

Domen Vozel¹, Jure Urbančič², Nejc Steiner³, Saba Battelino⁴

Uporabnost plazme, bogate s trombociti in zunajceličnimi vezikli, pri rekonstrukciji lobanjske baze: prikaz primera s pregledom literature

Applicability of Platelet- and Extracellular Vesicle-rich Plasma in Skull-base Reconstruction: a Case Report with Literature Review

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: neoplazme lobanjske baze, lobanjska baza, plazma, bogata s trombociti, vodena regeneracija tkiv, neoplazme hipofize, likvoreja, eksosomi.

Plazma, bogata s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet and extracellular vesicle-rich plasma*, PVRP) je izdelek iz krvi s koncentracijo trombocitov in koncentracijo zunajceličnih veziklov (ZV), ki sta višji od njunih ravni v krvi. Dosedaj je PVRP v otorinolaringologiji veljala za dopolnilno ali alternativno terapevtsko sredstvo za zdravljenje različnih motenj celjenja. Ključno regenerativno vlogo PVRP posredujejo ZV, saj so bistveni posredniki medcelične in znotrajcelične komunikacije. Druga terapevtska sredstva, podobna PVRP, katerih glavna lastnost je predvsem visoka koncentracija trombocitov (npr. plazma, bogata s trombociti), so do sedaj uporabljali v različnih vejah medicine, od koder izvirajo tudi že raziskane možnosti uporabe PVRP. Kljub temu učinkovitosti omenjenih pripravkov ne moremo enačiti z učinkovitostjo PVRP. V kirurgiji lobanjske baze primanjkuje avtolognih nekomercialnih pripravkov za zaporo likvorske fistule. Dejstvo, da s PVRP v obliki gela (angl. *platelet and extracellular vesicle-rich gel*, PVRG) lahko zagotovimo vodotesno tesnjenje in spodbujamo osteogenezo, pomeni, da PVRG lahko s pridom uporabljamo pri rekonstrukcijah lobanjske baze. V prispevku predstavljamo pregled literature in opisujemo postopek priprave na kliničnem primeru zapore likvorske fistule po endoskopski transsfenoidalni resekciji makroadenoma hipofize.

¹ Asist. dr. Domen Vozel, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za otorinolaringologijo, Zaloška cesta 2, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; domen.vozel@kclj.si

² Asist. Jure Urbančič, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Nejc Steiner, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁴ Izr. prof. dr. Saba Battelino, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Katedra za otorinolaringologijo, Zaloška cesta 2, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: skull base neoplasms, skull base, platelet-rich Plasma, guided tissue regeneration, pituitary neoplasms, cerebrospinal fluid leak, exosomes.

Platelet- and extracellular vesicle-rich plasma (PVRP) is a blood product with concentrations of platelets and extracellular vesicles (EVs) above blood levels. To date, PVRP has been used in otorhinolaryngology as an adjunct or alternative therapeutic agent for the treatment of various diseases. The key regenerative role of PVRP is mediated by EVs, as they are essential mediators of inter- and intracellular communication. So far, other therapeutic agents similar to PVRP and whose main feature is a high concentration of platelets (e.g., platelet-rich plasma), have been used in various branches of medicine, and they also lead to the possibilities of using PVRP, which we have already studied. Nevertheless, the efficacy of these preparations cannot be equated with the efficacy of PVRP. Skull-base surgery lacks autologous non-commercial preparations for cerebrospinal fluid (CSF) leak closure. Because PVRP in gel form (platelet- and extracellular vesicle-rich gel, PVRG) can provide waterproof sealing and stimulate osteogenesis, we present the possibilities of using PVRG in skull-base reconstruction surgeries by reviewing the literature and describing the preparation procedure in a case report of CSF leak closure after endoscopic transsphenoidal pituitary macroadenoma resection.

PLAZMA, BOGATA S TROMBOCITI IN ZUNAJCELIČNIMI VEZIKLI

V literaturi za krvne pripravke, bogate s trombociti in z regenerativnim delovanjem, uporabljamo različne izraze, npr. plazma bogata s trombociti (angl. *platelet-rich plasma*, PRP); fibrinski matriks, bogat s trombociti; fibrin, bogat s trombociti (angl. *platelet-rich fibrin*, PRF); rastni faktorji, bogati s trombociti; koncentrat trombocitov; trombocitni gel (1). Terminološke nedoslednosti so posledica različnih metod opazovanja, protokolov priprave, komercialnih namenov in industrijskih motivov (2). Pripravke, bogate s trombociti, uporabljamo v otorinolaringologiji, natančneje kirurgiji glave in vratu, ter v ortopediji, travmatologiji, kirurgiji ran, maksilofacialni kirurgiji in zobozdravstvu (3).

Zunajcelični vezikli

Vse večje zanimanje za raziskave nanotecnosti (tj. diagnosticiranja in zdravljenja s sredstvi razreda velikosti nanometra) je pripeljalo do odkritja pomembnih struktur,

ki jih imenujemo zunajcelični vezikli (ZV). ZV so zaradi svoje membranske strukture in molekularnega podpisa pomembni posredniki medcelične komunikacije, zato jih s pridom uporabljamo v regenerativni medicini in otorinolaringologiji. Mednarodno združenje za zunajcelične vezikle opredeljuje ZV kot delce, ki se naravno sproščajo iz celic in so omejeni z maščobnim dvoslojem. Ker ne vsebujejo funkcionalnega jedra, se ne morejo razmnoževati. V splošnem jih razvrstimo glede na fizično in biokemijsko sestavo ter glede na opis stanj ali celic, iz katerih nastanejo (4). Poleg tega ZV na splošno delimo na eksosome in mikrovezikle (5). Obe skupini so pred kratkim prepoznali kot sredstva za napredno regenerativno zdravljenje, zlasti ZV, ki izvirajo iz trombocitov (t. i. trombocitni ZV), zaradi indukcije celične diferenciacije in izboljšanja kostno-mišične ali nevronske regeneracije (6). Dosedaj so v raziskavah na živalih *in vitro* in *in vivo* iz PRP izolirane trombocitne ZV uporabljali za zdravljenje ishemije miokarda, atero-

skleroze, okvare krvnih žil, hemoragičnega šoka, ishemije možganov, kroničnih in diabetičnih kožnih ran, osteonekroze glavice stegenice, osteoartritisa in akutne okvare pljuč (7).

Razvoj postopkov priprave plazme, bogate s trombociti in zunajceličnimi vezikli

Nedavno smo v avtolognem tekočem pripravku iz krvi, bogatemu s trombociti (8, 9), zaznali in izmerili pomembne koncentracije ZV. Zato smo ga poimenovali plazma, bogata s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich plasma*, PVRP). PVRP je pripravek, pridobljen iz krvi, in ima koncentracijo trombocitov in koncentracijo ZV, ki sta višji od koncentracij v krvi. Zato je PVRP pravzaprav »nadgradnja« drugih krvnih pripravkov na področju avtolognega regenerativnega zdravljenja (3). Kasneje se je avtologna PVRP, pripravljena po protokolu dvostopenjskega centrifugiranja, izkazala za učinkovito pri zdravljenju kroničnega pooperativnega vnetja temporalne kosti (8). Žal smo z dolgotrajnim protokolom priprave, ki v povprečju traja kar 80 minut, iz odvzete krvi lahko pripravili le približno 10% PVRP (8). Vemo tudi, da na sestavo PVRP vplivajo obdelava vzorcev krvi in značilnosti bolnikove krvi (3, 10).

Zaradi potrebe po razvoju čvrstega pripravka smo iz PVRP pripravili gel in ga poimenovali gel, bogat s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich gel*, PVRG) (11).

Za premagovanje izzivov variabilnosti v sestavi v PVRP in PVRG med bolniki in pri posameznem bolniku smo razvili matematični model o vplivu postopkov priprave PVRP in PVRG, ki upoštevajo biofizikalne lastnosti krvi in njenih komponent (tj. hitrost sedimentacije eritrocitov) (9). V validacijski klinični raziskavi smo razvili protokol priprave PVRP in PVRG za zdravljenje osteoradionekroze lateralne lobanjske baze,

kronične perforacije bobniča in likvorske fistule (12).

Možnosti uporabe plazme, bogate s trombociti in zunajceličnimi vezikli

Doslej so pripravke, bogate s trombociti (npr. PRP in PRF), uporabljali v različnih vejah medicine (tabela 1). Pri navedenih boleznih in stanjih je v prihodnosti možna tudi uporaba PVRP.

Po našem vedenju o uporabi PVRP v otorinolaringologiji trenutno obstajajo le posamične objave in redke metaanalize (18), kar je verjetno posledica pomanjkanja dobro načrtovanih randomiziranih kontroliranih kliničnih raziskav (19).

Pregled uporabe pripravkov, bogatih s trombociti (npr. PRP in PRF) v otorinolaringologiji je prikazan na sliki 1.

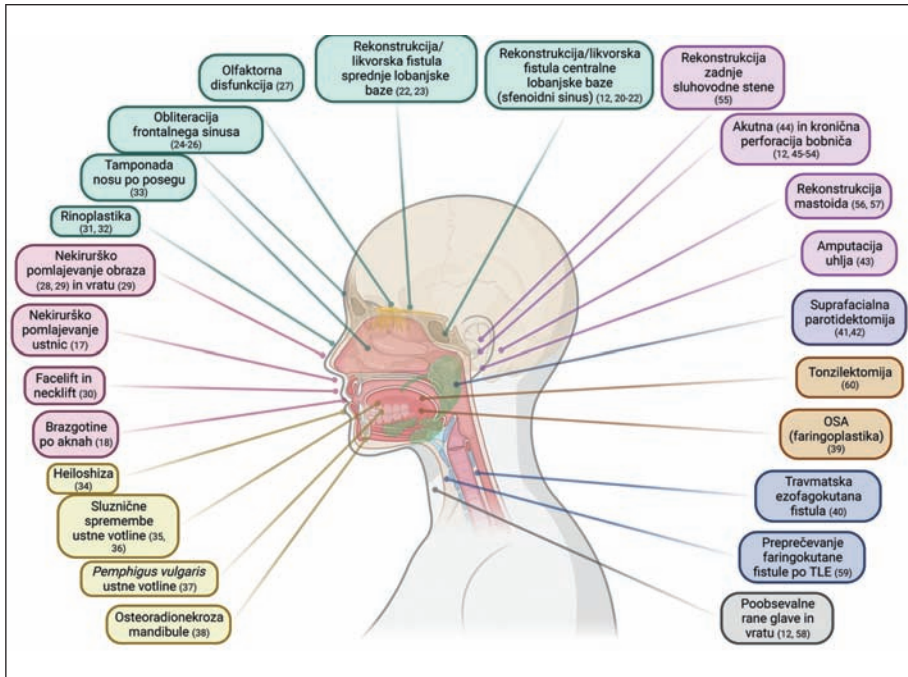
KIRURGIJA LOBANJSKE BAZE IN LIKVORSKA FISTULA

Glavna značilnost kirurgije lobanjske baze je natančna disekcija baze lobanje, ki je tesno povezana z življenjsko pomembnimi živčnimi in žilnimi strukturami ter posebnimi čutili (tj. vidom, sluhom, ravnotežjem, vonjem in okusom). Kirurgija sprednje lobanjske baze običajno označuje transnazalno endoskopsko in/ali klasično transfacialno kirurgijo. Kirurgija stranske lobanjske baze v večini pomeni lateralni pristop k bazi lobanje, ki je običajno otokirurški. S temi pristopi lahko seciramo sprednjo, srednjo in zadnjo lobanjsko kotanjo. Zaradi znotrajlobanjske (intrakranialne) resekcije pri tovrstni kirurgiji običajno sodeluje nevrokirurg.

Kirurgija anteriorne in lateralne lobanjske baze ima pomembno vlogo pri zdravljenju številnih pridobljenih ali prirojjenih motenj, ki vključujejo kosti lobanjske baze (tj. frontalno, etmoidno, sfenoidno, temporalno in okcipitalno kost). To so na primer resekcija novotvorb (npr. meningiom, estezionevroblastom, rak srednjega ušesa) ali

Tabela 1. Področja uporabe pripravkov, bogatih s trombociti**, in možnosti uporabe PVRP. Nekatera področja medicine si delijo indikacije, bolezní ali kirurške posege, pri katerih uporabljamo PVRP. PRP – plazma, bogata s trombociti (angl. *platelet-rich plasma*), PRF – fibrin, bogat s trombociti (angl. *platelet-rich fibrin*), * – sistematični pregled/metaanaliza, ** – PRP in PRF, PVRP – plazma, bogata s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich plasma*). Nekatera področja medicine si delijo indikacije, bolezní ali kirurške posege, pri katerih uporabljamo PVRP (3, 13–17).

Področje medicine	Indikacija, bolezen ali kirurški poseg	
ortopedija in travmatologija	*plantarni fasciitis	Ahilova tendinopatija
	*epikondilitis komolca	patelarna tendinopatija
	*osteoartritis kolena	zlom kosti
	osteoartritis kolka	pretrganje sprednje križne vezi
plastična, rekonstrukcijska in estetska kirurgija ter kirurgija roke	redukcijska mamoplastika	sindrom karpalnega kanala
	abdominoplastika	pomlajevanje obraza in vratu
kirurgija ran	rekonstrukcija dojke z lipofilingom	opekline
	*diabetične razjede	razjede zaradi pritiska
	venske razjede nog	poškodbene rane
maksilofacialna in oralna kirurgija	arterijske razjede	kronične rane
	*parodontalne vrzeli	kirurgija zobnih implantatov
	*parodontalna bolezen	dvig maksilarnega sinusa
	*osteoartritis čeljustnega sklepa	bisfosfonatna osteonekroza mandibule
	kirurgija odontogenih cist mandibule	ortognatska kirurgija
ginekologija in urologija	kirurgija zlomov mandibule	ekstrakcija zob
	carski rez	urinska inkontinenca
	ektopija materničnega vratu	neplodnost
	distrofija vulve	vaginalne okužbe
	vulvektomija zaradi raka	vaginalno staranje
	vezikularne, perianalne in rektovaginalne fistule	Peyroniejeva bolezen
Oftalmologija	erektilna disfunkcija	
	hiposekretorno suho oko	Sjögrenov sindrom
Dermatologija	suho oko po laserski refrakcijski kirurgiji	razjede roženice
	<i>lichen planus</i>	
kardiorakalna kirurgija	alopecija	
	hilotoraks po ezofagektomiji	
	sternotomijske rane	
abdominalna kirurgija	mediastinitis po operaciji srca	
	hiatalna hernija	
Nevrokirurgija	bariatrična kirurgija želodca	
	glavobol po punkciji dure	
	kirurgija ledvene hrbtenice	
	likvoreja po operaciji lobanje in hrbtenice	



Slika 1. Prikaz doseganje uporabe pripravkov, bogatih s trombociti (npr. PRP in PRF), in možnosti njihove uporabe pri prikazanih indikacijah oziroma posegih. Shema obenem prikazuje možnosti uporabe PVRP in PVRG v prihodnosti. PRP – plazma, bogata s trombociti (angl. *platelet-rich plasma*), PRF – fibrin, bogat s trombociti (angl. *platelet-rich fibrin*), OSA – obstruktivna nočna apneja (angl. *obstructive sleep apnea*), TLE – totalna laringektomija. PVRP – plazma, bogata s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich plasma*), PVRG – gel, bogat s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich gel*).

vnatega tkiva (npr. invazivna glivična bolezen, holesteatom), dekompresija lobanjskih živcev (npr. travmatska kompresija obraznega ali optičnega živca) in zaprtje likvorske fistule.

Likovrska fistula nastane, ko se zaradi raztrganine dure in arahnoidne ustvari komunikacija med arahnoidnim prostorom, ki vsebuje likvor, in zunanostjo (npr. nosna votlina). Raztrganina je posledica poškodbe ali posega v področju lobanjske baze (npr. namerno med resekcijo baze lobanje ali nenamerno ob funkcionalni endoskopski kirurgiji obnosnih votlin). Če vzroka likvoreje ne ugotovimo, govorimo o spontani likvorski fistuli, ki je običajno povezana z idiopatsko znotrajlobanjsko hipertenzijo. Znak likvorske fistule je rinolikvoreja ali oto-

likvoreja, bolniki pa tožijo tudi za glavobolom, slabšim vidom in sluhom, motnjami ravnotežja, vrtoglavico in omotičnostjo ter so nagnjeni k razvoju meningitisa (9).

V skladu z mednarodnim dogovorom (61) je bistveno, da likvorsko fistulo čim prej zapremo. Zapiranje fistule je potrebno že pri primarni operaciji, kasneje pri revizijski operaciji ali pri zdravljenju spontanega likvorske fistule. Potrebno je večplastno zaprtje, a soglasja o najprimernejšem materialu ni (61). Glavni cilj zapiranja je zagotoviti trajno vodotesno zaprtje, ki ga lahko zagotovimo z različnimi avtolognimi materiali (npr. *fascia lata*, trebušna maščoba, sluznični reženj, perikranialni reženj) ali s heterolognimi materiali (npr. TachoSil®, Vivostat®, Surgicel®).

Uporaba PVRP in PVRG v kirurgiji sprednje lobanjske baze

Glede na objave, ki so trenutno na voljo, kliničnih raziskav o uporabi pripravkov, bogatih s trombociti na področju kirurgije lobanjske baze, vključno z rekonstrukcijo lobanjske baze oziroma zaprtjem likvorske fistule, ni dovolj (slika 1) (tabela 2).

Vlogo pripravkov, bogatih s trombociti, so natančneje raziskali v raziskavah *in vitro* in v raziskavah na živalih. Vasilikos in sod. (2020) je raziskoval hermetični učinek trombocitnega gela. *In vitro* so ustvarili duralne raztrganine in jih rekonstruirali z gelom in šivom ali samo s šivom. Dura, rekonstruirana z gelom in šivom, je zadržala višji vodni tlak kot dura, rekonstruirana samo s šivom (62). Poleg hermetičnih lastnosti pripravkov, bogatih s trombociti, so v prospektivni randomizirani kontrolirani raziskavi Kim in sod. (2014) ugotovili, da so na živalskem modelu (zajcu) omenjeni pripravki omogočili povečano osteogenezo lobanjskih kosti (63).

Ker v raziskavah *in vitro* in raziskavah na živalih poročajo o obetavnih rezultatih, so pripravek, bogat s trombociti, uporabili pri transnazalni endoskopski rekonstrukciji defektov lobanjske baze. Po nam znanih podatkih so o največji velikosti vzorca poročali Soldatova in sod. (2017), in sicer o dajanju fibrina, bogatega z levkociti in s trombociti (angl. *leukocyte- and platelet-rich fibrin*, L-PRF) pri 47 bolnikih z resekcijo selarne, paraselarne ter supraselarne benigne in maligne (tj. metastatske in nemetastatske) bolezni, ki je zahtevala transsfenoidni, transplanarni, transklivalni, transkribriformni, transetmoidni ali transpterigoidni pristop. L-PRF so pripravili brez antikoagulantna, zato med centrifugiranjem nastane gel oz. beli krvni strdek (23). To je razlog, da Amaral in sod. (2016) menijo, da pripravek ni PVRP ali PVRG (24). L-PRF so v raziskavi podložili (angl. *inlay*) in ga položili preko (angl. *overlay*) mukoperistealnega presadka ali režnja (npr.

Haddadovega režnja). Čeprav je incidenca (pojavnost) pooperativne likvorske fistule nizka, tvorba krast in brazgotin pa zadovoljiva, bo potrebnih več raziskav. Glavne omejitve raziskave so namreč retrospektivnost, odsotnost kontrolne skupine in heterogenost skupine (20).

L-PRF so v raziskavah uporabili tudi Khafagy in sod. (2018), in sicer pri transnazalni endoskopski zapori spontane likvorske fistule, ter uporabili L-PRF na *inlay* in *overlay* način kot dodatek avtolognim presadkom in režnjem. Med kontrolno in intervencijsko skupino niso ugotovili statistično značilnih razlik med tlaki likvorja (tj. kazalnik znotrajlobanjskega tlaka), velikosti vrzeli lobanjske baze in ponovitvi likvrije, kar kaže na ugodne učinke L-PRF pri rekonstrukciji lobanjske baze. Glavna pomanjkljivost raziskave je relativno kratek čas pooperativnega spremljanja (tj. $6,8 \pm 10,3$ meseca) (23).

V pilotni raziskavi so Fredes in sod. (2017) poročali o neoosteogenezi lobanjske baze, rekonstruirani s kombinacijo L-PRF in avtolognih režnjev ali presadkov. Pri štirih od petih bolnikov so s CT na mestu rekonstrukcije ugotavljali radiološke znake tvorbe nove kostnine (21).

Rasmussen in sod. (2018) so L-PRF uporabil za rekonstrukcijo defektov po transsfenoidnem endoskopskem pristopu na področje turškega sedla (*sella turcica*). Čeprav so L-PRF uporabili izključno na način *overlay*, so po kirurškem posegu opazili zmanjšano nastajanje krast, medtem ko likvorske fistule niso zaznali. Glavna pomanjkljivost raziskave je majhen vzorec (samo 12) preučevanih bolnikov (27).

Uporaba PVRP in PVRG v kirurgiji stranske lobanjske baze

Čeprav so pripravke, bogate s trombociti, že doslej uporabljali v kirurgiji sprednje lobanjske baze, raziskav o njihovi uporabi v kirurgiji lateralne lobanjske baze po našem vedenju ni.

Tabela 2. Pregled kliničnih raziskav o uporabi pripravkov, bogatih s trombociti pri rekonstrukciji lobanjske baze. L-PRF – fibrin, bogat z levkociti in s trombociti (angl. *leukocyte- and platelet-rich fibrin*), CT – računalniška tomografija, PVRG – gel, bogat s trombociti in zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich gel*).

Avtor (leto)	Tip raziskave	Število bolnikov	Defekt	Način rekonstrukcije	Izid intervencije
Khafagy in sod. (2018)	randomizirana kontrolirana	20 + 20	spontane likvorske fistule v področju obnosnih votlin, najpogosteje <i>lamine cribrose</i>	skupina A: večslojno zapiranje z L-PRF skupina B: večslojno zapiranje	Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik glede ponovnega pojava likvorske fistule. L-PRF je dober pomožni material pri endoskopskem zdravljenju spontane likvorske fistule.
Rasmussen in sod. (2018)	kohortna prospektivna	12	likvorske fistule po transsfenoidni transselarni resekciji	vechslojno zapiranje z L-PRF	L-PRF spodbuja zgodnjo regeneracijo sluznice sfenoidnega sinusa pri zapiranju endoskopskih pristopov na <i>sello</i> . V prvih 30 pooperativnih dneh ni bilo zapletov.
Soldatova in sod. (2017)	kohortna retrospektivna	47	likvorske fistule po resekciji selarnih, paraselarnih in supraselarnih lezij	vechslojno zapiranje z L-PRF	Pri 42 % ugotovljamo zmanjšanje nastajanja krast (21 dni oz. 7 dni po operaciji); pri 23 % ni bilo krast; pri 34 % ni bilo sprememb v prisotnosti krast; pri 8,5 % se je pojavila pooperativna likvorska fistula.
Fredes in sod. (2017)	kohortna retrospektivna	5	likvorske fistule po resekciji lezij sprednje lobanjske baze	vechslojno zapiranje z L-PRF	Pri štirih bolnikih je CT je pokazala zaprtje kostne vrzeli z neoosteogenezo, a je bila kost videti manj gosta kot sosednja normalna kost. Primerjava s kontrolnim bolnikom je pokazala podobne radiološke značilnosti. L-PRF spodbuja celjenje in regeneracijo kost
Steiner in sod. (2022)	prikaz primera	1	na kirurško zdravljenje neodzivna likvorska fistula po transsfenoidalni transselarni resekciji	vechslojno zapiranje z individualiziranim PVRG	Peti dan po zadnjem kirurškem zaprtju likvorske fistule so s CT izključili pomemben pnevmocelalus. Na kontrolnem pregledu dva meseca po odpustu ni bilo vodenega izcedka in glavobola. Nosna endoskopija ni pokazala znakov likvorske fistule in krast.

Ker je med otokirurškimi posegi rutinsko izpostavljena dura srednje lobanjske kotanje, bi PVRP in PVRG lahko uporabili za preprečevanje likvorske fistule ali nastanka meningokele prek mehanizmov neosteogeneze in remukozalizacije. Poleg tega bi lahko obliteracijske lastnosti PVRP in PVRG izkoristili kot dodatek k maščobi pri obliteraciji po mastoidektomiji ali pri subtotalni petrosektomiji.

Ker ZV zlahka prečkajo krvno-možgansko pregrado in so jih predlagali kot vektorje pri zdravljenju naglušnosti, bi lahko PVRP in PVRG imeli potencialno vlogo pri zdravljenju okvare notranjega ušesa (4, 65, 66).

PRIKAZ PRIMERA ZAPORE LIKORSKE FISTULE V SFENOIDNEM SINUSU

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije (št. 0120-146/2019/5, 17. 4. 2019 in št. 0120-498/2020-3, 13. 1. 2021).

Povzetek anamneze, statusa in preiskav

42-letna ženska z vodenim izcedkom iz obeh nosnic, vztrajno zvišano telesno temperaturo, glavobolom, arterijsko hipertenzijo, sindromom policističnih jajčnikov in prediabetesom je bila sprejeta zaradi zdravljenja likvorske fistule v predelu turškega sedla (*sella turcica*) po transnazalni transsfenoidalni endoskopski ekstrakapsularni resekciji ACTH adenoma hipofize.

Intraoperativno smo večplastno, tj. s Haddadovim režnjem in heterolognim neadhezivnim resorbilnim kirurškimi lepili, rekonstruirali vrzel dure. Sedmi dan po kirurškem posegu se je pri bolnici pojavil voden izcedek iz nosu zaradi likvorske fistule. Deseti pooperativni dan smo vstavili lumbalno drenažo za znižanje znotrajlobanjskega tlaka, a je rinolikvoreja vztrajala. Petnajsti pooperativni dan smo opravili endoskopijsko nosu v lokalni in epimukozni anesteziji, med katero smo ugotovili mesto likvorske

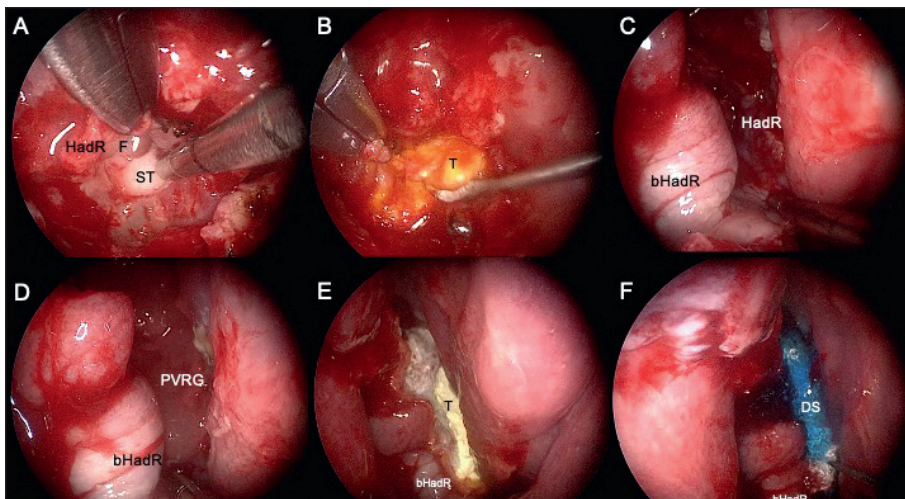
fistule in jo zaprli s heterolognim resorbilnim neadhezivnim kirurškim materialom. Teden dni po posegu likvorske fistule nismo zaznali, zato smo lumbalno drenažo odstranili. 26 dni po odstranitvi adenoma hipofize oz. 11 dni po zapori likvorske fistule se je rinolikvoreja ponovila, zato smo bolnico sprejeli na našo kliniko. Protimikrobno zdravljenje, predpisano na dan prve operacije, smo na dan sprejema prekinili.

Režim zdravljenja

Tri dni po sprejemu na naš oddelek smo v splošni anesteziji izvedli zaprtje visokopretočne likvoreje v predelu sedla (*sella*). Po deepitelizaciji in osvežitvi robov likvorske fistule smo najprej na *inlay* način ustavili rinolikvorejo s fibrinskim tesnilom TachoSil® (Baxter, Deerfield, Illinois, ZDA). Preko Tachosila® smo na *overlay* način namestili Haddadov reženj in preko režnja namestili približno 30 ml PVRG. (Na koncu smo vse prekrili s TachoSilom® in resorbilno nosno oblogo SINU-KNIT™ (Smith-Nephew, London, Velika Britanija) ter preko tega polili DuraSeal™ (Integra, Princeton, New Jersey, ZDA) (Slika 2). Preostali PVRG smo nanесли na izpostavljeno kost in poškodovano sluznico nad defektom, ki je nastal po septektomiji. Ob koncu kirurškega posega smo v vsako nosno votlino vstavili po en nosni tampon Merocel® (Medtronic®, Dublin, Irska), s čimer smo podprli rekonstruirano področje in zagotovili hemostazo. Predpisali smo perioperativno protimikrobno profilaktično zdravljenje. Po kirurškem posegu smo bolnico sprejeli v enoto za intenzivno nego, kjer smo uvedli nefarmakološke ukrepe za zmanjšanje znotrajlobanjskega tlaka (dvig glave za 30°, ukrepi proti napenjanju, odvajalo, 24 ur strogega ležanja). Drugi pooperativni dan smo odstranili nosne tampone.

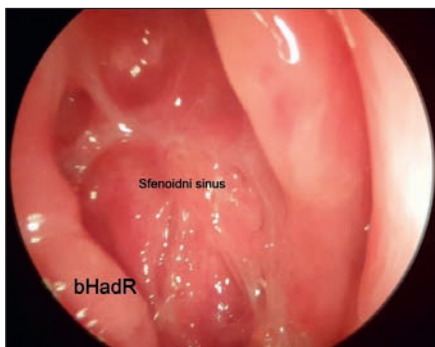
Izid zdravljenja

Peti dan po zadnjem kirurškem zaprtju likvorske fistule smo s CT glave izključili



Slika 2. Intraoperativni prikaz rekonstrukcije lobanjske baze v področju turškega sedla (*sella turcica*). A – likvorska fistula v področju turškega sedla po deepitelizaciji in osvežitvi robov, B – prvi sloj *inlay* Tachosila®, C – prekritje fistule s Haddadovim režnjem, D – prekritje Haddadovega režnja s PVRG na način *overlay*, E – *overlay* prekritje s Tachosilom®, F – prelitje večslojne zapore fistule z DuraSealom™, HadR – Haddadov reženj, F – likvorska fistula, ST – *sella turcica*; T – Tachosil®, bHadR – baza Haddadovega režnja, PVRG – gel, bogat s trombociti in z zunajceličnimi vezikli, DS – DuraSeal™.

pomemben pnevmocelalus. Bolnico smo naslednji dan odpustili domov. Na kontrolnem pregledu dva meseca po odpustu je poročala, da vodene izcedka in glavobola ne opaža več. Nosna endoskopija ni pokazala likvoroje in krast (slika 3).



Slika 3. Sfenoidni sinus dva meseca po zaprtju likvorske fistule s PVRG. Sinus je popolnoma epiteliziran in brez krast. PVRG – gel, bogat s trombociti in zunajceličnimi vezikli, bHadR – baza Haddadovega režnja.

Priprava avtolognega PVRG

PVRG smo pripravili intraoperativno. Postopek priprave PVRG v splošnem razdelimo glede na komponente, tj. priprava PVRP in priprava seruma, s katerim PVRP pretvorimo v PVRG. Pred pripravo PVRP izračunamo volumen krvi, ki ga moramo odvzeti. Sledi centrifugiranje krvi za proizvodnjo PVRP in seruma. Nato PVRP, serum in kalcijev klorid zmešamo, da proizvedemo PVRG.

Izračun potrebnega volumna PVRG

Najprej izračunamo volumen PVRG, ki ga potrebujemo za zdravljenje (enačba 1):

$$V_{PVRG} = S \times h \quad (1)$$

pri čemer velja: V_{PVRG} – prostornina PVRG, S – površina rane in h – predvidena debelina gela.

Da je rana temeljito prekrita, smo določili $h = 2$ cm in $S = 14$ cm², torej volumen

PVRG 28 cm³ oz. ml. Upoštevati moramo, da del mešanice PVRP, CaCl₂ in seruma (iz katerega proizvedemo PVRG) ostane v tekoči obliki, zato je končna debelina PVRG manjša od 2 cm.

Izračun volumna odvzema krvi

Skupni volumen krvi (V_T), ki ga potrebuje mo za pripravo PVRG, je vsota volumna krvi za pripravo PVRP in volumna krvi za pripravo seruma. V_T izračunamo z enačbo 2:

$$V_T = \frac{5}{6} V_{PVRG} \left(\frac{1}{\eta} + \frac{1}{5(1-Ht)} \right) \quad (2)$$

pri čemer velja: V_{PVRG} – volumen PVRG, izračunan po enačbi 1, Ht – hematokrit, n – izkoristek krvi ($n = 0,5$ po matematičnem modelu Božič in sod. (2022)) (9). Volumen CaCl₂ je glede na V_T zanemarljiv (tj. znaša 1 % volumna PVRP), zato ga pri izračunu V_T zanemarimo.

Izračun V_T nam poda informacijo o upravičenosti zdravljenja s PVRG. Kontraindikacija za zdravljenje s PVRG je na primer pričakovana znatna krvavitev med posegom ali prisotna huda anemija (tabela 3).

Ker kri za pripravo PVRP in kri za pripravo seruma odvezamo v različne epruvete (4,5-mililitrske epruvete z natrijevim citratom za PVRP in 4-mililitrske plastične epruvete za serum), moramo poznati natančen volumen krvi za pripravo PVRP

($V_{kri \text{ za PVRP}}$) in volumen krvi za pripravo seruma ($V_{kri \text{ za SERUM}}$). Izračunamo ju z enačbama 3 in 4:

$$V_{kri \text{ za PVRP}} = \frac{5}{6\eta} V_{PVRG} \quad (3)$$

$$V_{kri \text{ za serum}} = \frac{V_{PVRG}}{6(1-Ht)} \quad (4)$$

Pri naši bolnici je vrednost $V_{kri \text{ za PVRP}}$ znašala 46,7 ml, vrednost $V_{kri \text{ za SERUM}}$ pa 7,8 ml.

Odvzem krvi

Pred odvzemom krvi za pripravo PVRG je bolnica izpolnjevala naslednja vključitvena merila:

- v 24 urah pred zdravljenjem ni izvajala težke telesne dejavnosti;
- bila je tešča (tj. v 8 urah po zdravljenju ni zaužila nobene hrane in pijače razen vode);
- dan pred zdravljenjem ni zaužila hrane z visoko vsebnostjo maščob ali alkohola.

Kri smo odvzeli intraoperativno iz periferne arterije. Druge možne načine odvzema krvi za pripravo PVRP in PVRG prikazujemo v tabeli 4.

Glede na izračune (enačbi 3 in 4) smo odvzeli skupaj 57,5 ml krvi, in sicer v:

- enajst 4,5-mililitrskih citratnih krvnih epruvet (9 NC natrijevega citrata 0,105 M,

Tabela 3. Vključitvena merila in izključitvena merila. PVRG – gel, bogat s trombociti in z zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich gel*).

Vključitvena merila	Izključitvena merila
<ul style="list-style-type: none"> • starost nad 18 let 	<ul style="list-style-type: none"> • preobčutljivost na sintetične materiale, uporabljene v pripravi PVRG • prisotnost sistemske nalezljive bolezni • vnetje mesta odvzema krvi
<ul style="list-style-type: none"> • izčrpane standardne kirurške metode 	<ul style="list-style-type: none"> • prisotnost metastatske maligne bolezni • prisotnost maligne bolezni na mestu aplikacije PVRG • huda anemija ali izguba krvi • nedavna sistemska aplikacija antifibrinolitika (npr. traneksamična kislina).

Tabela 4. Mesta odvzema krvi za pripravo PVRP in PVRG. PVRP – plazma, bogata s trombociti in z zunajceličnimi vezikli, PVRG – gel, bogat s trombociti in z zunajceličnimi vezikli (angl. *platelet- and extracellular vesicle-rich gel*), A – alternativna izbira, PICC – periferno vstavljen centralni venski kateter (angl. *peripherally inserted venous catheter*), CVK – centralni venski kateter.

Mesto punkcije	Indikacija	Utemeljitev
periferni venski kateter	zlati standard	najmanjše tveganje zapletov, enostavna izvedba
punkcija periferne arterije	A: ko periferni venski dostop ni dosežen in je potrebna velika količina krvi	omogoča odzem velikega volumna krvi, večje tveganje zapletov
PICC ali CVK	A: ko ni dosežen periferni arterijski ali periferni venski dostop	največje tveganje zapletov, zahteva posebne veščine

BD Vacutainer, Becton Dickinson, San Jose, CA, ZDA) in jih shranili pri sobni temperaturi. Epruvete smo v celoti napolnili, s čimer smo zagotovili ustrezno razmerje med krvjo in antikoagulantom. To kri uporabimo za pripravo PVRP. Epruvete takoj po vzorčenju 3- do 4-krat obrnemo na glavo, da dobimo ustrezno mešanico krvi in natrijevega citrata;

- dve 4-mililitrski plastični krvni epruveti brez antikoagulanta (npr. Z Serum, Vacutube, LT Burnik, d. o. o., Slovenija), shranjeni pri sobni temperaturi. To kri uporabimo za pripravo seruma, torej aktivatorja, ki pretvori PVRP (tj. tekočino) v gel (tj. PVRG). Po približno 5–10 minutah v epruveh nastane krvni strdek.

Po odvzemu kri čim krajši čas shranjujemo pri sobni temperaturi 22 °C do centrifugiranja.

Centrifugiranje krvi za pripravo PVRP

Odvzeto kri v citratnih epruveh smo centrifugirali (Tehtnica, Centric 400R, Domel, d. o. o., Železniki, Slovenija) po postopku, opisanem v raziskavi Božič in sod. (2022) (9). Pred centrifugiranjem smo epruvete ponovno 3- do 4-krat obrnili, da smo vzorce resuspendirali. Kri smo nato centrifugirali pri relativnem pospešku $30 \times g$ pri 18 °C. Čas centrifugiranja (t) smo izračunali individualno na osnovi podatka

o bolnikovi hitrosti sedimentacije eritrocitov (tj. SR) po prej izdelanem matematičnem modelu (9). Izkoristek krvi za pripravo PVRP je 50 %. Velja enačba 5:

$$t = \frac{x_{\max} \ln((x_{\max} + x_{\min})/2x_{\min})}{\varepsilon \text{ SR RCF}} \quad (5)$$

pri čemer je x_{\max} razdalja od osi rotorja centrifuge do dna epruvete, x_{\min} razdalja od osi rotorja centrifuge do ravni vzorca krvi v epruveti, ε konstanta (tj. 0,13), SR hitrost sedimentacije eritrocitov in RCF relativni pospešek centrifugiranja.

Priprava PVRP

Po centrifugiranju citratnih epruveh se kri razdeli na dve vidni frakciji – rdečo, ki vsebuje predvsem eritrocite, in rumeno, ki je PVRP. Včasih je med slojema prisotna neprozorna belkasta plast (angl. *buffy coat*). PVRP nežno in počasi aspiriramo s pipeto (ref.: 225-1S, Termofisher science, ZDA) nad rdečo in belo plastjo, ne da bi ju premešali. Aspirate (tj. PVRP) iz vseh epruveh združimo v drugo sterilno plastično epruveto ali posodo in izmerimo skupni volumen. Nato PVRP vnesemo v rano ali ga zunaj telesa aktiviramo s serumom in kalcijevim kloridom, da nastane PVRG. Pri naši bolnici smo uporabili PVRG.

Priprava PVRG (aktivacija PVRP)

Avtologni PVRP, avtologni serum (v razmerju 1:5 proti PVRP) in 1M CaCl₂ (v razmerju

1:100 do PVRP) zmešamo, da se PVRP v nekaj minutah pretvori v PVRG.

Za pripravo avtolognega seruma 10 minut centrifugiramo plastične krvne epruvete brez antikoagulantov pri relativnem pospešku $1260 \times g$ in pri $18^\circ C$. Po centrifugiranju supernatant, ki je nad rdečim krvnim strdkom, predstavlja serum. Slednjega s sterilno pipeto nežno aspiriramo brez mešanja plasti in prenesemo v sterilno polipropilensko epruveto.

Za začetek procesa aktivacije PVRP na petrijevko s sterilno pipeto naneseemo 1M $CaCl_2$ (14,7-%, Lekarna UKC Ljubljana, shranjeno pri sobni temperaturi) v razmerju 1:100 s PVRP (tj. 1-%; npr. 170 μl za aktiviranje 17 ml PVRP). Nato na $CaCl_2$ naneseemo avtologni serum v razmerju 1:5 s PVRP (tj. 20-%; npr. 4 ml za aktiviranje 20 ml PVRP (enačba 4). Na koncu avtologni PVRP s sterilno pipeto apliciramo na mešanico $CaCl_2$ in avtolognega seruma. Da pride do aktivacijskega procesa in nastane PVRG, mora preteči vsaj 5 minut. Pričakujemo lahko, da se nekaj mešanice ne bo spremenilo v gel.

ZAKLJUČEK

Zaradi pomanjkanja konsenza o uporabi kirurških materialov pri rekonstrukciji

lobanjske baze bi lahko PVRG uporabili kot del večplastnega zapiranja lobanjske baze. Izkusili smo ugodno natezno odpornost PVRG, kar je omogočilo enostavno roko-vanje z endoskopskimi inštrumenti. Pri naši bolnici se rinolikkvoreja po uporabi PVRG, ki smo ga pripravili po našem protokolu, ni ponovila. To kaže na obetavno klinično prakso medoperativne priprave avtolognega kirurškega materiala, ki ga lahko uporabljajo tudi kirurgi drugih specialnosti (61).

Menimo, da lahko učinkovitost PVRG pri zapiranju likvorske fistule pripišemo stimulaciji tvorbe in odlaganju kolagena, reepitelizaciji in angiogenezi ter drugim protimikrobnim učinkom, ki jih posredujejo predvsem zunajcelični vezikli (4). K vodotesnemu zaprtju likvorske fistule in tvorbi nove kostnine verjetno pomembno prispevajo ZV iz PVRG, ki posredujejo osteogene lastnosti trombocitov (6).

Čeprav je prezgodaj, da bi z gotovostjo napovedovali rutinsko uvedbo PVRG v endoskopsko kirurgijo lobanjske baze, lahko verjetno pričakujemo razvoj novih avtolognih materialov, namenjenih rekonstrukciji. Mednje nedvomno sodita tudi PVRP in PVRG, ki sta varna, stroškovno učinkovita in dokaj enostavna za pripravo.

LITERATURA

1. Alves R, Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: History, biology, mechanism of action, and classification. *SAD*. 2018; 4 (1): 18–24.
2. Ehrenfest D, Bielecki T, Mishra A, 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 phar biotechnol*. 2011; 13: 1131–7.
3. Vozel D, Božič D, Jeran M, et al. Treatment with platelet- and extracellular vesicle-rich plasma in otorhinolaryngology-A review and future perspectives. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* [Internet]. 2020 [citirano 2022 Aug 31]. Dosegljivo na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451963420300224>
4. Sluga M, Battelino S, Vozel D. Prospects of extracellular vesicles in otorhinolaryngology, head and neck surgery. *J Nanotheranostics*. 2021; 2 (4): 208–23.
5. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012; 64 (3): 676–705.
6. Antich-Rosselló M, Forteza-Genestra MA, Monjo M, et al. Platelet-derived extracellular vesicles for regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (16).
7. Wu J, Piao Y, Liu Q, et al. Platelet-rich plasma-derived extracellular vesicles: A superior alternative in regenerative medicine? *Cell Prolif*. 2021; 54 (12): e13123.
8. Vozel D, Božič D, Jeran M, et al. Autologous platelet- and extracellular vesicle-rich plasma is an effective treatment modality for chronic postoperative temporal bone cavity inflammation: Randomized controlled clinical trial. *Frontiers*. 2021;9: 541
9. Božič D, Vozel D, Hočvar M, et al. Enrichment of plasma in platelets and extracellular vesicles by the counterflow to erythrocyte settling. *Platelets*. 2022; 33 (4): 592–602.
10. Štukelj R, Schara K, Bedina - Zavec A, et al. Effect of shear stress in the flow through the sampling needle on concentration of nanovesicles isolated from blood. *Eur J Pharm Sci*. 2017; 98: 17–29.
11. Vozel D, Battelino S. Preparation of platelet- and extracellular vesicle-rich gel and its role in the management of cerebrospinal fluid leak in anterior and lateral skull-base surgery. V: *Zbornik recenziranih prispevkov* [Internet]. Ljubljana: Zdravstvena fakulteta; 2020. str. 47–58. Dostopno na: http://www2.zf.uni-lj.si/images/stories/datoteke/Zalozba/Sokratska_2019.pdf, <https://repositorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=113167&lang=slv>
12. Steiner N, Vozel D, Urbančič J, et al. Clinical implementation of platelet- and extracellular vesicle-rich product preparation protocols. *Tissue Engineering Part A*. 2022. V tisku.
13. Kao YC, Lin DZ, Lee SL, et al. Assisted therapy with platelet-rich plasma for burn patients: A meta-analysis and systematic review. *BURNS*. 2021; 47 (5): 1012–23.
14. Mokni S, Kenani Z, Arousse A, et al. Platelet-rich-plasma: A potential therapeutic tool for nail lichen planus. *Dermatol Ther*. 2021; 34 (6).
15. Debs T, Iannelli A, Frey S, et al. Mesenchymal stem cells and platelet rich plasma therapy to treat leak after sleeve gastrectomy. *J Surg Res*. 2021; 268: 405–10.
16. Paranyak M, Patel R, Grubnyk V, et al. Repair of large hiatal hernias with the use of mesh and autologous platelet-rich plasma. *surgical laparoscopy endoscopy & percutaneous techniques* [internet]. 2022; 32 (1). Dostopno na: https://journals.lww.com/surgical-laparoscopy/Fulltext/2022/02000/Repair_of_Large_Hiatal_Hernias_With_the_Use_of.3.aspx
17. Hamid O, Quinlan DJ, Seemann R, et al. Injectable platelet-rich fibrin for perioral rejuvenation as assessed by 3D lip volume imaging. *J Cosmet Dermatol*. 2021; 20 (10, 51): 3270–7.
18. Hsieh TS, Chiu WK, Yang TF, et al. A meta-analysis of the evidence for assisted therapy with platelet-rich plasma for atrophic acne scars. *Aesth Plast Surg*. 2019; 43 (6): 1615–23.
19. Pachito DV, Latorraca C de OC, et al. Efficacy of platelet-rich plasma for non-transfusion use: Overview of systematic reviews. *Int J Clin Pract*. 2019; 73 (11): e13402.
20. Soldatova L, Campbell RG, Elkhatib AH, et al. Role of leukocyte-platelet-rich fibrin in endoscopic endonasal skull base surgery defect reconstruction. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2017; 78 (1): 59–62.
21. Rasmussen J, Ruggeri C, Ciralo C, et al. Application of fibrin rich in leukocytes and platelets in the reconstruction of endoscopic approaches to the skull base. *World Neurosurgery*. 2018; 118: 32–41.
22. Fredes F, Pinto J, Pinto N, et al. Potential effect of leukocyte-platelet-rich fibrin in bone healing of skull base: A pilot study. *Int J Otolaryngol*. 2017; 2017: 1231870.
23. Khafagy YW, Abd Elfattah AM, Moneir W, et al. Leukocyte- and platelet-rich fibrin: A new graft material in endoscopic repair of spontaneous CSF leaks. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018; 275 (9): 2245–52.

24. Mendonça-Caridad JJ, Juiz-Lopez P, Rubio-Rodriguez JP. Frontal sinus obliteration and craniofacial reconstruction with platelet rich plasma in a patient with fibrous dysplasia. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(1): 88–91.
25. Mendonça-Caridad JJ, Juiz-Lopez P, Fayos FV, Miery G. A novel approach to human cranial tissue regeneration and frontal sinus obliteration with an autogenous platelet-rich/fibrin-rich composite matrix: 10 patients with a 6-10 year follow-up. *J Tissue Eng Regen Med.* junij 2013; 7 (6): 491–500.
26. Tagliatalata Scafati C, Tagliatalata Scafati S, Aveta A, Cassese M, Vitale C. Chronic frontal sinus disease: combined use of platelet-rich plasma and calvarial bone grafts for sinus obliteration in aggressive and secondary cases. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2010; 111(4): 216–20.
27. Yan CH, Mundy DC, Patel ZM. The use of platelet-rich plasma in treatment of olfactory dysfunction: A pilot study. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology.* 2020; 5 (2): 187–93.
28. Maisel-Campbell AL, Ismail A, Reynolds KA, Poon E, et al. A systematic review of the safety and effectiveness of platelet-rich plasma (PRP) for skin aging. *Arch Dermatol Res.* 2019
29. Gawdat HI, Tawdy AM, Hegazy RA, et al. Autologous platelet-rich plasma versus ready-made growth factors in skin rejuvenation: A split face study. *J Cosmet Dermatol.* 2017;16(2):258–64.
30. Man D, Plosker H, Winland-brown JE. The Use of Autologous Platelet-rich Plasma (platelet Gel) and Autologous Platelet-poor Plasma (fibrin Glue) in Cosmetic Surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107 (1): 229–36.
31. Gode S, Ozturk A, Kismali E, et al. The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Nasal Skin Thickness in Rhinoplasty. *Facial Plast Surg.* avgust 2019;35(4):400–3.
32. Gode S, Ozturk A, Berber V, Kismali E. Effect of Injectable Platelet-Rich Fibrin on Diced Cartilage's Viability in Rhinoplasty. *Facial Plast Surg.* avgust 2019;35(4):393–6.
33. Kuzucu I, Beriat GK, Ezerarslan H, Ozdemir S, Kocaturk S. Effects of the Autologous Platelet-Rich Plasma in Nasal Pack on Postoperative Quality of Life. *J Craniofac Surg.* maj 2017; 28 (3):e299–302.
34. Refahee SM, Aboulhassan MA, Abdel Aziz O, et al. Is PRP Effective in Reducing the Scar Width of Primary Cleft Lip Repair? A Randomized Controlled Clinical Study. *Cleft Palate Craniofac J.* 2019; 57 (5): 581–8.
35. Pathak H, Mohanty S, Urs AB, et al. Treatment of Oral Mucosal Lesions by Scalpel Excision and Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting: A Review of 26 Sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73 (9): 1865–74.
36. Mahajan M, Gupta MK, Bande C, Meshram V. Comparative Evaluation of Healing Pattern After Surgical Excision of Oral Mucosal Lesions by Using Platelet-Rich Fibrin (PRF) Membrane and Collagen Membrane as Grafting Materials—A Randomized Clinical Trial. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 76 (7): 1469.e1–1469.e9.
37. EL-Komy MHM, Saleh NA, Saleh MA. Autologous platelet-rich plasma and triamcinolone acetonide intralesional injection in the treatment of oral erosions of pemphigus vulgaris: A pilot study. *Arch Dermatol Res.* 2018; 310 (4): 375–81.
38. Scala M, Gipponi M, Mereu P, et al. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel. *In Vivo.* 2010; 24 (6): 889–93.
39. Elkahwagi M, Elokda M, Elghannam D, et al. Role of autologous platelet-rich fibrin in relocation pharyngoplasty for obstructive sleep apnoea. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1. februar 2020; 49 (2): 200–6.
40. Joudi M, Hamidi Alamdari D, Hyradfar M, et al. Lateral Traumatic Esophago-Cutaneous fistula in a Child; Platelet-Rich Fibrin Glue Challenge. *Iran Red Crescent Med J.* 2013; 15 (3): 256–9.
41. Ricci E, Riva G, Dagna F, et al. The use of platelet-rich plasma gel in superficial parotidectomy. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2019; 39 (6): 363–6.
42. Scala M, Mereu P, Spagnolo F, et al. The use of platelet-rich plasma gel in patients with mixed tumour undergoing superficial parotidectomy: a randomized study. *In Vivo.* 2014; 28 (1): 121–4.
43. Lee SK, Lim YM, Lew DH, Song SY. Salvage of Unilateral Complete Ear Amputation with Continuous Local Hyperbaric Oxygen, Platelet-Rich Plasma and Polydeoxyribonucleotide without Micro-Revascularization. *Arch Plast Surg.* 15. 2017; 44 (6): 554–8.
44. Habesoglu M, Oysu C, Sahin S, et al. Platelet-Rich Fibrin Plays a Role on Healing of Acute-Traumatic Ear Drum Perforation. *J Craniofac Surg.* 2014; 25 (6):2056–8.
45. Yadav SPS, Malik JS, Malik P, et al. Studying the result of underlay myringoplasty using platelet-rich plasma. *J Laryngol Otol.* november 2018; 132 (11): 990–4.
46. Sharma D, Mohindroo S, Azad RK. Efficacy of platelet rich fibrin in myringoplasty. *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2018; 4 (3): 677–81.
47. Sankaranarayanan G, Prithiviraj V, Kumar RV. A Study on Efficacy of Autologous Platelet Rich Plasma in Myringoplasty. *Otolaryngology Online Journal.* 2013; 3 (3): 1–15.
48. Saeedi M, Ajallouei M, Zare E, et al. The Effect of PRP-enriched Gelfoam on Chronic Tympanic Membrane Perforation: A Double-blind Randomized Clinical Trial. *Int Tinnitus J.* 2017;21(2):108–11.

49. Fawzy T, Hussein M, Eid S, Guindi S. Effect of adding platelet-rich plasma to fat grafts in myringoplasty. *Egypt J Otolaryngol.* 2018;34(4):224–8.
50. El-Anwar MW, Elnashar I, Foad YA. Platelet-rich plasma myringoplasty: A new office procedure for the repair of small tympanic membrane perforations. *Ear Nose Throat J.* 2017;96(8):312–26.
51. Nair NP, Alexander A, Abhishekh B, et al. Safety and Efficacy of Autologous Platelet-rich Fibrin on Graft Uptake in Myringoplasty: A Randomized Controlled Trial. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2019;23(1):77–82.
52. El-Anwar MW, El-Ahl MAS, Zidan AA, Yacoup MARAS. Topical use of autologous platelet rich plasma in myringoplasty. *Auris Nasus Larynx.* 2015;42(5):365–8.
53. Ersözlü T, Cultekin E. A Comparison of the Autologous Platelet-Rich Plasma Gel Fat Graft Myringoplasty and the Fat Graft Myringoplasty for the Closure of Different Sizes of Tympanic Membrane Perforations. *Ear Nose Throat J.* 2020;145561319900388.
54. Shiomi Y, Shiomi Y. Surgical outcomes of myringoplasty using platelet-rich plasma and evaluation of the outcome-associated factors. *Auris Nasus Larynx.* april 2020;47(2):191–7.
55. Elbary M, Nasr W, Sorour S. Platelet-Rich Plasma in Reconstruction of Posterior Meatal Wall after Canal Wall Down Mastoidectomy. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2018;22(2):103–7.
56. Jang CH, Choi CH, Cho YB. Effect of BMP2-Platelet-rich Plasma-Biphasic Calcium Phosphate Scaffold on Accelerated Osteogenesis in Mastoid Obliteration. *In Vivo.* 2016;30(6):835–40.
57. Askar SM, Saber IM, Omar M. Mastoid Reconstruction With Platelet-Rich Plasma and Bone Pate After Canal Wall Down Mastoidectomy: A Preliminary Report. *Ear Nose Throat J.* 2019;145561319879789.
58. Bramati C, Biafora M, Galli A, et al. Use of platelet-rich plasma in irradiated patients to treat and prevent complications of head and neck surgery. *BMJ CASE REPORTS.* marec 2022;15(3).
59. Eid AM, Ebada HA, El-Fattah AMA, et al. Platelet-rich fibrin: an autologous biomaterial for healing assistance of pharyngeal repair in total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2020.
60. Gökçe Kütük S, Özdaş T. The impact of platelet-rich plasma therapy on short-term postoperative outcomes of pediatric tonsillectomy patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019; 276 (2): 489–95.
61. Georgalas C, Oostra A, Ahmed S, et al. International consensus statement: Spontaneous cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Int Forum Allergy & Rhinol.* 2021; 71: 794–803.
62. Vasilikos I, Beck J, Ghanaati S, et al. Integrity of dural closure after autologous platelet rich fibrin augmentation: An in vitro study. *Acta Neurochirurgica.* 2020; 162 (4): 737–43.
63. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, et al. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of Oral Biology.* 2014; 59 (5): 550–8.
64. do Amaral RJFC, da Silva NP, Haddad NF, 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.
65. Banks WA, Sharma P, Bullock KM, et al. Transport of extracellular vesicles across the blood-brain barrier: Brain pharmacokinetics and effects of inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4407.
66. György B, Sage C, Indzhukulian AA, et al. Rescue of hearing by gene delivery to inner-ear hair cells using exosome-associated aav. *Mol Ther.* 2017; 25 (2): 379–91.