



**Медицински университет – Варна
„Проф. д-р Параскев Стоянов“**

Д-р Атанаска Йорданова Чешмеджиева

**Клинични резултати от приложението на
тромбоцитни концентрати в
постекстракционни участъци при използване на
нови протоколи за добиване на богата на
тромбоцити плазма**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ в област на
висшето образование 7. Здравеопазване, професионално направление 7.2.
Дентална медицина,
научна специалност „Хирургична стоматология“

Научен ръководител:
Проф. Росен Господинов Коларов, д.м.н.

Варна, 2023

Съдържание

I. Въведение	4
II. Литературен обзор	5
1. История и развитие на обогатените тромбоцитни концентрати	5
2. Сравнителен анализ на методите за изготвяне на обогатена с тромбоцити плазма.....	8
3. Номенклатура и класификации на тромбоцитните концентрати	13
4. Влияние на тромбоцитните концентрати върху тъканното оздравяване в хирургичната дентална медицина	21
5. Проблеми в оралната хирургия, относно формирани костни дефекти	26
6. Оздравителни процеси при костни и мекотъканни рани след оперативни дентални процедури	34
7. Механизъм на действие на обогатената с тромбоцити плазма	39
III. Цел, задачи, хипотеза	57
IV. Материали и методи	58
V. Собствени резултати	79
VI. Дискусия	110
VII. Изводи	151
VIII. Приноси	153
IX. Заключение	155
X. Приложения	156
XI. Библиография	171

Дефиниции и съкращения използвани в текста

БТП – богата на тромбоцити плазма

ТР – тромбоцити

ТК – тромбоцитен концентрат

ОХ – орална хирургия

ХЕ – хирургична екстракция

РФ – растежни фактори

ДМ – долен мъдрец

ДТМЗ – долен трети моларен зъб

ООХ – отделение по орална хирургия

ОПГ – ортопантомограма (рентгенова зъбна снимка)

ЛОХ – лична орална хигиена

BC/ Buffy coat“ – „бъфи коат“

ECGF/ Endothelial growth factor – ендотелен растежен фактор

EGF/ Epidermal growth factor – епидермален растежен фактор

GF/ Growth factors – растежни фактори

IGF// Insulin like growth factor - – инсулиноподобен растежен фактор

ILs - Интерлевкини

L-PRF/ Leukocyte- and platelet rich fibrin - – богат на левкоцити и тромбоцити фибринов съсирек

PC/ Platelet concentrates – тромбоцитни концентрати

PDGF/ Platelet-derived growth factor - – получен от тромбоцити растежен фактор

PPP/ Platelet poor plasma – бедна на тромбоцити плазма

PRF/ Platelet rich fibrin – богат на тромбоцити фибрин

PRP/ Platelet rich plasma – обогатена с тромбоцити плазма

RCF, g/relative centrifugal force – относителна центробежна сила

TGF- β -1/ Transforming growth factor beta - трансформиращ растежен фактор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Съществуващият проблем с тъканното оздравяване, съпроводен със стремеж към качествен процес, опционален за стимулиране, е занимавал хирурзите десетилетия назад. Сериозни пречки за нормално протичане на възстановителния процес и до ден днешен остават суперпонираната инфекция, използвани чужди тела под формата на костни или мекотъканни присадки, липсата на стабилност при фиксирането им и др. През петдесетте и шестдесетте години на миналия век основно средство в борбата срещу тези пречки са били антибиотиците – основно от пеницилиновата група, в допълнение с тази на цефалоспорините и линкозамидите. Така основно е била повлиявана развилата се хирургична инфекция (5, 6, 7). През седемдесетте години на двадесети век все по-широко навлиза използването на различни фиксиращи устройства – титанови плаки и винтове, които допринасят за увеличаване стабилността в местата на прикрепване на използваните алотрансплантати (9, 10). По този начин се намаляват микродвиженията в реципиентната ложа между собствените и чуждите тъкани, което води до увеличаване на клетъчната пролиферация и формиране на нови кръвоносни съдове, имащи основна роля в нормалното протичане на оздравителния процес (5). През 1980 година Knighton (70, 69), Hunt (70, 72) и Marx (71) дефинират водещото значение на кислорода, заедно с отговора на макрофагите, при тъканното оздравяване. Те, също така, правят изследвания и проучвания, с които откриват и установяват растежни фактори (69, 71), подпомагащи рехабилитацията на увредените тъкани. За първи път, през 1990 година, Knighton въвежда в клиничната медицинска практика използването на изолирани от тромбоцитите в кръвната плазма растежни фактори (80, 86). Той, заедно със сътрудници, доказват приноса на тромбоцитния концентрат за стимулиране зарастването на раните в човешкия организъм, както и нейния противовъзпалителен ефект. Поставят се стълбовете на методология, основаваща се на използването на собствените тромбоцити на пациента за подобряване възстановяването на меките тъкани и костите след хирургични или дентални процедури. Обобщено, методът представлява вземане на периферна кръв от пациента чрез конвенционални флеботомични техники, която се центрофугира, като се образува отчетлив среден слой, съдържащ тромбоцити и бели кръвни клетки (WBC). Този слой се поставя в зоната на увредата, където се отделят растежни фактори и други цитокини, за да се даде възможност за по-бърза и предсказуема регенерация, с превенция на евентуално постхирургично възпаление.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. История и развитие на обогатените тромбоцитни концентрати

Първото научно изследване относно препаратите, обогатени с тромбоцити и ефектите на растежните им фактори се свързва с името на Marx (1998) (202). В действителност историята на тези техники започва много по-рано с изследователските работи на Matras (1970) относно фибриновите лепила, използвани за подобряване на заздравяването на кожни рани при модел на плъх (205). Част от тези фибринови лепила все още се използват в наши дни (като Tisseel от Baxter, Deerfield, IL, САЩ). При тези технологии фибриновата матрица е основната съставка на кръвта (с няколко други свързани матрични протеини), която се използва за стимулиране на заздравяването и поради това е малко ограничена в сравнение с пълния набор от кръвни съставки, които могат да бъдат използвани. Въпреки това матрицата на фибрина е крайният резултат от реакционните вериги на коагулацията и първата матрица на заздравяване. Използването на такива лепила представлява един от първите биологични хирургични адюванти, разработени в съвременната ера (120).

Няколко години по-късно (1975-1979 г.) редица изследователски проучвания предлагат подобрена концепция за използване на кръвни екстракти, наречени „тромбоцит-фибриноген-тромбинови смеси“ или „желатинова тромбоцитна гелообразна пяна“ (256). В тази нова концепция фибриновите лепила включват значителна концентрация на тромбоцити в крайния препарат. PRP (platelet rich plasma – богати на тромбоцити плазма) продуктите се използват в активирано състояние на гел. Гелът се получава чрез добавяне на тромбин и допълнително калций-съдържащо съединение, който насърчава активирането на тромбоцитите и каскадата на коагулацията, в резултат на което се образува подобно на тромб желатиново вещество (тромбоцитен гел). Активираните тромбоцити са уловени във фибриновата мрежа, където отделят биоактивни вещества, които бавно се дифузират в околните тъкани. Тези стратегии подчертават ролята на тромбоцитите във фибриновия гел и предлагат отлични предварителни резултати в офталмологията, неврохирургията, и общата хирургия. Този подход се потвърждава и през следващите години с успех при лечението на кожни язви и трудно зарастващи рани, следвайки по-рано разработените принципи от Matras et al. (1970) на базата на фибриновите лепила (167).

Научните трудове на Whitman (1997) и Marx et al. (1998) са отправна точка за прилагането на тези техники в оралната и лицево-челюстната хирургия и насочват вниманието към възможностите на тромбоцитните растежни фактори в областта на регенеративна дентална медицина (202, 318). От този момент броят на научните публикации нараства експоненциално бързо. На пазара навлизат множество комерсиални автоматичните системи за добив на тромбоцитни концентрати, като се създават условия на масово обръкване, тъй като самите продукти са коренно и концептуално различни поради липсата на стандартизация (256). Тогава всички тези продукти са означени като PRP (БТП), без да се отчита тяхното съдържание и структура, като този нонсенс в терминологията продължава много години.

Във Франция редица автори разработват друга форма на тромбоцитни концентрати, наречена platelet rich fibrin (PRF) – богат на тромбоцити фибрин, поради силната полимеризация на фибриновия гел на препарата (82). Тази техника е означена като „концентрация на тромбоцити от второ „поколение“ (82). Сега PRF се разглежда като друго семейство продукти спрямо останалите. Еволюцията на терминологията е много важна на това ниво, тъй като за първи път се отдиференцира достатъчно различен продукт от останалите. Втората по важност еволюция в терминологията се осъществява през последните години, когато автори като Dohan Ehrenfest, Everts и Bielecki наблягат, че тромбоцитните концентрати са неминуемо свързани и с различни форми на циркулиращи клетки, специално левкоцитите (58, 59, 84, 85, 101, 104). В редица проучвания се набляга на необходимостта от по-задълбочено разглеждане на клетъчната популация в обогатените на тромбоцити плазмени концентрати (86, 88, 89).

Еволюцията в приложението на автоложните тромбоцитни продукти преминава през няколко фази, като започва с фибриновата матрица като лечебен материал, след това се дава приоритет на лечебните свойства на тромбоцитите и впоследствие вниманието на авторите се насочва към въздействието на растежните фактори за регенерация на тъканите (202, 256). Важен факт е и наличието на остатъчни циркулиращи кръвни клетки в тромбоцитните концентрати за правилната преценка при прилагането им. Фибрин, тромбоцити, растежни фактори с бавно освобождаване, левкоцити и други клетки са ключовите компоненти активни участници в естествения лечебен процес и комбинирани заедно, образуват автоложен продукт, извлечен от кръвообращението. Тази сложна комбинация е ключът към оптималните клинични резултати – желан оздравителен процес, без данни за суперпонирана инфекция. Поради тази причина богатият на

левкоцити и тромбоцити фибринов съсирек (L-PRF) често е описван като „оптимизиран кръвен съсирек“, който може да се използва и хирургично (87).

Прилагането на обогатена с тромбоцити плазма е документирано в много области на медицината. Първо е популяризирана от M. Ferrari (1987) като преливане на автоложни компоненти след открита сърдечна операция, а сега са налице над 5200 вписвания в Националния център за биотехнологична информация (NCBI) за прилагането на обогатена с тромбоцити плазма в области от ортопедията и травматологията, спортната медицина, стоматологията, оториноларингологията, неврохирургията, офталмологията, урологията, пластична и възстановителна хирургия и лицево-челюстна хирургия (107).

Богата на тромбоцити плазма рутинно се използва като ефективно средство за възстановяване на костите и тъкани в областта на оралната хирургия и при поставяне на дентални импланти (230, 318). Whitman et al. (1997) популяризират употребата на тромбоцитен гел в областта на лицево-челюстната хирургия (318). Авторите достигат до заключението, че чрез активиране на тромбоцитите в гела и освобождаването на растежните фактори трябва да се очаква повишаване във възможностите за заздравяване на раните.

PRP продуктите придобиват все по-нарастваща популярност и е общоприето схващането, че правилната стратегия в лечението на рани е използването на автоложна богата на тромбоцити плазма, съдържаща растежни фактори, която се аплицира директно (локално) на местата с хирургични интервенции, рани или наранявания (39, 40). За поставянето на тромбоцитен гел в хронична рана или улкус се използват различни аферезни машини с продължително центрофугиране. Редица компании препоръчват техните комерсиални китове и устройства, които осигуряват обогатена плазма, която впоследствие се активира с автоложен тромбин до дегранулиране на тромбоцитите. Противоречията възникват от вариабилността в протоколите, различните обеми за събиране на периферна кръв и различното насищане на продуктите с концентрирани тромбоцити, а оттам и нееднаквост по отношение на растежните фактори (39, 100).

В последните години PRP продуктите обичайно се използват в оралната и лицево-челюстна хирургия, като се смята, че подобряват интегрирането на пародонталните импланти, ускоряват възстановителния следекстракционен процес и подпомагат реконструирането на различни дефекти (21, 74, 202). Автоложните тромбоцитни продукти имат изключително широко приложение при лечението на редица мускулно-

скелетни заболявания в хуманната и дори ветеринарната медицина (71, 266, 270, 292, 296, 306).

В лицево-челюстната и кранио-фациалната хирургия, богатата на тромбоцити плазма намира приложение в оперативните процедури, свързани с реконструкции на мандибулата, максилата, при реконструкции на средния лицев етаж, операции по повод вродени цепки на устната, небцето и алвеоларния гребен. В тези случаи, поставянето ѝ в оперативните рани и в местата на костните остеотомии, подпомага процеса на костна формация, и скъсява времето за достигане на нормална костна зрялост. В денталната медицина може да се прилага при лечение на гингивит, пародонтит, алвеолит, периимплантит.

От първите години на нашия век са документирани проучвания и публикации в чуждестранния печат, относно прилагането на богата на тромбоцити плазма и в областта на оралната хирургия. Съвременните дентални процедури като латерален синус лифт, сплит ридж аугментация, възстановяване на пародонтални джобове, регенерация на постекстракционни дефекти, както и лечение на тежки лигавични загуби в устната кухина, все повече използват действията на БТП. У нас, представяне на единични случаи на употреба на PRP продукти, започват преди около 10 години.

В родната литература също съществуват данни за приложение на PRP продукти - Реев (2007). Авторът прилага обогатената с тромбоцити плазма в имплантологията и съобщава за много добра стабилност при третиране на импланти с PRP преди поставянето им (238). Edrev и Gonkov (2019) докладват за прилагане на PRP при моларно задържане и оперативна интервенция на зъбна киста. Авторите показват определени предимства на богатите с тромбоцити плазма по отношение на възприемането на болката и костната плътност (96).

2. Сравнителен анализ на методите за изготвяне на БТП

Описвайки богатата на тромбоцити плазма според метода на производство, трябва да се отдиференцира – едно- или двустепенен процес на центрофугиране на периферната кръв и концентриране на тромбоцитите (7, 111, 187). Докато нормалните граници на тромбоцити в цялата кръв на здрави индивиди е от 150 000 до 350 000 тромбоцити/ μ l, то работното определение за тромбоцитната концентрация е в границите на 1 000 000 тромбоцити/ μ l от тромбоцитния препарат. С други думи, концентрацията на тромбоцитите трябва да достигне от 3 до 5 пъти повишение над базовото (203, 313).

Marx (2001) предлага праг на тромбоцитна концентрация от 1 000 000 тромбоцита/ μL , като работна дефиниция за PRP, базирайки се на научни доказателства по отношение на терапевтичния ефект върху костната и мекотъканна репарация (19, 203). Rodjeti et al. (2008) проучват взаимоотношението между концентрацията на тромбоцитите в тромбоцитния гел и промените във функционалната активност на човешките ендотелни клетки. Пролиферацията на ендотелните клетки, тяхната миграция и инвазия се осъществява по последователен начин. Авторите достигат до извода, че нивото на стимулация за пролиферация на ендотелните клетки е с върхова концентрация $1,25 \times 10^6$, а съответно нивото за индуциране на ангиогенеза $1,5 \times 10^6$ тромбоцита/мл. Това потвърждава факта, че тромбоцитни концентрати със стойност около 1 000 000 тромбоцита/ μL е работната дефиниция за терапевтична обогатена кръвна плазма и отхвърля критиките за неполучаване на очакваните оптимални резултати от PRP, което може да се дължи на ниски концентрации на тромбоцити (260).

Съществуват множество комерсиални системи за изготвянето на PRP продукти с цел улесняване на използването в амбулаторни условия на обогатените с тромбоцити суспензии. Тези системи се различават значително по отношение на вземането на кръвната субстанция, концентрацията на тромбоцитите в зависимост от времето и начина на центрофугиране. Като резултат са налице суспензии с различни нива на тромбоцити и левкоцити, което обуславя разнообразието в концентрацията на отделните растежни фактори. Разлики в концентрациите на тромбоцитите и левкоцитите влияят върху нивото на растежните фактори.

Характеристиката на обогатената на тромбоцити плазма, добита чрез техника на центрофугиране, се променя в зависимост от относителната центробежна сила на въртене, температурата и времето. Редица автори считат, че протоколът на изготвяне от два етапа (сепариране и концентриране) дава най-висок резултат.

Различните протоколи са били оптимизирани по отношение на редица променливи като обем на вземане на проби от периферната кръв, брой центрофугиране, време на въртене и обхват на центробежното ускорение. Като се има предвид сложността на изготвяне на PRP и необходимостта от контрол на качеството за различните клинични приложения, се счита, че от решаващо значение е стандартизирането на процедурата и възпроизвеждането на постоянни резултати.

Въпреки различията в протоколите, налице са няколко последователни етапа, които се състоят във вземане на кръв, първоначално центрофугиране за отделяне на тромбоцитите, центрофугиране за концентриране на тромбоцитите и други клетъчни компоненти и активиране на получената проба чрез добавяне на различни видове активатори. Amable et al. (2013) проучват вариациите по отношение на относителната центробежна сила (RCF, g), температурата и времето за оптимизиране на условията за изолиране на тромбоцитите и количествено определяне на цитокини и растежни фактори в PRP преди и след активиране на тромбоцитите (9). Авторите изследват периферна кръв от 22 здрави доброволци между 20- и 54-годишна възраст. Използвани са 4,5 мл вакутейнери, съдържащи 0,5 мл натриев цитрат. Кръвните проби са центрофугирани чрез избиране на RCF от 240 до 400 g, време от 8 до 19 минути и температура от 8°C до 16°C. Най-добри резултати при първото центрофугиране са получени при използване на параметри от 300 g за 5 мин при 12°C и при 240 g за 8 минути при 16°C. Параметрите на второто центрофугиране са 700 g за 17 минути, което позволява по-малка загуба на тромбоцити във фракцията на PRP и образува стълбчета от тромбоцити, които лесно се ресуспендират (9).

В проучванията на Perez et al. (2014) е налице висока концентрация на тромбоцитите (5 пъти над базисните нива), като авторите центрофугират 3,5 мл кръв при 100×g за 10 минути (първи етап) и 400×g за 10 минути (втори етап), като отделят две трети от остатъчната плазма. Те считат, че времето и ускорението са основните параметри, които определят състава на PRP субстрата след първата стъпка на центрофугиране. Според тях по-дългото време на центрофугиране увеличава леко възстановяването на тромбоцитите и намалява концентрацията на белите кръвни клетки в горния слой. Следователно параметърът време може да бъде контролен, когато е необходим PRP продукт с ниски нива на бели кръвни клетки като гранулоцити и лимфоцити (239).

Kahn et al. (1976) установяват, че центробежно ускорение от 3731×g за период от 4 минути са оптималните условия за получаване на най-висока концентрация на тромбоцити от 478 мл периферна кръв (155). В проучването на Slichter и Harker (1976) е достигната най-висока ефективност на възстановяване на тромбоцитите – около 80%, като се използва проба от 250-440 мл цяла кръв, която се центрофугира при 1000 g за период от 9 минути. Също така авторите установяват, че последващо центрофугиране с параметри от 300 g/20 мин намалява жизнеспособността на тромбоцитите (231).

В задълбочената работа на Landesberg et al. (2000) са достигнати PRP продукти с приблизително 3,2 пъти увеличена концентрация на тромбоцитите спрямо базовата линия от периферната кръв. Протоколът на авторите включва 5 мл периферна кръв, две завъртания при 200×g за 10 минути (178).

Jo et al. (2013) изследват ефекта от времето на центрофугиране и гравитационната сила g по отношение на насищането на тромбоцитите в PRP. Авторите прилагат двуетапен протокол за изготвяне при 39 субекти. Периферната кръв се центрофугира от 500×g до 1900×g на стъпки от 200×g за 5 минути и от 100×g до 1300×g на стъпки от 200×g за 10 минути. Във втория етап отделените в плазмата тромбоцити са концентрирани при сила 1000×g за 15 мин, 1500×g за 15 мин, 2000×g за 5 мин и 3000×g за 5 мин. Авторите постигат по-добра ефективност (92%) чрез прилагане на ускорение от 900×g за 5 мин при първото центрофугиране. Използвана е 9 мл периферна кръв, като концентрацията на тромбоцитите е в диапазона $310.7 \pm 78.5 \times 10^3/\text{mm}^3$. Максимумът ефективност за втория етап е 84%, получен при сила 1500×g за 15 мин, като концентрацията на тромбоцитите е $633.2 \pm 91.6 \times 10^3/\text{mm}^3$, което е стойност 4.2 пъти по-голяма от базовата концентрация (151).

В своето проучване Bausset (2012) установява, че оптималните условия при двуетапно центрофугиране на кръвните продукти са 130×g или 250×g за 15 минути. Концентрацията на тромбоцитите е 3,47 над изходните стойности, получени от обработената 8,5 мл периферна кръв (първи етап) и 2 мл плазма (втори етап) (27).

Множество автори извършват сравнителна характеристика по отношение на обема тромбоцитна маса в PRP продукта на различни комерсиални системи.

Montalvo et al. (2007) съпоставят два метода на добиване на PRP: двойно центрофугиране чрез системата (ACE system; Surgical Supply and Surgical Science Systems, Brockton, MA USA) и единично центрофугиране (Nahita System; Nahita, Navarra, Spain). Американската система за двойно центрофугиране използва вакутейнери с 8,5 мл периферна кръв, поставени в съответната центрофуга, при параметри 160×g (1300 RPM) за 10 минути. Второто центрофугиране е осъществено отново за 10 минути при сила 400×g (2000 RPM). Испанската система използва 3,5 мл епруветки, съдържащи 0,5 мл тринатриев цитрат, цитрат и цитрат декстроза като антикоагуланти. Тестовите вакутейнери са центрофугирани при сила 280×g /1500 rpm/ за 7 минути. Концентрацията

на тромбоцитите от американската и испанската системи са съответно 336% и 227% (220).

Mazzossa (2012) анализира три протокола за изготвяне на PRP продукти с различно съдържание: 1) ниски тромбоцити ($382 \times 10^3/\text{mm}^3$) и ниска стойност на бели кръвни клетки ($0.6 \times 10^3/\text{mm}^3$), получени при еднократно центрофугиране на 10 мл периферна кръв при 1500 rpm за пет минути; 2) високи тромбоцитни стойности ($940 \times 10^3/\text{mm}^3$) и високи стойности на левкоцити ($17 \times 10^3/\text{mm}^3$), получени при еднократно въртене на 27 мл периферна кръв за 15 мин при 3200 оборота за минута; 3) двуетапен процес на концентриране (1500 rpm за 5 минути и 6300 rpm за 20 минути), което осигурява висока тромбоцитна концентрация ($472 \times 10^3/\text{mm}^3$) и ниско съдържание на левкоцити ($1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$) (209).

Авторите като Anitua et. al (2008) използват само едно центрофугиране в своя протокол и събират обема субстрат, разположен непосредствено над еритроцитния слой. Периферната кръв (4,5 мл) е взета в стерилни контейнери, съдържащи 3,8% тринатриев цитрат, центрофугирана за 8 минути при сила $460 \times g$. Този протокол достига насищане на тромбоцитите 2,67 пъти над изходните базисни стойности (14).

В проучването на Dugrillon et al. (2002) е установено, че броят на тромбоцитите е невинаги пропорционален на количеството растежни фактори, като авторите акцентират на извода, че вниманието трябва да бъде насочено по-скоро към качеството на PRP продукта, отколкото към броя на тромбоцитите в него. Тяхното изследване доказва, че TGF- $\beta 1$ (един от основните въздействащи на оздравителния процес растежни фактори) и тромбоцитната концентрация са пропорционално свързани спрямо центрофужните сили, когато тези сили са по-малки от $800 \times g$. Нивото на TGF- $\beta 1$ става обратно зависимо от центрофужната сила, когато нейната стойност е над $800 \times g$ (95).

Araкі et al. (2012) счита, че оптимизираният протокол за получаване на PRP от периферна кръв включва въртене при $230-270 \times g$ за 10 минути, като полученият субстрат е с ниска стойност на левкоцити (4.1%-5.8% от цяла кръв). Според автора левкоцитите преципитират, когато центрофужната сила е $\geq 840 \times g$. Тромбоцитната концентрация е 7,4 пъти над базисните стойности след отстраняването на 1/10 от PPP и добавяйки EDTA като антикоагулант (20).

Редица автори в своите протоколи използват оборотите в минута (rpm), вместо центробежната сила (g), което усложнява задачата за сравнение и възпроизвеждане на резултатите (106, 284).

В задълбоченото проучване на Keseci et al. (2014) първият етап от протокола на центрофугиране е определен като т.нар „меко въртене“, 10 минути при сила 50–270×g. При второто въртене центрофужната сила варира от 300×g, 500×g, 750×g, 1000×g, 1500×g и 2000×g за 10 минути като тромбоцитната концентрация нараства пропорционално на увеличаването на центробежната сила при второто въртене с 1.92 пъти, 2.16 пъти, 2.80 пъти, 3.48 пъти, 3.67 пъти и 3.76 пъти. Авторите считат, че получаването на определена концентрация на тромбоцитите е възможно чрез регулиране на центрофужната сила според индивидуалните изходни базисни стойности (161).

3. Номенклатура и класификации на ТК

Литературата, разглеждаща обогатената с тромбоцити плазма, е изключително разнообразна и богата, но публикуваните резултати често са противоречиви. Трудно се отдиференцират, систематизират и тълкуват наличните данни поради големия брой техники за изготвяне на PRP продуктите, терминологията, формата на апликация на тези материали и безкрайния списък от потенциални приложения.

Оптималната класификационна система трябва да улеснява комуникацията между авторите, да бъде лесна за интерпретиране и приложение в практиката като по този начин показва ниска вариабилност между изследователите, използващи съответната системата за класифициране (145).

По отношение на тромбоцитните концентрати повечето продукти са означени като богата на тромбоцити плазма (PRP). Този термин е много общ и непълен, което води до редица затруднения при интерпретиране на резултатите в научната база данни. Терминологията, която е използвана за обозначаване на продуктите, произлизащи от богата на тромбоцити плазма, търпи постоянна модификация и/или адаптация поради широкия диапазон на продукти с физико-химични характеристики. Литературата е изпълнена с термини, описващи концентрирани тромбоцитни продукти: автоложно фибриново лепило, фибринов съсирек, плазма, богата на тромбоцити и левкоцити,

автоложен тромбоцитен концентрат, плазмен гел, богат на тромбоцити, и други. Редица изследвания демонстрират ползотворния ефект на тромбоцитните растежни фактори върху тъканната регенерация.

Икономически обоснованата техника за производство на тромбоцитен концентрат следва да отговаря на критериите: ниска цена, висока практичност – стандартизиран и неkomplициран протокол на изготвяне. Широкото приложение на PRP продуктите в различните сфери на медицината мотивира разработването на множество търговски системи, които отговарят на търсенето. В редица изследвания се набляга на голямото разнообразие на PRP продуктите според техните характеристики и приложения. Различията в протоколите от събирането на периферната кръв до момента на прилагане водят до производство на няколко различни вида тромбоцитни концентрати (86, 132). De Vries посочват основните моменти, които могат да повлияят върху отделните етапи при изготвянето на PRP продуктите (73):

- начин на пробовземането, нерискуващ тромбоцитната дегранулация преди изготвянето на автоложния концентрат;
- методите на изготвяне: 1) ръчен метод, в едностранна камера; 2) използване на китове, които улесняват разделянето на различните кръвни компоненти; 3) метод на афереза, представляващ цялостна филтрация на кръвта през специална наномембрана;
- скорост и време на центрофугиране, брой тромбоцити, които определят количеството концентрирани тромбоцити и повлияват тяхната способност за агрегация в крайния продукт;
- наличието или отсъствието на левкоцити;
- използването или не на различни видове антикоагуланти като цитрат декстроза, натриев цитрат и хепарин;
- прилагането или не на агонист или тромбоцитен активатор, като калциев хлорид, аденозин дифосфат, епинефрин, колаген и тромбин (най-силния от тях);
- характеристики на фибриновата мрежа;

Разглеждайки автоложния биоматериал, обогатената с тромбоцити плазма зависи и от биологичните условия на пациента като години, пол, придружаващи заболявания, хормонални разстройства, кръвни заболявания. Влияние оказва също използването на противовъзпалителни лекарства, аспирин, антибиотици и някои други категории медикаменти, повлияващи тромбоцитната дегрануация. Всяка от тези вариации променя по някакъв начин крайния брой тромбоцити и тяхното действие при нараняване, като е възможно вариране на концентрацията на растежните фактори от 3 до 27 пъти (212, 246).

Широката вариация на наличните продукти може да обясни противоречията и неуспехите от използването на PRP, както и положителното ѝ влияние върху оздравителните процеси, в зависимост от метода на получаване.

Най-общо описаните техниките за добиване на обогатена с тромбоцити плазма включват няколко стъпки: събиране на периферна кръв, смесена с антикоагулант, последвано от центрофугиране (118, 234). Налице са много променливи параметри като време и центробежна сила, събрани плазмени фракции, вид и концентрация на агонист, използван при PRP активирането. Комбинацията от тези параметри води до различни състави на PRP продукта (86, 198). Използването на различни методи за подготовка, и следователно типове PRP, се отнасят до различни терминологии и съкращения. Съществуващите класификации се основават на вида на активиране, концентрация на тромбоцитите, растежни фактори и наличие или липса на левкоцити или фибрин (175).

Anitua (1999) защитава тезата за производството на тромбоцитен концентрат без левкоцити, тъй като наличието им може да предизвиква проинфламаторни ефекти, поради присъствието на протеази и киселинни хидролази. Авторът предлага термина plasma rich in growth factors PRGF (плазма богата на растежни фактори), основавайки се на принципа, че всеки тромбоцитен концентрат след активиране ще освободи растежни фактори, които са фундаменталните в лечебната каскада. Произведената PRGF от периферна кръв на здрави индивиди е получена при обработка с центрофужна сила 160x g за 6 минути. Те описват техния положителен ефект върху регенерацията на костите при пациенти, подложени на зъбна екстракция (12, 137, 178).

По-късно други изследвания в литературата възприемат термините гел или матрица за назоваване на PRP продукти, активирани от агонисти (калциев хлорид, автоложен или

говежди тромбин), класифицирайки ги като autologous platelet-rich clots (APRC), богати на тромбоцити автоложни съсиреци, тромбоцитно-левкоцитен гел, автоложен тромбоцитен гел и platelet-rich fibrin (PRF), обогатен на тромбоцити фибрин (15, 169, 104). Проучването на Everts 2008 се основава на два принципа: 1) невъзможността за получаване на продукти без левкоцити и 2) необходимостта от активиране на тромбоцити за произвеждане на гелообразен продукт за вътрешно или външно приложение. Следователно понятието „тромбоцитно левкоцитен гел“ (PLG) е предложено да се обозначава всеки продукт, получен от тромбоцити, което предполага истинността на въвеждане на 1 и 2 (104, 215).

След множество дебати относно съдържанието и ролята на различните компоненти в тези препарати, Dohan Ehrenfest (2009) предлага първа класификация, която и сега е широко цитирана като крайъгълен камък в процеса на изясняване на терминологията. Тази класификация всъщност е много проста и разделя продуктите, следвайки най-малко 2 ключови параметъра: наличието на клетъчно съдържание (предимно левкоцити) и фибриновата архитектура (86, 164). Това разделяне позволява да се определят 4 основни групи продукти.

1. Чиста обогатена с тромбоцити плазма или бедната на левкоцити и обогатена с тромбоцити плазма (Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) or Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma) – продуктите са препарати без левкоцити и с фибринова мрежа с ниска плътност след активиране. По определение всички продукти от това семейство могат да се използват като течни разтвори или под формата на активиран гел. Следователно може да се инжектира (например в спортната медицина) или да се постави след активиране под форма на гелообразна структура върху рана или шев на кожата (подобно на използването на фибринови лепила). Освен добиването им чрез автоматични системи, докладвани в литературата, тази група препарати са широко добивани и чрез ръчни методи с вариация в параметрите време и центрофужна сила (69, 78, 173).

2. Плазма, обогатена с левкоцити и тромбоцити (Leukocyte-and Platelet-Rich Plasma) (L-PRP). Тези препарати съдържат левкоцити и фибринова мрежа с ниска плътност след активиране. Подобно на P-PRP, всички продукти от това семейство могат да се използват като течни разтвори или под формата на активиран гел (69, 218).

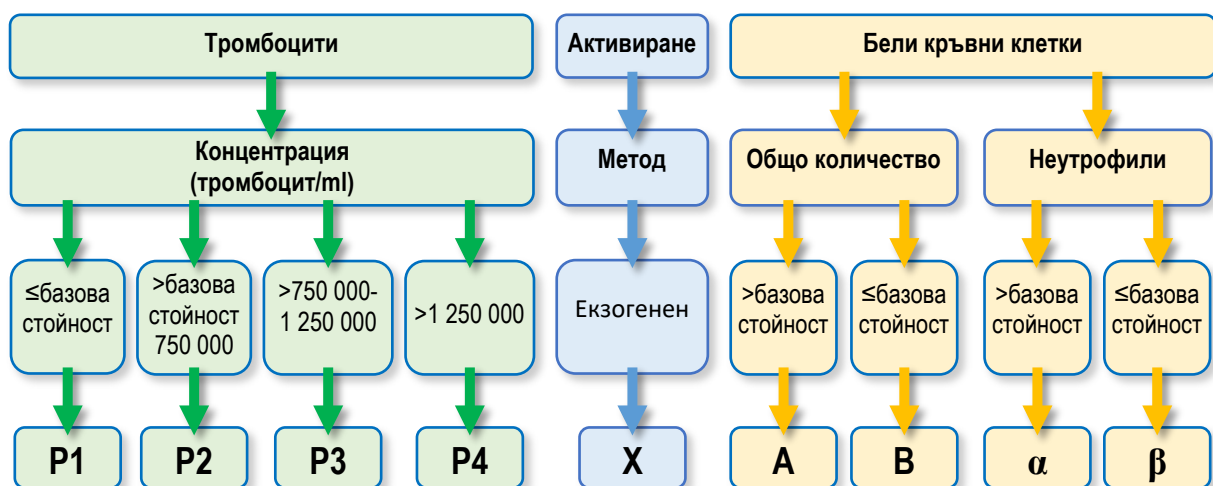
3. Чист, обогатен с тромбоцити фибрин или беден на левкоцити и богат на тромбоцити фибрин (Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF) or Leukocyte-Poor Platelet-Rich

Fibrin) – са препарати без левкоцити и с фибринова мрежа с висока плътност. Според определението тези продукти съществуват само в силно активирана гел форма и не могат да се инжектират или използват като традиционните фибринови лепила. Въпреки това, поради тяхната здрава фибринова матрица, те могат да се обработват като истински твърд материал за други приложения. В това семейство има само един продукт, комерсиално известен като Fibrinet PRFM (Fibrinet-Rich Fibrin Matrix, Cascade Medical, Wayne, USA). Основното неудобство на тази техника остава нейната цена и относителна сложност в сравнение с другите налични форми на PRF, L-PRF (69, 154).

4. Фибрин, обогатен с тромбоцити и левкоцити (Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin) (L-PRF). Тази група обединява препарати с левкоцити и с фибринова мрежа с висока плътност. Тези продукти съществуват само в силно активирана гел форма и не могат да се инжектират или използват като традиционните фибринови лепила. Поради тяхната здрава фибринова матрица те могат да се обработват като истински твърд материал за други приложения (69, 83). Техниката за добив на (L-PRF) първоначално е разработена и оценена като техника с отворен достъп, базирана на концепцията за едноетапно центрофугиране на кръв без антикоагулант и без активатор на кръв (82, 94): препаратът е напълно естествен и това остава ключова разлика с всички други семейства продукти. Понастоящем единствената одобрена от FDA система със сертификат L-PRF със сертифицирани материали се предлага под името Intra-Spin L- PRF (Intra-Lock Inc., Boca Raton, FL, USA) (69, 167).

Класификационна система на Ehrenfest е цитирана, подкрепяна и утвърдена от многодисциплинарна консенсусна конференция POSEIDO (2012) (Periodontology, Oral Surgery, Esthetic and Implant Dentistry Organization). Тази класификационна система и терминологията, произтичаща от нея, се считат за основа на консенсус в много области, особено в стоматологичните и лицево-челюстните дисциплини (69, 202). Избраните 2 параметъра за дефиниране на 4-те семейства продукти, както и всички други препарати, обединени под общото наименование обогатени с тромбоцити плазмени концентрати, са очевидни и логични и има консенсус относно тяхното значение. Всеки изследовател, боравещ с тези продукти, може веднага да забележи значителните разлики между отделните продукти. Тези разлики също трябва да бъдат подчертани и количествено определени чрез биологични и клинични параметри.

През 2012, DeLong et al. (2012) предлагат PAW (platelet, activation, white blood cells) класификационна система (76, 158). Тя се основава на 3 компонента: (1) абсолютния брой тромбоцити, (2) начин, по който тромбоцитите се активират и (3) наличието или отсъствието на бели клетки (в частност неутрофили). Анализирайки тези променливи, авторите предлагат един много изчерпателен и обхванат класификационен модел на тромбоцитните концентрати. При тази класификация авторите идентифицират четири различни нива на концентрация на тромбоцитите, както следва: P1 (\leq базова стойност), P2 ($>$ базова стойност – 750 000 тромбоцити/ μ l), P3 ($>$ 750 000–1 250 000 тромбоцити/ μ l) и P4 ($>$ 1 250 000 тромбоцити/ μ l). Други разглеждани параметри са използването или не на активатори на тромбоцитите, наличие на бели кръвни клетки и неутрофили (над или под изходното ниво, присъстващо в периферната кръв). Според авторите точното определяне на клетъчни компоненти, използването и вида на екзогенния активатор са важна информация при сравняване проучвания с PRP (фиг. 1).



Фиг. 1. PAW класификационна система.

Mirsha et al. (2012) класифицират обогатената с тромбоцити плазма според присъствието или липсата на левкоцити, използване на активиращ агент и крайната концентрация на тромбоцити, според което се делят на четири типа: Тип 1 – висока левкоцитна концентрация без активирание; Тип 2 – висока левкоцитна концентрация с активирание; Тип 3 – ниска или липсваща концентрация на левкоцити без активирание; и Тип 4 – ниска или липсваща концентрация на левкоцити с активирание. Всички тези продукти могат да бъдат класифицирани или като: А) имащи тромбоцитна концентрация пет или повече пъти над изходното ниво, или В) имащи тромбоцитна концентрация по-малко от пет пъти от изходното ниво (217, 221).

Mautner (2015) описва променлива повлияваща активността и ефективността на PRP, която нито една от публикуваните преди това класификации на PRP не съдържа – процент на неутрофилно съдържание. Авторът означава класификацията като PLRA (platelets, leukocytes, red blood cells, activation) – важни за описанието са броят на тромбоцитите (абсолютен брой/ μ l), левкоцитно съдържание (положително или отрицателно) и когато присъства, описва процента неутрофили, съдържание на червени кръвни клетки (като положително или отрицателно) и активиране (да или не за екзогенен активатор) (206, 232, 257).

Magalon et al. (2016) публикуват друга класификация, базирана на четири базисни компонента: 1) доза на инжектираните тромбоцити; 2) ефективността на производство; 3) чистотата на получения PRP продукт и 4) активационен процес. В тази класификация е необходимо да се определи пълният брой на клетъчния състав в пълната кръв и в PRP продукта, както и обемът на събраната кръв и инжектирана обогатена на тромбоцити плазма. Дозата се изчислява чрез умножаване на броя на тромбоцитите в PRP по получения обем PRP, класифицирана от А (>5 милиарда тромбоцита) до D (<1 милиард тромбоцити). Ефективността съответства на процента на възстановяване на тромбоцитите от цяла кръв, вариращи от А (>90%) до D (<30%). Чистотата съответства на процента на тромбоцитите и клетки като левкоцити и червени кръвни клетки, вариращи от А (>90% тромбоцити спрямо другите клетъчни типове) до D (<30%). Активирането е свързано с добавяне на екзогенен активатор. Класификацията на Magalon е наречена DEPA (Dose of injected platelets, Efficiency of production, Purity of the PRP, Activation of the PRP) (193, 203).

Lana (2017) публикува нова класификация, наречена MARSPILL (M: Method; A: activation, R: red blood cells, S: spin, P: platelets, I: image guidance, L: leukocytes, L: light activation). Тя се фокусира върху разграничаването на продуктите обогатена с тромбоцити плазма и богата на мононуклеарни клетки, от една страна, и обогатена с тромбоцити плазма и бедна на мононуклеарни клетки, от друга страна. Класификационната система е свързана с употребата на левкоцити в препаратите, но специално внимание е отделено на мононуклеарната клетъчна популация (в това число лимфоцити, моноцити). Тази класификация разглежда също и други параметри, използвани по време на подготовката и прилагането на PRP, сред тях са: начинът на добив на тромбоцитния концентрат – автоматичен начин или ръчно изработен; брой въртенета – единично или двойно (Sp1 или Sp2); присъствие на червени кръвни клетки

в продукта – богат на еритроцити (RBC-R) и беден на еритроцити (RBC-P); увеличена концентрация на тромбоцитите – от 2–3, 4–6, 6–8 и 8–10 пъти на базовата стойност; богати на левкоцити (LR PRP) или бедна на левкоцити (LP PRP); активирани (A+, активиран продукт) или не (A–, неактивиран продукт); активирани на продукта светлинно (L+) или не (L-). Включват също и използването (G+) или неизползването (G-) на образни средства за правилното място на приложение (табл. 1) (175, 194).

Таблица 1. MARSPILL класификация.

	MARSPILL класификация	
Буква	Отнася се за	Тип
M	Метод	Ръчен (H), автоматичен (M)
A	Активиране	Активиран (A+) неактивиран (A-)
R	Червени кръвни клетки	Богат (RBC-R), беден (RBC-P)
S	Въртене	Единично (Sp1), двойно (Sp2)
P	Тромбоцитно насищане в пъти над базова стойност	PL 2–3, PL 6–8, PL 4–6, PL 8–10
I	Образни средства насоки	с вкл.(G+), без вкл. (G-)
L	Левкоцитна концентрация	Богата на левкоцити (LR) Бедна на левкоцити (LP)
L	Светлинно активиране	активиран (A+) неактивиран (A-)

Множество проучвания показват различната роля на всяко вещество в обогатената с тромбоцити плазма и веригата на лечебния процес, въпреки че публикуваната информация все още е недостатъчна или е основана на казуси и данни, получени от изучаване върху животни или „ин витро“ проучвания (150, 187). Изглежда че колкото по-конкретна и по-малко обширна е класификацията за тази „джунгла“ от продукти, толкова по-лесно би било да се характеризират и пригодят към желаното приложение. Поради липсата на единна система за оценка на PRP продуктите, големия брой и разнообразие от системи за класифицирането им валидирането на данните сред изследователите е относително затруднено.

Считаме, че класификациите, предложени от Dohan Ehrenfest, PAW класификацията на DeLong, MARSPILL класификация на Lana, създават относително добра възможност за характеризиране и типизиране на финалния продукт. Това би улеснило възпроизводимостта и сравняването на резултатите, като прилагането на конкретна класификационна система следва да изхожда от характеристиката на PRP продукта, която зависи пряко от търсения клиничен ефект на приложението.

4. Влияние на тромбоцитните концентрати върху тъканното оздравяване в хирургичната дентална медицина

Хирургичната дентална медицина е представена от оперативни процедури, включващи както традиционните хирургични и конвенционални зъбни екстракции, така и съвременни интервенции като латералния синус лифт, разцепване на алвеоларния гребен (split-ridge), хоризонтална и вертикална костна аугментация и др. Те представляват нова насока в предпротетичната и предимплантната хирургия, които заедно с пародонталната хирургия имат за цел да осигурят по-добро дентално здраве на пациентите за по-кратки срокове.

Възстановяването на естествената кост и запазването на костната присадка или костния заместител зависят от регенерацията на нова кост чрез механизмите на клетъчна пролиферация и синтеза на остеоид (остеогенеза), от миграцията на клетки в костния дефект (остеокондукция) или от процесите на костна резорбция и ремоделиране (остеоиндукция) (146, 149, 150). PRP продуктите, с високото ниво на растежни фактори, съдържащи се в техните тромбоцити, подпомага и увеличава зарастването на костните рани. Когато те бъдат добавени самостоятелно в оперативната рана или заедно с автогенен графт, алографт, костен заместител или композитен графт, се наблюдава стимулиране на костната регенерация (54, 139, 191).

Тромбоцитните концентрати, получени чрез определени техники, водещи до стимулиране на оздравителния процес, намират широко приложение при оперативните интервенции, представляващи съвременното течение в областта на оралната хирургия.

Латерален синус лифт

Синус лифт хирургията е относително нова процедура, датираща от началото на 90-те години, когато стана възможно поставянето на дентални импланти в горната челюст.

Нейната единствена цел е да осигури достатъчно количество кост в максилата, която да поддържа зъбните импланти. Увеличаването трябва да е поне 8 мм, така че ако е възможно да се получи 18 мм вертикален размер от билото на алвеоларния гребен до новото елевирано ниво на горночелюстната кухина (166, 167).

За тази процедура имплантирането на автогенна кост е „златният стандарт”. Тя дава възможност за образуване на трабекуларна кост с плътност от 40% до 60%, зависещи от различни фактори – възраст на пациента, наличие на системни придружаващи заболявания, компрометирано състояние на локалните тъкани. Значение за крайния резултат при открития синус лифт имат още негативното влияние на тютюнопушенето, приема на някои лекарства, както и болести на максиларния синус. Прилагането на богата на тромбоцити плазма в допълнение играе важна роля в подпомагането на костната регенерация. Друго нейно действие е потискане отрицателното влияние на възрастта, на компрометираното общо медицинско здраве и на намаленото качество на местните тъкани в оперираната област (93, 94, 95, 96, 102).

За нуждите на синус лифт хирургията са необходими около 7 мл материал за имплантиране. Това количество представлява доста голям обем, който трябва да се получи, чрез създаване на втора оперативна рана, в повечето случаи от екстраорална донорна ложа. Част от пациентите не са съгласни на тази хирургична процедура, а и техниките на екстраоралната костна „жътва” са трудоемки за хирурга. Затова лиофилизираната и деминерализирана кост, неорганичният говежди костен заместител, хидроксилapatитният продукт и други видове експланти и ксенотрансплантати, са често използвани при открития синус лифт. Плътността на получената по този начин трабекуларна кост е по-малка в сравнение с автогенната присадка и варира между 15% и 30%. Като се добавят към този факт и наличието на по-горе посочените утежняващи фактори – възраст, съпътстващи болести, тютюнопушене, понижен имунитет и др., резултатите по отношение на костната регенерация са често незадоволителни. Това налага, когато при синус лифт процедурите се използва графт, различен от автогенния, костната регенерация да бъде стимулирана чрез приложение на богата на тромбоцити плазма (148, 150).

Хоризонтална и вертикална костна аугментация

Увеличаването на максиларния или мандибуларния алвеоларен гребен, за да може да се поставят дентални импланти, може да бъде реализирано в хоризонтална, вертикална

или едновременно в двете равнини, чрез поставяне на костен графт. Във всички случаи, обаче, е необходима защита на графта от дъвкателните сили и/или натоварването при използване на временни протези, през целия период на реваскуларизация и клетъчна пролиферация (99, 102, 159).

След приложение на богата на тромбоцити плазма при тези процедури, графтът трябва да бъде протектиран в първите 3 следоперативни седмици. В случаите, когато не е използван тромбоцитния концентрат, той е уязвим 6 седмици след поставянето му.

В зависимост от размера и формата, които са необходими за аугментацията, приложение намират основно автогенните костни присадки – от клона на долната челюст, ментума, калварията и илиячната кост. Характерно е, че те търпят редукция на първоначалния си обем от 25% до 40% (с изключение на калварията – 15%-25%) в първите 6 месеца. За да бъде сведена редукцията до минимум, е необходимо имобилизацията им чрез титанови винтове и добавяне на БТП (139, 169, 171).

Одонтектомия на мъдреци

Хирургичната екстракция на третите моларни зъби представлява голям обем от оперативните интервенции в областта на оралната хирургия. Тя често се асоциира с две добре познати усложнения, основно след отстраняване на долните мъдреци. Едното е алвеоларният остейт, извстен като сух алвеолит, който се среща между 3% и 25% от случаите. Другото е редукцията на костна регенерация особено в областта на дисталната коренова повърхност на втория молар, която води до образуване на патологичен пародонтален джоб. Vabbush и Mancuso (100, 109, 110, 111) демонстрират за първи път забележителната възможност на богата на тромбоцити плазма да редуцира развитието на „суха алвеола“ и да увеличи костната регенерация в постекстракционната алвеола на третия от групата на дъвкателните зъби молар (141, 156, 160).

Прилагането на тромбоцитен концентрат в тези клинични случаи е изключително необходимо при жени, вземащи противозачатъчни таблетки, пушачи, при пациенти над 30 години и такива, които съобщават за развитие на чести перикоронарити. Пациентите на стероидна терапия или продължаваща химиотерапия, пациенти с предшестващо облъчване в областта на мъдреците, диабетици също са показани за използване на PRP в постоперативната рана.

Лечение на пародонтални дефекти

Увреждането на пародонта е резултат от болестни процеси, инициирани от намиращите се субгингивално патогенни микроорганизми. Техните токсини провокират постоянно възпаление на венечната тъкан около зъбите, което прогресира, разрушава епителното и съединителнотъканно прикрепване и води до резорбция на подлежащата кост. Нелекувано, възпалението причинява авансирала загуба на кост, в резултат на която настъпва разклащане на зъбите и се стига до тяхната загуба (105, 107).

За възстановяването на пародонталните дефекти е необходимо тяхното запълване с партикулирана автогенна кост или различни видове костни заместители, която да доведе до костна регенерация (106, 108, 109).

Прилагането на богата на тромбоцити плазма като слой над повърхността на поставения графт, предизвиква стимулиране на костното възстановяване. При този начин на приложение, секретираните от тромбоцитите растежни фактори влизат в директен контакт с надлежащото мукопериостално ламбо и подпомагат също така и регенерацията на гингивалните тъкани (112, 113).

Имплантология

Едно от най-честите приложения на БТП е при поставяне на дентални импланти. Тази хирургична интервенция, заедно с няколко вида предимплантни процедури, представляват съвременните тенденции в областта на Оралната хирургия. Целта на използваната тромбоцитна плазма е стимулиране на процеса на остеоинтеграция между челюстната кост и зъбния имплант, което води до по-ранната негова стабилност. В резултат на по-бързото му вкостяване, става възможно реализирането на търсената дъвкателна функция, която е крайна цел при заместване на увредени и липсващи зъби с дентални импланти (109, 122, 129).

Остеоинтеграцията на последните възниква и се определя от клетъчната миграция и диференциация, от формирането и ремоделирането на нова кост по имплантната повърхност. Всеки един от тези процеси е в непосредствена зависимост от наличието на тромбоцитен или обикновен кръвен съсирек. Автоложната концентрирана тромбоцитна плазма може да бъде използвана за стимулиране и подобряване на костното свързване при пациенти, при които се предполага неговото възпрепятстване. Такива са възрастните индивиди, хора с придружаващи заболявания като диабет, остеопороза или други,

където се наблюдава компрометирана костна регенерация. Към тази група се отнасят и клиничните случаи на поставяне на дентални импланти в задните участъци на горната челюст. При здрави организми влиянието на тромбоцитния концентрат се проявява в ускоряване на нормално протичащия костен оздравителен период (122, 144, 145).

Поставянето на зъбните импланти е свързано с формиране на микропроцеп, около 25 микрометра, между металната им титанова повърхност и костната стена, формирана от машинния дрил, необходим за оформяне на имплантната ложа в костта. В него се откриват обичайните клетъчни компоненти: тромбоцити, еритроцити, бели кръвни клетки, както и адхезионните белтъчни молекули на фибрина, фибро – и витронектина. В този случай последните имат водеща роля при кръвосъсирването и образуването на връзката между имплантната повърхност и костта. Когато в костната ложа се постави БТП или имплантът преди поставянето му бъде потопен в изолиран тромбоцитен концентрат, моделът на остеоинтеграционния процес е различен. Увеличените тромбоцити в микропроцепа дегранулират и секретират техните седем растежни фактора – Platelet – derived growth factor (три изомера), Transforming growth factor (два изомера), Vascular endothelial growth factor и Epithelial growth factor. В резултат на тяхното действие настъпва стимулиране на остеобластите и стволовите клетки от костния мозък, намиращи се в стената на имплантната ложа, формирана от дрела. Настъпва клетъчна пролиферация и миграция. Наблюдава се изразено движение по нишките от фибрина, фибронектина и витронектина в микропроцепа. При този процес недиференцираните мезенхимни клетки претърпяват диференциация и започват да произвеждат остеоидна тъкан, което от хистологична гледна точка представлява имплантната остеоинтеграция. По-нататък пролиферацията на остеобластите продължава в посока от костната стена към металната повърхност. Те увеличат и стимулират трансформацията на стволови клетки в нови остеообласти, продуциращи остеоид. Последващите процеси на ремоделиране и матурация водят до обвиването им с минерален матрикс и превръщането им в остеоцити. Така контактът на имплантната повърхност, обработена или поставена в среда с богата на тромбоцити плазма, способства за ускоряване на остеоинтеграцията. В резултат на нейното действие в микропроцепа се образува своеобразен резервоар, изпълнен с растежни фактори и протеини, допринасящи за ускорената регенерация на костта меките тъкани. Това е от съществено значение за дългосрочния успех на лечението с дентални импланти.

Резултатите са отлични като показват надеждна стабилност и повишена устойчивост по време на дъвкателна функция.

5. Проблеми в оралната хирургия, относно формирани костни дефекти

Един от сериозните проблеми в денталната хирургия е възстановяването на костни дефекти, получени в резултат на различни заболявания или оперативното им лечение. Костни дефекти и кухини могат да възникнат при редица хирургични интервенции: онкологични, травматологични, пластични, ортогнатични, предпротетични, пародонтални и имплантологични. Една от най-широко разпространените по честота оперативни интервенции от домена на оралната хирургия, след която се формират трудно зарастващи костни рани, е хирургичната екстракция на третите моларни зъби, в частност – долните мъдречи. Поради големия обем в някои случаи, е необходимо поставянето на костен заместител, за да стимулира костното възстановяване (77, 90, 94).

Съществуващите материали, които се използват за тази цел, имат три различни механизми на действие, подпомагащи костната регенерация. Това са остеогенеза, остеоиндукция и остеокондукция. Те определят и основните свойства на използваните материали като остеогенност, остеоиндуктивност и остеокондуктивност (94, 95, 105).

Остеогенни са материалите, които имат способността да произвеждат нова кост благодарение на собствени остеобласти, които са се запазили живи след присаждането.

Остеоиндуктивни материали са тези, които посредством собствени биохимични фактори, наречени костни морфогенетични протеини, стимулират конверсията на плурипотентни мезенхимни клетки на реципиента в остеобласти и хондробласти, способни да произвеждат нова кост.

Остеокондуктивните материали нямат способността да произвеждат нова кост или да индуцират нейното производство. Те играят роля на биосъвместимо скеле в мястото на имплантирането, където влизат и се развиват клетъчни и стромални елементи от ръбовете на костта-реципиент. Остеокондуктивните материали направляват формирането на нова костна тъкан тогава, когато се намират в костна среда. За разлика от тях, остеоиндуктивните имат способността да индуцират образуване на нова кост и когато са имплантирани в некостни тъкани.

Костозаместващите материали се разделят на: автотрансплантати – присаждане на собствени тъкани в един и същ организъм; алотрансплантати – използване на тъкани от генетично различни организми, но от един и същ вид; ксенотрансплантати - прилагане на тъкани между организми от различни видове и експлантите, които представляват материали с небιологичен произход, имплантирани в организма. Автотрансплантатите и алотрансплантатите са органични (костни присадки), а ксенотрансплантатите и експлантите са неорганични (костни заместители).

Автотрансплантатите притежават остеогенност, остеоиндуктивност и остеокондуктивност, докато алотрансплантатите само остеоиндуктивност и слаба остеоиндуктивност (с изключение на деминерализираната кост, при която остеоиндуктивността е силна). Ксенотрансплантатите и експлантите притежават типични остеокондуктивни свойства.

Възможностите на действие на тромбоцитния концентрат като автогенен източник на растежни фактори биват ползвани и прилагани заедно с костозаместващите материали (149, 152, 153). Прибавеният автоложен трансплантат след активирането му, проявява своя механизъм на влияние. Значително се ускорява образуването на нова кост, увеличава се нейното количество и се подобрява нейното качество.

Автотрансплантатите, използвани в оралната хирургия са основно свободни невакуларизирани. Те представляват в повечето случаи най-добрия избор за възстановяването на костни дефекти, поради добрите си биологични качества: от една страна липса на имунологична реакция за отхвърляне, а от друга – притежават и трите свойства – остеогенност, остеоиндуктивност и остеокондуктивност. Важни условия за успеха на една автотрансплантация са доброто кръвоснабдяване в ложата на имплантирането, широкият контакт с реципиентната кост и липсата на подвижност (111, 185, 210, 217).

Образуването на нова кост при невакуларизирания автотрансплантат преминава през две фази. През първата се извършва образуване на кръвоносни съдове, а впоследствие – и на грануляционна тъкан от ръбовете на костта-домакин. През тази фаза главно участие в новото костообразуване взема самият автотрансплантат с неговите живи остеообласти. През втората фаза се извършва резорбция на присадката от остеокласти и прогресивно заместване с нова кост от остеообласти, произхождащи от мезенхимните клетки на грануляционната тъкан на костта-домакин. По този начин през

втората фаза главно участие в новото костообразуване взема костта-реципиент. Новата кост е винаги с по-малък обем от първоначалния обем на присадката. Прилагането на богатата на тромбоцити плазма компенсира тази загуба, тъй като заедно с индуциране на костната регенерация, тя води до образуване на по-голямо количество кост. Така в обемно отношение се наблюдава пълно костно възстановяване (226, 227, 242).

По отношение на вида на костта, която се използва, автотрансплантатът може да е спонгиозен, кортикален или смесен. Строежът на спонгиозните позволява по-ранна реваскуларизация (те реваскуларизират за около 2 седмици, докато кортикалните за 1 до 2 месеца), а и по-бързо и пълно инфилтриране от грануляционната тъкан на костта-домакин. Ранната реваскуларизация спомага за запазване на повече живи остеообласти в присадката. Те започват веднага новата костна продукция, а бързото формиране на грануляционна тъкан в присадката осигуряват остеообластите на костта-домакин. Обратно, плътният строеж на кортикалните присадки е предпоставка за намаляване броя на живите остеообласти, удължава резорбцията и забавя включването в процеса на остеообластите на костта-домакин. Като резултат на това, процесът на възстановяване е удължен и минава през стадий, през който присадката представлява смес от витална и невитална кост (период от около 6 седмици до 6 месеца). През този период присадката е с около 50% намалена механична здравина. Последната се възстановява след около 18 месеца, когато цялата присадка е заместена с нова кост (149, 151).

Използването на тромбоцитен концентрат в костната рана в тези случаи води до скъсяване времето на половина за достигане на пълно костно зарастване.

Спонгиозните присадки превъзхождат кортикалните в голяма степен. Те показват по-добро преживяване, по-добра резистентност към инфекция и по-бързо възстановяват механичната здравина на реципиентната кост. Въпреки това, кортикалните имат своето място в костното възстановяване: по-плътният им строеж осигурява необходимата първоначална структурна подкрепа при по-големи транскортикални дефекти, а бавната им резорбция осигурява по-голяма стабилност по отношение обема на присадката. Спонгиозните се предпочитат при възстановяване на малки транскортикални дефекти (до 5 см), за запълване на костни кухини след цистектомии, в т.ч. и след отстраняване на ДТМЗ с обширни фоликуларни кисти заемащи голяма площ от ъгъла и клона на челюстта, където има реална опасност от патологична фрактура; за повдигане пода на максиларния синус и др.

Автотрансплантатите могат да бъдат взети от донорски места извън лицево-челюстната област, както могат да бъдат и интраорални. Най-често и предпочитано екстраорално място е илиачната кост, нейният гребен. От него може да се получи голямо количество качествена кост, която позволява добро моделиране. Присадката може да бъде спонгиозна, моно-, бикортикална или смесена. От *crista illiaca* могат да се вземат най-големите трансплантати от спонгиозна кост, които имат най-силни остеоиндуктивни свойства в сравнение с всички останали донорски места на автогенна кост (екстраорални и интраорални). Поради тези си свойства присадките, в комбинация с PRP, се използват особено често в областта на пародонтологията за възстановяване на хоризонтално и вертикално костно стапяне на зъбодържачия апарат (234, 257, 263).

За нуждите на оралната и лицево-челюстната хирургия се използва и автотрансплантат от ребро: от 4-то до 8-мо, вкл., като най-често приложение намира 7-мо ребро. Предимство на ребрената присадка е наличието на хрущялен компонент. Други екстраорални донорски места са калварията – нейната фронтална, окципитална и париетална кост, а така също и тибията.

Интраоралните автотрансплантати се получават от леснодостъпни места на устната кухина, най-често под локална анестезия. Поради ограниченията в количеството, те се използват за възстановяване на малки по размери дефекти, главно за нуждите на предпротетичната, пародонталната хирургия и имплантологията. Обикновено количеството е достатъчно за едностранно повдигане на пода на синуса или за костна пластика в областта на два до три импланта. Подходящи донорски места за долната челюст са менталната и ретромолярната области, туберът за горната челюст, както и пресни екстракционни рани. С изключение на последните, кортикалната компонента обикновено преобладава, особено при тези, получени от долната челюст. Кост може да се вземе и от заздравяващи екстракционни рани (8-12-та седмица след екстракцията), обеззъбени участъци на челюстите, екзостози, торуси, места на проведена остеотомия и др.

Менталната област е най-често използваното интраорално донорско място. При взимане на кост от тази област трябва да се внимава да не се промени контурът на ментума. Границите на остеотомията трябва да отстоят от апексите на зъбите и от *foramen mentale* поне на 5 мм, за да не се увреди виталитета на фронталните долни зъби, както и да се запази от травмиране менталния нерв. За профилактика на евентуално

настъпили сетивни промени в менталната област Finkemeier и сътрудници (147) поставят богата на тромбоцити плазма в донорната ложа и доказват нейния обезболяващ и противовъзпалителен ефект.

Костните стружки или ситно раздробените костни парченца се смесват с кръвта на пациента и се имплантират в дефекта. Когато те биват смесени с PRP–съсирек, се получава увеличаване продукцията на нова кост и подобряване на нейното качество, заедно със скъсяване времето за пълно костно възстановяване на наличния дефект (252).

Алотрансплантатите елиминират нуждата от втора оперативна интервенция, както и ограничеността в количеството, характерни за автогенните присадки. Те могат да бъдат приложени при възрастни пациенти и при малки деца. Основните недостатъци са наличието на антигенни свойства в алогенния графт и рискът от пренасяне на заболявания. Последните могат да са бактериални или вирусни инфекции (хепатит В и С, болестта на Creutzfeldt-Jacobs и др.). Други недостатъци са по-лошите механични и биологични свойства на алотрансплантатите, сравнени с автотрансплантата. Относно последните, те притежават остеоиндуктивност, слаба остеоиндуктивност и никаква остеогенност. Остеогенност не съществува, тъй като не се запазват живи остеообласти в присадката. Остеоиндуктивността е слаба, поради унищожаване на по-малка или по-голяма част от костните морфогенетични протеини при обработка на присадките, с която се цели потискане на антигенните свойства и намаляване риска от пренасяне на инфекции. Приложена БТП заедно с алогенен графт подобрява възможността му за остеоиндукция, а от там и способността за по-добра костна регенерация (147, 215).

Образуването на нова кост при алотрансплантацията се извършва по подобен на автотрансплантацията начин – чрез резорбция на присадката от остеокласти и прогресивно заместване с нова кост от остеообласти, произхождащи от костта-домакин. Заместването на алотрансплантата с нова кост обаче е по-бавно, отколкото при автотрансплантата. Lodde (148) доказва, че след прилагане на PRP в костната рана, процесът на костното зарастване се ускорява.

Костните заместители са неорганични костозаместващи вещества. Разделят се на ксенотрансплантати, които имат естествен произход и на експланти, които са синтетични. Всичките, като неорганични субстанции, се характеризират с това, че нямат антигенни свойства. С изключение на един от ксенотрансплантатите (костния минерал от говежда кост), те също не носят риск от пренасяне на инфекции. Това, заедно с

тяхната неограниченост като количество, са големите им предимства пред групата на костните присадки. Недостатъците им са основно липсата на остеогенност и остеоиндуктивност. Костните заместители са само остеокондуктивни.

В зависимост от реакциите, които костните заместители предизвикват, когато се имплантират в костта, се разделят на: биотолерантни, биоинертни и биоактивни.

Биотолерантните материали се инкорпорират в костта чрез т.нар. дистантна остеогенеза – имплантът е отделен от костната тъкан чрез слой фиброзна тъкан. Пример за такива материали е полиметилметакрилатът (РММА).

Биоинертните материали не предизвикват образуване на такъв фиброзен слой, а показват контактна остеогенеза – костна тъкан се образува в посока от костта към импланта, до контакт с неговата повърхност. Такива материали са например алуминиевите керамики.

Биоактивните материали показват най-благоприятно взаимодействие с костната тъкан – процес, наречен свързваща остеогенеза. При него новата костна тъкан се образува в обратна посока, т.е. започва формирането си от повърхността на импланта. Това води до установяване на пряка връзка на импланта с костта посредством тази новообразувана кост, наречена костно свързване (bone bonding) (146, 150). За да се получи адекватно костно свързване е необходимо повърхността на биоактивните материали да се покрие с реактивен карбонатен апатитен слой. Именно на този слой се дължи формирането на контакт между костта и материала. Оформянето му е свойство, характерно за костно-свързващите материали, въпреки че последните преминават през различни пътища за неговото образуване. Развитието му зависи от някои физикохимични свойства на материала, като степента на кристализация, структура на кристала и др. Карбонатният слой определя и степента на костно свързване. Биоактивни свойства притежават костния минерал от говежда кост и мадрепоровият коралов скелет от групата на ксенотрансплантатите, а от експлантите само някои полимери, калциевофосфатните керамики и биоактивните стъкла.

Най-често за нуждите на Оралната хирургия се използват костният минерал от говежда кост и калциевофосфатните керамики. Основните им индикации са при алвеоларна реконструкция и аугментация, запълване на костни кухини след кистектомии или екстракция на ретинирани зъби, запълване на алвеоли след екстракция,

запълване на пародонтални костни дефекти, третиране на костни дефекти в имплантологията (31, 33).

Минералът от говежда кост се получава след премахване на органичния компонент. Остатъчният минерал представлява хидроксилапатит. Той превъзхожда синтетичния по отношение на биологичните си свойства (включително и по биоактивността), поради по-голямата си химична прилика с човешкия хидроксилапатит. Главното предимство на този естествен материал пред синтетичния хидроксилапатит е, че запазва триизмерната структура на костта и това му придава силни остеокондуктивни свойства. Сравнен с алотрансплантатите той има предимство, че поради пълната депротеинизация, не притежава никакви антигенни свойства.

Образуването на нова кост се извършва чрез резорбция на материала от остеокласти и прогресивно заместване с нова кост от остеобластите на костта-домакин. Скоростта на заместването на този ксенотрансплантат с нова кост е подобна на тази при алотрансплантата и по-бавна, отколкото тази при автогенната присадка. Предлага се като спонгиоза и кортикалис под форма на гранули или блок, а също и в комбинация с колаген. Колагенът е отключващ фактор за проява физиологичната активност на всички клетки в човешкия организъм, с изключение на кръвните. Така прекурсорните клетки и остеобластите, т.е. клетките отговорни за костното репарирание, свързвайки се с този протеин, индуцират началото на каскадата на костната регенерация. Освен това структурата му е благоприятна за минерално отлагане и той свързва неколагеновите протеини, които започват и контролират минерализацията (46, 54, 59).

Керамиките са висококристални материали, получени от минерални соли при температурни процеси в рамките на 1100 – 1300 градуса по Целзий. Калциевофосфатните керамики са най-често използвани в дефектите на челюстните кости поради тяхната биосъвместимост и композиционна прилика с минералната съставка на костта. Трикалциевият фосфат и синтетичният хидроксилапатит притежават много добра биоактивност, биологична поносимост и остеокондуктивни свойства. След проведени проучвания Brujin (146) установява, че недостатъците им са лошите механични качества (чупливост), бърза и непредсказуема скорост на резорбция. Всичко това се подобрява чрез прилагане на богата на тромбоцити плазма в костните дефекти заедно с костния заместител. Получените резултати показват ускорена и подобрена костна регенерация в местата, където тя е необходима.

Костната регенерация при използване на костни заместители се реализира от автогенните остеобласти на костта-домакин. Те мигрират в посока към зместващия графт и заемат пространствата между неговите частици. Приемливо костно зарастване при употреба на костен заместител може да се получи, ако материалът адсорбира фибрин и ако неговите частици не са прилепени плътно една за друга. Отношение към възстановителния процес има още повърхността на материала и неговата порьозност.

Тъй като в такива костни дефекти, при които е използван подобен материал, недиференцираните мезенхимни клетки са по-малко в сравнение с автогенния графт и тъй като е необходима значителна миграция на остеобласти, които да възстановят обема на костния дефект с нова кост, прилагането на богата на тромбоцити плазма е повече от ценно.

Частичите на костния заместител се смесват с PRP–съсирека, в резултат на което се образува мрежа от фибрин, фибронектин, витронектин, малко количество червени и бели кръвни клетки, и множество концентрирани тромбоцити (70, 71, 72). При така поставен в костния дефект материал, още в първите 10 минути, започват процеси на дегранулация на тромбоцитите. Те отделят съдържащите се в алфа гранулите им седем растежни фактори. Едни от тях предизвикват образуване на нови кръвоносни съдове, а други стимулират пролиферацията, диференциацията на стволови клетки и миграцията на остеобласти от костта–реципиент към графта. Тези процеси се развиват по мрежовидната структура, формирана основно от фибрина. Така се образуват мостове от костно вещество в микропроцепа между собствената кост и поставения материал (75). Постепенно, чрез серии от подобни процеси, се формира нова кост, която запълва наличното пространство и води до стабилност на присадката.

Тъй като формирането на нова кост след използване на костен заместител се реализира по-бавно и за по-дълго време, тя се образува в по-малки количества, в сравнение с автогенните присадки. Прилагането на тромбоцитен концентрат скъсява този процес, стимулира и подобрява костната регенерация (62, 72).

Чрез рентгенологични изследвания и използване на компютърно-томографски методи се доказва, че увеличаването на минералната костна плътност на присадката, когато е приложена БТП е от 1.6 до 2.2 пъти, в сравнение със случаите, в които не се прилага PRP. Клинично това се проявява с по-бързо формиране и по-ранно узряване на костния графт. Хистоморфометрични анализи показват, че в автогенния костен графт без PRP увеличената продукция на трабекуларна кост е в стойности от 55% +/-8%.

Сравнени с естествените регенеративни способности на мандибулата те са 38% +/-6%, а при прилагане на БТП образуването на трабекуларната костна структура е в стойности от 74% +/-11% (111, 156).

За лечение на костните дефекти съществуват различни оперативни методи. За да се възстанови загубената или увредена кост се използват различни видове материали. Това са костните присадки – автогенни или алогенни и костните заместители – ксенотрансплантатите и експлантатите. Крайната цел на всички методи е постигане на адекватна в качествено и количествено отношение нова кост. От казаното до тук се вижда, че при различните подходи има предимства и недостатъци. Това поставя важен за решение проблем пред хирурга, относно насоката за постигане на желания резултат, а именно – костната регенерация, която би могла да бъде стимулирана от ТК, получен по даден протокол, осигуряващ нуждите на клинициста и пациента.

6. Оздравителни процеси при костни и мекотъканни рани след оперативни дентални процедури

Първите документирани проучвания, относно приложението на автогенна богата на тромбоцити плазма, датират от началото на нашия век. По това време за пръв път чуждестранни автори публикуват и представят своя клиничен опит, показващ стимулиращия ѝ ефект върху костната регенерация, в областта на Оралната хирургия, Оралната медицина, Оралната патология, Оралната радиология и Ендодонтия. Те използват увеличена от 4 до 7 пъти спрямо периферната кръв концентрация на тромбоцити под формата на PRP - съсирек, които дегранулират по време на кръвосъсирващия процес в костната рана. Така те отделят съдържащите се в техните алфа гранули растежни фактори, ускоряващи оздравителния процес. Редица чуждестранни и български автори доказват по-силно изразения клиничен ефект на БТП при костното зарастване в сравнение с използването ѝ при мекотъканни рани, където механизмът на действие е същият, но клиничните резултати са показани в по-ниска степен (76, 79).

Зарастване на мекотъканни рани

Зарастването на меките тъкани е сложен процес, който включва коагулация, възпаление, синтез на матрикс (основна субстанция), ангиогенеза, фиброплазии, епителизация, свиване на раната и последващо преустройство. Физиологичният процес

започва незабавно при нараняване на тъканите и включва четири различни, но припокриващи се фази: а) хемостаза, б) възпаление, в) пролиферация и г) ремоделиране (80). Фазата на хемостазата започва непосредствено след нараняване на тъкани, свързани със съдово увреждане, освобождава се вътреклетъчният калций, активира се коагулационният фактор VII и се индуцира външната коагулационна каскада. Едновременно с коагулационната каскада пътищата на метаболизиране на арахидоновата киселина, освобождаването на растежни фактори и цитокини съвместно иницират и поддържат фазата на възпаление, както и последователността на клетките, участващи в процеса (65, 66, 80). По време на ранния период след нараняване тромбоцитите осигуряват изобилие от GF. Тези GF действат върху възпалителните клетки, фибробластите и ендотелните клетки, ръководейки зарастването на раната, включително и хемотаксиса на неутрофили, моноцити и фибробласти в раната. Пролиферативната фаза започва 2-3 дни след нараняването. По време на фазата на ремоделиране броят на макрофагите намалява в раната и затова фибробластите стават основен източник за TGF- β , PDGF, кератиноцитен растежен фактор (KGF) и IGF-1.

Фази на зарастването:

А) Коагулация. Появата на раната в резултат на хирургично или друго въздействие се съпровожда с кръвотечение. Съдовият спазъм в наранените съдове настъпва непосредствено след увреждането им и се дължи на катехоламини, брадикинини, серотонин и хистамин. Те иницират в нея процес на диапедеза на формени елементи от кръвта, от които се формира съсирекът.

Б) Възпаление /1-5 ден/. То започва с миграция в раната на левкоцити, а по – късно макрофаги и лимфоцити. Тези клетки участват в регулирането на създаването на съединително-тъканен матрикс. Възпалителният процес, вследствие миграцията на левкоцити в раната, се развива след няколко часа и е причина за локален оток, болки и зачервяване около раната.

В) Пролиферативна фаза /5-14 ден/. Настъпва миграция на фибробласти и прорастване на капиляри в раната.

През първата и втората седмица фибробласти мигрират в областта на раната. Под действие на ензими, отделяни от клетките на кръвта и съседните тъкани, фибробластите

формират колагенови влакна и основното вещество в раната – фибронектин. Тези вещества подпомагат фиксирането на фибробластите към подлежащия слой. Колагенизацията на раната (фиброплазия) започва към 5-тия ден и е особено интензивна до 7-мия, което води до бързо нарастване здравината на регенериралите тъкани. Реконструкцията в нея зависи от равновесието между образуването на колагена и неговото разграждане. Възстановяват се и останалите компоненти на увредената съединителна тъкан. Настъпва реканализация, прорастване и формиране на лимфните и кръвоносни съдове, хранещи фибробластите.

Г) Фаза на преструктуриране /след 14-тия ден до 1 година/. Количеството на колагена в тази фаза практически не се увеличава, настъпва неговото преустройство и образуване на напречни връзки между колагеновите влакна, с което нараства здравината на цикатрикса. Формираният цикатрикс рядко достига устойчивост към увреждане, еднаква с тази на здравата тъкан. Раните на кожата обикновено достигат 70-90% от първоначалната ѝ здравина след зарастване.

Проучвания доказват ефекта на богатата на тромбоцити плазма върху мекотъканните рани. Knifghton и сътрудници правят изследвания при вземането на свободен невакуларизиран разцепен кожен трансплантат (80, 84, 89). Те сравняват възстановяването на две донорски места на един и същ пациент. Едната ложа, непосредствено след вземането на трансплантата, постилват с говежди тромбин, имащ хемостатичен ефект, а другата – с PRP съсирек. Зарастването на раната се дължи на прорастване на капиляри, които чрез механизми на перфузия осигуряват хранителни вещества и чрез епителна миграция от краищата ѝ. Поставен в раната, тромбоцитният съсирек осигурява тъканно свързване. Тромбоцитите в него дегранулират и секретират техните седем растежни фактори, докато фибринът, фибронектинът и витронектинът действат като адхезионни молекули. Те осигуряват матрикса за клетъчна миграция. Васкуларният ендотелен растежен фактор и трите изомера на получения от тромбоцитите растежен фактор индуцират бърза капилярна пролиферация. Новообразуваните кръвоносни съдове осигуряват хранителната доставка в донорното място. Трансформираният растежен фактор – бета изомерите му, стимулират фиброплазията и синтеза на колаген. Изключителна важност има ендотелният растежен фактор. Той действа на базалните клетки по ръбовете на раната, които всъщност са стволови клетки от епителния слой на кожата. Така се увеличава пролиферацията на епителните клетки, които впоследствие мигрират към центъра на раната и попадат на

повърхността на белтъчните адхезионни молекули, намиращи се в тромбоцитния съсирек (3, 8, 9, 70).

На 6-тия ден след вземане на трансплантатите Knifghton и сътрудници установяват значителна разлика в оздравителния процес в полза на донорното място, което е покрито с PRP. Около ложата с нормалния кръвен съсирек, който е изграден от 95% еритроцити и само 5% тромбоцити, се наблюдава периферен еритем и ясно оформена в изобилие грануляционна тъкан, с начална фаза на епителна миграция от периферията. При прилагане на PRP не се установява околоръстно такъв еритем, а в раната се виждат остатъци от вече заменената грануляционна тъкан. В резултат на БТП, на 6-тия следоперативен ден, в нея е наличен тънък слой от новообразуван епител. Този ефект е установен на хистологични срезове (92, 96, 98).

След ново сравняване на двете донорни ложи на 45-тия ден се вижда, че раната с PRP - съсирека е с възстановена плътност, дебелина и цвят на нормална кожа. Това означава, че е настъпила регресия на стимулираната васкуларизация. Потискането на капилярообразуването бележи зреенето на дермата и епидермиса, т.е. 4-тата фаза от зарастването на мекотъканните рани – тяхното преструктуриране. За разлика, в раната без PRP се наблюдават останали червени кръвни клетки и малко количество новообразуващи се кръвоносни съдове под повърхността. В резултат на това кожата в това донорно място изглежда хиперемирана.

От подобни опити е установено, че използването на БТП редуцира болковия следоперативен синдром през първата седмица и намалява образуването на цикатрикс. Пациентите съобщават за 40% редукция на болката при сравняване на двете донорски ложи. Приложението на PRP в мекотъканни дефекти води до по-малко белези и осигурява възстановяването на нормална по цвят и качество кожа, чрез нейната по-ранна епителизация и посредством подпомагане функцията на меланоцитите.

Механизъм на възстановяване на костната тъкан

I-ви стадий започва веднага след костното увреждане. Вследствие на нарушената цялост настъпва излив на кръв. Под действието на медиаторите на възпалението се реализира вазодилатация и екстравазален излив на плазма. В мястото се концентрират полиморфноядрени левкоцити, макрофаги и лимфоцити. Отделят се биохимични

медиатори от сигнални белтъчни молекули, участващи в нормалната костна хомеостаза. До 24-тия час започва резорбирането и организирането на кръвния коагулум.

II-ри стадий е свързан с настъпване на исхемия и асептична некроза. Започва резорбцията с участие на остеокластите. Този период е 10-12 дни след костното нараняване.

III-ти стадий /Репаративен/. Образуваният кръвен коагулум осъществява първична механична стабилизация. Отделят се клетъчни медиатори – простагландини. Фибриновият скелет на коагулума е мястото за съсредоточаване на клетки, участващи в костната регенерация. РН от неутрална преминава в алкална, което способства за минерализация на калуса. Съединителна тъкан, млада кост, хрущял се изграждат от фибробласти, остеобласти, хондроцити и ендотелни клетки. Те водят началото си от плурипотентни мезенхимни клетки, произхождащи от съседните тъкани и мигриращи с кръвния ток. Настъпва реваскуларизация с образуване на капилярни бримки и формиране на грануляционна тъкан. Тя осъществява първичния мекотъканен грануляционен мост между краищата на раната. Изграждането на белтъчния матрикс продължава с участието на хондроцити, остеобласти и пролиферация на кръвоносни съдове. Така се формира началният калус. Той се състои от фиброзна тъкан, кръвоносни съдове и млада кост.

IV-ти стадий Преобладават процесите на остеогенеза. Когато тя се осъществява в среда, богата на O_2 в тъканите се образува нова кост, а при неговия недостиг – преобладава хондрогенезата, т.е. образуване на хрущялна тъкан. С прогресиране на калусообразуването се увеличава производения от остеобластите колаген и остеопонтин, костни протеини, алкална фосфатаза. Намаляват гликозоаминогликаните и се увеличават неутралните протеогликани, които стимулират минерализацията на костния калус – с комплекси от $CaPO_4$. Отделят се ензими /протеази и алкална фосфатаза/, чиято функция се стимулира от отделените в първия етап на костна регенерация растежни фактори. Този процес протича в продължителен период от време – от 45 дни до 1 година.

Образуваната „млада кост” е с архитектоника на хаотично разположени костни ламели, които наподобяват спонгиоза. Започва процес на ремоделиране, като постепенно се замества със зряла кост. Постепенното заместване на млада кост се осъществява чрез синхронно действие на остеокласти и остеобласти. Матриксният

протеин остеопонтин стимулира съсредоточаване в раната на остеокласти, а активността им се модулира от остеокалцинът. Костната резорбция се стимулира от простагландин Е. Остеокластите разрушават неправилно разположените костни гредички на незрялата кост, като образуват канали, ориентирани по посока на силовите линии. В тях концентрично се отлагат костни ламели, между които прорастват кръвоносни съдове.

Така протичащият в посочените срокове процес на костна регенерация в един костен дефект, може да бъде повлиян чрез добавяне на богата на тромбоцити плазма. Концентрираният тромбоцитен съсирек, който тя представлява, отделя в първите часове, в процеса на кръвосъсирване, увеличен брой растежни фактори – PDGF, TGF, VEGF, EGF. Те стимулират и ускоряват нормалния оздравителен процес на костта. По този начин възстановеният костен дефект по-рано възобновява своята анатомична цялост и свързаната с това негова функция, без развитие на суперпонирана инфекция.

От изложеното по-горе става ясно, че прилагането на ТК, получени по определени протоколи, осигурява стимулиране на костното възстановяване в първите дни след оперативната интервенция и води до скъсяване на нормалния период за изграждане на желаната от хирурга плътна хомогенна костна структура.

7. Механизъм на действие на БТП

Структура на тромбоцитите

Тромбоцитите представляват фрагменти от цитоплазмата на зрелите мегакариоцити, които водят своето начало от костния мозък. Те, както червените кръвни клетки, навлизат в общата циркулация на кръвотока като безядрени клетки и имат определено време на живот. В кръвта циркулират около 65% от всички тромбоцити. Останалото количество се съдържа в слезката. Техните стойности са 140-440G/l. Докато червените кръвни клетки живеят 120 дни, тромбоцитите са жизнеспособни само 7-10 дни. Въпреки че нямат ядра, те са с висока метаболитна активност. Характерно за тромбоцитите е, че те синтезират растежни фактори през целия си жизнен цикъл и ги секретират, като отговор на кръвосъсирващия процес. Електронномикроскопски изследвания показват, че формата им е кръгла или дисковидна. В най-големия си диаметър те достигат 2 микрометра. За сравнение, еритроцитите са около 8 микрометра, а лимфоцитите – от 12 до 14 микрометра (3). Тромбоцитите са обвити с рехав пласт от гликопротеини и

гликозаминогликани, наречени гликокаликс (3). Той осигурява връзката им с плазмените фактори на кръвосъсирването, съответно участието на тези клетки в процеса на кръвосъсирване и фибринолиза. Непосредствено под него е разположена плазмената им мембрана. Тя има трипластов строеж, формира различни инвагинации и се състои от липидни и белтъчни молекули, намиращи се в постоянно относително движение едни спрямо други. Върху мембраната се намират рецептори за аденозиндифосфат и тромбин. Под нея е разположена система от субмембранни нишки и микротубули. Те изграждат опорната структура на тромбоцитите – цитоскелет. Цитоскелетът поддържа формата на тромбоцитите. Те притежават освен това и вторична система от микрофиламенти, която, взаимодействайки с гъстата тубулна система, предизвиква промени във формата на клетките. В цитоплазмата на тромбоцитите се намират и везикули, които са изпълнени със складирани гранули. Везикулите са съставени от три типа гранули – лизозомални, плътни и алфа. Лизозомалните функционират като склад за храносмилателни ензими. В плътните се съхранява и секретира аденозиндифосфат, който потенцира и активира други тромбоцити, катехоламини, серотонин и др. Алфа гранулите съдържат характерните за тромбоцитите растежни фактори, които са бионеактивни протеини в спокойно състояние. Това са три изомера на получен от тромбоцитите растежен фактор (platelet – derived growth factor - PDGF_{aa}, PDGF_{bb}, PDGF_{ab}), два изомера на трансформиращ растежен фактор (transforming growth factor - TGF_{b1}, TGF_{b2}), съдовоендотелен растежен фактор (vascular endothelial growth factor - VEGF) и епителиален растежен фактор (epithelial growth factor - EGF). Алфа гранулите са също богати на адхезионните молекули витронектин и фибронектин, които се изискват и са необходими в процесите на остеокондукция и остеоинтеграция. Тромбоцитите не съдържат инсулиноподобен растежен фактор (insulin – like growth factor ILG1, ILG2) и костни морфогенетични протеини (bone morphogenetic protein BMP), (табл.2,3); (1, 2, 12, 17).

Таблица 2. Съдържание на тромбоцитните алфа-гранули.

Категория	Наименование	Биологични активности
Слепващи протеини	VWf + propeptide, Fg, Fn, Vn, TSP-1, laminin-8	Клетъчно контактно взаимодействие, съсирване, съставяне на извънклетъчен матрикс

Фактори на кръвосъсирването и свързаните протеини	Factor V/Va, factor XI, multimerin, gas6, protein S, high-molecular weight chininogen, antithrombin, tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Производство на тромбин и неговото регулиране, ангиогенеза
Фибринолитични фактори и свързаните протеини	Plasminogen, PAI-I, u-PA, osteonectin, alpha2-antiplasmin, histidine-rich glycoprotein, TAFI, alpha2-Macroglobulin	Производство на плазмин и съдово ремоделиране
Протеази и антипротеази	Tissue inhibitor of metalloprotease-4 (TIMP-4), metalloprotease-4, platelet inhibitor of FIX, protease nexin-2, C1 inhibitor, alpha1-Antitripsin	Ангиогенеза, съдово моделиране, регулиране на кръвосъсирването, регулация на клетъчното поведение
Растежни фактори, цитокини и хемокини	PDGF, TGF alpha 1 and 2, EGF, IGF-1, VEGF (A and C), bFGF and FGF-2, hepatocyte GF, RANTES, IL-8, MIP-1alpha, growth regulated oncogene-alpha, ENA-78, MCP-3, angiopoietin-1, IL-1beta alpha, IGF BP-3, neutrophil chemotactive protein	Хемотаксис, клетъчната пролиферация и диференциация, ангиогенеза
Основни протеини и други	PF4, beta-thromboglobulin, platelet basic, protein, connective tissue activating peptide III, neutrophil activating peptide-2, endostatins	Регулация на ангиогенезата, съдово моделиране, клетъчни взаимодействия
Антимикробни протеини	Thrombocidins	Бактерицидни и фунгицидни свойства
Други	Chondroitin 4-sulfate, albumin, Immunoglobulins	Разнообразни
Мембранни гликопротеини	alphaIIb beta3, alpha beta3, GPIb, PECAM-1, most plasma membrane constituents, receptors for primary agonists, CD40L,	Тромбоцитна агрегация и адхезия, ендоцитоза на протеини, възпаление, образуване на тромбин, тромбоцитно-левкоцитни взаимодействия

Секрецията на растежните тромбоцитни фактори се активира от процеса на кръвосъсирване. Той води до структурни промени в мембранната им система, след което настъпва отделяне на синтезираните в алфа гранулите РФ. Тези гранули мигрират към вътрешната повърхност на тромбоцитната мембрана. Там те се сливат с нейните белтъчни (хистони) и въглехидратни (карбохидрати) вериги, и в резултат на този процес, растежните фактори получават специфична биологична активност. Важно е да се отбележи, че те са естествени протеини, проявяващи своя ефект при нормална генна регулация и не търпят мутация (27,28).

Табл. 3. Основни молекулярни компоненти в α -гранулите и тяхното биологично действие.

Растежен фактор	Лечение на рани и способност за образуване на тъкан
епидермален растежен фактор (EGF)	<ul style="list-style-type: none"> - стимулира пролиферацията на епидермални и епителни клетки, фибробласти и ембрионални клетки - хемоатрактант за фибробласти и епителни клетки - стимулира реепителизацията и ангиогенезата - влияе върху синтеза и обръщението на извънклетъчния матрикс
получен от тромбоцитен растежен фактор (PDGF)	<p>А и В изоформите са мощни митогени за фибробластите, клетки на артериалния гладък мускул, хондроцити, епителни ендотелни клетки</p> <ul style="list-style-type: none"> • мощни хемоатрактанти за хемопоеични и мезенхимни клетки, фибробласти, и мускулни клетки, стимулира хемотаксис към градиент на PDGF • активира TGF-β, стимулира неутрофили и макрофаги, митогенеза на фибробластни и гладки мускулни клетки, синтез на колаген, колагеназна активност, и ангиогенеза
трансформиращ растежен фактор алфа (TGF- α)	<p>Наподобява EGF, свързва се със същия рецептор</p> <ul style="list-style-type: none"> • стимулира мезенхимни, епителни, и растежа на ендотелни клетки, ендотелен хемотаксис, контролира епидермалното развитие • стимулира пролиферацията на ендотелните клетки, по-мощен от EGF • подпомага образуването на остеобласти, които им въздействат, за да се предостави на костите матрица по време на остеогенеза • влияе на образуването на кост и ремоделирането чрез инхибиране на синтеза на колаген и освобождаване на калций

трансформиращ растежен фактор бета (TGF-β1)	<p>Стимулира фибробластния хемотаксис и пролиферация и стимулира синтеза на колаген</p> <ul style="list-style-type: none"> • намалява дермални белези • инхибитор на растежа на епителни и ендотелни клетки, фибробласти, невронални клетки, хематопоеични клетъчни видове и кератиноцити • антагонизира биологичните активности на EGF, PDGF, aFGF и bFG
кератоцитен растежен фактор (KGF или FGF-7)	<p>Най-мощен растежен фактор за кожни кератиноцити, играе роля в тъканната поправка след кожни наранявания</p> <ul style="list-style-type: none"> • подпомага заздравяването на раните чрез пролиферация, диференциация, ангиогенеза и клетъчна миграция • митоген за много епителни клетки, но не и за фибробласти и ендотелни клетки
фибробластен растежен фактор, киселинен (FGF-1 или aFGF)	<p>Участва в пролиферация, диференциация, ангиогенеза и клетъчна миграция</p> <ul style="list-style-type: none"> • митоген за кожно извлечени кератиноцити, дермални фибробласти и съдово ендотелни клетки
основен фибробластен растежен фактор (FGF-2 или bFGF)	<p>Стимулира растежа на фибробласти, миобласти, остеобласти, невронни клетки, ендотелни клетки, кератиноцити, и хондроцити</p> <ul style="list-style-type: none"> • стимулира ангиогенезата, пролиферация на ендотелни клетки, синтез на колаген, свиване на раната, матрикс синтез, епителизация и производство KGF
васкуларен ендотелен растежен фактор (VEGF/VEP)	<p>Стимулира пролиферацията на макроvascularни ендотелни клетки.</p> <ul style="list-style-type: none"> • силен ангиогенен протеин, предизвиква неоваскуларизация индуцира синтеза на metalloпротеиназа, който разгражда интерстициален колаген тип 1, 2, и 3
инсулиноподобният растежен фактор (IGF)	<p>Растежен фактор за нормалните фибробласти, митогенен <i>in vitro</i> за редица видове мезодермални клетки</p> <ul style="list-style-type: none"> • промотира синтеза на колагенази и простагландин E2 • стимулира синтеза на колаген и матрикс от костните клетки, регулира метаболизма на ставния хрущял
тумор-некротизиращ фактор-алфа (TNFα)	<p>растежен фактор за фибробласти, промотира ангиогенезата</p>
интерлевкин 8 (IL-8)	<p>поддържа ангиогенеза митогенен за епидермални клетки</p>

Полученият от ТР растежен фактор със своите три изомера (PDGF_{aa}, PDGF_{bb}, PDGF_{ab}) стимулира репликацията на мезенхимните стволови клетки, подпомага растежа на остеобластите и продуцираната от тях остеоидна тъкан, увеличава растежа на ендотелните клетки и секретиранията от тях базална ламина на новоформираните кръвоносни съдове, стимулира клетъчното делене на фибробластите и продукцията им на колаген. Трансформиращите растежни фактори (TGF β 1 и TGF β 2) са протеини, които също стимулират клетъчния растеж, но основното им въздействие е върху увеличаване на матриксната продукция и диференциацията ѝ до хрущялна и костна тъкан. Вазкуларният ендотелиален РФ (VEGF) е друг протеин, чиито ефект е свързан с определяне на ендотелните клетки и синтезиране от тях на базалната съдова ламина. Той отговаря и за възстановяването на перидитите – нискодиференцирани клетки, намиращи се около кръвоносните съдове, които са трансформират и подпомагат развитието на новоформираните капиляри при заздравяването на раните. Епителният РФ (EGF) лимитира базалните клетки от кожата и лигавиците, стимулира клетъчния им растеж и делене и допринася за по-бърза регенерация на специфичните компоненти от базалния слой на кожата и мукозните мембрани.

Всички тези растежни фактори нормално се съдържат в тромбоцитите, циркулиращи свободно в общата кръв на човешкото тяло, заедно с останалите нейни формени елементи. При получаване на костна или мекотъканна рана настъпва процес на кръвотечение, последван от такъв на кръвосъсирване.

Ефективността на PRP зависи от биологичното състояние на тромбоцитите. Дегранулацията и секретиранията на съдържащите се в тях растежни фактори са в пряка връзка с кръвосъсирващия процес.

Процес на кръвосъсирване

Тромбоцитният тромб се образува около 5 секунди след съдовото увреждане. Малко след това от тромбоцитите се освобождава тромбоцитен фактор 3. Плазмените фактори 8 и 9 се свързват с него и стимулират активирането на фактор 10. Тези реакции, развиващи се върху тромбоцитната повърхност, се ускоряват от действащия като кофактор плазмен фактор 5. След това фактор 5 се фиксира върху мембраната на

тромбоцитите и става рецептор за фактор 10. Зависимите от витамин К фактори 10 и 11, както и калциевите йони притежават способността да се свързват за тромбоцитните фосфолипиди (тромбоцитен фактор 3). Взаимодействието на тези фактори довежда до образуването на тромбин, а впоследствие и на фибрин. Същевременно се стимулира синтезирането на простаглицлини от ендотелните клетки, а чрез това се ограничава ексцесивното нарастване на тромба.(2, 3)

Факторите на съсирването се отделят от тромбоцитите и наранените тъкани. Те способстват за образуване на фибрин, който обезпечава хемостазата и служи като своеобразна мрежа, в която след това мигрират фибробластите, одонтобластите, както и клетките, участващи във възпалението. Фибринът се явява резултат от пускането на каскада от механизми за съсирването на кръвта. Без фибриновата мрежа цикатриксът на зарастващата рана или новообразуваната кост ще бъдат недостатъчно здрави.

Структура на тромбоцитния концентрат

В следекстракционната рана, при оформяне на костната ложа за поставяне на дентален имплант, при поставяне на костен графт или в един мекотъканен дефект, образувалият се нормален кръвен съсирек е представен от 94% червени кръвни телца, 5% тромбоцити и 1% левкоцити (43, 69). В него нормално настъпва активация на тромбоцитите и освобождаване на растежни фактори, чиято концентрация е изключително ниска. За да се използват във висока степен техните търсени ефекти, водещи до по-бърза регенерация на тъканите, много проучвания и клинични изследвания са довели до извличане чрез методи на центрофугиране от автогенната цяла кръв, на богата на тромбоцити плазма. В така получената тромбоцитна плазма, наречена още тромбоцитен концентрат/сусирек, съотношението на изграждащите го клетки е: 94% тромбоцити, 5% еритроцити и 1% левкоцити. По този начин концентрацията на ТР е увеличена от 4 до 7 пъти. Именно тази промяна в клетъчното съотношение – заместването на еритроцитите от тромбоцити, водеща до стимулиране на всички фази от оздравителния процес, обяснява влиянието ѝ върху по-бързия клетъчен растеж и допринася за ускоряване на тъканната регенерация.

Ефект на действие на тромбоцитния концентрат върху костната регенерация

По отношение на оралната патология, където имаме заболявания на челюстните кости и заобикалящата ги лигавица с подлежащите меки тъкани, по-голям принос на

БТП се установява при заздравяване на оперативните костни рани, в сравнение с мекотъканните (34, 46, 68).

Основният механизъм на действие, на използваната за целите на оралната хирургия автоложна, богатата на тромбоцити плазма, се изразява в по-бързо възстановяване на костните дефекти в устната кухина. Нейното прилагане интраоперативно, заедно със или без костна присадка, води до скъсяване времето на половина, за постигане на качествена и количествена регенерация (64, 66).

Алфа гранулите, намиращи се в тромбоцитите, дали в обикновения кръвен съсирек или в тромбоцитния екстракт, започват процеси на дегрануация в рамките на 10 минути след инициране на кръвосъсирващия процес. Те секретират 90% от своите биологично неактивни растежни фактори през първия 1 час. След отделянето им, те се свързват с трансмембранните рецептори на остеопрогениторните, ендотелните и недиференцираните мезенхимни стволови клетки. Заедно с белтъчните молекули на фибрина и фибронектина, съдържащи се в ацелуларната част на кръвния съсирек, с добавянето и на витронектина от алфа гранулите, те поставят началото за оформяне на костния матрикс. Трите изомера на PDGF увеличават митотичната активност на остеобластите, ендотелните клетки и пролиферацията на плурипотентните стволови клетки. Двамата изомера на TGF β допълват ускоряването на митозите, както и съдействат и подпомагат диференцирането на голяма част от стволовите клетки в остеобласти. VEGF допринася за специфичния капилярен растеж. EGF е нефункционален при липсата на епителни клетки, каквито има в изключително оскъдно количество, при определени клинични случаи в костните рани (53, 63).

Механизмът на действие на ТРФ, проявяващ се в процесите на остеоинтеграция в следекстракционни костни дефекти, при поставяне на дентални импланти, използване на автогенен костен графт или костен заместител, протича в няколко фази - на клетъчно и тъканно ниво. В резултат на увеличената концентрация на ТР в изолираната и приложена в костната рана плазма, може да бъде наблюдавано по-бързо начало на клетъчния отговор в автогенната костна присадка, поставена в реципиентната ложа. Различни проучвания установяват, че още на 3-тия следоперативен ден се вижда ускорена митотична активност на клетките, предшественици на остеобластите (59,62). На същия този ранен етап могат да бъдат видяни и оформящи се капилярни разклонения. От 17-тия до 21-ден пенетрацията на съдови капиляри е завършена, т.е. има

новосформирани кръвоносни съдове в посока от костта домакин към автогенния графт. Наличието на нови образувани капиляри е белег за успешно протичане на оздравителния процес. Тази първа фаза обхваща трите седмици, непосредствено след проведената хирургична интервенция. Тя се характеризира основно с ускореното формиране на нови кръвоносни съдове, както и с увеличаване на клетъчния метаболизъм и пролиферация. В този етап поставеният костен графт е изключително нестабилен и уязвим спрямо различни инфекции. Това налага хирургът да осигури абсолютна неподвижност на присадката и да проведе антибиотична профилактика.

Въпреки че животът на TP е 7-10 дни, техният ефект върху остеоинтеграцията е установен и доказан (59, 61, 64). Те определят степента на количествената и качествена костна регенерация. Циркулиращите макрофаги и кръвни моноцити също попадат в костната рана. На повърхността си макрофагите притежават рецептори, които са чувствителни на намалена кислородна концентрация. Характерната хипоксия за този ранен етап след поставянето на костния графт и намаляването на киселинността – рН от 4-6 става 7.42 (3, 71), привличат циркулиращите макрофаги. Те са привлечени в зоната на контакт между присадената кост и костта-домакин, и секретират допълнително растежни фактори, които регулират и участват в по-нататъшната костна регенерация. Наличните в кръвната плазма фибрин, фибронектин и витронектин подпомагат слепването на клетките. Те стимулират клетъчната миграция и адхезия. С тяхна помощ се формира клетъчният матрикс и заедно с новообразуваните капиляри се изгражда скеле. Така изградената мрежа осигурява продукцията на остеоидна тъкан, което представлява прехода към следващата фаза от механизма на действие на БТП.

Между 3 и 6 седмици след оперативната процедура незрелите костни клетки пролиферират и търпят необходимата степен на диференциация, за да продуцират остеоид – незряла костна тъкан. По този начин, чрез образуването на млада кост, се осъществява консолидация на графта, където е наличен и свързването му със съседната собствена кост-домакин. Този период се описва като втора фаза на костната регенерация. Напълно завършили своето формиране и зрели нови капиляри правят графта по-жизненоспособен и можещ да понесе лека функция. Те възстановяват съдържанието на кислород в костната рана и премахват хипоксията. По този начин се потиска действието на макрофагите, отделящи допълнително растежни фактори, за да не настъпи хиперплазия на съответната тъкан.

В началото на 6-тата следоперативна седмица образуваната остеоидна тъкан задължително се подлага на резорбтивно-ремоделиращи процеси. Слабият и еластичен остеоид търпи резорбция от остеокластите, които освобождават костни морфогенетични протеини. Тези протеини обратно индуцират наличните съседни остеобласти и мезенхимните стволови клетки да се диференцират, като продуцират и заместват младата тъкан с по-зряла кост. Тя е изградена от типичната ламеларна структура и система от Хаверсови канали. Постепенно тя се реорганизира, става едно цяло с останалата челюстна кост и бива включена в ежедневните процеси на костна резорбция и остеогенеза, произтичащи в резултат на реализираната дъвкателна функция (71, 75).

Клиничният опит на редица автори, проучващи ТК показва, че те имат основна и водеща роля в ранната биохимична първа фаза от тристепенния процес на костна регенерация.

Ефект на действие на PRP при мекотъканни дефекти

Зарастването на мекотъканната рана, постлана с БТП се дължи на прорастване на капилляри, които чрез механизми на перфузия осигуряват хранителни вещества и епителна миграция от краищата ѝ. Поставен в раната, тромбоцитният съсирек осигурява тъканно свързване. Тромбоцитите в него дегранулират и секретират техните седем растежни фактори, докато фибринът, фибронектинът и витронектинът действат като адхезионни молекули. Те осигуряват матрикса за клетъчна миграция. Васкуларният ендотелен растежен фактор и трите изомера на получения от тромбоцитите растежен фактор индуцират бърза капилярна пролиферация. Новообразуваните кръвоносни съдове осигуряват хранителната доставка в донорното място. Трансформираният растежен фактор – бета изомерите му, стимулират фиброплазията и синтеза на колаген. Изключителна важност има ендотелният растежен фактор. Той действа на базалните клетки по ръбовете на раната, които всъщност са стволови клетки от епителния слой на кожата. Така се увеличава пролиферацията на епителните клетки, които впоследствие мигрират към центъра на раната и попадат на повърхността на белтъчните адхезионни молекули, намиращи се в тромбоцитния съсирек.

На 6-ти следоперативен ден, при прилагане на PRP , в раната се виждат остатъци от вече заменената грануляционна тъкан. В резултат на БТП, в нея е наличен тънък слой от

новообразуван епител. За разлика при нормалния оздравителен процес, без PRP, на този етап оперираното място е представено от изобилна грануляционна тъкан и начална епителна миграция. 45 дни след използване на тромбоцитен концентрат се наблюдава възстановяване на плътността, дебелината и цвета на нормална кожа в зоната на мекотъкания дефект, при използване на ТК (81, 82, 86, 116).

Съществуват различни методи за добив на БТП. В медицинската и дентална практика за добиване на автоложни тромбоцитни концентрати от цяла кръв, които подобряват и стимулират главно костните оздравителни процеси, се използват две основни техники. Всяка има своите модификации, но като цяло могат да бъдат обобщени като техника на концентрирана богата на тромбоцити плазма (сPRP) и „buffy coat“ техника (BC) (214, 227).

Концентрирана богата на тромбоцити плазма (сPRP)

Техниката сPRP има широка популярност в САЩ (185). сPRP техниката включва събиране на цяла кръв, която е антикоагулирана и е разделена чрез центрофугиране. Разделянето се основава на физическите свойства на клетките (специфично тегло, размер и деформируемост) в допълнение към вискозитета на плазмата (214). Етапите на тази техника са следните:

1. Изтегля се венозна кръв в желанния обем, която се подлага на центрофугиране с ниска стойност на g, т.нар. „soft spin“, което позволява разделяне на кръвта в три слоя. Дъното на епруветката се заема от червени кръвни клетки около 55% от обема, средният слой около 5% е PRP, а горната част съдържа бедна на тромбоцити плазма (PPP) – 40% от общия обем. Това нискоскоростно центрофугиране води до PRP слой, който съдържа по-голямата част от отложените тромбоцити, 30-50% от количеството бели кръвни клетки и някои единични еритроцити.
2. PPP и PRP слоевете се прехвърлят в отделна епруветка и се центрофугират при по-висока сила (g), т.нар. „hard spin“ за по-дълъг период от време. Наблюдават се отново три видими слоя в епруветката, като тромбоцитите са концентрирани на дъното на епруветката над някои остатъчни еритроцити. Препоръчва се тромбоцитните да останат в покой за 1 час преди следващата стъпка с оглед

минимизиране на агрегацията и увреждането на тромбоцитите (224).

3. Основната част (50-80%) от общия обем на супернатанта, обхващащ PPP, се отстранява. Останалата част се използва за ресуспендиране на тромбоцитите и останалите еритроцити чрез леко разклащане. Получава се концентриран PRP продукт (сPRP) с бледорозов цвят, дължащ се на присъствието на червени кръвни клетки.

При добавянето на калций или говежди тромбин към получената суспензия се получава тромбоцитен гел (PGEL). Желирането на тромбоцитния концентрат се получава бързо. Фибриногенът също се концентрира по време на добиването на сPRP и неговата полимеризация образува фибринова матрица с хемостатични и адхезивни свойства.

Потенциалът за масово освобождаване на цитокини и растежни фактори по време на активирането на тромбоцитите с говежди тромбин изглежда зависи от времето на активиране и от механични и биологични свойства на крайния фибринов матрикс (82, 213). За да се направи PRP гел при завършване на горните стъпки, една трета до половината от бедната на тромбоцити плазма (PPP) се добавя обратно в сPRP, последвано от добавянето на активатор.

Buffy Coat техника

Техниката на „buffy coat“ (BC) е по-често прилагана в Европа, като основните стъпки са:

1. Взема се желаното количество кръв, която се центрофугира от 7 до 10 минути при висока центробежна сила (различни автори приемат различни стойности за т.нар. hard spin, но преобладаващите вариации са над 1000xg). Това създава т.нар. „buffy coat“, съставен от тромбоцити и левкоцити. По време на високоскоростно центрофугиране левкоцитите първоначално се утаяват с еритроцитите, докато тромбоцитите остават в плазмената супернатанта. След това червените кръвни клетки слепват плътно и бързо падат на дъното на епруветката. Този процес принуждава левкоцитите да се придвижат нагоре, като се разположат непосредствено над еритроцитите. Тромбоцитите в

супернатантната плазма се утаяват и натрупват също в тази зона. При тази техника за добиване на PRP разположението на тромбоцитите върху червените клетки може да обясни по-малката степен на активиране на тромбоцитите в сравнение с метода на cPRP (88). Аспирира се образуваният „buffy coat“ от долния плазмен слой, състоящ се от тромбоцити, левкоцити и малка част от горния слой на червените кръвни клетки.

2. След това отделеният „buffy coat“ с част от PPP се центрофугира на ниска скорост, за да се отделят тромбоцитите от левкоцитите и всички останали еритроцити. Налице са множество специфични системи за събиране, които имат разделящата преграда, позволяваща отстраняването на плазмата от горната част и еритроцитите от долната част, като тромбоцитите остават необезпокоявани. Техниката е изпълнима и при работа без разделящи прегради, но с висока степен на прецизност.
3. Полученият след второ центрофугиране PRP продукт може да се прилага според желаното направление, т.е. с или без последваща активация.

Активиране на обогатената с тромбоцити плазма

Терминът „активиране“ се отнася до 2 ключови процеса, които се инициират по време на подготовката на PRP продуктите: (1) дегранулация на тромбоцитите за освобождаване на растежни фактори от α -гранули и (2) разцепване на фибриноген за образуването на матрица, процес на съсирване, който позволява образуването на тромбоцитен гел и следователно да се ограничи секрецията на биоактивни молекули извън желаното място (207). Стъпката на активиране преди прилагане на PRP е включена в много от използваните протоколи, обикновено чрез добавяне на тромбин и/или калциево съединение (CaCl_2 или калциев глюконат), но някои автори предпочитат да инжектират PRP в неактивирана форма, разчитайки на спонтанно активиране на тромбоцити, настъпило в присъствие на естествения колаген в съединителната тъкан (46, 64, 78).

Няма консенсус за това дали е необходимо или не тромбоцитите да бъдат предварително активирани преди тяхното прилагане (171).

Наличието или отсъствието на тромбоцитни активатори, също както и видът на използвания активатор, е важен елемент за очаквания клиничен резултат. Екзогенен тромбоцитен активатор може да е необходим за генериране на съсирек при определени процедури, например в следекстракционните рани в устната кухина, докато ендогенното тромбоцитното активиране без използването на външен фактор на съсирване може да бъде идеално при други показания. Дефиниция за разликите между методите за активиране може да позволи подготовката на PRP да бъде оптимизирана чрез идентифициране на най-подходящата стратегия за всяка конкретна патология. По този начин е възможно получаване на персонализиран PRP продукт за различни клинични показания.

Ендогенно активиране: Ендогенното активиране на тромбоцитите се предизвиква от тъканния колаген, центрофугиране на тромбоцитите с висока центрофужна сила, а също и от игла, предизвикваща кървене по време на инжектиране на PRP. Ендогенното активиране има потенциал за по-бавно агрегиране на тромбоцитите и освобождаване на растежни фактори, като позволява на колагенът в тъканта да работи като активатор, осигуряващ естествен модел на освобождаване (39, 134).

Според DeLong и съавтори ендогенният колаген активира тромбоцитите също толкова ефективно, колкото и тромбин, без образуване на плътна фибринова матрица (76). Авторът твърди, че активирането от колаген тип I освобождава подобни нива на PDGF и VEGF и по-високи нива на TGF- β в сравнение с тромбиновото активиране. Активираните с колаген тромбоцити не образуват съсиреци *in vitro*, което предполага, че тромбоцитите и растежните фактори могат да мигрират далеч от мястото на инжектиране (44, 56, 76).

Екзогенно активиране: Екзогенното активиране води до бърза коагулация на тромбоцитите. Образуваните съсиреци се прилагат най-добре ръчно върху тъканите вместо чрез инжектиране. Те често могат да бъдат ситуирани на желаното място. Предложените ползи от предварително формирания съсирек включват способност за точно локализиране на повторното отдаване на растежен фактор. Множество автори считат, че предварително съсиреният PRP продукт притежава по-трайно освобождаване на растежни фактори, защото те се отделят бавно в период от няколко дни.

Тромбоцитни активатори

Тромбин

Тромбинът причинява бързо агрегиране на тромбоцитите. Бързото активиране може да доведе до прекомерно кондензиране на фибриновата матрица и значително свиване на съсиреците, водещо до намалена клетъчната миграция и включване на растежен фактор в сравнение с по-малко кондензираното физиологично активиране (7, 111, 123). Бързото активиране може също да доведе до намаляване на общото количество растежни фактори на място в тъканите с течение на времето. Тъй като употребата на говежди тромбин е свързан със значителен риск от имунологични странични ефекти и потенциален спад в нивата на TGF- β 1, неговото използване за производството на PRP е поставено под въпрос (76, 134).

Калций-съдържащо съединение

Калцият се добавя също екзогенно към PRP препаратата вместо говежди тромбин и може да доведе до образуването на по-малко кондензиран фибринов матрикс. Фибриновата матрица може да осигури механизъм за улавяне на тромбоцитите, което води до по-малки количества от образуването на тромбин ендогенно. Това позволява по-бавно освобождаване на растежни фактори за 7-дневен период, което може да засили клетъчната миграция и лечебен процес (26, 50, 111). Инжекции, съдържащи калциев хлорид, имат ниско рН и причиняват значителна болка и усещане за парене на пациента.

Калциев хлорид плюс тромбин

Калциевият хлорид е цитратен инхибитор и позволява на плазмата да коагулира. Тромбинът кара фибрина да полимеризира в неразтворим гел; след това тромбоцитите се дегранулират и освобождават растежни фактори (130). Комбинацията от калциев хлорид, тромбин и PRP води до образуване на гелоподобна матрица. Това може да предложи предимството за по-бавно във времето освобождаване на растежните фактори. (76)

Колаген тип I

Установено е, че ендогенният колаген тип I е също толкова ефективен, колкото и тромбинът като тромбоцитен активатор и стимулатор за освобождаването на растежни фактори. Ин витро изследване с включени активатори говежди тромбин и колаген тип I показва освобождаване на подобни нива на PDGF и VEGF, но с по-продължително освобождаване на TGF- β в пробите от PRP, активирани с колаген спрямо тромбин. В

допълнение, както тип I колаген, така и говежди тромбин стимулира подобно освобождаване на PDGF и VEGF между 1 и 10 ден, докато тромбинът води до по-голямо освобождаване на TGF – между 1-ви и 5-и ден, от първи до десети ден и по-високи нива на TGF- β в сравнение с тромбиновото активиране (118).

Заключение

Литературният обзор показва, че богатата на тромбоцити плазма може да бъде прилагана в много области на общата и денталната медицина. Автоложният тромбоцитен концентрат, ендо- или екзогенно активиран, проявява своя стимулиращ ефект при оздравителните процеси в човешкия организъм; оказва влияние и подобрява репарационните процеси, както на меките, така и на твърдите костни тъкани, профилактира появата на локални следоперативни усложнения. Заедно с тези данни става ясно, че е налице липса на стандартизация по отношение протоколите на изготвяне, класификациите, които се използват в практиката, както и параметрите на получените продукти от обогатена плазма. Изборът на конкретен продукт се пада на клинициста, в зависимост от конкретните нужди на изявената патология.

По-горе изложените факти показват в някои клинични случаи протрахираното протичане на костния и мекотъканен оздравителен процес. Устната кухина е една от областите, където оперативните дентални интервенции, в т.ч. следекстракционните рани особено на долните трети моларни зъби, изискват повишено внимание по отношение на тъканното възстановяване. При здрави организми остеогенезата и зреенето на цикатрикса продължава от 6 месеца до 1 година след оперативната интервенция. При компрометирани пациенти, с налични придружаващи заболявания, тези процеси са протрахираны и окончателното оздравяване настъпва много по-късно. Това означава забавено привеждане във функция на увредената тъкан или орган, което не отговаря на съвременните нужди на днешния пациент. Прилагането на тромбоцитен концентрат обаче, стимулира и ускорява тъканното възстановяване, води до превенция на евентуални усложнения, респективно скъсява времето за постигане на функционална годност на увредените тъкани. Тази методология осигурява необходимото качество на живот при денталния пациент, което е свързано с възстановяване функциите на устната кухина след оперативна интервенция, да бъде постигнато своевременно.

Изводи

1. Проблемът с регенерацията на челюстните кости и заобикалящите ги меки тъкани засяга голяма част от разнообразната патология, обект на оралната хирургия, изискващ оперативна намеса. Той е в пряка зависимост от максимално бързото и пълноценно възстановяване на пациентите, преминали през хирургична интервенция в устната кухина и тяхното връщане към рутинните им ежедневни дейности.
2. Всеки орален и лицево-челюстен хирург се очаква да бъде запознат с процеса на нормалното костно възстановяване и различните техники и методи за подобряването му, в т.ч. с алгоритъма за приложение на различни видове тромбоцитни концентрати..
3. Съвременната орална хирургия е представена от предпротетични, пародонтални, предимплатни процедури и дентална имплантология, осигуряващи по-добро дентално здраве за по-кратки срокове на пациента, чрез прилагане на биологични субстрати, в т.ч. тромбоцитни концентрати.
4. Прилагането на богата на тромбоцити плазма е световно възприета съвременна практика, която допълва използваните досега лечебни методи при наличие на костни и мекотъканни дефекти, както в общата медицина, така и в оралната хирургия.
5. Познаването на усложненията при протичане на оздравителните процеси в устната кухина при здрави пациенти и такива с придружаващи заболявания, очакваната им честота и рисковите фактори за възникването им, спомага за свеждането им до минимум, чрез използване на ТК.
6. Добавянето на тромбоцитен концентрат в костни и мекотъканни дефекти води до стимулиране на тъканната регенерация при клинично здравите пациенти и профилактира развитие на усложнения при рискови пациенти.
7. Ефектът на ТК се дължи на съдържащите се в тромбоцитите 7 растежни фактори, които се активират и освобождават при процеса на кръвосъсирване. Тяхната концентрация в плазмата, в сравнение с общата кръв, е увеличена от 3 до 5 пъти.

Направената от нас литературна справка ни провокира да проведем научно изследване върху най-често срещаната оперативна интервенция в устната кухина, обект на денталната хирургия и нашата ежедневна дейност - одонтектomia на трети долен молар. Оздравителният процес е деликатен, с протрахирано протичане понякога и с повишена честота на поява на усложнения. Той може да бъде стимулиран чрез прилагане на ТК. В настоящия труд ние използваме установените и национално стандартизирани четири нови протоколи за получаване на PRP продукти по Иванова и сътрудници (2021г.), които след количествено и качествено анализиране в тяхна научна разработка, доказват търсената от нас ефективност *in vivo* (3). Прилагайки методологията с БТП, получена по тези нови протоколи в следекстракционните дефекти на отстранени долни мъдреци, ние постигахме търсената цел – ускорено качествено възстановяване на рутинния дневен ритъм на нашите пациенти.

III. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, ХИПОТЕЗА

Цел

Да бъдат представени клинични резултати в постекстракционни участъци след оперативно отстраняване на долни трети моларни зъби, при използване на нови, национално стандартизирани четири протокола за извличане на тромбоцитни концентрати от цяла прясна автоложна кръв.

Задачи

За изпълнението на целта са поставени следните задачи:

1. Да се направи обобщен анализ на обективните и субективни симптоми, свързани с оздравителния процес, след оперативно отстраняване на долни трети моларни зъби.
2. Да се анализират ранните ефекти на въздействие на богатата на тромбоцити плазма в постекстракционните рани след хирургична одонтоектомия.
3. Да бъде оценено и дискутирано влиянието на тромбоцитния концентрат в следекстракционните зъбни дефекти върху костното зарастване.
4. Въз основа на използваните 4 нови протокола за добиване на богата на тромбоцити плазма, да се направи сравнение на базата на следоперативните клинични резултати.
5. Да се определи има ли протокол от новата генерация с абсолютно биологично значение на растежните тромбоцитни фактори върху ранните и по-късни постоперативни клинични симптоми след хирургична екстракция на трети долни моларни зъби.
6. Въз основа на проведеното проучване да се даде обективна оценка за терапевтичната стойност на методологията с прилагане на тромбоцитен концентрат в следекстракционни зъбни алвеоли.
7. Да се създаде диагностично-лечебен алгоритъм сред военнослужещите, при който използването на ТК след екстракция на долни трети моларни зъби да осигури стимулиране и ускоряване зарастването на оперативната рана и връщане към ежедневната работна натовареност в по-кратки срокове.

Работна хипотеза

Стандартизираните за страната ни нови четири протокола за извличане на автоложни тромбоцитни концентрати, с количествените колебания на кръвните компоненти в тях, имат различна степен на въздействие върху оздравителния процес в постекстракционните участъци след одонтоектомия на долни трети молари. Това внася достатъчна яснота на клинициста относно необходимостта от прилагане на БТП и какъв метод за получаването ѝ да използва, според търсените клинични резултати.

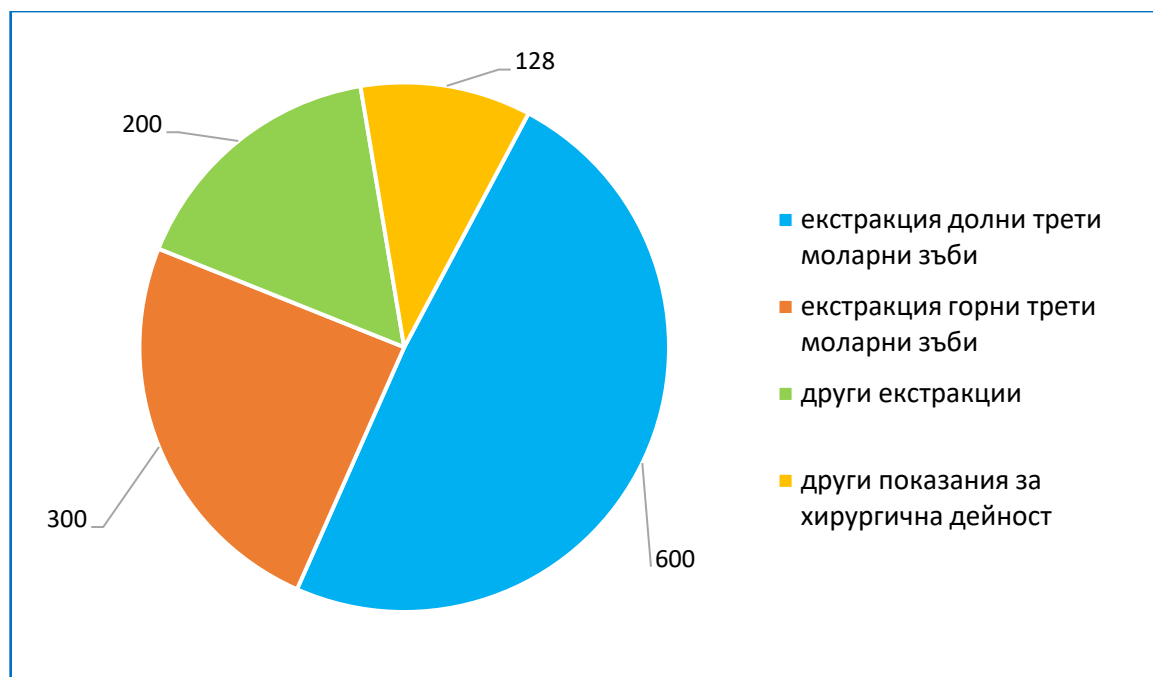
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

За постигане на поставената цел - да се представят клинични резултати в постекстракционни участъци след оперативно отстраняване на долни трети моларни зъби, при използване на тромбоцитни концентрати, получени по нови протоколи чрез извличане от цяла прясна автоложна кръв, се използва кръв от здрави донори – пациенти, нуждаещи се от хирургична екстракция на долни трети моларни зъби – хора с тяхното информирано съгласие и знание. Научното изследване е с разрешение от Комисията по етика на научните изследвания към МУ-Варна (125/26.01.2023).

Проучването е съчетано. Ретроспективно то обхваща 1 278 пациенти, преминали през стационара на Отделението по орална хирургия при ВМА – гр. София за периода: месец януари 2020 година – месец март 2023 година, на които са извършени хирургични процедури в устната кухина.

От проведената ретроспекция и анализ на „История на заболяването“ на пациента, се установява, че най-голям дял от оперираните болни в нашето отделение се пада на хирургично отстранените долни трети моларни зъби. Останалата хирургична активност се разпределя между на екстракцията на горни трети моларни зъби, кистектомии, отстраняване чрез костна трепанация на други зъби и зъбни корени, хирургично лечение на пародонтални заболявания, както и операции по ортодонтски, протетични и предимплантационни показания.



Фиг. 2. Разпределение на пациентите според вида хирургична дейност, по показания за необходимост.

Според данните от фиг. 2, ние решихме в проспективното проучване да включим пациенти, подложени на хирургична екстракция на долни трети молари. Те бяха разделени в няколко групи, според прилагане, интраоперативно, на автоложен тромбоцитен концентрат, извлечен по нови протоколи.

Проспективно, настоящото проучване обхваща общо 150 пациенти с екстрахирани долни мъдречи за периода октомври 2022 г. – март 2023 г., в резултат на различни причини – фоликуларна или пародонтална зъбна киста, кератокиста, екзацербирал периапикален процес или усложнен кариес.

Всички пациенти, участващи в проучването са военносслужещи от различни подразделения в системата на Министерство на отбраната, лекувани в стационара на нашето Отделение по орална хирургия.

Участниците са разделени в пет групи по 30 човека. При първата група не се използва ТК, докато в останалите четири групи се направи разпределяне относно протокола на извличане на ТК, който се приложи в следекстракционните костни дефекти, получен по четири различни нови метода.

Методи

За разработване на темата и изпълнение на целта и задачите, които си поставихме, използвахме следните методи.

1. Диагностични методи

Използват се методите на общата медицина, като се прилагат и специфични за областта. Целта на клиничното изследване е поставяне на точна диагноза, избор на най-добрия за съответния болен хирургичен метод за лечение и разработване на стратегия за последващо наблюдение.

1.1. Анамнеза

Анамнезата има за цел да представи сбор от сведения, получени при разпита на пациента и да изясни не само проблемите, свързани с конкретните му оплаквания (anamnesis morbi), но и да установи евентуални придружаващи заболявания, които могат да окажат отрицателно влияние върху оперативната намеса, прием на медикаменти, минали оперативни интервенции, алергични епизоди.

1.2. Физикално изследване

1.2.1. Status praesens generalis

1.2.2. Status praesens specificans

а) Екстраорален оглед – обръща се внимание на подутини по шията и лицето; установява се наличието или липсата на асиметрия; извършва се палпация с оглед установяване болезненост, размери, граници, повърхност, консистенция, състояние на околните тъкани, температура, флукуация.

б) Интраорален оглед – първо се определя обемът на отваряне и затваряне на устата. Тя нормално се отваря от 4 до 6 см. Ограниченията в отварянето се обозначават с тризмус, I степен (отваря 3 см), тризмус II степен (отваря до 2 см) и тризмус III степен (отваря по – малко от 1 см). Те са свързани с травма или възпаление на зъбите и/или челюстите. Измерването се извършва при режещите ръбове между централните резци на челюстите. Следва оглед на съзъбието и оклузо-артикуляционните съотношения. Съзъбието се

оглежда за вид на захапката (прикус) и състояние на отделните зъби (брой, цвят, положение в зъбната дъга, наличие на зъбен камък, кариес). Различаваме физиологичен (ортогнатичен) и патологичен (дълбок, открит, рѐбцов, прогения, прогнатия) прикус. При патологичен прикус са налице нарушения във функциите на дѐвчене и говор, както и промени във външния вид. Изследването продължава с цялостен оглед и палпация на лигавицата на вестибулума, гингивата, пода на устната кухина, бузите, небцето, езика. Следва перкусия – хоризонтална или вертикална на отделни зъби. Изследването чрез натиск с два инструмента (дентална сонда и огледало) се прилага за установяване на зъбна подвижност. Тя се определя в три степени: I степен – подвижност в медиодистална или вестибулоорална посоки по-малка от 1 мм; II степен – подвижност в медиодистална или вестибулоорална посоки по-голяма от 1 мм; III степен – подвижност в хоризонтална и вертикална посока. При диагностика на денталните заболявания се прилага и сондиране с дентална сонда, като се търси дефект по твърдите зъбни тъкани или се установява величината на пародонталните джобове. Поставянето на прецизна клинична диагноза, която по своята същност е предварителна спомага, за определяне по нататъшния лечебен алгоритъм.

1.3. Параклинични изследвания

1.3.1. Лабораторни показатели на кръвта

При заболявания на зъбите, околозъбните тъкани и на челюстните кости, може да настъпят промени в хематологичните показатели. За нуждите на нашето проучване е необходимо те да бъдат в границите на референтните си стойности. Става въпрос за количеството на формените елементи на кръвта – тромбоцити ($150-450 \times 10^9/\text{л}$), еритроцити ($4,2-6,2 \times 10^{12}/\text{л}$), левкоцити ($3,5-10,5 \times 10^9/\text{л}$) с диференциално броене, СУЕ (11-20 мм/ч), хемоглобин (120-160 г/л), време кървене (2-5 мин.) и съсирване (5-10 мин.), фибриноген (2-4 г/л), INR (International Normal Ratio – 0,9-1,2), кръвна захар (2,75-5,55 ммол/л).

От изключителна важност са нормалните стойности на тромбоцитите, изследвани в прясната цяла кръв, чиито ефект по отношение ускоряване на оздравителните процеси е в основата на нашите клинични опити. Друг важен показател е стойността на фибриногена, чието увеличаване може да бъде белег на заболяване на периферните

кръвоносни съдове и повишен риск от венозна тромбоза, което е неблагоприятно за нашето изследване. От особено значение за нас като орални хирурзи, извършващи проучването е и стойността на протромбиновия индекс (INR). Неговата норма е оценка на външния коагулационен път, особено при лечение с индиректни антикоагуланти. Необходимо е той да е в референтните си граници, което е белег за нормално протичане на кръвосъсирващите процеси в един организъм. Именно инициалната, неусложнена и незабавена хемостаза е фактор за проява на търсения в този дисертационен труд стимулиращ тъканната регенерацията ефект на тромбоцитния концентрат, поставен в оперативните рани.

1.3.2. Рентгенови методи

В ежедневната практика за диагностика на заболяванията на зъбите и околозъбните тъкани най-често се прилагат сегментната прицелна рентгенография и панорамната рентгенография. По-рядко се използва рентгенографията в захапка.

При диагностика на заболяванията на челюстните кости се използват обзорна рентгенография – анфас и профил и компютърната томография (СТ) без контрастно усилване, която дава триизмерен реален образ в милиметри за разпространението на патологичния процес в трите равнини.

На пациентите в нашето проучване им бяха направени пред- и следоперативни ортопантомографии, на 3-ти и 6-ти постоперативен месец. Целта им е установяване на клиничната патология, наличие на долен мъдрец изискващ хирургична екстракция – обект на настоящия труд, както и за анализ на следоперативните резултати, свързани с костното възстановяване в следекстракционните рани в наблюдаваните пет изследвани групи според прилагането на ТК.

2. Методи за получаване на богата на тромбоцити плазма

За практическото изпълнение на заложените задачи в дисертационния труд се използват следните лабораторни консумативи: първият – вакутейнер 8 мл със сепариращ биосъвместим инертен гел (циклоалифатен полимерен гел), съставен от смес от полимери за плазмено разделяне (елиминиращи червените кръвни клетки), вторият вид – моновета 8 мл (S-Monovette, Sarstedt) без наличие на сепариращ гел. Всеки вакутейнер

и моновета съдържат антикоагулант 3,2% тринатриев цитрат. Симетрично разположение на изпитваните епруветки и калибрирането на тежестта са задължителен елемент преди центрофугирането.

Венозната кръв се изтегля от всеки пациент в удобно положение, при спазване на условията за стерилност и добрата лабораторна практика. Венепункцията се извършва с игла с размер 22G, за да се избегне преждевременното активиране на тромбоцитите. Количеството изтеглена от всеки един участник кръв е около 10 мл. Тя се разпределя във вакутейнери и моновети с антикоагулант тринатриев цитрат за всеки пациент от четирите експериментални групи и се подлага на обработка по четири експериментални метода. Всяка кръвна единица е обработена в рамките на до 2 часа от нейното изтегляне. За нуждите на научното изследване е използвана малка настолна лабораторна центрофуга DM 0412 на SCIOLOGEX като ъгълът на въртене на пробите в ротора е 32° (сн.1а,б). Тя притежава гнездо за 12 обикновени или вакумни епруветки (7/15 мл), ъглов ротор, функция за импулсно центрофугиране, регулиране на оборотите (RPM) и центрофужната сила на въртене (RCF), таймер в минути, защитно изключване при нарушен баланс, функция на старт – стопен режим и защитно антикорозивно покритие от химикали и механични повреди. Симетрично разположение на изпитваните епруветки и калибрирането на тежестта са задължителен елемент преди центрофугирането.


Ефективната сепарация и необходимата висока концентрация от жизнени биоактивни тромбоцити са продукт на гравитационните центробежни сили за определено време, обикновено измерено в минути, при работа на центрофугата с поставените в нея пълни с цяла кръв епруветки. Използват се различни методи, относно брой пъти на центрофугиране на кръвта, както и различно време в минути и различни оборотите за центрофугиране. Ние, основавайки се на разработката на Иванова и сътр., използвахме и въведохме в нашата клинична практика следните нови протоколи за получаване на богата на тромбоцити плазма.



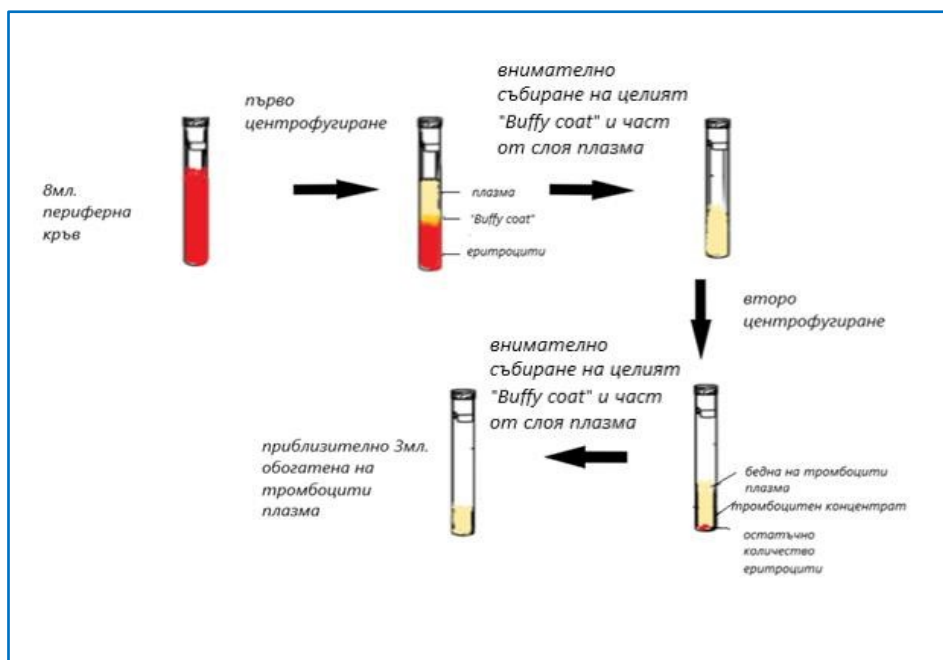
Сн.1а, б. Лабораторна работна центрофуга.

Първият протокол на обработка на кръвта включва единично центрофугиране на моновета без гел, при стайна температура с центрофужна сила 1500xg за 10 мин. Вторият метод е при същите условия на единично центрофугиране с центрофужна сила 1500xg за 10 мин, но с използване на вакутейнер със сепариращ гел. Третият протокол включва процес на двойно центрофугиране на моновета без гел. Първото въртене (разделително) е с центрофужна сила 1150xg за 10 мин, второто – концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин. Четвъртият метод подлага на обработка 8 мл кръв във вакутейнер със сепариращ гел в условия, както при метод три – първо въртене с центрофужна сила 1150xg за 10 мин и второ концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин (табл. 4).

Таблица 4. Протоколи за получаване на PRP по четири различни метода (Иванова и сътр.).

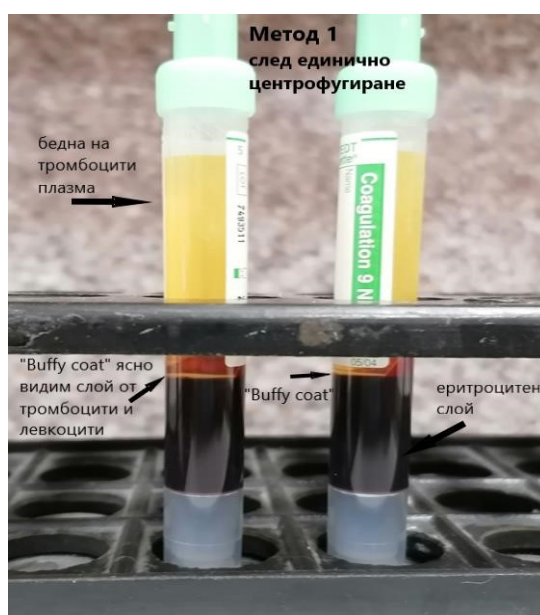
Методи		Сепариращо въртене		Концентриращо въртене	
		Центрофужна сила (g)	Време (мин)	Центрофужна сила (g)	Време (мин)
1	 без гел	1500	10		
2	 с гел	1500	10		
3	 без гел	1150	10	350	5
4	 с гел	1150	10	350	5

И при четирите метода кръвта се подлага на центрофугиране при стайна температура 20–22°C. Работните стъпки за добив на обогатена с тромбоцити плазма се причисляват към т.нар. „buffy coat“ техника, а именно първото въртене е с високи стойности на RCF (Relative centrifugal force) – относителна центробежна сила. След първото сепариращо въртене и при четирите метода се образуват три видими слоя: най-долният, богат на червени кръвни клетки; среден, богат на тромбоцити и бели кръвни клетки – т.нар. „buffy coat“; най-горен – беден на тромбоцити слой (platelet poor plasma – PPP) (фиг. 3).



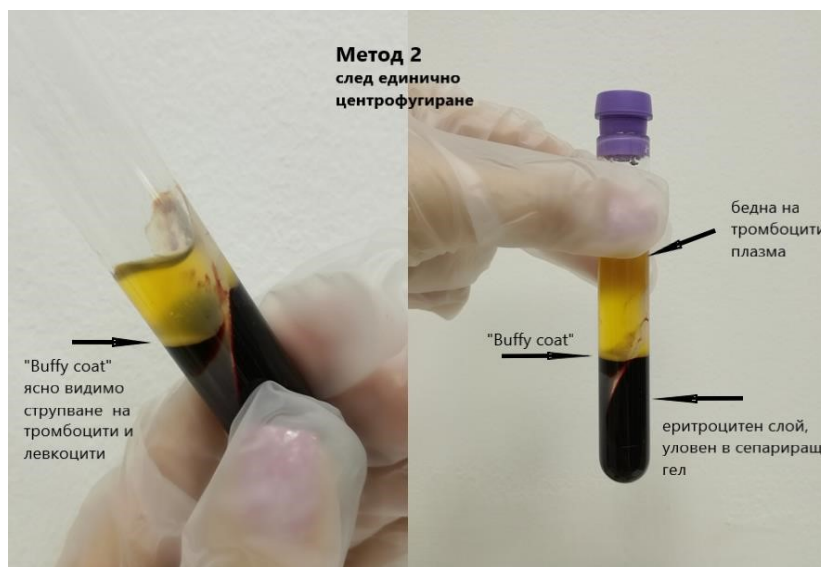
Фиг. 3. Схематично представяне на етапите в производството на PRP чрез техниката „Buffy coat“ (Иванова и сътр.).

При метод 1 и 2 – единично центрофугиране, отстраняване част от повърхностния беден на тромбоцити слой (PPP). При протокол 1 внимателно отпипетирваме 3 мл от останалия над еритроцитите продукт за последващо активиране и прилагане при експериментална група 1 (сн.2).



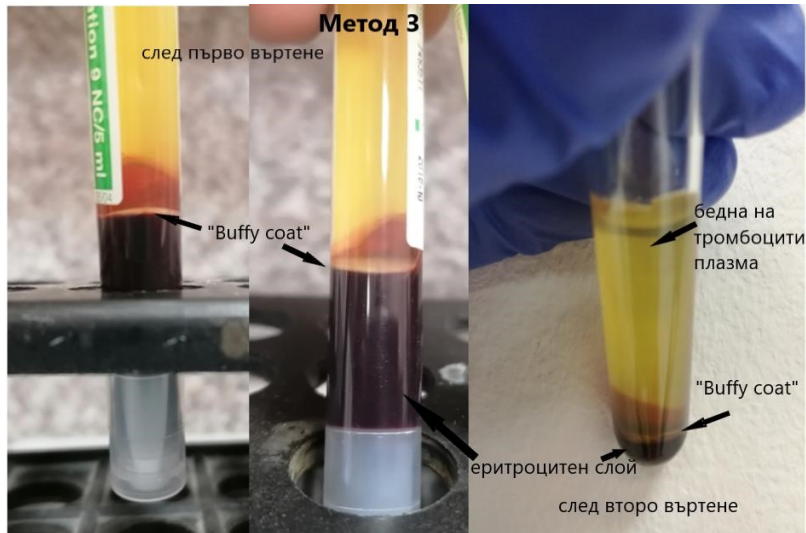
Сн.2.. Протокол 1 – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки без сепариращ гел (Иванова и сътр.).

При метод 2 – част от останалата плазма (PPP) в епруветката се аспирира и връща с цел да се „отлепи“ полепналият слой клетки върху сепариращия гел. След „отмиването“ на полепналите клетки от гела аспирираме продукта (също с обем 3 мл) за прилагането му при пациенти от експериментална група 2, след предшестващо екзогенно активиране. (сн.3).



Сн.3. Протокол 2 – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки със сепариращ гел (Иванова и сътр.).

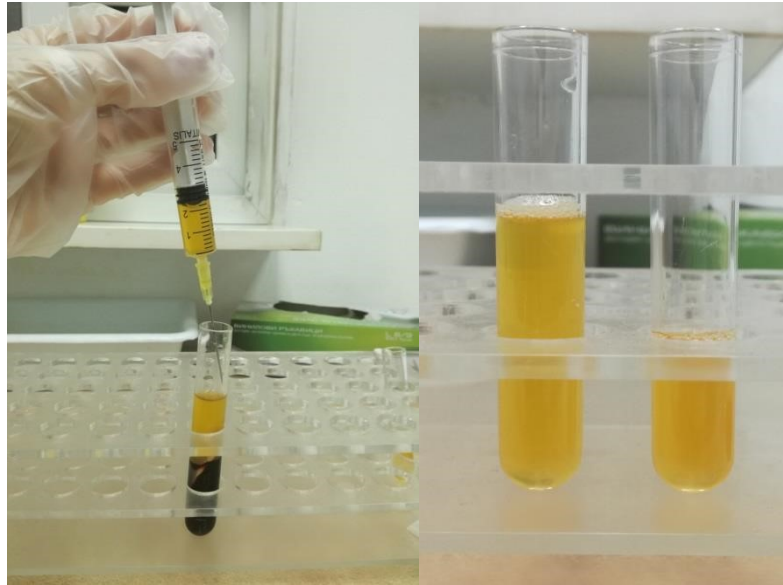
При протокол 3 и 4 средният слой и по-голямата част от бедната на тромбоцити плазма (PPP) внимателно се отпипетирват и се пренасят в нова епруветка вече без наличие на антикоагулант за последващо второ концентрационно центрофугиране. След второто центрофугиране се отчита малък брой еритроцити, утаени в долната част на епруветката, тромбоцитен концентрат над него и отново слой бедна на тромбоцити плазма най-отгоре (сн.4, сн.5). Внимателно аспирираме част от повърхностния слой – бедната на тромбоцити плазма, който се елиминира. Останалото количество плазма (с обем 3 мл) се евакуира с пипета, за да може да се улови максимално тромбоцитния концентрат, като полученият продукт се прилага, постекстракционно при пациенти от експериментална група 3 и 4 (сн.6).



Сн.4. Протокол 3 – ясно видими тромбоцитно-левкоцитни слоеве след първо и второ центрофугиране (Иванова и сътр.).

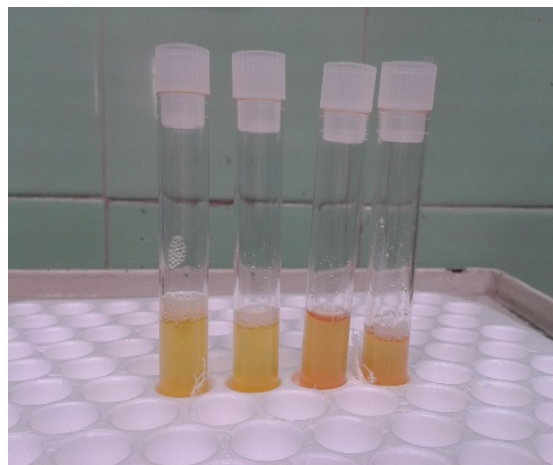


Сн.5. Протокол 4, етап I – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки със сепариращ гел (Иванова и сътр.).



Сн.6. (ляво) Премахване на горния слой бедна на тромбоцити плазма (дясно). Получено количество PPP и PRP от всяка изследвана проба.

Като краен продукт във всеки вакутейнер и моновета, след всеки един от четирите протокола е налице 3 мл PRP обем, който бива прехвърлен за последваща екзогенна активация (сн.7).



Сн. 7. Некоагулиран БТТ обем за последваща екзогенна активация.

Така извлечената богата на тромбоцити плазма е в некоагулирано състояние и остава в такова, докато не се инициира процесът на кръвосъсирване, при който тромбоцитите отделят гранулите си с растежни фактори и така стимулират оздравителните процеси в оперативното поле. Биоактивността и жизнеспособността на тромбоцитния концентрат се запазват за 8 часа при стайна температура. Това дава възможност той да се използва в клинични случаи, изискващи продължителни хирургични интервенции или такива, при които оперативната процедура трябва да се отложи с няколко часа. Препоръчително е БТП да остане антикоагулирана до момента, в който тя трябва да се постави в оперативната рана. Не се практикува поставянето ѝ в хладилник или нейното замразяване, защото по този начин се предизвиква разрушаване на тромбоцитната мембрана и компрометиране действието на растежните фактори.

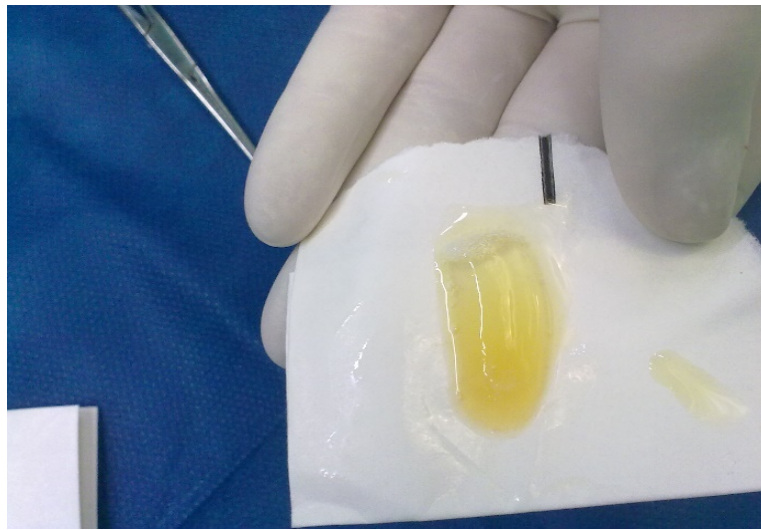
За екзогенен активатор избираме калциев глюконат (Calcium gluconicum amp. 10%) (сн.8). В епруветка без антикоагулант поставяме добитата плазма, която смесваме с 1мл калциев глюконат, т.е. в съотношение 3:1.



Сн.8. Некоагулиран обем БТП и екзогенен активатор калциев глюконат.

Хомогенизираме сместа и оставяме в покой при стайна температура за 20 мин. При прилагането на активирания тромбоцитен концентрат след екстракцията на един зъб, установихме, че се нуждаем от около 4 милилитра количество, което извличаме чрез по-горе изложените протоколи от 8 мл автоложна венозна цяла кръв. В хода на нашето проучване, установихме, че така полученият активиран биологичен продукт е с

изключително подходяща гелоподобна консистенция за аплициране в постекстракционните рани на пациентите (сн. 9, 10).



Сн.9. Краен биологичен продукт – ТК, прилаган е постекстракционните зъбни алвеоли.



Сн.10. Интраоперативно аплициране на ТК след екстракция на долен трети моларен зъб.

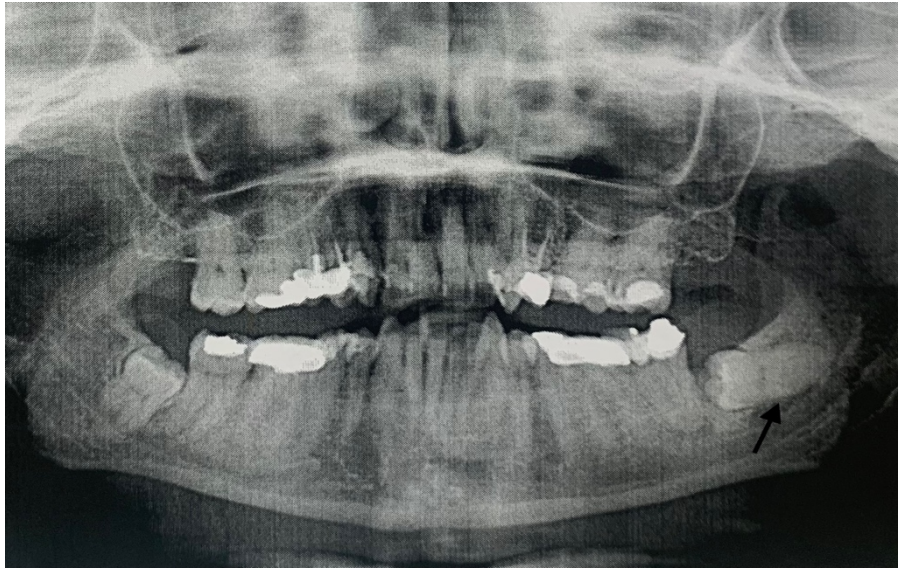
3. Хирургични методи

Екстракция на ретинирани или полуретинирани долни трети молари

В настоящото проучване приложихме конвенционална хирургична екстракция на долни трети моларни зъби, един от основните оперативни методи в областта на оралната хирургия.

Тази оперативна процедура, независимо от етиологичните фактори довели до необходимостта ѝ, обикновено е свързана с по-продължителен и утежнено протичащ оздравителен процес, както и с различни усложнения (счупване на долната челюст, възпалителни и др.), в сравнение с екстракцията на останалите зъби.

Ретинираният или полуретинираният долен мъдрец е покрит с различно количество кост (сн.11). Той, в зависимост от позицията на дългата му ос спрямо втори долен молар, бива в медиално, дистално, букално, хоризонтално, лингвално, вертикално или обърнат в обратно положение (Winter,G.B.,1926; Archer, W.H., 1975; Kruger, E., 1984). В зависимостта от дълбочината на ретенцията и разстоянието между втори молар и клоната на челюстта, съществуват различни класификации – по Pell – Gregory, по Archer - Kruger . Във всички тези случаи е необходимо да се проведе хирургична екстракция, под местна или обща анестезия. Тя започва с отпрепарирането на триъгълно или пликкообразно муко-периостално ламбо, като с разпаториум се открива короната и се премахва костта над и/или около нея. Това се постига с отнемаща костна фреза или с кръгъл борер се маркира големината на костния прозорец, с фисурен борер се съединяват перфорационните отвърстия и се отстранява покриващата короната кост. След като тя се освободи, се пристъпва към екстракцията на зъба.



Сн.11. Импактиран долен ляв трети моларен зъб.

Когато долният мъдрец е разположен дълбоко вертикално, медио-ангуларно, медио-дистално или хоризонтално, екстракцията се извършва чрез издлетяване и премахване на краниално и вестибуларно разположената около зъба кост. При медио-ангуларно, дисто-ангуларно или хоризонтално разположение на долния мъдрец и плътен контакт на дъвкательната повърхност на короната му с корените и шийката на втория молар, за да не се отстранява излишно здрава кост, се прави срязване и отделяне на короната от корените, като се вадят по отделно. Следва обработка на костната рана – кюретаж, заглаждане на неравни костни ръбове, адаптиране и зашиване на муко-периосталното ламбо. В голяма част от клиничните случаи, мъдреците са свързани с фоликуларна или пародонтална киста, които се екстирпират преди зашиване на раната.

Въпреки подобряването на хирургичната техника във времето, въвеждането на авангардни ултразвукови и други нови поколения костни бормащини, въпреки използването на системно антибиотици, приложени дори и интраалвеларно, хирургията на трети долен молар се свързва с две основни добре познати следоперативни усложнения. Първото е алвеоларният остейт, често познат като сух алвеолит, чиято честота на поява достига 18% (14, 26, 35). На второ място е редуцираната костна регенерация в областта на долния мъдрец, особено в непосредствена близост до втория долен молар, което води до задържане на храна и формиране на патологичен пародонтален джоб (156, 178). Множество проучвания (Babbush, Mancuso et al) през последното десетилетие демонстрират значителното влияние на БТП, поставена интраалвеоларно, което намалява честотата на сухия алвеолит и стимулира костното

възстановяване. Така познатите основни усложнения при хирургията на трети долен молар биват редуцирани, като се наблюдава превенция от патологични състояния, свързани с дисталната повърхност на втория молар (190, 192).

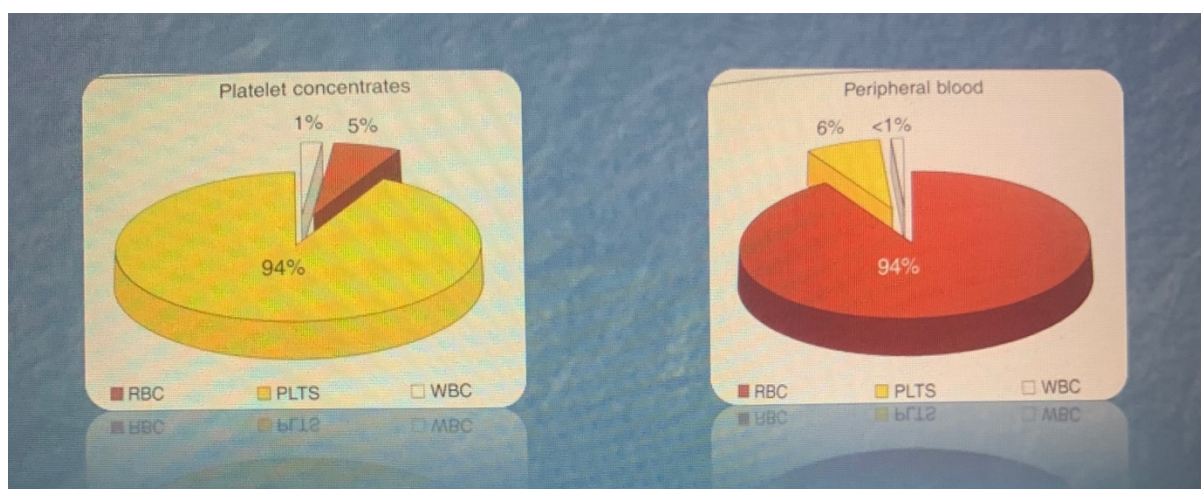
Алвеоларният остейт е първично замърсяване на кръвния коагулум, от който бактериите преминават и колонизират костните стени на алвеолата. Такъв е механизмът на провокиране на възпаление, водещ до намалена костна регенерация в алвеолата на долния мъдрец. Възпалението обяснява следоперативната болка, а разграждането на кръвния съсирек и бактериалната колонизация – лошият дъх и вкус, свързани със състоянието. Това, което отличава алвеоларния остейт от истинския остеомиелит е фактът, че бактериите не нахлуват в костномозъчните пространства на долната челюст. В редки случаи, особено при имунокомпрометирани пациенти или възрастни пациенти с редица системни придружаващи заболявания, алвеоларният остейт прогресира в различни състояния на остеомиелит.

Когато алвеоларният остейт се развива и персистира, фокусът на пациента и хирургът е справяне с болевия симптом и превенция развитието на остеомиелит. Локални промивки на следекстракционната алвеола, аплициране на различни противовъзпалителни и антибактериални медикаменти в нея и понякога назначаването на системни антибиотици, води до отстраняване на усложненията в рамките на седмица. Раната се запълва с грануляционна тъкан, епител от гингивата по съседство мигрира по повърхността и затваря следекстракционния дефект. Костта бавно се регенерира чрез миграция през грануляционната тъкан (остеокондукция) на остеоцити от костните стени на алвеолата. Въпреки това, в екстракционните рани, усложнени и развили остейт, настъпва редукция на костната височина и отсъствие на кост по задната повърхност на дисталния корен на втория молар. Последствията са кариес на корена и неразрешим периодонтит. Намаленото количество кост в алвеолата на мъдреца е пряк резултат от загубата на кръвния съсирек и растежните фактори, секретирани от тромбоцитите в него, както и от загубата на фибрин-фибронектин-витронектин адхезионни молекули, които нормално стимулират остеокондукцията чрез остеопрогениторните клетки от костните стени.

Съществуват редица научно документирани доказателства за значително намаляване на клиничните симптоми при суха алвеола, при третиране на алвеолата с богата на тромбоцити плазма до четири пъти. Нашата работна хипотеза цели да потвърди тези

данни и да осигури превенция на пациентите, нуждаещи се от хирургия на трети долен молар, от развитие на алвеоларен остейт и увреда на втория долен молар.

Механизмът, по който БТП предпазва от алвеоларен остейт и води до увеличаване на костната регенерация се дискутира и към този момент. Има се предвид, че съотношението на формените елементи в обикновения кръвен коагулум и тромбоцитния съсирек се различават съществено (сн.12). PRP-съсирека е представен от 94% тромбоцити, 5% червени кръвни клетки (еритроцити) и 1% бели кръвни клетки (левкоцити), докато нормалният кръвен съсирек съдържа 94% еритроцити, 1% левкоцити и само 6% тромбоцити.



Сн.12. Съотношение на кръвните клетки в PRP-съсирека и нормалния съсирек (R.Marx, A.Garg).

От друга страна PRP-съсирекът има стойности на рН 6.5-6.7 срещу рН 7.4 на нормалния съсирек, чиито ефект е инхибиране на бактериалния растеж. По-ниските стойности на рН в БТП е резултат от антикоагуланта във вакутейнерите (натриев цитрат). Освен това съдържанието на бели кръвни клетки, имащи противовъзпалителен ефект, особено в зависимост от протокола за добив на ТК, е също по-голямо в PRP-съсирека. Прилагането интраалвеоларно на БТП води и до по-бързо развитие на грануляционна тъкан с ранно формиране на кръвни капиляри, инхибиращи бактериалния растеж. Обяснението е привеждане във функция на макрофаги и неутрофили, които са в повишено количество в PRP-съсирека, създаващи по-богата на кислород среда в алвеолата, потискаща развитие на анаеробни микроорганизми. Счита се, че основният факт, който обяснява лечебното действие на БТП, е повишената

концентрация на тромбоцити, отделяните от тях растежни фактори и клетъчните адхезионни молекули.

Обобщено, оралният хирург трябва да прецизира и подходи индивидуално във всеки клиничен случай, изискващ хирургия на трети долен молар, относно прилагането на тромбоцитен концентрат интраалвеоларно. Той намалява риска от развитие на алвеоларен остейт при пушачи, жени на противозачатъчна хормонална терапия, пациенти над 30-годишна възраст с история за чести пери- и паракоронити (възпаление на меките тъкани при затруднен пробив на долен мъдрец), пациенти на кортикостероидна терапия или претърпели химио- и/или лъчетерапия в устната кухина, пациенти с диабет I и II тип, както и пациенти с импактирани долни трети моларни зъби, при които се предполага по-голям травматизъм от обикновено. Ние включваме още една група с показания за прилагане на ТК и това са военнослужещи, чиито длъжности изискват лек възстановителен постоперативен период, без усложнения, за своевременно връщане към работния процес.

4. Методи за оценка на терапевтичния резултат

4.1 Рентгенологична оценка

За оценка на терапевтичния резултат от приложението на автоложна богата на тромбоцити плазма в костните рани бяха използвани образни методи – основно ортопантомограма (панорамна зъбна снимка на двете челюсти), направени на 3-ти и 6-ти следоперативен месец. С помощта на панорамните рентгенографии от Digital Transtomograph ProMax – Planmeca (64,0kV 7,0mA 15,8s 79,1mGy/cm²) се обективизираха и бяха сравнявани получените клинични резултати след прилагане на тромбоцитни концентрати като допълнение към стандартното оперативно лечение, получени по четири стандартизирани нови протоколи за извличане на БТП, с цел стимулиране оздравителните процеси в устната кухина, превенция на дискутираните усложнения и оптимално костно възстановяване. Използвахме субективна визуална оценка относно регенерираната костна структура по вид – плътна хомогенна структура, хетерогенна структура, кост с малко трабекули. При малка част от пациентите използвахме данните от СТ – изследване, относно плътността на възстановената кост следоперативно, след прилагане на БТП, в сравнение със случаите, в които такава не беше използвана. Причина за само няколко направени компютърни томографии с

апарат на Siemens Somatom III генерация е високата финансова стойност на изследването, което не всички пациенти, включени в този експеримент, можеха да си го позволят, а то не се реимбурсира от НЗОК. Използването основно на рентгеновата диагностика постоперативно пред КТ - резултатите за установяване ефектът на действие на БТП, се дължи и на следните факти. При зреене на костта, когато тя след оперативна намеса се е възстановила количествено и продължават единствено процесите на минерализация, увеличаването на минералния ѝ състав е свързано с трупане на мастна тъкан между костните ламели (193, 197, 203). Тя е с по-малка плътност от останалите меки тъкани и в скалата на Хаунсфийлд е поставена под 0-та, заемаща отрицателни стойности. Спонгиозната кост на СТ се оценява на около 130 Hounsfield units (HU), компактната - на над 250 HU, а мастната тъкан – около-65 HU. Така, поради изложеното по-горе, плътността на зрялата кост може да се визуализира в по-слаба степен, в сравнение с прясна оперативна костна рана, изпълнена с млада остеоидна тъкан. Затова постоперативната оценка на стимулиращия костната регенерация ефект на тромбоцитния концентрат чрез методите на КТ – изследването, не се приема със стопроцентова достоверност.

4.2. Анкетен метод

Анализ на получените резултати направихме и с помощта на анкетни карти, които пациентите попълниха една седмица след проведените хирургични процедури, като предварително им бяха дадени подробни обяснения и пояснения, относно отговорите на въпросите в тях.

4.3. Обективна оценка от орален хирург на Status lokalis intraoralis postoperativa

Степента на възстановяване на меките тъкани околоръстно на зъбите и челюстите в оперативното поле и тяхното обективно състояние също беше оценено чрез Индекс на заздравяване на Landry, както и наличие на следекстракционни усложнения съгласно критериите по Cheung. Това се реализира при контролния преглед от орални хирурзи една седмица след хирургичната интервенция и прибавено като метод за определяне терапевтичния ефект на представения биологичен субстрат (PRP) в този дисертационен труд.

4.4 Инструментални изследвания

С помощта на пародонтална зъбна сонда направихме инструментално измерване на 3-ти и 6-ти следоперативен месец във всички проучвани групи, като анализираниите критерии са чувствителност по дисталната коренова повърхност на втория долен молар, наличие на пародонтален джоб при дисталния корен на 7-ми зъб, както и задържане на храна поради евентуалното патологично състояние на тъканите в областта на отстранения долен мъдрец.

5. Статистически методи

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет SPSS 16.0.1. При извършване на статистическите анализи за критично ниво на значимост е прието 0,05.

Използвани методи:

Едномерни и двумерни разпределения с изчисляване на брой и относителен дял за категориите променливи, а за количествените - определяне на средна аритметична, медиана, мода, стандартно отклонение и 95% доверителен интервал (5,6).

Chi квадрат анализ.

Екзактен тест на Фишер за оценка на връзката между категориите променливи.

t-тест за определяне дали има значими разлики в две средни от две независими извадки.

Тест на Колмогоров-Смирнов за определяне дали разпределенията на количествените променливи се различават от нормалното разпределение.

За сравнението между резултатите са приложени тестовете на Уилкоксън (при три категории на сравняваната променлива) и МакНемар (при две категории).

Графичните изображения на изследваните променливи са представени във вид на хистограми и секторни диаграми (bar chart, pie chart).

V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Дизайн на проучването

Настоящото изследване представлява рандомизирано, контролирано и докладвано проучване с паралелни групи пациенти. От изминалите през нашето отделение пациенти за периода октомври. 2022 година – март 2023 година ние избрахме 150 военнослужещи показани за хирургия на трети долен молар, независимо от етиологичния фактор. Те бяха разделени в пет групи по 30 пациента – една контролна и четири експериментални. На пациентите във всяка от отделните четири експериментални групи беше прилагана БТП, в постекстракционния дефект, получена по четири различни протокола за извличане на тромбоцитен концентрат (Иванова и сътр.): експериментална група, подложени на хирургична екстракция на трети долен молар и приложен ТК, получен по метод 1; експериментална група с хирургична екстракция на трети долен молар и приложен ТК, получен по метод 2; експериментална група с хирургична екстракция на трети долен молар и приложен ТК, получен по метод 3; експериментална група с хирургична екстракция на трети долен молар и приложен ТК, получен по метод 4. На общо 120 пациента ние приложихме в допълнение към хирургичното им лечение автоложна, богата на тромбоцити плазма, за да изпълним поставената от нас цел на дисертационния труд.

При подбора на пациентите ние оформихме критерии и условия за включване и изключване от проучването, на които оперираните пациенти трябваше да отговарят. Това са изискванията за участие в изследването:

- Здрави мъже и жени на възраст 18 и повече години;
- Пациенти с доказуема нужда от оперативно отстраняване на долен мъдрец, които ще бъдат подложени на локална или обща анестезия.

На военнослужещите, които бяха готови да ни сътрудничат и отговаряха на изискванията, свързани с протокола на проучването, им бе предоставено да попълнят писмено подходящо информирано съгласие, след подробно обяснение от страна на медицинския ни екип.

Пациенти, отговарящи на един или някои от следните критерии, не бяха допуснати до изследването:

- Придружаващо заболяване – синдром на тромбоцитна дисфункция или критична тромбоцитопения;
- Съпътстващо лечение с нестероидни противовъзпалителни средства, включително и аспирин, антибиотици, системни кортикостероиди, антикоагуланти или имunosупресивни средства;
- Захарен диабет;
- Сърдечно – съдови заболявания, включително анамнеза за ревматична треска или други състояния, изискващи антибиоточна профилактика;
- Неоплазия или злокачествени хематологични заболявания;
- Бъбречни, чернодробни или ендокринни заболявания;
- Метаболитно костно заболяване като остеомалация, хипокалциемия или хиперкалциемия;
- Бременност и кърмене;
- Прием на алкохол над 50 мл/ден; тютюнопушене – над 10 цигари, дневно;
- Участие в друго проучване.

Участващите в нашите 5 прицелни групи пациенти бяха първично прегледани в диагностично-консултативния кабинет на Отделението по орална хирургия при ВМА, гр. София. Беше им предоставена информацията относно целта на проучването и им се даде достатъчно време, за да преценят желанието си за участие. След това те бяха приети планирано в ООХ.

Предоперативно се направи рентгенографска проверка, изразяваща се в необходимостта от налични панорамни или прицелни, сегментни рентгенографии. Те определиха причината за приложението оперативен метод, например: усложнен кариес, локализиран или генерализиран пародонтит, пери- и паракоронарит, ортодонтска

причина, ендодонтска недостатъчност, фрактуриран зъб или зъбен корен, зъб в малпозиция, импактирани в челюстите зъби, зъби с периапикална патология.

Така също се събраха данни за всеки пациент, включващи пол, възраст, тютюнопушене (непушач, умерен пушач – до 10 цигари на ден, заклет пушач – повече от 10 цигари на ден), консумация на алкохол в единици, като за една единица приехме еквивалент от 10 мл алкохол (трезвеник, умерено пиене до 5 единици алкохол и алкохолик с прием на повече от 5 единици). Относно цигарите и алкохола подбрахме пациенти, попадащи в първите две групи.

Непосредствено преди провеждането на оперативната интервенция беше изготвяна автоложната богата на тромбоцити плазма от нашия екип за пациентите в четирите експериментални групи. Тя беше прилагана в костните рани в заключителния етап на операциите, преди зашиването на муко – периосталните ламба.

Извличането на БТП се получава чрез сепарация и концентрация на тромбоцитите от автоложна цяла прясна кръв. Този процес стартира с асептична и минимално травматична техника за флеботомия обикновено на антекубиталната вена, откъдето се изтеглят около 10 мл кръв. Количеството взета кръв се определя в зависимост от очаквания предпологаем обем на костната рана, която ще се получи при оперативната интервенция. Важно е да се отбележи, че процесът на вземане на кръвта и получаването на тромбоцитен концентрат предшества хирургичната намеса. Той се извършва непосредствено преди пациента да бъде вкаран в операционната зала или след поставянето му на операционната маса, преди започване подготовката на оперативното поле, свързана с обработка на кожата на лицето и дезинфекция на устната кухина.

При по-голямата част от извършените от нас оперативни процедури за целта на това проучване ние използвахме местна инфилтрационна проводна или терминална анестезия. В някои от клиничните случаи пациентите бяха подложени на обща ендотрахеална анестезия. За да се избегне попадането в общата циркулираща кръв на местни и/или общи анестетици, които биха повлияли търсеното действие на тромбоцитите, както и за да не се активира тромбоцитната функция и коагулационната система от самата операция, изтеглянето на цялото количество венозна кръв предшества всичко това.

Както бе споменато, съществуват различни протоколи за извличане на ТК. За целта на този труд, да се проучи клиничния ефект на БТП върху оздравителния процес след ХЕ на ДТМЗ, ние използвахме ТК, получен по нови четири протокола за извличане на PRP, представени от Иванова и сътр. Първият протокол на обработка на кръвта включва единично центрофугиране на моновета без гел, при стайна температура с центрофужна сила 1500xg за 10 мин. Вторият метод е при същите условия на единично центрофугиране с центрофужна сила 1500xg за 10 мин, но с използване на вакутейнер със сепариращ гел. Третият протокол включва процес на двойно центрофугиране на моновета без гел. Първото въртене (разделително) е с центрофужна сила 1150xg за 10 мин, второто – концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин. Четвъртият метод подлага на обработка 8 мл кръв във вакутейнер със сепариращ гел в условия, както при метод три – първо въртене с центрофужна сила 1150xg за 10 мин и второ концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин. Контейнерите с кръв ние центрофугирахме в малка настолна лабораторна центрофуга DM 0412 на SCIOLOGEX (подробно описани в глава Методи за получаване на БТП). Накрая получавахме екзогенно коагулиран кръвен субстрат с гелоподобна консистенция и бледожълт цвят, който много лесно аплицирахме в костните рани на пациентите от четирите експериментални групи, след отстраняване на долните мъдречи. В контролната група пациенти не прибавяхме БТП и операциите завършваха с кюретаж, костна хемостаза с ревизия и мекотъканна сатура на раните. На всички пациенти им беше назначавана аналгетична и противовъзпалителна терапия per os - за 3-5 дни.

Една седмица след операцията проведохме първия контролен преглед. След подробно обяснение от наша страна, на всички пациенти от контролната и експерименталните групи им бе предоставена анонимна анкетна карта, която те попълниха. За нуждите на настоящото изследване въпросите в нея бяха свързани със здравето, оценено чрез възприятието за възстановяване на пациента след проведената оперативна процедура, с или без тромбоцитна плазма, в четири основни области: болка, орална функция, обща дейност и други симптоми. Тежестта на болката се свързва с консумацията на аналгетици. Оралната функция се занимава със способността да се яде храна, с преглъщането, отварянето на устата и говорната реч. Промяна в общата активност се търсеше по отношение способността за извършване на ежедневните рутинни действия – работа, спане, самообслужване. Другите симптоми включват наличие на оток, кръвонасядане, кръвене, лош вкус или халитоза.

Беше оценено и състоянието на меките тъкани в оперативното поле, използвайки лечебния индекс на Landry et al., показващ налични отклонения от нормалното протичане на ранния оздравителен процес (табл. 5). То включва степента на цвета на гингивата, епителизацията на венечните ръбове, кървене при палпация, гранулиране и нагнояване.

Табл. 5. Критерии за мекотъканен оздравителен процес.

Лечебен индекс	Критерии
Много лошо 1	Цвят на гингивата: повече от 50% червено Отговор при палпация: кървене Гранулационна тъкан: има Ръбове на оперативната рана: неепителизирани, със загуба на епител Нагнояване: има
Лошо 2	Цвят на гингивата: повече от 50% червено Отговор при палпация: кървене Гранулационна тъкан: има Ръбове на оперативната рана: неепителизирани, с открита съединителна тъкан
Добро 3	Цвят на гингивата: по-малко от 50% червено Отговор при палпация: без кървене Гранулационна тъкан: няма Ръбове на оперативната рана: без открита съед.тъкан
Много добро 4	Цвят на гингивата: по-малко от 25% червено Отговор при палпация: без кървене Гранулационна тъкан: няма Ръбове на оперативната рана: без открита съед.тъкан
Отлично 5	Цвят на гингивата: розов Отговор при палпация: без кървене Гранулационна тъкан: няма Ръбове на оперативната рана: без открита съед.тъкан

На 7-ми следоперативен ден се направи оценка и на постекстракционните усложнения в проучваните групи, където има такива. Бяха отразявани персистиращо постоперативно кървене и тризмус (ограничение в отварянето на устата) след 48-мия час; затруднено хранене, говор и като следствие – смущения в качеството на редовия ежедневен работен процес.

Нормален оздравителен процес е този, при който при вторичното зарастване на алвеолите, те са изпълнени с грануляционна тъкан, в присъствие или отсъствие на болка. Критерии за усложнения, съгласно Cheung et al са:

- Алвеоларен остейт/локализиран остеомиелит– диагностицира се чрез присъствието на персистираща пулсираща следоперативна болка в и около екстракционната рана, която не се повлиява от предписаните аналгетици, включително и повишена телесна температура, изискващи системни антибиотици.
- Сух алвеолит – остро възпаление на екстракционните рани, болезнено, но без ексудат или повишена температура.

На 3-следоперативен месец се проведе втори контролен клиничен преглед на оперираните пациенти (всички проучвани групи) от нашия екип. Те трябваша да представят актуална ортопантомограма, на която ние, чрез обективна визуална оценка, класифицирахме регенерацията на костната структура в областта на отстранения ДМ, както следва: плътна хомогенна, хетерогенна и кост с малко трабекули. При обективния преглед се фокусирахме върху локалния статус в областта на вече липсващия ДМ, като чрез сондиране, установявахме има ли задържане на храна и наличие на пародонтален джоб $>/<$ от 5мм, дистално при втория долен молар, както и има или не чувствителност по задната повърхност на дисталния му корен, предшестващ развитие на кариозен дефект.

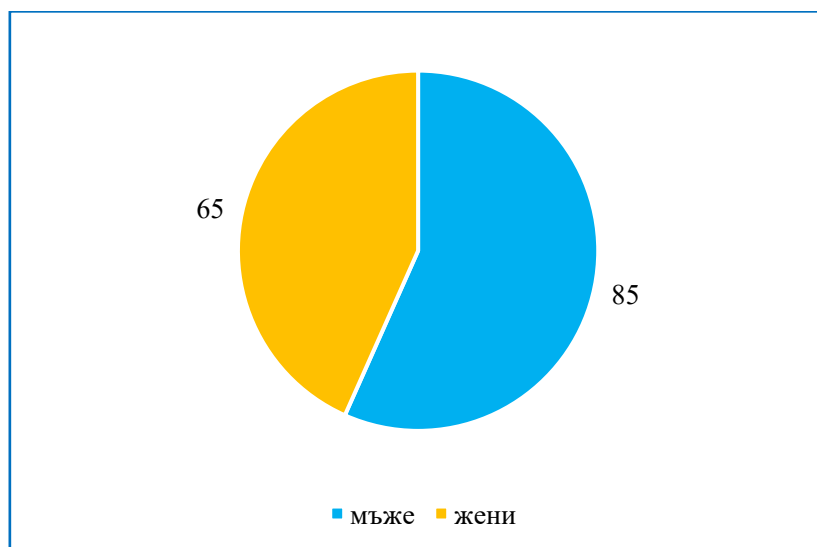
На 6-ти следоперативен месец отново събрахме данни за анализ на разглежданата от нас методология. Подобно, както при посещението на 3-ти следоперативен месец, военнослужещите от петте изследвани групи се явиха с нова ОПГ за определяне типа на възстановената костна структура, а при обективния преглед, интересът ни беше насочен към локалния статус, свързан с евентуални усложнения от страна на дисталия корен на долен втори молар.

Собствени резултати

1.1. Резултати при проучваните групи пациенти, подложени на хирургична екстракция на трети долен молар – 7-ми следоперативен ден (приложение 1).

Проследени са 150 военносслужещи, преминали през ООХ при ВМА-София, за периода октомври 2022г. – март 2023г., подложени на хирургична екстракция на трети долен моларен зъб и разпределени в 5 групи по 30 пациента. Едната група я определяме като контролна – при тези пациенти не използваме тромбоцитен концентрат. Останалите 4 - са както следва: група с екстрахиран долен мъдрец и приложен ТК получен по метод 1; група с екстрахиран долен мъдрец и приложен ТК получен по метод 2 група с екстрахиран долен мъдрец и приложен ТК получен по метод 3; група с екстрахиран долен мъдрец и приложен ТК получен по метод 4.

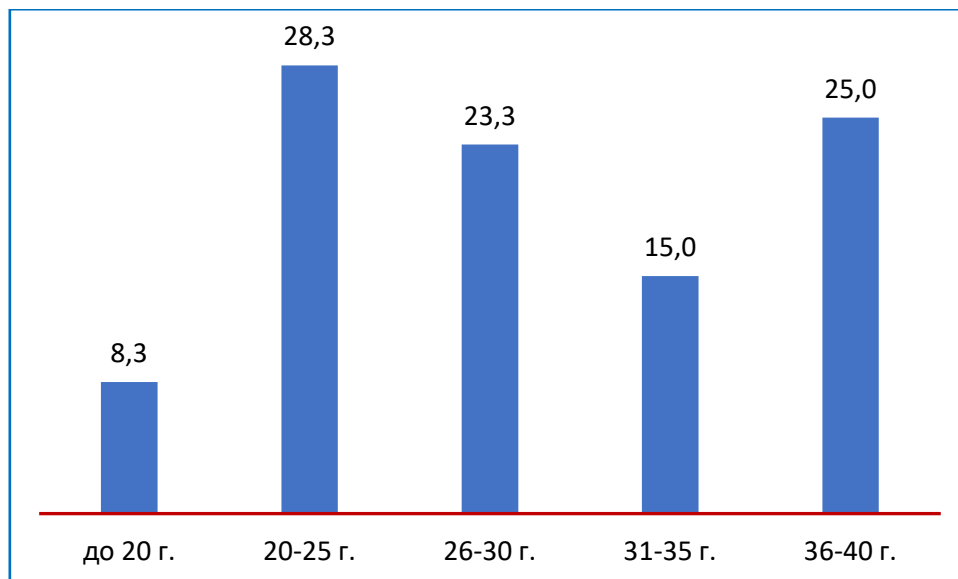
Малко над половината пациенти (56,7%) са мъже, а останалите 43,3% са жени, Фиг. 4.



Фиг. 4. Разпределение на пациентите по пол (относителен дял, $n=150$).

Средната възраст на пациентите е 28,8 г., медианата е 27 г., най-младият пациент е на 19 а най-възрастният – на 40 г. Стандартното отклонение е 6,74, а 95% доверителен интервал варира от 27,06 до 30,54 г. Всеки четвърти пациент (28,3%) е във възрастовата група между 20 и 25 г., още толкова лица (25%) са на възраст 36-40 г., а 23,3% са между

26 и 30 г. Представителите на групата 31-35 г. са 15%, а тези под 20 г. – едва 8,3%, Фиг. 5.



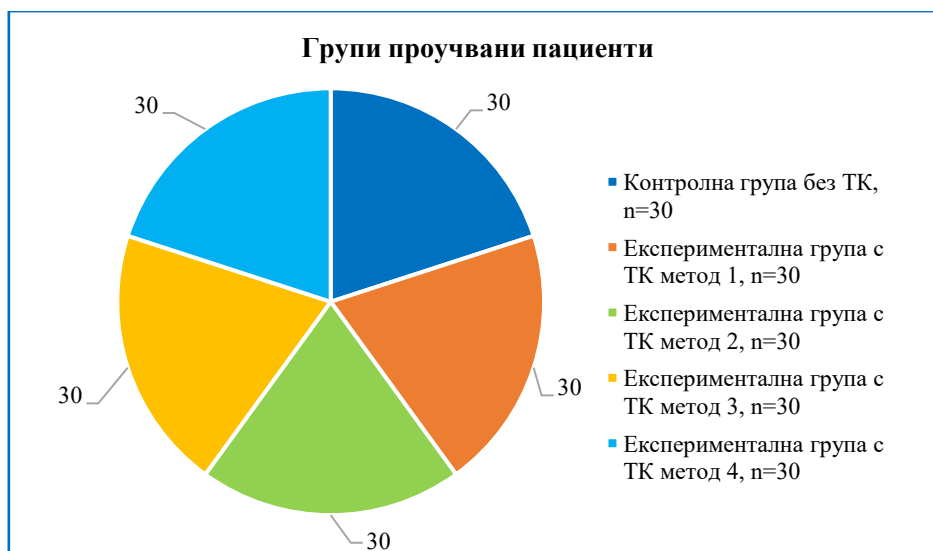
Фиг. 5. Разпределение на пациентите по възраст (относителен дял, $n=150$).

T-тест за независими извадки установи, че няма статистическо значимо различие за средноаритметичната стойност на възрастта на мъжете и жените: $t=-1.311$, $p>0.05$.

Проверка за нормалното разпределение на изследваните лица по възраст е извършена чрез тестовете на Kolmogorov-Smirnov, $D=0.154$, $p>0.05$ и Shapiro-Wilk, $D=0.927$, $p>0.05$, като резултатите показват, че двата теста не са статистически значими, т.е. разпределението по възраст на изследваните лица е нормално.

Статистическият анализ на представените по-долу данни е направен въз основа на попълнените от всички проучвани пациенти анкетни карти (приложение 1) с помощта на членове от екипа ни, заедно със снет обективен статус, 7 дни след отстраняване на мъдреците.

При 4/5 от всички проучвани пациента беше приложен в следекстракционните участъци ТК, получени по 4 различни протокола, докато при останалата 1/5 – следекстракционните рани се зашиха с наличие на нормален кръвен коагулум в тях, Фиг. 6.



Фиг. 6. Разпределение на пациентите според приложението на ТК (относителен дял, $n=150$).

Статистическата обработка на отговорите на военнослужещите от контролната група относно индекса на Landry показва, че 8% от тях са с индекс 1, при 10% от изследваните имат състояние на меките тъкани в оперативната рана, отговарящо на индекс 2; по 15% се пада на пациентите с индекс 3 и 4, а останалите 52% са с отлично състояние на гингивата, Фиг. 7.



Фиг. 7. Разпределение на пациентите в контролната група, без ТК, относно индекса на Landry (състояние на меките тъкани; относителен дял, $n=30$).

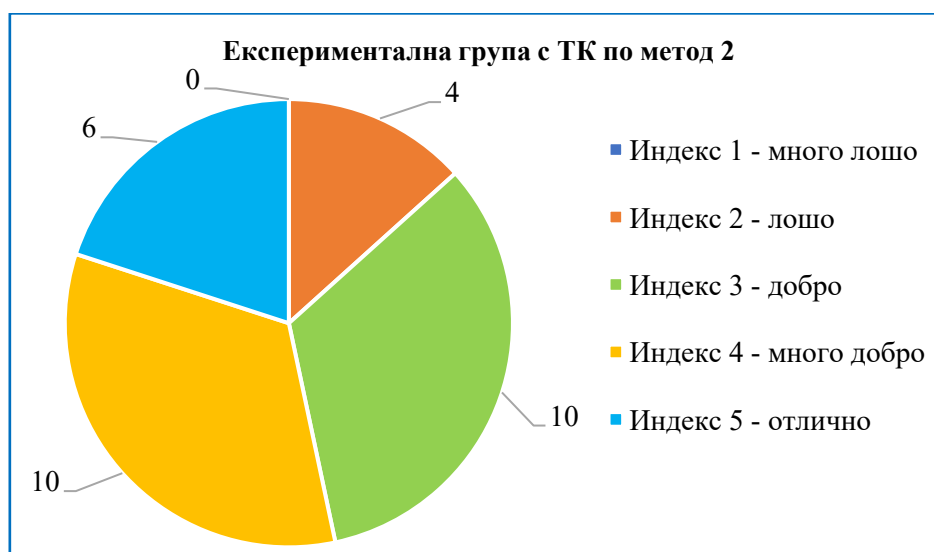
Военнослужещите от експерименталната проучвана група с прилагане на ТК по протокол 1, относно индекса на Landry са както следва: по 3.3% са с индекс 1 и 2,

половината от пациентите (50%) имат състояние на меките тъкани в оперативната рана, отговарящо на индекс 3; при всеки четвърти (26.7%) се наблюдава индекс 4, а останалите 16.7% са с отлично състояние на гингивата, Фиг.8.



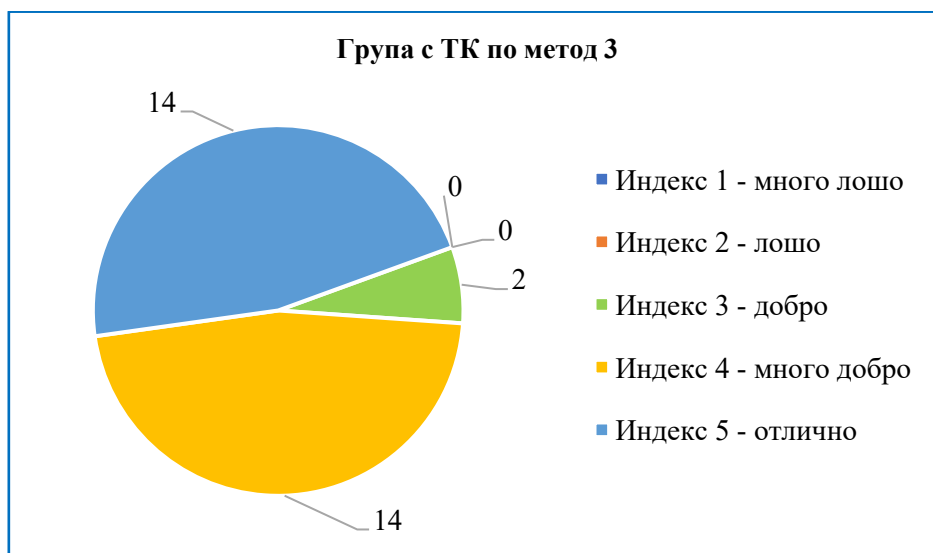
Фиг. 8. Разпределение на пациентите с ТК по протокол 1 спрямо индекса на Landry (относителен дял, n=30).

При военнослужещите от експерименталната проучвана група с прилагане на ТК по протокол 2, относно индекса на Landry не се наблюдават пациенти с индекс 1; индекс 2 се установява при 13.3% от тях; по 33.3% се пада на индекс 3 и 4, а всеки пети участник (20%) има състояние на меките тъкани, отговарящо на индекс 5, Фиг. 9.



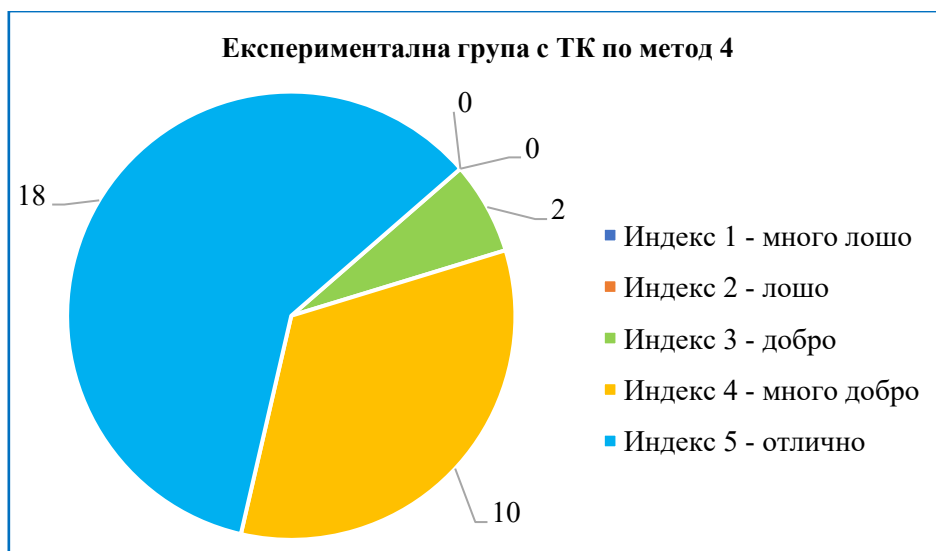
Фиг. 9. Разпределение на пациентите с ТК по протокол 2 спрямо индекса на Landry (относителен дял, n=30).

При военнорслужещите от експерименталната проучвана група с прилагане на ТК по протокол 3, относно индекса на Landry не се наблюдават пациенти с индекс 1 и 2; индекс 3 се установява при 6.7% от тях; а по 46.6% се пада на много доброто и отличното състояние на меките тъкани при използване на метод 3 за извличане на ТК, Фиг. 10.



Фиг. 10. Разпределение на пациентите с ТК по протокол 3 спрямо индекса на Landry (относителен дял, $n=30$).

При военнорслужещите от експерименталната проучвана група с прилагане на ТК по протокол 4, относно индекса на Landry също не се установяват пациенти с индекс 1 и 2; индекс 3 се установява отново при 6.7% от тях; индекс 4 е представен при всеки трети (33.3%) от групата, отличното състояние на меките тъкани при използване на метод 4 за извличане на ТК, се среща при 60% от случаите, Фиг. 11.

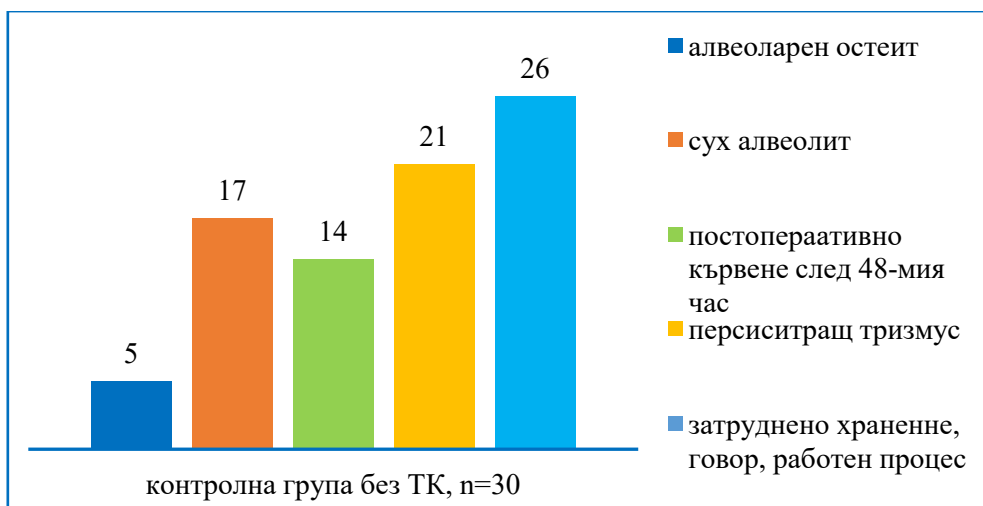


Фиг. 11. Разпределение на пациентите с ТК по протокол 4 спрямо индекса на Landry (относителен дял, n=30).

Най-често настъпилите възпалителни постоперативни усложнения диагностицирахме също така и според критериите на Cheung et al. Едно от тях е алвеоларен остейт - свързан с пулсираща болка, интра- и екстралокален оток и повишена температура, персистиращи дълго след 48-мия час от екстракцията на ДМ. Друго честа компликация е сухият алвеолит, клинично представен с болка в оперативната рана, без ексудация и повишена обща телесна температура.

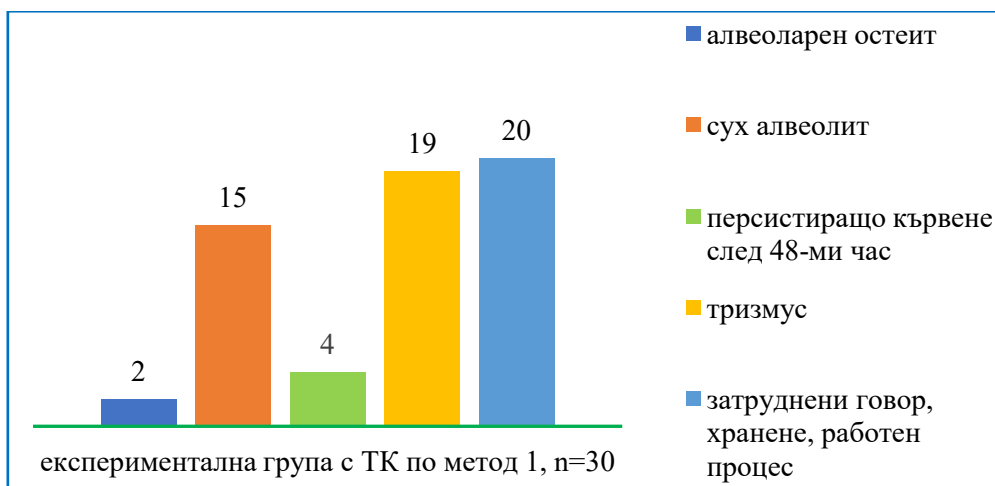
Постоперативното кървене, затрудненото отваряне на устата (тризмус) и смутено хранене, говор и нормална ежедневна дейност, продължаващи 48 часа след хирургичната интервенция, също са обект на статистически анализ по време на първия контролен преглед сред всички групи.

В контролната група 16.7% са случаите с диагностициран алвеоларен остейт, а повече от половината пациенти (56.7%) са със сух алвеолит. Също така, всеки втори военнослужещ (46.7%) съобщава за персистиращо кървене след 48-мия час; при 70% е наличен тризмус, а почти всички от групата (86.7%) споделят за затруднено хранене и нарушение в реализирането на нормалните ежедневни дейности, Фиг. 12.



Фиг. 12. Разпределение на пациентите в контролната група, без използван ТК интраалвеоларно, според постоперативните усложнения (относителен дял, n=30).

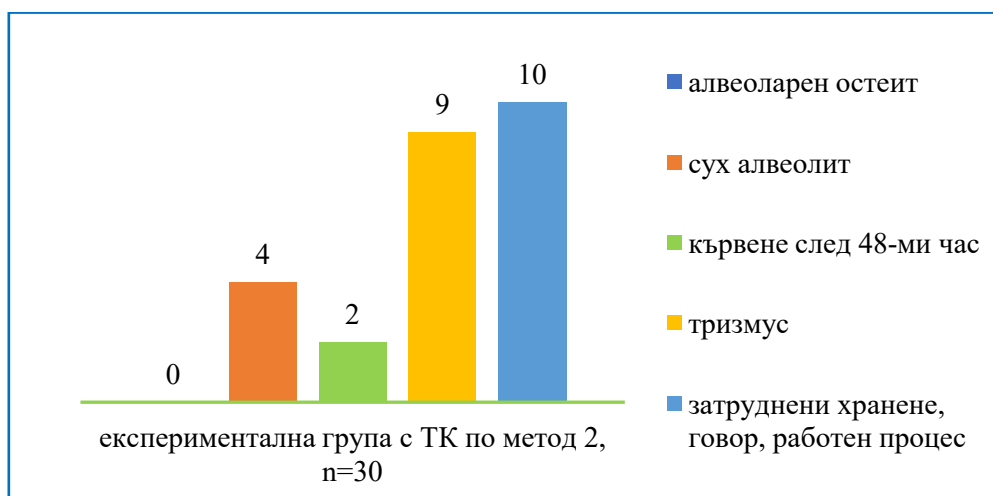
В експерименталната група пациенти с екстрахиран долен трети молар и поставен ТК по метод 1, случаите с диагностициран алвеоларен остейт, са 6.7%, а половината пациенти (50%) са със сух алвеолит. При 2/3 от военнослужещите отчитаме тризмус и функционални затруднения (респективно 63.4% и 66.7%), докато постоперативното кървене е представено сред 13.3 % от анкетираните, Фиг. 13.



Фиг. 13. Разпределение на пациентите в експериментална група с използван ТК по метод 1 интраалвеоларно, според постоперативните усложнения (относителен дял, n=30).

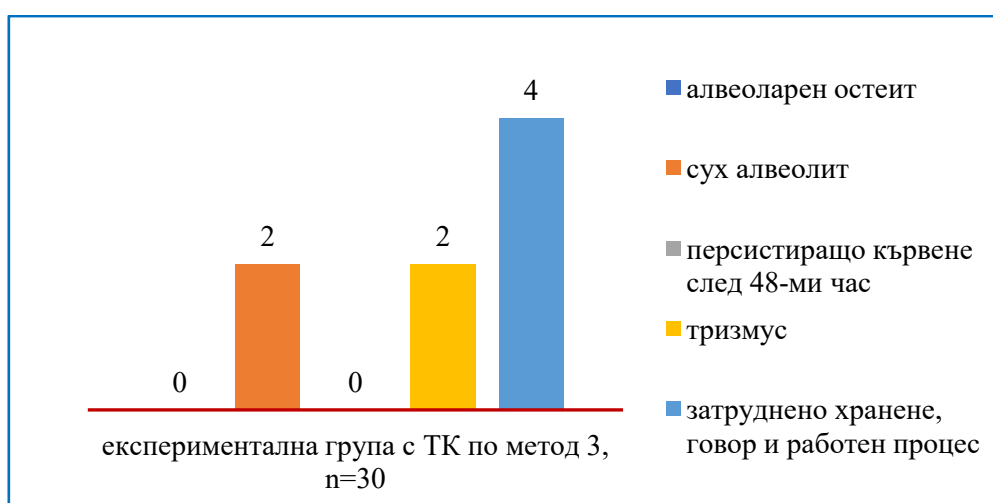
В експерименталната група пациенти с екстрахиран долен трети молар и поставен ТК по метод 2, няма случаи с диагностициран алвеоларен остейт; при 13,3% се наблюдава сух алвеолит. Само при 6.7% военнослужещи се обективизира персистиращо постоперативно кървене; един от всеки трима (30%) беше с тризмус и почти толкова

пациенти (33.3%) споделиха за нарушение при хранене, говор и изпълнение на работни ангажименти, Фиг. 14.



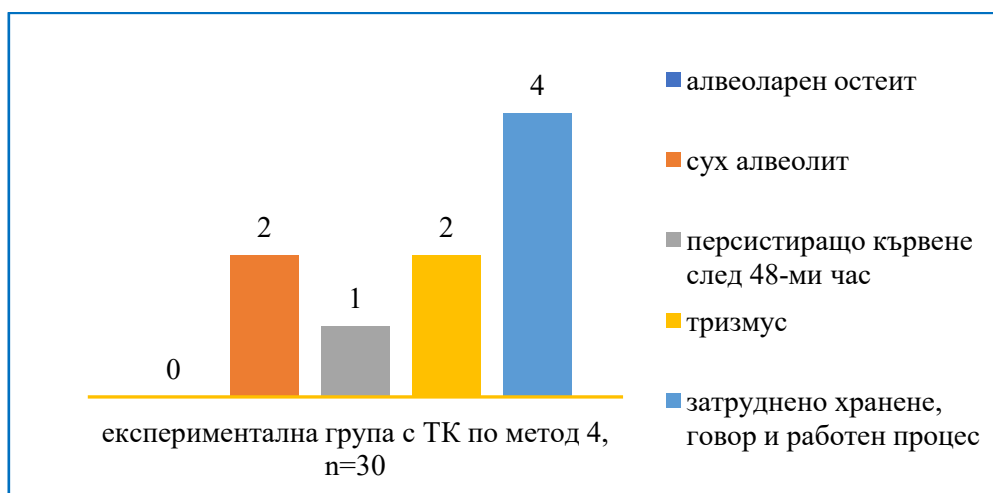
Фиг. 14. Разпределение на пациентите в експериментална група с използван ТК по метод 2 интраалвеоларно, според постоперативните усложнения (относителен дял, n=30).

В експерименталната група пациенти с екстрахиран долен трети молар и поставен ТК по метод 3, също така няма случаи с диагностициран алвеоларен остейт; при 6.7% се наблюдава сух алвеолит и също при толкова (6.7%) военнослужещи се обективизира затруднено отваряне на устата; няма пациенти с персистиращо кървене и 13.3% от анкетираните споделиха за нарушение при хранене, говор и изпълнение на работни ангажименти, Фиг. 15.



Фиг. 15. Разпределение на пациентите в експериментална група с използван ТК по метод 3 интраалвеоларно, според постоперативните усложнения (относителен дял, n=30).

В експерименталната група пациенти с екстрахиран долен трети молар и поставен ТК по метод 4, също както и в предходната група няма случаи с диагностициран алвеоларен остейт; същата като в група с ТК по метод 3 (6.7%) е честотата на сухия алвеолит и тризмуса (6.7%). Идентични са данните (13.3%) и по отношение нарушеното хранене, говор и изпълнение на работни ангажменти, Фиг. 16.



Фиг. 16. Разпределение на пациентите в експериментална група с използван ТК по метод 4 нтраалвеоларно, според постоперативните усложнения (относителен дял, n=30).

1.2. Резултати при 5-те проучвани групи пациенти, подложени на хирургична екстракция на трети долен молар – 3-ти следоперативен месец (приложение 2).

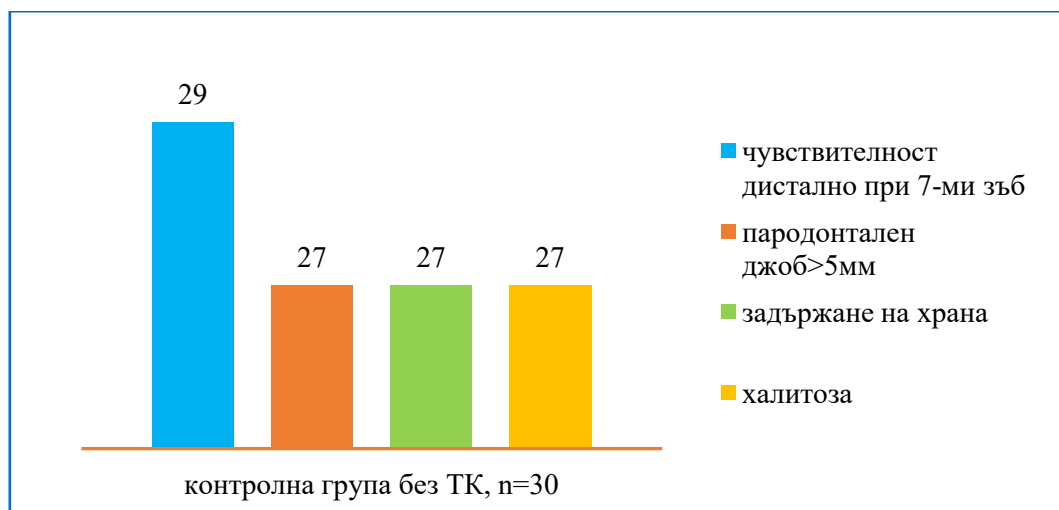
Клинични резултати

Вторият контролен преглед, който бе документиран за нуждите на изследването, реализирахме 3 месеца след оперативното лечение. Статистически данните са представени след анализ на попълнените от явилите се участници в проучването анкетни карти (приложение 2), заедно с данните от обективния клиничен преглед, относно локалния статус. Обект на този етап са следните симптоми: чувствителност при задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб след премахването на мъдрецата, наличие на пародонтален джоб в същото място, който ние групирахме след сондиране - според това дали е повече или по-малко от 5мм задържане на храна и халитоза (лош дъх) след провеждане на лична орална хигиена (ЛОХ) (сн. 13).



Сн. 13. Определяне сондажна дълбочина дистално при втори долен молар.

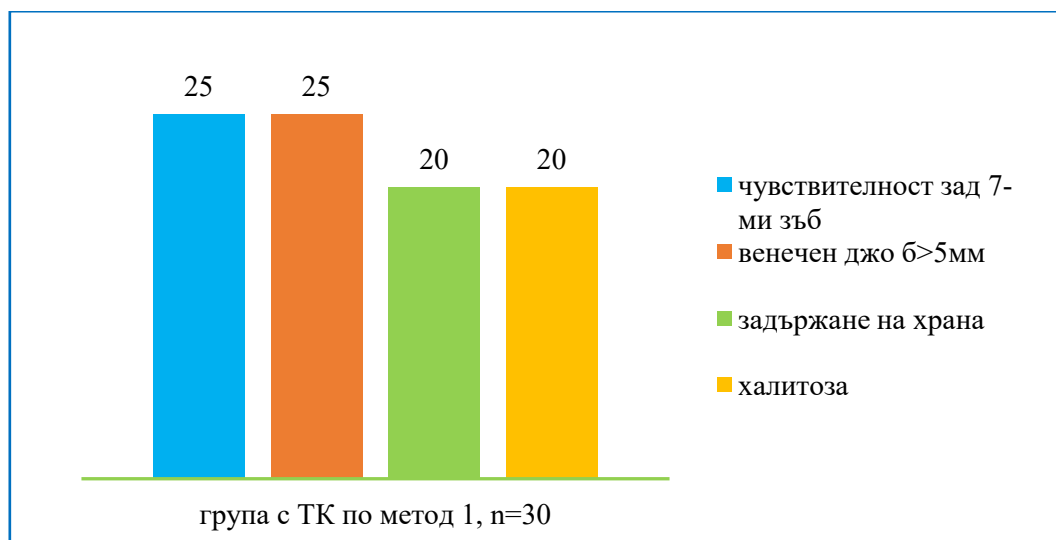
В контролната група, военнослужещи без ТК постекстракционно, чувствителността при 7-мия зъб се среща в 96% от случаите; дълбочина на венечния джоб >5мм е сондирана в 90% от пациентите; със същата честота е оплакването от задържане на храна (90%) и лош дъх след ЛОХ (90%), Фиг. 17.



Фиг. 17. Разпределение на симптомите 3 месеца след ХЕ на ТДМЗ в контролната група (относителен дял, n=30).

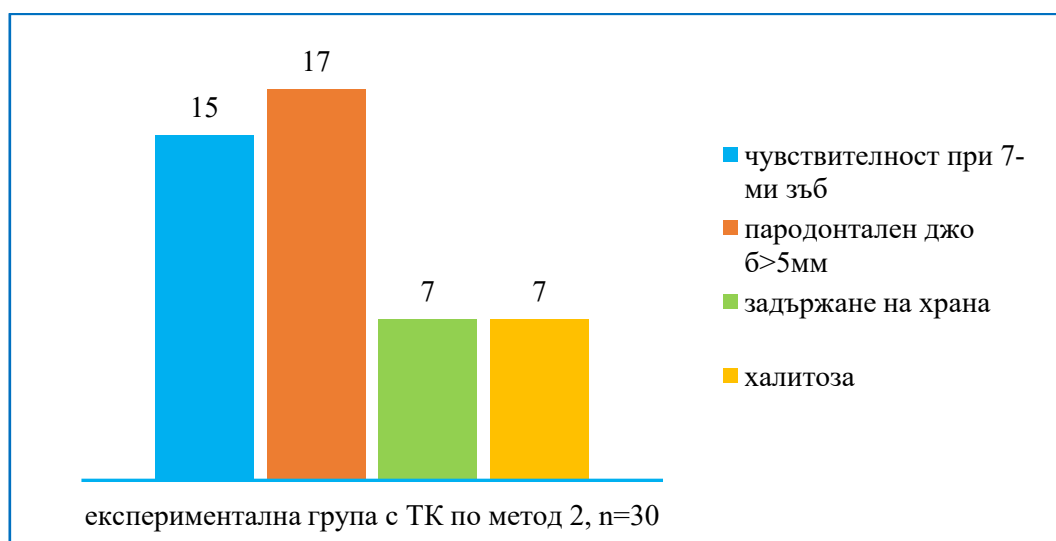
В изследваната група военнослужещи с ТК по метод 1 постекстракционно, чувствителността при 7-мия зъб се среща в 83.3% от случаите; дълбочина на венечния

джоб >5мм е сондирана в същия брой пациенти (83.3%); две трети имат оплакване от задържане на храна (66.6%) и при толкова се среща халитоза след ЛОХ (66.6%), Фиг. 18.



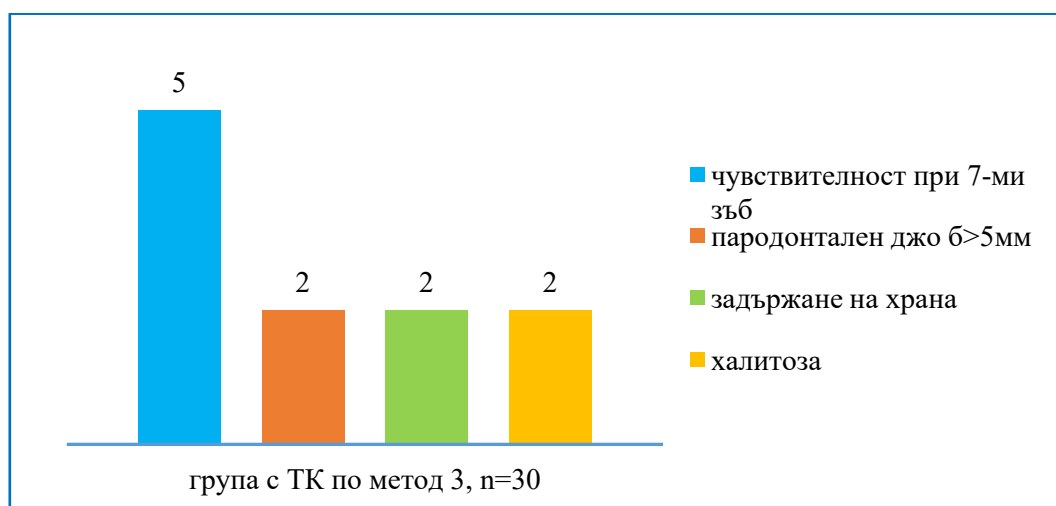
Фиг. 18. Разпределение на симптомите 3 месеца след ХЕ на ТДМЗ в експериментална група с ТК по метод 1 (относителен дял, n=30).

В изследваната група военнослужещи с ТК по метод 2 постекстракционно, чувствителността при 7-мия зъб се среща в половината (50%) от случаите; дълбочина на венечния джоб >5мм е сондирана при 56.7% от пациентите; еднакъв брой от групата – всеки пети, съобщава за задържане на храна (23.3%) и лош дъх (23.3%) след ЛОХ, Фиг. 19.



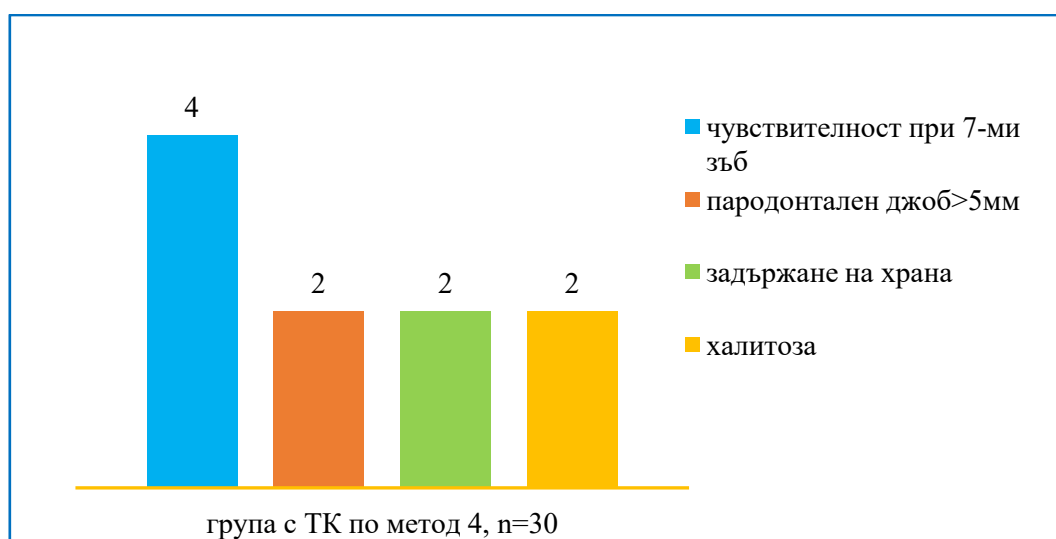
Фиг. 19. Разпределение на симптомите 3 месеца след ХЕ на ТДМЗ в експериментална група с ТК по метод 2 (относителен дял, n=30).

В изследваната група военнослужещи с ТК по метод 3 постекстракционно, при всеки шести пациент (16.7%) е налице чувствителност при 7-мия зъб; еднакъв дял – по 6.7% разпространение сред случаите се пада на дълбочина на венечния джоб >5мм, задържане на храна и лош дъх след ЛОХ, Фиг. 20.



Фиг. 20. Разпределение на симптомите 3 месеца след ХЕ на ТДМЗ в експериментална група с ТК по метод 3 (относителен дял, n=30).

В изследваната група военнослужещи с ТК по метод 4 постекстракционно само при четирима от тях (13.3%) е налице чувствителност при 7-мия зъб; еднакъв дял, както в предишната група – по 6.7% разпространение сред случаите се пада на дълбочина на венечния джоб >5мм, задържане на храна и лош дъх след ЛОХ, Фиг. 21.



Фиг. 21. Разпределение на симптомите 3 месеца след ХЕ на ТДМЗ в експериментална група с ТК по метод 4 (относителен дял, n=30).

Рентгенографска оценка

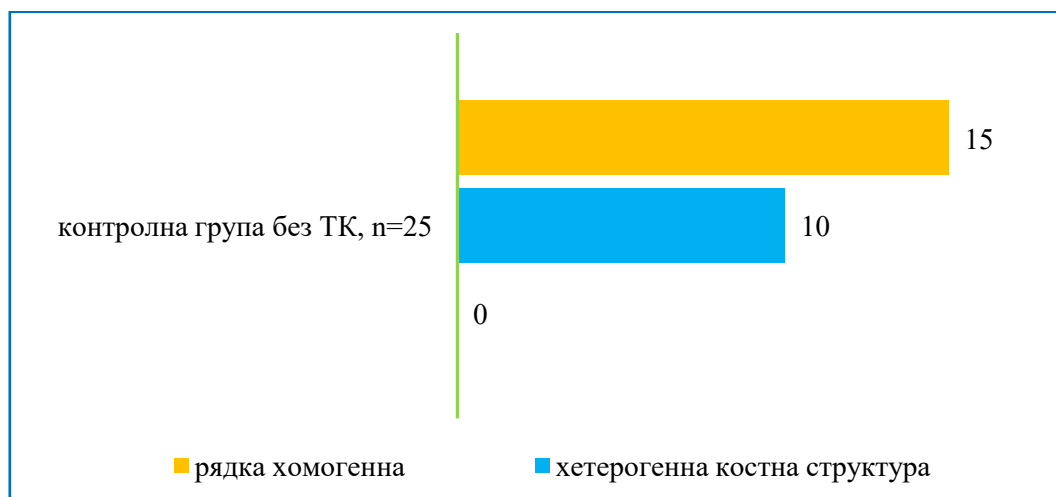
За оценка на новосформираната кост в различните клинични случаи бяха използвани образни методи – основно ортопантомограми, направени на 3-тия следоперативен месец. С помощта на панорамните рентгенографии от Digital Transtomograph ProMax – Planmeca (64,0kV 7,0mA 15,8s 79,1mGy/cm²) се обективизираха и бяха сравнявани получените клинични резултати без прилагане на богата на тромбоцити плазма и тези, където беше използван тромбоцитен концентрат, получен по четирите нови протокола. Бяха използвани и стандартизирани периапикални интраорални рентгенографии, направени с помощта на Heliodont MD (Siemens, Германия), експлоатиран при 70 KVP. Всички такива изображения в изследването са направени с F – степенен филм (Kodak, Helmel Hempstead, UK), размер 0 за предните и размер 2 за задните участъци. Паралелно бяха използвани и Rinn XCP филми (Dentsplay Rinn, Елджин, IL, USA). Всички филми са обработени с един и същ сензитометричен автоматичен процесор (DURR, Beitigheim - Bissingen, Германия) следвайки инструкциите на производителя.

Рентгенографиите бяха подложени на субективна визуална оценка, на 3-ти и 6-ти следоперативен месец. Те бяха гледани от специалисти по орална хирургия и колеги радиолози, за да се оцени качеството на трабекуларната кост в оперативните рани на 3ти и 6-ти следоперативен месец. Наблюдателите, които не знаеха за разпределението на пациентите в експерименталните и контролна групи, бяха помолени да класифицират модела на новосформираната трабекуларна кост в една от трите групи: гъста хомогенна, хетерогенна или рядка хомогенна (с малко трабекули), съгласно описанието на Lindh et al. Рентгенолозите и оралните хирурзи, правещи субективната визуална оценка по постоперативните рентгенографии, сравняваха снимки на пациенти от петте изследвани групи, с и без приложена тромбоцитна плазма при лечението, след което те обсъждаха и вземаха консенсусно решение.

Не всички пациенти в проучването се явиха на третия следоперативен месец с ОПГ. От контролната група прегледахме 25 панорамни зъбни снимки; наличните ОПГ от експерименталната група с ТК по метод 2 бяха 26; тези от групата с ТК по метод 2 – 27; явилите се участници с контролни зъбни рентгенографии от групата с ТК по метод 3 бяха - 28, докато от последната експериментална група с ТК по метод 4, се явиха всички изследвани пациенти с изискуемите ОПГ. Необходимо е да се отбележи, че същите проучвани лица, явили са на втория контролен преглед, донесоха актуални

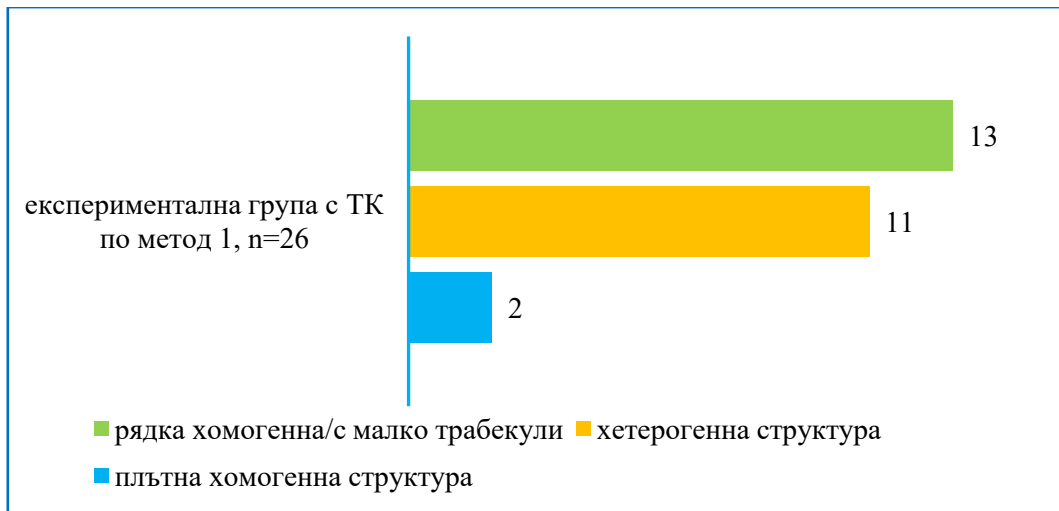
ортопантомограми при третия контролен преглед, 6 месеца след хирургичното отстраняване на трети долен моларен зъб.

Данните от контролната група показаха липса на случаи с плътна хомогенна структура, при всеки трети военнослужещ (33.5%) от групата се установи хетерогенна костна структура, а при повече от половината случаи (50%) костта се определи като рядка хомогенна/ с малко трабекули, Фиг. 22.; Сн. 14.



Фиг. 22. Разпределение на трите групи костна структура след субективна визуална оценка сред пациентите без ТК (относителен дял, n=25).

Данните от експерименталната група военнослужещи с ТК по метод 1 показаха 7.7% случаи с плътна хомогенна структура; при половината от тях (50%) се установи хетерогенна костна структура, а при 42,3% от случаите костта се определи като рядка хомогенна/ с малко трабекули, Фиг. 23.; Сн. 15.



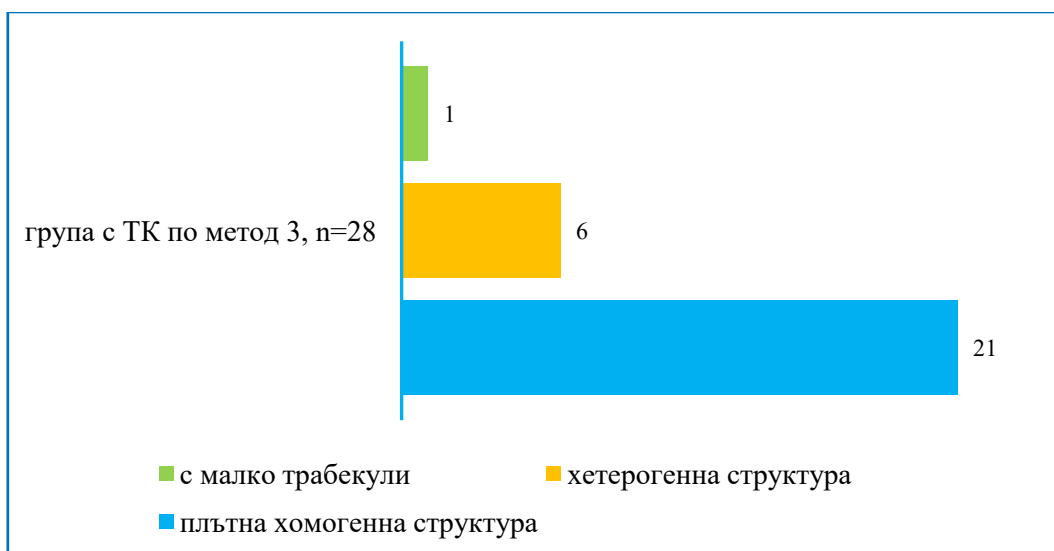
Фиг. 23. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 1 (относителен дял, n=26).

Данните от експерименталната група военносслужещи с ТК по метод 2 показаха 7.4% случаи с плътна хомогенна структура; при малко повече от половината (51.9%) се установи хетерогенна костна структура, а при 40.7% от случаите костта се определи като рядка хомогенна/ с малко трабекули, Фиг. 24.; Сн.16.



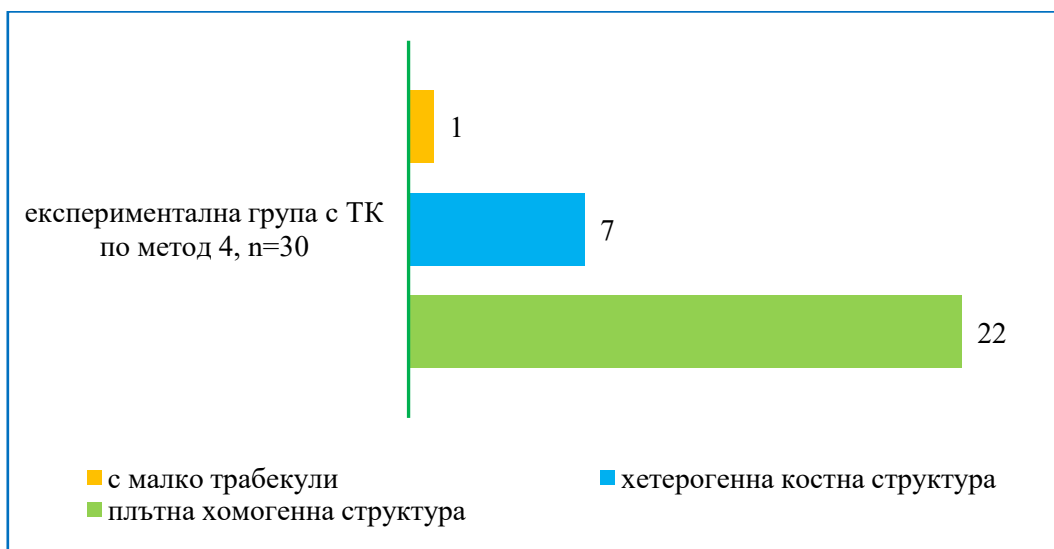
Фиг. 24. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 2 (относителен дял, n=27).

Данните от експерименталната група военносслужещи с ТК по метод 3 показаха, че при 75% от случаите костта има плътна хомогенна структура; при 21.1% се установи хетерогенна костна структура и само при един пациент (3.5%) костта се определи като рядка хомогенна/ с малко трабекули, Фиг. 25.; Сн.17.



Фиг. 25. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 3 (относителен дял, n=28).

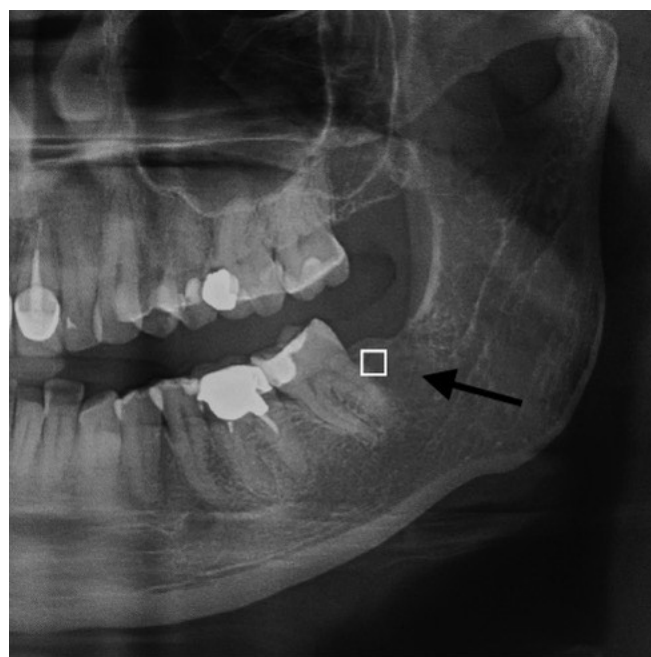
Данните от експерименталната група военносслужещи с ТК по метод 4 показаха, че при 73.3% от случаите костта има плътна хомогенна структура; при 1/5 от тях (23.3%) се установи хетерогенна костна структура и само при един пациент (3.5%) костта се определи като рядка хомогенна/ с малко трабекули, Фиг. 26.; Сн. 18.



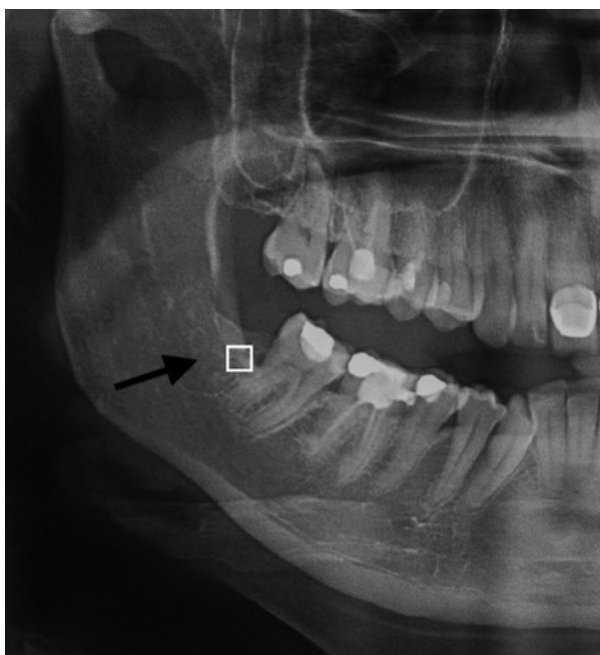
Фиг. 26. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 4 (относителен дял, n=30).



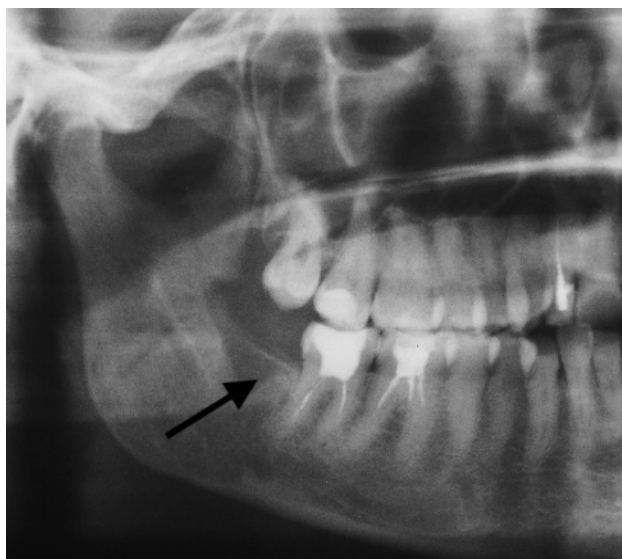
Сн. 14. Следоперативна ОПГ на пациент от контролна група без приложен ТК-костна структура с малко трабекули; втори контролен преглед – 3 месеца след екстракция на ляв ДТМЗ.



Сн. 15. Следоперативна рентгенография на пациент от експериментална група с приложен ТК по метод 1- костна структура с малко трабекули; втори контролен преглед – 3 месеца след екстракция на ляв ДТМЗ.



Сн. 16. Следоперативна рентгенография на пациент от експериментална група с приложен ТК по метод 2 – хетерогенна костна структура; втори контролен преглед – 3 месеца след екстракция на десен ДТМЗ.



Сн. 17. Следоперативна рентгенография на пациент от експериментална група с приложен ТК по метод 3 – хетерогенна костна структура; втори контролен преглед – 3 месеца след екстракция на десен ДТМЗ.



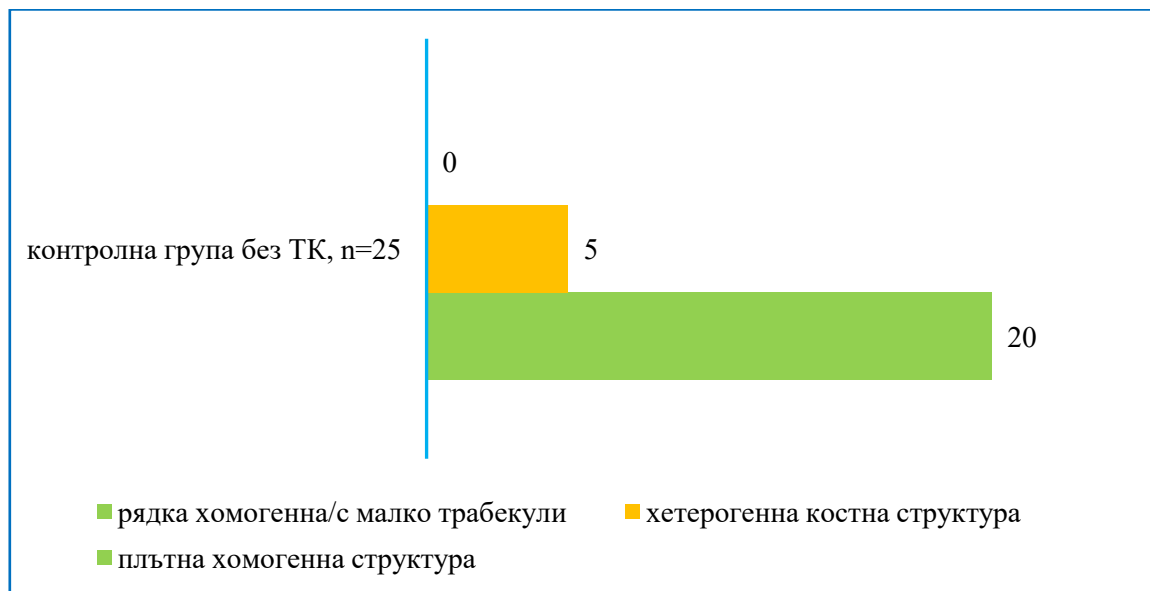
Сн. 18. Следоперативна ОПГ на пациент от експериментална група с приложен ТК по метод 4 – плътна хомогенна костна структура; втори контролен преглед – 3 месеца след екстракция на ляв ДТМЗ.

1.3. Резултати при 5-те проучвани групи пациенти, подложени на хирургична екстракция на трети долен молар – 6-ти следоперативен месец (приложение 3).

На третия контролен преглед, 6 месеца след ХЕ на ТДМЗ нашият екип направи повторна субективна визуална оценка на ОПГ. Освен това интерес представляваше и наличието при сондиране на венечен джоб ($>$ или $<$ от 5мм), дистално при долните втори молари от страната на екстрахирания ДМ. Очаквахме резултатите от тези проследени критерии да нямат значима разлика със същите, получени при втория контролен преглед (3-ти следоперативен месец).

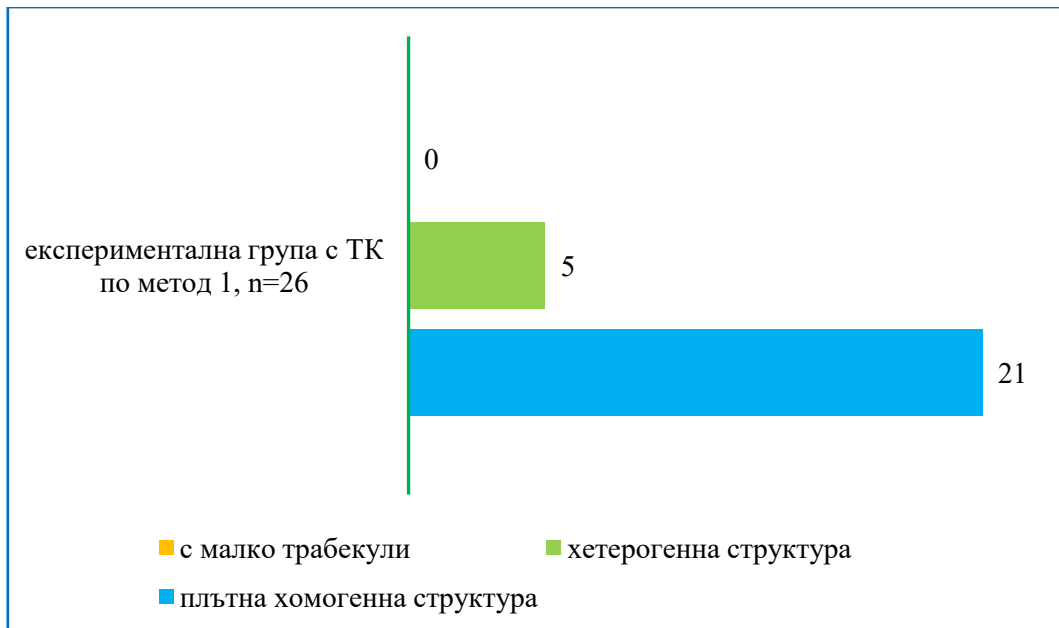
Необходимо за клиничния и статистически анализ е да се отбележи, че същите проучвани лица, явили са на втория контролен преглед с ОПГ, донесоха актуални ортопантомограми и при третия контролен преглед, 6 месеца след хирургичното отстраняване на трети долен моларен зъб, т.е.: контролна група – относителен дял, $n=25$, група с ТК метод 1 - $n=26$, група с ТК по метод 2 - $n=27$, с ТК по метод 3 - $n=28$ и група с ТК, метод 4 - $n=30$. Възстановената костна регенерация в мястото на екстрахирания мъдрец класифицирахме отново чрез субективна визуална оценка, в три групи: плътна хомогенна структура, хетерогенна и рядка хомогенна/с малко трабекули.

В контролната група пациенти, без ТК, установихме в 80% наличие на плътна костна структура, при 20% - хетерогенна и без наличие на участници с рядка хомогенна структура, Фиг. 27.



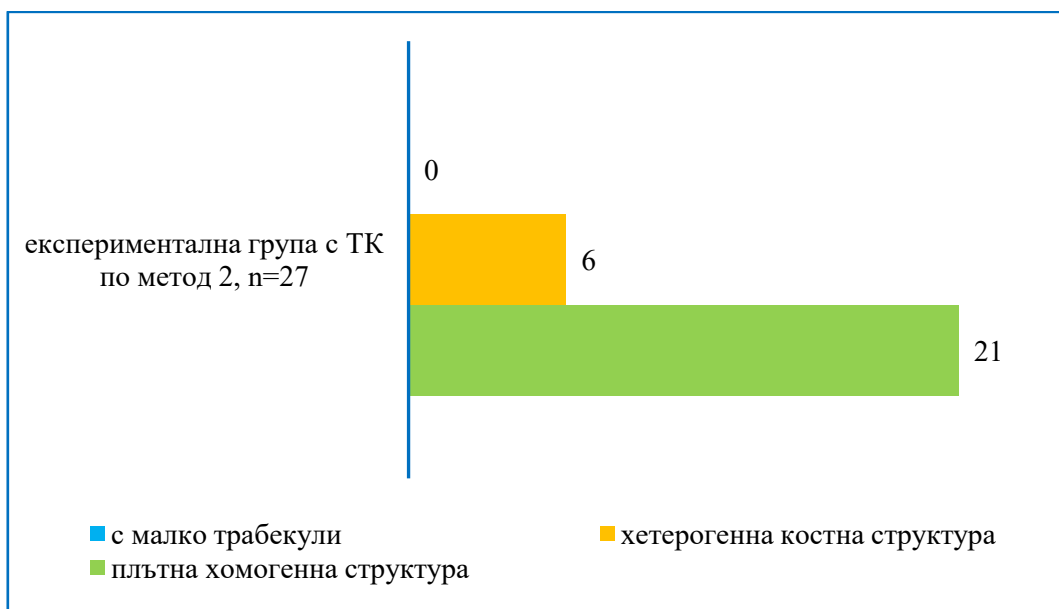
Фиг. 27. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата без ТК (относителен дял, n=25).

В експерименталната група пациенти, с ТК по метод 1, установихме почти същите стойности – 80.7% наличие на плътна костна структура и при 19.2% - хетерогенна; без случай с рядка хомогенна структура, Фиг. 28.



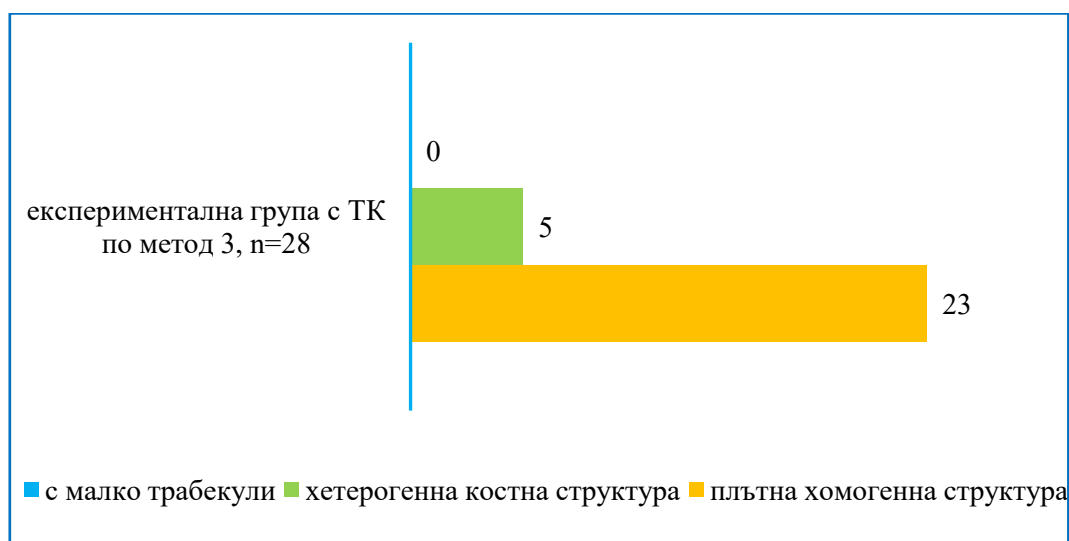
Фиг. 28. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 1 (относителен дял, n=26).

В експерименталната група пациенти, с ТК по метод 2, установихме 77.7% наличие на плътна костна структура и при 22.2% - хетерогенна; без случай с рядка хомогенна структура, Фиг. 29.



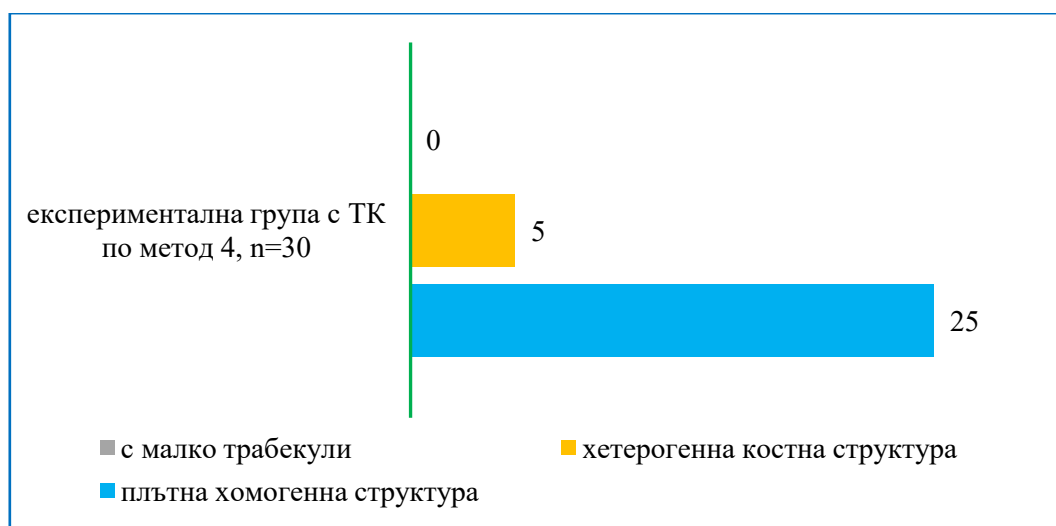
Фиг. 29. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 2 (относителен дял, n=27).

В експерименталната група пациенти, с ТК по метод 3, в 4/5 (82.1%) от пациентите установихме плътна костна структура, докато останалата 1/5 (17.9%) е с хетерогенна; без данни за рядка хомогенна структура, Фиг. 30.



Фиг. 30. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 3 (относителен дял, n=28).

В експерименталната група пациенти, с ТК по метод 4, повече от 3/4 (83,3%) от пациентите са с плътна костна структура, докато останалите 16.7% са с хетерогенна; също няма рентгенологични данни за кост с малко трабекули, Фиг. 31.



Фиг. 31. Разпределение на пациентите според трите групи костна структура, след субективна визуална оценка, в групата с ТК по метод 4 (относителен дял, n=30).

Относно диагностициране на пародонтален джоб по задната повърхност на дисталния корен на долния втори молар, разлика на този етап има в бройката военнослужещи, при които бе направено инструментирание с пародонтална сонда, спрямо отразяване на същия критерии, на 3-ти следоперативен месец, а именно: контролна група – относителен дял, n=25, група с ТК метод 1 - n=26, група с ТК по метод 2 - n=27, с ТК по метод 3 - n=28 и група с ТК, метод 4 - n=30.

В контролната група пациенти, без ТК, установихме в 4%, представен само от един пациент, пародонтален джоб при долен втори молар >5мм, докато при останалите 24 военнослужещи (96%), той беше <5мм, Фиг. 32.



Фиг. 32. Разпределение на случаите в контролната група пациенти без ТК според дълбочината на пародонталния джоб по задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб (относителен дял, n=25).

В експериментална група пациенти с ТК по метод 1, установихме идентични с предшестващата група данни - при 3.8% пародонтален джоб при долен втори молар >5мм, докато при останалите 96.2% - той беше <5мм, Фиг. 33.



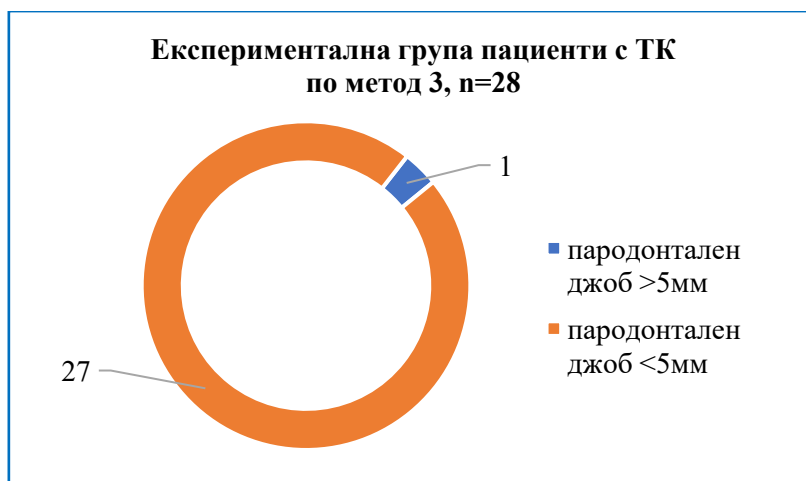
Фиг. 33. Разпределение на случаите в експериментална група пациенти с ТК по метод 1 според дълбочината на пародонталния джоб по задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб (относителен дял, n=26).

В експериментална група пациенти с ТК по метод 2, установихме, че при 7.4% от случаите е наличен пародонтален джоб при долен втори молар >5мм, докато при останалите 92.6% - той беше <5мм, Фиг. 34.



Фиг. 34. Разпределение на случаите в експериментална група пациенти с ТК по метод 2 според дълбочината на пародонталния джоб по задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб (относителен дял, n=27).

В експериментална група пациенти с ТК по метод 3, установихме, че при едва 3.6% от случаите е наличен пародонтален джоб при долен втори молар >5мм, докато при останалите 96% - той беше <5мм, Фиг. 35.



Фиг. 35. Разпределение на случаите в експериментална група пациенти с ТК по метод 3 според дълбочината на пародонталния джоб по задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб (относителен дял, n=28).

В експериментална група пациенти с ТК по метод 4, установихме, че само при 3.6% от случаите сондираме пародонтален джоб при долен втори молар >5мм, докато при всички останали пациенти 96.7% - той беше <5мм, Фиг. 36.



Фиг. 36. Разпределение на случаите в експериментална група пациенти с ТК по метод 4 според дълбочината на пародонталния джоб по задната повърхност на дисталния корен на 7-ми зъб (относителен дял, n=30).

VI. ДИСКУСИЯ

Един от сериозните проблеми в денталната хирургия е възстановяването на костни дефекти, получени в резултат на различни заболявания или оперативното им лечение. Костни дефекти могат да възникнат при редица хирургични интервенции: онкологични, травматологични, пластични, ортогнатични, предпротетични, пародонтални и имплантологични.

Всички хирурзи търсят ускорен и по-качествен процес на тъканно оздравяване. Въвеждането в клиничната дентална практика на автоложни изолирани и концентрирани от собствената кръв тромбоцити, заедно със съдържащите с в тях растежни фактори, под наименованието богата на тромбоцити плазма /БТП/ (platelet-rich plasma, PRP), допринася за стимулиране зарастването на раните в човешкия организъм, скъсява постоперативния период, водещ до окончателното анатомично и функционално възстановяване и има противовъзпалително действие.

Налице са множество проучвания (предимно доклади и поредици от случаи) относно добиването и приложението на обогатени с тромбоцити плазмени продукти и потенциалните клинични ползи в различни сфери на медицината. Независимо от това все още липсват достоверни доказателства по отношение на клиничната ефективност на PRP продуктите в рандомизирани мултицентрични контролни проучвания. Считаме, че до голяма степен това се дължи на липсата на ясни методологични стандарти за получаване на PRP и нейното характеризиране. Липсват и стандартизирани критерии при получаването на автоложния продукт, обвързани с конкретното му приложение.

Вариациите в процеса на добиване на PRP продукт, т.нар. променливите условия – центрофужната сила (RCF), време на центрофугиране, вид използван антикоагулант, необходимост от активиране или не, водят до получаване на автоложни тромбоцитни концентрати с разлики в биологичните им характеристики. Липсата на характеризиране на тези различни PRP продукти, получени чрез различни техники, включващи затворени автоматични системи, готови търговски китове или стандартни лабораторни консумативи и центрофуги, затруднява задълбочения анализ на литературата и прави стандартизирането трудоемко. Без консенсус клиничното приложение, респективно

терапевтичният ефект, остава непрозрачен и валидирането на PRP продуктите остава противоречиво.

Целта на настоящия дисертационен труд е да изследва ефекта на БТП (PRP, ТК), получена по 4 нови утвърдени в страната ни протокола, във връзка с оздравителния процес след хирургична екстракция на долен трети моларен зъб. Това е една от основните оперативни интервенции в областта на оралната хирургия, от която се нуждае почти всеки човек, по-рано или по-късно през живота си. Тя е свързана с известен травматизъм, постоперативно, който в голяма част от случаите причинява ранни и късни негативни последици. Наблюдават се персистиращи симптоми като кървене, болка, ограничение в отварянето на устата, подутина, развитие на възпалителни усложнения – алвеоларен остейт и сух алвеолит, с или без повишаване на телесната температура. Те са с индивидуален количествен и качествен характер, но в някои случаи, водят до нарушено хранене и говор, в рамките на 7 дни след отстраняването на ДМ, отразяващо се понякога и на нормалните ежедневни дейности на пациентите. Налични са и късни усложнения при тази патология, увреждащи втория долен молар, разположен в съседство на оперативната рана, както и формиране на пародонтален джоб при дисталния му корен, водещ до задържане на храна и лош дъх – ежедневен дискомфорт, смущаващ социалните контакти. Методологията с аплициране на БТП в следекстракционните участъци при премахване на ДМ, интраоперативно, има за цел да осигури по-комфортен ранен следоперативен оздравителен период, без евентуални усложнения и по-добро дентално здраве за по-кратки срокове - респективно да подобрят качеството на живот на пациентите и своевременното им връщане към ежедневните дейности. Тази теза се превърна в работна хипотеза на нашето изследване.

Поради множеството дискусии относно БТП, изложени по-горе, ние избрахме да проучим клиничните резултати на тромбоцитни концентрати, получени по 4 нови предложени за страната ни протокола (Иванова и сътр.), приложени в следекстракционните рани на отстранени от нас долни трети моларни зъби и да направим възможните сравнения на лечебното действие на ТК между отделните групи, както и с контролна група, в която пациентите с екстрахиран ДМ, не получиха БТП, интраалвеоларно.

Работният алгоритъм, въз основа на който Иванова и сътр. съпоставят резултатите за ТК, получени по 4 нови протокола, за нуждите на клиничната практика и предлагат 4 метода за добиване на БТП, е представен, както следва:

Изтегля се по 8-10 мл цяла венозна кръв от антекубиталната вена на всеки пациент в моновети (без сепарационен гел) и вакутейнери (съдържащи циклоалифатен сепарационен гел) с антикоагулант тринатриев цитрат. Той води до добро ниво на възстановяване на тромбоцитите след центрофугиране и отделяне двата им клинично важни растежни фактора – TGF beta 1 и PDGF AB. Използва се обикновена лабораторна центрофуга, в която прилагаме единично центрофугиране с обхват 1150g за 10 мин. (метод 1 и 2) и двойно центрофугиране с обхват 1150g за 10 мин. първо и 350g за 5 мин. второ въртене (метод 3 и 4), при оптимална температура от 21-24°C. Когато се говори за протоколи за добив на PRP, от съществено значение е да бъдат дефинирани не само началният обем венозна кръв, а и крайният обем обогатена плазма, тъй като концентрацията на един и същ брой тромбоцити в по-малък обем плазма и в по-голям обем плазма ще бъде различен. Спазването на това базово условие дава възможност протоколът за добив на автоложен концентрат да се повтаря и прилага от различни клиницисти, като количествените характеристики на кръвните клетки в продукта ще бъдат с относително постоянен брой и състав (различия биха се появили в резултат от индивидуалния характер на венозната кръв на всеки индивид и прецизността на изработване на обогатената с тромбоцити плазма).

Посочените от Иванова и сътр. резултати за добив на обогатена с тромбоцити плазма и по четирите експериментални протокола са с константни стойности на първоначално изтеглена венозна кръв от 8 мл и финално получен краен продукт PRP – 3 мл. Както бе споменато, за избор на екзогенен активатор се приема калциев глюконат, лесен за набавяне като фармацевтичен продукт и надежден източник на Са йони, който води до получаване на гелоподобна обогатена с тромбоцити плазма на стайна температура за около 20 минути.

Както беше отбелязано, Marx (2004) предлага да се зададе прагова концентрация от 1×10^6 тромбоцит/ μL или от 3-5 пъти насищане с тромбоцити, която да осигури терапевтично ефективно количество растежни фактори в PRP продуктите. В настоящото научно изследване обогатената плазма, получена по условията на **метод 1** (единично центрофугиране на кръв в моновети без сепариращ гел), има най-ниско количество

насищане с тромбоцити – 1.92 пъти спрямо контролната стойност. В плазмата, получена по **протокол 2** (единично центрофугиране във вакутейнери със сепариращ гел), тромбоцитното насищане е 4.37 пъти спрямо съдържанието на тромбоцити в контролата от цяла кръв. В плазмата, получена по експериментален **метод 3** (двойно центрофугиране в моновета без сепариращ гел) – 4.52 пъти, в продукта, получен по **протокол 4** (двойно центрофугиране във вакутейнери със сепариращ гел), насищането с тромбоцити е 4.9 пъти. Придържайки се към дефиницията, предложена от Marx, продуктът, получен от Иванова и сътр. по метод 1, не може да се определи като същински вид PRP, посочваните PRP продукти в литературата са с насищане на тромбоцити над 2 пъти над контролните сравними стойности.

Нивата на левкоцитите в PRP продуктите са от особено важно значение, имайки предвид техните биологични характеристики, относно противовъзпалителното им действие и антибактериалния ефект. Тяхното съдържание винаги трябва да бъде определяно в пробите от тромбоцитни концентрати. За намаляване нивото им в сравнение с цяла кръв често се използва левкоцитен филтър или се прилага двойно центрофугиране на пробите, като се манипулира внимателно с т.нар. „Buffy coat“. В проведеното от Иванова и сътр. проучване автоложните тромбоцитни концентрати, изготвени по условията на методи 1 и 2, доказват обогатяване на получените продукти и с левкоцити. Според MARSPILL класификационна система на Lana и съавтори спрямо количеството на левкоцити, получените от Иванова и сътр. и двата типа продукти можем да отнесем в групата на LR-PRP (leukocyte rich platelet-rich plasma), обогатена с левкоцити и тромбоцити плазма (175). Според същата класификационна система (175) продуктите от метод 3 и 4 могат да бъдат характеризирани като LP-PRP (leukocyte-poor platelet-rich plasma), бедна на левкоцити и обогатена с тромбоцити плазма.

Автоложната обогатена плазма, съдържаща високи стойности концентрирани тромбоцити, притежава изобилие от растежни фактори, позволяващи заздравяване и регенерация на тъканите. Lee et al. (2013) доказва, че растежните фактори се съдържат в най-висока концентрация в тромбоцитите (в техните α -гранули) и имат съществена роля в процеса на зарастване на раните и регенерация на тъканите – основните с доказано клинично действие са PDGF-AB и TGF beta 1 (180). Редица автори разглеждат задълбочено зависимостта на броя на тромбоцитите в PRP и нивото на растежните фактори Anitua et al. (2009), Eppley et al. (2004), Magalon et al. (2014), McCarrel & Fortier (2009), Sanchez et al. (2007) (16, 98, 192, 211, 249).

PDGF-AB се отделя от тромбоцитите и оказва влияние върху множество клетки. В проведеното от Иванова и сътр. изследване, след направен Т-тест за корелирани извадки, е установено статистическо значимо различие между средните стойности на PDGF-AB преди и след активиране по методи ($p < 0.05$). За **метод 1** средните стойности на PDGFAB в активираната плазма нарастват с 1,18 пъти, спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$). За **метод 2** средните стойности на PDGF-AB в активираната плазма нарастват с 1,20 пъти спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$). При **метод 3** стойностите на PDGF-AB в активираната плазма се увеличава с 1,13 пъти, спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$), а при **метод 4** увеличаването на PDGF-AB в активираната плазма е 1,08 пъти спрямо неактивираната плазма. От получените резултати ясно се вижда, че PDGF-AB позитивно корелира с броя на тромбоцитите от контролната рупа ($p < 0.05$). Установена е обаче и положителната корелация между броя на левкоцитите, получени след добиване на обогатената плазма по методи, спрямо PDGF-AB ($p < 0.05$). Впечатление прави най-висока стойност на PDGF-AB в пробите от метод 2. Това е автоложният обогатен с тромбоцити продукт, в който с високи стойности са представени както съдържанието на тромбоцити, така и съдържанието на левкоцити на едно място. Като извод трябва да отбележим, че количеството на PDGF-AB зависи и от съдържанието на левкоцити в крайния продукт.

Друг от основните растежни фактори в автоложните тромбоцитни продукти с клинични резултати за медицинската практика е TGF beta-1. Това е мултифункционален цитокин, участващ в контрола на растежа на клетките и стимулация на матриксна продукция. В изследването на Иванова и сътр. имаме следните данни (чрез Т-тест за корелирани извадки): в ТК, изготвени по метод 1 и 2, се наблюдава минимално понижаване на стойностите на TGF beta 1 след добавяне на активатор. В ТК, изготвени по метод 3 и метод 4, се наблюдава повишаване на средната стойност на TGF beta 1 в активираните проби, като най-високите средни стойности на TGF beta 1 са в пробите от метод 4. Най-ниска средна стойност на TGF beta 1 се установява в пробите от метод 1.

Използването на сепариращ биосъвместим гел, според Иванова и сътр., води до получаване на два вида тромбоцитни концентрати с присъствие на левкоцити (метод 2) и без присъствие на левкоцити (метод 4). Неминуемо двойното центрофугиране при

метод 4 подпомага за елиминиране на съдържанието на левкоцити в тромбоцитните продукти и за това свидетелства продуктът, получен в условията на метод 3, който е бедна на левкоцити и обогатена с тромбоцити плазма, получена в моновети без сепариращ гел и в условията на двойно центрофугиране също. Изводът, който е посочен относно използването на вакутейнери с гел, е, че се получава доста по-лесно и сигурно тромбоцитен концентрат без присъствие на левкоцити – при нужда от стимулиране на костна и хрущялна регенерация, без да се търси антибактериалния и противовъзпалителен ефект на левкоцитите.

Относно класифицирането на получените ТК по тези представени по-горе протокола, трябва да се има предвид следното: според съдържанието на еритроцити пробите от метод 1 и 2 са богати на еритроцити, а пробите от метод 3 и 4 са бедни на остатъчно количество еритроцити (съдържание 15 пъти по-ниско спрямо контролните стойности). Спрямо насищането с тромбоцити продуктът, получен по метод 1, не може да се класифицира спрямо посочените минимални насищания в граница от 2-3 пъти над базовите контролни стойности (средна стойност 1.92 пъти над средната стойност от контролната група). Тромбоцитните концентрати, получени чрез метод 2, 3 и 4, са в границите на насищане между 4-6 пъти спрямо средната стойност от контролната група. Продуктите, получени по метод 1 и 2, са богати на левкоцитно съдържание (средна стойност на пробите над средната стойност от контролната група), а продуктите, получени чрез метод 3 и 4, са бедни на левкоцити (средна стойност на пробите по-ниска от средната стойност на контролната група).

В таблица 6 са представени абривиатурните означения на получените от Иванова и сътр. автоложни тромбоцитни концентрати, класифицирани спрямо PAW и MARSPILL системите.

Табл. 6. Класифициране на получените от Иванова и сътр. четири продукта спрямо системите на PAW и MARSPILL.

Класификационна система	Автоложен обогатен с тромбоцити продукт			
	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
PAW	P2-A α P2-x-A α	P4-A α P4-x-A α	P4-B β P4-xB β	P4-B β P4-x-B β
MARSPILL	M(H) A(A-) R(RBCR) S(Sp1) P(PL-) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBCR) S(Sp1) P(PL 4-6) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBC- P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L(P) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L(P) L(L-)
	M(H) A(A+) R(RBCR) S(Sp1) P(PL-) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBCR) S(Sp1) P(PL 2-3) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBC- P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L(P) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L(P) L(L-)

Изводи относно получаването на автоложни тромбоцитни концентрати по 4 нови собствени протокола за извличане на ТК (Иванова и сътр.)

Според проучената литература и натрупани данни относно видовете PRP и тяхното насищане с тромбоцити продуктът, получен в условията на метод 1, не може да се нарече същинска обогатена с тромбоцити плазма поради насищане с тромбоцити в нея по-ниско от два пъти над контролните стойности. Обогатената с тромбоцити плазма, добита в условията на метод 2, според разгледаните класификации по-горе се означава като LR-PRP. Този вид тромбоцитен концентрат се характеризира и с повишаване количеството

на PDGF-AB растежен фактор. Продукт с такива характеристики може да повлияе заздравяването на меките тъкани и налично персистиращо мекотъканно възпаление, поради антибактериалната си активност. Обогадената с тромбоцити плазма, получена чрез методи 3 и 4, е сходна по своите характеристики за количествено присъствие на клетъчните компоненти с лечебно действие. Това са „пречистени“ по своята същност продукти – предимно богати на тромбоцити, означени като LP-PRP, с предложение за прилагане в клиничната практика за стимулиране на костната регенерация, като продукти с установена липса на левкоцити. Тромбоцитните концентрати, добити чрез методи 2, 3 и 4, могат да намират своето приложение след прилагане на активатор или не в зависимост от състоянието, в което трябва да бъдат приложени. При ТК, получени по метод 1 и 2, се установява, че след активация, в зависимост от незначително повишение стойностите на TGF beta 1 и PDGF-AB, могат да имат обемнозаместващ ефект и при необходимост да се ползват за запълване на кухини или костни дефекти или с цел превенция на евентуално локално възпаление.

Алгоритъм на нашето проучване

В настоящото проучване обхванахме общо 150 пациенти с оперативно отстранени ДМ за периода октомври 2022г. – март 2023г., разделени в пет групи по 30. Формирахме една контролна група, в която не използвахме ТК. В останалите 4 групи аплицирахме автоложен ТК, в костната рана на отстранения ДМ, който ние извличахме предоперативно чрез четирите нови протокола на получаване по Иванова и сътр.(дискутирани по-горе). Всички 30 пациенти от една експериментална група получаваха ТК по метод 1, 2, 3 или 4, въз основа на което направихме групирането. След извличане на ТК (краен продукт около 3мл), последваше процес на екзогенна активация с 10% р-р на калциев глюконат, в съотношение 3:1, на стайна температура за около 20 минути. Полученият от процеса гелоподобен автоложен биологичен субстрат, ние поставяхме в следекстракционните костни дефекти на ДТМЗ.

Участниците в проучването са военнослужащи в системата на Министерство на отбраната, лекувани в нашето Отделение по орална хирургия при ВМА гр. София, на които подробно им беше обяснена целта на настоящото изследване. Те подписаха информирано съгласие, относно тяхното участие в това проучване (приложение 4, 5, 6). За тях, особено тези, служещи в Авиационния отряд при ВВС, е изключително важно

следоперативният период да протича леко, бързо и без усложнения. Това им позволява скоростно възстановяване на дължостните задължения.

Осъществихме 3 контролни прегледа - 7 дни след проведената им хирургична интервенция, на 3-ти и 6-ти следоперативен месец. На първия от тях се явиха всички 150 оперирани пациенти. С помощта на колеги от екипа ни, военнослужещите попълниха предварително изготвени от нас анонимни анкетни карти (приложение 1). Обективно, беше оценено състоянието на меките тъкани в устната кухина, в областта на оперативната рана, както и наличието на евентуални следоперативни усложнения – алвеоларен остейт/сух алвеолит. Вторият контролен преглед бе реализиран на 3-ти следоперативен месец, когато изискахме от пациентите контролни рентгенови зъбни снимки, направени на същото устройство като предоперативните. Тях ние подложихме на анализ чрез субективна визуална оценка (от членове на екипа ни заедно с рентгенолог), относно плътността на възстановената костна структура в областта на отстранения ДМ. Също така, диагностицирахме чрез сондиране и интраоралния локален статус по отношение на изявена патология при долния втори молар от страната на хирургичната екстракция – чувствителност и пародонтален джоб при дисталния корен на 7-ми зъб, задържане на храна в мястото на екстракцията и халитоза (попълвани бяха нови анкетни карти – приложение 2). Явиха се отново всички изследвани пациенти (150), но само 136 от тях имаха исканите от нас ОПГ. Останалите 14 бяха направили зъбни снимки в рентгенова лаборатория, различна от първоначалната, които ние не включихме в изследването. На 6-ти следоперативен месец проведохме трети контролен преглед. За анализ на резултатите по това време ни беше нужно от всеки пациент актуална постоперативна ОПГ (направена на същия апарат като предходните две), както и определяне дълбочината на трайно формиран, ако има такъв, пародонтален джоб при дисталния корен на 7-ми зъб (участниците бяха отново анкетирани – приложение 3). Явиха се 136 пациента – същите, които бяха наблюдавани и при втория контролен преглед.

1.1. Сравнителен анализ на резултатите при проучваните групи пациенти – първи контролен преглед, 7-ми следоперативен ден

Сравняване на всяка група с останалите

Статистически методи: резултатите са представени като абсолютни честоти (n) и относителни честоти (%) на пациентите в отделните групи. Сравнението между групите е направено с хи квадрат анализ (екзактен тест на Фишер, когато е приложим).

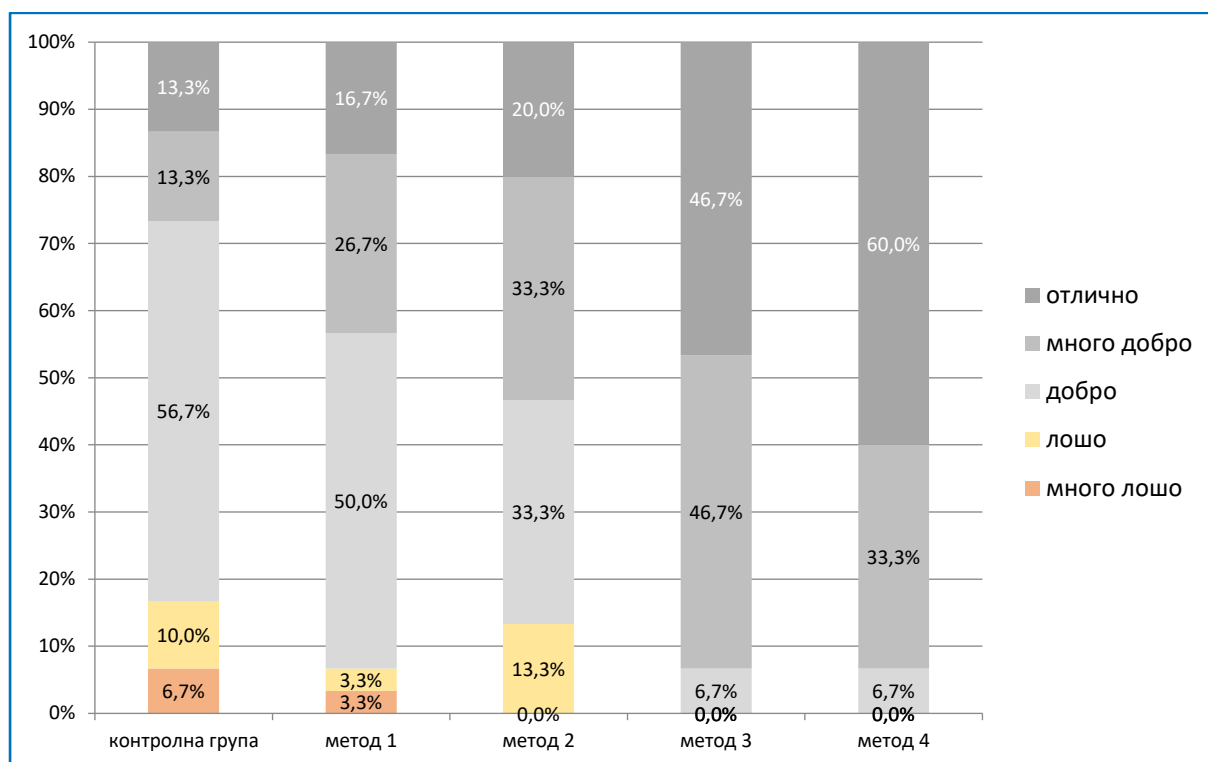
Проследени са 150 пациента, разпределени в 5 групи, както следва: контролна група- 30 пациенти с екстракция на долни мъдrecи без прилагане на тромбоцитен концентрат; група от 30 пациенти с екстрахиранни долни мъдrecи и приложен тромбоцитен концентрат по метод 1; група с екстрахиранни мъдrecи и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 2; група с екстрахиранни долни мъдrecи и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 3; група с екстрахиранни долни мъдrecи и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 4.

Определяне степента на оздравителния процес чрез индекса на Landry et al (7-ми следоперативен ден)

Табл. 7. Разпределение на пациентите според степента на оздравителния процес чрез индекса на Landry et al, по групи.

		контролна група без прилагане на тромбоцитен концентрат		група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 1		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 2		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 3		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 4	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Определяне степента на оздравителния процес чрез индекса на Landry et al (7-ми следоперативен ден)	много лошо	2	6,70%	1	3,30%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	лошо	3	10,00%	1	3,30%	4	13,30%	0	0,00%	0	0,00%
	добро	17	56,70%	15	50,00%	10	33,30%	2	6,70%	2	6,70%
	много добро	4	13,30%	8	26,70%	10	33,30%	14	46,70%	10	33,30%
	отлично	4	13,30%	5	16,70%	6	20,00%	14	46,70%	18	60,00%

Разгледано за цялата извадка, се доказва връзка между резултатите индекса на Landry et al и групата ($p < 0,001$). На Фиг. 37. се вижда как с нарастване номера на групата нараства и дела пациенти, оценени като отлично и много добро, а намалява лошо и много лошо (последната група липсва при методи 3 и 4).



Фиг. 37. Разпределение на пациентите според степента на оздравителния процес чрез индекса на Landry et al, по групи.

Статистическите данни от клиничните ни резултати потвърждават становището за приноса на ТК, получени по 4-те протокола. БТП в първите две експериментални групи повлияват слабо продължителното след 48-ми час кървене, болка и затруднено отваряне на устата. Резултатите от контролната група почти съвпадат с тази от група с ТК по метод 1. Идентични са данните по отношение индекса на Landry et al при пациентите с ТК от група с метод 3 и 4 – имаме над 60% „отлично“ състояние на меките тъкани в оперативното поле, в рамките на първа следоперативна седмица.

Изследвана е връзката между резултатите и групите по двойки.

Табл. 8. Изследване на връзката между степента на оздравителния процес чрез индекса на Landry et al и групите по двойки.

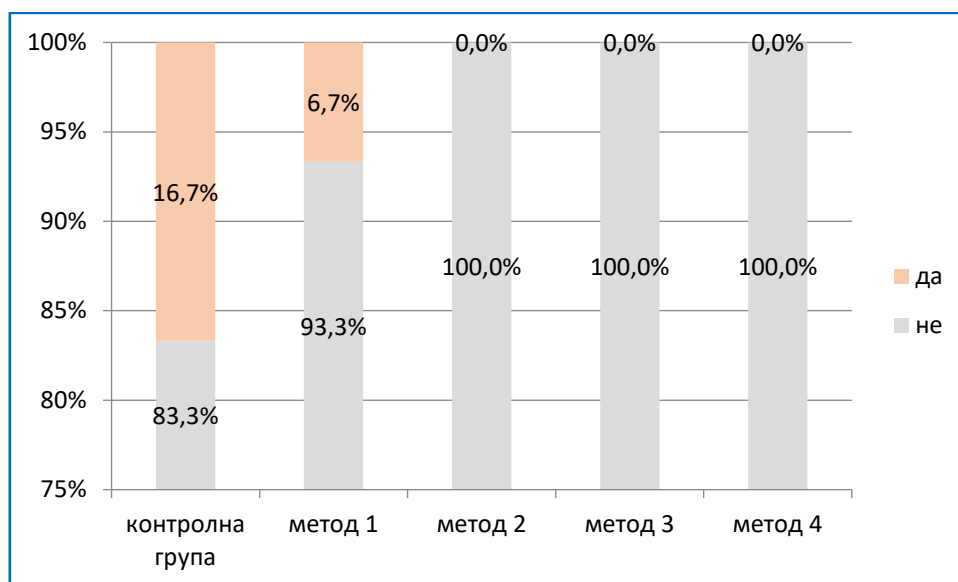
Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,547
контролна група	метод 2	0,140
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,391
метод 1	метод 3	0,001
метод 1	метод 4	0,001
метод 2	метод 3	0,004
метод 2	метод 4	0,002
метод 3	метод 4	0,558

Оценка на остекстракционните усложнения съгласно критериите на Cheung et al
(7-ми следоперативен ден)

Табл. 9. Разпределение на пациентите според постекстракционните усложнения съгласно критериите на Cheung et al, по групи.

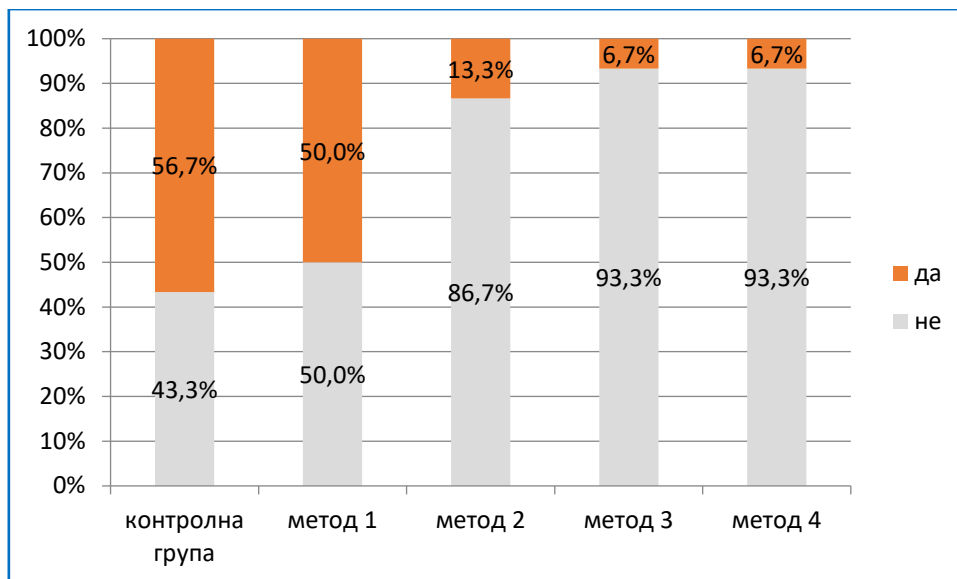
		контролна група без прилагане на тромбоцитен концентрат		група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 1		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 2		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 3		група с приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 4	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
алвеоларен остейт - пулсираща болка, подутина, повишена температура	не	25	83,3%	28	93,3%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	да	5	16,7%	2	6,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
алвеолит - болка, без подутина и ексудация, без повишена температура	не	13	43,3%	15	50,0%	26	86,7%	28	93,3%	28	93,3%
	да	17	56,7%	15	50,0%	4	13,3%	2	6,7%	2	6,7%
постоперативно кървене	не	16	53,3%	26	86,7%	28	93,3%	30	100,0%	29	96,7%
	да	14	46,7%	4	13,3%	2	6,7%	0	0,0%	1	3,3%
персистиращ тризмус след 48-ми час	не	9	30,0%	11	36,7%	21	70,0%	28	93,3%	28	93,3%
	да	21	70,0%	19	63,3%	9	30,0%	2	6,7%	2	6,7%
затруднено хранене, говор, работен процес след 48-ми час	не	4	13,3%	10	33,3%	20	66,7%	26	86,7%	26	86,7%
	да	26	86,7%	20	66,7%	10	33,3%	4	13,3%	4	13,3%

Всеки един от четирите изследвани показателя е свързан с променливата за група ($p=0,006$ за алвеоларен остейт и $<0,001$ за останалите показатели). Посоката на връзката е видна на Фиг. 38-42, с нарастване номера на групата намалява дела на пациентите с наличие на оценените параметри.



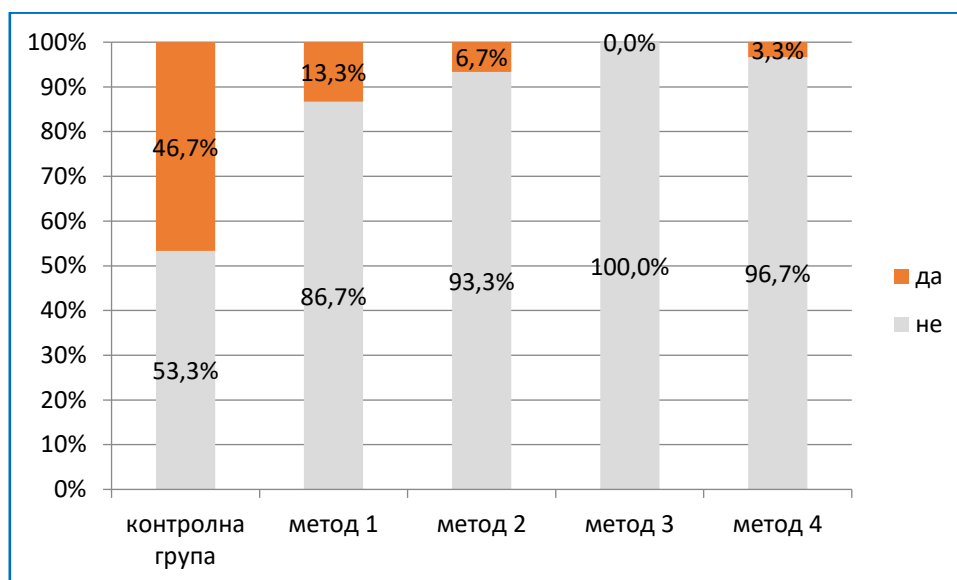
Фиг. 38. Разпределение на пациентите според наличие на алвеоларен остейт, по групи.

Най-тежкото постоперативно усложнение при ХЕ на ТДМЗ е развитието на алвеоларен остейт, който би могъл да премине в локализиран остеомиелит на долночелюстната кост. Симптоматично възпалителният процес се характеризира с подутина, пулсираща болка, трудно повлияваща се от аналгетици, ексудация от раната и дори повишена телесна температура. Данните от Фиг. 38 показват, че $<1/5$ от пациентите от контролната група са развили алвеоларен остейт, само 2-ма от експерименталната група с ТК по метод 1 са с такова усложнение и в останалите групи, няма разпространение.



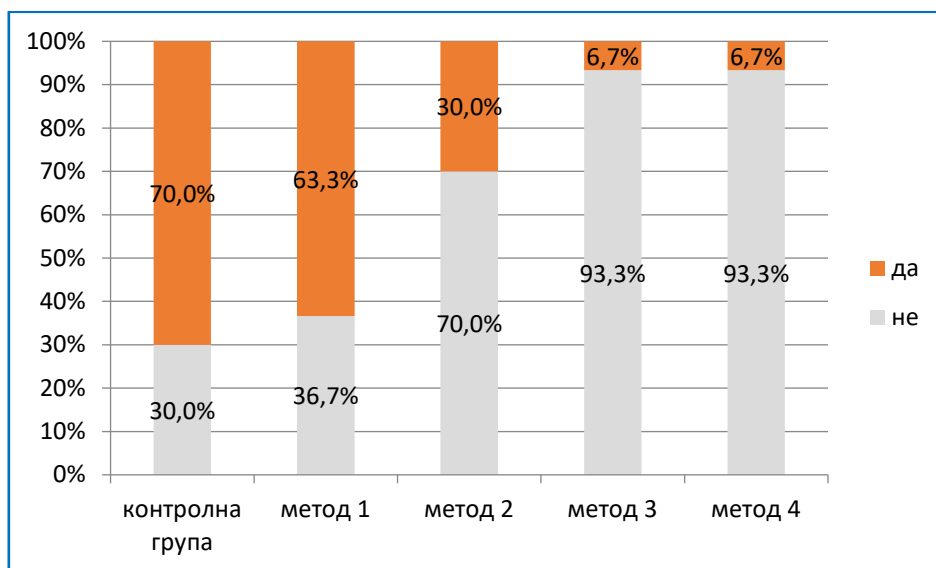
Фиг. 39. Разпределение на пациентите според наличие на алвеолит, по групи.

Идентични са данните по групи и според наличието на сух алвеолит (Фиг.39 – постекстракционно усложнение със следните симптоми: хронична болка с нисък интензитет, без подуване и ексудация в оперативното поле; без повишена обща температура. Резултатите показват категоричния лечебен и профилактичен ефект на ТК, получени по метод 3 и 4.



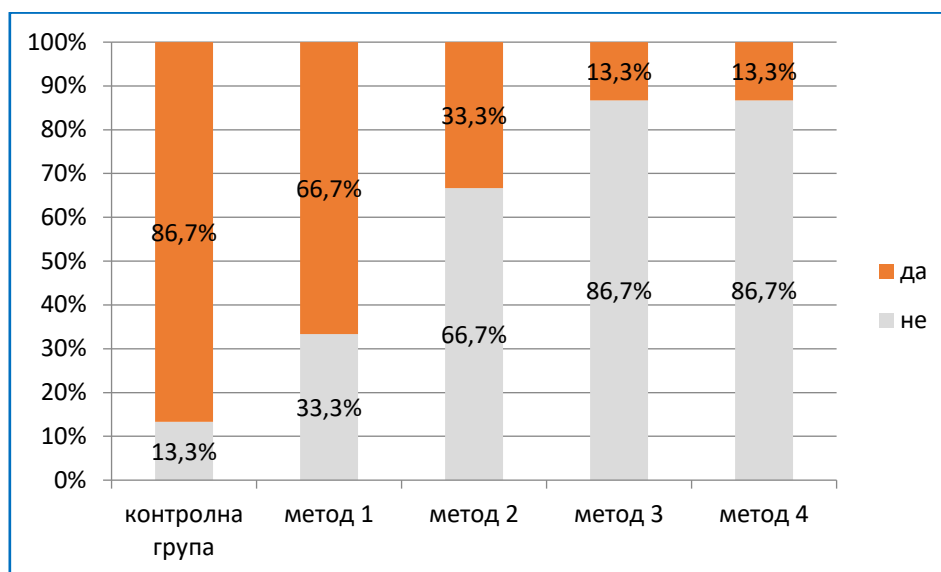
Фиг. 40. Разпределение на пациентите според наличие на постоперативно кървене, по групи

Фиг. 40 показва хемостатичния ефект на ТК при пациентите от всички експериментални групи и почти 50% от случаите в контролната група (без ТК) с персистиращо, след 48-мия час, кървене.



Фиг. 41. Разпределение на пациентите според наличие на персистиращ тризмус след 48-ми час, по групи.

По-честата поява на тризмуса сред пациентите се дължи на обичайния травматизъм, който съпровожда ХЕ на ДМ. Въпреки това от Фиг. 41 се вижда, че е минимално разпространен в групите с ТК по метод 3 и 4, докато при метод 1 и контролната група – почти няма разлика в резултатите.



Фиг. 42. Разпределение на пациентите според наличие на затруднено хранене, говор, работен процес след 48-ми час, по групи.

Анализът на разпространение на нарушените функции в устната кухина и забавянето относно възстановяване на нормалните ежедневни дейности на пациентите (Фиг.42) е идентичен с този от предходния изследван критерий.

Изследвана е връзката между резултатите и групите по двойки.

Табл. 10. Изследване на връзката между наличието на алвеоларен остейт и групите по двойки

Двойки групи		p
контролна група	метод 1	0,248
контролна група	метод 2	0,020
контролна група	метод 3	0,020
контролна група	метод 4	0,020
метод 1	метод 2	0,150
метод 1	метод 3	0,150
метод 1	метод 4	0,150
метод 2	метод 3	
метод 2	метод 4	
метод 3	метод 4	

Табл. 11. Изследване на връзката между наличието на алвеолит и групите по двойки.

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,605
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,002
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,389
метод 2	метод 4	0,389
метод 3	метод 4	0,999

Табл. 12. Изследване на връзката между наличието на постоперативно кървене и групите по двойки.

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,005
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,389
метод 1	метод 3	0,038

метод 1	метод 4	0,161
метод 2	метод 3	0,150
метод 2	метод 4	0,554
метод 3	метод 4	0,313

Табл. 13. Изследване на връзката между наличието на персистиращ тризмус след 48-ми час и групите по двойки.

Двойки групи		p
контролна група	метод 1	0,584
контролна група	метод 2	0,002
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,010
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,020
метод 2	метод 4	0,020
метод 3	метод 4	0,999

Табл. 14. Изследване на връзката между наличието на затруднено хранене, говор, работен процес след 48-ми час и групите по двойки.

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,067
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,010
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,067
метод 2	метод 4	0,067
метод 3	метод 4	0,999

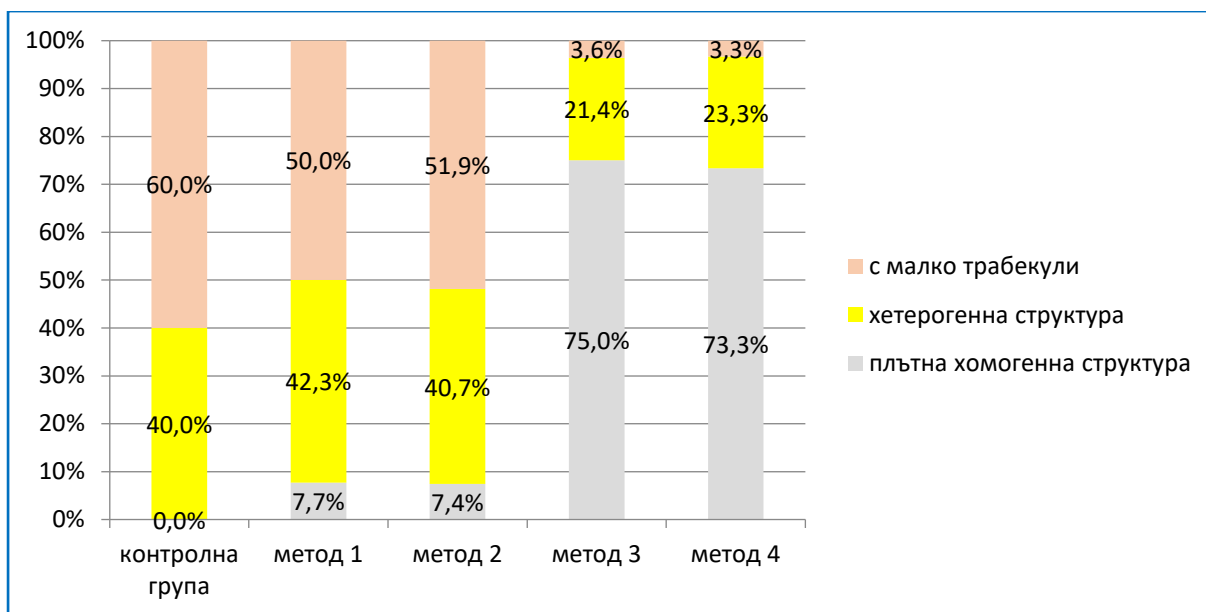
1.2. Сравнителен анализ на пациентите от проучваните групи – втори контролен преглед, 3-ти следоперативен месец

Клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург (3 следоперативен месец)

Табл. 15. Разпределение на пациентите според направения клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург (3-ти следоперативен месец), по групи.

		контролна група без прилагане на тромботичен концентрат		група с приложен тромботичен концентрат по метод 1		група с приложен тромботичен концентрат получен по метод 2		група с приложен тромботичен концентрат получен по метод 3		група с приложен тромботичен концентрат получен по метод 4	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург (3-ти следоп.м.)	плътна хомогенна структура	0	0,0%	2	7,7%	2	7,4%	21	75,0%	22	73,3%
	хетерогенна структура	10	40,0%	11	42,3%	11	40,7%	6	21,4%	7	23,3%
	с малко трабекули	15	60,0%	13	50,0%	14	51,9%	1	3,6%	1	3,3%

Доказа се връзка между направения клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми и групите ($p < 0,001$). Посоката на връзката е видна на Фиг. 43, с нарастване номера на групата нараства дела на пациентите с плътна хомогенна структура.



Фиг. 43. Разпределение на пациентите според направения клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург (3-ти следоперативен месец), по групи.

От посочените по-горе данни (Фиг. 43) се вижда, че търсената от всеки орален хирург, след оперативно отстраняване на ДМ, плътна хомогенна структура на регенерираната кост, има почти $\frac{3}{4}$ разпространение при пациентите с ТК по методи 3 и 4. В контролната група не се установява нито един случай, а в експерименталните групи с ТК по метод 1 и 2 – преобладава най-нежеланата от хирурзите рядка нехомогенна кост с малко трабекули.

Изследвана е връзката между резултатите и групите по двойки.

Табл. 16. Изследване на връзката между направения клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми и групите по двойки.

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,338
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001

контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,991
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	<0,001
метод 2	метод 4	<0,001
метод 3	метод 4	0,984

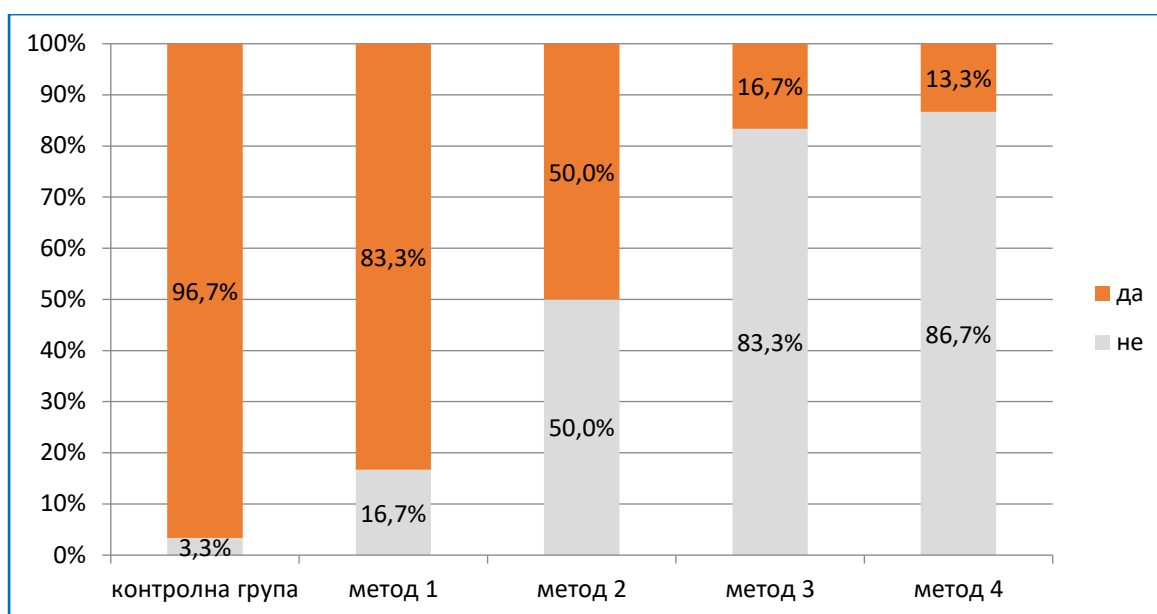
Клинични резултати при контролен преглед от орален хирург – 3-ти следоперативен месец

Табл. 17. Разпределение на пациентите според клиничните резултати при контролен преглед от орален хирург – 3-ти следоперативен месец, по групи.

		контролна група без прилагане на тромбоците и концентрат		група с приложен тромбоците и концентрат по метод 1		група с приложен тромбоците и концентрат получен по метод 2		група с приложен тромбоците и концентрат получен по метод 3		група с приложен тромбоците и концентрат получен по метод 4	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
чувствителност дистално при вторите долни молари	н	1	3,3%	5	16,7%	15	50,0%	25	83,3%	26	86,7%
	е	29	96,7%	25	83,3%	15	50,0%	5	16,7%	4	13,3%
дълбочина на пародонталния джоб дистално при долните втори молари >5мм	н	3	10,0%	5	16,7%	13	43,3%	28	93,3%	28	93,3%
	е	27	90,0%	25	83,3%	17	56,7%	2	6,7%	2	6,7%
задържане на храна в	н	3	10,0%	10	33,3%	23	76,7%	28	93,3%	28	93,3%
	е										

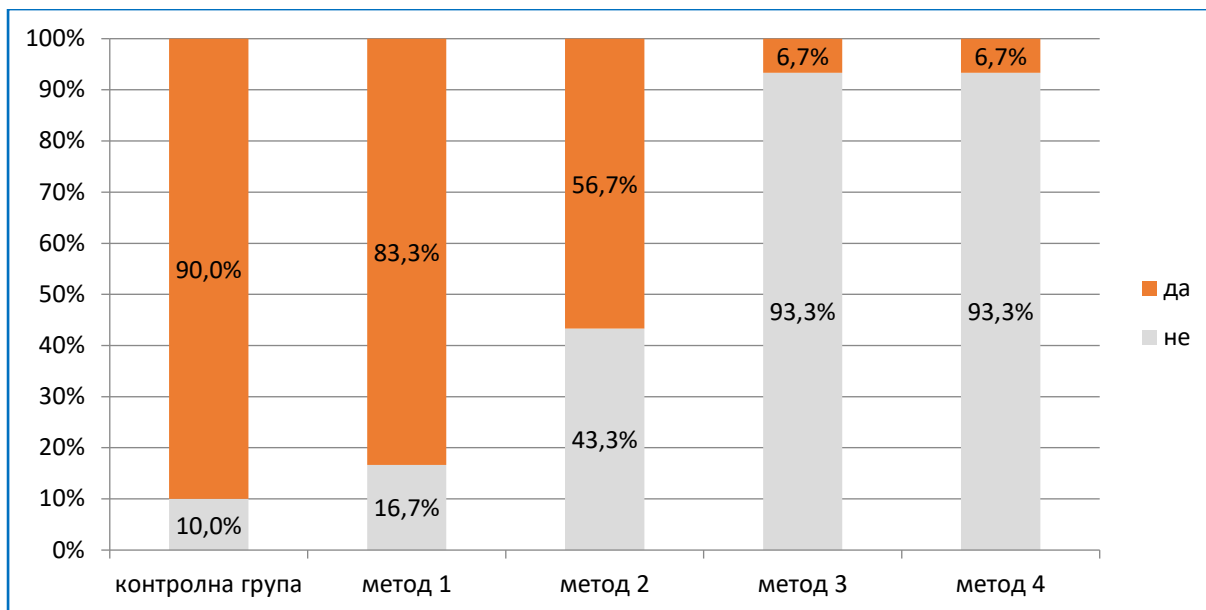
екстракционната рана	да	27	90,0%	20	66,7%	7	23,3%	2	6,7%	2	6,7%
халитоза въпреки личната орална хигиена	не	3	10,0%	10	33,3%	23	76,7%	28	93,3%	28	93,3%
	да	27	90,0%	20	66,7%	7	23,3%	2	6,7%	2	6,7%

И четирите проследени параметъра при контролния преглед имат връзка с групата, $p < 0,001$. Посоката на връзката е видна на Фиг. 44-47, с нарастване номера на групата намалява дела на пациентите с наличие на оценените параметри.



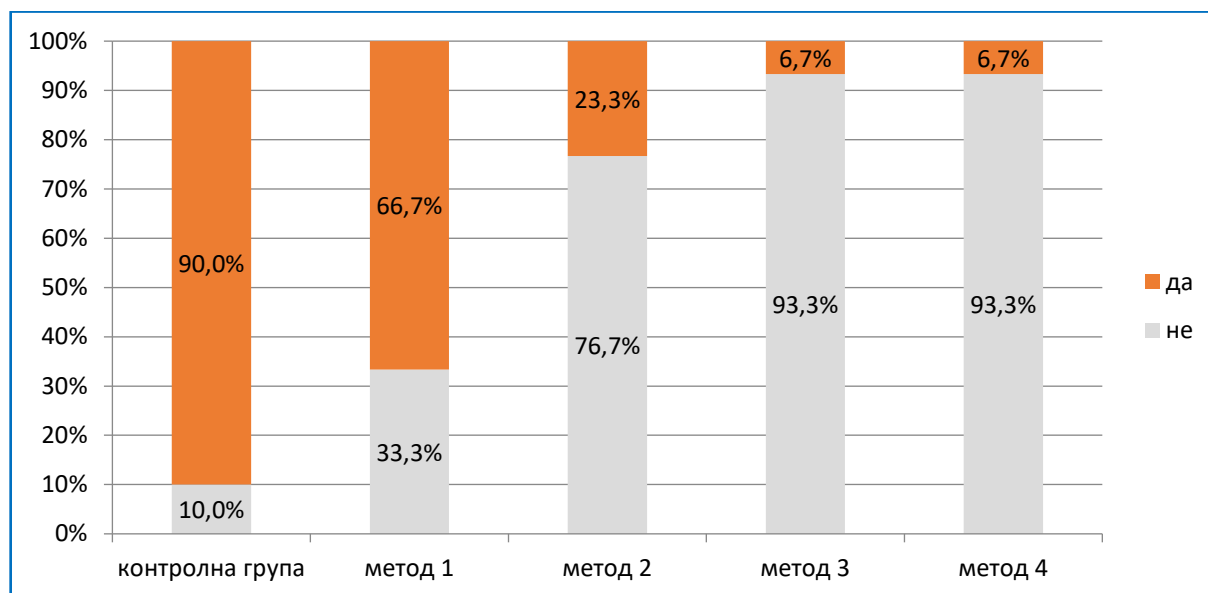
Фиг. 44. Разпределение на пациентите според наличието на чувствителност дистално при вторите долни молари, по групи.

Патологията дистално при 7-ми зъб следоперативно е често срещана и неприятна за пациентите, претърпели ХЕ на ДТМЗ. Данните от Фиг. 44 сочат изключителната ефективност на ТК по метод 3 и 4, както и абсолютната честота на поява при пациентите от контролната група и тези с ТК по метод 1.



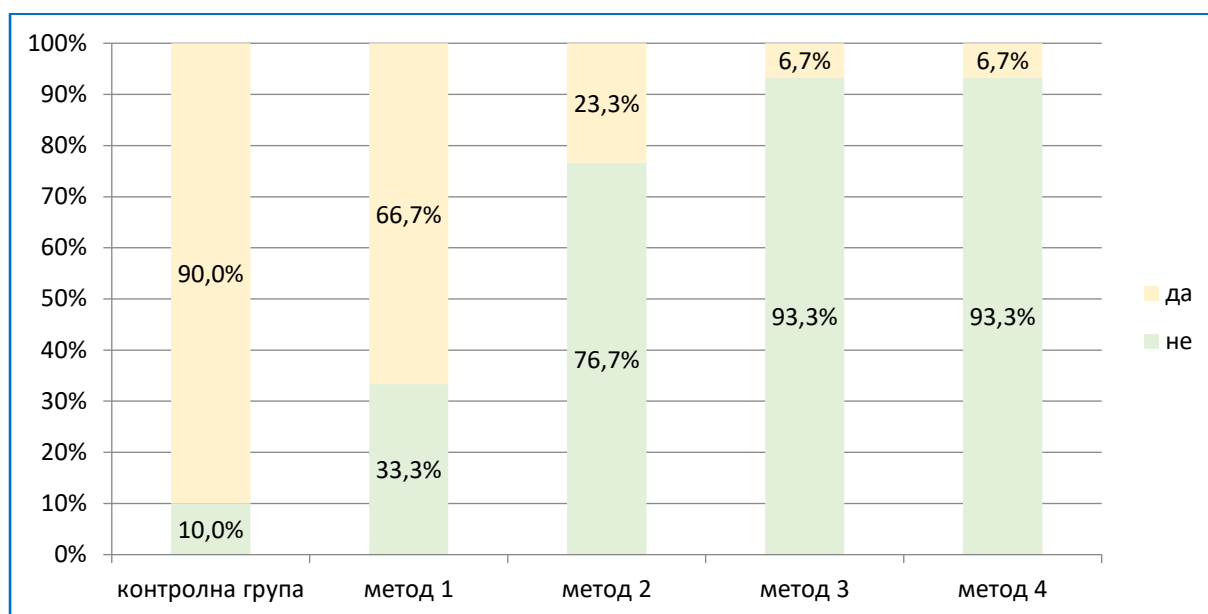
Фиг. 45. Разпределение на пациентите според наличието на дълбочина на пародонталния джоб дистално при долните втори молари >5мм , по групи.

Идентични са статистическите данни от клиничните ни резултати след сондиране във венечната бразда по задната повърхност на 7-ми зъб, дистално (Фиг. 45), по отношение ефективността на ТК, получен по четирите различни протоколи.



Фиг. 46. Разпределение на пациентите според задържане на храна в екстракционната рана, по групи.

Връзката между задържане на храна в раната поради костна резорбция и недостатъчна регенерация е показана на Фиг. 46. Отново в групите с ТК по метод 3 и 4 се установява почти пълно костно възстановяване, стимулирано от приложената БТП. Контролната група и тази с ТК по метод 1 резултат с непълноценно костно възстановяване.



Фиг. 47. Разпределение на пациентите според наличието на халитоза въпреки личната орална хигиена, по групи.

Изследвана е връзката между резултатите и групите по двойки.

Табл. 18. Изследване на връзката между наличието на чувствителност дистално при вторите долни молари и групите по двойки

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,085
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,006

метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,006
метод 2	метод 4	0,002
метод 3	метод 4	0,718

Табл. 19. Изследване на връзката между наличието на дълбочина на пародонталния джоб дистално при долните втори молари >5 мм и групите по двойки

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,448
контролна група	метод 2	0,004
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,024
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	<0,001
метод 2	метод 4	<0,001
метод 3	метод 4	0,999

Табл. 20. Изследване на връзката между наличието на задържане на храна в екстракционната рана и групите по двойки

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,028
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,001
метод 1	метод 3	<0,001
метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,071
метод 2	метод 4	0,071
метод 3	метод 4	0,999

Табл. 21 Изследване на връзката между наличието на халитоза въпреки личната орална хигиена и групите по двойки

Двойки групи		р
контролна група	метод 1	0,028
контролна група	метод 2	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001
метод 1	метод 2	0,001
метод 1	метод 3	<0,001

метод 1	метод 4	<0,001
метод 2	метод 3	0,071
метод 2	метод 4	0,071
метод 3	метод 4	0,999

Обобщение на сравнението по двойки групи

Метод 1 показва по-добри резултати спрямо контролната група само по отношение на 3 показателя: постоперативно кървене, задържане на храна в екстракционната рана и халитоза въпреки личната орална хигиена.

Метод 2 превъзхожда контролната група по 10 показателя – това са всички, без първия, индекса на Landry et al.

Методи 3 и 4 показват по-добри резултати спрямо контролната група, метод 1 и 2 по всички показатели.

Метод 2 превъзхожда метод 1 по 7 показателя, метод 3 и 4 превъзхожда 1 по 10 показателя, а метод 4 по 9 показателя.

Методи 3 и 4 са по-добри от 2 по 5 показателя.

Метод 4 не се доказва да е по-добър от 3 по нито един показател.

Табл. 22. Обобщение на сравнението на групите по двойки

Двойки групи		Определение на степента на оздравителния индекс чрез процеса на Lapdog et al (7 ^{мес} следоперативен ден)	алвеоларен остейт - пулсираща болка, подутина, повишена температура	алвеолит - болка, без подутина и ескулация, без повишена температура	постоперативно кървене	перистипраци тризмус след 48 ^{мес} час	загрудиено хранене, говор, работен процес след 48 ^{мес} час	Клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург (12 месеца)	чувствителност при вторите долни молари	дълбочина на пародонталния джоб при долните втори молари >5мм	задръжане на храна в екстракционна рана	халидоза выпреки личната орална хигиена
P												
контролна група	метод 1	0,547	0,248	0,605	0,005	0,584	0,067	0,338	0,085	0,448	0,028	0,028
контролна група	метод 2	0,14	0,02	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001
контролна група	метод 3	<0,001	0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
контролна група	метод 4	<0,001	0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
метод 1	метод 2	0,391	0,15	0,002	0,389	0,01	0,01	0,991	0,006	0,024	0,001	0,001
метод 1	метод 3	0,001	0,15	<0,001	0,038	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
метод 1	метод 4	0,001	0,15	<0,001	0,161	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
метод 2	метод 3	0,004		0,389	0,15	0,02	0,067	<0,001	0,006	<0,001	0,071	0,071
метод 2	метод 4	0,002		0,389	0,554	0,02	0,067	<0,001	0,002	<0,001	0,071	0,071
метод 3	метод 4	0,558		0,999	0,313	0,999	0,999	0,984	0,718	0,999	0,999	0,999

1.3. Сравнителен анализ при проучвани групи пациенти – трети контролен преглед, 6-ти следоперативен месец

Статистически методи: резултатите са представени като абсолютни честоти (n) и относителни честоти (%) на пациентите в отделните групи. Сравнението между групите е направено с хи квадрат анализ (екзактен тест на Фишер, когато е приложим).

Проследени са 150 пациента, разпределени в 5 групи, както следва: контролна група с екстрахирани долни трети моларни зъби без приложен тромбоцитен концентрат - 25 пациенти; група пациенти с екстрахирани долни трети моларни зъби и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 1-26 пациенти; група пациенти с екстрахирани долни трети моларни зъби и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 2-27 пациенти; група пациенти с екстрахирани долни трети моларни зъби и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 3-28 пациенти; група пациенти с екстрахирани долни трети моларни зъби и приложен тромбоцитен концентрат получен по метод 4-30 пациенти.

Пациентите са проследени на 6-тия месец след интервенцията. Резултатите са сравнени по два показателя: анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург и дълбочина на пародонталния джоб при сондиране зад долните втори молари.

Не се доказаха значими различия между отделните групи нито за цялата извадка, нито по двойки, по отношение резултатите от анализа на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург ($p > 0,05$), Табл. 23 и Табл. 24. Търсената като нормален оздравителен процес, след ХЕ на ТДМЗ, плътна хомогенна костна структура е налице в около 80% от клиничните случаи. Приемаме, че е невъзможно нейното теоретично разпространение от 100% - 6 месеца след операцията, поради индивидуални биологични особености на всеки пациент, свързани както с генетиката, така и с режима на хранене и професионални вредности (сн. 19, 20, 21, 22,23).

Табл. 23. Разпределение на пациентите от петте проследени групи според анализа на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург на 6-тия месец след операцията

p=0,988	Клиничен анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург - 6 месеца след зъбните екстракции					
	плътна хомогенна структура		хетерогенна структура		с малко трабекули	
	n	%	n	%	n	%
контролна група без приложен тромбоцитен концентрат	20	80,0%	5	20,0%	0	0,0%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 1	21	80,8%	5	19,2%	0	0,0%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 2	21	77,8%	6	22,2%	0	0,0%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 3	23	82,1%	5	17,9%	0	0,0%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 4	25	83,3%	5	16,7%	0	0,0%

Табл. 24. Резултати от сравнението по двойки групи на анализа на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург на 6-тия месец след операцията

	p
контролна група-метод1	0,945
контролна група-метод2	0,945
контролна група-метод3	0,942
контролна група-метод4	0,750
метод1-метод2	0,788

метод1-метод3	0,897
метод1-метод4	0,803
метод2-метод3	0,686
метод2-метод4	0,740
метод3-метод4	0,999



Сн. 19. Ортопантомограма - 6 месеца след оперативна екстракция на десен долен мъдрец, на пациент от контролната група, без приложен ТК – плътна хомогенна костна структура; трети контролен преглед



Сн. 20. Ортопантомограма – 6 месеца след оперативно отстраняване на ляв долен мъдрец, на пациент от експерименталната група, с приложен ТК по метод 1 – плътна хомогенна костна структура; трети контролен преглед



Сн. 21. Ортопантомограма – 6 месеца след оперативно отстраняване на ляв долен мъдрец, на пациент от експерименталната група, с приложен ТК по метод 2 – плътна хомогенна костна структура; трети контролен преглед (за уточнение – 36,37 зъби са екстрахирани три месеца след 38-ми, без ТК интраоперативно)



Сн. 22. Ортопантомограма – 6 месеца след оперативно отстраняване на ляв долен мъдрец, на пациент от експерименталната група, с приложен ТК по метод 3 – плътна хомогенна костна структура; трети контролен преглед)



Сн. 23. Ортопантомограма – 6 месеца след оперативно отстраняване на ляв долен мъдрец, на пациент от експерименталната група, с приложен ТК по метод 4 – плътна хомогенна костна структура; трети контролен преглед)

Не се доказаха значими различия между отделните групи нито за цялата извадка, нито по двойки, по отношение резултатите от дълбочината на пародонталния джоб при сондиране зад долните втори молари, 6-ти следоперативен месец ($p > 0,05$), Табл. 25 и

Табл. 26. Диагностицирането на патологичен пародонтален джоб при дисталния корен на 7-ми зъб >5мм се установи в спорадични случаи от всички изследвани групи, което бихме могли да обясним отново с наследствените фактори на всеки пациент, както и с начина им на живот (сн.24, 25). Установяването над 95% липса на такъв венечен джоб сред всички участници в проучването, 6 месеца следоперативно отговаря на изискванията за нормално протекъл костен и мекотъканен оздравителен процес.

Табл. 25. Разпределение на пациентите от петте проследени групи според дълбочината на пародонталния джоб при сондиране зад долните втори молари, 6-ти следоперативен месец

p=0,947	Дълбочина на пародонталния джоб при сондиране зад долните втори молари, 6-ти следоперативен месец			
	наличие на пародонтален джоб < 5мм		наличие на пародонтален джоб > 5мм	
	n	%	n	%
контролна група без приложен тромбоцитен концентрат	24	96,0%	1	4,0%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 1	25	96,2%	1	3,8%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 2	25	92,6%	2	7,4%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 3	27	96,4%	1	3,6%
група с приложен тромбоцитен концентрат по метод 4	29	96,7%	1	3,3%

Табл. 26. Резултати от сравнението по двойки групи на дълбочината на пародонталния джоб при сондиране зад долните втори молари, 6-ти следоперативен месец

	p
контролна група-метод 1	0,999
контролна група-метод 2	0,999
контролна група-метод 3	0,999
контролна група-метод 4	0,999
метод 1-метод 2	0,999
метод 1-метод 3	0,999
метод 1-метод 4	0,999
метод 2-метод 3	0,611
метод 2-метод 4	0,599
метод 3-метод 4	0,999



Сн. 24. Спорадични случаи в петте групи с възстановена плътна хомогенна костна структура и наличие на пародонтален джоб >5мм, дистално при втория долен мolar (6 месеца след хирургичната екстракция на 48-ми зъб)



Сн. 25. Преобладаващи случаи в петте групи с възстановена плътна хомогенна костна структура, без наличие на пародонтален джоб, дистално при втория долен молар (6 месеца след хирургичната екстракция на 38-ми зъб)

1.4. Сравнителен анализ при проучваните пациенти на резултатите между 3-ти и 6-ти следоперативен месец

Сравнението между резултатите на 3 и 6 следоперативен месец е направено с тестовите на Уилкоксън (при три категории на сравняваната променлива) и МакНемар (при две категории). Сравненията са направени за цялата извадка, както и за всяка група по отделно: контроли, пациенти с тромбоцитен концентрат по методи 1, 2, 3 и 4. Тъй като част от пациентите не са проследени на 6-тия следоперативен месец, те са изключени от анализа. Резултатите при стойности на $p < 0,05$ са приети за значими.

По отношение постоперативните ортопантомограми, се доказва значима промяна в посока подобрение на цялата извадка, както и сред контролите и пациентите с тромбоцитен концентрат, получен по методите 1 и 2 ($p < 0,001$). За пациентите по метод 3 не се доказва значима промяна ($p > 0,05$), вероятно защото голяма част от тях са показали много добри резултати още на 3-тия следоперативен месец. Пациентите, получили тромбоцитен концентрат по метод 4, показаха значимо подобрение, но значимостта му е близка до граничната ($p = 0,046$) защото и при тях е имало значимо подобрение още на 3-тия следоперативен месец.

Табл. 27. Разпределение на пациентите – общо и по групи, според резултатите от клиничния анализ на постоперативни ортопантомограми чрез субективна визуална оценка от орален хирург на 3-ти и 6-ти следоперативен месец

Групи	Резултати	3 м		6 м		p
		n	%	n	%	
за цялата извадка	плътна хомогенна структура	47	34,60%	110	80,90%	<0,001
	хетерогенна структура	45	33,10%	26	19,10%	
	с малко трабекули	44	32,40%	0	0,00%	
контролна група	плътна хомогенна структура	0	0,00%	20	80,00%	<0,001
	хетерогенна структура	10	40,00%	5	20,00%	
	с малко трабекули	15	60,00%	0	0,00%	
метод 1	плътна хомогенна структура	2	7,70%	21	80,80%	<0,001
	хетерогенна структура	11	42,30%	5	19,20%	
	с малко трабекули	13	50,00%	0	0,00%	
метод 2	плътна хомогенна структура	2	7,40%	21	77,80%	<0,001
	хетерогенна структура	11	40,70%	6	22,20%	
	с малко трабекули	14	51,90%	0	0,00%	
метод 3	плътна хомогенна структура	21	75,00%	23	82,10%	0,083
	хетерогенна структура	6	21,40%	5	17,90%	
	с малко трабекули	1	3,60%	0	0,00%	
метод 4	плътна хомогенна структура	22	73,30%	25	83,30%	0,046
	хетерогенна структура	7	23,30%	5	16,70%	
	с малко трабекули	1	3,30%	0	0,00%	

Наличието на пародонтален джоб >5мм показва значима промяна в посока подобрение, при сравняване на 3-ти и 6-ти следоперативен месец: за цялата извадка, за контролната група и за пациентите, получили тромбоцитен концентрат по методите 1 и 2 ($p < 0,001$). За групите на пациентите, при които е приложен тромбоцитен концентрат по методите 3 и 4 не се доказва значима промяна ($p > 0,05$), защото при почти всички от тях дълбочината на пародонталния джоб е била под 5 мм още на 3-тия следоперативен месец.

Табл. 28. Разпределение на пациентите – общо и по групи, според резултатите от измерената дълбочина на пародонталния джоб дистално при долните втори молари (под или над 5мм) на 3-ти и 6-ти следоперативен месец

Групи	Резултати	3 m		6 m		p
		n	%	n	%	
цялата извадка	наличие на пародонтален джоб < 5мм	65	47,80%	130	95,60%	<0,001
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	71	52,20%	6	4,40%	
контролна група	наличие на пародонтален джоб < 5мм	0	0,00%	24	96,00%	<0,001
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	25	100,00%	1	4,00%	
метод 1	наличие на пародонтален джоб < 5мм	1	3,80%	25	96,20%	<0,001
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	25	96,20%	1	3,80%	
метод 2	наличие на пародонтален джоб < 5мм	10	37,00%	25	92,60%	<0,001
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	17	63,00%	2	7,40%	
метод 3	наличие на пародонтален джоб < 5мм	26	92,90%	27	96,40%	0,999
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	2	7,10%	1	3,60%	
метод 4	наличие на пародонтален джоб < 5мм	28	93,30%	29	96,70%	0,999
	наличие на пародонтален джоб > 5мм	2	6,70%	1	3,30%	

Лимитиращи фактори

За лимитиращи фактори на настоящото проучване приемаме, че за оценка на терапевтичните резултати относно качеството и обема на новосформираната кост в трите равнини след прилагане на БТП, е желателно всички изследвани пациенти да имат освен ОПГ и направени компютърни триизмерни, с напречни сечения томографии на челюстите на 3-ти и 6-ти следоперативен месец. Трябва да отбележим също, че не всички военнослужещи се явиха на контролните прегледи с исканите от на ОПГ, направени на еднакъв рентгенов апарат. Недостатък може да бъде и липсата на компютърен автоматизиран софтуерен анализ на следоперативните ОПГ чрез хистограми, доказващи плътността на регенерираната костна структура в оперативните дефекти. Предполага се, че рентгенологичната оценка на постоперативните резултати, групите с и без ТК, може да се комбинира, за по-голяма достоверност, с костни биопсии 3 и 6 месеца след операцията, от мястото на проведената хирургична интервенция. С тази искана от нас хистологична оценка, пациентите ни не бяха съгласни, поради необходимостта от създаване на ново оперативен процес, изискващ отново възстановителен период. Що се отнася до набирането на пациенти, противопоказание за участие в проучването беше

наличието на придружаващи заболявания и състояния, изброени в „Дизайн на проучването”.

Финансов анализ

Общо 150 са участниците в нашето проучване. Всички те са приети в стационара на ООХ при ВМА-гр. София. Всички изследвани пациенти са воннослужещи, заемащи различни длъжности в структурите, подчинени на министерство на отбраната. Оказването на необходимата в случая хирургична екстракция на трети долен моларен зъб се поема от бюджета. Използваните консумативи, свързани с оперативната процедура, както и с добиването на тромбоцитните концентрати, приложени при 120 от всички проучвани пациенти, също са реимбурсирани от военното министерство.

VII. ИЗВОДИ

Автоложните PRP продукти са широко промотирани като възможност за лечение и подобряване на зарастването на костни, както и мекотъканни атонични рани чрез насърчаване на образуване на грануляционна тъкан.

Богата на тромбоцити плазма все повече се използва като ефективно средство за възстановяване на костите и тъкани в областта на всички направления – традиционни и авангардни, от денталната хирургия, както и при поставяне на зъбен имплант.

PRP продуктите придобиват все по-нарастваща популярност и е общоприето схващането, че правилната стратегия в постигане на адекватен оздравителен процес, е използването на автоложна богата на тромбоцити плазма, съдържаща растежни фактори, която се аплицира директно (локално) на местата с костни хирургични интервенции, мекотъканни рани или други видове наранявания.

Проведеното собствено проучване доведе до следните изводи:

1. Прилагането на БТП/ТК (PRP) в костните дефекти на челюстите може да се прилага в допълнение към някои от стандартните оперативни методи в оралната хирургия, най-често срещания от които е хирургичната екстракция на долен трети моларен зъб.
2. Използването на ТК в следекстракционните дефекти на долния мъдрец стимулира и оптимизира костния и мекотъканен оздравителен процес.
3. След проведените сравнителни анализи в петте проучвани от нас групи, между контролната/експерименталните пациенти, установихме лечебен и профилактичен ефект на действие на ТК.
4. Потвърдиха се съществуващите литературни данни относно клиничните резултати на ТК, в зависимост от начина на добиването им – многобройните протокола за извличане на БТП водят до различни последствия върху оздравителните процеси, като някои от тях почти нямат клинично значение.
5. Използваните от нас 4 метода за извличане на ТК (по Иванова и сътр.) са обект на предшестваш научно-практичен труд, където са детайлно анализирани

получените биологични субстрати – количеството на формените елементи и основни действащи протеини (PDGF-AB, TGF-beta1 и др.), в зависимост от необходимото клинично приложение.

6. Нашите клинични резултати, в зависимост от използваните 4 протокола за получаване на БТП, потвърждават разликите между тях и показват кои от тях са за предпочитане при проучваното от нас оперативно отстраняване а долен мъдрец.
7. Прилагането на ТК подобрява комфорта на пациента в ранния следоперативен период, до 7 дни след операцията, както и профилактира появата на постхирургични усложнения. Превенцията се дължи на факта, че БТП е физиологичен антибиотик – рН 6,6.
8. Добавен, следекстракционно, ТК предпазва и разпространение на късни следоперативни усложнения, свързани с патология на втори долен молар.
9. Пациентите, при които приложихме БТП, съобщават за по-бързо локално и общо възстановяване следоперативно, свързано със своевременно връщане към нормалните им рутинни задължения, особено когато се касае за военни авиатори от структурите на Военновъздушните сили на Република България
10. Методологията за извличане и ползване на БТП е безопасна, ефективна (извличането на автоложните ТК бе реализирано от налични в структурата ни медицински професионалисти в болничен стационар) с възможност за 8-часова продължителност на оперативната интервенция, поради жизнеността на активираните тромбоцити за този период от време.
11. Финансовият анализ на самостоятелното прилагане на PRP е в полза на пациента.
12. Методологията с използване на извлечен автогенен ТК, при хирургия на долен трети молар, не изисква продължителен болничен престой и не удължава времето на оперативната дейност, поради предварителното му изготвяне.

VIII. ПРИНОСИ

С оригинален характер:

1. За първи път в България, във Военномедицинска академия, е изготвено предложение за авангарден алгоритъм на поведение при летците от военната авиация, нуждаещи се от хирургична екстракция на долен трети моларен зъб, а именно – добавяне в следекстракционния дефект на автоложна БТП. Основна цел – максимално бързо и пълноценно възстановяване на длъжностните ангажменти в летателното пространство на Република България.

С приложен характер:

2. Анализирани са следоперативните затруднения, свързани с изпълняване на ежедневните дейности според длъжностните характеристики сред военнослужещите, при най-често използвания оперативен метод в нашето отделение по орална хирургия –хирургична екстракция на долни трети моларни зъби.
3. Изведени са необходимите мерки за оптимизиране, нуждаещи се от стимулиране на костния оздравителен процес след хирургична екстракция на долни мъдреци, чрез използване на автоложни тромбоцитни концентрати.
4. Създаден е алгоритъм на поведение в Отделението по орална хирургия при ВМА гр. София - при хирургична екстракция на долни трети молари, при военнослужещите, да се прилага БТП в следекстракционните дефекти по стандартизирани за страната ни протокол 3 и 4 - по Иванова и сътр.

С потвърдителен характер:

5. Доказан е стимулиращия ефект на ТК по отношение на ранния възстановителен период след хирургия на долен мъдрец, осигуряващ своевременно качествено ежедневие на пациентите.
6. Установена е оптимизирана костна регенерация в оперативната рана и профилактика на последваща патология при втори долен молар, в резултат от действията на тромбоцитния концентрат, 3 месеца след хирургичната интервенция.

7. Потвърдено е, че клиничните следоперативни резултати при хирургия на долен мъдрец, корелират с техниката на получаване на тромбоцитния концентрат, т.е. налице е пряка зависимост от количеството, концентрацията на клетъчните компоненти и действащите протеини в тях.
8. Потвърдено е, че добивът на обогатена с тромбоцити плазма е надежден при използване на ръчни методи със стандартна малка лабораторна центрофуга, без помощта на затворени търговски комплекти и китове, което прави методологията лесно изпълнима и надеждна при стандартни условия, дори и в амбулаторната дентална хирургична практика.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото проучване представя вариация на травматичния оперативен метод по отстраняване на долни трети моларни зъби, който в голям процент от случаите е свързан с нарушаване качеството на живот на пациентите, следоперативно. Предлагаме добавяне на автоложен тромбоцитен концентрат, интраалвеоларно в следекстракционните дефекти, извлечен по някои от новите стандартизирани за страната ни протоколи, което води до стимулиране на обичайно тежкия следекстракционен период, без развитие на усложнения. Смеем да заявим, че тази рационализация е в абсолютна полза на съвременния пациент и не смущава ежедневните му дейности.

БЛАГОДАРНОСТИ:

В заключение изказвам благодарности на:

- *Научния ми ръководител проф. Росен Господинов Коларов, д.м. – за под-крепата и помощта при разработването, анализа и подготовката на дисертационния труд*
- *Проф. Стефан Василев Пеев, д.м.н. – за споделения професионален опитотносно PRP добиване и приложение*
- *ФДМ при МУ-Варна, Катедра по орална хирургия, където е представен и защитен дисертационния труд*
- *Ръководството на ВМА-гр.София, където е проведена практическата част от научното изследване;*
- *Всички мои колеги за споделения опит, професионална и техническа помощ при извършване на експерименталната част; за последващото статистическо и технологично оформление на дисертационния труд*
- *Николета Иванова и сътр. за използваните техни научно-практични ре-зултати за целите на собственото проучване*

Х. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Анкетна карта

(първи контролен преглед - 7-ми следоперативен ден)

Уважаеми пациенти,

Това проучване цели да установи има ли и какви са предимствата на приложената Ви в устната кухина богата на тромбоцити плазма след хирургична екстракция на трети долен молар, на 7-ми следоперативен ден.

Моля, отговорете с „да“ и „не“ (подчертайте вярното) на зададените въпроси, касаещи периода 48 часа след оперативната процедура!

Пол:

Възраст:

Диагноза: а) Dentitio difficilis

б) Cysta parodontalis

в) Cysta follicularis/Keratocysta

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат)

а) да

б) не

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат), извлечен по:

а) метод 1

б) метод 2

в) метод 3

г) метод 4

1. Приемахте ли системно аналгетици след 48-мия час от оперативната интервенция?
 - а) да
 - б) не
2. Имахте ли ясно изразена подутина на бузата, пулсираща болка в раната, повишена телесна температура след 48-мия час, което наложи консултация с член от екипа ни преди 7-ми следоперативен ден?
 - а) да
 - б) не
3. Страдахте ли от персистираща болка с постоянен интензитет, без ексудация от оперативната рана, без повишена телесна температура?
 - а) да
 - б) не
4. Продължи ли кървене от раната след 48-мия час от операцията?
 - а) да
 - б) не
5. Имахте ли ограничено отваряне на устата до 1см (тризмус), което продължи почти цялата следоперативна седмица?
 - а) да
 - б) не
6. Затруднено ли беше храненето и говорната функция, без значение от конкретната локална причина?
 - а) да
 - б) не
7. Имаше ли съществени смущения с реализиране на ежедневните Ви занимания (невъзможност за възстановяване на служебните ангажименти 48 часа, следоперативно)?
 - а) да
 - б) не

Благодаря за отделеното време!

Приложение 2

Анкетна карта

(втори контролен преглед – 3-ти следоперативен месец)

Уважаеми пациенти,

Това проучване цели да установи има ли и какви са предимствата на приложената Ви в устната кухина богата на тромбоцити плазма след хирургична екстракция на трети долен молар, на 3-ти месец след оперативната процедура.

Моля, отговорете с „да“ и „не“ (подчертайте вярното) на зададените въпроси!

Пол:

Възраст:

Диагноза: а) Dentitio difficilis

б) Cysta parodontalis

в) Cysta follicularis/Keratocysta

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат)

а) да

б) не

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат), извлечен по:

а) метод 1

б) метод 2

в) метод 3

г) метод 4

1. Бихте ли определили като чувствителен долния втори молар (от страната на екстрахирания мъдрец) – има ли оплаквания от студено и сладко по време на хранене?
 - а) да
 - б) не
2. Усещате ли повишена чувствителност при долния втори молар (след отстраняване на мъдреца) при говор и дишане, когато сте навън, на студено (попълва се в зависимост от периода на оперативната интервенция и налични ниски температури през календарната година)?
 - а) да
 - б) не
3. Имате ли неприятен вкус в устата, дори и след щателно измиване на зъбите?
 - а) да
 - б) не
4. Задържа ли се често храна, изискваща повишено внимание при почистване на зъбите (лична орална хигиена), зад втория молар, останал последен зъб в долната редица, след екстракцията на мъдреца?
 - а) да
 - б) не
5. Ако сте посетили дентален лекар през този период, казал ли Ви е, че имате джоб зад 7-ми зъб, от страната на операцията?
 - а) да
 - б) не

Благодаря за отделеното време!

Приложение 3

Анкетна карта

(трети контролен преглед – 6-ти следоперативен месец)

Уважаеми пациенти,

Това проучване цели да установи има ли и какви са предимствата на приложената Ви в устната кухина богата на тромбоцити плазма след хирургична екстракция на трети долен молар, на 6-ти месец след оперативната процедура.

Моля, отговорете с „да“ и „не“ (подчертайте вярното) на зададените въпроси!

Пол:

Възраст:

Диагноза: а) Dentitio difficilis

б) Cysta parodontalis

в) Cysta follicularis/Keratocysta

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат)

а) да

б) не

БТП/ТК (богата на тромбоцити плазма/тромбоцитен концентрат), извлечен по:

а) метод 1

б) метод 2

в) метод 3

г) метод 4

1. Бихте ли определили като по-чувствителен долния втори молар, от страната на екстрахирания мъдрец, в резултат на термични и/или вкусови дразнителі?
 - а) да
 - б) не
2. Имате ли неприятен вкус в устата, дори и след щателно измиване на зъбите?
 - а) да
 - б) не
3. Задържа ли се често храна, изискваща фокусирано почистване на зъбите при втория молар, останал последен зъб в долната редица, след екстракцията на мъдреца?
 - а) да
 - б) не
4. Посещавали ли сте по-често от обичайно дентален лекар през този период, поради нуждата от професионално почистване при 7-ми зъб, от страната на операцията?
 - а) да
 - б) не

Благодаря за отделеното време!

Приложение 4

Информирано съгласие за флеботомия и получаване на богата на тромбоцити плазма

I. Какво представлява БТП

Д – р препоръчва употребата на богата на тромбоцити плазма за подобряване на Вашия локален и общ оздравителен процес. БТП е компонента на Вашата собствена кръв, която съдържа растежни фактори, познати като стимули на костното и мекотъканното постоперативно възстановяване. Получаването ѝ става от собствената Ви цяла кръв по стерилен начин и затова Вие сте предпазени от заразяване с болести от други хора.

За да се получи необходимата БТП трябва да бъдат изтеглени около 10 мл. Ваша кръв от антекубиталната вена чрез асептична техника. Рискът, асоцииран с тази манипулация, е изключително нисък: съществува далечна възможност от прилошаване, гадене, флебит, посиняване или увреда на съседни нерви. Взетата кръв се центрофугира в специално устройство за определено време на определени обороти в минута. Полученият кръвен субстрат се активира с калциев глюконат, след което се поставя в оперативната рана, за да се реализира стимулиращия ефект на така извлечения тромбоцитен концентрат.

Аз, г – н/г – жа/, участвам доброволно в настоящото проучване. Информиран/а съм за начина на получаване на БТП и прилагането ѝ като част от моя лечебно – оздравителен план. Съгласен/на съм да ми се вземе необходимото количество кръв, която да се подложи на процедурата за извличане на тромбоцитен концентрат, която ми беше обяснена от моя лекуващ лекар. Съгласен/на съм извлечената от собствената ми кръв концентрирана тромбоцитна плазма да бъде поставена в раната ми, в устната кухина, за да подобри и стимулира оздравителния процес.

II. Обяснение на рисковете и причините за дискомфорт

Аз разбирам, че PRP се прилага локално и може да причини временно раздразнение при някои пациенти. Също така ми е ясно, че тегленето на кръвта става с игли и вакутейнери чрез убождаване във вената на ръката или някое друго място. Докато аспирирането на кръвта включва минимален риск, то съществува теоретична възможност от появата на гадене, повръщане, отпадналост, виене на свят, формиране на кожен хематом в мястото на убождаване, натъртване, кръвозагуба или суперпониране на инфекция.

I. Обяснение на ползите от БТП

Информиран/а съм, че лечението с БТП е само част от моята оздравителна програма. Зная, че прилагането на БТП води до ускоряване на оздравителния процес в устната ми кухина, но не е гаранция за стопроцентово здраве.

II. Допълнителна информация

Ясно ми е, че съм свободен/на да се отегля от предложеното ми лечение с БТП по всяко време. Това не означава, че ще компрометирам възможността да продължа с традиционните оперативни методи. Ако имам въпроси по време на моето лечение, аз мога да контактувам с лекуващия ми лекар или член от екипа му по всяко едно време.

.....

Три имена на пациента

Дата/Подпис

.....

Лекуващ лекар

Дата/Подпис

Приложение 5

Известие

за защита на данните на изследваните лица (пациенти), участници в научно изследване на тема *"КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРИЛОЖЕНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИ КОНЦЕНТРАТИ В ПОСТЕКСТРАКЦИОННИ УЧАСТЪЦИ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА НОВИ ПРОТОКОЛИ ЗА ДОБИВАНЕ НА БОГАТА НА ТРОМБОЦИТИ ПЛАЗМА"*, провеждано в Медицински университет „Проф. Д-р П. Стоянов“ – Варна, практическа база – ООХ, ВМА-София, с главен изследовател: д-р Атанаска Чешмеджиева

Администратор на лични данни: Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна, адрес: гр. Варна, ул. “Марин Дринов“ 55, ЕИК 000083633.

Каква е целта на този документ?

Това известие описва как събираме и използваме личната Ви информация преди, по време и след приключване на научните изследвания с Ваше информирано съгласие за участие. Всички дейности, описани тук, са в съответствие с Общия регламент за защита на данните (Регламент 2016/679) (ОРЗД). <https://www.cpdp.bg/?p=element&aid=991>

Важно е да прочетете внимателно това известие, за да разберете как и защо използваме Вашата лична информация.

I. С каква информация разполагаме за Вас?

„Лични данни“ или „лична информация“ означава всяка информация за физическо лице, чрез която това лице е или може да бъде идентифицирано.

Ние ще събираме, съхраняваме и използваме следните категории лични данни за Вас:

- *Попълва се за конкретното проучване (например, име; възраст; пол; телефонен номер и др).*

Също така ще обработваме и следните специални категории, по-чувствителни данни за Вас:

- Информация за Вашето здравословно състояние получена в резултат от изследване или преглед на част от тялото или на телесно вещество, включително от генетични данни и биологични проби; и всякаква информация, например за заболяване, увреждане, риск от заболяване, медицинска история, клинично лечение или физиологично или биомедицинско състояние.

II. Как събираме Вашите лични данни?

Ние събираме Вашите лични данни по време на подбора на участниците, включването в научното изследване, провеждането на самото научно изследване, анализиране на резултатите. Предоставянето на тази информация се осъществява или директно от Вас като пациент/доброволец или чрез достъп до медицинска документация.

III. Как ще използваме Вашите лични данни?

Ние ще използваме Вашите лични данни, само когато това е позволено от законодателството и е свързано с целите на научното изследване.

IV. Ако не ни предоставите личните данни, които ние изискваме

Отказът да предоставите необходимата информация възпрепятства Вашето участие в научното изследване.

V. Промяна на целите

Ако трябва да използваме Вашите лични данни за друга цел, ще Ви уведомим за това и ще Ви обясним какво е правното основание за тази промяна.

VI. Някои от нашите основни задължения като администратор

Ние ще използваме информация за Вашето физическо и психическо здраве, за да изпълним целите на научното изследване, да осигурим Вашето здраве и безопасност, да вземем необходимите мерки за намаляване на потенциалните рискове и да положим необходимите грижи в случай на инцидент или усложнение във връзка с провеждането на проучването.

VII. Необходимо ли ни е Вашето изрично съгласие?

С настоящето уведомление Ви предоставяме необходимите данни за получаване на Вашето свободно изразено, изрично, доброволно и информирано съгласие на базата на предоставената Ви тук информация.

VIII. Сигурност на данните

Пълен достъп до предоставените от Вас категории лични данни ще имат членовете на изследователския екип.

В случаите, когато е необходимо, Вашите лични данни да се предоставят на физическо или юридическо лице, публичен орган, агенция или друга структура с цел обработване от името на администратора (обработващ лични данни), това ще бъде в съответствие с изискванията на Регламент 2016/679 и осигуряване защита на Вашите права.

<https://www.cdpd.bg/?p=element&aid=991>

XI. Колко дълго ще използваме личните Ви данни?

Ние ще съхраняваме личните Ви данни само за периода, за който са ни необходими, за да изпълним целите, за които сме ги събрали.

В някои ситуации е възможно да анонимизираме Вашите лични данни, така че повече да не е възможно да бъдат свързани с Вас. В резултат на това можем да продължим да използваме анонимизираните данни, без да Ви уведомим за това. След прекратяването на научното изследване, ние ще съхраним информацията Ви в съответствие с нашите политики и законодателни изисквания и ще я унищожим по сигурен начин след като периодът на съхранение, описан в нашите политика и регламентиран в закон изтече.

XII. Право на достъп, корекция, изтриване и ограничаване

Вашите права във връзка с личните Ви данни са свързани с достъп до информация (копия на лични данни), коригиране на непълна или неточна информация, изтриване или премахване на Ваши лични данни, възражение срещу обработка, ограничаване на обработката, преносимост на данните (имате възможност да изискате от нас да предоставим съхраняваните в електронна форма Ваши данни на трето лице).

При такова искане от Ваша страна е възможно да е необходимо да ни предоставите информация, потвърждаваща Вашата самоличност.

Ако искате да упражните някое от правата си, описани по-горе, моля да се свържете с д-р Атанаска Чешмеджиева (*главен изследовател, събирац информираните съгласия*), тел. 0886899599

XIII. Право да оттеглите съгласието си

В случай, че сте предоставили изричното си съгласие за обработването на Ваши лични данни за конкретна цел, Вие имате право да оттеглите това съгласие. За да оттеглите Вашето съгласие, моля да се свържете с д-р Атанаска Чешмеджиева; тел. 0886899599. След получаване на Вашето искане, ние ще преустановим обработката на данните за целите, за които Вие първоначално сте се съгласили, освен ако нямаме друго законово основание, за да продължим обработката, за което ще Ви уведомим своевременно. Оттеглянето на съгласието не засяга законосъобразността на обработването въз основа на Вашето съгласие, преди то да бъде оттеглено.

XIV. Длъжностно лице по защита на данните

Ние сме определили длъжностно лице по защита на данните, което да контролира спазването на изискванията на законодателството по защита на личните данни в нашата организация. Можете да се свържете с него на телефон 0876989491 (Георги Казаков).

За допълнителна информация и разяснения може да се обръщате и към г-жа Иванка Кондова – юристконсулт на Медицински университет – Варна на телефон 052/677-035.

XV. Промени на това известие

Запазваме си правото да променяме и актуализираме това известие по всяко време. Ще Ви предоставим ново известие всеки път, когато предприемем промени.

Аз, (ИМЕ НА ЛИЦЕТО), потвърждавам, че на (ДАТА) получих копие от настоящото известие от д-р Чешмеджиева, *главен изследовател, събирац информираните съгласия*, което прочетох и разбрах.

Подпис:

Приложение 6

Декларация за информирано съгласие

С подписа си по-долу аз,потвърждавам следното:

Прочетох информацията от този формуляр и разбирам неговото съдържание.

Беше ми обяснена целта на проучването, неговото значение и всички дейности, свързани с провеждане на изследването. Получих подробно обяснение относно извършваната хирургична екстракция на долен трети молар – причини за необходимостта ѝ, същински медицински детайли, свързани с реализацията – използване на режещи инструменти и костни фрези; наличието на травматичен, продължителен, изискващ специализирани грижи следоперативен период със спазване на подходящ хигиенно-диетичен режим. Разяснено ми беше евентуалното прилагане на богата на тромбоцити плазма, получена чрез вземане на моя венозна кръв и изготвяне по специални методи. Получих подробен алгоритъм за следоперативните контролни прегледи.

Имах възможност да задам въпросите си относно проучването и на въпросите ми беше отговорено изчерпателно.

Аз ще бъда уведомяван своевременно за всяка информация, която може да повлияе на желанието ми да продължа участието си в проучването.

Разбирам, че участието ми в проучването е напълно доброволно и че съм свободен/а да се оттегля по всяко време, без да посочвам каквато и да е причина, без да бъда засегнат/а по какъвто и да е начин или да бъдат нарушени моите права.

С подписването на този формуляр не се отказвам от законните си права.

Получих, прочетох и разбрах „Известието за защита на личните данни“ на участниците в научно проучване.

Давам разрешение за достъп до моята поверителна информация на изследователите или регулаторните органи при поискване.

Давам разрешение за обработване на информацията, отнасяща се до мен, за целите на проучването.

Съгласен съм да участвам в това проучване. Ще получа копие от този формуляр.

Име на участника:

Дата:

Подпис на участника:

/...../

/...../

/...../

Име и подпис на лицето,

Име и подпис

провело рзговора за получаване

Дата:

на главния

на информирано съгласие:

изследовател:

/...../

/...../

/...../

Научна активност свързана с дисертационния труд

1. Чешмеджиева А. Нови протоколи за получаване на тромбоцитни концентрати, // Сп. Военна медицина, София, 2022, бр. 4, ISSN 1312-2746, стр. 22-27.
2. Чешмеджиева А. Тромбоцитни концентрати-видове, класификация, приложение, // Сп. Военна медицина, София, 2022, бр. 2, ISSN 1312-2746, стр. 72-78.
3. Чешмеджиева А, Насева Е. Ранни клинични резултати при използване на автоложни тромбоцитни концентрати след екстракция на, долен трети молар, // Сп. Военна медицина, София, 2023, бр. 1, ISSN 1312-2746, стр. 66-69
4. Използване на Platelet – Rich Plasma след конвенционална екстракция на зъби. Чешмеджиева А., Васева В., Насева Е., Митов Ст., Колев Ст., Коларов Р., сп. Военна медицина бр.1-2/2015г.

Участие в научни форуми

- I. Гландуларна одонтогенна киста – диагностична дилема със съдбоносен характер, А.Чешмеджиева, С.Колев, С.Петров. case report..... 25-th CONGRESS OF BALKAN MILITARY MEDICINE COMMITTEE – к.к. Албена ,28-31.05.2023г.
- II. Имедиатно поставяне на дентални импланти, облечени в тромбоцитна пелерина – А.Чешмеджиева, С.Колев, В.Николова, SDM may 2017

XI. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Атанасов, Д. Орална хирургия - учебник за студенти по специалността „Дентална медицина”. Под ред. Д. Атанасов. 2011. Пловдив.
2. Дочев, Д. Лабораторна диагностика - хематологични изследвания. Под ред. Д. Дочев и Т. Шипков. 1988, София, Мед. и физк.
3. Иванова, Н. Количествени и качествени характеристики на автоложни тромбоцитни концентрати и биологичното значение на протеините в тях, дисертация, МУ-Варна, 2021
4. Кавракиров, В., Анастасов, К., Анастасов, Ю. Оперативни методи в лицево-челюстната хирургия. Под ред. В. Кавракиров. 1998, МИ „Арсо”.
5. Насева, Е., Васева, В., Кундуржиев, Т., Стойчева, М. Подготовка на биомедицински данни за статистическа обработка и анализ. // Военна медицина, 2013, № 3-4, 84-87.
6. Цачева, Н., Любомирова, К., Янчева-Стойчева, М., Кундуржиев, Т., Насева, Е. Трудова медицина и обществено здраве. // Статистика в трудовата медицина. София, 2015.
7. Abuzeni, P.Z., Alexander, R.W. Enhancement of autologous fat transplantation with PRP. //Cosm. Surg., Vol. 23, 2007, 387-397.
8. Adler, S.C. Enhancing wound healing with growth factor. //Facial Plast. Surg., Vol. 23, 2002, 129-136.
9. Adler, S.C., Kent, K.L. Enhancing healing with PRP and PGF. //Fac. Plast. Surg., Vol. 34, 2007, 678- 687.
10. Agarwal, A., Gupta, N. Platelet-Rich Plasma Combined with Decalcified Freeze-Dried Bone Allograft for the Treatment of Noncontained Human Intrabony Periodontal Defects: A Randomized Controlled Split-Mouth Study. // Dev. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, Vol. 34, 2014, No 5, 704-711.
11. Akça, K., Çehreli, M., Demiralp, B., Güzel, E., Dağdeviren, A. Platelet-Rich Plasma and Bone Healing: A Histologic Study in Titanium Bone Chambers. // International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, Vol. 27, 2007, No 4, 386-392. 6 Color Photographs.
12. Alberktston, T. Repair of bone grafts: A vital microscopic and histologic investigation in the rabbit. // J. Plast. Reconstr. Surg., Vol. 34, 1997, 345- 356.
13. Alexander, R.W. Cosmetic alterations of the aging neck. //Cosmetic Oral Maxillofac. Surg., Vol. 23, 2005, 298-301.
14. Alissa, R., Esposito, M., Horner, K., Oliver, R. The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. // European Journal of Oral Implantology. 2010.
15. Amaral RJ, da Silva NP, Haddad NF, Lopes LS et al. Platelet-Rich Plasma Obtained with Different Anticoagulants and Their Effect on Platelet Numbers and Mesenchymal Stromal Cells Behavior In Vitro. Stem Cells Int. 2016;2016:7414036. doi: 10.1155/2016/7414036. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27340410; PMCID: PMC4909912

16. Anitua, E. The use of PRGF in oral surgery. //Pract. Proced. Aesthet. Dent., Vol. 13, 2009, 487–493.
17. Arora S, Doda V, Kotwal U, Dogra M. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. *Transfus Apher Sci.* 2016; 54(1):103-10. doi: 10.1016/j.transci.2016.01.028
18. Assirelli E, Filardo G, Mariani E. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc.* 2015;23:2690–2703.
19. Babbush, C.A. The use of PRP in conjunction with other bone graft materials: Alloraft, Alloplast, Xenograft. // San Francisco 2nd Symposium of PRP, 2010.
20. Badr, M., Coulthard, P., Alissa, R., Oliver, R. The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial. // *European Journal of Oral Implantology*, 2010.
21. Banoth, S., Alex, J.C. Current applications of platelet gels in plastic surgery. // *Fac. Plast. Surg.*, Vol. 23, 2009, 678-687.
22. Bardach, M., Harri, K., Ohmori, S. Basic principles in free bone autografts. // *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Vol. 23, 2002, 987- 999.
23. Barroso, C. Sáez-Torres; Benito, J. Calvo; Puig, A. Gayà Platelet-rich plasma quality: a study on platelet activation. // *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial.* Vol. 29, 2007, No 4, 240-247.
24. Bashutski, J.D., Hom-Lay Wang. Role of platelet-rich plasma in soft tissue root-coverage procedures: A review. // *Quintessence International*, 2008, Jun.
25. Belts, G., Fonseca , T. Allogeneic grafting of dentoalveolar clefts. // *Oral and Maxillofac. Surg.*, Vol. 23, 1999, 661-672.
26. Bennion, . L.W., Mancuso, J. PRP: A prevention of alveolar osteitis. // *J. Oral Maxillofacial Surg.*, Vol. 23, 2009, 345-356.
27. Bertrand-Duchesne, M.-P., Grenier, D., Gagnon, G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. // *Journal of Periodontal Research*, 2010, Feb.
28. Betoni-Jr, W., Dechichi, P., Esteves, J.C., Zanetta-Barbosa, D., Magalhães, A. E. O. Evaluation of the Bone Healing Process Utilizing Platelet-Rich Plasma Activated by Thrombin and Calcium Chloride: A Histologic Study in Rabbit Calvaria. // *Journal of Oral Implantology*, 2013, Feb.
29. Betts, N.J., Powers, M., Barber, H,D. Reconstruction of the severely atrophic edentulous mandible with the transmandibular implant systems. // *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Vol. 54, 2009, 295-303.
30. Betz, R, Wilson, J. Autogenous Bone Grafting.// *J. Oral. Surg.*, 2005, May.
31. Bin Shi, Yi Zhou, Yi Ning Wang, Xiang Rong Cheng. Alveolar Ridge Preservation Prior to Implant Placement with Surgical-Grade Calcium Sulfate and Platelet-rich Plasma: A Pilot Study in a Canine Model. // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2007, Jul/Aug.

32. Boyne, P.J., Sands, N.R. Combined orthodontic – surgical management of residual alveolar cleft defects. // Vol. 23, Am. J. Orthod., 2009, 467-478.
33. Brogini, N., Hofstetter, W., Hunziker, E., Bosshardt, D. D., Bornstein, M.M., Seto, I., Weibrich, Gernot, Buser, D. The Influence of PRP on Early Bone Formation in Membrane Protected Defects. A Histological and Histomorphometric Study in the Rabbit Calvaria. // *Clinical Implant Dentistry & Related Research*. 2011, Mar.
34. Bruijn, G.D. Calcium Phosphate Biomaterials: Bone bonding and biodegradation, 2001, Leiden.
35. Byron, J., Bayley, N. Surgery of the oral cavity. // 2001 Year Book Medical Publishers.
36. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*. 2002; 37:300-6.
37. Camargo, P.M., Vasilic, G., Madzarevic, M. PRP and bovine porous bone mineral combined with GTR. // *J. Period.*, Vol. 23, 2011, 234–245.
38. Camarini, E. T., Zanoni, J. N.; Leite, P.C.C., Boos, Fernanda Brasil Daura, J. Use of Biomaterials With or Without Platelet-Rich Plasma in Postextraction Sites: A Microscopic Study in Dogs. // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2009.
39. Caplan, A.L. Mesenchymal stem cells combined with PRP. // *J. Orthop. Surg.*, Vol. 23, 1999, 678-689.
40. Caplan, A.L. Mesenchymal stem cells and gene therapy. // *Clin. Orthop.*, 2008, 379.
41. Carlson, E.R., Strauss, J.E. PRP: GF enhancement for bone grafts. // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pat. Radiol. Endod.*, Vol. 85, 2008, 876-879.
42. Carlson, N.E, Roach, R.B. PRP: Clinical applications in dentistry. // *J. Am. Dent. Assoc.*, Vol. 133, 2007, 1383-1386.
43. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation system. *Am J Sports Med*. 2010; 39:266-271.
44. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6591717. doi: 10.1155/2016/6591717. Epub 2016 Sep 8. PMID: 27672658; PMCID: PMC5031826.
45. Chan KL, Pilon NJ, Silvaloganathan DM et al. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem*. 2015;290(27): 16979–16988
46. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):272-288.
47. Chrisitie, R.J., Carrington, L., Alving, B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombine. // *Surgery*, Vol. 121, 2003, 708-710.

48. Clinical application of autologous platelet rich plasma (P.R.P.) in the extraction of third impacted mandibular molar. // Romanian Journal of Stomatology. Vol. 53 2007, No81-88.
49. Cohen D. Limitations of autograft and allograft: New synthetic solutions. // J. Orthop. Surg., Vol.15, 2001, 980-991.
50. Consolo, U., Zaffe, D., Bertoldi, C., Ceccherelli, G. Platelet-rich plasma activity on maxillary sinus floor augmentation by autologous bone. // *Clinical Oral Implants Research*, 2007, Apr.
51. Cordeiro, P.G., Disa, J.J., Hidalgo, D.A. Reconstruction of the mandible with osseus free flaps: A 10 year ezperience with 150 consecutive patients. //Plast. Reconstr. Surg., Vol. 104, 2009, 1314-1320.
52. Creeper, F., Ivanovski, S. Effect of autologous and allogenic platelet-rich plasma on human gingival fibroblast function. // Oral Diseases, 2012, July.
53. Crovetti, G., Martineli, G., Issi, M. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. //Transfus. Apheresis Sci., Vol. 30, 2007, 145-151.
54. David, D.O. Treatment of a palatinaly impacted canine and application of PRP. // Quintessence International, Vol. 56, 2004, No 6.
55. Davies, J.E., Lowenberg, B., Shigia, A. The bone – titanium interface in vitro. // J. Biomed. Mater Res., Vol. 24, 2010, 1289-1306.
56. Davis, J.C., Hunt, K. Problem Wounds – The Role of Oxygen. 2010, New York, Elsevier.
57. De Vasconcelos Gurgel, B. C., Gonçalves, P. F., Pimentel, S. P., Ambrosano, G. M.B., Nociti Júnior, F. H., Sallum, E.A., Casati, M. Z. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. // *Clinical Oral Implants Research*, Vol. 18, 2007, No 5, 49-654.
58. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, Weinstein R. Is platelet concentrate advantageous for the surgical treatment of periodontal diseases? a systematic review and meta-analysis. J Periodontol. 2011;82(8):1100–1111. doi:10.1902/jop.2010.100605.
59. Della Valle A, Sammartino G, Marenzi G, Tia M, Espedito di Lauro A, Ferrari F, et al. Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: Use of platelet-rich plasma gel. J Oral Maxillofac Surg. 2003;61:1275-8.
60. DeLong J M, Ryan B.Sc, Russell P, Mazzocca A, et al. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System. The Journal of Arthroscopic and Related Surgery. 2012;28:7:998-1009.
61. Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M. Platelet rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy—a systematic review. Musculoskeletal Surgery. 2015;99:1:1–9.
62. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, 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. 2006;101:e37-44.
63. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, 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. 2006;101:e45-50.

64. Dohan DM, Diss A, Dohan SL, Mouhyi J, 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.* 2006;101:e51-5.
65. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *J Biomed Mater Res A.* 2010;15: 95(4):1280-2.
66. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1145-52.
67. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: Platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1131–7.
68. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors.* 2009;27(1):63-9.
69. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4):546-55.
70. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27 (3):158-167.
71. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:615-9. 96. Edrev St, Gonkov I. Platelet-rich plasma applications in molar retention and dental cyst surgery. *Scripta Scientifica Medicinae Dentalis.* 2019;5(1):39-46.
72. Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. // *Journal of Oral Implantology*, Vol. 34, 2008, No 2, 119-119.
73. Eker İ, Yılmaz S, Çetinkaya RA, et al. A Cycle of Freezing and Thawing as a Modified Method for Activating Platelets in Platelet-rich Plasma to Use in Regenerative Medicine. *Panam J Trauma Crit Care Emerg Surg.* 2020;9(2):101–104.
74. *Endod.* 1998;85(6):638–646. doi:S1079-2104(98)90029-4 [pii]
75. Enemark, H., Bundgaard, M. Long – term results after secondary bone grafting of alveolar cleft. // *J. Oral Maxillofacial Surg.*, 2002, No 12, 1345-1354.
76. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502-8.

77. Ergun, G., Egilmez, F., Cekic-Nagas, I., Karaca, İ. R., Bozkaya, S. Effect of Platelet-Rich Plasma on the Outcome of Early Loaded Dental Implants: A 3-Year Follow-up Study. //Journal of Oral Implantology, 2013, May.
78. Evanson JR, Guyton MK, Oliver DL, Hire JM, Topolski RL, Zumbrun SD, et al. Gender and age differences in growth factor concentrations from platelet-rich plasma in adults. *Mil Med.* 2014;179(7):799-805.
79. Everts PA, Brown MC, Hoffmann JJ, Schonberger JP, Box HA, van Zundert A, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors.* 2006;24:165–71.
80. Everts PA, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JP, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006;16(5):363-8.
81. Everts PA, Hoogbergen MM, Weber TA, Devilee RJ, van Monfort G, de Hingh IH Is the use of autologous platelet-rich plasma gels in gynecologic, cardiac, and general, reconstructive surgery beneficial? *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1163-72.
82. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. A.
83. Everts PA, van Zundert A, Schönberger JP, Devilee RJ, Knape JT. What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *Biomed Mater Res A.* 2008;85(4):1135-1136.
84. Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359(1445):839-850.
85. Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Ávila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang H-L. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:687–93.
86. Fikret Tözüm, T., Gencay Keçeli, H. Treatment of Peri-implant Defect with Modified Sandwich Bone Augmentation. //New York State Dental Journal, 2008, Jun/Jul.
87. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli M. L, Marcacci M, Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy.* 2015;23(9): 2459–2474.
88. Finkemeier, G.C. Current concepts review: bone grafting and bone graft substitute. //J. of Bone and Joint Surg. Am. 2001.
89. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev.* 1982;62:185–261.
90. Froum 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 Restorative Dent.* 2002; 22:45-53.
91. Frykberg RG, Driver VR, Carman D, et al. Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: A prospective case series. *Ostomy Wound Manage.* 2010;56:36-44.
92. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:684-690.

93. Garcia, R. V., Cabrini Gabrielli, M. A., Hochuli-Vieira, E., Spolidorio, L. C., Padilha Filho, J.G., Doria Neto, F. A., Gouveia de Cardoso, L. A., Shibli, J. A. Effect of Platelet-Rich Plasma on Peri-Implant Bone Repair: A Histologic Study in Dogs. // *Journal of Oral Implantology*, 2010.
94. Garg, A.K., Hunt, T.K. *Grafting materials in repair and restoration.* Chicago: Quintessence, 1999, 83-101.
95. Geurs, N., Ntounis, A., Vassilopoulos, Ph., Van der Velden, U., Loos, B.G., Reddy, M. Using Growth Factors in Human Extraction Sockets: A Histologic and Histomorphometric Evaluation of Short-Term Healing. // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, Vol. 29, 2014, No 2, 485-496.
96. Giacco F, Perruolo G, D'Agostino E, Fratellanza G, Perna E, Misso S, et al. Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *FASEB J.* 2006; 20(13):2402-2404. doi:fj.06-6104fje pii
97. Giraldo Carlos E, Álvarez María E, Carmona Jorge U. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res.* 2015;11: 60.
98. Giusti I, Di Francesco M, D'Ascenzo S, Palumbo P, Rughetti A, Dell'Orso L, et al. Leukocyte depletion does not affect the *in vitro* healing ability of platelet rich plasma. *Exp Ther Med.* 2018 Apr;15(4):4029-4038. doi: 10.3892/etm.2018.5887. Epub 2018 Feb 22. PMID: 29556269; PMCID: PMC5844025.
99. Gunne, J., Astrand ,K. Implants in partially edentulous patients with PRP. // *Clin. Oral Surg.*, Vol. 23, 2007, 498-501.
100. Haas, R., Baron, M., Donath, K. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus. // *Int. Oral Maxillofacial J.*, Vol. 19, 2008, 234-245.
101. Hall, H.D., Werther, W.R. Conventional alveolar cleft bone grafting. // *J. Maxillofac. Surg.*, Vol. 23, 2009, 278-289.
102. Hamdy, C.R., Demers C. Natural coral exoskeleton as bone graft substitute.// *Bio - Med. Mater Eng.*, 2002.
103. Heasman, P.A. The effect of PRP like sinus membrane. // *J. Oral Surg.*, Vol. 21, 2006, 278–289.
104. Heasman, P.A., Jacobs, D.J. A clinical investigation into the incidence of dry socket. // *Br. J. Oral Surg.*, Vol. 23, 2002, 233-241.
105. Hunt, T.K. The physiology of wound healing.// *An. Emerg. Med.*, Vol. 17, 2000, 1265-1273.
106. Ilgenli, T., Dündar, N., İlhan Kal, B. Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma vs platelet-rich plasma alone in infrabony defects: a clinical and radiographic evaluation. // *Clinical Oral Investigations*, 2007, Mar.
107. Ivanov S. Cannulated screw fixation for dislocated fractures of the calcaneus. *Scr Sci Med.* 2019;51(2):23-9. doi: 10.14748/ssm.v51i1.5882

108. Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of prp on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:57883.
109. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop.* 2005; 29:67-72.
110. Jo, C. H., Young, H. R., Ji, E. Ki., Sue, S., Kang Sup Yoon. Optimizing Platelet-Rich Plasma Gel Formation by Varying Time and Gravitational Forces During Centrifugation. //Journal of Oral Implantology, 2013, Oct.
111. John, V., Gossweiler, M. Implant treatment and role of PRP. //J. Indiana Dent. Assoc., Vol. 82, 2008, 8-13.
112. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10; 238(1):265-72.
113. Jungbluth P, Wild M, Grassmann JP, et al. Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Orthop Res.* 2010;28:1448–1455.
114. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007;317:1767–1770.
115. Kahn RA, Cossette I, Friedman LI. Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products. *Transfusion.* 1976;16:162–5.
116. Kakaiya K, Aronson CA, Jana Julleis J. Whole Blood Collection and Component Processing. Technical Manual, 16th ed: AABB; 2008.
117. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood.* 1979;53(6):1043-1052.
118. Kassolis, J.D., Rosen, P.S., Reynolds, M.A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing PRP in combination with freeze – dried bone allograft. //J. Periodontal., Vol. 71, 2008, 1654-1661.
119. Kassolis, L.D., Rosen, P.S. Alveolar ridge and laterat sinus lift with PRP. // J. Periodontol., Vol. 71, 2002, 1654-1661.
120. Katzel EB, Wolenski M, Loiselle AE, Basile P, Flick LM, Langstein HN et l. Impact of Smad3 loss of function on scarring and adhesion formation during tendon healing. *J Orthop Res.* 2011; 29(5):684-693.
121. Kaur, M., Ramakrishnan, T., Amblavanan, N., Emmadi, P. Effect of platelet-rich plasma and bioactive glass in the treatment of intrabony defects - a split-mouth study in humans. // Brazilian Journal of Oral Sciences. 2010.
122. Kaushick, Bharadwaj T., D., Jayakumar N., O., Padmalatha, V. S. Treatment of human periodontal infrabony defects with hydroxyapatite + β tricalcium phosphate bone graft alone and in combination with platelet rich plasma: A randomized clinical trial. // *Indian Journal of Dental Research.* 2011, Jul/Aug.
123. Kececi Y, Ozsu S, Bilgir O. A cost-effective method for obtaining standard platelet-rich plasma. *WOUNDS.* 2014;26:232-8.

124. Keceli, H.G., Sengun, D., Berberoğlu, A., Karabulut, E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: a randomized-controlled trial. // *Journal of Clinical Periodontology*, 2008, Mar.
125. Kent, K.J. Promising results from a preliminary study of autologous platelet gel in facelift surgery. // *Arch. Fac. Plast. Surg.*, Vol. 23, 2006, 456-467.
126. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004;36:28–35.
127. Kevy, S., Jacobson, M. Preparation of GF enriched autologous platelet gel. // 27th Annual Meeting, Minneapolis, MN, 2008, April.
128. Keyser JE. Diabetic wound healing and limb salvage in an outpatient wound care program. *South Med J.* 1993;86:311-7.
129. Kim, S.G., Chung, C.H., Kim, Y.K. Use of particular dentin – plaster of Paris combination with/without PRP in the treatment of bone defects around implants. // *Int. J. Oral Maxillofacial Surg.*, Vol. 34, 2012, a 367-378.
130. King GL, Buchwald S. Characterization and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Clin Invest.* 1984;73:392-6.
131. Kinlough-Rathbone, Packham, Mustard. Platelet aggregation. In: Harker L. A, editor. *Methods in Hematology.* Churchill Livingstone: New York; 1983. p. 64–91.
132. Kiuru J, Viinikka L, Myllylä G, Pesonen K, Perheentupa J. Cytoskeleton dependent release of human platelet epidermal growth factor. *Life Sci.* 1991;49:1997-2003.
133. Klein, M. O., Kämmerer, P. W., Scholz, T., Moergel, M., Kirchmaier, C. M., Al-Nawas, B. Modulation of platelet activation and initial cytokine release by alloplastic bone substitute materials. // *Clinical Oral Implants Research*, 2010, Mar.
134. Knezevic N.N, Candido K.D, Desai R, Kaye A.D. Is platelet-rich plasma a future therapy in pain management? *Med Clin N Am.* 2016;100(1):199–217.
135. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204:322–330.
136. Knighton, D.R., Hunt, T.K., Werb, Z., Banda, M.J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. // *Science*, Vol. 221, 2007, 1234-1235.
137. Knighton, D.R., Silver, I. A., Hunt, T.K. Regulation of wound – healing angiogenesis. // *Surgery*, Vol. 90, 1989, 262-270.
138. Kobayashi Yohei, Saita Yoshitomo, Nishio Hirofumi, Ikeda Hiroshi, et al. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *Journal of Orthopaedic Science.* 2016;21:683-689.
139. Kovacs, K., Velich, N. Comparative study of beta – tricalcium phosphate mixed with PRP. // *Acta Vet. Hung.*, Vol. 51, 2007, 475-484.

140. Kurikchy, M., Al-Rawi, N. Ayoub, R., Mohammed, S. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). //Clinical Oral Investigations, 2013, Apr.
141. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cells proliferation and growth factor release. J Periodontol. 2003;74:1498–507.
142. Laki K. Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences. Jornal of MFS,2016
143. Lana J, Huber, Purita, et al. Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP - The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade. Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma. 2019;10:S7-S12.
144. Lana J, Purita J, Paulus Ch, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma – proposal of a new classification: MARSPILL, Regen Med. 2017;12(5):565-574.
145. Lana J, Santana M, Belangero W, Luzo A. Platelet-rich plasma Regenerative Medicine:Sports Medicine, Orthopedic and Recovery of Musculoskeletal Injuries. 2014;154-155.
146. Lancet. Notes of Gulliver's Researches in Anatomy, Physiology, Pathology, and Botany. 9th ed. Carpenter's Physiology: ed. Power; 1880.
147. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg. 2000;58:297–300.
148. Lee, C. Y. S., Rohrer, M.D., Prasad, H. S., Stover, J.D., Suzuki, J. B. SINUS Grafting with a natural flourohydroxyapatite for immediate load: A study with histologic analysis and histomorphometry. // Journal of Oral Implantology, 2009.
149. Lekovic, V., Vasilic, N., Camargo, P.M. Effectiveness of a combination of PRP, bovine porous bone mineral and GTR in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. // Clin. Period., 2001, No 12, 234-245.
150. Lodde, J.P. Biomaterials in plastic and maxillofacial. //J. Oaral Maxillofac. Surg., Vol. 23, 2006, 785–792.
151. Maas, Cs., Merwin, G.E. Comparision of biomaterials for facial bone augmentation. // J. Maxillofac. Surg. Vol. 23, 2004, 390-401.
152. Macaluso, M.. The Science of Platelet-Rich Plasma. //Access, 2011, May/Jun.
153. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B et al. DEPA classification: a proposal for standardizing PRP use and retrospective application of available devices. BMJ Open Sport Exerc. Med. 2016; 2(1),
154. Maiorana, C., Brivio, P., Beretta, M., Grossi, G. B., Cicciù, M. Five years of clinical and radiographical evaluation of implant survival and dimensional stability of maxillary sinus augmentation procedures performed with platelet-rich plasma. // Journal of Dental Implants, 2011, Jul.
155. Man, D., Plosker, H. The use of autologous PRP and autologous PPP in cosmetic surgery. //Plast. Reconstr. Surg., Vol. 107, 2007, 229-237.

156. Mancuso, J., Bennion, L.W. PRP: A preliminary report in routine impacted mandibular third molar surgery. //J. Oral Surg. Vol. 23, 2011, 234-243.
157. Marlovits S, Mousavi M, Gäbler C, Erdös J, Vécsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J.* 2004;13(1):102-6. doi: 10.1007/s00586004-0715-3. Epub 2004 Jun 22. PMID: 15221571; PMCID: PMC3592190.
158. Martin P, D'Souza D, Martin J, et al. Wound healing in the PU.1 mouse—Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol.* 2003;13:1122-11.
159. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005;15:599-607.
160. Martin, W. Complication after mandibular third molar extraction. // *J. Oral Surg.*, Vol.23, 2009, 345-365.
161. Martinez F.O, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* 2014;3:6–13.
162. Martinowitz U, Spotnitz WD. Fibrin tissue adhesives. *Thromb Haemost.* 1997; 78:661-6.
163. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR Platelet rich plasma: growth factors enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*
164. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implants Dental.* 2001;10(4):225-228.
165. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489– 496.
166. Marx, R.E., Snyder, R. Cellular survival of human marrow during placement of marrow – cancellous bone graft. //J. Oral Surg., Vol, 37, 2003, 712–718.
167. Marx, R.E. PRP: A source of multiple autogenous growth factors for bone graft. Applications in Maxillofacial surgery and Periodontology. //Chicago, Quintessence, 2006, may.
168. Marx, R.E. PRP: Evidence to support its use.// *J. Oral Maxillofacial Surg.*, Vol. 62, 2004, 489-496.
169. Marx, R.E. PRP: Severely resorbed mandible:Predictable reconstruction with soft tissue matrix expansion grafts. //J. Oral Maxillofacial Surg., Vol. 23, 2005, 345–357.
170. Marx, R.E., Smith, B.,R. PRP: Growth factor enhancement for bone grafts in maxilla // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio.l Endod.*, Vol. 85, 2008, 638-646.
171. Marx, R.E., Carlson, E.R. PRP – Growth factor enhancement for bone grafts in mandible // *Oral Surg. Oral Med.*, Vol. 86, 2012, 628-636.
172. Marx, R.E., Ehler, W.J. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. // *Surgery*, Vol. 160, 2000, 519-524.
173. Mautner K, Malanga G, Smith J, et al. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *Am J Phys Med Rehabil.* 2015;7(4):53–59

174. Mazor, Z., Peleg, M., Garg, A.K., Luboshitz, J. PRP for bone graft enhancement in sinus floor augmentation. // *Implant Dent.*, Vol. 13, 2009, 65-78.
175. Messora, M. R., Nagata, M. J. H., Dornelles, R. C. M., Bomfim, S. R. M., Furlaneto, F. A. C., De Melo, L. G. N., Deliberador, T. M., Bosco, A. F., Garcia, V. G., Fucini, S. E. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. // *Journal of Periodontal Research*, 2008, Dec.
176. Messora, M. R., Nagata, M. J. H., Furlaneto, F. A. C., Dornelles, R.C. M., Bomfim, S. R. M., Deliberador, T. M., Garcia, V. G., Bosco, A. F. A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. // *RSBO: Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 2011, jul.
177. Mitz, V., Peyronie, M. The SMAS in the parotid and the cheek area. // *Plast. Reconstr. Surg.*, Vol. 23, 1999, 345- 354.
178. Moghe, S., Saini, N., Moghe, A. Platelet-rich plasma in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. // *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 2012, July.
179. Mushler, T., Nacamotto ,A. Tissue – engineered bone regeneration. // *Nature Biotechnology*, 2003.
180. Nagata, M. J. H., Melo, L. G. N., Messora, M. R., Bomfim, S. R. M., Fucini, S.E., Garcia, V.G., Bosco, A. F., Okamoto, T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. // *Journal of Clinical Periodontology*, 2009, Sep.
181. Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H. Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:53–84.
182. Nayar, U., Iyer, Sh. Implant Site Development Part II. // *International Journal of Clinical Implant Dentistry*, 2010, Jan-Apr.
183. Niiya K, Hodson E, Bader R, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood.* 1987;70:475–483.
184. Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(3):249-258.
185. Nikolidakis, D., Van den Dolder, J., Wolke, J.G.C., Jansen, J. A Effect of platelet-rich plasma on the early bone formation around Ca-P-coated and non-coated oral implants in cortical bone. // *Clinical Oral Implants Research*, 2008, Feb.
186. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.*
187. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1988;72(6):2020-5. PMID: 3143429.
188. Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrie R, et al. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood.* 2004;104:107–114.

189. Nyman, S. Bone regeneration using the principle of GTR. //Clin. Period., 2013, No 12, 123-134.
190. Ohlsson, L., Danin, J. Outcomes of periradicular surgery with PRP. //Oral Surg. Oral Med., Vol. 32, 2006, 365-376.
191. Olson, J.W., Dent, C.D., Morrhis, H.F. Long – term assesmennt of endosseous dental implants placed in the augmented maxillary sinus. //Ann. Per., 2001, No 5, 152-156.
192. Parikh, B., Navin, S., Vaishali, P. A comparative evaluation of healing with a computed tomography scan of bilateral periapical lesions treated with and without the use of platelet-rich plasma. // *Indian Journal of Dental Research*, 2011, May/Jun.
193. Parrish WR, Roides B. Physiology of blood components in wound healing: an appreciation of cellular co-operativity in platelet rich plasma action. *J Exerc Sports Ortho.* 2017;4(2):1e14
194. Peleg, M., Mazor, Z., Garg, A.K. Augmentation grafting of the maxillary sinus and simultaneous implant placement in patients with 3 to 5 mm of residual alveolar bone height. // *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, Vol. 14, 2007, 549-556.
195. Petrungaro, P.S. Using PRP to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. // *J. Period.*, Vol. 23, 2013, 345-356.
196. Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Iezzi, G., Piattelli, A., Giardino, R., Bassi, M., Donati, D., Marchetti, C. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. // *Journal of Clinical Periodontology*, 2008, Jun.
197. Pinski, K.S. Autologous fat transplantation: Long - term follow - up. //*J. Derm. Sutg. Oncol.*, Vol. 23, 2005, 789-798.
198. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006;38:174–87.
199. Pochini AC, Antonioli E, Bucci DZ, et al. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein Sao Paulo.* 2016;14(3):391-397. doi:10.1590/S1679-45082016AO3548
200. Powel, W., Chang, E., Fariior, E.H. Recovery from deep – plane rhythidectomy following unilateral wound treatment with PRP. // *Plast. Surg.*, Vol. 32, 2008, 890-899.
201. Quinones, C.R., Arnold, D.R. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants. // *Clin. Oral Implants Res.*, Vol. 20, 2009, 539-548.
202. Robert, E. Marx, D.D.S., Arun, K., Garg, D.M.D. *Dental and Craniofacial Applications of PRP.* 2009, Quintessence Publishing Co, Inc.
203. Roussy, Y., Bertrand Duchesne, M.-P., Gagnon, G. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. // *Clinical Oral Implants Research*, 2007, Oct.
204. Rutkowski, J. L., Fennell, J.W., Kern, J.C., Madison, D. E., Johnson, D. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet-rich plasma. // *Journal of Oral Implantology*, Vol. 33, 2007, No 3, 116-121.

205. Rutkowski, J. L., Thomas, J. M., Bering, C. L., Speicher, J. L., Radio, N. M., Smith, D.M., Johnson, D.A. An analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. *// Journal of Oral Implantology*, 2008.
206. Sabarish R, Lavu V, Rao SR. A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma (PRP) Obtained Following Preparation by Three Different Methods. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(2):10-12 doi:10.7860/JCDR/2015/11011.5536.
207. Saluja, H., Dehane, V., Mahindra, U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *// Annals of Maxillofacial Surgery*, 2011, Mar.
208. Schmitt, J., Hwang, K. Bone morphogenetic proteins. *//J. Orthop. Res.*, Vol. 17, 2007, 269-279.
209. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exerciseinjured skeletal muscle: How do we resolve the controversy? *Sports Med*. 2007;37:837-856.
210. Schopper, C., Moser, D., Sabbas, A. The FHA FRIOS Algipore is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. *// Clin. Oral Implants Res.*, Vol. 14, 2004, 743–749.
211. Schwarz HP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH. Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood*. 1985;66:1452–1455.
212. Seftel MD, Growe GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee CY, et al. Universal prestorage leukoreduction in canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood*. 2004;103:333-9.
213. Servin-Trujillo MA, Reyes-Esparza JA, Garrido-Farina G, Flores-Gazca E, Osuna-Martinez U, Rodriguez-Fragoso L. Use a graft of demineralized bone matrix along with TGF-beta1 leads to an early bone repair in dogs. *J Vet Med sci Jpn Soc Vet Sci*. 2011;73(9):1151-1161.
214. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature*. 2011;11(11):762–774.
215. Shlomi, B., Horowitz, I., Kahn, A. The effect of sinus membrane perforation and repair with Lambone on the outcome of maxillary sinus floor augmentation: A radiographic assessment. *//Int. J. Oral Maxillofacial Surg*. 2009, No 12, 456-467.
216. Shukla RV, Patel TG, Gupte SC. Time Dependent Release of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- α in Platelet Concentrate. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015;31(2):259-63. doi: 10.1007/s12288-014-0435-8. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25825569; PMCID: PMC4375163.
217. Sindet – Pedersen,S., Enemark, H. Comparative study of secondary and late secondary bone grafting in patients with residual cleft defect. *//Am. J. Orthod.*, Vol. 23, 2001, 579-589.
218. Sindet-Pedersen, S., Enematk, H. Reconstruction of alveolar cleft with mandibular or iliac crest bone grafts. *// J. Oral Maxillofac. Surg.*, Vol. 34, 2007, 567-578.
219. Somani, R., Zaidi, I., Jaidka, S. Platelet Rich Plasma--A Healing Aid and Perfect Enhancement Factor: Review and Case Report. *//International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2011, Jan-Apr.

220. Sood, V., Masamatti, S. S., Khatri, M., Kumar, A., Jindal, V. Platelet Concentrates - Part I. //Indian Journal of Dental Sciences. 2012, Juni.
221. Starshak, M, Thoma, W. Preprosthetic Oral Surgery with applications of PRP. //J. Oral Surg., Vol. 23, 2001, 453-464.
222. Stover, E., Seigel, L.C., Hood, P.A. PRP sequestration, with therapeutic platelet yields, reduces allogenic transfusion in complex cardiac surgery. //Anesth. Analg, Vol. 90, 2000, 509-512.
223. Straum OK. The optimal platelet concentration in platelet-rich plasma for proliferation of human cells in vitro—diversity, biases, and possible basic experimental principles for further research in the field: A review. PeerJ 8. 2020;e10303.
224. Taniguchi Y, Yoshioka T, Kanamori A, Aoto K, Sugaya H, Yamazaki M. Intra-articular platelet-rich plasma (PRP) injections for treating knee pain associated with osteoarthritis of the knee in the Japanese population: a phase I and IIa clinical trial. *Nagoya J Med Sci.* 2018;80(1):39-51. doi:10.18999/nagjms.80.1.39
225. Torres, J., Tamimi, F., Alkhraisat, M. H., Manchón, Á., Linares, R., Prados-Frutos, J.C., Hernández, G., López Cabarcos, E. Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. // Journal of Clinical Periodontology, 2010, Oct.
226. Torres, J., Tamimi, F. M., Tresguerres, I. F., Alkhraisat, M. H., Phil, M., Khraisat, A., Lopez-Cabarcos, E., Blanco, L. Effect of Solely Applied Platelet-Rich Plasma on Osseous Regeneration Compared to Bio-Oss®: A Morphometric and Densitometric Study on Rabbit Calvaria. // *Clinical Implant Dentistry & Related Research*, 2008.
227. Torres, J., Tamimi, F., Martinez, P.-P., Alkhraisat, M.H., Linares, R., Hernández, G., Torres-Macho, J., López-Cabarcos, E. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. // Journal of Clinical Periodontology, 2009, Aug.
228. Tozum, T. F, Demiralp, B. PRP: A promising innovation in dentistry. // J. Can. Dent. Assoc. Vol. 69, 2009, 664.
229. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, et al. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood.* 2004;104(10):3198-3204. doi:10.1182/blood-2004-04-1485.
230. Vaccaro AR, Anderson DG, Toth CA. Recombinant human osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) as an osteoinductive agent in spinal fusion. *Spine.* 2002;27:59-65.
231. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Galli A. The role of autologous fibrinplatelet glue in plastic surgery: A preliminary report. *Int J Artif Organs.* 2002;25:334-8.
232. Van Munster BC, Korevaar JC, Zwinderman AH, Levi M, Wiersinga WJ, De Rooij SE. Timecourse of cytokines during delirium in elderly patients with hip fractures. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(9):1704-9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2008.01851. x. Epub 2008 Aug 4. Erratum in: *J Am Geriatr Soc.* 2009 Jan;57(1):190. PMID: 18691278.
233. Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cunningham DD. Protease nexin-II (amyloid betaprotein precursor): a platelet alpha-granule protein. *Science.* 1990;248:745-748.
234. Vastardis, S., Yknh, R.A. PRP plus Alloderm for gingival recession treatment. //J. Dent. Res., Vol. 34, 2009, 456-465.

235. Villela DL, Santos VL. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors*.2010;28(2):111–116. doi:10.3109/08977190903468185.
236. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2131-7.
237. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc*. 2008;232(10):1515–1520. doi:10.2460/ javma.232.10.1515 10.2460/javma.232.10.1515 [pii].
238. Wasterlain A. S, Braun H. J, Dragoo J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2012;22(1):33–42.
239. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J Extra Corpor Technol*. 2004;36:250-4.
240. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*.
241. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (vegf) is released from platelets during blood clotting: Implications for measurement of circulating blood levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94:395-404.
242. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on periimplant bone regeneration. *Bone*. 2004;34(4):665-71.
243. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, et al. The Harvest Smart PRePTM system versus the FriadentSchutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:233–239.
244. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002;30(2):97-102.
245. Weibrich, G., Kleis, W. K., Streckbein, Ph., Moergel, M., Hitzler, W. E., Hafner, G. Comparison of Point-of-Care Methods for Preparation of Platelet Concentrate (Platelet-Rich Plasma). // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2012.
246. Weltermann A, Wolzt M, Petersmann K, Czerni C, Graselli U, Lechner K, et al. Large amounts of vascular endothelial growth factor at the site of hemostatic plug formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:1757-60.
247. Westerhuis RJ, van Bezooijen RL, Kloen P. Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury*. 2005;36:1405–12.
248. Williams, T. Implants in surgery. // *J. Oral impl.*, Vol. 23, 2008, 288–297.
249. Wls, W. Autologous platelet gel: Clinical function and use in plastic surgery. // *Cosmet. Derm.*, Vol. 23, 2009, 387-397.
250. Wojtowicz, A., Chaberek, S., Urbanowska, E., Ostrowski, K. Comparison of Efficiency of Platelet Rich Plasma, Hematopoietic Stem Cells and Bone Marrow in Augmentation of Mandibular Bone Defects. // *New York State Dental Journal*, Vol. 73, 2007, No 2, 41-45.
251. Wolfe, S.A., Bercowitz, W.E. The use of cranial bone grafts in the closure of alveolar and anterior palatal clefts. // *Plast. Reconstr. Surg.*, Vol. 23, 2001, 298-299.

252. Word, T. The split – bene technique with PRP. // J. Oral Surg., Vol. 23, 2005, 789-798.
253. Xu F, Previti ML, Van Nostrand WE. Increased severity of hemorrhage in transgenic mice expressing cerebral protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. Stroke. 2007;38:2598–2601.
254. Xu J, Clark RA. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. J Cell Biol. 1996;132(1-2):239-249.
255. Yan R, Gu Y, Ran J. Intratendon delivery of leukocyte-poor platelet-rich plasma improves healing compared with leukocyte-rich platelet rich plasma in a rabbit achilles tendinopathy model. Am J Sports Med. 2017;45(8):1909–1920
256. Yan R, Gu Y, Ran J. Intratendon delivery of leukocyte-poor platelet-rich plasma improves healing compared with leukocyte-rich platelet rich plasma in a rabbit achilles tendinopathy model. Am J Sports Med. 2017;45(8):1909–1920.
257. Yilmaz, S., Cakar, G., Ipci, S. D., Kuru, B., Yildirim, B. Regenerative treatment with platelet-rich plasma combined with a bovine-derived xenograft in smokers and non-smokers: 12-month clinical and radiographic results. // Journal of Clinical Periodontology, 2010, Jan.
258. Yksha, R.A. The performance of PRP with Alloderm and gingival and mucosal flaps. // J. Period., 2009, No 12, 578-589.
259. Yuan T, Guo SC, Han P, Zhang CQ, Zeng BF. Applications of leukocyte- and platelet-rich plasma (L-PRP) in trauma surgery. Curr Pharm Biotechnol. 2012;13(7):1173-84.
260. Zehnder, J.L., Leug, L.L.K. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. // Blood, Vol. 76, 1998, 2011-2016.
261. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan M.V, Wang J.H.C. The differential effects of leukocyte containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells – implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. Stem Cell Res Ther. 2015;6:173–186.
262. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan M.V, Wang J.H.C. The differential effects of leukocyte containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells – implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. Stem Cell Res Ther. 2015;6:173– 186.
263. Zimmerman R et al (2001) Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. Transfusion 41(10):1217-1224
264. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. Vox Sang. 2003; 85:283-9.