

## АВТОЛОЖНИ ТРОМБОЦИТНИ КОНЦЕНТРАТИ ЗА ЛОКАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ – ВИДОВЕ, КЛАСИФИКАЦИЯ

**М. Александрова**

*Катедра по орална и лицево-челюстна хирургия,  
Факултет по дентална медицина – София*

**Резюме.** Активирането на тромбоцитите по време на тъканно увреждане води до освобождаване на плеяда биоактивни молекули, които повлияват положително репаративните и регенеративните процеси. Този факт е в основата на научния интерес по отношение на концентрирането им в автоложни тромбоцитни концентрати за локално приложение. От 2000 г. до днес те присъстват в нарастващ брой научни публикации. В много от тях авторите се опитват да характеризират и класифицират многобройните протоколи за получаването на тромбоцитни концентрати (режим на центрофугиране, вид антикоагулант), състава (тромбоцити, левкоцити, растежни фактори) и клиничните приложения.

**Ключови думи:** *тромбоцити, тромбоцитни концентрати, тромбоцитно богата плазма, фибрин*

## AUTOLOGOUS PLATELET CONCENTRATES FOR TOPICAL USE – TYPES AND CLASSIFICATION

**М. Aleksandrova**

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Faculty of Dental Medicine, Medical University – Sofia*

**Summary.** When activated at the time of tissue damage, the platelets release a pleiad of bioactive molecules that improve reparative and regenerative processes. This fact determines the scientific interest in the development of autologous platelet concentrates for topical use. Since 2000 a growing number of scientific papers have been published on platelet concentrates. Many authors try to characterize and classify the numerous techniques available in terms of preparation (centrifugation speed/time, type of anticoagulant), content (platelets, leukocytes, growth factors) and clinical applications.

**Key words:** *platelets, platelet concentrates, platelet-rich plasma, fibrin*

От цяла кръв могат да се получат различни кръвни съставки чрез центрофугиране, филтриране и замразяване. В трансфузионната медицина под наименованието „тромбоцитен концентрат” или „тромбоцитна маса” се разбира кръвна фракция, която се използва в специализирани клиники за превенцията и лечението

на кръвоизливи, дължащи се на количествен или качествен тромбоцитен дефицит – тежки тромбопени под  $20 \cdot 10^9/l$  с централен произход (медуларна аплазия, остра левкемия).

### **Фибринови адхезиви**

Исторически тромбоцитните концентрати (ТК) еволюират от фибриновите лепила, които вече 40 години се използват като тъканни адхезиви в сферата на много хирургични дисциплини. Фибриновият матрикс като краен продукт на коагулационната каскада е и първоизточник на всички оздравителни процеси. Адхезивните свойства на фибрина са открити от Bergel през 1909 г. Едва през 1970 г., след като става възможно получаването на по-концентриран фибриноген, те навлизат по-осезаемо в клиничната практика.

Концепцията се състои в имитиране на крайните етапи на коагулационната каскада – концентриране на циркулиращия в плазмата фибриноген и трансформирането му във фибринов матрикс с помощта на ензимен активатор – тромбин. Оказват се ефективни за профилактика на постоперативни хематоми и сероми, за овладяване на паренхиматозни кръвотечения, подпомагане на хемостазата при пациенти с коагулопатии, скъсяват хирургичното време, намаляват напрежението при адаптиране на ламбата и ускоряват оздравителния процес след хирургичната намеса [8, 25]. Качеството и силата на опън на фибриновия матрикс са функция на концентрацията на фибриногена, докато скоростта на полимеризация зависи от концентрацията на тромбин [18, 29]. Фибриновите адхезиви могат да се категоризират като автоложни, хомоложни (от един или няколко донора) и смесени. Автоложните намаляват риска от предаване на вирус- и прион-преносими заболявания, като днес се получават чрез криопреципитация, но концентрацията на фибриноген в тях е значително по-ниска в сравнение с комерсиализираните хомоложни продукти – Tisseel, Crosseal<sup>TM</sup>/Quixil®, Beriplast P, Evicel. Те се предлагат под формата на два отделни компонента, които се разтварят и смесват преди апликирането им. Първият най-често съдържа високопречистен лиофилизиран човешки фибриноген и фактор XIII. Вторият се състои от човешки тромбин, калций и антифибринолитичен

агент. При смесването им се финализира коагулационната каскада и се получава безклетъчен коагулум.

Фибриновите адхезиви се считат за биоинертни – те не съдържат тромбоцити и съответните им растежни фактори и цитокини. Резорбират се напълно от макрофаги и фибробласти за около 2 седмици [26].

Сравнително по-късно възниква предположението, че тромбоцитите могат да допринесат за стимулирането на оздравителния процес чрез освобождаване на растежни фактори.

Тромбоцитите са малки дискоидни цитоплазмени фрагменти (2-4  $\mu\text{m/d}$ ), които се отделят от мегакариоцитите в костния мозък и навлизат в кръвообращението под формата на безядрени клетки. Липсата на ядро предопределя кратък живот – 8-12 дни. Тромбоцитите са изключително активни метаболитно – участват в процесите на хемостаза, възпаление, ангиогенеза, антибактериална защита, тъканно регенериране [6, 7]. Основната роля във физиологичните им функции засяга процесите на кръвосъсирване – т.нар. тромбоцитна фаза на хемостазните механизми, която се състои в адхезия, активиране и агрегация на циркулиращи тромбоцити. Те променят формата си от дискоидна в сферична и излъчват много псевдоподи, при което освобождават съдържанието на гранулите си в мястото на увреждане. Чрез положителна обратна връзка, процеси на активиране и хемиотаксис се привличат нови тромбоцити в увреденото място. При този самоусилващ се процес се оформя временна хемостатична запушалка от скупчени тромбоцити с рехав строеж, чиято роля е да ограничи кръвозагубата през наранения съд.

В следващата плазмена фаза се отключва коагулационната каскада чрез вътрешен и външен път.

Въпреки че основният акцент пада върху ролята им в хемостазните механизми, откритието, че тромбоцитите складираят стоотици протеини, в това число плеяда от растежни фактори, ензими, имунни медиатори и биоактивни съставки, повдигна въпроса как да бъде оптимизирана и използвана терапевтичната им сила. В тази насока през последните 20 години се появиха и усъвършенстваха редица стратегии.

Характерно за тромбоцитите е наличието на складиращи  $\alpha$ -гранули, лизозомни гранули и плътни телца. Алфа-гранулите са най-многобройни – около 50-80 в една клетка, с размери от 200

до 500 nm и сравнително хетерогенно съдържание [5]. Съдържат високомолекулни полипептиди, които участват в тромбоцитната и плазмената фаза на хемостазния процес: фибриноген, фибронектин, витронектин, фактор V, Von Willebrand фактор, както и редица растежни фактори в неактивна форма. Много от пептидите в  $\alpha$ -гранулите са с противоположни свойства – про- и антикоагуланти, протеази и техните инхибитори, про- и антиангиогенни протеини. Активирането на тромбоцитите е сигнал, при който  $\alpha$ -гранулите масово освобождават съдържанието си чрез екзоцитоза. В процеса на сливането им с клетъчната мембрана се осъществява биоактивирането на растежните фактори чрез добавяне на хистони и странични въглеродородни вериги към основната молекула [22]. Морфологичното увреждане на тромбоцитите по време на получаване на тромбоцитния концентрат неизбежно води до липсата на биоактивни растежни фактори [20, 22].

Растежните фактори са малки полипептиди, които участват в междуклетъчния диалог. Повлияват много процеси, като ангиогенеза, химиотаксис, пролиферация, диференциация; контролират синтеза и разграждането на протеините на екстрацелуларния матрикс. Те оказват тези ефекти на мястото на освобождаването им. Трудно е да се диференцира самостоятелният принос на всяка от тези молекули в процесите на тъканно възстановяване, тъй като много от тях са мултифункционални и ефектът им зависи както от съотношенията им, така и от разпределението на съответните им рецептори по повърхността на различните видове прицелни клетки. Ключово значение имат следните растежни фактори, съдържащи се в тромбоцитите: тромбоцитен растежен фактор, трансформиращ растежен фактор-бета, съдовоендотелен растежен фактор, епидермален растежен фактор, основен фибробластен растежен фактор, инсулиноподобен растежен фактор, тромбоцитен фактор 4 и др. [10]. По този начин тромбоцитите стартират и предопределят темповете на оздравителните процеси в тъканите. Тромбоцитните концентрати само увеличават броя им, с което усилват терапевтичната им мощ.

Първоначално ТК са били използвани за лечение на незаздравяващи хронични кожни улцери (Knighton, 1986). С течение на времето в научните разработки ролята на тромбоцитите започва да получава превес над тази на фибриновия матрикс. Научният ентузиазъм и интересът към приложението на ТК стартират с

публикацията на Marx et al. през 1998 г. – авторите проследяват рентгенографски и хистоморфометрично възстановяването на 88 мандибуларни дефекта над 5 cm чрез костни спонгиозни автотрансплантати от crista iliaca за реконструкция на долната челюст след резекция по повод на неопластични заболявания. Те комбинират половината от тях с богата на тромбоцити плазма (БТП) и установяват, че това води до ускорена матурация и хистоморфометрично по-голяма плътност на регенериралата кост [21]. Установяват рентгенографски 1,62-2,16 пъти ускорена матурация на костните трансплантати с БТП в сравнение с контролите. С публикацията на R. Marx се свързва акцентът върху съдържащите се в тях растежни фактори и „новото“ наименование – богата на тромбоцити плазма – БТП.

Публикациите по въпроса обаче са трудни за анализирание поради липсата на ясна терминология повече от 10 години. Много различни продукти се обединяват под името БТП. Те трудно се поддават на сравнение, тъй като не са обикновени фармакологични препарати, а кръвни екстракти, които концентрират хиляди активни молекули с определена роля в регулирането на оздравителния процес и представляват обработени автоложни хемоконцентрати. ТК трябва да се разглеждат като вид тъкан – със съответно клетъчно съдържание и архитектура на матрикса. Основният компонент на матрикса на всички ТК е фибрин, който се организира в мрежа с различна архитектура и плътност. Клетъчното съдържание обхваща основно наличието на тромбоцити и левкоцити. Повечето продукти на пазара днес са всъщност тромбоцитно-левкоцитни концентрати [11].

За разлика от ТК в трансфузионната хематология, ТК за локално приложение се получават чрез двойно центрофугиране (с някои изключения) и се използват като помощни средства в хирургичната практика.

***Начин на получаване: богата на тромбоцити плазма (БТП); PRP – platelet-rich plasma***

В началния период от навлизането на тромбоцитните концентрати за локално приложение те са били получавани чрез плазмафереза с помощта на хематологични клетъчни сепаратори. Обработването на значително по-ограничени количества кръв

с помощта на компактни центрофуги е в основата на актуалните днес опростени методи и прави възможно използването на БТП в извънболнични лечебни заведения. Съществуват различни протоколи за получаване на БТП, но всички те се подчиняват на няколко основни принципа [16]:

~ 20-80 ml венозна кръв се събира в контейнери с антикоагулант, за да не се активират и дегранулират тромбоцитите. Антикоагулантът свързва калциевите йони и предотвратява конверсията протромбин-тромбин.

~ **първо центрофугиране (soft spin, separation spin)** – 2400 rpm/10 min (400 g) – кръвта се разделя на три фракции:

– еритроцити и левкоцити на дъното на епруветката – 55% от общия обем;

– безклетъчна плазма на повърхността, състояща се от циркулиращи плазмени протеини (фибриноген) – 40% от общия обем – тромбоцитно бедна плазма;

– между първите два слоя има трети, при който концентрацията на тромбоцити и фибриноген е висока. Той съставлява около 5% от общия обем и поради характерния си бял цвят е наречен в литературата „бяла пелена” – „buffy coat”. Именно този слой стои в основата на бъдещия тромбоцитен концентрат, но на този етап трудно може да бъде отделен от останалите два.

~ аспирират се тромбоцитно бедната плазма, тромбоцитно богатата плазма и повърхностният слой еритроцити; прехвърлят се в друга епруветка, без антикоагулант.

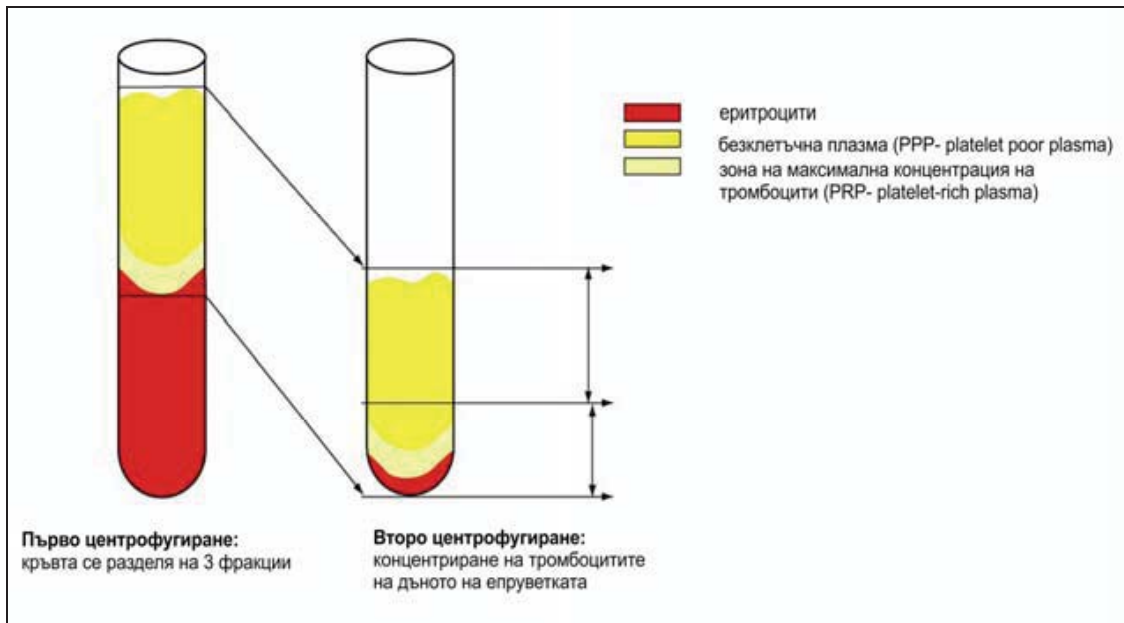
~ тя подлежи на **второ центрофугиране – (hard spin, concentration spin)** – 3600 rpm/15 min (600 g) по-продължително и с по-висока скорост от първото, при което се открояват нови три слоя:

– малък брой еритроцити на дъното на епруветката;

– безклетъчна плазма (PPP) – 80% от общия обем;

– между двата гореспоменати слоя – по-белезникав слой тромбоцитен концентрат.

~ аспирира се по-голямата част от тромбоцитно бедната плазма така, че да остане достатъчно количество за суспензиране на концентрираните тромбоцити [4, 16]. Цветът е с розов нюанс поради останалите еритроцити. Тромбоцитно бедната плазма съдържа пълния набор плазмени протеини, отговорни за каскадното коагулиране, и може да се използва за постигане на добра хемостаза.



**Фиг. 1.** Схематично представяне на технологичния процес при получаване на БТП [16]

*Активиране на ТК* – с този термин се обозначават две събития:

1) дегрануирането на тромбоцитите

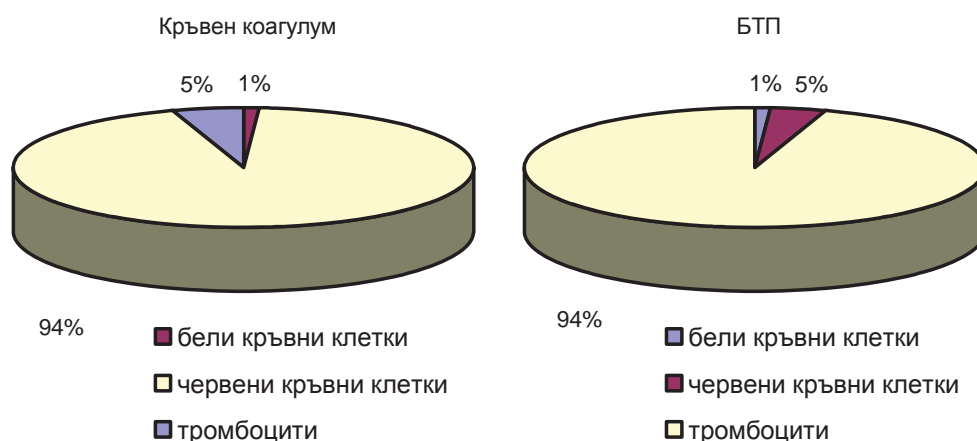
2) превръщането на разтворимия фибриноген в плазмата в неразтворим фибрин. Най-често това се постига с добавяне на тромбин и калциев хлорид към суспензията – калциевият хлорид неутрализира ефекта на антикоагуланта, а тромбинът участва в превръщането на фибриногена във фибрин [21]. Тромбинът, който се е използвал най-често за активиране на БТП в миналото, е бил от говежди произход. След появилите се съобщения за случаи на коагулопатии при повторно използване на говежди тромбин, дължащи се на повишени нива на антитела срещу човешките фактори на кръвосъсирване Va, IX и тромбин, неговата употреба е силно оспорвана [1, 19, 27]. В съвременните протоколи за получаване на БТП се забелязва тенденция за използването на автоложен тромбин. По този начин се активират тромбоцитите, отделят се растежните фактори и суспензията се трансформира в гел поради полимеризирането на концентрирания фибриноген във фибринова мрежа, което става за няколко минути. Активното секретирание на растежните фактори започва 10 минути след коагулацията. Повече от 95% от пресинтезираните фактори се секретират в следващия един час [21, 28] – БТП трябва да се използва до

10 min след активирането. В неактивиран вид БТП остава стерилна и концентрираните тромбоцити в нея жизнени за 8 ч [21, 22].

Скоростта на полимеризация на фибрина и плътността на резултантния фибринов матрикс са правопрпорционални на количеството тромбин.

Някои автори (Anitua, PRGF) използват само калциев хлорид като активатор. При инжектирането на течни ТК те се активират при директния контакт с колаген. Това *in vivo* активиране има предимството да предизвиква по-бавно освобождаване на растежни фактори.

За сравнение, ако естественият кръвен коагулум съдържа 95% червени кръвни клетки, 5% тромбоцити и по-малко от 1% бели кръвни клетки, то БТП съдържа 4% червени кръвни клетки, 95% тромбоцити и 1% бели кръвни клетки [24].



**Фиг. 2.** Графичен израз на разликите между естествения кръвен коагулум и БТП

Около 10% от първоначалния обем автоложна кръв се превръща в БТП концентрат след центрофугиране.

Като се имат предвид различните протоколи за получаване на БТП, при които се получава и различно активиране на тромбоцитите, и индивидуалните вариации в броя тромбоцити, не е изненадващо многообразието от крайни продукти, обединени под акронима БТП. Към днешна дата съществуват над 40 разновидности под това наименование. Този факт силно затруднява стан-

дартизирането на протоколите и сравнението на резултатите, получени при тяхната употреба.

Много фактори като:

- ~ количеството цяла кръв,
- ~ вида антикоагулант,
- ~ силата и времето на центрофугиране,
- ~ крайния обем плазма, в който остават суспензирани тромбоцитите,
- ~ концентрацията на тромбоцити,
- ~ запазването на интегритета им,
- ~ начина на активирането им,
- ~ броя бели кръвни клетки,
- ~ броя остатъчни червени кръвни клетки,
- ~ концентрацията фибриноген,
- ~ времето, необходимо за получаването им,

определят различията при различните техники [23].

Тромбоцитите варират индивидуално от 150 000 до 350 000/ $\mu$ l в човешкия организъм. Условно е прието броят на тромбоцитите в БТП за локално приложение да е 1 000 000/ $\mu$ l – в 3 до 5 пъти над нормата (концентрация на тромбоцити 338%). Тази дефиниция се основава на *in vivo* установения благотворен ефект на БТП с такава концентрация при експерименти с костни автотрансплантати [20, 21, 22]. Същото изследване установява, че по-ниските концентрации са субоптимални, а най-високите могат да имат инхибиторен ефект [9, 30].

***Начин на получаване: богата на растежни фактори плазма; PRGF – plasma rich in growth factors***

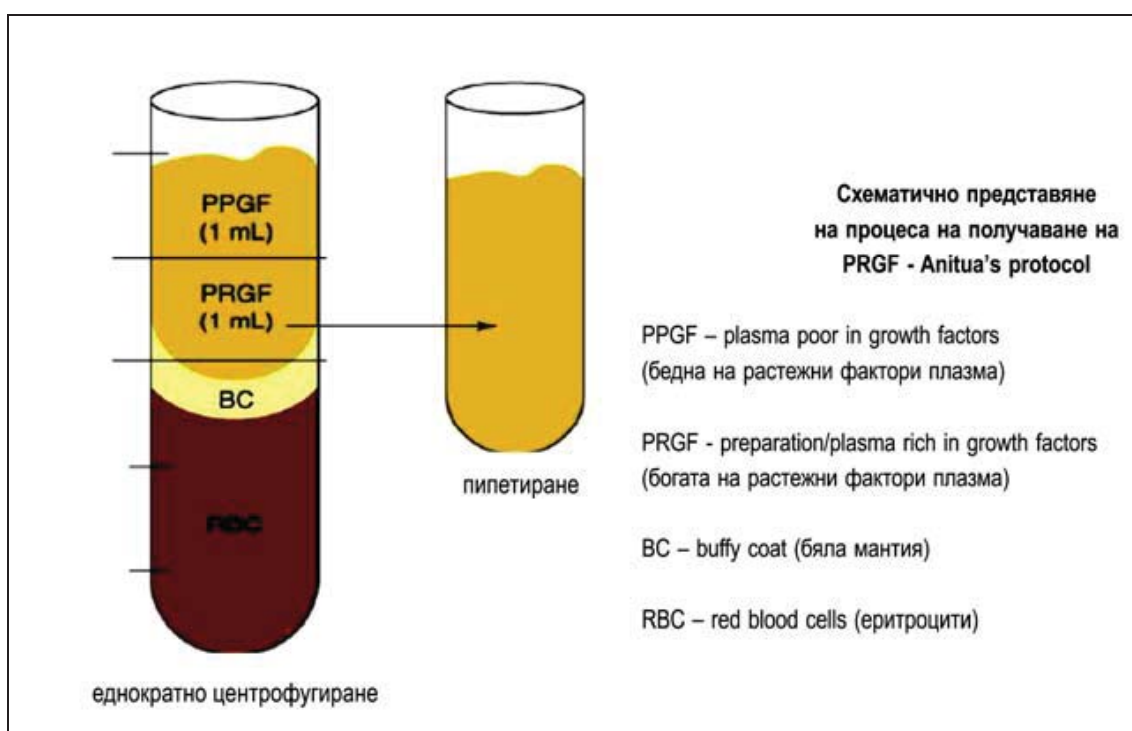
Това е един от първите методи за получаване на ТК, създаден през 1999 г. от Eduardo Anitua и комерсиализиран от ВТИ (BioTechnology Institute, Vitoria, Spain), който използва само едно центрофугиране. Малки количества цитрирана кръв (4,5 ml) се центрофугират в режим 8 min/460 g (1800 rpm) със специално конструирана за целта центрофуга (PRGF System IV) [31]. Получават се следните слоеве:

– повърхностен слой безклетъчна плазма (наречен тук PPGF) – около 1 ml – се отстранява чрез пипета внимателно, без да се предизвиква завихряне. От него може да се изготви фибринова мембрана за 30 min след активирането му.

– подлежащ слой – наречен тук PRGF – от всички епруветки се събира с помощта на плазма-трансфериращо устройство в една епруветка [2]. Под него остават:

- бяла пелена
- червени кръвни клетки.

PRGF се активира чрез добавяне на 10% калциев хлорид за около 20 min при 37° C, вследствие на което се превръща в нестабилен гел, който трябва веднага да бъде използван. Добавянето на калциев хлорид подпомага образуването на нативен тромбин, с което се отключват последните етапи на коагулационната каскада [1, 15]. Само вторият слой се използва за приготвяне на тромбоцитния концентрат, с цел да не попадат левкоцити в PRGF. Продуктът е с ниско съдържание на тромбоцити – около  $6 \cdot 10^5$  тромбоцити/ $\mu\text{l}$  [1] – около два пъти над нормата [2, 3].



Фиг. 3. Схематично представяне на протокол за PRGF [16]

### ***Начин на получаване: богат на тромбоцити фибрин (БТФ); PRF – platelet-rich fibrin***

PRF е създаден във Франция през 2001 г. с оглед избягване на рестрикциите във френското законодателство по отношение на реимплантиране на биохимично обработени кръвни продукти. Получава се без използване на антикоагуланти, без добавяне на химични съединения и чужди протеини, по опростен и бърз начин.

10-80 ml венозна кръв от голямокалибрени вени на ръката се разпределят в 10 ml сухи стерилни стъклени епруветки без антикоагулант и се центрофугират веднага в режим 2700 rpm за 12 min или 3000 rpm (около 400 g) за 12 min [11, 12, 13, 14].

Различават се отчетливо три слоя: безклетъчна плазма на повърхността, БТФ по средата и червени кръвни клетки в основата. Тромбоцитите кумулират в долните участъци на фибриновото блокче – на и под границата на БТФ и червените кръвни клетки [12]. Поради този факт срязването на блокчето се прави малко под границата с червените клетки, като включва и малка част от тях. Четири епруветки са достатъчни за покриване на малък костен дефект или за изготвяне на четири мембрани. Важно условие е центрофугирането да започне веднага след вземането на кръв (до 2 min 30 s). Ако това условие не бъде спазено, фибринът полимеризира дифузно и не се получава тромбоцитен концентрат. Изваждането на ТК веднага след приключване на центрофугирането също е важно условие за успех – така се предотвратява депозирането му по дъното на епруветката и смесването му с еритроцитите. БТФ е под формата на гелообразно блокче, което може да се оформя в мембрани с дебелина 1 mm или във фибринови цилиндри след отстраняване на течността. Възможно е също изготвяне на мембрана от една част от концентрата и фрагментиране на останалото количество, което да бъде смесено с костен трансплантат.

### **Класификация**

Неотдавна бе предложена система за класификация на технологиите за получаване на тромбоцитни концентрати, която да въведе известна яснота в терминологията [15].

Технически тромбоцитните концентрати могат да бъдат групирани в 4 фамилии с различна архитектура на фибриновата мрежа, клетъчно съдържание и съответно – различен потенциал за клинично приложение. Чиста БТП и съдържаща левкоцити и тромбоцити плазма са тромбоцитни суспензии, респективно без и с левкоцити. Те са течни – не се образува фибринова мрежа – и могат да се инжектират в травмирани стави и сухожилия – в този вид се използват предимно в спортната медицина. След активирането им се превръщат в гел, който може да се апликира директно в оперативната рана.

От друга страна, чистият БТФ и съдържащият левкоцити и тромбоцити фибрин, съответно без и с левкоцити, съществуват само в активирано (активирането е част от процеса на получаването им) твърдо състояние, поради което се разглеждат като биоматериали. Това се дължи на по-силните механични качества на специфичното омрежване на фибриновия им матрикс, в който остават “уловени” растежни фактори, клетки и матриксни молекули.

***Чиста (без левкоцити) тромбоцитна плазма (P-PRP):***

- чрез плазмафереза,
- Vivostat PRF,
- Anitua’s PRGF.

***Богата на тромбоцити и левкоцити плазма (L-PRP):***

- Неавтоматизирани системи:
  - Curasan PRP Kit ( Curasan Pharma GmbH AG, Lindingstrab, Kleinostheim, Germany);
  - Regen PRP( Regen Laboratory, Mollens, Switzerland);
  - Friadent-Schütze, (Vienna, Austria);
  - Plateltext (Bratislava, Slovakia).
- Автоматизирани системи:
  - Smart PReP Autologous Platelet Concentrate System (Harvest Technologies Corp, Plymouth, MA);
  - Platelet Concentration Collection System – PCCS (3I Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FLA);
  - Magellan Autologous separator (Medtronic Inc, Minneapolis, MN);
  - GPS (Gravitational Platelet Separation System), Biomet Biologic, Warsaw, USA.

**Чист тромбоцитно богат фибрин (P-PRF):** Fibrinet PRFM kit (FIBRINET®, Cascade Medical Enterprises, Wayne, NJ, USA).

**Богат на тромбоцити и левкоцити фибрин (L-PRF):** Choukroun's PRF.

Автоложните тромбоцитни концентрати, обект на научен интерес от 20 години, са съвременни иновативни технологии, които произлизат от фибриновите адхезиви. Те заемат заслужено място като помощни средства в различни хирургични дисциплини, като ускоряват естествените физиологични механизми на костното и мекотъканното възстановяване. ТК се използват успешно в ортопедичната хирургия, торакалната хирургия, кардиохирургията, неврохирургията, както и в пластичната хирургия, дерматологията и офталмологията. Въпроси, които предстои да бъдат изяснени, са: Растежните фактори или фибриновата структура са в основата на техните качества? Между научната истина, мита и комерсиалните интереси – какви клинични преимущества осигуряват тромбоцитните концентрати за локално приложение? Какви са конкретните индикации за прилагане на различните им разновидности в оралната и лицево-челюстната хирургия?

### Библиография

1. Anitua, E. et al. Delivering growth factors for therapeutics. – Trends Pharmacol. Sci., **29**, 2008, № 1, 37-41.
2. Anitua, E., R. Prado et M. Sánchez. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. – Oper. Tech. Orthop., **22**, 2012, 25-32.
3. Anitua, E., M. Alkhrasat et G. Orive. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. – J. Control. Release, **10**, 2012, № 1, 29-38.
4. Arnoczky, S., D. Delos et S. Rodeo. What is platelet-rich plasma? – Oper. Tech. Sports Med., **19**, 2011, № 3, 142-148.
5. Blair, P. et R. Flaumenhaft. Platelet  $\alpha$ -granules: basic biology and clinical correlates. – Blood Rev., **23**, 2009, № 4, 177-189.
6. Broos, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. – Blood Rev., **25**, 2011, № 4, 155-167.
7. Broos, K. et al. Blood platelet biochemistry. – Thromb. Res., **129**, 2012, № 3, 245-249.
8. Clark, R. Fibrin glue for wound repair: facts and fancy. – Thromb. Haemost., **90**, 2003, № 6, 1003-1006.

9. Choi, B. H. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. – *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **34**, 2005, № 4, 420-424.
10. Cytokines & cells online pathfinder encyclopedia:  
[www.copewithcytokines.de/cope.cgi](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi)
11. Dohan, D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. – *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **101**, 2006, № 3, E37-44.
12. Dohan, D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. – *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **101**, 2006, № 3, E45-50.
13. Dohan, D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? – *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **101**, 2006, № 3, E51-55.
14. Dohan, D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. – *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **101**, 2006, № 3, E56-60.
15. Dohan, D., L. Rasmusson et T. Albrektsson. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). – *Trends Biotechnol.*, **27**, 2008, № 3, 158-167.
16. Dohan, S. et al. De l'usage des concentrés plaquettaires autologues en application topique. – *Odontologie*, 2005, № 1, 141-180.
17. Everts, P. A. et al. What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? – *J. Biomed. Mater. Res.*, **85**, 2008, № 4, 1135-1136.
18. Ganong, W. *Review of Medical Physiology*. London, McGraw-Hill Companies, 2005.
19. Landesberg, R. et al. Risks of using platelet-rich plasma gel. – *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **56**, 1998, № 9, 1116-1117.
20. Marx, R. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. – *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **62**, 2004, № 4, 489-496.
21. Marx, R. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. – *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **85**, 1998, № 6, 638-46.
22. Marx, R. et A. Garg. *Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma*. Berlin, Quintessence Books, 2005.
23. Mercier, V. *Stimulation de la cicatrisation du tissu gingival et du tissu osseux par l'utilisation de concentrés plaquettaires*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire, présentée publiquement le 9 decembre, 2011, Université Henri Poincaré, Nancy, Faculté d'odontologie.
24. Mish, C. E. *Contemporary Implant Dentistry*. N. Y., Mosby, 2008.
25. Mobley, S., J. Hilinski et D. Toriumi. Surgical tissue adhesives. – *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.*, **10**, 2002, 147-154.
26. Petersen, B. et al. Tissue adhesives and fibrin glues. – *Gastrointest. Endosc.*, **60**, 2004, № 3, 327-332.

27. R a j a , S. et M. Naidu. Platelet-rich fibrin: evolution of a second generation platelet concentrate. – Indian J. Dent. Res., **19**, 2008, № 1, 42-46.
28. S o m a n i , R. et al. Platelet-rich plasma – a healing aid and perfect enhancement factor: review and case report. – Int. J. Clin. Pediatr. Dent., **4**, 2011, № 1, 69-75.
29. V a l b o n e s i , M. Fibrin glues of human origin. – Best. Pract. Res. Clin. Haematol., **19**, 2006, № 1, 191-203.
30. W a s t e r l a i n , A. et al. Contents and formulations of platelet-rich plasma. – Oper. Tech. Orthop., **22**, 2012, № 1, 33-42.
31. W e i b r i c h , G. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma rich in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. – Int. J. Oral. Maxillofac. Implants, **20**, 2005, № 1, 118-123.

☒ *Адрес за кореспонденция:*

Д-р М. Александрова

Факултет по дентална медицина,

Катедра по орална и лицево-челюстна хирургия

ул. „Св. Георги Софийски” № 1

1431 София

Постъпила на 30 септември 2013 г.