

# Trombositten Zengin Plazmanın Farklı Konsantrasyonlarının Üç Farklı Hücre Üzerine Etkisi - Yeni *in vitro* yara iyileşmesi modeli

## *Effects of Various Consantrations of Platelet-Rich Plasma on Three Different Cell Types - A new in-vitro wound healing model*

Fatih ARIKAN<sup>1</sup>

Sema BECERİK<sup>1</sup>

Şule SÖNMEZ<sup>1</sup>

İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN<sup>2</sup>

Ege Üniversitesi, <sup>1</sup>Dişhekimliği Fakültesi, Periodontoloji AD, <sup>2</sup>Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İZMİR

### Özet

**Amaç:** Trombositten zengin plazmanın (TZP) periodontal rejenerasyonda büyüme faktörü kaynağı olarak kullanılmasının iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, araştırma grubunca geliştirilen *in vitro* yara iyileşmesi modelinde trombin ve TZP'nin farklı konsantrasyonlarının gingival fibroblast (GF), periodontal ligament fibroblastı (PLF) ve osteoblastlar (OB) üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** PLF, GF ve OB hücre kültürlerinde 5 mm çapında bir yara oluşturuldu. Hücre kuyuları beş gruba bölündü. Kontrol grubunda sadece Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) kullanılırken, test gruplarında 1/3 veya 1/2 trombinli %0,5 TZP ve 1/3 veya 1/2 trombinli %0,1 TZP uygulandı. Çalışmanın 2., 5., 7., 9. ve 11. günlerinde her gruptaki hücreler hematoksilien eozin ile boyandı. Her bir zaman aralığında dijital tarama yapıldı ve sonuçlar yüzey alanının yüzdesi olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Diğer gruplarla karşılaştırıldığında 1/3 trombinli %0,1 TZP grubunda oluşturulan yara yüzeyi, hücreler tarafından daha kısa sürede kapatıldı. GF'lerin büyüme faktörüne yanıtı PLF yanıtından daha iyi bulundu. OB'lerin tüm konsantrasyonlarda kontrol grubundan ve diğer hücre gruplarından daha az artış gösterdikleri saptandı.

**Sonuç:** TZP periodontal hastalıklarda hasarlı bölgelerde yara iyileşmesini etkili bir şekilde destekleyebilir. Geliştirilmiş olan yara modeli gelecekte periodontal yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılabilir.

**Anahtar sözcükler:** Periodontal rejenerasyon, yara iyileşme modeli, TZP

### Abstract

**Aim:** The use of platelet-rich plasma (PRP) as a source of growth factors is reported to be beneficial for periodontal regeneration. The aim of this study was to evaluate the effects of different PRP and thrombin concentrations on gingival fibroblasts (GF), periodontal ligament fibroblasts (PLF) and osteoblasts (OB) in an *in vitro* wound model designed by the research group.

**Materials and Methods:** A wound with a diameter of 5 mm has been performed on PLF, GF and OB cell cultures. The cell wells were divided into five groups. The control group received only Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), where the test groups received 0.5% PRP with 1/3 or 1/2 thrombin or 0.1% PRP with 1/3 or 1/2 thrombin. The cells in each group were stained with hematoxylin-eosine on days 2, 5, 7, 9 and 11. Digital screenings were performed on each time point and the results were interpreted by means of % surface area.

**Results:** PLF and GF cells covered the wound area earlier in the 0.1% PRP with 1/3 thrombin when compared with other groups and GF response was better than PLF. OB group showed less proliferation than the control and the other cell groups at any concentration.

**Conclusions:** PRP might effectively promote wound healing at sites of injury in periodontal disease. The developed wound model may be utilized in future investigations of periodontal wound healing.

**Keywords:** Periodontal regeneration; wound healing model; PRP

### Giriş

Periodontitis diş destek dokularında yıkıma yol açan kronik enflamatuvar bir hastalıktır.

Periodontal hastalık sonucu kaybolan dokuların önceden tahmin edilebilir şekilde rejenerasyonu periodontal tedavinin hedeflerinden biridir.

Periodontal rejenerasyonu sağlamak için kullanılan yöntemler; kök yüzeyinin demineralizasyonu,<sup>1</sup> yönlendirilmiş doku rejenerasyonu membranlarının kullanılması<sup>2</sup> ve inert osteokondüktif/osteoinduktif materyallerin uygulanmasıdır.<sup>3</sup> Son yıllarda, otolog TZP'nin periodontal rejenerasyon sağlaması amacıyla kullanımı yaygınlaşmıştır.<sup>4-6</sup>

Yara iyileşmesi süreci dört ayrı ancak birbiriyle örtüşen fazla karakterize olan karmaşık bir süreçtir: hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon.<sup>7</sup> Proliferatif faz, endotel hücreleri tarafından kan damarlarının oluşumunu ve osteoblastlar tarafından kemik sentezini içermektedir. Tüm bu olaylar hücre-hücre etkileşimleri ve çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan çözünabilir büyüme faktörlerince koordine edilirler.<sup>8</sup> Literatürde trombositlerin, trombosit kökenli büyüme faktörlerini (PDGF), ensülin-benzeri büyüme faktörünü (IGF) ve transforme eden büyüme faktörü  $\beta$ 'yi (TGF- $\beta$ ) salgıladığı ve rejenerasyonu hızlandırarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğu dair kanıtlar bulunmaktadır.<sup>9</sup> TZP'nin terapötik etkinliği üzerine halen çeşitli araştırma grupları çalışmalar yapmaktadır. İnsan TZP preparatlarında PDGF ve TGF- $\beta$  yüksek seviyelerde yer alır ve hücrelerin proliferasyonunu hücre tipine spesifik tarzda modüle eder.<sup>10</sup> Kawase ve arkadaşları<sup>4</sup> TZP'nin çekirdek olarak mineralizasyonunu, PDL hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve kollagen üretimini stimüle ederek trombosit agregatlarının oluşumunu sağladıklarını açıklamışlardır. Bu etkilerinden faydalanılması ve bunun sonucunda periodontal doku rejenerasyonunu artırması amacıyla TZP periodontal defektlerde kullanılmaktadır. Ekonomik ve biyolojik sebeplerden dolayı, TZP hastaların kendi plazmalarından elde edilmektedir ve periodontal doku rejenerasyonunda büyüme faktörlerinin otolog kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak, halen TZP'nin PLF, GF ve OB hücrelerinin rejenerasyonu üzerindeki kantitatif etkisi ile ilgili mevcut bilgi sınırlıdır. TZP'nin periodontal hücreler üzerine etkilerine dair bir kanıt temin etmek için, bu çalışmada yeni bir *in vitro* yara iyileşmesi modeli geliştirilmiştir ve TZP'nin PLF,

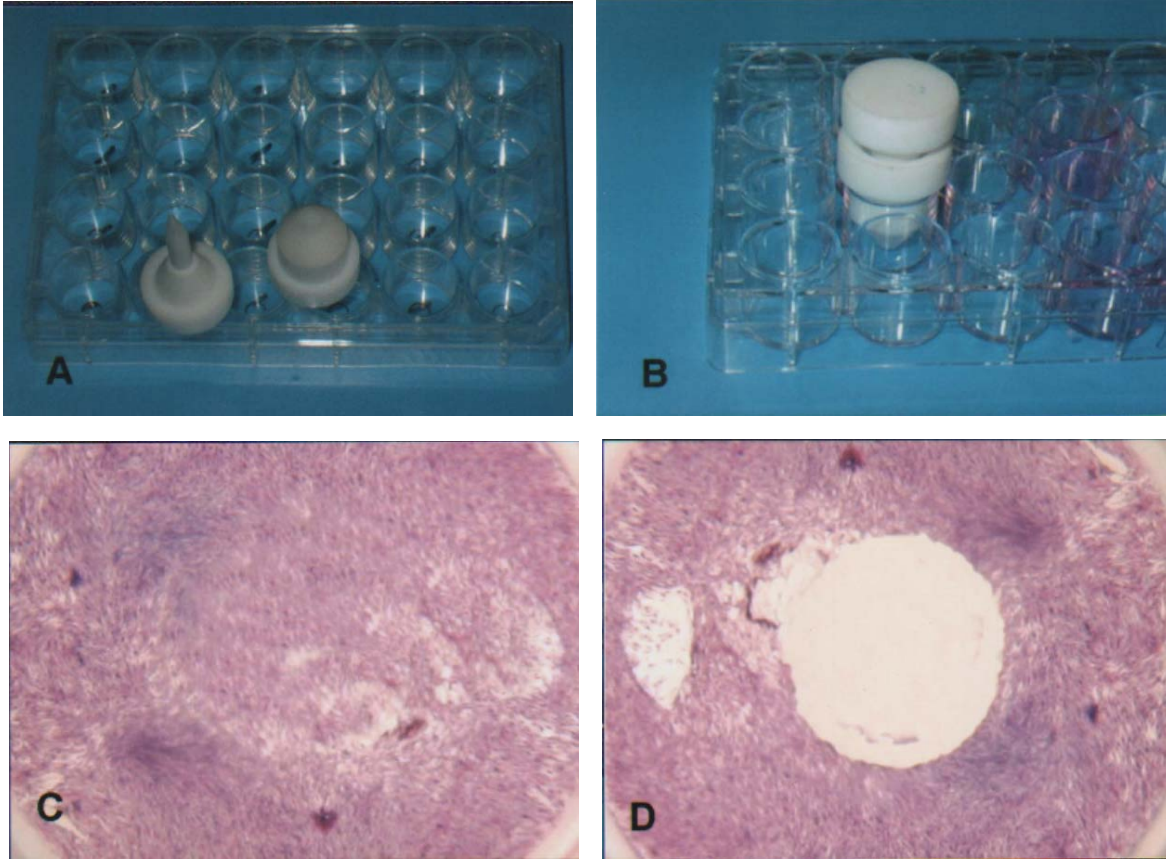
GF ve OB hücrelerinin *in vitro* yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Hücre Kültürü

İnsan PLF'leri Somerman ve arkadaşlarının<sup>11</sup> yöntemine göre sistemik ve periodontal olarak sağlıklı hastaların ortodontik amaçla çekilen sağlıklı premolar dişlerinden elde edildi. Hastalar çalışmanın doğası ve kapsamı hakkında tam olarak bilgilendirildiler ve Helsinki Bildirgesine göre hastaların yazılı onayları alındı. Dişler çekildikten sonra % 0,1 NaHCO<sub>3</sub>, 400 U/ml penisilin/400  $\mu$ g/ml streptomisin ve %0,5 amfoterisin B içeren DMEM/F-12 (Biochrom, Almanya) içine konuldular. Daha sonra steril koşullar altında, periodontal ligament dokusu bir bisturi ile diş köklerinin orta bir bölü üçlük kısımlarından toplandı ve 35 mm çapındaki kültür kaplarına transfer edildi. Kültür kaplarına %20 fötal sığır serumu (FBS) (Biochrom, Almanya), %0,1 NaHCO<sub>3</sub>, 400 U/ml penisilin/400  $\mu$ g/ml streptomisin ve %0,5 amfoterisin B içeren DMEM/F-12 vasatı eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de bekletildi. İki günde bir hücrelerin ortamı değiştirildi ve hücrelerin kültür kabını kaplamasını takiben hücreler pasajlandı. Çalışmada 6. pasaj hücreleri kullanıldı.

İnsan GF'leri ortodontik amaçla çekilen aynı sağlıklı premolar dişlere komşu papillalardan elde edildi. Dişlerin çekilmesini takiben papilla bir bisturi ile eksize edildi ve derhal %20 fötal sığır serumu (FBS) (Biochrom, Almanya), %0,1 NaHCO<sub>3</sub>, 400 U/ml penisilin/400  $\mu$ g/ml streptomisin ve %0,5 amfoterisin B içeren DMEM/F-12'ye yerleştirildi. Steril koşullar altında, gingival dokular 35 mm'lik kültür kaplarına transfer edildi, bir bisturi ile küçük parçalara ayrıldı ve %10 fötal sığır serumu (FBS) (Biochrom, Almanya), %0,1 NaHCO<sub>3</sub>, 400 U/ml penisilin/400  $\mu$ g/ml streptomisin ve %0,5 amfoterisin B içeren DMEM/F-12 vasatı eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de bekletildi. İki günde bir hücrelerin ortamı değiştirildi ve hücrelerin kültür kabını kaplamasını takiben hücreler pasajlandı. Çalışmada 6. pasaj hücreleri kullanıldı.



Şekil 1.

A. Teflondan yapılan hücre kazıyıcı (I) Ana gövde (II) Aktif taşıyıcı parça  
C. Hücre kazıyıcı uygulanmamış hücre kültürü (X10)

B. Hücre kazıyıcı apareyin uygulanması.  
D. Hücre kazıyıcı uygulandıktan sonra yaranın görünümü (X10)

Deneylerde OB hücreleri olarak osteojenik sarkoma hücreleri olan Saos-2 (HTB-85, ATCC, USA) hücre hattı kullanıldı.

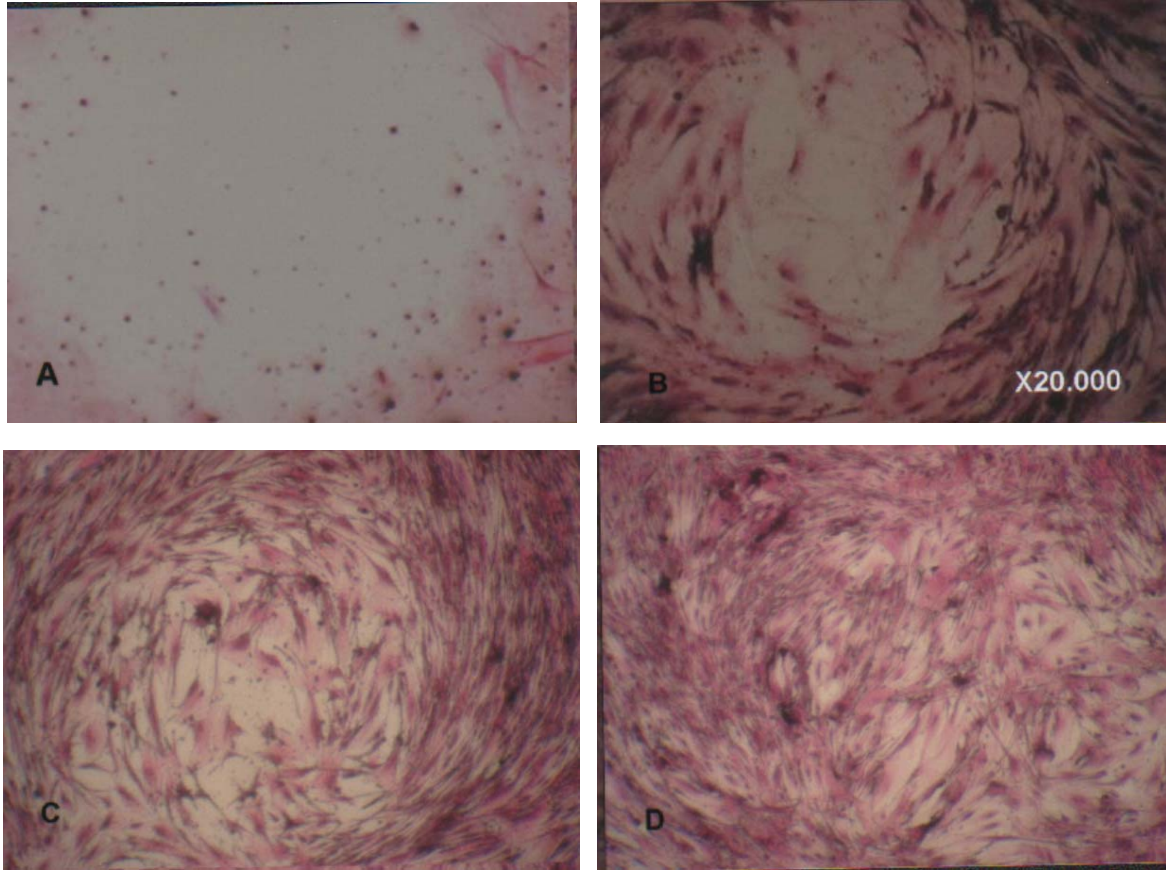
#### *In Vitro Yara Protokolü*

Standart yara modeli hazırlamak için, mililitre-sinde  $10^5$  PLF, GF veya OB içeren 2 ml'lik vasat standart 24 gözlü kültür kaplarının 10 gözü içerisine konuldu ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de 24 saat enkübe edildi. Enkübasyon sonrasında PFL, GF veya OB hücreleri kültür kabının yüzeyine tutundu ve kapladı. Bu hücre tabakasında standart yara meydana getirilmesi amacıyla çalışma grubu tarafından geliştirilmiş olan teflon bir araç kullanıldı. Yarayı hazırlamak için önce aracın ana kısmı (Şekil 1a) 24 gözlü kültür

kabının kuyularından birine yerleştirildi. Daha sonra aracın aktif kısmı (Şekil 1a) ana kısım vasıtasıyla yerleştirilip hücresel ve hücre dışı materyali dağıtmak ve birbirinden ayırmak için kabın yüzeyi süpürülerek bir kaç kez saat yönünde döndürüldü (Şekil 1b). Yara yüzeyi oluşturulan göz daha sonra PBS ile üç kez yıkanarak yüzeyden kaldırılan hücreler uzaklaştırıldı (Şekil 1c ve 1d). 24 gözlü kültür kabının 10 gözünde oluşturulan 5 mm çapında merkeze yerleşmiş olan yaralar faz-kontrast mikroskopta (Olympus CK, Japonya) incelendi.

#### *TZP Hazırlanması*

TZP basit bir protokol izlenerek hazırlandı. Venöz kan örnekleri sağlıklı gönüllüden çekildi.



**Şekil 2.** %0,1 TZP 1/3 trombosit konsantrasyonunda 2., 5., 7. ve 9. günlerde PDL hücrelerinin örnekleri

Otolog trombosit konsantreleri SmartPREP®2 (APC-20i) (Harvest Technologies Corporation, MA, ABD) ile ve ilgili araç ile hazırlandı ve trombin desteği için otoloji trombin kiti kullanıldı (Hat Kit; Harvest Technologies Corporation, MA, ABD). Bahsi geçen prosedürler imalatçının talimatları doğrultusunda uygulandı.<sup>12</sup> Toplanan TZP %0,5 ila %0,1 oranında ortama eklendi ve 37° C'de 30 dakika süresince enkübe edildi. FBS varlığı trombosit agregasyonuna ve degranülasyonuna imkan tanıdı. Otolog trombin kitinden (Hat Kit) elde edilen trombin, kullanılan vasata TZP'nin 1/2'si veya 1/3'ü oranlarında eklendi. Hazırlanmış olan solüsyon test gruplarına uygulandı. Hücre kuyuları beş gruba bölündü. Kontrol grubuna sadece DMEM uygulanırken, test gruplarına sırasıyla 1/3 trombinli

%0,5 TZP; 1/3 trombinli % 0,1 TZP, 1/2 trombinli %0,5 TZP ve 1/2 trombinli %0,1 TZP uygulandı. İki günde bir vasatı değiştirilen hücreler %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de bekletildi. Tüm gruplardaki hücreler hematoksilen eozin ile 2., 5., 7., 9. ve 11. deney günlerinde boyandılar (Şekil 2). Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı.

#### *Yara Repopülasyonunun Değerlendirilmesi*

Dijital taramalar her bir zaman aralığında uygulandı ve dijital ortamda her bir yara çemberi üzerine 304 eşit kareden oluşan bir ızgara yerleştirildi. Hücreler tarafından kaplanan her bir kareye 1'den 4'e kadar skorlar verildi. Karenin %25'i hücreler tarafından kaplıysa skor 1, %50'si kaplıysa skor 2, %75'i kaplıysa skor 3

ve %100'ü kaplıysa skor 4 değeri verildi. Yara alanı tamamen kaplandığında, skor 1216 olarak kaydedildi. Tüm örnek resimler bir kodla temsil edildi ve çalışma gruplarının üç bağımsız gözlemcisi tarafından kör değerlendirilmeler uygulandı. Bulgular % yüzey alanları olarak yorumlandı.

### İstatistiksel Analiz

Bulgular ortalama (M) ± standart sapma (SD) olarak verildi. Üç gözlemci arasındaki harmoniyi analiz etmek için Pearson korelasyon analiz uygulandı. Sayılmış olan hücreler log 10 dönüşümü sonrası analiz edildi. Çift faktörlü tekrarlayan ANOVA ölçümü çeşitli konsantrasyonların farklı zaman aralıklarındaki hücre sayıları

üzerine etkisini değerlendirmek üzere uygulandı.

Konsantrasyonlar ve zaman aralıkları arasında anlamlı etkileşim bulundu. Bu yüzden, tüm zaman aralıklarındaki her konsantrasyon ANOVA tek faktörlü tekrarlayan ölçütleri ile değerlendirildi.

Dunnet-C testi spesifik zaman aralıklarında anlamlı bir farkın bulunduğu konsantrasyonları karşılaştırmak amacıyla kullanıldı. Fark p değerinin 0,05'den küçük olduğunda anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Farklı gruplardaki PLF, GF ve OB'lerin yara bölgesini kaplama yüzdeleri ortalama (M) ±

**Tablo 1.** Tüm konsantrasyonların ve tüm günlerin ortalama ve standart sapmaları

		2. gün (%) M ± SD	5. gün (%) M ± SD	7. gün (%) M ± SD	9. gün (%) M ± SD	11. gün (%) M ± SD
PLF	%0,1 TZP 1/3 trombin	1,10 ± 2,27	17,68 ± 3,63 <sup>1,2</sup>	45,29 ± 19,70 <sup>1</sup>	82,99 ± 38,03 <sup>1,2,3</sup>	85,80 ± 34,79 <sup>1,3</sup>
	%0,1 TZP ½ trombin	6,45 ± 2,55	18,51 ± 25,43	22,43 ± 27,34 <sup>1,2</sup>	49,70 ± 27,94 <sup>1,2</sup>	78,89 ± 41,02 <sup>1</sup>
	%0,5 TZP 1/3 trombin	32,54 ± 20,67	34,08 ± 26,12	43,62 ± 39,73	25,47 ± 38,13 <sup>2</sup>	56,46 ± 49,08
	%0,5 TZP 1/2 trombin	11,23 ± 10,97	23,26 ± 11,13	22,09 ± 26,72	55,78 ± 45,53	26,88 ± 36,14
	Kontrol	2,06 ± 9,67	5,78 ± 1,56 <sup>1</sup>	23,56 ± 33,57	14,32 ± 17,05 <sup>2</sup>	60,78 ± 46,85
	%0,1 TZP 1/3 trombin	35,24 ± 1,45	62,56 ± 3,37 <sup>1,2</sup>	71,35 ± 43,05 <sup>1,2</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>1,2,3</sup>	75,45 ± 38,45 <sup>1</sup>
GF	%0,1 TZP 1/2 trombin	7,29 ± 3,86	72,56 ± 29,46 <sup>1,3</sup>	71,33 ± 45,89 <sup>1</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>1,2,3</sup>	69,66 ± 44,69 <sup>1</sup>
	%0,5 TZP 1/3 trombin	13,67 ± 9,89	61,56 ± 27,66	63,78 ± 29,73	64,37 ± 36,14	72,04 ± 38,97
	%0,5 TZP 1/2 trombin	13,69 ± 12,02	11,99 ± 5,49	41,87 ± 56,86	44,79 ± 54,46	68,86 ± 34,65
	Kontrol	34,78 ± 8,10	10,43 ± 2,89	47,19 ± 33,43	60,82 ± 40,46	62,96 ± 41,56
	%0,1 TZP 1/3 trombin	4,52 ± 2,31	6,11 ± 4,56	11,39 ± 6,82	42,96 ± 78,43	81,93 ± 40,29
	%0,1 TZP 1/2 trombin	4,95 ± 3,89	9,38 ± 29,46	12,46 ± 5,13	35,73 ± 42,63	71,69 ± 44,69
OB	%0,5 TZP 1/3 trombin	3,62 ± 9,36	60,28 ± 27,97	9,69 ± 7,23	53,37 ± 36,14	72,04 ± 38,97
	%0,5 TZP 1/2 trombin	13,69 ± 12,02	11,99 ± 5,49	27,98 ± 33,7	32,34 ± 39,46	78,00 ± 0,00
	Kontrol	2,54 ± 8,02	10,43 ± 2,89	37,13 ± 12,9	54,83 ± 40,46	89,00 ± 17,8

<sup>1</sup> Aynı grupta konsantrasyonların 2. günle arasındaki farkları göstermektedir (p<0,05).

<sup>2</sup> Aynı konsantrasyonlarda hücre grupları arası farkları göstermektedir (p<0,05).

<sup>3</sup> Aynı hücre grubunda konsantrasyonlar arasındaki farkları göstermektedir (p<0,05).

standart sapma (SD) olarak günlere göre Tablo 1'de sunuldu. Resim 2'de PLF'lerin 2., 5., 7. ve 9. günlerde %0,1-1/3 trombin konsantrasyonlarında yara kaplaması gösterilmektedir. PLF ve GF grubunda günler ve konsantrasyonlar arasındaki etkileşim anlamlıydı ( $p < 0,05$ ). Bu nedenle her grubun gruplar arası varyasyonu günlere göre analiz edildi. PLF %0,1 TZP-1/3 trombin grubunun 2'inci günde yara kapanması ile sırasıyla 5., 7., 9. ve 11. günleri arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Aynı anlamlı fark PLF %0,1 - 1/2 trombin grubunun 2'inci günü ile sırasıyla 7., 9. ve 11. günleri arasında da bulundu ( $p < 0,05$ ). GF grubunda, %0,1 TZP ve 1/2 trombin konsantrasyonunda ve %0,1 TZP ve 1/3 trombin konsantrasyonunda, 2'inci gün ile 5., 7., 9. ve 11. günler arasındaki yara kapanmasındaki fark anlamlıydı ( $p < 0,05$ ). Aynı zaman aralıklarında %0,5 TZP-1/3 trombin ve %0,5 TZP - 1/2 trombin konsantrasyonları arasında yara kapanma yüzdesindeki fark hem PLF, hem de GF'de anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

Dunnet-C test sonuçlarına göre, PLF'lerin ikinci günde % 0,1 TZP konsantrasyonu %0,5 TZP konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında yara kapatmada %0,1'lik TZP'nin daha etkin olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ). Bu bulgu PLF'lerin beşinci günü için de geçerlidir. GF yara kapanmasında bu bulgu beşinci güne kaymıştır. %0,1 TZP konsantrasyonu %0,5 TZP ile karşılaştırıldığında hücreler üzerinde daha pozitif bir etkiye sahiptirler. Ancak, zaman aralıklarına odaklanıldığı zaman, %0,1 TZP-1/3 trombin ile %0,1 TZP-1/2 trombin konsantrasyonlarının yara kapanmasında hem PLF, hem de GF'ler üzerinde etkin olduğu bulundu. %0,1-1/3 trombin ve %0,1-1/2 trombin konsantrasyonlarında, bahsi geçen zaman aralıklarında GF'nin PLF'ye göre daha iyi cevap verdiği görülmektedir. 1/3 trombin ile %0,1 TZP grubunun yara çemberini anlamlı bir farkla ( $p < 0,01$ ) kapattığı ve GF cevabının PLF ve beklenildiği gibi OB hücrelerinin cevabından daha iyi olduğu ortaya kondu ( $p < 0,01$ ).

OB grubunda günler ve konsantrasyonlar arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Tüm konsantrasyonlar kontrol grubuna göre daha

yavaş hücre artışına sebep oldu ve kontrol grubunda ancak 11.günde yara kapanması saptandı.

## Tartışma

Periodontal yara iyileşmesi çoklu hücrel ve moleküler etkileşimler vasıtasıyla düzenlenmektedir. Hücrel seviyede, PLF, GF ve OB'ler arasındaki proliferasyon oranlarını karşılaştırmış olan çok az çalışma mevcuttur. Lacker ve arkadaşları<sup>15</sup> yara iyileşmesi ile ilişkili hücrel olayları araştıran bir *in vitro* model geliştirmişlerdir. İnsan PLF ve GF kültürlerini kullanarak, 3 mm genişliğinde hücre bandı kaldırmışlar ve mekanik olarak *in vitro* yara oluşturmuşlardır. GF'nin geçerli olan yönlendirilmiş doku rejenerasyon (GTR) prensipleriyle tutarlı olacak şekilde PLF'ye göre daha hızlı oranlarda yara alanlarını doldurduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada Lacker ve arkadaşları'nın<sup>15</sup> yara modeli geliştirerek kantitatif yüzey kaplama analizinin tam olarak kontrol edilebildiği dairesel bir yara alanı oluşturulmuştur. *In vitro* yara gelişmesini takiben yaranın dolması, tüm göç etme ve proliferasyon etkilerinin bir ölçütü olarak göz önünde tutulduğunda GF'nin PLF'ye ve OB'ye göre yarayı daha hızlı oranlarda iyileştirdiği önceki çalışmalarla paralel olarak gösterilmiştir.<sup>12-14</sup>

TZP'nin PLF ve GF'ler üzerindeki etkisinin içerdiği fibrinojenin bu hücrelerce üretilen trombin tarafından parçalanması sonucu fibrine dönüşmesi yoluyla olduğu düşünülmektedir. Meydana gelen fibrin pıhtısı tip I kollagen sentezini yalnız başına veya TZP içinde bulunan PDGF, TGF- $\beta$  ile birlikte fibrinojene göre daha güçlü olarak stimüle eder. TZP'nin hücre sayısını artırma yetisine sahip olduğu ve eş zamanlı olarak ekstraselüler matris üretimini yükselttiği öne sürülmüştür.<sup>4</sup> Bu iki etkinin birleşiminin periodontal hasar bölgesinde, yara iyileşmesine olumlu katkılarının olabileceği öngörülmüştür.<sup>4,10,15</sup> Bir *in vitro* çalışmada, Kawase ve ark.'ları<sup>4</sup> fibrine dönüştürülmüş olan fibrinojenin TZP'de mevcut olan büyüme faktörleri ile kombinasyonunun hasarlı bölgede yara iyileşmesini

modele edebileceğini belirtmişlerdir. Okuda ve arkadaşları<sup>10</sup> hem PDGF-AB'nin, hem de TGF-β1'in TZP preparatlarında yüksek oranda olduğunu göstermişler ve hücre tipine spesifik etkilerin periodontal rejeneratif tedavi için yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Annunziata ve ark.'ları<sup>16</sup> TZP ile primer insan PLF'leri, GF'ler ve keratinositler arasındaki etkiyi araştırmışlar ve insan PLF proliferasyonunun güçlü stimülasyon, GF'lerinin büyüme oranlarında artış ve keratinosit proliferasyonunda göze çarpan bir azalma olduğunu vurgulamışlardır. Mevcut çalışmanın sonuçları bahsi geçen araştırmalarla paraleldir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TZP uygulanan gruplar tüm konsantrasyonlarda daha iyi bir yara kapanması sergilemişlerdir (p<0,05). Ayrıca geliştirilen yara modeli dört farklı TZP konsantrasyonunun yara kapanması üzerindeki kantitatif etkisini değerlendirme olanağı vermektedir.

Trombosit konsantreleri yara iyileştirme uygulamalarında potansiyel olarak yararlıdır, çünkü hem doku kabuğu olarak, hem de güçlü mitojenik ve kemotaktik büyüme faktörlerinin kaynağı olarak işlev görürler.<sup>5,17-19</sup> Ancak, TZP hazırlama yöntemi trombosit iyileşmesi ve aktivasyonunun farklı seviyeleri üzerine anlamlı etkiye sahiptir. Trombosit konsantrelerinin hazırlanması esnasındaki trombosit aktivasyonu erken agranül salımı ve toplama prosesi esnasında büyüme faktörleri kaybı ile sonuçlanabileceğini gösteren çalışmalar vardır.<sup>5,20</sup> Bu nedenle, TZP hazırlama yöntemi trombosit sayısı, trombosit aktivasyon oranları ve büyüme faktörü profilleri yönünden farklılıklara sebep olabilir. TZP içindeki trombosit sayısının kemik rejenerasyonu üzerine etkisini *in vivo* olarak analiz eden Weibrich ve arkadaşları<sup>21</sup> kullandıkları TZP konsantrasyonunun %10'dan daha az olduğunu bildirmişlerdir. Frèchette ve arkadaşları<sup>5</sup> %10'luk TZP kullanmışlar ve TZP büyüme faktörü içeriğini ve onun yara iyileşmesindeki rolünü araştırmışlardır. Mevcut çalışmada, kesin TZP konsantrasyonunu belirlemek için bir ön test uygulandı. %10 ve %5'lik konsantrasyonlarda PLF ve GF'lerin hayatta kalamayacağı saptandı. Bu durum kültür ortamının besinsel kaynaklarını PLF ve GF'ler ile paylaşan trombositler nedeniyle

olabilir. Bu çalışmada yapılan ön testlere göre, en yüksek TZP konsantrasyonları %0,1 ve %0,5 olarak belirlendi. SmartPreP® (Harvest Technologies Corporation, MA, ABD) üretici firması tarafından önerilen trombin konsantrasyonu %33'tür (1/3).<sup>12</sup> Bu çalışmada %33'lük trombinin yanısıra 1/2'lik konsantrasyon da kullanıldı, fakat 1/3 trombinin 1/2'den daha iyi etki gösterdiği bulundu. Ayrıca, yara kapanmasında %0,1 TZP, %0,5 TZP'den daha etkili bulundu.

Bu çalışmada OB hücreleri tüm trombosit konsantrasyonlarına kontrol grubundan daha az bir proliferasyonla cevap verdi. *In vitro* ortamda trombositlerin ortamdaki besin alması osteoblastları daha çok etkiliyor olabilir. Ancak hayvan çalışmalarında TZP'nin osteoblastlar üzerinde çok sınırlı veya hiç etkisinin olmadığını gösterilmiştir.<sup>22,23</sup> Osteoblastik aktiviteyi artırmak için farklı medyatörlerle TZP konsantrasyonunun kombinasyonunun daha etkili sonuçlar vermesi beklenebilir.

TZP'nin periodonsiyum hücreleri üzerindeki bildirilen *in vitro* etkileri trombositlerden salınan büyüme faktörleri için tarif edilenlere benzerlikler göstermektedir. Özellikle, PDGF ve TGF-β güçlü mitojenik ve anabolik faktörler olarak etki gösterirler ve ekstraselüler matris oluşumu kadar PLF proliferasyonunu belirgin olarak stimüle ederler<sup>21</sup>. TZP pıhtı oluşumu esnasında büyüme faktörleri, fibrin, fibrino-peptitler ve diğer aktif moleküllerden yüksek seviyede içerir.<sup>10,15,18</sup> Bu sebeple TZP'nin periodonsiyum hücrelerinin davranışını PDGF ve/veya TGF-β ile etkilediği düşünülebilir.<sup>10, 18</sup>

## Sonuç

Bu *in vitro* çalışmanın sınırları içinde, TZP periodontal hücreler üzerine hücre tipine bağlı olarak farklı biyolojik etkiler sergilemektedir. Osteoblastlar üzerinde olumlu etkisi saptanmazken, özellikle gingival fibroblastların çoğalmasını artırıcı etkisi periodontal rejenerasyonda yara iyileşmesini hızlandırması yönünden önemli olabilir. Ancak yumuşak doku iyileşmesinde etkinliğinin test edilmesi için yeni klinik çalışmalara gerek vardır.

## Kaynaklar

1. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47: 256-260.
2. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 494-503.
3. Bowers GM, Granet M, Stevens M, Emerson J, Corio R, Mellonig J. Histological evaluation of new attachment in humans. *J Periodontol* 1985; 56:381-396.
4. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Amizuka N, Suzuki H, Yoshie H. Platelet-rich plasma provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells in vitro. *Cell Dev Biol* 2005; 41: 171-176.
5. Fréchette JP, Martineau I, Gagan G. Platelet-rich plasmas: Growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005; 84: 434-439.
6. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-1508.
7. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci Pub* 2004; 4: 283-289.
8. Pierce GF, Vande BJ, Rudolf R, Tarpley J, Mustoe TA. Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glysoaminoglycans, collagen and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol* 1991; 138: 629-646.
9. 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 and Endod* 1998; 85: 638-646.
10. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74: 849-857.
11. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 19998; 67: 66-70.
12. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRPTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 233-239.
13. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an *in vitro* wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* 2000; 71: 226-237.
14. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* 1990; 61: 103-111.
15. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The *in vivo* effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 212-219.
16. Annunziata M, Olivia A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, Guida. *In vitro* cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *J Periodontol* 2005; 40: 489-495.
17. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-1299.
18. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 529-535.
19. Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 664-664h.
20. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current view. *Int J Oral Maxillofac Imp* 2003; 18: 93-103.
21. Weibrich G, Hansen T, Kleis R, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665-671.
22. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M; Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofacial Surg* 2007; 65: 721-727.
23. Rai B, Ho KH, LeiY et al. Polycaprolactone-20%tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma fort the treatment of critical-sized defects of the mandible: a pilot study. *J Oral Maxillofacial Surg* 2007; 65: 2195-2205.

Fatih ARIKAN  
Ege Üniversitesi,  
Dişhekimliği Fakültesi,  
Periodontoloji AD,  
35100 Bornova, İZMİR  
Faks : (232) 388 03 25  
E-posta : fatih.arikan@ege.edu.tr