

İkinci nesil trombosit konsantrasyonunun klinik uygulamaları**Clinical application of second generation trombosite concentration**

İsmail Doruk Koçyiğit, DDS, PhD,^a Mustafa Tunalı, DDS, PhD,^b Hakan Özdemir, DDS, PhD,^c Yasemin Kartal, DDS, PhD,^d Berkay Tolga Süer, DDS, PhD^e

^aKırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

^bGATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Diş Hekimliği, Periodontoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

^cCumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye.

^dSerbest Diş Hekimi, İstanbul, Türkiye.

^eGATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Diş Hekimliği, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Received: 07 December 2012

Accepted: 03 April 2012

ÖZET

Trombositten zengin otojen ürünlerin tedavi amacı ile kullanılması, güncel bir yaklaşım olarak dikkati çekmektedir. Sert ve yumuşak doku iyileşmelerinde kullanılan ve çok çeşitli büyüme faktörleri ve proteinlerin kontrollü salınımlarını içeren bu preparatların doğal yara iyileşmesi için gerekli olan maddeleri yoğun olarak içerdikleri bilinmektedir.

Platelet-rich fibrin (PRF), yeni jenerasyon trombositten zengin otojen ürün olarak bilinmektedir. Kolay uygulanabilir ve biyokimyasal herhangi bir işlem gerektirmeyen PRF protokolü, kişinin kendisinden alınan kan örneklerinden lökosit ve trombosit zengin bir otolog biyomateryal elde edilmesine izin vermektedir.

Diş Hekimliğinde özellikle Periodontoloji ve Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi'ndeki klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanan PRF'nin önemi giderek artmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Trombosit, otojen fibrin, büyüme faktörü.

ABSTRACT

The therapeutic use of autologous platelet-rich fibrin constitutes a relatively new biotechnology that has been a breakthrough in the stimulation and acceleration of soft-tissue and bone healing. The efficiency of this process lies in the local and continuous delivery of a wide range of growth factors and proteins, mimicking the needs of the physiological wound healing and reparative tissue processes.

Platelet-rich fibrin (PRF) belongs to a new generation of platelet concentrates, with simplified processing and without biochemical blood handling. This easy protocol allows the production of leukocyte and platelet-rich fibrin clots starting from autologous blood samples.

PRF is used especially in clinical Periodontal and Oral and Maxillofacial Surgery applications. The significance of the PRF is gradually increasing

Keywords: Platelet, autogenous fibrine, growth hormone.

GİRİŞ

Doku mühendisliği, rekonstrüktif biyolojinin yeni ve umut vaat eden bir dalı olarak göze çarpmaktadır. Günümüz Tıp

Hakan ÖZDEMİR
Cumhuriyet Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji AD
Sivas, Türkiye
Telefon: 03462191010-2753
Fax: 03462191237
e-mail: hozdemir52@hotmail.com

ve Diş Hekimliği'nde Doku Mühendisliği başlığı altında, moleküler ve hücrel biyoloji, polimer kimyası ve fizyoloji alanlarında çok sayıda gelişme yaşanmaktadır. Doku mühendisliği temel olarak üç ana bileşenden oluşur.

1. Yapı iskeleti elemanları (kollagen, kemik mineralleri)
2. Haberleşme molekülleri (sitokinler, büyüme faktörleri)
3. Hücrel komponentler (osteoblastlar, fibroblastlar, sementoblastlar)

Bu üç ana koldaki gelişmelerle doku mühendisliği, diğer alanlarda olduğu gibi, Periodontolojide ve Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide de geniş kullanım alanları bulmaktadır. Ağız bölgesi gibi kompleks ve enfeksiyona her zaman açık bölgede başarılı ve öngörülebilir yumuşak ve sert doku rejenerasyonu elde etmek, vücudun diğer bölgelerine göre, nispeten daha zordur. Bu gerçekte rejenerasyon tekniklerinin ve dolayısıyla doku mühendisliği uygulamalarının önemini daha da artırmaktadır.^{1,2}

Kan kaynaklı ürünlerin yara kapatılmasında ve yara iyileşmesinin stimülasyonunda kullanılmasına, fibrin yapıştırıcıların kullanılmasıyla, 40 yıl önce başlamıştır. Fibrin; plazmatik molekül olan fibrinojenin aktive olmuş halidir. Bu çözülebilir fibriller molekül plazma ve trombositlerin α -graüllerinde yüksek miktarda bulunur ve hemostaz sırasında trombosit agregasyonunda belirleyici rol oynar. Aslında fibrinojen tüm koagülasyon reaksiyonlarının en son ürünüdür. Çözünebilir bir protein olan fibrinojen trombin sayesinde çözünemez bir yapı olan fibrine dönüşür. Polimerize fibrin jelde, hasarlı bölgenin ilk skatrisyel matriksini oluşturur. Biyolojik bir yapıştırıcıya dönüşen bu yapı, koagülasyon esnasında, ilk oluşan trombosit kümelerinin etrafında vasküler yapıya koruyucu bir duvar oluşturur.^{1,2,3}

Fibrin adezivleri kardiothorakik ve vasküler cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Bu adezivler diffüz mikrovasküler kanamaları örtmek için spreysel şekilde uygulanırlar. Ayrıca fibrin adezivleri yara kenarlarını örtmede ve kutanöz yenilenmeyi hızlandırmak için genel ve plastik cerrahide de kullanılmaktadır.⁴ Fibrinin biyolojik karakteri, cerrahların onu mekanik destek olarak yani skatrisyel dokuyu hızla oluşturmak için kullanmalarına da olanak sağlamıştır.⁵ Günümüzde de insan plazmasından elde edilen fibrin yapıştırıcılar bu amaçlarla

kullanılmaktadır. Otolog fibrin yapıştırıcılar kontaminasyon riskini engellemede en iyi tercih olarak bilinmesine rağmen üretilmelerindeki protokollerin karmaşıklığı ve yüksek maliyetleri kullanımlarını sınırlandırmaktadır.⁶

Trombositler, pıhtılaşmada önemli rolü olan ve damar yaralanmaları sırasında fazla kan kaybını engelleyen hücrelerdir. Trombositler, kemik rejenerasyonunu ve yumuşak doku matürasyonunu sağlayan çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü içerirler. Kilit büyüme faktörlerinden PDGF-AB (Platelet derived growth factor-AB), TGF β -1 (Transforming growth factor β -1), VEGF'ler (Vascular Endothelial growth factor) trombositlerde yoğun olarak bulunur. Bu büyüme faktörleri hücre çoğalmasını, matriks remodelasyonunu ve anjiyogenezisi stimüle etme potansiyelleri vardır.¹⁰ Son yirmi yılda, trombositlerin yara iyileşmesindeki rolünün daha iyi anlaşılmasından sonra bu hücrelerin tedavi amacı ile kullanılması fikri ortaya atılmıştır. Platelet Rich Plazma (PRP) olarak isimlendirilen yeni otojen preparat Ortopedi, Plastik Cerrahi ve Diş Hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{7,11} PRP konusunda farklı sonuçlar bulan çalışmalar olmasına rağmen yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği daha ağır basan görüştür. PRP preparatının özelliklerini belirleyen önemli etkenlerden biri de preparata katılacak olan pıhtılaşmayı sağlayacak maddelerdir. Katılan maddelerin miktar ve cinslerindeki değişiklikler çok sayıda PRP metodunun geliştirilmesini beraberinde getirmiştir. PRP teknikleri günümüzde de güncelliklerini korumaktadır.¹²

Platelet Rich Fibrin (PRF), diğer adı ile trombosit zengin fibrin, 2001 yılında, Fransa'da Choukron tarafından geliştirilen ikinci nesil trombosit konsantrasyonudur.⁶ PRF lökosit zengin ve trombosit zengin otolog fibrin biyomateryali olarak tanımlanmıştır. Diğer trombosit zengin ürünlerden farklı olarak bu teknikte bir antikoagülana, sığır kaynaklı trombine,

kalsiyum kloride veya herhangi bir jelleştirici maddeye ihtiyaç yoktur. Bu uygulanması basit ve maliyeti düşük açık teknikte cam kaplı plastik veya cam tüplere kan, bekletilmeden alınır ve protokole uygun olarak düşük devirde santrifüj edilir. Santrifüj sonucunda tüpte 3 katman oluşur.

1. Tüpün alt kısmında toplanan kırmızı kan hücreleri katmanı.

2. Trombositten fakir asellüler plazma, tüpün üst kısmında toplanır.

3. Tüpün orta kısmında ise oluşan trombositten zengin fibrin yani PRF pıhtısı oluşur

Santrifüj işlemi sonrası, doğal pıhtılaşma mekanizmasının yarattığı lökositten ve trombositten zengin pıhtının, kanın herhangi bir biyokimyasal modifikasyonuna gerek kalmadan elde edilmesi sağlanır.¹⁰

PRF Protokolü:

- Hastanın kendisinden alınan venöz kan (10 ml) herhangi bir antikuagülan içermeyen cam kaplı silicon ya da cam tüpe hemen yerleştirilir.
- Antikuagülan yokluğunda platelet aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu hemen tetikleneceğinden, vakit geçirilmeden tüp daha önce 3000 RPM (400 G)'e ayarlanmış santrifüje yerleştirilerek 10 dk. santrifüj edilir.

Santrifüj işleminden sonra tüpün alt kısmında toplanan kırmızı kan hücreleri katmanı, tüpün üst kısmında trombositten fakir asellüler plazma, tüpün orta kısmında ise trombositten zengin fibrin yani PRF pıhtısı oluşur.

- PRF kompleks bir üç boyutlu yapıdaki fibrin matikisi oluşturur. Bu fibrin matrikste, alınan kanın platelet ve lokositlerinin büyük bir kısmı toplanmıştır.
- Oluşan pıhtı nazik bir şekilde presel ile tüpten alınarak bu şekilde de kullanılabilir, ya da PRF pıhtısı steril iki gazlı bez arasına alınarak basınçsız bir şekilde sıkıştırılarak membran haline getirilebilir.

Diş hekimliğinde PRF'nin ve PRF membranının potansiyel kullanım alanları yumuşak doku iyileşmesinin güçlendirilmesi, kemik greftleri ile birlikte YDR ve YKR (yönlendirilmiş doku ve kemik rejenerasyonları) uygulamalarında, sinüs membran perforasyonlarının kapatılmasında veya tek başına sinus lift uygulamalarında osteokondüktif greft materyali olarak sayılabilir.^{8,13,14} Ayrıca kazanılmış ya da oluşturulmuş kemik defektlerinin tamirinde kullanılabileceği gibi dental implantların çevresinde oluşabilecek primer veya sekonder kemik kayıplarında da kullanım alanı bulmuştur.¹⁵

Bu makalede PRF'nin diş hekimliğinde kullanım alanları anlatılacaktır. Ayrıca PRF uygulamalarının avantaj ve dezavantajları, gelecek dönemlerde PRF uygulamalarından beklentiler tartışılacaktır

PRF'den Greft ve Membran Elde Edilmesi:

Elde edilen PRF pıhtısı serum fizyolojik ile nemlendirilmiş iki gazlı bez arasına alınarak minimal parmak basıncı ile membran haline getirilir. Oluşturulan membran kalınlığına ve kullanılacak bölgeye göre membran tek kat ya da iki kat şeklinde bölgeye yerleştirilir. Periodontal Plastik Cerrahi uygulamalar ile birlikte PRF membran Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR) ve Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu (YKR) uygulamalarında da rezorbe olabilen membran olarak kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca YDR uygulamalarında PRF membran haline getirilmeden de greft materyali şeklinde uygulanabilmektedir.^{1,5,10}

Elde edilmesinin ve uygulanmasının kolay olması, büyüme faktörleri ve savunma hücreleri açısından zengin oluşu PRF'nin önemli avantajları arasındadır. Yapılan çoğu klinik çalışmada da PRF olumlu sonuçlar vermiştir. Buna rağmen PRF'nin araştırılması gereken çok sayıda yönü de vardır.^{10,13,14} Bundan sonraki çalışmalar PRF'nin yumuşak ve sert dokuda ne kadar

süre ile etkisini gösterdiği, büyüme faktörlerinin dokuları ne kadar süre ile etkilediği, elde edilen membran kalınlığının yeterli olup olmadığı ve çift katlı uygulamaların gerekip gerekmediği ilk sorulacak sorular arasında gözükmektedir.

Periodontolojide PRF'nin Kullanım Alanları

Son yıllarda PRF, periodontolojide ve özellikle mukogingival cerrahi uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır. Periodontal Plastik Cerrahi'de PRF'nin kullanılması yeni bir uygulama olmasına rağmen, ikinci bir cerrahi alan gerektiren otojen Serbest Bağ Dokusu grefti gibi uygulamalardan daha atravmatik ve kolay uygulanabilir olması

sebebi ile hasta toleransı ve hekim açısından önemli avantajlara sahip görünmektedir.^{10,14}

Dişeti çekilmelerinin tedavisinde temel amaçlar olarak kök yüzeyi örtülmesi ve yapışık dişeti genişliği artışıdır. Bu amaçlar doğrultusunda, çeşitli flep teknikleri de kullanılarak, açık kök yüzeyi kapatılmaya çalışılırken palatinal bağ dokusu gibi sert damak bölgeden alınan matür yumuşak dokular flep altına yerleştirilerek dişeti kalınlığı ve kapatılan kök yüzeyi miktarı artırılmaya çalışılır. Dişeti çekilmelerinin tedavisinde PRF membran haline getirilerek, Serbest Bağ Dokusu grefti gibi uygulamalara benzer bir şekilde, değişik periodontal flep teknikleri ile birlikte kullanılabilir.^{4,10,14} (Resim 1).



Resim 1. Serbest bağ dokusu grefti yerine PRF membranının uygulanması.

PRF'nin ağız, diş ve çene cerrahisindeki uygulamaları

Dental implant uygulamalarının gelişmesiyle beraber son 20 yıl içerisinde çene kemiklerinin rekonstrüksiyonuna yönelik uygulamalarda artmıştır. Gerek otojen gerekse allojen greft ve membran uygulamaları artık rutin yapılan cerrahi işlemler haline almıştır. Çekim soketlerinin implant öncesi korunması, sinus, horizontal ve vertikal kemik ogmentasyonu

gibi işlemlerde farklı ogmentasyon materyalleri ve farklı teknikler kullanılmaktadır.¹⁵

İkinci nesil trombosit konsantrasyonu olan PRF ise hazırlanış ve uygulanış açısından biraz farklıdır. Öncelikle hazırlanışı sırasında 10 ml venöz kan dışında hiçbir ekstra katkıya ihtiyaç duymaz. İlk nesil PRP hazırlanışında olduğu gibi çoklu santrifüj işlemleri yerine

santrifüj işlemi bir kez yapılır. Yaklaşık 10 ml'den elde edilen kan 25x30 mm genişliğinde 0.5 mm kalınlığında bir

membran ve yine yaklaşık 1.5-2 cc greft hazırlamak için yeterlidir (Resim 2).



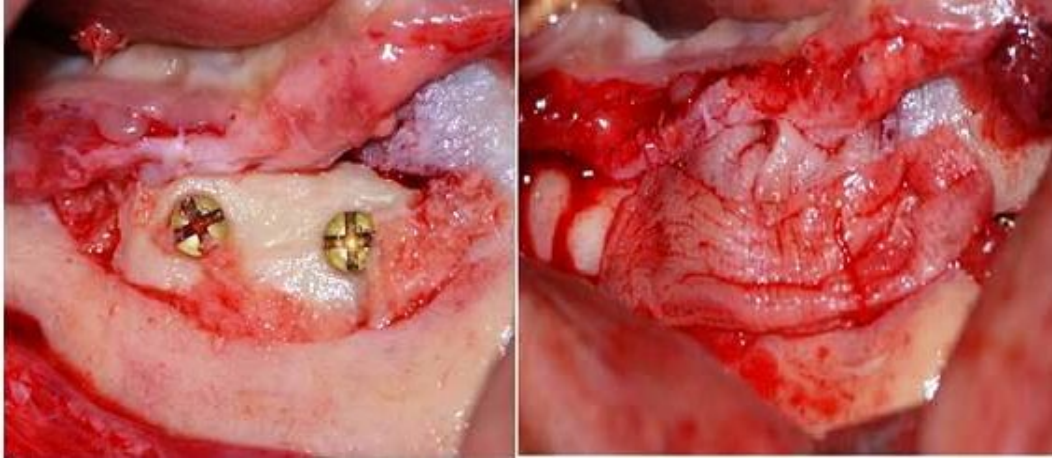
Resim 2. Membran ve greft olarak kullanılmak üzere hazırlanmış trombositten zengin fibrin yapı.

Klinik yaklaşım içerisinde ilk olarak membran uygulamaları olarak kullanmaya başladık. Özellikle implant cerrahisi sırasında oluşan kemik dehisenslerin de kullanıp başarılı sonuçlar elde ettik (Resim

3). Bununla beraber otojen kemik rekonstrüksiyonu gereken vakalarda otojen blok kemik üzerine yine membran olarak uygulamalar gerçekleştirdik (Resim 4).



Resim 3. Dental implant uygulamaları esnasında oluşan kemik dehisenslerinin örtülmesi için PRF kullanımı.



Resim 4. Otojen greftlerin üzerinin örtülmesi için PRF kullanımı.

Bunun yanı sıra odontojen kaynaklı kistlerin enukleasyonu sonrası oluşan kemik kavitealarının rekonstrüksiyonunda da komplikasyonsuz olarak kullandık (Resim 5). Literatürde de atravmatik kemik kistlerinin ve keratokistlerin neden olduğu

kemik kavitealarının tedavisinde de kullanıldığı örnekler mevcuttur.^{4,9} Ayrıca sinüs lift greftleme işlemini takiben membran olarak da kullanımı gerçekleştirdik (Resim 6).

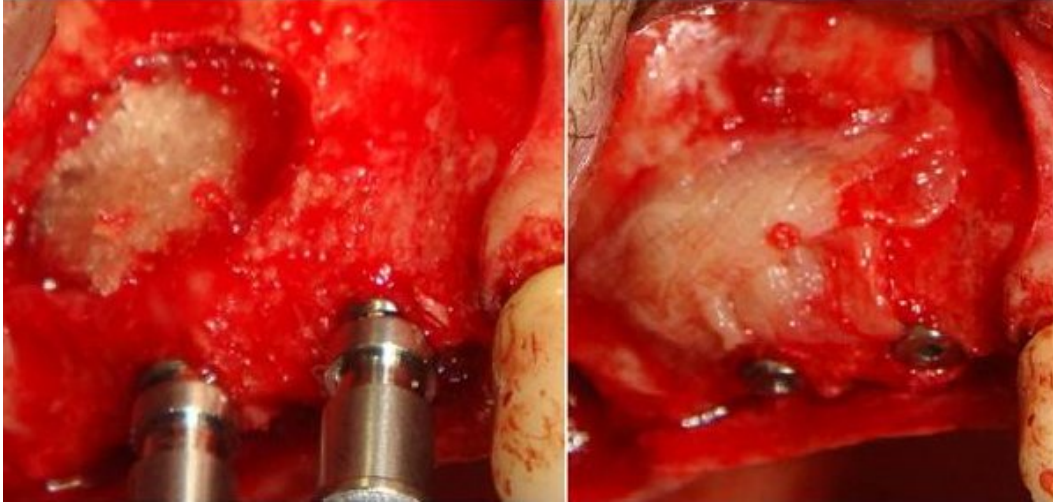


Resim 5. Odontojen kaynaklı kist enukleasyonu sonrası kavitenin rekonstrüksiyonu PRF ile greftlenmesi ve yine PRF membran ile örtülmesi.

TARTIŞMA

Bütün materyallerin avantajları olduğu kadar dezavantajları da mevcuttur. Özellikle altın standart konumundaki otojen greftlerin hızlı rezorpsiyona uğramaları, allojen materyallerin ise gerekli apozisyon ve rezorpsiyon

senkronunu gerçekleştirememeleri en sık karşılaşılan sorunlardır. Bu gelişmelerle beraber gelen nokta, iyileşme sürecinin hızlı başlaması ve iyileşme süresince özellikle iyileşmeden sorumlu büyüme hormonları gibi faktörlerin bölgede



Resim 6. Sinus lifting işlemi sonrası sinüs içerisine yerleştirilen greftin PRF membran ile örtülmesi.

bulunmasını arttırıcı ya da tetikleyici bir takım uygulamaların rekonstrüksiyon işlemine katılmasıdır. Dolayısı ile son 20 yıldır birinci nesil trombosit konsantrasyonları bu işlem için kullanılmaktadır. Trombosit agregasyonunun özellikle büyüme hormonları içeren α -granüllerini degranüle edip ani tetiklemeye neden olur. Bu biyolojik işlem bölgede özellikle iyileşmeden sorumlu; TGF β , IGF, PDGF, VGF gibi faktörlerin aktif hale gelmesini sağlar.⁷ Bu ve benzeri birçok büyüme hormonunu uzun süre yapısında barındırabilmesi nedeni ile sert ve yumuşak doku defektlerinin tamirinde başarı ile kullanıldığını düşünmekteyiz. Yumuşak doku iyileşmesi ve matürasyon için üç önemli faktör vardır. Bunlar; anjiogenez, bağışıklık ve epitelial kapanma. PRF ile oluşturulmaya çalışılan kuvvetli fibrin yapı bu 3 ana unsuru biyolojik ve mekanik olarak yerine getirebilecek kapasitededir.⁵ PRF'nin hazırlanışı ve uygulaması arasında geçen zamanın kısa olması uygulama başarısı ve kontaminasyonun engellenmesi açısından önemlidir. Operasyonlara başlandıktan ve greft/membran uygulamasına geçiş sırasında hastadan kan alınıp hazırlanması en doğru tercihtir. Bütün uygulamamızda PRF hazırlanışını

operasyonlar başladıktan sonra gerçekleştirdik ve hiçbir uygulamamızda hazırlanış açısında başarısızlığımız olmamıştır. Özellikle membran uygulaması esnasında greft ya da yara yüzeyine çok rahat adapte olması en büyük klinik kullanım avantajıdır. Bilindiği gibi kollajen esaslı ya da ikinci cerrahi gerektiren titanyum destekli veya tamamen titanyum olan membranların uygulanışı fazladan bir manüplasyon ve yeterli yumuşak doku esnekliğine ihtiyaç duyar. PRF ile hazırlanmış membranlar ile ilgili bu tür bir problem yaşanması, yapısından ve elastikiyetinden dolayı çok düşük bir ihtimaldir. Membran ve greftlerin ekspoz olmaları sonrasında, ikinci bir cerrahi işlem, çoğu zaman da kontaminasyondan dolayı bölgede enflamasyon önemli problemlerden biridir. PRF uygulamalarını gerçekleştirdiğimiz ve takibini yaptığımız 40 kadar vakanın hiçbirinde ekspoz ve enflamasyon komplikasyonu yaşamadık.

Choukroun ve ark. yaptığı bir vakada maksillada odontojen kaynaklı bir kist enukleasyonunu takiben, kaviteyi PRF ile kapatıp iyileşme sürecini 6-12 aydan 2 ay kadar kısa bir süreye indirdiklerini söylemektedirler.⁵ Bunu da fibrin matriksinin normal iyileşme sürecinden daha hızlı bir iyileşmeyi tetiklediği olarak açıklamaktadırlar. Kendi vakalarımızın

birçoğunda da aynı etkiyi gördüğümüzü söyleyebiliriz.

İkinci nesil trombosit konsantrasyonu olan PRF'nin, ilk nesil trombosit konsantrasyonu olan PRP'ye üstünlüğü biyolojik aktivasyonu ile açıklanmıştır. PRP'nin sahip olduğu yüksek trombin oranı hızlı polimerizasyona ve kısa süreli, kontrolsüz fibrin matrisi etkisine sebep olur. Bu da içerisinde mevcut bulunan büyüme faktörlerinin düzensiz dağılmasına, kısa süreli etkisine sebep olur.^{2,6} PRF'de ise durum tam tersidir. Kalıcı ve uzun süreli polimerizasyon tipi mevcut içeriğinin yani büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin, fibrin ağı üzerinden yavaş salınmasını ve uzun süreli kalmasını sağlar ve proteolize uğramasını engeller.^{2,3,6} TGFβ ve PDGF, PRF içerisinde şu ana kadar tanımlanmış büyüme faktörlerinden ikisidir. Bu ikisi dışında şu ana kadar tanımlanmış büyüme faktörü veya faktörleri mevcut değildir. Ayrıca bunların etkinliğini de tam olarak açıklayan çalışmalar mevcut değildir.

PRF uygulamaları için en önemli dezavantaj otolog bir süreç olmasıdır. Dolayısıyla başta hasta onayı gerektirir. Bununla birlikte limitleri bellidir. Çünkü tamamen tek donör kaynaklıdır. Herhangi bir şekilde PRF doku bankası veya allojenik greftler oluşturulması mümkün değildir. Çünkü PRF yüksek miktarda antijenik plasmatik molekül içerir.^{2,3,6}

SONUÇ

Limitli bilimsel verilerde PRF'nin PRP'ye oranla daha ümit veren otolog ve biyolojik bir trombosit konsantrasyonu olduğu belirgindir. Özellikle in-vitro çalışmalarla ve uzun dönem klinik takiplerle bu tezlerin desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Dohan EMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet rich fibrin (L-

PRF). Trends in Biotechnolgy 2011;27(3):158-167. [CrossRef]

2. Gible JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant. Transfusion 1990;30:741-747. [CrossRef]
3. Mosesson MW, Siebenlist KR, Mehn DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. Ann NY Acad Sci 2001;93(6):11-30. [CrossRef]
4. Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz MB, Dirrick A, Vascomez LO. Experimental and clinical applications of fibrin glue. Plast Reconstr Surg 1991;88:1005-1017. [CrossRef]
5. Choukroun J, Antonie D, Alain S. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part 4: Clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:e56-60
6. David M, Choukroun J, Antonie D. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part 1: Technological concepts and evolution Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:e37-44
7. Eduardo A, Mikel S, Alan T. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. Trends in Biotechnolgy 2006;24(5):227-234.
8. David M, Pierre D, Giuseppe M. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. Achieves of Oral Biology 2010;55:185-194.
9. Magremanne M, Baeyens W, Awada S, Vervaeke C. Solitary bone cyst of the mandible and platelet rich fibrin (PRF). Rev Stomatol Chir Maxillofac 2009;110(2):105-108.
10. Aroca S, Keglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. Clinical evaluation

- of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: A 6-month study. *J Periodontol* 2009;80:244-252. [\[CrossRef\]](#)
11. Choukroun J, Simonpieri A, Girard M, Fioretti F, Dohan S, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): A new biomaterial for healing. Part 4: Therapeutic implications. *Implantodontie* 2004;13:229-235.
 12. Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet-rich plasma: Validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg* 2005;16:749-756. [\[CrossRef\]](#)
 13. Zucchelli G, De Sanctis M. Treatment of multiple recession-type defects in patients with esthetic demands. *J Periodontol* 2000;71:1506-1514. [\[CrossRef\]](#)
 14. Han JS, John V, Blanchard SB, Kowolik MJ, Eckert GJ. Changes in gingival dimensions following connective tissue grafts for root coverage: Comparison of two procedures. *J Periodontol* 2008;79:1346-1354. [\[CrossRef\]](#).
 15. Jang ES, Park JW, Kweon H, Lee KG, Kang SW, Baek DH, Choi JY, Kim SG. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Jun;109(6):831-6.