

**РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ И КОСТНА РЕГЕНЕРАЦИЯ****С. Парушева***Катедра по орална и лицево-челюстна хирургия,  
Факултет по дентална медицина – София*

**Резюме.** Растежните фактори са естествени биологични фактори на организма, които имат способността да регулират жизнени функции, свързани с клетъчна миграция, диференциация, пролиферация, матрично моделиране и ангиогенеза в хирургичната рана. Възможностите за стимулиране на тъканното възстановяване и костната регенерация в раната са причина непрекъснато да се развиват и усъвършенстват техниките за получаване на автогенни растежни фактори. Повишаването на концентрацията на тромбоцитите в кръвните продукти води до усилване на оздравителния процес. Съществуват много техники с различни протоколи за работа и получаване на различни биологични продукти. PRP – богатата на тромбоцити плазма, е първата генерация тромбоцитен концентрат след фибриновите лепила. Богатият на тромбоцити фибрин (PRF) принадлежи към ново поколение тромбоцитни концентрати с опростен протокол и без биохимична обработка на кръв. Стремешът при всяко следващо поколение е да се намалява оздравителният период, усложненията при хирургична интервенция и да се ускори и подобри тъканната регенерация.

*Ключови думи:* растежни фактори, костна регенерация, дентална хирургия

**GROWTH FACTORS AND BONE REGENERATION****S. Parusheva***Department of Oral and Maxillofacial Surgery  
Faculty of Dental Medicine – Sofia*

**Summary.** Growth factors are naturally occurring biological agents, having the ability to regulate vital functions associated with cell migration, differentiation, proliferation, matrix modeling, and angiogenesis in the surgical site. The capabilities to stimulate tissue repair and bone regeneration in wound, is

a reason to continuously develop and improve the techniques for obtaining autologous growth factors. The increase of the platelet concentration in the blood products result in an enhancement of the healing process. There are many techniques with different protocols for handling and preparation of various organic products. PRP – platelet rich plasma is the first generation platelet concentrate after the fibrin glue. Platelet Rich Fibrin (PRF) belongs to a new generation of platelet concentrates with simplified protocol and without biochemical processing of blood. Each generation seeks to reduce healing time, complications in surgery, and to accelerate and improve tissue regeneration.

**Key words:** *growth factors, bone regeneration, dental surgery*

През последните години нараства интересът към растежните фактори и клетъчната диференциация, към техния капацитет да усилят оздравителния процес и костната регенерация [6, 20, 37].

Ограниченията на хирургията са, че не се гарантира и промотира заздравяването, а хирурзите непрекъснато търсят да премахнат всички възпрепятстващи оздравителния процес обстоятелства, като инфекция, травма, нестабилност на различните видове графт-материали или чужди тела. От началото на 1990 г. и до момента растежните фактори се считат за „Светия Граал” при заздравяването на раните [38, 45, 46].

Растежните фактори са естествени биологични продукти на организма, които имат способността да регулират жизнени функции, свързани с клетъчната миграция, диференциация, пролиферация, матриксното моделиране и ангиогенезата в хирургичната рана [3, 37, 41, 48].

В процеса на научното търсене непрекъснато се развиват и усъвършенстват много и разнообразни техники за получаване на автогенни растежни фактори.

### **Класификация на растежните фактори**

1. Epidermal Growth Factor (EGF) – епидермален растежен фактор
2. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) – тромбоцитно изолиран растежен фактор
3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFs) – васкуларно-ендотелен растежен фактор

4. Fibroblast Growth Factor (FGFs) – фибробластен растежен фактор
5. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGFs- $\beta$ ) – трансформиращ растежен фактор- $\beta$
6. Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGFs- $\alpha$ ) – трансформиращ растежен фактор- $\alpha$
7. Erythropoietin (Epo) – еритропоетин
8. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) – инсулиноподобен растежен фактор-1
9. Insulin-Like Growth Factor-2 (IGF-2) – инсулиноподобен растежен фактор-2
10. Интерлевкини
11. Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) – тумор-некротичен фактор- $\alpha$
12. Tumor Necrosis Factor-  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) – тумор-некротичен фактор- $\beta$
13. Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) – интерферон- $\gamma$
14. Colony Stimulating Factors (CSFs) – колонии-стимулиращ фактор

### **Механизъм на действие на растежните фактори**

Възстановяването на тъканите включва четири етапа:

1. Кървене и формиране на кръвен коагулум през първите 24 часа. Фибриновият скелет на коагулума играе ролята на матрикс, който направлява движението на клетките, включително мезенхимните и растежните фактори, участващи в костната регенерация. Неутрофилите и макрофагите навлизат в раната и разграждат бактериите и тъканните остатъци, като по този начин почистват раната. Отделят цитокини и растежни фактори, които предизвикват и стимулират миграцията на мезенхимни клетки и техни продукти в коагулума.
2. Организиране на коагулума и формиране на грануляционна тъкан, която го замества (2-ри-4-ти ден).
3. Заместване на грануляционната тъкан от съединителна (фиброзна) и епителизиране на раната (1-ва-2-ра седмица).
4. Моделиране и ремоделиране на новообразуваните тъкани.

Коагулумът се състои от червени (еритроцити), бели кръвни клетки (левкоцити) и тромбоцити, включени във фибринова мрежа. Той предпазва наранените тъкани и представлява матрикс за тъканна миграция.

Тромбоцитите произлизат от цитоплазмената фрагментация на мегакариоцитите в костния мозък. Те са малки безядрени клетки, които имат ограничен жизнен цикъл – 7-10 дни, за разлика от еритроцитите, които живеят около 120 дни. Независимо от това, че и двата вида клетки са безядрени, те са значително метаболитно активни. Тромбоцитите по време на жизнения си цикъл активно синтезират растежни фактори в отговор на съсирването. Морфологично се характеризират с неправилна форма, с множество инвагинации по клетъчната мембрана, псевдоподни израстъци и множество везикули в цитоплазмата (складиращи растежните фактори в гранули). Везикулите се групират в три типа гранули:  $\alpha$ -, dense- и лизозомни гранули [17, 41, 46, 61].

- Dense-гранулите основно складираат и секретират аденозиндифосфат (ADF), който е активатор на други тромбоцити.

- Лизозомните гранули функционират като склад за храносмилателни ензими.

- $\alpha$ -гранулите са склад за растежни фактори. Съдържат предпакутирани растежни фактори в непълна и бионеактивна форма. Също така са богати и на клетъчноадхезивни молекули – *витронектин*, който е необходим за остеокондукцията и остеоинтеграцията [18, 19, 27, 45, 61].

В  $\alpha$ -гранулите са изолирани следните растежни фактори с техните изомери:

- Transforming Growth Factor  $\beta$  – трансмормиращ растежен фактор- $\beta$  с два изомера (TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 2).

- Platelet-Derived Growth Factor – тромбоцитно изолиран растежен фактор с три изомера (PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$  и PDGF $\alpha\beta$ ).

- Vascular Endothelial Growth Factor – васкуларно-ендотелен растежен фактор (VEGF).

- Epidermal Growth Factor – епидермален растежен фактор (EGF) [41, 45, 48, 61, 64, 70].

Тромбоцити участват в естественото заздравяване на раните, съобразно броя им в кръвната циркулация. Повишаването на концентрацията им в кръвните продукти също води до усилване на оздравителния процес. И в двете ситуации секрецията на рас-

тежни фактори се активира от процеса на съсирване. Активацията на процеса на образуване на коагулум се свързва със структурна промяна в тромбоцитната мембрана, като проявата е активна секреция на неактивни растежни фактори в  $\alpha$ -гранулите. Те мигрират до повърхността на тромбоцитната мембрана и се сливат с нея. Тези неактивни протеини се свързват с хистони и карбохидратни вериги и се превръщат в биологично активни растежни фактори [31].

Кръвните продукти с концентрирани растежни фактори първоначално са били използвани за лечение и превенция на хеморагии при тежки тромбоцитопении, причинени от медуларна аплазия, остри левкемии или значителна кръвозагуба при тежки и продължителни операции. Стандартната тромбоцитна концентрация е наречена PRP и класически съдържа  $0,5 \times 10^{11}$  Thr per unit. Приложението на извлечени от кръв продукти за уплътняване на рани и стимулация на оздравяване започва с употребата на фибринови лепила, които за първи път са описани преди 40 години и са съставени от концентриран фибриноген (полимеризация, индуцирана от тромбин и калций) [20, 49]. Автогенните фибринови лепила се считат за най-добрия избор за избягване на риска от контаминация, но използването им си остава ограничено поради сложността и високата цена на техните продуктови протоколи [20, 26].

За пръв път през последното десетилетие Whitman et al. изследват употребата на тромбоцитните концентрати за подобряване на оздравяването на тъканите и за заместване на фибриновите лепила [65].

Днес съществуват много техники за концентриране на тромбоцити и различните фирми производители предлагат различни протоколи за работа, като всеки от тях води до продукт с различни биологични ползи.

До момента известните тромбоцитни концентрати са:

- **PRP** (Platelet rich plasma) – богата на тромбоцити плазма.
- **PRF** (Platelet rich fibrin) – богат на тромбоцити фибрин.
- **L-PRF** (Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin) – богат на левкоцити и тромбоцити фибрин.
- **PRGF** (Plasma rich in growth factors) – плазма, богата на растежни фактори.
- **CGF** (Concentrated growth factors) – концентрирани растежни фактори.

- **AFG** (Autologous fibrin glue) – автогенно фибриново лепило.
- **A-PRF** (Advanced platelet rich fibrin) – модерен фибринов матрикс, богат на тромбоцити.
- **i-PRF** (injectable platelet rich fibrin) – инжекционна форма на фибринов матрикс, богат на тромбоцити.
- **T-PRF** (titanium prepared platelets rich fibrin) – фибринов матрикс, богат на тромбоцити, приготвен в титаниеви епруветки.

Тези продукти се използват за локално освобождаване на растежни фактори, които имат способността за контрол върху жизнени функции – тъканно възстановяване и ремоделиране [17, 48, 61].

Освен в оралната и пародонталната хирургия тромбоцитните концентрати намират широко приложение и в други медицински области – орална и лицево-челюстна хирургия, пластична и възстановителна хирургия, травматология и ортопедия, офталмология, неврохирургия, дерматология, гинекология и др. [46].

### **Какво е PRP**

Това е автогенен кръвен съсирек, съдържащ висок брой на концентрирани, жизнеспособни и биоактивни тромбоцити в концентрация около 1 млн. тромбоцити/ $\mu$ L, или около 4-7 пъти повече от обичайния брой тромбоцити (200 000-450 000 тр./ $\mu$ L) според Marx [45].

Контрастиращо PRP съсирекът съдържа 94% тромбоцити, 5% еритроцити и 1% левкоцити, а нормалният кръвен съсирек, изолиран от зъбна алвеола, съдържа 94% еритроцити, само 6% тромбоцити и по-малко от 1% левкоцити [56].

### **Клиничен ефект на PRP при костната регенерация**

Първото проучване на Marx et al., одобряващо тромбоцитните концентрати и техния стимулиращ ефект при заздравяване на костния графт, се появява в оралната хирургия и патология през 1998г. и документира, че в PRP концентрацията на тромбоцити е 4-7 пъти повече в сравнение с концентрацията им в периферната кръв [45].

Проучването демонстрира, че клетките на костния графт наистина притежават мембранни рецептори за приблизително всички растежни фактори, съдържащи се в тромбоцитите. Рентгенови и компютърнотомографски изследвания върху естествени човеш-

ки долни челюсти са установили повишена костна минерална плътност при PRP подпомогнатите графтове, вариращо от 1,6 до 2,2 пъти повече от тези без PRP. Това повишение е показало клинично по-бързо формиране и по-ранна матурация на костния графт, стимулиран с PRP [45].

Чрез хистоморфометричните изследвания авторите са установили, че продукцията на трабекуларна кост при автогенен костен графт без PRP е в стойности от  $55 \pm 8\%$ , сравнено с чист долночелюстен графт в стойности  $38 \pm 6\%$ , а костната продукция при PRP подсиления графт е в стойности от  $74 \pm 11\%$ . При тези измервания се установява и повишена костна плътност и висока степен на съзряване на продуцираната от PRP кост [45].

### **Ефект на PRP върху оздравяването на меките тъкани**

Ефектът на PRP върху заздравяването на меката тъкан протича паралелно на костната регенерация, но често, изглежда, е по-бърз поради по-лесно наблюдаващото се заздравяване на меката тъкан. Заместването на развилния се нормален съсирек в меките тъкани с PRP съсирека повишава възможните тромбоцитни растежни фактори, които осигуряват повишеното оздравяване за по-кратко време. Marx et al. са установили, че в областта с естествен коагулум се задържа периферен еритем, докато при PRP съсирека не се наблюдава подобен еритемен пръстен [46].

### **Протокол за получаване на PRP. Тромбоцитната сепарация и концентрация**

1. Асептична и минимално инвазивна флеботомия за изтегляне на необходимото количество кръв. Препоръчваният размер игла е № 19, за да се избегне тромбоцитната дезинтеграция или активация в лумена на тесните игли. Най-подходящите зони за вземане на кръв са повърхностните вени на горния крайник: v. mediana cubiti, v. cephalica, v. basilica. Епруветките, с които се взема кръвта, трябва да съдържат антикоагуланта цитрат декстроза А (ACD-A) [4, 34, 38, 42]. Затова днес кръвните банки използват само ACDA, като разтвор, запазващ тромбоцитите за тромбоцитна трансфузия. ЕДТА, който се използва в диагностичните кръвни лаборатории, не е приложим за тези цели, тъй като той уврежда тромбоцитните мембрани. Цитрат фосфат декстрозата –

CPD, който се използва за складиране на червени кръвни клетки, също не се препоръчва за тази цел, защото не подкрепя тромбоцитния метаболизъм като ACDA.

2. Преди вземане на кръвта в епруветката на 10 ml кръв се поставя по 1 ml антикоагулант – ACD-A (цитрат декстроза А).

3. Поставяне на антикоагулираната автогенна кръв в специфичните устройства за сепарация и концентрация на тромбоцити (центрофуги), като се препоръчва специално SmartPReP устройство от Harvest Technologies.

4. Първо центрофугиране на 1000 g за 4 минути (сепарация) – (4,000 g/min).

5. Второ центрофугиране 800 g за 8-9 минути (концентрация) – (6,400-7,200 g/min).

6. Приложената сила е около 1/3 от стойността – 30,000 g/min, за която е известно, че разрушава тромбоцитната мембрана, т.е. 11,000 g/min.

7. Съхранява се на стайна температура, като се използва до 8-ия час (не трябва да се охлажда или замразява).

8. Активиране на PRP чрез добавяне на CaCl<sub>2</sub>-тромбинов разтвор, който се получава като към 5 ml 10% CaCl<sub>2</sub> се добавят 5,000 единици говежди тромбин.

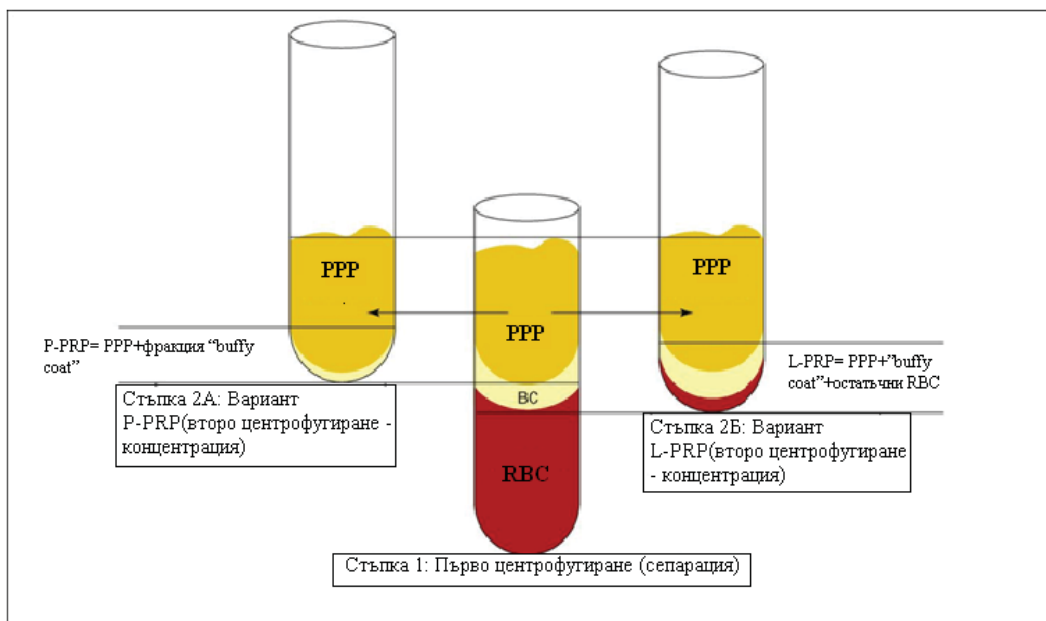
9. Три начина на активиране на PRP:

I. Антикоагулираното PRP се поставя в 10 ml спринцовка, а CaCl<sub>2</sub>-тромбиновият разтвор в 1 ml спринцовка. Двете се поставят в система, обединяваща двете спринцовки, с една дюза. По този начин експресията на разтворите е в съотношение 10:1 през върха на дюзата директно в дефекта. Съсирването протича за 6-10 s.

II. В съда (чаша) на PRP се добавят две капки от CaCl<sub>2</sub>-тромбиновия разтвор и след това се пренася към дефекта.

III. Аспириране на антикоагулираното PRP в спринцовка и аспирация на еквивалентното количество на две капки.

Важно е да се отбележи, че добавянето на повече от две капки CaCl<sub>2</sub>-тромбинов разтвор е контрапродуктивно (забавя или инхибира напълно съсирването чрез разреждане на фибриногенната концентрация).



**Фиг. 1.** Схематично представяне на PRP протокол (David M. Dohan)

### **PRP комбинации, използвани в оралната хирургия**

1. PRP съсирек, добавен към различни видове графт (материал), е една от най-популярните PRP конструкции, използвани от оралните хирурзи. Добавеният PRP съсирек консолидира костозаместителните частици в работещ комплекс с доказан манипулативен състав [48].

2. Един или няколко слоя PRP върху костен графт (при синуслифт) заздравяват и двата компонента – костен графт и подлежащи меки тъкани [59].

3. PRP мембрана, формирана чрез експресия на 1-2 ml от PRP върху гладка повърхност. След като PRP се съсери в рамките на 1 минута, може да бъде вдигнат с шпатулоподобен инструмент и да се приложи [59].

4. Съхранените костни и мекотъканни графтове (лиофилизиран алогенен графт или дермис) трябва да се рехидратират в антикоагулирано PRP за няколко минути. Тези графтове се обливат с  $\text{CaCl}_2$ -разтвор непосредствено преди поставянето [48].

### **Дентални, клинични приложения на PRP**

1. За презервация на постекстракционна алвеола (socket preservation).

2. Поставяне на PRP след екстракция на третия молар.

3. Приложение при синуслифт.
4. Хоризонтална и вертикална костна аугментация.
5. За лечение на пародонтални дефекти.

*Поставяне на PRP след екстракция на третия молар.* Независимо от подобренията на хирургичната техника и употребата на антисептици и вътреалвеоларни и системни антибиотици, операцията на третия молар продължава да бъде асоциирана с две добре известни усложнения: алвеоларен остейт (алвеолит) и редуцирана костна регенерация в областта на мъдреците и на съседния втори молар, водеща до патологичен пародонтален джоб [3, 21, 29]. Самостоятелно проучване на Babbush, Mansuno et al. демонстрира забележителна способност на PRP да редуцира случаите с алвеолит и да намали риска от развитие на пародонтални джобове дистално на втори молар [3, 7, 44]. Проучването на Mansuno et al. посочва доказателства за значително редуциране на клиничните симптоми при сух алвеолит, когато се прилага PRP [44].

Има три различни теории относно механизма на PRP коагулума за понижаване на остейта и за увеличаване на костната регенерация.

1. Киселинното рН на PRP от 6,5 до 6,7 инхибира бактериалния растеж за разлика от рН на естествения съсирек, което е 7,4 [42].

2. PRP концентрира освен тромбоцити и голям брой функционално жизнеспособни бели кръвни клетки, които инхибират бактериалния растеж [20].

3. Ранният растеж на капиляри (предизвикан от PRP) предотвратява бактериалния растеж чрез доставяне на по-голям брой макрофаги и неутрофили от кръвообращението и създаване на по-богата на кислород среда, която специфично потиска растежа на анаеробни микроорганизми [42].

Тези предимства на PRP трябва да се имат предвид при планови оперативни интервенции за екстракция на ретинирани трети молари, а особено при пациенти с висок риск от развитието на алвеолит: диабет тип 1 и 2, пушачи, пациенти след химиотерапия, лъчетерапия, стероиди и предполагаема травматична екстракция.

## Еволюция на кръвните концентрати

Използването на тромбин за активирането на PRP, нуждата от по-голямо количество кръв и съдържанието на левкоцити в състава на PRP са довели до ограничения в неговото използване. Тъй като съществува спор за и против съдържанието на левкоцити в тромбоцитните концентрати, е възникнала концепцията за PRGF техниката (плазма, богата на растежни фактори), при която се изключват левкоцитите [4, 5]. При PRGF техниката се получава по-висока концентрация на тромбоцити, добити от по-малко количество кръв, като за активиране на плазмата се използва малко количество  $\text{CaCl}_2$ . Тоест PRGF е еволюирала форма на PRP, но протоколът и техниката на получаване са различни [4, 6]. При следващите генерации тромбоцитни концентрати като богатия на тромбоцити фибрин – platelet rich fibrin (PRF), и негови производни се обръща внимание на нуждата от абсолютно всички левкоцити и по-специално от моноцити за получаване на костен морфогенен протеин – bone morphogenic protein (BMP), от кръвен концентрат. Авторите на тази концепция и протокол считат, че това е не само тромбоцитен концентрат, а един имунен комплекс, който освен растежни фактори съдържа и множество други цитокини, контролиращи възпалителните процеси. Тази концепция обяснява намаляването на възпалението при използване на PRF като хирургична добавка при оперативните интервенции [10, 19, 61].

Богатият на тромбоцити фибрин – PRF, разработен от Joseph Choukroun et al. (2001), е нова стъпка в терапевтичната концентрация на тромбоцитния гел. PRF е втора генерация тромбоцитен концентрат, широко използван за ускоряване на лечението на меки и твърди тъкани. Неговото предимство над добре известната богата на тромбоцити плазма (PRP) включва лесно приготвяне/приложение, минимален разход и липса на биохимична модификация (не се изисква говежди тромбин или антикоагулант). PRF е строго автоложна фибринова матрица, съдържаща голямо количество растежни фактори, тромбоцитни и левкоцитни цитокини [10, 17, 45].

Растежни фактори и цитокини в PRF:

- PDGF-AB – тромбоцитно изолиран растежен фактор-AB
- TGF- $\beta$ 1 – трансформиращ растежен фактор- $\beta$ 1

- IGF-1 – инсулиноподобен растежен фактор-1
- VEGF – васкуларно-ендотелен растежен фактор
- Thrombospondin (TSP-1) – тромбоспондин-1
- Fibronectin – фибронектин
- Vitronectin – витронектин
- IL-1B – интерлевкин-1B
- IL-4 – интерлевкин-4
- IL-6 – интерлевкин-6
- TNF- $\alpha$  – тумор-некротичен фактор- $\alpha$ .

Новият A-PRF протокол трябва да се възприеме като *златен стандарт* при техники за използване на кръвни концентрати (A-PRF – Choukroun's method). Разработен е за специална употреба в оралната и лицевочелюстната хирургия.

**PRF протоколът на Choukroun** е значително улеснен и представлява центрофугиране на кръв без никаква добавка. По време на PRF обработката тромбоцитите се активират и тяхната масивна дегранулация предполага много голямо освобождаване на растежни фактори и цитокини. Бавната фибринова полимеризация по време PRF обработката води до вътрешно включване на тромбоцитни цитокини и гликанни вериги във фибриновата мрежа. Това е доказало, че PRF за разлика от другите тромбоцитни концентрати е в състояние постепенно да освобождава цитокини по време на ремоделирането на фибриновата матрица. В свое проучване David M. Dohan et al. са установили, че с такъв механизъм може да се обяснят клинично наблюдаваните лечебни свойства на PRF [18].

В своето сравнително проучване авторите са определили количествено PDGF-BB, TGF $\beta$ -1 и IGF-I в PPP (бедна на тромбоцити плазма) повърхностно и в серумния ексудат на PRF съсирека [18].

Количественото определяне на тромбоцитните цитокини в PRF представлява значителна стъпка в разбирането на този биоматериал, защото тези разтворими молекули са ключови противвъзпалителни и оздравителни медиатори [18, 25]. В действителност освен количеството важен е и начинът на включване на цитокините във фибриновата матрица.

## **Роля на тромбоцитите, левкоцитите и цитокините от PRF в хемостазата, възпалението и тъканното възстановяване**

Активирането на специфичните за тромбоцитите (като  $\beta$ -тромбоглобулин) или неспецифичните за тромбоцитите (фибронектин, тромбоспондин, фибриноген и други фактори на коагулацията, стимулатори на растежа, инхибитори на фибринолиза, имуноглобулини и т.н.) по време на дегранулацията е от основно значение за иницирането и подпомагането на хемостазата поради агрегирането им в увреденото място и участието им в механизмите за кръвосъсирване. Дегранулацията предполага също освобождаване на цитокини, които могат да стимулират клетъчна миграция и пролиферация в матрицата на фибрин, стартирането на първите етапи на лечение. Освен това тромбоцитната мембрана е двойнолипиден слой, който има многобройни рецептори за много активни молекули [18, 41, 64].

### ***Тромбоцитни цитокини***

**TGF  $\beta$ -1:** фиброзен агент. Трансформираният растежен фактор  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) е голяма фамилия с повече от 30 члена. Референтната молекула, когато говорим за TGF  $\beta$ , всъщност ще бъде TGF  $\beta$ -1. Това е най-масово произвежданата изоформа не само в тромбоцитните  $\alpha$ -гранули, но също така и като цяло по време на междуклетъчната комуникация [45, 53]. In vitro неговите ефекти са изключително разнообразни в зависимост от използваното количество, матриксната среда и типа клетки [24]. Въпреки че ефектите му по отношение на пролиферацията са силно променливи, за голямото мнозинство от клетъчни типове, тя представлява най-мощният фиброзен агент сред всички цитокини [9, 48]. С други думи, тя ще предизвика огромен синтез на матриксни молекули, като например колаген I и фибронектин, от остеобласти или от фибробласти.

По този начин, въпреки че неговите регулационни механизми са особено комплексни, TGF  $\beta$ -1 може да се разглежда като инфламационен регулатор чрез своя капацитет за предизвикване на фиброзно заздравяване.

**PDGFs:** стимулатор на мезенхимни родословия. PDGF (тромбоцитен растежен фактор) са основни регулатори за мигра-

цията, пролиферацията и оцеляването на мезенхимните клетъчни клонове [43, 51]. Според разпределението на техните специфични рецептори, те са в състояние да индуцират стимулация толкова лесно, колкото и инхибиране на развитието на тези клетки [30, 45].

Тази позиция на регулиращ възел играе основна роля по време на ембрионалното развитие и на всички механизми за ремоделиране на тъканите. Поради тази причина PDGFs имат важна роля в механизмите на физиологична цикатризация и в патогенезата на атеросклерозата и много други фибропролиферативни заболявания (например неоплазия и белодробна и бъбречна фиброза) [45, 67].

**IGF:** клетъчнопротективно средство: Инсулиноподобните растежни фактори (IGFs) I и II са положителни регулатори на пролиферацията и диференциацията на повечето от клетъчните видове, които за съжаление включват и туморни клетки (използващи IGF системата, за да увеличат своя потенциал за оцеляване) [48, 66]. Въпреки че тези цитокини са медиатори за размножаването на клетките, главно те представляват основно регулиращо стъбло за програмирана клетъчна смърт (апоптоза) чрез предизвикване на сигнали за оцеляване и защита на клетките от много апоптотни стимули [8]. Освен това, въпреки че IGFs се освобождават по време на дегранулацията на тромбоцитите, те първоначално масово присъстват в кръвообращението.

Трите основни тромбоцитни цитокина (TGF  $\beta$ -1, PDGFs и IGF) играят основна роля в първоначалните оздравителни механизми поради тяхната способност да стимулират клетъчната миграция и пролиферация (особено от PDGFs) и индуцират ремоделирането на фибриновата матрица, както и секреция на цикатрициална колагенова матрица (особено от TGF  $\beta$ ) между фибриновата матрица и тромбоцитните цитокини, освободени по време на центрофугиране, и основната биологична архитектура на PRF.

След анализа на получените резултати в своето изследване авторите David M. Dohan et al., установяват няколко биологични хипотези относно биологичните функции на PRF [18].

След сравнение на техните стойности с тези, получени от други автори и голям брой cPRP протоколи [63, 69], те стигат до заключението, че PRF тромбоцитните цитокини остават в капана на клетката фибрин, а вероятно дори и в полимерите фибрин.

В следващи изследвания на David M. Dohan, Qian Zhang et al. е установено, че в регулацията на хемостазата участват и други кръвни елементи от кръвния концентрат – левкоцити. Те секретират цитокини в отговор на хемостатичния и инфламационен момент, който се индуцира в центрофугираната епруветка [19]. В своите изследвания авторите са проучили количествено следните клетъчни медиатори в бедния на тромбоцити плазмен повърхностен слой и ексудирания серум от PRF съсирека:

1. Възпалителен цитокин (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10);
2. VEGF – ключов стимулатор на растежа при ангиогенезата.

Получените резултати са били сравнени с тези от плазмата (неактивирана кръв) и в серуми (активирана кръв) [19].

Възпалителният процес се определя от всички реакции, които са в отговор на специфичен дразнител. Възпалителният процес протича в три последователни етапа: съдова фаза, клетъчна фаза и заздравителна фаза.

### ***Възпалителни цитокини***

Броят на медиаторите, участващи при възпалителните процеси, е голям, но вниманието на авторите е насочено върху следните основни възпалителни цитокини: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- $\alpha$ . По време на възпалителния процес пикът на секреция на тези три цитокина съвпада в пространството и времето [19].

#### **1. Интерлевкин-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

- Съществува в две изоформи,  $\alpha$  и  $\beta$ . IL-1 $\beta$  е широко разпространена форма.
- Произвежда се от активираните макрофаги, неутрофили, ендотелни клетки, фибробласти, кератиноцити и Лангерхансови клетки.
- Синтезът на IL-1 се медира от TNF- $\alpha$ , интерферони (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и бактериални ендотоксини.
- Ключов медиатор е за възпалителния контрол [15, 16] и стимулира Т-хелперните лимфоцити [48].

#### **2. Интерлевкин-2 (IL-2)**

- Известен като Т-клетъчен растежен фактор (TGF), секретира се от стимулирани Т-хелперни клетки, цитотоксични Т-клетки и големи гранулирани лимфоцити.
- Важна роля в имунорегулацията и възпалението.

- Стимулира пролиферация и диференциация на Т-, В-клетки, активира макрофаги и олигодендрцити, увеличава оцеляването на В-клетките.

### **3. Интерлевкин-6 (IL-6)**

- Произвежда се от стимулирани моноцити, фибробласти и ендотелни клетки, макрофаги, Т- и В-лимфоцити, гранулоцити, мастоцити, хондроцити и остеобласти.

- Физиологично IL-6 секрецията се стимулира от IL-1, бактериални ендотоксини, TNF- $\alpha$  и PDGF [30, 32].

- В присъствието на IL-2, той индуцира диференцирането на зрели и незрели Т-лимфоцити в цитотоксични Т-лимфоцити.

- В състояние е да индуцира крайната диференциация на В-лимфоцити в секретирани плазмоцити. В В-лимфоцитните популации IL-6 значително стимулира секрецията на антитела [32].

- IL-6 и IL-3 действат по синергичен начин за насърчаване на пролиферация на хемопоетични стволови клетки *in vitro*.

- Подкрепя реакционните вериги, водещи до възпаление, деструкция и ремоделиране.

### **4. Интерлевкин-10 (IL-10) – антиинфламаторен цитокин**

- Инхибира остеокластната активност и регулира остеобластното костно формиране (инхибира костната резорбция). Затова е терапевтична стратегия при процеси, свързани с костна резорбция.

- Регулира антивирусен отговор, чрез инхибиция на производството на интерферон гама, антигенното представяне и производството на IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ .

- Играе важна роля в В-клетъчната активация [51].

### ***Заздравителни цитокини***

Цикатрициалното свойство може да се определи по отношение на два аспекта:

- Потискат възпалителните сигнални пътища и неутрализират тяхното усилване.

- Подпомагат и координират развитието на първоначалните цикатрициални структури като съдовите тръби.

### **1. Интерлевкин-4 (IL-4)**

- Произвежда се основно от субпопулация на активирани Т-клетки (TH2, CD41), които също секретират IL-6 [8].

- Този цитокин подкрепя пролиферацията и диференциацията на активираните В-клетки. Въпреки това неговите ефекти са напълно зависими от средата на цитокина [35, 36, 48].

- Основната му функция се проявява в подкрепа на заздравяването, като активира  $\beta$ -клетките, като модерира възпалението и увеличава синтеза на колагенови фибрили от фибробластите и инхибиране стимулирането на MMP-1 и MMP-3 от IL-1 $\beta$  [57].

## **2. Съдов ендотелен растежен фактор (VEGF)**

- Най-мощният и повсеместен от известните съдови растежни промотори [68].

- Той играе пряка роля в контрола над поведението на ендотелните клетки, като пролиферация и миграция [28, 48, 52].

- Самото присъствие на този цитокин е начело на ангиогенезата, като насочва и усъвършенства растежа на мрежата [48, 58].

Получените резултати подчертават повишената секреция на всички възпалителни или цикатрициални тествани интерлевкини, които подобно на тромбоцитните цитокини са хванати във фибриновата мрежа по време на полимеризацията.

С такова съдържание на имунните ключови цитокини (проили противовъзпалителни) и ангиогенеза, PRF съсирекът се смята за имунно организиран възел, чийто отбранителен капацитет срещу инфекции е значителен, от хемотактичните свойства на цитокините. Така PRF е не само тромбоцитен концентрат, но и имунен възел, който е в състояние да стимулира защитните механизми [19, 20].

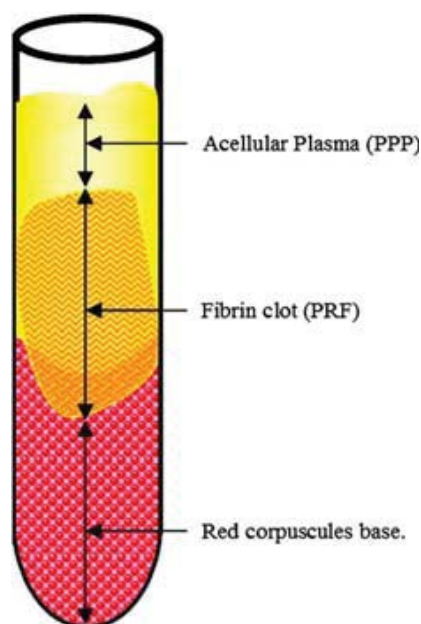
## **Протокол за получаване на PRF на Choukroun**

1. Кръвната проба се събира без антикоагулант в 10-милилитрови епруветки.

2. Веднага се центрофугира на 3000 оборота в минута (800 g) в продължение на 10 минути.

3. В рамките на няколко минути, липсата на антикоагулант позволява активиране на по-голямата част тромбоцити, съдържащи се в пробата, да предизвикат коагулационна каскада. Фибриногенът първо се концентрира в горната част на епруветката, докато ефектът на циркулиращия тромбин го трансформира във фибринова мрежа. Резултатът е фибринов съсирек, съдържащ

тромбоцити, намиращи се в средата на епруветката, точно между слоя от червени кръвни клетки на дъното и безклетъчна плазма в горната част [17, 45, 61, 63].



Фиг. 2. Схема на PRF протокол по метода на Choukroun

4. За разлика от PRP, PRF е резултат от естествена и прогресивна полимеризация, която се появява по време на центрофугиране. Този съсирек се отстранява от епруветката и прикрепените червени кръвни клетки се остъргват и се изхвърлят.

5. Извличането на PRF съсирека е възможно по няколко начина:

- Да се постави в стерилна метална чаша или стерилно петри за около 10 минути, за да се позволи бавно освобождаване на серума, съдържащ се в него.

- Да се използва специфичният PRF Vox® (Process Ltd., Ница, Франция) [61, 63].

PRF съсирекът се поставя на решетката в PRF Vox® и се покрива с компресора и капака. Това създава евтина автогенна фибринова мембрана за около една минута [61, 63].

В PRF Vox® се получават мембрани с постоянна дебелина, в които остават хидратирани в продължение на няколко часа, и чрез него се отстранява серумният ексудат, отделен от фибриновия съсирек, който е богат на протеините витронектин и фибронектин [18, 61]. Ексудът, събран в долната част на кутията, може

да се използва за инкубиране и хидратиране на графт-материали или за промиване на мястото на хирургична намеса.

Освен мембрани в специфични PRF Vox®, могат да бъдат получени и малки дебели дискове (тапи) от PRF, които могат да бъдат използвани за презервация на постекстракционна алвеола. В PRF Vox® има цилиндри, в които се поставя PRF съсирекът и бавно се компресира с бутало.

Получените малки дискове са 1 cm в диаметър и лесно се вмъкват в остатъчната екстракционна алвеола, за да се ускори оздравяването на меката тъкан, и позволяват идеално поставяне на имплант [59, 60].

### **Дентални, клинични приложения на PRF**

PRF продуктите могат да бъдат използвани самостоятелно или в комбинация с различни видове графт-материали в следните направления:

1. Презервация на дентална алвеола.
2. Вертикална и хоризонтална аугментация.
3. Синуслифт.
4. Хирургично лечение на пародонтални заболявания.
5. Между фрагментите в остеотомната линия при сплит-остеотомията.

В свое проучване Choukroun et al. са установили ускоряване на оздравителния процес при синуслифт, използвайки комбинация от PRF с лиофилизиран костен алографт (FDBA) [11]. От изследваните от тях групи са взели материал за изследване на 4-тия и 8-ия месец. При хистологичните им изследвания се констатира наличието на остатъчни костни частици, заобиколени от новоформираната кост и съединителната тъкан. На 4-тия месец, хистологичната матурация на изследваната група е идентична с тази на контролната група след период от 8 месеца, количеството на новообразувана кост е било еквивалентно между двата протокола.

В публикация от две части Simonpieri et al. съобщават за нова техника за максиларна реконструкция, използвайки FDBA, PRF мембрани и 0.5% разтвор на метронидазол [54, 55]. Малко количество от 0.5% разтвор на метронидазол (10 mg) е използвано за осигуряване на ефективна защита на костната присадка срещу

неизбежната бактериална контаминация [32]. PRF мембрани се използват за защита на мястото на хирургична намеса и за насърчаване на мекотъканното оздравяване и PRF продукти са смесени с частиците на графта. Мембраните могат да бъдат нарязани на няколко милиметрови фрагменти и да бъдат смесени с материала на присадката, функционирайки като "биологичен съединител" между различните елементи на присадката и като матрица, която благоприятства неоангиогенезата, уловените стволови клетки и миграцията на костно-прогениторни клетки до центъра на графта [27, 62]. Използвайки този протокол, е наблюдавана висока степен на гингивална матурация, което подобрява естетиката и крайния резултат от протезната рехабилитация. Авторите са установили, че използването на PRF намалява постоперативната болка и оток, и се ограничава дори и незначителният инфекциозен феномен [62].

При извършване на алвеоларна аугментация, PRF мембрани се използват за защита и стабилизиране на присадката, ускоряват интеграцията и ремоделирането на присадения биоматериал. Мембраните действат като фибринови превръзки, които ускоряват зарастването на меките тъкани, улесняват бързото затваряне на инцизията, въпреки значителния обем на добавена кост.

Според Simonpieri et al. използването на този тромбоцитен и имунен концентрат при присаждане на кост предлага следните четири предимства:

1. Фибриновият съсирек играе важна механична роля, PRF мембраната поддържа и защитава присадените биоматериали и PRF фрагменти, служещи като биологични връзки между костните частици.

2. Интегрирането на тази фибринова мрежа в регенерираното място улеснява клетъчната миграция, по-специално за ендотелни клетки, необходими за неоангиогенезата, васкуларизацията и оцеляването на присадката [17].

3. Тромбоцитните цитокини (PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1) се освобождават постепенно, като матрицата фибрин се резорбира и по този начин се осигурява постоянен процес на оздравяване [50, 54].

4. Наличието на левкоцити и цитокини в мрежата от фибрин играе значителна роля в саморегулацията на възпалителното и инфекциозното явление в рамките на присадката [22, 61].

Множество предклинични и клинични изследвания през последните 20 години демонстрират, че употребата на тромбоцитните концентрати, съдържащи различни растежни фактори, цитокини и фибринов матрикс, ускорява и значително подобрява мекотъканната и костната регенерация. Тяхната употреба при възстановяване на тъканните дефекти и рани позволява редуциране на времето за оздравяване, намалява възможните усложнения, увеличава успеваемостта и подобрява крайния резултат от хирургичната процедура. Представеният преглед на литературата ни дава основание да приемаме, че като основен оздравителен тромбоцитен и левкоцитен концентрат PRF и PRP имат своето място в ежедневната практика в оралната и лицево-челюстната хирургия.

### Библиография

1. Александрова, М. Автоложни тромбоцитни концентрати за локално приложение – видове и класификация. – Съвр. стоматол., 45, 2014, № 1, 24-38
2. Александрова, М. Автоложни тромбоцитни концентрати за локално приложение – клинични приложения. – Съвр. стоматол., 45, 2014, № 1, 39-56
3. Чешмеджиева, А. Приложение на автоложна богата на тромбоцити плазма в оралната хирургия. 2015, 5-66
4. Anitua, E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001;13:487-493.
5. Anitua, E. et al. (2007) The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 28, 4551-4560
6. Anitua, E. et al. (2008) Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 84, 415–421
7. Babush CA. The use of PRP in conjunction with other bone graft materials: Allograft, alloplast, xenograft. Presented at the 2nd Symposium on Platelet-Rich Plasma (PRP) and Its Growth Factors, San Francisco, 23-26 Apr 2003.
8. Boothby M, Mora AL, Aronica MA, Youn J, Sheller JR, Goenka S, Stephenson L. IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells. *Immunol Res* 2001;23:179-191.
9. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-1292.
10. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie* 2001; 42:55-62.
11. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101: 299-303.

12. Choukroun J, Simonpieri A, Del Corso M, Mazon Z, Sammartino, G, Dohan Ehrenfest, DM. Controlling systematic perioperative anaerobic contamination during sinus-lift procedures by using metronidazole: An innovative approach. *Implant Dent* 2008; 17:257-270.
13. Choukroun, J.I. et al. (2007) Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: a new opportunity in facial lipostucture (Coleman's technique) and tympanoplasty? *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord.)* 128, 27-32
14. Cordeiro PG, Disa JJ, Hidalgo DA, Hu QY. Reconstruction of the mandible with osseous free flaps: a 10-year experience with 150 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104:1314-1320.
15. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.
16. Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:378-385.
17. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:e37-44.
18. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:e45-50.
19. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Leukocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:e51-55.
20. Dohan DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology* ;2009;27:158-167.
21. Field EA, Speechley JA, Rotter E, Scott J. Dry socket incidence compared after a 12 year interval. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1985 ;23:419-427
22. From SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restor Dent* 2002;22:45-53.
23. Gaßling VLW, Açı, Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108:48-55.
24. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res* 1996;31:301-312.
25. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996;19(1 Suppl):23S-37S.

26. G i b b l e J W, N e s s P M. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30:741-747.
27. H a m d a n A A-S, L o t y S, I s a a c J, B o u c h a r d P, B e r d a l A, S a u t i e r J-M. Platelet-poor plasma stimulates proliferation but inhibits differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20:616-623.
28. H a r r y L E, P a e l o g E M. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 2003;69:363-374.
29. H e a s m a n P A, J a c o b s D J. A clinical investigation into the incidence of dry socket. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1984; 22:115-122.
30. H e l d i n C H. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS Lett* 1997;410:17-21.
31. H o t z G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part I: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991;20:204-207.
32. H o t z G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part II: Clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991;20:208-213.
33. K a m i m u r a D, I s h i h a r a K, H i r a n o T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:1-38.
34. K a s s o l i s J D, R o s e n P S, R e y n o l d s M A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71:1654-1661.
35. K a y N E, P i t t n e r B T. IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells. *Leuk Lymphoma* 2003;44:897-903.
36. K e e g a n A D, Z a m o r a n o J. Regulation of gene expression, growth, and cell survival by IL-4: contribution of multiple signaling pathways. *Cell Res* 1998;8:1-13.
37. K h o u r y F. Hadi Anton, Patrik Missika. Bone augmentation in oral implantology. University of Muenster Germany.
38. K n i g h t o n D R, H u n t T K, T h a k e r a l K K, G o o d s e n W H I I I. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: An in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 1982;196:379-388.
39. K n i g h t o n D R, H u n t T K, S c h e u e n s t u h l H, H a l l i d a y B J, W e r b Z, B a n d a M J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science.* 1983;221(4617):1283-1285.
40. K w a n T a t S, P a d r i n e s M, T h e o l e y r e S, H e y m a n n D, F o r t u n Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49-60.
41. L i n d M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998; 283:2-37
42. L i u Y, K a l é n A, R i s t o O, W a h l s t r ö m O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002;10:336-340.

43. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24:3095-3100.
44. Mancuso J, Bennion JW, Hull MJ, Winterholler BW. Platelet-rich plasma: A preliminary report in routine impacted mandibular third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61(suppl 1).
45. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-646.
46. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:489-496.
47. Marx RE, Ehler WJ, Tayapongsak PT, Pierce LW. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am J Surg.* 1990;160:519-524.
48. Marx RE, Garg AK. Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma.2005; 3-86.
49. Matras H. Die Wirkungen verschiedener fibrinpräparate auf kontinuierstrennungen der rattenhaut. *Osterr Z Stomatol* 1970; 67:338-359.
50. Mazon Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent* 2004;13:65-72.
51. Qian Zhang et al. Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *BioMed Research International Volume* 2014.
52. Ruhrberg C. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *Bioessays* 2003;25:1052-1060.
53. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:469-484.
54. Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole during Complex Maxillary Rehabilitations Using Bone Allograft. Part I: A New Grafting Protocol. *Implant Dent* 2009; 18:102–111.
55. Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole during Complex Maxillary Rehabilitations Using Bone Allograft. Part II: Implant Surgery, Prosthodontics, and Survival. *Implant Dent* 2009; 18:220–229.
56. Sunitha RV, Munirathnam NE. Platelet – Rich Fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res* 2008; 19(1):42-46.
57. Tiggleman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol* 1995;23:307-317.
58. Tiong A, Freedman SB. Gene therapy for cardiovascular disease: the potential of VEGF. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6:151-159.

59. Toffler M. Staged sinus augmentation using a crestal core elevation procedure (CCE) to minimize membrane perforation. *Pract Proced Aesthet Dent* 2002; 14:767–774.
60. Toffler M. Osteotome-mediated sinus floor elevation: A clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:266–273.
61. Toffler M, Toscano N et al. JIACD Continuing Education. Introduction Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. *The Journal of Implant and Advanced Clinical Dentistry*. 2009;21-31.
62. Vence BS, Mandelaris GA, Forbes DP. Management of dentoalveolar ridge defects for implant site development: An interdisciplinary approach. *Compend Cont Ed Dent* 2009; 30(5):250-262.
63. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest SmartPreP system versus the Friident-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:233-239.
64. White JG, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1987; 69:1196-1203.
65. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-1299.
66. Winkler R, Pasleau F, Boussif N, Hodzic D. The IGF system: summary and recent data. *Rev Med Liege* 2000;55:725-739.
67. Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:49-59.
68. Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1171-1177.
69. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;41:1217-1224.
70. Zucker-Franklin D, Benson KA, Myers KM. Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* 1985; 65:241-244.



*Адрес за кореспонденция:*

Д-р Садета Парушева  
 Катедра „Орална и лицево-челюстна хирургия”  
 Факултет по дентална медицина  
 МУ  
 ул. „Св. Г. Софийски” № 1  
 1431 София  
 e-mail: vitalmed@abv.bg