

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Olomouc 2016

MDDr. Radovan Žižka

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**KLINIKA ZUBNÍHO LÉKAŘSTVÍ**

**MATUROGENEZE: NOVÁ LÉČEBNÁ METODA PŘI OŠETŘOVÁNÍ  
STÁLÝCH ZUBŮ S NEDOKONČENÝM VÝVOJEM A NEKROTICKOU DŘENÍ**

Disertační práce v oboru stomatologie

Školitel:

MUDr. Zdeňka Zapletalová, PhD.

Autor:

MDDr. Radovan Žižka

Olomouc 2016

# Abstrakt

## Úvod

Ošetření zubů s nedokončeným vývojem a nekrotickou dřenou skrývá mnoho překážek a vždy patřilo v endodoncii k nejsložitějším výkonům. V nedávné době došlo k rozvoji klinických postupů s využitím poznatků z odvětví tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Nejrozšířenějším léčebným postupem je v současné době maturogeneze, která patří mezi tzv. „cell free“ postupy. Cílem laboratorní části studie bylo stanovení kvality ztuhnutí kalcium-silikátového MTA cementu v závislosti na vlastnostech intrakanalikulárního prostředí. Cílem terapeutické části studie bylo klinické a rentgenologické porovnání maturogeneze a konvenční apexifikace s využitím hydroxidu vápenatého.

## Metody

- a) Laboratorní část – polyethylenové formy simulující kořenový kanálek byly rozděleny do dvou skupin – experimentální a kontrolní. Formy byly vyplněny 9mm materiálem ProRoot MTA připraveného dle instrukcí výrobce. U kontrolní skupiny byl jeden konec formy uzavřen 3 mm tekutého fotokompozitního materiálu. U experimentální skupiny byla na materiál aplikována vlhká vata o tloušťce 1,5 mm a následně uzavřena 1,5 mm tekutého fotokompozitního materiálu. Po pěti dnech inkubace byla při 80% vlhkosti a teplotě 36 °C a za účelem simulování fyziologických podmínek simulovaná kořenová výplň vyjmuta z formy a zalita do polymethylmetakrylátové hmoty. Následně byly zhotoveny longitudinální výbrusy a povrch materiálu byl vyleštěn. Výbrus jsme rozdělili na třetiny v závislosti na vzdálenosti od simulovaného *foramen apicale anatomicum*. Tvrdost a modul pružnosti byly určeny prostřednictvím instrumentované vtiskové zkoušky s použitím univerzálního měřicího systému NanoTest vybaveného diamantovým Berkovičovým indentorem. Získané hodnoty byly následně statisticky zpracovány.
  
- b) Terapeutická část – byly shromážděny lékařské záznamy pacientů, kteří v letech 2011–2015 podstoupili na Klinice zubního lékařství endodontické ošetření stálých zubů s nedokončeným vývojem kořene. Po selekci pacientů jsme rozdělili pacienty do dvou skupin – ošetřených apexifikací hydroxidem vápenatým a ošetřených maturogenezí. Rentgenové snímky, které byly vybrány pro hodnocení, byly upraveny slučovací geometrickou transformací. Tímto došlo ke korekci rozdílů v odlišných projekcích. Na upravených snímcích jsme stanovili procentuální rozdíl v rentgenologické délce kořenů a rentgenologickém povrchu kořenů. Dále jsme sledovali, zda byli pacienti v průběhu kontrol asymptomatictí.

## Výsledky

- a) Laboratorní část – prokázali jsme signifikantní rozdíl mezi tvrdostí a modulem pružnosti v závislosti na intrakanalikulárním prostředí, a to ve všech třetinách vzorku. Vliv vzdálenosti od simulovaného *foramen apicale anatomicum* na tvrdost a modul pružnosti nebyl signifikantní.
- b) Terapeutická část – dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem jsme prokázali, že přírůstek rentgenologického povrchu kořene je statisticky signifikantně vyšší u pacientů, kteří podstoupili ošetření maturogenézí ( $p = 0,041$ ). Naopak není signifikantní rozdíl ve změně rentgenologické délky mezi ošetřením apexifikací hydroxidem vápenatým a maturogenézí ( $p = 0,939$ ). Taktéž není rozdíl v klinické úspěšnosti mezi léčebnými modalitami.

## Závěr

- a) Laboratorní část – z našich výsledků lze vyvodit, že vlhké intrakanalikulární prostředí má pozitivní vliv na hydratační reakci při tuhnutí kalcium silikátového cementu ProRoot MTA ve vzdálenosti 0–3 mm, 3–6 mm i 3–9 mm od simulovaného *foramen apicale*. To se projevilo signifikantně větší tvrdostí a modulem pružnosti materiálu při porovnání mezi jednotlivými skupinami. Vliv vzdálenosti od simulovaného *foramen apicale* nebyl při testování tvrdosti materiálu signifikantní ani ve vlhkém, ani suchém intrakanalikulárním prostředí.
- b) Terapeutická část – dle našich výsledků není mezi maturogenézí a apexifikací hydroxidem vápenatým rozdíl v klinické úspěšnosti a rentgenologické změně délky kořene. Signifikantní rozdíl je však ve změně rentgenologického povrchu kořene, jenž je u maturogeneze větší než u apexifikace hydroxidem vápenatým.

## Klíčová slova

Maturogeneze, apexifikace, zub s nedokončeným vývojem, regenerativní endodontický výkon, hydroxid vápenatý, kalcium-silikátový cement, MTA

# Abstract

## Background

Endodontic treatment of a permanent immature tooth with necrotic pulp poses several clinical challenges and is generally considered to be one of the most arduous interventions in endodontics. Recently, with new findings in the field of tissue engineering and regenerative medicine, new treatment protocols have been established. The most often used treatment modality is revascularization, which belongs to cell-free approaches. The aim of the laboratory part of this study was the determination the microhardness of calcium silicate cement, MTA, which set in different intracanal environments. The aim of the therapeutic part of the study was radiological and clinical comparison of maturogenesis treatment and conventional calcium hydroxide apexification.

## Methods

- a) Laboratory part – to simulate root canal system, we used polyethylen molds with an internal diameter of 1 mm and height of 12 mm. These molds were filled with a 9 mm thick layer of White ProRoot Mineral Trioxide Aggregate. The experimental group had a 1,5 mm high damp cotton pellet on which 1.5 mm of resin composite was placed. In the control group the whole 3 mm above MTA were filled with resin composite. The specimens were kept under the temperature of 37 °C and relative humidity of 80 % for 4 days in order to simulate physiological conditions. Specimens were longitudinally sectioned, polished and nanoindentation experiments were carried out using a Berkovich indenter at a loading rate of 2 mN/s. Differences were assessed using nonparametric Kruskal-Wallis and Wilcoxon Rank-Sum tests.
- b) Therapeutic part – data from patients who underwent endodontic treatment of immature permanent teeth with necrotic pulp at the Institute of Dentistry and Oral Sciences, Palacky University, Olomouc between 2011–2015, were collected. Patients were divided into two groups – calcium hydroxide apexification group and maturogenesis group. The affine geometric transformation of X-rays which were chosen for evaluation was done. On transformed X-rays, we have determined the percentage change in the radiographic root length and radiographic root area. Furthermore, teeth were observed in order to state whether they became asymptomatic. Data were assessed using the Wilcoxon rank-sum test and the Fisher factorial test.

## Results

- a) Laboratory part – the Kruskal-Wallis test showed no significant effect of depth on microhardness of material in the experimental and control groups. Statistical analysis employing the Wilcoxon Rank-Sum test showed a significant difference in microhardness and the modulus of elasticity between the control and experimental groups in the first, second and last third of the material from the simulated apical foramen.
- b) Therapeutic part – the Wilcoxon rank-sum test showed significant increase in the radiographic root area in the maturogenesis group ( $p = 0.041$ ). In contrast, there was no statistical difference in the change of the radiographic length ( $p = 0.939$ ) and clinical success rate between the maturogenesis and calcium hydroxide apexification groups.

## Conclusions

- a) Laboratory part – within limitations of this *ex-vivo* study, it seems that moist intracanal environment improved the setting of MTA at various depths.
- b) Therapeutic part – according to our data, there was no significant difference in the clinical success rate and the change in the radiographic length of teeth treated by maturogenesis or calcium hydroxide apexification. The change in the radiographic root area was significantly higher when teeth were treated by maturogenesis.

## Key words

Maturogenesis; apexification; immature tooth; regenerative endodontic procedure; calcium hydroxide; calcium silicate cement; Mineral Trioxide Aggregate

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně  
pod vedením MUDr. Zdeňky Zapletalové, Ph.D. s využitím  
zdrojů uvedených v přehledu literatury

.....

podpis autora

Děkuji MUDr. Zdeňce Zapletalové, Ph.D. za dlouholeté odborné vedení a podporu, MDDr. et MUDr. Jiřímu Šedému, Ph.D. za veškeré podnětné připomínky a MUDr. Jiřímu Škrdlantovi za zpětnou vazbu. Své rodině a přítelkyni děkuji za trpělivost a porozumění v průběhu celého studia.



## Obsah

1	Anatomie zubů s neukončeným vývojem.....	1
2	Epidemiologie nekrózy u zubů s neukončeným vývojem.....	2
3	Stávající léčebné metody.....	3
3.1	Apexifikace hydroxidem vápenatým .....	3
3.2	Technika MTA zátky.....	3
4	Regenerativní medicína v endodoncii.....	5
4.1	Historie.....	5
4.2	Názvosloví .....	5
4.3	Kmenové buňky.....	6
4.3.1	Kmenové buňky izolované z apikální papily (angl. stem cells from apical papilla, SCAP).....	6
4.3.2	Kmenové buňky zubní dřeně (angl. dental pulp stem cells, DPSC).....	7
4.3.3	Kmenové buňky periodontálních vláken (angl. peridontal ligament stem cells, PDLSC).....	8
4.3.4	Kmenové buňky kostní dřeně (angl. bone marrow stem cells, BMSC).....	8
4.3.5	Kmenové buňky periapikálního zánětu (angl. inflammatory periapical progenitor cells, iPAPCs) .....	8
4.3.5.1	Kmenové buňky periapikální léze (angl. Periapical Lesion Mesenchymal Stem Cells, (PL-MS) .....	9
4.3.5.2	Kmenové buňky periapikálních cyst (angl. periapical cyst mesenchymal stem cells, hPCy-MS) .....	9
4.4	Růstové faktory .....	10
4.4.1	Transformační růstový faktor beta-1 (angl. transforming growth factor beta-1, TGF-β1) .....	10
4.4.2	Bazický fibroblastový růstový faktor (angl. basic fibroblast growth factor, bFGF nebo FGF-2) .....	10
4.4.3	Cévní endotelový růstový faktor (angl. vascular endothelial growth factor (VEGF).....	11
4.4.4	Kostní morfogenetické proteiny (angl. bone morphogenetic proteins, BMP) .....	11
4.4.5	Růstový faktor izolovaný z destiček (angl. platelet-derived growth factor, PDGF) .....	11
4.5	Vnitřní matrice .....	12
5	Dezinfekce systému kořenových kanálků.....	14
5.1	Bakteriální spektrum u zubů s neukončeným vývojem .....	14
5.2	Výplachové roztoky .....	14
5.2.1	Chlornan sodný.....	14
5.2.2	Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA).....	15
5.2.3	Chlorhexidin .....	15

5.2.4	Kyselina citronová.....	16
5.3	Intrakanálová medikace.....	16
5.3.1	Antibiotické pasty.....	16
5.3.2	Hydroxid vápenatý.....	18
5.3.3	Formokresol.....	19
6	Klinický postup.....	20
6.1	První návštěva.....	20
6.2	Druhá návštěva.....	23
6.2.1	Přípravná fáze.....	23
6.2.2	Vytvoření vhodného intrakanalikulárního prostředí.....	24
6.2.2.1	Pomocí krevního koagula.....	24
6.2.2.2	Pomocí plazmy bohaté na krevní destičky.....	25
6.2.3	Aplikace koronální zátky z bioaktivního materiálu.....	25
6.2.4	Uzávěr zubu a rentgenologická kontrola.....	27
7	Hodnocení úspěšnosti terapie.....	28
7.1	Charakter získané tkáně.....	28
7.1.1	Histologická charakterizace tkáně po proběhlé maturogenezi u zvířat.....	28
7.1.2	Histologická charakterizace tkáně po proběhlé maturogenezi u lidí.....	29
7.1.3	Klasifikace tkání po proběhlé maturogenezi.....	29
7.2	Rentgenologická kontrola.....	30
7.2.1	Chenova klasifikace výsledků maturogeneze.....	31
8	Porovnání úspěšnosti terapie maturogeneze a apexifikace.....	32
8.1	Materiál a metodika.....	32
8.1.1	Výběr pacientů.....	32
8.1.2	Matematická korekce rentgenových snímků.....	32
8.1.3	Stanovení rentgenologického přírůstku tvrdých zubních tkání.....	34
8.1.4	Stanovení změny délky kořene.....	35
8.1.5	Klinická úspěšnost.....	35
8.2	Statistická analýza a výsledky.....	36
8.2.1	Stanovení rentgenologického povrchu kořene.....	36
8.2.1.1	Maturogeneze.....	36
8.2.1.2	Apexifikace Ca(OH) <sub>2</sub> .....	36
8.2.1.3	Rozdíly mezi léčebnými modalitami.....	36
8.2.2	Stanovení změny rentgenologické délky kořene.....	37

8.2.2.1	Maturogeneze .....	37
8.2.2.2	Apexifikace Ca(OH) <sub>2</sub> .....	37
8.2.2.3	Rozdíly mezi léčebnými modalitami.....	37
8.2.3	Klinická úspěšnost.....	38
8.3	Diskuse.....	38
8.4	Závěr.....	39
9	Srovnání tvrdosti materiálu MTA v závislosti na vlastnostech okolního prostředí metodou nanoindentace.....	40
9.1	Úvod.....	40
9.2	Materiál a metodika .....	40
9.2.1	Zhotovení vzorků .....	41
9.2.2	Úprava vzorků.....	41
9.2.3	Testování mechanických vlastností .....	42
9.3	Výsledky.....	42
9.3.1	Tvrdost .....	42
9.3.1.1	Vliv hloubky .....	42
9.3.1.2	Vliv intrakanalikulárního prostředí .....	43
9.3.2	Modul elasticity .....	44
9.3.2.1	Vliv hloubky .....	44
9.3.2.2	Vliv intrakanalikulárního prostředí .....	44
9.4	Diskuse.....	46
9.5	Závěr.....	48
10	Bibliografie.....	49
11	Seznam zkratk .....	67
12	Seznam obrázků.....	69
13	Seznam tabulek.....	70
14	Seznam grafů .....	71
15	Seznam odborných publikací autora .....	72
16	Souhrn poznatků dizertační práce .....	75

## **1 Anatomie zubů s neukončeným vývojem**

Pro úspěšné provedení maturogeneze je nutná znalost anatomických odlišností apikální oblasti zubů s neukončeným vývojem. Stále je přítomna Hertwigova epiteliální pochva, jež hraje důležitou roli při vývoji kořene. Apikálně od diafragmy, což je nejapikálnější část Hertwigovy epiteliální pochvy, se nachází apikální papila. Je velmi citlivá na poškození, a pokud dojde k jejímu zničení, ukončí se diferenciací odontoblastů a vývoj kořene se zastaví. Tato měkká tkáň bohatá na kmenové buňky je od dřeně oddělena zónou bohatou na buňky (angl. cell-rich zone).

## **2 Epidemiologie nekrózy u zubů s neukončeným vývojem**

Mezi nejčastější příčiny odúmrť zubní dřene stálých zubů s neukončeným vývojem je dentální trauma a zubní kaz (1-3) Zhruba 25 % dětí školního věku utrpí více či méně závažný úraz zubů (4). A zvláště pokud se stane ve věku do 9 let, je pravděpodobnost opakovaného úrazu zubů (angl. repeated dental trauma, RDT) několikanásobně vyšší (5). Dentální trauma může částečně nebo úplně poškodit cévní zásobení vyvíjejícího se zubu. Pokud nedojde k obnovení nebo je obnovení nedostatečné, dochází k nekróze zubní dřene. Zde se jedná především o frontální zuby, u zubů distálního úseku naopak převažuje kariézní etiologie (6). V neposlední řadě se jedná také o vývojové anomálie typu dens invaginatus, nebo dens evaginatus (3, 7). Nutno podotknout, že přesná četnost jednotlivých příčin v etiologii nekrózy zubní dřene nebyla podrobně popsána. Jedním z hlavních důvodů je fakt, že nekróza zubní dřene stálých zubů s neukončeným vývojem není čítná.

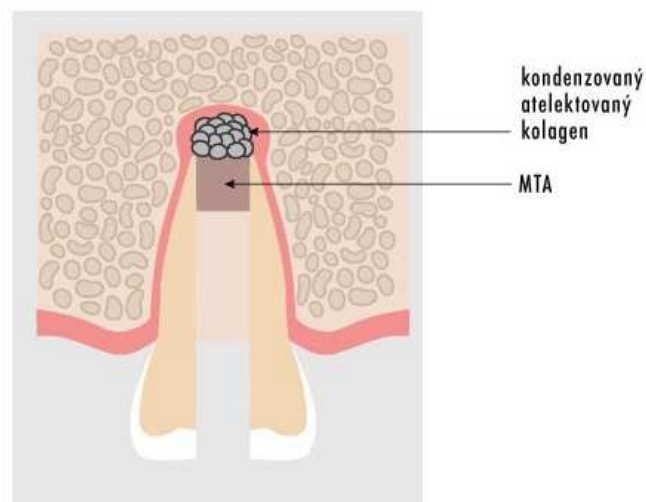
### 3 Stávající léčebné metody

#### 3.1 Apexifikace hydroxidem vápenatým

Apexifikace je klinický postup, jehož cílem je indukce vytvoření apikální bariéry, která slouží jako apikální stop pro následné plnění. Toto apikální stop se vytváří dlouhodobým působením  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , který se musí opakovaně aplikovat (8). Hlavní výhodou je, že se jedná se o výkon nenáročný na vybavení. Mezi nevýhody patří zvýšené riziko fraktury (9, 10), nižší úspěšnost (11), časová náročnost (12) a zastavení dalšího vývoje kořene (11).

#### 3.2 Technika MTA zátky

MTA zátka (angl. MTA plug) je metodou, která využívá jedinečných vlastností MTA cementu, zejména biokompatibility a možnosti tuhnutí ve vlhku. Torabinajjed navrhl využití MTA k zaplnění zubů s nedokončeným vývojem kořene již v roce 1999 (13). Původní dvoudobý koncept s aplikací navlhčené vaty byl postupně zkrácen na pouhou jednu návštěvu (14, 15). Také se zjistilo, že doporučená aplikace  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  do kořenového kanálku před zaplněním MTA nemá klinické opodstatnění. Retrospektivní studie ukazují vysokou míru úspěšnosti (14, 16, 17), která se pohybuje kolem 95 %. Zajímavostí je, že dochází k prodloužení délky kořene v průměru o 6 % (11). Výhodou metody je její rychlost a vysoká úspěšnost. Relativní nevýhodou je vyšší cena a obtížná manipulace s MTA.



**Obr. 1:** Schematický náčrt plnění technikou vnitřní matrice



## 4 Regenerativní medicína v endodoncii

### 4.1 Historie

Regenerativní endodontické postupy ale mají svůj pravý začátek v 60. letech minulého století. V roce 1961 publikoval Nygaard-Ostby práci, ve které zkoumal, zda krevní sraženina uvnitř kořenového kanálku zlepšuje hojení (18). U pacientů s infikovaným i neinfikovaným kořenovým systémem provedl ošetření kořenového systému následované rozšířením apikálního foramena, indukci krvácení z periapikální oblasti a překrytím krevní sraženiny chloroperčou. Po různých časových obdobích (17 dní až 3,5 roku) byly zuby extrahovány a nově vytvořená tkáň histologicky prozkoumána. Histologicky se jednalo o vazivovou tkáň s lokalizovanými okrsky mineralizace, bez přítomnosti odontoblastů. První snahy o co nejdokonalejší dezinfekci kořenového systému u zubů s nedokončeným vývojem sahají do roku 1966, kdy Rule (19) využil tři různé kombinace antibiotik, ale bez následné stimulace krvácení. O pět let později využil topickou aplikaci antibiotik i Nygaard-Ostby. Histologická analýza 35 zubů vedla k závěru, že v naprosté většině případů docházelo pouze k reparaci, tj. k vrůstání vazivové tkáně, a přibližně v polovině případů i k tvorbě celulárního cementu (20).

### 4.2 Názvosloví

Od roku 2001, kdy byla publikována první kazuistika moderní regenerativní endodoncie (21), vyšlo celkem 34 kazuistik nebo souborů kazuistik (22). V těchto kazuistikách panuje nejednoznačné názvosloví termínů revitalizace, revaskularizace, maturogeneze, regenerativní endodoncie aj. Teprve v nedávné době se ustálil všeobecný název regenerativní endodontický postup, který zaštiťuje všechny výkony mající za cíl obnovení vitální tkáně uvnitř kořenového systému. S tímto termínem pracuje ve svých doporučených postupech i Americká asociace endodontistů (AAE). Pro úplnost jsou uvedeny nejvíce používané termíny a jejich vysvětlení.

Revaskularizace – termín byl poprvé použit Iwayou (21). Tento termín byl následně obhajován tvrzením, že charakter tkáně uvnitř kořenového systému není předpověditelný. Jedinou jistotou je obnova cévního zásobení (23). Lépe však termín revaskularizace vystihuje obnovení cévního zásobení přítomné, již poškozené tkáně (např. v rámci dentální traumatologie) (24).



Revitalizace – tento termín popisuje obnovení přítomnosti nesespecifické vitální tkáně uvnitř kořenového systému bez jakéhokoliv vztahu k tvorbě tvrdých tkání či k dalšímu vývoji kořene (25).

Regenerativní endodontický postup (angl. regenerative endodontic procedure, REP) – jedná se o oficiální termín AAE, který zahrnuje všechny terapie využívající principy tkáňového inženýrství, jež vedou k obnově tkáně podobající se zubní dřeni. Bohužel ani při sterilních podmínkách na zvířecích modelech nebylo možné při stávajícím protokolu maturogeneze stimulovat regeneraci zubní dřene nebo jí podobnou tkáň (26-29).

Maturogeneze – poprvé byl termín maturogeneze využit v souvislosti s přímým překrytím dřene u stálých zubů s nedokončeným vývojem (30). Tento pojem popisuje fyziologické pokračování vývoje celého kořene, a nikoliv pouze apikálního segmentu (24, 30, 31). Významově se překrývá s apexogenezí, která se ale využívá u vitálních stálých zubů s neukončeným vývojem (32). Dle názoru autora nejlépe vystihuje momentální cíle terapie stálých nekrotických zubů s neukončeným vývojem (viz Hodnocení úspěchu terapie).

### **4.3 Kmenové buňky**

Kmenové buňky, které hrají roli při maturogenezi, patří do skupiny multipotentních mezenchymálních kmenových buněk (angl. mesenchymal stem cells, MSCs). Tyto buňky jsou přítomny a regulovány v malých vymezených oblastech, označovaných jako niky (angl. niches). Niky odontogenních kmenových buněk se nacházejí většinou perivaskulárně (33) a jsou charakterizovány třemi základními vlastnostmi (34-36):

- tvoří anatomický prostor, kde je regulován počet kmenových buněk,
- ovlivňují pohyblivost kmenových buněk,
- kmenové buňky jsou zde udržovány v klidovém režimu a v případě potřeby je nastartována jejich diferenciací a nastavena jejich regenerační kapacita.

#### **4.3.1 Kmenové buňky izolované z apikální papily (angl. stem cells from apical papilla, SCAP)**

Poprvé byla apikální papila a v ní přítomné kmenové buňky popsány (37) a charakterizovány Sonoyamou (38). Tyto kmenové buňky pravděpodobně hrají nejdůležitější roli při maturogenezi, protože patří k málo diferencovaným mezenchymálním kmenovým buňkám

(34, 39). SCAP jsou také pravděpodobně prekurzorem radikulární dřeně (40, 41) a primárních odontoblastů podílejících se na tvorbě radikulárního dentinu (42). SCAP jsou také regulovány Hertwigovou epiteliální pochvou prostřednictvím velkého množství epiteliálně-mezenchymálních interakcí, jež určují vývoj a tvar kořene (43). Když byly SCAP *in vitro* implantovány společně s hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem (HA/TCP), došlo k jejich diferenciaci v odontoblastům podobné buňky, produkující tkáň připomínající dentin (37). Pravděpodobně díky blízkosti apikální papily k apexu dochází při stimulaci krvácení k mnohonásobně vyššímu výskytu mesenchymálních kmenových buněk než v krevním oběhu (44). V této práci se nesledovaly markery typické pro SCAP, ale vzhledem k tomu, že při stimulaci krvácení byla lacerována apikální papila, předpokládá se, že naprostá většina kmenových buněk byly SCAP (22). Je s podivem, že kmenové buňky dokážou přežít v oblasti chronického zánětu v blízkosti komplexní mikroflóry, zánětlivých mediátorů, imunitních buněk a v prostředí s nízkou saturací kyslíkem. Pravděpodobně je to způsobeno relativně menší hustotou cév v apikální papile, než je tomu v zubní dřeni, a výrazně větší hustotou cév v zárodečném vaku, který obklopuje apikální papilu. Zásobení je pravděpodobně zajištěno difuzí ze zárodečného vaku a bohatě zásobené granulační tkáň (22). Dalším faktorem je, že hypoxie a přítomnost některých bakteriálních toxinů (např. endotoxin A) způsobuje zvýšení proliferace, zvýšené přežívání a angiogenní potencional odontogenních kmenových buněk (45-49). Zajímavostí je, že i bez neurogení stimulace mají SCAP přítomny několik nervových markerů (50).

#### **4.3.2 Kmenové buňky zubní dřeně (angl. dental pulp stem cells, DPSC)**

Poprvé byly popsány v roce 2000 Gronthosem a jednalo se o první popsané odontogenní kmenové buňky (51). I přes velkou plasticitu těchto kmenových buněk, jelikož jsou schopny diferenciovat do chondrocytů, adipocytů, osteoblastů, neuronů a hladkého svalstva (51, 52), jsou pravděpodobně zapojeny pouze v tvorbě reparativního dentinu a obnově odontoblastů (42). Když byly DPSC *in vitro* implantovány spolu s HA/TCP, došlo k jejich diferenciaci v odontoblastům podobné buňky produkující tkáň připomínající dentin (51, 52). Jejich využití v maturogenezi předpokládá přítomnost reziduální vitální dřeně. Tato možnost nastává v případě nekrózy, jež probíhá směrem koronoapikálním, přičemž v apikální části může být vitální dřeň (53). Byly popsány i případy, kdy u zubu s nedokončeným vývojem a rozsáhlým periapikálním nálezem byla pravděpodobně apikálně přítomna reziduální dřeň (21). Bylo taktéž prokázáno, že DPSC jsou přítomny v nezměněné podobě u zubů s ireverzibilní pulpitudou (54-56). Při pokusu na zvířecím modelu nebylo rozdílu v radiologických obrazech

mezi skupinou se stimulací krvácení a skupinou se směsí plazmy bohaté na růstové faktory s DPSC (57).

#### **4.3.3 Kmenové buňky periodontálních vláken (angl. peridontal ligament stem cells, PDLSC)**

Již dříve byla vyslovena hypotéza, že cementoblasty, alveolární kost a buňky periodontia jsou tvořeny jednou populací kmenových buněk (58-60). Poprvé byly kmenové buňky z periodontálních vláken izolovány a charakterizovány v roce 2004 (61). Následně byla potvrzena jejich schopnost diferenciaci v osteoblasty, chondroblasty a v buňky podobné cementoblastům. Tvorba kalcifikovaných okrsků v novotvořené tkáni je výrazně menší než u DPSC a SCAP (62-64). Při implantaci PDLSC spolu s HA/TCP do uměle vytvořeného lůžka v čelisti na zvířecím modelu došlo k tvorbě cementu ohraničeného periodontálními vlákny (37).

#### **4.3.4 Kmenové buňky kostní dřene (angl. bone marrow stem cells, BMSC)**

Jedná se o nejprozkoumanější skupinu mesenchymálních kmenových buněk. Morfologicky je to heterogenní skupina (65), schopná diferenciaci v chondroblasty, adipocyty, myocyty a neurogení linie (66, 67). Jejich působení v rámci maturogeneze je spíše omezené.

#### **4.3.5 Kmenové buňky periapikálního zánětu (angl. inflammatory periapical progenitor cells, iPAPCs)**

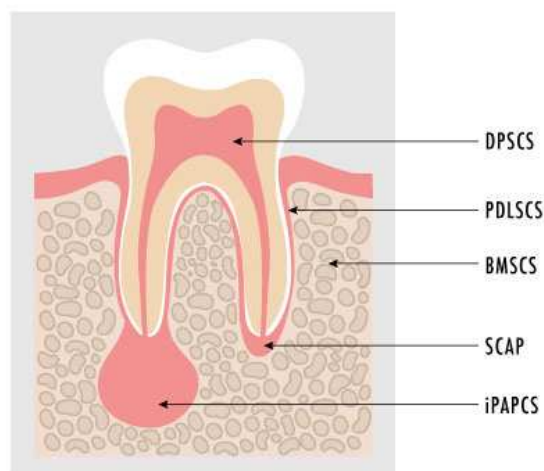
Poprvé byly popsány v roce 2011 u zubů s ukončeným vývojem kořene s přítomnou periapikální ostitidou (68). *In vitro* se potvrdila jejich velmi omezená schopnost diferenciaci v adipocyty, ale velká schopnost diferenciaci v osteoblasty. Nicméně *in vivo* není schopna vytvořit typickou kostní strukturu. To odpovídá všeobecně známému poznatku, že v kostěné tkáni se periapikální nález hojí od periferie směrem k centru a nikoliv homogenně. Taktéž nepřímě tomu odpovídají výsledky rychlosti hojení lézí, kdy při odstranění granulační tkáně dochází k rychlejšímu vyhojení (69). Při implantaci iPAPC s HA/TCP došlo k nižší tvorbě mineralizované tkáně než při implantaci DPSC. V této oblasti zatím není jasná nomenklatura a byly popsány i další druhy mesenchymálních kmenových buněk periapikální oblasti, jejichž definice a charakterizace se z velké části překrývají.

#### **4.3.5.1 Kmenové buňky periapikální léze (angl. Periapical Lesion Mesenchymal Stem Cells, (PL-MS))**

Poprvé byly popsány v roce 2012. Byla potvrzena jejich schopnost diferenciaci v osteoblasty, chondrocyty a adipocyty *in vitro* a produkce cytokinů s protizánětlivými vlastnostmi (70).

#### **4.3.5.2 Kmenové buňky periapikálních cyst (angl. periapical cyst mesenchymal stem cells, hPCy-MS))**

Poprvé popsány v roce 2013 (71). Byla potvrzena jejich schopnost diferenciaci v adipocyty a osteoblasty. V této práci nebylo provedeno histologické zkoumání vzorků, takže nemůžeme vyslovit domněnku, zda je přítomnost hPCy-MS stejná u radikulárních a bay cyst. Je velmi nepravděpodobné, že by tato linie kmenových buněk hrála při maturogenезi větší roli.



**Obr. 2:** Schematický náčrt zdrojů kmenových buněk. **DPSC** – Dental pulp stem cell, **SCAP** – Stem cells of apical papilla, **PDLSC** – Periodontal ligament stem cells, **iPAPCS** – inflammatory periapical stem cells, **BMSCs** – Bone marrow stem cells

## **4.4 Růstové faktory**

Růstové faktory jsou polypeptidy nebo proteiny, které se vážou na specifické receptory na povrchu cílových buněk (72) a jejich působení je pouze lokální – ovlivňují nitrobuněčné pochody, a to buď autokrinně, nebo parakrinně (73). V literatuře je přítomnost růstových faktorů dentinové matrix dobře popsána. V průběhu dentinogeneze jsou produkovány především odontoblasty a inkorporují se do kolagenové matrix, kolem níž dochází k mineralizaci (74, 75). Tyto růstové faktory se uvolňují při proběhlé kariézní demineralizaci a ovlivňují tvorbu obranného dentinu. K jejich uvolňování dochází i při leptání dentinu a aplikaci samoleptacích primerů (76). Dalším zdrojem růstových faktorů jsou matrice, jež vytvářejí vhodné intrakanalikulární prostředí. Níže zmíněné molekuly jsou účinné i při velmi nízkých koncentracích a podílejí se především na migraci buněk, angiogenezi a diferenciaci buněk.

### **4.4.1 Transformační růstový faktor beta-1 (angl. transforming growth factor beta-1, TGF- $\beta$ 1)**

Hraje důležitou roli v buněčné signalizaci při diferenciaci kmenových buněk zubní dřeně v odontoblasty (77) a při stimulaci tvorby dentinové matrix (78). Působí protizánětlivě a urychluje hojení zranění (79). Produkují jej odontoblasty. Je uložen v aktivní formě v dentinové matrix díky interakci s ostatními složkami matrix (80). Přidání purifikované frakce proteinů z dentinu zvyšuje sekreci matrix u terciárního dentinu, což se z velké části připisuje právě TGF-  $\beta$ 1 (81).

### **4.4.2 Bazický fibroblastový růstový faktor (angl. basic fibroblast growth factor, bFGF nebo FGF-2)**

Jedná se o mitogen, který stimuluje angiogenezi a indukuje tvorbu signálu ovlivňujícího diferenciaci buněk mezodermálního původu (82). Z krátkodobého hlediska zabraňuje mineralizaci kosti, ale v dlouhodobém měřítku její vývoj podporuje (83). Předpokládá se, že bFGF stabilizuje proteiny a inhibuje jejich interakce (84). Bazický fibroblastový růstový faktor se využívá ke stimulaci proliferace DPSC a zvýšení potenciálu k diferenciaci (85). Předpokládá se, že v období dentinogeneze hraje bFGF roli především v diferenciaci kmenových buněk. Byly pozorovány vyšší koncentrace v období od stádia zubního pohárku do stádia zvonku a také v odontoblastech v průběhu tvorby dentinu (86). Zdá se, že hraje velkou roli při iniciaci buněčných a molekulárních reakcí v průběhu tvorby reparativního dentinu. V průběhu primární dentinogeneze se vyskytuje rozsáhlá bohatě cévně zásobená oblast odontoblastů. Po ukončení primární dentinogeneze se zmenšuje až do subodontoblastické zóny. Při tvorbě reparativního dentinu dochází k reaktivaci a reorganizaci subodontoblastické pleteně a

podobá se více stavu z průběhu primární dentigenese (82). Působení bFGF na tvorbu reparativního dentinu je závislé na jeho koncentraci. Při vysokých koncentracích bFGF dochází k urychlení jeho tvorby v celém kořenovém systému, zatímco při regulovaném uvolňování dochází pouze k tvorbě dentinového můstku v místě postižení (87, 88).

#### **4.4.3 Cévní endotelový růstový faktor (angl. vascular endothelial growth factor (VEGF))**

Jedná se o angiogenní mitogen, který hraje velmi důležitou roli v angiogenezi a tvorbě cév (89). Tento protein, který váže heparin, indukuje proliferaci endoteliálních buněk a stimuluje tvorbu nových cév v místě zranění (90, 91), což bylo potvrzeno i *in vivo* studiemi (92, 93). Rodina VEGF obsahuje VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a růstový faktor placenty (angl. placental growth factor). Z těchto isoformů je nejrozšířenější VEGF-A, který je taktéž někdy znám jako faktor cévní propustnosti (angl. vascular permeability factor). Zvyšuje migraci a proliferaci buněk, vazodilataci a permeabilitu cév vazbou na tyrozin-kinázové receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 (94).

#### **4.4.4 Kostní morfogenetické proteiny (angl. bone morphogenetic proteins, BMP)**

Jedná se o extracelulárně secernované molekuly, podílející se na epitelo-mezenchymových interakcích. BMP mají silné osteoinduktivní a chondrogenní působení. I když se na embryonálním vývoji zubu podílí pět různých skupin morfogenetických proteinů, zdá se, že pro regeneraci zubu u dospělých jsou BMP dostatečné (95). Schopnost stimulovat dentinogenezi byla opakovaně prokázána *in vivo* u BMP-7 (96, 97). Dentinogeneze je ale podmíněna diferenciací buněk v odontoblasty nebo buňky jim podobné. Tyto schopnosti byly prokázány *in vitro* u BMP-2 (98, 99), BMP-4 (100, 101) a BMP-11 (102, 103). Aktivita kostních morfogenetických proteinů je regulována antagonisty BMP, což je například noggin nebo chordin (104). Předpokládá se, že interakce mezi BMP a jejími antagonisty hraje velmi důležitou roli v průběhu vývoje zubu (105).

#### **4.4.5 Růstový faktor izolovaný z destiček (angl. platelet-derived growth factor, PDGF)**

Tento tkáňový faktor, produkovaný krevními destičkami, hraje důležitou roli v angiogenezi a stimulaci buněčné proliferace (106, 107). Má minimální funkci v mineralizačních procesech DPSC, jelikož inhibuje alkalickou fosfatázu ve tkáňových kulturách buněk zubní dřeně (108). Tento protein existuje v pěti izoformách, přičemž exprese dentinsialoproteinu (DSP) je stimulována pouze faktory PDGF-AB a PDGF-BB. Efekt PDGF na diferenciaci odontoblastů záleží na přítomné dimerické formě PDGF a je velmi rozdílný (109).

Zkratka	Název	Zdroj	Aktivita	Použitelnost
TGF- $\beta$ 1	tumor growth factor beta	odontoblasty, dentinová matrix	protizánětlivý, stimuluje hojivé procesy	podpoření mineralizace
bFGF	basic fibroblast growth factor		stimuluje proliferaci	stimulace proliferace kmenových buněk, stimulace tvorby reparativního dentinu
VEGF	vascular endothelial growth factor	endotelové buňky	zvyšuje angiogenezi	zvýšení cévního zásobení
PDGF	platelet-derived growth factor	trombocyty, endotelové buňky	zvyšuje proliferaci buněk mezenchymálního původu	stimulace proliferace kmenových buněk
BMP	bone matrix proteins	kostní matrix	indukují diferenciaci odontoblastů a mineralizaci kostní matrix	diferenciace kmenových buněk stimulace mineralizace nově vzniklé matrix

**Tab. 1:** Přehled růstových faktorů významných pro maturogenezi

#### 4.5 Vnitřní matrice

Slouží jako fyzikálně-chemické a biologické 3D mikroprostředí, kde se mohou buňky dělit, diferenciovat a kam mohou migrovat. Matrice může sloužit jako nosič růstových faktorů. Matrice by také měla být efektivní v transportu výživových látek, kyslíku a odvádění odpadních produktů. Postupně by se měla dezintegrovat a být nahrazena regenerovanou tkání (95). V naprosté většině publikací se zdůrazňuje důležitost stimulace krácení z periapikální oblasti do kořenového systému (32). Následně vzniklá krevní sraženina tvoří provizorní matici z fibrinu a fibronektinu, v níž jsou i růstové faktory (110). Před aplikací kalcium silikátového cementu by se mělo vyčkat 15 minut, dokud není sraženina vyzrálá. Tento časový interval se může zkrátit při využití atelokolagenu (111) nebo oxidované celulózy. V malém množství prací je jako alternativa ke krevní sraženině využita krevní plazma bohatá na destičky (angl. platelet-rich plasma, PRP) (112-114). Mezi výhodami se uvádí, že obsahuje vyšší koncentraci růstových faktorů, stimuluje produkci kolagenu, umožňuje chemoatrakci buněk, produkuje protizánětlivé látky, zvyšuje vrůstání cév, indukuje diferenciaci buněk a zlepšuje hojení ran (115). Oproti krevní sraženině je nutné vyčkat pouze 5 minut před aplikací MTA (112). Nevýhodou je nutný odběr krve před výkonem, speciální vybavení a vyšší cenová náročnost ošetření (112). Při zkoumání kvality vzniklé tkáně při

využití krevní sraženiny a PRP při pokusu *in vivo* na psech bylo zjištěno, že nebylo rozdílu mezi využitými matricemi, co se týče úspěšnosti apikálního uzávěru, množství nově vytvořené tkáně a její kvality (114, 116). Tomuto závěru odpovídá i ojedinělá kazuistika proběhlé maturogeneze (110). V této práci byl první stálý dolní molár ošetřen maturogenezí, přičemž do kořenového systému distálního kořene byla aplikována PRP a v meziálních kořenech bylo stimulováno krvácení. Při následné histologické analýze, kterou umožnila vynucená extrakce zubu v důsledku vertikální zlomeniny zasahující intraosseálně, nebyl zjištěn žádný rozdíl v kvalitě tkáně v meziálním a distálním kořeni (117). Nicméně jsou popsány i případy, kdy došlo k pokračování vývoje kořene a ztlustění stěny kořene i bez indukovaného krvácení (26, 118, 119). Při experimentech na psech bylo dokázáno, že dochází k revaskularizaci autotransplantovaných zubů, u nichž byla odstraněna původní dřevina a nebylo stimulováno krvácení (120, 121). Tvorba krevní sraženiny nebo aplikace PRP do kořenového systému může výsledky maturogeneze zlepšit, ale možná pro její průběh nejsou naprosto nezbytné (114, 122).



## 5 Dezinfekce systému kořenových kanálků

### 5.1 Bakteriální spektrum u zubů s neukončeným vývojem

Dřeň vitálního zubu má přirozené obranné mechanismy, které ji činí odolnou vůči mikrobiální infekci. Pokud z různých příčin dojde k nekróze zubu, může dojít k rychlé bakteriální kontaminaci endodontu. Je známo, že bakterie proniklé do kořenového systému vytvářejí biofilm nejen na stěnách kořenových kanálků, ale i ve všech anatomických výchlípkách kořenového systému včetně dentinových tubulů. *In vivo* bylo zjištěno, že mikrobiální spektrum v infikovaných kořenových systémech zubů s nedokončeným vývojem kořene je podobné mikrobiálnímu spektru primárně infikovaných kořenových systémů zubů s ukončeným vývojem kořene (123). Tyto mikroorganismy se uplatňují v časných stádiích invaze do dřeně (většinou přes kazivou lézi) nebo přicházejí až následně a využívají změny prostředí po nekróze zubní dřeně. Jedná se především o anaerobní gramnegativní kmeny (např. *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*) nebo kmeny grampozitivní (např. *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*) (124).

### 5.2 Výplachové roztoky

#### 5.2.1 Chlornan sodný

V naprosté většině publikovaných kazuistik byl chlornan sodný použit jako hlavní výplachový roztok (125).

Antimikrobiální působení – toto působení je velmi dobře zdokumentováno nesčetnými *in vitro* i *in vivo* pokusy (126). Při koncentraci chlornanu sodného nad 1 % se antimikrobiální působení zvyšuje jen nepatrně (127, 128).

Působení proti biofilmu – toto působení úzce souvisí s proteolytickými vlastnostmi chlornanu sodného na extracelulární matrix biofilmu. Čím je koncentrace chlornanu vyšší, tím rychleji dochází k rozpouštění tkání (129). Zdá se, že chlornan sodný je jediný momentálně rozšířený výplachový roztok, který má schopnost rozrušit, případně odstranit mikrobiální biofilm z infikovaných kořenových kanálků (126, 130, 131).

Klinicky použité koncentrace – jedná se především o empiricky využitě koncentrace chlornanu dle zvyklostí pracoviště nebo dle předchozích kazuistik. Nejčastěji se využívá koncentrace 5,25% (132); 2,5% (133), 5% (21), a poté spíše výjimečně 6% (134, 135), 1,25% (26, 136), 3% (137) nebo 1% (138).

Koncentrace z pohledu molekulární biologie – z hlediska molekulární biologie se zdá být výhodnější využívat spíše nižší koncentrace chlornanu sodného pro potlačení jeho proteolytických vlastností. Bylo prokázáno, že při použití chlornanu sodného v koncentraci 5–6% na dentin nedochází k diferenciaci SHED (angl. stem cells from human exfoliated deciduous teeth) a DPSC v buňky podobné odontoblastům, a to jak *in vivo* (139), tak *in vitro* (139, 140). Vzhledem k tomu, že tento negativní efekt přetrvává i dlouho poté, co je chlornan odstraněn, dá se předpokládat jak přímé, tak nepřímé cytotoxické působení. Přímý negativní efekt reziduálním chlornanem sodným v dentinových tubulech se zdá nepravděpodobný, protože neutralizace pomocí thiosíranu sodného neměla žádný efekt na přežití a diferenciaci SCAP (125). Celkově se zdá, že chlornan sodný způsobuje snížení přežívání kmenových buněk v důsledku alterace chemického složení dentinu včetně denaturace inkorporovaných tkáňových faktorů a kolagenních vláken, které slouží k uchycení kmenových buněk (22). Je ale nutné zdůraznit, že při použití chlornanu sodného o koncentraci 1% nedochází k žádné signifikantní změně ve složení dentinu nebo jeho mechanických vlastností (141).

### **5.2.2 Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)**

Jedná se o chelatační činidlo, které se spolu s chlornanem sodným využívá v rámci klasických výplachových protokolů k odstranění sprašné vrstvičky (angl. smear layer) a otevření dentinových tubulů, což vede k lepší dezinfekci kořenového systému (142).

Antimikrobiální působení – samotná EDTA má slabé antimikrobiální působení oproti jiným dezinfekčním roztokům využívaným při klasickém endodontickém ošetření. Platí ale, že mezi chelatačními činidly používanými v rámci výplachových protokolů se jedná o neúčinnější antimikrobiální agens.

Funkce z pohledu molekulární biologie – působením EDTA dochází k narušování anorganické složky tvrdých zubních tkání, a tedy i k obnažování kolagenních vláken a mezi nimi inkorporovaných tkáňových faktorů z období dentinogeneze. Při tomto působení velmi záleží na době působení (140). Dalším pozitivním vlivem je inaktivace chlornanu sodného (143). Všechny tyto vlastnosti EDTA vedou k lepší adhezi kmenových buněk apikální papily k dentinu a jejich následnému zvýšenému přežívání (125, 144). Úprava povrchu dentinu pomocí EDTA vede taktéž ke zvýšené migraci, adhezi a diferenciaci kmenových buněk zubní dřně (DPSC) (145).

### **5.2.3 Chlorhexidin**

Je to syntetická kationová molekula bisguanidu, která je hydrofobní. Aby molekula chlorhexidinu byla rozpustná ve vodě, vyrábí se ve formě chlorhexidin diglukonátu (146).

Antimikrobiální působení – chlorhexidin reaguje s fosfolipidy a lipopolysacharidy bakteriální stěny, čímž následně narušuje osmotickou rovnováhu. Tímto mechanismem působí na celou řadu grampozitivních i gramnegativních bakterií včetně nejčastějších endodontických patogenů. Při použití stejných koncentrací chlorhexidinu a chlornanu sodného se jeví jako stejně účinný na bakterie v planktonické formě (147). Toto antimikrobiální působení je prodlouženo díky schopnosti vazby chlorhexidinu na dentin až na 12 týdnů (148). Nicméně jeho působením není možné biofilm rozrušit nebo dokonce odstranit (149), v malém množství na něj však působí antibakteriálně (150). Největší nevýhodou chlorhexidinu je jeho neschopnost rozpouštět měkké tkáně (151, 152).

Funkce z pohledu molekulární biologie – nejvýznamnější rolí z pohledu molekulární biologie je schopnost chlorhexidinu vázat se na obnažená kolagenní vlákna dentinové matrix. Nejenže touto vazbou dochází k inaktivaci antimikrobiálního působení chlorhexidinu (153), ale také znemožnění adherence SCAP k dentinu (144), což vede k minimálnímu přežití SCAP, i když je chlorhexidin jedním z nejméně toxických antiseptik (154).

#### **5.2.4 Kyselina citronová**

I přesto, že se kyselina citronová používá v konvenčním ošetření kořenových kanálků ke stejnému účelu jako EDTA, nebyla dosud publikována žádná kazuistika, ve které by ji autoři využili při maturogenezi. V ojedinělé laboratorní studii byl zkoumán vliv různých demineralizačních roztoků a prostředí na uvolnění růstových faktorů z dentinu. Kyselina v různých koncentracích a při různých pH byla shledána jako méně účinná než EDTA (155).

### **5.3 Intrakanálová medikace**

#### **5.3.1 Antibiotické pasty**

Využití antibiotik při maturogenezi vychází z konceptu tkáňové regenerace sterilizací léze, která byla vyvinuta v Japonsku na přelomu 80. a 90. let 20. století. Tato technika byla vyvinuta k ošetření dočasných zubů s infikovanými kořenovými kanálky. Po výplachu a aplikaci kombinací antibiotik došlo v naprosté většině případů k vymizení klinických příznaků a zahojení periapikálního nálezu. Směs antibiotik je zaměřena především na obligátní anaeroby, kteří tvoří naprostou většinu druhů izolovaných z kariézních lézí (156), infikovaného kořenového dentinu (157) a z neexponované dřeně, kam bakterie penetrovaly přes dentinové tubuly (158). *In vitro* studiemi se zjistilo (159, 160), že při využití kombinací

různých antibiotik je možné dosáhnout velmi dobré dekontaminace kořenového systému i při mnohem menších koncentracích antibiotik než při využití pouze jednoho druhu antibiotika.

Minocyklin – patří do skupiny tetracyklinů. Je součástí klasické Hoshinovy trojkombinace (3Mix), který bohužel není touto dobou registrován Státním úřadem pro kontrolu léčiv. Mezi jeho největší nevýhody patří zbarvení zubů, do kterých byl aplikován 3Mix s minocyklinem (137), což vedlo ke snaze ho nahradit nebo vyloučit (32). Byla vyvinuta i technika k prevenci zbarvení pomocí adhezivních systémů, která bude popsána v další části této práce (134). Z našeho pohledu se dá využít u nás registrovaný doxycyklin jako plnohodnotná náhrada minocyklinu v 3Mix.

Metronidazol – patří do skupiny nitroimidazolů. Již v 70. letech 20. století se zjistilo, že metronidazol má velmi široké spektrum použití proti orálním obligátním anaerobům (161) a proti kultivovaným bakteriím z primárně infikovaných kořenových kanálků. Již při koncentraci 10 µg/l dochází k eliminaci 99 % bakterií z kariézní léze (162), ale při dalším zvyšování koncentrací již nedochází ke zvýšení účinku.

Ciprofloxacin – patří mezi chinolony II. generace. Jeho antibakteriální efekt je z antibiotik v 3Mix nejmenší (159).

Amoxicilin – patří mezi aminopeniciliny. Jeho využití bylo poprvé popsáno v *in vitro* studii jako Mixed-drug I (163). V některých kazuistikách nahrazoval minocyklin pro snížení rizika nežádoucího zbarvení zubu.

Cefaklor – patří do skupiny cefalosporinů. Byl rovněž poprvé navržen jako lék druhé volby při zvýšeném riziku zbarvení zubů (Mixed-drug II) (163). Byl využit pouze v jedné kazuistice (136).

Rifampicin – byl využit v původní Hoshinově práci jako aditivní antibiotikum k 3Mix. Jeho přínos nebyl statisticky signifikantní, a proto se již dále nevyužíval a ani v žádné kazuistice nebyl popsán.

Jednosložková antibiotická pasta (angl. mono antibiotic paste, MAP) – v ojedinělé kazuistice byl jako nejdůležitější složka původní Hoshinovy trojkombinace využit pouze metronidazol v blíže nespecifikované koncentraci.

Dvosložková antibiotická pasta (angl. double antibiotic paste, DAP) – jedná se o kombinaci metronidazolu a ciprofloxacinu. Od využití antibiotik tetracyklinové skupiny je upuštěno pro možnou diskoloraci zubu (21).

Trojsložková antibiotická pasta (angl. triple antibiotic paste, TAP, 3Mix) – v klasické Hoshinově trojkombinaci se jedná o metronidazol, ciprofloxacin a minocyklin. V *in vitro* pokusech bylo zjištěno, že ke sterilizaci kořenového systému je zapotřebí směsi, kde každé dílčí antibiotikum má koncentraci 25 µg/l, tudíž celková koncentrace antibiotik ve směsi je 75 µg/l. Je nutné zdůraznit, že v prvních popsaných kazuistikách nebyly tyto koncentrace dodrženy. Cílem nebylo vytvořit přesně danou koncentraci, ale „krémovitou, až pastovitou konzistenci“ (21, 132). Tento postup byl přejat dalšími autory a dále využíván (112, 119), i když neměl oporu v *in vitro* studiích (164). Tímto postupem se získává antibiotická pasta o koncentraci převyšující 1 g/ml. I když tato koncentrace při implantaci subkutánně ve zvířecím modelu nezpůsobuje větší zánětlivé reakce než  $\text{Ca(OH)}_2$  (165), přesto má negativní vliv na přežití kmenových buněk apikální papily (SCAP) *in vitro* (164). Koncentrace trojantibiotické pasty, která je bezpečná pro SCAP byla stanovena 100 µg/ml od každého antibiotika, tudíž 300 µg/ml (164). Důležitý je také náhled na modifikaci dentinu při expozici TAP. Bylo zjištěno, že koncentrace 1 g/ml alteruje strukturu dentinu tak, že SCAP nejsou schopny se uchytit a proliferovat. Celková koncentrace 1 mg/ml TAP neměla žádný negativní efekt na přežití a proliferaci SCAP (166). S velkou pravděpodobností je to způsobeno velkou penetrací TAP až 350 µm do dentinových tubulů a její schopností vázat se na dentin. Výplachem je možno odstranit pouze 12 % TAP (167).

### 5.3.2 Hydroxid vápenatý

Hydroxid vápenatý je považován za zlatý standard k dezinfekci kořenového systému (168) a stimulaci tvorby tvrdých tkání při apexifikaci u stálých zubů s nedokončeným vývojem (169). Díky tomuto předpokladu se mu dostalo pozornosti u maturogeneze. Důležité je, aby byl aplikován do úrovně přechodu koronální a střední třetiny kořene (170). Bylo prokázáno, že při aplikaci do koronální poloviny kořene je tloušťka stěny kořene zvýšena o 53,8 %, zatímco při klasické aplikaci apikálně pouze o 3,3 % (171). Čerstvě namíchaný hydroxid vápenatý má pH přibližně 12,5 a je potencionálně toxický pro lidské buňky včetně SCAP. Aplikací dále od periapikální oblasti se s velkou pravděpodobností snižuje toxicita, přičemž stále zůstávají zachovány jeho pozitivní vlastnosti (119, 170, 171).

Antimikrobiální působení – jako hlavní mechanismus působení se udává vysoké pH a následná denaturace bílkovin. Hydroxid vápenatý má však při hodnocení pomocí kultivačních technik pouze omezené antimikrobiální působení (172). Je to dáno pravděpodobně tím, že ihned po aplikaci dochází k výraznému poklesu pH v důsledku pufování schopnosti dentinu.

Mezi jeho největší antibakteriální výhody patří deaktivace endotoxinu A a jeho účinku jako fyzikálně chemické bariéry, která zabraňuje proliferaci reziduálních bakterií a snižuje možnost reinfekce z dutiny ústní (168, 173).

Působení proti biofilmu – zatím publikované studie týkající se působení hydroxidu vápenatého na biofilm mají nekonzistentní závěry (174).

Působení z pohledu molekulární biologie – hydroxid vápenatý má schopnost rozpouštět tvrdé zubní tkáň a odhalovat kolagenní matrix dentinu s tkáňovými faktory z období dentinogeneze. *In vitro* bylo zjištěno, že SCAP měly větší míru přežití a proliferace na dentinu vystavenému hydroxidu vápenatému než na dentinu vystavenému různým koncentracím antibiotické pasty (166).

Možnosti odstranění – hydroxid vápenatý se z kořenového systému odstraňuje obtížně. Pravděpodobně nejlepšími výplachovými roztoky jsou chelatační činidla EDTA nebo kyselina citronová (175). Někteří autoři zdůrazňují jako významnější způsob aktivace výplachového roztoku než samotný typ výplachového roztoku (176). I přesto, že hydroxid vápenatý není možné z kořenového systému kompletně odstranit, je míra jeho odstranitelnosti mnohem větší než u trojantibiotické pasty (167).

### **5.3.3 Formokresol**

Jedná se o směs 19% formaldehydu a 35% kresolu v 15% vodném roztoku glycerinu, který roku 1904 popsal Buckley a dodnes se v anglosaské literatuře označuje jako Buckleyho roztok (177). Dnes se již většinou používá ředěný v poměru 1:5 (178). Kromě pulpotomií dočasných zubů se využíval i jako dezinfekční činidlo při pulpektomiích dočasných zubů (179). I přes rozsáhlý výzkum se nedokázal přesvědčivě prokázat kancerogenní potenciál při koncentracích využívaných k pulpotomiím (180). Formokresol byl využit pouze v jediné pilotní klinické studii (181). Dle rentgenologické analýzy byl přírůstek v tloušťce a délce kořene signifikantně menší než při využití hydroxidu vápenatého nebo kombinace antibiotik (171).

## 6 Klinický postup

Od roku počátku třetího tisíciletí, kdy se objevily první dvě kazuistiky moderní regenerativní endodoncie (21, 132), bylo publikováno velké množství kazuistik; do roku 2013 jejich počet čítal více než 150 případů (182). Velkým problémem těchto kazuistik byl chybějící standardizovaný protokol, který by umožňoval porovnat úspěšnost maturogeneze jako takové vůči apexifikaci pomocí hydroxidu vápenatého nebo MTA zátce. Tato absence standardizovaného protokolu vedla dokonce k doporučení, aby k maturogenezi bylo přistupováno jako k poslední možnosti záchrany zubu (183). V roce 2007 Americká asociace endodontistů ustanovila výbor pro regenerativní endodoncii, jenž v dubnu 2015 vydal poslední aktualizaci oficiálního postupu (angl. guideline) pro maturogenezi. Bere v potaz všechny do té doby známé preklinické i klinické studie (184).

### 6.1 První návštěva

Vlastní ošetření začíná aplikací lokální anestezie. V první návštěvě můžeme použít i lokální anestetika s vazokonstrikční přísadou (adrenalinem). Při ošetření využíváme kofferdam, neboť absolutní suchost pracovního pole a minimalizace možné reinfekce kořenového systému v průběhu ošetření jsou naprostou nezbytností. V rámci dentální traumatologie bývá velmi obtížné zajistit adekvátní nasazení kofferdamu u neúplně prořezaných zubů, kdy se linie maximální konvexity korunky zubu nachází hluboko pod gingivou. V těchto případech můžeme techniku nasazení kofferdamu modifikovat například tak, že jej nasadíme na sousední zuby a ošetřovaný zub izolujeme pomocí tekutého kofferdamu. Trepanací je nutné zajistit adekvátní přístup, aby bylo možné kompletně odstranit zbytky nekrotické dřevě a následně byla možná kontrola krevního koagula a optimální aplikace MTA cementu.



**Obř. 3:** Trepanace horního středního řezáku po nasazení kofferdamu. Zde dosaženo sanguinopurulentního exsudátu.



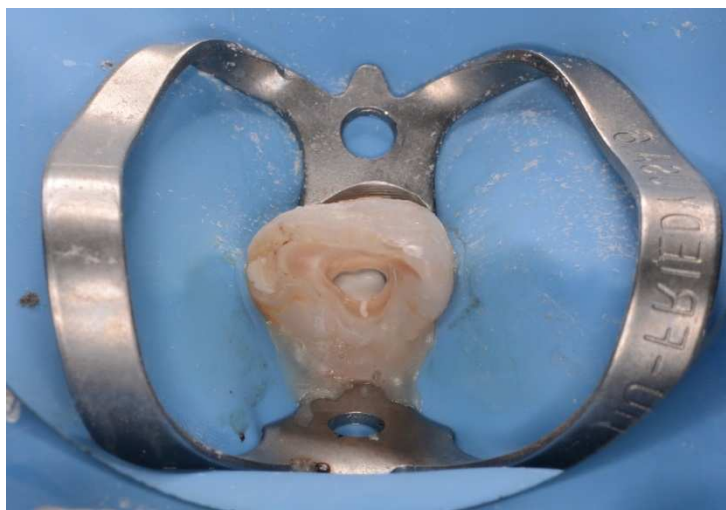
**Obr. 4:** Zavedení kořenové nástroje pro zhotovení měřicího snímku

Stanovení pracovní délky provádíme orientačně pomocí apexlokátoru s vědomím, že u zubů s neukončeným vývojem kořene dochází k nepřesnosti měření, které je dáno velkým průměrem *foramen apicale physiologicum*, a to zvláště při použití nástrojů s malým ISO (185). I přesto je v tomto případě apexlokátor užitečný pro orientační stanovení pracovní délky (186). I v případech, kdy jsme schopni pomocí apexlokátoru opakovaně stanovit pracovní délku, bychom měli zhotovit měřicí snímek. Pro něj platí, že sterilní kořenový nástroj většího průměru (autorovi se osvědčil K-file ISO 70) by měl být volně umístěn zhruba 1 mm od rentgenologického apexu.



**Obr. 5:** Měřicí snímek





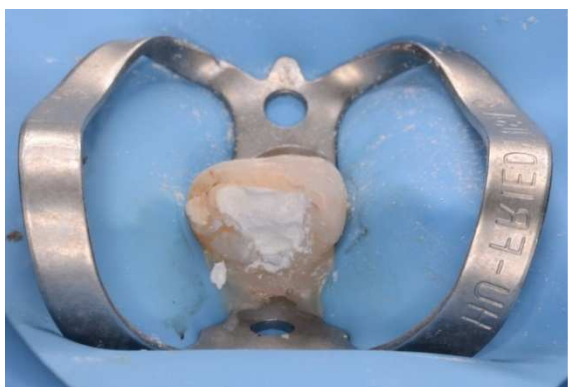
**Obr. 6:** Aplikace hydroxidu vápenatého do kořenového kanálku

Následně je kořenový systém zubu po dobu 5 minut vyplachován celkovým množstvím okolo 20 ml 1–1,5% chlornanu sodného, následovaném stejně dlouhým výplachem 20 ml fyziologického roztoku. Výplachová kanyla by měla být umístěna ve vzdálenosti 1 mm od *foramen physiologicum*. Následuje vysušení kořenového systému pomocí sterilních papírových čepů, zaváděných maximálně do délky odpovídající pracovní délce. Z hlediska aplikace medikace do kořenového kanálku není zatím jasné, která léčebná vložka by měla být preferována. AAE je ve svém doporučení řadí jako sobě rovné a je pouze na lékaři, kterou medikaci zvolí. Někteří autoři ale upřednostňují před antibiotickými pastami hydroxid vápenatý (170, 182). Antibiotické pasty se využívají až v případě, kdy medikace hydroxidem vápenatým nevede k ústupu klinických příznaků. Pokud je použit vodný roztok hydroxidu vápenatého, aplikuje se pomocí kanyly do koronální třetiny kořenového systému (170, 171). Směs antibiotik (TAP) se aplikuje taktéž pomocí kanyly (velikost 20G) 2 mm od *foramen physiologicum* (134). Pokud nemá antibiotická pasta požadovanou konzistenci, je možné dokončit její kondenzaci opačným koncem sterilního papírového čepu.

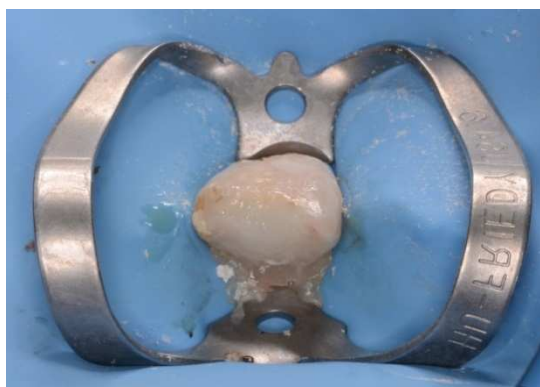


**Obr. 7:** Hydroxid vápenatý byl aplikován pouze do koronální poloviny kořenového kanálku

Následuje provizorní uzávěr pomocí sterilní přemostující výplně (angl. spacer), nejčastěji v podobě teflonové pásky a následná aplikace provizorní výplně. Vzhledem k nutnosti dokonalého okrajového uzávěru se doporučuje buď aplikace skloionomerního cementu, nebo sendvičová výplň pomocí 3–4 mm kalciumsulfátové hmoty (např. Cavit) následně překrytá adhezivně fixovaným tekutým kompozitem.



**Obr. 8:** Aplikace kalcium-sulfátové hmoty



**Obr. 9:** Adhezivní laminace kalcium-sulfátové hmoty tekutým kompozitem

## 6.2 Druhá návštěva

### 6.2.1 Přípravná fáze

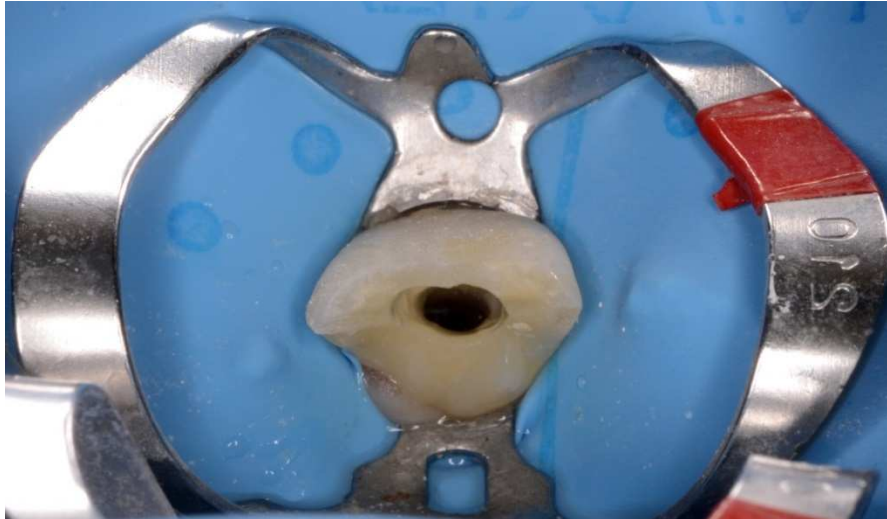
Pacient přichází na druhou fázi terapie za 2–4 týdny po první návštěvě. Zub by měl být klinicky klidný nebo maximálně mírně citlivý na poklep či palpaci. Při zvýšené citlivosti,

přítomnosti píštěle nebo otoku se opakuje postup z první návštěvy. Lokální anestezie se provádí pomocí anestetika bez obsahu adrenalinu, který působí vasokonstrikčně i v oblasti apikální papily. Pokud bychom využili anestetikum s adrenalinem, nemuseli bychom být úspěšní při indukci krvácení z apikální papily. Jako ideální anestetikum se jeví 3% mepivacain. Následně by měl být opět aplikován kofferdam. Po odstranění provizorní výplně a přemosťující výplně je medikace z kořenového kanálku odstraněna výplachem zhruba 30 ml 17% ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA) po dobu 10 minut. Následně se vyplachuje 10 ml fyziologického roztoku po dobu 5 minut. Vyplachovací kanyla by opět měla být ve vzdálenosti 1 mm od *foramen physiologicum*. Roztok aplikujeme šetrně, bez tlaku.

## **6.2.2 Vytvoření vhodného intrakanalikulárního prostředí**

### **6.2.2.1 Pomocí krevního koagula**

Tato fáze ošetření spočívá v indukci krvácení a stabilizaci krevního koagula. Důležité je při indukci nepoškodit Hertwigovu pochvu, která hraje důležitou roli při dalším vývoji kořene. Doporučuje se použití sterilního kořenového nástroje ISO 20-25, který by měl být lehce předehnut o přibližně 30°, aby došlo k dostatečnému rozrušení tkání periapikálně, a tedy i k většímu krvácení. Úhel by neměl být větší než 30°, jinak by mohlo dojít k narušení Hertwigovy pochvy. Tento nástroj se zavede 2 mm přes *foramen physiologicum* a zarotuje se s ním (118, 132, 134, 136, 182). Vzhledem k bohatému prokrvení apikální papily nastává krvácení prakticky ihned. Pomocí opačného konce sterilního papírové čepu namočeného ve fyziologickém roztoku se snažíme koagulum stabilizovat pod úroveň cementosklovinné hranice. Koagulum je plně stabilní po zhruba 15 minutách (118, 132, 134, 136). Další možností je aplikace atelokolagenu na nestabilní koagulum zhruba v úrovni cementosklovinné hranice (např. Hyprosorb). Atelokolagen následně funguje jako vnitřní matrice pro aplikaci MTA (118, 182). Kromě atelokolagenu se dá použít i například oxidovaná celulóza.



**Obr. 10:** Stav po indukci krvácení a stabilizaci koagula v oblasti cementoskvlovinné hranice

#### **6.2.2.2 Pomocí plazmy bohaté na krevní destičky**

Použití plazmy bohaté na destičky (angl. platelet rich plasma, PRP) popsal v roce 2011 poprvé Torabinejad jako alternativu ke stimulaci krvácení (112). Tato plazma obsahuje velké množství růstových faktorů, např. růstový faktor izolovaný z destiček (angl. platelet derived growth factor, PDGF), cévní endotelový růstový faktor (angl. vascular endothelial growth factor, VEGF), endoteliální růstový faktor (angl. endothelial growth factor, EGF) nebo růstový faktor podobný inzulinu (angl. insuline-like growth factor, IGF) (187, 188) a je připravena k aplikaci kalcium-silikátového cementu zhruba za 5 minut (112). Kmenové buňky nejsou aplikovány do kořenového systému s PRP proto, že se očekává chemotaktické působení tkáňových faktorů a vstup kmenových buněk na podkladě principu „přitahování buněk“ (angl. cell homing). Torabinejad popsal tkáň „podobnou dřeni“ u exstirpovaného vzorku v kazuistice, kdy došlo ke vzniku pulpitidy u zubu, jenž byl ošetřen maturogenézí s aplikací PRP (113). Další kazuistika, která využívala PRP a zároveň i stimulaci krvácení, neprokázala žádnou tkáň podobnou dřeni dva roky po provedené maturogenézi (117). Na zvířecích modelech se ale v kvalitě tkáně mezi krevní sraženinou a PRP neprokázal rozdíl (114). PRP se nyní jeví jako metoda volby v případech, kde není možno indukovat krvácení (184), jelikož je znatelný rozdíl v množství přírůstku mineralizovaných tvrdých tkání oproti ošetření bez krevního koagula nebo PRP (114).

#### **6.2.3 Aplikace koronální zátky z bioaktivního materiálu**

V zásadě se jako koronální bioaktivní zátka využívají kalcium-silikátové cementy, které by

měly být aplikovány do 3 mm tlusté vrstvy, která zajistí dostatečný hermetický uzávěr. V současné době existuje kontroverze, zda-li používat tyto kalcium-silikátové cementy jednodobě, nebo dvoudobě. Při dvoudobém postupu se na z kondenzovaný kalcium-silikátový cement vloží jako mezivrstva nalhčená vata. Ta by zde měla působit minimálně 24 hodin a působit jako další zdroj vlhka, který umožňují kvalitnější ztuhnutí kalcium-silikátových cementů. Tyto cementy patří mezi hydraulické cementy a jejich tuhnutí závisí na vlhkosti okolního prostředí. Dnes jsou v České republice k dispozici následující materiály:

MTA cement (angl. mineral trioxide aggregate, MTA) – na pevné koagulum nebo PRP aplikujeme zhruba 3 mm tlustou vrstvu MTA pomocí opačné strany sterilního papírového čepu. Nesmíme vytvářet nadměrný tlak při kondenzaci materiálu, protože bychom mohli rozrušit koagulum nebo PRP a došlo by k apikálnějšímu umístění MTA, než by bylo žádoucí. Největší nevýhodou MTA je diskolorace klinické korunky, a to i při použití jeho bílé formy (189). Diskolorace je znásobena v přítomnosti krve (190) nebo při kontaktu se zbytkovým chlornanem sodným (191). Částečně se této diskoloraci lze vyhnout zakončením aplikace MTA ve výši maximálně 3 mm pod cementosklovinnou hranicí. Další možností je využití protokolu, který byl vyvinut k zamezení zbarvení při využití TAP s minocyklinem. Po trepanaci je adhezivně připraven trepanační otvor a do kořenového systému je umístěn pryskyřičný nebo gutaperčový čep, který zabraňuje zatečení výplňové hmoty do kořenového systému a projikuje. Následně je prostor mezi čepem a koronálním dentinem vyplněn flow kompozitem. Tímto dochází k uzávěru dentinových tubulů a snižuje se pravděpodobnost prostupu TAP a MTA do tohoto prostoru (134).



**Obr. 11:** Aplikace kalcium silikátového cementu MTA na stabilizované koagulum

Biodentin (Septodont, Francie) – patří do skupiny kalcium-silikátových cementů a někdy je firemně prezentován jako druhá generace biokeramiky. Jeho výhodou je větší mechanická odolnost a nepřítomnost diskolorací (192). Tento materiál byl původně uveden na trh jako „náhrada dentinu“ pro přímé překrytí zubní dřeně (193), ale začal se používat i v jiných indikacích. V ojedinělých kazuistikách se popisuje využití Biodentinu jako zátka u maturogeneze.

TotalFill (FKG Dentaire, Švýcarsko) – jedná se o předmíchanou směs kalcium-silikátového cementu, která tuhne za přítomnosti vlhka. Dodává se ve třech modifikacích – BC Sealer, BC Root Repair Material (RRM) a BC putty (194). BC sealer a BC RRM mají málo viskózní konzistenci, tudíž je pro potřeby vytvoření zátky vhodný pouze materiál BC putty, který byl primárně vyvinut pro retrográdní plnění kořenových kanálků. Vzhledem k velmi jednoduché manipulaci, rychlému tuhnutí a absenci nežádoucích diskolorací se zdá být vhodnou náhradou za MTA. Jedinou nevýhodou je poměrně vysoká cena.

#### **6.2.4 Uzávěr zubu a rentgenologická kontrola**

Bezprostředně po aplikaci MTA bychom měli přistoupit ke zhotovení definitivní výplně. Doporučuje se buď přímá fotokompozitivní výplň, nebo uzavřená okamžitá sendvičová výplň, spočívající v aplikaci skloionomerního cementu v tloušce 3–4 mm s následným překrytím tekutým kompozitem v téže návštěvě (182). Ihned po ukončení terapie by měl být zhotoven kontrolní snímek pro porovnání úspěšnosti terapie.



**Obr. 12:** Adhezivní rekonstrukce zubu

## 7 Hodnocení úspěšnosti terapie

Terapii můžeme považovat za úspěšnou, pokud došlo k ústupu subjektivních obtíží a zub je klinicky klidný. Z rentgenologického hlediska posuzujeme zmenšení či vymizení periapikálního projasnění (primární cíl). Z dlouhodobého hlediska nás zajímá především nárůst tloušťky stěny kořene a také nárůst délky kořene a míra uzavření apikální oblasti (sekundární cíl). V neposlední řadě očekáváme obnovení funkce pulpy, zejména její senzitivní a imunologické funkce (terciární cíl) (182). Pokud je zub klinicky klidný i po dokončení vývoje (maturaci), doporučuje se neprovádět následné endodontické ošetření (26). Vychází se přitom z doporučení uváděných pro případy kalcifikační metamorfózy nebo obliterace kořenového systému po traumatu (195, 196).

### 7.1 Charakter získané tkáně

#### 7.1.1 Histologická charakterizace tkáně po proběhlé maturogenezi u zvířat

Velmi málo je v současné době známo o charakteru tkáně, která obsadí prostor kořenového systému, a skutečnosti, jak se bude dlouhodobě chovat. V minulých dekádách proběhlo několik experimentů na opicích, jejichž závěry se dají aplikovat i na problematiku maturogeneze. V roce 1972 Ham stimuloval vznik apikální *periodontitis* u stálých zubů s neukončeným vývojem. Následně po výplachu chlornanem sodným a krátkodobé aplikaci kafrparachlorfenolu indukoval krvácení z periapikální oblasti do kořenového kanálku. V různých časových intervalech byly opice utráceny a zuby histologicky zpracovány. U části vzorků pozoroval vrůstání kostěné tkáně do systému kořenových kanálků s kalcifikacemi na jejich povrchu. Také pozoroval depozita celulárního cementu sahající do stejných míst jako vazivová tkáň (197). Torneck v roce 1973 poukázal na fakt, že i při uměle stimulované apikální *periodontitis* může v apikální části systému kořenových kanálků zůstat reziduální zubní dřeň. I přes výrazně zánětlivé prostředí byla schopna produkovat tkáň podobnou dentinu (198, 199). Nevins prokázal, že i přes pozitivní bakteriální kultivaci může dojít k apozici celulárního cementu, vrůstání kosti a tvorbě reparativního dentinu. Tvorba reparativního dentinu byla ale přisouzena zbytkům lacerované zubní dřene (200-202). První moderní experimenty simulující maturogenezi na psech (203, 204) prokázaly, že tkáň vyplňující prostor kořenového systému se skládá ze zubního cementu, periodontálních vazů a kostěné tkáně. Tkáň zodpovědná za radiologické ztlustění stěny kořene jsou pak tkáň podobné cementu a kosti. Další pokusy tato zjištění potvrdily (27, 29, 205). Velmi zajímavým faktem je působení EDTA na povrch dentinu. Z uchycených buněk na povrchu dentinu vyrůstaly výčnělky



„podobné vlasům“, které sahaly až do dentinu (28). Při porovnání různých vnitřních matic nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi PRGF a krevním koagulem (114).

### **7.1.2 Histologická charakterizace tkáně po proběhlé maturogenezi u lidí**

Celkem byly zatím popsány pouze čtyři histologické kazuistiky lidských zubů, u nichž byla provedena maturogeneze a které následně musely být pro další trauma extrahovány. U první kazuistiky byla přítomna plně vyvinutá zubní dřeň (nutno podotknout, že výchozí diagnózou byla akutní *pulpitis*) (206) a u druhé se jednalo o směs periodontálních ligament, vaziva a cementu (117). Další histologickou kazuistikou je zub po maturogenezi pomocí PRP, u kterého se následně objevily známky ireverzibilní pulpitidy. Exstirpovaná tkáň byla popsána jako vazivová tkáň s cévní zásobou a inervací, kterou autoři nazvali „dřeni podobnou“ (113). Zatím poslední publikovanou kazuistikou je případ premoláru, jenž byl ošetřen maturogenezí a u něhož došlo k dosažení pouze primárních cílů terapie a byl následně extrahován z ortodontické indikace. Histologicky se jednalo o směs vaziva, tkání podobných cementu a tkání podobných kosti, která dle autorů plně odpovídá tkáním zjištěným ve zvířecích experimentech (207).

### **7.1.3 Klasifikace tkání po proběhlé maturogenezi**

Nejvíce informací o charakteru tkáně, která může potencionálně vzniknout, nám může říci dostupná literatura z oblasti dentální traumatologie a autotransplantací, kde se regenerací a reparací zubní dřeně zabývají delší dobu. Z dosud známých informací se zdá, že charakter tkání je velmi podobný, přičemž se jednoznačně liší zastoupení jednotlivých typů. Vrůstající tkáň se může rozdělit do čtyř základních skupin (208):

1. Revaskularizace zbytků dřeně s následnou zrychlenou tvorbou dentinu, která někdy vede k obliteraci kořenového systému – je nutné zdůraznit, že i při výskytu periapikálního nálezu lze v kořenovém systému zaznamenat zbytky vitální dřeně (53), které mohou být zdrojem regenerativního potenciálu. V případě, že jsou přítomny pouze zbytky nevitální dřeně, mohou posloužit jako matrice pro revaskularizaci. V případě, že dojde k následné obliteraci kořenového systému, je zde riziko rozvoje periapikální ostitidy 1 % za rok. Je to dáno především velmi malým *foramen apicale*, kde i velmi malé trauma může narušit nervově-cévní svazek (209).
2. Vrůstání cementu a periodontálních ligament – tento typ tkáně se nejčastěji popisuje



v koronálním fragmentu zubu s horizontální frakturou. Předpokládá se vrůst PDLSC a může dojít i takové apozici cementu, že dochází až k obliteraci kořenového systému. Dlouhodobá prognóza není známa.

3. Vrůstání zubního cementu, periodontálních vazů a kostěné tkáně – tato situace má pravděpodobně nejbližší k situaci podobné při většině maturogenezí. Popisuje se u laterálních luxací a avulzí zubů, kde nejsou zuby adekvátně uchovány před replantací (210). Při tomto úrazu dochází k poškození Hertwigovy epiteliální pochvy a následnému průniku BMSC a PDLSC do kořenového kanálku. Zajímavé je, že se vyvíjejí periodontální ligamenta uvnitř kořenového kanálku (angl. internal periodontal ligaments) (169). Ty však nemají schopnost ochránit zub před resorpcí. Takto vznikají místa resorptivních pochodů na vnitřním povrchu kořene, která jsou histologicky podobná ankylotickému spojení povrchu kořene a okolní kosti. Předpokládá se homeostatický efekt Mallasezových epiteliálních ostrůvků, které chrání zubní tkáň v případě periodontálních ligament na vnějším povrchu kořene. Dlouhodobá prognóza není plně známa, ale vzhledem k přítomnosti vnitřní ankylózy se zdá být spíše horší než při vrůstání pouze cementu a periodontálních ligament (208).
4. Vrůstání kosti a kostní dřevě do kořenového kanálku – tato situace je velmi vzácná a většinou bývá popisována v rámci avulzí. Dochází k vrůstání kosti a kostní dřevě do systému kořenových kanálků. Může se rozvíjet vnitřní tunelová resorpce (angl. tunnel internal resorption), kde dochází ke vzniku longitudinálních resorpčních kanálků, které jsou paralelní s dřeňovou dutinou (169). Dlouhodobá prognóza není dobrá (208).

## 7.2 Rentgenologická kontrola

V pravidelných intervalech zveme pacienta na kontroly, ve kterých hodnotíme stav zubu jak pomocí fyzikálního vyšetření, tak zobrazovacích metod. První RTG snímek by se měl zhotovit ihned po provedení maturogenze (viz výše), jelikož s tímto snímkem budeme porovnávat všechny následně zhotovené snímky. Kontrolní snímky zhotovujeme v intervalech 3 měsíce – 3 měsíce – 6 měsíců – 6 měsíců, a poté v ročních intervalech. Výrazné zmenšení či kompletní remisi periapikálního nálezu můžeme očekávat nejdříve po 6 měsících. Do 12–24 měsíců by mělo být zřetelné pokračování ve vývoji kořene, tedy jeho prodloužení, uzavření apexu a ztlustění stěny kořene (32).

### 7.2.1 Chenova klasifikace výsledků maturogeneze

V roce 2011 Chen publikoval soubor kazuistik čítajících 20 pacientů, u nichž popsal pět možných reakcí na provedenou maturogenezi. Zjistil, že výsledek v podobě pokračujícího vývoje kořene není na rozdíl od radiologického přírůstku na vnitřních stěnách kořene předvídatelný.

- I. typ Maturace kořene a ztlustění stěny kořene
- II. typ Bez dalšího vývoje kořene, kořen zůstává tupý, ale uzavřen
- III. typ Pokračující vývoj kořene, ale apex zůstává otevřen
- IV. typ Obliterace kořenového systému
- V. typ Tvorba můstku pod bariérou z MTA

Někteří autoři zmiňují ještě možnost dalšího typu, a to vrůst kostěné tkáně do systému kořenových kanálků.

## **8 Porovnání úspěšnosti terapie maturogeneze a apexifikace**

### **8.1 Materiál a metodika**

#### **8.1.1 Výběr pacientů**

Byly shromážděny lékařské záznamy pacientů, již podstoupili endodontické ošetření stálých zubů s neukončeným vývojem na Klinice zubního lékařství v letech 2011–2015 a zároveň splňovali následující podmínky:

- měli stálý zub s nekrotickou dření a nedokončeným vývojem kořene s periapikálním nálezem nebo bez něj
- byli ošetřeni apexifikací pomocí hydroxidu vápenatého nebo maturogenezí

Vyřazení ze studie byli pacienti, u nichž:

- se objevily známky zevní resorpce
- došlo k selhání terapie v kratší době než 6 měsíců od počátku terapie
- v rámci postendodontického ošetření byla nutná protetická rekonstrukce klinické korunky
- byly dostupné diagnostické snímky, snímky po ukončení terapie a kontrolní snímky minimálně 1 rok po ukončení terapie v případě apexifikace nebo 6 měsíců v případě maturogeneze
- nebylo možné provést matematickou korekci snímků

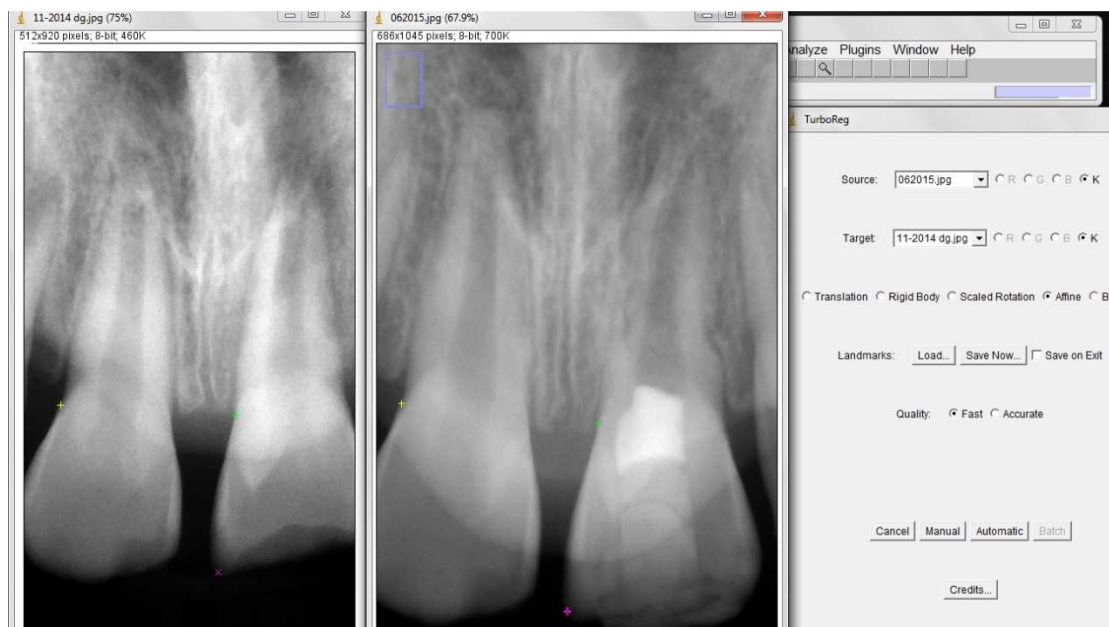
Záznamy obsahovaly informace o pohlaví, věku, lokalizaci zubu, klinických příznacích a symptomech, přítomnosti periapikálního nálezu, radiologické délce kořene, rentgenologickém povrchu kořene a délce sledování.

Apexifikace hydroxidem vápenatým byla prováděna konvenčními výplachy 1% chlornanem sodným a dlouhodobou aplikací hydroxidu vápenatého po průměrnou dobu 26,5 měsíce. Maturogeneze byla provedena podle doporučení AAE s využitím hydroxidu vápenatého.

#### **8.1.2 Matematická korekce rentgenových snímků**

Pro korekci odchylek projekcí jsme zvolili postup matematické korekce dle Boseho (171). Diagnostický snímek, případně snímek ihned po ukončení terapie byl spolu s kontrolním snímkem uložen ve formátu JPEG a převeden do programu Image J (verze 1.49, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), jenž slouží k měření a ukládání výsledků. K matematické minimalizaci možných rozdílů mezi diagnostickými a kontrolními snímky,

které mohly být způsobeny rozdílnými projekcemi, byl využit plug-in aplikace TurboReg (Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Švýcarsko). Algoritmus pluginu TurboReg provede slučovací geometrickou transformaci (angl. affine transformation) u dvou rentgenových snímků, aby projekce byly srovnatelné na obou snímcích. Podle dříve popsané metodiky (171, 211) byl vybrán diagnostický snímek nebo snímek pořízený ihned po ukončení terapie, který se nejvíce blížil izometrické a ortoradiální projekci. Tento snímek nazýváme zdrojový. Kontrolní snímek, jenž má být upraven, nazýváme cílový snímek. Na obou snímcích – jak zdrojovém, tak cílové snímku – zaznačíme tři referenční body, které nám vymezí referenční plochu na snímcích. Referenčními body mohou být pouze body, které jsou jednoduše určitelné a v čase neměnné. V našem případě se jednalo zvláště o cementosklovinné hranice, okraje výplní a apexy zubů s již ukončeným vývojem. Zvláštní zřetel byl brán na to, aby byly body vzdáleny od sebe co nejvíce a aby se pozice referenčních bodů v čase neměnila (např. neprořezané zuby, nebo apexy zubů s ještě neukončeným vývojem). U všech snímků bylo možné najít vhodné referenční body. U všech snímků byl vybrán automatický mód (angl. automatic mode) pro korekci snímků, aby byla eliminována možná chyba hodnotícího. Kompletní postup geometrické korekce je zobrazen na obrazové dokumentaci.



**Obr. 13:** Postup geometrické korekce projekcí snímků. Vlevo snímek zdrojový, uprostřed snímek cílový. Na obou snímcích jsou zaznačeny referenční body. Vpravo ovládací panel.

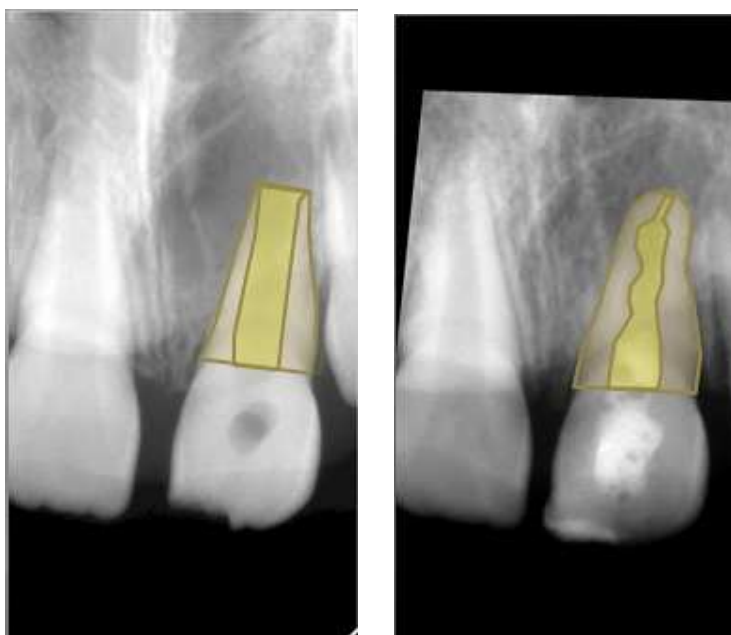
### 8.1.3 Stanovení rentgenologického přírůstku tvrdých zubních tkání

Pro hodnocení zisku tvrdých zubních tkání se zpočátku využívala technika dle Boseho (171), který měřil tloušťku stěny kořene v přechodu mezi střední a apikální třetinou. Problematické na této technice je měření pouze v jednom místě, které je navíc obtížně určitelné, pokud dochází k pokračování růstu kořene do délky. Nevýhody této techniky do velké míry eliminuje technika radiologického povrchu zubu dle Flakea (angl. radiological root area, RRA) (212). Tato technika prokázala vysokou míru shody mezi hodnotiteli a nebyl přítomen žádný vliv hodnotitele na měření (212).

Radiologický povrch kořene byl vypočten podle vzorce:

$$RRA = RPCK - RPKK$$

kde hodnoty RPCK (radiologický povrch celého kořene) a RPKK (radiologický povrch kořenového kanálku) byly změřeny pomocí funkce „polygon“ programu Image J (verze 1.49, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Touto funkcí se ohraničil pomocí co největšího počtu bodů povrch celého kořene, respektive povrch kořenového kanálku. Radiologický povrch kořene byl stanoven pětikrát na snímcích po slučovací geometrické korekci a z těchto hodnot byla vytvořena průměrná hodnota. Vzhledem k různému rozlišení snímků nebylo možné využít absolutní hodnoty, a tak jsme přistoupili k hodnocení relativních hodnoty – tj. procentuální změně oproti stavu na počátku terapie.



**Obr. 14 a 15:** Diagnostický snímek (vlevo) a upravený kontrolní snímek (vpravo).  
Na obou je vyznačen rentgenologický povrch kořene.

#### 8.1.4 Stanovení změny délky kořene

Pro stanovení změny délky kořene jsme využili techniku, již popsal Bose (171). Využili jsme funkci „straight line“ programu Image J (verze 1.49, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Spojením cementosklovinné hranice a radiologického apexu zubu jsme získali „radiologickou délku kořene“. Toto měření jsme opakovali pětkrát. Hodnoty byly po týdnu opětovně změřeny, aby byla zajištěna reprodukovatelnost měření. Jako závěrečnou radiologickou délku kořene jsme brali průměrnou hodnotu ze všech naměřených hodnot pro daný rentgenový snímek. Vzhledem k různému rozlišení snímků nebylo možné využít absolutní hodnoty, a tak jsme přistoupili k hodnocení hodnoty relativní – tj. procentuální změny oproti stavu na počátku terapie.



**Obr. 16 a 17:** Diagnostický snímek (vlevo) a upravený kontrolní snímek (vpravo).  
Na obou je vyznačena radiologická délka kořene.

#### 8.1.5 Klinická úspěšnost

Klinické a radiologické kontroly byly prováděny v 3měsíčních intervalech v prvním roce a následně co šest měsíců. V průběhu každé kontroly bylo provedeno cílené klinické vyšetření, zda je zub asymptomatický, a byl zhotoven kontrolní snímek. Zub byl vyhodnocen jako klinicky klidný v případě, pokud nebylo přítomno periapikální projasnění na kontrolním snímku a zub byl při klinickém vyšetření asymptomatický.

## **8.2 Statistická analýza a výsledky**

### **8.2.1 Stanovení rentgenologického povrchu kořene**

V původní práci byl pro stanovení změny rentgenologického povrchu kořene využit Mann-Whitneyho U-test (213), který je v našich končinách spíše znám jako dvouvýběrový Wilcoxonův test. Jedná se o neparametrický test, který je u normální distribuce dat téměř stejně přesný jako studentův t-test. Díky těmto výhodám jsme jej i my využili při porovnání léčebných modalit.

#### ***8.2.1.1 Maturogeneze***

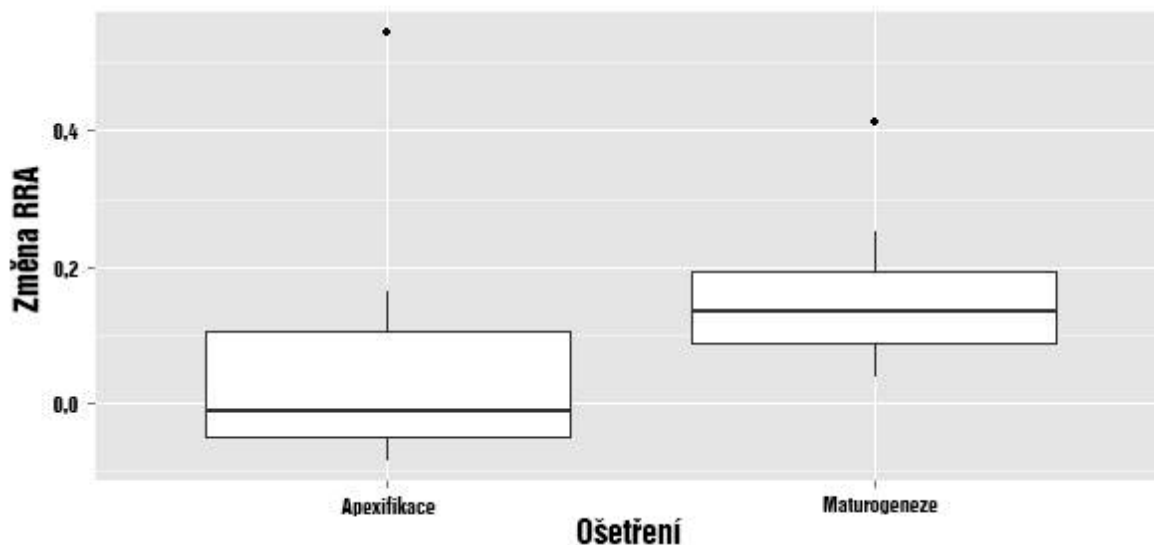
Normalitu hodnot nezamítáme (Shapiro-Wilkův test  $p = 0,2138$ ). Nulovou hypotézu, že při ošetření maturogenézí se rentgenologický povrch kořene po ošetření nemění, zkoumáme studentovým T-testem. Nulovou hypotézu zamítáme ( $p = 0,007$ ). Nárůst rentgenologického povrchu kořene je statisticky významný a činí 16 % (průměrná hodnota změny RRA při maturogenézi).

#### ***8.2.1.2 Apexifikace $\text{Ca}(\text{OH})_2$***

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test  $p = 0,0012$ ). Nulovou hypotézu, že při ošetření apexifikací  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se rentgenologický povrch kořene po ošetření nemění, zkoumáme jednovýběrovým Wilcoxonovým testem. Nulovou hypotézu nezamítáme ( $p = 0,5771$ ). Změna rentgenologického povrchu kořene není statisticky významná a činí 5,9 % (průměrná hodnota změny RRA při apexifikaci  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).

#### ***8.2.1.3 Rozdíly mezi léčebnými modalitami***

Nulovou hypotézu, že není rozdíl mezi maturogenézí a apexifikací  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , zkoumáme neparametrickým dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem ( $p = 0,041$ ). Rozdíl mezi léčebnými modalitami, co se týče zvětšení rentgenologického povrchu kořene, je významný ve prospěch maturogeneze.



**Graf 1:** Grafické znázornění procentuální změny rentgenologického povrchu kořene v závislosti na zvolené metodě léčby

## 8.2.2 Stanovení změny rentgenologické délky kořene

### 8.2.2.1 Maturogeneze

Normalitu hodnot změny rentgenologické délky zamítáme (Shapiro-Wilkův test  $p = 0,02872$ ). Nulovou hypotézu, že rentgenologická délka se po ošetření maturogenezí nemění, zkoumáme jednovýběrovým Wilcoxonovým testem. Nulovou hypotézu zamítáme ( $p = 0,01563$ ). Změna rentgenologické délky po ošetření je statisticky významná, a to v průměru o 5,3 %.

### 8.2.2.2 Apexifikace $\text{Ca}(\text{OH})_2$

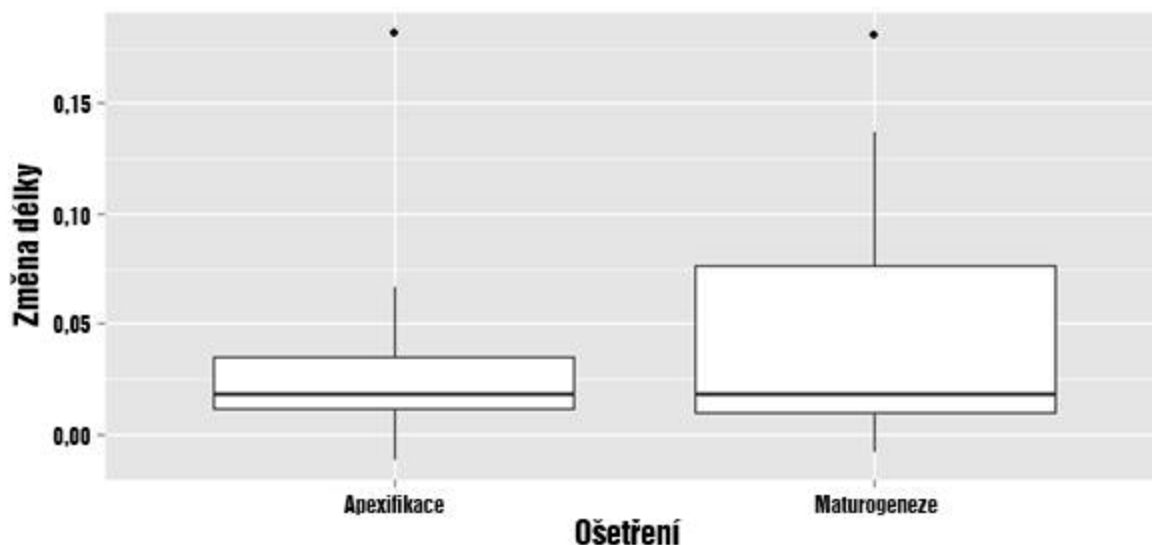
Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test  $p = 0,00047$ ). Nulovou hypotézu, že rentgenologická délka se po ošetření  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nemění, zkoumáme jednovýběrovým Wilcoxonovým testem. Nulovou hypotézu zamítáme ( $p = 0,004883$ ). Změna rentgenologické délky po ošetření je statisticky významná, a to v průměru o 3,56 %.

### 8.2.2.3 Rozdíly mezi léčebnými modalitami

Nulovou hypotézu, že není rozdíl mezi maturogenezí a apexifikací  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  zkoumáme neparametrickým dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Nulovou hypotézu nezamítáme



( $p = 0,939$ ). Rozdíly ve změně délky kořene mezi léčebnými modalitami nejsou statisticky signifikantní.



**Graf 2:** Grafické znázornění procentuální změny rentgenologické délky kořene v závislosti na zvolené metodě léčby

### 8.2.3 Klinická úspěšnost

Porovnání klinické úspěšnosti obou léčebných modalit jsme vzhledem k malé četnosti hodnot zkoumali neparametrickým Fisherovým faktoriálovým testem. Nulovou hypotézu, že mezi úspěšnostmi jednotlivých léčebných modalit není rozdíl, nezamítáme ( $p = 0,5459$ ).

## 8.3 Diskuse

Klinická úspěšnost obou léčebných postupů je dle našich výsledků shodná. Je ale nutné zdůraznit, že vzorek pacientů je malý, což je ale dáno malou incidencí případů stálých zubů s neukončeným vývojem a nekrotickou dření. Z našeho pohledu je nezbytné zdůraznit, že u silně infikovaného systému kořenových kanálků je nutné předpokládat přítomnost vysoce vyzrálého biofilmu. V tomto případě je zvýšené riziko, že výplachový protokol dle AAE bude méně účinný. Je to dáno tím, že mechanické odstranění biofilmu v průběhu opracování kořenového kanálku je eliminováno úplně a proteolytické působení chlornanu sodného na extracelulární matrix biofilmu je v důsledku jeho nízké koncentrace nižší. To může vést pouze ke krátkodobému snížení množství bakterií a selhání terapie za delší časový úsek. Nicméně i toto krátkodobé snížení množství bakterií může vytvořit podmínky vhodné pro tvorbu mineralizované tkáně na povrchu kořene, a tedy může dojít k naplnění sekundárních cílů

terapie, i když primární splněny nebudou (214). Tomu odpovídá i zvýšené riziko komplikací u maturogenezí (215).

Statisticky signifikantní je přírůstek rentgenologického povrchu kořene a potažmo šířky kořene. Toto zjištění odpovídá předchozím studiím, které se touto problematikou zabývaly. Námi změřená změna rentgenologického povrchu kořene 16,3 % se dá porovnat pouze s jednou studií (213). Pouze orientačně se dají využít studie, které měřily šířku kořene pouze v jednom daném místě (171). Některé studie však neprokázaly signifikantní rozdíl mezi maturogenezí a apexifikací, co se týče změny rentgenologického povrchu kořene (215). Charakter tkáně je spíše reparativní než regenerativní, a co se týče množství a charakteru tkáně, jsou nepředvídatelné.

Na rozdíl od přírůstku rentgenologického povrchu kořene není délkový přírůstek statisticky signifikantní. Jak bylo prokázáno Bosem, při aplikaci  $\text{Ca(OH)}_2$  pouze do koronální poloviny při apexifikaci  $\text{Ca(OH)}_2$  dochází k signifikantnímu prodloužení kořene oproti aplikaci  $\text{Ca(OH)}_2$  do celého systému kořenových kanálků (171). Můžeme tedy předpokládat, že podstatnou roli na prodloužení kořene do délky hraje Hertwigova epiteliální pochva. Tomuto zjištění odpovídají i další studie, kde nebylo prodloužení signifikantní (215, 216). Existují ale i studie, které signifikantní rozdíl v délce kořene prokázaly (11, 171, 217). Ve všech těchto studiích byla maturogeneze porovnávána s apexifikací, ať už pomocí  $\text{Ca(OH)}_2$ , kde se hydroxid vápenatý aplikoval do celého kořenového systému, nebo MTA. Pokud se hydroxid vápenatý u apexifikace použije tak, aby nebyla nadměrně traumatizována Hertwigova epiteliální pochva, můžeme ve změně délky kořene předpokládat podobné výsledky.

#### **8.4 Závěr**

Dle našich výsledků není mezi maturogenezí a apexifikací pomocí  $\text{Ca(OH)}_2$  rozdíl v klinické úspěšnosti a rentgenologické změně délky kořene. Signifikantní rozdíl je ale ve změně rentgenologického povrchu kořene, jenž je u maturogeneze větší než u apexifikace  $\text{Ca(OH)}_2$ .

## 9 Srovnání tvrdosti materiálu MTA v závislosti na vlastnostech okolního prostředí metodou nanoindentace

### 9.1 Úvod

V posledních dvaceti letech došlo v endodoncii k bouřlivému vývoji, který byl podmíněn uvedením nových materiálů, nástrojů a operačního mikroskopu do klinické praxe. Jednou ze zásadních novinek, která výrazně změnila strategii i výsledky ošetření, bylo uvedení kalcium-silikátových cementů na trh. Tyto hydraulické cementy se na rozdíl od ostatních materiálů využívaných v endodoncii a celkově v zubním lékařství vyznačují tím, že tuhnou za přítomnosti vlhka. Kromě toho se kalcium-silikátové cementy projevují vynikající biokompatibilitou a zřetelným osteokonduktivním působením (218). Tyto jejich vlastnosti umožnily rychlé, precizní a předvídatelné ošetření stavů v endodoncii, které dříve nebylo možné řešit konzervativně.

Původně byly tyto materiály doporučovány pro retrogradní výplně při apikektomiích (219) a pro krytí iatrogenních perforací kořene zubu (220). S postupem času ale bylo publikováno velké množství prací, kde jsou doporučeny i pro ošetřování jiných klinických stavů jako např. zevní cervikální invazivní resorpce, apexogeneze, endodontické výkony se zachováním vitality zubní dřeně, vnitřní granulomy, nebo i k ortogradnímu plnění širokých kořenových kanálků (221). Rozšíření indikačního spektra pro kalcium-silikátové cementy přineslo i otázky ohledně správného klinického postupu při jejich využití. Jelikož tyto cementy se řadí mezi hydraulické, potřebují ke svému ztuhnutí přítomnost vlhka. Při využití silnějších vrstev cementu nemusí proběhnout v koronálních částech kořenové výplně chemická reakce tak, jak proběhne apikálně v kontaktu s vlhkostí periapikální oblasti. V těchto případech je doporučován dvoudobý postup s aplikací vatové či molitanové peletky s vodou pro vytvoření vlhkého prostředí i intrakanalikulárně nad kořenovou kalcium-silikátovou výplní (13). Dosud ale neexistují jasná doporučení, u kterých výkonů je vhodné tento dvoudobý postup provést.

### 9.2 Materiál a metodika

Testování tvrdosti materiálu pomocí indentace se již delší dobu využívá ke zhodnocení kvality a progresu hydratačních procesů a jako indikátor kvality ztuhnutí materiálu (222, 223). Nevýhodou tohoto postupu je nutnost mít vzorky alespoň 6 mm silné a 12 mm široké. To ale naprosto neodpovídá klinickým situacím, v kterých jsou tyto materiály používány, kde nelze

takto silné vrstvy materiálu reálně dosáhnout. Proto je možno výsledky těchto testů porovnávat pouze v rámci jednotlivých experimentálních prací. Další nevýhodou je nemožnost zjištění kvality ztuhnutí v různých hloubkách materiálu (224). K překonání těchto nevýhod jsme přistoupili ke zhotovení longitudinálních výbrusů vzorků a stanovení tvrdosti materiálu v různých hloubkách pomocí nanoindentace.

### 9.2.1 Zhotovení vzorků

Využili jsme válcovité polyethylenové formy o vnitřním průměru 1 mm a délce 12 mm, abychom simulovali tvar široce otevřeného kořenového kanálku. U první experimentální skupiny jsme jeden konec formy uzavřeli 1,5 mm silnou vrstvou tekutého kompozitního materiálu (Filtek Ultimate Flowable Restorative, 3M ESPE, Seefeld, Německo). Po jeho vytvrzení jsme do formy vložili 1,5 mm vlhké vaty. U druhé experimentální skupiny jsme jeden konec formy uzavřeli 3 mm silnou vrstvou téhož tekutého kompozitního materiálu. Následně jsme zbytek formy vyplnili materiálem ProRoot MTA (ProRoot MTA, Dentsply, Tulsa, USA), který se všeobecně považuje za zlatý standard mezi kalcium-silikátovými cementy. Následně jsme celý vzorek kromě konce zaplněného materiálem ProRoot MTA natřeli lakem, abychom vyloučili možný průnik vlhkosti mimo simulované *foramen apicale*. Po pěti dnech inkubace při teplotě 36 °C a 80% vlhkosti jsme následně rozbrousili polyethylenové formy a získali standardizované vzorky o délce 9 mm a průměru 1 mm. Ty jsme poté zalili do polymethylmetakrylové hmoty (Dentacryl, Spofa dental, Nový Jičín, ČR), aby bylo možné zhotovit výbrusy.

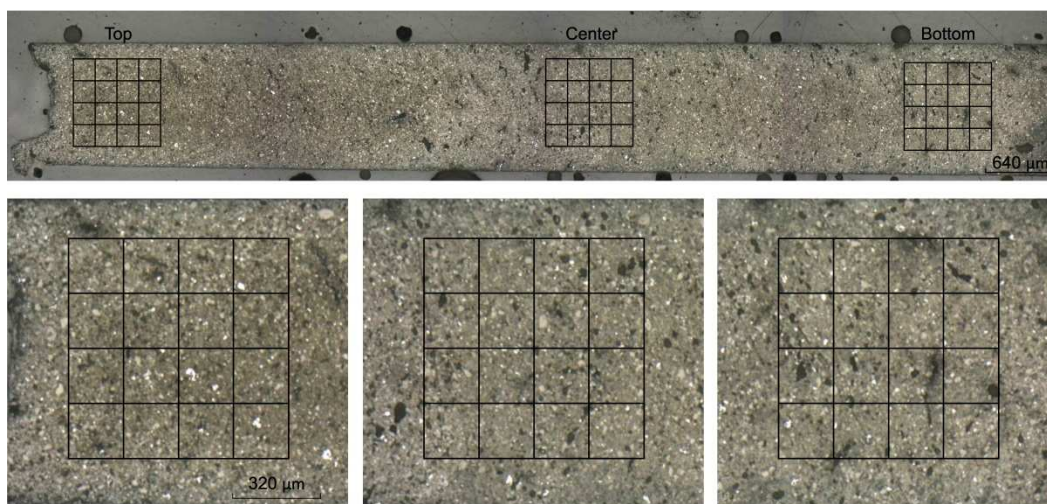
### 9.2.2 Úprava vzorků

Následně jsme takto vytvořené vzorky upravili vícestupňovým procesem. Longitudinální řezy byly vytvořeny odbroušením horní poloviny cementových válců podél delší osy. Následně byly tyto příčné řezy broušeny a leštěny za pomoci brusného prášku karbidu křemíku v postupně klesající zrnitosti F600 (Silicone Carbide Powder #600, Struers, Ballerup, Dánsko) a F800 (Silicone Carbide Powder #800, Struers, Ballerup, Dánsko). Finální úpravou bylo leštění diamantovou suspenzí s velikostí zrna 0,25 µm. Při všech operacích bylo použito chlazení vodou, aby nedošlo k přehřátí vzorků.

### 9.2.3 Testování mechanických vlastností

Tvrдость a modul pružnosti byly určeny prostřednictvím instrumentované vtiskové zkoušky pomocí univerzálního měřicího systému NanoTest vybaveného diamantovým Berkovičovým indentorem. Podstatou zkoušky je vnikání indentoru přesně definovaných rozměrů a geometrie do zkušební vzorku, přičemž je kontinuálně snímána zátěžová síla a poloha hrotu. Záznamem zkoušky je potom tzv. indentační křivka, která je v podstatě identická pro daný materiál. Pro analýzu křivek a extrakci materiálových charakteristik (tvrдость, modul pružnosti) jsme použili standardní metodu (225).

Měření byla provedena na příčném řezu ve třech oblastech umístěných v koronální, centrální a apikální oblasti. V každé oblasti bylo provedeno měření v 16 bodech umístěných v matici 4×4, kde vzdálenost vtisků byla 200 μm (Obr. 18). Celkem tedy bylo provedeno 48 měření tvrlosti a modulu pružnosti pro jeden vzorek.



**Obr. 18:** Vyleštěný vzorek materiálu ProRoot MTA s maticemi bodů, kde bylo provedeno měření nanoindentací. **Nahoře** – celá vrstva materiálu. **Dole** – detail jednotlivých úseků.

## 9.3 Výsledky

### 9.3.1 Tvrдость

#### 9.3.1.1 Vliv hloubky

##### A) Vzorky s vlhkým intrakanalikulárním prostředím

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 2,04 \cdot 10^{-8}$ , 0,001547 a  $1,756 \cdot 10^{-6}$  pro koronální, centrální a apikální třetinu).

Nulovou hypotézu, že mezi tvrdostmi v jednotlivých třetinách není rozdíl, testujeme neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem. Hypotézu nelze zamítnout ( $p = 0,1049$ ) a můžeme prohlásit, že mezi tvrdostmi v různých vzdálenostech od simulovaného apexu není rozdíl.

#### **B) Vzorky se suchým intrakanalikulárním prostředím**

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,000207$ ;  $1,386 \cdot 10^{-7}$  a  $1,618 \cdot 10^{-6}$  pro koronální, centrální a apikální třetinu).

Nulovou hypotézu, že mezi tvrdostmi v jednotlivých hloubkách není rozdíl, testujeme Kruskal-Wallisovým testem. Hypotézu nelze zamítnout ( $p = 0,2192$ ) a můžeme prohlásit, že mezi tvrdostmi v různých vzdálenostech od simulovaného apexu není rozdíl.

### **9.3.1.2 Vliv intrakanalikulárního prostředí**

#### **A) Apikální třetina**

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 1,756 \cdot 10^{-6}$  a  $1,618 \cdot 10^{-6}$  pro případ se suchým intrakanalikulárním a vlhkým intrakanalikulárním prostředím).

Nulovou hypotézu, že mezi tvrdostmi v apikální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 0,0001625$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím je rozdíl. Vyšší tvrdost kalcium-silikátového cementu v apikální třetině je v případě, pokud je přítomno vlhké intrakanalikulární prostředí.

#### **B) Centrální třetina**

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,001547$  a  $1,386 \cdot 10^{-7}$  pro případ se suchým a vlhkým intrakanalikulárním prostředím).

Nulovou hypotézu, že mezi tvrdostmi v centrální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 0,004634$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vatou a bez vaty je rozdíl. Vyšší tvrdost kalcium-silikátového cementu nastává v případě, pokud je v centrální třetině přítomno vlhké intrakanalikulární prostředí.

#### **C) Koronální třetina**

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 2,04 \cdot 10^{-8}$  a  $0,000207$  pro případ se suchým a vlhkým intrakanalikulárním prostředím).

Nulovou hypotézu, že mezi tvrdostmi v koronální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 4,005 \cdot 10^{-10}$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím je rozdíl. Vyšší tvrdost kalcium silikátového cementu nastává v případě, pokud je přítomno vlhké intrakanalikulární prostředí.

## 9.3.2 Modul elasticity

### 9.3.2.1 Vliv hloubky

#### A) Vzorky s vlhkým intrakanalikulárním prostředím

Normalitu zamítáme v centrální a koronální třetině (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,004323, 4,427 \cdot 10^{-10}$ ).

Nulovou hypotézu, že mezi hodnotou modulu pružnosti v jednotlivých třetinách není rozdíl, testujeme Kruskal-Wallisovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 0,002063$ ) a můžeme prohlásit, že mezi moduly elasticity je rozdíl. Neparametrickým porovnáním jsme zjistili, že rozdíl je mezi apikální a koronální třetinou, kdy koronální třetina má signifikantně vyšší modul elasticity. Rozdíl mezi koronální a centrální třetinou ale nebyl signifikantní.

#### B) Vzorky se suchým intrakanalikulárním prostředím

Normalitu zamítáme jen v centrální třetině (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,01399$ ).

Nulovou hypotézu, že mezi hodnotou modulu elasticity v jednotlivých třetinách není rozdíl, testujeme Kruskal-Wallisovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 0,001248$ ) a můžeme prohlásit, že mezi moduly elasticity je rozdíl. Neparametrickým porovnáním jsme zjistili, že rozdíl je mezi apikální a centrální třetinou a mezi centrální a koronální třetinou. Centrální třetina měla signifikantně vyšší modul elasticity než ostatní dvě třetiny. Nutno podotknout, že tato signifikance je hraniční.

### 9.3.2.2 Vliv intrakanalikulárního prostředí

#### A) Apikální třetina

Normalitu zamítáme v případě se suchým intrakanalikulárním prostředím (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,5749$  a  $4,427 \cdot 10^{-10}$  pro případ se suchým a vlhkým intrakanalikulárním prostředím). Nulovou hypotézu, že mezi modulem elasticity v apikální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 5,061 \cdot 10^{-8}$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vlhkým

a suchým intrakanalikulárním prostředím je rozdíl. Vyšší modul elasticity je v případě s vlhkým intrakanalikulárním prostředím.

### **B) Centrální třetina**

Normalitu hodnot zamítáme (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,01399$  a  $0,004323$  pro případ se suchým a vlhkým intrakanalikulárním prostředím).

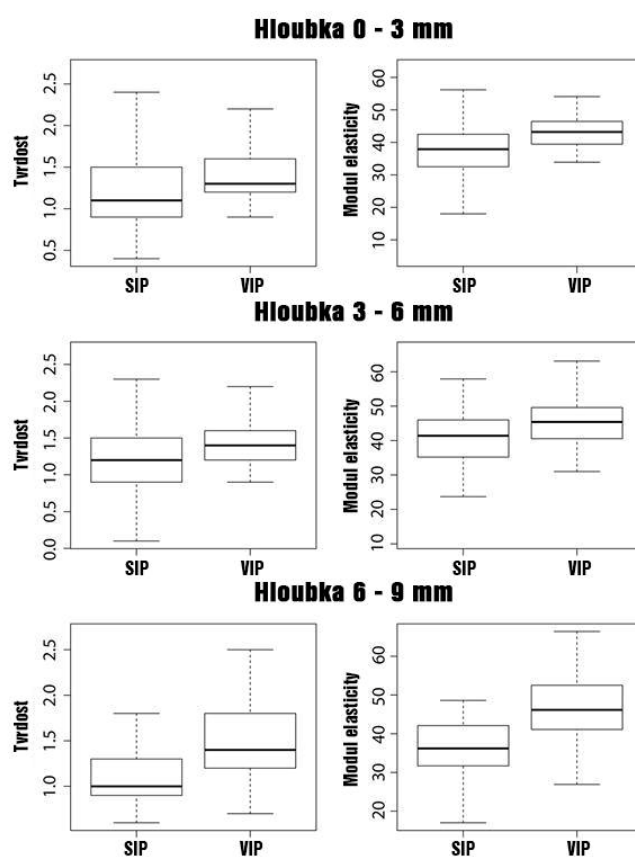
Nulovou hypotézu, že mezi moduly elasticity v centrální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 6,107 \cdot 10^{-5}$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím je rozdíl. Vyšší modul elasticity je v případě s vlhkým intrakanalikulárním prostředím.

### **C) Koronální třetina**

Normalitu hodnot jsme nezamítli (Shapiro-Wilkův test,  $p = 0,06487$  a  $0,5722$  pro případ se suchým a vlhkým intrakanalikulárním prostředím). Nezamítli jsme ani shodu rozptylů (F-test,  $p = 0,3566$ ).

Nulovou hypotézu, že mezi moduly elasticity v koronální třetině v případě s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím není rozdíl, testujeme studentovým T-testem. Hypotézu zamítáme ( $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$ ) a můžeme prohlásit, že mezi případem s vlhkým a suchým intrakanalikulárním prostředím je rozdíl. Vyšší modul elasticity je v případě s vlhkým intrakanalikulárním prostředím.





**Graf 3:** Grafické znázornění změny tvrdosti a modulu elasticity v závislosti na vlastnostech vnitřního prostředí. SIP – suché intrakanalikulární prostředí, VIP – vlhké intrakanalikulární prostředí

## 9.4 Diskuse

Testování tvrdosti materiálu je založeno na resistenci materiálu vůči deformaci. Dá se tak testovat kvalita a progresse hydratačních reakcí a lze jej brát jako indikátor ztuhnutí materiálu (222, 223). Předchozí publikace upozornily na vliv podmínek při tuhnutí materiálu na jeho mechanické vlastnosti, a to zvláště na tvrdost materiálu (226). Pro přesné porovnání mezi vzorky a mezi jednotlivými studii je nutné mít vzorky alespoň 6 mm silné a 12 mm široké. Navíc musí být dostatečně vyleštěné. Tyto podmínky naprosto neodpovídají klinickému využití daných materiálů, a tudíž jsou jednotlivé výsledky porovnatelné pouze v rámci jedné experimentální práce (224).

V současné době používané testování tvrdosti dle Vickerse je založeno na provedení vtisku o dané síle. Tento vtisk má za ideálních podmínek tvar čtverce, ale v reálných podmínkách častěji vidíme tvar kosočtverce. Podle velikosti úhlopříček se dopočítá tvrdost materiálu dle vzorce

$$HV = k * \frac{F}{d^2}$$

HV – tvrdost materiálu; k – koeficient; F – velikost síly; d – průměr úhlopříček

Velikost vtisku je poměrně velká a dá se použít pouze v horizontální rovině v jedné předem dané vzdálenosti, kde navíc nejde věrně nasimulovat intrakanalikulární podmínky. Další nevýhodou tohoto postupu je nemožnost získání dalších informací o vlastnostech materiálu, jelikož výše popsanou technikou se dá zjistit pouze tvrdost materiálu. Při využití nanoindentační zkoušky dle Berkoviče získáváme i informaci o modulu pružnosti materiálu. V současné době jsou dostupné informace, které naznačují, že vliv intrakanalikulárního prostředí nemá vliv při tuhnutí kalcium-silikátových cementů do 2 mm (227) nebo 4 mm (228, 229).

Z našich výsledků lze vyvodit, že vlhké intrakanalikulární prostředí má pozitivní efekt na hydratační reakci při tuhnutí kalcium-silikátového cementu ProRoot MTA ve vzdálenosti 0-3 mm, 3-6 mm i 3-9 mm od simulovaného *foramen apicale*. To se projevilo signifikantně větší tvrdostí a modulem pružnosti materiálu při porovnání mezi jednotlivými skupinami.

Vliv vzdálenosti od simulovaného *foramen apicale* nebyl při testování tvrdosti materiálu signifikantní ani při vlhkém, ani suchém intrakanalikulárním prostředí. Při testování modulu elasticity byl signifikantní rozdíl mezi koronální a apikální třetinou u vzorků s vlhkým intrakanalikulárním prostředím. Koronální třetina měla signifikantně větší modulus pružnosti. U skupiny se suchým intrakanalikulárním prostředím byl modulus pružnosti největší v centrální třetině.

Naše zjištění podporují myšlenku, že přítomnost vlhkého intrakanalikulárního prostředí přispívá k lepšímu průběhu hydratačních procesů při tuhnutí kalcium-silikátového cementu ProRoot MTA v celé tloušťce materiálu. V některých studiích je zmíněno, že přítomnost suchého či vlhkého intrakanalikulárního prostředí nemá signifikantní vliv na apikální utěsnění při využití kalcium-silikátových cementů o tloušťce 3 mm (230) a 5 mm (231). Při využití

kalcium-silikátových cementů o menších tloušťkách může hrát výraznou klinickou roli i kvalita proběhlé hydratační reakce a následné apikální utěsnění.

## **9.5 Závěr**

V rámci dostupných informací a omezeních vyplývajících z této laboratorní studie může být výhodné využívat dvoudobý postup s vlhkým intrakanalikulárním prostředím při klinických situacích, kde využíváme kalcium-silikátové cementy o tloušťce menší než 3 mm (např. maturogeneze, krytí perforací apod.)

## 10 Bibliografie

1. Goldstein S, Sedaghat-Zandi A, Greenberg M, Friedman S. Apexification & apexogenesis. *The New York state dental journal*. 1999;65(5):23-5.
2. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *International dental journal*. 2011;61(1):25-30.
3. Flanagan TA. What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2014;40(3):95-100.
4. Krasner P, Rankow HJ. New philosophy for the treatment of avulsed teeth. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1995;79(5):616-23.
5. Glendor U. Epidemiology of traumatic dental injuries--a 12 year review of the literature. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2008;24(6):603-11.
6. Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. *Endodontics & dental traumatology*. 1991;7(3):112-7.
7. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Journal of endodontics*. 2013;39(3 Suppl):S30-43.
8. Rafter M. Apexification: a review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2005;21(1):1-8.
9. Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endodontics & dental traumatology*. 1992;8(2):45-55.
10. 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.
11. Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *Journal of endodontics*. 2012;38(10):1330-6.
12. Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *British dental journal*. 1997;183(7):241-6.
13. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 1999;25(3):197-205.

14. Witherspoon DE, Ham K. One-visit apexification: technique for inducing root-end barrier formation in apical closures. *Practical procedures & aesthetic dentistry : PPAD*. 2001;13(6):455-60; quiz 62.
15. Steinig TH, Regan JD, Gutmann JL. The use and predictable placement of Mineral Trioxide Aggregate in one-visit apexification cases. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2003;29(1):34-42.
16. Holden DT, Schwartz SA, Kirkpatrick TC, Schindler WG. Clinical outcomes of artificial root-end barriers with mineral trioxide aggregate in teeth with immature apices. *Journal of endodontics*. 2008;34(7):812-7.
17. Nayar S, Bishop K, Alani A. A report on the clinical and radiographic outcomes of 38 cases of apexification with mineral trioxide aggregate. *The European journal of prosthodontics and restorative dentistry*. 2009;17(4):150-6.
18. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontologica Scandinavica*. 1961;19:324-53.
19. Rule DC, Winter GB. Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. *British dental journal*. 1966;120(12):586-90.
20. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scandinavian journal of dental research*. 1971;79(5):333-49.
21. 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.
22. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S52-7.
23. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatric dentistry*. 2008;30(3):206-10.
24. Huang GT, Lin LM. Letter to the editor: comments on the use of the term "revascularization" to describe root regeneration. *Journal of endodontics*. 2008;34(5):511; author reply -2.
25. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *Journal of endodontics*. 2012;38(3):411-4.
26. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatric dentistry*. 2007;29(1):47-50.
27. da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;109(5):779-87.

28. Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *Journal of endodontics*. 2011;37(12):1636-41.
29. Zhu W, Zhu X, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhang C. Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. *International endodontic journal*. 2013;46(10):962-70.
30. Weisleder R, Benitez CR. Maturogenesis: is it a new concept? *Journal of endodontics*. 2003;29(11):776-8.
31. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *Pediatric dentistry*. 2008;30(3):253-60.
32. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):319-26.
33. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(4):696-704.
34. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*. 2008;34(6):645-51.
35. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*. 2012;120(11):2174-81.
36. Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellermann O, Goldberg M, Dr es Sciences N. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S13-8.
37. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS one*. 2006;1:e79.
38. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*. 2008;34(2):166-71.
39. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):357-63.
40. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*. 2009;88(9):792-806.

41. Rodriguez-Lozano FJ, Moraleda JM. Use of dental stem cells in regenerative dentistry: a possible alternative. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2011;158(6):385-6.
42. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *International endodontic journal*. 2009;42(11):955-62.
43. Xu L, Tang L, Jin F, Liu XH, Yu JH, Wu JJ, et al. The apical region of developing tooth root constitutes a complex and maintains the ability to generate root and periodontium-like tissues. *Journal of periodontal research*. 2009;44(2):275-82.
44. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *Journal of endodontics*. 2011;37(2):133-8.
45. Agata H, Kagami H, Watanabe N, Ueda M. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells. *Differentiation; research in biological diversity*. 2008;76(9):981-93.
46. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nor JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2010;36(10):1633-7.
47. Dai Y, He H, Wise GE, Yao S. Hypoxia promotes growth of stem cells in dental follicle cell populations. *Journal of biomedical science and engineering*. 2011;4(6):454-61.
48. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Archives of oral biology*. 2010;55(9):648-54.
49. Abe S, Imaizumi M, Mikami Y, Wada Y, Tsuchiya S, Irie S, et al. Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;109(1):149-54.
50. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell biology international*. 2012;36(10):927-36.
51. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13625-30.
52. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of dental research*. 2003;82(12):976-81.
53. Lin L, Shovlin F, Skribner J, Langeland K. Pulp biopsies from the teeth associated with periapical radiolucency. *Journal of endodontics*. 1984;10(9):436-48.
54. Wang J, Wei X, Ling J, Huang Y, Gong Q. Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell. *Journal of endodontics*. 2010;36(3):453-8.

55. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative medicine*. 2010;5(4):617-31.
56. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Pocas-Fonseca MJ, et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International endodontic journal*. 2012;45(12):1080-90.
57. Zhu X, Zhang C, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhu W. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *Journal of endodontics*. 2012;38(12):1604-9.
58. McCulloch CA. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *The Anatomical record*. 1985;211(3):258-62.
59. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *The Anatomical record*. 1987;219(3):233-42.
60. Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 1985;67(2):130-1.
61. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
62. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & craniofacial research*. 2007;10(3):149-60.
63. Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *Journal of dental research*. 2012;91(11):1011-8.
64. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem cells and development*. 2009;18(3):487-96.
65. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3213-8.
66. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem cells*. 2003;21(6):681-93.
67. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8(3):301-16.



68. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *Journal of endodontics*. 2011;37(9):1217-24.
69. Kvist T, Reit C. Results of endodontic retreatment: a randomized clinical study comparing surgical and nonsurgical procedures. *Journal of endodontics*. 1999;25(12):814-7.
70. Dokic J, Tomic S, Cerovic S, Todorovic V, Rudolf R, Colic M. Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(9):807-16.
71. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *International journal of biological sciences*. 2013;9(10):1070-8.
72. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1996;67(4):407-17.
73. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000;12(6):547-54.
74. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of oral biology*. 2012;57(2):109-21.
75. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of oral biology*. 2000;45(11):1013-6.
76. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *The journal of adhesive dentistry*. 2013;15(5):407-12.
77. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell biology international*. 2008;32(7):827-34.
78. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of dental research*. 2000;79(9):1689-96.
79. Murray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007;25(8):1007-17.
80. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *European journal of oral sciences*. 1998;106 Suppl 1:179-84.
81. Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Advances in dental research*. 2001;15:51-4.

82. Sonmez AB, Castelnovo J. Applications of basic fibroblastic growth factor (FGF-2, bFGF) in dentistry. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2014;30(2):107-11.
83. Hatch NE, Franceschi RT. Osteoblast differentiation stage-specific expression of the pyrophosphate-generating enzyme PC-1. *Cells, tissues, organs*. 2009;189(1-4):65-9.
84. Aigner A, Ray PE, Czubayko F, Wellstein A. Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development. *Histochemistry and cell biology*. 2002;117(1):1-11.
85. Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Archives of histology and cytology*. 2009;72(1):51-64.
86. Tsuboi T, Mizutani S, Nakano M, Hirukawa K, Togari A. Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcified tissue international*. 2003;73(5):496-501.
87. Kitamura C, Nishihara T, Terashita M, Tabata Y, Washio A. Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of fgf-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. *International journal of dentistry*. 2012;2012:190561.
88. Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK, et al. Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. *Journal of endodontics*. 2009;35(6):858-65.
89. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue engineering Part A*. 2010;16(10):3023-31.
90. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9.
91. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *The American journal of pathology*. 1999;154(2):375-84.
92. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC, Botero TM, Holland GR, et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of dental research*. 2008;87(12):1144-8.
93. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, et al. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2009;22(3):699-706.
94. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.

95. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(3):369-76.
96. Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2002;13(2):225-32.
97. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *European journal of oral sciences*. 2000;108(3):202-6.
98. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of endodontics*. 2004;30(4):205-8.
99. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, et al. Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- $\kappa$ B signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(28):19359-70.
100. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *Journal of dental research*. 1994;73(9):1515-22.
101. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Archives of oral biology*. 1994;39(12):1085-9.
102. Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene therapy*. 2002;9(12):814-8.
103. Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Akamine A. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Human gene therapy*. 2003;14(6):591-7.
104. Gaggero E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2006;7(1-2):51-65.
105. Hu X, Wang Y, He F, Li L, Zheng Y, Zhang Y, et al. Noggin is required for early development of murine upper incisors. *Journal of dental research*. 2012;91(4):394-400.
106. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2010;180:103-14.
107. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002;110(1):139-48.
108. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Archives of oral biology*. 1992;37(3):231-6.

109. Yokose S, Kadokura H, Tajima N, Hasegawa A, Sakagami H, Fujieda K, et al. Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. *Cell and tissue research*. 2004;315(3):375-84.
110. Civinini R, Macera A, Nistri L, Redl B, Innocenti M. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2011;8(1):25-31.
111. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *Journal of endodontics*. 2010;36(3):536-41.
112. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *Journal of endodontics*. 2011;37(2):265-8.
113. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *Journal of endodontics*. 2012;38(6):864-8.
114. Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H. Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *Journal of endodontics*. 2015;41(6):846-52.
115. Hiremath H, Gada N, Kini Y, Kulkarni S, Yakub SS, Metgud S. Single-step apical barrier placement in immature teeth using mineral trioxide aggregate and management of periapical inflammatory lesion using platelet-rich plasma and hydroxyapatite. *Journal of endodontics*. 2008;34(8):1020-4.
116. Zhang DD, Chen X, Bao ZF, Chen M, Ding ZJ, Zhong M. Histologic comparison between platelet-rich plasma and blood clot in regenerative endodontic treatment: an animal study. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1388-93.
117. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *Journal of endodontics*. 2013;39(1):138-44.
118. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Journal of endodontics*. 2008;34(7):876-87.
119. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *Journal of endodontics*. 2009;35(2):160-4.
120. Laureys W, Beele H, Cornelissen R, Dermaut L. Revascularization after cryopreservation and autotransplantation of immature and mature apicoectomized teeth. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of*

Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2001;119(4):346-52.

121. Claus I, Laureys W, Cornelissen R, Dermaut LR. Histologic analysis of pulpal revascularization of autotransplanted immature teeth after removal of the original pulp tissue. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2004;125(1):93-9.

122. Lin LM, Ricucci D, Huang GT. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *International endodontic journal.* 2014;47(8):713-24.

123. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *Journal of endodontics.* 2014;40(6):778-83.

124. In: HARGREAVES KM, editor. *Cohen's pathways of the pulp.* 10ed ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011. p. 572-4.

125. Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of endodontics.* 2014;40(1):51-5.

126. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International dental journal.* 2008;58(6):329-41.

127. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1983;55(3):307-12.

128. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of endodontics.* 2000;26(6):331-4.

129. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, et al. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Australian dental journal.* 2006;51(3):245-51.

130. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International endodontic journal.* 2001;34(4):300-7.

131. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of endodontics.* 2006;32(6):527-31.

132. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics*. 2004;30(4):196-200.
133. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *Journal of endodontics*. 2006;32(12):1205-13.
134. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *International endodontic journal*. 2009;42(1):84-92.
135. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *International endodontic journal*. 2009;42(12):1118-26.
136. Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatric dentistry*. 2009;31(2):145-8.
137. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *Journal of endodontics*. 2010;36(6):1086-91.
138. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Australian dental journal*. 2010;55(4):446-52.
139. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of dental research*. 2010;89(6):603-8.
140. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of endodontics*. 2011;37(11):1536-41.
141. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *International endodontic journal*. 2007;40(10):786-93.
142. Saif S, Carey CM, Tordik PA, McClanahan SB. Effect of irrigants and cementum injury on diffusion of hydroxyl ions through the dentinal tubules. *Journal of endodontics*. 2008;34(1):50-2.
143. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *International endodontic journal*. 2003;36(6):411-7.
144. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *Journal of endodontics*. 2011;37(8):1109-15.
145. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *International endodontic journal*. 2015.

146. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986;57(6):370-7.
147. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal*. 2009;42(4):288-302.
148. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2004;98(4):488-92.
149. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of endodontics*. 2006;32(5):434-7.
150. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF, Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *Journal of endodontics*. 2001;27(10):616-9.
151. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *International endodontic journal*. 2004;37(1):38-41.
152. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *Journal of endodontics*. 2004;30(11):785-7.
153. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *International endodontic journal*. 2001;34(3):184-8.
154. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society*. 1990;3(3):157-63.
155. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of endodontics*. 2015;41(3):363-8.
156. Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *Journal of dental research*. 1985;64(10):1195-8.
157. Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *International endodontic journal*. 1990;23(1):20-7.
158. Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *International endodontic journal*. 1992;25(1):2-5.
159. 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.
160. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *International endodontic journal*. 1996;29(2):118-24.

161. Ingham HR, Selkon JB, Hale JH. The antibacterial activity of netronidazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1975;1(4):355-61.
162. Hoshino E, Kota K, Sato M, Iwaku M. Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vitro. *Caries research*. 1988;22(5):280-2.
163. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral microbiology and immunology*. 1993;8(3):172-6.
164. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of endodontics*. 2012;38(10):1372-5.
165. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *Journal of endodontics*. 2012;38(1):91-4.
166. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of endodontics*. 2014;40(4):521-5.
167. Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *Journal of endodontics*. 2014;40(8):1172-7.
168. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International endodontic journal*. 2011;44(8):697-730.
169. Andreasen FM, Andreasen JO. Resorption and mineralization processes following root fracture of permanent incisors. *Endodontics & dental traumatology*. 1988;4(5):202-14.
170. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International endodontic journal*. 2012;45(3):294-305.
171. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of endodontics*. 2009;35(10):1343-9.
172. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *International endodontic journal*. 2007;40(1):2-10.
173. Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. *Journal of the California Dental Association*. 2011;39(3):152-5, 8-61.
174. Mohammadi Z, Soltani MK, Shalavi S. An update on the management of endodontic biofilms using root canal irrigants and medicaments. *Iranian endodontic journal*. 2014;9(2):89-97.
175. Rodig T, Vogel S, Zapf A, Hulsmann M. Efficacy of different irrigants in the removal of calcium hydroxide from root canals. *International endodontic journal*. 2010;43(6):519-27.



176. Kenee DM, Allemang JD, Johnson JD, Hellstein J, Nichol BK. A quantitative assessment of efficacy of various calcium hydroxide removal techniques. *Journal of endodontics*. 2006;32(6):563-5.
177. Ján L. *Detské zubné lékarstvo*. 2 dopln. vyd. ed. Bratislava: Dali-BB; 2012 2012.
178. King SR, McWhorter AG, Seale NS. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. *Pediatric dentistry*. 2002;24(2):157-9.
179. Curzon M. *Kennedy's pediatric operative dentistry*. 4th ed. ed. Boston: Wright; 1996 1996.
180. Milnes AR. Persuasive evidence that formocresol use in pediatric dentistry is safe. *Journal*. 2006;72(3):247-8.
181. Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *Journal of endodontics*. 2008;34(8):919-25; Discussion 1157.
182. DIOGENES A MH, FB TEIXEIRA, KM HARGREAVES. . An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*. 2013;28(1):2-23.
183. Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2012;28(1):33-41.
184. Endodontists AAo. *AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure 2015* [updated 12.4.2015 28.12.2015]. Available from:  
[http://www.aae.org/uploadedfiles/publications\\_and\\_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf](http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf).
185. Ebrahim AK, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. The effects of file size, sodium hypochlorite and blood on the accuracy of Root ZX apex locator in enlarged root canals: an in vitro study. *Australian dental journal*. 2006;51(2):153-7.
186. Kang JA, Kim SK. Accuracies of seven different apex locators under various conditions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2008;106(4):e57-62.
187. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;114(6):1502-8.
188. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of sports medicine*. 2009;37(11):2259-72.
189. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *International endodontic journal*. 2012;45(10):942-9.
190. Felman D, Parashos P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 2013;39(4):484-7.

191. Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):436-40.
192. Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *Journal of endodontics*. 2015;41(7):1139-45.
193. Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *BioMed research international*. 2014;2014:160951.
194. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *Journal of endodontics*. 2011;37(3):372-5.
195. Smith JW. Calcific metamorphosis: a treatment dilemma. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1982;54(4):441-4.
196. McCabe PS, Dummer PM. Pulp canal obliteration: an endodontic diagnosis and treatment challenge. *International endodontic journal*. 2012;45(2):177-97.
197. Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF. Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1972;33(3):438-49.
198. Torneck CD, Smith JS, Grindall P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. 3. Effect of debridement and disinfection procedures in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1973;35(4):532-40.
199. Torneck CD, Smith JS, Grindall P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. IV. Effect of debridement procedures and calcium hydroxide-camphorated parachlorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1973;35(4):541-54.
200. Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG, Laporta R. Revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel. *Journal of endodontics*. 1976;2(6):159-65.
201. Nevins A, Wrobel W, Valachovic R, Finkelstein F. Hard tissue induction into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. *Journal of endodontics*. 1977;3(11):431-3.
202. Nevins A, Finkelstein F, Laporta R, Borden BG. Induction of hard tissue into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. *Journal of endodontics*. 1978;4(3):76-81.
203. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2007;33(6):680-9.
204. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2010;36(1):56-63.

205. Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL, Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *Journal of endodontics*. 2011;37(8):1069-73.
206. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *Journal of endodontics*. 2012;38(9):1293-7.
207. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *Journal of endodontics*. 2014;40(1):133-9.
208. Andreasen JO, Bakland LK. Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2012;28(1):13-8.
209. Robertson A, Andreasen FM, Bergenholtz G, Andreasen JO, Noren JG. Incidence of pulp necrosis subsequent to pulp canal obliteration from trauma of permanent incisors. *Journal of endodontics*. 1996;22(10):557-60.
210. Andreasen JO, Borum MK, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 3. Factors related to root growth. *Endodontics & dental traumatology*. 1995;11(2):69-75.
211. Webber RL, Ruttimann UE, Groenhuis RA. Computer correction of projective distortions in dental radiographs. *Journal of dental research*. 1984;63(8):1032-6.
212. Flake NM, Gibbs JL, Diogenes A, Hargreaves KM, Khan AA. A standardized novel method to measure radiographic root changes after endodontic therapy in immature teeth. *Journal of endodontics*. 2014;40(1):46-50.
213. 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.
214. Zizka R, Buchta T, Voborna I, Harvan L, Sedy J. Root Maturation in Teeth Treated by Unsuccessful Revitalization: 2 Case Reports. *Journal of endodontics*. 2016;42(5):724-9.
215. Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS, et al. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *Journal of endodontics*. 2014;40(8):1063-70.
216. Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):333-8.
217. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):192-8.

218. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of endodontics*. 2010;36(2):190-202.
219. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *Journal of endodontics*. 1993;19(12):591-5.
220. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of endodontics*. 1993;19(11):541-4.
221. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics*. 2010;36(3):400-13.
222. Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials*. 2004;25(5):787-93.
223. Bolhari B, Nekoofar MH, Sharifian M, Ghabrai S, Meraji N, Dummer PM. Acid and microhardness of mineral trioxide aggregate and mineral trioxide aggregate-like materials. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):432-5.
224. Torabinejad M. *Mineral Trioxide Aggregate*. Wiley Blackwell. 2014.
225. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*. 1992;7:1564-83.
226. Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST, et al. The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*. 2008;41(2):108-16.
227. Shokouhinejad N, Jafargholizadeh L, Khoshkhounejad M, Nekoofar MH, Raoof M. Surface microhardness of three thicknesses of mineral trioxide aggregate in different setting conditions. *Restorative dentistry & endodontics*. 2014;39(4):253-7.
228. Caronna V, Himel V, Yu Q, Zhang JF, Sabey K. Comparison of the surface hardness among 3 materials used in an experimental apexification model under moist and dry environments. *Journal of endodontics*. 2014;40(7):986-9.
229. DeAngelis L, Chockalingam R, Hamidi-Ravari A, Hay S, Lum V, Sathorn C, et al. In vitro assessment of mineral trioxide aggregate setting in the presence of interstitial fluid alone. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):402-5.
230. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, et al. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *Journal of endodontics*. 2007;33(3):272-5.

231. Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. *Journal of endodontics*. 2005;31(2):117-9.

## 11 Seznam zkratek

**AAE** – Americká asociace endodontistů (angl. American Association of Endodontists)

**bFGF** – bazický fibroblastový růstový faktor (angl. basic fibroblast growth factor)

**BMP** – kostní morfogenetický protein (angl. bone morphogenetic protein)

**BMSC** – kmenové buňky kostní dřeně (angl. bone marrow stem cells)

**DPSC** – kmenové buňky zubní dřeně (angl. dental pulp stem cells)

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina (angl. ethyldiamintetraacetic acid)

**FGF-2** – fibroblastový růstový faktor 2 (angl. fibroblast growth factor 2)

**HA/TCP** – hydroxyapatit/trikalciem fosfát

**hPCy-MSc** – kmenové buňky periapikálních cyst (angl. human periapical cyst – mesenchymal stem cells)

**iPAPSC** – kmenové buňky periapikálního zánětu (angl. inflammatory periapical stem cells)

**MAP** – jednosložková antibiotická pasta (angl. mono antibiotic paste)

**MSCs** – mesenchymální kmenové buňky (angl. mesenchymal stem cells)

**MTA** – angl. mineral trioxide aggregate

**PDGF** – růstový faktor izolovaný z destiček (angl. platelet derived growth factor)

**PDLSC** – kmenové buňky z periodontálních ligament (angl. periodontal ligament stem cells)

**PL-MSc** – kmenové buňky periapikální léze (angl. periapical lesion – mesenchymal stem cells)

**PRP** – plazma bohatá na destičky (angl. platelet rich plasma)

**RDT** – opakované zubní trauma (angl. repeated dental trauma)

**SCAP** – kmenové buňky izolované z apikální papily (angl. stem cells of apical papilla)

**SIP** – suché intrakanalikulární prostředí

**TAP** – trojsložková antibiotická pasta (angl. triple antibiotic paste)

**VEGF** – cévní endotelový růstový faktor (angl. vascular endothelial growth factor)

**VEGFR** – receptor cévního endotelového růstového faktoru (angl. vascular endothelial growth factor receptor)

**VIP** – vlhké intrakanalikulární prostředí

**TGF- $\beta$ 1** – transformační růstový faktor – beta 1 (angl. transforming growth factor – beta 1)

## 12 Seznam obrázků

**Obr. 1:** Schematický nákres plnění technikou vnitřní matrice

**Obr. 2:** Schematický nákres zdrojů kmenových buněk. **DPSC** – Dental pulp stem cell, **SCAP** – Stem cells of apical papilla, **PDLSC** – Periodontal ligament stem cells, **iPAPSCs** – inflammatory periapical stem cells, **BMSCs** – Bone marrow stem cells

**Obr. 3:** Trepanace horního středního řezáku po nasazení kofferdamu. Zde dosaženo sanguinopurulentního exsudátu.

**Obr. 4:** Zavedení kořenové nástroje pro zhotovení měřicího snímku

**Obr. 5:** Měřicí snímek

**Obr. 6:** Aplikace hydroxidu vápenatého do kořenového kanálku

**Obr. 7:** Hydroxid vápenatý byl aplikován pouze do koronální poloviny kořenového kanálku

**Obr. 8:** Aplikace kalcium-sulfátové hmoty

**Obr. 9:** Adhezivní laminace kalcium-sulfátové hmoty tekutým kompozitem

**Obr. 10:** Stav po indukcí krvácení a stabilizaci koagula v oblasti cementosklovinné hranice

**Obr. 11:** Aplikace kalcium silikátového cementu MTA na stabilizované koagulum

**Obr. 12:** Adhezivní rekonstrukce zubu

**Obr. 13:** Postup geometrické korekce projekcí snímků. Vlevo snímek zdrojový, uprostřed snímek cílový. Na obou snímcích jsou označeny referenční body. Vpravo ovládací panel.

**Obr. 14 a 15:** Diagnostický snímek (vlevo) a upravený kontrolní snímek (vpravo). Na obou je vyznačen rentgenologický povrch kořene.

**Obr. 16 a 17:** Diagnostický snímek (vlevo) a upravený kontrolní snímek (vpravo). Na obou je vyznačena radiologická délka kořene.

**Obr. 18:** Vyleštěný vzorek materiálu ProRoot MTA s maticemi bodů, kde bylo provedeno měření nanoindentací. **Nahoře** – celá vrstva materiálu. **Dole** – detail jednotlivých úseků.



## 13 Seznam tabulek

**Tab. 1:** Přehled růstových faktorů významných pro maturogenezi

## 14 Seznam grafů

**Graf 1:** Grafické znázornění procentuální změny rentgenologického povrchu kořene v závislosti na zvolené metodě léčby

**Graf 2:** Grafické znázornění procentuální změny rentgenologické délky kořene v závislosti na zvolené metodě léčby

**Graf 3:** Grafické znázornění změny tvrdosti a modulu elasticity v závislosti na vlastnostech vnitřního prostředí. SIP – suché intrakanalikulární prostředí, VIP – vlhké intrakanalikulární prostředí

## **15 Seznam odborných publikací autora**

### **1. Práce související s disertační prací:**

#### **Seznam článků publikovaných v odborných časopisech s IF – hlavní autor:**

**Žižka R.**, Buchta T., Voborná I., Harvan L., Šedý J.: Root maturation in teeth treated by unsuccessful revitalization: 2 case reports. Journal of Endodontics. 2016, 42(5): 724-729

#### **Seznam článků publikovaných v odborných časopisech bez IF – hlavní autor**

**Žižka R.**, Škrdlant J., Míšová E.: Maturogeneze. LKS. 2015, 25(11): 220-228

**Žižka R.**, Šedý J., Škrdlant J., Němcová N.: Maturogeneze. Část 1. Úvod, anatomie, kmenové buňky, růstové faktory, vnitřní matrice. Česká stomatologie. 2016, 116(1): 20-26

**Žižka R.**, Šedý J., Škrdlant J., Anděl T., Němcová N.: Maturogeneze. Část 2. Výplachové protokoly, medikace uvnitř kanálku. Praktické zubní lékařství. 2016, 64(1): 3-8

**Žižka R.**, Šedý J., Škrdlant J., Němcová N., Buchta T.: Maturogeneze. Část 3. Klinický protokol

- Přijato do časopisu Česká stomatologie do tisku dne 13. 12. 2015

**Žižka R.**, Škrdlant J., Azar B., Prukner V.: Maturogenesis. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS). 2016, 15(4): 60-66

**Žižka R.**, Škrdlant J., Šedý J. Mikroskopické ortográdní ošetření dnes invaginatus: kazuistika. LKS

- Přijato do časopisu LKS do tisku dne 7. 3. 2016

#### **Grantový projekt**

Projekt IGA\_LF\_2016\_007

**Tuhnutí kalcium silikátových cementů v závislosti na vlastnostech okolního prostředí**

Hlavní řešitel, počátek řešení 03/2016

#### **Publikovaná abstrakta:**

**Žižka R.:** „Maturogeneze“ v Olomouci dne 20. 3. 2015 na konferenci stomatologů Úsměv 015 (Sborník abstrakt konference „Úsměv 015“)

**Žižka R., Šedý J., Vlna M.:** „Endodontické ošetření stálých zubů s neukončeným vývojem“ v Senci dne 6. 12. 2015 na X. kongresu mladých zubných lékařů (Sborník abstrakt „X. kongres mladých zubných lékařů“)

**Žižka R., Šedý J.:** „Radiografické a klinické výsledky ošetření zubů s neukončeným vývojem – srovnání apexifikace a maturogeneze“ v Olomouci 8. 9. 2015 na Konferenci vědeckých prací studentů DPS. (Sborník abstrakt „Konference vědeckých prací studentů DPS“)

**Žižka R., Zapletalová Z.:** „Ortográdní mikrochirurgické ošetření dens invaginatus – kazuistika“ dne 1. 4. 2016 (Sborník abstrakt konference „Úsměv 016“)

**Žižka R., Škrdlant J.:** „Endodontické ošetření horních premolárů“ dne 9. 10. 2015 na konferenci Pražské dentální dny 2015. (Sborník abstrakt „Pražské dentální dny 2015“)

## **2. Ostatní publikace**

### ***Seznam článků publikovaných v odborných časopisech bez IF – hlavní autor:***

**Žižka R.**, Škrdlant J.: Termomechanická kondenzace. Quintessenz: Mezinárodní časopis pro zubní lékaře a zubní techniky. 2014, 17(6):41-44

**Žižka R.**, Šedý J., Škrdlant J., Němová N.: Apexlokátor v praxi zubního lékaře. LKS

- Přijato do časopisu LKS do tisku dne 11. 1. 2016

### ***Seznam článků publikovaných v odborných časopisech bez IF – spoluautor:***

Voborná I., Foltasová L., **Žižka R.**, Dubovská I., Harvan L.: Centric relation registration possibilities, Journal of Engineering (IOSR-JEN), 6(3): 1-3

Foltasová L., Zapletalová Z., **Žižka R.**, Voborná I., Morozova Y., Číhalová L.: Accuracy and Reliability of Age Estimation from Physiological Changes of Third Molars. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS), 15(2): 73-76

Harvan L., Konečná P., Voborná I., **Žižka R.**: Porovnání cyklické únavy NiTi rotačních nástrojů v endodoncii. In vitro studie. LKS, 26(5): 110-114

## 16 Souhrn poznatků dizertační práce

Na základě získaných poznatků z teoretické a praktické části dizertační práce můžeme prohlásit, že při ošetření stálých zubů s neukončeným vývojem a nekrotickou dření pomocí maturogeneze dochází k větší produkci mineralizované tkáně a její apozici na vnitřní stěnu kořene. Histologicky se nejedná o regeneraci, jelikož výsledná tkáň je většinou směsí cementu, periodontálních ligament a vaziva. Apozice tkání apikálně a prodloužení kořene do délky není závislé na metodě léčby a spíše se odvíjí od stavu Hertwigovy epitelální pochvy.

Dále můžeme prohlásit, že vlhké intrakanalikulární prostředí vede k lepší hydratační reakci kalcium silikátového cementu MTA. Kvalitně ztuhlý materiál má lepší mechanické vlastnosti a měl by lépe zabránit případnému bakteriálnímu průniku. Vzhledem k dostupným znalostem se zdá, že je vhodné dvoudobě aplikovat materiál MTA zvláště v případech, kdy tloušťka materiálu je spíše menší a kvalitně ztuhlý materiál je nezbytný pro úspěšnou terapii, např. při maturogenezi.