

# **Trombositten Zengin Plazma (TZP)'nın Kondrosit Proliferasyonu Üzerine Etkisi Var Mı?**

## **ÖZET**

Geleneksel uygulanan trombositten zengin plazmanın elde edilmesinde kullanılan ticari kitlerin birçoğunda kolajen, trombin ve  $\text{CaCl}_2$  ile aktive edilmeden hazırlanan trombositler, herhangi bir ilaç taşıma sistemi olmaksızın doğrudan hastalara uygulanmaktadır. Yarı ömürleri çok kısa olan büyüme faktörlerinin, canlı dışına alındığında dakikalar içerisinde biyoetkinliği yok olarak ölmektedir. Dahası hangi lökosit konsantrasyonuna sahip trombositten zengin plazmanın kırıldak hasarlarında daha efektif olacağına yönelik kanıt değeri yüksek çalışma yok denecek kadar azdır. Bu yüzden bu araştırmada biyopolimerik hidrojel içerisine emdirilerek kullanılacak olan farklı lökosit konsantrasyonuna sahip trombositten zengin plazmanın; kondrosit proliferasyonu ve prekondrosit diferansiyasyon proteini olan stage spesifik embryonic antigen-1 (SSEA-1) üzerine, geleneksel klinik uygulanan PRP'den daha efektif olabileceğinin moleküler düzeyde gösterilebilmesi amaçlandı. Olguların osteokondral dokularından izolasyonla, standart primer insan kondrosit kültürleri hazırlandı. Osteokondral dokusu kullanılan her bir hastaya ait otolog kan örnekleri alınarak, lökosit içeriği farklı konsantrasyonlarda olan aktive edilmiş trombositten zengin plazmalar elde edildi. Kültürize kondrositleri içeren örnekler beş ana gruba ayrıldı. Moleküler düzeyde, sadece MTT-cell viability, toksisite, proliferasyon ve stage spesifik embryonic antigen-1 protein ifadeleri analizlenmedi aynı zamanda, enviromenting scanning electron ve inverted light mikroskopileri de değerlendirildi. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda, hem sağlıklı proliferasyona müsaade eden hem de SSEA-1 proteinin daha fazla ifade edildiği grubun, hidrojel içerisine düşük konsantrasyonda lökosit içeren TZP emdirilen örneklerin olduğu gözlemlendi ( $p=0.000$ ). SSEA-1 seviyesi ile hücre proliferasyonu arasında korelasyonun olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu

raporlandı ( $\rho=0.745$ ;  $p=0.000$ ). Kıkırdak hasarlarının tedavisinde geleneksel uygulanan TZP yerine, düşük konsantrasyonda lökosit içeren TZP emdirilen ilaç taşıyıcı matrikslerin kullanılmasının acilen *in vivo* deneysel metotlarla test edilmesinin önemi vurgulandı.

**Anahtar kelimeler:** Kondrosit proliferasyonu, ilaç taşıma sistemleri, primer kondrosit kültürasyonu, Platellet zengin plazma, stage spesifik embryonic antigen-1.

## GİRİŞ

Klinik ve toplumsal sorun olmaya devam eden osteoartrit (OA) gibi eklem kıkırdak hasarının onarılmasında, güncel farmakolojik ya da cerrahi tedavi modaliteleri, istenen düzeyde yüz güldürücü sonuçlar vermemiştir (1, 2, 3).

Farmasötik olmayan, normal iyileşme sürecinin lokal büyüme faktörlerinin ortama salınması ile gerçekleşmesine olanak tanıyan, homeostasis ve pıhtılaşmada önemli işlevlere sahip, trombositten zengin plazma (TZP) lokal enjeksiyonlar ile kıkırdak hasarlarında veya hasar sonrası meydana gelen ikincil OA'da tedavi amaçlı kullanılabilir (4, 5).

TZP, doku matriksinin sentezinde rol oynayan protein ve peptid yapıda birçok büyüme faktörlerini içermektedir (6). Kolajen, trombin,  $CaCl_2$  veya fotoaktivasyon gibi çeşitli yöntemler ile işlenen trombositler, aktive olduğu an itibari ile uygulandıkları ortama büyüme hormonları ve sitokinlerin salınımını sağlarlar. Bu sayede kolajen sentezinin artarak hasarlı dokuların iyileştirilmesinde etkin olduğu bildirilen TZP, tıbbın bütün alanlarında olduğu gibi ortopedik cerrahi alanında da lateral ve medial epikondilit, sırt, kalça, el, el bileği, diz, ayak ve ayak bileği'ne ait kas, tendon ve ligaman yaralanmalarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (6-13).

Günümüzde birçok farklı yöntem ve farklı içerik konsantrasyonları ile ya da farklı kullanıma hazır ticari kitler yardımı ile TZP'ler hazırlanmıştır. Ancak literatürde; farklı trombosit konsantrasyonu hazırlanan TZP'lerin, kıkırdak dokusu hücrelerine ait sağlıklı ve

efektif proliferasyonun araştırılmasına yönelik daha güncel ve derin bilgilere ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (13).

Literatürde; bunun dışında en az bu konu kadar önem taşıyan iki bilginin tam olarak aydınlatılabildiği araştırmaya rastlanmamıştır. Bunlardan ilki; TZP içeriğinde yer alan peptid yapılı büyüme faktörlerinin azami iki dakika gibi kısa yarı ömürlerine sahip oldukları, ve herhangi bir ilaç taşıyıcı matriks olmaksızın insan vücudu dışına alınan TZP içeriğindeki bu büyüme faktörlerinin, ne kadar biyoetkinlik gösterebileceğidir (11, 12, 14). İkincisi; TZP'nin uygulandığı an itibari ile kondrosit öncüsü hücrelerin diferansiyasyon ve/veya undiferansiyasyon belirteci olan SSEA-1 protein seviyesinin araştırılmadığıdır.

Bu anlamda bu araştırma literatürde bir ilk olup, hidrojel içerisine emdirilen farklı lökosit konsantrasyonlarına sahip TZP'nin, kondrosit proliferasyonu ve SSEA-1 protein seviyesinde, geleneksel olan TZP uygulamalarına üstünlük sağlayabileceği hipotezinin araştırılması amaçlandı.

## **MATERYAL VE METOT**

Bu proje İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul (10840098-296/24.11.2014) onayı ile gerçekleştirildi. Hastalardan, elde edilen osteokondral ve kan dokularının laboratuvarında deneysel amaçlı kullanılabilmesi için, bilinçlendirilmiş gönüllü olgu formları ile rızaları alındı.

Ölçümsel hataları minimuma indirmek adına benzer analizler aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirilirken, araştırmacılar gruplarda yer alan hidrojel ve TZP'nin elde edilmiş yöntemlerine karşı kördü. TZP'ler kapalı sistemler içerisinde ve hava kontaminasyonu olmaksızın hazırlandı. Deneyler altı kez tekrar edildi.

***Materyal:***

Kollajenaz Tip II enzim (1 mg/mL; Invitrogen Corporation), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS-1X, catalog # 14025, Gibco), penisilin-streptomisin (PS), fetal bovine serum (FBS), ve besi ortamı Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 1000 mg glucose/L) , Insulin-transferrin-selenious acid (ITS) Sigma Chemical, St. Louis, USA firmasından temin edildi. Ko-kültür oluşturulmasında kullanılan Transwell chamberlar (Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts CLS3422 SIGMA) firmasından alındı.

MTT analizi Vybrant MTT Cell Proliferation assay (cat# V-13154), Cell Biolabs Inc., USA kullanılarak gerçekleştirildi. Human prechondrocyte characterization kiti olan; SSEA-1 (Cat#K36094-21A) Cellprogen; Stem cells research & therapeutics, Gaffey Street Suite A&B San Pedro, CA 90731, USA'den temin edildi.

Kanların alındığı vacutainer tüpler BD marka olup Franklin Lakes, NJ, USA'den temin edildi. TZP elde edilmesi ve aktivasyonunda kullanılan kit Adi-Light 2 device (AdiStem Ltd, Hong Kong) olup, fotoaktivasyonda kullanılan cihaz Adi-Light 2 cihazının (AdiStem Ltd, Hong Kong) markadır.

The laminar flow kabini (Air Flow-NUVE / NF-800 R) ve inkübatör (NUVE, 06750) Ankara, Türkiye marka kullanıldı. Olympus CKX41 inverted mikroskop ve Olympus Cell Soft Imaging System software hücrelerin izlenmesinde kullanıldı. Mindray MR-96A (China) ELISA cihazı MTT ve SSEA-1 Eliza analizlerinde kullanıldı. Quanta 250 FEG (Fei Company, Hillsboro, Oregon, USA) elektron mikroskobu ile hücre yüzey morfolojilerindeki değişimler belirlendi.

***Metot:***

***Doku seçim kriterleri:***

Hematokrit oranları 42%-52% olan ve ileri evre osteoarthritis hastalarına ait dokular (n=9) çalışmada kullanıldı. Evrelendirme Kellgren-Lawrence protokolüne göre yapıldı (15). Dokuları alınan hastalar, ameliyattan 21 gün sonra kliniğe davet edilerek otolog kanları alındı.

Son iki hafta içerisinde non steroid antiinflamatuvar, antitrombotik veya antikoagulan ilaçları alanlar ve son 48 saat içerisinde alkol ve sigara tüketimi gerçekleştiren gönüllüler çalışmaya dâhil edilmedi. Kalan gönüllülere yapılan hemogram ve elektrokardiyografi test sonuçları değerlendirildi. Anemi, polisitemi veya trombotik hastalıkların tümü dâhil herhangi bir kan hastalığı olanlar ile arrhythmia'lı gönüllüler çalışmadan dışlandı (16).

Kalan dokuz hastadan elde edilen osteokondral dokulardan standart primer kondrosit kültürleri gerçekleştirildi.

### ***Deney grupları:***

Hazırlanan grup içeriğine göre, hidrojellerin içine iki farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TZP'ler ilave edildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Deney grupları, içerik ve uygulamalar: P-TZP; Pure- Trombositten Zengin Plazma ifade etmektedir. Düşük konsantrasyonda lökosit içermektedir. P-TZP'de Lökosit sayısı 2000-4000 Lökosit/ $\mu$ L'dir. L-TZP; Lökosit pozitif- Trombositten Zengin Plazma ifade etmektedir. Yüksek konsantrasyonda lökosit içermektedir. L-TZP'de lökosit sayısı 9000-11000 Lökosit/ $\mu$ L'dir.

<i>Grup</i>	<i>Açıklama</i>	<i>Uygulama</i>
<i>Grup I</i>	Kontrol	(-)
<i>Grup II</i>	Monolayer kondrosit kültürü	P-TZP
<i>Grup III</i>	Monolayer kondrosit kültürü	L- TZP
<i>Grup IV</i>	Hidrojel ve kondrosit ko-kültürü	P- TZP
<i>Grup V</i>	Hidrojel ve kondrosit ko-kültürü	L- TZP

Örneklerden, her bir analiz için birer adet fazladan hazırlanan deney düzeneğinde, 24 saat (24h), 10. ve 21. günlerde MTT-cell viability, toxicity and proliferation ile human pre-kondrosit karakterizasyon SSEA-1 protein ticari ölçüm kitleri yardımı ile ELISA analizleri

gerçekleştirildi. Eş zamanlı olarak, ESEM ve inverted ışık mikroskobisi ile görüntüler kaydedildi.

#### ***Primer kondrosit kültürlerinin hazırlanması:***

Diz arthroplasty ameliyatı geçiren hastalara ait ve atık materyal kabul edilen kıkırdak dokuları steril koşullar altında alınarak laboratuara getirildi. Standart primer kültür portokolleri kullanılarak tek tanbakalı kondrosit hücre kültürleri elde edildi. (2, 11, 12, 17, 18). %90 konfluent hale gelen kültürler ile deney aşamalarına başlandı. Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı ve tripan mavisi varlığında canlı hücre sayımı yapıldı.  $125 \times 10^3$  hücre 24-well plate'lere ekildi. Besi ortamı iki günde bir değiştirilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

#### ***Fotoaktive edilen trombosit- zengin plazma hazırlanması:***

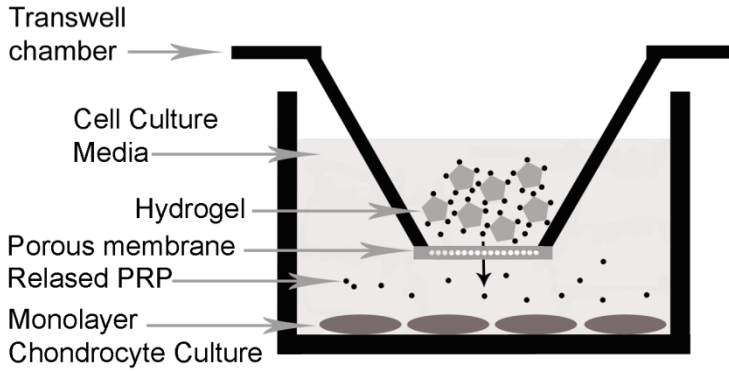
Hastalara ait 24 mL periferik kan  $3 \times 8.5$  ml trisodyum sitrat içeren tüplere alındı. Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve platellet zengin plazma ayrıldı. Fotoaktivasyon cihazı kullanılarak TZP nin aktivasyonu sağlandı (16, 19, 20).

Örneklerden elde edilen ortalama 2.8 mL TZP kısmı mikro pipetler sayesinde gruplara göre hidrojel içerisine, hidrojin kroslinkleme aşamasından önce solüsyona ilave edilmek üzere hazırlandı.

#### ***TZP'lerin hidrojellere emdirilmesi:***

12% Poly(vinyl alcohol) solüsyonu ile 4% nişasta solüsyonunun homojenize edilerek karıştırılması sağlandı. Zayıf çapraz bağlanmanın gerçekleşmiş olduğu bu karışım üzerine, hastalardan elde edilerek steril kabin içerisinde tüplere aktarılan PZP'ler, her bir örnekte 2.8mL olacak şekilde ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra bu karışım içerisine; hazırlanan hidrojin hem cerrahi kullanıma müsaade edecek kıvamda hem de hidrojin kıkırdak

hasarının tamir edileceği minimum 21 günlük süreye yetebilecek günlerde uygulandığı bölgede kontrollü bir şekilde biyo-parçalanarak kalabilmesi amacıyla, %16'lık sodyum tetra boratın satüre çözeltisi ilave edildi. Bu sayede daha kararlı çapraz bağları olan osmotik pompa ve bio-degradasyon esasına göre içerisindeki TZP'nin kontrollü salımına müsaade edebilecek hidrojel sistemi hazırlandı. Gruplara göre içerikleri farklı olacak şekilde hazırlanan polimerik hidrojeller aynı ağırlık ve büyüklükte idi. Hidrojeller transwell chamber içerisine yerleştirilirken hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi (16). Transwell chamber kullanılarak oluşturulan ko-kültürler Şekil 1.de şematize edilmiştir.



**Şekil 1.** Hidrojel ve monolayer kondrosit ko-kültürasyonunun şematik gösterimi.

#### ***Invert mikroskopi ve ESEM analizi:***

Hücre morfolojisi ve kültürlerin gelişimi inverted mikroskopi ile takip edildi. 4X, 10X, 20X ve 40X büyütmelelerde mikro-resimler elde edildi. ESEM analizi ile hücre yüzey morfolojisindeki değişimler daha detaylı olarak görüntülendi (11, 12, 16-18).

Kullanılan ESEM cihazı FEG iyon pompaları ile yüksek vakum sağlayan bir cihazdır. Cihazda görüntüleme 1,000-160,000x büyütmelelerde, 41.4 ve 414 µm aralığında rezolusyon derinliği, 5.00 kV voltaj ve 8.8-8.9 mm WD ayarlarında gerçekleştirildi.

### ***ELİZA analizi:***

ELISA analizi kullanılan ticari kitin talimatnamesine uygun olarak 24 saat, 10. Gün ve 21. Günde gerçekleştirildi.

### ***MTT analizi:***

MTT canlılık ve proliferasyon analizi kullanılan ticari kitin talimatnamesine uygun olarak 24 saat, 10. Gün ve 21. Günde gerçekleştirildi.

### ***SSEA-1 protein komponenti sayesinde kondrositik aktivite tayini:***

Embriyonik kök hücreleri içeren insan mezenkimal kök hücreleri farklılaşma esnasında SSEA-1 protein komponenti up-regüle olur. Oysa diferansiyasyona uğramayan hücrelerde SSEA-1 protein komponenti belirteci down-regüle olmaktadır. Hücre lizatları hazırlanmasına gerek kalmaksızın ilaç eneylerinde, kültürize hücrelerin SSEA-1 artış ya da azalışı tespit edilerek diferansiye mi, undiferansiye mi, stimulasyon mu yoksa inhibisyona mı gittiğini kontrol edebilmek için, human prechondrocytes characterization commercial kit sayesinde 540 nm dalga boyu absorbansda ölçümler gerçekleştirildi (21).

### ***İstatistiksel Analizler:***

Tanımlayıcı istatistikler mean±standard deviation olarak gösterildi. Elde edilen verilerin analizinde, sonuçlar hücre sayısı, proliferasyonu ve SSEA-1 protein komponent ifadesi üzerinden değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmelerde Minitab R16 programı kullanıldı. Değerlendirmeler 95% confidence interval'de gerçekleştirildi.

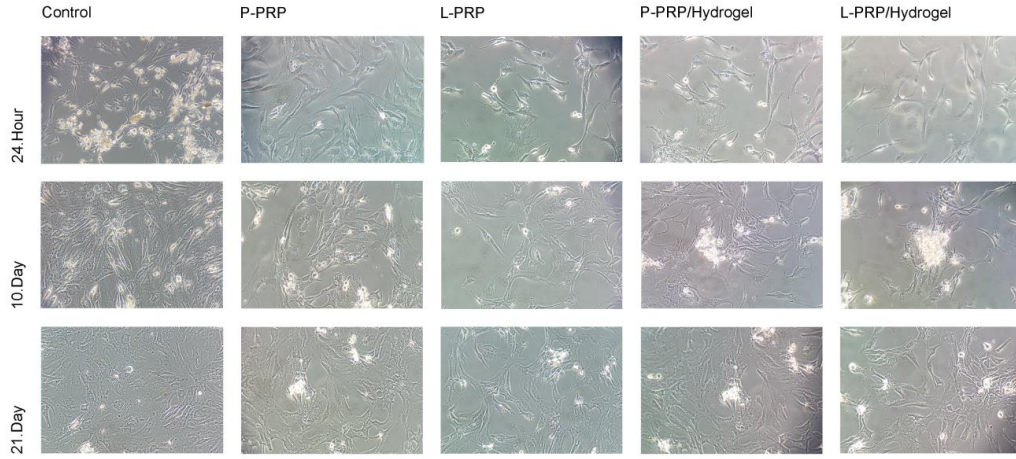
Gruplar arası karşılaştırmalarda ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı Varyans Analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası farkın olduğu durumda, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti ve de yanlış pozitifliğin denetlenmesi için post-hoc mutiple pairwise comparisons testlerden Tukey honestly significantly different



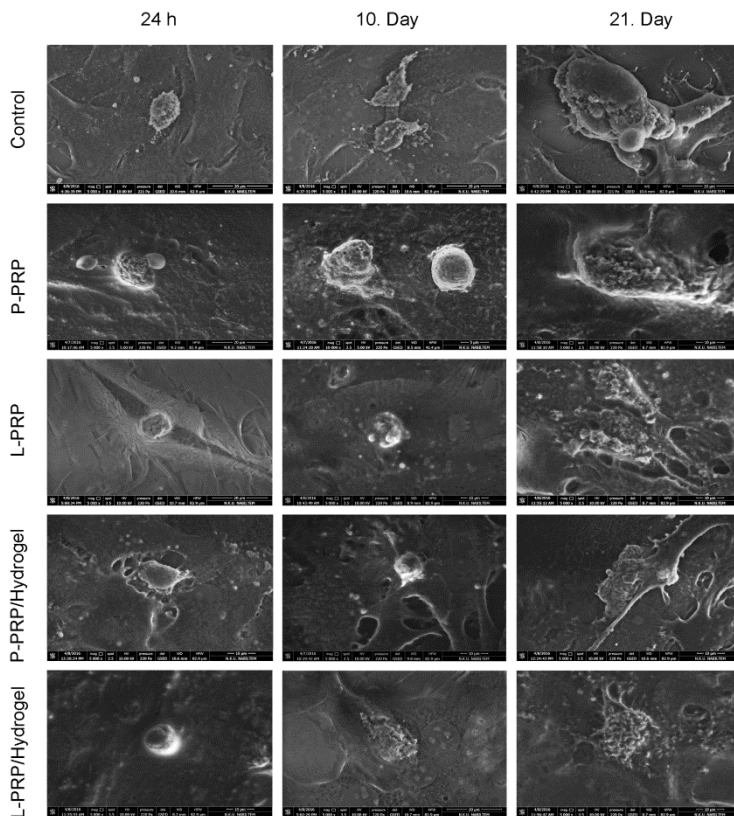
(HSD) ile gerçekleştirildi. Böylece eşit örneklem gruplarına ait ortalamalar arasındaki farklar değerlendirilebildi.

## BULGULAR

### *İnverted mikroskopi ve ESEM analizleri*



**Şekil 2:** Şekilde tüm deney gruplarından elde edilen inverted mikroskopi görüntüleri verilmiştir. Trombositten zengin plazma içeren hidrojeller ile beraber kültüre edilen kondrositlerin en hızlı proliferasyon yapan grup olduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 3:** Şekilde tüm deney gruplarından elde edilen ESEM görüntüleri verilmiştir. Trombositten zengin plazma içeren hidrojeller ile beraber kültüre edilen kondrositlerin en hızlı proliferasyon yapan grup olduğu gözlemlenmiştir.

**İstatistiksel Analiz:**

Gruplar arası farkların Varyans Analizi sonrası Tukey HSD ile değerlendirilmesi neticesinde fark olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı görüldüğü raporlandı (**Tablo 2, Tablo 3**).

**Tablo 2.** Gruplar arası farkların Varyans Analizi

Variance Analysis of SSEA-1 ELISA analysis					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Method	14	6.51729	0.465521	22752.72	0.000
Error	75	0.00153	0.000020		
Total	89	6.51882			
Variance Analysis of MTT analysis					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Method	14	14.6339	1.04528	134971.53	0.000
Error	75	0.0006	0.00001		
Total	89	14.6345			

**Tablo 3.** Gruplar arası farkların Varyans Analizi sonrası Tukey HSD ile değerlendirilmesi

Tukey Pairwise Comparisons for SSEA-1 protein (Grouping information using the Tukey Method and 95% confidence interval).			
	N	Mean ± Standard Deviation	Grouping
Group IV. Day 21	6	1.06017	A
Group I. Day 21	6	0.94633	B
Group IV. Day 10	6	0.89600	C
Group II. Day 21	6	0.74317	D
Group II. Day 10	6	0.71883	E
Group I. Day 10	6	0.63533	F
Group V. Day 21	6	0.54583	G
Group I. 24h	6	0.48133	H
Group V. Day 10	6	0.42217	I
Group III. 24h	6	0.41367	I
Group II. 24h	6	0.38133	J
Group III. Day 21	6	0.33133	K
Group III. Day 10	6	0.31250	L
Group V. 24h	6	0.17700	M

<b>Group IV. 24h</b>	6	0.14417	N
Tukey Pairwise Comparisons for MTT- cell viability toxicity and proliferation (Grouping information using the Tukey Method and 95% confidence interval).			
	N	Mean ± Standard Deviation	Grouping
<b>Group IV. Day 21</b>	6	1.69133	A
<b>Group IV. Day 10</b>	6	1.25367	B
<b>Group V. Day 10</b>	6	1.09800	C
<b>Group V. Day 21</b>	6	1.08800	D
<b>Group II. Day 21</b>	6	0.94583	E
<b>Group II. Day 10</b>	6	0.84150	F
<b>Group I. Day 21</b>	6	0.60700	G
<b>Group I. Day 10</b>	6	0.50100	H
<b>Group I. 24h</b>	6	0.47600	I
<b>Group III. 24h</b>	6	0.44033	J
<b>Group II. 24h</b>	6	0.42850	K
<b>Group III. Day 21</b>	6	0.38450	L
<b>Group III. Day 10</b>	6	0.33483	M
<b>Group V. 24h</b>	6	0.32867	N
<b>Group IV. 24h</b>	6	0.30833	O

Kontrol grubuna göre; SSEA-1 proteininin en düşük değere, 24. saatte ölçümlenen, P-TZP emdirilen hidrojeller ile L-TZP emdirilen hidrojellerin yer aldığı group IV ve group V’de olduğu gözlemlendi. Kondrositik öncülerin artışını ifade eden SSEA-1 düzeyinin, kontrol grubuna oranla, en az seviyede ölçümlendiği grubun, 21. günde ve hidrojel içermeyen ve L-TZP’nin kondrositlere doğrudan uygulandığı group III’de olduğu raporlandı .

Yine SSEA-1 seviyesinin diğer gruplara oranla düşük seviyede saptandığı, (hidrojele emdirilen veya hidrojele emdirilmeden doğrudan kültürlerle uygulanan L-TZP’nin yer aldığı), 10. günde group III ve group V’de olduğu görüldü.

Dikkate değer şekilde 21. günde; hidrojel içerisine P-TZP’nin emdirildiği örneklerin yer aldığı group IV’de, en yüksek SSEA-1 içeren grup idi. Bunu, yine group IV (P-TZP’nin emdirildiği hidrojeller)’de yer alan, 10. günde analizlenen örnekler takip ediyordu.

Mitokondriyal aktivitenin en düşük değerlerde olduğu, P-TZP ve L-TZP’nin emdirildiği hidrojellerin yer aldığı group IV ve group V, 24. saat örnekleri olduğu kaydedildi. Bunu; 10. ve 21.günlerde doğrudan kültür ortamına uygulanan, hidrojel içermeyen L-TZP’lerin uygulandığı, group II takip ediyordu.

Mitokondriyal aktivite göstergesi olan canlılık ve proliferasyonun, en fazla 21. günde, P-TZP'lerin emdirildiği hidrojeller üzerine ekilen kondrositlerin yer aldığı grup IV'de, olduğu raporlandı.

SSEA-1 and MTT-cell proliferation Pearson product moment correlation katsayısı (Pearson Correlationsig. (2-tailed); rho) 0,745 olarak bulundu. SSEA-1 ile MTT cell proliferation arasında korelasyonun olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu raporlandı (P-Value = 0.000).

### **TARTIŞMA:**

Dünya genelinde, kırık dokusu hasarlarına bağlı problemlerin, kaliteli yaşamı olumsuz etkilemekte, sakatlıklara neden olabilmekte (22), ve piyasada mevcut olan ilaçlar ile yapılan tedavilerde net bir uygulama protokolü olmadığından, farklı klinisyenler tarafından farklı terapötik protokoller uygulanabilmektedir.

Bunun sonucunda bir yandan devlet ekonomisine fazladan külfete yol açılmakta (23), diğer yandan, uygulanan tedavilerin başarı oranları çok yüksek olmadığı için, hasta memnuniyeti de genellikle sağlanamamaktadır.

Durum böyle olunca, kırık dokusundaki hasarların tedavisinde biyolojik onarım tekniklerinin kullanılması son zamanlardaki araştırmaların ana konusu olmuştur (24).

Klinik geçmişi 1990'lı yıllardan bu yana olan (25), ve yaraların iyileşmesini hızlandırmak için modern tıbbın gelişmesinde devrim niteliğinde olumlu sonuçlar yaratan TZP'nin; otokrin ve parakrin sisteme ait self aktivasyonlarla, inflamatuvar cevabın, kemotaksisin, aterotrombozisin, koagülasyon ve hücresel farklılaşma regülasyonunu indüklediği bildirilmiştir (26). Tıbbın tüm branşlarında olduğu gibi, spor hekimliği ve ortopedik cerrahi alanlarında da özellikle hasarlı kırık dokusunu tamir etmek için kullanılmaya başlanmıştır (27).

TZP içerisinde yer alan doğal büyüme faktörlerinin biyolojik yarı ömürleri çok kısadır. Bu faktörler, enjekte edildikleri bölgelerden hızlı bir şekilde metabolizasyona uğrayarak uzaklaşmaktadırlar (11, 12, 14). Bu gibi nedenlerden dolayı; intraartiküler veya sistemik uygulama sırasında efektif tedavi etkinliğinin oluşabilmesi için, yüksek ve tekrar eden dozlarda etken maddeler kullanılmaktadır.

Literatürde; TZP içeriğindeki etkin maddelerin; konsantrasyon farkı nedeniyle, basit difüzyona uğrayarak, tatbik edilen bölgedeki mikroçevreye yayılması sonucu, uygulandığı bölgede tutulamamasının istenmeyen yan etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (28).

Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda bilim insanlarının hedefi, bu tür ürünlerin vücuda biyolojik aktivitelerinin bozulmadan, belirli ilaç taşıyıcıları içerisinde verilerek, içerisinde yer alan büyüme faktörlerinin daha uzun sürede ve efektif olmasını sağlayacak sistemleri gerçekleştirmek olmuştur (11, 12).

Bilindiği üzere kontrollü ilaç taşıma sistemleri, mikrogram veya daha küçük miktarlarda etkinlik gösteren büyüme faktörlerinin taşınmasında uygun sistemlerdir. Büyüme faktörleri bu sistemler içine hapsedilerek yapı ve aktivitelerini korumaları sağlanmakta ve uzun süreli olarak aktif, efektif formlar halinde tutulabilmektedir. Hem sistemik kullanıma bağlı oluşabilecek olan side ve/veya advers etkilerin ortadan kaldırılması hem de büyüme faktörlerinin in vivo etkinliğinin arttırılması için, biyoaktif molekülün bir polimerik taşıyıcı sistem içine hapsedilmesi ve belli bir zaman periyodu içinde uzun süreli salınmasının sağlanması gerektiğinden bahsedilmiştir (11, 12).

Bu amaçla bu çalışmada, protein ve peptid yapıdaki kısa yarılanma ömrüne sahip TZP içeriğinin, efektif tedavi edici dozlarda ve hedeflendirildiği bölgede, iyileştirici düzeylerinin sürekli korunması ve istenmeyen etkilerin kaldırılması, gerek duyulan doz miktarı ve uygulama sıklığının azaltılabilmesi için hidrojeller kullanıldı. Kullanılan bu hidrojelin;

kendisinin veya parçalanmış ürünün toksik etki veya biyolojik uyumsuzluk göstermesine engel olmak amacıyla doğal polimerik yapıda olan maddeler tercih edildi. Bu ilaç taşıma sistemi sayesinde, *in vitro* ve/veya *in vivo* yarılanma ömrü kısa olan büyüme faktörlerinin biyodegradabilitesinin önlenmesi ve yarılanma ömrünün uzaması ile istenen bölgeye hedeflendirilerek, kıkırdak rejenerasyonundaki tedavi etkinliğininin kıyaslanmasına gidildi.

Kemik iliğinde şekillenen bir çeşit beyaz kan hücresi olan megakaryositlerin sitoplazmik fragmantasyonu olan TZP (29, 30); trombositlerin hemostaz ile ilgili bilinen görevinin dışında, yara iyileşme sürecinde etkin bir şekilde rol aldığı anlaşılınca tıbbın bütün alanlarında uygulanmaya başlanmıştır. İyileşme etkisinin; TZP içeriğindeki lökositler yardımı ile olduğu bildirilmiş ve bu tür endotel hücrelerin, dolaşan kemik iliği kökenli progenitör hücrelerle ilişki kurmak suretiyle etkilerini gösterdiği raporlanmıştır (29-31).

Trombositlerle ilişkili literatür incelendiğinde; bazı çalışmaların lökositlerin etkisini genellikle göz ardı ettiği görülmüş, bazılarında ise bilimsel kanıt olmamasına rağmen lökositlerin TZP içerisinden çıkartılması gerektiğini vurgulanmıştır (32).

Daha da önemlisi, trombosit konsantrasyonlarında trombosit ve lökosit içeriğinin, ayrı ayrı ve clear bir şekilde mekanizmasının açıklandığı, kanır değeri yüksek olan klinik veya prelinik bir çalışmaya rastlanmamıştır (33).

İlaç taşıma sistemlerinden biri olan hidrojeller içerisine TZP'nin emdirilerek, kondrojenik diferansiyasyonun analizlendiği, sadece üç adet yayına rastlanmıştır (34-36).

Ancak ne yazık ki bu araştırmalarda, rat veya tavşanlar gibi canlı memeli denekler kullanılmıştır. Bilindiği üzere insan ile hayvan dokularına ait fizyolojik yapı ve/veya hassasiyetin birbirinden farklı olabileceği sonucu, hayvan dokusundan elde edilecek verilerin güvenilir olamayabileceği bildirilmektedir (17, 37, 38).

Biz bu araştırmada insan dokusundan izole edilen primer kondrosit kültür örneklerini kullandık.

Ortopedik cerrahi kliniğinde geleneksel olarak uygulanan TZP'nin, lökosit içeriğine göre, in vitro deneysel ortamda değerlendirildiği, kanıt değeri yüksek üç adet makaleye rastlanmıştır. Ancak bu araştırmalardan biri kondrositler üzerinde değil, synoviocytes üzerinde (39), diğerinin ise human ligament fibroblasts'da gerçekleştirildiği görülmüştür (40).

Kanıt değeri yüksek ve insana ait osteoartritik dokudan izole edilen kondrosit ltrleri üzerinde TZP'nin test edildiği bir in-vitro deneysel çalışmaya rastlanmıştır. Ancak ne yazık ki rastlanan bu tek çalışmada ise kültürlerin sadece dört erkek hastadan izole edildiği anlaşılmıştır (13).

Bizim alışmamızda analizlerimiz, daha fazla sayıda olgudan (n=9), hem kadın hem de erkek cinsiyeti içeren kondral dokulardan izole edilen primer kondrosit kültürleri üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tüm bunlara ek olarak ve daha da önemlisi; hücrelerin doğal ortamı olan vücut içerisindeki, fenotipik veya genotipik özelliklerini kaybettiği bilinen ticari cell-line'ları kullanmadık (17, 18, 37, 38, 41). Bu çalışmada, rutin klinik uygulamaları esnasında, total diz protezi konulan hastalara ait kıkırdak dokuları kullanıldı. Protez uygulaması esnasında, rezeksiyonu yapılan eklem yüzlerinin bozuk olmayan kondral dokulardan primer kondrosit kültürleri hazırlandı. Oldukça sağlam veya sağlama yakın lateral kompartmandan alınan kondral kesi materyallerinden elde edilen primer kültürler sayesinde, sadece kıkırdak hücreleri değil aynı zamanda hücre etrafında yer alan ekstraselüler matriks gibi uzantılarında yer aldığı ortamda analizler gerçekleştirilebildi.

Bu gibi nedenlerden dolayı, literatürde ilk olan bu araştırmamıza ait sonuçların güçlü olabileceği inancındayız. Bu bulgular, klinikte uygulanan TZP'nin içeriğinin P-TZP olması gerektiğine ve TZP'nin geleneksel uygulamalarla değil, mutlaka ilaç taşıma sistemlerinden

olan hidrojeller gibi herhangi bir skafold içerisine emdirilerek uygulanması gerektiğinin önemini bildirmektedir. Ancak bulguların in vitro deneysel ortamdan elde edildiği unutulmamalıdır.

#### **References:**

1. Lu YC, Evans CH, Grodzinsky AJ. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R142.).
2. Yilmaz I, Gokay NS, Bircan R, Saracoglu GV, Dervisoglu S, Gokce A. How different methodologies of harvesting and analysing the samples affect the test results in determining joint mediators. *Arthritis.* 2013;2013:631959.
3. Frobell RB, Roos EM, Roos HP, Ranstam J, Lohmander LS. A randomized trial of treatment for acute anterior cruciate ligament tears. *N Engl J Med* 2010, 363:331-342.
4. Italiano JE Jr, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1174–1182.
5. Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):204.
6. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008;13:3532–3548.
7. Halpern BC, Chaudhury S, Rodeo SA. The role of platelet-rich plasma in inducing musculoskeletal tissue healing. *HSS J.* 2012;8(2):137-45.
8. Dolkart O, Chechik O, Zarfati Y, Brosh T, Alhajajra F, Maman E. A single dose of platelet-rich plasma improves the organization and strength of a surgically repaired rotator cuff tendon in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2014;134(9):1271-7.



9. Pak J, Lee JH, Jeon JH, Lee SH. Complete resolution of avascular necrosis of the human femoral head treated with adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J Int Med Res.* 2014;42(6):1353-62.
10. Mall NA, Tanaka MJ, Choi LS, Paletta GA Jr. Factors affecting rotator cuff healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(9):778-88.
11. Yilmaz I, Gokay NS, Gökçe A, Tonbul M, Gökçe Ç. A Novel designed chitosan based hydrogel which is capable of consecutively controlled release of TGF-Beta 1 and BMP-7. *Türkiye Klinikleri J MedSci.* 2013;33(1):18-32.
12. Gokce A, Yilmaz I, Bircan R, Tonbul M, Gokay NS, Gokce C. Synergistic effect of TGF- $\beta$ 1 And BMP-7 on chondrogenesis and extracellular matrix synthesis: An in vitro study. *Open Orthop J.* 2012;6:406-13.
13. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Pereira Ruiz MT, et al. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(5):423-9.
14. Getgood A, Brooks R, Fortier L, Rushton N. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(5):565-76.
15. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957;16:494–502.
16. Isyar M, Yilmaz I, Guler O, Mahirogullari M. Could platelet rich plasma be soaked to polymeric hydrogel which could be used at biological repair of cartilage? *International Refereed Journal of Orthopaedics Traumatology and Sports Medicine.* 2015;4:40-51 (Doi: 10.17372/OTSHD.2015412555).
17. Isyar M, Bilir B, Yilmaz I, et al. Are biological agents toxic to human chondrocytes and osteocytes? *J Orthop Surg Res* 2015;10:118.

18. Dogan M, Isyar M, Yilmaz I, et al. Are the leading drugs against *Staphylococcus aureus* really toxic to cartilage? *J Infect Public Health* 2015;S1876-0341(15)00187-2.
19. Freitag JB, Barnard A. To evaluate the effect of combining photoactivation therapy with platelet-rich plasma injections for the novel treatment of osteoarthritis. *BMJ Case Rep*. 2013;pii: bcr2012007463.
20. Freitag JB, Barnard A, Rotstein A. Photoactivated platelet-rich plasma therapy for a traumatic knee chondral lesion. *BMJ Case Rep*. 2012; pii:bcr2012006858.
21. <http://www.celprogen.com/details.php?pid=10765>
22. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 30;16(11):26035-54.
23. Das BR, Roy A, Khan FR. Cartilage oligomeric matrix protein in monitoring and prognostication of osteoarthritis and its utility in drug development. *Perspect Clin Res*. 2015 Jan-Mar;6(1):4-9.
24. Mardones R, Jofré CM, Minguell JJ. Cell Therapy and Tissue Engineering Approaches for Cartilage Repair and/or Regeneration. *Int J Stem Cells*. 2015 May;8(1):48-53).
25. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999 Feb;39(2):144-8.
26. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-8.
27. Jo CH, Shin JS, Lee YG, Shin WH, Kim H, Lee SY, et al. Platelet-rich plasma for arthroscopic repair of large to massive rotator cuff tears: a randomized, single-blind, parallel-group trial. *Am J Sports Med*. 2013 Oct;41(10):2240-8.
28. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF et al. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent* 2009; 18: 303-10.

29. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482-94.
30. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118: 147e-59e.
31. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil* 2007; 9: 227-38.
32. Everts PA, van Zundert A, Schönberger JP, Devilee RJ, Knape JT. What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jun 15;85(4):1135-6.
33. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009 Mar;27(3):158-67.
34. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded in situ-formed hydrogel enhances hyaline cartilage regeneration by CB1 upregulation. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Nov;100(11):3099-107.
35. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *J Control Release*. 2012 May 10;159(3):332-7.
36. Saito M, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, et al. To investigate the therapeutic potential of administration of gelatin hydrogel microspheres containing platelet-rich plasma (PRP), by examining its effects on progression of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(2):201-7.

37. Beyzadeoglu T, Torun KG, Ekinici ID, et al. Cytotoxicity of local anesthetics to rats' articular cartilage: an experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2012;46:201-207.
38. Isyar M, Yilmaz I, Nusran G, Guler O, Yalcin S, Mahirogullari M. Safety of bioabsorbable implants in vitro. *BMC Surg.* 2015;15(1):127.
39. Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Dragoo JL. The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med.* 2014;42(5):1204-10.
40. Pifer MA, Maerz T, Baker KC, Anderson K. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligamentfibroblasts. *Am J Sports Med.* 2014;42(5):1211-8.
41. Wataha JC. Biocompatibility of Dental Materials. In: Anusavice KJ, editors. *Phillip's Science Of Dental Materials.* Missouri: Elsevier Science 2003;171-202.