T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

HİDROKSİAPATİT TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN (HA-TZF) GİNGİVA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İZZET MELİH GÜRKAN

Periodontoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanları
Prof. Dr. Hakan ÖZDEMİR
Doç. Dr. Seçil ÇALIŞKAN

Eskişehir
2025

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

HİDROKSİAPATİT TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN (HA-TZF) GİNGİVA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İZZET MELİH GÜRKAN

Periodontoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanları
Prof. Dr. Hakan ÖZDEMİR
Doç. Dr. Seçil ÇALIŞKAN

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TDH-2024-3041 proje numarası ile ve TÜSEB tarafından 34399 proje numarası ile desteklenmiştir.

Eskişehir
2025

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

HİDROKSİAPATİT TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN (HA-TZF) GİNGİVA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İzzet Melih GÜRKAN

Tez Savunma Tarihi: 29.08.2025

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan ÖZDEMİR (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa TUNALI (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi)
Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Burak YAVUZ (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Batu Can YAMAN
Dekan

Uzmanlık Tezi
ESKİŞEHİR-2025

UZMANLIK TEZİ BEYANNAMESİ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum **"HİDROKSİAPATİT TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN (HA-TZF) GİNGİVA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ"** başlıklı araştırmayı danışmanlarım Prof. Dr. Hakan ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Seçil ÇALIŞKAN'ın rehberlik ve sorumluluğunda tamamladığımı; çalışma protokolü ve hazırlık süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı, tez metnini hazırlarken kaynakçanın eksiksiz olarak gösterildiğini, tezin yazım kılavuzu kurallarına uygun olarak hazırlandığını ve belirtilen hususların aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Dt. İzzet Melih GÜRKAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **IV**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VII**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **X**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XII**

1.GİRİŞ **1**

2.GENEL BİLGİLER **4**

2.1.Trombosit Konsantrelerinin Tanımı ve Gelişimi 4

2.1.1. Trombositten Zengin Plazma 4

2.1.1.1. TZP Elde Edilmesi 6

2.1.2. Trombositten Zengin Fibrin 7

2.1.2.1. TZF Elde Edilmesi 11

2.1.3. Trombosit Konsantrelerinin Sınıflandırılması ve TZF Modifikasyonları 12

2.1.3.1. Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-TZF) 13

2.1.3.2. Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin + (A-TZF+) 14

2.1.3.3. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-TZF) 14

2.1.3.4.Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-TZF) 14

2.2. Nanopartiküller 16

2.2.1.Hidroksiapatit Nanopartiküller 18

2.3. Kök Hücreler 21

2.3.1. Yetişkin Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler 21

2.3.1.1.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler 26

2.4. Hücre Kültürü 28

2.4.1. Hücre Kültürü Tipleri 29
2.4.1.1. Primer Hücre Kültürü 29
2.4.1.2. Sürekli (Kalıcı) Hücre Kültürleri 29
2.4.2. Hücre Kültürü Teknikleri 30
2.4.2.1. Süspansiyon Kültürleri 30
2.4.2.2. Monolayer (Tek Tabaka) Hücre Kültürü 30
2.4.2.3.Üç Boyutlu Hücre Kültürleri 30
2.4.2.4. Eksplant Kültürler 30
3. MATERYAL VE METOT 32
3.1. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi 32
3.2. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu 34
3.2.1 Karakterizasyon için MKH'lerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi 34
3.2.2. Karakterizayon için MKH'lerin Farklılaştırma Analizleri 34
3.3. Nano-hidroksiapatit Kaplı Tüp Üretimi ve Analizi 36
3.4. Deney Materyalleri Uygulamaları için Çalışma Gruplarının Hazırlanması 37
3.4.1. Çalışma Grupları 37
3.5. Hücrelerin Canlılık ve Proliferasyon (MTT) Analizi 40
3.6. Hücrelerin AnnexinV-PI ile Flow Sitometrik Apoptoz Analizi 40
3.7. Hücrelerin Taramalı Elektron Mikroskobu İle Ultrastrüktürel Değerlendirmesi 41
3.8. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) 41
3.9. Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 42
3.10. Hücre Yara İyileşmesi Analizi 43
3.11. İstatistiksel Yöntem 44
4.BULGULAR 45

4.1.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü 45
4.2.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri İle Karakterizasyonu..... 45
4.3. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu İçin Farklılaştırma Analizleri..... 46
4.4. MTT Bulguları 48
4.5. Flow Sitometride Anneksin-V/PI Bulguları..... 51
4.6. SEM Bulguları 54
4.7.ELİSA Bulguları..... 55
4.8. qRT-PCR Bulguları 58
4.9.Yara İyileşmesi Bulguları..... 62
5.TARTIŞMA 71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 88
KAYNAKLAR..... 89
EKLER 108
EK-1. ÖZGEÇMİŞ..... 108
EK-2. ETİK KURUL ONAYI 109
EK-3. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU..... 112

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, anlayışı ile her zaman yanımda olan, mesleki tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Hakan ÖZDEMİR'e,

Tez çalışmama dahil olarak bilgisi ve tecrübeleriyle bana destek olan ikinci danışman hocam değerli Doç. Dr. Seçil ÇALIŞKAN'a,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Periodontoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım ve birlikte çalışmaktan her zaman onur ve gurur duyduğum Periodontoloji Anabilim Dalı'nın değerli araştırma görevlilerine, hemşirelerine ve personellerine,

Tez çalışmam boyunca desteklerini, tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeden benimle paylaşan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin değerli hocalarına,

Yaşamım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen her zaman yanımda olan canım annem Hasibe GÜRKAN'a, değerli ağabeyim Mert GÜRKAN'a ve bugün hayatta olsaydı gurur duyacağını bildiğim babam Şükrü GÜRKAN'a

Sonsuz Teşekkürlerimle.

ÖZET

Hidroksiapatit Trombositten Zengin Fibrinin Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkililiğinin Değerlendirilmesi

Amaç: Yeni bir biyomateryal olarak elde edilen HA-TZF membranın gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkinliğini L-TZF ve T-TZF membranlarla karşılaştırarak değerlendirmektir.

Materyal ve Metot: Gingiva ve kan örnekleri sistemik olarak sağlıklı gönüllü bir erkek bireyden alındı. Kan örnekleri, cam tüpte ve nano boyutta hidroksiapatit kaplı tüpte 2700 rpm hızda 12 dakika boyunca, titanyum tüpte ise 2700 rpm hızda 20 dakika boyunca santrifüj edildiler. Elde edilen TZF pıhtıları metal bir kutuda kompresör ve metal kapak yardımıyla membran haline getirildi. TZF membranları ile 1, 3 ve 7. günlerde önceden izole ve karakterize edilmiş olan gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde canlılık, apoptoz, ELİSA, qRT-PCR deneyleri yapıldı. TZF membranların 1 ve 3 günlük salınımları ile yara iyileşmesine olan etkileri in vitro olarak incelendi. TZF membranlarının 1, 3 ve 7. günlerdeki morfolojisi SEM ile değerlendirildi. Deneyler sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: MTT analizinde 7. gün L-TZF ve HA-TZF membran içerikli grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak bir şekilde en yüksek canlılık değer ortalamaları görüldü. Flow sitometride Anneksin-V/PI analizinde apoptoz ve nekroz yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi Yara iyileşmesi deneyinde 12. ve 24. saatte pozitif kontrol ve HA-TZF membran içerikli grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha küçük bir yara yüzey alanı görüldü.

Sonuç: HA-TZF membranın gingiva kaynaklı mezenkimal üzerinde sitotoksik etkisi görülmemiştir. TZF membranlar kök hücrelere karşı anti apoptotik bir etki göstermiştir. HA-TZF membran L-TZF ve T-TZF membranlara göre yara iyileşmesinde daha etkilidir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, yara iyileşmesi, trombositten zengin fibrin, hücre kültürü, sitotoksisite, nano boyutta hidroksiapatit

ABSTRACT

Evaluation of the Effectiveness of Hydroxyapatite Platelet-Rich Fibrin on Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells and Wound Healing

Aim: To evaluate the effectiveness of the HA-PRF membrane, a novel biomaterial, on gingiva-derived mesenchymal stem cells by comparing it with L-PRF and T-PRF membranes.

Materials and Methods: Gingiva and blood samples were obtained from a systemically healthy male volunteer. Blood samples were centrifuged in glass tubes and nano-sized hydroxyapatite-coated tubes at 2700 rpm for 12 minutes, and in titanium tubes at 2700 rpm for 20 minutes. The obtained PRF clots were made into membranes in a metal box using a compressor and a metal lid. Viability, apoptosis, ELISA, and qRT-PCR experiments were performed on gingiva-derived mesenchymal stem cells, which were previously isolated and characterized, with PRF membranes on days 1, 3, and 7. The effects of the secretions of PRF membranes on days 1 and 3 on wound healing were investigated in vitro. The morphology of PRF membranes on days 1, 3, and 7 was evaluated by SEM. The data obtained as a result of the experiments were statistically analyzed.

Results: In the MTT analysis, the highest average viability values were observed in the L-TZF and HA-TZF membrane-containing group on day 7 in a statistically significant manner. In the Annexin-V/PI analysis during flow cytometry, no statistically significant difference was found between the percentages of apoptosis and necrosis. In the wound healing experiment, a statistically significant smaller wound surface area was observed at 12 and 24 hours in the positive control and HA-TZF membrane-containing group.

Conclusion: The HA-TZF membrane did not exhibit cytotoxic effects on gingiva-derived mesenchymal stem cells. TZF membranes demonstrated an anti-apoptotic effect against stem cells. HA-TZF membrane is more effective in wound healing compared to L-TZF and T-TZF membranes.

Keywords: Stem cells, wound healing, platelet-rich fibrin, cell culture, cytotoxicity, nano-sized hydroxyapatite.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

µg: Mikrogram

µl: Mikroliltre

AB: Alcian Blue

ADN: ADIPONECTIN

Alpha MEM: Alfa modifiyeli Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri

AKKMKH: Alveoler kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreler

APKMKH: Apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreleri

ARS: Alizarin Red S

A-TZF: Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin

BSA: Bovine Serum Albumin

Ca^{+2}: Kalsiyum

CD: Yüzey antijenleri

cm^2: Santimetrekare

CO_2: Karbondioksit

COLL II: COLLAGEN II

DFKMKH: Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler

DGKMKH: Diş germi kaynaklı mezenkimal kök hücreler

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco 'nun Değiştirilmiş Eagle Ortamı

DMSO: Dimetilsülfoksit

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetikasit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ELISA: Enzime bağlı immünosorbent deneyi

FBS: Fetal sığır serumu

FGF: Fibroblast benzeri büyüme faktörü

g: Santrifüj kuvveti

GKMKH: Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler

HAp: Hidroksiapatit

HA-TZF: Hidroksiapatit trombositten zengin fibrin

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü -1

IL: İnterlökin

I-TZF: Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin

L-TZF: lökosit trombositten zengin fibrin

L-TZP: Lökosit Trombositten Zengin Plazma

m: Metre

M: Molar

mg: Miligram

Mg^{+2}: Magnezyum

MKH: Mezenkimal kök hücreler

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

MTT: (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)

NanoHAp: Nano boyuttaki hidroksiapatit partiküller

nm: Nanometre

nM: Nanomolar

ORO: Oil Red O

OCN: OSTEOCALCIN

PBS: Fosfat tamponlu serum

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDLKMKH: Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreleri

PGE_2: Prostaglandin E2

PI: Propidyum iyodür

PKMKH: Pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreleri

PPP: trombositten fakir plazma

P-TZF: Saf Trombositten Zengin Fibrin

P-TZP: Saf Trombositten Zengin Plazma

rpm: Dakika başına devir

SDKMKH: Süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler

SO: Safranin O

TGF-β1: dönüştürücü büyüme faktörü- β1

TK: Trombosit konsantreleri

TZF: Trombositten zengin fibrin

TNF-α: Tümör nekrotizan faktör- α

T-TZF: Titanyum trombositten zengin fibrin

TZP: Trombositten zengin plazma

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

qRT-PCR: Kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Trombositten zengin plazmanın elde edilmesi 7

Şekil 2.2. Bilateral bağlantılar 10

Şekil 2.3. Eşkenar bağlantılar 11

Şekil 2.4. Trombositten zengin fibrin elde edilmesi 12

Şekil 2.5. Kök hücrelerin sınıflandırılması 22

Şekil 3.1. TZF membran elde etmek için kullanılan tüpler **(a)** cam tüp, **(b)** nano kalınlıkta hidroksiapatitle kaplı cam tüp, **(c)** titanyum kaplı tüp 38

Şekil 3.2. (a) Hastadan kan alınması, **(b)** tüplerin santrifüje yerleştirilmesi, **(c)** TZF elde edilmesi, **(d)** TZF'lerin steril metal kaba yerleştirilmesi 38

Şekil 3.3. Deney gruplarının hazırlanması 39

Şekil 4.1. (a) İzolasyonun 7. gününde tutunan hücrelerin koloni görüntüsü. **(b)** GKMKH'lerin izolasyonunun iğsi yapıda yıldız şekilli fibroblast benzeri hücre görüntüsü. (Ölçek çubuğu: A:200 µm, B:200 µm) 45

Şekil 4.2. CD90, CD73, CD105, CD44 ve CD29 pozitif, CD34, CD45, CD69, CD25, CD19, CD14 ve HLA-DR negatiftir. Histogramda, hedef antikorlar mavi renkte ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor renkte gösterilmiştir 46

Şekil 4.3. (a) 15. günde adipojenik soya farklılaştırılan Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin faz-kontrast mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu =100µm). **(b)** Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral lipid vakuollerinin birikiminin Oil Red O boyası ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 50 µm). 47

Şekil 4.4. (a) 25. günde osteojenik soya farklılaştırılan Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin faz-kontrast mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu = 200 µm). **(b)**

Osteojenik farklılaşmış hücrelerde kalsiyum nodüllerinin Alizarin Red S boyası ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 200 µm). 47

Şekil 4.5. (a) Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde kondrojenik dokunun Alcian mavisi ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 100 µm). (b) Safranin o boyaması ile kondrojenik hücrelerin gösterilmesi..... 48

Şekil 4.6. 1, 3 ve 7. günlerde hücresiz besiyerinden alınmış L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların yüzeylerinin 2500x büyütme ile alınmış SEM görüntüleri 54

Şekil 4.7. 1, 3 ve 7. günlerde hücreli besiyerinden alınmış L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların yüzeylerinin 2500x büyütme ile alınmış SEM görüntüleri 55

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. TZF hazırlama protokolleri 16

Tablo 3.1. Çalışmada hazırlanan deney grupları 37

Tablo 3.2. qRT-PCR analizinin primer dizileri..... 43

Tablo 4.1. Gün ve çalışma gruplarının canlılığa etkisi..... 48

Tablo 4.2. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değerleri..... 48

Tablo 4.3. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değerleri..... 50

Tablo 4.4. Gün ve çalışma gruplarının canlılık, apoptoz ve nekroza etkisi 52

Tablo 4.5. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz değerleri 52

Tablo 4.6. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz değerleri 53

Tablo 4.7. Gün, çalışma grupları ve proanjiyojenik faktörlerin salınıma etkisi..... 55

Tablo 4.8. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınımları (pg/ml)... 56

Tablo 4.9. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınımları (pg/ml)..... 57

Tablo 4.10. Gün, çalışma grupları ve proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonuna etkisi 58

Tablo 4. 11. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonları 59

Tablo 4.12. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonları 60

Tablo 4.13. Çalışma grupları, 1. ve 3. gün salınımları ve saatlerin yara yüzey bölgesine etkisi..... 62

Tablo 4.14. Gruplar arası 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%) 62

Tablo 4.15. Grup içi 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%) 64

Tablo 4.16. Gruplar arası 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%) 66

Tablo 4.17. Grup içi 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%) 67

Tablo 4.18. TZF membranların 1 ve 3 günlük salınımlarının arasındaki farklılığın yara yüzey alanına etkisi (%) 69

1.GİRİŞ

Yara iyileşmesi, farklı hücresel ve biyolojik mekanizmaların etkileşimiyle gerçekleşen, dinamik ve çok aşamalı bir biyolojik süreçtir. Bu mekanizmalar, hasar gören dokuların onarımı ve yeniden yapılanmasını sağlamak üzere düzenli ve koordineli bir biçimde yürütülmektedir.[1] Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon olmak üzere dört temel evreden oluşmaktadır. Trombositler, hemostaz evresinde kanamanın kontrol altına alınmasında görev alan ve fibrin pıhtısının oluşumunu başlatan temel hücrelerdir. Trombositler; trombosite özgü proteinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) başta olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri, pıhtılaşma faktörleri, adezyon molekülleri ile sitokinler ve kemokinleri salgılayarak yara iyileşmesinde görev alan fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar ve mezenkimal kök hücrelerin (MKH) proliferasyonunu ve aktivasyonunu uyarmaktadır.[2]

Mezenkimal kök hücreler, yara iyileşmesinin farklı evrelerinde çeşitli düzeylerde görev üstlenmektedir. Bu hücrelerin en belirgin etkilerinden biri, inflamatuar yanıtı doğrudan baskılamalarıdır. Çalışmalar, MKH'lerin immün yanıt sürecinde proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasını azaltırken, aynı zamanda antiinflamatuar sitokinlerin üretimini artırdığını göstermiştir. MKH'lerin antiinflamatuar özellikleri, bu hücrelere yara tedavisinde kritik bir rol kazandırmakta; inflamatuar fazdan sonraki evrelere geçişi kolaylaştırarak durmuş yaralarda iyileşme sürecinin yeniden başlatılmasına olanak sağlamaktadır.[3] Mezenkimal kök hücreler yara iyileşmesinin çeşitli aşamalarında önemli rollere sahiptir ancak bu etkinliklerini açığa çıkarmaları için yönlendirilmeleri gerekmektedir.

Yumuşak ve sert dokuların yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla uzun yıllardır farklı biyomateryaller kullanılmaya çalışılmaktadır. 'Otolog biyomalzemeler' olarak

adlandırılan ve doğal olarak organizmada bulunan bu biyolojik ürünler, doku onarımı, rejenerasyon ve iyileşme süreçlerinde sinyal görevi üstlenmektedir. Yara iyileşmesinde otolog kökenli trombosit ve fibrinin ise kritik bir rol oynadığı kabul edilmektedir.[4]

Yaklaşık 20 yıldır trombositten zengin fibrin (TZF), diş hekimliğinde diş eti çekilmelerinin tedavisinde, çene cerrahisinde kemik greftleriyle birlikte ve sinüs operasyonlarında iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.[5] Trombositten zengin fibrin TZF, yara iyileşmesinin erken evrelerinde hücresel aktiviteyi destekleyen bir iskelet görevi üstlenerek canlı hücreler içeren üç boyutlu bir fibrin ağı oluşturabilmektedir. Bu aşama esnasında, trombositler hemostatik bir tıkaç oluşturarak hücre göçünü ve çoğalmasını uyarmak amacıyla içeriğindeki sitokinlerin yavaş bir şekilde salınımı sağlar ve fibrin matriksi ile etkileşime girer. TZF, yapısında trombositlerin yanı sıra monositler, lenfositler ve granülositleri içeren lökositleri de barındırmaktadır. Bu hücreler ile fibrin matriksi arasındaki etkileşimin, büyüme faktörlerinin kontrollü ve yavaş salınımını teşvik ederek yara iyileşmesini daha etkin bir şekilde desteklediği bildirilmiştir. Lökosit ve trombosit sitokinleri TZF'nin iyileştirme kapasitesinde önemli bir rol oynasa da, genellikle bu unsurları destekleyen fibrin matriksinin aslında terapötik potansiyelinden sorumlu olduğu öne sürülmüştür.[2]

Cam tüpte veya silika kaplı plastik tüpte elde edilen TZF ile ilgili başarılı klinik sonuçlar elde edilmesine karşın son dönem yapılan çalışmalarda cam ve silika kaplı plastik tüpler içerisindeki silikanın TZF içerisine geçebileceğini, sonucunda da fibrin oluşumunu negatif etkilediğini ve sağlığa zararlı etkileri olabileceği belirtilmiştir.[6-8] Bu sebeple araştırmacılar silika partiküllerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla titanyum kaplı tüpleri geliştirmişlerdir.[9] Bununla birlikte, bu tüplerin yüksek maliyeti ve ağırlığı nedeniyle, alternatif bir yaklaşım olarak cam tüplerin iç yüzeyi nano boyuttaki hidroksiapatit partikülleri (NanoHAp) ile kaplanarak yeni tüpler geliştirilmeye

çalışılmaktadır. İç yüzeyi hidroksiapatit nanopartiküller ile kaplı tüplerin cam ve titanyum tüplerin olumsuz özelliklerini engelleyeceği düşünülmektedir.

Hidroksiapatit (HAp), insan kemikleri ve dişlerinde doğal olarak bulunan bir kalsiyum fosfat türüdür; diş minesinin yaklaşık %97'sini, kemiklerin ise %65'ini oluşturmaktadır. Bu dokularla gösterdiği kimyasal benzerlik, sentetik HAp'a biyolojik sistemlerle yüksek afinite kazandırmakta ve onu biyomedikal uygulamalar açısından ideal bir biyomalzeme haline getirmektedir.[10]

Çalışmamızın amacı, yeni bir biyomateryal olarak geliştirilen hidroksiapatit trombositten zengin fibrin (HA-TZF) membranın, lökosit trombositten zengin fibrin (L-TZF) ve titanyum trombositten zengin fibrin (T-TZF) membranlarıyla karşılaştırmalı olarak gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkinliğini in vitro koşullarda değerlendirmektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Trombosit Konsantrelerinin Tanımı ve Gelişimi

Periferik kandan elde edilen trombositler otojen büyüme faktörü kaynağıdır. Tıbbi uygulamalarda, trombosit konsantresi kandan elde edilir ve merkezi kökenli ciddi trombositopeni durumlarında kanamaların önlenmesi ve tedavisi için kullanılır.[11] Biyoaktif cerrahi katkı maddesi olarak trombosit konsantresinin gelişimi, fibrin yapışkanlarının kullanımından gelmektedir. [1] Fibrin yapıştırıcı terimi ilk kez 1970 yılında tanımlanmıştır ve fibrinojenin, trombin ve kalsiyum ile polimerizasyonuyla oluşur.[12]

Trombosit konsantreleri (TK), hastadan alınan kanın basit ve hızlı bir şekilde santrifüj edilmesiyle elde edilen, büyüme faktörü açısından zengin ürünlerdir.[13] Trombosit konsantreleri [trombositten zengin plazma (TZP) ve trombositten zengin fibrin], özellikle ağız ve çene cerrahisinde, plastik cerrahide ve spor tıbbında olmak üzere birçok tıp alanında cerrahi işlemlerde sıkça kullanılmaktadır. Bütün bunların amacı, bir kan örneğinin tüm faydalı bölümlerini açığa çıkarmak, iyileşmeyi geliştirmek ve doku yenilenmesini teşvik etmektir.[14]

Whitman ve ark.[5], 1997 yılında ağız içi cerrahi işlemlerde trombositten zengin plazmanın kullanımını ilk kez tanıtmış ve bunun konakçı kemikte ile kemik greftinde osteoprogenitör hücreleri artırarak önemli avantajlar sağladığını bildirmiştir.[5] Choukroun ve ark.[15] ilk olarak ağız, çene ve yüz cerrahisinde kullanmak için TZF'yi geliştirmişlerdir.

2.1.1. Trombositten Zengin Plazma

TZP, yüksek trombosit konsantrasyonuna sahip birinci nesil bir trombosit konsantresidir.[16] Doğal bir kan pıhtısı, %94 eritrosit, %5 trombosit ve %1lökosit içerirken,[11] TZP, %95 trombosit, %4 eritrosit ve %1 lökosit içerir.[12]

Trombositler, 2-4 mikrometre (μm) çapında küçük, düzensiz şekilli çekirdeksiz hücrelerdir. Ortalama yaşam süreleri 8 ila 12 gün arasında değişmektedir. Hemostazda temel bir rol oynarlar ve büyüme faktörlerinin doğal bir kaynağıdırlar.[12] Büyüme faktörleri trombositler aktive olduğunda salınır ve bu aktivasyon, trombin, kalsiyum klorür, kollajen gibi çeşitli maddeler tarafından başlatılabilir.[17]

TZP'nin içeriğinde bulunan trombositlerden elde edilen büyüme faktörleri, kendi görevlerinin yanı sıra diğer büyüme faktörleri ile de etkileşime girerek gen ekspresyonu ve protein sentezinin aktivasyonunu sağlarlar. Bu büyüme faktörleri, yara iyileşmesi, mitogenez, kemotaksis, farklılaşma ve metabolik süreçlerin düzenlenmesine yardımcı olurlar.[12] TZP büyüme faktörü olarak içerisinde trombosit kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF-1), dönüştürücü büyüme faktörü- β1 (TGF-β1) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) bulundurur.[18]

TZP'nin yapısı, trombosit konsantrelerinin oluşturduğu çift taraflı bağlantılardan meydana gelir. Fibrin polimerlerinin kalınlaşması sitokinler için uygun olmayan sert bir ağ meydana getirirken, aynı zamanda hücre göçünü teşvik etmektedir.[19] TZP; periodontal defektlerin tedavisi, kök kapama, alveoler sırt greftlemesi, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, sinüs lift işlemleri ve implant cerrahisinde kullanılmaktadır. Ayrıca mandibular ve maksiller rekonstrüksiyon, dermal yağ greftleri ve ortopedik cerrahi alanlarında da klinik uygulama alanı bulmaktadır.[16]

TZP'nin başlıca avantajları; sitokinler ve büyüme faktörlerini uygulama alanına ulaştırması, trombosit aracılığıyla fibrin yapıştırıcıya göre daha hızlı rejenerasyon sağlaması ve bulaşıcı hastalık riski içermemesidir. Bu özellikleri sayesinde klinik kullanımı güvenli ve pratiktir.[16]

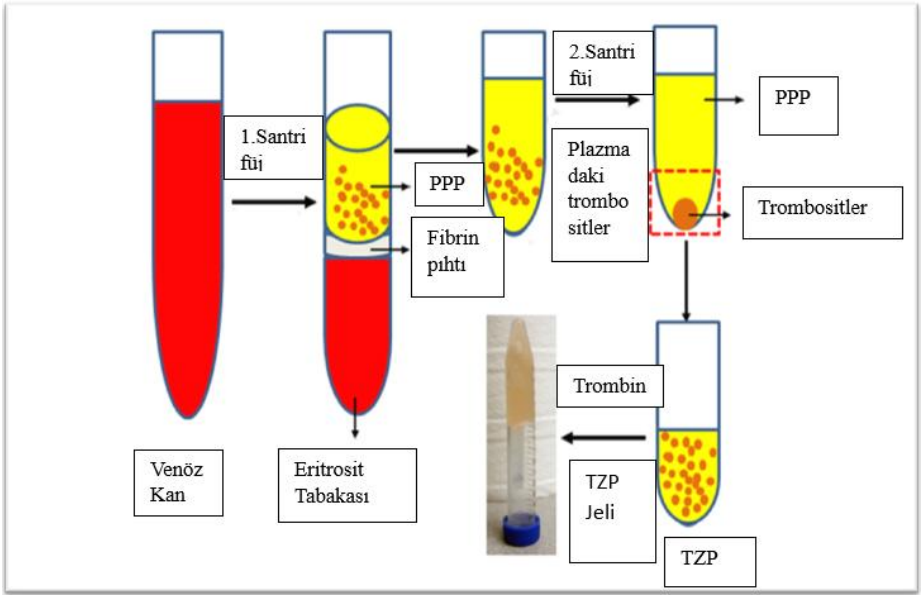
2.1.1.1. TZP Elde Edilmesi

TZP elde etme yöntemlerinde, venöz kanın trombosit aktivasyonu ve degranülasyonunu engellemek amacıyla antikoagülan (EDTA, teofilin, adenosin, dipirimadol) içeren tüpler kullanılmaktadır. Bu yöntemler, trombosit ve lökositleri değişen oranlarda konsantre etme kapasitesine sahiptir İlk santrifüj aşaması (hafif çevirme) kanı üç katmana ayırmak için tasarlanmıştır: Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) en altta yer alır ve toplam hacmin %55' ini oluşturur, aselüler plazma ya da trombositten fakir plazma (PPP) en üstte yer alır ve fibrinojen açısından zengindir. Fibrin tabakası olarak adlandıran trombositlerin yoğun olarak bulunduğu kısım ise her iki fraksiyonun ortasında yer alır. İlk santrifüj eritrositleri, trombositleri ve lökositleri pıhtılaşma faktörlerini içeren plazmadan ayıracaktır. Sonraki aşamaların amacı eritrosit ve PPP tabakalarının uzaklaştırılarak fibrin pıhtı tabakasını elde etmektir. Steril bir şırınga yardımıyla, PPP, fibrin tabaka ve eritrosit tabakasının bir kısmı alınır ve başka bir tüpe aktarılır.

İkinci santrifüj (sert çevirme) trombositleri ve lökositleri az miktarda eritrositle beraber plazmadan ayırır. Bu dönüş TZP'yi üretir ve çok sayıda eritrosit tarafından oluşturan engelden arındırarak PPP'den ayırır.

Sonuç olarak, tüpün üst kısmındaki PPP ile alt kısmındaki TZP arasında bir ayrım oluşmaktadır. Alttaki tabaka alınır ve sığır trombini veya kalsiyum klorür ile birleştirilir, bu da trombosit ve fibrinojen konsantrasyonlarının jelleşmesini aktive eder.[20]

TZP'nin başlıca dezavantajları; hazırlama sürecinin standardizasyonundaki güçlükler, trombosit konsantrelerinin saklama süresine bağlı varyasyonlar ve koagülopati vakalarında kullanımın riskli olmasıdır. Nitekim sığır trombini, pıhtılaşma faktörlerine karşı antikor oluşumunu tetikleyerek ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir.[16]



Şekil 2.1. Trombositten zengin plazmanın elde edilmesi[21]

2.1.2. Trombositten Zengin Fibrin

2001 yılında Fransa'da Choukroun ve ark.[15] tarafından geliştirilen TZF, ağız, çene ve yüz cerrahisinde kullanılmak üzere tasarlanmış ikinci nesil bir trombosit konsantresidir.[11] TZP'nin geliştirilmiş bir versiyonu olan bu biyomateryal, trombosit ve sitokinlerin pıhtı içerisinde yoğunlaştırılmasıyla elde edilir. TZF'deki bu hücresel ve biyokimyasal bileşenler inflamasyonun düzenlenmesi ve yara iyileşmesinin hızlandırılmasında kritik rol üstlenmektedir..[22]

Trombositlerin yapısında α-granüller, yoğun granüller ve lizozomlar olmak üzere 3 ana tipte organel bulunur.[23] Trombositlerdeki alfa granülleri trombosite özgü (trombomodulin) ve trombosit dışı (fibronektin, trombospondin, fibrinojen, pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri, fibrinoliz inhibitörleri, immünoglobülinler vb.) birçok protein içerir.[22] Yoğun granüller lizozomla ilişkili olup endozomal bölgeden köken alır. Yoğun veziküller, endozomal bölgede veziküllerin taşınmasında görevli olan lizozomla ilişkili organel komplekslerinin oluşumunda rol oynar. Trombosit lizozomları ise katepsin, kollajenaz, elastaz, glukozidaz, galaktozidaz ve asit fosfataz gibi protein, karbonhidrat ve fosfat esterlerini parçalayan enzimleri içerir.[23] Trombositler aktive

olduklarında yara bölgesinde agregasyon ve pıhtılaşma mekanizmalarında rol oynayarak hemostazı başlatan ve destekleyen temel hücrelerdir. Degranüle oldukları zaman fibrin matriste iyileşmenin ilk aşaması olan hücre göçünü ve proliferasyonu uyaran sitokinlerin salınımını da sağlarlar.[22]

Trombositten zengin fibrinin yapısında bulunan trombositlerdeki α-granüller, trombosit kaynaklı büyüme faktörü , dönüştürücü büyüme faktörü- β , vasküler endotelyal büyüme faktörü , epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerini içerir.[22, 24]

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, yara iyileşmesi ve periodontal rejenerasyonda görevli olup, reseptörleri sementte, diş etinde ve periodontal ligamentte bulunur. Fibroblastları ve osteoblastları etkinleştirerek protein sentezini teşvik eder ve yine fibroblastlar ve osteoblastlar için kemoatraktan olarak işlev görerek bu hücreleri aktive eder.[24]

Dönüştürücü büyüme faktörü-β, 30'dan fazla üyeden oluşan geniş bir süper ailedir. Referans molekülü TGF-β1'dir ve hücreler arası iletişim sırasında en çok izole edilen formudur. TGF-β1 temel olarak fibrozis etkeni olarak bilinir. Kemik hücrelerinin proliferasyonunu hem uyarır hem de inhibe eder. Proliferasyon açısından etkileri değişken olmasına rağmen tüm sitokinler içerisinde en güçlü fibrozis etkenidir. Başka bir deyişle fibroblast ve osteoblastlar tarafından kollajen ve fibronektin gibi moleküllerin sentezini indükler.[22]

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, yara iyileşmesinde ve inflamasyonda rol oynayan çok önemli anjiyojenik bir sitokindir. Endotel hücrelerinin çoğalması, proteolitik enzim salgılanması ve kemotaksisi uyararak anjiyogenezin ilerlemesini sağlar.[25]

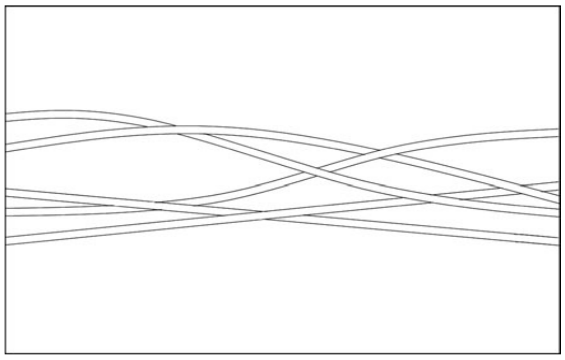
Trombositten zengin fibrin membranlar tarafından salgılandığı bilinen anjiyojenik ve proinflamatuar ajanlar olan PDGF, VEGF, TGF-β, interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6

(IL-6), tümör nekrotizan faktör- α (TNF-α) yara iyileşme sürecinin başarısında rol oynarlar. Bu ajanlar, hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını ve metabolizmasını değiştiren biyolojik olarak aktif polipeptitlerdir.[26]

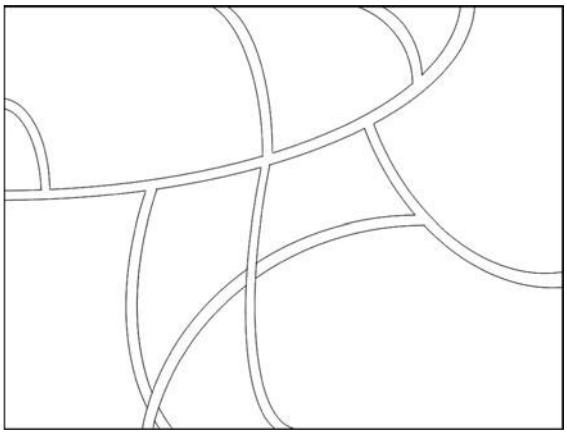
Santrifüj edilen tüpte elde edilen trombositten zengin fibrin, hemostatik ve inflamatuar olaylara yanıt olarak çeşitli sitokinler salgılamaktadır. Bu nedenle postoperatif inflamasyonda rol oynayan homeostatik düzenleyici moleküllerin TZF'de tanımlanması kritik öneme sahiptir. Trombositler sitokin salınımının ana kaynağı olmakla birlikte, diğer kan hücreleri de inflamatuar sürece katkıda bulunmaktadır. PPP ve TZF pıhtılarında IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler belirlenmiştir. İnflamatuar sürece TZF'nin eklenmesi, zararlı etkilerin azaltılmasına ve yaralı dokuların iyileşme döneminde ortaya çıkan yıkıcı etkilerin düzeltilmesine katkı sağlayabilir. IL-1β, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve langerhans hücreleri tarafından üretilir. Ana görevi yardımcı T lenfositleri uyarmaktır. TNF-α ile birlikte osteolizde de görev alır. IL-6, inflamatuar bir sitokindir. Başlıca, uyarılmış monositler, endotel hücreleri, fibroblast, makrofaj, T ve B lenfositler, kondrositler, mast hücreleri ve granülositler tarafından üretilir. IL-6, B lenfositleri için diferensiasyon faktörüdür ve T lenfositler için uyarıcıdır. IL-6, antikor salınımını önemli ölçüde uyarır. TNF-α, bakteri endotoksini karşısında ilk salınan inflamatuar sitokinlerden biridir. Monositler, makrofajlar, nötrofiller, polimorfonükleer lökositler ve T lenfositler tarafından salınır. TNF-α, monositleri aktive eder, fagositoz ve nötrofil sitotoksisitesini artırır.[27]

TZF ve TZP arasındaki başlıca farklılık, elde edilme aşamalarından kaynaklanmaktadır. TZP'de pıhtılaşmanın son basamaklarını başlatmak için sığır trombini veya kalsiyum klorür eklenerek fibrin polimerizasyonu indüklenir. TZF'de ise polimerizasyon, santrifüj işlemi sırasında doğal ve yavaş bir şekilde gerçekleşir. Sığır

trombini eklenmediğinden, TZF'de fibrinojene etki eden trombin düzeyi fizyolojik seviyelere oldukça yakındır. Polimerizasyon dinamikleri, oluşan fibrin matrisinin mekanik ve biyolojik özelliklerini belirlemekte; jelleşme esnasında fibrin fibrilleri 2 farklı yapıda organize olabilmektedir. Bunlar: Yoğun tetramoleküler veya bilateral bağlantılı trimoleküler bağlantılar veya eşkenar bağlantılar. Bilateral bağlantılar güçlü trombin konsantrasyonları ile oluşur ve fibrin polimerini kalınlaştırır ancak bu sert ağ yapısı sebebiyle hücre göçünü zorlaştırır. Eşkenar bağlantılar ise zayıf trombin konsantrasyonları ile oluşur. Bu bağlantılar esnek ve gevşek bir fibrin ağı oluşturarak hücresel göçü destekler. Eşkenar bağlantılardaki bu 3 boyutlu yapı TZF membranında gözle görülür bir esneklik sağlar. TZF yapısal olarak sitokinler, glikanik zincirler ve glikoproteinler (fibronektin) içeren katmanlı bir biyomalzemedir. Yavaşça polimerleşen bir fibrin ağda yer alarak oluşur. Yapısındaki biyokimyasal bileşenlerin iyileşme süreçleri üzerinde pozitif etkisi vardır.[28]



Şekil 2.2. Bilateral bağlantılar[28]



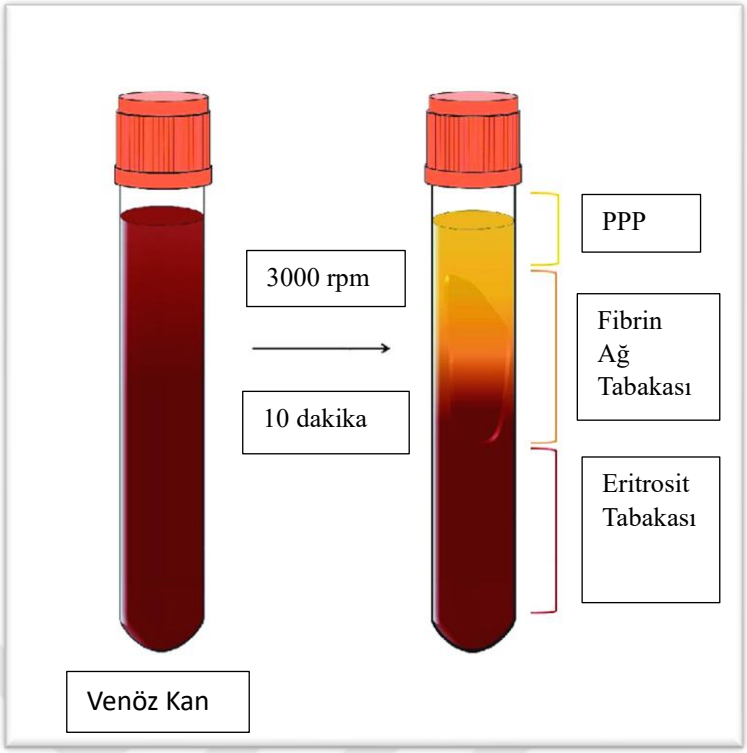
Şekil 2.3. Eşkenar bağlantılar[28]

Trombositten zengin fibrin matrisinin doğrudan anjiyogeneze yol açtığı gözlemlenmiştir. TZF'nin anjiyogenez özelliği içeriğindeki fibrinin 3 boyutlu yapısı ve ağlarda bulunan sitokinlerin eş zamanlı etkisi ile açıklanabilir. Anjiyogenezde fibrin pıhtının miktarı da önemlidir. Fibrin matrisin sertliği fibroblast benzeri büyüme faktörü (FGF) veya VEGF salınımına bağlı olarak kapiller endotel hücrelerinin oluşumunu önemli ölçüde etkiler.[29]

TZF, fizyolojik bir fibrin matris olarak fibrin membranda hızlı bir anjiyogenez geliştiğinde kök hücreler için ağ görevi görür. Bu durum kemik defektlerinin tedavisinde ilgi çekicidir.[29]

2.1.2.1. TZF Elde Edilmesi

TZF hazırlama metodu çok kolaydır: Antikoagülan içermeyen tüpe alınan 10 mililitre (ml) venöz kan 10 dakika (dk) boyunca 3000 dakika başına devir (rpm) hızda santrifüj edilir. Antikoagülanın yokluğu, tüp duvarlarıyla temas halinde olan trombositlerin dakikalar içinde aktive olmasını ve pıhtılaşma faktörlerinin salınımını ifade eder. Fibrinojen başlangıçta tüpün üst kısmında bulunur daha sonra trombin tarafından fibrine dönüştürülür. Sonuç olarak üstte PPP, orta kısımda fibrin ağ tabakası ve altta ise eritrosit tabakası oluşur.



Şekil 2.4. Trombositten zengin fibrin elde edilmesi

2.1.3. Trombosit Konsantrelerinin Sınıflandırılması ve TZF Modifikasyonları

Ehrenfest ve ark.[30] ilk olarak 2009 yılında trombosit konsantrelerinin fibrin yapısı ve hücre içeriğine göre trombosit konsantrelerini 4 gruba ayıran bir sınıflandırma yaptılar.

Bu sınıflamaya göre tanımlanan 4 ana grup şu şekildedir: Saf Trombositten Zengin Plazma (P-TZP), Lökosit Trombositten Zengin Plazma (L-TZP), Saf Trombositten Zengin Fibrin (P-TZF), Lökosit Trombositten Zengin Fibrin (L-TZF)

Saf Trombositten Zengin Plazma (P-TZP), içeriğinde lökosit yoktur ve düşük yoğunluklu bir fibrin ağ yapısına sahiptir. Bu sebepten dolayı sıvı veya enjekte edilebilir jel formunda kullanılırlar.[30]

Lökosit Trombositten Zengin Plazma (L-TZP), düşük yoğunluklu fibrin matriksi içerisinde lökosit bulundurmasıyla karakterize edilmektedir. Enjekte edilebilir formu sayesinde özellikle cilt yaraları ve sütür hattı bölgelerinde klinik uygulama alanı bulmaktadır.[30]

Saf Trombositten Zengin Fibrin (P-TZF), lökosit içermeyen ve yüksek yoğunluklu fibrin ağı ile karakterize edilmektedir. Bu yoğun fibrin yapısı enjeksiyon için uygun değildir; ancak katı formu sayesinde çeşitli klinik uygulamalarda kullanılabilmektedir.[30]

Lökosit Trombositten Zengin Fibrin (P-TZF), yüksek lökosit içeriği ve güçlü fibrin matriksi ile karakterize edilmektedir. Yoğun yapısı nedeniyle enjeksiyon formunda kullanılamamakta, ancak katı formu sayesinde klinik uygulamalarda değerlendirilebilmektedir. Literatürde "Choukroun'un TZF'si" olarak da tanımlanan bu ürün, antikoagülan içermeyen silika kaplı tüplere alınan venöz kanın santrifüj edilmesiyle elde edilmektedir. Trombositten Zengin Plazma ürünlerinden farklı olarak kolay çözünmeyen bu yapı, yavaş bir şekilde şekillenmektedir. Yapısındaki lökositleri ve trombositleri yüksek verimlilikte korur. Bu biyomalzemenin en önemli avantajı, düşük maliyetle aynı anda çok sayıda ve hızlı bir şekilde üretilebilmesidir. Bu özelliklerinden dolayı diş hekimliği ve tıp alanında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır.[30, 31]

Son yıllarda TZF'nin elde edilme protokolüne ilişkin olarak araştırmacılar tarafından 2 temel değişiklik önerilmiştir. Bu değişiklikler, kullanılan tüpün tasarımı ve materyali ile santrifüjün devir sayısı ve süresine dayanmaktadır.[32] Bu parametrelerdeki farklılıklara bağlı olarak TZF'nin çeşitli modifikasyonları ortaya çıkmıştır.

2.1.3.1. Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-TZF)

L-TZF steril cam tüplerde 2700 rpm hızda ve 12 dakikada santrifüj edilerek elde edilir. A-TZF ise steril vakumlu cam tüplerde 1500 rpm hızda ve 15 dakika boyunca santrifüj edilerek üretilir. Bu protokol sayesinde B ve T lenfositlerin yakalanmasının yükseldiği, trombositlerin ve nötrofillerin daha homojen dağıldığı öne sürülmüştür. Aynı zamanda A-TZF de trombositler de dahil olmak üzere canlı hücrelerin miktar olarak daha çok bulunduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Bu durum klinik uygulama da daha çok büyüme faktörü ve sitokin salınımına sebep olacağından avantaj sağlayacaktır.[32]

2.1.3.2. Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin + (A-TZF+)

Fujioka-Kobayashi ve ark.[32], A-TZF'nin santrifüj parametrelerini değiştirerek 1300 rpm'de 8 dakika süreyle santrifüj uygulamış ve bu protokol sonucunda A-TZF+ olarak adlandırılan yeni bir modifiye TZF geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, santrifüj süresinin azaltılmasıyla kan hücrelerinin maruz kaldığı santrifüj kuvvetlerinin düşeceğini, bunun sonucunda ise TZF matriksinde daha fazla hücrenin korunarak yer alacağını ileri sürmüşlerdir.

2.1.3.3. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-TZF)

Son zamanlarda üretilen TZF tiplerinden biri de I-TZF'dir. TZF'nin enjeksiyon formunda kullanılamaması, bazı klinik uygulamalarda dezavantaj oluşturabilmektedir. Bu nedenle, enjekte edilebilir veya sıvı formda yeni TZF türevleri geliştirilmiştir. Injektabl TZF, antikoagülan içermeyen plastik tüplere alınan kanın 700 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edilmesiyle elde edilmektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar 2400–2700 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilmesini önermiştir. Her iki yöntem aynı prensibe dayansa da, elde edilen ürün I-TZF'nin farklı varyantlarını temsil etmektedir. Günümüzde I-TZF, kemik greftleri ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Pıhtılaşma sürecinin tamamlanmasıyla birlikte greft partiküllerini uygun bir kıvama getirerek işlem kolaylığı sağlamakta, ayrıca greftin fibrin matrise sıkı bir şekilde tutunmasını destekleyerek partikül sızıntısını azaltmaktadır. Kemik greftini I-TZF ile karıştırmak, alıcı bölgede büyüme faktörlerinden yararlanılmasına ve tek kullanıldığında kemik greftinde olmayacak bir durumun oluşmasına olanak sağlar. Bu durum osteokondüktif bir grefti osteprogenitör hale getirerek daha hızlı ve verimli kemik oluşmasını sağlar.[32]

2.1.3.4.Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-TZF)

Tunalı ve ark.[33] L-TZF elde edilmesinde cam tüpler yerine titanyum kaplı tüpler kullanarak cam tüplerden kaynaklanabilecek silikanın olası olumsuz etkilerinden

kaçınmayı amaçlamışlardır. Bu sebepten dolayı gönüllü kişilerden aldıkları venöz kanı titanyum kaplı tüplerde 2800 rpm hızda, 12 dakika boyunca santrifüj ederek T-TZF'yi üretmişlerdir. T-TZF, L-TZF'ye kıyasla fibrin mimarisinde bazı farklılıklar sergilese de, temel fibrin yapısı açısından benzer özellikler göstermektedir. Bununla birlikte, T-TZF genel olarak L-TZF'ye kıyasla daha organize bir yapıya sahip olup fibrin tabakası daha kalın ve belirgin özellikler göstermektedir. Yapılan analizlerde, T-TZF'nin fibrin büyüklüğünün L-TZF'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bildirilmiştir. Trombosit ve lökositten zengin, güçlü bir fibrin ağı oluşturan T-TZF'nin tam etkinliğinin ortaya konulabilmesi için ise ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, T-TZF'nin elde edilmesinde kullanılan titanyum kaplı tüplerin yüksek maliyeti önemli bir dezavantaj olarak değerlendirilmektedir.

Tüplerin yüzey özelliklerini geliştirmek tüpe temas eden trombositlerin aktivasyonunu ve adezyonunu uyararak daha iyi bir TZF membran oluşumu için umut verici olabilir. Tunalı ve ark.[34], yenilikçi bir yaklaşım olarak geleneksel cam tüp yüzeylerini nano boyutta titanyum ile kaplayarak kan ile temas eden titanyum yüzey alanını artırmayı ve böylece trombositlerin titanyumla temas sonucu daha güçlü bir şekilde aktive olmasını sağlamayı hedeflemişlerdir.

Son yıllarda diş hekimliğinde nano teknoloji uygulamaları sayesinde gelişmiş özelliklere sahip modern malzemeler üretilmiştir. Diş hekimliği alanında potansiyel kullanım alanları olan nanomalzemeler arasında nano hidroksiapatit partiküller, nano kompozitler ve nano yapılı yüzeyler bulunmaktadır. Bu materyaller benzersiz özellikleri sebebiyle yeni bir yaklaşım ortaya çıkarmışlardır.[35]

Tablo 2.1. TZF hazırlama protokolleri

TZF	Üretildiği yıl	Rpm	Zaman (dakika)	Tüp
L-TZF	Choukron 2001[15]	2700	12	Cam Kaplı Tüp
A-TZF	Ghaanati 2014[36]	1300	15	Vakumlu Cam Tüp
A-TZF+	Fujioka-Kobayashi 2016[37]	1300	8	A-TZF ile aynı
I-TZF	Mourao 2015[38]	700	3	Kaplamasız Plastik Tüp
T-TZF	Tunalı 2014[33]	2800	12	Titanyum Kaplı Tüp

2.2. Nanopartiküller

Nano terimi Yunanca kökenli olup bilimsel ölçekte '1 milyarda 1' anlamına gelmektedir ve 10^{-9} birimiyle ifade edilmektedir. Bu kadar küçük bir boyutu zihinde canlandırmak güç olduğundan, nanoskalayı açıklamak amacıyla çeşitli benzetmeler kullanılmaktadır. Örneğin, 1 metre ile 1 nanometre arasındaki oran, dünyanın çapı ile 1 fındığın çapı arasındaki oranla yaklaşık olarak benzerdir. Ayrıca, 1 nanometre uzunluğu, 1 tırnağın 1 saniyede uzadığı mesafeye eşdeğer kabul edilmektedir.[39]

"Nanoteknoloji" terimi ilk olarak Richard Feynman tarafından tanıtılmıştır.[40] Mekanik ve kimyasal özellikleri, hacimsel olarak kullanılanlardan daha üstün olan ve atomik düzeyde 1–100 nm aralığında bir yapısal boyuta sahip materyalleri tanımlar . Örneğin, çapı 10 nm olan nano taşıyıcılar, bir hidrojen atomundan 100 kat daha büyük, ancak bir bakteriden 100 kat daha küçüktür. Nano materyallerin entegrasyonu, bileşiklerin optik, kimyasal, elektriksel ve mekanik özelliklerini geliştirebilir. Bu nedenle, nanoteknoloji tıp ve diş hekimliği alanlarında güçlü bir yardımcı haline gelmiştir.[41]

Nano terapiler, nanopartiküllerin (NP) biyosidal özellikleri sayesinde biyofilmin kontrolünü sağlama olanağı gösterir. NP'ler, nanometrik olarak küresel, kübik veya iğne şeklinde parçaçıkları içerir. Metalik NP'ler, farklı biyomateryallerin yüzeylerine kaplanmış veya polimerlerle birleştirilmiş oksitler ve organik NP'ler dahil olmak üzere birçok diş hekimliği uygulamasına sahip olabilir.[41] Çeşitli nanopartiküller arasında

nanoporlar, nanotüpler, kuantum noktaları, nanoshell'ler, nanosferler, nanoteller, nanokapsüller, dendrimerler, nanorodlar, lipozomlar vb. bulunmaktadır.[42] NP'lerin daha küçük çapı, sadece mekanik özelliklerini değil, aynı zamanda yüksek yüzey:hacim oranı nedeniyle antimikrobiyal etkilerini de artırır. [41]

Dental materyal olarak kullanılan nanoteknolojik ürünler, geleneksel tedavilerde ortaya çıkabilecek komplikasyonların aşılmasında avantaj sağlayan özgün fizikokimyasal ve biyolojik özellikler taşımaktadır. Çeşitli nanopartikül ve nanokompozit türlerinin, konak dokuların özelliklerini taklit edebildiği literatürde ortaya konulmuştur.[41]

Doku mühendisliği ve kök hücre araştırmalarının diş hekimliğindeki potansiyel uygulamaları, yüz kırıkların tedavisi, kemik hacminin artırımı, temporomandibüler eklemin kıkırdak rejenerasyonu, pulpa tedavisi, periodontal ligament yenilenmesi ve implant osseointegrasyonunu içermektedir. Doku mühendisliği, uzun bir iyileşme süresini ortadan kaldıran, daha önce kullanılan implantlardan biyolojik ve fizyolojik olarak daha stabil olan ve erken yüklemeyi güvenli bir şekilde destekleyebilen implantların yerleştirilmesini sağlar. Daha iyi ve gelişmiş özelliklere sahip kemik greftleri, nano boyutta hidroksiapatit kullanılarak geliştirilebilir. Nano boyutta hidroksiapatitin periodontal doku rejenerasyonu için gerekli hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir.[42]

Osteoblast proliferasyonu, implant yüzeyinde nano boyutlu parçacıkların oluşturulmasıyla indüklenmiştir. İmplant yüzeyinin nano ölçekte pürüzlendirilmesi, dokuda meydana gelen hücresel yanıt için önemlidir. Birçok çalışma, implant yüzeyinin nano boyutta osteojenik hücreleri önemli ölçüde etkilediğini ve nano ölçekte yüzey morfolojisinin osteoblast yapışmasını artırdığını göstermiştir. Nano boyutta yüzey morfolojisi alanı artırır ve böylece biyolojik ortamla etkileşime girebilecek artan bir implant yüzey alanı sağlar. [42]

Nanoteknoloji, organik bileşenlerden (özellikle kolajen) oluşan ve inorganik bileşenlerle güçlendirilmiş doğal yapıyı taklit etmeyi amaçlamaktadır. Nanokristaller, kristaller arasında yer alan nanoporlara sahip gevşek bir mikro yapıya sahiptir. Porların yüzeyleri, silika moleküllerinin eklenmesi nedeniyle protein adsorbe edecek şekilde değiştirilmiştir. Kemik defektleri, hidroksiapatit nanoparçacıkları kullanılarak tedavi edilebilir.[42]

2.2.1.Hidroksiapatit Nanopartiküller

Hidroksiapatit, doğal olarak oluşan bir mineral (kalsiyum apatit formu) olup, aynı zamanda kemiklerin ve dişlerin ana inorganik bileşenidir.[43] Kemiklerin ağırlık olarak yaklaşık %8'i sudan, %22'si proteinden ve %70'i mineralden oluşur. Hidroksiapatit, kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan bir kalsiyum fosfat formudur ve altıgen kristal yapıya sahiptir. Kemikler, sertlik ve dayanıklılıktan sorumlu olan 5–20 nm genişliğinde ve 60 nm uzunluğunda iğne şeklindeki bir bileşik olan hidroksiapatitin yaklaşık %65'ini içerir.[44]

Hidroksiapatit biyolojik olarak aktif (osteokondüktif) bir madde olup, bu nedenle, canlı kemik veya kemiğe dönüşme potansiyeline sahip hücrelerin yakınında yerleştirildiğinde kemik büyümesini destekleme yeteneğine sahiptir.[41] Doğada başka kalsiyum fosfat formları da bulunmaktadır, ancak hidroksiapatit bunlar arasında en stabil ve en az çözünür olanıdır. Hidroksiapatit, iyi biyouyumluluk ve biyolojik aktiviteye sahip bir malzemedir. Biyouyumluluk, bir malzemenin performansı sırasında ev sahibi tarafından uygun bir yanıt verilmesi ile sağlanırken, biyolojik aktivite, malzemenin canlı dokuya yapışma yeteneğini ifade eder. Ancak, bu malzemenin dezavantajları, gözenekli yapısından ve zayıf mekanik özelliklerinden kaynaklanmaktadır.[45]

Hidroksiapatit nanopartiküllerinin olağanüstü biyouyumlu ve biyolojik aktivitesi, ilk olarak diş hekimlerinin, ortopedik cerrahların ve kemik doku mühendislerinin

dikkatini çekmiştir. O zamandan beri, HAp'ın potansiyel uygulama sayısı bu alanların ötesine genişlemiştir. Bugün, HAp'ın tıbbi uygulamalarda doku tanısı, tedavisi ve artırılması için cazip bir aday olmasını sağlayan birçok fizikokimyasal özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. onuç olarak, HAp; stokiyometrik, kalsiyum eksik, iyonik ikame edilmiş, yoğun veya gözenekli, nanokristalin ya da mikrokristalin, kolloidal, granüler ve monolitik formlar dahil olmak üzere pek çok farklı kompozisyonel ve yapısal biçimde uygulanmıştır. Bu HAp formlarının her biri belirli özelliklere sahiptir ve benzersiz biyolojik tepkiler oluşturur.[46] Nano-hidroksiapatitler ilk olarak 1980'lerde Japonya'da üretilerek kullanılmaya başlanmıştır. Diş macunlarının içerisinde çürük önleyici ajan olarak katılan nano-hidroksiapatitler, 1993 yılında Japonya'da ilkokul çocuklarında uygulanmış ve nano-hidroksiapatit içeren diş macunu kullanan çocuklarda standart bir florürlü diş macunu kullanan çocuklara oranla daha az diş çürüğü geliştiği bildirilmiştir.[47]

Hidroksiapatit nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalarda kemik için bir apatit deposu olarak mikrometre boyutundaki hidroksiapatite kıyasla daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, farklı morfolojilere sahip NanoHAp partiküllerinin yüksek dereceli malign melanom hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve elde edilen bulgular, bu partiküllerin nano-ölçek özellikleri sayesinde söz konusu malign hücrelerin proliferasyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir.[48] Başka bir çalışma da, 20 ila 80 nm arasında değişen farklı boyutlardaki NanoHAp'ın kemik ile ilgili hücrelerin (kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve osteosarkom hücreleri) proliferasyonu üzerindeki etkilerini analiz etmiştir.[49] Hücre kültürü deneyleri, geleneksel HAp ile karşılaştırıldığında, nanofaz mineralinin sitofilisitesinin NanoHAp ile arttığını göstermiştir. Ayrıca, NanoHAp için, özellikle 20nm'den küçük partiküller için, kök hücrelerin artan canlılığı ve yayılması izlenmiştir. Aynı şekilde, 20 nm parçacıkların osteosarkom hücrelerinin büyümesini iyi bir şekilde inhibe ettiği ortaya çıkmış, fakat tüm NanoHAp'lar büyüme sürecini

yavaşlatmıştır. Başka bir çalışmada ise NanoHAp'ın antitümör etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir.[44]

Hidroksiapatit, esas olarak kemiklere ilaç taşıyıcı olarak kullanılır; bu, onun doğal osteoiletkenlik avantajından faydalanmayı sağlar, ancak aynı zamanda uygun hedefleme faktörleri ile etiketleyerek diğer organlara ve dokulara da yönlendirilir. İlaçların akıllı bir şekilde salınımı, tümörler ve enfeksiyon bölgeleri gibi asidik ortamlarda, HAp'ın pH'a duyarlı çözünme özellikleri sayesinde sağlanabilir. Hidroksiapatitin bir diğer önemli avantajı, parçacık boyutunun ve fonksiyonel grupların bağlanmasının fiziksel adsorpsiyon veya yüzey fosfat ikamesi yoluyla kontrol edilebilmesidir. Bu özellik, daha hassas hücre ve doku hedeflemesine imkan tanımaktadır. Ayrıca, HAp'ın son derece esnek kristal yapısı, farklı atom yarıçaplarına sahip iyonların kolaylıkla yapıya entegre olmasına olanak sağlamaktadır.[46]

Hidroksiapatitin biyouyumluluğunun genellikle tartışılmaz olduğu düşünülse de, bu genel bir terim değildir ve her özel bağlamda ve her belirli boyut, şekil ve kristal yapı için HAp parçacıklarının yeniden test edilmesi önerilmektedir. Mevcut anlayış, biyolojik yanıtın parçacıkların boyutu ve yükü gibi parametreler ile bu parçacıkların canlı sistemle etkileşim şekli tarafından etkilendiğidir. Ayrıca, farklı hücre hatları HAp'a farklı tepkiler verebilir ve farklı testler genellikle HAp'ın biyouyumluluğu ile ilgili olarak farklı sonuçlar verebilir.[46]

Doku mühendisliği ilkelerine göre canlı hücreler ile bu hücrelere uygun iskelelerin beraber kullanılması sayesinde çeşitli dokuların yenilenmesi mümkündür. Son zamanlarda, mezenkimal kök hücreler doku mühendisliği alanında potansiyel faydaları sebebiyle büyük bir ilgi görmektedir.[50] Mezenkimal kök hücreler, bir taşıyıcı araç, matris iskelesi veya biyoaktif büyüme faktörleriyle beraber kullanıldığında doku onarımının incelenmesi için önemli avantajlar sağlar.[51]

2.3. Kök Hücreler

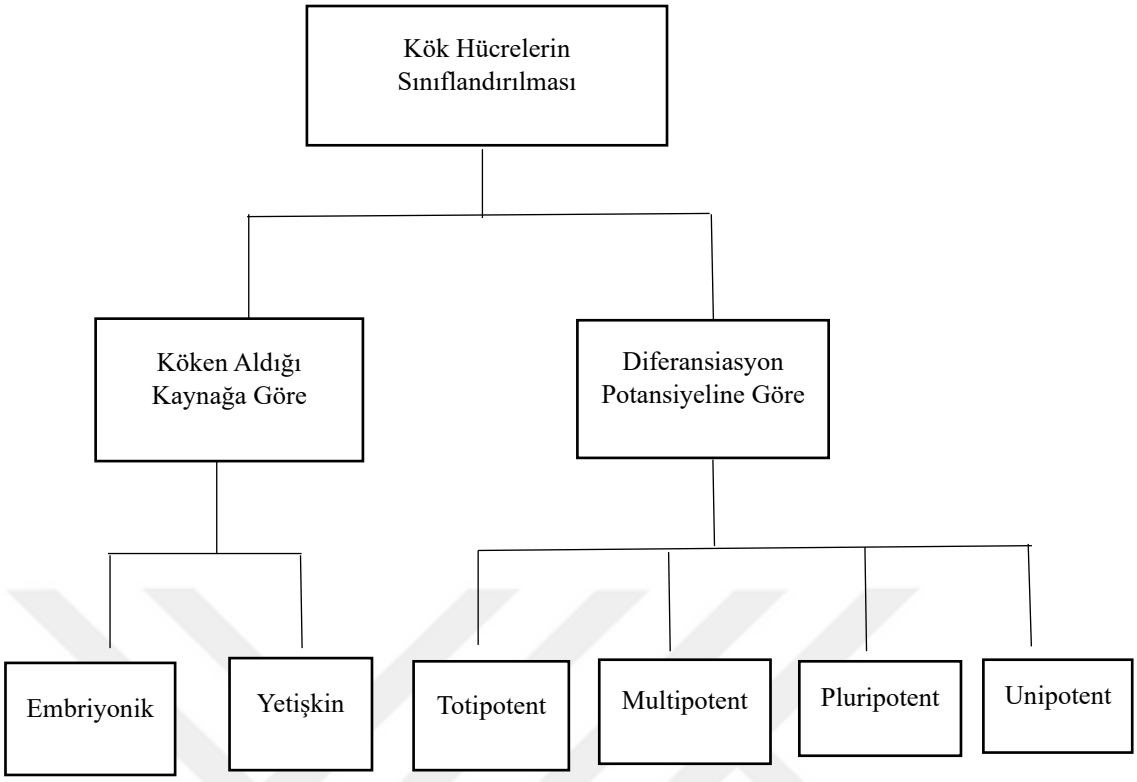
Kök hücreler, kendini yenileme yeteneğine sahip olan ve farklılaşma süreçleri aracılığıyla çok sayıda farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeli bulunan olgunlaşmamış ve özelleşmemiş hücreler olarak tanımlanmaktadır.[52] Bu hücrelerin temel özellikleri; yüksek çoğalma kapasitesine sahip olmaları, genellikle tek bir hücreden köken almaları ve farklı hücre soylarına farklılaşabilme potansiyeli taşımalarıdır.[53]

Kök hücreler köken aldıkları dokulara göre 2 şekilde kategorize edilirler: Embriyonik (erken) kök hücre ve yetişkin (olgun) kök hücre.[54] Embriyonik kök hücreler, sınırsız olarak kendilerini yenileme ve farklılaşma kapasitesi gösterirler. Organizmayı oluşturan mezoderm, ektoderm ve endoderm katmanlarının hücrelerine dönüşebilir. Bu hücreler blastosistin iç tabakasından köken alırlar. Yetişkin kök hücreler multipotent hücrelerdir ve bir veya birkaç hücre soyuna farklılaşma potansiyeli gösterirler.[55]

Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler 4 sınıfa ayrılır: Totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent. Totipotent hücreler, embriyo dışı hücre tipleri de dahil olmak üzere tüm hücreleri oluşturur. Pluripotent hücreler, embriyonik hücreler de dahil olmak üzere tüm vücut hücrelerini oluşturur. Multipotent hücreler, hematopoietik kök hücreler gibi tüm doku hücrelerini oluşturur. Unipotent hücreler, tek bir hücre tipi oluşturur.[56]

2.3.1. Yetişkin Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler

Yetişkin kök hücrelere somatik kök hücreler veya doğum sonrası kök hücreleri de denir.[58] Yetişkin kök hücreler beyin, deri, bağırsak, karaciğer, dişler, testis, kalp gibi farklı organlardan ve kemik iliği, kan damarları, periferik kan, iskelet kası ve yumurtalık epiteli gibi çeşitli dokulardan üretilmiştir.[59] Ancak, bu hücrelerin kendilerini yenileme ve farklılaşma potansiyelleri, embriyonik kök hücrelere kıyasla daha sınırlıdır. Yetişkin kök



Şekil 2.5. Kök hücrelerin sınıflandırılması[57]

hücreler, birden fazla hücre soyuna farklılaşabilmelerine rağmen pluripotent özellik göstermemektedir. Bu hücreler arasında en yoğun araştırmaya konu olan grup ise hematopoetik kök hücrelerdir (HKH).[60] HKH'ler kemik iliği, periferik kan veya göbek kordonu kanı gibi farklı anatomik bölgelerden elde edilebilir.[61] Kemik iliği stroması, hematopoietik ve hematopoietik olmayan olmak üzere 2 ana bölgeye ayrılmaktadır. İnsanlarda hematopoietik bölge, hematopoietik kök hücreleri barındırırken; henüz tam olarak karakterize edilmemiş olan hematopoietik olmayan bölge ise ağırlıklı olarak endotel hücreleri, mezenkimal kök hücreler ve bunların türevleri olan adipositler, kondrositler ve osteojenik soy hücrelerinden oluşmaktadır.[62]

Birçok farklı tipte yetişkin kök hücre, çeşitli mezenkimal dokularda bulunur ve bu hücrelere topluca mezenkimal kök hücreler veya mezenkimal stromal hücreler denir.[58] Mezenkimal kök hücreler, yüksek kendini yenileme kapasitesine sahip olup mezodermal

soylara farklılaşabilme potansiyeli taşımaktadır. Bu özellikleri sayesinde kıkırdak, kemik, yağ dokusu ve iskelet kası oluşturabilmekte ve pek çok kraniyofasiyal yapının gelişimine katkıda bulunmaktadır.[63] Tedaviye ihtiyaç duyan hastalardan izole edilebildiği için, immünorejeksiyon endişesi olmadan otolog olarak kullanılabilir.[64] MKH'ler kolayca erişilebilmelerinin yanı sıra etik açıdan da daha az soruna sahiptir.[65] Özellikle, son çalışmalar, kültüre edilmiş MKH'lerin anti-apoptotik, immün modülatör, anjiyojenik, anti-skar yapıcı ve kemo-çekici özelliklere sahip çeşitli biyoaktif moleküller salgıladığını göstermektedir ve bu da in vivo olarak lokal rejeneratif ortamlar sağlamak ve geliştirmek için araç olarak kullanılmalarına temel oluşturmaktadır.[61]

MKH'ler yağ dokusundan, amniyotik sıvıdan, amniyotik zardan, endometriyumdan, mensturasyon kanından, periferik kandan, plasenta ve fetal zardan, tükürük bezinden, deri ve sünnet derisinden, subamniyotik göbek kordonu zarından, sinovyal sıvıdan ve Wharton jeli gibi birçok insan doku ve organından izole edilmiştir.[65] Diş dokularından elde edilen hücrelerde bir tür mezenkimal kök hücredir ve özel yöntemlerle diş dokularından ayrılarak elde edilebilirler. Peridontal ligament, pulpa, süt dişi, apikal papilla, dental folikül, diş germi, gingiva ve alveoler kemik MKH elde edilen diş dokularıdır.[66]

Farklı laboratuvarlar, kısmen farklı işleme veya kültür koşulları altında, belirli özelliklere sahip MKH'leri (veya MKH benzeri hücreleri) tanımlamış ve bunlara farklı isimler verilmiştir. Spesifik olarak mezenkimal kök hücre belirteçlerinin eksikliği ve MKH popülasyonlarının heterojenliği nedeniyle, Uluslar Arası Hücresel Terapi Merkezi Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, insan kemik iliği ve diğer mezenkimal dokulardan izole edilen MKH'lerin in vitro olarak karşılaması gereken üç asgari kriter belirlemiştir.[67] Bu kriterler şunlardır:

- Standart kültür koşullarında hücrelerin plastiğe yapışması gereklidir

- Mezenkimal kök hücreler spesifik olarak bir yüzey antijeni ekspresyon örüntüsü göstermelidir. CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerini pozitif, CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19, CD79a, HLA-DR yüzey belirteçlerini negatif ifade etmelidir.
- Mezenkimal kök hücreler osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soylara farklılaşma potansiyeli gösterilmedir.

Periodontal ligament, sement ile alveolar kemik arasında yer alan özel bir dokudur ve dişlerin korunması ile desteklenmesinde temel rol oynamaktadır. Bu doku sürekli bir yenilenme kapasitesine sahiptir ve söz konusu yenilenmenin, diş folikülünden köken alan mezenkimal progenitör hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca periodontal ligament, sementoblastlar ve osteoblastlara farklılaşabilen çeşitli hücre tiplerini içermektedir..[68] Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (PDLKMKH), çok yönlü farklılaşma potansiyeli sergilemekte olup in vivo koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik fenotipler gösterebilmektedir.[55] Peridontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler, gömülü üçüncü azı dişlerinin köklerinde bulunan peridontal ligamentten izole edilirler ve STRO-1 ve CD146 ekspresyonu gösterdikleri bulunmuştur.[69]

Pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (PKMKH), yetişkinlerin üçüncü molar dişlerinin pulpasından izole edilen ilk diş dokusu kaynaklı kök hücre türüdür. PKMKH'lerin baskın morfolojisi, fibroblast hücrelerine benzer şekilde olsa da, PKMKH'lerin nöral kret veya mezenkimal kökeni nedeniyle çeşitli morfolojiler görülebilir.[59] PKMKH' lerin izolasyonları gerçekleştirilmiş ve sonrasında çeşitli farklılaşma ortamlarıyla dentinojenik, osteojenik, adipojenik, nörojenik, kondrojenik ve miyojenik soylara farklılaşma potansiyelleri gösterilmiştir.[70, 71]

Diş gelişimi sırasında, dental papilla pulpa dokusuna dönüşür ve sonrasında kökün gelişimine katkı sağlar. Dental papilla, gelişmekte olan köke gevşek bir şekilde bağlanır

ve apikale doğru ilerler.[72] Apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreler (APKMKH) kendilerini yenileyebilen fibroblast benzeri hücrelerdir ve PKMKH'lerden daha yüksek bir proliferasyon oranına sahiptirler. Diğer diş kök hücrelerine benzer şekilde, APKMKH'ler de erken mezenkimal yüzey belirteçleri olan STRO-1 ve CD146'yı ifade eder.[69] Bu hücreler, uygun indüktif ortamlarda kültürlendiklerinde osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve nörojenik farklılaşma kapasitelerini gösterirler.[68]

Daimi dişlerin gelişimi, süt dişlerinin kök rezorpsiyonu ile ilişkili bir süreçtir. Çekilen veya doğal olarak düşen süt dişlerinin pulpa dokusu, kök hücreler için değerli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. 2003 yılında yapılan çalışmalarda, süt dişi pulpa dokusundan mezenkimal kök hücreler izole edilmiş ve bu hücreler süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SKMKH) olarak tanımlanmıştır.[73] SKMKH, dopaminerjik nöronlar, odontoblastlar, osteoblastlar, kondrositler, adipositler, karaciğer hücreleri, deri hücreleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere bir çok farklı hücre tipine farklılaşabilir. SKMKH, diş ve kemik rejenerasyonu, tedavi edilemeyen pediatrik cerrahi hastalıkları, karaciğer yetmezliği, sinir rejenerasyonu ve revaskülarizasyon gibi klinik uygulamalarda potansiyel bir hücre kaynağıdır.[66]

Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFKMKH), diş germini çevreleyen mezenkimal kökenli bir doku olan diş folikülünde bulunur ve yirmi yaş dişi çekiminden sonra kolayca izole edilebilir. Bu hücreler yalnızca 20 yaş dişi sürmesi sırasında hastalardan elde edilebilir. DFKMKH, alveolar osteoblastlara, PDL fibroblastlarına, sementoblastlara, adipositler ve nöron benzeri hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir. DFKMKH fibroblast benzeri, koloni oluşturan ve plastik yapışkan hücrelerdir.[61]

Diş germi kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DGKMKH), diş dokularının gelişiminin çan evresinde 3. molar diş germinin mezenkimal dokusundan izole edilen,

yüksek proliferasyon hızları ve stabil iğsi morfolojileri ile karakterize edilen multipotent kök hücre popülasyonunu oluşturmaktadır.[74] DGKMKH, in vitro olarak hepatositlerin morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel özelliklerine sahip hücrelere farklılaşabilir ve bu da bu hücrelerin karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için kullanılabileceğini düşündürmektedir.[75]

Alveolar kemik, embriyonik olarak dental folikül kökenli bir kemiktir ve dişleri yerinde tutar.[59] 2003 yılında alveolar kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (AKKMKH) başarılı bir şekilde izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, iğ şeklinde fibroblast benzeri bir morfoloji, plastik tabanına yapışma ve koloni oluşumu özelliği sergilemektedir.[76] AKKMKH'lerin yüksek bir proliferasyon kapasitesine ve miyojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.[66] Diğer kök hücre popülasyonlarına benzer şekilde kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerine sahiptirler.[77]

2.3.1.1.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Diş eti, dişleri çevreler ve mukozal bir bariyer olarak görevi görür. Histolojik ve işlevsel olarak diş eti, çiğneme sırasında yiyeceklerin sebep olduğu sürtünmeye direnç gösteren çiğneyici mukoza dokusuna sahiptir.[78] Diş eti hızlı yara iyileşme özelliğiyle karakterize olan periodonsiyumun temel bir bileşenidir. Diş eti dokusu, epitel tabakası ve altındaki lamina propriadan oluşur.[79] Diş eti bağ dokusu, embriyonik olarak nöral kret ektomezenşimi, perifoliküler mezenşim ve kısmen dental folikülden oluşur. Embriyonik kökeni ve dişlere ve periodontal ligamente yakınlığı, MKH' lerin bilinen bir rezervuarı olması, diş eti bağ dokusun bir kök hücre kaynağı olmasını sağlar. Kesilmiş diş eti dokusu deepitelize edilir ve bağ dokusu ayrılarak toplanır. Bağ dokusu kesilir ve MKH' leri izole etmek için kullanılır.[80] Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler (GKMKH) ilk olarak 2009 senesinde diş etinden izole edilerek elde edilmiştir.[81] GKMKH'ler normal veya iltihaplı diş etinden, yapışık ve serbest diş etinden ve hiperplastik diş etinden izole

edilerek, enzimatik sindirim veya eksplant kültürü yoluyla elde edilebilir.[82] GKMKH'ler, CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD271 ve STRO-1 gibi belirteçleri pozitif şekilde ifade ederken CD14, CD19, CD34, CD38, CD45 ve CD54 yüzey antijenlerini ifade etmez GKMKH'ler, uzun süreli in vitro koşullarda normal karyotip ve telomeraz aktivitesini koruyarak iyi bir klinik güvenlik gösterir.[66]

Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler ağız boşluğundan elde edilen diğer MKH'lere kıyasla, kolay erişilebilirlikleri ve donör bölgedeki yaraların hızlı iyileşmesi sebebiyle daha avantajlıdır.[83] GKMKH' ler, diğer dokulardan elde edilen MKH' lerle aynı farklılaşma ve rejenerasyon özelliklerini gösterir. İn vitro, tek koloniden üretilen GKMKH' lerin adipositlere ve osteoblastlara farklılaştığı gösterilmiştir.[84] İn vitro ve in vivo mükemmel immünomodülatör özelliklere sahiptirler.[85]

Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler, PDLKMKH'lere kıyasla çok daha yüksek ardışık kültür ve proliferasyon oranı gösterirler. GKMKH'ler, birden fazla soya farklılaşması, bu farklılaşma ile ilişkili genlerin ekspresyonu ve in vivo ortamda kemik oluşumu için güçlü bir potansiyele sahiptir. GKMKH'ler, indüktif kültür koşullarında inkübe edildiklerinde osteoblastik, adipositik, kondrositik, endotelyal ve nöral hücrelere farklılaşma göstermiştir.[80] Periodontal ligament kök hücreleri periodontal doku rejenerasyonu için en yaygın olarak incelenen ve kullanılan hücrelerdir. Ancak, in vitro PDLKMKH elde etmek için, birden fazla çekilmiş dişe ihtiyaç vardır ve kültürün başarı oranı çok düşüktür GKMKH'ler, bol miktarda kaynak içermeleri ve diş çekimi gerektirmemeleri nedeniyle PDLKMKH'lere ve diğer MKH'lere göre daha kolay elde edilebilirler.[86] GKMKH'ler bağ dokusu benzeri yapılar oluşturabilirken, PKMKH'ler ve PDLKMKH'ler dentin benzeri ve sement/periodontal ligament benzeri yapılar oluşturabilir. GKMKH'lerin bu özelliği, bu hücreleri ağız dışı hücre bazlı klinik uygulamalarda ve ayrıca ağız içi rejeneratif kemik prosedürlerinde kullanıldığında, onu

ağız boşluğundan elde edilen diğer MKH'lere göre üstün veya tercih edilen bir MKH türü haline getirmektedir. Bu nedenle, GKMKH'ler gelecekte rejeneratif tıpta kolayca elde edilebilen bir kök hücre kaynağı olarak kullanılması umut vericidir.[80]

Hücre kültürü teknikleri, belirli in vivo deneylere başlamadan önce bir tarama yöntemi olarak biyomalzeme araştırmalarında kullanılma eğilimindedir. Bu teknikler inflamasyon, yara iyileşme mekanizmalarının değerlendirilmesini, belirli biyomalzeme uygulamalarının incelenmesini ve gelecekteki yönelimlerinin belirlenmesini sağlar.[87]

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir hayvan veya bitkiden hücrelerin alınması ve daha sonra yapay olarak kontrol edilen bir ortamda büyütülmesi işlemidir.[88] Hücre kültüründe hücrelerin optimum şekilde büyümesi için ortamda kontrollü bir sıcaklık, hücrelerin yapışması için uygun bir yüzey ve doğru pH ve osmolaliteyi koruyan uygun bir büyüme ortamı ve inkübatör gereklidir. Hücre kültüründeki en önemli ve kritik adım, in vitro gelişim için uygun büyüme ortamının seçilmesidir. Büyüme ortamı veya kültür ortamı, mikroorganizmaların, hücrelerin büyümesini desteklemek üzere tasarlanmış sıvı veya jeldir. Hücre kültürü medyası genellikle uygun bir enerji kaynağı ve hücre döngüsünü düzenleyen bileşenler içerir. Tipik bir kültür ortamı, amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glukoz ve büyüme faktörleri, hormonlar ve yapışma faktörleri kaynağı olarak serumdan oluşan bir bileşim içerir. Besinlerin yanı sıra, ortam aynı zamanda pH ve osmolaliteyi korumaya da yardımcı olur.[89]

Hücre kültürü çalışmaları temel hücre biyolojisi, hücre döngü mekanizmaları, hücre fonksiyonları, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin incelenmesinde, yeni geliştirilen ilaçların etkilerinin değerlendirilmesinde, gen tedavilerinde, kanser hücrelerinin karakterizasyonunda, aşıların üretiminde kullanılabilir.[90]

2.4.1. Hücre Kültürü Tipleri

2.4.1.1. Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültürleri, doğrudan sağlam organizmadan alınan hücreler veya dokularla hazırlanır. Hücre tipine ve kültür koşullarına bağlı olarak birkaç günden birkaç aya kadar değişen sınırlı bir süre boyunca in vitro olarak muhafaza edilebilirler. Genellikle primer kültürler, olgunlaşmamış hücrelerden veya dokulardan elde edilir ve in vitro olarak farklılaşmalarına ve olgunlaşmalarına izin verilir. Genel olarak, birincil hücreler yalnızca sınırlı sayıda hücre bölünmesine uğrar ve sınırlı bir yaşam süresine sahiptir. Hemopoietik hücreler ve bazı transforme hücreler dışında, çoğu hücre yapışık özellik göstermektedir. Bu hücrelerin in vitro ortamda büyüyebilmeleri için özel olarak hazırlanmış yapay yüzeylere veya diğer hücrelerin yüzeyine tutunmaları gerekmektedir. Ayrıca, yapışık hücre popülasyonlarının bölünmesi ve yeniden kültüre edilmesi (alt kültürleme/pasajlama) sırasında hücrelerin ayrıştırılabilmesi için özel tekniklerin uygulanması zorunludur. [91]

2.4.1.2. Sürekli (Kalıcı) Hücre Kültürleri

Sürekli kültürler, süresiz olarak çoğalabilen hücrelerden oluşur. Sürekli bölünen hücreler, normal hücrelerin in vitro olarak çoğaltılmasının ardından (örn., fibroblastlar veya astrositler) sürekli alt kültüre alınması sürecinde kendiliğinden ortaya çıkabilir. Böyle bir hücre soyuna hücre suşu adı verilir. Bununla birlikte, "ölümsüz" hücrelerin çoğu, transforme hücreler sınıfına aittir. Transforme hücreler, kalıcı, kalıtsal bir değişiklik geçirmiştir ve tümörojeniktir. [91]

2.4.2. Hücre Kültürü Teknikleri

2.4.2.1. Süspansiyon Kültürleri

Süspansiyon kültürleri genellikle hemopoietik hücreler ve bazı transforme hücre hatları gibi bağımsız hücreler ve serbest yüzen hücreler veya hücre oluşumları için kullanılır. [91]

2.4.2.2. Monolayer (Tek Tabaka) Hücre Kültürü

Monolayer hücre kültürü, farklı laboratuvarlarda çeşitli protokollerle uygulanan ve en yaygın kullanılan hücre kültürü tekniğidir. Bu yöntemde hücreler, kültür kabının yüzeyine tutunarak büyümektedir; ancak daha iyi hücre adezyonu ve/veya daha fizyolojik büyüme koşullarının sağlanabilmesi için kültür kabı yüzeyine özel işlemler uygulanması gerekebilmektedir. Ayrıca, hücrelerin büyüme koşullarının hücre yoğunluğundan da etkilendiği bilinmektedir. Yüksek hücre yoğunluklu bir kültürde, temel metabolitler hızla tükenebilir ve bu da yoğunluğa bağlı büyüme inhibisyonuna ve sonunda hücre ölümüne neden olabilir. Tek katmanlı kültürlerin başlıca avantajlarından biri, doğrudan mikroskobik incelemeye imkan tanımalarının yanı sıra morfolojik, immünositokimyasal ve elektrofizyolojik analizler için kolay erişilebilirlik sağlamalarıdır. [91]

2.4.2.3.Üç Boyutlu Hücre Kültürleri

Üç boyutlu hücre kültürleri, kontrollü koşullar ve sürekli dairesel çalkalama altında yeniden toplanarak düzenli, küresel hücre yapıları oluşturan ayrışmış hücrelerden hazırlanır. Bu tür kültürler, maksimum hücre-hücre etkileşimine ve dolayısıyla doğal bir hücre matrisi ve histotipik hücre oluşumlarının gelişimine olanak tanır. [91]

2.4.2.4. Eksplant Kültürler

Eksplant kültürleri, dorsal kök ganglionları, sempatik ganglionlar, parasempatik siliyer ganglionlar gibi sağlam organlardan veya herhangi bir boyutu 1 mm'yi geçmeyen küçük doku parçalarından hazırlanır. Bu yaklaşım, yapısal ve işlevsel karmaşıklıkları

nedeniyle in vitro olarak yeniden oluşturulması en zor olan sinir dokuları için özellikle yararlıdır. [91]

Çalışmamızda, rutin olarak kullanılan cam ve titanyum tüplerden elde edilen TZF membranları ile yeni geliştirilmiş nano kalınlıkta hidroksiapatit kaplı cam tüplerden elde edilen HA-TZF membranlarının mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri karşılaştırılacak ve bu sayede literatürdeki mevcut boşluğun doldurulmasına katkı sağlanacaktır.

Çalışmamız, 3 farklı tüpte hazırlanan TZF membranlarının avantaj ve dezavantajlarının ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca L-TZF ve T-TZF membranlar ile HA-TZF membranlarının sitotoksik özellikleri ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek objektif klinik sonuçların elde edilmesine yönelik bilimsel bir zemin oluşturulacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırmada kullanılan deneysel yöntemler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESTEM) laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Gingival kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi amacıyla gerekli doku örnekleri, ESOGÜ Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği'nde poliklinik koşullarında temin edildi. İşlem öncesinde tüm gönüllülerden Aydınlatılmış Onam Formları alındı. Çalışmaya, sistemik hastalığı bulunmayan, 18–40 yaş aralığında, antikoagülan ilaç kullanmayan ve sigara içmeyen (aktif ya da pasif) sağlıklı 10 erkek gönüllü dahil edildi. Lokal anestezi altında gerçekleştirilen gömülü 20 yaş dişi cerrahisi sırasında flep kaldırılması ve yumuşak doku rekonstrüksiyonu gereken hastalardan doku örneği elde edildi. Kemik cerrahisi öncesinde, flep kaldırma işlemi sırasında sağlıklı dokudan yaklaşık 2×2 milimetre (mm) boyutlarında gingiva örneği alındı ve örnek antibiyotik içeren besiyerine transfer edildi.

Gönüllülerden alınarak laboratuvara transfer edilen dokuların 9 tanesinde gerekli hücreler kültürde başarıyla izole edildi. Bu hücrelerden 3 hastaya ait örnekler, flow sitometri ve farklılaşma besiyerleri kullanılarak karakterize edildi. Karakterizasyonu tamamlanan 3 vakadan yalnızca biriyle çalışmaya devam edilerek, belirlenen zaman noktalarında TZF örnekleri elde edildi. Laboratuvar ortamına getirilen doku, güvenlik kabini içerisinde, 5 miligram (mg) /ml dispaz (Stem Cell Technologies, America) ve 2,5 mg/ml kollajenaz tip 1'e (Serva, Germany) maruz bırakıldı. Tek bir hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla dişeti dokusu 37°C'de hafif çalkalamalı bir inkübatör içinde

enzimatik olarak ayrıştırıldı. Kollajenazı ve dispazı uzaklaştırmak için hücre süspansiyonuna santrifüj işlemi uygulandı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biological Industries, Israel Beıt Haemek) ve L-askorbat-2-fosfat ile takviye edilen 100 IU/ml penisilin-100 mikrogram (µg) streptomisin içeren nükleozidli alfa modifiyeli Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri (Alpha MEM) içerisinde kültüre alındı. İzole edilen hücreler 37°C'de nemli bir ortamda %5 CO_2 oranına sahip bir inkübatörde, 25 santimetrekare (cm^2) boyutunda 2 adet plastik doku kültür flaskına ekilerek 3 gün boyunca inkübe edildi. Kültür kabına yapışmayan hücreler 3. günün sonunda kültür ortamından uzaklaştırıldı ve kültürde kalan çoğalmakta olan hücrelere yeni besiyeri takviyesi yapıldı. Primer kültürdeki kültür tabanına yapışmış hücrelerin konfluensisi %70-80 ulaştığında hücrelere pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama işlemi için hücreler öncelikle kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) bulundurmayan fosfat tamponlu serum (PBS) ile yıkandı ve sonrasında %0,25 Tripsin- EDTA solüsyonu ile 37°C'de 3 dk boyunca inkübe edildi. Tripsinin etkisini engellemek amacıyla en az kullanılan tripsinin 2 katı kadar olan serum içerikli büyüme ortamı eklendi. Daha sonra hücreleri pellet haline getirmek için hücreler 350 x santrifüj kuvvetinde (g) 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücreler büyüme ortamı ile tekrar süspanse edilerek Thoma lamında sayıldı. Hücreler sonrasında 75 cm^2'lik kültür flasklarına $1x10^6$ hücre/flask yoğunluğunda olacak şekilde ekildi. 10-14 günlük süreçte 3 günde 1 besiyeri değiştirildi ve hücreler kültür kabında %80 konfluensiye ulaştıkça pasajlama işlemi uygulandı. Hücreler 3. pasaja geldiğinde izole edilen hücrelerin bir kısmı karakterizasyon analizi için kullanılırken kalan hücreler sonrasında kullanılmak amacıyla -150 °C dondurucuda stoklandı.[92-94]

3.2. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu

3.2.1. Karakterizasyon için MKH'lerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi

Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürde büyüdükten ve çoğaldıktan sonra fenotipik özelliklerini devam ettirdiklerini doğrulamak amacıyla farklılaşmamış kök hücrelere flow sitometri analizi yapıldı. Kök hücreler 3.pasajdan sonra bulunduğu kültür kaplarından tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve 2 defa Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandı. CD19, CD90, CD44, CD 69, CD 25 CD105, CD73, HLA-DR, CD14, CD34, CD45 (Brolegand, San Diago, Kaliforniya) antikorlarını çalışmak amacıyla hücreler $1x10^6$/45 hücre/ml yoğunlukta Ca^{+2} ve Mg^{+2} içerikli fosfat tamponlu serumda otoflorosan, CD pozitif ve CD negatif antikorlar 3 ayrı tüpte toplandı ve hücreler 10 dk oda sıcaklığında %4 paraformaldehit ile fikse edilerek inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 2 defa Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandı ve takiben %1 BSA (Bovine Serum Albumin) solüsyonu içerisinde spesifik olmayan antikorların bağlanmalarını önlemek amacıyla yarım saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonrasında hücreler 30 dk boyunca oda sıcaklığında primer antikorlar ile (marker flow: CD 19, CD90, CD44, CD 69, CD 29, CD105, CD73, HLA-DR, CD14, CD25, CD45) inkübe edildi ve tekrar 2 defa Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandı ve 30 dk boyunca hücrelere sekonder antikorlar uygulandı. Son yıkama aşamasından sonra Novocyte D3005(Agilent, Santa Clara, USA) cihazı ve NovoExpress (version 1.5.0, Agilent) yazılımı kullanılarak akım sitometri analizleri gerçekleştirildi.[92-97]

3.2.2. Karakterizayon için MKH'lerin Farklılaştırma Analizleri

Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaların in vitro farklılaşma çalışmaları daha önce açıklanan yöntemlere göre gerçekleştirildi.

İn vitro adipojenik farklılaşma, 3. pasajdan gelen hücreler (3000 hücre/cm2), adipojenik farklılaşmayı indüklemek için 6 oyuklu plakalarda kaplanmış tip I kollajen lamellere (BD Biosciences) ekildi. Adipojenik farklılaşma için hücreler, %10 FBS (Invitrogen/GIBCO), 0.5 milimolar (mM) izobütilmetilksantin (IBMX, Sigma-Aldrich), 10^6 molar (M) deksametazon (Sigma-Aldrich, Fluka Chemie AG, Buchs, İsviçre), 10 mg/ml insülin (Invitrogen/GIBCO), 200 mM indometasin (Sigma-Aldrich) ve %0,2 primosin (Invivogen) içeren ortamda 4 hafta boyunca inkübe edildi. Ortam haftada 2 kez değiştirildi. Adipojenik farklılaşmanın meydana geldiğini gösteren hücre içi lipid damlacıklarının varlığı, Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich) ile histokimyasal boyama ve ADIPONECTIN (ADN) ile immünositokimyasal etiketleme ile doğrulandı.

In vitro osteojenik farklılaşma, 3. geçitten gelen hücreler (3,000 hücre/cm2), tip I kollajen kaplı lamellerle 6 oyuklu plakalara ekildi. Osteojenik farklılaşma için hücreler, 100 nanomolar (nM) deksametazon (Sigma-Aldrich), 0.05 mM askorbat-2-fosfat (Wako Chemicals, Richmond, VA, ABD), 10 mM gliserofosfat (Sigma- Aldrich) içeren Dulbecco ‘nun Değiştirilmiş Eagle Ortamı (DMEM)‘nda (Invitrogen/GIBCO) Aldrich), %0,2 primosin (Invivogen) ve %10 FBS (Invitrogen/GIBCO) inkübe edildi. Farklılaşma ortamı haftada 2 kez değiştirildi. Dördüncü haftanın sonunda Alizarin Red S (ARS; Sigma-Aldrich, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) ile histokimyasal boyama ve OSTEOCALCIN (OCN) ile immünositokimyasal işaretleme ile osteojenik farklılaşma değerlendirildi.

İn vitro kondrojenik farklılaşma, kondrojenik farklılaşmayı başlatmak için $2.5x10^5$ hücre, 15 ml'lik bir polipropilen tüpe aktarıldı ve peletlenmiş bir mikrokütle (3 boyutlu) oluşturmak için 1300 x g'de 5 dakika santrifüjlendi. Mikro kütle, 2 hafta boyunca kondrojenik ortam ile kültürlendi ve ortam haftada 2 kez değiştirildi. Kondrojenik ortam, 10 ng/ml dönüştürücü büyüme faktörü-β1 (Biosource PHG0021), 50 ug/ml askorbat-2-

fosfat (Wako Chemicals, Richmond, VA, ABD), 0,1 mikromolar (μM) deksametazon (Sigma-Aldrich, Fluka Chemie AG, Buchs, İsviçre), 100 μg/ml sodyum piruvat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), 40 μg/ ml prolin (Merck, Darmstadt, Almanya), 50 mg/ml ITS ön karışımı (BD Biosciences, Bedford, MA) ve %0,2 primosin (Invivogen) içerecek şekilde hazırlandı. %4 paraformaldehit ile sabitlenen ve parafine gömülen peletler, histokimyasal olarak Alcian Blue (AB) ve Safranin O (SO) ile boyanacak ve kondrojenik farklılaşmayı değerlendirmek için COLLAGEN II (COLL II) ile immünohistokimyasal olarak etiketlendi.[92-94, 98, 99]

3.3. Nano-hidroksiapatit Kaplı Tüp Üretimi ve Analizi

Nano-hidroksiapatit (nHA) kaplama işleminde Ultrasonik Spray Kaplama (USP) sistemi kullanıldı. Cam tüpler, işlem öncesinde etil alkol ile temizlendi ve 4 dakika süreyle sıcak hava akışı uygulanarak kaplamaya hazır hale getirildi.

Çözelti hazırlığı için kalsiyum ve fosfor kaynakları olarak Calcium nitrate tetrahydrate [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] (AFG BioScience, %98 saflık) ve Ammonium dihydrogen phosphate [$NH_4H_2PO_4$] (Sigma Aldrich) kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler 0,1 M, 0,3 M ve 0,5 M konsantrasyonlarında çalışıldı.

Kaplama, USP sisteminde nozulun tüp içine koaksiyel olarak daldırılıp çıkarılması ile gerçekleştirildi. Bu protokol sayesinde tüp iç yüzeyinde boyuna yönde homojen bir nHA film elde edilmesi amaçlandı. Her çevrimde nozul belirlenen derinliğe indirilip kısa süreli püskürtme yapıldıktan sonra kontrollü biçimde çıkarıldı. İşlem toplam 5–10 dakika sürdü ve farklı çevrim sayıları denendi.

Kaplama sırasında taban sıcaklığı 300–350 °C arasında sabit tutuldu ve nozul hareketi ile püskürtme adımları PLC sistemi ile senkronize edildi. En iyi film bütünlüğü ve homojenliği, 0,5 M çözelti ve 300–350 °C koşullarında elde edildi.

Kaplanan tüplerin yapısal ve morfolojik özellikleri XRD, AFM, SEM ve EDS yöntemleri ile değerlendirildi. Sonuçlar, tüp iç yüzeyinde sürekli, tutarlı ve homojen nHA kaplamalar elde edildiğini göstermiştir.

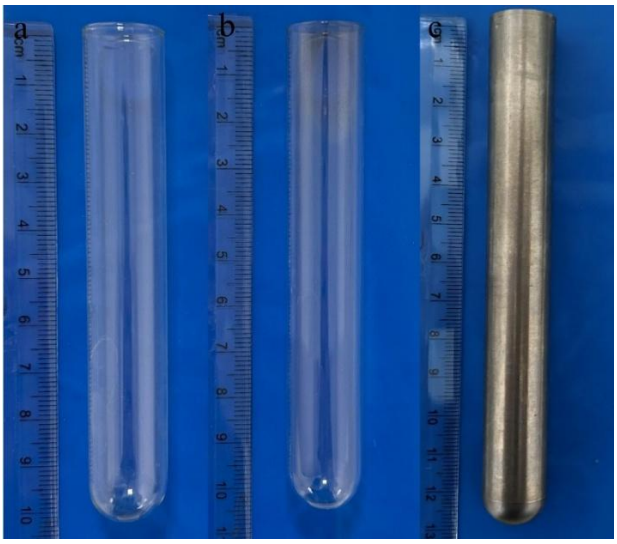
3.4. Deney Materyalleri Uygulamaları için Çalışma Gruplarının Hazırlanması

3.4.1. Çalışma Grupları

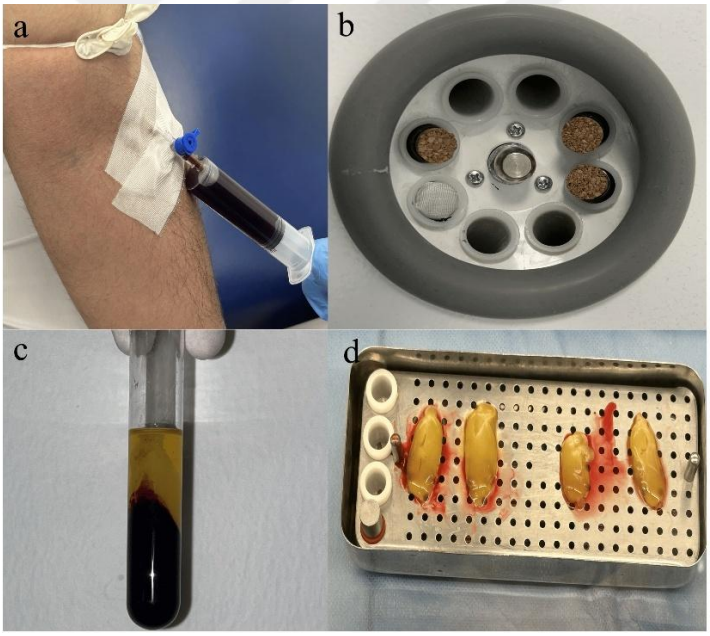
Tablo 3.1. Çalışmada hazırlanan deney grupları

Çalışma Grupları	Etken Madde
Grup 1:Negatif Kontrol	Tedavi yok + %1 FBS
Grup 2:Pozitif Kontrol	Tedavi yok + %10 FBS
Grup 3:Cam tüp	L-TZF (Lökosit Trombositten Zengin Fibrin)
Grup 4: Nano kalınlıkta hidroksiapatitle kaplı cam tüp	HA-TZF (Hidroksiapatit Trombositten Zengin Fibrin)
Grup 5: Titanyum tüp	T-TZF (Titanyum Trombositten Zengin Fibrin

Gönüllü bireyden 30 ml kan alındı. Gönüllünün antekübital veninden elde edilen kanlar zaman geçirmeden antikoagülan içermeyen 10 ml' lik cam tüplere, 10 ml' lik nano kalınlıkta hidroksiapatitle kaplı cam tüplere ve 10 ml' lik titanyum tüplere konularak cam ve nano boyutta hidroksiapatitle kaplı tüp 2700 rpm de 12 dakikada, titanyum kaplı tüp ise 2700 rpm 20 dakikada masa santrifüjünde (elektro-mag, İstanbul, Türkiye) santrifüj edildi. Elde edilen TZF steril metal kaba yerleştirildi. Daha sonra TZF pıhtıları metal kaplar üzerinde kompresör ve kapak ile kapatılarak kapağın ağırlığı kadar 10 dk kompres edildi ve membran elde edildi.



Şekil 3.1. TZF membran elde etmek için kullanılan tüpler **(a)** cam tüp, **(b)** nano kalınlıkta hidroksiapatitle kaplı cam tüp, **(c)** titanyum kaplı tüp



Şekil 3.2. (a) Hastadan kan alınması, **(b)** tüplerin santrifüje yerleştirilmesi, **(c)** TZF elde edilmesi, **(d)** TZF'lerin steril metal kaba yerleştirilmesi

Daha öncesinden karakterize edilmiş olan 3. pasajdaki gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile çalışma devam ettirildi.

-150°C stoklarımızda saklanan hücreler hızlıca çözdürülmek için 37°C su banyosuna alındı. Sonrasında çözülmüş olan hücreler tam bir besiyeri ile 2 kez yıkandı

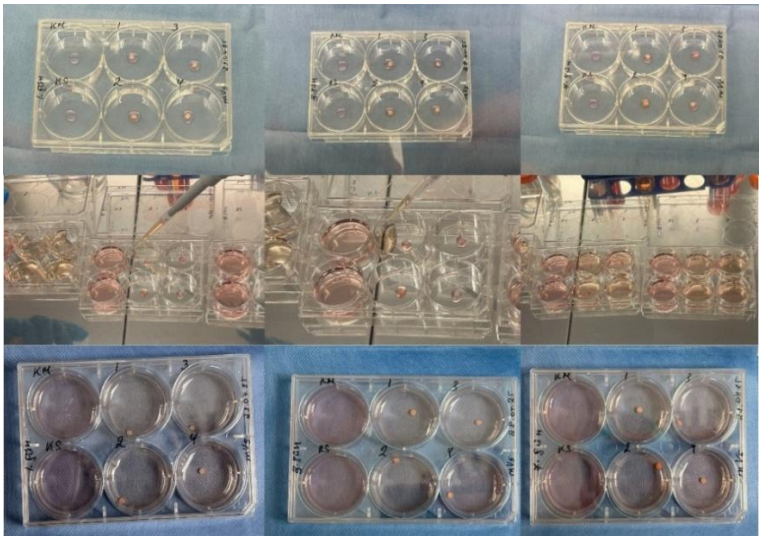
ve deneyler için yeterli hücre sayısını elde etmek amacıyla 37°C sıcaklığa sahip %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edildiler.

Daha önceden hücre kültür ortamına koyulmak üzere gönüllü bireyden alınan kan örnekleri hazırlanan TZF membranları, metal kompresör ve kapak arasında 10 dakika boyunca kapağın ağırlığı kadar kompres edilerek elde edildi. Çalışmalara göre in vitro ortamda 7 gün boyunca bozunmayan TZF membranlar için deney aralıkları 1, 3 ve 7. günler olacak şekilde belirlendi.[100, 101] 1, 3 ve 7. günlerdeki deney inkübasyon periyodları için her grupta 3 örnek olacak şekilde rasgele gruplara ayrıldı. (n:3*4*4=48 örnek)

Her bir kuyucuğa biyopsi punch (Plasti-med, İstanbul, Türkiye) yardımıyla kesilerek standardize edilmiş 4 mm'lik membran formundaki TZF hassas taşıyıcı yardımı rastgele bir şekilde kültür ortamına yerleştirildi.

Ayrıca 1, 3 ve 7.günlerdeki deney inkübasyon periyodları için TZF membran uygulaması yapılmayan 2'şer kuyucuk pozitif ve negatif kontrol grubu olarak hazırlandı.

Sonrasında 1, 3 ve 7. günlerdeki deney inkübasyon periyodları sonunda mikroskop altında değerlendirilerek görüntüleri alınan hücrelerin her 3 günde 1 defa besiyeri değiştirildi ve pasajlama prosedüründeki gibi tripsinizasyon ile kuyucuk tabanından ayrıldı ve hücre süspansiyonu analizlere hazır hale getirildi.



Şekil 3.3. Deney gruplarının hazırlanması

3.5. Hücrelerin Canlılık ve Proliferasyon (MTT) Analizi

Hazırlanan TZF membranlarının gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi, üretici talimatlarına göre (Abcam, UK) MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum indirgeme deneyi kullanılarak değerlendirildi.

TZF membran uygulamaları sonrası hücreler kültüre edildikleri 1, 3 ve 7. günlerin ardından analizler için hazır hale getirilerek, MTT testi için 96 kuyucuklu plakalara 5000 hücre/well olacak şekilde ekildi. TZF membranlar ile hücreler birlikte inkübe edildikten sonra 37°C sıcaklığa sahip, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyonun ardından MTT solüsyonu her bir kuyucuğa 5 mg/ml oranında olacak şekilde eklendi ve 37°C sıcaklığa sahip, %5 CO_2 içeren inkübatörde 2-4 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından kuyucuklarda oluşan formazon kristalleri 15 dakikalık zaman süresince 100 mikroliltre (µl) DMSO (Dimetilsülfoksit) ile muamele edilerek çözdürüldü ve 575 nm dalga boyunda (Biotek microplate reader, USA) absorbansa dayalı olan bir ölçüm gerçekleştirildi. MTT analizi kendi içerisinde 6 tekrarlı olacak şekilde ölçülürken bütün deney prosedürleri ise üç tekrarlı şekilde gerçekleştirildi..[102, 103]

3.6. Hücrelerin AnnexinV-PI ile Flow Sitometrik Apoptoz Analizi

TZF membranlarla 1, 3 ve 7. günlerde kültüre edilmesinin ardından kaldırılan hücrelerde; (kontrol grupları ve TZF membran uygulaması yapılan hücrelerin) apoptozun tespit edilmesinde Annexin V/PI boyaması yapıldı. TZF membrana maruz bırakılan hücreler Tripsin-EDTA ile süspanse edildi. Süspanse haldeki hücreler santrifüj tüplerine konularak 5 dakika süresince 300 x g'de, santrifüj edildi. Hücre pelletine, 1:100 oranında seyreltilmiş Annexin V-iFluor 488™, 1:500 oranında seyreltilmiş propidyum iyodür (PI) eklendi ve 1 saat boyunca 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. Ardından hücreler 5 dakika süresince 300 x g'de santrifüj edilerek hücrelerin üzerine 1mL

yıkama solüsyonu eklendi ve tekrar 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüj edildi. Son olarak hücre pelletinin üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutularak NovoExpress software (Agilent, CA, ABD) ile analiz edildi. Analizler 3 kez tekrarlandı.[103, 104]

3.7. Hücrelerin Taramalı Elektron Mikroskobu İle Ultrastrüktürel Değerlendirmesi

TZF membranlarla kültüre edilmesinden 1, 3 ve 7.gün sonra kaldırılan hücrelere, uygulanan TZF'lerin doğrudan etkisi taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirildi. İnkübasyon periyodu sonrası kaldırılan hücreler PBS içinde %3 glutaraldehit (Sigma-Aldrich, MO, ABD) ile 30 dakika sabitlendi. Numuneler daha sonra kademeli bir etanol serisi kullanılarak dehidre edilecek, ardından 5 dakika heksametildisilazan (Sigma-Aldrich, MO, ABD) işlemi uygulandı. Son olarak numuneler altın püskürtme ile kaplanarak Taramalı Elektron Mikroskobu (Hitachi Regulus 8230) kullanılarak gözlemlendi.

3.8. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Anjiyojenik faktör miktarlarını göstermek amacıyla VEGF ve TGF-β1 belirteçlerine bakıldı. Bunun için öncelikle tüm deney grupları ile muamele edilen hücrelerin 1,3 ve 7.günlerindeki inkübasyon sürelerinde (her 3 günde 1 defa değiştirilen besiyeri de dahil olmak üzere) süpernatantları toplandı. Süpernatantlardaki enflamatuar sitokin ve anjiyojenik faktör miktarı VEGF ve TGF-β1 ELISA kitleri (ABclonal Massachusetts, ABD) kullanılarak belirlendi. Kısaca kit içerisinde bulunan 96 kuyucuklu kültür kabı yıkandıktan sonra örneklerimizden 100µl/kuyucuk eklendi ve 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Kuyucuklar yıkandıktan sonra 100 µl Biotin bağlı çalışma solüsyonu eklenecek 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar yıkandıktan sonra 100 µl Streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklendi 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar

yıkandıktan sonra 100 µl substrat solüsyonu eklenip 20 dakika inkübe edildi. 100 µl stop solüsyonu eklenerek absorbans değerleri 450nm'de monokromatör sistemli mikroplaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) tespit edildi.[105]

3.9. Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

TZF membran uygulaması sonrası elde edilen örnekler önce 500xg'de 10 dakika santrifüj edildi, kağıtlar çıkartıldıktan sonra 500 x g'de 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edildi. Elde edilen hücrelerden total RNA, A.B.T RNA Purification Kit (Atlas Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye)kullanılarak izole edildi. Hücre içerisindeki mRNA'nın elde edilmesi için santrifüj sonrası oluşan pellet 2mL eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1mL lizis buffer eklenerek homojenize edildi ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonrasında 12.000 x g'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe toplandı ve 200µL kloroform eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonrasında 12.000 x g'de 15 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen fazlardan şeffaf olan kısım yeni bir tüpe aktarıldı. Elde edilen faz miktarında binding buffer eklendi. Elde edilen karışın ayrıştırma kolonlarına aktarılarak 10.000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Ayrıştırma kolonlarında alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. 50µL DNase I buffer eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 500µL Wash I buffer eklendi ve 11.000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Alta geçen faz uzaklaştırıldı. 500µL Wash II buffer eklendi ve 14.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Alta geçen faz uzaklaştırıldı. Ayrıştırma kolonlarındaki tüm sıvının uzaklaştırılması için 21.000 x g'de santrifüj edildi. Kolonlara yeni tüplere aktarıldı ve 100µL Elution buffer eklenerek 1 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. Daha sonrasında 11.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. RNA konsantrasyonu NanoDrop-One Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, Almanya) ile ölçüldü. Elde edilen mRNA'lar 5ng olacak şekilde eşitlenerek cDNA sentez kiti (cDNA

Synthesis kit with RNase Inh.; Atlas Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılarak üretici protokolü uygulanarak komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir.

cDNA'nın oluşturulmasıyla birlikte, hedef genlere uygun olacak bir şekilde probe-primerler (Tablo 3.2.) ve 2x qPCR SYBR Green Master Mix kiti (Atlas Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılarak real time qRT-PCR (Rotor Gene Q5 plex + HRM Real Time PCR, Qiagen, Almanya) cihazında hedef genler çoğaltılarak analiz gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dk 1 döngü, denatürasyon 95°C'de 30 sn, bağlanma (annealing) 59°C'de 1 dk 40 döngü, erime eğrisi (melting curve) 95°C'de 5 sn 1 döngü olacak şekilde çalışıldı. Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşturulan Ct verileri (threshold cycle) ile kontrol olarak housekeping belirteç geni kullanılıp ham veri normalizasyonu ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyon verilerinin analizi yapıldı.[105]

Tablo 3.2. qRT-PCR analizinin primer dizileri

qRT-PCR analizinin primer dizileri.		
Hedef Genler	Forward (5'–3')	Reverse (3'–5')
TNF-α:	CATGATCCGGGACGTGGAG	TTCGAGAAGATGATCTGACTGCC
IL-6:	CCCACCGGGAACGAAAGAG	GGACCGAAGGCGCTTGT
IL -1β:	GCCAATCTTCATTGCTCAAGTGT	AGCCATCATTTCACTGGCGA

3.10. Hücre Yara İyileşmesi Analizi

Hücre göçü, bir in vitro yara iyileşmesi deneyi kullanılarak gerçekleştirilecektir. 2 x 10^5 hücre/oyuk konsantrasyonundaki hücreler, 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 24 saat normal büyüme ortamında tutuldu. Kültür ortamı daha sonra serumsuz kültür ortamı ile değiştirilecek ve 24 saat süreyle kültürlendi. Sonrasında sterilize edilmiş bir pipet ucu kullanılarak kuyucuklar içine bir çizik oluşturularak hücreler chamber yardımıyla daha öncesinde 1.ve 3. günlerde TZF membran bırakılmış besiyerinden alınan salgı örneklerine maruz bırakıldı. Aynı açılamada alınan başlangıç ve 6, 12, 24, 30 ve 36

saat sonrası görüntüleri ters faz kontrast mikroskobu kullanılarak çekildi. Göç eden hücreler, 0. saatteki başlangıç görüntüsüyle aynı çerçeveden en az 3 görüntüden sayıldı.[97]

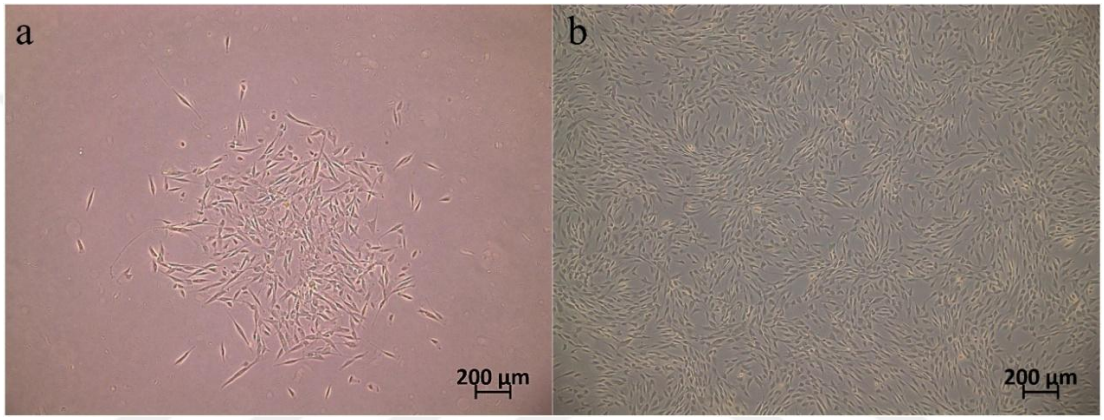
3.11. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel yöntem olarak çalışmamızın verileri SPSS (ver. 22.0) programına yüklendi. MTT ve flow sitometride Anneksin-V/PI deneylerinin analizleri için One Way Anova ve Two Way Anova, ELİSA, qRT-PCR ve yara iyileşmesi deneylerinin analizleri için ise One Way Anova ve Three Way Anova testleri kullanıldı. One Way Anova testi sonrası çalışma gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olması durumunda farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için post hoc olarak Tukey testleri kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı. Sonuçların $p<0.05$ olması halinde anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi.

4.BULGULAR

4.1.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

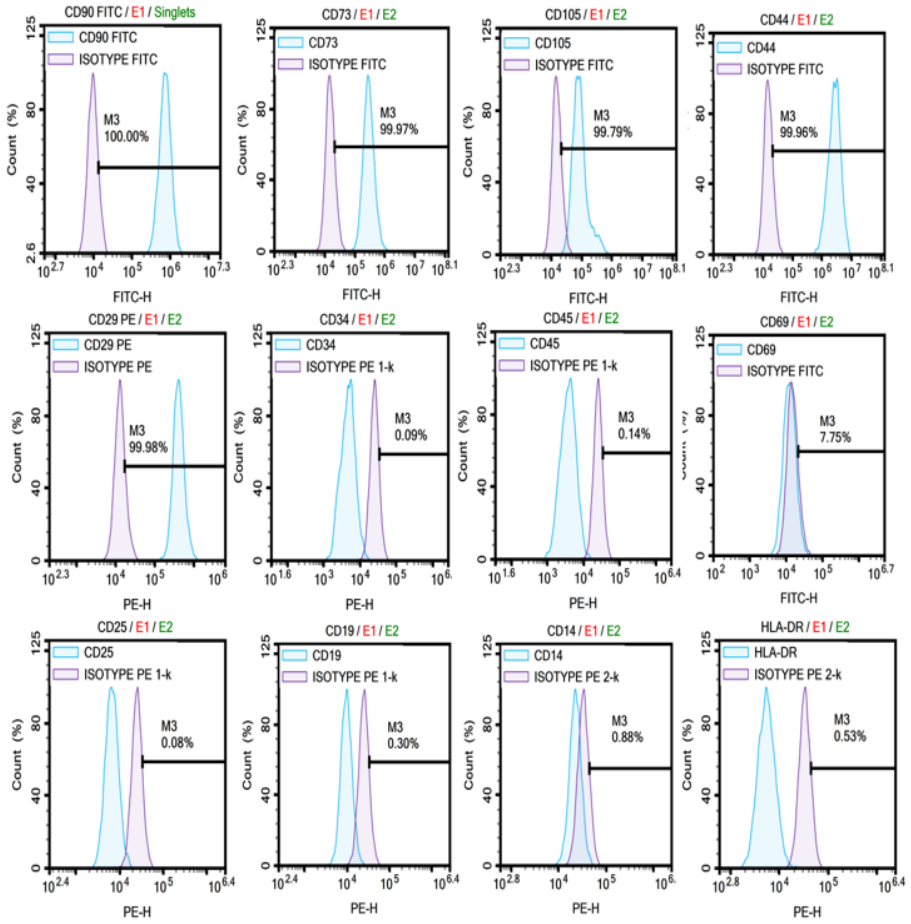
Faz-kontrast mikroskobu altında gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler günlük olarak incelenmiş ve bu hücrelerin mezenkimal orjinli olduğu görülmüştür. Çekilen fotoğraflar morfolojik açıdan değerlendirildiğinde gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler fibroblast benzeri iğsi şekilli bir yapı göstermiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. (a) İzolasyonun 7. gününde tutunan hücrelerin koloni görüntüsü. **(b)** GKMKH'lerin izolasyonunun iğsi yapıda yıldız şekilli fibroblast benzeri hücre görüntüsü. (Ölçek çubuğu: A:200 µm, B:200 µm)

4.2.Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri İle Karakterizasyonu

Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler 3.pasaja ulaştıklarında flow sitometri analizleri ile immünofenotipik olarak karakterize edildiler. Yapılan bu analizler sonucunda GKMKH' lerin CD34 (%0.09), CD45 (%0.14), CD69 (%7.75), CD25 (%0.08), CD19 (%0.30), CD14 (%0.88), ve HLA-DR (%0.53) belirteçlerini negatif olarak eksprese ettiği; CD90 (%100), CD73 (%99.97), CD105 (%99.79), CD44 (%99.96) ve CD29 (%99.98) pozitif olarak eksprese ettiği belirlendi (Şekil 4.2.).

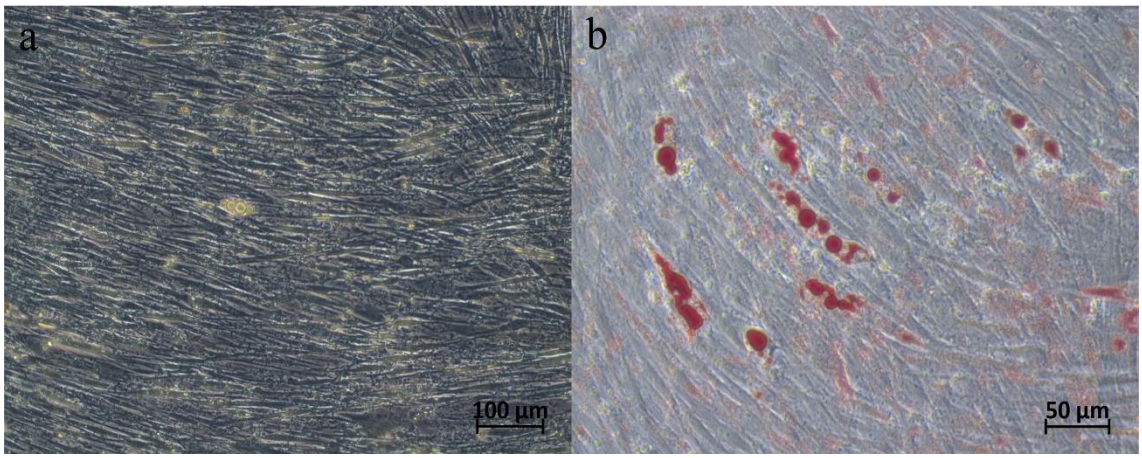


Şekil 4.2. CD90, CD73, CD105, CD44 ve CD29 pozitif, CD34, CD45, CD69, CD25, CD19, CD14 ve HLA-DR negatiftir. Histogramda, hedef antikorlar mavi renkte ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor renkte gösterilmiştir

4.3. Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu İçin Farklılaştırma Analizleri

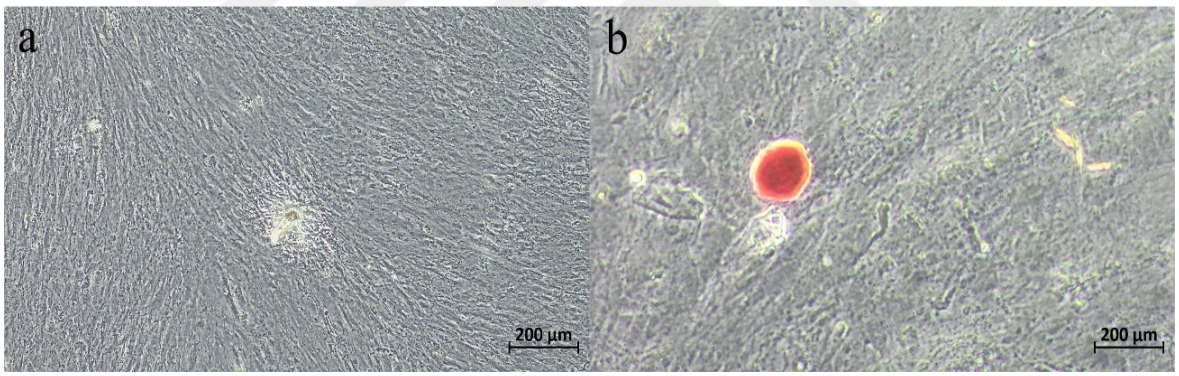
Mezenkimal kök hücrelerin mezoderm kaynaklı adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokuların hücrelerine farklılaşabildiğini göstermek için GKMKH'ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma analizlerine alındı ve adipjenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşabildiği görüldü.

Adipojenik besiyeri ile indüksiyon sonrası farklılaşan GKMKH'lerin nötral yağ damlacıkları Oil Red-O boyaması ile pozitif olarak görüldü (Şekil 4.3.).



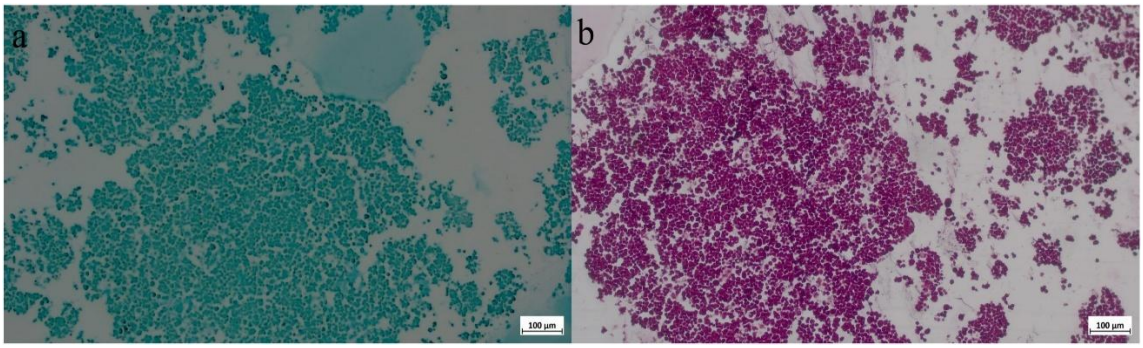
Şekil 4.3. (a) 15. günde adipojenik soya farklılaştırılan Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin faz-kontrast mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu =100µm). **(b)** Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral lipid vakuollerinin birikiminin Oil Red O boyası ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 50 µm).

Osteojenik farklılaşma besiyerinde indükte edilen GKMKH'lerde farklılaşma sonucunda meydana gelen mineral birikimi Alizarin Red S (kırmızı) boyaması ile pozitif olarak gösterildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. (a) 25. günde osteojenik soya farklılaştırılan Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin faz-kontrast mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu = 200 µm). **(b)** Osteojenik farklılaşmış hücrelerde kalsiyum nodüllerinin Alizarin Red S boyası ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 200 µm).

Kondrojenik farklılaşma besiyerinde indükte edilen GKMKH' lerde farklılaşma sonucunda meydana gelen kondrojenik doku AB ve SO boyaması ile pozitif olarak gösterildi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. (a) Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde kondrojenik dokunun Alcian mavisi ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 100 µm). (b) Safranin o boyaması ile kondrojenik hücrelerin gösterilmesi

4.4. MTT Bulguları

Tablo 4.1. Gün ve çalışma gruplarının canlılığa etkisi

Değişkenler	Kareler Toplamı (KT)	Serbestlik Derecesi (sd)	Kareler Ortalaması (KO)	F	p	Etki Büyüklüğü (η^2)
Günler-Çalışma Grupları	0.246	8	0.031	27.612	0.000*	0.747

P<0.05*, Two Way Anova

İki yönlü anova sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. Gün ve çalışma gruplarının beraber etki büyüklüğünün 0.747 olması büyük bir etkiye işaret etmekte olup bu bulguların klinik açıdan önemli ve anlamlı bir değere sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.2. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değerleri

	1.Gün		3.Gün		7.Gün	
Çalışma Grupları	Ort. ± Std. Sapma	p	Ort. ± Std. Sapma	p	Ort. ± Std. Sapma	p
Negatif Kontrol	0.04481±0.000368 a	0.000*	0.04894±0.002172 a	0.000*	0.18526±0.049677 a	0.000*
Pozitif Kontrol	0.04728±0.00047 b,d		0.0784±0.000959 b, d		0.33874±0,067633 b	
L-TZF	0.07812±0.001517 c		0.09199±0.001033 c		0.47107±0.047896 c	
HA-TZF	0.04631±0.000464 a,b		0.07711±0.000877 b		0.47779±0.043395 c	
T-TZF	0.04875±0.001188 d		0.07926±0.000684 d		0.23775±0.074098 a	

p<0.05*, One Way Anova.

Grupların 1. gün canlılık değer ortalamaları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Grupların canlılık değer ortalamaları sırasıyla L-TZF > T-TZF > pozitif kontrol > HA-TZF > negatif kontrol şeklindeydi. L-TZF grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değeri ortalaması bulundu. T-TZF grubunun canlılık değer ortalaması, HA-TZF ve negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulundu. T-TZF grubunun canlılık değer ortalaması ile pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. HA-TZF grubunun canlılık değer ortalaması ile pozitif kontrol ve negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmadı. Pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.2.)

Grupların 3. gün canlılık değer ortalamaları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$*). Grupların canlılık değer ortalamaları sırasıyla L-TZF > T-TZF > pozitif kontrol > HA-TZF > negatif kontrol şeklindeydi. L-TZF grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değeri ortalaması görüldü. T-TZF grubunun canlılık değer ortalaması, HA-TZF ve negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. HA-TZF ve T-TZF gruplarında canlılık değer ortalaması ile pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. HA-TZF grubunun canlılık değer ortalaması negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. Pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. (Tablo 4.2.)

Grupların 7. gün canlılık değer ortalamaları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. ($p<0.05$) Grupların canlılık değer ortalamaları sırasıyla HA-TZF > L-TZF > pozitif kontrol > T-TZF > negatif kontrol şeklindeydi. En yüksek canlılık değer ortalaması HA-TZF grubunda görüldü. L-TZF ve HA-TZF gruplarının canlılık değer ortalamaları negatif – pozitif kontrol ve T-TZF gruplarının canlılık değer ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. L-TZF ve HA-TZF gruplarının canlılık değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. T-TZF grubunun canlılık değer ortalaması pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanırken, negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Pozitif kontrol grubunun canlılık değer ortalaması negatif kontrol grubunun canlılık değer ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. (Tablo 4.2.)

Tablo 4.3. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değerleri

Çalışma Grupları	Günler	Ort. ± Std. Sapma	p
Negatif Kontrol	1.Gün	0.04481±0.000368 [a]	0.000*
	3.Gün	0.04894±0.002172 [a]	
	7.Gün	0.18526±0.049677 [b]	
Pozitif Kontrol	1.Gün	0.04728±0.00047 [a]	0.000*
	3.Gün	0.0784±0.000959 [a]	
	7.Gün	0.33874±0.067633 [b]	
L-TZF	1.Gün	0.07812±0.001517 [a]	0.000*
	3.Gün	0.09199±0.001033 [a]	
	7.Gün	0.47107±0.047896 [b]	
HA-TZF	1.Gün	0.04631±0.000464 [a]	0.000*
	3.Gün	0.07711±0.000877 [a]	
	7.Gün	0.47779±0.043395 [b]	
T-TZF	1.Gün	0.04875±0.001188 [a]	0.000*
	3.Gün	0.07926±0.000684 [a]	
	7.Gün	0.23775±0.074098 [b]	

$p<0.05$*, One Way Anova.

Negatif kontrol grubunun 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Günlerin canlılık değer

ortalamaları sırasıyla 7. gün > 3. gün > 1. gün şeklindeydi. 7. günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değer ortalaması görüldü. 1. ve 3. günlerdeki canlılık değer ortalamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.3.).

Pozitif kontrol grubunun 1, 3 ve 7.günlerdeki canlılık değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0.05$). Günlerin canlılık değer ortalamaları sırasıyla 7. gün > 3. gün > 1. gün şeklindeydi. 7.günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değer ortalaması görüldü. 1. ve 3. günlerdeki canlılık değer ortalamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.3.).

L-TZF grubunun 1, 3 ve 7.günlerdeki canlılık değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Günlerin canlılık değer ortalamaları sırasıyla 7. gün > 3. gün >1. gün şeklindeydi. 7.günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değer ortalaması görüldü. 1. ve 3. günlerdeki canlılık değer ortalamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.3.).

HA-TZF grubunun 1, 3 ve 7.günlerdeki canlılık değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Günlerin canlılık değer ortalamaları sırasıyla 7. gün > 3. gün >1. gün şeklindeydi. 7.günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değer ortalaması görüldü. 1. ve 3. günlerdeki canlılık değer ortalamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.3.).

T-TZF grubunun 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılık değer ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Günlerin canlılık değer ortalamaları sırasıyla 7. gün > 3. gün > 1. gün şeklindeydi.7.günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık

oluşturacak şekilde en yüksek canlılık değer ortalaması görüldü. 1 ve 3. günlerdeki canlılık değer ortalamalarının arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı (Tablo 4.3).

4.5. Flow Sitometride Anneksin-V/PI Bulguları

Tablo 4.4. Gün ve çalışma gruplarının canlılık, apoptoz ve nekroza etkisi

Değişkenler	Kareler Toplamı (KT)	Serbestlik Derecesi (sd)	Kareler Ortalaması (KO)	F	p	Etki Büyüklüğü (η^2)
Günler-Çalışma Grupları	0.004	8	0.001	0.000	1.000	0.000

p<0.05*, Two Way Anova

İki yönlü anova sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.4.).

Tablo 4.5. Gruplar arası 1,3 ve 7. günlerdeki canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz değerleri

	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	L-TZF	HA-TZF	T-TZF	
Değişkenler-Günler	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
Canlılık 1.Gün	88.2833± 14.02210	86.9433± 15.35852	99,0367± 0.16921	99.0433± 1.00917	97.3633± 1,72181	0.354
Canlılık 3.Gün	89.9000± 12.50166	88.0533± 8.15357	97.3100± 2.49357	97.6000± 2.05424	97.2833± 1.83195	0.309
Canlılık 7.Gün	89.2167± 14.45041	94.1133± 8.43840	92.7967± 10.76750	94.5067± 3.93116	93.1967± 8.50168	0.965
Erken Apoptoz 1.Gün	0.7800± 1.00777	3.3633± 5.70423	0.3000± 0.38223	0.0100± 0.01000	0.0500± 0.04000	0.507
Erken Apoptoz 3.Gün	0.0900± 0.07937	0.6367± 0.69616	0.0833± 0.04041	0.1000± 0.08718	0.4567± 0.61849	0.397
Erken Apoptoz 7.Gün	1.1467± 1.00719	0.3700± 0.12124	0.6733± 0.45236	1.1367± 1.44970	0.6100± 0.74478	0.769
Geç Apoptoz 1.Gün	0.1200± 0.09165	0.1600± 0.14107	0.0167± 0.02887	0.0200± 0.02646	0.0467± 0.04163	0.178
Geç Apoptoz 3.Gün	0.2033± 0.21572	0.2067± 0.18502	0.1733± 0.26633	0.0667± 0.09866	0.1900± 0.17349	0.894
Geç Apoptoz 7.Gün	0.5567± 0.72507	0.1300± 0.16523	0.1067± 0.05774	0.3733± 0.38553	0.3200± 0.31241	0.643
Nekroz 1.Gün	10.8300± 13.03944	0.5333± 0.56081	0.6467± 0.20984	0.9300± 1.01119	2.5400± 1.70238	0.316
Nekroz 3.Gün	9.8000± 12.59837	0.1033± 0.51155	2.3267± 2.28977	2.2333± 1.95809	2.0700± 1.32861	0.312
Nekroz 7.Gün	9.0800± 13.73726	0.3867± 0.33657	6.4200± 10.31512	3.9867± 3.56307	5.8767± 8.94310	0.974

p<0.05*, One Way Anova.

Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki gün içi canlılık yüzde ortalamaları arasında, erken apoptoz yüzde ortalamaları arasında, geç apoptoz yüzde ortalamaları arasında ve

nekroz yüzde ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05), (Tablo 4.5.).

Tablo 4.6. Grup içi 1,3 ve 7. günlerdeki canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz değerleri

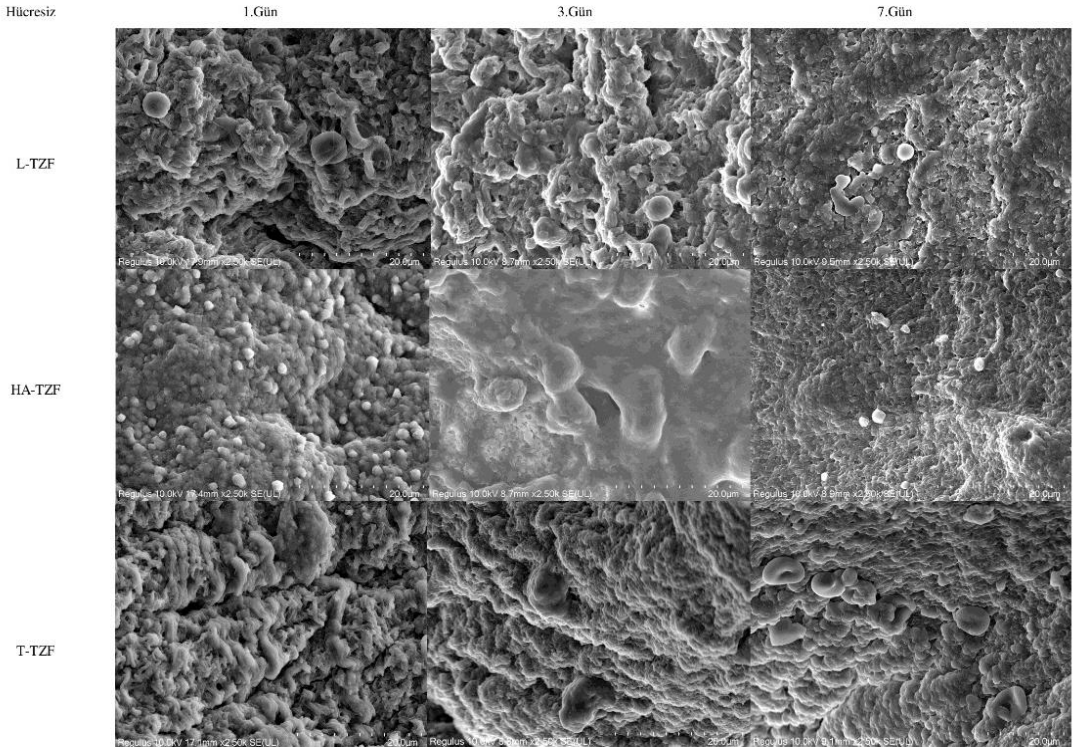
	Negatif Kontrol		**Pozitif Kontrol**		**L-TZF**		**HA-TZF**		**T-TZF**	
Değişkenler-Günler	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Canlılık 1.Gün	88.23± 14.022[a]		86.94± 15.358[a]		99.03± 0.1691[a]		99.04± 1.0097[a]		97.36± 1.7218[a]	
Erken Apoptoz 1.Gün	0.78± 1.0077[b]		3.363± 5.7042[b]		0.3± 0.3822[b]		0.01± 0.01[b]		0.05± 0.04[b]	
Geç Apoptoz 1.Gün	0.12± 0.0916[b]	0.00*	0.16± 0.1410[b]	0.00*	0.0167± 0.2887[b]	0.00*	0.02± 0.0264[b]	0.00*	0.046± 0.0416[b]	0.00*
Nekroz 1.Gün	10.83± 13.039[b]		9.533± 9.5608[b]		0.646± 0.2098[b]		0.93± 1.0111[b]		2.54± 1.70238[b]	
Canlılık 3.Gün	89.9± 12.506[a]		88.05± 8.1537[a]		97.31± 2.4937[a]		97.6± 2.0544[a]		97.28± 1.8319[a]	
Erken Apoptoz 3.Gün	0.09± 0.07937[b]		0.6367± 0.69616[b]		0.0833± 0.04041[b]		0.1± 0.0871[b]		0.4567± 0.61849[b]	
Geç Apoptoz 3.Gün	0.203± 0.2157[b]	0.00*	0.206± 0.1850[b]	0.00*	0.173± 0.2663[b]	0.00*	0.066± 0.9866[b]	0.00*	0.19± 0.1734[b]	0.00*
Nekroz 3.Gün	9.8± 12.59[b]		11.10± 7.5115[b]		2.326± 2.2897[b]		2.233± 1.9580[b]		2.07± 1.9286[b]	
Canlılık 7.Gün	89.216± 14.4504[a]		94.113± 8.4384[a]		92.796± 10.7675[a]		94.506± 3.93116[a]		93,196± 8.50168[a]	
Erken Apoptoz 7.Gün	1.1467± 1.00719[b]		0.37± 0.12124[b]		0.6733± 0.45236[b]		1.1367± 1.4497[b]		0.61± 0.74478[b]	
Geç Apoptoz 7.Gün	0.5567± 0.16523[b]	0.00*	0.13± 0.72507[b]	0.00*	0.1667± 0.05774[b]	0.00*	0.3733± 0.3855[b]	0.00*	0.32± 0.31241[b]	0.00*
Nekroz 7.Gün	9.08± 13.7372[b]		5.3867± 8.33657[b]		6.42± 10.3151[b]		3.9867± 3.5630[b]		5.8767± 8.9431[a]	

p<0.05*, One Way Anova. Aynı sütunda aynı harfe sahip gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Çalışma gruplarında grup içi 1. gün canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz yüzdelerinin ortalamaları arasında, 3. gün canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz yüzdelerinin ortalamaları arasında ve 7. gün canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz yüzdelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılıklar görüldü (p<0.05*). Canlılık yüzde ortalaması 1, 3 ve 7. günlerde çalışma gruplarında diğer değişkenlerin yüzde ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.6.).

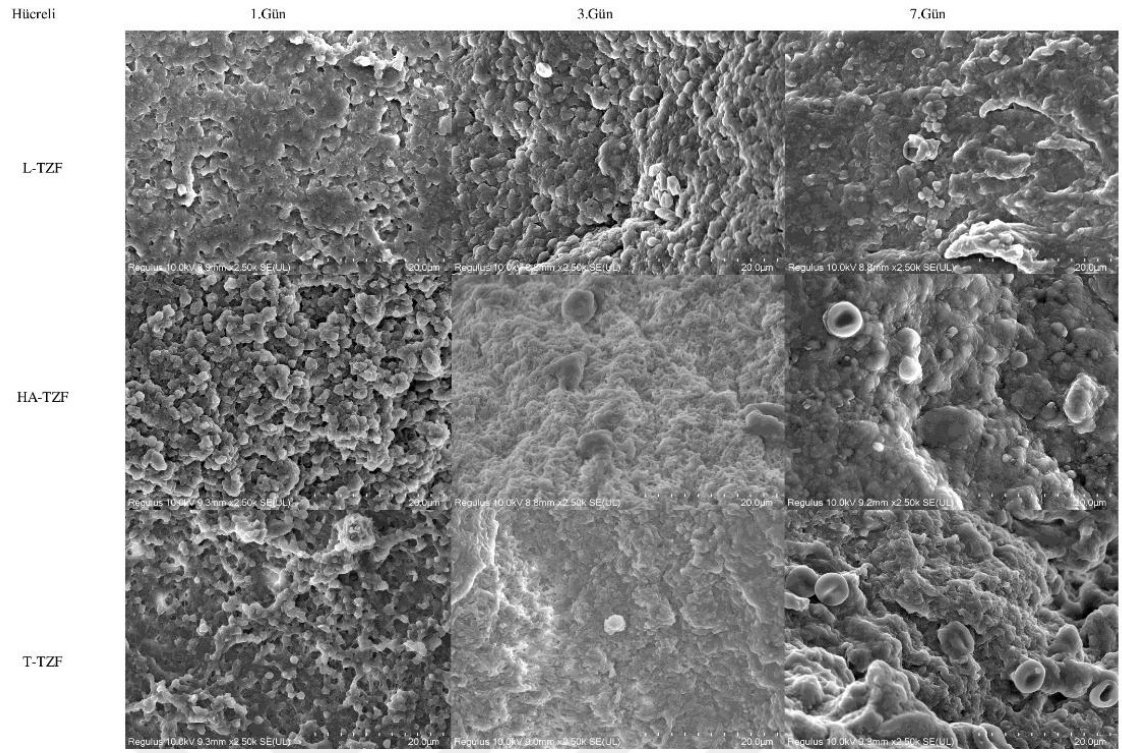
4.6. SEM Bulguları

Hücresiz besiyerinden alınan L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların hepsinde iyi organize olmuş bir matris ve fibrin olgunlaşması görüldü. 1, 3 ve 7. günlerde alınan SEM görüntülerinde L-TZF, HA-TZF ve T-TZF gruplarının matris yapısında bir bozulma görülmedi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. 1, 3 ve 7. günlerde hücresiz besiyerinden alınmış L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların yüzeylerinin 2500x büyütme ile alınmış SEM görüntüleri

Hücreli besiyerinden alınan L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların hepsinde iyi organize olmuş bir matris ve fibrin olgunlaşması görüldü. 1, 3 ve 7. günlerde alınan SEM görüntülerinde L-TZF, HA-TZF ve T-TZF gruplarının matris yapısında bir bozulma görülmedi. GKMKH'lerin L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların matris morfolojilerini etkilemediği görüldü (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 1, 3 ve 7. günlerde hücreli besiyerinden alınmış L-TZF, HA-TZF ve T-TZF membranların yüzeylerinin 2500x büyütme ile alınmış SEM görüntüleri

4.7.ELİSA Bulguları

Tablo 4.7. Gün, çalışma grupları ve proanjiyojenik faktörlerin salınıma etkisi

Değişkenler	Kareler Toplamı (KT)	Serbestlik Derecesi (sd)	Kareler Ortalaması (KO)	F	p	Etki Büyüklüğü (η^2)
Çalışma Grupları-Günler	963972.266	8	120496.533	1.423	0.206	0.159
Çalışma Grupları-Faktörler	1639114.073	4	409778.518	4.839	0.002*	0.244
Günler-Faktörler	213147.526	2	106573.763	1.259	0.291	0.040
Çalışma Grupları-Günler-Faktörler	1518631.611	8	189828.951	2.242	0.036*	0.230

$p<0.05$*, Three Way Anova

Üç yönlü anova sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. Çalışma grupları ve faktörlerin beraber etki büyüklüğünün 0.244, çalışma grupları, günler ve faktörlerin beraber etki büyüklüğünün 0.230 olması büyük bir etkiye

işaret etmekte olup bu bulguların klinik açıdan önemli ve anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.7.).

Tablo 4.8. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınımları (pg/ml)

	Negatif Kontrol	**Pozitif Kontrol**	**L-TZF**	**HA-TZF**	**T-TZF**	
Faktörler-Günler	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
VEGF 1.Gün	246±233	98,5±75,5	336±168	252±252	326±303	0.699
VEGF 3.Gün	761±578[a]	606±418[a]	67±67[b]	41±7[b]	29.5±29.5[b]	0.044*
VEGF 7.Gün	947±947	27±27	808.5±280.5	146±88	268.5±219.5	0.112
TGF-β1 1.Gün	0±0	11±11	332.50961± 315.740385	203.375± 187.375	55.875± 10,125	0.131
TGF-β1 3.Gün	0±0	0±0	450.34617± 436.653845	555.9711693± 552.278846	0±0	0.126
TGF-β1 7.Gün	0±0	0±0	223.5±223.5	194.125± 194.125	179.125± 179.125	0.269

p<0.05*, One Way Anova. Aynı satırda aynı harfe sahip gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Grupların 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1. ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmazken (p>0.05), 3. gündeki VEGF salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (p<0.05). Pozitif ve negatif kontrol gruplarının 7. gün VEGF salınım ortalamaları L-TZF, HA-TZF ve T-TZF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. Pozitif ve negatif kontrol gruplarının 7. gün VEGF salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.8.).

Grupların 1, 3 ve 7. günlerdeki TGF-β1 salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1, 3. ve 7. günlerdeki TGF-β1 salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. (p>0.05), (Tablo 4.8.)

Tablo 4.9. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınımları (pg/ml)

	VEGF		TGF-β1	
Çalışma Grupları-Günler	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Negatif Kontrol 1.Gün	246±233		0±0	
Negatif Kontrol 3.Gün	761±578	0.447	0±0	---
Negatif Kontrol 7.Gün	947±947		0±0	
Pozitif Kontrol 1.Gün	98.5±75,5		11±11	
Pozitif Kontrol 3.Gün	606±418	0.054	0±0	0.125
Pozitif Kontrol 7.Gün	27±27		0±0	
L-TZF 1.Gün	336±168[a]		332.50961±315.740385	
L-TZF 3.Gün	67±67[a]	0.009*	450.34617±436.653845	0.724
L-TZF 7.Gün	808.5±280.5[b]		223.5±223.5	
HA-TZF 1.Gün	252±252		203.375±187.375	
HA-TZF 3.Gün	41±7	0.316	555.9711693±552.278846	0.418
HA-TZF 7.Gün	146±88		194.125±194.125	
T-TZF 1.Gün	326±303		55.875±10.125	
T-TZF 3.Gün	29.5±29.5	0.281	0±0	0.176
T-TZF 7.Gün	268.5±219.5		179.125±179.125	

p<0.05*, One Way Anova.

Negatif kontrol grubunda 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0.05). 1, 3 ve 7. günlerde TGF-β1 salınımı görülmedi. (Tablo 4.9.)

Pozitif kontrol grubunda 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları arasında ve 1, 3 ve 7. günlerdeki TGF-β1 salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0.05). 3. ve 7. günlerde TGF-β1 salınımı görülmedi. (Tablo 4.9.)

Lökosit trombositten zengin fibrin grubunda 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılık bulunurken (p<0.05), 1, 3 ve 7. günlerdeki TGF-β1 salınımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (p>0.05), 7. gündeki VEGF salınım ortalaması 1 ve 3. günlerdeki VEGF salınım ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.9.).

Hidroksiapatit trombositten zengin ve titanyum trombositten zengin fibrin gruplarında 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF ve TGF-β1 salınım ortalamaları değerlendirildiğinde 1, 3 ve 7. günlerdeki VEGF salınım ortalamaları arasında ve 1, 3 ve 7. günlerdeki TGF- β1 salınım ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. T- TZF grubunda 3. gün TGF-β1 salınımı görülmedi ($p>0.05$), (Tablo 4.9.).

4.8. qRT-PCR Bulguları

Tablo 4.10. Gün, çalışma grupları ve proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonuna etkisi

Değişkenler	Kareler Toplamı (KT)	Serbestlik Derecesi (sd)	Karelerin Ortalaması (KO)	F	p	Etki Büyüklüğü (η^2)
Gün-Proinf. Sit.	57607.199	4	14401.800	3.028	0.022	0.119
Gün-Çalışma Grupları	120206.873	8	15025.859	3.159	0.003	0.219
Proinf. Sit-Çalışma Grupları	116684.909	8	14585.614	3.066	0.004	0.214
Gün-Çalışma Grupları-Proinf. Sit.	228490.450	16	14280.653	3.002	0.000	0.348

$p<0.05$*, Three Way Anova

Üç yönlü anova sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. Gün ve proinflamatuar sitokinlerin beraber etki büyüklüğünün 0.119 olması orta ila büyük bir etkiye, gün ve çalışma gruplarının beraber etki büyüklüğünün 0.219, proinflamatuar sitokinler ve çalışma gruplarının beraber etki büyüklüğünün 0.214, gün, çalışma grupları ve proinflamatuar sitokinlerin beraber etki büyüklüğünün 0.348 olması büyük bir etkiye işaret etmektedir. Bu bulguların klinik açıdan önemli ve anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.10.).

Tablo 4. 11. Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonları

	Negatif Kontrol	**Pozitif Kontrol**	**L-TZF**	**HA-TZF**	**T-TZF**	
Sitokinler-Günler	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
IL-1β 1.Gün	0.73063± 0.683588	1,00000± 0.000000	10.51568± 10.019132	474.65567± 461.107740	19.77475± 2.386995	0.068
IL-1β 3.Gün	8.66052± 6.794457	1,00000± 0.000000	3.05364± 1.974413	6.18447± 4.593399	2.91294± 1.811033	0.194
IL-1β 7.Gün	0.24840± 0.288972[a]	1,00000± 0.000000[a,b]	0.42125± 0.270164[a,b]	1.10320± 0.053486[b]	0.70117± 0.519671[a,b]	0.022*
Il-6 1.Gün	1.07917± 0.839356	1,00000± 0.000000	29.09143± 28.190175	18.11666± 15.943190	0.94966± 0.791441	0.119
Il-6 3.Gün	1.06909± 1.599512	1,00000± 0.000000	0.36882 0.208714	0.27591 0.235071	0.06366 0.098218	0.389
Il-6 7.Gün	4.24449± 1.295950[a]	1,00000± 0.000000[b]	0.97942 0.000000[b]	1.07275± 0.100090[b]	1.37454± 0.842316[b]	0.001*
TNF-α 1.Gün	0.39963± 0.384952	1,00000± 0.000000	2.71598± 1.396474	1.56284± 1.365331	14.76628± 14.073728	0.092
TNF-α 3.Gün	0.17945± 0.157356[a]	1,00000± 0.000000[a,b]	2.38808± 0.214607[b]	1.27772± 0.487683[a,b]	1.49622± 1.515006[a,b]	0.043*
TNF-α 7.Gün	0.21064± 0.195624	1,00000± 0.000000	0.41115± 0.369822	0.45167± 0.411793	0.44678± 0.357065	0.088

p<0.05*, One Way Anova.

Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; 1. ve 3. günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0.05). 7. gün IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılık görüldü (p<0.05). 7. gün HA-TZF grubunun IL-1β gen ekspresyon düzeyi negatif kontrol grubunun IL-1β gen ekspresyon düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.11.).

Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-6 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; 1. ve 3. günlerdeki IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05). 7. gün IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (p<0.05). 7. gün negatif kontrol grubunun IL-6 gen ekspresyon düzeyi pozitif kontrol, L-TZF, HA-TZF ve T-TZF gruplarının IL-6 gen ekspresyon düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.11.).

Gruplar arası 1, 3 ve 7. günlerdeki TNF-α gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; 1. ve 7. günlerdeki TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05). 3. gün TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılık görüldü (p<0.05*). 3. gün L-TZF grubunun TNF-α gen ekspresyon düzeyi negatif kontrol grubunun TNF-α gen ekspresyon düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.11.).

Tablo 4.12. Grup içi 1, 3 ve 7. günlerdeki proinflamatuar sitokinlerin relatif gen ekspresyonları

	IL-1β		**IL-6**		**TNF-α**	
Çalışma Grupları-Günler	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Negatif Kontrol 1.Gün	0.73063± 0.683588		1.07917± 0.839356[a]		0.39963± 0.384952	
Negatif Kontrol 3.Gün	8.66052± 6.794457	0.069	1,06909± 1,599512[a]	0.036*	0.17945± 0.157356	0.576
Negatif Kontrol 7.Gün	0.24840± 0.288972		4.24449± 1.295950[b]		0.21064± 0.195624	
Pozitif Kontrol 1.Gün	1.00000± 0.000000		1.00000± 0.000000		1.00000± 0.000000	
Pozitif Kontrol 3.Gün	1.00000± 0.000000	---	1.00000± 0.000000	---	1.00000± 0.000000	---
Pozitif Kontrol 7.Gün	1.00000± 0.000000		1.00000± 0.000000		1.00000± 0.000000	
L-TZF 1.Gün	10.51568± 10.019132		29,09143± 28.190175		2.71598± 1.396474[a]	
L-TZF 3.Gün	3.05364± 1.974413	0.175	0.36882± 0.208714	0.122	2.38808± 0.214607[a,b]	0.031*
L-TZF 7.Gün	0.42125± 0.270164		0.97942± 0.000000		0.41115± 0.369822[b]	
HA-TZF 1.Gün	474.65567± 461.107740		18.11666± 15.943190		1.56284± 1.365331	
HA-TZF 3.Gün	6.18447± 4.593399	0.117	0.27591± 0.235071	0.094	1.27772± 0.487683	0.335
HA-TZF 7.Gün	1.10320± 0.053486		1.07275± 0.100090		0.45167± 0.411793	
T-TZF 1.Gün	19.77475± 2.386995[a]		0.94966± 0.791441		14.76628± 14.073728	
T-TZF 3.Gün	2.91294± 1.811033[b]	0.000*	0.06366± 0.098218	0.125	1.49622± 1.515006	0.134
T-TZF 7.Gün	0.70117± 0.519671[b]		1.37454± 0.842316		0.44678± 0.357065	

p<0.05*

Negatif kontrol grubunda günler arası 1, 3 ve 7.günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında ve günler arası 1, 3 ve 7.günlerdeki TNF-α gen ekspresyon düzeyleri

arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmazken ($p>0.05$), günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık tespit edildi ($p<0.05$*). 7. gün IL-6 gen ekspresyon düzeyinin 1 ve 3. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu bulundu (Tablo 4.12.).

Lökosit trombositten zengin fibrin grubunda günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında ve günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmazken ($p>0.05$), günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). 1. gün TNF-α gen ekspresyon düzeyi 7. güne göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 3. Gün TNF-α gen ekspresyon düzeyi ile 1. ve 7. gün TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.12.).

Hidroksiapatit trombositten zengin fibrin grubunda günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında, günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında ve günler arası 1, 3 ve 7. günlerdeki TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.12.).

Titanyum trombositten zengin fibrin grubunda 1,3 ve 7.gündeki IL-1β gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). 1.gündeki IL-1β gen ekspresyon düzeyi 3 ve 7. günlerdeki IL-1β gen ekspresyon düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulundu. 3. ve 7. günlerdeki gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 1, 3 ve 7. günlerdeki günler arası IL-6 gen ekspresyon düzeyleri arasında ve 1, 3 ve 7. günlerdeki günler arası TNF-α gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. ($p>0.05$), (Tablo 4.12.).

4.9.Yara İyileşmesi Bulguları

Tablo 4.13. Çalışma grupları, 1. ve 3. gün salınımları ve saatlerin yara yüzey bölgesine etkisi

Değişkenler	Kareler Toplamı (KT)	Serbestlik Derecesi (sd)	Karelerin Ortalaması (KO)	F	p	Etki Büyüklüğü (η^2)
1-3.Gün Salınım-Saatler	871.781	5	174.356	2.321	0.047*	0.088
1-3.Gün Salınım - Çalışma Grupları	471.741	4	117.935	1.570	0.187	0.050
Saatler-Çalışma Grupları	11052.059	20	552.603	7.355	0.000*	0.551
1-3.Gün Salınım-Saatler-Çalışma Grupları	1900.753	20	95.038	1.265	0.216	0.174

p<0.05*, Three Way Anova

Üç yönlü anova sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Saatler ile 1. ve 3. gün salınımlarının beraber etki büyüklüğünün 0.088 olması orta ila büyük bir etkiye, saatler ve çalışma gruplarının beraber etki büyüklüğünün 0.551 olması büyük bir etkiye işaret etmekte olup bu bulguların klinik açıdan önemli ve anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.13.).

Tablo 4.14. Gruplar arası 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%)

	Negatif Kontrol	**Pozitif Kontrol**	**L-TZF**	**HA-TZF**	**T-TZF**	
Saatler-Yara Yüzeyi	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
0.Saatteki Yara Yüzeyi	100.0000± 0.00000	100.0000± 0.00000	100.0000± 0.00000	100.0000± 0.00000	100.0000± 0.00000	---
6.Saatteki Yara Yüzeyi	90.8481± 7.97815	76.6219± 4.25386	94.7924± 6.71339	91.6561± 1.76033	95.8912± 20.66067	0.245
12.Saatteki Yara Yüzeyi	71.5540± 6.47509[a]	33.5400± 6.06951[b]	66.8037± 7.55551[a]	58.7362± 5.55670[a,b]	80.3187± 23.73918[a]	0.008*
24.Saatteki Yara Yüzeyi	34.9558± 17.16491	---	25.9180± 33.57895	---	44.8642± 21.81255	0.672
30.Saatteki Yara Yüzeyi	16.3272± 3.52088	---	---	---	20.7925± 11.57488	0.557
36.Saatteki Yara Yüzeyi	---	---	---	---	---	---

p<0.05*, One Way Anova.

Gruplar arasındaki 1 günlük salınım sonrası 6. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0.05).

Yara yüzey alanı ortalamaları pozitif kontrol < negatif kontrol < HA-TZF < L-TZF < T-TZF şeklindeydi (Tablo 4.14).

Gruplar arasındaki 1 günlük salınım sonrası 12. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). Yara yüzey alanı ortalamaları pozitif kontrol < HA-TZF < L-TZF < negatif kontrol < T-TZF şeklindeydi. Pozitif kontrol ve HA-TZF gruplarının yara yüzey alanı negatif kontrol, L-TZF ve T-TZF gruplarının yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. Pozitif kontrol grubu yara yüzey alanı ile HA-TZF yara yüzeyi alanı arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.14).

Gruplar arasındaki 1 günlük salınım sonrası 24. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Pozitif kontrol ve HA-TZF gruplarında yara yüzey alanı tamamen kapandı. Diğer grupların yara yüzey alan ortalamaları L-TZF < negatif kontrol < T-TZF şeklindeydi (Tablo 4.14).

Gruplar arasındaki 1 günlük salınım sonrası 30. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p<0.05$). L-TZF grubunun yara yüzey alanı tamamen kapandı. Diğer grupların yara yüzey alan ortalamaları negatif kontrol < T-TZF şeklindeydi (Tablo 4.14).

Tablo 4.15. Grup içi 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%)

	Negatif Kontrol		**Pozitif Kontrol**		**L-TZF**		**HA-TZF**		**T-TZF**	
	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
0.Saat Yara Yüzeyi	100.000± 0.00000[a]		100.0000± 0.00000[a]		100.0000± 0.00000[a]		100.0000± 0.00000[a]		100.0000± 0.00000[a]	
6.Saat Yara Yüzeyi	90.8481± 7.97815[a,b]		76.6219± 4.25386[b]		94.7924± 6.71339[a]		91.6561± 1.76033[b]		95.8912± 20.66067[a]	
12.Saat Yara Yüzeyi	71.5540± 6.47509[b]	0.00*	33.5400± 6.06951[c]	0.00*	66.8037± 7.55551[a]	0.003*	58.7362± 5.55670[c]	0.00*	80.3187± 23.73918[a,b]	0.001*
24.Saat Yara Yüzeyi	34.9558± 17.16491[d]		---		25.9180± 33.57895[d]		---		44.8642± 21.81255[b,c]	
30.Saat Yara Yüzeyi	16.3272± 3.52088[d]		---		---		---		20.7925± 11.57488[c]	
36.Saat Yara Yüzeyi	---		---		---		---		---	

$p<0.05$*, One Way Anova.

Negatif kontrol grubunda 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). 0. saatteki yara yüzey alanı 12, 24 ve 30 saatlerdeki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 0. saat ile 6. saat yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı. 6 ve 12. saatteki yara yüzey alanları 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 6. saat ile 12. saat yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir farklılık bulunmadı. 36. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.15).

Pozitif kontrol grubunda 1 günlük salınım sonrası 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). 0. saatteki yara yüzey alanı 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. 6. saatteki yara yüzey alanı 12. saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 24. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.15).

Lökosit trombositten zengin fibrin grubunda 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12 ve 24.saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılıklar bulundu ($p<0.05$*). 0, 6 ve 12. saatteki yara yüzey alanları 24 saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.30. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.15).

Hidroksiapatit trombositten zengin fibrin grubunda 1 günlük salınım sonrası 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). 0. Saatteki yara yüzey alanı 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 6. saatteki yara yüzey alanı 12. saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 24. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.15).

Titanyum trombositten zengin fibrin grubunda 1 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılıklar bulundu ($p<0.05$*). 0. ve 6. saatteki yara yüzey alanları 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 0, 6 ve 12. saat yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı.12. saatteki yara yüzey alanı 30. saatteki yara yüzey alanı göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 12. saat ile 24. saat yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı. 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı. 36. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.15).

Tablo 4.16. Gruplar arası 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%)

	Negatif Kontrol	**Pozitif Kontrol**	**L-TZF**	**HA-TZF**	**T-TZF**	
Saatler	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
0.Saatteki Yara Yüzeyi	100.000± 0.00000	100.000± 0.00000	100.000± 0.00000	100.000± 0.00000	100.000± 0.00000	---
6.Saatteki Yara Yüzeyi	92.2979± 12.40397[a]	58.7466± 7.31124[b]	89.5464± 7.05254[a]	79.8866± 5.49556[a]	94.1536± 4.64799[a]	0.001*
12.Saatteki Yara Yüzeyi	80.9097± 5.32639[a]	11.4708± 3.32088[b]	57.7091± 9.46246[c]	33.9281± 7.96344[d]	69.4342± 9.24701[a,c]	0.000*
24.Saatteki Yara Yüzeyi	26.3651± 14.85619	---	13.3975± 1.08725	---	22.1419± 17.19147	0.508
30.Saatteki Yara Yüzeyi	19.6308± 7.38217	---	---	---	4.3788± 4.22069	0.105
36.Saatteki Yara Yüzeyi	---	---	---	---	---	---

p<0.05*, One Way Anova.

Gruplar arasındaki 3 günlük salınım sonrası 6. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılık bulundu (p<0.05*). Yara yüzey alanı ortalamaları pozitif kontrol < HA-TZF < L-TZF < negatif kontrol < T-TZF şeklindeydi. Pozitif kontrol grubunun yara yüzey alanı diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. Negatif kontrol, L-TZF, HA-TZF ve T-TZF gruplarının yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.16).

Gruplar arasındaki 3 günlük salınım sonrası 12. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (p<0.05). Yara yüzey alanı ortalamaları pozitif kontrol < HA-TZF < L-TZF < T-TZF < negatif kontrol şeklindeydi. Pozitif kontrol grubunun yara yüzey alanı diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. HA-TZF grubu yara yüzey alanı negatif kontrol, L-TZF ve T-TZF gruplarının yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. L-TZF grubunun yara yüzey alanı negatif kontrol grubunun yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. L-TZF ve T-TZF gruplarının yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı. T-TZF ve negatif kontrol

gruplarının yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Tablo 4.16).

Gruplar arasındaki 3 günlük salınım sonrası 24. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Pozitif kontrol ve HA-TZF gruplarında yara yüzey alanı tamamen kapandı. Diğer grupların yara yüzey alan ortalamaları L-TZF < T-TZF < negatif kontrol şeklindeydi (Tablo 4.16).

Gruplar arasındaki 3 günlük salınım sonrası 30. saatteki yara bölgesi yüzey alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p<0.05$). L-TZF grubunun yara yüzey alanı tamamen kapandı. Diğer grupların yara yüzey alan ortalamaları T-TZF < negatif kontrol şeklindeydi (Tablo 4.16).

Tablo 4.17. Grup içi 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saatlerdeki yara yüzey alanları (%)

	Negatif Kontrol		**Pozitif Kontrol**		**L-TZF**		**HA-TZF**		**T-TZF**	
	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
0.Saat Yara Yüzeyi	100.000± 0.00000[a]		100.000± 0.00000[a]		100.000± 0.00000[a]		100.000± 0.00000[a]		100.000± 0.00000[a]	
6.Saat Yara Yüzeyi	92.2979± 12.40397[a]		58.7466± 7.31124[b]		89.5464± 7,05254[a]		79,8866± 5,49556[b]		94,1536± 4,64799[a]	
12.Saat Yara Yüzeyi	80.9097± 5.32639[a]	0.00*	11.4708± 3.32088[c]	0.00*	57,7091± 9.46246[b]	0.00*	33,9281± 7,96344[c]	0.00*	69,4342± 9,24701[b]	0.00*
24.Saat Yara Yüzeyi	34.9558± 17.16491[b]		---		13.3975± 1.08725[c]		---		22,1419± 17,19147[c]	
30.Saat Yara Yüzeyi	26.3651± 14.85619b		---		---		---		4,3788± 4,22069[c]	
36.Saat Yara Yüzeyi	---		---		---		---		---	

$p<0.05$*, One Way Anova.

Negatif kontrol grubunda 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılıklar bulundu ($p<0.05$*). 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanı 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı. 0, 6 ve 12.

saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark bulunmadı. 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 36. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.17).

Pozitif kontrol grubunda 3 günlük salınım sonrası 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). 0. saatteki yara yüzey alanı 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 6. saatteki yara yüzey alanı genişliği 12. saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 24. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.17).

Lökosit trombositten zengin fibrin grubunda 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12 ve 24.saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklılıklar bulundu ($p<0.05$). 0 ve 6. saatteki yara yüzey alanları 12 ve 24. saatteki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 0 ve 6. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.12. saatteki yara yüzey alanı 24. saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 30. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.17).

Hidroksiapatit trombositten zengin fibrin grubunda 3 günlük salınım sonrası 0, 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). 0. saatteki yara yüzey alanı 6 ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 6. saatteki yara yüzey alanı 12. saatteki yara yüzey alanına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 24. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.17).

Titanyum trombositten zengin fibrin grubunda 3 günlük salınım sonrası 0, 6, 12, 24 ve 30.saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

farklılık saptandı ($p<0.05$). 0. ve 6.saatteki yara yüzey alanları 12, 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 0 ve 6.saat yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 12. saatteki yara yüzey alanı 24 ve 30. saatteki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulundu. 24 ve 30. saatlerdeki yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. 36. saatte yara yüzey alanı tamamen kapandı (Tablo 4.17).

Tablo 4.18. TZF membranların 1 ve 3 günlük salınımlarının arasındaki farklılığın yara yüzey alanına etkisi (%)

	1 Günlük Salınım	**3 Günlük Salınım**	
TZF Grupları-Saatler	Ort±SS	Ort±SS	p
L-TZF 6.Saat	94.7924±6.71339	89.5464±7.05254	0.404
L-TZF 12.Saat	66.8037±7.55551	57.7091±9.46246	0.263
L-TZF 24.Saat	25.9180±33.57895	13.3975±1.08725	0.554
HA-TZF 6.Saat	91.6561±1.76033	79.8866±5.49556	0.024*
HA-TZF 12.Saat	58.7362±5.55670	33.9281±7.96344	0.011*
T-TZF 6.Saat	95.8912±20.66067	94.1536±4.64799	0.894
T-TZF 12.Saat	80.3187±23.73918	69.4342±9.24701	0.500
T-TZF 24.Saat	44.8642±21.81255	22.1419±17.19147	0.229
T-TZF 30.Saat	20.7925±11.57488	4.3788±4.22069	0.082

$p<0.05$*, One Way Anova.

Lökosit trombositten zengin fibrin grubunda 6, 12 ve 24. saatlerdeki 1 ve 3 günlük salınımlar karşılaştırıldığında yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı. ($p>0.05$) Yara yüzey alan ortalamaları 1 günlük salınım 6. saat > 3 günlük salınım 6. saat, 1 günlük salınım 12. saat > 3 günlük salınım 12. saat, 1 günlük salınım 24. saat > 3 günlük salınım 24. saat şeklindeydi (Tablo 4.18).

Hidroksiapatit trombositten zengin fibrin grubunda 6 ve 12. saatlerdeki 1 ve 3 günlük salınımlar karşılaştırıldığında yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$). 1 günlük salınımın 6. ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanları, 3 günlük salınımın 6. ve 12. saatlerdeki yara yüzey alanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.18).

Titanyum trombositten zengin fibrin grubunda 6, 12 ,24 ve 30. saatlerdeki 1 ve 3 günlük salınımlar karşılaştırıldığında yara yüzey alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Yara yüzey alan ortalamaları 1 günlük salınım 6. saat > 3 günlük salınım 6. saat, 1 günlük salınım 12. saat > 3 günlük salınım 12. saat, 1 günlük salınım 24. saat > 3 günlük salınım 24. saat, 1 günlük salınım 30.saat > 3 günlük salınım 30.saat şeklindeydi (Tablo 4.18).

5.TARTIŞMA

Kanın yapısındaki elemanlar iyileşme sürecinde önemli bir rol oynarlar. Fibrin matriks biyoaktif moleküllere bağlanarak iyileşme sürecini tetikler.[106] İyileşmenin istenilen şekilde olması için anjiogenez, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, ekstraselüller matriks birikimi ve dokunun yeniden şekillenmesi gibi karmaşık hücresel olayların gerçekleşmesi gerekir. Bu karmaşık olaylar parakrin mekanizmaları, anti-inflamasyon, farklılaşma ve rejeneratif potansiyelleri sebebiyle MKH kullanılarak hızlandırılabilinir.[107] Ancak MKH'lerin etkili olabilmesi için hücrelerin yeterli sayıda olması ve farklı soylara dönüşebilmeleri amacıyla yönlendirilmeleri gerekir. Bu sebeple, MKH'lerin in vitro ortamda çoğalmasını ve farklılaşmasını önemli ölçüde geliştirebilen yardımcı maddelerin kullanımının son derece önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Trombositten zengin ürünler, son zamanlarda bu istenilen sonuçlara ulaşmak amacıyla potansiyel bir araç olarak ortaya çıkmıştır.[108]

Trombositten zengin fibrin içeriğinde çok sayıda büyüme faktörü içeren bir trombosit konsantresidir.[109] TZF, sitokinlerin birbirine bağlanmasını ve hücre migrasyonunu destekleyen üç boyutlu bir fibrin ağdan oluşur. İçeriğindeki büyüme faktörlerini uzunca bir süre yavaşça salar ve bu da bu biyomalzemeyi doku rejenerasyonunda kök hücrelerin taşınmasında cazip bir seçim haline getirir.[110]

Choukroun ve ark.[111] tarafından geliştirilen trombositten zengin fibrin antikoagülan madde içermeksizin hastadan alınan 10 ml venöz kanın 12 dk 2700 rpm de cam veya silika kaplı tüpte santrifüj edilmesiyle elde edilen ikinci nesil bir trombosit konsantresidir. Önceden yapılmış olan in vitro çalışmalara bakıldığında L-TZF'nin MKH'lerin ve diğer hücre tiplerinin çoğalmasını desteklediği görülmektedir.[100, 112, 113]

Ancak cam tüpte bulunan silika partiküllerinin iyileşmeyi bozacağına dair son zamanlarda yapılan çalışmalarda vardır.[6-8, 114-116]

O'Connel 2007 yılında L-TZF'nin klinik kullanımı ile ilgili sorunları içeren editöre gönderdiği bir mektubu yayınlamıştır. Becton Dickinson tarafından üretilen silika kaplı tüplerin insan dokuları için zararlı olduğunu, üretici tarafından klinik kullanımlarının uygun olmadığını ve sadece teşhis amaçlı olarak üretildiğini belirtmiştir. Silika partiküllerinin fibrin pıhtı ve trombositten fakir plazma tabakalarında bulunabileceğini, hastanın kesinlikle silika partikülleri ile temas edeceğini ifade etmiştir.[7]

Tunalı ve ark.[9] 2013 yılında IV.sınıf titanyumdan elde ettikleri titanyum tüpler ile cam tüplerde bulunan silika partiküllerinin dezavantajını ortadan kaldırmayı amaçlamışlardır. Koroziv özellikleri olmayan titanyum çok iyi bir biyouyumluluğa sahiptir ve adeziv oksit tabakası oluşturarak in vivo ortamda kendini pasifleştirir. Titanyum tüpler ile elde edilen T-TZF de herhangi bir partikül kontaminasyon olmadığı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.[33] Kullanılan titanyum tüp, tek parça titanyumdan elde edilmektedir ve "machined" yüzeylidir. Cam tüplere göre ekonomik olarak daha maliyetli ve ağırlığı da daha fazladır.

Tunalı ve ark.[34] 2024 yılında yeni bir fikir olarak geleneksel TZF tüp yüzeylerini nano boyutta titanyum partiküller ile kaplayarak bu tüplerden geliştirilmiş bir fibrin yapısı elde etmeyi amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmada geleneksel cam tüpleri yüksek vakum altında yüksek hızlı bir termoiyonik vakum arkı işlemi uygulayarak titanyum nano partikülleri ile kaplamışlardır. Bu kaplanmış tüplerden elde ettikleri yeni bir biyomalzeme olan nanoT-TZF ile geleneksel cam tüplerden elde edilen L-TZF ve titanyum tüplerden elde edilen T-TZF üzerinde X-ışını kırınımı, atomik kuvvet mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonuçlarında nanoT-TZF deki fibrin alanlarının T-TZF' den daha yoğun olduğunu

ve L-TZF deki fibrin alanlarında ise en az yoğunluğun olduğunu göstermişlerdir. NanoT-TZF ve T-TZF deki hücre dağılımlarının birbirine paralel L-TZF de ise fibrin sınırına gömüldüğünü ifade etmişlerdir. Bu çalışma ile rejeneratif tıp alanının ilerlemesine yenilikçi bir yaklaşım getirmişlerdir.

Çalışmamızda, bu yenilikçi yaklaşımdan yola çıkarak geleneksel cam tüpleri aynı yöntemle fakat titanyum nano partiküller yerine nano boyutta hidroksiapatit partiküller ile kapladık. NanoHAp diğer nano partiküllerden farklı olarak geniş bir yüzey alanına ve benzersiz yüzey özelliklerine sahiptir.[10] Aynı zamanda NanoHAp partiküller kan dokusu ile mükemmel bir biyouyumluluk gösterir.[117] Bu sebeple NanoHAp partiküller ile kaplanan tüpler geleneksel cam tüplerin sebep olduğu silika kontaminasyonunu azaltabilir ve titanyum tüplerin ekonomik dezavantajlarını ortadan kaldırabilir.

Diş hekimliğinde kullanılan tüm biyomalzemeler hasta sağlığını ve güvenliğini korumak amacıyla biyouyumluluk açısından tarama testleri ile değerlendirilmelidir. Doku mühendisliği, kök hücre, genetik transfer, biyomalzemeler ve büyüme faktörü ile ilişkili tedaviler açısından yeni gelişimler yaşanmaktadır. Klinik kullanımlarından önce, bu yeni teknolojilerin güvenli olduğu ve insan sağlığına zarar vermediği gösterilmelidir. Bu amaçla hücre kültürü çalışmaları biyomalzemelerin sitotoksisitesini değerlendirmek için kullanılabilir.[118]

Bu amaçla çalışmamızda geleneksel cam tüplerden elde edilen L-TZF, titanyum kaplı tüplerden edilen T-TZF ve nano boyutta hidroksiapatit partiküller ile kaplanmış cam tüplerden elde edilen HA-TZF'nin gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkinliğini hücre kültüründe değerlendirmeyi hedefledik. Gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler ağız boşluğundan elde edilen diğer MKH'lere kıyasla daha kolay elde edilebilirler. Bu sebepten dolayı çalışmamızda GKMKH'leri kullandık.[83, 86] Literatürde TZF'lerin gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerine etkinliklerini inceleyen

çalışmalar sınırlıdır. L-TZF ve T-TZF'nin gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerine etkinliğini inceleyen herhangi bir çalışma görülmemiştir.

Çalışmamızda, izole edilen GKMKH'ler standart kültür koşullarında çoğaltılıp daha sonra karakterize edilmişlerdir. GKMKH'lerde akım sitometrisi kullanılarak belirli kök hücre yüzey antijenlerinin tespiti immünofenotipik analizler ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, GKMKH'ler CD105, CD90, CD73, CD44 ve CD29 yüzey belirteçlerini pozitif eksprese ederken; CD69, CD45, CD34, CD25 ve HLA-DR yüzey belirteçlerini ise negatif eksprese etmişlerdir. Bunun yanında, izole edilmiş olan GKMKH'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylara başarılı bir şekilde farklılaştığı tespit edilmiştir. Adipojenik soya farklılaşma, hücredeki yağ damlacıklarının Oil Red O boyası ile pozitif bir şekilde boyanması ile doğrulanmıştır. Osteojenik soya farklılaşma, kalsiyum birikimlerinin Alizarin Red S boyası ile pozitif bir şekilde boyanması ile doğrulanmıştır. Kondrojenik soya farklılaşma ise, içeriğinde glikozaminoglikan bulunan ekstraselüler matriksin Safranin O ve Alcian Blue boyaları ile pozitif bir şekilde boyanması ve hücre morfolojisinin lakünalı kondroblastlara benzer şekilde izlenmesi ile desteklenmiştir. Bu sonuçlar, kök hücrelerin kondrojenik soya başarılı bir şekilde farklılaştığını göstermektedir ve başarılı bir şekilde izole edilen GKMKH'lerin, mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için Uluslararası Hücresel Terapi Derneği tarafından belirlenen minimal kriterleri karşıladığını göstermektedir.[67]

Çalışmamızda cam tüp içerisindeki kan standart protokolde 2700 rpm ve 12 dakikalık bir süre boyunca santrifüj edilirken, yeni geliştirdiğimiz iç yüzeyi nano boyutta hidroksiapatit ile kaplı cam tüplerde 2700 rpm ve 12 dakikalık bir süre boyunca santrifüj edildi. Titanyum tüpler ise önerilen protokolden farklı olarak 12 dakika yerine 20 dakikalık bir süre boyunca santrifüj edildiler. Klinik tecrübelerimiz 12 dakika santrifüj edilen titanyum tüplerde santrifüj sonrası uygun bir fibrin pıhtısının elde edilemediği

yönündedir. Yapılan bir çalışmada TZF elde edilmesinde santrifüj süresinin uzatılması ile daha yoğun ve uygun bir fibrin elde edilebileceği ifade edilmiştir.[119] Bu sebepten dolayı çalışmamızda titanyum tüpler 12 dakika yerine 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Trombositten zengin fibrinler herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, 20-40 yaş arası sağlıklı bir erkek gönüllüden elde edilmiştir. Menstural döngünün trombosit sayısı ve fonksiyonunu değiştirebileceği düşünülerek kadın gönüllü çalışmaya dahil edilmemiştir.[120] Farklı bireylerden elde edilen hücreler ve TZF'ler arasında immün yanıt gelişme riski nedeniyle çalışmamızda aynı bireyden elde edilen hücreler ve TZF'ler kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalar TZF membranların 7-14 gün boyunca bozunmadan klinik olarak kalabildiğini ve içeriğindeki büyüme faktörlerini 15 dakika ile 28 gün arasındaki bir zaman sürecinde salgılayabildiğini göstermiştir.[15, 37, 101, 121] Çalışmalar farklı büyüme faktörlerinin farklı zaman aralıklarında maksimum düzeylerine ulaştıklarını belirtmiştir. Salınımın genellikle ilk günlerde daha yüksek olması beklenir.[122, 123] Bu sebeple çalışmamızda TZF membranların gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki 1, 3 ve 7 günlük etkilerini inceledik.

Çalışmamızda, GKMKH'lerin proliferasyonunu ve canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. MTT deneyi her grup için 1, 3 ve 7. günlerde yapılmıştır. Hücrelerin apoptoz ve nekrozunu belirlemek amacıyla 1 ,3 ve 7. günlerde her grup için flow sitometride Anneksin-V/PI testi yapılmıştır. TZF membranların morfolojilerini değerlendirmek amacıyla 1, 3 ve 7 günlük membranların SEM görüntüsü alınmıştır. Anjiojenik büyüme faktörleri olan VEGF, TGF-β1 için 1, 3 ve 7. günlerde ELİSA analizi, proinflamatuar sitokinler olan IL-1β, IL-6, TNF-α için 1, 3 ve 7. günlerde qRT-PCR analizi yapılmıştır. 1 ve 3 günlük TZF membran salgıları kullanılarak yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir.

Canlılığı ölçmek için yaptığımız MTT testinin sonuçları değerlendirildiğinde L-TZF grubunun canlılık değeri 1, 3 ve 7. günlerde pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. 1 ve 3. günlerde HA- TZF grubu ile pozitif kontrol grubunun canlılık değeri arasında anlamlı bir fark görülmemişken, 7. günde HA-TZF grubunun canlılık değeri pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. 1 ve 3. günlerde T-TZF grubu ile pozitif kontrol grubunun canlılık değeri arasında anlamlı bir fark görülmemişken, 7. günde T-TZF grubunun canlılık değeri pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Negatif kontrol grubu tüm deney inkübasyon periyotlarında en düşük canlılık değerini göstermiştir.

Ehrenfest ve ark.[100] yaptıkları bir çalışmada L-TZF varlığında insan kaynaklı prekeratinosit, gingival fibroblast, preadiposit ve osteoblast hücrelerinin in vitro ortamda davranışını incelemişlerdir. Hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT testini kullanmışlardır ve inkübasyon sürelerini 3, 7, 14 ve 21 gün olacak şekilde planlamışlardır. 50-60 yaş arası gönüllü erkek bireylerden hem hücreleri hem de TZF membranları üretmişlerdir. Test edilen her bir plakaya tek TZF membran ve doza bağlı etkinliğini araştırmak için ise iki TZF membran yerleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda L-TZF membran ile inkübe edilen 4 hücre tipinde proliferasyonun arttığını göstermişlerdir. Kullanmış oldukları MTT testi ile L-TZF'nin sitotoksik etkisinin olmadığını ve L-TZF'nin osteoblast hücreleri üzerinde doza bağlı olarak proliferasyonu arttırdığını bulmuşlardır. Bu sonuç bizim MTT testi sonuçlarımıza benzemektedir. Çalışmamızda L-TZF membran ile inkübe edilen GKMKH' lerin proliferasyonu artmıştır.

Ehrenfest ve ark. [113] yaptıkları bir çalışmada, L-TZF'nin insan kemik iliği kaynaklı kök hücreleri üzerindeki etkilerini in vitro olarak incelemişlerdir. Hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT testini kullanmışlardır ve inkübasyon sürelerini 3, 7, 14, 21 ve 28 gün olacak şekilde planlamışlardır. İmmün

yanıttan kaçınmak amacıyla hücreleri ve L-TZF membranları aynı donörden elde etmişlerdir. L-TZF membranları standart ve farklılaşma koşullarında hazırlanmış besiyerlerine önce 1 tane ve sonra doza bağlı etkinliğini değerlendirmek amacıyla 2 tane membran olacak şekilde yerleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda 1 ve 2 L-TZF membran varlığında hem standart hem de farklılaşma koşularında inkübe edilen kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin tüm deney inkübasyon sürelerinde proliferasyonlarının arttığını göstermişlerdir. Standart koşullarda inkübe edilen 2 membranlı kültürlerin 1 membranlı kültürlere göre ilk 14 gün daha fazla proliferasyon etkisi gösterdiğini ancak bu etkinin zamanla azaldığını bulmuşlardır. Farklılaşma besiyerinde inkübe edilen 2 membranlı kültürlerin 1 membranlı kültürlere göre tüm deney süresi boyunca daha fazla proliferatif etki gösterdiğini bulmuşlardır. L-TZF'nin hem standart hem de farklılaşma kültür koşullarında doza bağlı olarak kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin proliferasyonunu önemli ölçüde arttırdığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucu L-TZF bulgularımıza benzerdir.

Tsai ve ark. [124] yaptıkları bir çalışmada TZF'nin oral epitel hücreleri, osteoblastlar, gingival fibroblastlar ve periodontal ligament hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerini incelemişlerdir. Proliferatif etkiyi incelemek için MTT testini kullanmışlardır. 10 sağlıklı sigara içmeyen gönüllü bireyden 10 ml kan örneği alıp antikoagülan içermeyen cam kaplı plastik tüplere yerleştirerek 3000 rpm devirde 12 dakikalık santrifüjle L-TZF elde etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda L-TZF membranın osteoblast, gingival fibroblast ve periodontal ligament hücreleri üzerinde çoğalmayı artırıcı etki gösterdiğini bulmuşlardır. L-TZF'nin periodontal dokularla ilişkili hücrelere sitotoksik bir etki göstermediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucu bulgularımıza benzerdir.[124]

Baygın ve ark.[125] 2024 yılında yaptıkları bir çalışmada L-TZF ile T-TZF'nin osteoblast proliferasyonu ve osteoblastik aktiviteyi ölçen ALP, OCN, COL1A1 ve

RUNX2 genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 20-50 yaş arası sağlıklı, sigara içmeyen erkek gönüllü bireylerden 10 ml kan alıp L-TZF ve T-TZF üretmişlerdir. Çalışmanın sonucunda her iki grupta da osteoblast proliferasyonunda gelişme görmüşlerdir. Ancak T-TZF'nin L-TZF' ye kıyasla osteoblast proliferasyonunda 72 saate kadar daha tutarlı bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonucu bizim çalışmamızın sonucu ile nispeten benzerdir. Çalışmamızda L-TZF ve T-TZF membranın GKMKH'ler üzerinde proliferasyonu 7.güne kadar tutarlı bir şekilde artırdığını bulduk. Ancak 7 günlük sonuçlarımızda L-TZF, T-TZF' ye göre GKMKH proliferasyonunda daha tutarlı bir artış göstermiştir. Sonuçlarımız bu açıdan çelişmektedir. Farklı sonuçlar kanın santrifüjü, membrandaki trombosit sayısı, membran elde edilme ve membranların hücre kültürüne uygulanması arasındaki zaman farklılıkları ve bireysel varyasyonlardan kaynaklanabilir.[126] Çalışmalar trombosit konsantrelerinin içeriğinde farklı etkilere sahip faktörler olduğunu ve farklı tipteki trombosit konsantrelerinin içeriğindeki bu faktörlerin farklı miktarda olabileceğini ve bunun hücre canlılığını etkileyebileceğini belirtmiştir.[127]

Cai ve ark.[49] 2007 yılında 20 nm, 40 nm ve 80 nm çaptaki hidroksiapatit nanopartiküllerin MKH'ler ve osteosarkom hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda özellikle 20 nm boyutundaki partiküllerin MKH canlılığı ve proliferasyonunu artırdığını bulmuşlardır. Partikül boyutunun hücre üzerindeki etkinlikte önemli bir rol oynadığını vurgulamışlardır. Bu çalışmanın sonucu HA-TZF lehine yorumlanabilir.

Shi ve ark.[128] yaptıkları bir çalışmada 20 nm ve 80 nm çapındaki NanoHAp partiküllerinin osteoblast benzeri MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerini in vitro olarak incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda NanoHAp'ların MG-63 hücrelerinin

kültürdeki mitojenik etkilerini artırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonucu HA-TZF lehine yorumlanabilir.

Zandi ve ark.[129] 2010 yılında NanoHAp ile kaplanmış yeni bir iskele hazırlamışlardır. Hazırlamış oldukları bu iskelelerin biyouyumluluğunu MKH'ler üzerinde in vitro olarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda NanoHAp ile kaplanmış iskelelerin hücre bağlanması ve çoğalması üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. NanoHAp ile kaplı iskelelerin daha iyi hücre çoğalmasına sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucu HA-TZF ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir.

Flow sitometride apoptoz ve nekroz bulgularımızı değerlendirdiğimizde, 1, 3 ve 7. günlerde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmese de özellikle TZF membran gruplarına ait toplam apoptoz ve nekroz yüzdeleri kontrol gruplarına kıyasla yüzdesel olarak düşüktü. Canlılık bulgularımız MTT bulgularımıza benzerlik gösterdi.

Kargarpour ve ark.[130] yaptıkları bir çalışmada L-TZF ile standart ve ıstılmış şekilde hazırlanan trombositten fakir plazmanın hidrojen peroksitin toksik konsantrasyonunu gingival fibroblastlar üzerinde nötralize edip edemeyeceğini incelemişlerdir. Sonuç olarak TZF'nin aktive trombositlere benzer bir şekilde hidrojen peroksitin sebep olduğu nekrozu azalttığı sonucunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar çalışmamızın sonucunu lehine yorumlanabilir. Çalışmamızda %1 ve %10 FBS kullanılan kontrol gruplarına kıyasla TZF membran kullanılan grupların 1. ve 3. günlerde GKMKH'leri daha az oranda nekroze ettiği sonucuna ulaşıldı

Verboket ve ark.[131] yaptıkları bir çalışmada iki farklı santrifüj protokolüyle elde elde ettikleri enjekte edilebilir trombositten zengin fibrinlerin kemik iliği kaynaklı hücreler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin apoptozisini 2. ve 7. günlerde Anneksin V boyama ve akım sitometrisi kullanarak değerlendirmişlerdir.

Sonuç olarak TZF'nin seruma kıyasla 2. ve 7. günlerde antiapoptotik bir etki gösterdiğini 7.günden sonra bu etkinin azaldığını bildirmişlerdir. TZF'den salgılanan TGF-β ve IGF'nin antiapoptotik etkinlikte rol oynadığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bulgularımıza benzerdir. Çalışmamızda TZF gruplarının kontrol gruplarına kıyasla 1. ve 3. günde daha antiapoptotik olduğu ve TZF gruplarından daha yüksek miktarda TGF-β salgılandığı sonucuna ulaşıldı.

Sadeghian ve ark.[132] yaptıkları bir çalışmada 1.nesil trombosit konsantresi olan trombositten zengin plazma ve sığır kaynaklı serumun yağ dokusundan elde edilen kök hücreler üzerindeki proliferasyona ve canlılığa olan etkilerini 4. ve 8.günlerde incelemişlerdir. Apoptotik hücrelerin değerlendirilmesinde anneksin boyaması ve flow sitometri kullanmışlardır. Sonuç olarak TZP grubunun FBS grubuna kıyasla daha az oranda apoptotik hücre yüzdeleri bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları bulgularımız lehine nispeten yorumlanabilir. Biz çalışmamızda farklı tiplerde tüplerden elde edilen 2.nesil trombosit konsantreleri olan trombositten zengin fibrinleri kullandık ve TZF'lerin 1. ve 3. günlerde kontrol gruplarına kıyasla GKMKH'ler üzerinde daha antiapoptotik bir etki gösterdiğini ancak 7.günde bu etkinliğin daha azaldığı sonucunu bulduk. Bu farklılık TZP ve TZF'nin fibrin ağ yapısı ve her iki trombosit konsantresinin salgı mekanizmalarından kaynaklanabilir.

Grupların ELİSA deneyi sonrası proanjiyojenik faktör salınımları değerlendirildiğinde, kontrol grupları ve TZF membran içerikli gruplarda 1, 3 ve 7. günlerde VEGF salınımı görüldü. 3.gün VEGF salınımları arasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. L-TZF ve HA-TZF membran içeren gruplar tüm deney günleri boyunca TGF-β1 salınımı yaparken, T-TZF içeren grupta 1. ve 7. günlerde, pozitif kontrol grubunda ise sadece 1. günde TGF-β1 salınımı görüldü. Negatif kontrol grubunda ise deney süresi boyunca TGF-β1 salınımı görülmedi.

Kagiwada ve ark.[133] yaptıkları bir çalışmada in vitro ortamda kültüre edilmiş insan mezenkimal kök hücreleri ile fibroblastların VEGF ekspresyonlarını ELİSA analizi ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak insan mezenkimal kök hücrelerin VEGF ekspresyonu yaptığını ve bunun fibroblastlardan daha fazla olduğu sonucunu bulmuşlardır. Bu çalışma bulgularımızla örtüşmektedir. Çalışmamızda insan dişetinden elde ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin 1, 3 ve 7. günlerde in vitro ortamda VEGF salınımı yaptığı sonucu bulundu.

Su ve ark.[134] yaptıkları bir çalışmada lökosit trombositten zengin fibrinin içeriğindeki çeşitli büyüme faktörlerinin salınımını 5 dakika ila 300 dakikalık bir zaman sürecinde ELİSA deneyi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak çalışma süreci boyunca L-TZF' nin PDGF, TGF-β1, VEGF ve IGF-1 büyüme faktörlerini eksprese ettiğini bildirdiler. Bu çalışma bulgularımızla örtüşmektedir. Çalışmamızda L-TZF' nin VEGF ve TGF-β1 faktörleri eksprese ettiği sonucuna ulaşıldı.

He ve ark.[135] yaptıkları bir çalışmada TZP ve TZF'nin rat osteoblastlarının proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak TZF membranından büyüme faktörlerinin kademeli olarak eksprese olduğunu ifade etmişler. Bu çalışma ELİSA bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmamızda L-TZF, HA-TZF ve T-TZF 'nin içeriğindeki VEGF ve TGF-β1 büyüme faktörlerini 1 ,3 ve 7. günlerde kademeli olarak saldığı sonucu bulundu.

Literatürde TZF'lere uygulanan sıkıştırma prosedürlerinin TZF membranların fibrin mimarisini bozduğunu bu sebeple büyüme faktörlerinin fibrin membrana sıkıştığını ve salınım kinetiğini etkilendiğini belirten çalışmalar vardır.[136, 137] Bu 3.günde kontrol gruplarında neden daha yüksek VEGF salınımı olduğunu açıklayabilir. Çalışmamızda santrifüj sonrası elde edilen TZF pıhtıları metal bir kutuda sıkıştırılarak membran haline getirildi. Deney gruplarında sıkıştırma sonrası elde edilen membranlar kullanıldı.

TZF membran içeren gruplarda 7 günlük toplam VEGF ve TGF-β1 salımları karşılaştırıldığında L-TZF membran içeren grupta HA-TZF ve T-TZF membran içeren gruplara göre daha fazla salınım olduğu sonucu bulundu. Gruplar arasındaki bu farklılığın sebebi büyüme faktörlerinin salınımının, hücre dışı matris ile etkileşim yoluyla düzenlenmesi ve büyüme faktörlerinin fibrin ağı tarafından tutularak büyüme faktörlerinin fibrine bağlanmasıyla ilişkili olabilir. Genel olarak, biyomalzemelerden salınım üç şekilde gerçekleşebilir: Büyüme faktörlerinin kademeli (patlama) salınımı, hücre dışı matrisin erken degradasyonuyla sağlanan hızlı salınım ve yavaş salınım şeklinde olabilir.[138] Bu anlamda daha düşük bir fibrin yoğunluğuna sahip bir matristen daha hızlı bir salınım gerçekleşecektir.[139] Literatürdeki çalışmalar T-TZF membranın L-TZF membrana göre daha geç degrade olduğunu ve T-TZF membranların daha yoğun bir fibrin yapısı sergilediğini belirtmektedir.[33, 34, 140]

Mamajiwala ve ark.[119] yaptıkları bir çalışmada santrifüj hız ve süresinde farklı protokoller uygulandığında TZF'nin trombosit sayısı, antimikrobiyal etkinliği ve fibrin ağı modelinde değişiklik olup olmayacağını incelemişlerdir. TZF membrandaki trombosit sayılarını tam kan ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak santrifüj hız ve süresi arttıkça TZF membran içeriğindeki trombosit sayısında %50' ye varan bir azalma olduğunu bulmuşlardır ve santrifüj hız ve süresinin trombosit sayısı üzerinde etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bulgularımızı desteklemektedir. TZF'nin içeriğindeki trombositlerin α granüllerinde büyüme faktörleri bulunur. [22, 24] Çalışmamızda daha uzun süreyle santrifüj edilerek elde edilen T-TZF membran, L-TZF ve HA-TZF membranlara kıyasla daha az büyüme faktörü salınımı gerçekleştirdi ve yara iyileşmesi deneyinde yara bölgesini daha geç kapattı. Buradan yola çıkıldığında TZF membran elde edilmesinde santrifüj protokollerinin farklı tüp tiplerine kıyasla TZF membranın içeriğindeki büyüme faktörü salınımını daha fazla etkilediği varsayımı çıkarılabilir.

Ehrenfest ve ark.[141] yaptıkları bir çalışmada L-TZF membranların bazı temel büyüme faktörlerinin in vitro olarak salınımlarını ve salınım kinetiklerini incelemişlerdir. 6 gönüllü bireyden 10 ml venöz kan alıp alınan cam tüpleri koyarak standart prosedürde santrifüj etmişlerdir ve elde ettikleri TZF' leri hafifçe sıkarak TZF membran haline getirmişlerdir. L-TZF membranlardan salınan TGF-β1, VEGF, PDGF ve trombospondini ELİSA kitleri kullanarak ölçmüşlerdir. Sonuç olarak TZF membranda aktive edilmiş lökositlerin TGF-β1 ve VEGF salınımı gerçekleştirdiğini ifade etmişler. Bu bulgu TZF membran içerikli gruplara kıyasla daha az veya hiç TGF-β1 salınımı gerçekleştirmeyen kontrol gruplarının salınım sonuçlarını açıklayabilir.

Grupların qRT-PCR analizi sonrası proinflamatuar sitokin gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında IL-1β ve IL-6 gen ekspresyonunda 7. günde anlamlı bir farklılık bulunurken, TNF-α gen ekspresyonunda 3. günde anlamlı bir farklılık bulundu. TZF membran içeren gruplarda genel olarak proinflamatuar sitokinler 1. ve 3. günlerde daha yüksek gen ekspresyonu seviyesi gösterirken 7. günlerde bu seviye azaldı.

Ehrenfest ve ark.[27] yaptıkları bir çalışmada L-TZF'nin içeriğindeki IL-1β, IL-6 ve TNF-α varlığını incelemişlerdir. Sonuç olarak L-TZF'nin IL-1β, IL-6 ve TNF-α içerdiğini, L-TZF' nin savunma mekanizmalarını uyarak yara enfenksiyonu durumunda önemli bir rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızın bulguları bu çalışmayı desteklemektedir. Çalışmamızda L-TZF membranın IL-1β, IL-6 ve TNF-α genlerini eksprese ettiği sonucu bulundu.

Wang ve ark.[142] yaptıkları bir çalışmada L-TZF'nin anti inflamatuar kapasitesini incelemişlerdir. Bunun için schawnn hücrelerini içeren iki farklı ortam hazırlamışlardır. Bir ortam sadece hücre ile beraber lipopolisakkarit (LPS) içerirken, diğer ortama hücre ve LPS ile beraber L-TZF eklemişlerdir. Ortamlardaki proinflamatuar gen ekspresyon

düzeyini RT-PCR kullanarak ölçmüşlerdir. Sonuç olarak bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile şartlandırılan ortamda L-TZF'nin IL-1β, IL-6 ve TNF-α gen ekspresyon seviyelerini azaltarak anti inflamatuar bir etkinlik gösterdiğini ifade etmişlerdir. Schär ve ark.[143] ise yaptıkları bir çalışmada L-TZF ve L-TZP' den salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin MKH ve endotel hücreleri üzerindeki migrasyona etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak MKH' nin en güçlü migrasyon yanıtını L-TZF grubunda yaptığını, L-TZF' nin daha yüksek IL-1β salınımı gösterdiğini ve IL-1β'nın hücre göçünü indüklediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızın bulguları O. Schär ve ark.'nın çalışmasına benzemektedir. PCR bulgularımızda IL-1β gen ekspresyonu en yüksek HA-TZF içeren grupta görülmüştür. Yara deneyi bulgularımızda ise HA-TZF içeren grupta yara bölgesi L-TZF ve T-TZF içerikli gruplara göre daha erken kapanmıştır. Eğer ortamda toksin yoksa TZF anti inflamatuar bir etki yerine içeriğindeki proinflamatuar sitokinlerin salınımını yaparak yara iyileşmesini ve göçünü geliştirir varsayımı çıkarılabilir.

Çalışmamızın klinik açıdan uygulamaları iyileşmenin ilk evrelerinde bulunan proinflamatuar sitokinlerin mevcudiyetine dayanmaktadır. Fizyolojik yara iyileşmesi sırasıyla hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon aşamalarından oluşur. Hemostaz aşaması yaralanmadan hemen sonra meydana gelen aşamadır. Bu aşamayı takiben inflamatuar aşama meydana gelir.Bu aşamada enflamatuar hücreler göç eder ve pıhtı içinde ilk vasküler yapılar ortaya çıkarak granülasyon dokusunu oluşturur. Sonraki 2 hafta boyunca olgunlaşmamış fibroblastlar olgunlaşarak granülasyon dokusu proliferasyon fazı olarak bilinen aşamada kollajen dokusu ile yer değiştirir.[144] Çalışmamız deney inkübasyon süresi itibariyle ilk 3 aşamaya karşılık gelmektedir. Proinflamatuar sitokinler özellikle IL-1β, IL-6 ve TNF-α iyileşmenin inflamatuar safhasında yukarı yönde düzenlenir.[26] Bu inflamatuar aşama 1 ile 3 gün arasında meydana gelir.[145] Çalışmamızın bulguları bunu desteklemektedir.

Yara iyileşmesi deneyi bulgularımız değerlendirildiğinde, hem 1. gün salınım hem de 3. gün salınımlarında HA-TZF membran içeren grup ve pozitif kontrol grubu yara bölgesinde en hızlı kapatmayı gösterdi. Her iki grupta yara yüzey alanını 24. saatte kapattı. L-TZF içeren grup yara bölgesini 30. saatte tam kapatabilirken, T-TZF içeren grup ile negatif kontrol grubu yara bölgesini 36.saatte kapattı. 1.gün ve 3.gün salınımlarının yara bölgesini kapatma etkileri arasında HA-TZF membran içeren grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken, L-TZF ve T-TZF gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 3. gün salınımlarının 1. güne göre deney saatleri düzeyinde daha fazla yara bölgesi kapattığı görüldü.

Tsujino ve ark.[8] yaptıkları bir çalışmada hastalardan aldıkları kan örneklerini 3 farklı silika markası içeren plastik tüplere aktararak A-TZF protokolüne göre santrifüj ettiler. Santrifüj sonrası elde edilen TZF membranları fikse edip taramalı elektron mikroskobu kullanarak incelediler ve TZF membranlarındaki silika mikro partiküllerinin miktarını spektrofotometrik olarak belirlemek için TZF membranlarını enzimatik olarak parçaladılar. Hem taramalı elektron mikroskobu hem de spektrofotometrik analiz sonucunda silika mikro partiküllerinin TZF matrisine dahil olduğunu gösterdiler. Silika mikro partiküllerinin doku rejenerasyonunu olumsuz etkileyebileceğini ve klinisyenlerin bu durumu göz ardı etmemesini ifade ettiler. Çalışmamızın bulguları bu çalışmayı desteklemektedir. Hidroksiapatit nano partiküller ile kaplanan tüplerden elde ettiğimiz HA-TZF cam tüplerden elde ettiğimiz L-TZF'ye kıyasla yara bölgesinde daha erken bir iyileşme gösterdi. Bu sebeple NanoHAp kaplı tüplerin cam tüplere göre daha az silika kontaminasyonu yaptığı düşünülmektedir.

Masuki ve ark.[6] yaptıkları bir çalışmada silika kaplı tüp duvarlarından salınan silika mikro partiküllerinin potansiyel sitotoksik etkilerini insan periosteal hücreleri üzerinde araştırmışlardır Silika mikro partiküllerinin hücrelere yüksek affinite göstererek

yapıştığını ve silika mikro partikülleri ile kontamine olmuş TZF matrislerinin kullanımlarının yerleştirildiği bölgede tehlikeli olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızın bulguları bu çalışmayı desteklemektedir. Hidroksiapatit nano partiküller ile kaplanan tüplerden elde ettiğimiz HA-TZF'nin L-TZF'ye kıyasla daha erken bir yara iyileşmesi göstermesi bu tüplerin kanda daha az oranda silika kontaminasyonu yaptığı sonucunu ortaya çıkabilir.

Kobayashi ve ark.[146] yaptıkları bir çalışmada farklı santrifüj protokolleriyle elde ettikleri L-TZF, A-TZF ve A^+-TZF'lerin büyüme faktörü salınımlarını ve gingival fibroblastlar üzerindeki migrasyona olan etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak düşük santrifüj devir ve süresinde elde ettikleri A-TZF ve A^+-TZF membranların daha yüksek büyüme faktörü salgıladıklarını ve fibroblastlar üzerinde daha iyi migrasyon gösterdikleri sonucunu bulmuşlardır. Çalışmamızın bulguları bu bulguları desteklemektedir. Çalışmamızda yaptığımız ELİSA analizinde uzun süreli santrifüj edilen T-TZF membran içerikli grupta L-TZF ve HA-TZF membrana göre büyüme faktörü salınımı daha az bulundu ve yara iyileşmesi deneyinde T-TZF içerikli grup yara yüzeyini daha geç kapattı.

Pitzura ve ark.[147] yaptıkları bir çalışmada A-TZF ve L-TZF membranların dişeti ve periodontal ligament kaynaklı fibroblastlar üzerindeki proliferasyon ve migrasyona olan etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla A-TZF ve L-TZF membranların migrasyona olan etkilerini değerlendirmek için yapay bir yara bölgesi hazırlayarak iyileştirme deneyi yapmışlardır. Sonuç olarak L-TZF membran kullanılan grupta 24.saatte yaranın kapanmadığını ve L-TZF membrana göre daha düşük santrifüj devir ve süresinde hazırlanan A- TZF membranın yara bölgesinde daha fazla hücre migrasyonu yaptığını bildirmişlerdir. Çalışmamızın bulguları bu çalışmayı desteklemektedir. Çalışmamızda L-TZF membran içerikli grup hazırlanan yapay yara bölgesini 24. saatte kapatamamıştır ve L-TZF ve HA-TZF membranlara göre daha uzun süreyle santrifüj edilen T-TZF

membranın yara bölgesini diğerlerine kıyasla geç kapatarak daha az hücre migrasyonu yapmıştır.

Lökosit trombositten zengin fibrin membran içeren grup ve T-TZF membran içeren grubun pozitif kontrole göre yara bölgesini daha geç kapatması bu membranların içeriğindeki nötrofiller tarafından üretilen matriks metalloproteinazlarının zarar verici etkileri ile açıklanabilir.[148] 3.gün salımlarının 1.gün salınımlarına kıyasla yara bölgesini daha fazla kapaması 3.gün daha fazla TGF-β1 salınımı olması ve daha az proinflamatuar gen ekspresyonu olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda TZF membranların bir bütün halinde in vitro olarak değerlendirilememesi ve yalnızca 1, 3 ve 7. günlerdeki etkilerinin incelenmesi çalışmamızı sınırlayan durumlardır. Bu sınırlayıcı durumlar çerçevesinde yaptığımız çalışmada hidroksiapatit nano partikül kaplı tüpten elde ettiğimiz HA-TZF membranların in vitro olarak gösterdiği etkinlik gelecek için umut vericidir. Ancak bu tüplerden elde edilen HA-TZF membranların etkinliklerinin kapsamlı olarak ortaya çıkarılması için daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda nano boyutta hidroksiapatitle kaplı tüplerden elde edilen HA-TZF membranların GKMKH'ler ve yara iyileşmesine üzerine olan etkisi rutinde kullanılan L-TZF ve T-TZF membranlarla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında aşağıdaki sonuçlar ortaya çıkmıştır.

1. Hücreler üzerinde canlılığı değerlendirmek amacıyla yapılan MTT analizine göre HA-TZF membranların kök hücreler üzerinde toksik etkisi olmadığı ve hücre çoğalmasını artırıcı etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

2. Hücreler üzerinde apoptoz oranını belirlemek amacıyla yapılan akış sitometrisi analizine göre HA-TZF membranlar kök hücreler üzerinde anti apoptotik bir etki göstermiştir.

3. Taramalı elektron mikroskop görüntülerine göre HA-TZF membranların L-TZF ve T-TZF membranlar gibi organize bir fibrin matriks yapısı gösterdiği görülmüştür.

4. Yapılmış olan ELİSA ve RT-PCR analizlerine göre HA-TZF membranların rutinde kullanılan L-TZF ve T-TZF membranlar gibi proanjiyojenik ve proinflamatuar sitokin salınımı yaptığı sonucuna ulaşılmıştır.

5. Yara iyileşmesi deneyinde HA-TZF membranların L-TZF ve T-TZF membranlara kıyasla daha etkili bir yara iyileşmesi gösterdiği görülmüştür.

Nano boyutta hidroksiapatitle kaplı tüplerden elde edilen HA-TZF membranlarla yapılacak sonraki in vitro araştırmalarda kök hücreler üzerindeki osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Quirynen M, Sculean A, Blanco J, Wang HL, Donos N. Introduction and overview on autogenous Platelet concentrates. Periodontol 2000 2025.
2. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review. Tissue Eng Part B: Rev 2017;23(1):83-99.
3. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. Stem cells Trans Med 2012;1(2):142-49.
4. Saini K, Chopra P, Sheokand V. Journey of platelet concentrates: a review. Biomed Pharmacol J 2020;13(1):185-91.
5. Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, Fuentes R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. Int J Clin Exp Med 2015;8(5):7922.
6. Masuki H, Isobe K, Kawabata H, Tsujino T, Yamaguchi S, Watanabe T, Sato A, Aizawa H, Mourão CF, Kawase T. Acute cytotoxic effects of silica microparticles used for coating of plastic blood-collection tubes on human periosteal cells. Odontology 2020;108(4):545-52.
7. O'Connell SM. Safety issues associated with platelet-rich fibrin method. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103(5):587.
8. Tsujino T, Takahashi A, Yamaguchi S, Watanabe T, Isobe K, Kitamura Y, Tanaka T, Nakata K, Kawase T. Evidence for contamination of silica microparticles in advanced platelet-rich fibrin matrices prepared using silica-coated plastic tubes. Biomedicines 2019;7(2):45.

9. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. Br J Oral Maxillofac Surg. 2013;51(5):438-43.
10. Sun W, Zhong J, Gao B, Feng J, Ye Z, Lin Y, Zhang K, Su W, Zhu S, Li Y. In vitro/In vivo Evaluations of Hydroxyapatite Nanoparticles with Different Geometry. Int J Nanomedicine 2024;8661-79.
11. Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. Ann Maxillofac Surg 2011;1(1):53-57.
12. Raja VS, Naidu EM. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. Indian J Dent Res 2008;19(1):42-46.
13. Damsaz M, Castagnoli CZ, Eshghpour M, Alamdari DH, Alamdari AH, Noujeim ZEF, Haidar ZS. Evidence-based clinical efficacy of leukocyte and platelet-rich fibrin in maxillary sinus floor lift, graft and surgical augmentation procedures. Front Surg 2020;7537138.
14. Agrawal AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. World J Clin Cases 2017;5(5):159.
15. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):e37-e44.
16. Mohan SP, Jaishangar N, Devy S, Narayanan A, Cherian D, Madhavan SS. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in periodontal regeneration: a review. J Pharm Bioallied Sci 2019;11(Suppl 2):S126-S30.

17. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85(6):638-46.
18. Yin W, Qi X, Zhang Y, Sheng J, Xu Z, Tao S, Xie X, Li X, Zhang C. Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte-and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. J Transl Med 2016;141-19.
19. Raaj V, Gautam A, Abhishek KP. Platelet-rich fibrin (PRF): A new generation platelet concentrate. Int J Dent Med Res 2015;1(6):164-67.
20. Fioravanti C, Frustaci I, Armellin E, Condo R, Arcuri C, Cerroni L. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. Oral Implantol 2015; 8 (4): 96-113.
21. Liu F, Xu H, Huang H. A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo. Stem Cell Res Ther 2019;101-12.
22. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):45-50.
23. Gremmel T, Frelinger III AL, Michelson AD In Platelet physiology, Seminars in thrombosis and hemostasis. Thieme Medical Publishers: 2016; 191-204.
24. Preeja C, Arun S. Platelet-rich fibrin: Its role in periodontal regeneration. Saudi J Dent Res 2014;5(2):117-22.
25. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman N, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. J Periodontal Res 1998;33(8):491-99.

26. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2008;16(5):585-601.
27. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):51-55.
28. Vinaya Kumar R, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. Cell Tissue Bank 2013;14453-63.
29. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101(3):56-60.
30. Ehrenfest DMD, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. Muscles Ligaments Tendons J 2014;4(1):3.
31. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol 2009;27(3):158-67.
32. Shah R, Thomas R, Mehta D. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. Eur J Prosthodont Restor Dent 2017;25(2):64-72.
33. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Yaprak E, Toker H, Fıratlı E. A novel platelet concentrate: titanium-prepared platelet-rich fibrin. Biomed Res Int 2014;2014(1):209548.

34. Tunalı M, Ercan E, Pat S, Sarıca E, Bağla AG, Aytürk N, Sıddıkoğlu D, Bilgin V. Nano-titanium coating on glass surface to improve platelet-rich fibrin (PRF) quality. J Mater Sci Mater Med 2024;35(1):1-9.
35. Nicolae C-L, Pîrvulescu D-C, Niculescu A-G, Rădulescu M, Grumezescu AM, Croitoru G-A. An overview of nanotechnology in dental medicine. J Compos Sci 2024;8(9):352.
36. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. J Oral Implantol 2014;40(6):679-89.
37. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. Clin Oral Investig 2016;202353-60.
38. Mourão CFdAB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft. Rev Col Bras Cir 2015;42421-23.
39. Jandt KD, Watts DC. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. Dent Mater J 2020;36(11):1365-78.
40. Freitas Jr RA. Nanodentistry. J Am Dent Assoc 2000;131(11):1559-65.
41. Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, Chaubal TV, Pandurangappa R, Jnanendrappa N, Gorain B, Khurana S, Kesharwani P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. Drug Discov Today 2019;24(1):85-98.
42. Abiodun-Solanke IMF, Ajayi D, Arigbede A. Nanotechnology and its application in dentistry. Ann Med Health Sci Res 2014;4(3):171-77.

43. Turon P, Del Valle LJ, Alemán C, Puiggalí J. Biodegradable and biocompatible systems based on hydroxyapatite nanoparticles. Appl Sci 2017;7(1):60.
44. Kuśnieruk S, Wojnarowicz J, Chodara A, Chudoba T, Gierlotka S, Lojkowski W. Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles. Beilstein J Nanotechnol 2016;7(1):1586-601.
45. Bordea IR, Candrea S, Alexescu GT, Bran S, Băciuț M, Băciuț G, Lucaciu O, Dinu CM, Todea DA. Nano-hydroxyapatite use in dentistry: A systematic review. Drug Metab Rev 2020;52(2):319-32.
46. Ghiasi B, Sefidbakht Y, Mozaffari-Jovin S, Gharehcheloo B, Mehrarya M, Khodadadi A, Rezaei M, Ranaei Siadat SO, Uskoković V. Hydroxyapatite as a biomaterial–a gift that keeps on giving. Drug Dev Ind Pharm 2020;46(7):1035-62.
47. Najibfard K, Ramalingam K, Chedjieu I, Amaechi B. Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. J Clin Dent 2011;22(5):139.
48. Li B, Guo B, Fan H, Zhang X. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro. Appl Surf Sci 2008;255(2):357-60.
49. Cai Y, Liu Y, Yan W, Hu Q, Tao J, Zhang M, Shi Z, Tang R. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. J Mater Chem 2007;17(36):3780-87.
50. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K-I, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. J Craniofac Surg 2002;13(2):231-39.
51. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. Methods Enzymol 2006;420339-61.
52. Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. J Pathol Clin Res 2002;197(4):424-29.

53. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Respiration 2012;85(1):3-10.
54. Kalra K, Tomar PC. Stem cell: basics, classification and applications. Am J Phytomed Clin Ther 2014;2(7):919-30.
55. Rai S, Kaur M, Kaur S. Applications of stem cells in interdisciplinary dentistry and beyond: an overview. Ann Med Health Sci Res 2013;3(2):245.
56. Bissels U, Diener Y, Eckardt D, Bosio A. Characterization and classification of stem cells. Regenerative Medicine-from Protocol to Patient:2. Stem Cell Science and Technology, Springer; 2016: 1-25.
57. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani S, Aval FS. Multipotent stem cell and current application. Acta Med Iran 2017;6-23.
58. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry–part I: stem cell sources. J Prosthodont Res 2012;56(3):151-65.
59. Khazaei M, Bozorgi A, Khazaei S, Khademi A. Stem cells in dentistry, sources, and applications. Dent Hypotheses 2016;7(2):42-52.
60. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W-s. Culture systems for pluripotent stem cells. J Biosci Bioeng 2005;100(1):12-27.
61. Sudulaguntla A, Gurung S, Nanjwade BK, Tamang JK. A review: Stem cells and classification of stem cells based on their origin. J Pharm Pharm Sci 2016;15(1):105-12.
62. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. Int J Hematol 2003;4(2):92-96.
63. Bongso A, Lee EH. Stem cells: from bench to bedside.1nd ed. Singapore:World Scientific Publishing; 2005.

64. Mao JJ, Collins FM. Sources, Therapies and the Dental Professional. Stroke 2008;8(10):12.
65. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. Biosci Rep 2015;35(2):e00191.
66. Lei T, Zhang X, Du H. Characteristics, classification, and application of stem cells derived from human teeth. Stem Cells Int 2021;2021(1):8886854.
67. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Garcia Castro J, Garcia Arranz M, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. Expert Opin Biol Ther 2010;10(10):1453-68.
68. McCulloch C, Melcher A. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. Am J Anat 1983;167(1):43-58.
69. Jamal M, Chogle S, Goodis H, Karam SM. Dental stem cells and their potential role in regenerative medicine. Hamdan Med J 2011;4(2):53-61.
70. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. Cell Tissue Res 2013;353(1):65-78.
71. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng 2006;12(10):2813-23.
72. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT-J. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod 2008;34(2):166-71.

73. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci 2003;100(10):5807-12.
74. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. Differentiation 2008;76(5):495-505.
75. Yalvaç ME, Yilmaz A, Mercan D, Aydin S, Dogan A, Arslan A, Demir Z, Salafutdinov II, Shafigullina AK, Sahin F. Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. Neurochem. Res 2011;36(12):2227-35.
76. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res 2005;20(3):399-409.
77. Pekovits K, Kröpfl JM, Stelzer I, Payer M, Hutter H, Dohr G. Human mesenchymal progenitor cells derived from alveolar bone and human bone marrow stromal cells: a comparative study. Histochem Cell Biol 2013;140(6):611-21.
78. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. J Cell Physiol 2011;226(3):832-42.
79. Vázquez A, Fernández-Sevilla LM, Jiménez E, Pérez-Cabrera D, Yañez R, Subiza JL, Varas A, Valencia J, Vicente A. Involvement of mesenchymal stem cells in oral mucosal bacterial immunotherapy. Front Immunol 2020;11567391.
80. Venkatesh D, Kumar KM, Alur JB. Gingival mesenchymal stem cells. J Oral Maxillofac Pathol 2017;21(2):296-98.

81. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. J Immunol 2009;183(12):7787-98.
82. Grawish ME. Gingival-derived mesenchymal stem cells: an endless resource for regenerative dentistry. World J Stem Cells 2018;10(9):116.
83. Santamaría S, Sanchez N, Sanz M, Garcia-Sanz JA. Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies. Clin Oral Investig 2017;21(4):1095-102.
84. Zhao J, Wang J, Dang J, Zhu W, Chen Y, Zhang X, Xie J, Hu B, Huang F, Sun B. A preclinical study—systemic evaluation of safety on mesenchymal stem cells derived from human gingiva tissue. Stem Cell Res Ther 2019;10(1):165.
85. Bekić M, Radanović M, Đokić J, Tomić S, Eraković M, Radojević D, Duka M, Marković D, Marković M, Ismaili B. Mesenchymal stromal cells from healthy and Inflamed Human Gingiva Respond differently to Porphyromonas gingivalis. Int J Mol Sci 2022;23(7):3510.
86. Qiu J, Wang X, Zhou H, Zhang C, Wang Y, Huang J, Liu M, Yang P, Song A. Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: a comparative study in rats. Stem Cell Res Ther 2020;11(1):42.
87. Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Hermanns MI, Peters K, Unger RE. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. Biomater 2007;28(34):5193-98.

88. Bhatia S, Naved T, Sardana S. Introduction to animal tissue culture science. Introduction to pharmaceutical biotechnology. 1nd ed. India: College of Pharmacy; 2019;31-30.
89. Arora M. Cell culture media: a review. Mater methods 2013;3(175):24.
90. Verma A, Verma M, Singh A. Animal tissue culture principles and applications. Animal biotechnology, Elsevier, 2020: 269-93.
91. Honegger P. Overview of cell and tissue culture techniques. Current protocols in pharmacology 1999;4(1):12.1. 1-12.1. 12.
92. Du L, Yang P, Ge S. Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. J Dent Sci 2016;11(3):304-14.
93. Jin SH, Lee JE, Yun J-H, Kim I, Ko Y, Park JB. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. J Periodontal Res 2015;50(4):461-67.
94. Kim D, Lee AE, Xu Q, Zhang Q, Le AD. Gingiva-derived mesenchymal stem cells: potential application in tissue engineering and regenerative medicine-a comprehensive review. Front Immuno 2021;12667221.
95. Di Domenico G, Del Vecchio L, Postiglione L, Ramaglia L. Immunophenotypic analysis of human gingival fibroblasts and its regulation by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). Minerva Stomatol 2003;52(3):81-7, 87.
96. Garna DF, Hughes FJ, Ghuman MS. Regulation of gingival fibroblast phenotype by periodontal ligament cells in vitro. J Periodontal Res 2022;57(2):402-11.

97. Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, Porntaveetus T, Osathanon T. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. BMC Oral Health 2021;21(1):209.
98. Duman BO, Sariboyaci AE, Karaoz E. Bio-engineering of 3-D cell sheets for diabetic rats: Interaction between mesenchymal stem cells and beta cells in functional islet regeneration system. Tissue Cell 2022;79101919.
99. Sariboyaci A, Uysal O, Gunes S. Differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into functional pancreatic beta cells. Medicine 2021;10(3):951-8.
100. Ehrenfest DMD, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte M-P, Charrier J-B. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108(3):341-52.
101. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2015;103(4):825-31.
102. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. Cell viability assays: methods and protocols 2017;1-17.
103. Rodríguez-Lozano FJ, López-García S, García-Bernal D, Sanz J, Lozano A, Pecci-Lloret M, Melo M, López-Ginés C, Forner L. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. Clin Oral Investig 2021;255009-24.

104. Kargarpour Z, Nasirzade J, Panahipour L, Miron RJ, Gruber R. Platelet-rich fibrin decreases the inflammatory response of mesenchymal cells. Int J Mol Sci 2021;22(21):11333.

105. Yang H, Gao L-N, An Y, Hu C-H, Jin F, Zhou J, Jin Y, Chen F-M. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. Biomater 2013;34(29):7033-47.

106. Bucur M, Constantin C, Neagu M, Zurac S, Dinca O, Vladan C, Cioplea M, Popp C, Nichita L, Ionescu E. Alveolar blood clots and platelet-rich fibrin induce in vitro fibroblast proliferation and migration. Exp Ther Med 2019;17(2):982-89.

107. Heydari MB, Ghanbari-Movahed Z, Heydari M, Farzaei MH. In vitro study of the mesenchymal stem cells-conditional media role in skin wound healing process: A systematic review. Int Wound J 2022;19(8):2210-23.

108. Shani S, Ahmad RE, Vasudevaraj Naveen S, Murali MR, Puvanan K, Abbas AA, Kamarul T. Platelet rich concentrate promotes early cellular proliferation and multiple lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro. Sci World J 2014;2014(1):845293.

109. Kazemi D, Asenjan KS, Dehdilani N, Parsa H. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: Macroscopic and histological assessments. Bone Joint J 2017;6(2):98-107.

110. Honda H, Tamai N, Naka N, Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. J Artif Organs 2013;16305-15.

111. Choukroun J, Adda F, Schoeffer C, Vervelle A. PRF: an opportunity in perio-implantology. Implantodontie 2000;4255-62.

112. Choukroun J, Braccini F, Diss A, Giordano G, Doglioli P, Dohan D. Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: A new opportunity in facial lipostructure (Coleman's technique) and tympanoplasty? Rev. Laryngol. Otol. Rhinol 2007;128(1-2):27-32.
113. Ehrenfest DMD, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier J-B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. Arch Oral Biol;55(3):185-94.
114. Takahashi A, Tsujino T, Yamaguchi S, Isobe K, Watanabe T, Kitamura Y, Okuda K, Nakata K, Kawase T. Distribution of platelets, transforming growth factor-β1, platelet-derived growth factor-BB, vascular endothelial growth factor and matrix metalloprotease-9 in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factor matrices. J Investig Clin Dent 2019;10(4):e12458.
115. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, Zhang X, Wei Y, Chen Y, Mourão CFdAB. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. Clin Oral Investig 2020;241171-82.
116. Miron RJ. Understanding platelet-rich fibrin. (No Title) 2021.
117. Sun W, Li J, Zhong J, Feng J, Ye Z, Lin Y, Su W, Zhu S, Li Y, Jia W. Exploring the effect of hydroxyapatite nanoparticle shape on red blood cells and blood coagulation. Nanomed 2024;19(27):2301-14.
118. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2007;12(3):258-66.
119. Mamajiwala AS, Sethi KS, Raut CP, Karde PA, Mangle NM. Impact of different platelet-rich fibrin (PRF) procurement methods on the platelet count, antimicrobial

efficacy, and fibrin network pattern in different age groups: an in vitro study. Clin Oral Investig 2020;24(5):1663-75.

120. Knol HM, Kemperman RF, Kluin-Nelemans HC, Mulder AB, Meijer K. Haemostatic variables during normal menstrual cycle. Thromb Haemost 2012;107(01):22-29.

121. A Zumstein M, Berger S, Schober M, Boileau P, W Nyffeler R, Horn M, A Dahinden C. Leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) for long-term delivery of growth factor in rotator cuff repair: review, preliminary results and future directions. Curr Pharm Biotechnol 2012;13(7):1196-206.

122. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orlowska A, Dias A, Booms P, Dohle E, Sader R, Kirkpatrick C. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). Eur J Trauma Emerg Surg 2019;45467-79.

123. Zwittnig K, Kirnbauer B, Jakse N, Schlenke P, Mischak I, Ghanaati S, Al-Maawi S, Végh D, Payer M, Zrnc TA. Growth factor release within liquid and solid PRF. J Clin Med 2022;11(17):5070.

124. Tsai C-H, Shen S-Y, Zhao J-H, Chang Y-C. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. J Dent Sci 2009;4(3):130-35.

125. Baygın M, Çakiris A, Yabacı Tak A, Abacı N, Ekmekçi SS, Gürkan Köseoğlu B. In vitro comparison of the effects of titanium-prepared platelet-rich fibrin and leukocyte platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and their gen expression. BMC Oral Health 2024;24(1):1552.

126. Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, Esfahrood ZR. Effects of plasma rich in growth factors and platelet-rich fibrin on proliferation and viability of human gingival fibroblasts. J Dent (Tehran) 2015;12(7):504.

127. Italiano Jr JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. Blood, J Am Soc Hematol 2008;111(3):1227-33.

128. Shi Z, Huang X, Cai Y, Tang R, Yang D. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. Acta Biomater 2009;5(1):338-45.

129. Zandi M, Mirzadeh H, Mayer C, Urch H, Eslaminejad MB, Bagheri F, Mivehchi H. Biocompatibility evaluation of nano-rod hydroxyapatite/gelatin coated with nano-HAp as a novel scaffold using mesenchymal stem cells. J Biomed Mater Res A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials 2010;92(4):1244-55.

130. Kargarpour Z, Nasirzade J, Di Summa F, Panahipour L, Miron RJ, Gruber R. Platelet-rich fibrin can neutralize hydrogen peroxide-induced cell death in gingival fibroblasts. Antioxidants 2020;9(6):560.

131. Verboket R, Herrera-Vizcaíno C, Thorwart K, Booms P, Bellen M, Al-Maawi S, Sader R, Marzi I, Henrich D, Ghanaati S. Influence of concentration and preparation of platelet rich fibrin on human bone marrow mononuclear cells (in vitro). Platelets 2019;30(7):861-70.

132. Sadeghian M, Hashemibeni B, Mardani M, Amirpoor N, Aliakbari M. Comparing the effect of platelet rich plasma (PRP) and fetal bovine serum (FBS) on proliferation

and survival of adipose-derived stem cells in fibrin scaffolds. J Isfahan Med Sch 2015;32(317):2299-311.

133. Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. J Tissue Eng Regen Med 2008;2(4):184-89.

134. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su C-H, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108(1):56-61.

135. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108(5):707-13.

136. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, Nally M, Lanata N, Wang H-L, Quirynen M. 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):171-84.

137. Saeed MA, Abd El-Rahman M, Helal ME, Zaher AR, Grawish ME. Efficacy of human platelet rich fibrin exudate vs fetal bovine serum on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. Int J Stem Cells 2017;10(1):38.

138. Turner PA, Thiele JS, Stegemann JP. Growth factor sequestration and enzyme-mediated release from genipin-crosslinked gelatin microspheres. J Biomater Sci Polym Ed 2017;28(16):1826-46.

139. Buie T, McCune J, Cosgriff-Hernandez E. Gelatin matrices for growth factor sequestration. Trends Biotechnol 2020;38(5):546-57.

140. Ravi S, Santhanakrishnan M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF-an in vitro study. Biomater Res 2020;24(1):16.
141. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. Growth Factors 2009;27(1):63-69.
142. Wang Z, Mudalal M, Sun Y, Liu Y, Wang J, Wang Y, Sun X, Zhou Y. The effects of leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF) on suppression of the expressions of the pro-inflammatory cytokines, and proliferation of Schwann cell, and neurotrophic factors. Sci Rep 2020;10(1):2421.
143. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. Clin Orthop Relat Res 2015;473(5):1635-43.
144. Baca-Gonzalez L, Serrano Zamora R, Rancan L, González Fernández-Tresguerres F, Fernández-Tresguerres I, López-Pintor RM, López-Quiles J, Leco I, Torres J. Plasma rich in growth factors (PRGF) and leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF): comparative release of growth factors and biological effect on osteoblasts. Int J Implant Dent 2022;8(1):39.
145. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of wound healing. Curr Dermatol Rep 2018;7(4):350-58.
146. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. J Periodontol 2017;88(1):112-21.

147. Pitzurra L, Jansen ID, de Vries TJ, Hoogenkamp MA, Loos BG. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. J Periodontal Res 2020;55(2):287-95.

148. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. Trends Biotechnol 2006;24(5):227-34.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	İzzet Melih GÜRKAN
Akademik unvan/pozisyon	Araştırma Görevlisi
Görev yeri	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Periodontoloji AD
Telefon numarası	
E-posta adresi	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yıl	**Bölüm**	**Kurum**	**Derece**
2018	Diş Hekimliği	Bülent Ecevit Üniversitesi	Lisans

İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Tarih Aralığı	**Kurum**	**Görev**
2021-2022	AFSÜ Diş Hekimliği Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2022-	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	Araştırma Görevlisi

EK-2. ETİK KURUL ONAYI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	***"Hidroksiapatit Trombositten Zengin Fibrinin (HA-TZF) Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkililiğinin Değerlendirilmesi"***
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**
	AÇIK ADRESİ:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Eskişehir
	TELEFON	0 222 239 29 79 – Dahili: 4690
	FAKS	-
	E-POSTA	etikkurul@tm.ogu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Hakan ÖZEMİR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Diş Hekimliği Fakültesi,			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ / Diş Hekimliği Fakültesi,			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	TÜSEB-ESOGÜ BAP			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
		Diğer ise belirtiniz: Gözlemsel ex-vivo araştırma-Uzmanlık Tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	***"Hidroksiapatit Trombositten Zengin Fibrinin (HA-TZF) Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkililiğinin Değerlendirilmesi"***
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19.07.2023	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	30.07.2023	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	19.07.2023	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	19.07.2023 imza tarihli Bütçe Formu
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☒	1. İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi ve Pediatrik Popülasyonda Yürütülen Klinik Araştırmalarda Etik Yaklaşımlara İlişkin Kılavuzdaki tüm hususlara uyulacağına dair Taahhütname 2. Araştırma sırasında gönüllüye veya SGK'ya ek yük getirecek hiçbir işlem uygulanmayacağına dair Taahhütname 3. Araştırmanın daha önce başka bir Etik Kurulda değerlendirmeye sunulup sunulmadığı ve Etik Kurul onayı almaksızın çalışmaya başlanmayacağı ile ilgili Taahhütname 4. Literatürler 5. Araştırmaya dahil edilen araştırma merkezleri ve araştırma ekibinde yer alacak araştırmacılar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı Doç.Dr.Hakan ÖZEMİR, Doç.Dr. Seçil Çalışkan, Dr. Bahar DEMİR CEVİZLİDERE, Arş.Gör.Dt.İzzet Melih GÜRKAN 6. Özgeçmiş Formları

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 46**	**Tarih: 21.09.2023**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	***"Hidroksiapatit Trombositten Zengin Fibrinin (HA-TZF) Gingiva Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkililiğinin Değerlendirilmesi"***
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM**

Unvanı/Adı/Soyadı	**Uzmanlık Alanı**	**Kurumu**	**Cinsiyet**		**Araştırma ile ilişki**		**Katılım ***		**İmza**
Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM	Göğüs Hastalıkları	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof.Dr.Nurdan ACAR	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Acil Tıp AD	E ☐	K ☒	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Nilüfer DEMİRSOY	Tıp Tarihi ve Etik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof.Dr.Özge AYDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları / Neonatoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. AD / Neonatoloji BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-
Doç.Dr.Pınar YILDIZ	İç Hastalıkları	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Semra YİĞİTASLAN	Farmakoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Seçkin TUNCER	Biyofizik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Mustafa Emin ÇANAKÇI	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Acil Tıp AD	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☐	H ☒	-
Doç.Dr.Ömür DERECİ	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	Eskişehir Osmangazi Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cer. AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Erol ŞENER	Analitik Kimya	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-
Dr.Öğr.Üy.Gürkan BOZAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Dr.Öğr.Üy.Nazmiye ÖZENBAŞ BOYDAĞ	Hukuk	Anadolu Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Dr.Öğr.Üy.Muzaffer BİLGİN	Biyoistatistik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Av. Berçem ÇELİK	Hukuk	Avukat	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK-3. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

T.C

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Versiyon Tarihi:30/07/2023

Versiyon Numarası:01

Sayın Hastamız,

1- Bu çalışma bir araştırmadır.

2- Bu araştırmanın amacı cam, titanyum tüplerde oluşturulan Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ile titanyum kaplı cam tüplerden elde edilen Hidroksi Apatit- Trombositten Zengin Fibrin'nin (HA-TZF) gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin ve yara iyileşmesindeki etkinliklerinin değerlendirilmesidir.

3- Kullanılmış olan bu materyaller sizden alınacak 10 cc. kan ile elde edilen TZF (Trombositten Zengin Fibrin) ürünüdür. TZF, kemik rejenerasyonunu ve yumuşak dokunun olgunlaşmasını sağlayan çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü içerir. PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor), TGFβ-1(Transforming Growth Factor β-1), VEGF'ler (Vasculer Endothelial Growth Factor) trombositlerde yoğun olarak bulunurlar. Bu büyüme faktörleri hücre çoğalmasını, matriksin yeniden oluşumunu ve damarlanmayı uyarma potansiyelindedirler. Bu süreçte öncelikle antekübital venden elde edilen kanlar zaman geçirmeden antikoagülan içermeyen tüplere konularak 2700 rpm. de 12 dk. masa santrifüjünde santrifüj edilecektir.

4- Santrifüj işleminden sonra elde edilen TZF steril metal kaba yerleştirilecektir. Her bir TZF hemogram değerlendirmesinde kullanılmak amacıyla 20 dk. serumunu salması için bekletilecektir. Daha sonra TZF pıhtıları metal kaplar üzerinde kompresör ve kapak ile kapatılarak kompres edilecek ve membran elde edilecektir. Elde edilen membranlar da hücresel sitotoksisite ve yara iyileşme üzerine etkinliği analiz edilecektir. Kullanılacak olan materyal sadece bu çalışma için kullanılacak ve artan materyal olursa imha edilecektir.

5- Araştırmaya katılımınız isteğe bağlı olup istediğiniz zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz.

6- İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoriteleri sizin araştırmaya konu olacak çalışma ile ilgili olarak tutulan kayıtlarınıza doğrudan erişebilir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır ve bu formu imzalayarak siz veya yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

7- İlgili mevzuat gereğince kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak kamuoyuna açıklanmayacak, araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

8- Araştırma konusuyla ilgili ve sizin araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde siz veya yasal temsilciniz zamanında bilgilendirileceksiniz.

9- Araştırma hakkında, kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmeyen olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmeniz için temasa geçebileceğiniz kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Arş.Gör.Dt. İzzet Melih GÜRKAN 05388322200

Doç Dr. Hakan ÖZDEMİR 05327870641

10- Gebelik/ emzirme dönemindeyseniz, sigara kullanımı veya diyabetiniz varsa mutlaka bu konuda doktorunuzu bilgilendiriniz. Bu durumlarda doktorunuz gerekli işlemleri yapacak ancak sizi çalışma dışında tutacaktır.

11- Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı yaklaşık 12 kişidir.

12- Biyolojik materyallerin analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESTEM) laboratuvarı yapılacaktır.

13- Açıklamaların bulunduğu yazılı metinde okuyarak anlamakta güçlük çektiğiniz hususların sözlü olarak açıklanması için mutlaka doktorunuza başvurunuz. Uygulanacak yöntemlerle ilgili olarak, anlamadığınız hiçbir noktanın kalmadığından emin olunuz.

14- Bu araştırmaya herhangi bir etki altında kalmadan gönüllü olarak katıldığınızın bilincinde olmalısınız. İstediğiniz takdirde araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Araştırmaya başladıktan sonra devam etmek istememe hakkınız vardır. Aynı şekilde, araştırmacılar da araştırma başlangıcından sonra rızanız olmadan sizi araştırma haricinde bırakabilirler.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

Adı Soyadı:

Cinsiyeti:

Doğum Yeri ve Tarihi:

Adres:

Telefon No (Ev): (İş): (GSM):