nler ve Trombositten Zengin Fibrinler*. Turkiye Klinikleri J Periodontol-Special Topics, 2017. **3**(3): p. 109-12.



160. Hallman, M., S. Lundgren, and L. Sennerby, *Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue*. *Clinical implant dentistry and related research*, 2001. **3**(2): p. 87-96.
161. Choukroun, J., et al., *A second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. **101**: p. 299-303.
162. Diss, A., et al., *Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 2008. **105**(5): p. 572-579.
163. Toffler, M., N. Toscano, and D. Holtzclaw, *Osteotome-mediated sinus floor elevation using only platelet-rich fibrin: an early report on 110 patients*. *Implant dentistry*, 2010. **19**(5): p. 447-456.
164. Mazor, Z., et al., *Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months*. *Journal of periodontology*, 2009. **80**(12): p. 2056-2064.
165. Kim, B.-J., et al., *A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2012. **113**(5): p. 583-592.
166. Darby, I., S.T. Chen, and D. Buser, *Ridge preservation techniques for implant therapy*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009. **24**(Suppl): p. 260-271.
167. Ruga, E., C. Gallesio, and P. Boffano, *Platelet-rich fibrin and piezoelectric surgery: a safe technique for the prevention of periodontal complications in third molar surgery*. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2011. **22**(5): p. 1951-1955.
168. Shah, M., et al., *Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A systematic review and meta-analysis*. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2014. **18**(6): p. 698.
169. Bansal, C. and V. Bharti, *Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with demineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects*. *Journal of Indian society of periodontology*, 2013. **17**(3): p. 361.
170. Pradeep, A., et al., *Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial*. *Journal of periodontology*, 2012. **83**(12): p. 1499-1507.
171. Pradeep, A., et al., *Platelet-Rich Fibrin With 1.2% Rosuvastatin for Treatment of Intrabony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial*. *Journal of periodontology*, 2016. **87**(12): p. 1468-1473.
172. Panda, S., et al., *Adjunctive effect of autologous platelet-rich fibrin to barrier membrane in the treatment of periodontal intrabony defects*. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2016. **27**(3): p. 691-696.

173. Aydemir Turkal, H., et al., *Evaluation of the adjunctive effect of platelet-rich fibrin to enamel matrix derivative in the treatment of intrabony defects. Six-month results of a randomized, split-mouth, controlled clinical study.* Journal of clinical periodontology, 2016. **43**(11): p. 955-964.
174. Galav, S., et al., *Comparative evaluation of platelet-rich fibrin and autogenous bone graft for the treatment of infrabony defects in chronic periodontitis: Clinical, radiological, and surgical reentry.* Indian Journal of Dental Research, 2016. **27**(5): p. 502.
175. Sharma, A. and A.R. Pradeep, *Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: A randomized clinical trial.* Journal of periodontology, 2011. **82**(10): p. 1396-1403.
176. Kanoriya, D., et al., *Mandibular Degree II Furcation Defects Treatment With Platelet-Rich Fibrin and 1% Alendronate Gel Combination: A Randomized Controlled Clinical Trial.* Journal of periodontology, 2017. **88**(3): p. 250-258.
177. Ehrenfest, D.M.D., et al., *Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way.* Archives of oral biology, 2010. **55**(3): p. 185-194.
178. Chang, I., C.H. Tsai, and Y.C. Chang, *Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts.* Journal of biomedical materials research Part A, 2010. **95**(1): p. 327-332.
179. Tsai, C.-H., et al., *Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro.* Journal of Dental Sciences, 2009. **4**(3): p. 130-135.
180. Su, C.Y., et al., *In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, 2009. **108**(1): p. 56-61.
181. Lee, E.-H., et al., *A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, 2010. **109**(5): p. e33-e38.
182. Huh, J.-Y., et al., *The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2006. **101**(4): p. 426-431.
183. Ozdemir, H., et al., *Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier.* Archives of oral biology, 2013. **58**(5): p. 537-544.
184. Öncü, E., et al., *Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration.* Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal, 2016. **21**(5): p. e601.
185. Knapen, M., et al., *Effect of Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on Bone Regeneration: A Study in Rabbits.* Clinical implant dentistry and related research, 2015. **17**(S1).
186. Ezirganli, S., et al., *Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions.* Clinical oral implants research, 2015. **26**(12): p. 1482-1488.

187. Aroca, S., et al., *Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study*. Journal of periodontology, 2009. **80**(2): p. 244-252.
188. Anilkumar, K., et al., *Platelet-rich-fibrin: A novel root coverage approach*. Journal of Indian Society of Periodontology, 2009. **13**(1): p. 50.
189. Jankovic, S., et al., *The coronally advanced flap in combination with platelet-rich fibrin (PRF) and enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: a comparative study*. Eur J Esthet Dent, 2010. **5**(3).
190. Gupta, S., et al., *Clinical evaluation and comparison of the efficacy of coronally advanced flap alone and in combination with platelet rich fibrin membrane in the treatment of Miller Class I and II gingival recessions*. Contemporary clinical dentistry, 2015. **6**(2): p. 153.
191. Uraz, A., et al., *Comparative evaluation of platelet-rich fibrin membrane and connective tissue graft in the treatment of multiple adjacent recession defects: A clinical study*. Journal of Dental Sciences, 2015. **10**(1): p. 36-45.
192. Castro, A.B., et al., *Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis*. Journal of clinical periodontology, 2017. **44**(1): p. 67-82.
193. Jankovic, S., et al., *Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial*. International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2012. **32**(2): p. 165.
194. Tunali, M., et al., *Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: A 12-month study*. Int J Periodontics Restorative Dent, 2015. **35**(1): p. 105-114.
195. Keceli, H.G., et al., *The adjunctive effect of Platelet-Rich Fibrin to Connective Tissue Graft in the treatment of buccal recession defects: results of a randomized, parallel-group controlled trial*. Journal of periodontology, 2015. **86**(11): p. 1221-1230.
196. Thamaraiselvan, M., et al., *Comparative clinical evaluation of coronally advanced flap with or without platelet rich fibrin membrane in the treatment of isolated gingival recession*. Journal of Indian Society of Periodontology, 2015. **19**(1): p. 66.
197. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *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, 2017: p. 1-14.
198. Eren, G., et al., *Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product*. Platelets, 2016. **27**(5): p. 427-432.
199. Fujioka-Kobayashi, M., et al., *Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response*. Journal of periodontology, 2017. **88**(1): p. 112-121.
200. Peck, M., D. Hiss, and L. Stephen, *Factors affecting the preparation, constituents, and clinical efficacy of leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. South African Dental Journal, 2016. **71**(7): p. 298-302.

201. Gaßling, V.L.W., et al., *Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics. **108**(1): p. 48-55.
202. Simonpieri, A., et al., *The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole During Complex Maxillary Rehabilitations Using Bone Allograft. Part I: A New Grafting Protocol*. Implant Dentistry, 2009. **18**(2): p. 102-111.
203. Inchingolo, F., et al., *Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010. **14**(12): p. 1075-84.
204. Gassling, V., et al., *Comparison of two different absorbable membranes for the coverage of lateral osteotomy sites in maxillary sinus augmentation: a preliminary study*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2013. **41**(1): p. 76-82.
205. Thorat, M., A. Pradeep, and B. Pallavi, *Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial*. Journal of clinical periodontology, 2011. **38**(10): p. 925-932.
206. Nacopoulos, C., et al., *Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft*. J Craniofac Surg, 2014. **25**(6): p. 2164-8.
207. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
208. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics, 2006. **101**(3): p. e37-e44.
209. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *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**(2): p. 171-184.
210. Miron, R.J., et al., *Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?* Clinical oral investigations, 2017. **21**(8): p. 2619-2627.
211. M Dohan Ehrenfest, D., et al., *Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012. **13**(7): p. 1145-1152.
212. William, V., *The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration*. J. Periodontol., 1996. **67**: p. 545-553.
213. Dereka, X., C. Markopoulou, and I. Vrotsos, *Role of growth factors on periodontal repair*. Growth Factors, 2006. **24**(4): p. 260-267.
214. Nurden, A.T., et al., *Platelets and wound healing*. Front Biosci, 2008. **13**(9): p. 3532-48.
215. Jinnin, M., et al., *Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts*. Journal of cellular physiology, 2005. **202**(2): p. 510-517.

216. Passaretti, F., et al., *Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives*. Platelets, 2014. **25**(4): p. 252-256.
217. Ogino, Y., et al., *The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor- $\beta$ 1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, 2006. **101**(6): p. 724-729.
218. Lopez-Castejon, G. and D. Brough, *Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion*. Cytokine & growth factor reviews, 2011. **22**(4): p. 189-195.
219. Schär, M.O., et al., *Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2015. **473**(5): p. 1635-1643.



## 8. EKLER

### Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

#### *(Hekimin Açıklaması);*

“Trombositten Zengin Fibrin hazırlanmasında farklı santrifüj parametrelerinin büyüme faktörleri ve sitokin seviyeleri üzerine etkisi” isimli araştırma yapmayı planlıyoruz. Trombositler kanda doğal olarak bulunmaktadır. Vücudumuzda bir yer kanadığında pıhtılaşmayı sağlayarak hem kanamayı durdururlar hem de yara bölgesinin üzerini örterek korunmasını sağlarlar. Ayrıca trombositlerin içinde bulunan bir takım maddeler ki biz bunlara büyüme faktörleri diyoruz yaranın iyileşmesine katkıda bulunurlar. Bu maddeler çok önemlidir. Trombositten zengin fibrin bu maddeleri daha fazla miktarda içerir. Bu fibrini herhangi bir nedenle veya ameliyat nedeniyle oluşan yara bölgesine koyduğumuzda daha çabuk ve daha iyi bir iyileşme olmaktadır. Bu fibrini elde edebilmek için kan alınması gerekmektedir. Bunun bir avantajı da kişinin kendi kanının kullanılmasıdır. Böylece hastalık kapma riski olmayacaktır.

*Araştırmanın amacı:* Alınan kan örneklerinizden önce tam kan sayımınız yapılacaktır. Alınan kanın geri kalanı tüplere konup bir cihaz içerisinde döndürülecektir. Bu döndürme olayına santrifüj işlemi adı verilmektedir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen materyalin içerisinde bulunan ve yara iyileşmesinde çok önemli roller oynayan bir takım faktörlerin miktarları incelenecek ve bu materyal için en ideal döndürme (santrifüj) hız ve kuvvetinin belirlenmesine çalışılacaktır.

Araştırma esnasında size herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

Planlanan çalışma için sizden sadece kan örneği alınacaktır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı arzu ediyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Sizlerden elde edilen tüm bilgiler kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda ve bildirimlerde kullanılabilir. Bu amaç dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir. Kayıtlarınız en az 10 yıl süreyle saklanacak ve siz çalışmadan

çekilmeye karar verdiğinizde bu kayıtlar silinecektir. Çalışmaya katıldığınız için sizden ücret alınmayacak, size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Çalışma sürecinde sizden üç hafta ara ile öğleden önce olmak koşuluyla toplam 170 ml kan alınacaktır. Bir insan, kan bağışında bulunurken tek seferde 450 ml kan verebilmektedir. Çalışmamızda 170 ml kan yarıya bölünerek (85 ml / 1 defada kan alımı) 2 defada alınacaktır. Bunun dışında herhangi bir girişimsel işlem yapılmayacaktır. Kan verme sırasında kanın deri altında birikmesi (hematom) gelişebilir; baş dönmesi, mide bulantısı, titreme, terleme, stres hali, düşme ve bayılma hissi; düşük düzeyde ağrı hissedebilirsiniz. Kan alma sonrasında ise kanın deri altında birikmesi, baş dönmesi, baş ağrısı, kol uyuşukluğu, hissedebilirsiniz. Elli kilonun üzerinde olan ve yaşları 18 ile 65 arası olan her sağlıklı kişi kan verebilir. Ardından kan veren kişiye şekerli meyve suları veya tatlı gıdalar verilip kan şekerinin düşmemesi sağlanır. Kan vermek günlük yaşantınızın akışında önemli bir değişiklik yapmayacaktır. Kan vermek günlük yaşantınızın akışında önemli bir değişikliğe yol açmayacaktır. Ancak yine de dikkat edilmesi gereken bazı konular vardır. Kan bağışında bulunulan günde bol sıvı alınmalı, bağış izleyen 2 saat boyunca sigara kullanılmamalıdır. Araç kullanılacak ise kan bağış sonrası 30 dakika içerisinde araç kullanılmamalıdır. Kan bağışını takip eden 1 saat boyunca, kan dolaşımı reaksiyonlarının önlenmesi amacıyla uzun süreli ayakta durulmamalıdır. Kan vermiş olduğunuz kolunuza yapıştırılmış olan koruyucu bant 2 saatten önce çıkarılmamalıdır. Kan bağış yapılan günde aşırı uğraşılarda bulunulmamalıdır. Örneğin; planörcülük, paraşüt sporları, araba ve motosiklet yarışı, dağcılık, dalgıçlık vs. Bağış günü, vücudu aşırı yoran ve sıvı kaybına yol açan aktivitelerden (sauna, spor vb) kaçınılmalıdır. Kan verilmiş olan kolla ilk birkaç saat ağır eşyalar taşınmamalıdır. Bu durum kanamaya yol açabilir. Kan bağışından sonra baş dönmesi, baygınlık hissi olursa yere uzanılmalı veya baş iki dizinizin arasına alınacak şekilde oturulmalıdır. Alkol, ikinci yemek öğününden önce kullanılmamalıdır. Tren makinistleri, ağır yük şoförleri, otobüs şoförleri, ağır iş makinesi operatörleri, vinç operatörleri, pilotlar, işleri gereği portatif merdiven veya şantiye iskelesine tırmanmak zorunda olan kişiler, yer altında çalışan madenciler gibi uzun süre bitkinlik ve yorgunluğa neden olan mesleklere sahip olan kişiler kan bağışında bulunduktan 24 saat sonra bu işleri yapabilirler. Kan alma sırasında oluşacak herhangi bir rahatsızlığınız tarafımızdan giderilmeye çalışılacaktır. Herhangi bir sorunuz olduğunda Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda Arş. Gör. Dt. Mehmet Özgür'e 0312 305 22 17-37, 0531 920 76 65 numaralı telefonlardan, sorumlu araştırmacı Yrd. Doç. Dr. H. Gencay Keçeli'ye 0312 305 22 17 37 numaralı telefonlardan ulaşabilirsiniz. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve

reddettiğiniz takdirde size uygulanması gereken rutin tedaviler aynen uygulanacaktır. Ayrıca çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyerek bu konudaki görüşünüzü belirtiniz.

***(Katılımcının/Gönüllünün Beyanı);***

Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dt. Mehmet Özgür'ün ve Yrd. Doç. Dr. H.Gencay Keçeli'nin yer alacağı çalışmanın detayları bana sözlü olarak anlatıldı ve okuduğum formun bir kopyası tarafıma iletildi. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırmaya katıldığım için bana da herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda, herhangi bir saatte araştırmacıyı hangi telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.



**Hasta**

Adı Soyadı

Doğum tarihi

Adres/Tel

İmza

**Hekim**

Adı Soyadı

Doğum tarihi

Adres/Tel

İmza

Görüşme tarih ve saati:

## EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi

## HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Trombositten Zengin Fibrin Hazırlanmasında Farklı Santrifüj Parametrelerinin Bıyölçme Faktörleri ve Sitokin Değerleri Üzerine Etikli Klinik Araştırma Çalışması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-----	
SIĞIRTA	<input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	02.01.2017 emre tarihli
BİYÖLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
ILAN	<input type="checkbox"/>	
YILLIK BİLDİRİMİ	<input type="checkbox"/>	
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
DİĞER:	<input type="checkbox"/>	
KARAR BELGELERİ	Karar No: 201702-09 (KA-17016) Toplantı Tarihi: 16.02.2017 (İlk değerlendirme tarihi: 12.01.2017)	
Üniversitemiz Dış Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı egretim üyelerinden Yrd Doç. Dr. H. Gensay KEÇELİ'nin sorumlu araştırmacısı olduğu, Dr. Mehmet ÖZGÜR'ün uzmanlık tezi olan, Prof. Dr. Dilek İLHAN ve Prof. Dr. Filiz AKBIYIK ile birlikte çalıştıkları "Trombositten Zengin Fibrin Hazırlanmasında Farklı Santrifüj Parametrelerinin Bıyölçme Faktörleri ve Sitokin Değerleri Üzerine Etikli Klinik Araştırma Çalışması" başlıklı proje öneri dosyası, araştırmanın/yatırımın gereği, amaç, saklanması ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve bilgi edinilmiş olup, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/yatırımlar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İy Klinik Uygulanması Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. F. Alev TÜRKER					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Çiğneyet	Araştırma ile İlgili	Katkı*		İmza
Prof. Dr. F. Alev Türker Başkan	İç Hast. Onkoloji	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Zafar Çelrek, Başkan Yardımcısı	Periodonti	Hacettepe Ü. Dişhalk. F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Mithat Hayran, Raportör	Epidemiyoloji	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Fatma Önerik	Çocuk Sağl. ve Hast. Hastalıkları BD.	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Murat Yardımcık	Çocuk Sağl. ve Hast. Nematoloji BD.	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Tarkan Eldemir	Par. Biyoteknoloji	Hacettepe Ü. Ecz. F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Nilgün Seyisely	İç Hast. Hematoloji	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>		GÖREVLİ
Prof. Dr. Ayşe Kılıçkürücü	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Ankara Ü. Tıp F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Nüket Ömerik, Bakım	Tıp Tarihi ve Etik	Hacettepe Ü. Tıp F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Mahmut Uğur	Biyofizik	Ankara Ü. Tıp F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. İnci Erdemir	Farmakoloji	Hacettepe Ü. Eczeneçik F.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Erdem Karabulut	Biyostatistik	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Ümit Mustafa Şakıncı	Çocuk Sağl. ve Hast. Allerji BD.	Hacettepe Ü. Tıp F.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>		İZİNDE
Av. Mehmet Önerik	Hukuk	Hacettepe Ü. Hukuk Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Av. Ç. Ziya Akpaşlıyan	Hukuk	Ereğli (sivil hay)	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		

\* Toplantıda Bulunan

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. F. Alev TÜRKER  
İmzası:

Not: Etik Kurul Başkanı'nın her sayfada imzası yer almalıdır.