

Bölüm 9

REJENERATİF ENDODONTİDE KAN PIHTISI VE TROMBOSİT KONSANTRASYONLARI

Nihan BERKDEMİR¹

GİRİŞ

Çürük, travma veya periodontal hastalıklara bağlı meydana gelen diş pulpası nekrozu dünyada en sık görülen sağlık sorunlarından biridir (1). Dişin ağızda fonksiyonel kalması için uygulanan geleneksel kök kanal tedavisi nekrotik pulpa dokusu çıkarılarak ve kanal boşluğu yapay ve biyouyumlu materyallerle doldurularak yapılır (2).

Kök kanal tedavisinin başarı kriterlerinden biri, apikal bakteri sızıntısını önlemek için sızdırmaz bir apikal tıkaç elde etmektir. Bu nedenle apeksi açık dişlerde apikal tıkaçın elde edilmesi daha zordur. Genellikle nekrotik immatür daimi dişlere kalsiyum hidroksit veya MTA ile apeksifikasyon tedavisi uygulanır (3-5). Kalsiyum hidroksit apeksifikasyonu genellikle birçok randevu gerektirir (6). Ayrıca kök kanalındaki kalsiyum hidroksitin uzun vadede kök dentininin kırılma direncini azaltabileceği gösterilmiştir (7). Kalsiyum hidroksite alternatif olarak MTA ile apeksifikasyon tedavi süresini kısaltabilir (5). Ancak apeksifikasyon tedavisi kök kanalındaki hasarlı pulpa dokusunu yeniden oluşturamaz ve kök ucu oluşumunu indükleyemez.

Nekrotik pulpalı açık apeksli daimi dişler için geleneksel apeksifikasyona alternatif olarak rejenerasyon protokolleri önerilmiştir (8). Rejeneratif tıp, yapısal ve fonksiyonel dokuları onaran veya değiştiren uygulamaları temsil eder (9). Rejeneratif tıp geliştikçe son yıllarda rejeneratif endodonti de büyük ilgi görmektedir (10).

Rejeneratif endodonti, “Dentin ve kökte hasar görmüş diş yapılarının pulpa-dentin kompleksi hücreleriyle beraber yerine konması için tasarlanmış biyolojik esaslı uygulamalardır” şeklinde tanımlanmıştır (11). Bu tanıma dayanarak,

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Medipol Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, nihan.berkdemir@medipol.edu.tr

rejeneratif endodontik tedavide (RET), açık apeksli daimi dişlerdeki enfeksiyon, travma ya da gelişimsel anomali nedeniyle zarar görmüş pulpa-dentin kompleksinin yeniden oluşturulması amaçlanmaktadır (10).

RET, 1952 yılında Dr. B. W. Hermann'ın vital pulpa amputasyonunda Ca(OH)_2 uygulamasıyla başlayan uzun bir geçmişe sahiptir (12). Daha sonra, yönlendirilmiş doku veya kemik rejenerasyonu ve distraksiyon osteogenezi (13); kemik ogmentasyonu için trombositten zengin plazma (PRP) ve rekombinant insan kemiği morfojenik proteini (rhBMP) (14, 15), periodontal doku rejenerasyonu için emdogain ve fibroblast büyüme faktörü 2'nin (FGF2) kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır (16, 17).

Iwaya ve ark. 2001 yılında fistül yolu bulunan kronik apikal periodontitisli ve açık apeksli daimi bir diş ilk defa 'revaskülarizasyon' tanımını kullanarak tedavi etmişlerdir (18). Daha sonra yapılan histolojik incelemede, dişlerin vital dokular içerdiği ve kanalının apikal bölümünde lifli bağ dokusu ve hücreli sementin oluştuğunu tespit etmişlerdir (19, 20).

Banchs ve Trope tarafından 2004 yılında kök kanal dezenfeksiyonu ve kanal boşluğunda kan pıhtısı indüksiyonuna dayanan bir revaskülarizasyon protokolü önerilmiştir (20-23). Bugün bilinen üçlü antibiyotik patını ve kanal içi bariyer olarak cam iyonomer siman yerine mineral trioksit aggregate (MTA) kullanarak rejeneratif endodontinin temelleri atılmıştır (18, 23).

Pulpa-dentin kompleksi rejenerasyonu için doku mühendisliğinin üç ana unsuru; kök hücreler, büyüme faktörleri ve iskele gereklidir. Kök hücreler, birbirine benzer hücrelere bölünebilme yeteneğine sahip, farklı hücre ve doku türlerine dönüşebilen hücrelerdir (24). Büyüme faktörleri, hedef hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanan polipeptitler veya proteinlerdir. Kök hücreler de dahil olmak üzere diş pulpa hücreleri, göç, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere hücrel aktiviteyi etkiler (25). Dokular üç boyutlu yapılardır ve hücre büyümesini ve farklılaşmasını desteklemek için uygun bir iskeleye ihtiyaç duyarlar (26).

REJENERATİF ENDODONTİDE İSKELE

Dokular üç boyutlu yapılardır, hücre büyümesini ve farklılaşmasını desteklemek için uygun bir iskeleye ihtiyaç duyarlar. Hücre dışı matris (Ekstraselüler matriks, ECM), doku veya organ barındıran hücreler tarafından üretilir. ECM bileşimi ve yapısı hücre davranışını, fenotipini, hücre bağlanmasını, hücre gö-

çünü, çoğalmasını, farklılaşması ve üç boyutlu yapısını doğrudan etkiler. Başka bir deyişle ECM, içinde bulunduğu hücreler, dokular ve organlarla dinamik bir denge durumundadır ve hücreler arasında bilgi aktarım ortamı olarak hizmet eder. Bundan dolayı ECM, hemen hemen her vücut sistemindeki doku mühendisliği uygulamaları için biyolojik bir iskeledir (27). ECM molekülleri kök hücrelerinin farklılaşmasını kontrol eder. Dokulara uygun bir iskele, hücreleri seçici olarak bağlayıp yerleştirebilir, büyüme faktörlerini içerebilir ve zamanla biyolojik bozunmaya uğrayabilir (28, 29). Doku mühendisliği için üretilen iskele doğal ECM yapısına olabildiğince uygun olmalıdır (26).

Bir doku hasarlandığı zaman pıhtılaşma mekanizması devreye girer. Çeşitli basamaklar sonucunda çözünebilir bir protein olan fibrinojen, trombin varlığında aktifleşerek çözünemez bir yapı olan fibrine dönüşür. Fibrin matrisinde hücreler ve büyüme faktörleri bulunur. Ayrıca doku rejenerasyonunda hızlı ve güçlü bir artış sağlar. Bu fibrinler molekül; hem plazmada, hem de trombosit granülü en fazla olan α granüllerinde yüksek oranda bulunur (30).

Fibrin, hemostaz sırasında trombosit kümeleşmesinde belirleyici rol oynar ve hücrelerin tutunmasına yardımcı olur. Böylece doku rejenerasyonuna izin veren geçici bir matris olarak görev alır (31-33).

RET'te kullanılacak doğal iskeleler; kollajen, azaltılmış mineral yapı/doğal dentin matrisi, kan pıhtısı, trombositten zengin plazma (PRP), PRF, kitosan, glukozaminoglikan/hyaluronik asit ve cilt. Biyoseramikler, polilaktik asit, polilaktik-ko-glikolik asit, poliglukolik asit, poli (ϵ -kaprolakton) yapay iskeleler oluşturur (34).

İSKELE OLARAK KAN PIHTISI VE TROMBOSİT KONSANTRASYONLARI

Kan esas olarak plazma, kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositler olarak dört bileşenden oluşur. Trombositler özellikle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), pıhtılaşma faktörleri, adezyon molekülleri, sitokinler ve anjiyogenik faktörlerin aktivasyonu ve salınmasından sorumludur. Bunlar da fibroblast, lökosit, makrofaj ve mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler) oluşumunu ve aktivitesini sağlar. Aktive edilmiş trombositler tarafından oluşturulan pıhtıdan; pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri ve sitokinler salınır. Bu moleküller doku onarımı, vasküler remodelling ve doku rejenerasyonu gibi fizyolojik olayları düzenler (35-37).

Kan Pıhtısı

Kan pıhtısı, fibrin ve trombositlerin kümeleşmesinden oluşur. İçinde pek çok büyüme faktörünün ve kök hücrelerin yanı sıra fagositler, immünooglobulinler, proinflatuar sitokinler ve antibakteriyel peptidler de bulunmaktadır (38, 39).

Bu bileşenler antibakteriyel özellik göstererek kanalda kalan bakterileri öldürmeye yardımcı olabilir. Ancak RET’de kan pıhtısının antimikrobiyal özelliklerinin anlaşılması için daha fazla araştırma yapılmalıdır (10).

RET’de, kan pıhtısı kök hücre kaynağı olması ve biyolojik bir iskele görevi görmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu işlem apikalden kasıtlı olarak başlatılan kanamanın, kanal boşluğunda pıhtılaştırılmasıyla gerçekleştirilir (40). Burda amaç, iskele olarak bir kan pıhtısı sağlamak ve pulpa dokusu rejenerasyonunu başlatmak için kanal boşluğuna trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) ve mezenkimal kök hücrelerinin gelmesini sağlamaktır (10).

Kan pıhtısını iskele olarak kullanmak, gereken maliyet ve zaman bakımından avantajlıdır. Ayrıca tripanofobisi (iğne korkusu) veya hemofobisi (kan görme korkusu) olan ve kolundan kan alınmasına izin vermeyen hastalar için uygun olsa da (41) bazı sınırlamaları beraberinde getirmektedir. Apikal dokulardaki hasar sebebiyle apikal kanamayı sağlamak her zaman mümkün olmayabilir. Kanal boşluğu içinde yeterli kan hacmine ulaşılamayabilir. Diğer kök kanallarından bir miktar kan transferi yapılması molar dişlerinde pratik bir çözüm olsa da tek köklü dişlerde bu yöntem mümkün değildir (42-44). Kan pıhtısının iskele olarak kullanılmasındaki dezavantajların önüne geçilmesi amacıyla, trombosit konsantrasyonlarının kan pıhtısı yerine iskele olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (43, 45, 46).

Son zamanlarda lökosit içeriğine ve fibrin yapısına göre trombosit konsantrasyonları için 4 ana sınıflama yapılmıştır (47):

1. Nesil - Trombositten zengin plazma (Platelet-rich Plasma, PRP): Konsantrasyon trombosit sayısı ve büyüme faktörleri doğrulanmıştır. Otomatik PRP hazırlığı için cihazlar geliştirilmektedir.
2. Nesil - Trombositten zengin fibrin (Platelet-rich Fibrin, PRF): Önceki hazırlık tekniklerinde modifikasyonlar ve trombositten zengin fibrin gibi yeni trombosit açısından zengin plazma türevlerinin geliştirilmesi sürdürülmektedir.
3. Nesil - Geliştirilmiş PRF’ler (A-PRF, A-PRF+, T-PRF, İ-PRF): Trombositten zengin fibrin türevleri; mekanik stabiliteyi, dayanıklılıkları ve biyo-

lojik olarak parçalanabilirlikleri bakımından çeşitli büyüme faktörlerini reaksiyona sokma, tutma ve salma yetenekleri açısından karşılaştırılır.

4. Nesil: Trombosit konsantrasyonlarının eşleşmesi (ortak hücreler) araştırılmaktadır.

Trombositten Zengin Plazma (Platelet-Rich Plasma, PRP)

Trombositten zengin plazma (PRP), fizyolojik sınırların çok üzerinde büyüme faktörleri içeren trombosit konsantrasyonuna sahip otolog plazma hacmidir. Birinci jenerasyon trombosit konsantrasyonu olarak tanımlanır (48). Kandaki normal trombosit değeri 150.000-350.000 trombosit / μ l arasındadır ve ortalama yaklaşık 200.000 trombosit / μ l'dir. PRP'nin çalışma tanımı olan 5 ml plazma hacminde 1.000.000 trombosit / μ l konsantrasyonu mevcuttur. Bu miktarın kemik ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırdığı kanıtlanmıştır (49). Trombositten zengin plazma, sadece rejeneratif diş hekimliğinde değil, aynı zamanda çene cerrahisinde, ortopedik cerrahide ve estetik tıpta da yaygın kullanıma sahiptir (50). PRP'nin ortaya çıktığı ilk yıllarda, artan başarısına ve kullanımına rağmen, potansiyelini engelleyen birkaç sınırlama ortaya çıkmıştır. Bunlar yapılan işlemlerin uzun sürmesi ve yara iyileşmesini olumsuz etkileyen sıkır trombin veya $CaCl_2$ antikoagülanlarının kullanılmasıdır (30).

En iyi düzeyde sonuç alınması için taze hazırlanmış PRP ilk 4 saat içinde kullanılmalıdır. Büyüme faktörlerinin salınımı, hazırlandıktan sonra 10 dakika içinde başlar ve büyüme faktörlerinin neredeyse % 95'i ilk saat içinde salınır (51). Büyüme faktörlerinin plazmadaki yarı ömürlerinin kısa olduğu bilindiğinden dolayı, tercihen yavaş ve kontrollü salınımının, yara iyileşmesini daha olumlu etkileyebileceği öne sürülmüştür (52-54).

Trombositten Zengin Fibrin (Platelet-Rich Fibrin, PRF)

PRF iskelesi biyolojik 3 boyutlu bir ağ olarak tanımlanmıştır. Kan pıhtısı içinde, ince fibrin liflerinden oluşan mikro gözenekler oluşur. Trombositler, fibrin ağı içinde kitlesel olarak hapsolür ve büyüme faktörleri bu üç boyutlu PRF ağı içinde tutulur. Bunu takiben büyüme faktörlerinin zaman içinde yavaş ve kademeli olarak serbest kalmasını sağlar (55). İkinci nesil trombosit konsantrasyonu olarak tanımlanır (48).

Rezerv haldeki yoğun büyüme faktörleri, endotelial hücrelerin göçüne, çoğalmasına ve fenotipik değişimine izin veren, böylece anjiyogenezi sağlayan ECM'yi etkiler (56, 57). Pıhtı ayrıca doku hücrelerinin yaralı bölgeye alınması

ve fibronektin, fibrin, monositler, fibroblastlar ve endotelial hücrelerin hareketi için geçici bir matris olarak işlev görür. PRF'nin osteoprotogenin ve alkalın fosfat ekspresyonunu artırarak dental pulpa hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (46).

PRF, hazırlama sürecinin PRP'ye göre nispeten kolay olması, elde etme maliyetinin düşüklüğü, ilave antikoagülan veya sığır trombininin kullanılmaması da dahil olmak üzere PRP'ye göre birçok avantaja sahiptir. Ayrıca kısa süreli etkili sıvı formdaki PRP'den farklı olarak PRF fibrin ağı, sitokinleri yavaşça salarak doku iyileşmesinde 1-4 hafta gibi uzun süreli bir etkiye sahip homojen 3 boyutlu bir yapı oluşturur (58, 59).

Araştırmacılar standart PRF elde etme tekniğindeki santrifüj hızını ve süresini değiştirerek; lökosit bakımından zenginleştirilmiş, ileri tip kondanse edilebilir A-PRF, A-PRF+ ve enjekte edilebilir i-PRF'yi geliştirmiştir (60-62).

2006 yılında Sacco, kanın santrifüj ayarlarını değiştirerek konsantre büyüme faktörünü (Concentrated growth factor, CGF) geliştirmiştir. PRF'ye kıyasla fibrin matriksinin içindeki büyüme faktörleri anlamlı ölçüde daha yoğun olduğu gözlenmiştir (63).

2013 yılında Tunalı ve ark.'nın L-PRF'yi modifiye ederek ve titanyum tüp kullanarak geliştirdikleri T-PRF; trombosit, sitokinler, lökositler ve hapsedilmiş ve emilebilir bir zar görevi gören çeşitli büyüme faktörlerinden oluşan polimerize bir matrisin bulunduğu trombosit konsantresidir (64). T-PRF periodontolojide güncel çalışmada başarıyla kullanılırken (65, 66) rejeneratif endodontide de kullanılan bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır.

Ulusoy ve ark.'nın 2019 yılında rejeneratif endodontide kan ve kan konsantrasyonlarıyla ilgili yaptıkları çalışmada (45), kan pıhtısı, PRP, PRF ve platelet pellet (PP) arasındaki kök genişliği, kök uzunluğu, radyografik kök alanı ve radyografik kanal alanı karşılaştırılmıştır. Tüm gruplarda kök genişliği ve kök uzunluğunda benzer bir artış görülmesine rağmen, kan pıhtısı grubunun radyografik kök alanı, PRP ile benzer; PRF ve PP gruplarından önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Kan pıhtısı grubunun radyografik kanal alanı ise PRP, PRF ve PP'den önemli ölçüde daha büyük bulunmuştur. PRP, PRF ve PP, kan pıhtısında da olduğu gibi apikal kanamaya ihtiyaç duymadan ve kök kanal obliterasyonuna önemli ölçüde daha az sebep olarak kan pıhtısına benzer klinik ve radyografik sonuçlar verebilir.

Apeksi açık nekrotik dişlerin revitalizasyonunda trombosit konsantrasyonlarının klinik çalışmalarının sistematik bir incelemesi, PRP veya PRF'nin kanal duvarlarının kalınlaşmasını ve devam eden kök gelişimini teşvik etmesinde kan pıhtısına göre önemli ölçüde üstün olmadığını göstermiştir (67). Yapılan başka bir çalışmada da kan pıhtısı ve PRF kombinasyonu tek başına kan pıhtısı kullanımından daha olumlu sonuç vermediği gösterilmiştir (68).

Bezgin ve ark.'nın 2015 yılında yaptıkları klinik çalışmada (69), tek köklü apeksi açık dişlerde PRP ve kan pıhtısının doku iskelesi olarak karşılaştırmışlardır. PRP kullanımıyla kök gelişiminde ve apikal kapanmada başarılı revaskülarizasyon vakaları görülse de kan pıhtısına göre belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Benzer şekilde Agalt ve ark.'nın 2017 yaptıkları klinik çalışmada (70), 12. ayın sonunda rejeneratif endodontik tedavi uyguladıkları vakalar arasında kök uzunluğundaki önemli bir artış dışında, iskele olarak PRP ve kan pıhtısı arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

Jayadevan ve ark.'nın 2021 yılında rejeneratif endodontide A-PRF ve PRF iskelelerini karşılaştırdıkları klinik çalışmada (71), 12 aylık takibin ardından gruplar arası periapikal iyileşme ve apikal cevap bakımından anlamlı bir fark görülmezken, kök kalınlığı ve uzunluğu bakımından A-PRF istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha iyi sonuçlar vermiştir.

Araujo ve ark.'nın 2022 yılında rejeneratif endodontide iskeleleri karşılaştıran çalışmalardan yaptıkları derlemede (72), PRF ve PRP iskeleleri kan pıhtısına ile karşılaştırıldığında kök uzunluğu ve dentin kalınlığında daha fazla artış olduğu sonucuna varılmıştır.

SONUÇ

Rejeneratif endodontide gelecek vadeden kan pıhtısı, PRP, PRF ve CGF iskeleleri ile tedavi başarısı açısından önemli sonuçlar elde edilmektedir. Birbirlerine üstünlüğü hakkında çeşitli tartışmalar olsa da, daha fazla araştırma ile endodontik tedavi gerektiren dişlerin kan pıhtısı ve trombosit konsantrasyonlarını kullanarak başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi günümüzde ve gelecekte RET'ler açısından önemli bir potansiyel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019;394(10194):249-60.
2. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *J Endod*. 2020;46(9s):S161-s74.
3. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc*. 1966;72(1):87-93.
4. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc*. 1975;8(2):74-93.
5. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol*. 2005;21(1):1-8.
6. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2002;18(3):134-7.
7. Doyon GE, Dumsha T, von Fraunhofer JA. Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. *Journal of endodontics*. 2005;31(12):895-7.
8. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *Journal of endodontics*. 2008;34(7 Suppl):S51-S6.
9. Rahaman MN, Mao JJ. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(3):261-84.
10. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J*. 2018;51(12):1367-88.
11. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007;33(4):377-90.
12. Hermann BW. On the reaction of the dental pulp to vital amputation and calxyl capping. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1952;7(24):1446-7.
13. Block MS, Cervini D, Chang A, Gottsegen GB. Anterior maxillary advancement using tooth-supported distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(5):561-5.
14. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*. 2000;71(10):1654-61.
15. Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208(1):316-22.
16. Heijl L, Heden G, Svärdröm G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EM-DOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):705-14.
17. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res*. 2001;80(12):2075-9.
18. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2001;17(4):185-7.

19. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:324-53.
20. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res.* 1971;79(5):333-49.
21. Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol.* 1986;2(3):83-9.
22. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *International endodontic journal.* 1996;29(2):125-30.
23. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics.* 2004;30(4):196-200.
24. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(5):452-5.
25. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand.* 1996;67(4):407-17.
26. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod.* 2008;34(7 Suppl):S51-6.
27. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol.* 2004;12(3-4):367-77.
28. Bi Y, Ehrirchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007;13(10):1219-27.
29. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res.* 1985;64 Spec No:530-40.
30. Miron RJ, Choukroun J. Platelet rich fibrin in regenerative dentistry : biological background and clinical indications. Hoboken, NJ: Wiley; 2017.
31. Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 2003;40(4):329-43.
32. Mazzucco L, Borzini P, Gope R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function. *Transfus Med Rev.* 2010;24(3):218-34.
33. Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18(5):363-82.
34. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod.* 2016;42(1):47-56.
35. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000;5(1):40-6.
36. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28(3):321-6.

37. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*. 2007;42(3):115-70.
38. Özdemir H, editor *Clinical application of second generation trombosit concentration*2012.
39. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia. Saunder Elsevier. 2007.
40. Endodontists AAo. *AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure 2016* [updated 06/08/16. Available from: <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf>.
41. Murray PE. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:139.
42. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod*. 2011;37(4):562-7.
43. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*. 2011;37(9):1327-30.
44. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*. 2011;37(2):265-8.
45. Ulusoy AT, Turedi I, Cimen M, Cehreli ZC. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J Endod*. 2019;45(5): 560-6.
46. Huang FM, Yang SF, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2010;36(10):1628-32.
47. Kawase T, Mubarak S, Mourão CF. The Platelet Concentrates Therapy: From the Biased Past to the Anticipated Future. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(3).
48. Caruana A, Savina D, Macedo JP, Soares SC. From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery. *Eur J Dent*. 2019;13(2):280-6.
49. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dentistry*. 2001;10(4):225-8.
50. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-96.
51. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-46.
52. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-60.

53. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, Tazzari PL, O'Connel SM, Ricci F, et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *Eur Cell Mater.* 2010;20:13-23.
54. Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann Maxillofac Surg.* 2011;1(1):53-7.
55. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, 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(3):e45-e50.
56. Burnouf T, Goubran HA, Chen T-M, Ou K-L, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013;27(2):77-89.
57. Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(4):441-50.
58. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, et al. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103(4):825-31.
59. Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J.* 2012;57(2):207-12.
60. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014;40(6):679-89.
61. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.* 2017;21(8):2619-27.
62. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-67.
63. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Buffoli B, Labanca M, Scari G, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech.* 2011;74(8):772-7.
64. Tunali M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51(5):438-43.
65. Ercan E, Suner SS, Silan C, Yilmaz S, Siddikoglu D, Sahiner N, et al. Titanium platelet-rich fibrin (T-PRF) as high-capacity doxycycline delivery system. *Clin Oral Investig.* 2022;26(8):5429-38.
66. Uzun BC, Ercan E, Tunali M. Effectiveness and predictability of titanium-prepared platelet-rich fibrin for the management of multiple gingival recessions. *Clin Oral Investig.* 2018;22(3):1345-54.

67. Lolato A, Bucchi C, Taschieri S, Kabbaney AE, Fabbro MD. Platelet concentrates for revitalization of immature necrotic teeth: a systematic review of the clinical studies. *Platelets*. 2016;27(5):383-92.
68. Zhou R, Wang Y, Chen Y, Chen S, Lyu H, Cai Z, et al. Radiographic, Histologic, and Biomechanical Evaluation of Combined Application of Platelet-rich Fibrin with Blood Clot in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2017;43(12):2034-40.
69. Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Kolsuz ME, Sonmez H. Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod*. 2015;41(1):36-44.
70. Alagl A, Bedi S, Hassan K, AlHumaid J. Use of platelet-rich plasma for regeneration in non-vital immature permanent teeth: Clinical and cone-beam computed tomography evaluation. *J Int Med Res*. 2017;45(2):583-93.
71. Jayadevan V, Gehlot PM, Manjunath V, Madhunapantula SV, Lakshmikanth JS. A comparative evaluation of Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) as a Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment of Traumatized Immature Non-vital permanent anterior teeth: A Prospective clinical study. *J Clin Exp Dent*. 2021;13(5):e463-e72.
72. Araújo L, Goulart TS, Gil ACK, Schuldt DPV, Coelho BS, Figueiredo DR, et al. Do alternative scaffolds used in regenerative endodontics promote better root development than that achieved with blood clots? *Braz Dent J*. 2022;33(2):22-32.