



**HACETTEPE
ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

PROJE BAŞLIĞI

Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftlerinin İn Vivo Etkinliğinin İncelenmesi

Proje No

FHD-2019-18296

Proje Türü

Hızlı Destek

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Dr. Öğr. Üyesi Soner Çakmak
Biyomühendislik A.B.D.

Araştırmacı(lar)

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Kimya Mühendisliği Bölümü

Arş. Gör. Sena Koç
Kimya Mühendisliği Bölümü

Arş. Gör. Dr. Mahmut Muhsin Yılmaz
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.

Ağustos 2020
ANKARA

TEŞEKKÜR

Sena Koç'un yüksek lisans tez çalışmaları boyunca FYL-2018-16974 no'lu proje kapsamında ve ardından *in vivo* hayvan çalışmaları için **FHD-2019-18296** maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim.

Projenin çıkış noktasını oluşturan "Kemik Hasarlarının Tedavisi için Sıkıştırılabilir ve Kolay Şekil Alabilen 3-Boyutlu Kompozit Fibröz Malzemeler-Üretim, Karakterizasyon ve *În Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları" isimli ve 215M179 numaralı '3001-Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programı' kapsamındaki önceki çalışmamıza desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Projeye katkılarından dolayı Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, proje kapsamında deneyleri gerçekleştiren Arş. Gör. Sena Koç'a çok teşekkür ederim.

Yoğun iş temposu arasında her daim vakit ayıran ve hayvan deneylerini gerçekleştirilmesinde katkı sağlayan Doç. Dr. Mert Çalış ve Dr. Mahmut Muhsin Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

Mikro-CT analizlerindeki desteklerinden dolayı Dr. Arda Büyüksungur'a teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik boyamalar süresince çalışmalarımızın başarı ile sonuçlanabilmesi için büyük bir özveri ile destek olan Prof. Dr. Sevil Çaylı'ya ve öğrencisi Gülben Akcan'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Öğr. Üyesi Soner Çakmak
Proje Yürütücüsü
Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1. Kullanılan Malzemeler	5
3.2. Doku İskelelerinin Üretimi	5
3.3. PRP Uygulaması	5
3.4. <i>İn Vivo</i> Hayvan Deneyleri	6
3.5. Bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) Görüntülemesi	7
3.6. Histolojik Analiz	7
3.7. İstatistiksel Analiz	8
4. BULGULAR	9
4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	9
4.1.1. Nanofiber Yüzeylerin Modifikasyonu	12
4.2. PRP Uygulaması	16
4.3. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar	18
4.3.1 Klinik Gözlem	18
4.3.2 Bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) Görüntülemesi	18
4.3.3 Histolojik Analiz	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	26
6. KAYNAKLAR	27
7. EKLER	31

ÖZET

Bu çalışmada, poli (L-laktik asit) (PLLA) ve hidroksiapatit (HAp) nanofiber matrisleri, geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere 3 boyutlu (3B) elektroğirme yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir. Üç-boyutlu PLLA-HAp greft gruplarının ortalama nanofiber çapı 425 ± 127 nm olarak kemik ECM'sinde bulunan kolajen nanofiberlerin çaplarıyla uyumlu olarak bulunmuştur. Ayrıca, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin Image J programına aktarılmasıyla 2-boyutlu doku iskelelerindeki gözenek büyüklükleri 2-10 μ m, 3-boyutlu biyomalzemelerdeki gözenekler ise 30-50 μ m olarak hesaplanmıştır. Bu da 3-boyutlu üretimle, çok daha büyük gözenek çaplarında nanofiber doku iskeleleri elde edilebildiğini göstermiştir. Modifikasyon işlemleri, matrislerin ıslatılabilirliğini arttırmak için farklı zamanlarda farklı konsantrasyonlarındaki NaOH çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon öncesi su temas açısı $128.2 \pm 3.1^\circ$ iken, 0.1 M NaOH çözeltisi ile 6 saat gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda su temas açısı $84.2 \pm 8.1^\circ$ olarak ölçülmüştür ve modifikasyon süresiyle hidrofilisitenin arttığı tespit edilmiştir. SEM görüntüleriyle de yüzey pürüzlülüğü artmıştır ve fiber morfolojisini koruyan alloplastik greft malzemelerin üretilebildiği görülmüştür.

Geliştirilen malzemelerin biyoaktivitesini arttırmak için gönüllü bireylerden alınan kan ile trombosit zengin plazma (PRP) izolasyonu santrifüj işlemiyle gerçekleştirilmiştir. Trombosit zengin plazma pipetleme yöntemiyle greftlere yüklenmiş ve % 10 CaCl₂ ile aktive edilmiştir. Aktivasyon etkinliği ise akış sitometrisi ile CD62 (P-selektin) ve CD41/61 (glikoprotein IIb/IIIa) proteinlerinin yüzdelere bakılarak incelenmiştir. Aktivasyon sonrası protein yüzdelерinin yaklaşık 4 kat arttığı ve aktivasyonun başarıyla gerçekleştiği görülmüştür.

In vivo hayvan deneyleri 24 adet Wistar Albino Sıçan kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve sıçanların kalvariyumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında kemik defektleri oluşturulmuştur. Erken kemikleşmeyi takip etmek için 8. hafta sonunda, geç dönem kemikleşme için de 20. hafta sonunda sıçanlardan kemik dokuları alınmış ve bilgisayarlı tomografi (mikro-CT), histoloji ve immünohistokimyasal boyama görüntüleriyle kemikleşme ve hücresel aktivite karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda, en yüksek kemik rejenerasyonu %76 olup, beklenildiği gibi altın standart olan otogreft grubunda görülürken; en yüksek kemik hacmi/defekt hacmi (BV/TV) oranına sahip ikinci grup PRP içerikli PLLA-HAp grefti (%59) olarak belirlenmiştir. En düşük BV/TV oranı ise ~%25 ile kontrol grubundadır. Ayrıca, kemik rejenerasyonunu göstermek için defekt bölgesindeki mineral yoğunluğu (BMD) da hesaplanmıştır. Yirminci haftadaki BMD değerlerine göre PRP yüklü ve boş greft grupları arasında anlamlı derecede yüksek fark olmamakla birlikte PRP+PLLA-HAp grubu otogreftten sonraki en yüksek BMD değerine sahip gruptur. Histoloji ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarının da mikro-CT verilerini destekler şekilde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, geliştirilen PRP+PLLA-HAp greft materyalinin altın standarda alternatif olarak kullanılabileceğini ve kontrol ve PLLA-HAp grupları göz önüne alındığında PRP'nin kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Üç-boyutlu elektroğirme, Poli(L-laktik asit), Hidroksiapatit, Trombosit zengin plazma, *In vivo*.

ABSTRACT

In this study, poly (L-lactic acid) (PLLA) and hydroxyapatite (HAp) nanofiber matrices were successfully produced by 3-dimensional (3D) electrospinning method for the treatment of bone defects with irregular geometry. The average nanofiber diameter of three-dimensional PLLA-HAp graft groups was found to be 425 ± 127 nm which is consistent with the diameters of collagen nanofibers in bone ECM. In addition, by transferring scanning electron microscopy (SEM) images to ImageJ software, pore sizes in 2D scaffolds were calculated as 2-10 μ m, and 3-dimensional biomaterials has 30-50 μ m pore sizes. This result showed that nanofiber scaffolds with much larger pore diameters can be obtained with 3D production. The modification processes were carried out with different concentrations of NaOH solutions at different times to increase the hydrophilicity of the matrices. Before the modification, the water contact angle was $128.2 \pm 3.1^\circ$, then the water contact angle was measured as $84.2 \pm 8.1^\circ$ as a result of the modification performed with 0.1 M NaOH solution for 6 hours. It was found that the hydrophilicity increased with the modification time. Surface roughness increased and it was seen with SEM images that alloplastic graft materials preserving fiber morphology materials can be produced successfully.

In order to increase the bioactivity of the developed materials, platelet rich plasma (PRP) isolation of blood taken from volunteers was performed by centrifugation. Platelet rich plasma was loaded into the grafts by pipetting method and activated with 10 % CaCl_2 . Activation efficiency was investigated by looking at the percentages of CD62 (P-selectin) and CD41/61 (glycoprotein IIb/IIIa) proteins by flow cytometry. It was observed that the protein percentages increased approximately 4 times after activation and the activation was successful.

In vivo animal experiments were performed using 24 Wistar Albino rats and independent bone defects of 5 mm diameter were created in both parietal bones in the calvarium of rats. Bone tissues were taken from rats at the end of the 8th week to show early ossification and at the end of the 20th week for late ossification. The ossification and cellular activity were compared with computed tomography (micro-CT), histology and immunohistochemical staining images. At the end of the study, the highest bone regeneration was 76%, while it was seen in the gold standard autograft group as expected. The second group with the highest bone volume/defect volume (BV/TV) ratio was determined as the PRP containing PLLA-HAp graft (59%). The lowest BV/TV ratio is in the control group with ~ 25%. Bone mineral density (BMD) at the defect area was also calculated to show bone regeneration. Although the BMD values at the 20th week are not significantly different between the PRP loaded and empty graft groups, the PRP+PLLA-HAp has the highest BMD value after the autograft. Histology and immunohistochemical staining results was consistent with micro-CT. These results showed that the developed PRP+PLLA-HAp graft material can be used as an alternative to the gold standard and that PRP supports bone regeneration when the control and PLLA-HAp groups are considered.

Keywords: Bone tissue engineering, Three-dimensional electrospinning, Poly(L-lactic acid), Hydroxyapatite, platelet rich plasma, *In vivo*.

1. GİRİŞ

Dünyada her yıl milyonlarca insan, kemik hasarlarından kaynaklanan enfeksiyonlar ve sıvı kaybı nedeniyle ölüm riski ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, kemik rejenerasyonunu destekleyen ve enfeksiyonların üstesinden gelebilecek özellikte ürünlerin geliştirilmesi için yeni çalışmalar yapmaktadır.

Trombositten zengin plazma (PRP), kanın santrifüjleme işlemine tabi tutularak hücrelerinin moleküler ağırlıklarına göre katman katman ayrıştırılması ile otolog olarak elde edilmektedir [1]. Trombositler, yara iyileşmesinin üç temel fazından ilki olan hemostaz ve inflamasyon basamağında aktif rol oynamaktadır. Hasarın olduğu bölgeye gelen trombositler, kan damarlarının etrafında kümeleşmektedir. Trombosit yapısında bulunan α -granüller, immün cevap olarak yara iyileşmesinde görev alan biyoaktif moleküllerin ve büyüme faktörlerinin salımını yapmakta; ayrıca fibronektin, vitronektin gibi adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlanmayla iletişimden sorumlu fibrinojen gibi proteinleri uyarmaktadır. Böylece bağ dokusu iyileşmesi, epitel doku gelişimi, kolajen matriks yapısı oluşumu ve anjiyogenez indüklenmektedir [2]. Trombositlerden büyüme faktörleri salımı, kalsiyum glukonat, kalsiyum klorür, trombin veya kolajen gibi kimyasal veya biyolojik ajanların kullanımıyla trombositlerin aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu uyarılara bağlı olarak aktive edilmiş trombositlerden; hızlı, çok fazla miktarda ve kontrollü olmayan bir şekilde büyüme faktörleri salımı görülebilmektedir [3]. Ancak, klinik kullanımda sürekli ve kontrol edilebilir büyüme faktörleri salımını indükleyen alternatif kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple, PRP'nin taşıyıcı bir malzeme ile kullanımının, hem büyüme faktörlerinin kontrollü salımını sağlayacağı hem de malzemenin biyoaktif özelliğini arttıracığı düşünülmektedir. Taşıyıcı olarak düşünülen ve kemik hasarlarında kullanılan seramiklerin, biyobozunur, biyouyumlu ve kolayca sıkıştırılabilir 3-boyutlu polimer matriksler içerisine enkapsülasyonu ile elde edilen esneklik ve mekanik özellikler yönünden gelişmiş kompozit greft malzemeleri, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarında; cerraha zaman kazandıracak ve ayrıca şekillendirme için herhangi bir metal ekipmana ihtiyaç duyulmayacağından hasarlı bölgede enfeksiyon riskinin azalmasına da yardımcı olacaktır.

Sunulan proje çalışmasında buradan yola çıkılarak, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarının tedavisi için kolayca şekil alabilen, PRP ile biyoaktivitesi artırılmış üç boyutlu (3B) nanofibröz kompozit kemik greftlerinin geliştirilmesi ve *in vivo* etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Osteoindüktif etkiyi arttırmak için HA α nanopartikülleri, poli(L-laktik asit) (PLLA) içerisine katılmıştır ve 3B elektroegirme yöntemiyle pamuksu yapıda nanofibroz biyomalzemeler üretilmiştir. Trombositten zengin plazmanın yapısının ve işlevselliğinin önemli olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışma özellikle son yıllarda literatürde yer almaktadır. Ancak, PRP'nin 3B elektroegirme ile üretilmiş greftlerle birleştirilerek doku mühendisliği uygulamalarında kullanıldığı çalışmalar yok denecek kadar azdır ve greft malzemelerinin 3B elektroegirmeyle üretimi çalışmanın özgün yönlerinden biridir. Ayrıca insan kanından elde edilen PRP'nin, farklı türlerde (sıçan, fare, köpek vb.) etkisini inceleyen ve başarılı sonuçlar veren çalışmalara da literatürde sık rastlanmamaktadır. Bu sebeple, proje kapsamında kullanılacak PRP, 25 yaşlarında sağlıklı erkek bireylerden izole edilmiştir ve kemik rejenerasyonuna olan etkisi 24 Wistar Albino sıçanda kranial defekt oluşturularak gözlemlenmiştir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen (215M179), yürütücülüğünü Dr. Soner Çakmak'ın yapmış olduğu "Kemik Hasarlarının Tedavisi için Sıkıştırılabilir ve Kolay Şekil Alabilen 3-Boyutlu Kompozit Fibröz Malzemeler-Üretim, Karakterizasyon ve İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları" isimli proje kapsamında 3-boyutlu poli(L-laktik asit) (PLLA) temelli sıkıştırılabilir doku iskeleleri üretilmiştir ve proje Eylül 2017'de tamamlanmıştır. Söz konusu projede, bu iskelelerin hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklediği ancak oldukça hidrofobik yapıda oldukları görülmüştür. Üretilen kemik greftlerinin hidrofilik özelliklerinin artırılmasına yönelik yüzey modifikasyonu ve biyoaktivitelerinin artırılmasına yönelik de PRP yükleme işlemi Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda, Sena Koç'un "Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri (FYL-2018-16974)" isimli yüksek lisans tez projesi kapsamında yapılmış ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları

başarıyla tamamlanmıştır. Bu proje ise bu çalışmaların devamı niteliğinde olup *in vivo* hayvan deneylerini kapsamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kemik doku hasarlarının tedavisinde endojenik mekanizmalar tercih edildiği gibi çeşitli biyomalzemelerden hazırlanan kemik yamaları (greftler) da kullanılmaktadır. Kemik greftleri, kemik doku rekonstrüksiyonunda uyarıcı ve yer tutucu malzemeler olarak tanımlanır. Kemik greft malzemelerinde aranan başlıca özellikler; antijenik olmaması, kolayca sterillenebilmesi, revaskülarizasyon, osteoindüksiyonu ve osteokondüksiyonu artırması, defekte destek sağlaması ve kolayca şekillendirilebilir olmasıdır. Kemik greftleri otogreft, allogreft ve alloplastlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Aynı bireyde bir bölgeden alınıp başka bir bölgeye nakledilen **otogreftler**, immünolojik reddi minimuma indirme, tam doku uyumu, osteokondüktif, osteojenik ve osteoindüktif özellikleri başarılı olarak sunma gibi avantajlar sebebiyle kemik rejenerasyonunda altın standart olarak kabul edilmektedir [4]. Ancak postoperatif dönemde ağrı, donör sahanın bulunduğu yere göre gelişebilen çeşitli komplikasyonlar, ikinci bir cerrahi saha oluşması ve sınırlı miktarda elde edilebilen otogreftlerin dezavantajları arasındadır [5]. Kadavra kaynaklarından elde edilen **allogreft** kemiğin en büyük artısı, çeşitli şekillerde ve boyutlarda hazır bulunabilmesi ve donör alan morbiditesi içermemesidir. Ancak yine de, sterilizasyon yoluyla tamamen elimine edilemeyen ve büyük bir sorun olan immün yetmezlik virüsü (HIV), hepatit B ve C gibi viral hastalıkları ve bakteriyel hastalıkları taşımasıyla ilgili tartışmalar hala devam etmektedir [6, 7]. Yukarıda bahsedilen greft türlerinin yarattığı sınırlamalara bağlı olarak günümüzde insan ve hayvan kaynaklı olmayan, sentetik biyomalzemelerden hazırlanan **alloplastik** greft odaklı araştırmalar hız kazanmıştır.

Osteoprogenitör/kök hücrelerin işlevi için uygun matrikslerin tasarımı, doğal kemik hücre dışı matriksini (ECM) bileşiminin morfolojik özelliklerinin ve mekanik fonksiyonunun taklit edilmesiyle başarılabılır. Kemik ECM'sinde bulunan ve ana protein yapı olan kolajen, nanofiberlerden oluşur ve hücrel davranışları kontrol eder. Kolajen fibrillerin birleşim noktalarında ise amorf formda, kemiğe yüksek mukavemet sağlayan HAp nanopartikülleri yer almaktadır. Kemik ECM'sinin organik kısmını taklit etmek için sentetik veya doğal polimerler kullanılırken, kemiğin inorganik kısmı için ise genellikle trikalsiyum fosfat (TCP) ve HAp gibi yapılar tercih edilmektedir. Hücre dışı matriks benzeri yapıların nano boyutlardaki fiber yapıda üretiminde ise basit kurulumu ve 2/3-boyutlu üretime olanak sağlaması nedenleriyle elektroegirme yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yöntem, sıvı bir çözeltiye elektriksel alan uygulanması ilkesine dayanır. Temel olarak şırınga pompası, voltaj kaynağı ve toplayıcıdan oluşan elektroegirme yönteminde, elektriksel alana bağlı olarak şırınga ucundan çıkan polimer jeti uzayarak inceler ve toplayıcı üzerinde kesintisiz ipliksi fiberler elde edilir. Klasik elektroegirme yönteminde yüksek gözenekliliğe sahip malzemeler üretilebilmesine rağmen, üretilen malzemeler esnek değildir ve şekillendirmesi zordur. Boyuta ve esnekliğe bağlı bu dezavantajların çözümü olarak, 3B nanofiber malzemelerin üretilebileceği doğrudan ıslak olarak eğirme (wet electrospinning) ve 3B elektriksel alan oluşturabilen geometrilerle eğirme gibi tasarımlar geliştirilmiştir [8, 9]. Islak elektroegirme yönteminde klasik yöntemden farklı olarak katı metal toplayıcı yerine metanol vb. sıvılarla doldurulmuş banyo sistemi kullanılmaktadır. Yokoyama vd. (2009), poli (glikolik asit)'i (PGA) hekzafloroizopropanol (HFIP) içerisinde çözmüştür ve ıslak elektroegirme yönteminde toplayıcı olarak farklı oranlarda tersiyer bütill alkol içeren banyo sistemini kullanmıştır. Üretilen malzemenin, 3B ve köpük formunda, düşük malzeme yoğunluğunda ve yüksek gözeneklilikte olduğu görülmüştür [10]. Islak elektroegirme yönteminde toplayıcı olarak yüzey gerilimi yüksek olan su gibi sıvılar kullanıldığında, fiberlerin batmamasına bağlı olarak yoğun fibroz malzemeler elde edilmektedir. Bu nedenle uygun toplayıcı seçimine dikkat edilerek işlemin etkinliği artırılmalıdır [11]. Bir başka yaklaşım olan toplayıcı tasarımını değiştirmek ise geleneksel elektroegirme yöntemiyle 3B yapıların elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Toplayıcı üzerinde elektriksel iletkenlikten etkilenmeyen bölgeler oluşturularak çeşitli geometrilerde iskeleler üretilebilmektedir. Örneğin, bir çalışmada metal çivilerin yalıtkan bir plastik üzerine belirli bir düzende hizalanmasıyla oluşturulan toplayıcı üzerinde, 3B elektriksel alanda pamuksu formda polikaprolakton (PCL) nanofiberler toplanmıştır ve bu yapıların birçok doku mühendisliği uygulamasında kullanılabileceği gösterilmiştir [9]. İlave işlem gerektirmemesi ve ıslak elektroegirme yönteminde olduğu gibi metanol vb. herhangi bir kimyasal kullanımına ihtiyaç duyulmaması, bu yöntemin tercih edilme

sıklığını arttırmaktadır. Bu avantajlar ve hücre davranışında 3B çevrenin önemi düşünüldüğünde, doku iskelesi üretimi için uygun toplayıcı tasarımıyla 3B elektroegirme yöntemi proje kapsamında tercih edilmiştir.

Proje kapsamında gönüllü bireylerden alınan kanın santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla elde edilen trombositten zengin plazma (PRP) doku iskelelerine emdirilmiştir. Boyutları 2-4 µm ve kandaki konsantrasyon değerleri mikrolitre başına 150.000 ile 400.000 arasında olan trombositler, pıhtı oluşumu ve yara iyileşmesindeki etkin rolleri ile doku rejenerasyonunda önemli bir yere sahiptir [13, 14]. Bir yara iyileşme sürecinde bölgeye diğer birçok hücre grubu ile trombositler de göç etmektedir. Trombosit hücreleri kolajen, trombin ve kalsiyum gibi moleküller ile aktive olup bölgede stabil bir pıhtı oluşturduktan sonra trombosit içerisindeki granüllerde bulunan büyüme faktörlerinin ortama salınımıyla iyileşme sağlanır [15, 16]. Bu büyüme faktörleri farklılaşmayı indüklemek, iyileşmeyi arttırmak ve doku rejenerasyonunu desteklemekten sorumludur [17]. Trombositten zengin plazma yapısında, plateletten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri başta olmak üzere yaklaşık 600 büyüme faktörü olduğu tahmin edilmektedir [18]. Trombositten zengin plazma, sadece içerisindeki büyüme faktörleri ile değil, aynı zamanda fiziksel ve kimyasal özellikleri ile de yara iyileşmesinde etkili olmaktadır. Çünkü büyüme faktörlerinin dışında fibrinojen, laminin-8 gibi hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinde etkili olan birçok biyoaktif molekülü de yapısında barındırmaktadır [19]. PRP ayrıca, osteokondüksiyon için hücre yapışma molekülü olan ve aynı zamanda kemik, bağ ve epitel doku gelişimi için bir matriks görevi gören fibronektin ve vitronektin proteinlerini de içermektedir [20]. Son zamanlarda, PRP ile yapılan çalışmalar; tek seferde birden fazla büyüme faktörü kullanımına imkân vermesi, buna bağlı olarak maliyet etkinliğini artırması ve hastanın kendi kanından hazırlanarak immün yanıt riskini azaltması gibi sebepler sayesinde ivme kazanmıştır [21, 22].

Trombositten zengin plazmanın kişinin kendi kanından elde edilmesi sebebiyle immün bir yanıt oluşturmadığı bilinmektedir. Ancak türler arasında etkisini inceleyen çalışmalar yok denecek kadar azdır. Nakatani vd. (2017), yaptığı bir çalışmada 3 farklı insan kanından taze izole edilmiş ve liyofilize edilip distile suda çözündürülmüş iki farklı PRP formunun 6 haftalık bağışıklığı olmayan farelerdeki etkisini incelemiştir. PRP çözeltileri, TCP partikülleri ile karıştırılarak farelerde kranial defekt bölgesine implante edilmiştir ve 4. ve 8. haftalardaki doku örnekleri incelenmiştir. Histolojik ve immünohistokimyasal boyamalarla PRP konsantrasyonunun kemik rejenerasyonundaki etkinliğini artırabileceği görülmüştür [23]. Buna karşın 4 farklı bireyden izole edilen PRP ile yapılan diğer bir çalışmada ise PRP'lerin kalsiyum ve trombin ile aktivasyonunun *in vitro* olarak büyüme faktörleri salınımı ve endotel hücre bölünmesini düzenlediği ancak timüs bezi olmayan (atimik) sıçan modeliyle yapılan *in vivo* çalışmada erken veya olgun kemik oluşumunu geliştirmedeği görülmüştür. Bu bilgilerden yola çıkarak, türler arasında PRP kullanım etkinliğinin hala tartışılmakta olduğu ve daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir [24].

Sunulan proje çalışmasında, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere kolayca şekil alabilen, PRP ile biyoaktivitesi artırılmış üç boyutlu (3B) nanofibröz kompozit kemik greftlerinin geliştirilmesi ve *in vivo* etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Osteoindüktif etkiyi arttırmak için HAp nanopartikülleri, poli(L-laktik asit) (PLLA) içerisine katılmıştır ve 3B elektroegirme yöntemiyle pamuksu yapıda nanofibroz biyomalzemeler üretilmiştir. Geliştirilen malzemelerin biyoaktivitesini arttırmak için PRP izolasyonu gerçekleştirilmiş ve 25 yaşlarında sağlıklı erkek bireyler donör olarak seçilmiştir. Ardından, *in vivo* hayvan deneyleri 24 adet Wistar Albino Sıçan kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sıçanların kalvaryumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında kemik defektleri oluşturulmuştur. Erken kemikleşmeyi takip etmek için 8. hafta sonunda, geç dönem kemikleşme için de 20. hafta sonunda sıçanlardan kemik dokuları alınmış ve bilgisayarlı tomografi (mikro-CT), histoloji ve immünohistokimyasal boyama görüntüleriyle kemikleşme ve hücresel aktivite karşılaştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Tıbbi kullanıma uygun poli(L-laktik asit) (PLLA) polimeri Corbion (Hollanda) firması tarafından proje çalışmalarında kullanılmak üzere hediye edilmiştir. Sentetik vücut sıvısı (SBF) hazırlanmasında kullanılan sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ve polimeri çözmek için kullanılan 1,1,1,3,3,3- hekzafloro-2-propanol (HFIP) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Trombositten zengin plazma izolasyonunda kullanılan kitler T-Lab (Türkiye) firmasından alınmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar için kullanılan anti-osteokalsin fare monoklonal antikoru Thermo Fischer (ABD) tarafından temin edilmiştir. Histokimyasal boyamalarda kullanılan Hematoksilen & Eozin boya (Merck, Almanya) firmasından alınmıştır.

3.2. Doku İskelelerinin Üretimi

Doku iskelelerinde Sena Koç'un yüksek lisans tezinde izlenen protokol takip edilmiştir ve karakterizasyon çalışmaları tez kapsamında yapılmıştır [25]. Yöntem kısaca şöyledir: çapı yaklaşık 15 cm olan içi boş, yarım daire şeklinde bir plastik kap toplayıcı 3-B nanofibröz doku iskelelerinin üretimi için kullanılmıştır. Kabın merkezine bir metal çivi yerleştirilerek bu merkezden eşit açılı olacak şekilde aralarında 2-3 cm'lik bir boşluk olan 5 adet metal çivi hattı oluşturulmuştur. Bu bölgede birikecek fiberlerin bir cam çubuk vasıtasıyla sarılmasıyla, sıkıştırılabilir ve kolayca şekil alabilen pamuksu formda doku iskeleleri üretilmiştir. On kat deriştirilmiş SBF çözeltisi (10xSBF) hazırlanmış ve bu çözeltiden mikrodalga köktürme yöntemiyle HAp parçacıkları sentezlenmiştir [6, 7]. Poli(L-laktik asit) ($M_w = 260,000$ g/mol) polimeri, %8 kütle/hacim (w/v) derişimlerinde olacak şekilde HFIP içerisinde çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltiye, HAp nanoparçacıkları polimer kütlelerine göre %40 oranında eklenmiştir. Uygulanan voltaj 14 kV, çözelti akışı hızı 1.4 mL/sa, şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 15 cm olacak şekilde en uygun üretim koşulları belirlenmiştir. Doku iskelelerinin üretiminin ardından 0.1 M NaOH çözeltisi ile 6 saat yüzey modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu başlığı altında modifiye edilmiş kompozit malzeme grupları, modifiye olmayan gruplar (PLLA-HAp) ile kıyaslamak yapabilmek için "M" harfi kullanılarak ifade edilmiştir (PLLA-HAp/M). Ancak, çalışmalar modifiye grup üzerinden devam ettiğinden ve anlam karmaşasını önlemek için bundan sonraki başlıklarda "M" harfi kullanılmamış ve modifiye edilmiş malzeme grupları PLLA-HAp ve modifiye edilmiş PRP yüklü gruplar ise PRP+PLLA-HAp şeklinde daha kısa biçimde isimlendirilmiştir.

3.3. PRP Uygulaması

GO17/671-23 karar numaralı, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan rapor ile sağlıklı ve 25 yaşlarında "Aydınlatılmış Onam Formunu" okuyan, 3 erkek gönüllü bireyin onayının ardından Beytepe Gün Hastanesi'nde görevli sağlık personelleri tarafından kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri laminar akışlı kabin içerisinde, T-lab (Türkiye) kit protokolüne uygun olarak PRP izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur. Yöntem kısaca şu şekildedir: içerisinde pıhtılaşmayı önleyici ajan bulunan vakumlu flebetomi tüpüne 10 mL kan çekilmiştir ve hafifçe çalkalanmıştır. Kan örneği, 1500 g'de 8 dk. köktürülerek PRP izolasyonu gerçekleştirilmiştir [1]. Daha sonra % 10 CaCl_2 çözeltisi 2:5 (v/v) oranında PRP ile karıştırılıp aktivasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir [26]. *In vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılan PRP aynıdır.

3.4. *In Vivo* Hayvan Deneyleri

2019/02-15 karar numaralı, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından alınan rapor ile 200-250 g olan 24 adet bağıışıklığı olmayan Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, her bir grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanların kalvariyumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında yuvarlak şekilde biparietal kemik defektleri oluşturulmuştur. Oluşturulan defektler birbirinden bağımsız iyileştiğı ve tedavi sürecine de birbirinden bağımsız olarak yanıt verdiğı için her bir sıçandan 2 örnek elde edilmiştir. Erken ve geç dönemlerde kemikleşmeyi karşılaştırılmak için erken kemikleşmeye ait doku örnekleri 8. ve geç kemikleşmeye ait olan doku örnekleri ise 20. haftanın sonunda alınmıştır.

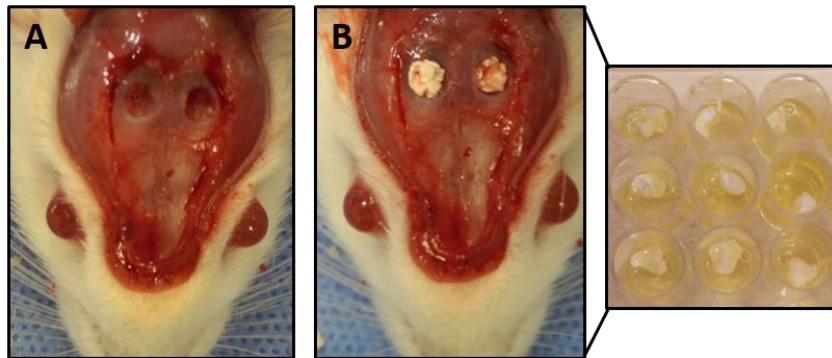
Birinci grup, kontrol grubu (n=6): Bu grupta, herhangi bir tedavi edici uygulama olmaksızın işlem tamamlanmıştır (şam grubu).

İkinci grup, otogreft (n=6): Bu grupta, defekte sıçanın kafatasından alınan kemik tozları implante edilmiştir (altın standart).

Üçüncü grup, boş greft malzemesi grubu (PLLA-HAp) (n=6): Bu grupta, defekte herhangi bir kimyasal veya biyolojik ajanın yüklü olmadığı 5 mm çap ve 3 mm kalınlığında boş PLLA-HAp kompozit greft malzemesi implante edilmiştir.

Dördüncü grup, PRP yüklenmiş greft malzemesi (PRP+PLLA-HAp) (n=6): Bu grupta, 250 µL PRP:CaCl₂ yüklü greft malzemesi 5 mm çapında ve 3 mm kalınlığındaki defekte implante edilmiştir.

Sıçanların genel anestesizinde intraperitoneal olarak gerçekleştirilerek anestezi için ketamin hidroklorür 87.5 mg/kg ve ksilazin hidroklorür 12.5 mg/kg kullanılmıştır. Anestezi etkinliğı, cilt veya parmak kısırtma testine ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirilmiştir. Cerrahi alan, gerekli asepti-antisepti prosedürlerine uygun olarak steril örtü ile örtülmüştür, kafatası ve çevresi Batikon ile temizlenmiştir. Dorsal V şeklinde bir insizyonla periost da dahil edilecek şekilde skalp flebi kaldırılarak kemik ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1A). Sagittal sütür hattına göre simetrik olacak şekilde sağ ve sol parietal kemikler üzerinde dental burr vasıtasıyla 5 mm çapta kemik defektleri oluşturulmuştur. Cerrahi işlem sırasında, %0.9 (v/v) serum fizyolojik çözeltisi ile sürekli irrigasyon uygulanarak duranın ve venöz sinusün travmatize olmamasına dikkat edilmiştir. Kaldırılan skalp flebi kemik defektlerini örtecek şekilde yerine iade edilmiştir ve cilt insizyonu 4-0 ipek sütür materyali ile yapılmıştır. Cerrahi operasyon sonrası ortaya çıkabilecek ağrıları önlemek için sıçanların içme sularına 2 mg/mL parasetamol eklenmiştir. Hayvanlar deney süreci boyunca ad libitum olarak standart yem ile beslenmiş ve genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden günlük olarak değerlendirilmiştir. Sekizinci ve 20. haftaların sonunda yüksek doz anestetik ile deneyde kullanılan hayvanlara ötenazi işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Proje kapsamında skalpte yapılan V insizyona ait A) implantasyon öncesi, B) sonrası 5 mm çapındaki kranial defekt görüntüleri.

3.5. Bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) Görüntülemesi

Bilgisayarlı tomografi (μ -CT) görüntülemesi için kurban edilen hayvanlardan alınan kranial kemikler %10 fosfat formalin içeren çözelti içine bırakılarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Mikro-CT öncesi örnekler, hızla sertleşen bir macun vasıtasıyla bulundukları kaplara sabitlenmiştir ve böylelikle tarama süresince hareket etmemeleri sağlanmıştır. Elde edilen kemik dokularının μ -CT yöntemiyle tarama işlemi Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜNİTEK) gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri Skyscan (Bruker) marka 1272 model X-ışınları tomografisi ile görüntülenmiştir ve ham X-ışınları tomografisi verileri NRecon (Skyscan) yazılımı ile yeniden oluşturulmuştur. Yeniden oluşturulan kesitler CTvox ve CTAn (Skyscan) yazılımları ile analiz edilmiştir. Bu kesitlerde kemikte açılan defekt kadar bir alan (region of interest-ROI) oluşturulmuştur ve yeni oluşan kemik yüzdesi kemik hacmi/defekt hacmi (BV/TV) oranı kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca, farklı yoğunluklardaki hidroksiapatit fantomu ile kalibrasyon yapılarak kemik mineral yoğunluğu (BMD) da hesaplanmıştır.

3.6. Histolojik Analiz

Dokular % 10 nötr tampon formalin çözeltisi içinde fikse edilmiş ve formik asit çözeltisiyle dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyondan sonra numuneler etanol serisinde dehidre edilmiş, ksilende temizlenmiştir ve ardından parafine gömülmüştür. Sürgülü bir mikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile 10 μ m kalınlığında kesitler alınmış ve bu kesitler Hematoksin ve Eosin (H&E) ile boyanmıştır. Histolojik değerlendirme ilgili literatüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir [27].

Histolojik skorlama kemik kesit alanı, kemik olgunluğu ve hücresel aktiviteye göre yapılmıştır. Her segment, iki gözlemci tarafından 0-4 puanlık bir skalaya göre puanlanmıştır. Dokular 10X ve 40X büyütme altında değerlendirilmiş ve puanlama sistemi Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Kemik rejenerasyonunun histolojik analizi için skorlama sistemi.

Skor	Kemik Kesit Alanı
0	Kemik oluşumu gözlenmemiştir
1	Greftin %1-25'i kemik oluşumu gösterir
2	Greftin %26-50'i kemik oluşumu gösterir
3	Greftin %51-75'i kemik oluşumu gösterir
4	Greftin %76-100'ü kemik oluşumu gösterir
Skor	Kemik Olgunluğu
1	Kemik oluşumu yok
2	Olgunlaşmamış/Organize değil
3	Olgunlaşmamış
4	Olgun
5	Olgun/Organize
Skor	Hücresel Aktivite
0	Yok
1	Nadir
2	Az
3	Orta
4	Yoğun

Streptavidin-biyotin peroksidaz yöntemi, önceki protokollere bağlı olarak immünohistokimyasal inceleme için kullanılmıştır [28]. Kemikteki hücresel aktiviteyi incelemek için yeni oluşan dokularda Kolajen tip I (1/200, C2456, Sigma, ABD) ve BMP-2 (1/100, ab6285, Abcam, İngiltere) proteinleri

incelenmiştir. Kısaca yöntemde, kesitler kademeli alkol serileri ve ksilol ile dehidre edilmiştir ve parafinden arındırılmıştır. Dokular, PBS içerisinde 15 dk. yıkanmıştır ve endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için % 3 metanol içerisinde 20 dk. hidrojen peroksit ile işlenmiştir. Fosfat tampon çözeltisi içinde üç kez yıkandıktan sonra, dokular 10 dk. boyunca normal serum ile inkübe edilmiştir. Daha sonra birincil antikorlar içerisindeki dokular 4°C'de 1 gece muhafaza edilmiştir. Ertesi gün, dokular PBS ile tekrar yıkanmış ve 20 dk. boyunca biyotinlenmiş ikincil antikor (Thermo Scientific, TP-125 HL) uygulanmıştır. Ardından, dokulara streptavidin alkalın fosfataz konjugatı (Thermo Scientific) 30 dk. boyunca eklenmiştir ve örnekler PBS ile yıkanmıştır. Örnekler DAB kromojeni (3,3 diaminobenzidin, S3309; Dako) ile inkübe edilerek Mayer'in hematoksilini ile karşı boyanmıştır. Kontroller için, kesitler kullanılan birincil antikora bağlı olarak uygun izotip fare ve tavşan IgG ile muamele edilmiştir. Boyanan bölümler ışık mikroskobu (Olympus BX43, Hamburg, Almanya) altında incelenmiştir ve 10X ve 40X altında fotoğraflanmıştır.

İmmünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi daha önce uygulanan protokollere bağlı olarak H-skoru analizleriyle değerlendirilmiştir [29]. Kolajen tip 1 ve BMP-2 immünoreaktivitelerinin yoğunlukları yoğunluk kategorileri kullanılarak yarı kantitatif olarak incelenmiştir. Her kesitte, rastgele seçilen 5 alan bir ışık mikroskobu (40X objektif) altında değerlendirilmiştir ve her iki gözlemcinin de ortalama puanı kullanılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

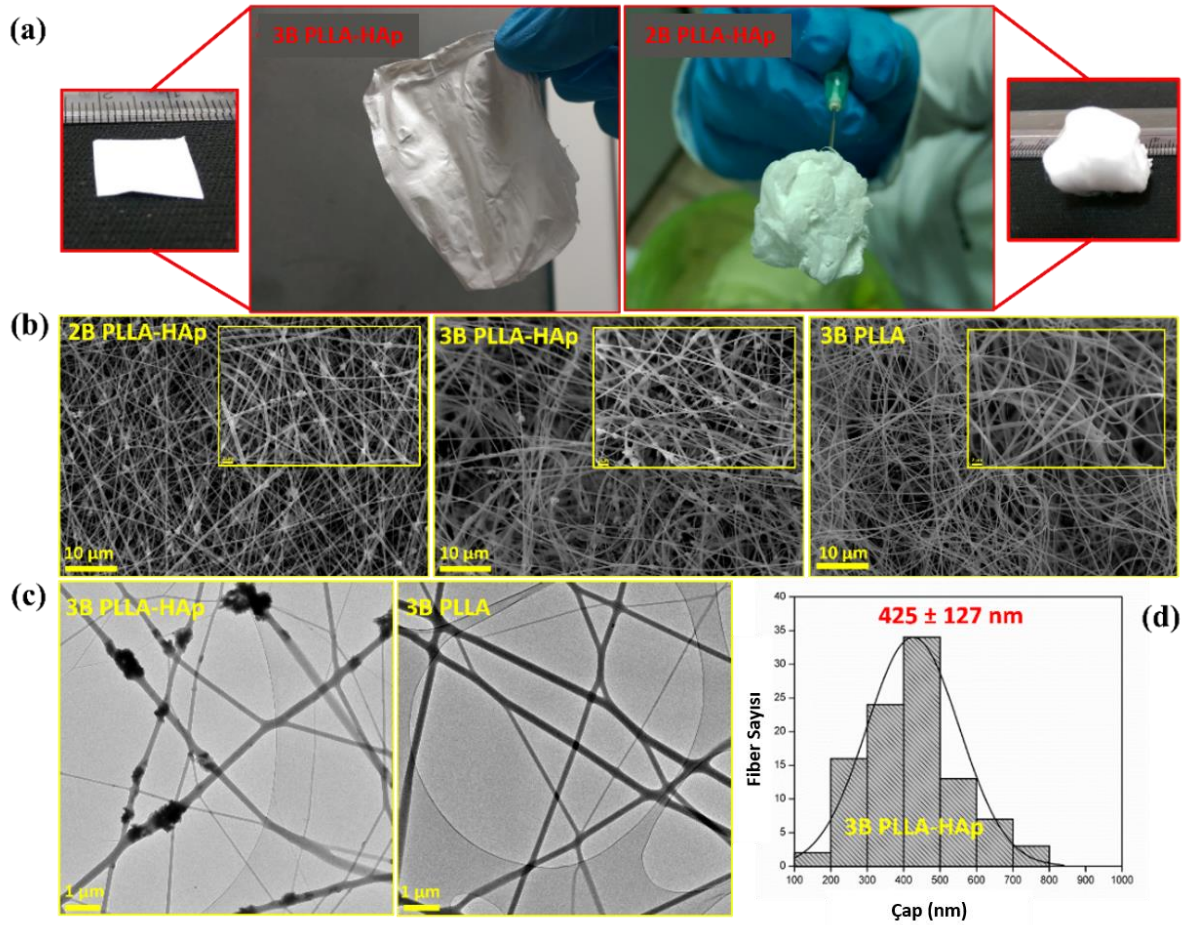
İstatistiksel analiz, Graphpad Prism 6 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte 3 bağımsız tekrar yapılarak sunulmuştur. Gruplar arası kıyaslama için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), grup içi kıyaslama da ise t-test kullanılmıştır. En düşük $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Amorf yapıdaki HAp nanopartiküller ve 3B sıkıştırılabilir doku iskeleleri, Çakmak vd. (2016) tarafından yürütülen TÜBİTAK 3001 Projesi'ndeki optimum koşullar ve yöntemler izlenerek üretilmiştir (Şekil 2) [25]. Nanofiberlerin yüzey modifikasyonu sonrası karakterizasyon çalışmaları, PRP uygulamalarıyla ilgili çalışmalar ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları FYL-2018-16974 numaralı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi lisansüstü tez projesi kapsamında başarıyla tamamlanmıştır [26]. Bu proje ise bu çalışmaların devamı niteliğinde olup hayvan deneylerini kapsamaktadır.

Hâlihazırda, ortopedik cerrahi işlemlerinde blok, granül ya da çimento formunda trikalsiyum fosfat (TCP), hidroksiapatit (HAp) ya da bunların karışımları veya biyocam gibi seramik malzemeler kullanılmaktadır. Ancak bu malzemeler, kemik hasarının düzgün geometride olmadığı durumlarda, ameliyat sırasında şekillendirme güçlüğü ya da kırılma gibi dezavantajlar göstermektedir. Dolayısıyla, geliştirilen biyomalzemenin, esnek yapıda, kolaylıkla şekillendirilebilir ve sıkıştırılabilir olması, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarında, cerraha zaman, süre ve enfeksiyon riskinin azaltılması gibi önemli avantajlar kazandırabileceği düşünülmektedir (Şekil 2a, sağ).

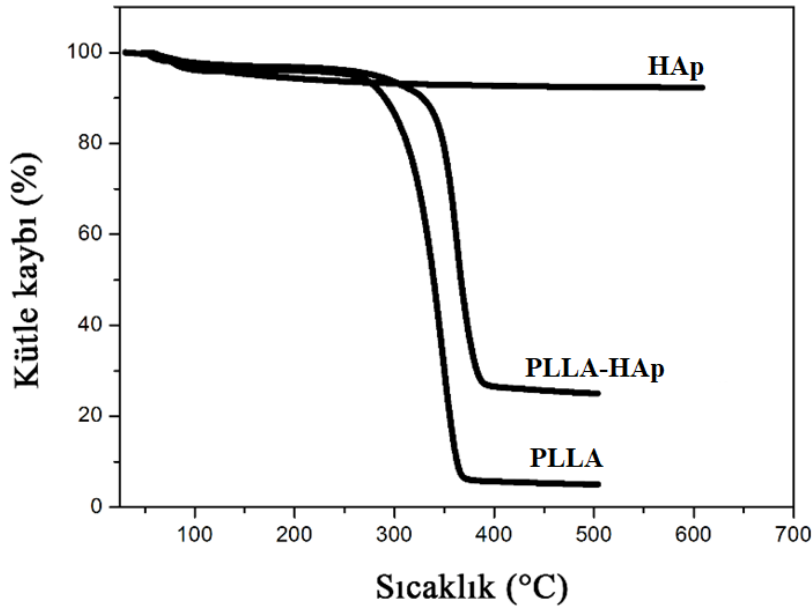


Şekil 2. (a) Farklı boyutlardaki (2B ve 3B) PLLA ve PLLA-HAp matrislerinin makroskopik, (b) SEM, (c) TEM görüntüleri ve (d) 3B PLLA-HAp matrislerine ait çap dağılımlarını gösteren histogram [25, 26].

Kemik ekstraselüler matrisi (ECM), temelde çapları 50-500 nm arasında değişen nanofiber formunda, yapısıyla hücre davranışlarını kontrol eden kolajen proteininden oluşur ve kolajen nanofiberlerin arasına amorf formda HAp nanoparçacıklar yerleşmiştir [30]. Üç-boyutlu PLLA-HAp greft gruplarının ortalama

nanofiber çapı 425 ± 127 nm olarak bulunmuştur ve bu sonuç kemik ECM'sinde bulunan kolajen nanofiberlerin çaplarıyla uyumludur. Ayrıca, SEM görüntülerinin Image J programına aktarılmasıyla 2-boyutlu doku iskelelerindeki gözenek büyüklükleri 2-10 μm , 3-boyutlu biyomalzemelerdeki gözenekler ise 30-50 μm olarak hesaplanmıştır. Bu da 3-boyutlu üretimle, çok daha büyük gözenek çaplarında nanofiber doku iskeleleri elde edilebildiğini göstermiştir.

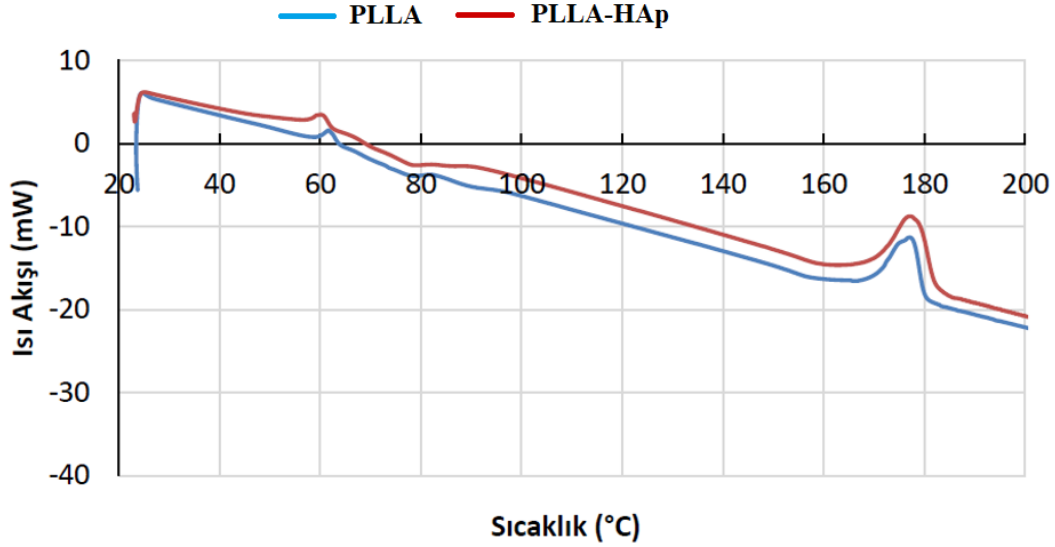
Poli(L-laktik asit) yavaş bozunan bir polimerdir ve Şekil 3'te verilen termograma göre tek basamaklı bir süreçle bozunmaktadır. Poli(L-laktik asit) doku iskeleleri, 275°C'de bozunmaya başlamıştır ve maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklık 350°C olarak bulunmuştur. Sentezlenen HAp 600°C'ye kadar neredeyse hiç bozunmamış ve termal olarak kararlı kalmıştır. Hidroksiapatit içeren PLLA kompozit doku iskeleleri ise 300°C'de bozunmaya başlamıştır ve bozunmanın maksimum hızla gerçekleştiği sıcaklığın 364°C olduğu görülmüştür. Böylelikle, yapıya HAp'ın katılmasıyla PLLA'nın termal özelliklerinin iyileştiği sonucuna ulaşılmıştır. Iqbal vd. [31], kolajen/aljinat/HAp'ı farklı oranlarda kullanarak elde edilen malzemenin mekanik ve antibakteriyel testler ile kemik dolgu maddesi olarak kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Geliştirilen biyomalzemenin yapısına %40, %50, %60 ve %70 oranlarında HAp katılmıştır ve TGA sonuçları ile % 70 HAp içeren malzemenin, daha yüksek sıcaklıkta bozunduğu ve kütle kaybının diğer gruplardan daha az olduğu görülmüştür. Bu durum, HAp varlığında malzemelerin termal özelliklerinin artmasının literatürle uyumlu olduğunu desteklemektedir.



Şekil 3. Hidroksiapatit ve PLLA greftlerinin TGA termogramı [25, 26].

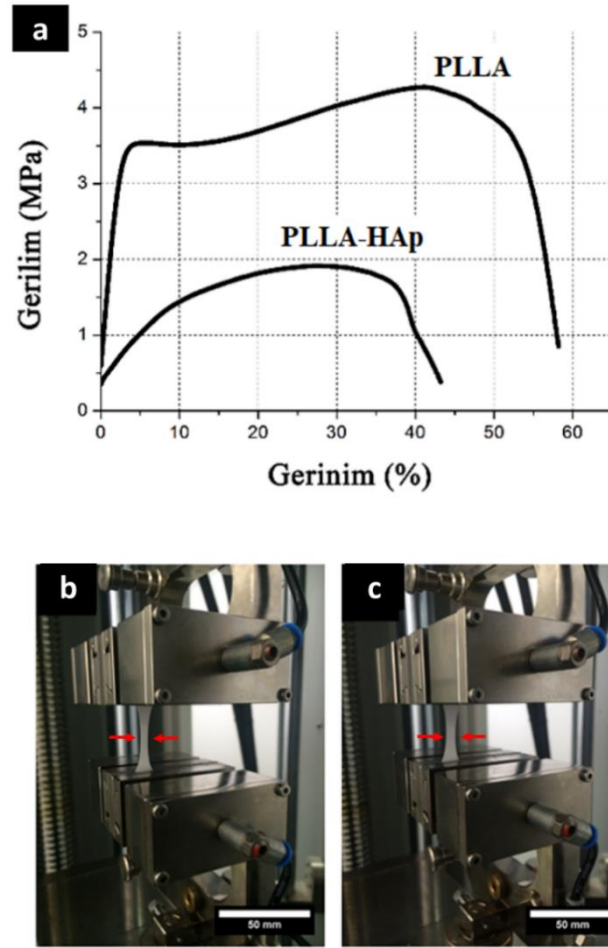
Laktik asit kiral bir moleküldür ve L- ve D- laktik asit olmak üzere doğada optik olarak iki aktif formda bulunur. Bu monomerlerin polimerizasyonu ile yarı-kristalin polimerler elde edilir. Tez kapsamında kullanılan PLLA, ~%37 kristaliniteye sahip bir polimerdir ve kristalinite derecesi molekül ağırlığına ve işleme yöntemine göre değişebilmektedir [32]. Literatür verilerine göre PLLA'nın camsı geçiş sıcaklığı 60-65°C aralığındadır, erime sıcaklığı ise ~175°C'dir [32]. Çalışma kapsamında hazırlanan PLLA ve PLLA-HAp fiber doku iskelelerine ait DSC termogramları Şekil 4'te gösterilmiştir. Her iki malzeme için de 61.6 ve 60.3°C'lerde görülen pikler PLLA'nın camsı geçiş sıcaklığını göstermektedir. Poli(L-laktik asit) ve PLLA-HAp için erime entalpileri sırasıyla 33.6 ve 43.6 J/g bulunmuş ve bunlara karşılık gelen % kristalinite değerleri %36 ve %47 olarak hesaplanmıştır. Buradan yola çıkarak, PLLA'nın yapısına HAp katılmasıyla kompozit malzemenin % kristalinitesinin arttığı görülmüştür.

Bir çalışmada, HAp ile desteklenmiş poli (eter-eter-keton) (PEEK) kompozitlerinin yük taşıyan kemikler için implant malzemesi olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Geliştirilen malzemelerin kristalinitesi yoğunluk analizi ve DSC ile incelenmiştir ve DSC sonuçlarına göre, HAp miktarıyla kristalinitenin %26.8'den %30.6'ya arttığı görülmüştür [33]. Bir başka çalışmada ise HAp partikülleri kütle oranı (polimer/HAp) 98/2 ve 80/20 aralığında olacak şekilde PLLA ile kullanılarak kompozit yapılar elde edilmiştir. Hidroksiapatit miktarıyla beraber, erime sıcaklığı, entalpisi ve kristalinite artarken camsı geçiş sıcaklığının düştüğü görülmüştür [34]. Dolayısıyla, PLLA-HAp greftlerine ait termal analiz sonuçları literatürle uyumludur.



Şekil 4. PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait DSC termogramı [25, 26].

Poli(L-laktik asit) doku iskelelerine ait tipik gerilim-gerinim eğrisi Şekil 5'te verilmiştir. Çekme testlerinde analiz düzgün geometride örneklerle gerçekleştirilebildiğinden analiz için benzer nanofiber çaplarında ve aynı PLLA-HAp kütle oranında olacak şekilde iki boyutlu (2B) matriksler üretilmiştir. PLLA doku iskeleleri için elastik modülü 80.4 ± 24.2 MPa, kopma noktasındaki maksimum dayanım 4.25 ± 0.80 MPa ve % uzama 43 ± 12 olarak bulunmuşken bu değerler PLLA kompozit doku iskeleleri için sırasıyla 15.9 ± 3.5 MPa, 1.7 ± 0.3 MPa ve 22.0 ± 5.0 olarak hesaplanmıştır. Yapıya HAp'ın eklenmesiyle PLLA'nın elastik modülü yaklaşık 5 kat, kopma noktasındaki maksimum güç yaklaşık 2.5 kat azalmıştır. Kemik dokusunun inorganik ve kırılgan bir bileşeni olan HAp seramiğinin aşırı miktarı, tahmin edildiği gibi kompozit yapının elastikliğini değiştirerek yapıyı daha kırılgan hale getirmiş ve mekanik özelliklerini azaltmıştır. Ancak makroskobik incelemelerde ve *in vivo* çalışmalarda geliştirilen greft malzemesinin geometrisi düzgün olmayan kemik hasarında bölgenin şeklini rahatlıkla alabildiği ve yeterince esnek olduğu ve sıkıştırılabilir formunu koruduğu görülmüştür.



Şekil 5. a) PLLA ve PLLA kompozit doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrisi ve b) PLLA ve c) PLLA-HAp kompozit doku iskelelerin kopma öncesi uzama oranlarını gösteren kamera görüntüleri (n=3) [25, 26].

Elde edilen tüm bu sonuçlar PLLA ve PLLA-HAp doku iskeleleri için karşılaştırmalı olarak Çizelge 2’de sunulmuştur.

Çizelge 2. PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait termal ve mekanik özellikler [25, 26].

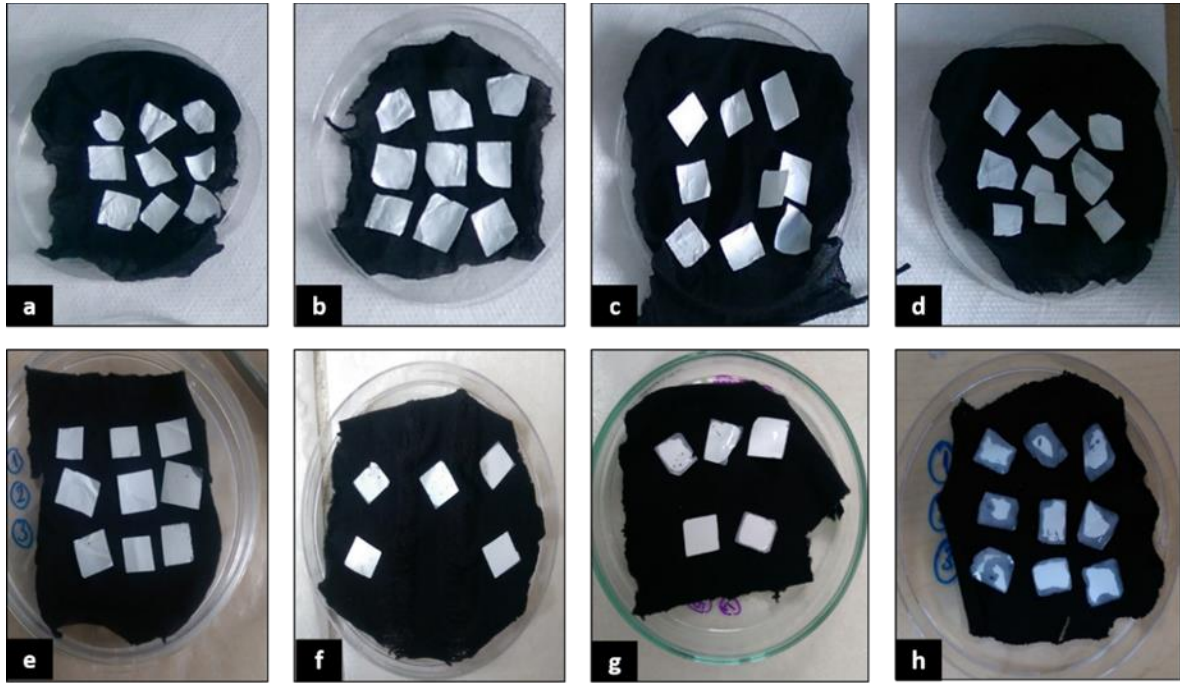
	PLLA	PLLA-HAp
Ortalama çap (nm)	460 ± 147	425 ± 127
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	61.6	60.3
Erime entalpisi (J/g)	33.6	43.6
Kristanilite (%)	36	47
Elastik modül (MPa)	80.4 ± 24.2	15.9 ± 3.5
Maksimum dayanım (MPa)	4.25 ± 0.80	1.7 ± 0.3
Uzama (%)	43.0 ± 12.0	22.0 ± 5.0

4.1.1. Nanofiber Yüzeylerin Modifikasyonu

Hücresel yapışma ve çoğalma, biyomalzemenin topografisiyle ilişkilendirilmektedir. Poli(L-laktik asit) FDA onaylı ve doku mühendisliği uygulamalarında başarılı sonuçlar veren bir polimer olsa da hidrofobik yapısı nedeniyle proteinlerin, dolayısıyla da hücrelerin doku iskelelerine rahatça tutunup çoğalmasını

kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için ultraviyole (UV) ışınması ile serbest radikalleri ortaya çıkaran yüzey aşılama polimerizasyonu, hava, argon vb. gazlar yardımıyla gerçekleştirilen plazma işlemi ve kimyasal ajanlarla ıslak aşındırma yöntemi gibi çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir [35].

Su temas açısı analizi düzgün geometrideki örneklerle gerçekleştirilebildiğinden, yüzey modifikasyonunun HAp içeren ve içermeyen greft malzemelerin ıslatılabilirlik özelliklerine etkisi 3B elektroçizme ile aynı koşullarda üretilmiş 2B nanofiber biyomalzemeler ile incelenmiştir. İki-boyutlu elektroçizme ile üretilen doku iskelelerinin su temas açısı ölçümleri PLLA ve PLLA-HAp için sırasıyla $131.5 \pm 2.3^\circ$ ve $128.2 \pm 3.1^\circ$ olarak bulunmuştur. Hidroksiapatitin yapıya katılmasının hidrofilisitede anlamlı bir fark yaratmadığı ve iki grubun da hidrofobik olduğu görülerek modifikasyon işlemleri PLLA doku iskeleleri üzerinden gerçekleştirilmiştir ve sonrasında belirlenen uygun koşullar 3B PLLA-HAp grubuna uygulanmıştır. İki saat süreyle iki boyutlu olarak üretilen PLLA doku iskeleleri NaOH muamelesi için kullanılmıştır. Doku iskeleleri yaklaşık $1 \times 1 \text{ cm}^2$ alana sahip olacak şekilde kesilmiş ve çalışmalar 3 paralel üzerinden gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonunda kullanılan PLLA örneklerinin kütleleri yaklaşık 10 mg olacak şekilde seçilmiştir. PLLA için örnekler 0.1, 0.2 ve 0.5 M NaOH çözeltisinde 1 saat bekletilmiştir ve 0.5 M ve 0.2 M NaOH içerisindeki yapıların bozunmaya başladığı, 0.1 M'de ise herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Bu sebeple uygun NaOH derişimi 0.1 M olarak belirlenmiş ve 5, 10, 15 ve 30 dakika ve 2, 4, 5 ve 6 saat süreleri denenerek su temas açısı ölçüm sonuçlarına göre uygun modifikasyon süresi belirlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş 2 boyutlu PLLA doku iskeleleri a) 5 dk, b) 10 dk, c) 15 dk, d) 30 dk ve e) 2 sa, f) 4 sa, g) 5 sa, h) 6 sa [26].

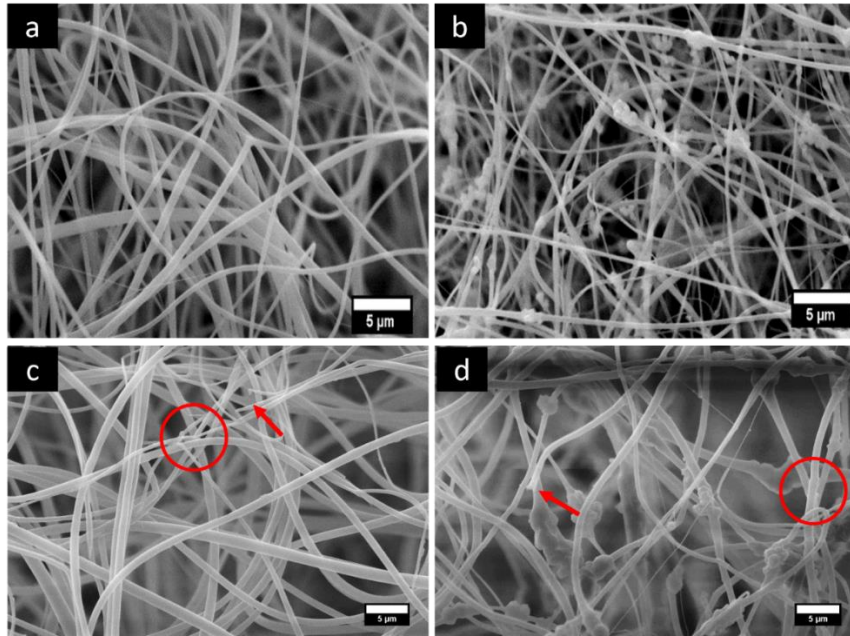
Çizelge 3'te NaOH modifikasyon süresinin artmasıyla su temas açısının azaldığı görülmüştür ve bu sonuçlara paralel olarak modifikasyon için örneklerin 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde 6 saat bekletilmesine karar verilmiştir. Literatürde yapılan bir çalışmada PLA doku iskelesinin farklı yöntemlerle modifiye edilmesinin su temas açısını $69-72^\circ$ aralığında değiştirdiği ve modifiye edilen doku iskelelerinin hücre yapışmasını desteklediği görülmüştür [36]. Bir başka çalışmada ise PLGA doku iskelesinin 5 dk süreyle 0.1 M NaOH modifikasyonu sonucu su temas açısının 98 dereceye düştüğü ve bu doku iskelelerine hücre yapışmasının arttığı belirlenmiştir [37]. Su temas açısı ölçüm sonuçları literatürle

kıyaslandığında, modifikasyon işleminin hücrelerin malzeme yüzeyine tutunup yapışmasını destekleyeceği düşünülmektedir.

Çizelge 3. Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş iki boyutlu PLLA doku iskelelerine ait su temas açısı değerleri [26].

5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	2 sa	4 sa	5 sa	6 sa
123.1±8.1	117.1±11.8	121.9±6	106.3±8.3	113.9±5.3	118.1±6.9	107.9±12.5	73.8±12.3

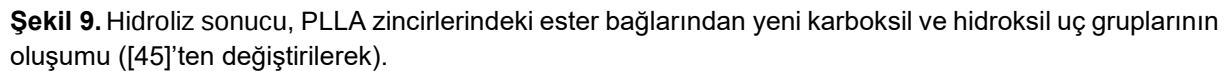
Şekil 7’de verilen SEM görüntüsü, yüzey modifikasyonunun fiberlerin genel itibariyle morfolojisini koruyarak yapıyı bozmadığı ve başarılı bir şekilde uygulandığını göstermiştir. Sodyum hidroksit kullanımının, fiber yüzeylerde gözenek miktarının artmasına sebep olduğu ve NaOH derişimiyle hidroliz şiddetinin arttığı bilinmektedir [38]. Şekil 7c ve d’ye bakıldığında gözeneklerin modifikasyon uygulanmayan gruplara kıyasla daha büyük boyutta olduğu görülmektedir. Modifikasyon gruplarında gözenek boyutları yaklaşık $\sim 70 \mu\text{m}$ ’ye kadar ulaşmıştır. Literatürde gözenek boyutu $70\text{--}250 \mu\text{m}$ aralığında olduğu zaman kemik hücrelerinin büyümesinin desteklendiği gösterilmiştir ve buradan da çalışmada geliştirilen greft malzemelerin literatürle uyumlu olarak kemik doku rejenerasyonunu destekleyebileceği düşünülmüştür [39]. Ayrıca, alkalizasyonun yüzey topografisini değiştirdiği ve pürüzlülüğü arttırdığı bilinmektedir. Yoon vd. [40], pürüzsüz bir yüzeyin hücre yapışması için yeterli olmadığını göstermişlerdir. Şekil 7c ve d’de daire içine alınarak gösterilen bölgelerde fiber yüzeylerindeki pürüzlülüğün literatüre benzer şekilde arttığı görülmüştür.



Şekil 7. Üç-boyutlu malzemelere ait SEM görüntüleri a) PLLA, b) PLLA-HAp, c) PLLA/M, d) PLLA HAp/M (M: NaOH modifikasyonu). Oklar kopan fiberleri, daireler ise fiber yüzeyinde meydana gelen pürüzlülüğü göstermektedir [26].

Şekil 8’de HAp, PLLA ve PLLA-HAp kompozit doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, $1000\text{--}1500$, $1700\text{--}1800$ ve $2900\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralıklarında PLLA polimerine ait karakteristik pikler görülmektedir [41]. 1749 , 1178 , 1128 ve 1083 cm^{-1} ’de görülen pikler PLLA ana zincirindeki ester gruplarına ait karakteristik absorpsiyon bandlarına aittir [41]. Hidroksiapatitin yapıya katılmasıyla 558 , 605 ve 1020 cm^{-1} ’de görülen yeni pikler fosfat gruplarının varlığını

Hidroлиз reaksiyonu sonucunda, ester bağları karboksil ve hidroksil grupları oluşturmaktadır (Şekil 9) [42]. Modifikasyon sonrasında C=O bandının şiddetindeki azalma yapıdaki ester gruplarının karboksilik asit oluşumunu sağladığı ve yapının hidrofilitesinin arttığını göstermektedir [43]. PLLA ana zincirindeki ester gruplarına ait 1178, 1128 ve 1083 cm^{-1} 'de görülen piklerin şiddetindeki azalmalarla NaOH etkisi doğrulanmıştır. 1 M NaOH kullanılarak yapılan bir çalışmada PLLA fiberlerin FTIR spektrumunda 3200-3500 cm^{-1} aralığında değişim gözlenmiştir ve bunun NaOH konsantrasyonuna bağlı olarak artan -OH- etkisi sonucunda olduğu düşünülmüştür [44]. Şekil 8'de bu şekilde anlamlı bir değişim görülmemiştir ve bu durumun düşük molaritede NaOH tercih edilmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.



15

Çizelge 4. NaOH modifikasyonu uygulanan ve uygulanmayan greft gruplarının karakteristik özellikleri [26].

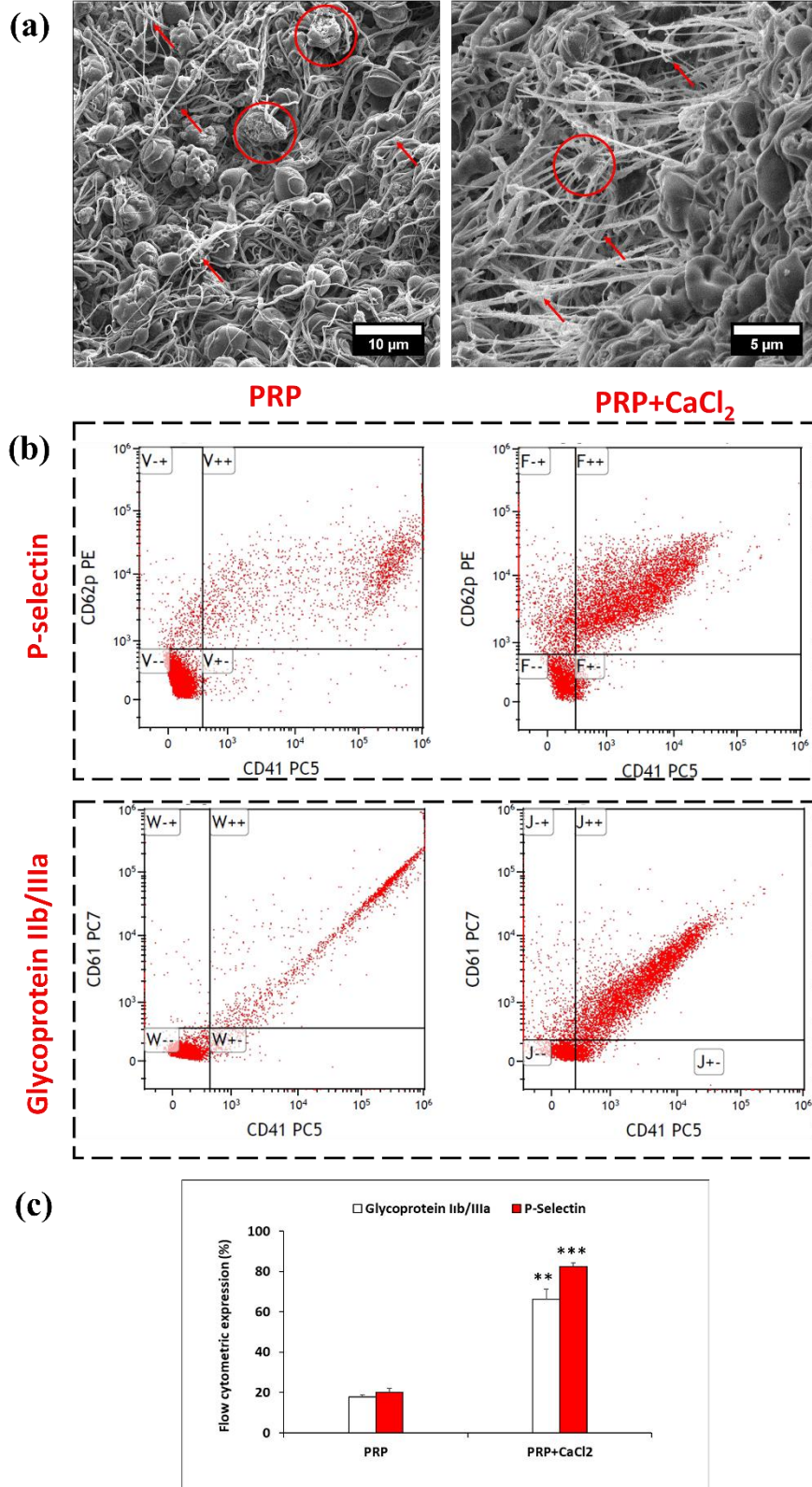
Malzemeler	Ortalama çap (nm)	Su temas açısı (°)	Kütlece bozunma (%)	Su tutma kapasitesi (%)
PLLA	460 ± 147	131.5 ± 3.3	3.0 ± 0.8	942 ± 325
PLLA/M	492 ± 196	73.8 ± 12.3	-	1194 ± 206
PLLA-HAp	425 ± 127	128.2 ± 2.5	5.0 ± 0.9	431 ± 188
PLLA-HAp/M	508 ± 102	84.2 ± 8.1	10.0 ± 0.8	705 ± 405

İlk 10 günde tüm grupların su tutma kapasitelerinde çok hızlı bir artış olmuş, sonrasında dengeye ulaşılmıştır. Yirmi sekiz gün sonunda yukarıdaki çizelgede verildiği üzere modifiye edilmiş doku iskelelerinin modifiye edilmemiş olanlara kıyasla su tutma kapasitesi değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler, alkali muamelesinin, iskelelerin hidrofilisitesini arttırdığını doğrulamaktadır. Poli(L-laktik asit) yarı kristalin ve hidrofobik bir polimerdir ve biyobozunurluğu *in vitro*'da 1-2 yıl arasında değişmekle birlikte yapılan bir çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip PLA'nın tamamen emiliminin *in vivo* süreçte 2 ile 6 yıl arasında gerçekleştiği rapor edilmiştir [32]. Çizelge 4'ten görüldüğü üzere 58 günlük bir biyobozunma sürecinde PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerindeki kütle kaybı yaklaşık %4-5 seviyelerinde gerçekleşirken, modifiye edilen PLLA-HAp/M gruplarında bu oran %10 olarak bulunmuştur. Modifiye grubunun 2 aylık süre sonunda %10 bozunmasıyla, orta dönemde iyileşmesi beklenen kemik hasarlarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, PRP uygulaması ve diğer çalışmalar için uygun malzeme grubu olarak 0.1 M NaOH içerisinde 6 saat muamele edilen kompozit PLLA-HAp/M seçilmiştir.

Bundan sonraki başlıklarda, seçilen kompozit malzeme grubu PLLA-HAp olarak isimlendirilmiş, PRP destekli olan gruplar ise PRP+PLLA-HAp olarak ifade edilmiştir.

4.2. PRP Uygulaması

Trombositçe zengin plazmanın (PRP), trombosit aktivasyonunu sağlayan kalsiyum ile muamelesinin fibrin ağ oluşumuna yol açtığı bilinmektedir [46-49]. Trombositlerin boyutları 2-4 µm olup Şekil 10'da gösterilen yapı büyüklükçe ve fibrin ağ yapısı bakımından literatürle uyumludur. Trombositlerin dinlenme durumlarındaki küresel tipik morfolojide değil, aktivasyona yönelik oval morfolojide olduğu görülmüştür [50]. Trombosit aktivasyonunun belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise akış sitometrisidir. Akış sitometrisi, granüllerin trombosit membranına yapışarak hücre yüzeyinde ortaya çıkan P-selektin (CD62) ve glikoprotein-IIb/IIIa (CD41/61) gibi proteinlerin fibrinojene bağlanması sonucu oluşturduğu yeni epitopların antikor kullanımıyla belirlenmesi ilkesine dayanır [51]. Aktivasyonun en önemli belirteçlerinden olan CD62 ve CD41/61 yüzdesi, PRP örneklerine kıyasla, CaCl₂ ile karıştırılmış PRP örneklerinde yaklaşık 4 kat fazla bulunmuştur (Şekil 10b ve c).

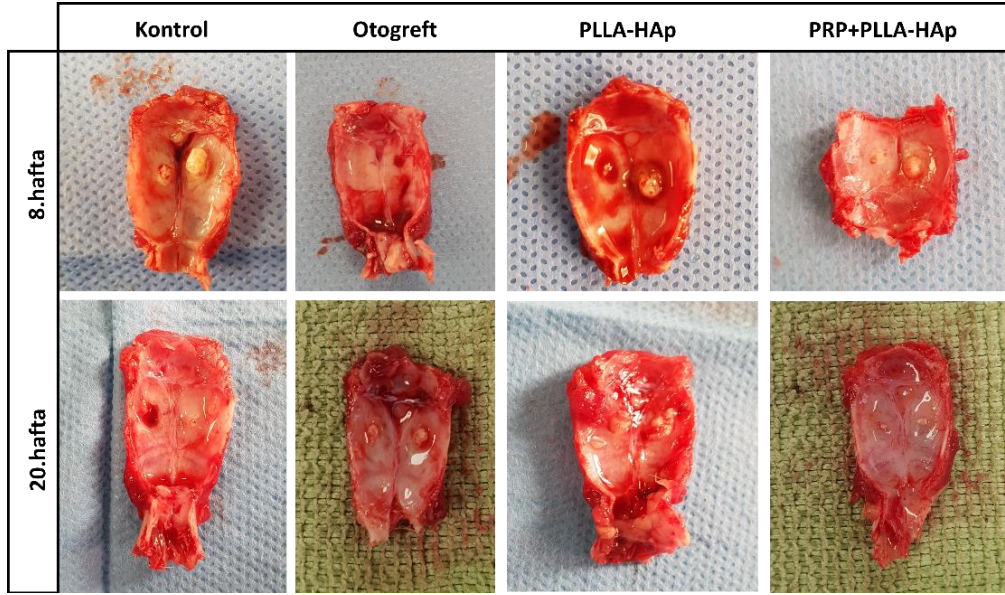


Şekil 10. (a) PRP+PLLA-HAP doku iskelesinin CaCl₂ aktivasyonu sonrası SEM görüntüleri. Kırmızı daireler trombositleri, oklar ise fibrin ağ yapısı göstermektedir. (b) ve (c) aktive edilmiş ve aktifleştirilmemiş trombositlerin P-selektin ve GP IIb/IIIa ifadelerinin akış sitometrisi sonuçları (n=3). PRP (inaktif) grubu kontrol grubu olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. [26].

4.3. İn Vivo Çalışmalar

4.3.1. Klinik Gözlem

Makroskobik incelemede kontrol grubunda 8. ve 20. haftalık grupların her ikisinde de defekt bölgesinin dolduğu, ancak kemikleşme yerine sadece ince bir membran yapısının olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 11). Altın standart olarak kabul edilen otogreft yönteminde, 8. hafta sonunda defektlerin kapanıp kemikleşmenin başladığı görülmüştür. Yirminci hafta sonunda elde edilen görüntülerde de kemikleşmenin devam ettiği ancak fibröz tabakaların da olduğu tespit edilmiştir. Herhangi bir kimyasal veya biyolojik ajanın yüklü olmadığı greft (PLLA-HAp) ve PRP yüklenmiş greft grubu (PRP+PLLA-HAp) incelendiğinde 8. ve 20. hafta örneklerinde herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu ya da enfeksiyon gözlenmemiştir. Sekizinci hafta sonunda elde edilen örneklerde greft malzemelerinin bozunmadığı ve üzerinde fibröz bir membran tabakasının olduğu görülmüştür. Yirminci hafta sonunda elde edilen PRP yüklü örnek gruplarında ise greftlerin büyük bir çoğunluğunun bozunmaya başladığı ve PLLA-HAp gruplarının aksine fibröz bağ dokusundan ziyade kemik benzeri dokuların geliştiği gözlemlenmiştir. Klinik gözlem sonucunda, 20. hafta örneklerinde greft gruplarında malzemenin büyük bölümünün bozunduğu ayrıca PRP yüklenmiş greft gruplarında, otogrefttekiler gibi kemik benzeri dokuların geliştiği tespit edilmiştir.



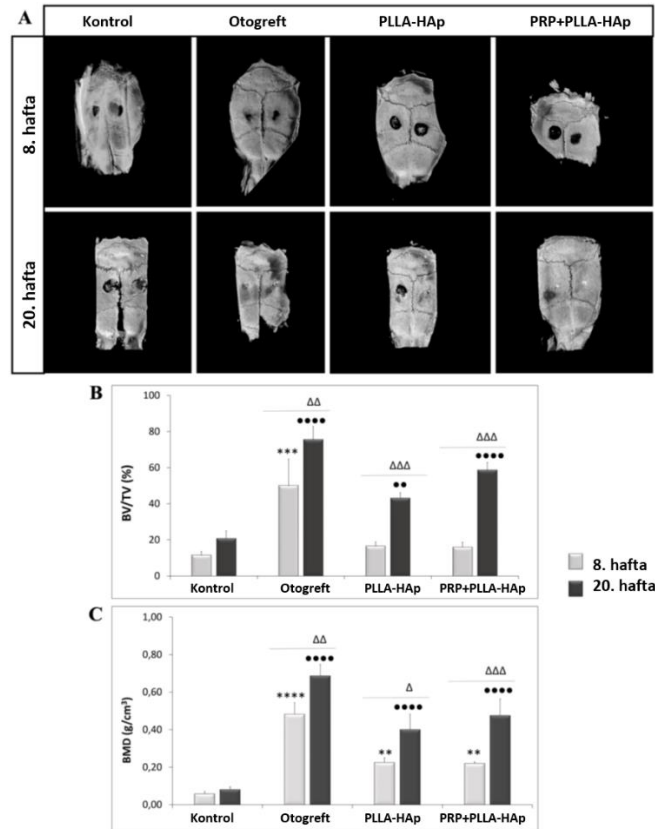
Şekil 11. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonundaki kemikleşme.

4.3.2. Bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) Görüntülemesi

Doku örneklerine μ -CT analizi yapılmış ve analiz görüntüleri Şekil 12'de verilmiştir. Mikro-CT görüntülerinde, 8. haftanın sonunda tüm gruplarda defekt bölgesinin büyük bölümünün iyileşmediği ve kemik rejenerasyonu için bu sürenin yeterli olmadığı görülmüştür. Yirminci haftanın sonunda ise klinik gözlemdaki sonuçlara benzer olarak otogreftlerde defekt bölgesinin neredeyse tamamen dolduğu ve PRP yüklenmiş greft gruplarında, otogrefttekiler gibi kemik benzeri dokuların geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 12A). Kantitatif analiz için ise CTVox ve CTAn (Skyscan, Bruker, İngiltere) yazılımlarıyla sadece defekt bölgesinde oluşan yeni kemik hacmi ölçülmüştür ve bu değerler 5 mm çapındaki defekt hacmine oranlanmıştır. Böylece yeni oluşan kemik yüzdesi kemik hacmi/defekt hacmi (BV/TV) oranı kullanılarak hesaplanmıştır. Sekizinci haftada gruplar arasında kontrol grubuna göre sadece otogreftteki iyileşme anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p < 0.001$), 20. haftanın sonunda kemik rejenerasyonunun her grupta arttığı ve gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Şekil 12B). Çalışma sonunda, en

yüksek kemik rejenerasyonu %76 olup, beklenildiği gibi altın standart olan otogreft grubunda görülürken; en yüksek BV/TV oranına sahip ikinci grup PRP içerikli PLLA-HAP grefti (%59) olarak belirlenmiştir. En düşük BV/TV oranı ise ~%25 ile kontrol (şam) grubundadır. Bu sonuçlar geliştirilen PRP+PLLA-HAP greft malzemesinin altın standarda alternatif olarak kullanılabileceğini ve şam grubu ve boş PLLA-HAP grubu düşünüldüğünde PRP'nin kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.

Kemik rejenerasyonunu göstermek için defekt bölgesindeki mineral yoğunluğunun da hesaplanması gerekmektedir. BV/TV hesaplarıyla defekt bölgesinin kapandığı görülmekte ancak kapanmanın implante edilen greft malzemesinden mi yoksa yeni kemik oluşumundan mı kaynaklandığı net olarak bilinmemektedir. Bu sebeple çalışma kapsamında hidroksiapatit ile fantom kalibrasyonu yapılarak BMD hesabı da yapılmıştır. Şekil 12C'de gösterildiği gibi, 8. haftada en düşük BMD değerleri 0.06 ± 0.01 g/cm³ olarak kontrol gruplarında bulunmuştur. Diğer taraftan, otogreft grubu için BMD değeri 0.48 ± 0.06 g/cm³ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, kontrol grubundan 8 kat, PLLA-HAP ve PRP+PLLA-HAP gruplarından ise 2 kat daha fazladır. Yirminci haftada kontrol grubu dışındaki tüm grupların BMD değerleri 8. haftaya göre daha yüksek bulunmuştur ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Ayrıca, üç grup için de 20. haftadaki BMD değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. En yüksek BMD değeri BV/TV sonuçlarına benzer olarak otogreft grubunda görülmüştür. PRP yüklü ve boş greft grupları arasında ise anlamlı derecede yüksek fark olmamakla birlikte PRP+PLLA-HAP grubu otogreftten sonraki en yüksek BMD değerine sahip gruptur. Bu sonuçlar, geliştirilen PRP+PLLA-HAP greft materyalinin altın standarda alternatif olarak kullanılabileceğini ve şam ve PLLA-HAP grupları göz önüne alındığında PRP'nin kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.



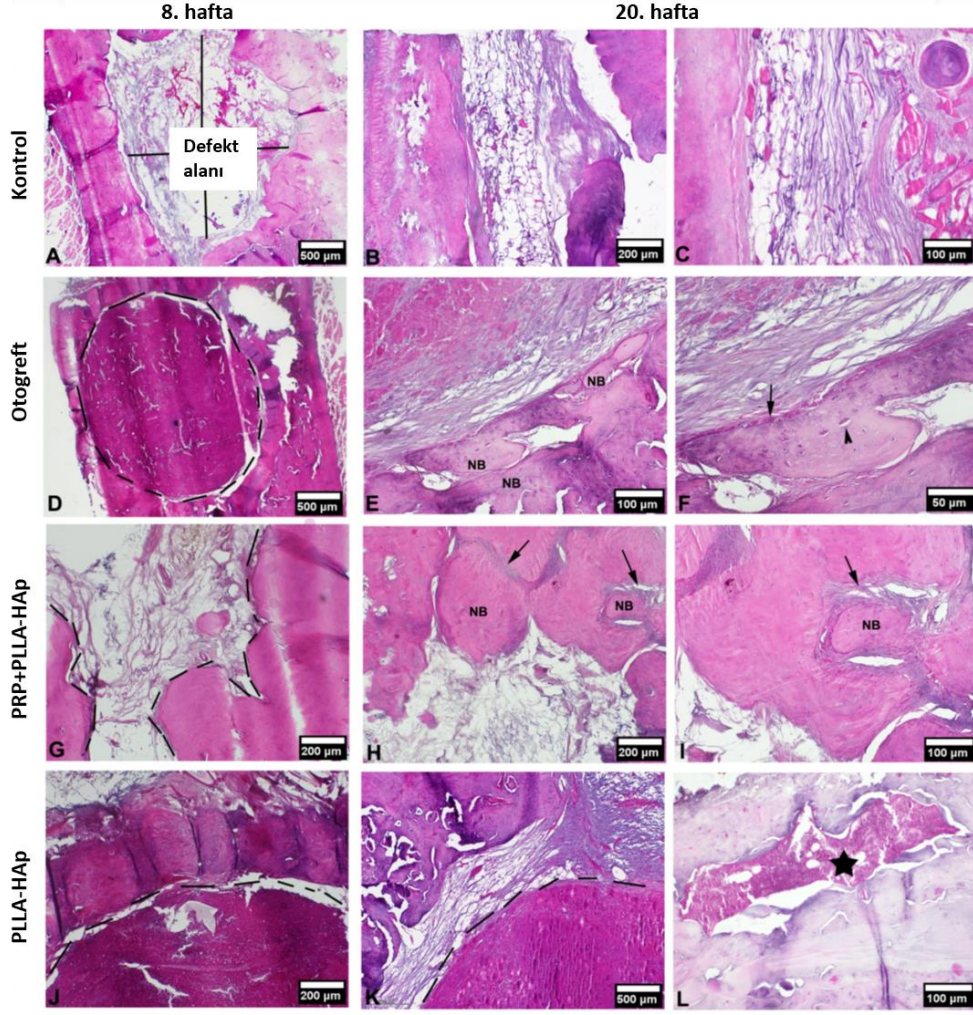
Şekil 12. Tüm gruplarda 8. ve 20. haftaların sonunda elde edilen a) μ -CT görüntüleri, b) BV/TV oranları ve c) kemik mineral yoğunluğu (n=6). İstatistiksel olarak anlamlı farklar, 8. hafta kontrol (şam) grubu kontrol grubu iken; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. 20. hafta kontrol (şam) grubu kontrol grubu iken; • $p < 0.05$, •• $p < 0.01$, ••• $p < 0.001$, •••• $p < 0.0001$. Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında 8. hafta kontrol grubu iken; Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.0001$.

Kim vd., yaptığı bir çalışmada, PRP, trombositten zengin fibrin (PRF) ve konsantre büyüme faktörlerinin (CGF) tavşanlarda kemik rejenerasyonuna olan etkisini kemik hacmi ve BMD ölçümlerine bakarak incelemişlerdir. Parietal kemikte 10 x 15 mm² büyüklüğünde açılan defektlerde 12. hafta sonunda kontrol grubu (boş defekt) hariç deney grupları (PRP, PRF ve CGF) arasında BMD değerleri için anlamlı bir fark görülmese de en yüksek BMD (~264 mg/mL) değeri PRP grubuna ait bulunmuştur [52]. Sonuçlar incelendiğinde PRP'nin kemik rejenerasyonunu desteklediği ancak 12 haftalık sürenin iyileşme için yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada bulunan BMD değerleri proje kapsamında bulunanlara kıyasla daha düşüktür ve bunun sebebinin defekt alanıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bir başka çalışmada ise 5 mm çapındaki tavşan kraniyal defekt bölgesine jelatin hidrojel içeren PRP, trombin ile aktive edilmiş PRP ve boş bir hidrojel implante edilmiştir. Sekiz haftanın sonunda en yüksek BMD değeri ~700 mg/m³ olarak PRP içeren hidrojel grubunda görülmüştür. Jelatin yapısında bulunan kolajenin trombosit aktivasyonunu 8 hafta boyunca sağladığı ve ayrıca trombin gibi kimyasal bir ajana gerek kalmadan büyüme faktörlerinin salımının yapılabileceği gösterilmiştir [53]. Sunulan proje kapsamında, literatüre benzer olarak PRP'nin hidroksiapatit dolayısı ile kalsiyum içeren greftler ile kullanımının, 20. haftada elde edilen BMD değerleri kıyaslandığında PRP+PLLA-HAp greftlerinde, PRP yapısında bulunan büyüme faktörlerinin uzun süreli salımının gerçekleştiği şeklinde yorumlanabilir.

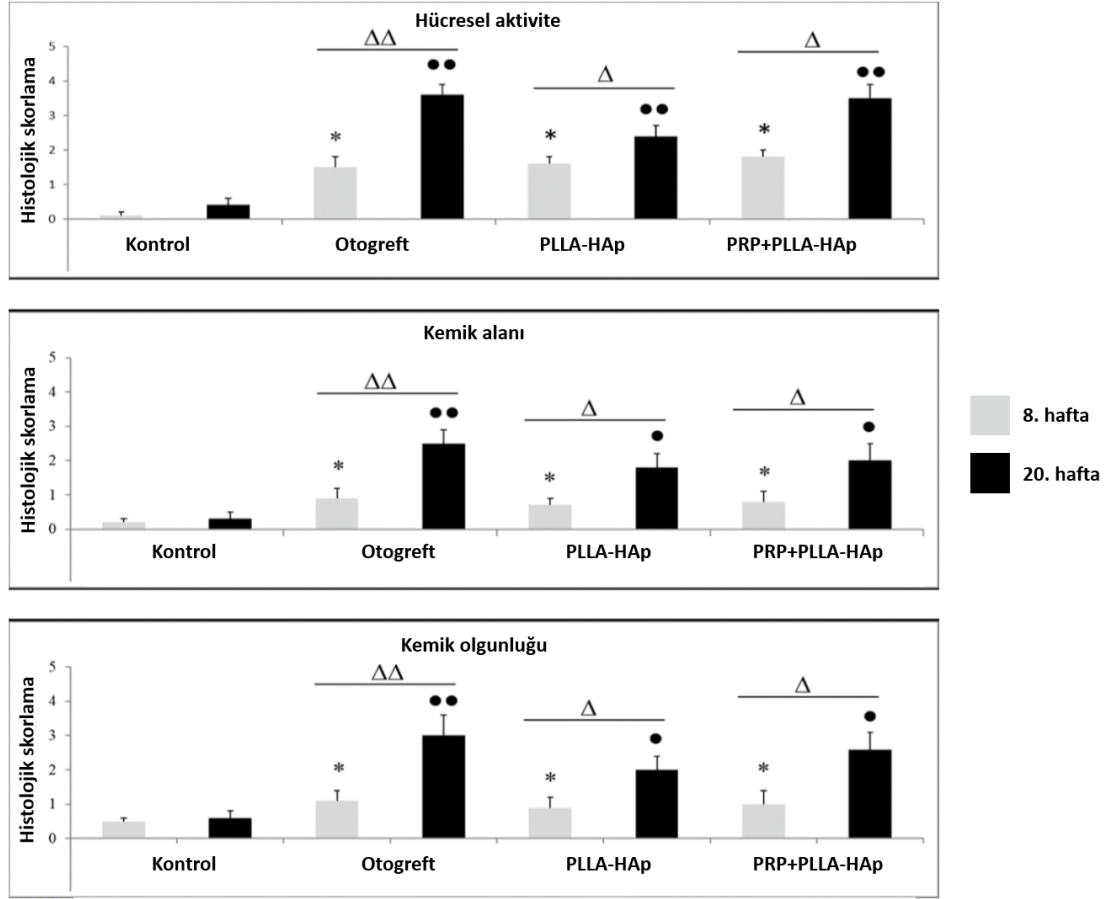
4.3.3. Histolojik Analiz

Dört grup arasındaki farklılıkları histolojik düzeyde gözlemlemek için H&E boyaması yapılmış ve örnekler 10X ve 40X büyütme oranlarında ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Sıçan kafatasındaki defekt alanı Şekil 13A'da gösterilmiştir. 8 haftanın sonunda, kontrol grubundaki defekt bölgesinde fibröz dokular gözlenmiştir. Yirminci haftada, doldurulmayan defekt tamamen iyileşmemiş ve defekt bölgesinde daha fazla fibröz doku gözlemlenmiştir (Şekil 13B ve C). Defekt 8. ve 20. haftalarda greftler ile kapanmıştır. Greft ve sağlam kemik arasındaki sınır bölgesi Şekil 13'te noktalı çizgilerle gösterilmiştir. Yirminci haftada bile, tüm gruplarda bozunmadan kalan greftler önemli miktarlarda görülmüştür. Her gruptaki defekt çapı farklı oranlarda azalma göstermiştir.

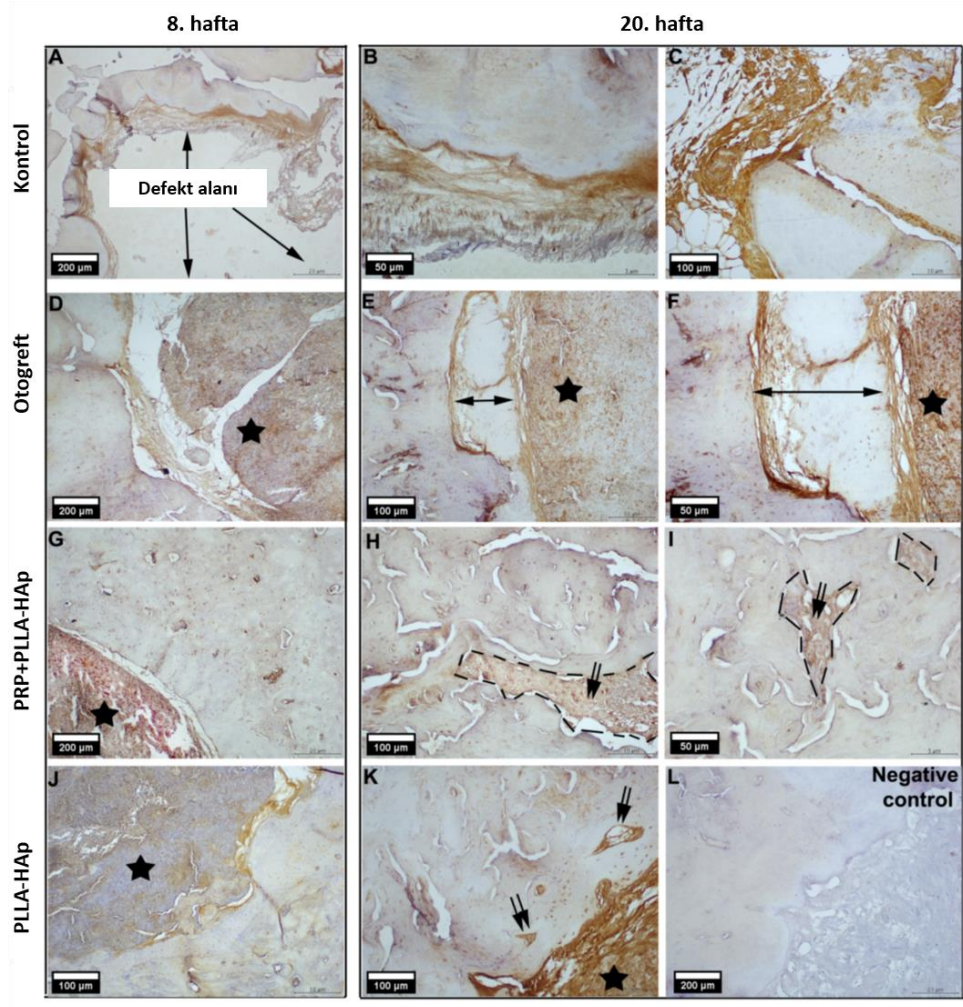


Şekil 13. Sekizinci ve 20. haftalarda H&E tarafından boyanan sıçan kranial defekti ve çevresindeki dokuların histolojik kesitleri. Kontrol (A-C), otogreft (D-F), PRP+PLLA-HAp (G-I), PLLA-HAp (J-L) grupları. Not: Sıçan kranial defekti (A-C); oklar sıçanın kafatasından alınan kemiği gösterir. D, G, J'de defekte implante edilen farklı greft tipleri gösterilmiştir. NB: Yeni kemik, oklar: osteoblast, ok ucu: osteosit, yıldız: kemik dokusuna uzanan gömülü greft.

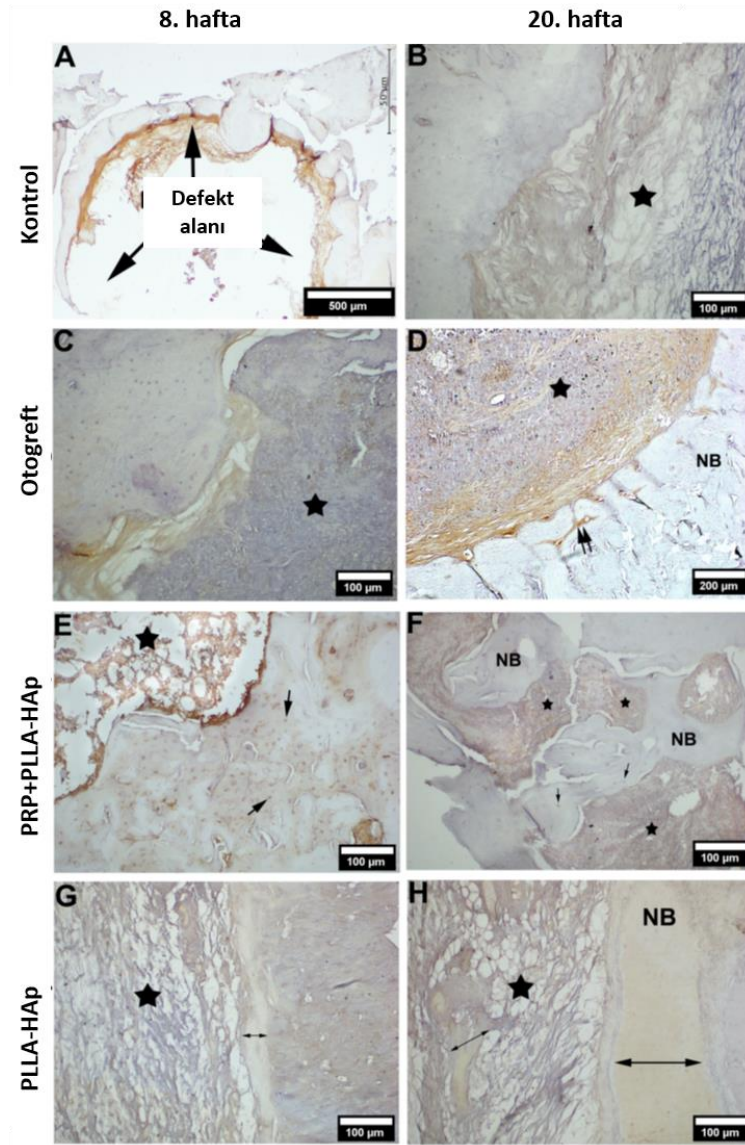
Kesitler öncelikle osteoblast, fibroblast ve osteoprogenitör hücreler gibi osteojenik hücrelerin infiltrasyonu için puanlanmıştır. Şekil 14A'da gösterildiği gibi, otogreft grubunun 20. haftanın sonundaki ortalama hücresel aktivitesi diğer gruplara kıyasla en yüksektir. Ancak, 20. haftada PRP+PLLA-HAp grubunun medyan hücresel aktivitesi otogreft grubuna çok yakın bulunmuştur. Kemik bölgesi yeni kemik oluşumunu gösteren greft yüzdesi olarak da skorlanmıştır (Şekil 14B). Otogreft, PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp gruplarında, 8. haftada kemik alanı %25'ten azdır ve anlamlı bir kemik rejenerasyonu gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 20. haftada otogreft grubunda kemik alanı neredeyse %50'dir. Otogreft grubuna benzer şekilde 20. haftada kemik alanının PRP+PLLA-HAp grubunda en yüksek olduğu bulunmuştur. Yeni oluşan kemiğin olgunluğu 8. haftada tüm gruplarda çok az iken, 20. haftada otogreft, PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp gruplarında bu grupların 8. haftasına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Osteoblastlar ile osteoid oluşumu ve kılcal damarların başlangıcı, osteoindüksiyonu destekleyen otogreft grubunda 20. haftanın sonunda iyi bir şekilde gözlenmiştir. Lakeoe içinde osteositler görülmüştür ve matriksin eşit asidofilik boyamasıyla yeni oluşan kemik tespit edilmiştir (Şekil 13F, ok başı). Kemiğin yüzeyinde kübik osteoblastlar da fark edilmiştir (Şekil 13F, ok).



Şekil 14. Bütün gruplarda 8. ve 20. haftaların sonunda elde edilen kemik hücresel aktivitesi, kemik olgunluğu ve kemik alanı değerleri ile skorlanan kemik rejenerasyonunun histolojik analizi (n = 6). 8. hafta kontrol defekt grubu kontrol grubu olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlendi; * $p < 0.05$, 20. haftadaki boş defekt grubu kontrol grubu olduğunda; gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, ● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$ ve her örneğin 8. haftası kontrol grubu olarak alındığında; Δ $p < 0.05$, ΔΔ $p < 0.01$.



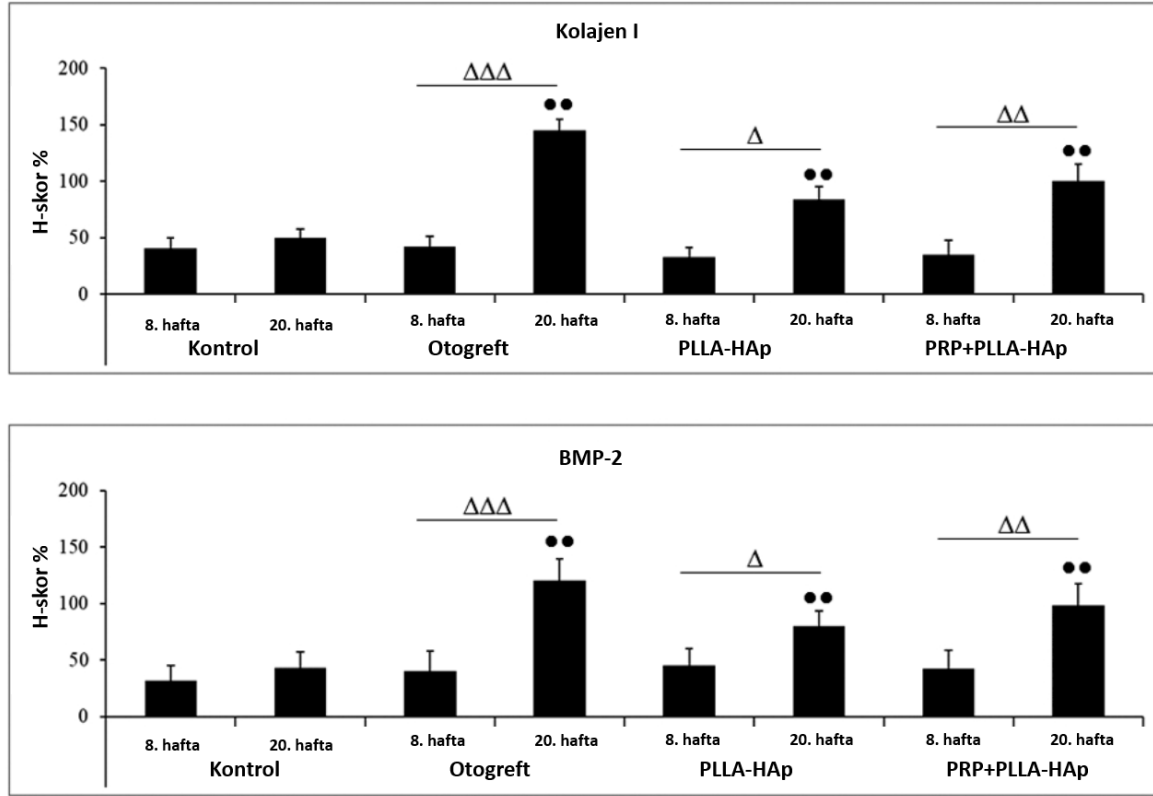
Şekil 15. Kontrol (A-C), otogreft (D-F), PRP+PLLA-HAp (G-I), PLLA-HAp (J-L) gruplarında Kolajen I'in immünohistokimyasal boyanması. D, G, J'de gösterilen defekte implante edilen farklı greft türleri gösterilmiştir. Siyah yıldız: greft malzemesi, siyah oklar: yeni kemik, çift ok: kemiğe gömülü greft.



Şekil 16. Kontrol (A-B), otogreft (C-D), PRP+PLLA-HAp (E-F), PLLA-HAp (G-H) gruplarında BMP-2'nin immünohistokimyasal boyanması. C, E, G'de defektlere yerleştirilen farklı tipte greft türleri gösterilmiştir. Siyah yıldız: greft malzemesi, çift kenarlı siyah oklar: yeni kemik, NB: yeni kemik, ok: osteosit.

Histopatolojik analize ek olarak, kontrol ve diğer gruplarda Kolajen I ve BMP-2 immün boyamaları da gerçekleştirilmiştir. Kemik morfogenetik proteinlerinin yeni kemik oluşumunu uyardığı ve kemik kusurlarını onardığı bilinmektedir. Özellikle Kolajen I, kemiğin mimarisinde ve işlevinde önemli bir rol oynamaktadır. Kontrol gruplarında, defekt alanı çevresinde Kolajen I ve BMP-2 immünoreaktivitesi gözlenmiştir (Şekil 15A ve Şekil 16A). Kolajen I ve BMP-2 de osteoblast, osteosit ve iç matriks çevresinde tespit edilmiştir (Şekil 15B, C ve Şekil 16B). 20. haftada kemik dokularında kolajen I ve BMP-2 pozitif hücrelerin yoğunluğu ve sayısı artmıştır. Ayrıca, yeni kemik oluşumu çevresinde Kolajen I ve BMP-2 immünoreaktivitesi 20. haftada otogreft grubunda daha belirgin bulunmuştur (Şekil 15E ve F). İmmünohistokimyaya dayanarak, Hscore analizi, 8. hafta örneklerine kıyasla 20. haftada kemik dokularındaki Kolajen I ve BMP-2 immünopozitivite sayısında ve Kolajen I ve BMP-2 yoğunluğunda önemli bir artış göstermiştir (Şekil 17). Kolajen I yerine izotip antikorunun kullanıldığı bölümlerde immün boyama görülmemiştir (Şekil 15L). Bütün gruplar arasında 8. hafta örneklerinde Kolajen I ve BMP-2 immünoreaktiviteyi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte, Kolajen I ve BMP-2 immün boyama, 20. haftada otogreft grubunda en yüksek Hscore değerini göstermiştir. Ayrıca, otogreft,

PLLA-HAp ve PRP+PLLA HAp gruplarındaki Kolajen I ve BMP-2 immünoreaktiviteleri, 20. haftada kontrol gruplarından önemli ölçüde farklı bulunmuştur (Şekil 17).



Şekil 17. Kontrol, otogreft, PRP+PLLA-HAp, PLLA-HAp gruplarında Kolajen I ve BMP-2'nin Hscore analizi. Toplam yoğunluk ve boyanmış hücrelerin sayısı 20. haftadaki kemik dokularında 8. haftadaki kemik dokularından daha yüksektir. 20. haftadaki boş defekt grubu kontrol grubu olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi; Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, • $p < 0.05$, •• $p < 0.01$ ve her örneğin 8. haftası kontrol grubu olarak alındığında; Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çok sayıda büyüme faktörü içeren, kolay ve düşük maliyetli bir süreçte hastanın kendi kanından izole edilen trombositten zengin plazma, polimerik greft materyallerinin biyoaktivitesini arttırmak için umut verici bir yaklaşım sunmaktadır. Bu çalışmada, FDA onaylı sentetik polimer olan PLLA, 3D elektroelme yöntemi ile HAp partiküllerinin varlığında üretilmiştir. Geliştirilen malzemelerin osteojenik etkinliği PRP olan ve olmayan bu greftler ile *in vivo* hayvan çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Bu amaçla Wistar Albino sıçanlarında oluşturulan 5 mm kranial defekt modeli oluşturulmuştur. Cerrahi işlem sırasında greft materyallerinin kolayca sıkıştırılabilir olduğu ve düzensiz geometriye sahip hasar bölgesinin şeklini alabildiği kanıtlanmıştır. Mikro-CT sonuçları, PRP yüklü PLLA greftlerine ait BV/TV ve BMD değerlerinin altın standart olan otogreft ile karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar, boş defekt dışındaki tüm greft gruplarında yeni kemik oluşumunun gözlemlendiğini doğrulamıştır. Türler arasında PRP kullanım etkinliği hala tartışılmaktadır ve otogreft gruptaki kemik rejenerasyonunun geliştirilen greft malzemesinden yüksek olmasının insan kaynaklı PRP'nin sıçanlarda kullanılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [23, 24]. Sonuç olarak, bu çalışmada polimerik greftlerin PRP varlığında biyoaktivitesi ve osteojenitesi artırılarak yeni bir tedavi yöntemi sunulmuştur ve bu materyallerin düzensiz kemik defektleri için otogreftte alternatif polimerik greftlerin kullanılabileceği gösterilmiştir.

Proje önerisinde doku rejenerasyonu histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelemek için ayrıca Mallory Trikróm ve Osteokalsin antikoru ile boyama yapılması hedeflenmiştir. Ancak Mallory Trikróm istenen şekilde boyanmamış ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Ek 1). Osteokalsin ise farklı seyreltme oranlarında denenmesine rağmen çalışmamış ve hiçbir sonuç vermediğinden rapora eklenmemiştir (Ek 2). Bu problemin boyalardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Proje kapsamında bitirilmesi tamamlanması planlanan iş paketleri aşağıda sunulmuştur;

- 1) Greft malzemelerinin üretimi ve yüzey modifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi
- 2) Kandan PRP eldesi, aktivasyon işlemleri ve PRP'nin doku iskelelerine yüklenmesi
- 3) Üretilen greftlerin sıçanlara implante edilmesi
- 4) Mikro-CT görüntülerinin alınması ve yorumlanması
- 5) Histolojik ve immünohistokimyasal boyamaların gerçekleştirilmesi

ve tüm iş paketleri başarıyla tamamlanmıştır.

Proje çıktıları, 'Three Dimensional Nanofibrous and Compressible Poly(L-Lactic Acid) Bone Grafts Loaded with Platelet-Rich Plasma' adıyla Doku Mühendisliği alanında önemli dergilerden biri olan *Materials Science and Engineering C* dergisine 23 Nisan 2020 tarihinde yayınlanmak amacıyla sunulmuştur. İlk değerlendirmede, hakemler tarafından düzeltme verilmiştir ve düzeltmeler tamamlandıktan sonra yayına kabul edilmesi beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

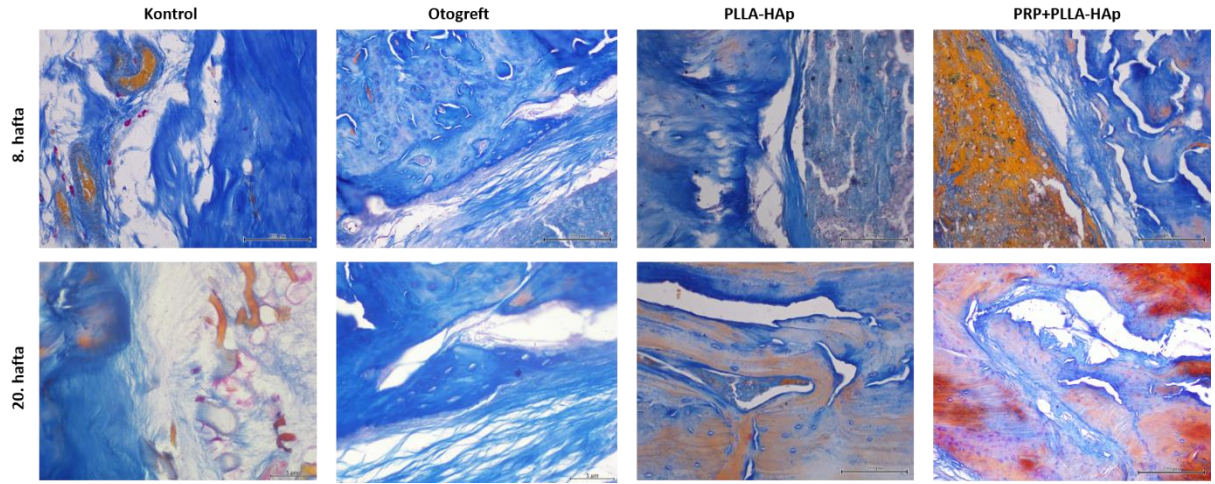
- [1] Irmak, G., Demirtaş, T. T., & Gümüşderelioğlu, M. (2020). Sustained release of growth factors from photoactivated platelet rich plasma (PRP). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 148, 67-76.
- [2] Peng, G. L. (2019). Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation: Facts, Fiction, and Pearls for Practice. *Facial Plastic Surgery Clinics*, 27(3), 405-411.
- [3] Hesseler, M. J., & Shyam, N. (2019). Platelet-rich plasma and its utility in the treatment of acne scars: A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(6), 1730-1745.
- [4] Samartzis, D., Shen, F. H., Goldberg, E. J., & An, H. S. (2005). Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation?. *Spine*, 30(15), 1756-1761.
- [5] Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40(5).
- [6] Nandi, S. K., Roy, S., Mukherjee, P., Kundu, B., De, D. K., & Basu, D. (2010). Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian Journal of Medical Research*, 132(1), 15-30.
- [7] Grove, J. R. (2008). Autograft, allograft and xenograft options in the treatment of neglected Achilles tendon ruptures: a historical review with illustration of surgical repair. *surgeon*, 15(33), 47.
- [8] Raeisdasteh Hokmabad, V., Davaran, S., Ramazani, A., & Salehi, R. (2017). Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 28(16), 1797-1825.
- [9] Blakeney, B. A., Tambralli, A., Anderson, J. M., Andukuri, A., Lim, D. J., Dean, D. R., & Jun, H. W. (2011). Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, 32(6), 1583-1590.
- [10] Yokoyama, Y., Hattori, S., Yoshikawa, C., Yasuda, Y., Koyama, H., Takato, T., & Kobayashi, H. (2009). Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials letters*, 63(9-10), 754-756.
- [11] Çatiker, E., Konuk, E., Gültan, T., & Gümüşderelioğlu, M. (2019). Enhancement of scaffolding properties for poly (3-hydroxybutyrate): blending with poly-β-alanine and wet electrospinning. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(6), 338-349.
- [12] Wang, D. A., Williams, C. G., Yang, F., & Elisseeff, J. H. (2004). Enhancing the tissue-biomaterial interface: Tissue-initiated integration of biomaterials. *Advanced functional materials*, 14(12), 1152-1159.
- [13] Carlson, N. E., & Roach Jr, R. B. (2002). Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *The Journal of the American Dental Association*, 133(10), 1383-1386.
- [14] Boyapati, L., & Wang, H. L. (2006). The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant dentistry*, 15(2), 160-170.
- [15] Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., & Nurden, A. T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*, 91(01), 4-15.
- [16] Evans, C. H. (2013, November). Advances in regenerative orthopedics. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 88, No. 11, pp. 1323-1339). Elsevier.
- [17] Huang, S., & Wang, Z. (2012). Platelet-rich plasma-derived growth factors promote osteogenic differentiation of rat muscle satellite cells: in vitro and in vivo studies. *Cell biology international*, 36(12), 1195-1205.
- [18] Fernandes, G., & Yang, S. (2016). Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone research*, 4(1), 1-21.

- [19] Díaz-Gómez, L., Ballarin, F. M., Abraham, G. A., Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2015). Random and aligned PLLA: PRGF electrospun scaffolds for regenerative medicine. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(5).
- [20] Prosecká, E., Rampichová, M., Litvinec, A., Tonar, Z., Králíčková, M., Vojtova, L., ... & Jančář, J. (2015). Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(2), 671-682.
- [21] Vanassche, B., & Defrancq, J. (2001). Use of PRP (Platelet Rich Plasma) in bone volume augmentation. *Revue belge de medecine dentaire*, 56(2), 125-133.
- [22] Sajesh, K. M., Kiran, K., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2016). Sequential layer-by-layer electrospinning of nano SrCO₃/PRP loaded PHBV fibrous scaffold for bone tissue engineering. *Composites Part B: Engineering*, 99, 445-452.
- [23] Nakatani, Y., Agata, H., Sumita, Y., Koga, T., & Asahina, I. (2017). Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. *Archives of oral biology*, 73, 172-178.
- [24] Roussy, Y., Bertrand Duchesne, M. P., & Gagnon, G. (2007). Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clinical oral implants research*, 18(5), 639-648.
- [25] Çakmak, S (2015-2017), Kemik hasarlarının tedavisi için sıkıştırılabilir ve kolay şekil alabilen 3-boyutlu kompozit fibröz malzemeler-üretim, karakterizasyon ve in vitro hücre kültürü çalışmaları, TÜBİTAK, 215M179.
- [26] Koç, S (2019), Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [27] Hamilton, P. T., Jansen, M. S., Ganesan, S., Benson, R. E., Hyde-DeRuyscher, R., Beyer, W. F., Gile, J. C., Nair, S. A., Hodges, J. A., & Gron, H. (2013). Improved bone morphogenetic protein-2 retention in an injectable collagen matrix using bifunctional peptides. *Plos One*, 8(8), e70715, 1-10.
- [28] Akcan, G., Alimogullari, E., Abu-Issa, R., & Cayli, S. (2020). Analysis of the developmental expression of small VCP-interacting protein and its interaction with steroidogenic acute regulatory protein in Leydig cells. *Reproductive Biology*, 20(1), 88-96.
- [29] Ozsoy, A. S., Cayli, S., Sahin, C., Ocakli, S., Sancı, T. O., & İlhan, D. B. (2018). Altered expression of p97/Valosin containing protein and impaired autophagy in preeclamptic human placenta. *Placenta*, 67, 45-53.
- [30] Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., & Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, 6(1), 13.
- [31] Iqbal, B., Sarfaraz, Z., Muhammad, N., Ahmad, P., Iqbal, J., Khan, Z. U. H., ... & Rahim, A. (2018). Ionic liquid as a potential solvent for preparation of collagen-alginate-hydroxyapatite beads as bone filler. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 29(10), 1168-1184.
- [32] Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.
- [33] M. A. Bakar, P. Cheang ve K. A. Khor, *Journal of Materials Processing Technology*, 89 (1999) 462-466.

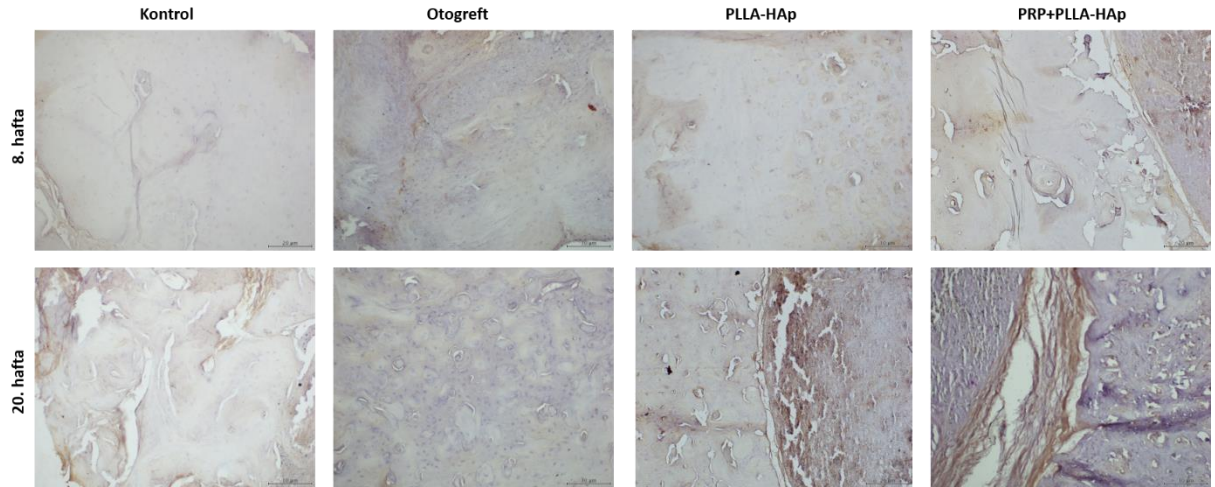
- [34] Hong, Z., Zhang, P., He, C., Qiu, X., Liu, A., Chen, L., ... & Jing, X. (2005). Nano-composite of poly (L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 26(32), 6296-6304.
- [35] Yoo, H. S., Kim, T. G., & Park, T. G. (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 61(12), 1033-1042.
- [36] Y. Hu, S. R. Winn, I. Krajcovich & J. O. Hollinger, *Journal of Biomedical Materials Research Part 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*, 64(3) (2003) 583-590.
- [37] Sadeghi, A. R., Nokhasteh, S., Molavi, A. M., Khorsand-Ghayeni, M., Naderi-Meshkin, H., & Mahdizadeh, A. (2016). Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. *Materials science and engineering: C*, 66, 130-137.
- [38] Oushabi, A., Sair, S., Hassani, F. O., Abboud, Y., Tanane, O., & El Bouari, A. (2017). The effect of alkali treatment on mechanical, morphological and thermal properties of date palm fibers (DPFs): Study of the interface of DPF–Polyurethane composite. *South African Journal of Chemical Engineering*, 23, 116-123.
- [39] Sharifi, E., Azami, M., Kajbafzadeh, A. M., Moztarzadeh, F., Faridi-Majidi, R., Shamousi, A., ... & Ai, J. (2016). Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 533-541.
- [40] Yoon, H., Kim, G. H., & Koh, Y. H. (2010). A micro-scale surface-structured PCL scaffold fabricated by a 3D plotter and a chemical blowing agent. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(2), 159-170.
- [41] Lin, C. C., Fu, S. J., Lin, Y. C., Yang, I. K., & Gu, Y. (2014). Chitosan-coated electrospun PLA fibers for rapid mineralization of calcium phosphate. *International journal of biological macromolecules*, 68, 39-47.
- [42] Park, G. E., Pattison, M. A., Park, K., & Webster, T. J. (2005). Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*, 26(16), 3075-3082.
- [43] Karahaliloğlu, Z., Ercan, B., Chung, S., Taylor, E., Denkbaş, E. B., & Webster, T. J. (2014). Nanostructured anti-bacterial poly-lactic-co-glycolic acid films for skin tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12), 4598-4608.
- [44] Hamid, Z. A., Tham, C. Y., & Ahmad, Z. (2018). Preparation and optimization of surface-engineered poly (lactic acid) microspheres as a drug delivery device. *Journal of materials science*, 53(7), 4745-4758.
- [45] Tham, C. Y., Hamid, Z. A. A., Ahmad, Z. A., & Ismail, H. (2014). Surface engineered poly (lactic acid)(PLA) microspheres by chemical treatment for drug delivery system (Vol. 594, pp. 214-218). *Trans Tech Publications Ltd*.
- [46] Lee, J. H., Nam, J., Kim, H. J., & Yoo, J. J. (2015). Comparison of three different methods for effective introduction of platelet-rich plasma on PLGA woven mesh. *Biomedical Materials*, 10(2), 025002.
- [47] Wang, H., Feng, Y., Zhao, H., Xiao, R., Lu, J., Zhang, L., & Guo, J. (2012). Electrospun hemocompatible PU/gelatin-heparin nanofibrous bilayer scaffolds as potential artificial blood vessels. *Macromolecular Research*, 20(4), 347-350.
- [48] Chen, Y., Lin, J., Fei, Y., Wang, H., & Gao, W. (2010). Preparation and characterization of electrospinning PLA/curcumin composite membranes. *Fibers and Polymers*, 11(8), 1128-1131.

- [49] Diaz-Gomez, L., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Silva, M., Dominguez, F., Sheikh, F. A., ... & Macossay, J. (2014). Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 180-188.
- [50] Fernández-Barbero, J. E., Galindo-Moreno, P., Ávila-Ortiz, G., Caba, O., Sánchez-Fernández, E., & Wang, H. L. (2006). Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical oral implants research*, 17(6), 687-693.
- [51] Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH (1997). Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: A comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 86–95.
- [52] Kim, T. H., Kim, S. H., Sándor, G. K., & Kim, Y. D. (2014). Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of oral biology*, 59(5), 550-558.
- [53] Hokugo, A., Sawada, Y., Hokugo, R., Iwamura, H., Kobuchi, M., Kambara, T., ... & Tabata, Y. (2007). Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 104(1), 44-48.

7. EKLER



Ek 1. Kontrol, otogreft, PRP+PLLA-HAp, PLLA-HAp gruplarında Mallory trikrom ile histolojik boyama.



Ek 2. Kontrol, otogreft, PRP+PLLA-HAp, PLLA-HAp gruplarında osteokalsinin immünohistokimyasal boyanması.