



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Dubravka Turjanski

**PRIMJENA TROMBOCITIMA
OBOGAĆENOGA FIBRINA
U REVASKULARIZACIJI
MLADIH TRAJNIH ZUBA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Dubravka Turjanski

**PRIMJENA TROMBOCITIMA
OBOGAĆENOGA FIBRINA
U REVASKULARIZACIJI
MLADIH TRAJNIH ZUBA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Domagoj Glavina

prof. dr. sc. Suzana Jakovljević

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Dubravka Turjanski

**REVASCULARISATION OF YOUNG
IMMATURE PERMANENT TEETH
USING PLATELET RICH FIBRIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Domagoj Glavina, PhD

Professor Suzana Jakovljević, PhD

Zagreb, 2026.

Rad je ostvaren na Zavodu za dječju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Zavodu za materijale Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu.

Lektor hrvatskog jezika: Elvira Čukac, prof.

Lektor engleskog jezika: Zlata Đurić, prof.

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Datum obrane rada: _____ (upisuje se naknadno rukom)

Rad sadrži: stranicu

tablica

slika

CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihova podrijetla.

Zahvala

Sažetak

PRIMJENA TROMBOCITIMA OBOGAĆENOGA FIBRINA U REVASKULARIZACIJI MLADIH TRAJNIH ZUBA

U ovom je istraživanju primijenjen modificirani protokol regenerativne endodontske terapije, koji uključuje postavu A-PRF+ nosača u radikularni, ali i koronarni dio endodontskog prostora, uz isključivu uporabu staklenoionomernog cementa (SIC) kao jedinog materijala za koronarno brtvljenje. Cilj je istraživanja bio usporediti učinkovitost modificiranog protokola u liječenju mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe s konvencionalnom apeksifikacijom kalcijevim hidroksidom, kao i laboratorijski ispitati bioaktivna svojstva SIC-a primijenjenih u navedenom protokolu tijekom dvanaestomjesečnog razdoblja praćenja.

Evaluirani su klinički, radiološki i funkcionalni ishodi liječenja, dok je laboratorijski dio istraživanja obuhvaćao ispitivanje bioaktivnih svojstava SIC-a primjenom FE-SEM/EDS analize, uz praćenje vremenski ovisnih mikrostrukturnih i mikrokemijskih promjena.

Primjena modificiranog protokola rezultirala je statistički i klinički značajnim produljenjem korijena, zadebljanjem dentinskih stijenki i apikalnim zatvaranjem, potpunim radiološkim cijeljenjem periapikalnih lezija do devetog mjeseca praćenja te visokim udjelom pozitivnih odgovora na testove osjetljivosti, uz potvrđenu pulpalnu perfuziju metodom laser-doplerske floumetrije (LDF) u gotovo svim slučajevima. Klinička procjena restauracija potvrdila je zadovoljavajuću funkcionalnu i estetsku stabilnost SIC-a, dok je FE-SEM/EDS analiza pokazala dinamičnu interakciju ispitivanih materijala s tvrdim zubnim tkivima.

Na temelju dobivenih rezultata primjena modificiranog protokola povezana je s povoljnijim ukupnim ishodima liječenja u usporedbi s konvencionalnom apeksifikacijom, dok SIC-i predstavljaju potencijalno prikladnu opciju za koronarno brtvljenje u okviru regenerativne endodontske terapije.

Ključne riječi: RET; A-PRF+; revaskularizacija; mladi trajni zubi; nekroza pulpe; apeksifikacija kalcijevim hidroksidom; LDF; SIC; bioaktivnost

Summary

REVASCULARISATION OF YOUNG IMMATURE PERMANENT TEETH USING PLATELET RICH FIBRIN

Background: Immature permanent teeth with pulp necrosis represent a significant therapeutic challenge due to incomplete root development, a wide open apex, thin dentinal walls, and reduced structural integrity, all of which increase susceptibility to cervical and root fractures and may compromise long-term tooth survival. Conventional calcium hydroxide apexification aims to induce apical barrier formation and resolve periapical pathology; however, it does not promote continued physiological root maturation or structural reinforcement of the root.

Regenerative endodontic therapy (RET) represents a biologically oriented treatment concept grounded in the principles of tissue engineering, seeking to move beyond simple revascularisation towards biologically guided regeneration of the pulp-dentine complex. This concept is based on the coordinated interaction of cells with regenerative potential, a biocompatible three-dimensional scaffold, and signalling molecules or growth factors that support angiogenesis, neurogenesis, and cell differentiation within the root canal environment. Reported regenerative outcomes include root lengthening, dentinal wall thickening, and apical narrowing or closure; nevertheless, clinical results remain variable and depend on multiple factors, including the effectiveness of disinfection, the choice and extent of the intracanal scaffold, and the quality of coronal sealing.

Among currently available scaffolds, autologous platelet concentrates have attracted particular interest due to their biocompatibility and sustained release of growth factors. Advanced platelet-rich fibrin (A-PRF⁺), obtained using a low-speed centrifugation protocol, provides a higher cellular content and prolonged delivery of growth factors, potentially enhancing regenerative processes in immature non-vital teeth. Despite these biological advantages, several limitations of current regenerative endodontic protocols remain. In particular, the use of calcium silicate-based materials, such as mineral trioxide aggregate and Biodentine, has been associated with tooth discolouration, while restricting the scaffold to the root canal space limits the regenerative process to a relatively small anatomical environment.

The present doctoral dissertation evaluates a modified regenerative endodontic protocol incorporating A-PRF⁺ as the sole biological scaffold extending from the apical region to the

coronal cavity, combined with the exclusive use of glass ionomer cement for coronal sealing, thereby ensuring reliable sealing while minimising the risk of tooth discolouration.

Aim: The aim of this doctoral research was to evaluate the effectiveness of a modified regenerative endodontic protocol in immature permanent teeth with pulp necrosis, with particular emphasis on outcomes related to the regeneration of the pulp-dentine complex, the preservation of functional and aesthetic tooth characteristics, and radiographic indicators of continued root development. The protocol was compared with conventional calcium hydroxide apexification, while additional analyses focused on pulpal revascularisation and innervation, as well as the bioactive and clinical performance of glass ionomer cements used for coronal sealing.

Materials and methods: The present doctoral dissertation combines a clinical study and an *in vitro* laboratory investigation, which together provide a comprehensive assessment of the proposed modified regenerative endodontic protocol.

The clinical study was designed as a prospective investigation with a historical control group and included systemically healthy patients aged 8–18 years presenting with immature, single-rooted permanent teeth diagnosed with pulp necrosis. Eligible teeth were consecutively treated using a modified regenerative endodontic protocol, and outcomes were compared with a matched cohort of patients previously managed with conventional calcium hydroxide apexification at the same institution. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, approved by the appropriate ethics committee, and retrospectively registered at ClinicalTrials.gov. Written informed consent was obtained from all participants and their legal guardians prior to enrolment.

Patients in the experimental group underwent a standardised multi-visit regenerative protocol involving minimal instrumentation, chemical disinfection, intracanal medicament placement, induction of apical bleeding, and application of autologous A-PRF+ as the sole scaffold extending from the apical region into the coronal cavity, followed by definitive coronal sealing using glass ionomer cement. The control group consisted of teeth treated with calcium hydroxide apexification according to established clinical protocols. All patients were followed for 12 months.

Clinical and radiographic evaluations were performed at predefined follow-up intervals over a 12-month observation period. Radiographic analysis focused on changes in root length, dentinal wall thickness, and apical diameter, calculated as differences between baseline and follow-up

measurements. Pulp vitality was assessed using sensibility testing and laser Doppler flowmetry as an objective indicator of pulpal blood flow. The clinical performance of glass ionomer cement restorations was evaluated using modified United States Public Health Service (USPHS) criteria.

The *in vitro* laboratory investigation was conducted using extracted human molars to evaluate the microstructural and microchemical characteristics of four commercially available glass ionomer cements – Ketac Universal Aplicap, Fuji IX GP Fast, Equia Forte Fil, and Glass Carbomer GlassFill – used for coronal sealing. Standardised cervical cavities were prepared in enamel and dentine, and the materials were applied according to the manufacturers' instructions under controlled setting conditions. Specimens were subsequently stored in artificial saliva for predefined periods to simulate the oral environment and allow assessment of material–tooth interactions over time. Following storage, samples were embedded, sectioned and prepared for analysis, with microstructural evaluation performed by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and microchemical characterisation carried out using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS).

Elemental analysis targeted key inorganic components of glass ionomer cements – fluoride, aluminium, silicon, phosphorus, calcium, and strontium – within the material matrix and at enamel–material and dentine–material interfaces to assess elemental changes over time.

Statistical analysis was performed using the Statistics and Machine Learning Toolbox (R2023b, MathWorks Inc., USA). Descriptive statistics were calculated for all variables. Group comparisons were conducted using appropriate parametric or non-parametric tests, with post hoc analysis applied where relevant. Linear regression was used to explore predictors of apical closure in the A-PRF+ group. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results: At baseline, the A-PRF+ and historical control groups were comparable with respect to all assessed demographic and clinical variables, allowing subsequent outcome comparisons. Over the 12-month follow-up, no tooth loss, clinical symptoms, complications, or tooth discolouration were documented in either group, and all restorations demonstrated satisfactory clinical performance according to modified USPHS criteria. Radiographically, no cases of root fracture, internal or external resorption, or new periapical pathology were identified, and pre-existing periapical radiolucencies resolved by 9 months in all A-PRF+ cases and in all but one control case. At 12 months, the A-PRF+ group demonstrated greater radiographic changes than the control group, with mean increases in root length of 1.88 mm versus 0.12 mm, dentinal wall thickness of

0.60 mm versus 0.11 mm, and apical narrowing of 0.84 mm versus 0.12 mm, with statistically significant intergroup differences ($p < 0.05$). An apical diameter of < 0.5 mm was recorded in 12/28 teeth in the A-PRF+ group compared with 1/28 in the control group. Sensibility testing yielded positive cold and electric pulp test responses in 71% and 75% of cases, respectively, while laser Doppler flowmetry detected pulpal blood flow in 93% of analysed teeth.

In the laboratory study, FE-SEM revealed progressive matrix homogenisation of glass ionomer cements over time, with the formation of a mineralised-like region in Glass Carbomer GlassFill after 12 months. EDS analysis demonstrated material-dependent differences in elemental composition within the cement matrix. Enamel and dentine adjacent to the restorative materials, however, exhibited similar temporal elemental patterns, with generally higher ion mass fractions in dentine than enamel and statistically significant differences limited to selected material–element combinations.

Conclusions: The modified regenerative endodontic protocol demonstrated favourable clinical, radiographic, and functional outcomes in immature permanent teeth with pulp necrosis over a 12-month follow-up period. The findings included continued root development with apical narrowing, absence of tooth loss and clinically evident complications or discolouration, and the presence of detectable pulpal blood flow. Laboratory analyses further characterised the microstructural maturation and microchemical behaviour of glass ionomer cements used for coronal sealing, supporting their stable clinical performance over time.

Keywords: Regenerative Endodontics; Platelet-Rich Fibrin; Revascularization; Permanent Teeth; Dental Pulp Necrosis; Apexification; Laser-Doppler Flowmetry; Glass Ionomer Cements; Bioactivity

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Anatomija i fiziološka uloga zubne pulpe	2
1.2. Etiološki čimbenici pulpne patologije i gubitka vitaliteta	3
1.2.1. Infektivni čimbenici	3
1.2.2. Traumatski čimbenici	3
1.2.3. Razvojni čimbenici	3
1.2.4. Jatrogeni čimbenici	4
1.3. Patofiziologija i klinička klasifikacija pulpne patologije	5
1.4. Smjernice za liječenje ireverzibilnog pulpitisa mladih trajnih zuba.....	6
1.5. Anatomske posebnosti mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe	7
1.6. Utjecaj gubitka zuba na oralnozdravstvenu kvalitetu života	8
1.7. Terapijski postupci liječenja mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe	9
1.7.1. Apeksifikacija kalcijevim hidroksidom	10
1.7.2. Apeksifikacija mineralnim trioksidnim agregatom ili Biodentinom	11
1.7.3. Terapijski postupak revaskularizacije.....	13
1.8. Regenerativna endodontska terapija	15
1.8.1. Ciljevi regenerativne endodontske terapije.....	16
1.8.2. Indikacije i kontraindikacije za regenerativnu endodontsku terapiju	16
1.8.3. Uvjeti za uspješnost regenerativne endodontske terapije	17
1.8.4. Kontrola infekcije	18
1.8.4.1. Mehanička obrada korijenskog kanala.....	19
1.8.4.2. Kemijska dezinfekcija korijenskog kanala.....	19

1.8.4.3. Upotreba intrakanalnih medikamenata.....	21
1.8.5. Biološki koncept regenerativne endodontske terapije	23
1.8.5.1. Matične stanice.....	23
1.8.5.2. Signalne molekule	26
1.8.5.3. Trodimenzionalni nosač	28
1.8.5.3.1. Ključna svojstva idealnog nosača	28
1.8.5.3.2. Klasifikacija nosača	30
1.8.5.3.3. Nosači u regenerativnoj endodontskoj terapiji.....	32
1.8.6. Materijali za koronarno brtvljenje	39
1.8.6.1. Mineralni trioksidni agregat	39
1.8.6.2. Biodentin	41
1.8.6.3. Staklenoionomerni cementi.....	42
1.8.7. Ishodi regenerativne endodontske terapije	45
1.8.8. Kriteriji evaluacije uspješnosti regenerativne endodontske terapije.....	46
1.8.8.1. Klinička i radiološka uspješnost.....	46
1.8.8.2. Odgovor na testove vitaliteta.....	48
1.9. Ograničenja regenerativnih protokola i opravdanost njihove modifikacije	50
2. CILJEVI I HIPOTEZE	51
2.1. Temeljni cilj istraživanja	52
2.2. Specifični ciljevi istraživanja.....	52
2.3. Hipoteze istraživanja	53
3. MATERIJALI I POSTUPCI.....	54
3.1. Klinička studija.....	55
3.1.1. Dizajn kliničke studije	55

3.1.2. Ispitanici.....	56
3.1.3. Kriteriji uključivanja i isključivanja	57
3.1.3.1. Eksperimentalna skupina (A-PRF+ revaskularizacija)	57
3.1.3.2. Kontrolna skupina (apeksifikacija kalcijevim hidroksidom)	58
3.1.4. Statistička snaga i veličina uzorka	58
3.1.5. Protokol A-PRF+ revaskularizacije (eksperimentalna skupina).....	60
3.1.5.1. Prvi posjet.....	60
3.1.5.2. Drugi posjet (dva tjedna nakon početnog zahvata)	60
3.1.5.3. Treći posjet (tri tjedna nakon početnog zahvata)	61
3.1.5.3.1. Priprema autolognog A-PRF+ krvnog pripravka	61
3.1.5.3.2. Postupak A-PRF+ revaskularizacije.....	64
3.1.6. Terapija apeksifikacije kalcijevim hidroksidom (kontrolna skupina)	66
3.1.7. Praćenje i kliničko-radiološka evaluacija	67
3.1.7.1. Plan kontrolnih pregleda	67
3.1.7.2. Klinički pregled.....	67
3.1.7.3. Klinička evaluacija ispuna	68
3.1.7.4. Radiološka analiza.....	69
3.1.7.5. Testiranje vitaliteta pulpe	71
3.1.7.6. Pokazatelji ishoda liječenja	72
3.1.8. Alokacija i zasljepljivanje.....	73
3.2. Laboratorijska studija	74
3.2.1. Dizajn laboratorijske studije	74
3.2.2. Priprema uzoraka	75
3.2.3. Veličina uzorka i statistička snaga.....	76

3.2.4. FE-SEM/EDS metodologija	76
3.3. Metode statističke analize podataka	78
4. REZULTATI	80
4.1. Rezultati kliničke studije	81
4.1.1. Početna demografska i klinička obilježja ispitanika.....	81
4.1.2. Klinički ishodi.....	82
4.1.3. Rezultati kliničke evaluacije ispuna	82
4.1.4. Rezultati radiološke analize	83
4.1.4.1. Produljenje korijena	87
4.1.4.2. Zadebljanje dentinske stijenke	87
4.1.4.3. Apikalno zatvaranje.....	88
4.1.4.4. Radiološka procjena apikalnog promjera i terapijskih ishoda	89
4.1.5. Rezultati testiranja vitaliteta pulpe	91
4.1.6. Linearni regresijski model za predviđanje apikalnog zatvaranja.....	92
4.2. Rezultati laboratorijske studije	95
4.2.1. Rezultati FE-SEM mikrostrukturne analize materijala.....	95
4.2.2. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija M	97
4.2.3. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija CM.....	101
4.2.4. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija DM.....	107
4.2.5. Usporedba ugradnje iona u caklini i dentinu	113
5. RASPRAVA.....	114
5.1. Klinički ishodi modificiranog protokola	117
5.2. Klinička evaluacija ispuna za koronarno brtvljenje.....	118
5.3. Radiološki ishodi modificiranog protokola	120

5.4. Procjena vitaliteta pulpe i funkcionalne obnove pulpnog tkiva.....	124
5.5. Diskoloracija zuba	127
5.6. Regresijski model apikalnog zatvaranja	129
5.7. Mikrostrukturne promjene staklenoionomernih cemenata	131
5.8. Mineralizacijski potencijal Glass Carbomera.....	133
5.9. Ionska interakcija na sučelju materijala i zuba	135
5.9.1. EDS mikrokemijska analiza materijala – regija M.....	136
5.9.2. EDS mikrokemijska analiza sučelja materijala i cakline – regija CM	138
5.9.3. EDS mikrokemijska analiza sučelja materijala i dentina – regija DM	141
5.9.4. Usporedba ionske interakcije s caklinom i dentinom	143
5.10. Sinteza nalaza kliničkog i laboratorijskog dijela studije	145
5.11. Metodološka ograničenja istraživanja i buduće smjernice	147
6. ZAKLJUČAK.....	150
7. LITERATURA	153
8. ŽIVOTOPIS S POPISOM RADOVA	176
9. PRILOZI	
PRILOG A: Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija M	
PRILOG B: Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija CM	
PRILOG C: Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija DM	
PRILOG D: Obrazac informiranog pristanka	
PRILOG E: Pisane informacije za pacijente (ispitanike)	

Popis kratica

AAE	Američko udruženje endodonata (engl. <i>American Association of Endodontists</i>)
A-PRF+	unaprijeđeni trombocitima obogaćeni fibrin (engl. <i>advanced platelet-rich fibrin plus</i>)
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
AS	aritmetička sredina
AZ	apikalno zatvaranje
CBCT	konusno-snopna kompjutorizirana tomografija (engl. <i>cone-beam computed tomography</i>)
CGF	koncentrirani čimbenici rasta (engl. <i>concentrated growth factors</i>)
E	Equia Forte Fil (staklenoionomerni cement)
EDS	energijsko-disperzijska rendgenska spektroskopija (engl. <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESE	Europsko društvo za endodonciju (engl. <i>European Society of Endodontology</i>)
ETV	električni test vitaliteta
F	Fuji IX GP Fast (staklenoionomerni cement)
FE-SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija s emisijom elektrona iz polja (engl. <i>field emission scanning electron microscopy</i>)
G	Glass Carbomer GlassFill (staklenoionomerni cement)
K	Ketac Universal Aplicap (staklenoionomerni cement)
MSC	mezenhimske matične stanice (engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
MTA	mineralni trioksidni agregat (engl. <i>mineral trioxide aggregate</i>)
PK	produljenje korijena
PRF	trombocitima obogaćeni fibrin (engl. <i>platelet-rich fibrin</i>)

PRGF	plazma bogata čimbenicima rasta (engl. <i>plasma rich in growth factors</i>)
PRP	plazma bogata trombocitima (engl. <i>platelet-rich plasma</i>)
RET	regenerativna endodontska terapija (engl. <i>regenerative endodontic therapy</i>)
SCAP	matične stanice apikalne papile (engl. <i>stem cells from the apical papilla</i>)
SD	standardna devijacija
SIC	staklenoionomerni cement
TAP	triantibiotska pasta (engl. <i>triple antibiotic paste</i>)
TVH	test vitaliteta hladnoćom
ZDS	zadebljanje dentinske stijenke
wt. %	maseni udio (engl. <i>weight percent</i>)

1. UVOD

1.1. Anatomija i fiziološka uloga zubne pulpe

Zubna pulpa visoko je specijalizirano, rahlo vezivno tkivo, smješteno unutar pulpne šupljine i korijenskih kanala, potpuno okruženo mineraliziranim dentinom, što osigurava strukturni integritet zuba, ali istodobno ograničava njezinu sposobnost reparacije u slučaju ozljede ili infekcije. Pulpa se sastoji od krvnih i limfnih žila, guste mreže živčanih vlakana te različitih staničnih populacija, uključujući odontoblaste, fibroblaste, makrofage, nediferencirane ektomezenhimalne stanice i druge imunokompetentne stanice. Takva histološka građa omogućuje složene interakcije između stanica i izvanstanične matrice, što je nužno za održavanje homeostaze i pokretanje reparativnih procesa (1).

Zatvoreni anatomski prostor pulpne šupljine, uz ograničenu kolateralnu vaskularizaciju, čini pulpu osobito osjetljivom na poremećaje cirkulacije i upalne procese (2).

Pulpa ima ključnu ulogu u formiranju i očuvanju vitalnosti tvrdih zubnih tkiva, posebno dentina. Njezina formativna funkcija uključuje stvaranje primarnog dentina tijekom odontogeneze, dok se u patološkim ili traumatskim uvjetima aktivira proces sekundarne i tercijarne dentinogeneze. Taj proces uključuje stvaranje reakcijskog dentina od preživjelih odontoblasta kao odgovor na blaže ili kronične podražaje te formiranje reparativnog dentina koji sintetiziraju novodiferencirane, odontoblastima slične stanice nakon gubitka izvornih stanica zbog jačih ili akutnih oštećenja (3).

Osim formativne, pulpa ima i senzoričku funkciju, prenoseći osjetne podražaje, prvenstveno bol, kroz mijelinizirana i nemijelinizirana živčana vlakna. Također, osigurava prehranu dentina kisikom i hranjivim tvarima putem pulpne vaskularne mreže. Imunološka funkcija temelji se na prisutnosti imunokompetentnih stanica i molekularnim mehanizmima koji omogućuju brzu, lokaliziranu obranu od infekcija (3–5).

Stoga je vitalnost pulpe ključna za prehranu dentina, učinkovit imunološki odgovor i dugoročno očuvanje funkcionalnog i strukturnog integriteta zuba. Gubitak vitalnosti, osobito u nezrelim trajnim zubima, može imati ozbiljne posljedice za daljnji razvoj korijena i mehaničku otpornost zuba (6).

1.2. Etiološki čimbenici pulpne patologije i gubitka vitaliteta

Etiologija pulpne patologije i posljedičnog gubitka vitaliteta zubne pulpe višestruka je te uključuje infektivne, traumatske, razvojne i jatrogene čimbenike, koji mogu djelovati samostalno ili u međusobnoj interakciji, pri čemu intenzitet, trajanje i vrijeme djelovanja znatno utječu na klinički tijek i ishod bolesti pulpe (2).

1.2.1. Infektivni čimbenici

Zubni karijes predstavlja vodeći uzrok pulpne patologije i jednu od najraširenijih kroničnih bolesti u svijetu, s procijenjenom prevalencijom od oko 514 milijuna djece s karijesom mliječnih zuba i 2 milijarde ljudi s karijesom trajnih zuba (7). Progresijom karijesnog procesa dolazi do bakterijske penetracije kroz dentinske tubule, što može rezultirati upalnim promjenama pulpe i, u konačnici, gubitkom njezine vitalnosti (2).

1.2.2. Traumatski čimbenici

Prema podacima različitih epidemioloških studija, traumatske dentalne ozljede čine drugi najčešći uzrok pulpne nekroze, pogađajući do 50 % djece prije punoljetnosti, s vrhuncem učestalosti u dobi od 8 do 12 godina (8,9). Najčešće su zahvaćeni prednji gornji zubi, osobito maksilarni središnji sjekutići, a rizični čimbenici uključuju povećani horizontalni pregriz (engl. *overjet*), nedovoljnu pokrivenost zuba usnama, sudjelovanje u sportskim aktivnostima te niži socioekonomski status (9).

U literaturi se navode različite stope rizika – kod višestrukih ozljeda istog zuba vjerojatnost razvoja nekroze pulpe iznosi 67,4 %, u usporedbi s 36,7 % kod izoliranih trauma, pri čemu su intruzija i avulzija među klinički najtežim oblicima traume, s izrazito nepovoljnom prognozom (10). Težina i vrsta ozljede, stadij razvoja korijena te pravodobnost i adekvatnost terapijskog pristupa prepoznaju se kao ključni prognostički čimbenici očuvanja vitalnosti pulpe (8,10–12).

1.2.3. Razvojni čimbenici

Razvojne anomalije zuba, iako rjeđe, mogu imati važnu etiološku ulogu u nastanku pulpne patologije, čak i bez prisutnosti karijesa. Među njima se najčešće ističu *dens evaginatus* i *dens invaginatus* (13,14).

Dens evaginatus karakterizira prisutnost dodatne kvržice, najčešće na okluzalnoj plohi mandibularnih premolara, unutar koje se često proteže pulpno tkivo. Prevalencija se kreće od 0,1 do 15 %, s većom učestalošću u azijskim populacijama. Fraktura ili trošenje takve kvržice u ranoj dobi može dovesti do izlaganja pulpe, bakterijske kontaminacije i ubrzanog razvoja pulpne patologije (13).

Dens invaginatus definira se kao uvlačenje caklinskog organa u dentalnu papilu prije mineralizacije, što rezultira složenom anatomijom pogodnom za nakupljanje biofilma i brzu bakterijsku penetraciju u pulpni prostor. Prevalencija iznosi 0,25 – 10 %, a najčešće zahvaća gornji lateralni sjekutić. Invaginacija može biti ograničena na krunu ili se protezati do apeksa, čime se znatno povećava rizik od ranog razvoja pulpne patologije (14).

1.2.4. Jatrogeni čimbenici

Jatrogeni čimbenici obuhvaćaju oštećenja zubne pulpe i potpornih struktura nastala tijekom izvođenja stomatoloških zahvata, koja mogu potaknuti upalni odgovor pulpe i dovesti do njezina ireverzibilnog oštećenja ili nekroze. Takva oštećenja najčešće nastaju tijekom restaurativnih i endodontskih postupaka, osobito u slučajevima neadekvatne tehničke izvedbe, nedovoljne kontrole bioloških čimbenika te nepoštivanja bioloških ograničenja pulpo-dentinskoga kompleksa (2,15).

Među najvažnije jatrogene čimbenike ubrajaju se agresivna preparacija kaviteta, slučajno otvaranje pulpne komore, neadekvatna kontrola topline tijekom brušenja i polimerizacije restaurativnih materijala, nepravilna primjena kemijskih sredstava te tehničke pogreške tijekom endodontskih zahvata, uključujući nepotpunu eradikaciju mikrobiološke infekcije i proceduralne komplikacije. Takva oštećenja mogu dovesti do perzistencije upale, razvoja periapikalne patologije i nepovoljnog dugoročnog ishoda liječenja (16,17).

Dostupni dokazi potvrđuju da jatrogeni čimbenici predstavljaju važan, ali u velikoj mjeri preventabilan uzrok pulpne patologije, pri čemu su pravilna tehnička izvedba zahvata i poštivanje bioloških principa ključni za očuvanje vitalnosti pulpe (2,15).

1.3. Patofiziologija i klinička klasifikacija pulpne patologije

Na razvoj pulpne patologije, uz prethodno navedene etiološke čimbenike, znatno utječu trajanje patološkog podražaja, njegov intenzitet, imunološki odgovor i reparativni kapacitet zubne pulpe, koji zajedno određuju mogućnost reverzibilnosti upalnog procesa i njegov konačni ishod (18).

U kliničkoj praksi razlikuju se tri osnovna oblika pulpne patologije: reverzibilni pulpitis, ireverzibilni pulpitis i nekroza pulpe. Reverzibilni pulpitis označava stanje blažeg upalnog odgovora uz očuvanu vitalnost pulpnog tkiva, pri čemu pravodobno uklanjanje uzročnog čimbenika omogućuje potpuni oporavak strukture i funkcije pulpe. Nasuprot tomu, ireverzibilni pulpitis obilježen je trajnim oštećenjem pulpe, izraženijim i dugotrajnim bolnim simptomima te nepovratnim gubitkom reparativnog potencijala. Bez pravodobne terapijske intervencije to stanje obično napreduje u nekrozu pulpe (19).

Nekroza pulpe označava potpuni gubitak vitalnosti pulpnog tkiva, uključujući vaskularizaciju i inervaciju, čime se stvaraju povoljni uvjeti za kolonizaciju mikroorganizama i razvoj periapikalne patologije. Patofiziološki mehanizmi koji vode prijelazu upalnog procesa u nekrozu uključuju perzistentnu imunološku aktivaciju, poremećaje mikrocirkulacije i iscrpljivanje obrambenih sposobnosti pulpe (2).

1.4. Smjernice za liječenje ireverzibilnog pulpitisa mladih trajnih zuba

Prema najnovijim smjernicama Američkog udruženja endodonata (AAE; engl. *American Association of Endodontists*) i Europskog društva za endodonciju (ESE; engl. *European Society of Endodontology*), u slučajevima ireverzibilnog pulpitisa sve se češće preporučuju minimalno invazivni terapijski postupci na vitalnoj pulpi – poput djelomične i potpune pulpotomije – ne samo u nezrelim zubima već i u trajnim, potpuno razvijenim zubima (19–21).

Ključni preduvjet za primjenu takvih terapijskih postupaka jest pravilna klinička procjena stupnja i reverzibilnosti pulpne upale, jer samo točna selekcija slučajeva omogućuje očuvanje preostalog vitalnog pulpnog tkiva i postizanje povoljnog dugoročnog ishoda liječenja. Temelj je takva pristupa selektivno uklanjanje inficiranog koronarnog pulpnog tkiva uz očuvanje vitalnosti radikularne pulpe, čime se čuva prirodna funkcija i struktura zuba te se smanjuje invazivnost zahvata (19).

Primjena biokompatibilnih materijala na bazi kalcijeva silikata, poput mineralnog trioksidnog agregata (MTA; engl. *mineral trioxide aggregate*) i Biodentina (biokeramičkog materijala na bazi kalcijeva silikata), pokazala je visoke stope uspješnosti. Klinički ishodi djelomične pulpotomije, prema novijim sustavnim analizama, pokazuju uspješnost od 85 do 90 %, dok radiološki rezultati iznose od 92 do 100 %. Kod potpune pulpotomije klinička uspješnost iznosi od 98 do 100 %, a radiološka od 78 do 93 % u praćenju do pet godina (19,21).

Svojstva suvremenih biokompatibilnih materijala omogućuju stvaranje bioaktivnog okruženja pogodnog za reparaciju pulpnog tkiva, poticanje formiranja dentinskog mosta i postizanje adekvatnog brtvljenja, što pridonosi očuvanju funkcije zuba i smanjenju potrebe za radikalnijim endodontskim zahvatima (19,20).

1.5. Anatomske posebnosti mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe

U mladim trajnim zubima prijelaz ireverzibilnog pulpitisa u nekrozu prekida rast i razvoj korijena te onemogućuje fiziološko zatvaranje apeksa. Posljedično, dentinske stijenke ostaju tanke i oslabljene, apikalni otvor širok, a nepovoljan omjer krune i korijena znatno narušava stabilnost i dugoročnu prognozu zuba (22–24).

Specifična morfološka obilježja – prije svega široki apikalni otvor i nedostatak apikalnog suženja – otežavaju provedbu konvencionalne endodontske terapije u dječjoj i preventivnoj dentalnoj medicini. Poteškoće u postizanju adekvatnog apikalnog brtvljenja, povećan rizik od ekstrudiranja punila u periapikalno područje te sklonost frakturama zbog tanke dentinske stijenke korijenskog kanala dodatno umanjuju dugoročnu prognozu (23–25).

Prema Cvekovoj klasifikaciji mladi trajni zubi obuhvaćaju prva tri stadija razvoja:

- stadij 1: razvijeno manje od polovice duljine korijena, uz široki apikalni otvor
- stadij 2: razvijena polovica duljine korijena, uz široki apikalni otvor
- stadij 3: razvijene dvije trećine duljine korijena, uz široki apikalni otvor.

Ni jedan od navedenih stadija ne osigurava dovoljnu strukturnu stabilnost, a tanke dentinske stijenke i široki apikalni otvor zahtijevaju alternativne terapijske strategije usmjerene na poticanje nastavka razvoja korijenskih struktura (4,23). Izostanak pravodobnih i adekvatnih terapijskih postupaka u takvim slučajevima može rezultirati gubitkom zuba (26).

1.6. Utjecaj gubitka zuba na oralnozdravstvenu kvalitetu života

Očuvanje zuba u zubnom luku ključno je za održavanje oralnozdravstvene kvalitete života (OHRQoL; engl. *Oral Health-Related Quality of Life*), pojma koji opisuje utjecaj oralnog zdravlja ili bolesti na svakodnevno funkcioniranje, psihološko stanje i društvene odnose pojedinca (27).

Gubitak zuba, osobito u estetskim regijama, može narušiti govor, otežati žvakanje, negativno utjecati na sliku o sebi, smanjiti samopouzdanje i dovesti do socijalne izolacije. Djeca i adolescenti posebno su osjetljivi na takve promjene zbog izraženog estetskog i psihološkog učinka, a posljedice se mogu neposredno odraziti i na dinamiku unutar obitelji (27).

U slučajevima traumatskih dentalnih ozljeda ili drugih stanja koja dovode do gubitka zuba, negativan utjecaj na OHRQoL može biti izražen i dugotrajan. Stoga očuvanje zuba, kad god je to moguće, predstavlja ključni terapijski cilj – ne samo zbog funkcionalne i estetske uloge nego i radi dugoročnog očuvanja psihosocijalnog blagostanja pacijenta (27).

1.7. Terapijski postupci liječenja mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe

Terapijski postupci liječenja mladih trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijenskih struktura i nekrozom pulpe mogu se podijeliti u dvije glavne skupine (24,28):

1. Konvencionalni postupci – primjenjuju se ponajprije kod zuba s nekrozom pulpe i širokim apikalnim otvorom, s osnovnim ciljem poticanja stvaranja čvrste i stabilne apikalne barijere. Nakon provedene terapije omogućuje se sigurno i kvalitetno punjenje korijenskih kanala trajnim materijalima, poput odgovarajućih punila u kombinaciji s gutaperkom ili termoplastičnom gutaperkom.

U skupinu konvencionalnih terapijskih postupaka ubrajaju se:

- apeksifikacija kalcijevim hidroksidom
- apeksifikacija mineralnim trioksidnim agregatom ili Biodentinom.

Ovakvim se pristupom sprječava prodor mikroorganizama iz usne šupljine u periapikalno područje, smanjuje se rizik od ponovne infekcije te se omogućuje funkcionalno očuvanje zuba u zubnom luku, unatoč izostanku daljnjeg razvoja korijenskih struktura (23,28).

2. Suvremeni, biološki orijentirani postupci – temelje se na dostignućima regenerativne dentalne medicine, tkivnog inženjerstva i biologije matičnih stanica. Njihova je osnovna svrha očuvanje vitalnosti preostalog pulpnog tkiva te poticanje nastavka rasta i ojačavanja korijenskih struktura.

U ovu se skupinu ubrajaju:

- revaskularizacijski terapijski postupci
- regenerativna endodontska terapija.

Za razliku od konvencionalnih terapijskih postupaka, koji su ponajprije usmjereni na formiranje apikalne barijere, suvremeni terapijski pristupi nastoje obnoviti cjelovit pulpo-dentinski kompleks te ponovno uspostaviti njegovu fiziološku funkciju. Time predstavljaju važan iskorak prema predvidljivom i dugoročno uspješnijem liječenju mladih trajnih zuba (24,28,29).

Pravilno i pravodobno odabrana terapija ključna je za dugoročno očuvanje funkcije i strukture zuba u djece i adolescenata. Pri odabiru optimalnog terapijskog postupka uzimaju se u obzir klinički status zuba, stupanj razvoja korijena, prisutnost i opseg infekcije te opće zdravstveno stanje

pacijenta. Budući da izostanak adekvatnog liječenja može dovesti do gubitka zuba, temeljito poznavanje etiologije, patofiziologije i terapijskih izazova nekroze mladih trajnih zuba presudno je za oblikovanje učinkovitih, predvidljivih i individualiziranih kliničkih protokola, u skladu s najsuvremenijim načelima dječje i preventivne dentalne medicine (24,28).

1.7.1. Apeksifikacija kalcijevim hidroksidom

Apeksifikacija kalcijevim hidroksidom klasičan je terapijski postupak kojim se potiče stvaranje čvrste apikalne barijere kod mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe i nezavršenim razvojem korijena. Prvi ju je opisao Frank 1966. godine, a unatoč razvoju suvremenijih terapijskih pristupa, i dalje se primjenjuje u kliničkoj praksi kao jedna od opcija za liječenje nekrotiziranih nezrelih trajnih zuba (28,30). Postupak se temelji na opetovanom postavljanju paste kalcijeva hidroksida u korijenski kanal tijekom duljeg razdoblja, čime se potiče mineralizacija u području apikalnog otvora i formira apikalna barijera, što omogućuje naknadno sigurno punjenje kanala trajnim opturacijskim materijalom (28,31).

Terapijski cilj ovog postupka ograničen je isključivo na postizanje apikalne barijere, bez mogućnosti nastavka fiziološkog razvoja korijena ili obnove pulpnog tkiva. Indikacije uključuju zube sa širokim apikalnim otvorom, tankim dentinskim stijenkama i nedovoljno razvijenim korijenom, osobito u situacijama kada suvremeni materijali ili protokoli nisu dostupni ili su kontraindicirani (28).

U svakodnevnoj kliničkoj praksi upotrebljavaju se pripravci kalcijeva hidroksida s različitim vrstama nosača. Paste na bazi vode omogućuju brzo otpuštanje hidroksilnih iona i nagli porast pH u dentinu, čime se postiže izražen antibakterijski učinak i poticanje mineralizacijskih procesa. Međutim, zbog brze difuzije iona, njihov se alkalni učinak relativno brzo smanjuje, pa je nužna češća zamjena materijala. Suprotno tomu, paste na bazi ulja ili silikonskih nosača pokazuju sporije otpuštanje iona, ali omogućuju dulje održavanje alkalnog pH u području korijenskog kanala, što ih čini prikladnijima za dugotrajne terapijske protokole (32).

Prednosti ovog postupka uključuju visoku stopu uspješnosti u postizanju apikalne barijere, snažno antibakterijsko djelovanje te dugogodišnje kliničko iskustvo koje potvrđuje njegovu učinkovitost. Osim toga, postupak je tehnički jednostavan i široko dostupan, što je osobito važno u uvjetima ograničenih resursa (31). Međutim, navedena se uspješnost odnosi prvenstveno na zatvaranje

apikalnog otvora, dok biomehanička svojstva korijena, nastavak njegova razvoja i dugoročna otpornost zuba ostaju nepromijenjeni (28).

Među ograničenjima apeksifikacije kalcijevim hidroksidom ističu se dugotrajnost terapije, potreba za čestim kontrolnim posjetima te povećani rizik od reinfekcije korijenskog kanala tijekom višemjesečnog liječenja. Dugotrajna prisutnost kalcijeva hidroksida u korijenskom kanalu povezuje se i s potencijalnim slabljenjem dentinskih stijenki zbog produljene izloženosti visokom pH, što može negativno utjecati na biomehanička svojstva nezrelog korijena. Osim toga, formirana apikalna barijera često je nepravilne strukture i varijabilne debljine, što može otežati optimalno brtvljenje i dugoročnu stabilnost punjenja. Iako su neka istraživanja upozorila na povećanu sklonost frakturama zuba nakon dugotrajne primjene kalcijeva hidroksida, dostupni podatci o tom riziku ostaju neujednačeni i djelomično proturječni (12,33).

Ova su ograničenja posebno klinički relevantna kod mladih trajnih zuba, u kojima je očuvanje strukturne čvrstoće korijena ključno za dugoročnu prognozu (33).

Smjernice Europske akademije za dječju stomatologiju (EAPD; engl. *European Academy of Paediatric Dentistry*) iz 2017. godine daju prednost apeksifikaciji biokeramičkim materijalima zbog kraćeg trajanja terapije i formiranja kvalitetnije apikalne barijere. Ipak, u određenim kliničkim okolnostima, osobito kada suvremeniji materijali nisu dostupni ili su kontraindicirani, apeksifikacija kalcijevim hidroksidom i dalje ostaje prihvatljiva terapijska opcija. Istodobno, jasno prepoznata biološka ograničenja apeksifikacijskih postupaka potaknula su razvoj terapijskih strategija usmjerenih ne samo na zatvaranje apikalnog otvora nego i na obnovu izgubljenih tkiva te nastavak fiziološkog razvoja korijena (28).

1.7.2. Apeksifikacija mineralnim trioksidnim agregatom ili Biodentinom

Apeksifikacija mineralnim trioksidnim agregatom ili Biodentinom, poznata i kao metoda formiranja apikalnog stopa, odnosno jednoposjetna apeksifikacija, etabliran je terapijski postupak za liječenje mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe i nezavršenim razvojem korijena. Za razliku od dugotrajne apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, ovaj postupak omogućuje stvaranje čvrste, homogeno građene apikalne barijere u jednom ili u nekoliko posjeta, čime se skraćuje trajanje terapije, poboljšava suradljivost pacijenata i smanjuje rizik od komplikacija povezanih s višemjesečnim liječenjem (34,35).

Klinički postupak uključuje mehaničku i kemijsku obradu korijenskog kanala, nakon čega se u apikalni dio pažljivo postavlja sloj MTA-a ili Biodentina debljine približno 3 – 5 mm radi zatvaranja apikalnog otvora i stvaranja nepropusne umjetne barijere. Nakon stvrdnjavanja materijala i radiološke provjere apikalnog stopa, korijenski kanal puni se trajnim opturacijskim materijalom u istom ili sljedećem posjetu. U jednoposjetnoj apeksifikaciji svi se terapijski koraci izvode unutar jednog posjeta, što dodatno pojednostavljuje postupak i čini ga osobito prihvatljivim za djecu i adolescente (35–38).

MTA i Biodentin odlikuju se visokom biokompatibilnošću, sposobnošću poticanja stvaranja mineraliziranih tkiva te izvrsnim brtvenim svojstvima. Njihova je primjena povezana s visokim stopama uspjeha u formiranju apikalne barijere i očuvanju funkcije zuba, što je potvrđeno kliničkim i eksperimentalnim istraživanjima (35,36,39,40). Biodentin, kao biokeramički materijal novije generacije, ima kraće vrijeme stvrdnjavanja, povoljnija mehanička svojstva i manji rizik od diskoloracije u usporedbi s ranijim formulacijama MTA-a (37,39).

Prednosti ovog postupka uključuju predvidljive kliničke rezultate, brzo formiranje apikalne barijere, smanjen rizik od mikropropusnosti te potencijalno veću otpornost korijena na frakturu u usporedbi s dugotrajnom apeksifikacijom kalcijevim hidroksidom (37,38,41,42). Među glavnim ograničenjima ističu se tehnička osjetljivost, mogućnost ekstrudiranja materijala u periapikalno područje te viši troškovi u odnosu na tradicionalne intrakanalne pripravke. Važno je naglasiti da se ovim postupkom ne potiče nastavak rasta korijena ni zadebljanje dentinskih stijenki, već isključivo formiranje stabilne apikalne barijere koja omogućuje kvalitetno brtvljenje korijenskog kanala (33,40).

Zahvaljujući navedenim svojstvima apeksifikacija MTA-om ili Biodentinom danas se široko primjenjuje kao jedna od preferiranih terapijskih opcija kod nezrelih trajnih zuba s nekrozom pulpe, osobito u situacijama kada je potrebno brzo, sigurno i predvidljivo liječenje uz povoljnu kratkoročnu prognozu (34,37,38). Unatoč tomu, suvremeni terapijski izazovi, koji uključuju potrebu za nastavkom rasta korijena i dugoročnim očuvanjem biomehaničke stabilnosti zuba, sve više usmjeravaju dentalnu medicinu prema biološki orijentiranim pristupima. U tom kontekstu, postupci revaskularizacije i regenerativne endodontske terapije predstavljaju važan iskorak u liječenju mladih trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijenskih struktura (5,43,44).

1.7.3. Terapijski postupak revaskularizacije

Revaskularizacija je suvremena metoda liječenja avitalnih nezrelih trajnih zuba, koja se temelji na stvaranju biokompatibilnog okruženja uz minimalnu instrumentaciju i temeljitu kemijsku dezinfekciju korijenskog kanala. Postupak uključuje izazivanje krvarenja iz periapikalnog područja, pri čemu se u kanalu formira krvni ugrušak koji djeluje kao prirodni trodimenzionalni nosač za stanice sposobne potaknuti nastavak rasta korijena, zadebljanje dentinskih stijenki te suženje ili zatvaranje apikalnog otvora (45,46). U literaturi se opisuje i kao „revitalizacija” (engl. *revitalisation*) ili „inducirano” / „potaknuto” / „provocirano krvarenje” (engl. *induced bleeding*) te se smatra začetkom biološki orijentiranih pristupa u endodonciji (47,48).

Postupak se najčešće provodi u dva posjeta. U prvom se osigurava izolacija zuba, izrađuje pristupni kavitet i provodi obilna kemijska irigacija, najčešće 1,5 – 3 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl), uz minimalnu ili izostavljenu mehaničku instrumentaciju radi očuvanja apikalnih stanica i tkiva. Nakon sušenja kanala aplicira se intrakanalni medikament – kalcijev hidroksid ili triantibiotska pasta (TAP; engl. *triple antibiotic paste*) – te se zub privremeno hermetički zatvori (47,49). U drugom posjetu, obično nakon 2 – 4 tjedna, medikament se uklanja, a korijenski kanal ispiru 17 %-tnom otopinom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) radi oslobađanja dentinskih čimbenika rasta. Krvarenje se inducira nježnim prelaskom endodontskog instrumenta 1 – 2 mm kroz apeks, a nakon što krv ispuni kanal do razine ili neposredno ispod cementno-caklinskog spoja (CEJ; engl. *cementoenamel junction*), ugrušak se stabilizira i prekriva biokeramičkim materijalom – najčešće MTA-om ili, alternativno, kalcij-fosfatno-silikatnim biokeramikama poput TotalFilla, EndoSequencea ili Biodentina. Na kraju se izrađuje trajni, hermetički koronarni ispun visoke kvalitete (47,50).

Klinički ciljevi postupka uključuju uklanjanje simptoma, cijeljenje periapikalne lezije, nastavak razvoja korijena uz zadebljanje dentinskih stijenki i/ili suženje apikalnog otvora te pozitivan odgovor na testove vitaliteta (50,51). Usporedna klinička i radiološka istraživanja na parovima zuba liječenih revaskularizacijom i apeksifikacijom MTA-om pokazuju povoljnije promjene u revaskularizacijskim slučajevima – dulji korijen, deblji zidovi, zatvaranje apeksa – uz visoku stopu cijeljenja periapikalnih promjena (45,50). Sustavni pregledi i metaanalize dodatno potvrđuju visoku kliničku uspješnost, iako se opseg promjena razlikuje ovisno o protokolu i individualnim čimbenicima (46,52).

Iako su klinički ishodi često povoljni, histološki nalazi pokazuju da se pulpo-dentinski kompleks nakon revaskularizacije u pravilu ne obnavlja. Umjesto toga, novonastalo tkivo čini mješavina vezivnog tkiva i tkiva slična cementu i/ili kosti, s ili bez elemenata parodontnog ligamenta. Takav sastav upućuje na pretežno reparativni proces pa se postupak točnije opisuje kao vođena tkivna reparacija, a ne potpuna regeneracija pulpe (46,53). U literaturi se pojmovi revaskularizacija, revitalizacija i regenerativna endodoncija često rabe kao sinonimi. Revaskularizacija označava ponovnu uspostavu vaskularne opskrbe unutar kanala, ali ne i prisutnost odontoblasta. Suprotno tomu, regeneracija pulpe zahtijeva i formiranje odontoblastnog sloja, prisutnost simpatičkih i parasimpatičkih živčanih vlakana, fibroblasta i matičnih stanica pulpe – elemenata koji u standardnom postupku revaskularizacije uglavnom izostaju (29,54).

Revaskularizacija je tehnički zahtjevan i osjetljiv terapijski postupak, pri čemu uspjeh liječenja ovisi o preciznoj provedbi svih faza – od atraumatskog rukovanja instrumentima i temeljite kemijske dezinfekcije kanala do kontroliranog induciranja krvarenja i pravilne stabilizacije ugruška. Krvni ugrušak može biti strukturno nepostojan jer se lako ošteti prije formiranja stabilne fibrinske mreže, a njegova kvaliteta (gustoća, volumen, mehanička otpornost) znatno varira među pacijentima, što može utjecati na tijek cijeljenja. Prirodni krvni ugrušak često sadržava ograničenu količinu čimbenika rasta, što smanjuje biološki poticaj za diferencijaciju i proliferaciju stanica. Među ograničenjima se navodi i rizik od diskoloracije zuba, osobito pri primjeni MTA-a kojemu je dodan bizmutov oksid radi postizanja radiokontrastnosti materijala. Konačno, potpuno uklanjanje bakterijskog biofilma iz kanala presudno je za uspjeh jer preostali mikroorganizmi mogu omesti formiranje novog tkiva, izazvati ponovnu infekciju i ugroziti nastavak rasta korijena (50,55).

Zbog navedenih ograničenja razvijaju se suvremeni regenerativni endodontski postupci, koji – uz uporabu biološki bogatijih nosača, poput trombocitima obogaćenog fibrina (PRF; engl. *platelet-rich fibrin*), plazme bogate trombocitima (PRP; engl. *platelet-rich plasma*), plazme bogate čimbenicima rasta (PRGF; engl. *plasma rich in growth factors*) i koncentriranih čimbenika rasta (CGF; engl. *concentrated growth factors*) – ciljano povećavaju regenerativni potencijal tkiva, potiču angiogenezu te omogućuju formiranje funkcionalno organiziranog, inerviranog i vaskulariziranog pulpnog tkiva (52,55,56). Spomenuti postupci nadovezuju se na klasičnu revaskularizaciju, predstavljajući sljedeći korak u razvoju suvremene endodontske terapije.

1.8. Regenerativna endodontska terapija

U kontekstu suvremenih terapijskih izazova u liječenju mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe i nezavršenim razvojem korijenskih struktura, regenerativna endodontska terapija (RET) predstavlja biološki orijentiran pristup usmjeren na obnovu vitalnog pulpnog tkiva. Za razliku od revaskularizacijskih postupaka, koji često dovode do formiranja reparativnog tkiva s obilježjima sličnima cementnom ili koštanom, RET teži stvaranju funkcionalnog pulpo-dentinskog kompleksa, uključujući vaskularizaciju, inervaciju, imunološku obranu i odontogenu aktivnost (57).

RET se temelji na načelima tkivnog inženjerstva koja uključuju sinkronizirano djelovanje stanica s regenerativnim potencijalom, biokompatibilnog trodimenzionalnog nosača (engl. *scaffold*) i signalnih čimbenika koji potiču angiogenezu, neurogenezu i diferencijaciju stanica u odontoblastima slične stanice (58). Usklađena interakcija ovih elemenata omogućuje nastavak rasta korijena, zadebljanje dentinskih stijenki i smanjenje rizika od fraktura, čime se poboljšava dugoročna funkcionalna i mehanička prognoza zuba (59).

U suvremenoj regenerativnoj endodonciji razlikuju se dva osnovna terapijska koncepta:

- pristup bez stanica (CF-RET; engl. *cell-free regenerative endodontic therapy*)
- pristup temeljen na stanicama (CB-RET; engl. *cell-based regenerative endodontic therapy*).

CF-RET se oslanja na mobilizaciju endogenih matičnih stanica iz periapikalnog područja u korijenski kanal, najčešće potaknutim krvarenjem ili primjenom autolognih krvnih derivata (npr. PRP, PRF). Suprotno tomu, CB-RET uključuje izravnu primjenu laboratorijski izoliranih i uzgojenih matičnih stanica, koje se unose u prethodno pripremljeni kanal zajedno s odgovarajućim nosačem i signalnim molekulama (57,60).

1.8.1. Ciljevi regenerativne endodontske terapije

Temeljni ciljevi regenerativne endodontske terapije usmjereni su na biološku obnovu strukture i funkcije zubne pulpe i dentina, u cilju dugoročnog očuvanja zuba u zubnom luku.

Ciljevi RET-a obuhvaćaju:

- obnovu vitalnog pulpnog tkiva unutar korijenskog kanala, koje omogućuje održavanje homeostaze i sudjeluje u lokalnim obrambenim mehanizmima
- rekonstrukciju pulpo-dentinskoga kompleksa, uključujući funkcionalno integrirane odontoblaste, uspostavu vaskularne mreže i razvoj živčanih vlakana
- poticanje nastavka rasta korijena u nezrelim trajnim zubima, što uključuje produljenje korijena, zadebljanje dentinskih stijenki i zatvaranje apikalnog otvora, čime se povećava mehanička otpornost zuba i smanjuje rizik od fraktura
- očuvanje ili povratak osjetne funkcije zuba, uključujući osjet na toplinu, hladnoću, bol i pritisak
- očuvanje zuba u funkciji primjenom biološki usmjerenih i minimalno invazivnih terapijskih postupaka
- unaprjeđenje kvalitete života pacijenata očuvanjem dentalne estetike, funkcionalnosti i psihološke dobrobiti (1,27).

1.8.2. Indikacije i kontraindikacije za regenerativnu endodontsku terapiju

Primjena regenerativne endodontske terapije zahtijeva pažljivu procjenu kliničkih i bioloških okolnosti koje omogućuju stvaranje pogodnog mikrokoliša za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa. Najpovoljnijim kandidatima smatraju se pacijenti mlađe životne dobi, osobito između 9. i 18. godine, kod kojih su izraženije proliferacijske i diferencijacijske sposobnosti matičnih stanica, bolja prokrvljenost periapikalnog područja te veći potencijal za nastavak razvoja korijenskih struktura (4,48,54).

Jedan od ključnih čimbenika uspješnosti RET-a jest promjer apikalnog otvora. Širok apikalni otvor omogućuje nesmetanu migraciju mezenhimskih matičnih stanica iz periapikalnog tkiva te ulazak krvi bogate čimbenicima rasta, čime se formira prirodni trodimenzionalni nosač koji podupire regeneraciju. Najviša stopa uspješnosti zabilježena je kod zuba s apikalnim otvorom promjera između 0,5 i 1,0 mm (4,54).

Iako su ranija istraživanja sugerirala potrebu za mehaničkim proširenjem apeksa radi postizanja minimalne širine od 1 mm (46), noviji dokazi upućuju na to da je regeneracija moguća i kod znatno manjih otvora. Uspješna revaskularizacija opisana je pri promjerima od svega 0,32 mm, dok su pozitivni klinički ishodi potvrđeni i kod otvora širine između 0,4 i 0,6 mm. Stoga se u novijoj praksi sve više naglašava važnost očuvanja prirodne anatomije apeksa, dok se mehanička manipulacija tim područjem sve češće izbjegava kako bi se smanjio rizik od jatrogenih oštećenja, osobito frakture korijena (55).

Prema dostupnoj literaturi, najčešće indikacije za primjenu RET-a uključuju:

- nezrele trajne zube s nekrozom pulpe
- apikalni otvor širine $\geq 0,5$ mm
- prisutnost apikalnog parodontitisa bez značajne destrukcije periapikalnih tkiva
- dob pacijenta između 9. i 18. godine.

S druge strane, RET je kontraindiciran u prisutnosti čimbenika koji znatno narušavaju njegovu predvidljivost i sigurnost. Među glavnim kontraindikacijama ističu se:

- opsežna resorpcija korijena, koja znatno smanjuje mehaničku stabilnost zuba
- nemogućnost postizanja učinkovite dezinfekcije kanala, čime se onemogućuje stvaranje sterilnog mikrokoliša
- neadekvatni uvjeti za trajno i hermetičko koronarno brtvljenje, što povećava rizik od reinfekcije i terapijskog neuspjeha.

U takvim slučajevima alternativni terapijski pristupi – poput apeksifikacije ili konvencionalne endodontske terapije – mogu predstavljati sigurniju kliničku opciju (4,46,48,61).

1.8.3. Uvjeti za uspješnost regenerativne endodontske terapije

Uspješnost regenerativne endodontske terapije uvelike ovisi o ispunjenju niza međusobno povezanih bioloških i kliničkih preduvjeta koji omogućuju stvaranje stabilnog i pogodnog mikrokoliša za obnovu pulpo-dentinskoga kompleksa. Prema suvremenim preglednim radovima, uspješan ishod regenerativnih postupaka ne ovisi o jednom izoliranom čimbeniku, već o sinergijskom djelovanju učinkovite kontrole infekcije, bioloških elemenata tkivnog inženjerstva i kvalitetnog koronarnog brtvljenja (58,62).

Klinički gledano, ključni uvjeti uspješnosti RET-a uključuju:

- učinkovitu kontrolu infekcije u korijenskom kanalu
- prisutnost i aktivaciju trijade tkivnog inženjerstva – matičnih stanica, trodimenzionalnog nosača i signalnih molekula
- hermetičko i dugoročno stabilno koronarno brtvljenje (4,57,62).

Kontrola infekcije predstavlja primarni korak u pripremi korijenskog kanala. Njome se uklanja infektivni sadržaj i čuvaju vitalne stanice koje mogu doprinijeti regeneraciji. Pravilno provedena kemijska irigacija i selektivna mehanička instrumentacija sprječavaju dodatnu traumu tkiva te čuvaju njegov regenerativni potencijal (58).

Biološku osnovu RET-a čini interakcija triju osnovnih elemenata tkivnog inženjerstva – matičnih stanica, signalnih molekula i trodimenzionalnog nosača. Njihova sinergija omogućuje proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica unutar korijenskog kanala (58).

Aдекватно koronarno brtvljenje presudno je za dugoročni ishod terapije jer sprječava prodiranje mikroorganizama u kanalni sustav i osigurava stabilan mikrookoliš za regeneraciju. Materijal za brtvljenje trebao bi imati antibakterijska i bioaktivna svojstva, uz minimalan rizik od diskoloracije (49,62,63).

1.8.4. Kontrola infekcije

Uspješnost regenerativne endodontske terapije uvelike ovisi o učinkovitoj kontroli infekcije unutar korijenskog kanala. Primarni cilj ovog terapijskog koraka jest smanjenje mikrobnog opterećenja, uklanjanje upalnih produkata te stvaranje stabilnog mikrookoliša pogodnog za preživljavanje, migraciju i diferencijaciju matičnih stanica, što se smatra ključnim preduvjetom uspješne regeneracije pulpo-dentinskoga kompleksa (4,64).

Za razliku od konvencionalne endodontske terapije, kontrola infekcije u regenerativnim postupcima provodi se uz poseban naglasak na očuvanje biološkog potencijala zuba, osobito kod nezrelih trajnih zuba. Takav pristup podrazumijeva minimalnu, odnosno potpuno izostavljenu mehaničku instrumentaciju, primjenu kemijskih iriganasa niske citotoksičnosti te uporabu intrakanalnih medikamenata koji ne ugrožavaju vitalnost matičnih stanica apikalne papile (54,58).

1.8.4.1. Mehanička obrada korijenskog kanala

U regenerativnoj endodontskoj terapiji mehanička obrada korijenskog kanala provodi se minimalno ili se u potpunosti izostavlja, osobito kod nezrelih trajnih zuba. Cilj takva pristupa jest očuvanje osjetljivih dentinskih struktura, širokog apikalnog otvora i vitalnih stanica apikalne papile, koje su ključne za regenerativni potencijal zuba (54).

Za razliku od konvencionalne endodontske terapije, u kojoj je oblikovanje kanala temeljni terapijski postupak, u RET-u se ograničena mehanička instrumentacija upotrebljava isključivo radi poboljšanja protoka iriganasa i učinkovitosti kemijskih dezinfekcijskih sredstava, uz istodobno očuvanje bioloških uvjeta nužnih za regeneraciju (4,49). Takav pristup smanjuje rizik od jatrogene frakture korijena i sprječava nepotreban gubitak preostalog vitalnog tkiva (58).

Histološke i mikrobiološke analize upućuju na važnost barem minimalne instrumentacije u cilju disrupcije biofilma, čime se poboljšava učinkovitost dezinfekcije te olakšava otpuštanje čimbenika rasta iz dentinske matrice, koji imaju ključnu ulogu u migraciji i diferencijaciji matičnih stanica tijekom regeneracije pulpo-dentinskoga kompleksa (54,65).

Stoga se mehanička obrada u kontekstu RET-a ne provodi radi oblikovanja korijenskog kanala, već kao pažljivo kontrolirana intervencija usmjerena na potporu biološkim procesima regeneracije.

1.8.4.2. Kemijska dezinfekcija korijenskog kanala

Kemijska dezinfekcija predstavlja ključni korak u protokolu regenerativne endodontske terapije, radi eliminacije mikroorganizama iz korijenskog kanala, očuvanja vitalnosti matičnih stanica apikalne papile (SCAP; engl. *stem cells from the apical papilla*) te poticanja otpuštanja endogenih čimbenika rasta iz dentinskih stijenki. Zbog minimalne ili potpuno izostavljene mehaničke instrumentacije u nezrelim trajnim zubima, primjena kemijskih iriganasa ima presudnu ulogu u stvaranju povoljnog mikrookoliša za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa (4,54).

Biokompatibilnost iriganasa ovisi o njihovoj koncentraciji, trajanju izlaganja, pH-vrijednosti te potencijalnoj citotoksičnosti prema SCAP-u (66). Najčešće korišteni suvremeni protokoli temelje se na kombinaciji 1,5 % natrijeva hipoklorita (NaOCl) za početnu dezinfekciju i 17 % etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) za završno ispiranje (4). Ovakav pristup omogućuje učinkovitu antimikrobnu aktivnost uz istodobno poticanje otpuštanja čimbenika rasta iz dentinske

matrice, uključujući transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- β), koštane morfogenetske proteine BMP-2 i BMP-7 te druge signalne molekule ključne za diferencijaciju i regenerativni potencijal SCAP-a (65).

Istraživanja su pokazala da povišene koncentracije NaOCl ($> 1,5 \%$, osobito $\geq 3 \%$) i klorheksidina (CHX $\geq 2 \%$) imaju izražen citotoksični učinak te negativno utječu na vitalnost SCAP-a. Nasuprot tomu, EDTA, osobito kada se primjenjuje kao završno ispiranje u trajanju od približno pet minuta, smatra se biokompatibilnom opcijom za završnu irigaciju u okviru RET protokola, uz ograničenja na temelju *in vitro* dokaza (4,66). Kombinacija NaOCl i EDTA dodatno pojačava otpuštanje čimbenika rasta, pri čemu se preporučuje završno ispiranje fiziološkom otopinom radi uklanjanja ostataka iriganasa i smanjenja rezidualnog djelovanja, osobito između primjene pojedinih otopina (4).

Tehnički aspekti irigacije ključni su za sigurnost i učinkovitost terapije. Preporučuje se uporaba igala zatvorenog vrha s postraničnim otvorima, postavljenih 1 – 2 mm koronarno od apikalnog foramena, čime se znatno smanjuje rizik od ekstruzije iriganasa u periapikalno područje. Aktivacija iriganasa pasivnom ultrazvučnom irigacijom (PUI; engl. *passive ultrasonic irrigation*) poboljšava njihovu penetraciju i dezinfekcijski učinak. Učinkovitost kemijske dezinfekcije može se dodatno povećati primjenom negativnog tlaka, laserske aktivacije ili fotonima induciranog fotoakustičnog strujanja (PIPS; engl. *photon-induced photoacoustic streaming*), čime se postiže bolja distribucija iriganasa unutar kanalnog sustava uz smanjenje rizika od ekstruzije (4).

Učinci pojedinih iriganasa na otpuštanje čimbenika rasta opisani su u brojnim *in vitro* istraživanjima. EDTA pokazuje izražen učinak na otpuštanje transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β 1), dok kombinacija natrijeva hipoklorita i EDTA dodatno pojačava taj učinak. Limunska kiselina pokazuje sličan potencijal, ali uz povećani rizik od prekomjerne demineralizacije dentina (65). Suprotno tomu, MTAD i QMix u dostupnim istraživanjima pokazuju proturječne učinke na održivost i interakciju matičnih stanica apikalne papile s dentinskom površinom. Za MTAD je opisan nepovoljan učinak na adheziju SCAP-a, dok su rezultati za QMix heterogeni (66–68). Zbog izražene citotoksičnosti primjena klorheksidina nije preporučljiva u protokolima RET-a (4,66).

AAE smjernice preporučuju uporabu 1,5 % NaOCl za početnu irigaciju, zatim 17 % EDTA tijekom pet minuta, uz završno ispiranje fiziološkom otopinom. ESE dopušta primjenu NaOCl u rasponu koncentracija od 1,5 do 3 %, uz istovjetan protokol završne irigacije EDTA-om (4).

Unatoč postojećim preporukama, konsenzus o optimalnom protokolu kemijske dezinfekcije u RET-u još uvijek nije u potpunosti postignut. Razlike u korištenim metodologijama, koncentracijama iriganasa, trajanju izlaganja i eksperimentalnim modelima dodatno naglašavaju potrebu za daljnjim standardiziranim istraživanjima te otvaraju prostor za razmatranje modificiranih pristupa u okviru kemijske dezinfekcije u sklopu RET-a (4,66).

1.8.4.3. Upotreba intrakanalnih medikamenata

Upotreba intrakanalnih medikamenata u okviru regenerativne endodontske terapije ima ključnu ulogu u dodatnoj kemijskoj dezinfekciji, uz očuvanje bioloških čimbenika potrebnih za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa. Medikamenti koji se upotrebljavaju u okviru RET-a moraju eliminirati preostale mikroorganizme, pritom očuvati vitalnost matičnih stanica apikalne papile te mogu potaknuti otpuštanje čimbenika rasta iz dentina, ključnih za diferencijaciju, migraciju i proliferaciju stanica (54).

Triantibiotska pasta jedan je od najčešće korištenih intrakanalnih medikamenata. Sastoji se od metronidazola, ciprofloksacina i minociklina u omjeru 1 : 1 : 1. Ova kombinacija djeluje protiv anaerobnih i aerobnih bakterija – metronidazol i ciprofloksacin učinkoviti su protiv anaeroba, dok minociklin djeluje kao bakteriostatik, osobito protiv gram-pozitivnih bakterija (54,69).

TAP dodatno pokazuje biološku aktivnost; njezin kiseli pH može potaknuti demineralizaciju dentina i oslobađanje čimbenika rasta, poput TGF- β i BMP-ova, što može doprinijeti diferencijaciji SCAP-a (54,68).

Međutim, primjena TAP-a povezana je i s nizom ograničenja. Minociklin prisutan u sastavu TAP-a često se povezuje s diskoloracijom zuba, što može predstavljati velik estetski problem, osobito u prednjem segmentu denticije (69). Nadalje, primjena TAP-a u višim koncentracijama može imati citotoksične učinke na SCAP, smanjiti njihovu sposobnost diferencijacije, inhibirati vaskularizaciju te ograničiti otpuštanje čimbenika rasta iz dentinskih stijenki (66,68). AAE preporuke stoga sugeriraju uporabu TAP-a u koncentracijama manjim od 1 mg/mL, kako bi se

smanjili neželjeni učinci, a zadržala antimikrobna učinkovitost (4,54). Također se preporučuje aplikacija TAP-a isključivo unutar korijenskog kanala, ispod razine cementno-caklinskog spoja, uz prethodno premazivanje dentina adhezivnim sredstvom, radi smanjenja rizika od diskoloracije (4,69). Kako bi se izbjegla primjena minociklina, TAP se sve češće modificira zamjenom minociklina klindamicinom ili cefaklorom, čime se nastoji zadržati antimikrobna učinkovitost uz istodobno smanjenje estetskih komplikacija (4).

U novije se vrijeme sve više pažnje posvećuje dvoantibiotskoj pasti (DAP; engl. *double antibiotic paste*), koja se sastoji isključivo od metronidazola i ciprofloksacina. Ova kombinacija zadržava visoku antimikrobnu učinkovitost – metronidazol djeluje protiv striktno anaerobnih mikroorganizama, dok ciprofloksacin pokazuje snažnu aktivnost prema fakultativno anaerobnim i aerobnim uzročnicima. Uklanjanjem minociklina iz sastava smanjuje se rizik od diskoloracije zuba, što čini DAP prikladnijim izborom za primjenu u estetski osjetljivim regijama (4,70).

Zbog navedenih ograničenja antibiotskih formulacija, u literaturi je opisana i primjena paste kalcijeva hidroksida kao moguće alternative za intrakanalnu dezinfekciju u RET-u. Iako njegova antimikrobna učinkovitost nije jednaka onoj TAP-a, kalcijev hidroksid pokazuje manju citotoksičnost prema SCAP-u, potiče njihovu adheziju na dentinsku površinu te omogućuje povoljne uvjete za regeneraciju (54,71,72). Kombinacija s klorheksidinom može pojačati antimikrobni učinak, no zbog poznatih citotoksičnih svojstava klorheksidina taj se pristup ne preporučuje za rutinsku primjenu u RET-u (4,66). Ostala ograničenja kalcijeva hidroksida uključuju njegovu visoku pH-vrijednost, potencijal za induciranje resorpcije dentina te otežano potpuno uklanjanje iz korijenskog kanala (72).

Unatoč brojnim istraživanjima i postojećim smjernicama, još uvijek nije uspostavljen jedinstveni protokol za optimalni intrakanalni medikament u RET-u. Odabir sredstva treba individualno temeljiti na kliničkoj indikaciji, dobi pacijenta, položaju zuba, procjeni rizika od diskoloracije te biološkoj kompatibilnosti sa SCAP-om. Takva heterogenost dodatno naglašava potrebu za daljnjim standardiziranim *in vitro* i kliničkim istraživanjima, kako bi se definirale dugoročno najučinkovitije i najsigurnije terapijske opcije u okviru RET-a (4,73).

1.8.5. Biološki koncept regenerativne endodontske terapije

Regenerativna endodontska terapija temelji se na načelima tkivnog inženjerstva – interdisciplinarnog područja koje objedinjuje znanja iz biologije, medicine i inženjerstva radi obnove oštećenih tkiva i ponovne uspostave njihove funkcije. U endodontskom kontekstu cilj tog pristupa jest poticanje biološke obnove strukture i funkcije zubne pulpe primjenom strategija koje uključuju stanice s regenerativnim potencijalom, trodimenzionalne nosače i signalne molekule.

Središnji koncept regenerativnog pristupa je stvaranje kontroliranog i biološki povoljnog mikrookoliša unutar dezinficiranog korijenskog kanala, koji omogućuje regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa. Takav mikrookoliš mora omogućiti staničnu adheziju, proliferaciju i diferencijaciju, osigurati opskrbu kisikom i nutrijentima, uklanjanje metaboličkih produkata te regulaciju lokalnog upalnog odgovora, uz poticanje angiogeneze i neurogeneze (59,61).

Tri su osnovna elementa tkivnog inženjerstva u regeneraciji pulpe:

1. matične stanice s regenerativnim potencijalom
2. trodimenzionalni nosači
3. signalne molekule i čimbenici rasta.

Sinergijsko djelovanje ovih komponenti omogućuje regeneraciju funkcionalnog pulpnog tkiva, pri čemu cilj nije samo reparacija, već funkcionalna i strukturna biološka obnova pulpo-dentinskoga kompleksa. Time se RET afirmira kao suvremeni biološki terapijski pristup, osobito u liječenju nezrelih trajnih zuba (57,74).

1.8.5.1. Matične stanice

Matične stanice (SC; engl. *stem cells*) definiraju se kao nediferencirane, multipotentne ili pluripotentne stanice sposobne za samoobnavljanje i diferencijaciju u različite stanične linije.

Prema podrijetlu razlikuju se tri osnovne skupine matičnih stanica:

- embrionalne matične stanice (ESC; engl. *embryonic stem cells*), prisutne u blastocisti i sposobne za diferencijaciju u sve tipove stanica
- adultne (somatske) matične stanice (ASC; engl. *adult stem cells*), prisutne u postnatalnim tkivima i odgovorne za održavanje homeostaze i regeneraciju

- inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC; engl. *induced pluripotent stem cells*), dobivene reprogramiranjem somatskih stanica (75).

U području dentalne i maksilofacijalne medicine osobitu važnost imaju mezenhimske matične stanice (MSC; engl. *mesenchymal stem cells*), koje se, zahvaljujući multipotenciji, mogu diferencirati u osteoblaste, hondroците, adipocyte i odontoblaste. Odlikuju se i izraženom imunomodulatornom aktivnošću, što ih čini posebno pogodnima za primjenu u RET-u (58,76).

Orofacijalna i dentalna tkiva predstavljaju bogat izvor MSC stanica. Identificirane su brojne populacije dentalnih matičnih stanica (DSC; engl. *dental stem cells*):

- matične stanice zubne pulpe (DPSC; engl. *dental pulp stem cells*)
- matične stanice ispalih mliječnih zuba (SHED; engl. *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)
- matične stanice parodontnog ligamenta (PDLSC; engl. *periodontal ligament stem cells*)
- matične stanice apikalne papile (SCAP; engl. *stem cells from the apical papilla*)
- matične stanice folikula zuba u razvoju (DFPC; engl. *dental follicle precursor cells*)
- stanice zametka zuba (TGPC; engl. *tooth germ progenitor cells*) (76–78).

Također se istražuju i stanice iz drugih oralnih izvora:

- stanice iz alveolarne kosti (ABMSC; engl. *alveolar bone-derived mesenchymal stem cells*)
- stanice iz žlijezda slinovnica (SGDSC; engl. *salivary gland-derived stem cells*)
- stanice oralne sluznice (OMSC; engl. *oral mucosa-derived stem cells*) (78,79).

U kontekstu RET-a matične stanice osiguravaju stanične izvore za diferencijaciju u odontoblaste, cementoblaste, osteoblaste i neurone. Uz to, posjeduju sposobnost migracije, proliferacije te regulacije imunološkog odgovora (58,61).

Tri su populacije osobito važne za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa:

- SCAP stanice nalaze se u apikalnom području zuba u razvoju te pokazuju visok proliferacijski kapacitet, otpornost na upalu i sposobnost diferencijacije u odontoblaste, osteoblaste, adipocyte i neurone. Zahvaljujući izraženoj kolateralnoj vaskularizaciji, mogu preživjeti i u uvjetima pulpne nekroze ili periapikalne infekcije. Istraživanja su potvrdila njihovu sposobnost stvaranja tkiva sličnog dentinu, potaknutu čimbenicima rasta poput

TGF- β 1, BMP-2, VEGF i PDGF. Također, izlučuju neurotrofične čimbenike poput BDNF-a, što upućuje na njihov potencijal i u neuralnoj regeneraciji (49,63,80,81).

- DPSC stanice (matične stanice zubne pulpe), koje su prvi put izolirane 2000. godine, pokazuju visok odontogeni potencijal i sposobnost diferencijacije u odontoblaste. Aktivno luče angiogene i signalne molekule, poput VEGF-a i TGF- β 1, koje su ključne za vaskularizaciju i regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa. U usporedbi sa SCAP-om, DPSC imaju višu ekspresiju odontogenih markera, ali relativno niži proliferacijski potencijal (49,80).
- SHED stanice (matične stanice iz ispalih mliječnih zuba) predstavljaju lako dostupan i neinvazivan izvor matičnih stanica, a karakterizira ih visoka stopa proliferacije i multipotentnost. Uspješno diferenciraju u adipogene, odontoblastične i neurogene stanice, a mogu poslužiti kao alogeni izvor stanica, ali i za autolognu primjenu kod djece s nekrozom pulpe. Iako se u početku smatralo da ne mogu sudjelovati u regeneraciji pulpo-dentinskoga kompleksa, novija istraživanja – u kombinaciji s čimbenicima rasta i odgovarajućim nosačima – pokazuju njihov regenerativni potencijal u tom kontekstu (63).

Matične stanice mogu se tijekom terapije uvesti u korijenski kanal poticanjem krvarenja iz periapikalnog područja, čime se u mikrookoliš unose endogene stanice i signalne molekule. Alternativno, mogu se primijeniti egzogene stanice (DPSC, SHED, SCAP), prethodno izolirane i umnožene *in vitro*, koje se zatim transplantiraju u kanal (61).

Sve populacije DSC stanica dijele fenotipske značajke MSC-a te posjeduju multipotentni diferencijacijski potencijal – osteogeni, dentinogeni, cementogeni, adipogeni, neurogeni i dr. (76,82). Osim diferencijacije, DSC stanice luče angiogene i neurotrofične čimbenike – VEGF, BDNF, GDNF, CNTF i β -NGF – koji potiču vaskularizaciju, neurogenezu i regeneraciju tkiva. Njihova funkcionalnost snažno ovisi o mikrookolišu, osobito u prisutnosti upale, koja može modulirati migraciju, proliferaciju i imunološki odgovor. Zbog svih navedenih svojstava, dentalne matične stanice smatraju se jednim od najperspektivnijih staničnih izvora za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa, no predstavljaju i potencijalni terapijski alat u liječenju neuroloških, kardiovaskularnih, metaboličkih i autoimunih bolesti, iako je njihova klinička primjena i dalje ograničena regulatornim i tehničkim izazovima (76).

1.8.5.2. Signalne molekule

Signalne molekule, osobito čimbenici rasta, imaju ključnu ulogu u regenerativnoj endodontskoj terapiji jer reguliraju različite stanične procese, uključujući kemotaksiju, proliferaciju, diferencijaciju, preživljenje i međustaničnu komunikaciju. U kombinaciji s matičnim stanicama i trodimenzionalnim nosačima omogućuju stvaranje funkcionalno i biološki aktivnog mikrokoliša pogodnog za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa (4,29).

Signalne molekule mogu biti:

- endogenog podrijetla – oslobađaju se iz dentinskog matriksa tijekom irigacije natrijevim hipokloritom i EDTA-om, djelovanjem kalcijeva hidroksida te primjenom bioaktivnih materijala poput MTA-a i Biodentina. Dodatno, krvni ugrušak nastao poticanjem krvarenja iz periapikalnog područja sadržava endogene čimbenike rasta i citokine koji doprinose regenerativnim procesima.
- egzogenog podrijetla – signalne molekule mogu se terapijski primijeniti u obliku rekombinantnih ljudskih proteina, poput rekombinantnog ljudskog čimbenika rasta podrijetlom iz trombocita (rhPDGF; engl. *recombinant human platelet-derived growth factor*) ili rekombinantnog ljudskog koštanog morfogogenetskog proteina 2 (rhBMP-2; engl. *recombinant human bone morphogenetic protein 2*); zatim primjenom autolognih krvnih pripravaka bogatih trombocitima, kao što su PRP i PRF, ili s pomoću bioaktivnih nosača impregniranih čimbenicima rasta, poput FGF2 i VEGF, čime se omogućuje njihovo ciljano i kontrolirano otpuštanje (4,29,61).

Relevantni čimbenici rasta u RET-u razvrstavaju se prema biološkim funkcijama (4,29,81):

1. Migracija stanica:

- transformirajući čimbenik rasta beta 1 (TGF- β 1; engl. *transforming growth factor beta 1*)
- fibroblastni čimbenik rasta 2 (FGF2; engl. *fibroblast growth factor 2*)
- čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF; engl. *platelet-derived growth factor*)

2. Proliferacija stanica:

- TGF- β 1
- FGF2
- vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF; engl. *vascular endothelial growth factor*)
- inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF; engl. *insulin-like growth factor*)

3. Angiogeneza:

- VEGF
- PDGF
- FGF2
- stromalni čimbenik 1 alfa (SDF-1 α ; engl. *stromal cell-derived factor 1 alpha*)

4. Dentinogeneza i odontogena diferencijacija:

- koštani morfogenetski protein 2 (BMP-2; engl. *bone morphogenetic protein 2*)
- koštani morfogenetski protein 7 (BMP-7; engl. *bone morphogenetic protein 7*)
- FGF2
- proteini dentinskog matriksa (DMP; engl. *dentin matrix protein*)
- dentinski fosfoprotein (DPP; engl. *dentin phosphoprotein*)
- glikozaminoglikani (npr. hondroitin sulfat i dermatan sulfat)

5. Neurogeneza i reinervacija:

- čimbenik rasta živčanih stanica (NGF; engl. *nerve growth factor*)
- moždani neurotrofni čimbenik (BDNF; engl. *brain-derived neurotrophic factor*)
- cilijarni neurotrofni čimbenik (CNTF; engl. *ciliary neurotrophic factor*).

1.8.5.3. Trodimenzionalni nosač

Nosač ili matrica igra ključnu ulogu u uspostavljanju mikrookoliša pogodnog za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa. Djeluje kao privremena strukturna potpora unutar korijenskog kanala, omogućujući organizaciju stanica, difuziju nutrijenata i plinova te kontrolirano otpuštanje čimbenika rasta potrebnih za proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica (83). Osim mehaničke potpore, nosač ima i biološku funkciju – sudjeluje u regulaciji staničnog ponašanja, usmjerava tkivnu obnovu i postupno se razgrađuje kako novoformirano tkivo preuzima svoju funkciju (84,85).

1.8.5.3.1. Ključna svojstva idealnog nosača

Idealni bi nosač trebao zadovoljiti niz kriterija koji osiguravaju uspješnu regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa (59,61,82):

- biokompatibilnost

Nosač mora biti netoksičan i ne smije izazivati upalne reakcije. Također, mora biti siguran za kontakt sa stanicama te ne smije negativno utjecati na njihovu vitalnost i diferencijacijski potencijal, uz prikladnost za primjenu u oralnom okolišu.

- poroznost i međusobnu povezanost pora

Struktura nosača mora omogućiti učinkovitu difuziju kisika, hranjivih tvari i metabolita, kao i migraciju stanica te urastanje krvnih žila, što je ključno za vaskularizaciju regeneriranoga tkiva.

- stimulaciju staničnih procesa

Nosač treba poticati adheziju, proliferaciju, migraciju i diferencijaciju matičnih stanica, osobito onih relevantnih za regeneraciju pulpe zuba, poput matičnih stanica zubne pulpe (DPSC) i matičnih stanica apikalne papile (SCAP).

- mehaničku stabilnost

Mora posjedovati odgovarajuću čvrstoću i elastičnost kako bi održao strukturni integritet tijekom procesa regeneracije te bio otporan na vlažno i kemijski nestabilno okruženje.

- kontroliranu biorazgradnju

Nosač se treba razgrađivati postupno, a brzina njegove razgradnje mora biti usklađena s brzinom stvaranja novog tkiva, čime se osigurava stabilan prijelaz prema funkcionalnoj obnovi.

- bioaktivnu površinu

Površina nosača mora omogućavati vezanje bioaktivnih molekula, kao što su čimbenici rasta i signalni peptidi, te njihovo kontrolirano otpuštanje, čime se dodatno potiču procesi regeneracije.

- sterilizaciju i sigurnost

Nosač mora zadržati svoja fizikalna i biološka svojstva nakon sterilizacije te ne smije predstavljati rizik od prijenosa patogena, osobito ako je biološkoga podrijetla.

- kliničku praktičnost i prilagodljivost

Nosač mora biti jednostavan za rukovanje i aplikaciju unutar korijenskog kanala, a njegova se struktura mora moći prilagoditi obliku i veličini pulpnog prostora, primjerice primjenom injektabilnih oblika, hidrogelova ili tehnologije 3D ispisa, čime se olakšava klinička primjena i povećava reproducibilnost postupka.

1.8.5.3.2. Klasifikacija nosača

Nosači se mogu klasificirati prema različitim kriterijima (59,83,84):

1. Prema podrijetlu:
 - prirodni nosači
 - sintetski nosači
2. Prema razgradivosti:
 - biorazgradivi nosači
 - biostabilni nosači
3. Prema obliku i strukturi:
 - hidrogelovi
 - spužvasti nosači
 - vlaknasti odnosno mrežasti nosači
 - injektabilni sustavi
4. Prema prisutnosti stanica:
 - acelularni nosači
 - celularni nosači.

Tablica 1 prikazuje sažet usporedni prikaz klasifikacije nosača prema Sequeiri i suradnicima (59).

Tablica 1. Klasifikacija nosača u regenerativnoj endodonciji prema podrijetlu, razgradivosti, morfološkoj strukturi i prisutnosti stanica; prema Sequeiri i sur. (59)

Kriterij	Vrsta nosača	Primjeri	Osnovne značajke
podrijetlo	prirodni	kolagen, fibrin, hijaluronska kiselina, decelularizirana ECM, PRF, PRP, CGF	visoka biokompatibilnost, sadržaj prirodnih čimbenika rasta, bioaktivnost, niža mehanička otpornost
	sintetski	PLA, PGA, PLGA, PCL, HA, β -TCP, bioaktivno staklo	veća kontrola nad fizikalno-kemijskim svojstvima, reproducibilnost, ograničena bioaktivnost
	kompozitni / hibridni	kolagen + HA, PLGA + bioaktivno staklo	kombinacija mehaničke čvrstoće i biološke aktivnosti, uz mogućnost bioaktivne površinske prilagodbe
razgradivost	biorazgradivi	PRF, PLGA, PCL, prirodni nosači	postupna razgradnja, prilagođena dinamičkim regeneraciji, bez potrebe za kirurškim uklanjanjem
	biostabilni	titan, trajni sintetski polimeri (eksperimentalno)	ne razgrađuju se, dugotrajna mehanička stabilnost, ograničena primjena u REP
struktura i oblik	hidrogelovi	alginat, GelMA, PRF u gelu	visoka hidratacija, difuzija, lako injiciranje, mogućnost isporuke bioaktivnih tvari
	spužvasti nosači	kolagenske spužve, PRF membrana	visoka poroznost, potiču urastanje krvnih žila i migraciju stanica
	vlaknasti / mrežasti nosači	nanovlakna dobivena elektroispredanjem	imitiraju arhitekturu ECM-a, prikladna za usmjeravanje stanične migracije
	injektibilni sustavi	PRP, različiti hidrogelovi	prilagodljivi obliku i veličini defekta, minimalno invazivna aplikacija
prisutnost stanica	acelularni nosači	PRF, PRP, sintetski nosači bez stanica	ne sadržavaju stanice, oslanjaju se na privlačenje i migraciju endogenih stanica
	celularni nosači	ECM s ugrađenim matičnim stanicama (eksperimentalno)	sadržavaju matične stanice, aktivno sudjeluju u regeneraciji, primjena ograničena na istraživačke modele

ECM – ekstracelularna matrica; PRP – plazma bogata trombocitima; PRF – trombocitima obogaćeni fibrin; CGF – koncentrirani čimbenici rasta; PLA – polilaktična kiselina; PGA – poliglikolična kiselina; PLGA – kopolimer PLA i PGA; PCL – poli(kaprolakton); HA – hidroksiapatit; β -TCP – beta-trikalcijev fosfat; GelMA – gelatin metakrilat.

Unutar navedene klasifikacije najvažnija se podjela temelji na podrijetlu materijala, odnosno na prirodnim i sintetskim nosačima. Ova dihotomna podjela predstavlja osnovu za razumijevanje razlika u biološkom potencijalu, mehaničkim svojstvima i kliničkoj primjeni različitih materijala (59).

Prirodni nosači obuhvaćaju materijale biološkog podrijetla, poput kolagena, fibrina, hijaluronske kiseline i decelularizirane ekstracelularne matrice, kao i autologne krvne pripravke bogate trombocitima, poput PRP-a, PRF-a i CGF-a. Njihova je glavna prednost visoka biokompatibilnost i sposobnost prijenosa prirodnih čimbenika rasta, dok im često nedostaje odgovarajuća mehanička stabilnost (49,59,63,81).

Sintetski nosači, s druge strane, izrađeni su od laboratorijski proizvedenih polimera (npr. PLA – polilaktična kiselina, PCL – poli(kaprolakton), PLGA – kopolimer PLA i PGA) te keramičkih materijala, poput hidroksiapatita. Omogućuju veću kontrolu nad fizikalno-kemijskim svojstvima, veću reproducibilnost i višu mehaničku stabilnost, no često zahtijevaju dodatnu površinsku modifikaciju kako bi se postigla odgovarajuća bioaktivnost (49,59,63).

1.8.5.3.3. Nosači u regenerativnoj endodontskoj terapiji

U regenerativnoj endodontskoj terapiji najčešće se upotrebljavaju prirodni (biološki) nosači poput krvnog ugruška i autoloških trombocitnih koncentrata (86).

- *Krvni ugrušak*

Krvni ugrušak (BC; engl. *blood clot*) najstariji je i najčešće korišten prirodni trodimenzionalni nosač u postupku revaskularizacije, najranije opisanoj terapijskoj strategiji unutar okvira RET-a. Nastaje poticanjem krvarenja iz periapikalnog područja, čime se spontano formira autologna fibrinska mreža bogata trombocitima, mezenhimnim matičnim stanicama (MSC), čimbenicima rasta i bioaktivnim molekulama. Ova mreža omogućuje zadržavanje i migraciju SCAP stanica, koje, čak i u uvjetima pulpne nekroze, zadržavaju vitalnost i diferencijacijski potencijal prema odontoblastima sličnim stanicama, doprinoseći regeneraciji pulpo-dentinskoga kompleksa (81,86).

Histološki, ugrušak se postupno zamjenjuje granulacijskim, vezivnim, cementnim i koštanim tkivom, uz stvaranje novih krvnih žila. Kliničke studije bilježe visoku stopu uspješnosti (90 – 94 %), uključujući apikalno zatvaranje, produljenje korijena i zadebljanje dentinskih stijenki (81,87).

Zahvaljujući biokompatibilnosti, dostupnosti i jednostavnosti primjene, ovaj je postupak klinički prihvatljiv i ekonomski isplativ, osobito uz adekvatno koronarno brtvljenje (npr. MTA-om). Ipak, njegova je učinkovitost ograničena varijabilnošću potaknutog krvarenja i kvalitetom ugruška, nemogućnošću kontrole unosa matičnih stanica te čestim ishodima reparacije umjesto potpune regeneracije. Moguće su i neželjene posljedice, poput obliteracije kanala zbog neregulirane mineralizacije te postoperativne bolnosti izazvane iritacijom periapikalnih tkiva (81).

Ako se krvarenje ne može potaknuti, preporučuje se primjena 17 % EDTA-e ili aspiracija krvi iz susjednog kanala. U iznimnim slučajevima može se upotrebljavati i autologna venska krv pacijenta. U literaturi je također opisana uspješna primjena krvnog ugruška dobivenog aspiracijom krvi iz alveolarne kosti kao alternativnog biološkog nosača u RET-u, što predstavlja moguću strategiju u situacijama kada poticanje periapikalnog krvarenja nije učinkovito (4,88).

- *Trombocitni koncentрати*

Trombocitni koncentрати (PC; engl. *platelet concentrates*) predstavljaju autologne pripravke dobivene iz venske krvi pacijenta, koje karakterizira visoka koncentracija trombocita i čimbenika rasta uključenih u procese cijeljenja i regeneracije tkiva. Zahvaljujući svojim protuupalnim, angiogenim i reparativnim svojstvima, ovi pripravci potiču cijeljenje mekih i tvrdih tkiva te se primjenjuju u različitim područjima oralne i maksilofacijalne medicine, uključujući augmentaciju alveolarnog grebena, sinus lift, implantološke zahvate, liječenje osteonekroze čeljusti izazvane bisfosfonatima ili zračenjem, kao i terapiju oralnih ulceroznih promjena (89–92).

U RET-u trombocitni koncentрати služe kao biološki aktivni nosači koji osiguravaju trodimenzionalnu potporu i omogućuju postupno otpuštanje čimbenika rasta potrebnih za diferencijaciju matičnih stanica, angiogenezu i regeneraciju pulpnog tkiva (93–95). Njihova se primjena povezuje s poboljšanom vaskularizacijom, povoljnijim mikrookolišem za migraciju stanica i potencijalno boljim kliničkim ishodima u usporedbi s klasičnim krvnim ugruškom (94,95).

Najčešće korišteni pripravci u RET-u su PRP, PRF, uz dodatne varijante poput PRGF-a i CGF-a. Izbor pripravka ovisi o kliničkim ciljevima i željenoj kinetici oslobađanja čimbenika rasta, pri čemu PRF i CGF omogućuju produljeno, stabilnije otpuštanje bioaktivnih molekula u usporedbi s PRP-om (93–96).

○ *Trombocitima bogata plazma (PRP)*

Trombocitima bogata plazma predstavlja autologni trombocitni koncentrat prve generacije, dobiven centrifugiranjem venske krvi pacijenta radi koncentracije trombocita i čimbenika rasta. Aktivacijom trombocita dolazi do degranulacije α -granula i otpuštanja niza signalnih molekula, uključujući PDGF, TGF- β , VEGF, EGF i IGF, koje potiču angiogenezu, proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica, sintezu kolagena te pokazuju protuupalni učinak, dok se antibakterijsko djelovanje smatra ograničenim i neizravnim (94).

U kontekstu RET-a, PRP se promatra kao standardiziranija, biološki aktivnija alternativa krvnom ugrušku. Međutim, većina studija nije pokazala statistički značajnu kliničku prednost u smislu apikalnog zatvaranja, produljenja korijena ili zadebljanja dentinskih stijenki u usporedbi s krvnim ugruškom (87,95).

PRP se može podijeliti na čisti PRP (P-PRP; engl. *pure platelet-rich plasma*), koji sadržava visoku koncentraciju trombocita bez leukocita, te leukocitni PRP (L-PRP; engl. *leukocyte- and platelet-rich plasma*), obogaćen leukocitima, čija se biološka aktivnost povezuje s izraženijim protuupalnim i imunomodulatornim učinkom (97).

Ograničenja PRP-a uključuju složeniju pripremu, potrebu za specijaliziranom opremom i dodatnim aktivatorima polimerizacije (npr. goveđi trombin ili kalcijev klorid), što može povećati rizik od kontaminacije i neželjenih imunoloških reakcija. Nadalje, čimbenici rasta iz PRP-a oslobađaju se brzo i u relativno kratkom vremenskom razdoblju, bez prisutnosti stabilne fibrinske mreže koja bi omogućila njihovo postupno i produljeno otpuštanje, čime se može ograničiti dugoročna biološka učinkovitost ovog pristupa u RET-u (97,98).

○ *Plazma bogata čimbenicima rasta (PRGF)*

Plazma bogata čimbenicima rasta predstavlja autologni pripravak druge generacije, sličan PRP-u, ali bez prisutnosti leukocita i njihovih upalnih nusprodukata, čime se smanjuje potencijalni proinflamatorni učinak. PRGF se priprema iz manjeg volumena venske krvi te je tehnički jednostavniji za pripremu i primjenu, što ga čini pogodnim za kliničku upotrebu. Sadržava trombocite i plazmatske adhezijske proteine (fibronektin, fibrinogen i vitronektin), koji djeluju kao matrica za staničnu adheziju i proliferaciju (96).

Otpušta ključne čimbenike rasta poput PDGF-a, IGF-a, TGF- β i VEGF-a, potičući regeneraciju mekih i tvrdih tkiva. Kliničke studije potvrđuju njegovu učinkovitost u parodontologiji i oralnoj kirurgiji. Ipak, dokazi o primjeni PRGF-a u RET-u zasad su ograničeni, a njegova uloga u revitalizaciji pulpe i regeneraciji pulpo-dentinskoga kompleksa još uvijek nije dovoljno istražena (96,99).

○ *Trombocitima obogaćeni fibrin (PRF)*

Trombocitima obogaćeni fibrin predstavlja autologni trombocitni koncentrat druge generacije, koji je 2001. godine razvio Joseph Choukroun za potrebe oralne i maksilofacijalne kirurgije. Za razliku od PRP-a, PRF se priprema jednostavnije – centrifugiranjem venske krvi bez uporabe antikoagulanasa ili egzogenih aktivatora, čime se smanjuje rizik od imunoloških reakcija i kontaminacije (94).

Nakon centrifugiranja u epruveti se formiraju tri sloja (94,100):

- gornji sloj – acelularna, trombocitima siromašna plazma
- srednji sloj – PRF ugrušak, koji se upotrebljava kao terapijski biomaterijal
- donji sloj – crvena frakcija bogata eritrocitima.

Sastav PRF-a uključuje fibrinsku matricu u kojoj su zarobljeni trombociti, leukociti, progenitorske stanice i brojni čimbenici rasta. Alfa-granule trombocita unutar PRF ugruška otpuštaju niz signalnih molekula i čimbenika rasta koji imaju ključnu ulogu u procesima cijeljenja i regeneracije tkiva, među kojima su (100,101):

- transformirajući čimbenik rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) – sudjeluje u kontroli rasta stanica, proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi
- faktor rasta podrijetlom iz trombocita BB (PDGF-BB) – potiče stanični rast i proliferaciju
- vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) – potiče angiogenezu
- inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-1) – sudjeluje u rastu i diobi stanica, osobito koštanih, živčanih i mišićnih
- fibroblastni čimbenik rasta (FGF) – pospješuje angiogenezu i cijeljenje rana
- epidermalni čimbenik rasta (EGF)
- endotelni čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita (PDEGF; engl. *platelet-derived endothelial growth factor*).

Osim trombocita, leukociti prisutni u PRF-u doprinose imunomodulaciji i regulaciji upalnog odgovora putem otpuštanja različitih citokina i signalnih molekula, čime dodatno sudjeluju u stvaranju povoljnog mikrookoliša za regeneraciju i reparaciju tkiva (96,101).

Fibrinska mreža PRF-a omogućuje postupno i produljeno otpuštanje bioaktivnih molekula tijekom 7 do 14 dana, što potiče angiogenezu, migraciju fibroblasta, osteogenezu te diferencijaciju matičnih stanica u odontoblastima slične stanice (100,101). Leukociti unutar PRF-a pridonose imunomodulaciji i antimikrobnom učinku (96).

Histološki nalazi pokazuju da PRF omogućuje stvaranje stabilne mikrostrukture koja osigurava pogodno okruženje za urastanje krvnih žila i regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa (94). Prednost PRF-a leži u njegovoj dugotrajnijoj biološkoj aktivnosti i manjoj sklonosti obliteraciji kanala (87).

Prema sastavu i obliku, PRF se dijeli na (81,97):

- čisti PRF (P-PRF; engl. *pure platelet-rich fibrin*) – ne sadržava leukocyte
- leukocitni PRF (L-PRF; engl. *leukocyte- and platelet-rich fibrin*) – sadržava leukocyte
- injektibilni PRF (I-PRF; engl. *injectable platelet-rich fibrin*) – tekući oblik, prikladan za injekcijsku primjenu.

L-PRF, najčešće korišten oblik trombocitima obogaćenog fibrina u RET-u, dobiva se centrifugiranjem venske krvi pri 2700 okretaja u minuti (rpm) tijekom 12 minuta. Ovim postupkom

nastaje stabilna fibrinska matrica koja sadržava trombocite i leukocite te omogućuje postupno otpuštanje bioaktivnih molekula važnih za procese cijeljenja i regeneracije (97,100).

U cilju poboljšanja staničnog sastava i biološke aktivnosti PRF-a razvijen je tzv. LSCC koncept (engl. *Low Speed Centrifugation Concept*), koji se temelji na smanjenju brzine i/ili trajanja centrifugiranja. Ovakav pristup omogućuje zadržavanje većeg broja vitalnih stanica, osobito leukocita, te njihovu ravnomjerniju raspodjelu unutar fibrinske matrice (100,102):

- A-PRF (engl. *Advanced PRF*): 1500 rpm, 14 minuta – smanjena brzina centrifugiranja omogućuje veći broj živih stanica, osobito leukocita, te ravnomjerniju raspodjelu u cijeloj matrici.
- A-PRF+ (engl. *Advanced PRF + time*): 1300 rpm, 8 minuta – kombinacija niske brzine i skraćenog vremena dovodi do najintenzivnijeg i najdugotrajnijeg otpuštanja čimbenika rasta, osobito VEGF-a, TGF- β 1 i EGF-a, tijekom desetodnevnog razdoblja, uz optimalnu staničnu vitalnost i biološku aktivnost.

Horizontalno centrifugirani PRF (H-PRF; engl. *horizontally centrifuged platelet-rich fibrin*) predstavlja noviji oblik PRF-a koji se dobiva horizontalnim postavljanjem epruveta u rotor centrifuge. Ovakav način centrifugiranja omogućuje ravnomjerniju raspodjelu stanica unutar fibrinske matrice, veću koncentraciju trombocita i leukocita te povišene razine čimbenika rasta, uključujući PDGF, VEGF i FGF-2. Navedena svojstva povezuju se s poboljšanim biološkim učinkom, osobito u pogledu osteogenog potencijala i povoljnog utjecaja na mikrookoliš regenerativnih postupaka (103).

U novijim se istraživanjima sve više ispituju kombinacije PRF-a s hidrogelovima, pri čemu PRF osigurava postupno i produljeno otpuštanje čimbenika rasta, dok hidrogel djeluje kao trodimenzionalni nosač koji pruža mehaničku potporu te omogućuje staničnu proliferaciju, migraciju i kolonizaciju unutar regenerativnog mikrookoliša (58).

○ *Koncentrirani čimbenik rasta (CGF)*

Koncentrirani čimbenik rasta predstavlja napredni trombocitni pripravak razvijen iz PRF-a uporabom protokola centrifugiranja s promjenjivim brzinama i vremenskim intervalima. Takav način pripreme rezultira gustom i mehanički stabilnom fibrinskom matricom, bogatom trombocitima i leukocitima, koja omogućuje produljeno i postupno otpuštanje bioaktivnih

molekula uključenih u procese cijeljenja i regeneracije. Među najčešće opisane čimbenike rasta prisutne u CGF-u ubrajaju se TGF- β 1, PDGF-BB, VEGF i IGF-1, dok se prisutnost drugih molekula može razlikovati ovisno o protokolu pripreme (104–106).

Za razliku od PRP-a, CGF se priprema bez uporabe antikoagulanasa ili egzogenih aktivatora, čime se smanjuje rizik od imunoloških reakcija i kontaminacije. U usporedbi s klasičnim PRF-om, CGF pokazuje izraženiju fibrinsku strukturu i veću mehaničku stabilnost, što može pridonijeti duljem zadržavanju biomaterijala unutar korijenskog kanala i produljenom biološkom učinku (107).

In vitro istraživanja upućuju na to da CGF može potaknuti proliferaciju, migraciju i diferencijaciju matičnih stanica relevantnih za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa, kao i njihovo usmjeravanje prema mjestu ozljede. Opisano je i poticanje diferencijacije u odontoblastima slične stanice, kao i formiranje mineraliziranih struktura. U uvjetima upalnog mikrookoliša CGF može modulirati stanični odgovor smanjenjem ekspresije pojedinih proinflamatornih citokina, uz istodobno poticanje reparativnih i regenerativnih procesa (104).

Prvi klinički izvještaji o primjeni CGF-a u RET-u pokazuju potencijalno povoljne ishode, uključujući zadebljanje dentinskih stijenki i apikalno zatvaranje pri primjeni u postupcima revaskularizacije, kao i stvaranje reparativnog dentina u vitalnoj pulpotomiji. Međutim, dostupni klinički dokazi zasad su ograničeni brojem studija i heterogenošću protokola, zbog čega je potrebna opreznija interpretacija dostupnih rezultata (104).

U usporedbi s naprednim PRF pripravcima, poput A-PRF+, CGF se ponajprije ističe mehaničkom stabilnošću i gustom fibrinskom arhitekturom, dok se razlike u koncentraciji čimbenika rasta i staničnom sastavu razlikuju među studijama i ovise o načinu pripreme. A-PRF+ pritom pokazuje prednost u pogledu ravnomjernije raspodjele stanica i dugotrajnog, kontroliranog otpuštanja biomolekula, što ga čini pogodnijim izborom u suvremenim regenerativnim protokolima. Zbog još uvijek ograničene kliničke baze dokaza, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se jasnije definirala uloga CGF-a u RET-u (108,109).

1.8.6. Materijali za koronarno brtvljenje

Uspjeh regenerativnih endodontskih postupaka ne ovisi samo o učinkovitoj dezinfekciji korijenskog kanala i poticanju regeneracije pulpnog tkiva, već i o kvalitetnom koronarnom brtvljenju, koje predstavlja završnu, ali ključnu fazu terapije. Njegova je uloga spriječiti koronarnu mikropropusnost te posljedičnu reinfekciju korijenskog kanala mikroorganizmima iz usne šupljine, čime se štiti osjetljivi regenerativni mikrookoliš i povećava ukupna uspješnost liječenja (110,111).

Materijal za koronarno brtvljenje treba biti biokompatibilan i netoksičan jer je u neposrednom kontaktu s regenerativnim nosačem u kojem se odvija diferencijacija matičnih stanica. Osim toga, poželjno je da posjeduje antibakterijska i bioaktivna svojstva kako bi dodatno pridonio regeneraciji i smanjio rizik od mikrobne kontaminacije (111,112). Bioaktivnost se pritom odnosi na otpuštanje hidroksilnih (OH^-) i kalcijevih (Ca^{2+}) iona, koji interakcijom s dentinom omogućuju stvaranje mineralizirane veze između materijala i tvrdog zubnog tkiva (112,113).

Pri odabiru materijala za koronarno brtvljenje nužno je uzeti u obzir i estetske čimbenike, osobito u području prednjih zuba. Diskoloracija može nastati kao posljedica kemijskog sastava materijala, ali i njegova kontakta s krvlju iz biološkog nosača, što je česta pojava u RET-u (114,115). Stoga se prednost daje materijalima s minimalnim rizikom od promjene boje zuba, kako bi se očuvao estetski ishod terapije.

U tom kontekstu biokeramički materijali na bazi kalcijevih silikata smatraju se materijalima izbora u RET-u zbog svoje visoke biokompatibilnosti, izražene bioaktivnosti i pouzdanog koronarnog brtvljenja (39,116). Među njima se MTA i Biodentin najčešće opisuju i primjenjuju u kliničkoj praksi, pri čemu Biodentin, zbog odsutnosti bismut oksida, pokazuje manji estetski rizik u usporedbi s MTA-om (57). Usporedna istraživanja potvrđuju da se stupanj diskoloracije uvelike razlikuje među materijalima te da se dodatno povećava u uvjetima kontaminacije krvlju, osobito kod hidrauličnih cemenata na bazi kalcijevih silikata (114,117).

1.8.6.1. Mineralni trioksidni agregat

Među biokeramičkim materijalima koji se upotrebljavaju za koronarno brtvljenje u regenerativnoj endodontskoj terapiji, mineralni trioksidni agregat i dalje je najzastupljeniji zahvaljujući svojoj kliničkoj pouzdanosti i dobro dokumentiranim biološkim svojstvima. Od uvođenja u kliničku

praksu tijekom 1990-ih godina, MTA se kontinuirano primjenjuje u širokom spektru endodontskih zahvata, uključujući i postupke RET-a (116,118).

Sastav MTA-a uključuje trikalcijev i dikalcijev silikat, aluminatne faze te bizmutov oksid, koji osigurava radiopaknost materijala. Kombinacija navedenih komponenti odgovorna je za njegovu izraženu bioaktivnost, pri čemu MTA potiče angiogenezu, osteogenezu i dentinogenezu, što ga čini pogodnim materijalom za regeneraciju pulpo-dentinskoga kompleksa (119,120).

Mehanizam djelovanja MTA-a temelji se na procesu hidratacije i posljedičnom otpuštanju kalcijevih (Ca^{2+}) i hidroksilnih (OH^-) iona, čime se uspostavlja alkalno mikrookruženje povoljno za cijeljenje i regeneraciju tkiva. Otpušteni kalcijevi ioni interagiraju s dentinom i tkivnim tekućinama, potičući stvaranje hidroksiapatitnog sloja na sučelju materijala i dentina, što rezultira stabilnom mineraliziranom interakcijom i učinkovitim brtvljenjem. Istodobno, alkalni pH i bioaktivna površina MTA-a moduliraju stanični odgovor te potiču adheziju, proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica zubne pulpe i apikalne papile prema odontoblastima sličnim stanicama, uz stimulaciju angiogeneze i osteogeneze (110,112,116,121).

Učinkovitost MTA-a potvrđena je i u zahtjevnijim kliničkim situacijama, uključujući liječenje mladih trajnih zuba s upalom ili nekrozom pulpe, prisutnošću periapikalnih patologija te u slučajevima nakon neuspješne apeksifikacije. U tim okolnostima MTA omogućuje formiranje stabilne apikalne barijere i potiče regeneraciju periapikalnih tkiva (116).

Unatoč brojnim prednostima, primjena MTA-a povezana je i s određenim ograničenjima. Relativno dugo vrijeme vezivanja, koje može trajati nekoliko sati, može otežati kliničku manipulaciju, dok kontakt s krvlju može smanjiti radiopaknost i otežati naknadnu radiografsku evaluaciju (116). Dodatno, MTA je povezan s rizikom diskoloracije zuba, osobito kod sivih varijanti, što se pripisuje prisutnosti bizmutova oksida i aluminatnih faza. Iako je bijeli MTA razvijen radi smanjenja tog neželjenog učinka, novija istraživanja upućuju na to da rizik od promjene boje i dalje postoji, osobito u uvjetima kontakta s krvlju (114,117). Zbog toga se njegova primjena u estetski osjetljivim područjima, osobito u koronarnim dijelovima prednjih zuba, procjenjuje s povećanim oprezom.

Kako bi se prevladala navedena ograničenja, razvijeni su novi hidraulični kalcijevo-silikatni cementi s kraćim vremenom vezivanja i poboljšanim fizikalno-biološkim svojstvima, uz zadržanu biokompatibilnost i regenerativni potencijal. Među njima se ističu (119):

- RetroMTA – s vremenom vezivanja od približno 150 sekundi uz očuvanu biološku učinkovitost
- Endocem MTA Premixed – prethodno pripremljen materijal, jednostavan za kliničku primjenu
- Biodentin – s kraćim vremenom vezivanja i nižim rizikom diskoloracije.

Unatoč tehnološkom napretku i dostupnosti novih materijala, MTA i dalje ostaje najčešći izbor za koronarno brtvljenje u RET-u, zahvaljujući svojoj dokazanoj učinkovitosti, predvidljivim biološkim učincima i širokoj kliničkoj primjeni (116).

1.8.6.2. Biodentin

Biodentin je trikalcijev-silikatni cement nove generacije, razvijen kao biokompatibilna i estetski prihvatljivija alternativa MTA-u. U kliničku praksu uveden je 2011. godine u cilju prevladavanja ograničenja starijih kalcij-silikatnih materijala, osobito dugog vremena vezivanja i neželjene promjene boje zuba. Unatoč tim poboljšanjima, njegova se primjena i dalje temelji na istom osnovnom biokeramičkom konceptu kao i kod MTA-a (116,122).

Sastav Biodentina uključuje trikalcijev i dikalcijev silikat, kalcijev karbonat, kalcijev i željezov oksid te cirkonijev oksid, dok je tekućina za miješanje otopina kalcijeva klorida, vodotopivog polimera i vode. Takva formulacija omogućuje postizanje visoke pH-vrijednosti (~11,7) koja ostaje stabilna do 28 dana, čime se osigurava dugotrajan antibakterijski učinak (112,116). Mehanizam djelovanja Biodentina, slično kao i kod MTA-a, temelji se na procesu hidratacije i otpuštanju kalcijevih i hidroksilnih iona, čime se uspostavlja alkalno mikrokruženje i potiče mineralizirana veza s dentinom (113,116).

Među glavnim kliničkim prednostima ističu se brzo vezivanje (10 – 12 minuta) i jednostavna primjena, zahvaljujući kapsulama spremnim za miješanje (119). Budući da ne sadržava bizmutov oksid, rizik od diskoloracije znatno je smanjen, zbog čega se Biodentin preporučuje za upotrebu u estetskoj zoni, osobito kod prednjih zuba (114,117). Međutim, dostupni podatci upućuju na to da rizik od diskoloracije nije u potpunosti eliminiran, osobito u uvjetima kontakta s krvlju, koji su inherentni RET-u (114,117).

U regenerativnoj endodontskoj terapiji upotrebljava se za koronarno brtvljenje, a klinička istraživanja potvrđuju njegovu uspješnost u poticanju nastavka razvoja korijenskih struktura, pružajući rezultate koji su usporedivi s MTA-om (112,116).

Kombinacija Biodentina s biološkim nosačima, poput PRF-a i PRP-a, dodatno može poboljšati regenerativne ishode, osobito u klinički zahtjevnim slučajevima, potičući formiranje novog tkiva i očuvanje vitalnosti (116,121). Ipak, većina dostupnih istraživanja usmjerena je na kratkoročne kliničke ishode, dok su podaci o dugoročnoj stabilnosti koronarnog brtvljenja u uvjetima regenerativne endodontije ograničeni (116,119).

U usporednim ispitivanjima Biodentin je pokazao jednaku učinkovitost kao MTA u nastavku razvoja korijena i rezoluciji simptoma, ali povećanu estetsku stabilnost (116,117). Uz navedeno, viša cijena materijala predstavlja dodatni praktični čimbenik koji može ograničiti njegovu rutinsku primjenu u kliničkoj praksi (112,116).

1.8.6.3. Staklenoionomerni cementi

Staklenoionomerni cementi (SIC) dentalni su materijali s dugogodišnjom kliničkom primjenom, poznati po kemijskoj adheziji na tvrda zubna tkiva, sposobnosti otpuštanja fluoridnih iona, visokoj biokompatibilnosti i jednostavnosti primjene. Od njihova uvođenja u kliničku praksu početkom 1970-ih godina, neprestano se unaprjeđuju u pogledu kemijskog sastava, mehaničkih svojstava i načina primjene (123–126).

Osnovu staklenoionomernih cemenata čine prah kalcijsko-aluminijsko-fluorosilikatnog stakla i tekućina koja sadržava kopolimere poliakrilne kiseline (123). Miješanjem sastavnica započinje acidobazna reakcija koja se odvija u tri faze: inicijalno oslobađanje iona, stvaranje hidrogelne mreže te formiranje stabilnih soli koje osiguravaju mehaničku čvrstoću materijala i njegovu kemijsku adheziju na caklinu i dentin (123,125,127). Tijekom procesa stvrdnjavanja dolazi do otpuštanja različitih iona iz matrice cementa, čime se uspostavljaju kemijski i strukturni preduvjeti za interakciju materijala s tvrdim zubnim tkivima (125,128,129).

Ionsko otpuštanje iz staklenoionomernih cemenata predstavlja jedan od ključnih mehanizama njihove bioaktivnosti i funkcionalne interakcije s tvrdim zubnim tkivima. Tijekom i nakon stvrdnjavanja, SIC-i kontinuirano oslobađaju terapijske ione, pri čemu fluoridni ioni pridonose

inhibiciji demineralizacije i poticanju remineralizacijskih procesa, dok otpuštanje kalcija i fosfata može povećati lokalni omjer Ca/P te pogodovati taloženju mineralnih faza sličnih hidroksiapatitu na sučelju materijal–dentin (125,128,129). Recentna istraživanja upućuju na to da modificirani staklenoionomerni cementi, osobito oni obogaćeni bioaktivnim komponentama, pokazuju izraženiju ionsku razmjenu i povoljniji biološki odgovor u usporedbi s konvencionalnim formulacijama (126). Iako svi SIC-i ne ispunjavaju kriterije klasične bioaktivnosti, poput formiranja jasno definiranih hidroksiapatitnih prekursora, potvrđeno ionsko otpuštanje te utjecaj na pH-vrijednost i mineralni sastav okolnog tkiva pokazuju njihov potencijal u poticanju remineralizacije i jačanju kemijske veze s dentinom (130). U kontekstu RET-a ovi su mehanizmi osobito relevantni jer bi stabilno ionsko otpuštanje moglo pridonijeti očuvanju funkcionalnog integriteta koronarnog brtvljenja i stabilnosti regenerativnog mikrokoliša, iako su za potvrdu takva učinka potrebna dodatna eksperimentalna i klinička istraživanja (125).

Glavne prednosti staklenoionomernih cemenata uključuju kemijsku adheziju na tvrda zubna tkiva, visoku biokompatibilnost i nisku citotoksičnost, antikariogeni učinak zahvaljujući otpuštanju i mogućnosti ponovne apsorpcije fluorida, nisku razinu mikropropusnosti, koeficijent toplinske ekspanzije sličan dentinu te jednostavnu i brzu primjenu, osobito u pedijatrijskoj i gerijatrijskoj populaciji (123–126,131). Nasuprot tomu, glavni nedostaci konvencionalnih SIC-a odnose se na njihovu relativnu krhkost, nižu otpornost na trošenje te osjetljivost na vlagu tijekom početne faze vezivanja, što ograničava njihovu primjenu u područjima izloženim visokim žvačnim opterećenjima (123,131,132).

Unatoč navedenim ograničenjima, staklenoionomerni cementi i dalje zauzimaju važnu ulogu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Uspješno se primjenjuju u restaurativnoj stomatologiji kao trajni i privremeni ispuni, u atraumatskoj restaurativnoj terapiji (ART), za pečaćenje jamica i fisura, kao podloge kod dubokih karijesnih lezija te za cementiranje fiksnoprotetskih nadomjestaka i ortodontskih naprava (123,131,133).

Radi poboljšanja mehaničkih i funkcionalnih svojstava razvijene su nove formulacije staklenoionomernih cemenata koje uključuju dodatak nanočestica, bioaktivnog stakla i hidroksiapatita. Jedan je od takvih materijala Glass Carbomer, obogaćen nanočesticama hidroksiapatita, za koji je opisana veća bioaktivnost i bolja otpornost u usporedbi s konvencionalnim SIC-ima (123,126,134). *In vitro* istraživanja pokazala su da Glass Carbomer i

srodne staklenoionomerne formulacije pokazuju visoku biokompatibilnost u kontaktu s ljudskim stanicama zubne pulpe (hDPSC; engl. *human dental pulp stem cells*), uz nisku citotoksičnost i povoljan stanični odgovor u usporedbi s pojedinim drugim restaurativnim materijalima, što ih čini potencijalno pogodnima za biološki osjetljive postupke regeneracije (126,133). Sustavni pregled literature Malacarne i suradnika pokazuje da staklenoionomerni cementi, uključujući suvremene modificirane formulacije, imaju povoljan biološki profil i ne pokazuju klinički relevantnu genotoksičnost, što dodatno potvrđuje njihovu prikladnost za primjenu u biološki osjetljivim kliničkim situacijama (135).

U literaturi je opisana i primjena toplinske energije tijekom početne faze vezivanja staklenoionomernih cemenata u cilju poboljšanja njihovih početnih mehaničkih i adhezijskih svojstava. Ova se tehnika osobito dovodi u vezu s određenim suvremenim formulacijama, poput Glass Carbomera, koji je razvijen uz mogućnost kontrolirane primjene topline tijekom stvrdnjavanja s pomoću specijaliziranih uređaja. Iako se primjena topline tijekom vezivanja povezuje s povoljnijom adaptacijom materijala i većom stabilnošću u ranoj fazi, većina dostupnih podataka temelji se na ranijim eksperimentalnim istraživanjima, dok su novija istraživanja, koja bi detaljnije razjasnila mehanizme i klinički značaj ovog pristupa, još uvijek ograničena (136,137).

Najnovija istraživanja usmjerena su na funkcionalizaciju staklenoionomernih cemenata, odnosno ciljane modifikacije njihova sastava dodatkom bioaktivnih komponenti poput hitozana i mezoporoznih silikatnih nanočestica (MSNs; engl. *mesoporous silica nanoparticles*). Ovi su dodatci povezani s poboljšanim antibakterijskim svojstvima, većom otpornošću na trošenje te povećanom sposobnošću otpuštanja i reapsorpcije fluoridnih iona, uz zadržavanje visoke biokompatibilnosti materijala (125,126,134).

Iako se staklenoionomerni cementi ne primjenjuju rutinski u regenerativnoj endodontskoj terapiji, njihova povoljna biološka i kemijska svojstva opravdavaju razmatranje njihove primjene kao materijala za koronarno brtvljenje. Visoka biokompatibilnost, kemijska adhezija na dentin, niska mikropropusnost i sposobnost otpuštanja terapijskih iona mogli bi pridonijeti očuvanju stabilnosti i funkcionalnog integriteta regenerativnog mikrookoliša. Međutim, uloga staklenoionomernih cemenata kao materijala za koronarno brtvljenje u RET-u još uvijek nije bila predmet sustavnih istraživanja, što opravdava potrebu za daljnjom eksperimentalnom i kliničkom evaluacijom (116,123,125).

1.8.7. Ishodi regenerativne endodontske terapije

Ishodi regenerativne endodontske terapije odražavaju složenost bioloških procesa unutar pulpo-dentinskoga kompleksa koji se aktiviraju nakon primjene regenerativnog postupka te mogu pokazivati značajnu varijabilnost. Na opseg i karakter takve varijabilnosti utječe niz čimbenika, uključujući individualne karakteristike pacijenta, odabrani terapijski protokol te specifičan biološki odgovor tkiva na primijenjenu terapiju (4,73).

Dosadašnja istraživanja pokazuju širok spektar mogućih reparativnih i regenerativnih odgovora nakon RET-a, koji se mogu očitovati u različitim stupnjevima mineralizacije, zadebljanju dentinskih stijenki te formiranju tkiva koje histološki i morfološki može nalikovati cementu, kosti ili parodontnom tkivu (54,94).

Procjena ishoda temelji se na kombinaciji kliničkih znakova i simptoma, radioloških nalaza, histoloških analiza te subjektivnih pokazatelja iz perspektive pacijenta. Interpretacija tih nalaza u velikoj mjeri ovisi o jasno definiranim, standardiziranim i višerazinskim kriterijima evaluacije, koji omogućuju objektivniju i međusobno usporedivu procjenu uspješnosti regenerativnih postupaka (4,138).

1.8.8. Kriteriji evaluacije uspješnosti regenerativne endodontske terapije

U kliničkoj praksi evaluacija uspješnosti regenerativne endodontske terapije provodi se prema unaprijed definiranim kriterijima koje su predložila relevantna stručna društva. Najčešće korišteni evaluacijski okviri razvijeni su od AAE-a i ESE-a, pri čemu oba sustava primjenjuju višerazinski pristup procjeni terapijskih ishoda (4,138).

Prema smjernicama AAE-a razlikuju se tri razine terapijskih ciljeva. Primarni se cilj odnosi na uklanjanje kliničkih simptoma i postizanje radiološkog cijeljenja periapikalnog područja. Sekundarni cilj uključuje produljenje korijena, zadebljanje dentinskih stijenki i zatvaranje apikalnog otvora, dok se tercijarni cilj odnosi na pozitivan odgovor na testove vitaliteta, koji može upućivati na prisutnost vitalnog pulpnog tkiva. Ovakva hijerarhijska podjela omogućuje diferenciranu interpretaciju uspješnosti regenerativnih postupaka u različitim kliničkim scenarijima (4,73).

ESE dodatno naglašava kriterije povezane s odsutnošću upalnih procesa, nastavkom razvoja korijena, izostankom patološke resorpcije, formiranjem nove parodontne ovojnice te očuvanjem estetskog izgleda zuba bez pojave diskoloracije. U usporedbi sa smjernicama AAE-a, ESE kriteriji u većoj mjeri integriraju parodontne i estetske aspekte ishoda RET-a (4,138).

S obzirom na ograničenu primjenjivost histološke evaluacije u rutinskoj kliničkoj praksi, kriteriji AAE-a najčešće se upotrebljavaju kao referentni okvir za procjenu uspješnosti RET-a. Međutim, suvremeni pristupi sve češće ističu potrebu za višeperspektivnom interpretacijom ishoda, pri čemu se terapijski rezultati mogu razmatrati s aspekta pacijenta, kliničara i znanstvene zajednice, ovisno o dostupnim dijagnostičkim pokazateljima i ciljevima evaluacije (4,138).

1.8.8.1. Klinička i radiološka uspješnost

Klinička uspješnost RET-a temelji se na uklanjanju simptoma i očuvanju funkcije zuba. Prema smjernicama AAE-a, primarni cilj obuhvaća izostanak boli, otoka, fistule te osjetljivosti na perkusiju i palpaciju, uz radiološku potvrdu cijeljenja periapikalne lezije. Takav ishod, usporediv s rezultatima konvencionalne endodontske terapije, bilježi se u 83,3 – 100 % slučajeva. Iz perspektive pacijenta, uspjeh podrazumijeva očuvanje funkcionalnog zuba bez potrebe za dodatnim terapijskim zahvatima (4,54,73).

Radiološka uspješnost procjenjuje se na temelju cijeljenja periapikalne lezije te promjena morfologije korijena, uključujući produljenje korijena, zadebljanje dentinskih stijenki i zatvaranje apikalnog otvora (4,138). Wei i suradnici, na temelju ranijih sustavnih pregleda, navode da stopa cijeljenja periapikalnih lezija nakon regenerativne endodontske terapije iznosi između 91 % i 94 %, dok je morfološki razvoj korijena izrazito varijabilan, s promjenama u rasponu od –4 % do +72,67 % (4).

Chen i suradnici (2012) opisali su pet karakterističnih radioloških obrazaca cijeljenja i razvoja korijena kod zuba liječenih regenerativnim endodontskim postupcima (139):

- tip 1: produljenje korijena, uz zadebljanje dentinskih stijenki i zatvaranje apikalnog otvora
- tip 2: zatvaranje apikalnog otvora bez produljenja korijena
- tip 3: produljenje korijena bez zatvaranja apikalnog otvora
- tip 4: obliteracija korijenskog kanala zbog kalcifikacije
- tip 5: stvaranje unutarnje kalcificirane barijere ispod materijala za koronarno brtvljenje (najčešće MTA).

Navedena klasifikacija i dalje se upotrebljava u suvremenim kliničkim istraživanjima za opis radiografskih ishoda RET-a (140).

Radiološka evaluacija ishoda RET-a može biti otežana tehničkim ograničenjima, poput promjena u projekcijskom kutu snimanja te oslanjanja isključivo na dvodimenzionalnu radiografiju (4). Suvremeni pregledni radovi ističu da konusno-snopna kompjutorizirana tomografija (CBCT; engl. *cone-beam computed tomography*) omogućuje precizniju identifikaciju periapikalnih lezija i morfoloških promjena koje mogu ostati nevidljive na standardnim dvodimenzionalnim snimkama, čime se poboljšava procjena ishoda regenerativne endodontske terapije (141).

Na uspješnost radioloških i kliničkih ishoda RET-a mogu znatno utjecati kvaliteta dezinfekcije korijenskog kanala te adekvatnost koronarnog brtvljenja. Nedostatna mehanička obrada, perzistencija rezidualne infekcije, neadekvatna izolacija operacijskog polja ili gubitak privremenog ispuna tijekom liječenja mogu dovesti do ponovne infekcije, neuspješnog cijeljenja te razvoja resorpcije korijena (4).

Zabilježeno je da su traumatski uzrokovani slučajevi povezani s povećanim rizikom od resorptivnih procesa, ponajprije zbog oštećenja Hertwigove epitelne ovojnice i apikalne papile, što može kompromitirati uspjeh RET-a (4,54).

1.8.8.2. Odgovor na testove vitaliteta

Pozitivan odgovor na testove vitaliteta nakon regenerativne endodontske terapije smatra se, prema AAE smjernicama, tercijarnim ishodom. Odnosi se na povrat klinički mjerljivog odgovora koji može upućivati na prisutnost organiziranijeg vitalnog tkiva, ali sam po sebi ne predstavlja dokaz histološki identične pulpne strukture (4). Iako je povratak osjeta poželjan u kliničkom kontekstu, on ne mora nužno značiti da je došlo do potpune regeneracije pulpnog tkiva, već može upućivati na prisutnost vaskulariziranog i inerviranog tkiva koje histološki ne odgovara pravoj pulpi (54,73).

Prema dostupnim istraživanjima pozitivan odgovor na testove vitaliteta zabilježen je u 50 – 60 % slučajeva nakon RET-a (4). Histološke analize, s druge strane, pokazuju kako se u većini slučajeva unutar korijenskog kanala ne razvija pravo pulpno tkivo, već ono s obilježjima cementa, kosti ili parodontnog ligamenta (94). U studijama koje opisuju histološki nalaz sličan pulpi utvrđeno je da pulpa prije postupka nije bila potpuno nekrotična ili je dio vitalnog tkiva ostao očuvan (54).

U kliničkoj evaluaciji najčešće se primjenjuju test vitaliteta hladnoćom, električni test vitaliteta, laser-doplerska floumetrija te pulsna oksimetrija, koja procjenjuje oksigenaciju krvi i izravnije odražava vaskularni status tkiva (54,142). Važno je istaknuti da se navedeni testovi ne temelje na procjeni vitalnih odontoblasta, već na odgovoru živčanih vlakana ili protoku krvi, pa tako test hladnoćom i električni test prvenstveno ispituju osjetljivost, dok su laser-doplerska floumetrija i pulsna oksimetrija prikladniji pokazatelji stvarne vitalnosti (4,73,142).

Novoformirana tkiva mogu sadržavati živčana vlakna i vaskularnu mrežu, zbog čega je moguć pozitivan odgovor na testove vitaliteta (54,73). Istodobno, odgovor na testove osjetljivosti može biti odgođen ili promjenjiv, osobito u slučajevima s izraženom dentinskom depozicijom i promijenjenom debljinom stijenki korijenskog kanala, što može otežati prijenos toplinskih ili električnih podražaja do živčanih vlakana te otežati interpretaciju nalaza (142–144).

Budući da su histološke analize kod ljudi ograničene etičkim i metodološkim razlozima te se ne provode rutinski, odgovor na testove vitaliteta ostaje neizravni pokazatelj mogućeg biološkog odgovora, ali se ne može smatrati konačnim dokazom regeneracije pulpnog tkiva (4,54,94). Rezultate testova stoga treba tumačiti s oprezom i uvijek ih razmatrati u kontekstu cjelokupne kliničke slike i radioloških nalaza, koji ostaju primarni kriteriji uspješnosti terapije (4,73). Nadalje, kada je to izvedivo, preporučuje se primjena objektivnijih metoda procjene vitalnosti, poput laser-doplerske floumetrije i pulsne oksimetrije, koje pružaju pouzdaniji uvid u vaskularni status novoformiranog tkiva u odnosu na klasične testove osjetljivosti (142,143).

1.9. Ograničenja regenerativnih protokola i opravdanost njihove modifikacije

Unatoč napretku regenerativne endodontske terapije, postojeći protokoli i dalje su opterećeni ograničenjima koja mogu utjecati na estetski ishod, biološku predvidljivost i interpretaciju terapijskog uspjeha. Poseban izazov predstavlja uporaba materijala za koronarno brtvljenje koji mogu uzrokovati diskoloraciju zuba, zbog čega se njihova primjena u kliničkoj praksi često ograničava na radikularni dio korijenskog kanala. Iako estetski opravdan, takav pristup smanjuje raspoloživi prostor za regeneraciju u koronarnom dijelu kanala – anatomskom području koje je biološki i funkcionalno važno za uspostavu optimalnog regenerativnog odgovora.

U tom kontekstu, predloženi terapijski pristup uvodi novost u vidu proširenja postave biološkog nosača i u koronarni dio kanala. Time se povećava volumen dostupnog prostora za regeneraciju i omogućuje povoljnija organizacija novoformiranog tkiva unutar cjelokupnog endodontskog prostora zuba. Ovaj prostorni koncept dodatno je podržan uporabom staklenoionomernog cementa kao jedinog materijala za koronarno brtvljenje, čime se izbjegava rizik diskoloracije povezan s kalcijsko-silikatnim materijalima poput MTA-a i Biodentina, koji su u ovom protokolu namjerno izostavljeni.

Kao biološki nosač odabran je A-PRF+, temeljem njegovih potvrđenih bioloških svojstava, uključujući strukturnu stabilnost i produljeno otpuštanje bioaktivnih čimbenika rasta. Navedene modifikacije čine osnovu novopredloženog modificiranog regenerativnog protokola koji je predmet istraživanja ove doktorske disertacije.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Na temelju prethodno izloženih znanstvenih i kliničkih spoznaja provedeno je istraživanje usmjereno na evaluaciju učinkovitosti modificiranog regenerativnog protokola u liječenju mladih trajnih zuba s nekrozom pulpe i nezavršenim razvojem korijena. U istraživanju su analizirani klinički, radiološki i biološki ishodi liječenja.

2.1. Temeljni cilj istraživanja

Temeljni cilj istraživanja bio je ispitati učinkovitost modificiranog regenerativnog protokola u poticanju regeneracije pulpo-dentinskoga kompleksa, uz očuvanje funkcionalnih i estetskih obilježja liječenih zuba.

2.2. Specifični ciljevi istraživanja

Specifični ciljevi istraživanja tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja bili su:

1. Usporediti učinak modificiranog regenerativnog protokola s konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, s obzirom na:
 - produljenje korijena
 - zadebljanje dentinskih stijenki
 - zatvaranje apikalnog otvora.
2. Ispitati dolazi li do ponovne uspostave cirkulacije i funkcionalne inervacije unutar novonastalog, pulpi sličnog tkiva nakon primjene modificiranog regenerativnog protokola, primjenom testova vitaliteta i mjerenjem pulpnog protoka krvi metodom laser-doplerske floumetrije.
3. Analizirati bioaktivna svojstva i mineralizacijski potencijal staklenoionomernih cemenata korištenih za izradu sekundarnog krova pulpne komore, primjenom FE-SEM/EDS analize.
4. Procijeniti kliničku učinkovitost različitih staklenoionomernih cemenata primijenjenih kao završni restaurativni materijali u modificiranom regenerativnom protokolu, prema modificiranim USPHS kriterijima.

2.3. Hipoteze istraživanja

U skladu s definiranim ciljevima istraživanja, postavljene su sljedeće radne hipoteze:

- Prva radna hipoteza (H_1) polazi od pretpostavke da primjena modificiranog regenerativnog protokola rezultira statistički i klinički značajno većim produljenjem korijena, zadebljanjem dentinskih stijenki i zatvaranjem apikalnog otvora kod mladih trajnih zuba u usporedbi s konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom.
- Druga radna hipoteza (H_2) polazi od pretpostavke da primjena modificiranog regenerativnog protokola dovodi do ponovne uspostave cirkulacije i funkcionalne inervacije unutar novonastalog, pulpi sličnog tkiva.
- Treća radna hipoteza (H_3) pretpostavlja da staklenoionomerni cementi korišteni za restauraciju sekundarnog krova pulpne komore posjeduju bioaktivna svojstva te tijekom vremena pokazuju znakove mineralizacije.
- Dopunska hipoteza (H_{3a}), kao podhipoteza treće radne hipoteze, pretpostavlja da Glass Carbomer, zbog svoje napredne formulacije, pokazuje izraženiji mineralizacijski potencijal u usporedbi s ostalim ispitivanim staklenoionomernim cementima.
- Četvrta radna hipoteza (H_4) temelji se na pretpostavci da svi ispitivani staklenoionomerni cementi tijekom jednogodišnjeg kliničkog praćenja osiguravaju zadovoljavajuću funkcionalnu i estetsku stabilnost restauracija, bez potrebe za dodatnim terapijskim intervencijama.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. Klinička studija

Napomena o terminologiji: U ovom radu upotrebljava se termin *revaskularizacija* u skladu s ranijim publikacijama i izvornim nazivom istraživačkog protokola. Iako opisani terapijski postupak – koji uključuje primjenu A-PRF+, biološki aktivnih komponenti, membrane i završne restauracije – prema suvremenim smjernicama pripada području regenerativne endodontske terapije, što je detaljno objašnjeno u uvodnom dijelu ove disertacije, pojam *revaskularizacija* ovdje se upotrebljava uvjetno, kao dio šireg koncepta regenerativne endodontske terapije.

3.1.1. Dizajn kliničke studije

Ova je klinička studija osmišljena kao prospektivno intervencijsko istraživanje s povijesnom kontrolnom skupinom. U istraživanje su bili uključeni pacijenti koji su se tijekom dvogodišnjeg razdoblja javljali u Zavod za dječju i preventivnu dentalnu medicinu Kliničkoga bolničkog centra Zagreb radi liječenja avitalnih trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijena.

Ispitanici koji su ispunjavali kriterije uključivanja prospektivno su uključivani i liječeni prema modificiranom regenerativnom protokolu uz primjenu A-PRF+ autolognog krvnog pripravka.

Kontrolnu skupinu činili su pacijenti prethodno liječeni u istoj ustanovi, kod kojih je proveden konvencionalni postupak apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, uz ispunjavanje jednakih kriterija uključivanja kao kod eksperimentalne skupine.

Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije te je odobreno od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na XXV. redovnoj sjednici održanoj 15. veljače 2018. godine (broj: 05 PA 24 2/2018). Naknadna registracija studije izvršena je na portalu ClinicalTrials.gov (identifikacijski broj: NCT07092488; datum registracije: 28. srpnja 2025.), u skladu s Uredbom (EU) 536/2014 o kliničkim ispitivanjima lijekova za humanu primjenu, koja je stupila na snagu 31. siječnja 2022. godine.

3.1.2. Ispitanici

Uključivanje ispitanika u studiju temeljilo se na prethodno utvrđenoj kliničkoj indikaciji za provođenje postupka revaskularizacije uz primjenu autolognog krvnog pripravka A-PRF+. Indikacija je postavljena na osnovi medicinske i stomatološke anamneze, kliničkog pregleda, testova vitaliteta zubne pulpe te radiološke analize zahvaćenog zuba.

Nakon što je indicirana potreba za zahvatom, pacijentima i njihovim roditeljima ili zakonskim skrbnicima pružene su detaljne informacije o terapijskom protokolu, uključujući moguće koristi i rizike. Uz usmeno objašnjenje, uručen im je i pisani obrazac s informacijama za pacijente (Prilog E), nakon čega je zatraženo potpisivanje informiranog pristanka (Prilog D). Posebno je naglašeno da ispitanici u bilo kojem trenutku mogu povući svoj pristanak, bez negativnih posljedica za nastavak liječenja konvencionalnim postupcima.

Uključivanje ispitanika odvijalo se sukcesivno, tijekom približno dvije godine, počevši od ožujka 2018. godine, neposredno nakon dobivanja etičkog odobrenja. Svaki je pacijent praćen u razdoblju od dvanaest mjeseci od početka terapijskog postupka. Tijekom praćenja dvije su osobe isključene iz studije zbog neredovitog dolaska na kontrolne preglede, čime je onemogućena objektivna evaluacija ishoda liječenja. Konačan broj ispitanika u eksperimentalnoj skupini koji su dovršili cijeli terapijski protokol i bili uključeni u završnu analizu iznosio je 28.

Paralelno s time, analizirana je stomatološka dokumentacija pacijenata kod kojih je u istom vremenskom razdoblju i u istoj zdravstvenoj ustanovi provedena konvencionalna apeksifikacija kalcijevim hidroksidom. Od ukupno 47 dokumentiranih slučajeva koji su ispunjavali kriterije uključivanja, nasumično je odabrano 28 ispitanika kako bi se postigla brojčana usklađenost s eksperimentalnom skupinom te formirala povijesna kontrolna skupina.

3.1.3. Kriteriji uključivanja i isključivanja

3.1.3.1. Eksperimentalna skupina (A-PRF+ revaskularizacija)

U skladu sa smjernicama koje su naveli Wei i suradnici (4), u eksperimentalnu su skupinu uključeni ispitanici koji su ispunjavali sljedeće kriterije:

- sistemski zdravi ispitanici (ASA klasifikacija I ili II)
- dob između 8 i 18 godina
- prisutnost avitalnih jednokorijenskih trajnih zuba s očuvanom kliničkom krunom
- negativan odgovor na testove vitaliteta (test vitaliteta hladnoćom i električni test vitaliteta)
- radiološki potvrđena nezrelost korijena prema Cvekovoj klasifikaciji (stadiji I – IV)
- apikalni otvor širine $\geq 0,5$ mm
- prethodno provedena, ali dugotrajna i neučinkovita apeksifikacija kalcijevim hidroksidom.

Iz istraživanja su isključeni ispitanici koji su imali jednu ili više od sljedećih karakteristika:

- prisutnost sistemskih bolesti
- poznata preosjetljivost na sastojke koji se rabe u terapiji (uključujući lokalne anestetike i komponente triantibiotske paste)
- komplicirana fraktura krune zuba s frakturnom pukotinom koja se proteže subgingivno
- radiološki znakovi ankiloze ili resorpcije korijena
- istodobno provođenje ortodontske terapije
- odbijanje sudjelovanja u bilo kojoj fazi protokola A-PRF+ revaskularizacije
- izražena anksioznost, fobija od igala ili drugi oblici nesuradljivosti koji onemogućuju sigurno provođenje terapije.

Tijekom istraživanja ispitanici koji su u početku ispunjavali sve kriterije uključivanja mogli su naknadno biti isključeni u skladu s unaprijed definiranim protokolom istraživanja. Najčešći razlozi za naknadno isključenje bili su izostanak s planiranih kontrolnih pregleda, što je onemogućilo sustavnu evaluaciju terapijskog učinka, ili razvoj dodatne komplicirane dentalne traume na liječenom zubu, što je moglo znatno utjecati na tijek terapije i kompromitirati objektivnu procjenu njezine učinkovitosti.

3.1.3.2. Kontrolna skupina (apeksifikacija kalcijevim hidroksidom)

Kontrolnu skupinu činili su ispitanici u dobi od 8 do 18 godina s nezrelim trajnim jednokorijenskim zubima, kod kojih je dijagnosticirana nekroza pulpe uzrokovana karijesom ili dentalnom traumom, a koji su prethodno liječeni postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom u istoj zdravstvenoj ustanovi.

Uključivanje u ovu skupinu temeljilo se na sljedećim kriterijima: očuvana klinička kruna zuba, potpuna stomatološka dokumentacija, dostupnost najmanje dviju dijagnostičkih radioloških snimki (početne i završne kontrole), radiološki potvrđena nezrelost korijena prema Cvekovoju klasifikaciji (stadiji I–IV) te prisutnost apikalnog otvora širine $\geq 0,5$ mm.

Radiološka usporedivost snimki postignuta je mjerenjem meziodistalnih i incizocervikalnih dimenzija krune zuba; snimke s odstupanjem većim od 10 % bile su isključene iz analize, u skladu s preporukama o standardiziranim tehnikama paralelizacije (145).

Kriteriji za isključenje obuhvaćali su trajanje terapije kraće od šest mjeseci ili dulje od dvanaest mjeseci, nepotpunu dokumentaciju te odstupanja u evidentiranom terapijskom protokolu. Radi smanjenja rizika od selekcijske pristranosti, iz povijesne kohorte nasumično je odabrano 28 ispitanika koji su u cijelosti zadovoljavali sve navedene uvjete, čime je osigurana brojčana usporedivost s eksperimentalnom skupinom.

3.1.4. Statistička snaga i veličina uzorka

Procjena potrebne veličine uzorka temeljila se na aritmetičkim sredinama (AS) i standardnim devijacijama (SD) triju ključnih ishodovnih parametara: produljenja korijena (PK), zadebljanja dentinske stijenke (ZDS) i apikalnog zatvaranja (AZ). Vrijednosti su dobivene na temelju mjerenja provedenih nakon šestomjesečnog praćenja deset ispitanika liječenih prema protokolu A-PRF+ revaskularizacije. Također su analizirani i podatci deset nasumično odabranih pacijenata iz kontrolne skupine, kod kojih je proveden postupak apeksifikacije kalcijevim hidroksidom (Tablica 2).

Tablica 2. Procjena veličine uzorka na temelju preliminarnih rezultata za A-PRF+ i kontrolnu skupinu prema parametrima: produljenje korijena (PK), zadebljanje dentinske stijenke (ZDS) i apikalno zatvaranje (AZ); prema Turjanski i sur. (146)

Parametar	PK A-PRF+	PK Kontrola	ZDS A-PRF+	ZDS Kontrola	AZ A-PRF+	AZ Kontrola
AS (mm)	1,06	0,09	0,33	0,08	0,68	0,11
SD (mm)	1,15	0,11	0,20	0,06	0,46	0,09
Δ AS (mm)	0,97		0,25		0,57	
Združena SD	0,83		0,15		0,32	
Veličina učinka (Cohenov d)	1,19		1,68		1,73	
Potrebna veličina uzorka ¹	20		11		10	
Prilagođena veličina uzorka ²	25		14		13	

¹ Izračunano za statističku snagu od 95 %, $\alpha = 0,05$, dvosmjerni test.

² Prilagođena veličina uzorka uzima u obzir očekivani gubitak od 20 % tijekom praćenja.

Za izračun veličine uzorka kao referentni parametar odabrano je produljenje korijena (PK) jer je za taj ishod, u usporedbi s ostalim analiziranim varijablama, bila potrebna najveća veličina uzorka, čime je osigurana dovoljna statistička snaga za analizu svih ishodovnih parametara uključenih u istraživanje. Za postizanje statističke snage od 95 % pri razini značajnosti $\alpha = 0,05$ (dvosmjerni test), bilo je potrebno uključiti najmanje 25 zuba po skupini, uz predviđeni gubitak od 20 % tijekom praćenja. Tijekom trajanja istraživanja u svaku su skupinu uključena po 28 zuba, čime je u potpunosti zadovoljen zahtjev za minimalnom veličinom uzorka.

Izračuni su provedeni korištenjem programskog paketa Statistics and Machine Learning Toolbox (verzija R2023b, MathWorks Inc., Natick, MA, SAD). Veličina učinka (engl. *effect size*) izražena je s pomoću Cohenova d, koji prikazuje standardiziranu razliku između aritmetičkih sredina (AS) dviju skupina. U te je svrhe korištena združena standardna devijacija (pooled SD). Naknadne (*post hoc*) provjere, temeljene na podacima iz 9. i 12. mjeseca praćenja, potvrdile su da je početna procjena bila statistički opravdana i dostatna.

3.1.5. Protokol A-PRF+ revaskularizacije (eksperimentalna skupina)

Sve su kliničke zahvate u kontroliranim aseptičnim uvjetima na Zavodu za dječju i preventivnu dentalnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb izveli iskusni specijalisti dječje dentalne medicine.

Tijekom svakog postupka osigurana je odgovarajuća razina sterilnosti primjenom standardnih mjera zaštite, uključujući uporabu sterilnih rukavica i prekrivača te izolaciju zuba koferdamom. Zubna površina temeljito je dezinficirana 5 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita.

3.1.5.1. Prvi posjet

Nakon primjene lokalne anestezije (Mepivastesin; 3M ESPE, Seefeld, Njemačka) i izolacije radnog polja koferdamom (Elastidam; Coltene, Altstätten, Švicarska), oblikovan je pristupni kavitet. Radna duljina određena je s pomoću elektroničkog apekslokatora (Endometer ES-02; Artronic d.o.o., Zagreb, Hrvatska), uz standardno skraćenje od 0,1 mm u odnosu na radiološki apeks.

Kanal je minimalno instrumentiran s pomoću H-strugača veličine 25 (Medin a.s., Nové Město na Moravě, Češka). Korijenski kanal ispran je 5 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u količini od 10 mL, a zatim istom količinom sterilne fiziološke otopine.

Nakon sušenja sterilnim papirnatim štapićima (Diadent MMPP; DiaDent Group International, Cheongju, Južna Koreja), u kanal je injicirana pasta kalcijeva hidroksida (Calcicur; Voco GmbH, Cuxhaven, Njemačka). Na ulaz u kanal postavljena je sterilna vatica, a zub je privremeno zatvoren staklenoionomernim cementom (GC Fuji IX GP Fast; GC Corporation, Tokio, Japan).

3.1.5.2. Drugi posjet (dva tjedna nakon početnog zahvata)

Pristupni kavitet ponovno je otvoren. Provedena je minimalna instrumentacija nakon koje je uslijedila irigacija s 5 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita (10 mL) i sterilnom fiziološkom otopinom (10 mL). Kanal je zatim osušen sterilnim papirnatim štapićima.

Triantibiotska pasta pripremljena je trituracijom tableta ciprofloksacina (Cipromed; 250 mg; Pliva, Zagreb), metronidazola (Medazol; 400 mg; Belupo, Koprivnica) i minociklina (Hiramicin; 100 mg; Pliva, Zagreb) u fini prah. Jednake mase pomiješane su u omjeru 1 : 1 : 1 te razrijeđene sterilnom

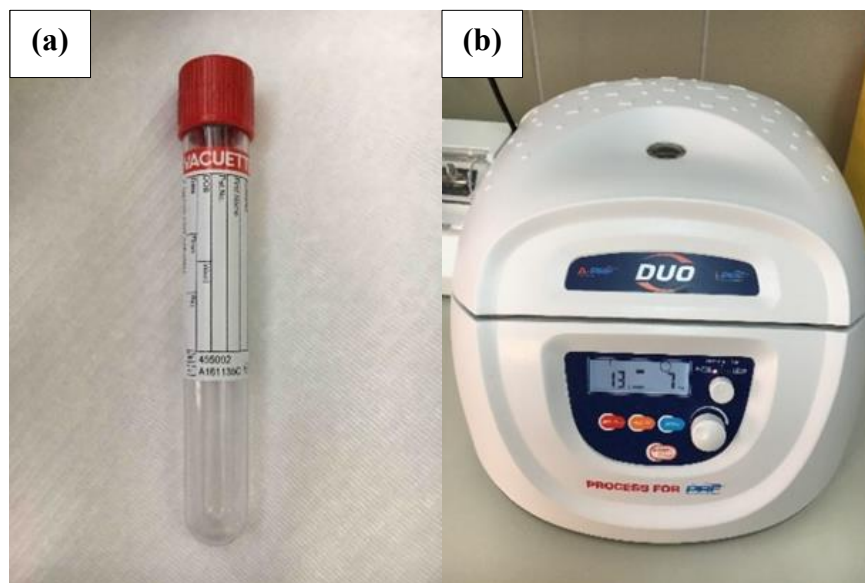
fiziološkom otopinom do približne koncentracije od 5 mg/mL, u skladu s preporukama za regenerativnu endodontsku terapiju (4).

Pasta je aplicirana u korijenski kanal ispod razine cementno-caklinskog spoja s pomoću lentulo-spirale veličine 25 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Švicarska), čime se nastojao umanjiti rizik od diskoloracije uzrokovane minociklinom. Zub je privremeno zatvoren sterilnom vaticom i staklenoionomernim cementom.

3.1.5.3. Treći posjet (tri tjedna nakon početnog zahvata)

3.1.5.3.1. Priprema autolognog A-PRF+ krvnog pripravka

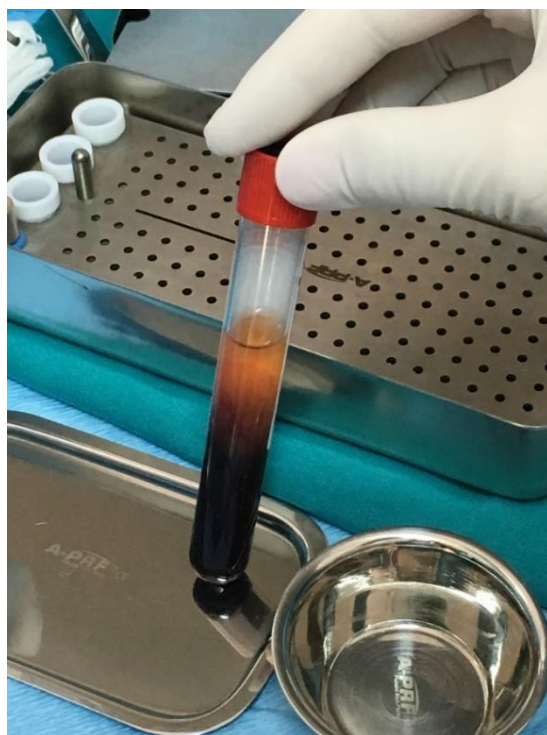
Neposredno prije zahvata autologni A-PRF+ pripravak pripremljen je venepunkcijom i prikupljanjem periferne venske krvi pacijenta u dvije sterilne epruvete volumena od 9 mL, bez dodatka antikoagulansa (VACUETTE® Z Serum Clot Activator; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija) (Slika 1a). Uzorci su potom centrifugirani u uređaju PRF DUO (Process for PRF; Nica, Francuska) (Slika 1b), pri brzini od 1300 okretaja u minuti tijekom 8 minuta.



Slika 1. (a) sterilna epruveta za vensku krv (VACUETTE® Z Serum Clot Activator, 9 mL);
(b) centrifuga PRF DUO (Process for PRF; Francuska)

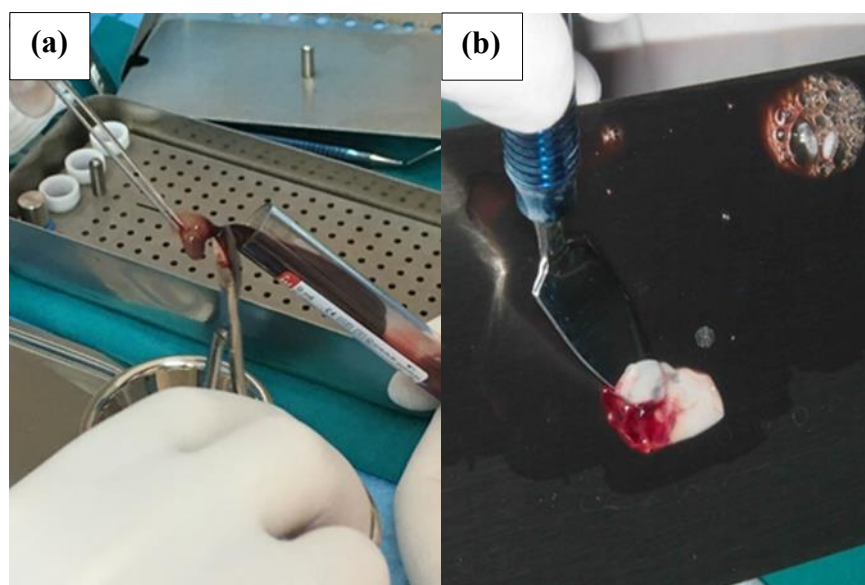
Konačni produkt centrifugiranja sastojao se od triju slojeva (Slika 2):

- gornji sloj – plazma siromašna trombocitima (PPP; engl. *platelet-poor plasma*)
- središnji sloj – A-PRF+ ugrušak
- donji sloj – eritrociti.

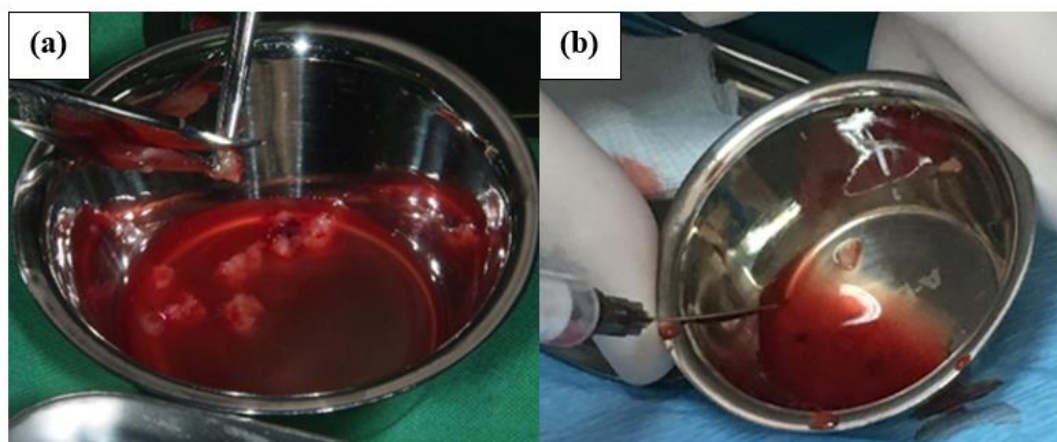


Slika 2. Konačni produkt centrifugiranja: plazma siromašna trombocitima (gornji sloj), A-PRF+ ugrušak (središnji sloj) i eritrociti (donji sloj)

A-PRF+ ugrušak odvojen je od eritrocitnog sloja s pomoću sterilnih kirurških škara (Slika 3a), nakon čega je podijeljen na dva dijela: jedan je dio iskorišten za oblikovanje A-PRF+ membrane (Slika 3b), a drugi je usitnjen za intrakanalnu primjenu (Slika 4a). Plazma siromašna trombocitima (PPP) aspirirana je sterilnom štrcaljkom s iglom i sačuvana za kasniju irigaciju korijenskog kanala (Slika 4b).



Slika 3. (a) odvajanje A-PRF+ ugruška od eritrocitnog sloja s pomoću sterilnih kirurških škara;
(b) oblikovanje A-PRF+ membrane



Slika 4. (a) usitnjavanje A-PRF+ ugruška za intrakanalnu primjenu;
(b) aspiracija plazme siromašne trombocitima (PPP) za intrakanalnu irigaciju

3.1.5.3.2. Postupak A-PRF+ revaskularizacije

Nakon primjene lokalne anestezije bez vazokonstriktora (Mepivastesin; 3M ESPE), zahvat je proveden u kontroliranim aseptičnim uvjetima uz izolaciju zuba koferdamom (Elastidam; Coltene) (Slika 5; korak A). Površina zuba dezinficirana je vaticom natopljenom 5 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita, nakon čega je uklonjen privremeni ispun (Slika 5; korak B).

Triantibiotska pasta uklonjena je ispiranjem s 10 mL sterilne fiziološke otopine (Slika 5; korak C), nakon čega je provedeno završno ispiranje plazmom siromašnom trombocitima (PPP), prethodno izdvojenom iz A-PRF+ pripravka (Slika 5; korak D).

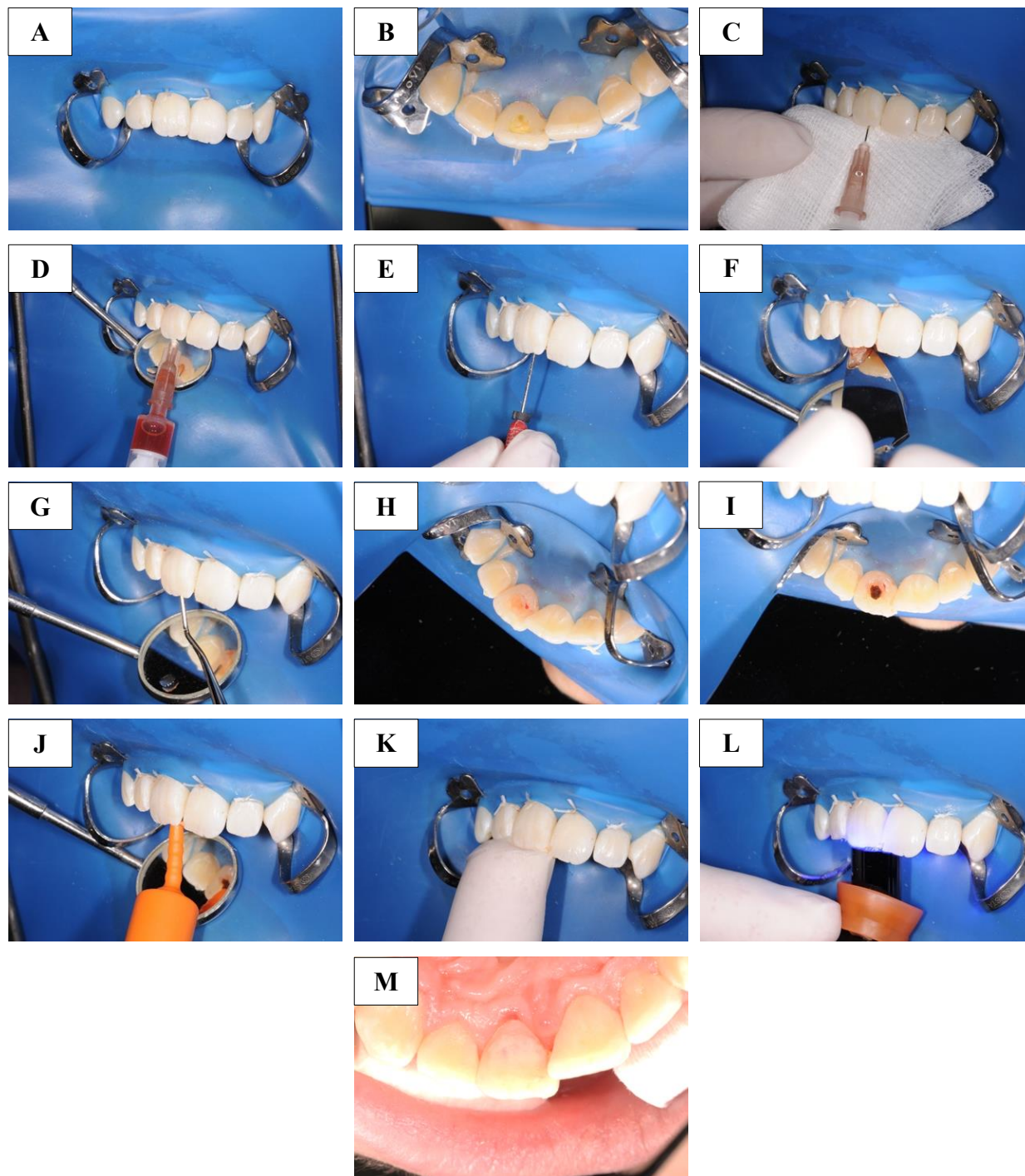
Krvarenje u korijenski kanal potaknuto je blagom preinstrumentacijom periapikalnog tkiva ručnim endodontskim instrumentom – H-strugačem veličine 25 (Medin a.s.) (Slika 5; korak E). Korijen te početni dio (prva trećina) krune zuba punjeni su usitnjenim A-PRF+ ugruškom (Slika 5; koraci F i G), na koji je potom položena A-PRF+ membrana, prethodno oblikovana sterilnim kirurškim škarama kako bi odgovarala dimenzijama kaviteta (Slika 5; korak H).

Radi stabilizacije i zaštite materijala, u kavitet je postavljena želatinozna spužvica (Gelatamp; Roeko) (Slika 5; korak I), nakon čega je zub trajno zatvoren staklenoionomernim cementom (Slika 5; korak J).

Za završnu restauraciju korištena su četiri različita kapsulirana staklenoionomerna cementa:

- Ketac Universal Aplicap (3M ESPE, Njemačka)
- Fuji IX GP Fast (GC Corporation, Tokio, Japan)
- Equia Forte Fil (GC Corporation, Tokio, Japan)
- Glass Carbomer GlassFill (GCP Dental, Nizozemska).

Materijal je premazan tankim slojem vazelina (Slika 5; korak K) i zagrijavan tijekom 60 sekundi LED lampom visokog intenziteta (Bluephase G2; Ivoclar Vivadent; 1200 mW/cm²), bez ugrađenog sustava hlađenja (Slika 5; korak L). Nakon toga je usklađena okluzija, a zub je završno oblikovan i poliran (Slika 5; korak M).



Slika 5. Prikaz postupka A-PRF+ revaskularizacije

3.1.6. Terapija apeksifikacije kalcijevim hidroksidom (kontrolna skupina)

Pacijenti uključeni u kontrolnu skupinu prethodno su liječeni konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, u skladu s važećim kliničkim smjernicama za zbrinjavanje avitalnih trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijena. Terapija se provodila tijekom više posjeta, a klinički tijek obuhvaćao je jasno definirane korake.

Nakon primjene lokalne anestezije i izolacije radnog polja koferdamom, formiran je pristupni kavitet. Uslijedila je minimalna mehanička instrumentacija korijenskog kanala, nakon čega se provodila irigacija – prvo 1 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita, a zatim sterilnom fiziološkom otopinom. Kanal se potom sušio sterilnim papirnatim štapićima, nakon čega se u njega aplicirala pasta kalcijeva hidroksida u funkciji privremenog intrakanalnog medikamenta. Ulaz u kanal zatvaran je sterilnom vaticom i staklenoionomernim cementom.

Intrakanalni medikament mijenjao se svakih jedan do tri mjeseca, ovisno o kliničkoj procjeni i radiološkim nalazima tijekom redovitih kontrola. U skladu s uobičajenom kliničkom praksom, dopuštala su se manja odstupanja u izboru paste kalcijeva hidroksida ili irigansa. Sve su zahvate izvodili specijalisti dječje dentalne medicine, a stomatološka dokumentacija svakog pacijenta temeljito je analizirana kako bi se potvrdilo ispunjavanje svih kriterija uključivanja u istraživanje.

Završetak terapije apeksifikacije definiran je prema unaprijed utvrđenim kriterijima. Terapija se smatrala završenom kada je na radiološkoj snimci bila vidljiva formirana apikalna barijera koja je omogućavala sigurno konvencionalno punjenje korijenskog kanala. U slučajevima u kojima je tijekom liječenja došlo do promjene terapijskog pristupa, završetkom terapije smatrane su i situacije u kojima je postavljen apikalni čep od MTA-a, kao i prijelaz na alternativne regenerativne ili apeksifikacijske postupke. Ovi su kriteriji definirani prema smjernicama koje je naveo Murray (147).

3.1.7. Praćenje i kliničko-radiološka evaluacija

3.1.7.1. Plan kontrolnih pregleda

Kontrolni pregledi provodili su se u unaprijed utvrđenim vremenskim točkama – nakon 1., 3., 6., 9. i 12. mjeseca od završetka terapijske intervencije. Takav je protokol omogućio sustavno, vremenski ujednačeno i metodološki dosljedno praćenje razvoja korijena tijekom postintervencijskog razdoblja.

Tijekom svakog kontrolnog posjeta provodila se standardizirana dijagnostička evaluacija, koja je uključivala:

- klinički pregled
- testiranje vitaliteta pulpe
- standardizirano intraoralno radiološko snimanje.

Početne (referentne) radiološke snimke definirane su kao one načinjene neposredno nakon provedene terapije te su služile kao osnova za sve naknadne usporedbe unutar evaluacijskog razdoblja.

3.1.7.2. Klinički pregled

Standardizirani klinički pregled obuhvaćao je vizualnu procjenu promjene boje zuba usporedbom s kontralateralnim zubom, kao i detekciju znakova upale, uključujući crvenilo, oteklinu ili prisutnost fistuloznog otvora.

Ispitivala se osjetljivost na palpaciju i perkusiju, a bilježena je i eventualna patološka pomičnost zuba, kao i svi ostali klinički znakovi koji bi mogli upućivati na poremećaj procesa cijeljenja ili progresiju patoloških promjena.

U kontrolnoj skupini evaluacija se temeljila na analizi dostupne stomatološke dokumentacije, pri čemu su zabilježeni podatci uspoređeni s navedenim parametrima. S obzirom na retrospektivnu prirodu prikupljenih podataka, postoji mogućnost da pojedini klinički znakovi i simptomi nisu bili dosljedno evidentirani.

3.1.7.3. Klinička evaluacija ispuna

Kako bi se procijenila klinička učinkovitost četiriju staklenoionomernih cemenata koji su se upotrebljavali za završne ispune – Ketac Universal Aplicap, Fuji IX GP Fast, Equia Forte Fil i Glass Carbomer GlassFill – pri svakom se kontrolnom pregledu provodila standardizirana klinička evaluacija ispuna.

Procjena se temeljila na modificiranim kriterijima USPHS-a (engl. *modified United States Public Health Service*), koji predstavljaju općeprihvaćen i znanstveno validiran sustav za evaluaciju restaurativnih materijala u kliničkim ispitivanjima (148).

Tijekom evaluacije analizirani su sljedeći parametri:

- retencija
- rubna diskoloracija
- anatomski oblik
- rubna prilagodba
- prisutnost sekundarnog karijesa
- površinska tekstura.

Svaki od navedenih parametara bodovan je prema trostupanjskoj skali:

- *Alpha* – klinički izvrsno stanje
- *Bravo* – klinički prihvatljivo stanje
- *Charlie* – klinički neprihvatljivo stanje / neuspjeh restauracije.

Primijenjeni kriteriji i sustav bodovanja preuzeti su iz metodologije opisane u radu autora Kaynar i Dönmez (149), a prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Modificirani USPHS kriteriji za kliničku evaluaciju ispuna; prilagođeno prema: Kaynar i Dönmez (149)

USPHS kriterij	Ocjena	Objašnjenje
retencija	<i>Alfa</i> <i>Charlie</i>	nema gubitka ispuna prisutnost bilo kakva gubitka ispuna
rubna diskoloracija	<i>Alfa</i> <i>Bravo</i> <i>Charlie</i>	nema promjene boje uz rub ispuna blaga promjena boje uz rub ispuna izražena promjena boje uz rub ispuna
anatomski oblik	<i>Alfa</i> <i>Bravo</i> <i>Charlie</i>	u potpunosti očuvan izvorni oblik ispuna djelomični gubitak oblika bez potrebe za zamjenom ispuna znatan gubitak oblika; potrebna zamjena ispuna
rubna prilagodba	<i>Alfa</i> <i>Bravo</i> <i>Charlie</i>	nema vidljivih pukotina prisutna pukotina u koju sonda može prodrijeti pukotina s izloženim dentinom
sekundarni karijes	<i>Alfa</i> <i>Charlie</i>	nema znakova sekundarnog karijesa prisutnost sekundarnog karijesa
površinska tekstura	<i>Alfa</i> <i>Bravo</i> <i>Charlie</i>	glatka površina, slična caklini blago hrapava površina; klinički prihvatljivo hrapava površina koja zadržava plak; potrebna zamjena ispuna

3.1.7.4. Radiološka analiza

Radiološka analiza provedena je na standardiziranim intraoralnim periapikalnim snimkama. U eksperimentalnoj skupini (A-PRF+ revaskularizacija) snimke su izrađene neposredno nakon provedbe terapijskog postupka te nakon 1, 3, 6, 9 i 12 mjeseci. U kontrolnoj skupini bile su dostupne isključivo početna i završna snimka, koje su retrospektivno analizirane radi procjene moguće distorzije. U tu svrhu uspoređivane su meziodistalne i incizocervikalne dimenzije krune zuba, a snimke s odstupanjem iznad 10 % isključene su iz analize, u skladu s preporučenim smjernicama za primjenu paralelne tehnike intraoralnog snimanja (145).

Mjerenja su provedena s pomoću softverskog paketa Scanora 5.1 (Soredex, verzija 5.1.0.9; IAM verzija 4.05.0009, Tuusula, Finska). U analizi su korišteni alati za označavanje regija interesa (ROI; engl. *region of interest*), uključujući sljedeće:

- ROI Measuring Length – za precizna linearna mjerenja
- ROI Equalizer – za optimizaciju kontrasta i jasnije definiranje anatomskih granica
- ROI Magnification – za povećanje prikaza radi postizanja veće točnosti mjerenja.

Provedena su sljedeća morfometrijska mjerenja:

- duljina korijena – definirana je kao linearna udaljenost od cementno-caklinskog spoja do vrha korijena. Za svaki zub mjerenja su provedena na mezijalnoj i distalnoj strani, a prosječna duljina korijena izračunana je kao aritmetička sredina tih dviju vrijednosti.
- debljina dentinske stijenke – određena je na razini koja se nalazi na dvije trećine ukupne duljine korijena, mjereno od cementno-caklinskog spoja prema vrhu korijena. Na toj točki izmjerena je ukupna širina korijena i širina pulpnog prostora, a prosječna debljina dentinske stijenke izračunana je kao polovica razlike između navedenih dviju vrijednosti.
- apikalni promjer – određen je na razini vrha korijena kao horizontalna širina apikalnog otvora.

Metodologija mjerenja temeljila se na protokolu koji su opisali Saoud i suradnici (150), čime je osigurana dosljednost s validiranim pristupima radiološke procjene nezrelih avitalnih zuba.

Za potrebe kvantitativne analize učinka terapije analizirane su promjene u sljedećim parametrima usporedbom početne i kontrolnih snimki tijekom vremena:

- produljenje korijena (PK): razlika između prosječne duljine korijena na kontrolnoj i početnoj snimci
- zadebljanje dentinske stijenke (ZDS): razlika između prosječne debljine dentinske stijenke na kontrolnoj i početnoj snimci
- apikalno zatvaranje (AZ): razlika između početnog i kontrolnog apikalnog promjera (početna minus kontrolna vrijednost).

Fokusiranjem na promjene dimenzija tijekom vremena, umjesto na njihove apsolutne vrijednosti, smanjena je varijabilnost uvjetovana prirodnim anatomskim razlikama među ispitanicima, čime je poboljšana usporedivost rezultata između skupina. Sve su promjene prikazane kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($AS \pm SD$), izražene u milimetrima (mm). Radiološka analiza također je uključivala bilježenje prisutnosti (+) ili odsutnosti (–) periapikalne lezije.

3.1.7.5. Testiranje vitaliteta pulpe

Procjena vitaliteta pulpe temeljila se na primjeni subjektivnih testova – testa vitaliteta hladnoćom (TVH) i električnog testa vitaliteta (ETV) – te objektivne metode kvantificiranja cirkulacije unutar pulpnog tkiva – laser-doplerske floumetrije (LDF). Ovakav kombinirani pristup omogućio je pouzdanu i sveobuhvatnu evaluaciju funkcionalnog statusa pulpe tijekom kontrolnog razdoblja, u skladu s recentnim kliničkim istraživanjima koja potvrđuju visoku dijagnostičku vrijednost LDF-a u procjeni vitaliteta traumom zahvaćenih ili nezrelih zuba (151–153).

TVH provodio se uporabom rashladnog sredstva u spreju (Plurasol Kältespray; Pluradent GmbH, Dresden, Njemačka), nanesenog na vaticu koja se potom prislonila na vestibularnu površinu ispitanog zuba. Prije testiranja, zub je bio izoliran vaterolicama i osušen zrakom iz pusteru. Podražaj je primijenjen na liječeni zub te na kontralateralni zdravi zub, koji je služio kao referentna vrijednost. Odgovor pacijenta bilježen je kao pozitivan (+) u slučaju osjeta odnosno negativan (–) ako je osjet izostao.

ETV se provodio s pomoću uređaja PARKELL Model PT-20 (Parkell Inc., Edgewood, NY, SAD). Nakon sušenja i izolacije zuba vaterolicama, na vestibularnu površinu krune apliciran je elektrovodljivi medij (voda), a elektroda vitalometra postavljena je na incizalnu trećinu krune, iznad očekivanog područja novonastalog pulpnog tkiva. Reakcija pacijenta interpretirana je kao pozitivan odgovor (+) u slučaju osjeta, a kao negativan (–) u slučaju izostanka bilo kakve reakcije.

Za objektivnu procjenu protoka krvi kroz pulpno tkivo, kod svakog je ispitanika jednom tijekom razdoblja praćenja provedeno mjerenje LDF-om, i to pri kontrolnom pregledu u 9. ili 12. mjesecu. Mjerenje je izvedeno s pomoću uređaja Laser Blood Flow Monitor MBF3/D (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK), koji djeluje na valnoj duljini od 780 do 785 nm, uz izlaznu snagu od 1,0 mW i frekvenciju uzorkovanja od 40 Hz. Korišten je jedan mjerni kanal, a parametar fluks (engl. *flux*) bilježen je tijekom dvominutnog kontinuiranog snimanja. Fluks predstavlja umnožak koncentracije i prosječne brzine kretanja eritrocita te se upotrebljava kao neinvazivni pokazatelj mikrocirkulacije unutar pulpnog tkiva. Kontinuirani signal fluksa tijekom mjerenja interpretiran je kao pozitivan odgovor (+), dok je izostanak ili prekid signala označen kao negativan odgovor (–).

Radi standardizacije mjernog postupka i minimizacije interferencije mekih tkiva, svakom je ispitaniku izrađen individualni držač sonde od hidrokoloidnog otisnog materijala (Correct Plus;

Kerr Pentron, Uxbridge, UK). Sonda je bila fiksirana na cervikalnu trećinu krune zuba, otprilike 5 mm od ruba gingive, što je omogućilo stabilnu i ponovljivu registraciju signala (153).

3.1.7.6. Pokazatelji ishoda liječenja

Primarni ishod ovog istraživanja bile su kvantitativne promjene morfometrijskih parametara zuba, koje su obuhvaćale:

- produljenje korijena (PK)
- zadebljanje dentinske stijenke (ZDS)
- apikalno zatvaranje (AZ).

Svaka od navedenih promjena izračunana je kao razlika između početnih (referentnih) i kontrolnih vrijednosti dobivenih radiološkim mjerenjem. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($AS \pm SD$), izraženi u milimetrima (mm).

Sekundarni pokazatelji ishoda uključivali su:

- prisutnost ili odsutnost periapikalne lezije
- rezultate testova vitaliteta pulpe – test vitaliteta hladnoćom (TVH), električni test vitaliteta (ETV) i laser-doplerska floumetrija (LDF)
- očuvanost zuba u oralnoj šupljini (preživljenje zuba)
- pojavu neželjenih kliničkih nalaza, poput promjene boje zuba ili patološke pomičnosti.

Kategorijske varijable (npr. odgovori na testove vitaliteta i prisutnost kliničkih simptoma) bilježene su kao prisutan (+) ili odsutan (–), a rezultati su prikazani u obliku postotaka.

3.1.8. Alokacija i zaslijepljivanje

Istraživanje je provedeno kao otvoreno ispitivanje u kojem ni sudionici, ni kliničari, ni procjenjivači ishoda nisu bili zaslijepljeni tijekom terapijskog postupka. Unatoč tomu, primijenjene su mjere za smanjenje potencijalne pristranosti.

Alokacija u skupine nije bila randomizirana zbog metodoloških ograničenja – eksperimentalna skupina uključena je prospektivno, dok je kontrolna skupina odabrana retrospektivno iz baze povijesnih slučajeva koji su zadovoljavali kriterije uključivanja. Kako bi se smanjila selekcijska pristranost, 28 kontrolnih slučajeva nasumično je odabrano iz skupa od 47 dostupnih zapisa.

Radiološka mjerenja provedena su na kodiranim snimkama kako bi se smanjila mogućnost identifikacije slučaja i vremenske točke praćenja. Mjerenja je izveo educirani ispitivač prema prethodno definiranom protokolu, primjenjujući standardiziranu metodu radi ograničavanja subjektivne pristranosti.

Kontrolne preglede – uključujući kliničke evaluacije i testiranja vitaliteta pulpe – proveli su neovisni kliničari koji nisu sudjelovali u početnoj fazi liječenja. Navedene su mjere pridonijele smanjenju ispitivačke pristranosti i poboljšanju interne valjanosti procjene ishoda.

3.2. Laboratorijska studija

3.2.1. Dizajn laboratorijske studije

In vitro laboratorijska studija provedena je uz odobrenje Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 05-PA-24-2/2018). Ekstrahirani intaktni trajni molari pribavljeni su u suradnji sa Zavodom za oralnu kirurgiju navedene ustanove. Budući da su zubi izvađeni isključivo iz kliničkih razloga koji nisu bili povezani s ovim istraživanjem, njihova uporaba u znanstvene svrhe nije zahtijevala zasebnu, potpisanu informiranu suglasnost pacijenata.

U istraživanju je korišteno ukupno 12 intaktnih trajnih molara, ravnomjerno raspoređenih u četiri skupine, pri čemu je svaka skupina odgovarala jednoj vrsti analiziranog staklenoionomernog cementa. Mikrostrukturna analiza ispitivanih materijala i okolnog zubnog tkiva provedena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom s emisijom elektrona iz polja (FE-SEM; engl. *field emission scanning electron microscopy*), dok je mikrokemijska analiza provedena energijsko-disperzijskom rendgenskom spektroskopijom (EDS; engl. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*).

Ispitivani su sljedeći kapsulirani staklenoionomerni cementi:

- Ketac Universal Aplicap (3M ESPE, Seefeld, Njemačka) (K): konvencionalni SIC temeljen na fluoroaluminosilikatnom staklu, s tekućom fazom koja sadržava kopolimer poliakrilne i maleinske kiseline te dodatak vinske kiseline (154)
- Fuji IX GP Fast (GC Corporation, Tokio, Japan) (F): viskozni konvencionalni SIC koji sadržava stroncij-fluoroaluminosilikatno staklo i poliakrilnu kiselinu (155)
- Equia Forte Fil (GC Corporation, Tokio, Japan) (E): viskozni konvencionalni SIC u kombinaciji sa smolastim zaštitnim premazom koji poboljšava otpornost na trošenje (156)
- Glass Carbomer GlassFill (GCP Dental, Vianen, Nizozemska) (G): unaprijeđena formulacija koja uključuje fluoroaluminosilikatno staklo, nanočestice hidroksiapatita i bioaktivno staklo (157).

3.2.2. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka provedena je na prethodno ekstrahiranim trajnim molarima. Nakon odvajanja krunskog dijela od korijena, na bukalnoj i oralnoj plohi svake krune izrađeni su standardizirani kaviteti kružnog oblika u području cervikalne trećine (promjer 2 mm, dubina 2 mm), s pomoću obrnuto koničnog dijamantnog svrdla, uz vodeno hlađenje.

Površine kaviteta kondicionirane su 5 %-tnom otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl; Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) tijekom 5 sekundi, potom isprane vodom i osušene zrakom iz pustera. Staklenoionomerni cementi (K, F, E, G) aplicirani su u kavitete u skladu s uputama proizvođača. Površine ispuna izolirane su vazelinom te su zagrijavane tijekom 60 sekundi uporabom polimerizacijske lampe bez ugrađenog sustava hlađenja (Bluephase G2; Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn; 1200 mW/cm²).

Nakon stvrdnjavanja uzorci svakog materijala pohranjeni su zasebno u umjetnoj slini (sastav: 0,5 g/L NaCl; 4,2 g/L NaHCO₃; 0,03 g/L NaNO₃; 0,2 g/L KCl) tijekom razdoblja od 1 tjedna, 6 mjeseci i 12 mjeseci, kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija i osigurali neovisni profili izmjene iona. Otopina se mijenjala tjedno kako bi se održala ionska ravnoteža i smanjio rast mikroorganizama.

Neposredno prije FE-SEM/EDS analize uzorci su ugrađeni u standardne cilindrične kalupe s pomoću epoksidne smole (Clarocit; Struers, Ballerup, Danska), a zatim rezani na debljinu od 2 mm preciznom rezalicom pri niskoj brzini (Minitom; Struers, Ballerup, Danska; 150 okr/min), uz kontinuirano vodeno hlađenje.

3.2.3. Veličina uzorka i statistička snaga

Ukupno su pripremljena 24 trajna molara, od kojih je 12 korišteno za analizu ($n = 3$ po skupini), dok je preostalih 12 uzoraka – po 3 u svakoj skupini – služilo kao pričuva u slučaju gubitka ili oštećenja tijekom rezanja i manipulacije. Analitička veličina uzorka ($n = 3$ po skupini) odabrana je radi osiguravanja odgovarajuće statističke snage ($1 - \beta \geq 0,80$) za detekciju srednjih do velikih razlika u koncentraciji kemijskih elemenata između četiriju ispitivanih skupina materijala. Veličina učinka procijenjena je korištenjem Cohenova koeficijenta f . Ova veličina uzorka procijenjena je dostatnom za identifikaciju statistički značajnih razlika pri razini značajnosti $\alpha = 0,05$. Analiza statističke snage potvrdila je sposobnost studije za minimizaciju pogreške drugog tipa (β).

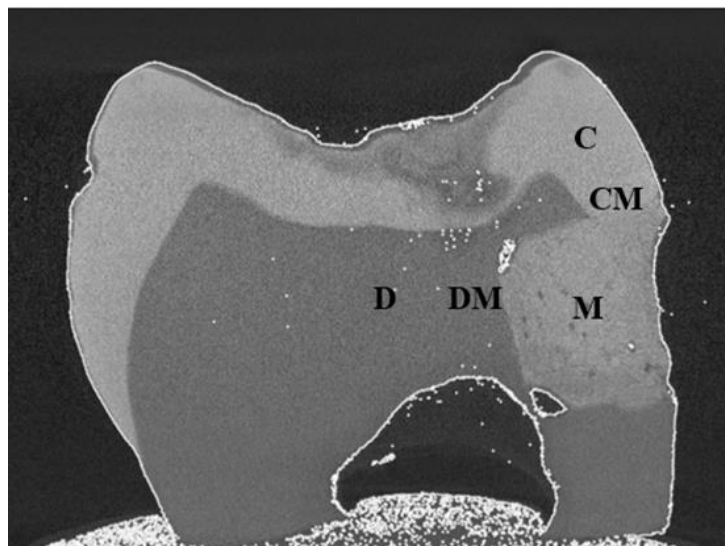
3.2.4. FE-SEM/EDS metodologija

Metodološki pristup korišten u ovom istraživanju u velikoj je mjeri usklađen s prethodnim studijama koje su se služile FE-SEM i EDS analizama za ispitivanje mikrokemijskih i mikrostrukturnih svojstava dentalnih materijala (158–160).

Analize su provedene s pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa s emisijom elektrona iz polja (FE-SEM; JSM-7000F, JEOL, Tokio, Japan), opremljenog energijsko-disperzijskim rendgenskim spektrometrom (EDS; INCA Energy 350, Oxford Instruments, Belfast, UK) na svim uzorcima (K, F, E i G) nakon pohrane u umjetnoj slini tijekom 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci.

Radi bolje električne vodljivosti svi su uzorci napareni tankim slojem zlata i paladija s pomoću uređaja za napanje (Gatan 682 PECS; Gatan Inc., Pleasanton, CA, SAD). Električna vodljivost uzorka nužna je kako bi se izbjeglo nakupljanje naboja (engl. *charging*) na njegovoj površini, a time i znatna degradacija kvalitete slike.

Na slici 6 prikazana je kompjutorizirana tomografska (CT) snimka reprezentativnog uzorka s označenim regijama predviđenima za EDS analizu.



Slika 6. CT prikaz reprezentativnog uzorka s označenim regijama EDS analize: C – caklina udaljena od materijala; D – dentin udaljen od materijala; M – restaurativni materijal; CM – caklina u kontaktu s materijalom; DM – dentin u kontaktu s materijalom; prema Turjanski i sur. (161)

Za potrebe FE-SEM analize snimanje je provedeno pri radnom naponu od 10 kV. Pregledna mikrostrukturalna analiza regija C, D i M provedena je pri povećanju od 300×, dok je analiza regija CM i DM provedena pri povećanju od 2000×.

Kvantitativna analiza elemenata provedena je uporabom standardnih kalibracijskih krivulja za svaki pojedini element. Kemijski sastav određen je s pomoću softverskog paketa INCA Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, verzija 2.1 (Oxford Instruments, Belfast, UK), koji primjenjuje korekciju pozadinske buke te prikazuje koncentracije elemenata u obliku masenih udjela (wt. %).

Tijekom analize praćeni su sljedeći elementi: fluor (F), aluminiј (Al), silicij (Si), fosfor (P), kalcij (Ca) i stroncij (Sr).

Za potrebe EDS analize provedeno je jedno mjerenje na većem analiziranom polju dimenzija $300 \times 250 \mu\text{m}$ (pri povećanju od 300×) za sljedeće regije:

- C – caklina udaljena od materijala
- D – dentin udaljen od materijala
- M – restaurativni materijal.

Rezultati mjerenja u regijama C i D, dobiveni nakon jednog tjedna, korišteni su za određivanje inicijalnog kemijskog sastava cakline (C_0) i dentina (D_0), koji su poslužili kao referentne vrijednosti za usporedbu s rezultatima iz regija CM i DM (caklina i dentin u neposrednom kontaktu s materijalom) u svim vremenskim točkama ispitivanja (1 tjedan, 6 i 12 mjeseci).

Dodatno, provedena su tri ponovljena mjerenja na manjim analiziranim poljima dimenzija $45 \times 15 \mu\text{m}$ (pri povećanju od $2000\times$), koja su obuhvaćala $45 \mu\text{m}$ duž kontaktne površine i $15 \mu\text{m}$ u dubinu cakline ili dentina, u sljedećim regijama:

- CM – caklina u neposrednom kontaktu s materijalom
- DM – dentin u neposrednom kontaktu s materijalom.

Svi su rezultati EDS analize prikazani kao maseni udjeli (wt. %).

3.3. Metode statističke analize podataka

Statistička analiza provedena je korištenjem softverskog paketa Statistics and Machine Learning Toolbox, verzija R2023b (MathWorks Inc., Natick, MA, SAD). Za sve varijable primijenjena je deskriptivna statistika, uključujući izračun aritmetičkih sredina (AS), standardnih devijacija (SD) i 95-postotnih intervala pouzdanosti (CI). Kategorijalne varijable prikazane su kao apsolutne i relativne frekvencije.

Normalnost distribucije ispitana je s pomoću Shapiro–Wilkova i Kolmogorov–Smirnovljeva testa, dok je homogenost varijanci procijenjena Leveneovim testom.

Usporedbe među skupinama temeljile su se na vrsti i distribuciji podataka:

- za kontinuirane varijable koje su zadovoljavale pretpostavku normalnosti korišten je Studentov t-test
- za varijable koje nisu imale normalnu distribuciju primijenjen je Mann–Whitneyjev U-test.

Kategorijalne varijable uspoređene su hi-kvadrat testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom kada su očekivane frekvencije bile niske.

Za usporedbu više skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), dok su u slučajevima kada nisu bili zadovoljeni preduvjeti za primjenu ANOVA-e (npr. nenormalna distribucija, heterogenost varijance, mala veličina uzorka) korištene neparametrijske metode, uključujući:

- Kruskal–Wallisov test
- *bootstrap* metode ponovnog uzorkovanja.

Za potrebe *post hoc* analiza nakon ANOVA-e korišten je Tukeyjev HSD test.

Za potrebe laboratorijskog dijela istraživanja definirani su kumulativni indeksi interakcije restaurativnih materijala s caklinom i dentinom, temeljeni na zbrojevima masenih udjela (wt. %) odabranih elemenata. Indeksi su izračunani zasebno za caklinu i za dentin, prema istom metodološkom načelu. Korišteni su kao deskriptivni pokazatelji za usporedbu ispitivanih materijala te nisu bili podvrgnuti inferencijalnoj statističkoj analizi. Rezultati su prikazani rangiranjem materijala prema vrijednostima pojedinih indeksa, bez izračuna p-vrijednosti ili intervala pouzdanosti.

U svrhu modeliranja prediktivnih čimbenika apikalnog zatvaranja u skupini A-PRF+ primijenjena je linearna regresijska analiza. Veličina učinka procijenjena je Cohenovim koeficijentom f^2 , dok je snaga testa $(1 - \beta)$ izračunana kako bi se procijenila pouzdanost dobivenih rezultata.

Statistička značajnost definirana je na razini $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati kliničke studije

Većina rezultata prikazanih u ovom potpoglavlju temelji se na ranije objavljenom istraživanju Turjanski i suradnika (146), u kojem su detaljno opisani klinički protokol, korišteni materijali i metode evaluacije. U nastavku su prikazani najvažniji nalazi, uz dodatne analize i interpretacije koje proširuju kontekst istraživanja u okviru ove disertacije.

4.1.1. Početna demografska i klinička obilježja ispitanika

Analizom početnih karakteristika ispitanika utvrđeno je da su A-PRF+ i kontrolna skupina bile međusobno usporedive u pogledu dobi, spola, etiologije nekroze pulpe, tipa zuba te prisutnosti periapikalnih lezija. Statističke analize nisu pokazale značajne razlike između skupina u navedenim varijablama (Studentov t-test za dob; Fisherov egzaktni test za ostale kategorijske podatke).

Iako je u skupini A-PRF+ zabilježen nešto veći prosječni apikalni promjer u odnosu na kontrolnu skupinu ($1,63 \pm 0,90$ mm naspram $1,14 \pm 0,44$ mm), ta razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti (Mann–Whitneyjev U-test, $p = 0,08$). Detaljan pregled početnih demografskih i kliničkih pokazatelja prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Početna demografska i klinička obilježja ispitanika u A-PRF+ i kontrolnoj skupini; prema Turjanski i sur. (146)

Varijabla	A-PRF+ skupina (n = 28)	Kontrolna skupina (n = 28)
dob, godine (AS $\pm$ SD)	$11,36 \pm 2,39$	$11,57 \pm 2,08$
raspon dobi, godine	8–17	8–15
muški spol, n (%)	13 (46,4)	19 (67,9)
ženski spol, n (%)	15 (53,6)	9 (32,1)
karijes, n (%)	9 (32,1)	13 (46,4)
trauma, n (%)	19 (67,9)	15 (53,6)
gornji središnji sjekutić, n (%)	24 (85,7)	25 (89,3)
gornji bočni sjekutić, n (%)	1 (3,6)	3 (10,7)
donji drugi pretkutnjak, n (%)	3 (10,7)	0 (0)
Cvek stadij 1/2/3/4, n (%) *	8/5/7/8 (28,6/17,9/25/28,6)	1/5/11/11 (3,6/17,9/39,3/39,3)
periapikalna lezija, n (%)	12 (42,9)	12 (42,9)
trajanje terapije, mjeseci **	12	$8,64 \pm 2,78$

* Cvek stadij: 1 – apikalni promjer > 2 mm; 2 – apikalni promjer $1,5 - 2$ mm; 3 – apikalni promjer $1 - 1,49$ mm; 4 – apikalni promjer $0,6 - 0,99$ mm.

** U A-PRF+ skupini, trajanje praćenja protokolom je određeno na 12 mjeseci.

4.1.2. Klinički ishodi

Tijekom razdoblja praćenja u objema skupinama – eksperimentalnoj i kontrolnoj – nije zabilježen ni jedan slučaj gubitka zuba. U eksperimentalnu je skupinu u početku bilo uključeno 30 slučajeva, no dva su isključena zbog neredovitih dolazaka na kontrolne preglede pa je konačna analiza provedena na 28 slučajeva. Praćenje je provedeno prospektivno tijekom razdoblja od 12 mjeseci.

U kontrolnu je skupinu nasumično uključen jednak broj retrospektivnih slučajeva ($n = 28$), s prosječnim trajanjem terapije od $8,6 \pm 2,8$ mjeseci, također bez zabilježenih gubitaka zuba.

U eksperimentalnoj su skupini kliničke evaluacije provedene na svakoj kontrolnoj točki te su uključivale procjenu vitaliteta, znakova upale, osjetljivosti na palpaciju i perkusiju, patološke pomičnosti te promjene boje zuba. Nisu zabilježeni nikakvi patološki nalazi.

U kontrolnoj skupini analiza dostupne kliničke dokumentacije nije upućivala na prisutnost simptoma, komplikacija ili promjene boje, premda valja uzeti u obzir mogućnost nesustavnoga bilježenja pojedinih podataka.

4.1.3. Rezultati kliničke evaluacije ispuna

Tijekom jednogodišnjeg praćenja ispuni izrađeni od četiriju različitih staklenoionomernih cemenata – Ketac Universal Aplicap (K), Fuji IX GP Fast (F), Equia Forte Fil (E) i Glass Carbomer GlassFill (G) – pokazali su zadovoljavajuće kliničke karakteristike prema modificiranim USPHS kriterijima. Evaluacija se kontinuirano provodila na nekoliko vremenskih točaka, no u tablici 5 prikazani su isključivo rezultati nakon 12 mjeseci jer prethodne kontrole nisu pokazale klinički značajna odstupanja.

Nakon 12 mjeseci retencija ispuna bila je potpuna za sve analizirane materijale, bez zabilježenih slučajeva njihova gubitka; svi su ispuni ocijenjeni ocjenom *Alpha* (100 %). Manja odstupanja uočena su kod materijala K i F, gdje je po jedan ispun (14 %) ocijenjen ocjenom *Bravo* u kategorijama rubne diskoloracije, anatomskog oblika i rubne prilagodbe, dok su svi ostali ispuni u tim skupinama dobili ocjenu *Alpha*. Nasuprot tomu, ispuni izrađeni od materijala E i G zadržali su ocjenu *Alpha* u svim ocjenjivanim kategorijama.

U kategoriji površinske teksture uočen je dosljedan obrazac: svi ispuni izrađeni od materijala K i F ocijenjeni su ocjenom *Bravo*, dok su ispuni od materijala E i G u svim slučajevima zadržali ocjenu *Alpha*. Sekundarni karijes nije zabilježen ni kod jednog ispuna, neovisno o korištenom materijalu.

Zbog ograničenog broja ispitanika ($n = 7$ po skupini), formalna statistička analiza razlika među skupinama nije provedena. Ipak, opisni rezultati pokazuju stabilna i klinički prihvatljiva svojstva svih analiziranih materijala tijekom 12-mjesečnog razdoblja, bez znakova klinički značajnih pogoršanja.

Tablica 5. Rezultati kliničke evaluacije četiriju staklenoionomernih cemenata prema modificiranim USPHS kriterijima, nakon 12 mjeseci praćenja ($n = 7$ po skupini)

Kriterij (USPHS)	Ocjena	K, n (%)	F, n (%)	E, n (%)	G, n (%)
retencija	<i>Alpha</i>	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
rubna diskoloracija	<i>Alpha</i>	6 (86)	6 (86)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	1 (14)	1 (14)	0 (0)	0 (0)
anatomski oblik	<i>Alpha</i>	6 (86)	6 (86)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	1 (14)	1 (14)	0 (0)	0 (0)
rubna prilagodba	<i>Alpha</i>	6 (86)	6 (86)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	1 (14)	1 (14)	0 (0)	0 (0)
sekundarni karijes	<i>Alpha</i>	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
površinska tekstura	<i>Alpha</i>	0 (0)	0 (0)	7 (100)	7 (100)
	<i>Bravo</i>	7 (100)	7 (100)	0 (0)	0 (0)

4.1.4. Rezultati radiološke analize

Radiološkom evaluacijom tijekom razdoblja praćenja nije zabilježen ni jedan slučaj frakture korijena, interne ni eksterne resorpcije, niti pojava nove periapikalne patologije, i to ni u eksperimentalnoj skupini (A-PRF+) ni u kontrolnoj skupini (apeksifikacija kalcijevim hidroksidom).

U objema je skupinama, na referentnim radiološkim snimkama, zabilježena radiolucencija karakteristična za periapikalne lezije u 12 slučajeva. U skupini A-PRF+, 75 % lezija ($n = 9$) pokazivalo je radiološke znakove cijeljenja već do trećeg mjeseca praćenja, dok je u preostala tri

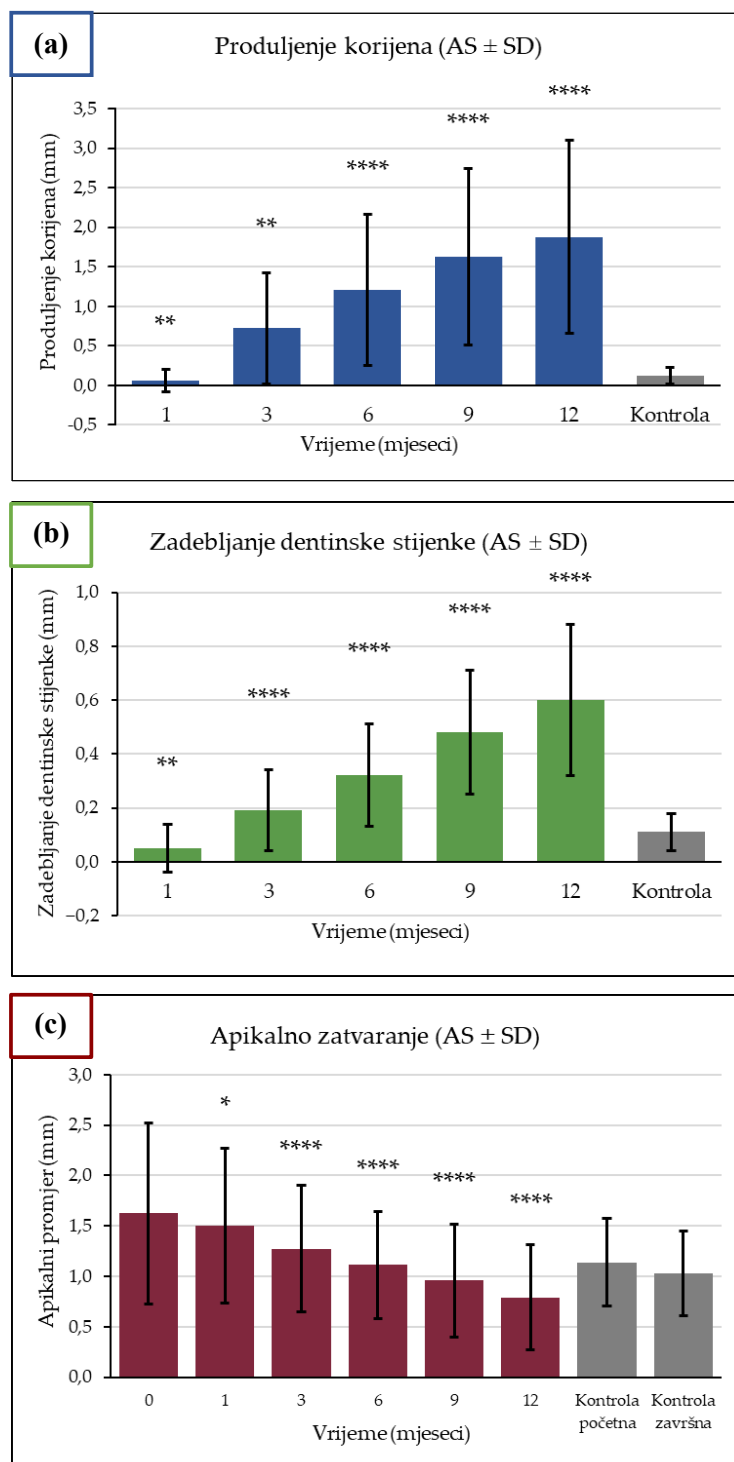
slučaja i dalje bila prisutna rezidualna periapikalna radiolucencija. Potpuno radiološko cijeljenje zabilježeno je kod svih ispitanika do devetog mjeseca praćenja. U kontrolnoj su skupini sve periapikalne lezije osim jedne pokazale potpuno cijeljenje do kraja terapijskog razdoblja.

Značajna i progresivna poboljšanja zabilježena su u svim analiziranim radiološkim parametrima – produljenju korijena (PK), zadebljanju dentinske stijenke (ZDS) i apikalnom zatvaranju (AZ) – u skupini A-PRF+ u usporedbi s kontrolnom skupinom, što je prikazano u tablici 6 i na slici 7. Reprezentativne radiološke snimke koje ilustriraju te razlike prikazane su na slici 8.

Tablica 6. Kvantitativni radiološki ishodi produljenja korijena (PK), zadebljanja dentinskih stijenki (ZDS) i apikalnog zatvaranja (AZ) u A-PRF+ i kontrolnoj skupini; prema Turjanski i sur. (146)

Ishod	Skupina	Vrijeme (mjeseci)	AS $\pm$ SD (mm)	n/28 (%)	p-vrijednost
PK	A-PRF+	1	$0,06 \pm 0,14$	7/28 (25 %)	0,0019 **
		3	$0,72 \pm 0,71$	21/28 (75 %)	0,0011 **
		6	$1,21 \pm 0,95$	25/28 (89 %)	< 0,0001 ****
		9	$1,62 \pm 1,12$	26/28 (93 %)	< 0,0001 ****
		12	$1,88 \pm 1,22$	26/28 (93 %)	< 0,0001 ****
	kontrola	završno mjerenje	$0,12 \pm 0,10$	19/28 (68 %)	–
ZDS	A-PRF+	1	$0,05 \pm 0,09$	9/28 (32 %)	0,0011 **
		3	$0,19 \pm 0,15$	23/28 (82 %)	< 0,0001 ****
		6	$0,32 \pm 0,19$	27/28 (96 %)	< 0,0001 ****
		9	$0,48 \pm 0,23$	28/28 (100 %)	< 0,0001 ****
		12	$0,60 \pm 0,28$	28/28 (100 %)	< 0,0001 ****
	kontrola	završno mjerenje	$0,11 \pm 0,07$	23/28 (82 %)	–
AZ	A-PRF+	1	$0,12 \pm 0,22$	9/28 (32 %)	0,037 *
		3	$0,35 \pm 0,38$	20/28 (71 %)	< 0,0001 ****
		6	$0,51 \pm 0,43$	27/28 (96 %)	< 0,0001 ****
		9	$0,67 \pm 0,44$	28/28 (100 %)	< 0,0001 ****
		12	$0,84 \pm 0,51$	28/28 (100 %)	< 0,0001 ****
	kontrola	završno mjerenje	$0,12 \pm 0,09$	22/28 (79 %)	–

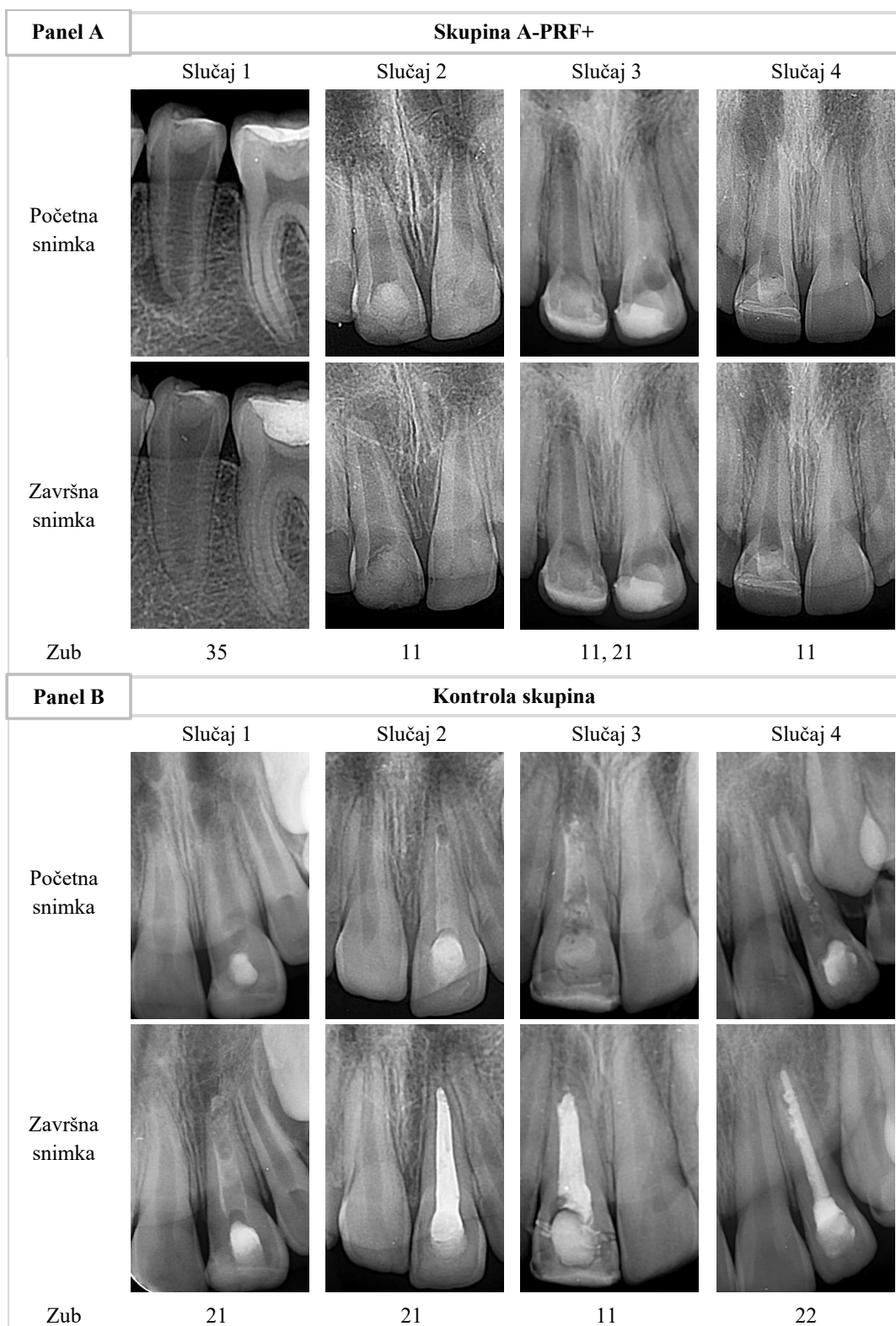
† Statistička značajnost (Mann–Whitneyjev U-test): * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.



† Statistička značajnost (Mann–Whitneyjev U-test):

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Slika 7. (a) produljenje korijena, (b) zadebljanje dentinske stijenke i (c) apikalno zatvaranje u A-PRF+ i kontrolnoj skupini tijekom promatranog vremenskog razdoblja; prema Turjanski i sur. (146)



Slika 8. Radiološke snimke reprezentativnih slučajeva: (Panel A) A-PRF+ skupina, (Panel B) kontrolna skupina – početno i završno stanje; prema Turjanski i sur. (146)

4.1.4.1. Produljenje korijena

U eksperimentalnoj skupini, liječenoj protokolom A-PRF+, tijekom dvanaestomjesečnog praćenja zabilježen je jasan, vremenski ovisan porast duljine korijena. Početno produljenje uočeno je već nakon prvog mjeseca praćenja ($0,06 \pm 0,14$ mm), uz terapijski učinak u 25 % slučajeva. Produljenjem razdoblja praćenja zabilježen je postupni porast vrijednosti produljenja korijena: u trećem i šestom mjesecu prosječne vrijednosti iznosile su $0,72 \pm 0,71$ mm (75 %) i $1,21 \pm 0,95$ mm (89 %). U devetom mjesecu produljenje je zabilježeno u 93 % slučajeva ($1,62 \pm 1,12$ mm), dok je na završnoj, dvanaestomjesečnoj kontroli prosječno produljenje korijena iznosilo $1,88 \pm 1,22$ mm, uz jednak udio pozitivnog terapijskog učinka.

U kontrolnoj skupini liječenoj postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom produljenje korijena bilo je znatno ograničeno te je iznosilo $0,12 \pm 0,10$ mm, uz pozitivan nalaz u 68 % slučajeva.

Statistička je analiza potvrdila značajne razlike između skupina već pri prvoj kontrolnoj točki ($p = 0,0019$), dok su u svim kasnijim vremenskim točkama razlike bile visoko statistički značajne ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 7a). Na završnoj kontrolnoj točki zabilježen je izražen klinički relevantan terapijski učinak, potvrđen vrlo snažnom veličinom učinka u korist A-PRF+ protokola (Cohenov $d = 2,03$).

4.1.4.2. Zadebljanje dentinske stijenke

Uz produljenje korijena, u eksperimentalnoj skupini zabilježeno je i postupno zadebljanje dentinske stijenke tijekom praćenja. Pozitivne promjene uočene su već u ranim fazama terapije, pri čemu su do trećeg mjeseca zabilježene u više od 80 % slučajeva. Od šestog mjeseca nadalje gotovo svi analizirani zubi (96 – 100 %) pokazali su mjerljivo zadebljanje dentinske stijenke.

Na završnoj, dvanaestomjesečnoj kontroli prosječno zadebljanje dentinske stijenke u skupini A-PRF+ iznosilo je $0,60 \pm 0,28$ mm. U kontrolnoj skupini zabilježena je znatno niža prosječna vrijednost zadebljanja ($0,11 \pm 0,07$ mm), uz sporiji i manje izražen porast tijekom praćenja.

Razlike između skupina bile su statistički značajne već u prvom mjesecu praćenja ($p = 0,0011$), dok su u kasnijim vremenskim točkama dosegnule visoku razinu statističke značajnosti ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 7b). Analiza veličine učinka na završnoj kontrolnoj točki upućuje na vrlo snažan učinak A-PRF+ protokola u odnosu na konvencionalnu terapiju (Cohenov $d = 2,40$).

4.1.4.3. Apikalno zatvaranje

U skupini A-PRF+ tijekom praćenja zabilježen je postupni proces apikalnog zatvaranja, izražen kontinuiranim smanjenjem apikalnog promjera. Početno smanjenje uočeno je već nakon prvog mjeseca ($0,12 \pm 0,22$ mm; 32 % slučajeva), dok je do trećeg mjeseca zabilježeno u 71 % slučajeva. U šestom mjesecu smanjenje apikalnog promjera bilo je prisutno u 96 % slučajeva, a na završnoj, dvanaestomjesečnoj kontroli prosječno smanjenje iznosilo je $0,84 \pm 0,51$ mm, uz pozitivan nalaz kod svih analiziranih zuba.

U kontrolnoj skupini prosječno smanjenje apikalnog promjera iznosilo je $0,12 \pm 0,09$ mm, uz pozitivan nalaz u 79 % slučajeva.

Statistička analiza potvrdila je značajne razlike između skupina već u prvom mjesecu praćenja ($p = 0,037$), dok su u svim kasnijim vremenskim točkama razlike bile visoko statistički značajne ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 7c). Dodatna analiza veličine učinka na završnoj kontrolnoj točki potvrđuje snažan učinak A-PRF+ protokola na apikalno zatvaranje u usporedbi s konvencionalnom terapijom (Cohenov $d = 1,97$).

Analiza vremenske dinamike pokazala je da su promjene produljenja korijena, zadebljanja dentinske stijenke i apikalnog zatvaranja slijedile usporediv obrazac, s približno linearnim tijekom te najizraženijim promjenama u razdoblju između trećeg i šestog mjeseca praćenja, nakon čega je zabilježena stabilizacija intenziteta promjena.

4.1.4.4. Radiološka procjena apikalnog promjera i terapijskih ishoda

U tablici 7 prikazana je raspodjela apikalnih promjera na početku i na završnom kontrolnom pregledu za A-PRF+ i kontrolnu skupinu, uz njihovu kategorizaciju prema kliničkoj prikladnosti za provođenje daljnje konvencionalne endodontske terapije. Ishodi terapije klasificirani su na temelju širine apikalnog promjera, koja je korištena kao objektivan pokazatelj stupnja zatvaranja apeksa i prikladnosti uvjeta za nastavak liječenja.

Definirane su sljedeće kategorije ishoda:

- negativan ishod: apikalni promjer $> 1,00$ mm – nepovoljni uvjeti za provedbu konvencionalne endodontske terapije
- dobar ishod: apikalni promjer $0,51 - 1,00$ mm – terapija je tehnički izvediva, ali potencijalno otežana
- vrlo dobar ishod: apikalni promjer $0,11 - 0,50$ mm – omogućuje povoljne uvjete za provedbu terapije
- izvrstan ishod: apikalni promjer $\leq 0,10$ mm – predstavlja optimalne uvjete za provedbu konvencionalne endodontske terapije.

Tablica 7. Terapijski ishodi prema apikalnom promjeru na početnom i završnom mjerenju u A-PRF+ i kontrolnoj skupini; prema Turjanski i sur. (146)

Procjena	Apikalni promjer (mm)	A-PRF+ skupina n (%)	Kontrolna skupina n (%)	Terapijski ishod
početno mjerenje	$> 2,00$	8 (28,6 %)	1 (3,6 %)	
	1,50–2,00	5 (17,9 %)	5 (17,9 %)	
	1,00–1,49	7 (25,0 %)	11 (39,3 %)	
	0,60–0,99	8 (28,6 %)	11 (39,3 %)	
završno mjerenje	$> 1,00$	8 (28,6 %)	8 (28,6 %)	negativan ¹
	0,51–1,00	8 (28,6 %)	19 (67,9 %)	dobar ²
	0,11–0,50	10 (35,7 %)	1 (3,6 %)	vrlo dobar ³
	$\leq 0,10$	2 (7,1 %)	0 (0 %)	izvrstan ⁴

¹ Negativan – apikalni promjer $> 1,00$ mm: nepovoljni uvjeti za provedbu konvencionalne endodontske terapije.

² Dobar – apikalni promjer $0,51 - 1,00$ mm: tehnički izvediva, ali potencijalno otežana terapija.

³ Vrlo dobar – apikalni promjer $0,11 - 0,50$ mm: povoljni uvjeti za terapiju.

⁴ Izvrstan – apikalni promjer $\leq 0,10$ mm: optimalni uvjeti za provedbu terapije.

Na početku istraživanja većina analiziranih slučajeva pokazivala je izraženu apikalnu nezrelost, s apikalnim promjerom $\geq 1,00$ mm u 71,4 % slučajeva u skupini A-PRF+ te u 78,6 % slučajeva u kontrolnoj skupini. Nakon provedene terapije, u skupini liječenoj A-PRF+ protokolom zabilježen je znatno viši stupanj apikalnog zatvaranja. U toj je skupini 42,9 % slučajeva (12/28) doseglo apikalni promjer $\leq 0,50$ mm, dok je u dodatnih 7,1 % slučajeva (2/28) zabilježen izvrstan terapijski ishod ($\leq 0,10$ mm).

U kontrolnoj skupini većina slučajeva (67,9 %) ostala je unutar granica dobrog ishoda (0,51 – 1,00 mm), uz samo jedan slučaj (3,6 %) koji je zadovoljio kriterij vrlo dobrog ishoda, dok izvrstan ishod nije zabilježen ni u jednom slučaju.

Usporedba kliničke prikladnosti za nastavak konvencionalne endodontske terapije upućuje na jasnu prednost A-PRF+ protokola jer je njegova primjena rezultirala znatno većim udjelom slučajeva s vrlo dobrim i izvrsnim ishodima, čime su ostvareni povoljniji tehnički i biološki uvjeti za eventualni nastavak terapijskog postupka.

4.1.5. Rezultati testiranja vitaliteta pulpe

Vitalitet pulpe u eksperimentalnoj skupini (A-PRF+) procjenjivao se pri svakom kontrolnom pregledu uporabom testa vitaliteta hladnoćom (TVH) i električnog testa vitaliteta (ETV). Laser-doplerska floumetrija (LDF) provedena je jednokratno po ispitaniku, i to tijekom kontrolnog pregleda u devetom ili dvanaestom mjesecu praćenja.

Tijekom dvanaestomjesečnog razdoblja praćenja zabilježen je postupni porast broja zuba s pozitivnim odgovorom na oba testa vitaliteta. Na završnoj kontroli pozitivan odgovor na TVH zabilježen je u 71 % slučajeva, dok je ETV bio pozitivan u 75 % slučajeva. LDF je potvrdila prisutnost krvnog protoka u novostvorenom tkivu u 93 % analiziranih zuba.

Iako je ETV ukupno detektirao veći broj pozitivnih odgovora ($n = 96$) u usporedbi s TVH-om ($n = 89$), razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Detaljni rezultati prema pojedinim vremenskim točkama prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati testiranja vitaliteta pulpe u A-PRF+ skupini tijekom 12 mjeseci, prikazani kao postotak pozitivnih odgovora na test vitaliteta hladnoćom (TVH), električni test vitaliteta (ETV) i laser-doplersku floumetriju (LDF); prema Turjanski i sur. (146)

Vrijeme (mjeseci)	TVH % (n/28)	ETV % (n/28)	LDF % (n/28)
1	43 % (12/28)	54 % (15/28)	–
3	61 % (17/28)	68 % (19/28)	–
6	71 % (20/28)	71 % (20/28)	–
9	71 % (20/28)	75 % (21/28)	93 % (26/28) *
12	71 % (20/28)	75 % (21/28)	93 % (26/28) *

* LDF je proveden jednom po ispitaniku, tijekom kontrolnog pregleda u 9. ili 12. mjesecu.

„–” označava da test nije proveden u toj vremenskoj točki.

4.1.6. Linearni regresijski model za predviđanje apikalnog zatvaranja

S obzirom na značajne razlike u apikalnom zatvaranju između A-PRF+ i kontrolne skupine, izrađen je linearni regresijski model radi boljeg razumijevanja odnosa između trajanja terapije i smanjenja apikalnog promjera unutar A-PRF+ skupine. Primarni je cilj bio razviti kvantitativni alat za procjenu odnosa između trajanja A-PRF+ terapije i stupnja apikalnog zatvaranja, čime se dodatno podupire individualizirano planiranje terapije i procjena prognoze.

Model je izrađen na temelju 157 opažanja iz eksperimentalne skupine, koja su obuhvaćala ponovljena mjerenja apikalnog promjera tijekom razdoblja praćenja. Apikalno zatvaranje izraženo kao smanjenje apikalnog promjera (*AZ*) predviđano je na temelju četiriju prediktora (neovisnih varijabli): trajanja terapije (*MJESECI*), dobi ispitanika (*DOB*), spola (*SPOL*; ženski ili muški) te etiologije (*UZROK*; karijes ili trauma), prema sljedećoj jednadžbi:

$$AZ = 1,2101 - 0,0755 \times MJESECI + 0,0273 \times DOB + 0,1251 \times SPOL_{\checkmark} - 0,0154 \times UZROK_k$$

pri čemu je:

- *AZ* – predviđeno smanjenje apikalnog promjera (u milimetrima)
- *MJESECI* – trajanje A-PRF+ terapije (u mjesecima)
- *DOB* – dob pacijenta (u godinama)
- *SPOL*_ž – spol (ženski = 1, muški = 0)
- *UZROK*_k – etiologija (karijes = 1, trauma = 0).

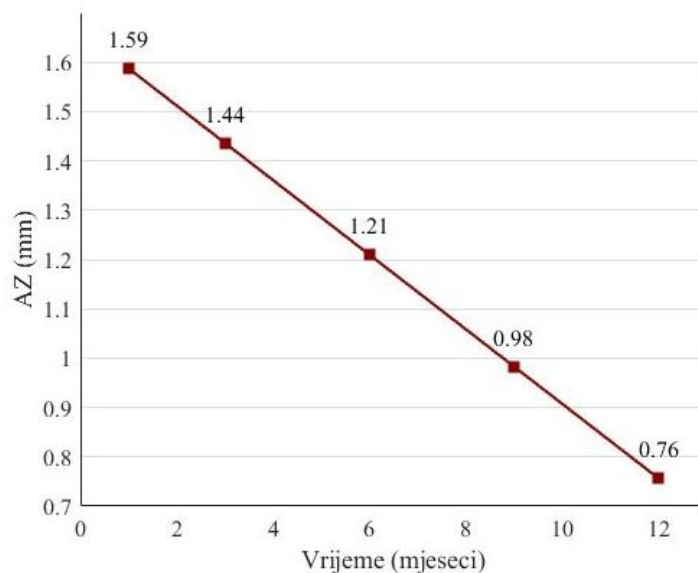
Primjer:

Procjena smanjenja apikalnog promjera nakon 6 mjeseci kod 12-godišnje pacijentice s traumom (*MJESECI* = 6, *DOB* = 12, *SPOL*_ž = 1, *UZROK*_k = 0):

$$AZ = 1,2101 - (0,0755 \times 6) + (0,0273 \times 12) + (0,1251 \times 1) - (0,0154 \times 0) = 1,2098$$

Ova vrijednost upućuje na predviđeno smanjenje apikalnog promjera od približno 1,21 mm nakon 6 mjeseci terapije.

Dijagram raspršenja s regresijskom linijom koji prikazuje pojednostavnjeni odnos između trajanja terapije i smanjenja apikalnog promjera ($AZ = 1,2101 - 0,0755 \times MJESECI$) prikazan je na slici 9. Od svih analiziranih prediktora statistički značajnim pokazalo se jedino trajanje terapije (*MJESECI*), dok prediktori *DOB*, *SPOL* i *UZROK* nisu imali statistički značajan utjecaj (Tablica 9). Svi regresijski koeficijenti prikazani su u tablici 9, a osnovni statistički pokazatelji modela sažeto su prikazani u tablici 10.



Slika 9. Dijagram raspršenja s regresijskom linijom koji prikazuje predviđeno smanjenje apikalnog promjera (*AZ*) u odnosu na trajanje terapije (*MJESECI*) u A-PRF+ skupini. Prikazana je jednačba prilagođenog linearnog regresijskog modela: $AZ = 1,2101 - 0,0755 \times MJESECI$; prema Turjanski i sur. (146)

Tablica 9. Procijenjeni regresijski koeficijenti u linearnom modelu za predviđanje apikalnog zatvaranja (*AZ*) u skupini A-PRF+; prema Turjanski i sur. (146).

Prediktor	Procjena koeficijenta	Standardna pogreška (SE)	t-statistika	p-vrijednost
Presjek	1,2101	0,281	4,31	< 0,001
<i>MJESECI</i>	-0,0755	0,012	-6,26	< 0,0001
<i>DOB</i>	0,0273	0,023	1,21	0,229
<i>SPOL_ž</i>	0,1251	0,106	1,18	0,238
<i>UZROK_k</i>	-0,0154	0,111	-0,14	0,890

Tablica 10. Osnovni statistički pokazatelji linearnog regresijskog modela za predviđanje apikalnog zatvaranja u A-PRF+ skupini; prema Turjanski i sur. (146)

Statistički pokazatelj	Vrijednost
broj opažanja	157
stupnjevi slobode pogreške (df)	152
koeficijent determinacije (R^2)	0,211
prilagođeni koeficijent determinacije (R^2 prilagođeni)	0,191
korijen srednje kvadratne pogreške (RMSE)	0,649
F-statistika regresijskog modela	10,2
p-vrijednost F-statistike	$2,49 \times 10^{-7}$

Vrijednost F-statistike regresijskog modela, uz pripadajuću p-vrijednost od $2,49 \times 10^{-7}$, upućuje na to da model statistički značajno bolje predviđa ishod u usporedbi s nul-modelom bez neovisnih varijabli.

Od uključenih prediktora varijabla *MJESECI* pokazala se kao jedini pojedinačno statistički značajan prediktor ($p < 0,0001$). Negativna vrijednost njezina regresijskog koeficijenta upućuje na povezanost duljeg trajanja terapije sa smanjenjem apikalnog promjera. Varijable *DOB*, *SPOL* i *UZROK* nisu pokazale statistički značajnu povezanost s ishodom varijablom te su u model uključene kao klinički relevantne kontrolne kovarijate, u cilju preciznije procjene učinka glavnog prediktora.

Iako model objašnjava umjerenu razinu ukupne varijance ($R^2 = 0,211$), dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu povezanost trajanja terapije sa smanjenjem apikalnog promjera nakon primjene A-PRF+ protokola.

4.2. Rezultati laboratorijske studije

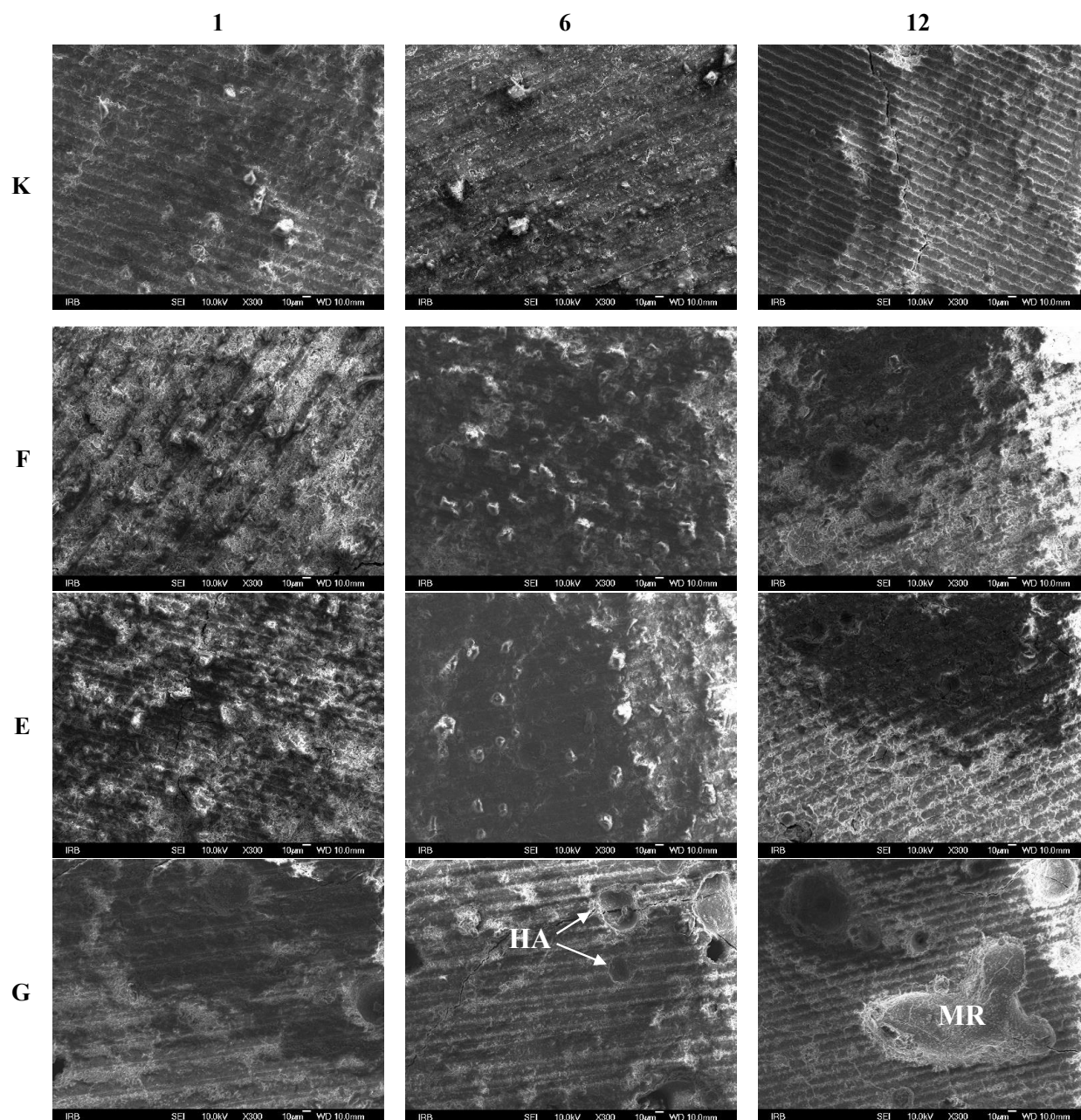
Rezultati prikazani u ovom potpoglavlju temelje se na prethodno objavljenom istraživanju Turjanski i suradnika (161), u kojem su tijekom 12 mjeseci analizirani morfološki i kemijski aspekti bioaktivnosti različitih staklenoionomernih materijala.

4.2.1. Rezultati FE-SEM mikrostrukturne analize materijala

FE-SEM mikrostrukturna analiza provedena je nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije.

Na slici 10 prikazane su reprezentativne FE-SEM snimke sljedećih materijala:

- Ketac Universal Aplicap (3M ESPE, Njemačka) – K
- Fuji IX GP Fast (GC Corporation, Tokio, Japan) – F
- Equia Forte Fil (GC Corporation, Tokio, Japan) – E
- Glass Carbomer GlassFill (GCP Dental, Nizozemska) – G.



Slika 10. Reprezentativne FE-SEM snimke materijala Ketac Universal Aplicap (K), Fuji IX GP Fast (F), Equia Forte Fil (E) i Glass Carbomer GlassFill (G) nakon 1 tjedna (1), 6 mjeseci (6) i 12 mjeseci (12) maturacije. Oznake: HA – hidroksiapatit; MR – mineralizirana regija. Prema: Turjanski i sur. (161)

Na FE-SEM snimkama uzoraka K1, F1 i E1, snimljenima u ranoj fazi, nakon jednog tjedna maturacije, vidljive su gusto raspoređene čestice punila različitih veličina i morfologije unutar cementne matrice. U svim analiziranim materijalima dominiraju čestice nepravilnog, uglatog oblika, koje su jasno razgraničene od okolne strukture.

S napredovanjem maturacije (K6, F6 i E6) zamijećeno je smanjenje broja vidljivih čestica punila, uz slabije izraženu granicu između punila i matrice.

Na završnim snimkama, nakon dvanaest mjeseci maturacije (K12, F12 i E12), broj jasno uočljivih čestica dodatno se smanjio, a matrica je pokazivala izraženiju homogenizaciju. Kod uzoraka F12 i E12 uočene su izraženije mrežaste strukture unutar same matrice.

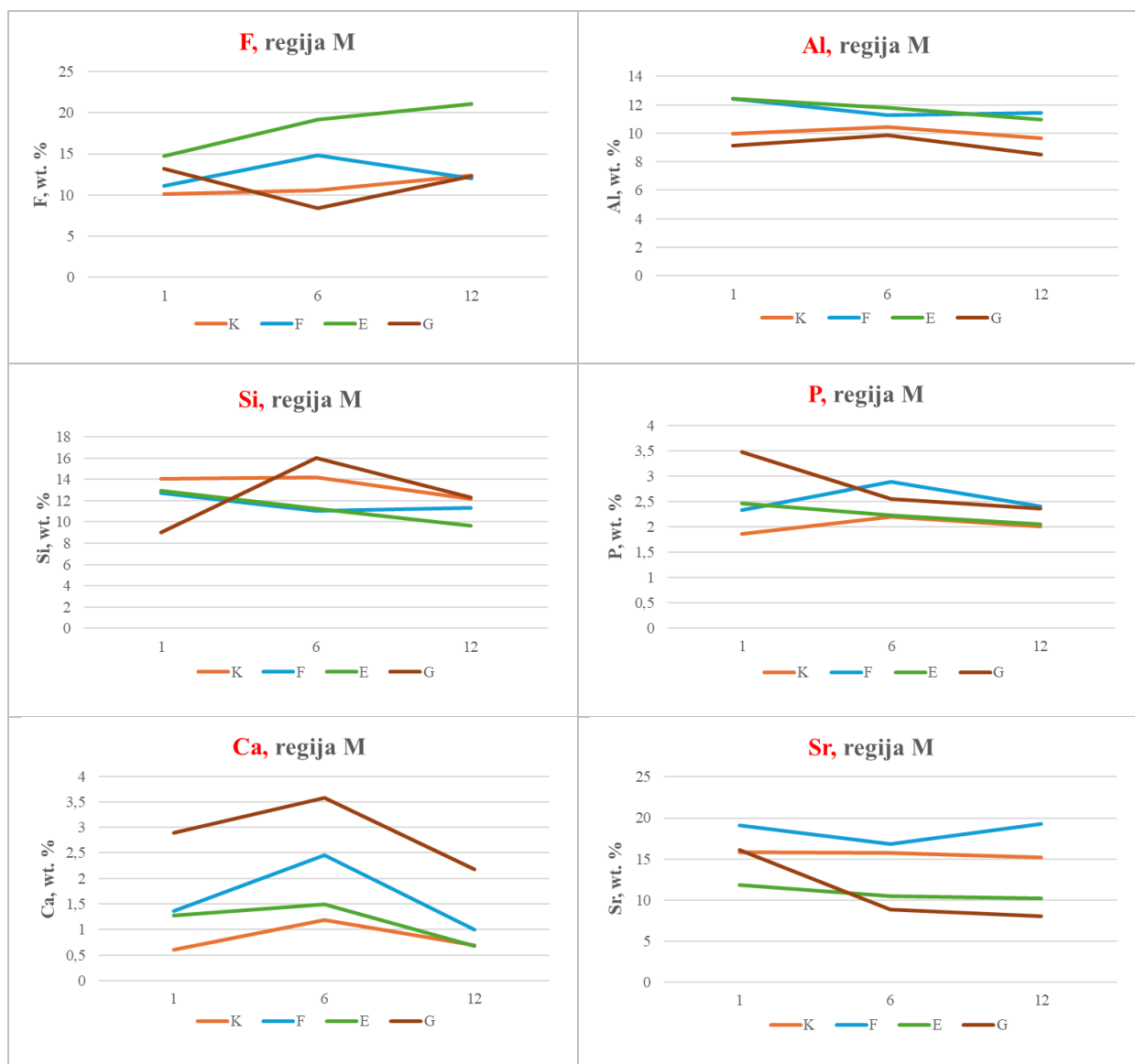
FE-SEM snimke Glass Carbomera nakon šest mjeseci maturacije (G6) prikazuju prisutnost zaobljenih, ujednačenih čestica glatke površine, koje su označene kao čestice hidroksiapatita (HA). Nakon dvanaest mjeseci (G12) uočen je jasno razgraničen dio matrice s drukčijom morfologijom, označen kao mineralizirana regija (MR), unutar koje dolazi do kohezivnoga grupiranja većeg broja HA čestica i njihove prostorne povezanosti s okolnom cementnom matricom.

Sitne pukotine, povremeno uočene na površinama pojedinih uzoraka, pripisuju se artefaktima nastalima tijekom pripreme uzoraka za FE-SEM analizu, osobito tijekom rezanja i sušenja.

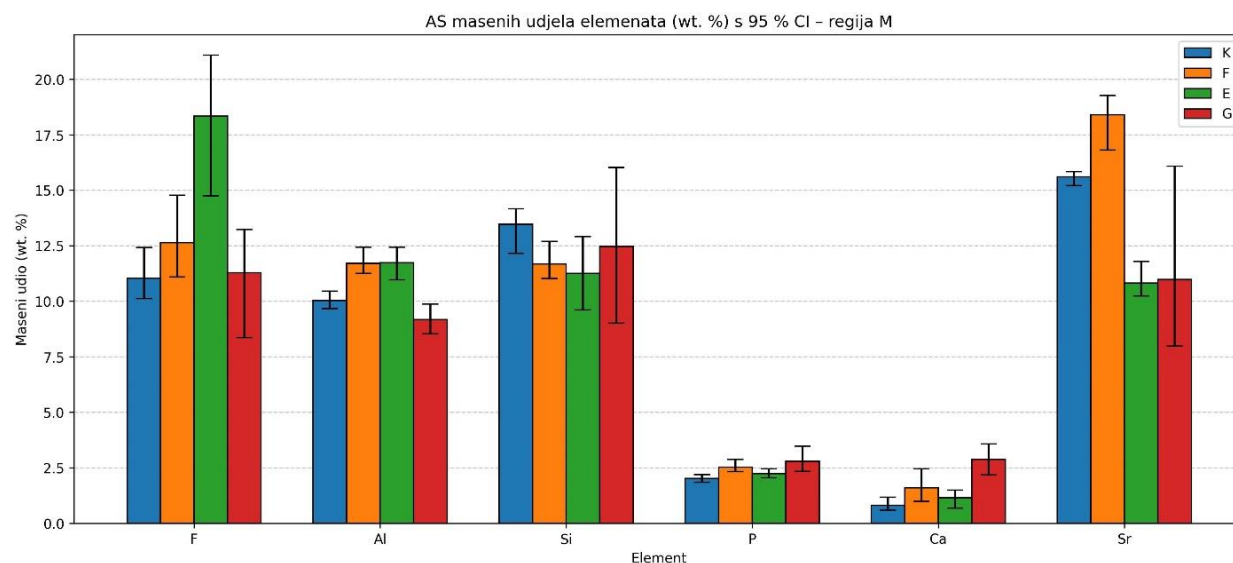
4.2.2. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija M

U ovom su potpoglavlju prikazani i interpretirani rezultati EDS analize provedene u regiji M za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije. Kvantitativna EDS analiza obuhvatila je elemente relevantne za kemijski sastav i bioaktivna svojstva staklenoionomernih materijala, uključujući fluor (F), aluminij (Al), silicij (Si), fosfor (P), kalcij (Ca) i stroncij (Sr).

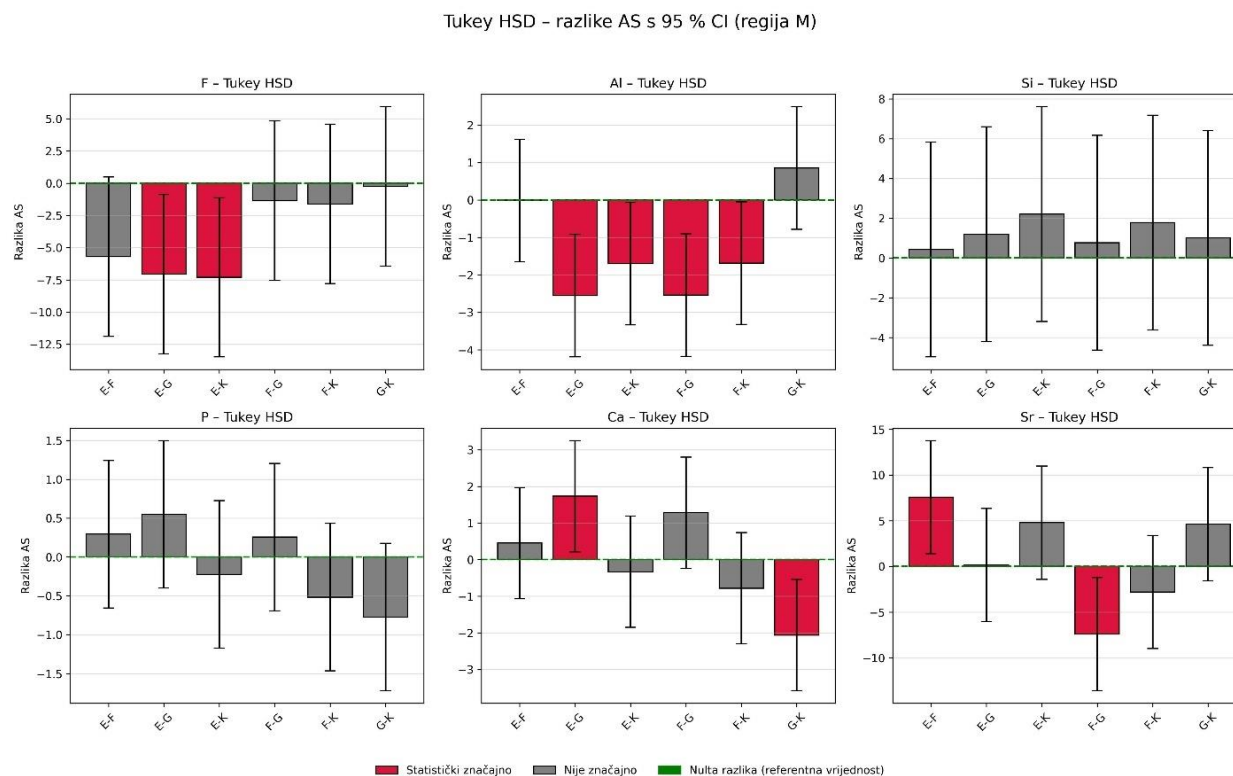
Vremenske promjene masenih udjela (wt. %) prikazane su grafički na slici 11, dok su aritmetičke sredine s pripadajućim 95-postotnim intervalima pouzdanosti prikazane na slici 12. Rezultati Tukeyjeva HSD *post hoc* testa, kojima se procjenjuju statistički značajne razlike među materijalima u aritmetičkim sredinama masenih udjela pojedinih elemenata tijekom 12-mjesečnog razdoblja, prikazani su na slici 13. Detaljni numerički podatci EDS analize, deskriptivni statistički pokazatelji i rezultati statističkih testova objedinjeni su u Prilogu A.



Slika 11. Promjene masenih udjela elemenata (wt. %) F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji M za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; prema Turjanski i sur. (161)



Slika 12. Aritmetičke sredine masenih udjela elemenata (wt. %) F, Al, Si, P, Ca i Sr s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji M za materijale K, F, E i G tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)



Slika 13. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji M, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)

U nastavku su izneseni rezultati EDS analize materijala (regija M) prema pojedinim elementima, s naglaskom na vremenske promjene i statističke usporedbe među skupinama.

Fluor (F):

U skupini E zabilježen je najviši relativni maseni udio fluora u svim vremenskim točkama, uz porast tijekom praćenja. Skupine K i F pokazale su porast udjela fluora u srednjem razdoblju, pri čemu su u skupini K vrijednosti ostale stabilne do završnog mjerenja, dok je u skupini F zabilježeno blago smanjenje. Skupina G pokazala je pad udjela fluora u srednjem razdoblju, uz porast na završnoj vremenskoj točki (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance potvrdila je statistički značajne razlike u udjelu fluora među skupinama (ANOVA, $p = 0,0172$), pri čemu su *post hoc* analizom utvrđene značajne razlike za parove E–K ($p = 0,0225$) i E–G ($p = 0,0267$) (Slika 13; Prilog A: Tablice A3 i A4).

Aluminij (Al):

Relativni maseni udio aluminija pokazivao je tendenciju smanjenja tijekom praćenja u svim analiziranim skupinama. Razlike u udjelu aluminija bile su prvenstveno uvjetovane razlikama među skupinama, pri čemu su skupine E i F u svim vremenskim točkama imale više vrijednosti u odnosu na skupine G i K (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance potvrdila je statistički značajne razlike u udjelu aluminija među skupinama (ANOVA, $p = 0,0002$). *Post hoc* Tukeyjeva HSD analiza pokazala je statistički značajne razlike za parove E–G ($p = 0,0046$), E–K ($p = 0,0420$), F–G ($p = 0,0048$) i F–K ($p = 0,0440$) (Slika 13; Prilog A: Tablice A3 i A4).

Silicij (Si):

Relativni maseni udio silicija pokazivao je varijacije tijekom razdoblja praćenja, bez jasno izraženog vremenskog trenda u analiziranim skupinama (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu silicija među skupinama (ANOVA, $p = 0,5985$). *Post hoc* Tukeyjeva HSD analiza, kao i *bootstrap* analiza, također nisu utvrdile statistički značajne razlike između pojedinih parova skupina, pri čemu su vrijednosti udjela silicija pokazivale preklapanje između svih analiziranih skupina (Slika 13; Prilog A: Tablice A3 i A6).

Fosfor (P):

Relativni maseni udio fosfora pokazivao je varijacije tijekom razdoblja praćenja, bez jasno izraženog vremenskog trenda u analiziranim skupinama (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu fosfora među skupinama (ANOVA, $p = 0,1244$).

Post hoc Tukeyjeva HSD analiza nije utvrdila statistički značajne razlike između pojedinih parova skupina, pri čemu su vrijednosti udjela fosfora pokazivale preklapanje između svih analiziranih skupina (Slika 13; Prilog A: Tablica A3).

Kalcij (Ca):

Relativni maseni udio kalcija pokazivao je promjene tijekom razdoblja praćenja, uz uočene razlike među analiziranim skupinama (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance potvrdila je statistički značajne razlike u udjelu kalcija među skupinama (ANOVA, $p = 0,0114$). *Post hoc* Tukeyjev HSD test pokazao je statistički značajne razlike za parove G–K ($p = 0,0106$) i E–G ($p = 0,027$), pri čemu su viši relativni maseni udjeli kalcija zabilježeni u skupini G. Razlike među ostalim parovima skupina nisu dosegnule razinu statističke značajnosti (Slike 12 i 13; Prilog A: Tablice A3 i A4).

Stroncij (Sr):

Relativni maseni udio stroncija pokazivao je razlike među analiziranim skupinama tijekom razdoblja praćenja (Slika 11). Jednosmjerna analiza varijance potvrdila je statistički značajne razlike u udjelu stroncija među skupinama (ANOVA, $p = 0,0111$). *Post hoc* Tukeyjeva HSD analiza pokazala je statistički značajne razlike za parove E–F ($p = 0,0187$) i F–G ($p = 0,0208$), pri čemu je skupina F imala najviši relativni maseni udio stroncija. Razlike između ostalih parova skupina nisu bile statistički značajne (Slike 12 i 13; Prilog A: Tablice A3 i A4).

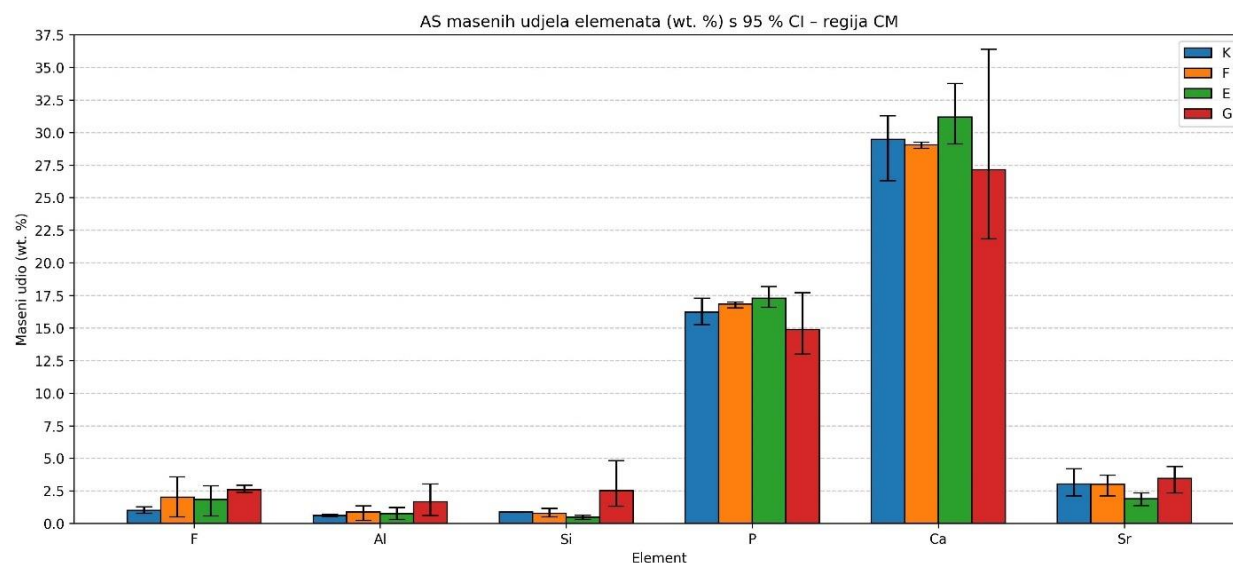
4.2.3. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija CM

Za analizu vremenskih promjena i razlika u masenim udjelima (wt. %) ključnih elemenata u sloju cakline u kontaktu s materijalima K, F, E i G primijenjene su deskriptivne i inferencijalne statističke metode. Dobiveni rezultati omogućuju uvid u dinamiku ionske razmjene na sučelju cakline i materijala tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja.

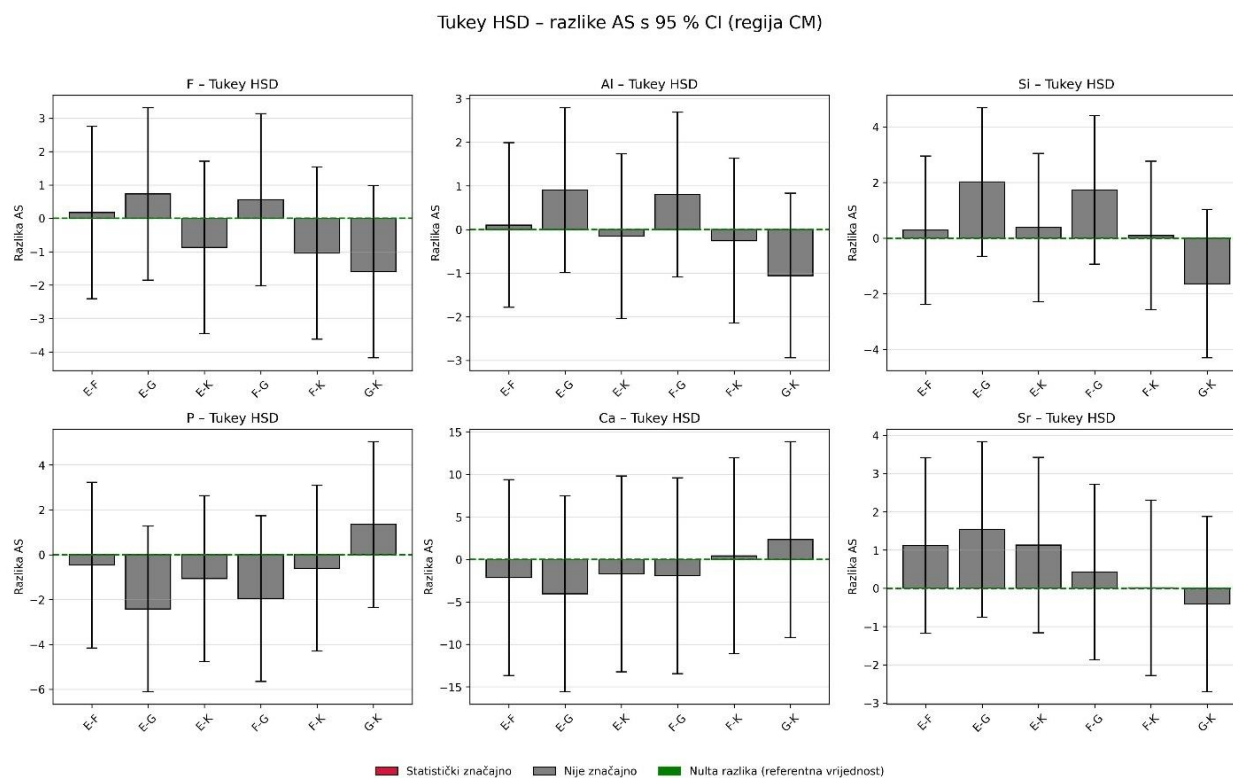
Grafički prikaz promjena masenih udjela elemenata u regiji CM tijekom triju vremenskih točaka, uz inicijalni sastav cakline (C_0) kao referentnu vrijednost, prikazan je na slici 14, dok su aritmetičke sredine i 95-postotni intervali pouzdanosti (CI), izračunani na temelju svih vremenskih točaka, prikazani na slici 15. Statistički značajne razlike među materijalima dodatno su ispitane Tukeyjevim HSD *post hoc* testom (Slika 16), a raspodjele podataka provjerene su i *bootstrap* analizom razlika medijana (Slika 17). Detaljni numerički i statistički podatci za regiju CM prikazani su u Prilogu B.



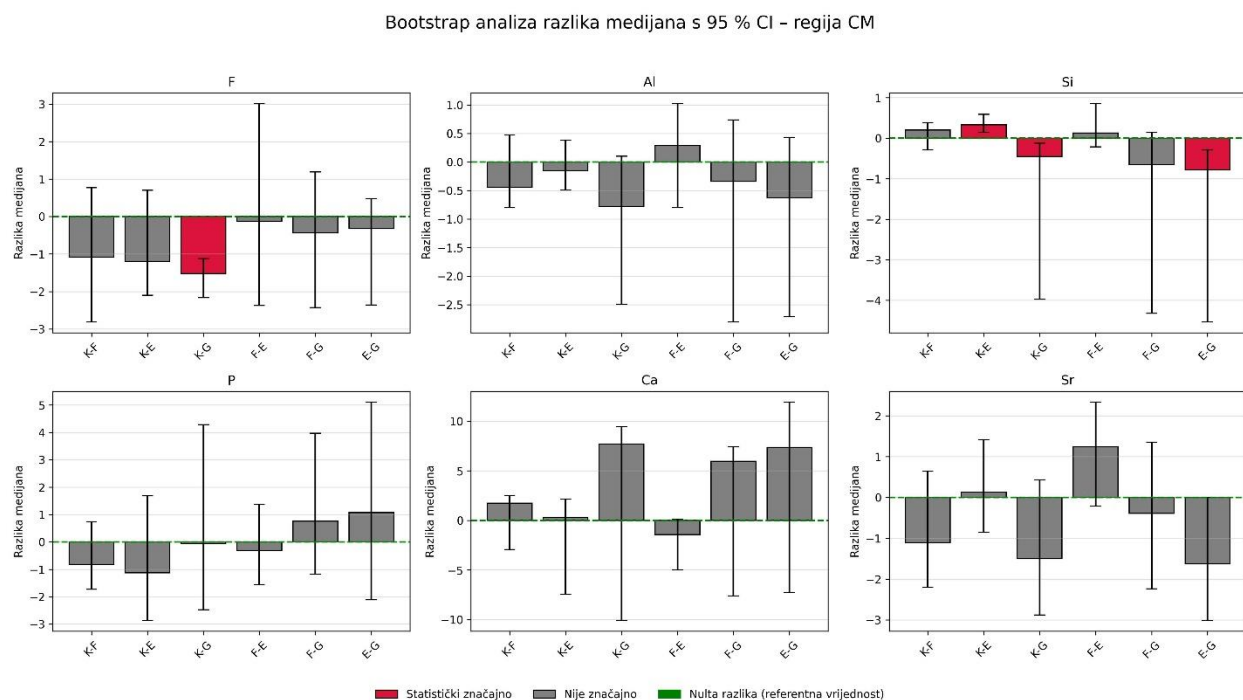
Slika 14. Promjene masenih udjela (wt. %) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji CM za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; inicijalni sastav cakline (C₀) prikazan je kao referentna vrijednost. Prema Turjanski i sur. (161)



Slika 15. Aritmetičke sredine masenih udjela elemenata (wt. %) F, Al, Si, P, Ca i Sr s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji CM za materijale K, F, E i G tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)



Slika 16. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji CM, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja



Slika 17. *Bootstrap* analiza razlika medijana među skupinama materijala – regija CM; prema Turjanski i sur. (161)

U nastavku su prikazani rezultati EDS analize sloja cakline u neposrednom kontaktu s restaurativnim materijalima (regija CM), s naglaskom na vremenske promjene i statističke usporedbe među skupinama.

Fluor (F):

U svim ispitivanim materijalima zabilježeni su povišeni relativni maseni udjeli fluora u odnosu na referentne vrijednosti (C_0), s porastom uočenim već nakon jednog tjedna i najvišim vrijednostima nakon šest mjeseci praćenja. U dvanaestom mjesecu zabilježen je blagi pad udjela fluora u odnosu na srednju vremensku točku, pri čemu su vrijednosti i dalje ostale više u usporedbi s početnim stanjem (Slika 14). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu fluora između skupina materijala (ANOVA, $p = 0,325$), dok je *bootstrap* analiza razlika medijana pokazala statistički značajnu razliku između skupina K i G; za ostale parove skupina statistički značajne razlike nisu potvrđene (Slika 17; Prilog B: Tablice B3 i B6).

Aluminij (Al):

Relativni maseni udio aluminija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost (C_0) u svim analiziranim materijalima i tijekom cijelog razdoblja praćenja, uz izražen porast tijekom vremena. U svim vremenskim točkama najniže vrijednosti zabilježene su u skupini K, dok su skupine F i E pokazivale umjeren porast udjela aluminija. Skupina G istaknula se izraženim povećanjem relativnog masenog udjela aluminija na završnoj vremenskoj točki, pri čemu je zabilježena najviša vrijednost među svim analiziranim skupinama (Slika 14). Unatoč uočenim razlikama u apsolutnim vrijednostima, jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu aluminija među skupinama (ANOVA, $p = 0,3126$). Dodatne statističke analize također nisu potvrdile statistički značajne razlike među skupinama (Prilog B: Tablice B3–B6).

Silicij (Si):

Relativni maseni udio silicija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost (C_0) u svim analiziranim materijalima i u svim vremenskim točkama praćenja, uz prisutne varijacije vrijednosti bez jasno izraženog vremenskog trenda. Skupina K pokazivala je stabilnije vrijednosti silicija tijekom cijelog razdoblja, dok su u ostalim skupinama zabilježene izraženije oscilacije (Slika 14). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu silicija među skupinama (ANOVA, $p = 0,2174$). Međutim, *bootstrap* analiza razlika medijana pokazala je statistički značajne razlike između pojedinih parova skupina (K–E, K–G i E–G), dok za ostale parove skupina statistički značajne razlike nisu potvrđene (Slika 17; Prilog B: Tablice B3 i B6).

Fosfor (P):

Relativni maseni udio fosfora bio je u većini analiziranih materijala blago snižen u odnosu na referentnu vrijednost (C_0), uz određene oscilacije tijekom razdoblja praćenja. U skupini K zabilježen je postupni pad, dok su u skupinama F i E vrijednosti ostale relativno stabilne i bliske početnoj vrijednosti. Skupina G pokazivala je najveću varijabilnost, s prolaznim porastom u srednjem razdoblju i izraženim padom na završnoj vremenskoj točki (Slika 14). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu fosfora među skupinama (ANOVA, $p = 0,6707$), kao ni dodatne statističke analize (Prilog B: Tablice B3–B6).

Kalcij (Ca):

Relativni maseni udio kalcija bio je snižen u odnosu na referentnu vrijednost (C_0) u svim analiziranim materijalima tijekom razdoblja praćenja. U skupinama K, F i E zabilježen je početni pad udjela kalcija, uz djelomičan oporavak prema završnoj vremenskoj točki, pri čemu vrijednosti nisu dosegnule početne razine. Skupina G pokazivala je izraženiju varijabilnost, s porastom u srednjem razdoblju i ponovnim padom na kraju praćenja (Slika 14). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu kalcija među skupinama (ANOVA, $p = 0,7445$), kao ni dodatne statističke analize (Prilog B: Tablice B3–B6).

Stroncij (Sr):

Relativni maseni udio stroncija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost (C_0) u svim analiziranim materijalima i tijekom cijelog razdoblja praćenja. U skupinama F i E zabilježen je postupan porast vrijednosti stroncija tijekom vremena, dok je u skupinama K i G uočen varijabilniji obrazac s padom u srednjem razdoblju i ponovnim porastom na završnoj vremenskoj točki; pritom su najviše vrijednosti stroncija uglavnom bile zabilježene u skupini G, a najniže u skupini E (Slika 14). Ni jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, $p = 0,1139$) ni dodatne statističke metode nisu potvrdile postojanje značajnih razlika među skupinama (Prilog B: Tablice B3–B6).

Kumulativni indeksi interakcije materijala i cakline

Radi cjelovitije procjene interakcije između restaurativnih materijala i cakline definirana su četiri kumulativna indeksa, temeljena na maksimalnim ili 12-mjesečnim vrijednostima masenih udjela specifičnih elemenata.

- Ukupna ionska izmjena s caklinom – definirana je kao zbroj maksimalnih masenih udjela fluora (F), aluminijsa (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) u caklini, pri čemu su za svaki materijal uzete najviše zabilježene vrijednosti pojedinih elemenata, neovisno o vremenskoj točki mjerenja.

Redoslijed materijala: $G > F > E > K$

- Dugotrajna ionska izmjena – definirana je kao zbroj masenih udjela fluora (F), aluminijsa (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) u caklini, izmjerenih u posljednjoj vremenskoj točki praćenja, nakon 12 mjeseci.

Redoslijed materijala: $G > F > K > E$

- Ukupni remineralizacijski potencijal – definiran je kao zbroj maksimalnih masenih udjela fluora (F) i stroncija (Sr) u caklini, pri čemu su za svaki materijal uzete najviše zabilježene vrijednosti navedenih elemenata, neovisno o vremenskoj točki mjerenja.

Redoslijed materijala: $G > F > K > E$

- Dugotrajna remineralizacijska aktivnost – definirana je kao zbroj masenih udjela (wt. %) fluora (F) i stroncija (Sr) u caklini, izmjerenih u posljednjoj vremenskoj točki praćenja, nakon 12 mjeseci.

Redoslijed materijala: $G > F > K > E$

4.2.4. Rezultati EDS mikrokemijske analize – regija DM

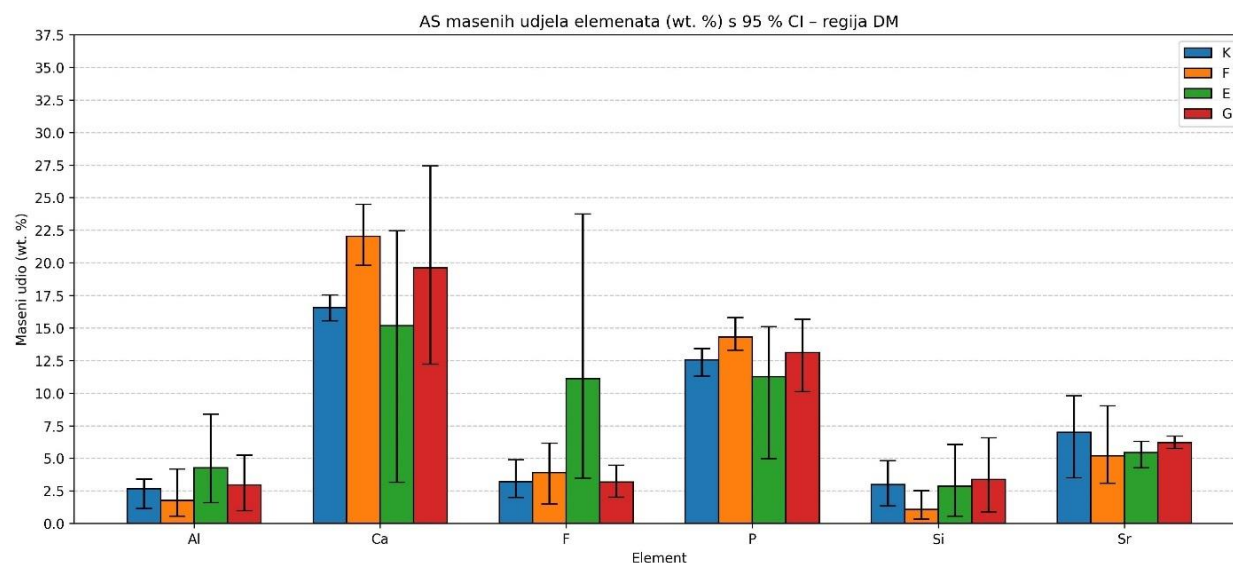
Za analizu vremenskih promjena i razlika u masenim udjelima (wt. %) ključnih elemenata u sloju dentina u kontaktu s materijalima K, F, E i G primijenjene su deskriptivne i inferencijalne statističke metode. Dobiveni rezultati omogućuju uvid u dinamiku ionske razmjene na sučelju dentina i restaurativnih materijala tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja.

Grafički prikaz promjena masenih udjela elemenata u regiji DM tijekom triju vremenskih točaka, uz inicijalni sastav dentina (D_0) kao referentnu vrijednost, prikazan je na slici 18, dok su aritmetičke sredine i 95-postotni intervali pouzdanosti (CI), izračunani na temelju svih vremenskih točaka, prikazani na slici 19.

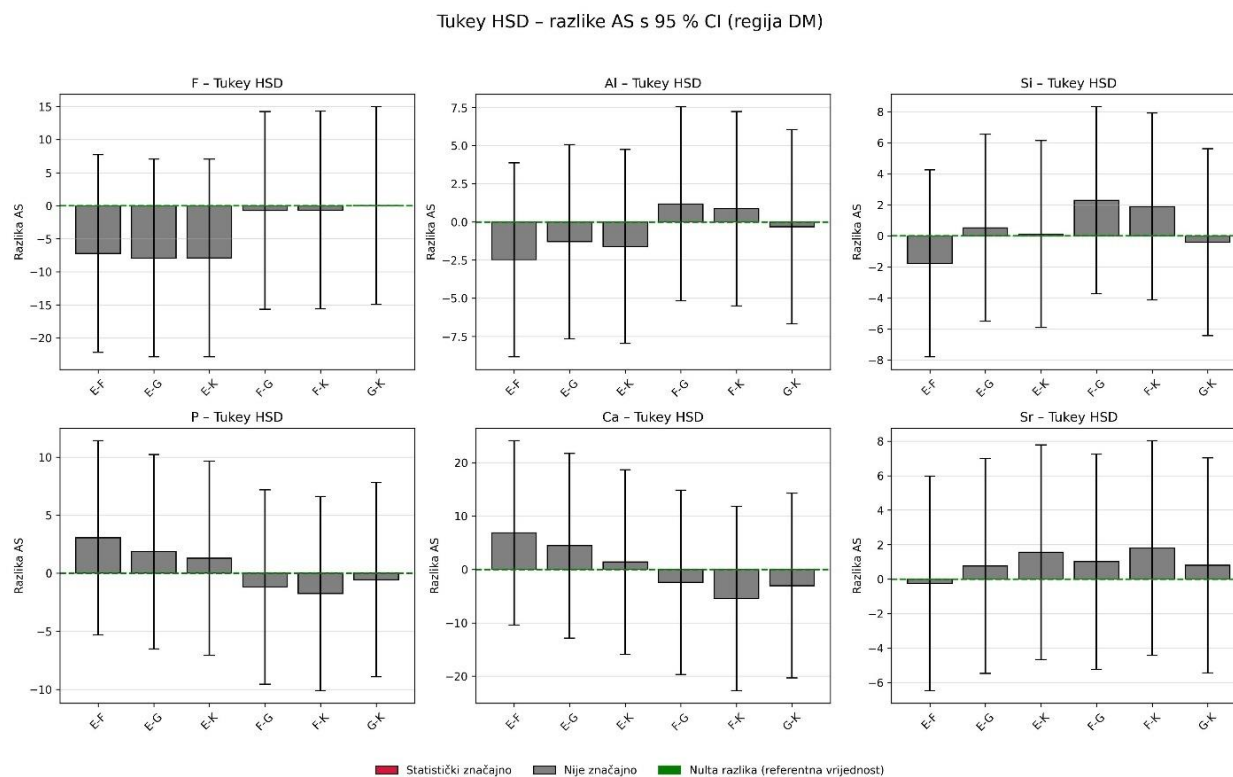
Statistički značajne razlike među materijalima dodatno su ispitane Tukeyjevim HSD *post hoc* testom (Slika 20), a detaljni numerički i statistički podatci za regiju DM prikazani su u Prilogu C.



Slika 18. Promjene masenih udjela (wt. %) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji DM za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; inicijalni sastav dentina (D₀) prikazan je kao referentna vrijednost. Prema Turjanski i sur. (161)



Slika 19. Aritmetičke sredine masenih udjela elemenata (wt. %) F, Al, Si, P, Ca i Sr s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji DM za materijale K, F, E i G tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)



Slika 20. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji DM, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)

U nastavku su prikazani rezultati EDS analize sloja dentina u neposrednom kontaktu s restaurativnim materijalima (regija DM), s naglaskom na vremenske promjene i statističke usporedbe među skupinama.

Fluor (F):

Relativni maseni udio fluora bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) u svim analiziranim materijalima i u svim vremenskim točkama praćenja. Najviše vrijednosti zabilježene su u skupini E, osobito nakon 6 mjeseci, dok su u ostalim skupinama bile niže, uz blaže oscilacije tijekom vremena (Slika 18). Unatoč uočenim kvantitativnim razlikama, jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u udjelu fluora među skupinama (ANOVA, $p = 0,3213$), niti su ih potvrdile dodatne statističke analize (Prilog C: Tablice C3–C5).

Aluminij (Al):

Relativni maseni udio aluminija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) u svim analiziranim materijalima i vremenskim točkama praćenja. Skupina K pokazivala je niže, ali stabilne vrijednosti, dok su u skupinama F i E zabilježeni postupni porasti, s najvišim vrijednostima na završnoj vremenskoj točki. Skupina G isticala se najvećom varijabilnošću i najvišim izmjerenim udjelima aluminija (Slika 18). Unatoč uočenim razlikama, jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (ANOVA, $p = 0,6702$), što su potvrdile i dodatne statističke analize (Prilog C: Tablice C3–C5).

Silicij (Si):

Relativni maseni udio silicija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) u svim analiziranim materijalima i vremenskim točkama praćenja, uz uočene varijacije tijekom vremena. Skupine K, F i E pokazivale su oscilacije bez jasno izraženog trenda, dok je u skupini G zabilježen izraženiji porast prema završnoj vremenskoj točki (Slika 18). Unatoč razlikama u dinamici jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (ANOVA, $p = 0,6417$), a dodatne su analize dale iste rezultate (Prilog C: Tablice C3–C5).

Fosfor (P):

Relativni maseni udio fosfora bio je uglavnom snižen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) u većini analiziranih materijala i vremenskih točaka, uz izražene oscilacije tijekom praćenja. Iznimno, u 1. tjednu zabilježene su vrijednosti usporedive ili blago povišene u skupinama F i G, dok je u skupini E u 6. mjesecu uočen izražen pad (Slika 18). Unatoč tim varijacijama, jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (ANOVA, $p = 0,7104$), niti su ih potvrdile dodatne statističke analize (Prilog C: Tablice C3–C5).

Kalcij (Ca):

Relativni maseni udio kalcija bio je uglavnom snižen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) tijekom većeg dijela razdoblja praćenja, uz oscilacije tijekom vremena. U pojedinim vremenskim točkama, osobito u 1. tjednu, zabilježene su vrijednosti usporedive ili blago povišene u odnosu na D_0 , no bez konzistentnog trenda. Vrijednosti udjela bile su uglavnom usporedive među skupinama, bez jasno izraženog zajedničkog obrasca kroz vrijeme (Slika 18). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (ANOVA, $p = 0,6042$), što su potvrdile i dodatne analize (Prilog C: Tablice C3–C5).

Stroncij (Sr):

Relativni maseni udio stroncija bio je povišen u odnosu na referentnu vrijednost dentina (D_0) u svim analiziranim materijalima, uz izražene oscilacije tijekom praćenja. U većini skupina zabilježene su povišene vrijednosti već u ranim vremenskim točkama, dok su u kasnijim fazama uočene varijacije bez jasno izraženog trenda (Slika 18). Unatoč uočenim deskriptivnim razlikama i varijabilnosti unutar skupina, jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (ANOVA, $p = 0,9382$), niti su ih potvrdile dodatne statističke analize (Prilog C: Tablice C3–C5).

Kumulativni indeksi interakcije materijala i dentina

Radi jasnije i cjelovitije procjene interakcije između restaurativnih materijala i dentina definirana su četiri kumulativna indeksa, temeljena na maksimalnim ili 12-mjesečnim vrijednostima masenih udjela specifičnih elemenata.

- Ukupna ionska izmjena s dentinom – definirana je kao zbroj maksimalnih masenih udjela fluora (F), aluminijsa (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) u dentinu, pri čemu su za svaki materijal uzete najviše zabilježene vrijednosti pojedinih elemenata, neovisno o vremenskoj točki mjerenja.

Redoslijed materijala: $E > G > K > F$

- Dugotrajna ionska izmjena s dentinom – definirana je kao zbroj masenih udjela fluora (F), aluminijsa (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) u dentinu, izmjerenih u posljednjoj vremenskoj točki praćenja, nakon 12 mjeseci.

Redoslijed materijala: $G > K > F > E$

- Ukupni remineralizacijski potencijal – definiran je kao zbroj maksimalnih masenih udjela fluora (F) i stroncija (Sr) u dentinu, pri čemu su za svaki materijal uzete najviše zabilježene vrijednosti navedenih elemenata, neovisno o vremenskoj točki mjerenja.

Redoslijed materijala: $E > F > K > G$

- Dugotrajna remineralizacijska aktivnost – definirana je kao zbroj masenih udjela (wt. %) fluora (F) i stroncija (Sr) u dentinu, izmjerenih u posljednjoj vremenskoj točki praćenja, nakon 12 mjeseci.

Redoslijed materijala: $F > K > G > E$

4.2.5. Usporedba ugradnje iona u caklini i dentinu

EDS mikrokemijskom analizom određen je inicijalni kemijski sastav cakline (C_0) i dentina (D_0), kao i sastavi slojeva cakline i dentina u neposrednoj blizini restaurativnih materijala (CM, DM) u više vremenskih točaka, izraženi kroz masene udjele pojedinih kemijskih elemenata. Povećanje masenog udjela pojedinog elementa u odnosu na inicijalne vrijednosti tumači se kao njegova ugradnja u odgovarajuće dentalno tkivo (caklinu odnosno dentin).

U svrhu usporedbe masenih udjela elemenata između cakline i dentina provedena je analiza razlika između regija CM i DM neovisno o vremenskoj točki mjerenja. Razlike su izražene kao razlike masenih udjela (wt. %) između regija DM i CM, dok je statistička značajnost razlika ispitana Kruskal–Wallisovim testom. Analiza je pokazala da su u većini ispitivanih kombinacija materijala i elemenata maseni udjeli fluora (F), aluminijska (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) bili viši u dentinu nego u caklini, pri čemu je iznimka zabilježena za aluminij u materijalu G.

Statistički značajne razlike potvrđene su samo za pojedine kombinacije materijala i elemenata, dok za ostale, unatoč uočenom trendu viših vrijednosti u dentinu, razlike nisu dosegnule razinu statističke značajnosti. Rezultati su sažeto prikazani u tablici 11, u kojoj su označene statistički značajne razlike ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

Tablica 11. Razlike masenih udjela (wt. %) elemenata između regija DM i CM s pripadajućim p-vrijednostima; prema Turjanski i sur. (161)

DM vs. CM	F		Al		Si		Sr	
	p- vrijednost	Razlika wt. %	p- vrijednost	Razlika wt. %	p- vrijednost	Razlika wt. %	p- vrijednost	Razlika wt. %
K	0,001 **	+1,98	0,027 *	+2,47	0,059	+1,45	0,046 *	+2,00
F	0,027 *	+2,43	0,508	+0,07	1,000	+0,51	0,137	+0,22
E	0,003 **	+5,30	0,010 *	+2,62	0,020 *	+2,23	0,002 **	+3,12
G	0,600	+0,37	0,183	−0,05	0,656	+0,49	0,008 **	+2,37

Razlika wt. % = wt. % (DM) – wt. % (CM); p-vrijednosti (Kruskal–Wallisov test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Liječenje mladih trajnih zuba s nekrotičnom pulpom i nezavršenim razvojem korijena predstavlja jedan od najvećih kliničkih izazova suvremene dječje i preventivne dentalne medicine (24,162). Terapijski cilj u takvim slučajevima nadilazi samo uklanjanje infekcije i očuvanje zuba u zubnom luku te uključuje omogućavanje daljnjeg rasta i sazrijevanja korijena, povećanje debljine dentinskih stijenki i osiguravanje dugoročne funkcionalne i strukturne stabilnosti zuba (162,163). U tom je kontekstu regenerativna endodontska terapija prepoznata kao suvremeni terapijski pristup koji odgovara biološkim i kliničkim zahtjevima liječenja mladih trajnih zuba (24,163).

Za razliku od konvencionalnih postupaka, koji se temelje na formiranju umjetne apikalne barijere, RET je usmjerena na očuvanje i reaktivaciju biološkog potencijala zuba, čime se omogućuje nastavak razvoja korijena i smanjuje rizik od frakture, osobito kod zuba s tankim stijenkama i kratkim korijenom (163,164). Stoga se RET ne promatra samo kao alternativna metoda, već kao konceptualno različit terapijski pristup, usmjeren na obnovu izgubljene funkcije, a ne na njezino nadomještanje (24,163).

Unatoč rastućem broju kliničkih i eksperimentalnih istraživanja, ishodi RET-a u literaturi ostaju heterogeni, što se pripisuje razlikama u primijenjenim protokolima, biološkim nosačima, materijalima za koronarno brtvljenje te kriterijima procjene uspješnosti liječenja (86,163). Većina postojećih pristupa primarno se fokusira na biološke aspekte regeneracije, osobito na odabir odgovarajućeg nosača i poticanje angiogeneze u apikalnom dijelu korijenskog kanala (163). Međutim, dugoročni terapijski ishod uvelike ovisi o stabilnosti regeneriranog tkiva, kvaliteti koronarnog brtvljenja i interakciji restaurativnih materijala s tvrdim zubnim tkivima (120).

Poseban izazov regenerativnih postupaka predstavlja ograničeni prostor unutar radikularnog dijela kanala, osobito u ranim fazama razvoja korijena, gdje je volumen dostupan za organizaciju novog vaskularnog i neuralnog tkiva izrazito ograničen (147,164). Dosadašnja su se istraživanja najvećim dijelom usmjerila na događaje u apikalnoj regiji, dok je potencijal koronarnog dijela endodontskog prostora u kontekstu regeneracije ostao relativno nedovoljno istražen (147,163). Ako regeneracija ostane ograničena samo na apikalnu regiju, mogućnosti su za razvoj funkcionalno zrelog i stabilnog tkiva smanjene (24,86). Time se otvara pitanje može li se proširenjem regeneracijskog prostora unutar endodontskog sustava stvoriti povoljniji biološki okvir za razvoj cirkulacije, inervacije i dugoročno stabilnije regeneracije (147,164).

Na temelju tih razmatranja razvijen je modificirani regenerativni protokol primijenjen u ovom istraživanju. Proširenjem primjene biološkog nosača i na koronarni dio korijenskog kanala povećava se ukupna dostupna površina za regeneraciju, čime proces više nije ograničen isključivo na apikalnu regiju, već obuhvaća veći dio endodontskog prostora. Takav pristup omogućuje kontinuitet regeneriranog tkiva i stvara povoljnije uvjete za funkcionalno povezivanje novostvorenog tkiva duž cijelog endodontskog sustava.

Dosadašnji regenerativni protokoli bili su uvelike ograničeni karakteristikama materijala korištenih za koronarno brtvljenje, osobito MTA-a i Biodentina, koji u kontaktu s krvlju ili trombocitnim derivatima pokazuju povećan rizik od diskoloracije zuba (114,120). Zbog estetskih ograničenja ti su se materijali u kliničkoj praksi najčešće postavljali ispod razine cementno-caklinskog spoja, što je u velikoj mjeri onemogućilo regeneraciju u koronarnoj regiji (120).

Uvođenjem staklenoionomernog cementa kao jedinog materijala za koronarno brtvljenje, u kombinaciji s proširenom primjenom A-PRF+ nosača, u ovom je istraživanju omogućeno istodobno optimiziranje bioloških i restaurativnih aspekata RET-a. Na taj su način prevladana ključna ograničenja dosadašnjih protokola, a regenerativna endodontska terapija sagledana je kao proces koji potencijalno zahvaća cjelokupni endodontski prostor, a ne isključivo njegov apikalni segment.

Iako se klinički uspjeh RET-a tradicionalno procjenjivao na temelju odsutnosti simptoma i radiološkog cijeljenja periapikalnih lezija, takvi kriteriji ne odražavaju u potpunosti složenost regeneracijskog procesa, niti pružaju potpun uvid u stupanj funkcionalne i strukturne obnove zuba (24). Stoga je u ovom istraživanju učinkovitost modificiranog regenerativnog protokola analizirana u usporedbi s konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, koji se dugi niz godina smatrao standardnim terapijskim postupkom u liječenju mladih trajnih zuba s nekrotičnom pulpom i nezavršenim razvojem korijena (147).

Takva je usporedba omogućila procjenu ne samo kliničkog učinka, već i morfoloških i funkcionalnih promjena, uključujući razvoj korijena, debljinu dentinskih stijenki, radiološke promjene i vitalitet, čime se jasno razgraničavaju reparativni učinci konvencionalnih postupaka od regenerativnog potencijala suvremenih terapijskih pristupa.

5.1. Klinički ishodi modificiranog protokola

Klinički ishodi predstavljaju osnovni kriterij za procjenu uspješnosti endodontskog liječenja, osobito u terapiji mladih trajnih zuba s nekrotičnom pulpom i nezavršenim razvojem korijena. U kontekstu regenerativne endodontske terapije primarni klinički cilj usmjeren je na uklanjanje simptoma, očuvanje funkcije zuba te sprječavanje daljnje progresije patoloških promjena, dok se biološka regeneracija i razvoj korijena procjenjuju dodatnim, ponajprije radiološkim parametrima.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju visoku razinu kliničke sigurnosti i predvidljivosti primijenjenog modificiranog regenerativnog protokola, temeljenog na proširenoj primjeni A-PRF+ nosača i koronarnom zatvaranju uporabom staklenoionomernog cementa. Tijekom dvanaestomjesečnog praćenja nije zabilježen ni jedan slučaj gubitka zuba u eksperimentalnoj skupini, niti su dokumentirani znakovi kliničkog neuspjeha, uključujući bol, osjetljivost na palpaciju ili perkusiju, oteklinu, prisutnost fistule ili patološku pomičnost zuba. Takvi nalazi potvrđuju da je primijenjeni protokol bio klinički siguran i dobro podnošljiv za pacijente.

Kliničke evaluacije provedene su prospektivno, uz unaprijed definirane i vremenski ujednačene kontrolne preglede, što je omogućilo sustavno praćenje mogućih komplikacija i pravodobno bilježenje svih relevantnih kliničkih promjena. Izostanak nepovoljnih kliničkih događaja tijekom prve godine nakon završetka liječenja upućuje na stabilnost terapijskog učinka, što je osobito važno s obzirom na osjetljivu populaciju mladih pacijenata i dugoročna funkcijska očekivanja.

U kontrolnoj skupini, liječenoj konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, također nisu zabilježeni gubici zuba, niti su dokumentirani klinički simptomi. Međutim, evaluacija kliničkih ishoda u toj skupini temeljila se na retrospektivnoj analizi postojeće stomatološke dokumentacije, što predstavlja metodološko ograničenje. Unatoč tomu, činjenica da su oba terapijska pristupa rezultirala očuvanjem zuba u zubnom luku potvrđuje njihovu kliničku učinkovitost, ali istodobno upućuje na ograničenu mogućnost razlikovanja terapijskih koncepata isključivo na temelju kliničkih pokazatelja.

Dobiveni klinički ishodi u skladu su s nalazima ranijih kliničkih istraživanja i metaanaliza. U tim se radovima prikazuju vrlo visoke stope kliničkog uspjeha RET-a, pri čemu se uspjeh najčešće definira kao odsutnost simptoma i očuvanje funkcije zuba. Jedan je od takvih primjera sustavni pregled i metaanaliza koje su proveli Li i suradnici, u kojima se izvještava da je 96,2 % nezrelih

trajnih zuba liječenih regenerativnim protokolima bilo bez simptoma, što potvrđuje da odsutnost kliničkih simptoma predstavlja očekivan ishod propisno provedenih regenerativnih endodontskih terapija (46). Slično tomu, Sabeti i suradnici u svojoj mrežnoj metaanalizi ističu da, unatoč visokim stopama kliničkog uspjeha, klinički parametri imaju ograničenu sposobnost razlikovanja reparativnih i regenerativnih ishoda, osobito zbog heterogenosti kriterija uspješnosti i praćenih ishoda (24).

Stoga, iako su povoljni klinički ishodi nužan preduvjet uspješne terapije, oni sami nisu dostatni za procjenu stvarnoga regenerativnog učinka. Odsutnost simptoma i očuvanje funkcije zuba moguće je postići i konvencionalnim terapijskim postupcima, poput apeksifikacije kalcijevim hidroksidom, bez stvarne obnove pulpo-dentinskoga kompleksa. U ovom se istraživanju klinička stabilnost stoga promatra prvenstveno kao pokazatelj sigurnosti i prihvatljivosti terapije, dok se stvarni doprinos modificiranog regenerativnog protokola dodatno vrednuje analizom radioloških pokazatelja razvoja korijena i strukturnih promjena tvrdih zubnih tkiva.

U tom smislu povoljni klinički ishodi zabilježeni u ovom istraživanju predstavljaju pouzdanu osnovu za daljnju analizu radioloških i razvojnih rezultata, koji omogućuju dublji uvid u biološki potencijal primijenjenog A-PRF+ protokola u odnosu na konvencionalne terapijske postupke.

5.2. Klinička evaluacija ispuna za koronarno brtvljenje

Klinička uspješnost RET-a ne ovisi isključivo o biološkim procesima unutar endodontskog prostora, već i o kvaliteti i stabilnosti koronarne restauracije, koja ima ključnu ulogu u sprječavanju mikropropuštanja i sekundarne infekcije te očuvanju postignutih terapijskih učinaka. U tom kontekstu, izbor restaurativnog materijala za koronarno brtvljenje predstavlja važan terapijski čimbenik, osobito kada se upotrebljava kao jedini materijal u završnoj fazi regenerativnog postupka kod mladih trajnih zuba.

U ovom je istraživanju klinička evaluacija ispuna izrađenih od različitih staklenoionomernih cemenata pokazala da su svi ispitivani materijali tijekom jednogodišnjeg praćenja zadržali klinički prihvatljiva funkcionalna i estetska svojstva prema modificiranim USPHS kriterijima. Potpuna retencija, očuvana rubna prilagodba, odsutnost sekundarnog karijesa i stabilna površinska svojstva upućuju na njihovu kliničku učinkovitost u zahtjevnim uvjetima RET-a, što je u skladu s recentnim

sustavnim pregledima i kliničkim studijama (165,166). Pritom valja istaknuti da se dostupni literaturni podatci pretežno odnose na opću kliničku prihvatljivost staklenoionomernih cemenata u restaurativnoj stomatologiji, dok za njihovu primjenu i ponašanje u kontekstu regenerativne endodontske terapije, osobito kada se upotrebljavaju kao jedini koronarni ispun, u dostupnoj literaturi ne postoje jasni i sustavno objedinjeni podatci.

Pojedina manja odstupanja, osobito u kategorijama rubne diskoloracije, anatomskeg oblika i teksture, nisu imala klinički značajan utjecaj niti su zahtijevala dodatne intervencije. Slične promjene, karakteristične za materijale s otpuštanjem iona, opisane su i u literaturi, bez utjecaja na retenciju ili potrebu za zamjenom restauracija (165). Takvi se nalazi mogu pripisati razlikama u sastavu, viskoznosti i površinskim karakteristikama među generacijama cemenata.

Posebno je važno da tijekom praćenja nije zabilježen ni jedan slučaj sekundarnog karijesa, neovisno o korištenom materijalu. Stabilno koronarno brtvljenje, zahvaljujući kemijskoj adheziji i stabilnim rubnim svojstvima, ključno je za očuvanje sterilnosti endodontskog prostora i prevenciju reinfekcije, čime se podupire uspjeh terapije i potvrđuje učinkovitost staklenoionomernih cemenata u svakodnevnoj kliničkoj praksi (166). U kontekstu regenerativne endodontske terapije, u kojoj je očuvanje sterilnog okruženja preduvjet nesmetanog odvijanja regenerativnih procesa, pouzdano koronarno brtvljenje samim time dobiva dodatnu kliničku važnost.

Iako ograničen broj ispitanika onemogućava čvrste statističke zaključke o razlikama među materijalima, opisni rezultati pružaju vrijedan uvid u njihovo ponašanje tijekom prve godine. Uočeni povoljan tijek, uz minimalna odstupanja bez funkcionalnih ili estetskih posljedica, upućuje na to da svi ispitivani cementi mogu osigurati klinički prihvatljivo i pouzdano koronarno brtvljenje kada se primjenjuju kao jedini restaurativni materijal u okviru RET-a.

Nalazi ovog istraživanja stoga podupiru četvrtu radnu hipotezu (H₄), prema kojoj svi ispitivani staklenoionomerni cementi tijekom jednogodišnjeg praćenja pokazuju funkcionalnu i estetsku stabilnost, bez potrebe za dodatnim intervencijama. Iako su uočene manje razlike u pojedinim kliničkim parametrima, one nisu utjecale na uspješnost restauracija niti su dovele u pitanje njihovu kliničku stabilnost tijekom promatranog razdoblja.

5.3. Radiološki ishodi modificiranog protokola

Sekundarni ciljevi regenerativne endodontske terapije, koji uključuju nastavak razvoja korijena kroz njegovo produljenje, zadebljanje dentinskih stijenki i zatvaranje apeksa, u ovom su istraživanju ostvareni primjenom modificiranog protokola s A-PRF+ nosačem. Dobiveni radiološki nalazi pokazuju statistički značajna i klinički relevantna poboljšanja svih analiziranih parametara u usporedbi s kontrolnom skupinom liječenom konvencionalnom apeksifikacijom kalcijevim hidroksidom.

Na završnoj, dvanaestomjesečnoj kontroli u skupini A-PRF+ zabilježeni su značajni pomaci u razvoju korijena, uključujući njegovo produljenje, zadebljanje dentinskih stijenki i apikalno zatvaranje. Pozitivne promjene bile su prisutne u gotovo svim slučajevima. Ove promjene nisu imale skokovit ili izoliran karakter, već su se razvijale postupno i kontinuirano tijekom razdoblja praćenja, što je dosljedno prikazano u svim analiziranim radiološkim parametrima (Slika 7a–c) te upućuje na vremenski organiziran i biološki uvjetovan regenerativni odgovor. Nasuprot tomu, u kontrolnoj skupini zabilježene su tek ograničene morfološke promjene, što je u skladu s reparativnom prirodom apeksifikacije, čiji je primarni cilj stabilizacija apeksa, a ne poticanje daljnjeg razvoja korijena.

Usporedba dobivenih nalaza s dostupnom literaturom pokazuje da ostvareni radiološki ishodi u većini analiziranih parametara nadmašuju rezultate konvencionalne apeksifikacije, dok su u pojedinim aspektima usporedivi ili povoljniji u odnosu na regenerativne postupke koji rabe krvni ugrušak ili standardni PRF (95,167,168). Takvi su nalazi u skladu s istraživanjem Qamara i suradnika, koji su pokazali izraženije produljenje korijena i zadebljanje dentinskih stijenki pri primjeni A-PRF-a u odnosu na krvni ugrušak, iako razlike nisu uvijek bile statistički značajne (168). U ovom istraživanju, međutim, primjena A-PRF+ rezultirala je konzistentnim i statistički značajnim prednostima u odnosu na konvencionalnu apeksifikaciju, što upućuje na potencijalno povoljniji biološki odgovor modificiranog protokola. Za razliku od pristupa koji se oslanjaju isključivo na cijeljenje periapikalnih promjena, ovdje je naglasak stavljen na praćenje kontinuiranog morfološkog razvoja korijenskih struktura. Time se jasnije razgraničavaju reparativni ishodi od regenerativno orijentirane interpretacije radioloških promjena.

Posebnu kliničku važnost ima postignuto zatvaranje apeksa. Prema podacima prikazanim u tablici 7, gotovo polovica zuba (12/28) u skupini A-PRF+ na završnoj kontroli imala je apikalni

promjer $\leq 0,50$ mm, što se smatra izvrsnim ili vrlo dobrim ishodom, jer omogućuje povoljne tehničke uvjete za obturaciju korijenskog kanala u slučaju potrebe za konvencionalnom endodontskom terapijom tijekom dugoročnog praćenja. U kontrolnoj je skupini takav ishod zabilježen tek iznimno rijetko. Klinički značaj postignutog apikalnog suženja očituje se u smanjenju rizika od mikropropuštanja, reinfekcije i dugoročnog terapijskog neuspjeha. Zatvaranje apeksa pritom predstavlja povoljan morfološki preduvjet za buduće terapijske opcije, a ne indikator gubitka vitaliteta zuba.

Analiza rane faze praćenja pokazala je da se početak morfološkog razvoja korijenskih struktura u eksperimentalnoj skupini bilježi već u prvom mjesecu, dok se najizraženiji intenzitet produljenja korijena, zadebljanja dentinskih stijenki i smanjenja apikalnog promjera ostvaruje u razdoblju između trećeg i šestog mjeseca. Nakon tog razdoblja promjene su se nastavile kontinuirano, uz postupno smanjenje brzine njihova napredovanja, bez naglih ili diskontinuiranih oscilacija.

Uz opseg promjena, klinički je relevantna i njihova vremenska dinamika. U skupini A-PRF+ radiološki znakovi razvoja korijena i započetog apikalnog zatvaranja bili su jasno vidljivi već unutar prva tri mjeseca praćenja, dok se u kontekstu konvencionalne apeksifikacije slični nalazi u kliničkoj praksi i literaturi najčešće opisuju tek u kasnijim fazama terapije. Takva ubrzana dinamika u skladu je s nalazima Wakhloo i suradnika, koji su formiranje tvrdotkivne barijere zabilježili kod većine zuba liječenih A-PRF protokolom već unutar tri mjeseca (169).

Dodatno, kvantitativna usporedba pokazala je da su radiološke promjene zabilježene u kontrolnoj skupini na završnoj kontroli bile znatno manjeg opsega. U eksperimentalnoj skupini s A-PRF+ promjene su za sva tri analizirana parametra već do trećeg mjeseca praćenja nadmašile ukupne promjene u kontrolnoj skupini tijekom cijelog trajanja terapije (Tablica 6). Takav obrazac vremenske raspodjele promjena upućuje na ubranu dinamiku morfološkog razvoja korijenskih struktura pri primjeni modificiranog regenerativnog protokola u usporedbi s reparativnim mehanizmom apeksifikacije, neovisno o ukupnom trajanju terapije u kontrolnoj skupini.

Ubrzani razvoj korijena bio je praćen i ranim cijeljenjem periapikalnih lezija. U većini su slučajeva u skupini A-PRF+ znakovi cijeljenja bili vidljivi već nakon tri mjeseca, dok je potpuno cijeljenje postignuto kod svih ispitanika do devetog mjeseca praćenja. Ovakav vremenski obrazac oporavka u skladu je s biološkim svojstvima A-PRF+ opisanim u literaturi, uključujući angiogene i regenerativne učinke povezane s produljenim otpuštanjem čimbenika rasta i poticanjem

vaskularizacije (167,169). U prilog ovakvoj interpretaciji idu i recentna trodimenzionalna radiološka istraživanja, koja su pokazala izraženije smanjenje volumena periapikalne radiolucencije pri primjeni A-PRF+ u usporedbi s kalcijevim hidroksidom (170).

U cjelini gledano, radiološki nalazi ovog istraživanja upućuju na to da A-PRF+ kao biološki nosač može omogućiti značajan morfološki razvoj korijena i učinkovito cijeljenje periapikalnih tkiva, brzinom i opsegom koji nadilaze konvencionalne terapijske postupke. Pritom je važno istaknuti da radiološko cijeljenje periapikalnih lezija predstavlja pokazatelj uspješne kontrole upalnog procesa i povoljnog biološkog okruženja, ali se samo po sebi ne može izjednačiti s histološki potvrđenom regeneracijom pulpo-dentinskoga kompleksa.

Radiološko je praćenje u eksperimentalnoj skupini provedeno u više unaprijed definiranih vremenskih točaka (1., 3., 6., 9. i 12. mjesec), dok je u kontrolnoj skupini radiološka evaluacija bila ograničena na početno i završno snimanje, s prosječnim trajanjem terapije od $8,64 \pm 2,78$ mjeseci. S obzirom na takav dizajn, usporedba između skupina nije bila usmjerena na vremenski identične točke mjerenja, već na ukupni opseg i smjer morfoloških promjena tijekom trajanja terapije. Time je omogućeno smisleno razlikovanje reparativnog ishoda apeksifikacije od regenerativno orijentiranog odgovora u eksperimentalnoj skupini.

Cilj radiološke analize nije bio određivanje apsolutnih dimenzija korijenskih struktura, već praćenje promjena dimenzija tijekom vremena unutar istog zuba. Fokusiranjem na relativne promjene (Δ) produljenja korijena, zadebljanja dentinskih stijenki i apikalnog promjera, dodatno je smanjen utjecaj individualnih anatomskih varijacija i mogućih projekcijskih pogrešaka, što predstavlja pristup široko prihvaćen u literaturi. Dodatno, primjena strogo standardizirane paralelne tehnike snimanja, uz isključenje snimki s izraženom distorzijom većom od 10 %, u skladu s metodološkim preporukama iz literature (145), kao i korištenje validiranog softverskog sustava s jasno definiranim referentnim točkama (cementno-caklinski spoj, vrh korijena, razina dvije trećine duljine korijena), povećali su preciznost i ponovljivost mjerenja. Konzistentnost progresivnih i statistički značajnih promjena kroz više vremenskih točaka, prisutnih kod većine ispitanika u eksperimentalnoj skupini, dodatno smanjuje vjerojatnost da su uočeni nalazi posljedica radioloških artefakata.

Radiološki ishodi bili su pritom u usklađenosti s kliničkim nalazima, uključujući ranije cijeljenje periapikalnih lezija i povoljnije terapijske kategorije apikalnog promjera, što dodatno podupire

biološku relevantnost zabilježenih promjena. Iako bi primjena CBCT-a omogućila detaljniju procjenu volumetrijskih promjena, njegova rutinska uporaba u pedijatrijskoj i adolescentskoj populaciji nije standardna klinička praksa te je opravdano ograničena zbog izloženosti ionizirajućem zračenju. U skladu s ciljevima ovog istraživanja, odabrani radiološki pristup predstavlja razuman kompromis između dijagnostičke vrijednosti i sigurnosti pacijenata.

Slijedom navedenoga može se zaključiti da metodološka ograničenja dvodimenzionalne radiološke analize ne isključuju interpretativnu vrijednost zaključaka ovog istraživanja. Naprotiv, longitudinalni dizajn, jasno definiran protokol mjerenja i konzistentnost nalaza pružaju čvrst temelj za interpretaciju dobivenih radioloških ishoda kao radioloških pokazatelja biološkog odgovora kompatibilnog s regenerativno orijentiranim procesima i progresivne biološke maturacije korijenskih struktura. Time se podupire prva radna hipoteza (H_1), prema kojoj je primjena modificiranog regenerativnog protokola povezana sa statistički i klinički značajno povoljnijim ishodima u pogledu produljenja korijena, zadebljanja dentinskih stijenki i zatvaranja apeksa u usporedbi s konvencionalnim postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom.

5.4. Procjena vitaliteta pulpe i funkcionalne obnove pulpnog tkiva

Procjena vitaliteta pulpe predstavlja jedan od najzahtjevnijih aspekata evaluacije ishoda regenerativne endodontske terapije, osobito kod mladih trajnih zuba s nekrotičnom pulpom i nezavršenim razvojem korijena. U takvim se slučajevima funkcionalni status pulpe ne može pouzdano procjenjivati isključivo na temelju klasičnih testova osjeta, s obzirom na nezrelost živčanih struktura, promijenjenu anatomiju dentinskih tubula te često prisutnu traumatsku anamnezu. Poznato je da testovi osjeta primarno odražavaju funkcionalni odgovor neuralnih elemenata, a ne izravno stanje pulpne cirkulacije, zbog čega njihova dijagnostička vrijednost u nezrelih i traumatiziranih zuba može biti smanjena ili vremenski odgođena (151).

Stoga je u ovom istraživanju primijenjen kombinirani dijagnostički pristup, koji je obuhvatio subjektivne testove vitaliteta pulpe (test vitaliteta hladnoćom i električni test vitaliteta) te objektivnu procjenu prisutnosti pulpne cirkulacije primjenom laser-doplerske floumetrije (LDF). Takav je pristup omogućio istodobnu procjenu osjetnog odgovora i funkcionalne cirkulacije, čime se smanjuju ograničenja povezana s primjenom pojedinačnih dijagnostičkih metoda.

Rezultati testiranja vitaliteta u eksperimentalnoj skupini liječenoj A-PRF+ protokolom pokazali su postupan, vremenski uvjetovan porast udjela pozitivnih odgovora tijekom jednogodišnjeg praćenja. Na završnoj kontroli pozitivan odgovor na test vitaliteta hladnoćom zabilježen je u 71 % zuba, dok je električni test vitaliteta bio pozitivan u 75 % slučajeva (Tablica 8). Takav obrazac nalaza u skladu je s postupnim uspostavljanjem funkcionalnog odgovora pulpnog tkiva, što odgovara konceptu RET-a kao dinamičnog i dugotrajnog procesa. Nešto veći udio pozitivnih odgovora pri električnom testiranju može se objasniti razlikama u mehanizmima podražaja i osjetljivosti pojedinih testova, pri čemu je važno naglasiti da ni jedna od navedenih metoda ne omogućuje izravnu procjenu pulpne perfuzije.

Dobivene stope pozitivnih odgovora na testove osjetljivosti bile su osjetno više u usporedbi s podacima iz dostupne literature. U recentnoj sustavnoj analizi i metaanalizi randomiziranih kontroliranih istraživanja pozitivni odgovori kod nekrotičnih nezrelih trajnih zuba zabilježeni su u 25,2 % slučajeva pri električnom testiranju, dok je kombinirani pozitivan odgovor na test vitaliteta hladnoćom i električni test iznosio svega 14,5 % (46). Iako je nužno uzeti u obzir heterogenost protokola uključenih u takve analize, ovako izražena razlika dodatno sugerira da primijenjeni modificirani protokol može povoljno utjecati na uspostavu funkcionalnog odgovora pulpnog tkiva.

Jedno od mogućih objašnjenja relativno visokog udjela pozitivnih osjetnih odgovora u ovom istraživanju odnosi se na specifičan prostorni raspored biološkog nosača. Za razliku od uobičajenih regenerativnih protokola, u kojima je nosač često ograničen na radikularni, ponajprije apikalni dio endodontskog prostora, u ovom je istraživanju A-PRF+ nosač proširen i na koronarni dio endodontskog prostora. Takav pristup potencijalno može omogućiti razvoj regeneriranog tkiva bliže mjestu primjene podražaja tijekom testiranja, čime se može povećati vjerojatnost detekcije osjetnog odgovora i smanjiti rizik od lažno negativnih nalaza, osobito u ranim fazama oporavka.

Iako radiološki ishodi ovog istraživanja jasno pokazuju nastavak razvoja korijena i strukturnu maturaciju nezrelih trajnih zuba, radiološki nalazi sami po sebi ne omogućuju pouzdanu procjenu funkcionalnog statusa novostvorenog tkiva. Promjene poput produljenja korijena, zadebljanja dentinskih stijenki i apikalnog zatvaranja mogu, barem djelomično, odražavati i reparativne procese koji ne uključuju uspostavu vitalnog, vaskulariziranog pulpnog tkiva. Stoga je za cjelovitu procjenu regenerativnog ishoda nužno morfološke radiološke nalaze nadopuniti funkcionalnom procjenom vitaliteta pulpe.

U tom je kontekstu laser-doplerska floumetrija korištena kao objektivna metoda procjene prisutnosti pulpne cirkulacije. Pritom treba istaknuti da je LDF u ovom istraživanju primijenjen isključivo u kvalitativnom obliku, pri čemu je bilježena prisutnost ili odsutnost detektabilnog signala pulpne perfuzije, a ne apsolutne perfuzijske vrijednosti. Takav je pristup odabran s obzirom na poznatu varijabilnost LDF signala, osobito u pedijatrijskoj populaciji i u zubima s promijenjenom anatomijom nakon regenerativnih postupaka, te je bio usmjeren na procjenu funkcionalne prisutnosti cirkulacije kao temeljnog pokazatelja vitaliteta pulpe (151).

Visok udio pozitivnih LDF nalaza, pri čemu je pulpna cirkulacija potvrđena u 93 % slučajeva, upućuje na ponovnu uspostavu funkcionalne vaskularizacije unutar novostvorenog tkiva u zubima liječenima A-PRF+ protokolom (Tablica 8). Ovaj nalaz ima posebnu kliničku važnost jer se odnosi na komponentu vitaliteta koju radiološke metode i testovi osjeta ne mogu izravno procijeniti. Klinička relevantnost LDF-a kao dijagnostičkog alata dodatno je naglašena u recentnim istraživanjima, koja ističu njegovu ključnu ulogu u donošenju terapijskih odluka vezanih uz očuvanje ili procjenu vitaliteta pulpnog tkiva (152).

U preostala dva slučaja u kojima LDF nije detektirao pulpnu perfuziju, moguće je da regenerativni odgovor nije bio dovoljan za uspostavu funkcionalne vaskularizacije. To se može povezati s težom

početnom traumom, smanjenim biološkim potencijalom tkiva ili izraženijom destrukcijom apikalnih struktura. Alternativno, varijabilnost odgovora može odražavati poznate biološke razlike u procesu regeneracije kod mladih trajnih zuba.

Kombinirana interpretacija subjektivnih testova osjeta i objektivne procjene pulpne cirkulacije omogućila je cjelovitiju evaluaciju funkcionalnog statusa regeneriranog tkiva. Postupan porast pozitivnih osjetnih odgovora, u kombinaciji s visokom stopom potvrđene pulpne perfuzije, upućuje na to da uočene promjene ne predstavljaju samo reparaciju, već pokazuju funkcionalna obilježja regenerativnog biološkog odgovora unutar endodontskog prostora.

Važno je pritom istaknuti da su podatci o primjeni objektivnih metoda procjene pulpne cirkulacije, poput laser-doplerske floumetrije, u kontekstu RET-a u dostupnoj literaturi zasad ograničeni, što otežava izravnu usporedbu dobivenih nalaza između različitih regenerativnih protokola. U tom smislu, primjena LDF-a u ovom istraživanju predstavlja dodatnu metodološku vrijednost u procjeni funkcionalnog vitaliteta pulpnog tkiva, a ne alat za kvantitativnu usporedbu intenziteta perfuzije.

Slijedom navedenoga rezultati ovog istraživanja podupiru drugu radnu hipotezu (H_2), prema kojoj primjena A-PRF+ u regenerativnoj endodontskoj terapiji omogućuje ponovnu uspostavu pulpne cirkulacije i funkcionalnog odgovora pulpnog tkiva. Dobiveni nalazi upućuju na funkcionalnu obnovu pulpnog prostora, kompatibilnu s regenerativno orijentiranim procesima, uz nužno uvažavanje metodoloških ograničenja i bez izravnih tvrdnji o histološki potvrđenoj regeneraciji pulpo-dentinskoga kompleksa.

5.5. Diskoloracija zuba

Diskoloracija zuba predstavlja jedno od najčešćih i klinički najrelevantnijih estetskih ograničenja regenerativne endodontske terapije, osobito kod mladih trajnih zuba u estetskoj zoni (54). Dostupna istraživanja upućuju na to da diskoloracija ne predstavlja isključivo estetski problem, već može negativno utjecati na zadovoljstvo pacijenata, prihvatanje terapije i percipirani dugoročni terapijski ishod, osobito u pedijatrijskoj i adolescentskoj populaciji (27).

Protokol primijenjen u ovom istraživanju osmišljen je radi minimiziranja rizika od diskoloracije, uz istodobno nastojanje da se optimiziraju estetski i biološki ishodi. Kao jedini materijal za koronarno brtvljenje odabran je staklenoionomerni cement, dok su MTA, u bijeloj i sivoj varijanti, kao i Biodentin, svjesno isključeni iz protokola. Ovi su materijali u literaturi, u brojnim kliničkim i eksperimentalnim istraživanjima, povezani s pojavom diskoloracije zuba, osobito u uvjetima kontakta s krvlju ili trombocitnim derivatima, poput PRF-a (171,172). Njihova primjena u regenerativnim postupcima često zahtijeva postavljanje materijala ispod razine cementno-caklinskog spoja kako bi se smanjio rizik estetskih komplikacija (28), čime se istodobno ograničavaju mogućnosti regeneracije u koronarnoj regiji.

U ovom istraživanju, tijekom dvanaestomjesečnog razdoblja praćenja, nije zabilježen ni jedan slučaj klinički vidljive diskoloracije zuba, što upućuje na učinkovitost primijenjene strategije koronarnog zatvaranja. Takav nalaz ima posebnu kliničku vrijednost, jer omogućuje primjenu regenerativnog protokola i u zubima u estetskoj zoni, bez uočenog kompromitiranja prirodne boje krune.

Dodatna mjera usmjerena na smanjenje rizika od diskoloracije odnosila se na primjenu triantibiotske paste (TAP), koja sadržava minociklin – antibiotik poznat po potencijalu izazivanja diskoloracije tvrdih zubnih tkiva (69,172). Kako bi se taj rizik dodatno smanjio, TAP je u ovom istraživanju primjenjivan isključivo ispod razine cementno-caklinskog spoja, uz strogu kontrolu koncentracije od 5 mg/mL. Odabrana koncentracija omogućuje učinkovito antibakterijsko djelovanje, dok istodobno ostaje ispod razine koja se u literaturi najčešće povezuje s klinički značajnom diskoloracijom (26,69).

Nadalje, prije postavljanja A-PRF+ nosača i završne restauracije, svi ostatci TAP-a iz pulpne komore pažljivo su i temeljito uklonjeni, u skladu s preporukama iz literature koje naglašavaju

važnost potpunog uklanjanja antibiotskih ostataka radi prevencije promjene boje zuba (69,172). Kombinacija ograničene primjene TAP-a, kontrolirane koncentracije i temeljitog čišćenja pulpne komore u ovom se istraživanju pokazala učinkovitom u očuvanju estetskih svojstava zuba.

Opisane modifikacije protokola, u kombinaciji s uporabom staklenoionomernog cementa kao jedinog materijala za koronarno brtvljenje, omogućile su primjenu A-PRF+ nosača i u koronarnom dijelu endodontskog prostora, bez uočenog povećanja rizika od promjene boje zuba. Na taj je način ublaženo jedno od ključnih ograničenja uobičajenih regenerativnih protokola, koji se u estetskoj zoni često ograničavaju isključivo na apikalni dio kanala. Regeneracija je pritom sagledana kao biološki proces koji potencijalno može zahvatiti cjelokupni endodontski sustav, uz očuvanje estetske prihvatljivosti terapije.

Takav pristup ima osobitu kliničku važnost kod mladih trajnih zuba u estetskoj zoni, gdje očuvanje prirodne boje zuba predstavlja jedan od ključnih terapijskih ciljeva (27,34). Dobiveni rezultati upućuju na to da je pravilnim odabirom materijala i pažljivo definiranim protokolom moguće istodobno postići povoljan biološki odgovor i stabilan estetski ishod, čime se dodatno povećava klinička vrijednost i primjenjivost modificiranog regenerativnog protokola. U ovom je istraživanju diskoloracija procjenjivana na temelju kliničke vidljivosti, u skladu s dizajnom i ciljevima istraživanja.

5.6. Regresijski model apikalnog zatvaranja

Primjena linearnog regresijskog modela u ovom je istraživanju omogućila kvantitativno sagledavanje odnosa između trajanja A-PRF+ terapije i dinamike apikalnog zatvaranja, pri čemu je regenerativni proces promatran kao kontinuiran i vremenski uvjetovan fenomen. Takav pristup nadilazi isključivo deskriptivnu analizu radioloških parametara te omogućuje uvid u opći tijek regeneracije, što je osobito važno u kontekstu bioloških procesa koji se odvijaju postupno i zahtijevaju dulje vrijeme.

Rezultati regresijskog modela pokazuju da je trajanje terapije najvažniji prediktor smanjenja apikalnog promjera (Tablica 9), što je u skladu s biološkom prirodom regeneracije pulpo-dentinskoga kompleksa. Regenerativni odgovor uključuje vremenski zahtjevnije procese, poput angiogeneze i organizacije novog tkiva, zbog čega se puni terapijski učinak ne može očekivati u kratkom vremenskom razdoblju, već se ostvaruje postupno tijekom praćenja.

Izostanak statistički značajnog utjecaja dobi valja tumačiti u kontekstu strukture uzorka. Prosječna dob ispitanika iznosila je $11,36 \pm 2,39$ godina, što odgovara dobnoj skupini koja se, prema važećim kliničkim smjernicama, smatra optimalnom za primjenu regenerativne endodontske terapije (4,147). Relativno uzak dobni raspon smanjuje varijabilnost prediktora dobi, čime se ograničava njegova mogućnost da se potvrdi kao neovisni čimbenik u regresijskom modelu. S obzirom na to da se regenerativni postupci sve češće primjenjuju i kod starijih adolescenata te zrelih trajnih zuba (46,48,55), uključivanje šireg dobnog raspona u buduće modele moglo bi omogućiti precizniju procjenu potencijalnog utjecaja dobi na regenerativni odgovor.

Izostanak značajnog utjecaja spola može se smatrati očekivanim nalazom u populaciji djece i adolescenata, u kojoj regeneracija u većoj mjeri ovisi o lokalnim biološkim uvjetima, stupnju razvoja korijena i primijenjenom terapijskom protokolu. Slično tomu, etiologija nekroze pulpe nije se pokazala značajnim prediktorom apikalnog zatvaranja, što se može dijelom pripisati pojednostavnjenoj binarnoj klasifikaciji (trauma/karijes), koja ne uzima u obzir kliničku heterogenost slučajeva ni težinu početnog oštećenja.

Iako linearni regresijski model objašnjava umjeren dio ukupne varijance apikalnog zatvaranja (Tablica 10), takav se nalaz ne treba promatrati kao nedostatak, već kao realan odraz složenosti regenerativnih bioloških procesa. Lu i suradnici, u suvremenoj studiji o prediktivnom modeliranju

ishoda regenerativne endodontske terapije, pokazuju da predviđanje terapijskog ishoda zahtijeva istodobnu integraciju više kliničkih i bioloških varijabli, pri čemu pojedinačni prediktori imaju ograničenu objašnjivu vrijednost kada se promatraju izolirano, a dodatni metodološki izazovi proizlaze iz heterogenosti uzoraka i terapijskih protokola (173). U tom su kontekstu umjerene vrijednosti koeficijenta determinacije u skladu s literaturom koja bilježi varijabilne radiološke i kliničke ishode cijeljenja (174).

Klinička vrijednost predloženog modela proizlazi iz njegove sposobnosti opisivanja opće dinamike apikalnog zatvaranja tijekom vremena, pri čemu linearna regresija služi kao aproksimacija prosječnog regenerativnog trenda. Iako model ne uključuje sve čimbenike koji mogu utjecati na individualni tijek regeneracije – dijelom zato što regresijska analiza nije bila središnji cilj ovog istraživanja, već dopunski analitički alat – on ipak pruža metodološki utemeljen okvir za razvoj složenijih i preciznijih prediktivnih alata, osobito u većim i heterogenijim kliničkim populacijama.

U budućim kliničkim istraživanjima prediktivni potencijal ovog regresijskog modela mogao bi se dodatno osnažiti uključivanjem većeg i heterogenijeg uzorka ispitanika, osobito šireg dobnog raspona te većeg broja zrelih trajnih zuba liječenih regenerativnim protokolima. Istodobno, detaljnija stratifikacija ključnih kliničkih varijabli, poput početne veličine periapikalne lezije, stupnja razvoja korijena, vremena proteklog od traume ili početka nekroze te svojstava restaurativnih materijala, mogla bi omogućiti preciznije kvantificiranje individualnog terapijskog odgovora.

Takav bi pristup omogućio pomak od opisivanja općih regenerativnih obrazaca prema razvoju klinički relevantnih i prognostički vrijednih prediktivnih alata, pri čemu bi linearni regresijski model primijenjen u ovom istraživanju zadržao ulogu metodološki pouzdane i konceptualno utemeljene osnove za njihov daljnji razvoj.

5.7. Mikrostrukturne promjene staklenoionomernih cemenata

Mikrostrukturna analiza provedena FE-SEM metodom pružila je detaljan uvid u promjene koje se odvijaju unutar staklenoionomernih cemenata tijekom jednogodišnjeg razdoblja maturacije u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Takav je pristup omogućio promatranje staklenoionomernih cemenata ne samo kao pasivnih restaurativnih materijala, već kao dinamičnih sustava u kojima se tijekom vremena odvijaju postupni procesi kemijske reorganizacije te mikrostrukturne i mineralne transformacije (175).

Dizajn laboratorijskog dijela istraživanja osmišljen je kao komplementaran kliničkom dijelu, pri čemu su u oba dijela korišteni isti restaurativni materijali, jednako ukupno razdoblje praćenja od 12 mjeseci te biološki relevantan medij. Time je osigurana metodološka povezanost i omogućena integrirana interpretacija laboratorijskih i kliničkih nalaza.

FE-SEM snimke analizirane nakon jednog tjedna maturacije pokazale su izraženu heterogenost mikrostrukture svih ispitivanih materijala, obilježenu gusto raspoređenim česticama punila različitih veličina i morfologija unutar cementne matrice. Prevladavale su čestice nepravilnog i uglatog oblika, jasno razgraničene od okolne matrice, što odgovara ranom stadiju nakon stvrdnjavanja, u kojem kiselinsko-bazna reakcija još uvijek nije u potpunosti dovršena (176,177). Takva mikrostrukturna slika odgovara inicijalnoj fazi vezivanja ionskih komponenti, uz još uvijek ograničenu integraciju punila u matricu.

Nakon šest mjeseci maturacije uočen je jasan pomak u mikrostrukturnoj organizaciji svih ispitivanih staklenoionomernih cemenata. Gustoća vidljivih čestica punila bila je smanjena, a granice između punila i matrice postale su manje izražene. Navedene promjene sukladne su postupnom djelomičnom otapanju staklene faze i integraciji ionskih komponenti u cementnu matricu, kako je opisano u kontekstu dugotrajne maturacije staklenoionomernih cemenata (178), te s nalazima o ionskoj izmjeni između staklenoionomernih cemenata i dentalnih tkiva koje su prikazali Moheet i suradnici (179). Istodobno je zabilježen povećani stupanj homogenizacije matrice, što pokazuje napredovanje procesa ionskog umrežavanja i postupnu stabilizaciju strukture.

Na snimkama analiziranim nakon dvanaest mjeseci maturacije mikrostrukturne promjene bile su još izraženije. Broj jasno prepoznatljivih čestica punila dodatno se smanjio, dok je cementna matrica pokazivala znatno ujednačeniju i kompaktniju strukturu. U većini uzoraka uočena je pojava

mrežastih struktura morfologije koja je kompatibilna s mineralnim karakterom, koje se protežu unutar matrice i mogu upućivati na kontinuirano taloženje mineralne faze. Takav se nalaz ne može pripisati isključivo pasivnom starenju materijala, već je u skladu s aktivnim procesima mineralne reorganizacije i biointeraktivnog ponašanja staklenoionomernih cementa tijekom dugotrajnog kontakta s vlažnim okolišem (175,178).

Vremenski slijed opisanih mikrostrukturnih promjena, uključujući postupnu homogenizaciju matrice i promjene u morfologiji površine tijekom različitih faza maturacije, jasno je prikazan na FE-SEM snimkama (Slika 10), čime se dodatno potkrepljuje interpretacija dugotrajne maturacije staklenoionomernih cementa.

Uočeni vremenski ovisni mikrostrukturni razvoj bio je prisutan kod svih ispitivanih staklenoionomernih cementa, neovisno o njihovoj formulaciji. Ova konzistentnost nalaza upućuje na to da staklenoionomerni cementi, primijenjeni kao materijali za restauraciju sekundarnog krova pulpne komore, pokazuju obilježja biointeraktivnog ponašanja te sposobnost postupne mineralne maturacije (175,178). Takvo je ponašanje suprotno konceptu restaurativnih materijala kao inertnih barijera te podupire shvaćanje staklenoionomernih cementa kao sustava koji tijekom vremena mogu aktivno sudjelovati u ionskoj i mineralnoj razmjeni s okolinom.

Sitne se pukotine povremeno uočene na površinama pojedinih uzoraka interpretiraju kao artefakti nastali tijekom pripreme uzoraka za FE-SEM analizu, osobito tijekom rezanja i sušenja, te se ne mogu smatrati sastavnim dijelom mikrostrukture ispitivanih materijala. Njihova nasumična distribucija, kao i odsutnost ponovljivog i konzistentnog obrasca, dodatno podupiru takvo tumačenje.

Sveukupno gledano, FE-SEM mikrostrukturna analiza pokazuje da svi ispitivani staklenoionomerni cementi tijekom vremena prolaze kroz jasno prepoznatljive faze maturacije, obilježene postupnom homogenizacijom matrice i razvojem struktura morfologije kompatibilne s mineralnim karakterom. Ovi nalazi podupiru pretpostavku da staklenoionomerni cementi korišteni u ovom istraživanju posjeduju potencijalna bioaktivna svojstva te tijekom vremena pokazuju obilježja postupne mineralne maturacije, čime se podupire treća radna hipoteza (H₃).

5.8. Mineralizacijski potencijal Glass Carbomera

Rezultati mikrostrukturne analize upućuju na to da Glass Carbomer pokazuje specifičan obrazac mineralno povezanih mikrostrukturnih promjena koji se kvalitativno razlikuje od onoga uočenog kod ostalih ispitivanih staklenoionomernih cementata. Za razliku od općih mikrostrukturnih promjena prisutnih kod svih materijala tijekom vremena, kod Glass Carbomera zabilježene su izraženije i prostorno organiziranije promjene koje upućuju na veći potencijal razvoja mineralno kompatibilnih struktura, što je u skladu s njegovom naprednom formulacijom i konceptom biointeraktivnosti modificiranih staklenoionomernih cementata (127,175).

FE-SEM analiza, provedena nakon šest mjeseci maturacije, pokazala je prisutnost diskretnih, zaobljenih čestica ujednačene veličine i glatke površine unutar cementne matrice Glass Carbomera (Slika 10; podslika G6). Ovakva se morfologija jasno razlikuje od nepravilnih i uglatih čestica punila karakterističnih za konvencionalne staklenoionomerne cemente te je u skladu s morfološkim obilježjima mineralno povezanih struktura opisanih u literaturi kod staklenoionomernih cementata modificiranih dodatkom hidroksiapatita (180). Pojava ovih struktura u srednjoj fazi praćenja može upućivati na raniji početak mineralno povezanih procesa u Glass Carbomeru u usporedbi s ostalim ispitivanim materijalima.

U završnoj fazi praćenja, nakon dvanaest mjeseci maturacije, u uzorcima Glass Carbomera uočene su jasno definirane regije različite morfologije u odnosu na okolnu cementnu matricu, obilježene kohezivnim grupiranjem većeg broja mineralno kompatibilnih čestica i njihovom prostornom organizacijom (Slika 10; podslika G12). Takav obrazac promjena nadilazi difuznu mikrostrukturnu reorganizaciju uočenu kod ostalih staklenoionomernih cementata te upućuje na progresivan i vremenski ovisan razvoj mineralno povezanih struktura unutar materijala. Razvoj ovih regija može upućivati na stvaranje stabilnijeg mikrookoliša unutar cementne matrice, pogodnog za dugotrajniju mineralnu integraciju.

Slični obrasci lokalno organiziranih mineralno povezanih mikrostrukturnih promjena u modificiranim staklenoionomernim cementima opisani su i u literaturi, osobito u kontekstu materijala s naglašenim biointeraktivnim svojstvima, kako su to prikazali Tuygunov i suradnici u recentnom sustavnom pregledu koji analizira bioaktivnost i remineralizacijski potencijal ovih materijala (129).

Važno je naglasiti da uočene se strukture u uzorcima Glass Carbomera ne mogu pripisati artefaktima pripreme uzoraka za FE-SEM analizu. Njihova dosljedna pojavnost, jasna morfološka diferencijacija te vremenska povezanost s razdobljem maturacije upućuju na to da se radi o stvarnim promjenama unutar materijala. Ovi nalazi podupiru shvaćanje da Glass Carbomer ne djeluje isključivo kao pasivni ionski rezervoar, već pokazuje obilježja biointeraktivnog restaurativnog materijala koji može aktivno sudjelovati u mineralno povezanim procesima (175).

Sveukupno gledano, rezultati mikrostrukturne analize upućuju na to da Glass Carbomer, zbog svoje napredne formulacije, pokazuje izraženiji i organiziraniji mineralizacijski potencijal u usporedbi s ostalim ispitivanim staklenoionomernim cementima. Ovakav obrazac ponašanja podupire dopunsku hipotezu (H_{3a}) te opravdava razmatranje Glass Carbomera kao potencijalno povoljnog restaurativnog materijala s naglašenim biointeraktivnim svojstvima, osobito u klinički zahtjevnim situacijama koje zahtijevaju dugoročnu stabilnost i biološku kompatibilnost, uključujući restauraciju sekundarnog krova pulpne komore u okviru regenerativne endodontske terapije (175).

5.9. Ionska interakcija na sučelju materijala i zuba

Energijsko-disperzijska rendgenska spektroskopija (EDS) omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu procjenu elementarnog sastava uzorka putem detekcije karakterističnog rendgenskog zračenja koje nastaje zbog interakcije usmjerenog elektronskog snopa s atomima uzorka. Energija emitiranog zračenja specifična je za svaki kemijski element, a kvantitativni se rezultati EDS analize izražavaju kao relativni maseni udjeli elemenata (wt. %) unutar analiziranog volumena (158–160).

U okviru EDS analize provedene u ovoj laboratorijskoj studiji, promjene relativnih masenih udjela elemenata tumače se kao odraz promjena u kemijskom sastavu površinskih i subpovršinskih slojeva cakline i dentina u području kontakta s restaurativnim materijalima (159,160). Povećanje relativnog masenog udjela pojedinog elementa u odnosu na inicijalni sastav cakline odnosno dentina (C_0 , D_0) tumači se kao potencijalna ugradnja ili nakupljanje tog elementa u dentalnom tkivu putem ionske difuzije, ionske izmjene ili adsorpcije na mineralnu matricu (159,160). Nasuprot tomu, smanjenje relativnog masenog udjela ne upućuje nužno na gubitak elementa, već može odražavati promjene u omjerima elemenata unutar analiziranog volumena ili njihovu redistribuciju unutar mineralne matrice (159).

S obzirom na to da EDS analiza daje isključivo relativne, a ne apsolutne koncentracije elemenata, interpretacija rezultata temelji se na usporedbi s referentnim vrijednostima i analizi promjena u međusobnim odnosima među elementima (159,160). U ovom je istraživanju usporedba inicijalnog sastava dentalnih tkiva s onim u područjima neposrednog kontakta s restaurativnim materijalima omogućila procjenu njihove međusobne interakcije, pri čemu su promjene u relativnim masenim udjelima interpretirane kao pokazatelji potencijalne ionske razmjene i ugradnje elemenata u mineralizirana dentalna tkiva.

5.9.1. EDS mikrokemijska analiza materijala – regija M

Rezultati EDS mikrokemijske analize materijala u regiji M upućuju na to da svi ispitivani staklenoionomerni cementi – Ketac Universal Aplicap (K), Fuji IX GP Fast (F), Equia Forte Fil (E) i Glass Carbomer GlassFill (G) – tijekom vremena prolaze kroz kemijske promjene koje su u skladu s procesom sazrijevanja i dinamičnom kemijskom reorganizacijom ionski umrežene cementne matrice, kako je detaljno opisano u radovima Nicholsona i suradnika o kinetici ionskog otpuštanja i maturaciji staklenoionomernih cementa, kao i u novijim preglednim analizama bioaktivnih obilježja ovih materijala (127,175).

Promjene relativnih masenih udjela elemenata u regiji M nisu bile jedinstvene ni konzistentne za sve analizirane materijale i elemente, što je očekivano s obzirom na višefaznu i o kemijskom sastavu ovisnu prirodu maturacije staklenoionomernih i bioaktivnih sustava. Budući da EDS analiza daje podatke o relativnim masenim udjelima elemenata, zabilježeni porasti ili padovi pojedinih vrijednosti ne predstavljaju nužno apsolutne promjene količine iona, nego mogu odražavati promjene u međusobnim omjerima elemenata unutar analiziranog volumena te procese njihove kemijske redistribucije tijekom procesa maturacije, što je u skladu s metodološkim ograničenjima i interpretativnim okvirima EDS analize opisanima u pregledima Kaczmarek i suradnika (181).

Na razini pojedinih elemenata udio fluora pokazivao je različite vremenske obrasce među analiziranim materijalima, uz statistički značajne razlike među pojedinim parovima materijala (Slika 13). Takvi vremenski obrasci mogu odražavati razlike u kemijskoj dinamici cementne matrice i raspoloživosti fluoridnih iona tijekom dugotrajnog sazrijevanja, pri čemu statistička značajnost među skupinama dobiva dodatnu interpretativnu i potencijalnu kliničku relevantnost u širem kontekstu, s obzirom na ulogu fluora u remineralizacijskim procesima (127).

Udio aluminija pokazivao je statistički značajne razlike među većim brojem parova analiziranih materijala, što odražava razlike u kemijskom sastavu i stupnju ionskog umrežavanja cementne matrice. S obzirom na strukturnu ulogu aluminija u staklenoionomernim cementima, ove se razlike tumače kao dio procesa sazrijevanja matrice, a ne kao pokazatelj bioaktivnosti (175).

Promjene udjela silicija bile su varijabilne među analiziranim materijalima, što može upućivati na kompleksnu kemijsku reorganizaciju staklene faze tijekom maturacije, u skladu s nalazima

Moheeta i suradnika, koji su opisali ionsku izmjenu silicija i drugih elemenata između staklenoionomernih cementa i prirodnih zubnih tkiva, pri čemu su neke od uočenih promjena kompatibilne s mikrostrukturnim promjenama zabilježenima FE-SEM analizom (179).

Ograničene promjene udjela fosfora u skladu su s dostupnom literaturom, prema kojoj fosfor u staklenoionomernim cementima nema dominantnu ulogu u kemijskoj dinamici matrice, već sudjeluje u stabilnijim fosfatnim komponentama sustava (179).

Udio kalcija pokazivao je statistički značajne razlike među analiziranim materijalima, što upućuje na razlike u kemijskom sastavu i procesima sazrijevanja ionski umrežene cementne matrice. Međutim, s obzirom na relativnu prirodu EDS analize i višestruku ulogu kalcija u strukturi cementa, veći relativni udio kalcija u regiji M ne može se izravno povezati s njegovom mobilnošću ili biološkim učinkom, već se prvenstveno tumači u kontekstu kemijske stabilizacije cementne matrice tijekom maturacije, što je u skladu s opažanjima Kuru i suradnika (182).

Udio stroncija pokazivao je statistički značajne razlike među skupinama materijala (Slika 13), što se može povezati s razlikama u kemijskom sastavu cementne matrice i raspoloživosti stroncijevih iona. Budući da se stroncij u literaturi opisuje kao ion sposoban supstituirati kalcij u mineralnoj fazi, uočene razlike, analogno fluoru, mogu imati potencijalnu biološku i kliničku relevantnost u kontekstu remineralizacijskog potencijala materijala, kako su opisali Saxena i suradnici (183).

Nalazi EDS analize u regiji M dodatno su potvrđeni FE-SEM analizom presjeka materijala, koja je pokazala vremenski ovisne promjene unutarne mikrostrukture cementne matrice. Budući da FE-SEM omogućuje uvid u morfologiju i mikrostrukturu, a EDS u relativni kemijski sastav istog područja, njihova zajednička interpretacija pruža komplementaran prikaz istodobnih kemijskih i strukturnih promjena tijekom sazrijevanja materijala (181,184).

Zaključno, regija M u ovom se istraživanju ne tumači kao izravan pokazatelj ionske izmjene sa zubnim tkivima, nego kao kemijska i strukturna osnova materijala koja odražava potencijalnu raspoloživost iona za biointerakciju u regijama sučelja s caklinom i dentinom.

5.9.2. EDS mikrokemijska analiza sučelja materijala i cakline – regija CM

Rezultati EDS mikrokemijske analize u regiji CM upućuju na postojanje mjerljivih i vremenski uvjetovanih promjena u kemijskom sastavu kontaktnog sloja cakline uza sve ispitivane materijale. Za razliku od regije M, u kojoj promjene prvenstveno odražavaju kemijsku reorganizaciju samog materijala, u regiji CM uočene se promjene očituju kao promjene relativnih masenih udjela pojedinih elemenata u kontaktnom sloju cakline (175). Budući da je analiza provedena na intaktnoj, nedemineraliziranoj caklini, za razliku od većine istraživanja temeljenih na demineraliziranim modelima, kako ističu Nicholson i Sidhu u raspravama o bioaktivnosti staklenoionomernih cemenata (175), uočene promjene ne mogu se tumačiti kao remineralizacijski proces, već kao kemijska interakcija restaurativnih materijala s očuvanim, mineraliziranim tkivom cakline (181). Takva interakcija uključuje prisutnost remineralizacijskih iona u kontaktnom sloju cakline te potencijalno može pridonijeti povećanoj otpornosti mineralne strukture na buduće demineralizacijske izazove (183).

Udio fluora pokazivao je trajno povišene vrijednosti u kontaktnom sloju cakline uza sve ispitivane materijale, uz slične vremenske obrasce tijekom razdoblja praćenja. Uočeni porast, s izraženijim vrijednostima u srednjem razdoblju i blagim smanjenjem u završnoj fazi, može biti kompatibilan s dinamičnom raspodjelom fluora unutar mineralne strukture cakline, pri čemu se smanjenje relativnog udjela u kontaktnom sloju ne mora tumačiti kao njegov gubitak, već kao moguća redistribucija u dublje slojeve (127). Slične obrasce redistribucije fluorida u mineraliziranim zubnim tkivima opisali su i Saxena i suradnici, naglašavajući da takve promjene mogu imati funkcionalno značenje bez nužne strukturne obnove mineralne faze (183). Statistički značajne razlike među pojedinim materijalima, potvrđene dodatnim statističkim analizama (Slika 17), upućuju na varijabilnost u obrascima fluoridne interakcije na sučelju s caklinom, koja u kliničkom kontekstu može imati funkcionalnu važnost u smislu povećane otpornosti mineralne faze na demineralizacijske izazove (183).

Prisutnost povišenih udjela stroncija u kontaktnom sloju cakline upućuje na kemijsku interakciju između restaurativnih materijala i mineraliziranog zubnog tkiva, pri čemu stroncij ima posebno značenje zbog svoje kemijske sličnosti s kalcijem. Saxena i suradnici opisali su stroncij kao ion sposoban supstituirati kalcij u apatitskoj strukturi, čime stječe potencijalno funkcionalno značenje u mineralnoj fazi zubnih tkiva (183). U kontekstu intaktne, nedemineralizirane cakline, uočene

promjene u udjelu stroncija ne mogu se tumačiti kao remineralizacijski proces u klasičnom smislu, već kao kemijska modifikacija kontaktnog sloja cakline na sučelju s materijalom. Takva modifikacija može imati povoljan funkcionalni učinak u smislu povećane otpornosti mineralne strukture na demineralizacijske izazove (183), bez impliciranja strukturne obnove ili regeneracije cakline. Nedostatak statistički značajnih razlika među skupinama dodatno upućuje na to da je uočena interakcija prvenstveno posljedica općih kemijskih svojstava stroncija i njegove raspoloživosti u sastavu materijala, a ne specifičnog učinka pojedine formulacije.

Opći trend sniženja relativnih masenih udjela kalcija i fosfora uočen je u kontaktnom sloju cakline u odnosu na referentne vrijednosti, uz određenu vremensku varijabilnost. Budući da kalcij i fosfor čine temeljnu mineralnu komponentu cakline, kako je detaljno opisano u fizikalno-kemijskim analizama prirodnih zubnih tkiva (185), uočene se promjene ne mogu tumačiti kao pokazatelj demineralizacije ili gubitka mineralne mase, osobito s obzirom na činjenicu da je analiza provedena na intaktnoj, nedemineraliziranoj caklini. S obzirom na relativnu prirodu EDS analize, smanjenje udjela Ca i P vjerojatno odražava promjene u međusobnim omjerima elemenata unutar analiziranog volumena, povezane s istodobnim porastom drugih ionskih komponenti u kontaktnom sloju (181). U tom se kontekstu promjene Ca i P tumače kao dio kemijske reorganizacije kontaktnog sloja cakline na sučelju s restaurativnim materijalima, a ne kao biološki relevantna promjena mineralne strukture cakline. Nedostatak statistički značajnih razlika među skupinama dodatno podupire tumačenje da se radi o općem obrascu površinske kemijske interakcije, neovisnom o vrsti materijala.

Aluminij, koji nema poznatu remineralizacijsku ulogu u mineraliziranim zubnim tkivima (175), u ovom se istraživanju razmatra isključivo kao pokazatelj kemijske interakcije i bliskog kontakta staklenoionomernih cemenata s mineralnom fazom cakline, bez implikacija na biološko ojačavanje ili obnovu mineralne strukture. Slično tomu, promjene u udjelu silicija u kontaktnom sloju cakline tumače se kao dio kemijske reorganizacije sučelja između silikatne komponente restaurativnih materijala i mineraliziranog zubnog tkiva, pri čemu se njihova prisutnost ne povezuje s remineralizacijskim procesima (186), već s površinskom kemijskom interakcijom na sučelju materijala i cakline.

Takav obrazac površinske ionske interakcije na sučelju staklenoionomernih cemenata i cakline u skladu je s nalazima Moheeta i suradnika, koji su opisali ionsku izmjenu između

staklenoionomernih materijala i prirodnih zubnih tkiva, kao i s opažanjima Bezerra i suradnika o povišenim koncentracijama određenih iona u caklini i dentinu uz staklenoionomerne restauracije (179,187).

Kumulativni indeksi ionske interakcije korišteni su kao opisni pokazatelji za integrirani prikaz maksimalnih i dugotrajnih promjena više ionskih komponenti u kontaktnom sloju cakline. U tom smislu, indeksi omogućuju usporedni uvid u raspoloživost i dinamiku ionskih komponenti u caklini tijekom vremena, bez impliciranja biološke učinkovitosti ili kliničke prednosti pojedinih materijala.

Sveukupno, rezultati EDS analize u regiji CM upućuju na postojanje trajne i višekomponentne kemijske interakcije između staklenoionomernih cemenata i cakline, unatoč njezinoj visokoj mineraliziranosti i relativnoj kemijskoj stabilnosti.

5.9.3. EDS mikrokemijska analiza sučelja materijala i dentina – regija DM

Rezultati EDS mikrokemijske analize u regiji DM upućuju na postojanje mjerljivih i vremenski uvjetovanih promjena u kemijskom sastavu kontaktnog sloja dentina u dodiru sa svim ispitivanim materijalima tijekom razdoblja praćenja. Budući da je analiza provedena na intaktnom, nedemineraliziranom dentinu, uočene promjene ne mogu se tumačiti kao remineralizacijski proces, već kao kemijska interakcija restaurativnih materijala s očuvanom mineralnom i organskom komponentom dentina (185). Za razliku od cakline, dentin kao strukturno i kemijski heterogenije tkivo pokazuje izraženiju ionsku dinamiku, što je kompatibilno s njegovom nižom razinom mineralizacije, prisutnošću organske matrice i dentinskih tubula, što prema Sarna-Boš i suradnicima omogućuje složenije i dinamičnije površinske kemijske interakcije (185).

Relativni maseni udio fluora u kontaktnom sloju dentina bio je povišen u odnosu na inicijalni sastav uza sve ispitivane restaurativne materijale tijekom cijelog razdoblja praćenja (Slika 18). Iako su zabilježene vremenske oscilacije, nije uočen jasan ni konzistentan obrazac promjena, niti su potvrđene statistički značajne razlike među materijalima, što upućuje na to da je fluoridna interakcija obilježje samog sučelja materijala i dentina. U kontekstu intaktnog, nedemineraliziranog dentina, povišeni udjeli fluora ne tumače se kao remineralizacijski proces, već kao kemijska modifikacija kontaktnog sloja dentina koja može pridonijeti povećanoj kemijskoj stabilnosti mineralne faze i smanjenoj osjetljivosti na demineralizacijske izazove, u skladu s opažanjima Ajcharanukul i suradnika o difuziji fluorida u dentinu (188).

Relativni maseni udio stroncija u kontaktnom sloju dentina bio je povišen u odnosu na inicijalni sastav uza sve ispitivane restaurativne materijale tijekom razdoblja praćenja, uz izražene vremenske oscilacije i bez jasno definiranog obrasca promjena (Slika 18). Unatoč deskriptivnim razlikama među materijalima, statističke analize nisu potvrdile postojanje značajnih razlika u udjelu stroncija među skupinama, što upućuje na to da je njegova prisutnost prvenstveno obilježje kemijske interakcije na sučelju materijala i dentina, a ne specifičnog sastava pojedine formulacije. Abdalla i suradnici ističu da stroncij, zbog kemijske sličnosti s kalcijem, može sudjelovati u modifikaciji mineralne faze dentina bez nužne strukturne obnove, što je kompatibilno s nalazima ovog istraživanja (189).

Relativni maseni udjeli kalcija i fosfora u kontaktnom sloju dentina bili su pretežito sniženi u odnosu na inicijalni sastav tijekom razdoblja praćenja, uz izraženu vremensku varijabilnost i bez

konzistentnog obrasca promjena (Slika 18). Izostanak statistički značajnih razlika među materijalima upućuje na to da uočene promjene odražavaju opću kemijsku dinamiku sučelja, a ne specifični učinak pojedinog materijala. S obzirom na relativnu prirodu EDS analize i činjenicu da kalcij i fosfor čine temeljnu mineralnu komponentu dentina, smanjenje njihovih relativnih udjela ne tumači se kao demineralizacija, već kao dio površinske kemijske reorganizacije mineralne faze kontaktnog sloja, povezane s istodobnom prisutnošću drugih ionskih komponenti, što je u skladu s interpretacijama Moheeta i suradnika o ionskoj izmjeni na sučelju dentina i restaurativnih materijala (185).

Relativni maseni udjeli aluminijske i silicijske u kontaktnom sloju dentina bili su povišeni u odnosu na inicijalni sastav tijekom razdoblja praćenja, uz izraženu vremensku varijabilnost i bez konzistentnog obrasca promjena (Slika 18). Izostanak statistički značajnih razlika među materijalima upućuje na to da su uočene promjene obilježje opće kemijske interakcije na sučelju materijala i dentina. S obzirom na to da aluminij i silicij nemaju izravnu remineralizacijsku ulogu u zubnim tkivima, njihova se prisutnost tumači kao pokazatelj kemijske reorganizacije kontaktnog sloja dentina na granici s materijalom, bez implikacija na biološko ojačavanje ili obnovu dentinskog tkiva (175).

U skladu s kumulativnim indeksima definiranim za caklinu, kumulativni indeksi ionske interakcije s dentinom primijenjeni su kao opisni alati za usporedni prikaz raspoloživosti i dinamike ionskih komponenti tijekom vremena, bez impliciranja biološke učinkovitosti ili kliničke prednosti pojedinih materijala.

Sveukupno, rezultati EDS analize u regiji DM upućuju na postojanje trajne i višekomponentne kemijske interakcije između staklenoionomernih cementa i dentina, u skladu s njegovom strukturnom i kemijskom heterogenošću te prisutnošću mineralne i organske komponente.

5.9.4. Usporedba ionske interakcije s caklinom i dentinom

Važno je naglasiti da se rezultati ovog istraživanja ne mogu izravno kvantitativno uspoređivati s nalazima drugih *in vitro* i *in situ* studija koje su ispitivale ionsku interakciju staklenoionomernih materijala s caklinom i dentinom, s obzirom na razlike u eksperimentalnim modelima, analitičkim metodama i načinu izražavanja rezultata. U dostupnoj se literaturi često primjenjuju različiti eksperimentalni modeli i analitički pristupi, uključujući demineralizirane modele zubnih tkiva, različite vremenske točke analize i alternativne tehnike površinske karakterizacije (181), dok se u ovom istraživanju EDS analiza temelji na relativnim masenim udjelima elemenata u intaktnim dentalnim tkivima. Stoga se usporedba s prethodnim istraživanjima može provoditi isključivo na razini općih trendova i obrazaca ionske interakcije, dok su međusobne usporedbe između regija CM i DM unutar ovog istraživanja metodološki utemeljene i izravno usporedive.

U obje regije zabilježen je porast udjela fluora, aluminija, silicija i stroncija u kontaktnim slojevima uz restaurativne materijale, pri čemu su u dentinu te promjene bile izraženije tijekom promatranog razdoblja. Posebno je u dentinu uočena veća sklonost zadržavanju fluoridnih i stroncijevih iona, što upućuje na povoljnije uvjete za dugotrajniju ionsku interakciju. Caklina, iako pokazuje ionske promjene u prisutnosti restaurativnih materijala, reagira slabijim intenzitetom u usporedbi s dentinom, u skladu sa svojom visokom mineraliziranošću i nižom propusnošću (185). Pad relativnih udjela kalcija i fosfora zabilježen je u obje regije, pri čemu je bio izraženiji u dentinu. Takav nalaz ne upućuje na demineralizaciju, već na promjenu relativnog kemijskog sastava kontaktnog sloja, povezanu s ionskom izmjenom i kemijskom reorganizacijom mineralne faze (185).

Komparativna analiza regija DM i CM pokazala je da u većini ispitivanih kombinacija materijala i elemenata dentin pokazuje tendenciju viših relativnih masenih udjela fluora (F), aluminija (Al), silicija (Si) i stroncija (Sr) u odnosu na caklinu (Tablica 11). Statistički značajne razlike potvrđene su samo za pojedine kombinacije, dok za ostale uočeni trend nije dosegnuo razinu statističke značajnosti.

Uočene razlike u intenzitetu ionske interakcije između cakline i dentina mogu se objasniti njihovim strukturnim i kemijskim obilježjima. Dentin se, u odnosu na caklinu, odlikuje sitnijim kristalima hidroksiapatita, većim udjelom organske matrice te izraženijom propusnošću, što je povezano s njegovom tubularnom građom i većom efektivnom površinom (179,185). Takva strukturna

obilježja pogoduju difuziji i zadržavanju ionskih komponenti iz restaurativnih materijala te rezultiraju izraženijom kemijskom izmjenom na sučelju s dentinom, što je u skladu s općim nalazima Moheeta i suradnika, koji su opisali intenzivniju ionsku izmjenu između staklenoionomernih cemenata i dentina u odnosu na caklinu, kao i s opažanjima Bezerra i suradnika o povišenim koncentracijama iona u dentinu uz staklenoionomerne restauracije (179,187).

Ovi nalazi dodatno upućuju na to da dentin, u odnosu na caklinu, predstavlja kemijski reaktivniji supstrat u interakciji s restaurativnim materijalima, što opravdava potrebu za zasebnom i diferenciranom interpretacijom ionskih interakcija na sučelju materijala s pojedinim tvrdim zubnim tkivima.

5.10. Sinteza nalaza kliničkog i laboratorijskog dijela studije

Nalazi ovog istraživanja, sagledani u cjelini, upućuju na to da uspjeh regenerativne endodontske terapije nezrelih trajnih zuba ne proizlazi iz djelovanja jednoga izoliranog čimbenika, već iz međusobno usklađenog doprinosa bioloških, kliničkih i restaurativnih komponenti terapijskog protokola. Dobiveni rezultati konzistentno upućuju na to da se regeneracija u ovom kontekstu očituje kao vremenski uvjetovan i progresivan proces koji uključuje strukturnu maturaciju korijena, funkcionalne pokazatelje obnove pulpnog tkiva, stabilno koronarno brtvljenje te očuvanje estetskih obilježja zuba.

Na temelju dobivenih nalaza može se pretpostaviti da primjena modificiranog regenerativnog protokola može pridonijeti povoljnim kliničkim i radiološkim ishodima. Uočeni obrasci cijeljenja, razvoja korijena i funkcionalnih nalaza vitaliteta upućuju na vremenski sinkroniziran razvoj morfoloških i funkcionalnih promjena. Takva paralelna dinamika rasta i funkcionalnog oporavka dodatno podupire pretpostavku da se u ovom istraživanju ne radi isključivo o reparativnim procesima, već o nalazima kompatibilnima s regeneracijom pulpo-dentinskoga kompleksa, uz jasno razlikovanje osjetnog odgovora i pokazatelja prisutnosti pulpne cirkulacije.

Posebno važan nalaz predstavlja potencijalna povezanost između radioloških pokazatelja razvoja korijena i funkcionalnih nalaza vitaliteta. Zubi s izraženijim produljenjem korijena, zadebljanjem dentinskih stijenki i naprednijim apikalnim zatvaranjem ujedno su pokazivali veći udio pozitivnih funkcionalnih nalaza, uključujući pokazatelje prisutnosti pulpne cirkulacije, mjerene laser-doplerskom floumetrijom. Ova podudarnost strukturnih i funkcionalnih pokazatelja upućuje na to da bi se regenerativni ishod mogao interpretirati kao integrirani proces u kojem morfološka stabilizacija i funkcionalni oporavak napreduju usporedno.

U kontekstu stabilnosti regenerativnog ishoda tijekom razdoblja praćenja koronarno se brtvljenje ističe kao izrazito važan čimbenik. U ovom su istraživanju staklenoionomerni cementi korišteni kao jedini i definitivni koronarni ispun nakon regenerativnog postupka. Klinički su nalazi tijekom razdoblja praćenja pokazali stabilno koronarno zatvaranje, bez gubitka retencije, sekundarnog karijesa ili diskoloracije zuba. Izostanak promjena boje zuba dodatno naglašava estetski povoljan učinak primijenjenog protokola, što ima osobitu važnost u pedijatrijskoj i adolescentskoj populaciji, gdje su funkcionalni i estetski ishodi neraskidivo povezani. Dobiveni nalazi upućuju na

to da pravilno odabrani, i adekvatno primijenjeni, staklenoionomerni cementi mogu zadovoljiti restaurativne i estetske zahtjeve regenerativne endodonske terapije unutar promatranog razdoblja.

Laboratorijski nalazi dodatno podupiru klinička opažanja. FE-SEM i EDS analize upućuju na kontinuiranu mikrostrukturnu maturaciju restaurativnih materijala te na trajnu, višekomponentnu kemijsku interakciju na sučelju s tvrdim zubnim tkivima, osobito s dentinom. U tom se kontekstu uloga restaurativnog materijala ne svodi isključivo na mehaničko brtvljenje, već uključuje i povoljnu kemijsku kompatibilnost s dentinom i caklinom. Takva kompatibilnost može pridonijeti stabilnosti sučelja materijala i zubnog tkiva te očuvanju povoljnih uvjeta za regenerativni proces.

Među ispitivanim materijalima uočene su razlike u obrascima mineralne interakcije, pri čemu se Glass Carbomer istaknuo izraženijim i organiziranijim mineralnim odgovorom, što je dodatno potvrđeno FE-SEM analizom mikrostrukture. Ipak, svi analizirani staklenoionomerni cementi pokazali su povoljna bioaktivna svojstva, što upućuje na mogućnost njihove primjene u okviru regenerativne endodonske terapije, uz jasno definirane indikacije i protokole.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da primijenjeni modificirani regenerativni protokol omogućuje uvjete kompatibilne s regeneracijom nezrelih trajnih zuba, a ne samo njihovom stabilizacijom ili reparacijom. Modificirani protokol razmatra se kao integrirani terapijski pristup koji objedinjuje biološku obnovu, funkcionalnu rehabilitaciju te estetsku i strukturnu stabilnost zuba tijekom promatranog razdoblja. Time ovo istraživanje pruža doprinos metodološki utemeljenom razumijevanju buduće kliničke primjene i daljnjeg razvoja regenerativne endodonske terapije.

5.11. Metodološka ograničenja istraživanja i buduće smjernice

Pri interpretaciji dobivenih rezultata potrebno je uzeti u obzir određena metodološka ograničenja ovoga istraživanja, od kojih su mnoga već detaljno razmotrena unutar pojedinih tematskih cjelina Rasprave. U nastavku su sažeto izdvojena ključna ograničenja relevantna za cjelokupnu interpretaciju nalaza.

Jedno od osnovnih ograničenja odnosi se na trajanje razdoblja praćenja, koje je bilo ograničeno na dvanaest mjeseci nakon završetka liječenja. Iako je to razdoblje dostatno za procjenu rane kliničke stabilnosti, inicijalnih radioloških promjena i funkcionalnih ishoda tijekom prve godine, ono ne omogućuje pouzdanu procjenu dugoročne stabilnosti regenerativnog odgovora, trajnosti vitaliteta niti postojanosti strukturnih promjena korijena.

Metodološko ograničenje predstavlja i nerandomizirani dizajn istraživanja te uporaba povijesne kontrolne skupine liječene postupkom apeksifikacije kalcijevim hidroksidom. Iako je takav pristup bio etički i klinički opravdan te je omogućio usporedbu suvremenog regenerativnog protokola s dugogodišnjim standardom liječenja, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost utjecaja razlika u načinu prikupljanja i dokumentiranja podataka između skupina.

Također, neusklađenost vremenskih točaka radiološkog praćenja između eksperimentalne i kontrolne skupine ograničava mogućnost usporedbe rane dinamike promjena, pri čemu je usporedba temeljena ponajprije na ukupnom opsegu i smjeru morfoloških promjena. Međutim, s obzirom na ograničen opseg radioloških promjena zabilježenih u kontrolnoj skupini, ovakav pristup praćenju nije bitno umanjio interpretativnu vrijednost usporedbe u okviru postavljenih ciljeva istraživanja.

Veličina i struktura uzorka dodatno ograničavaju opseg statističkih analiza i mogućnost generalizacije rezultata. Istraživanje je provedeno na relativno homogenoj populaciji djece i adolescenata s nezrelim trajnim zubima, što jest u skladu s indikacijama za regenerativnu endodontsku terapiju, ali istodobno ne omogućuje procjenu utjecaja dobi kao neovisnog čimbenika niti izravnu primjenjivost rezultata na starije dobne skupine ili zrele trajne zube.

Radiološka evaluacija temeljila se na standardiziranoj dvodimenzionalnoj periapikalnoj radiografiji, koja predstavlja klinički prihvatljiv i sigurnosno opravdan alat za longitudinalno praćenje, osobito u pedijatrijskoj populaciji. Međutim, takav pristup ne omogućuje

trodimenzionalnu ni volumetrijsku analizu, niti diferencijaciju vrste novonastalog mineraliziranog tkiva. Izostanak CBCT-a i histološke analize stoga onemogućuje potvrdu regenerativnih ishoda na tkivnoj razini, zbog čega se dobiveni nalazi interpretiraju isključivo kao pokazatelji regenerativno orijentiranoga biološkog odgovora, a ne kao dokaz potpune histološke regeneracije pulpo-dentinskoga kompleksa.

Ograničenja se odnose i na procjenu vitaliteta pulpe. Klinički testovi osjeta odražavaju funkcionalni odgovor neuralnih elemenata, ali ne omogućuju izravnu procjenu pulpne cirkulacije. Primjena laser-doplerske floumetrije u kvalitativnom obliku omogućila je detekciju prisutnosti ili odsutnosti perfuzije, ali ne i kvantitativnu analizu intenziteta cirkulacije, niti detaljnu hemodinamsku karakterizaciju novonastalog tkiva.

Procjena estetskih ishoda, uključujući diskoloraciju zuba, temeljila se na kliničkoj vidljivosti bez primjene instrumentalnih metoda. Takav pristup ne omogućuje detekciju suptilnih promjena boje koje nisu klinički uočljive, ali bi mogle biti mjerljive instrumentalnim metodama.

Laboratorijski dio istraživanja također nosi svojstvena metodološka ograničenja. FE-SEM i EDS analize omogućile su detaljan uvid u mikrostrukturne i površinske kemijske promjene staklenoionomernih cemenata, ali ne omogućuju izravnu identifikaciju kristalografske prirode struktura, kemijskog stanja iona niti razlučivanje površinske adsorpcije od dublje integracije u mineralnu strukturu zubnih tkiva. Interpretacija laboratorijskih nalaza stoga se temelji na kombinaciji morfoloških opažanja, relativnih promjena i dostupnih literaturnih podataka.

Unatoč navedenim ograničenjima, longitudinalni dizajn, jasno definirani protokoli, konzistentni klinički i radiološki nalazi te integracija kliničkih i laboratorijskih metoda pružaju čvrst temelj za interpretaciju rezultata u okviru postavljenih ciljeva istraživanja.

Buduća istraživanja trebala bi obuhvatiti veće i heterogenije uzorke te dulja razdoblja praćenja, kako bi se omogućila pouzdanija procjena regenerativnih ishoda. Nadalje, primjena naprednijih radioloških i bioloških metoda, ondje gdje je to opravdano, mogla bi pridonijeti preciznijoj karakterizaciji procesa unutar regenerativne endodontske terapije.

Uključivanje usporednih restaurativnih i regenerativnih protokola – uključujući i varijante modificiranih pristupa poput onoga primijenjenog u ovom istraživanju – kao i kvantitativna analiza

pulpne cirkulacije i bioloških interakcija materijala, moglo bi omogućiti dublje razumijevanje mehanizama koji određuju dugoročni uspjeh regenerativne endodontske terapije.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata, uzimajući u obzir metodološka ograničenja ovog istraživanja, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Modificirani regenerativni protokol predstavlja klinički sigurnu i prihvatljivu terapijsku opciju za liječenje mladih trajnih zuba s nekrotičnom pulpom i nezavršenim razvojem korijena.
2. Tijekom dvanaestomjesečnog praćenja u eksperimentalnoj skupini nije zabilježen gubitak zuba ni klinički znakovi terapijskog neuspjeha.
3. U usporedbi s konvencionalnom apeksifikacijom kalcijevim hidroksidom, modificirani regenerativni protokol bio je povezan sa statistički značajnim produljenjem korijena.
4. U usporedbi s kontrolnom skupinom, modificirani regenerativni protokol bio je povezan sa statistički značajnim zadebljanjem dentinskih stijenki.
5. U usporedbi s kontrolnom skupinom, modificirani regenerativni protokol bio je povezan sa statistički značajnim apikalnim zatvaranjem.
6. U zubima liječenima modificiranim regenerativnim protokolom zabilježen je visok udio pozitivnih odgovora na kliničke testove osjeta.
7. Laser-doplerska floumetrija pokazala je prisutnost detektabilne pulpne cirkulacije u 93 % analiziranih slučajeva.
8. Povezanost radioloških i funkcionalnih nalaza upućuje na prisutnost regenerativno orijentiranog odgovora pulpo-dentinskoga kompleksa.
9. Prema modificiranim USPHS kriterijima staklenoionomerni cementi korišteni za koronarno brtvljenje pokazali su stabilna funkcionalna i estetska svojstva.
10. FE-SEM analiza pokazala je vremenski ovisnu mikrostrukturnu maturaciju staklenoionomernih cemenata, obilježenu postupnom homogenizacijom matrice.

11. Glass Carbomer pokazao je izraženiji razvoj mikrostrukturnih promjena mineralnoga karaktera u odnosu na ostale ispitivane materijale.
12. Nalazi EDS analize upućuju na postojanje ionske kemijske interakcije analiziranih materijala s caklinom i dentinom.
13. Izostanak klinički vidljive diskoloracije zuba potvrđuje estetsku prihvatljivost modificiranog regenerativnog protokola.
14. Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da primijenjeni modificirani regenerativni protokol tijekom promatranog razdoblja ostvaruje učinak koji nadilazi isključivo reparativni odgovor.

7. LITERATURA

1. Sugiaman VK, Jeffrey J, Naliani S, Pranata N, Djuanda R, Saputri RI. Polymeric scaffolds used in dental pulp regeneration by tissue engineering approach. *Polymers*. 2023;15(5):1082.
2. Pohl S, Akamp T, Smeda M, Uderhardt S, Besold D, Krastl G, et al. Understanding dental pulp inflammation: from signaling to structure. *Front Immunol*. 2024;15:1474466.
3. Luo Z, Yu M, Shen T. Research progress of dental pulp regeneration treatment. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2024;49(6):989-97.
4. Wei X, Yang M, Yue L, Huang D, Zhou X, Wang X, et al. Expert consensus on regenerative endodontic procedures. *Int J Oral Sci*. 2022;14(1):55.
5. Widbiller M, Schmalz G. Endodontic regeneration: hard shell, soft core. *Odontology*. 2021;109(2):303-12.
6. Valverde Haro HP, Erazo Conde AD. The impact of vital pulp therapy on normal root development in immature teeth: a case report. *Iran Endod J*. 2025;20(1):e24.
7. Large JF, Madigan C, Pradeilles R, Markey O, Boxer B, Rousham EK. Impact of unhealthy food and beverage consumption on children's risk of dental caries: a systematic review. *Nutr Rev*. 2024;82(11):1539–1555.
8. Huang R, Zhou C, Zhan L, Liu Y, Liu X, Du Q, et al. Experts consensus on management of tooth luxation and avulsion. *Int J Oral Sci*. 2024;16(1):57.
9. Dolic O, Obradovic M, Kojic Z, Knezevic N, Trtic N, Veselinovic V, et al. Traumatic dental injuries in children and adolescents from a major dental clinic in Bosnia and Herzegovina: a 5-year retrospective study. *Medicina*. 2024;60(11):1843.
10. Kharkova LY, Korolenkova MV. Risk-orientirovannyi podkhod k prognozirovaniyu naruzhnoi vospalitel'noi rezorbtsii pri travmakh postoyannykh zubov u detei [Risk-oriented approach to predicting external inflammatory resorption in children with permanent teeth injuries]. *Stomatologiya (Mosk)*. 2024;103(6):42–46.

11. Tewari N, Lauridsen E, Atif M, Srivastav S, Tsilingaridis G, Haldar P, et al. Risk of pulp necrosis and related complications in the permanent anterior teeth with lateral luxation: a systematic review and meta-analysis. *Dent Traumatol.* 2024;40(5):482-98.
12. Koyuncuoglu G, Aren G. Clinical and radiographic evaluation of two different apexification protocols in traumatized immature permanent incisors. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2025;31(1):23-31.
13. Kim M, Jeon S, Seo MS. Endodontic characteristics of mandibular premolar with dens evaginatus: a retrospective study. *Restor Dent Endod.* 2024;49(3):e28.
14. Baruwa AO, Anderson C, Monroe A, Cracel Nogueira F, Corte-Real L, Martins JNR. Dens invaginatus: a comprehensive review of classification and clinical approaches. *Medicina.* 2025;61(7):1281.
15. Al-Manei KK, Alzaidi S, Almalki G, Al-Manei K, Almotairy N. Incidence and influential factors in pulp necrosis and periapical pathosis following indirect restorations: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2023;23(1):195.
16. Lau XE, Liu X, Chua H, Wang WJ, Dias M, Choi JJE. Heat generated during dental treatments affecting intrapulpal temperature: a review. *Clin Oral Investig.* 2023;27(5):2277-97.
17. Elmatary A, Moawad E, Heidarifar O, Stone S. Endodontic access cavity preparation: challenges and recent advancements. *Br Dent J.* 2025;238(7):469-75.
18. Sarfi S, Azaryan E, Naseri M. Immune system of dental pulp in inflamed and normal tissue. *DNA Cell Biol.* 2024;43(8):369-86.
19. Chhabra A, Prathap BS, Kp R, Yadav P, Himani, Parvathy SJ, et al. Pulpotomy for irreversible pulpitis in mature permanent teeth: an overview of systematic reviews of randomized controlled trials. *Sci Prog.* 2025;108(2):00368504251346677.

20. Komora P, Vámos O, Gede N, Hegyi P, Kelemen K, Galvács A, et al. Comparison of bioactive material failure rates in vital pulp treatment of permanent matured teeth – a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep*. 2024;14(1):18421.
21. Santos JM, Pereira JF, Marques A, Sequeira DB, Friedman S. Vital pulp therapy in permanent mature posterior teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a systematic review of treatment outcomes. *Medicina*. 2021;57(6):573.
22. Bučević Sojčić P, Leder Horina J, Bočkaj N, Borojević Renić T, Turjanski D, Goršeta K, et al. Stress behaviour of an immature maxillary central incisor: a 3D finite element analysis. *Materials*. 2025;18(10):2305.
23. Panda P, Mishra L, Govind S, Panda S, Lapinska B. Clinical outcome and comparison of regenerative and apexification intervention in young immature necrotic teeth – a systematic review and meta-analysis. *J Clin Med*. 2022;11(13):3909.
24. Sabeti M, Ghobrial D, Zanjir M, Da Costa BR, Young Y, Azarpazhooh A. Treatment outcomes of regenerative endodontic therapy in immature permanent teeth with pulpal necrosis: a systematic review and network meta-analysis. *Int Endod J*. 2024;57(3):238-55.
25. Mina MM, Moussa SM, Aboelseoud MR. Marginal adaptation of customized gutta percha cone with calcium silicate based sealer versus MTA and Biodentine apical plugs in simulated immature permanent teeth (an in vitro study). *BMC Oral Health*. 2024;24(1):1069.
26. Acharya S, Sahoo D, Singh B, Gurunathan D. Revascularization revisited with modified triple antibiotic paste and NeoPutty MTA. *J Pharm Bioallied Sci*. 2024;16(Suppl 2):S1871-S1874.
27. Das P, Mishra L, Jena D, Govind S, Panda S, Lapinska B. Oral health-related quality of life in children and adolescents with a traumatic injury of permanent teeth and the impact on their families: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(5):3087.

28. Asgary S, Shamszadeh S, Nosrat A, Aminoshariae A, Sabeti M. Management strategies for immature teeth with pulp necrosis: an umbrella review of systematic reviews. *Iran Endod J.* 2024;19(4):242-53.
29. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, et al. Functional dental pulp regeneration: basic research and clinical translation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8991.
30. Wikström A, Brundin M, Mohmud A, Anderson M, Tsilingaridis G. Outcomes of apexification in immature traumatised necrotic teeth and risk factors for premature tooth loss: a 20-year longitudinal study. *Dent Traumatol.* 2024;40(6):658-71.
31. Shaik I, Dasari B, Kolichala R, Doos M, Qadri F, Arokiyasamy JL, et al. Comparison of the success rate of mineral trioxide aggregate, EndoSequence bioceramic root repair material, and calcium hydroxide for apexification of immature permanent teeth: systematic review and meta-analysis. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021;13(Suppl 1):S43-7.
32. Nadar A, Muliya VS, Pai S, Pentapati KC. A comparative evaluation of calcium ion release and pH change using calcium hydroxide nanoparticles as intracanal medicament with different vehicles - an in vitro study. *J Conserv Dent.* 2023;26(1):47-51.
33. Kahler B, Swain MV. The calcium hydroxide controversy: does calcium hydroxide weaken teeth? *Dent Traumatol.* 2025;41(S1):53-63.
34. Casey SM, Fox D, Duong W, Bui N, Latifi N, Ramesh V, et al. Patient centered outcomes among a cohort receiving regenerative endodontic procedures or apexification treatments. *J Endod.* 2022;48(3):345-54.
35. Tolibah YA, Kouchaji C, Lazkani T, Ahmad IA, Baghdadi ZD. Comparison of MTA versus Biodentine in apexification procedure for nonvital immature first permanent molars: a randomized clinical trial. *Children.* 2022;9(3):410.
36. Gerard LM, Gaur S. Application of Biodentine for apexification of immature teeth of children: a scoping review. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2025;18(5):573-9.

37. Mohite P, Ramteke AD, Gupta R, Patil S, Gupta D. Comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and Biodentine apical plug thickness on fracture resistance of immature teeth: an in vitro study. *Ann Afr Med.* 2022;21(3):198-203.
38. Panjwani P, Banga K, Atram J, Wahjuningrum DA, Luke AM, Shetty KP, et al. The effect of varying thicknesses of mineral trioxide aggregate (MTA) and Biodentine as apical plugs on the fracture resistance of teeth with simulated open apices: a comparative in vitro study. *PeerJ.* 2024;12:e18691.
39. Dong X, Xu X. Bioceramics in endodontics: updates and future perspectives. *Bioengineering.* 2023;10(3):354.
40. Ghaly MS, Abozena NI, Ghouraba RF, Kabbash IA, El-Desouky SS. Clinical and radiographic evaluation of premixed bioceramic putty as an apical plug in nonvital immature anterior permanent teeth. *Sci Rep.* 2025;15(1):26487.
41. Nagaraj NJ, Sikarwar PPS, Jena D, Gangwal R, Mohanty I, Rizvi AH. Fracture susceptibility in non-vital apex teeth following various modified apexification procedures – an in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2024;16(Suppl 4):S3966–S3969.
42. De Souza GL, Freitas GAN, Ribeiro MTH, Lemus NXA, Soares CJ, Moura CCG. Effects of different calcium-silicate based materials on fracture resistance of immature permanent teeth with replacement root resorption and osteoclastogenesis. *Restor Dent Endod.* 2023;48(2):e21.
43. Swaikat M, Faus-Matoses I, Zubizarreta-Macho Á, Ashkar I, Faus-Matoses V, Bellot-Arcís C, et al. Is revascularization the treatment of choice for traumatized necrotic immature teeth? A systematic review and meta-analysis. *J Clin Med.* 2023;12(7):2656.
44. Jena D, Sabiha PB, Kumar NS, Ahmed SS, Bhagat P, Singh SP, et al. Regenerative therapy for the permanent immature teeth: a long-term study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2023;15(Suppl 1):S127-31.

45. Chai R, Yang X, Zhang AS. Different endodontic treatments induced root development of two nonvital immature teeth in the same patient: a case report. *World J Clin Cases*. 2023;11(11):2567-75.
46. Li J, Zheng L, Daraquel B, Liu J, Hu Y. Treatment outcome of regenerative endodontic procedures for necrotic immature and mature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis based on randomised controlled trials. *Oral Health Prev Dent*. 2023;21:141-52.
47. Ravikumar K, Chakravarthy Y, Kumar A, Samynathan M, Varshini RJ. Foreign body removal and revascularization of teeth with periapical radiolucency: 18 months' follow-up. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021;13(Suppl 1):S886-9.
48. Scelza P, Gonçalves F, Caldas I, Nunes F, Lourenço ES, Tavares S, et al. Prognosis of regenerative endodontic procedures in mature teeth: a systematic review and meta-analysis of clinical and radiographic parameters. *Materials*. 2021;14(16):4418.
49. Alothman FA, Hakami LS, Alnasser A, AlGhamdi FM, Alamri AA, Almutairii BM. Recent advances in regenerative endodontics: a review of current techniques and future directions. *Cureus*. 2024;16(11):e74121.
50. Bartaw RT, Eid MH, Gawad RYAA, Samad AMA. Discoloration after revascularization using calcium phosphosilicate-based bioceramic versus mineral trioxide aggregate in necrotic immature permanent anterior teeth: a randomized clinical trial. *J Conserv Dent Endod*. 2024;27(3):293–304.
51. Cheng G, Wu X, Li W, Lv Z. Comparative outcomes of apical induction versus pulp revascularization in young permanent anterior teeth with traumatic pulp necrosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2025;21:737-45.
52. Yang F, Sheng K, Yu L, Wang J. Does the use of different scaffolds have an impact on the therapeutic efficacy of regenerative endodontic procedures? A systematic evaluation and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2024;24(1):319.

53. Da Silva KTL, Ferreira MC, Grazziotin-Soares R, Dourado LG, De Castro Rizzi Maia C, Da Silva GR, et al. Regenerative endodontic procedure using Emdogain: a case series. *J Med Case Rep.* 2025;19(1):205.
54. Pulyodan MK, Paramel Mohan S, Valsan D, Divakar N, Moyin S, Thayyil S. Regenerative endodontics: a paradigm shift in clinical endodontics. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12 (Suppl 1):S20–S26.
55. Liang Y, Ma R, Chen L, Dai X, Zuo S, Jiang W, et al. Efficacy of i-PRF in regenerative endodontics therapy for mature permanent teeth with pulp necrosis: study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *Trials.* 2021;22(1):436.
56. Wei Y, Lyu P, Bi R, Chen X, Yu Y, Li Z, et al. Neural regeneration in regenerative endodontic treatment: an overview and current trends. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15492.
57. Brizuela C, Huang GTJ, Diogenes A, Botero T, Khoury M. The four pillars for successful regenerative therapy in endodontics: stem cells, biomaterials, growth factors, and their synergistic interactions. *Stem Cells Int.* 2022;2022:1580842.
58. Abbass MMS, El-Rashidy AA, Sadek KM, Moshay SE, Radwan IA, Rady D, et al. Hydrogels and dentin-pulp complex regeneration: from the benchtop to clinical translation. *Polymers.* 2020;12(12):2935.
59. Sequeira DB, Diogo P, Gomes BPFA, Peça J, Santos JMM. Scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *Medicina.* 2023;60(1):7.
60. Ahmed GM, Abouauf EA, AbuBakr N, Fouad AM, Dörfer CE, Fawzy El-Sayed KM. Cell-based transplantation versus cell homing approaches for pulp-dentin complex regeneration. *Stem Cells Int.* 2021;2021:8483668.
61. Biswas KP, Desai D, Shetty KV, Thomas D, Gupta A, Metkari SS, et al. Restoring vitality: the science and practice of pulp revascularization in endodontics. *J Pharm Bioallied Sci.* 2024;16(Suppl 3):S1941-3.

62. Farjaminejad R, Farjaminejad S, Garcia-Godoy F. Regenerative endodontic therapies: harnessing stem cells, scaffolds, and growth factors. *Polymers*. 2025;17(11):1475.
63. Quigley RM, Kearney M, Kennedy OD, Duncan HF. Tissue engineering approaches for dental pulp regeneration: the development of novel bioactive materials using pharmacological epigenetic inhibitors. *Bioact Mater*. 2024;40:182-211.
64. da Silva Magalhães K, Kuerten Gil AC, Goulart TS, Schuldt DPV, Coelho BS, Figueiredo D de R, et al. Efficacy of disinfection procedures performed prior to regenerative endodontic therapy: an integrative review. *Aust Endod J*. 2023;49(2):418-27.
65. Tavares S, Pintor A, Mourão CF de AB, Magno M, Montemezzi P, Sacco R, et al. Effect of different root canal irrigant solutions on the release of dentin-growth factors: a systematic review and meta-analysis. *Materials*. 2021;14(19):5829.
66. Parchami K, Dastorani M, Barati M. What is the impact of endodontic irrigant solutions on the viability of stem cells from apical papilla in an in-vitro setting: a systematic review. *Saudi Dent J*. 2024;36(9):1170-8.
67. Rahmati A, Karkehabadi H, Rostami G, Karami M, Najafi R, Rezaei-Soufi L. Comparative effects of Er:YAG laser, and EDTA, MTAD, and QMix irrigants on adhesion of stem cells from the apical papilla to dentin: a scanning electron microscopic study. *J Clin Exp Dent*. 2022;14(4):e310-5.
68. AlBatati M, AbuMostafa A. The effect of final irrigation with different solutions on smear layer removal and dentin erosion: a scanning electron microscope study. *PLoS One*. 2024;19(8):e0308606.
69. Panchal KG, Virani K, Patel V, Ali Khan A, Pettiwala A, Puranik SS, et al. Triple antibiotic paste: a game changer in endodontics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2024;16(Suppl 3):S1913-5.
70. Bhavsar BA, Jain V, Kumari A, Shukla P, Pandya R, Kumar MR, et al. Evaluate the antimicrobial properties of double antibiotic paste (DAP) and *Morinda citrifolia* and propolis

- paste (MCP) used in regenerative endodontics: an in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2025;17(Suppl 1):S703-5.
71. Rahul M, Tewari N, Mathur V, Atif M, Bansal K, Agrawal S, et al. In-vitro evaluation for effects of intracanal medicaments on viability, proliferation, and differentiation of stem cells from apical papilla: a systematic review. *Eur Endod J.* 2022;7(3):167-77.
72. Murad M, Duggal MS. Intra-canal antibiotic pastes may promote thicker dentin walls and calcium hydroxide may promote more apical closure. *J Evid Based Dent Pract.* 2022;22(2):101728.
73. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agraftoti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod.* 2015;41(2):146-54.
74. Alnasser M, Alshammari AH, Siddiqui AY, Alothmani OS, Issrani R, Iqbal A, et al. Tissue regeneration on rise: dental hard tissue regeneration and challenges – a narrative review. *Scientifica (Cairo).* 2024;2024:9990562.
75. Tian Z, Yu T, Liu J, Wang T, Higuchi A. Introduction to stem cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2023;199:3-32.
76. Song WP, Jin LY, Zhu MD, Wang H, Xia DS. Clinical trials using dental stem cells: 2022 update. *World J Stem Cells.* 2023;15(3):31-51.
77. Hu N, Li W, Jiang W, Wen J, Gu S. Creating a microenvironment to give wings to dental pulp regeneration – bioactive scaffolds. *Pharmaceutics.* 2023;15(1):158.
78. Smojver I, Katalinić I, Bjelica R, Gabrić D, Matišić V, Molnar V, et al. Mesenchymal stem cells based treatment in dental medicine: a narrative review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1662.
79. Miteva M, Mihaylova Z, Mitev V, Aleksiev E, Stanimirov P, Praskova M, et al. A review of stem cell attributes derived from the oral cavity. *Int Dent J.* 2024;74(5):1129-41.

80. Smeda M, Galler KM, Woelflick M, Rosendahl A, Moehle C, Lenhardt B, et al. Molecular biological comparison of dental pulp- and apical papilla-derived stem cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2615.
81. Kim D, Kim SG. Cell homing strategies in regenerative endodontic therapy. *Cells.* 2025;14(3):201.
82. Liu Y, Gan L, Cui DX, Yu SH, Pan Y, Zheng LW, et al. Epigenetic regulation of dental pulp stem cells and its potential in regenerative endodontics. *World J Stem Cells.* 2021;13(11):1647-66.
83. Noohi P, Abdekhodaie MJ, Nekoofar MH, Galler KM, Dummer PMH. Advances in scaffolds used for pulp-dentine complex tissue engineering: a narrative review. *Int Endod J.* 2022;55(12):1277-316.
84. Liu H, Lu J, Jiang Q, Haapasalo M, Qian J, Tay FR, et al. Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration. *Bioact Mater.* 2022;12:257-77.
85. Caviedes-Bucheli J, Muñoz-Alvear HD, Lopez-Moncayo LF, Narvaez-Hidalgo A, Zambrano-Guerrero L, Gaviño-Orduña JF, et al. Use of scaffolds and regenerative materials for the treatment of immature necrotic permanent teeth with periapical lesion: umbrella review. *Int Endod J.* 2022;55(10):967-88.
86. Shahoon H, Dehghani Soltani A, Dehghani Soltani H, Salmani Z, Sabzevari B, Sajedi SM. Clinical outcomes of biomaterial scaffolds in regenerative endodontic therapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Endod J.* 2025;10(2):83-93.
87. Ríos-Osorio N, Caviedes-Bucheli J, Jimenez-Peña O, Orozco-Agudelo M, Mosquera-Guevara L, Jiménez-Castellanos FA. Comparative outcomes of platelet concentrates and blood clot scaffolds for regenerative endodontic procedures: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Clin Exp Dent.* 2023;15(3):e239-49.

88. Wu Q. Regenerative endodontic treatment using autologous blood from alveolar bone for mature permanent premolar with apical periodontitis: a case report. *Clin Oral Investig.* 2023;27(8):4869-74.
89. González-Serrano J, Vallina C, González-Serrano C, Sánchez-Monescillo A, Torres J, Hernández G, et al. Effect of platelet concentrates on marginal bone loss of immediate implant procedures: a systematic review and meta-analysis. *Materials.* 2021;14(16):4582.
90. Caponio VCA, Baca-González L, González-Serrano J, Torres J, López-Pintor RM. Effect of the use of platelet concentrates on new bone formation in alveolar ridge preservation: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Clin Oral Investig.* 2023;27(8):4131-46.
91. Malcangi G, Patano A, Palmieri G, Di Pede C, Latini G, Inchingolo AD, et al. Maxillary sinus augmentation using autologous platelet concentrates (platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and concentrated growth factor) combined with bone graft: a systematic review. *Cells.* 2023;12(13):1797.
92. Sun J, Hu Y, Fu Y, Zou D, Lu J, Lyu C. Emerging roles of platelet concentrates and platelet-derived extracellular vesicles in regenerative periodontology and implant dentistry. *APL Bioeng.* 2022;6(3):031503.
93. Rebimbas Guerreiro S, Marto CM, Paula A, Pereira JR de A, Carrilho E, Marques-Ferreira M, et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in endodontics: a scoping review. *Int J Mol Sci.* 2025;26(12):5479.
94. Riaz A, Shah FA. Regenerating the pulp-dentine complex using autologous platelet concentrates: a critical appraisal of the current histological evidence. *Tissue Eng Regen Med.* 2021;18(1):37-48.
95. Markandey S, Das Adhikari H. Evaluation of blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin-mediated regenerative endodontic procedures in teeth with periapical pathology: a CBCT study. *Restor Dent Endod.* 2022;47(4):e41.

96. Zoltowska A, Machut K, Pawlowska E, Derwich M. Plasma rich in growth factors in the treatment of endodontic periapical lesions in adult patients: a narrative review. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):1041.
97. Pietruszka P, Chruścicka I, Duś-Ilnicka I, Paradowska-Stolarz A. PRP and PRF-subgroups and divisions when used in dentistry. *J Pers Med*. 2021;11(10):944.
98. Diab NAF, Ibrahim ASM, Abdallah AM. Fluid platelet-rich fibrin (PRF) versus platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of atrophic acne scars: a comparative study. *Arch Dermatol Res*. 2023;315(5):1249-55.
99. Cho YD, Kim KH, Lee YM, Ku Y, Seol YJ. Periodontal wound healing and tissue regeneration: a narrative review. *Pharmaceuticals*. 2021;14(5):456.
100. Alsabri GA, van der Horst F, Alkaabi SA, Alavi SA, Forouzanfar T, Helder MN. Evaluating growth-factor release in leukocyte- and platelet-rich fibrin, advanced platelet-rich fibrin, and injectable platelet-rich fibrin protocols: a narrative review. *Growth Factors*. 2024;42(4):216-28.
101. Coucke B, Dilissen E, Cremer J, Schrijvers R, Theys T, Van Gerven L. Leukocyte- and platelet-rich fibrin for enhanced tissue repair: an in vitro study characterizing cellular composition, growth factor kinetics and transcriptomic insights. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):954.
102. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112-21.
103. Farshidfar N, Apaza Alccayhuaman KA, Estrin NE, Ahmad P, Sculean A, Zhang Y, Miron RJ. Advantages of horizontal centrifugation of platelet-rich fibrin in regenerative medicine and dentistry. *Periodontol 2000*. 2025 Mar 25. Epub ahead of print. doi:10.1111/prd.12625.
104. Li Z, Liu L, Wang L, Song D. The effects and potential applications of concentrated growth factor in dentin-pulp complex regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):357.

105. Yahata Y, Handa K, Ohkura N, Okamoto M, Ohshima J, Itoh S, et al. Autologous concentrated growth factor mediated accelerated bone healing in root-end microsurgery: a multicenter randomized clinical trial. *Regen Ther.* 2023;24:377-84.
106. Dos Reis-Prado AH, Benetti F, Bottino MC, Dal-Fabbro R. Optimizing methods for regenerative endodontics. *Regen Med.* 2025;20(8):339-51.
107. Luo H, Liu W, Zhou Y, Jiang X, Liu Y, Yang Q, et al. Concentrated growth factor regulates the macrophage-mediated immune response. *Regen Biomater.* 2021;8(6):rbab049.
108. Elheeny AAH, Tony GE. Two-dimensional radiographs and cone-beam computed tomography assessment of concentrated growth factor and platelet-rich fibrin scaffolds in regenerative endodontic treatment of immature incisors with periapical radiolucency: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2024;50(6):792-806.
109. Zhang Y, Sheng M. Clinical and radiographic evaluation of regenerative endodontic procedures (REPs) with or without concentrated growth factor (CGF) as scaffolds for non-vital immature mandibular premolars. *J Clin Pediatr Dent.* 2024;48(4):168-75.
110. Kyaw MS, Kamano Y, Yahata Y, Tanaka T, Sato N, Toyama F, et al. Endodontic regeneration therapy: current strategies and tissue engineering solutions. *Cells.* 2025;14(6):422.
111. Yang N, Yang W, Shen R, Zhang S, Ma T, Liu Y. In vitro and in vivo evaluation of iRoot BP Plus as a coronal sealing material for regenerative endodontic procedures. *Clin Oral Investig.* 2024;28(1):70.
112. Jang YJ, Kim YJ, Vu HT, Park JH, Shin SJ, Dashnyam K, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial properties of four bioactive calcium silicate-based cements. *Pharmaceutics.* 2023;15(6):1701.
113. Gangishetti S, Kolluri A, Raj KA, Kamsani D, Manchala S, Jarupula D. Bioactivity of calcium silicate-based endodontic materials: a comparative in vitro evaluation. *J Pharm Bioallied Sci.* 2024;16(Suppl 2):S1716-20.

114. Mishra D, Arya A, Vamseekrishna KVN, Jahangeer B, Sachdeva M, Moses A. Evaluation and comparative analysis of coronal tooth discoloration induced by four endodontic biomaterials utilized in regenerative endodontic procedures: an ex-vivo study. *Cureus*. 2024;16(6):e62874.
115. Kapoor S, Bastawala DS, Nathani P. A comparison of coronal tooth discoloration elicited by various endodontic reparative materials MTA Plus, Bio MTA+, and Biodentine: an ex vivo study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2021;13(5):463-7.
116. Wang X, Xiao Y, Song W, Ye L, Yang C, Xing Y, et al. Clinical application of calcium silicate-based bioceramics in endodontics. *J Transl Med*. 2023;21(1):853.
117. Krug R, Schwarz F, Hahn B, Reymus M, Eggmann F, Krastl G, et al. Long-term tooth discoloration induced by apical plugs with hydraulic calcium silicate-based cements in bovine teeth with open apices: a 6-year in-vitro study. *Clin Oral Investig*. 2025;29(6):332.
118. Pushpalatha C, Dhareshwar V, Sowmya SV, Augustine D, Vinothkumar TS, Renugalakshmi A, et al. Modified mineral trioxide aggregate – a versatile dental material: an insight on applications and newer advancements. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:941826.
119. Ha YJ, Lee D, Kim SY. The combined effects on human dental pulp stem cells of fast-set or premixed hydraulic calcium silicate cements and secretome regarding biocompatibility and osteogenic differentiation. *Materials*. 2024;17(2):305.
120. Eskandari F, Razavian A, Hamidi R, Yousefi K, Borzou S. An updated review on properties and indications of calcium silicate-based cements in endodontic therapy. *Int J Dent*. 2022;2022:6858088.
121. Yune JY, Lee D, Kim SY. The combined effects of hydraulic calcium silicate cement and enamel matrix derivative regarding osteogenic and dentinogenic differentiation on human dental pulp stem cells. *Materials*. 2023;16(11):4003.
122. Camilleri J, Atmeh A, Li X, Meschi N. Present status and future directions: hydraulic materials for endodontic use. *Int Endod J*. 2022;55 Suppl 3:S710-77.

123. Singer L, Bourauel C. Herbalism and glass-based materials in dentistry: review of the current state of the art. *J Mater Sci Mater Med.* 2023;34(11):60.
124. Peric T, Markovic E, Markovic D, Petrovic B. Meta-analysis of in-vitro bonding of glass-ionomer restorative materials to primary teeth. *Materials.* 2021;14(14):3915.
125. Yücer S, Sarac B, Özarslan AC, Ciftci F. The role of ions in dental tissue treatment, repair, and remodelling: mechanisms, materials, and clinical implications. *Mater Today.* 2025;90:937-76.
126. De Castilho ARF, Rosalen PL, Oliveira MY, Burga-Sánchez J, Duarte S, Murata RM, et al. Bioactive compounds enhance the biocompatibility and the physical properties of a glass ionomer cement. *J Funct Biomater.* 2024;15(11):332.
127. Nicholson JW, Coleman NJ, Sidhu SK. Kinetics of ion release from a conventional glass-ionomer cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2021;32(4):30.
128. Šošić A, Šalinović I, Sauro S, Nemet I, Ilić N, Rončević S, et al. Evaluation of fluoride and calcium ion release and fluoride recharge capacity of glass-ionomer materials modified with experimental bioactive glass. *Sci Rep.* 2025;15(1):40212.
129. Tuygunov N, Khairunnisa Z, Yahya NA, Aziz AA, Zakaria MN, Israilova NA, et al. Bioactivity and remineralization potential of modified glass ionomer cement: a systematic review of the impact of calcium and phosphate ion release. *Dent Mater J.* 2024;43(1):1-10.
130. Oliveira TBDM, Ferreira PVC, Cardoso SMDNR, Nunes FRS, Macedo RFCD, Dos Santos APSDA, et al. Are glass ionomer cements bioactive? Analysis of ions release, pH, hydroxyapatite nanoprecursors formation, antibacterial activity, and cytotoxicity. *Int J Adhes Adhes.* 2024;135:103845.
131. Fricker JP. Therapeutic properties of glass-ionomer cements: their application to orthodontic treatment. *Aust Dent J.* 2022;67(1):12-20.

132. Thbayh KK, AlBadr RM, Ziadani KM, Thbayh DK, Mohi SM, Fiser B. Fabrication and characterization of novel glass-ionomer cement prepared from oyster shells. *Sci Rep*. 2024;14(1):24083.
133. Ilisulu SC, Oztop NE, Akkoc T, Seymen F. In vitro evaluation of pediatric restorative materials on human dental pulp stem cells. *Tissue Cell*. 2022;77:101871.
134. Elshenawy EA, El-Ebiary MA, Kenawy ER, El-Olimy GA. Modification of glass-ionomer cement properties by quaternized chitosan-coated nanoparticles. *Odontology*. 2023;111(2):328-41.
135. Malacarne IT, Takeshita WM, Souza DV de, Nagaoka MR, Aguiar O, Renno ACM, et al. Assessment of genotoxicity of glass ionomer cements: a systematic review. *Crit Rev Toxicol*. 2022;52(5):389-96.
136. Gorseta K, Glavina D. Thermo-cured glass ionomer cements in restorative dentistry. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2017;51(3 Suppl 1):S122-7.
137. Gorseta K, Borzabadi-Farahani A, Moshaverinia A, Glavina D, Lynch E. Effect of different thermo-light polymerization on flexural strength of two glass ionomer cements and a glass carbomer cement. *J Prosthet Dent*. 2017;118(1):102-7.
138. Vatankhah M, Najary S, Dianat O. Clinical, radiographic, and histologic outcomes of regenerative endodontic treatment in human immature teeth using different biological scaffolds: a systematic review and meta-analysis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2024;19(4):611-27.
139. Chen MYH, 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. *Int Endod J*. 2012;45(3):294-305.
140. Alfahadi HR, Al-Nazhan S, Alkazman FH, Al-Maflehi N, Al-Nazhan N. Clinical and radiographic outcomes of regenerative endodontic treatment performed by endodontic postgraduate students: a retrospective study. *Restor Dent Endod*. 2022;47(2):e24.

141. Wong J, Zhang C, Lee AHC. Clinical benefits and limitations of cone-beam computed tomography in endodontic practice: a contemporary evidence-based review. *Diagnostics*. 2025;15(24):3117.
142. Gupta D, Shaw AK, Gaikwad A, Kale P, Deshpande SM, Gachake A. The diagnostic accuracy of pulse oximetry for assessing pulp vitality: a systematic review. *Cureus*. 2025;17(1):e76820.
143. Maloney B, Creavin G, Duncan HF. Pulp diagnosis: current guidelines, shortcomings, and future developments. *J Ir Dent Assoc*. 2023;69(6):90027. doi:10.58541/001c.90027.
144. Igna A, Mircioagă D, Boariu M, Stratul Ștefan I. A diagnostic insight of dental pulp testing methods in pediatric dentistry. *Medicina*. 2022;58(5):665.
145. Yen M, Yeung AWK. The performance of paralleling technique and bisecting angle technique for taking periapical radiographs: a systematic review. *Dent J (Basel)*. 2023;11(7):155.
146. Turjanski D, Lisjak D, Bučević Sojčić P, Valpotić J, Borojević Renić T, Goršeta K, et al. Advanced platelet-rich fibrin plus sealed exclusively with glass ionomer cement: setting a new standard for healing, aesthetics and predictive modelling in regenerative endodontics. *Materials*. 2025;18(18):4421.
147. Murray PE. Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. *Int Endod J*. 2023;56 Suppl 2:188–99.
148. Hickel R, Mesinger S, Opdam N, Loomans B, Frankenberger R, Cadenaro M, et al. Revised FDI criteria for evaluating direct and indirect dental restorations – recommendations for its clinical use, interpretation, and reporting. *Clin Oral Investig*. 2023;27(6):2573–92.
149. Kaynar Z, Dönmez N. Twelve-month clinical performance evaluation of a glass carbomer restorative system. *Oper Dent*. 2022;47(4):382–91.

150. Saoud TMA, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Lin LM, Gibbs JL. Clinical and radiographic outcomes of traumatized immature permanent necrotic teeth after revascularization/revitalization therapy. *J Endod.* 2014;40(12):1946–52.
151. Belcheva A, Shindova M, Hanna R. Efficacy of laser doppler flowmetry as a diagnostic tool in assessing pulp vitality of traumatised teeth: a split mouth clinical study. *J Pers Med.* 2021;11(8):801.
152. Roeykens H, De Coster P, Jacquet W, De Moor RJG. The decisive role of laser doppler flowmetry for pulp preservation in discolored traumatized teeth. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2024;42(11):701–7.
153. Yang K, Guo F, Zhou Z, Hui Z, Wang Z, Wang J, et al. Laser doppler flowmetry to detect pulp vitality, clinical reference range and coincidence rate for pulpal blood flow in permanent maxillary incisors in Chinese children: a clinical study. *BMC Oral Health.* 2023;23(1):283.
154. 3M Company. Ketac Universal Aplicap Glass Ionomer Restorative: technical product profile [Internet]. 2023 [cited 2025 Dec 5]. Available from: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1090408O/ketac-universal-aplicap-technical-product-profile-pdf.pdf>
155. GC Corporation. GC Fuji IX GP: glass ionomer restorative material [Internet]. [cited 2025 Dec 5]. Available from: <https://www.gc.dental/america/products/operator/glass-ionomer-restoratives/gc-fuji-ix-gp>
156. GC America. EQUIA Forte HT: glass hybrid restorative material [Internet]. [cited 2025 Dec 5]. Available from: <https://www.gc.dental/america/products/operator/glass-hybrid-restoratives/equia-forte-ht>
157. Sidhu SK, Nicholson JW. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. *J Funct Biomater.* 2016;7(3):16.

158. Kam Hepdeniz Ö, Gürdal O. The effect of titanium dioxide nanoparticles on microhardness and SEM-EDS analysis of glass ionomer cement and amalgomer. *Selcuk Dent J.* 2021;8(3):623–8.
159. Martín-Vacas A, Vera-González V, Ramírez-Castellanos J, González-Gil D, De Nova García MJ. SEM/EDS analysis of tubules and mineral deposition in the dentin of children with osteogenesis imperfecta. *Appl Sci.* 2023;13(22):12451.
160. Butera A, Pascadopoli M, Gallo S, Lelli M, Tarterini F, Giglia F, et al. SEM/EDS evaluation of mineral deposition on a polymeric composite resin of a toothpaste containing biomimetic Zn-carbonate hydroxyapatite (microRepair) in the oral environment: a randomized clinical trial. *Polymers.* 2021;13(16):2740.
161. Turjanski D, Jakovljević S, Lisjak D, Bučević Sojčić P, Glavina F, Goršeta K, et al. Bioactivity of glass carbomer versus conventional GICs in sound enamel and dentine: a 12-month SEM-EDS study. *Materials (Basel).* 2025;18(15):3580.
162. Vitali FC, Dos Reis-Prado AH, Santos PS, Zeno APP, de Risso P de A, Maia LC, et al. Pre-operative factors on prognosis of regenerative endodontic procedures: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2025;58(12):1814–34.
163. Lopes LB, Neves JA, Botelho J, Machado V, Mendes JJ. Regenerative endodontic procedures: an umbrella review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(2):754.
164. Shi X, Hu X, Jiang N, Mao J. Regenerative endodontic therapy: from laboratory bench to clinical practice. *J Adv Res.* 2025;72:229–63.
165. Bodur ZB, Ciftci ZZ, Cengiz A, Karayilmaz H. Clinical evaluation of contemporary ion releasing restorative materials in primary molars subjected to selective caries removal: a randomised clinical trial. *Eur J Paediatr Dent.* 2025;26(1):61–8.
166. Panetta A, Lopes P, Novaes TF, Rio R, Fernandes GVO, Mello-Moura ACV. Evaluating glass ionomer cement longevity in the primary and permanent teeth – an umbrella review. *J Funct Biomater.* 2024;15(2):48.

167. Kritika S, Sujatha V, Srinivasan N, Renganathan SK, Mahalaxmi S. Prospective cohort study of regenerative potential of non vital immature permanent maxillary central incisors using platelet rich fibrin scaffold. *Sci Rep.* 2021;11(1):13679.
168. Qamar S, Mondal A, Singh S, Deep A, Kakran A, Tanwar AS. Comparative evaluation of advanced platelet-rich fibrin and blood clot as scaffolds in regenerative endodontics for immature necrotic teeth: a randomized clinical study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2025;17(Suppl 2):S1559–61.
169. Wakhloo T, Shukla S, Chug A, Dhar M. Advanced platelet-rich fibrin-mediated regeneration of necrotic immature permanent teeth: a clinico-radiographic observational study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2022;15(4):402–6.
170. Machut K, Żółtowska A. Plasma rich in growth factors in the treatment of endodontic periapical lesions in adult patients: 3-dimensional analysis using cone-beam computed tomography on the outcomes of non-surgical endodontic treatment using A-PRF+ and calcium hydroxide: a retrospective cohort study. *J Clin Med.* 2022;11(20):6092.
171. Pelissari TR, Buligon MP, Ribeiro CEVDC, Morgental RD, May LG, Bier CAS, et al. Tooth discoloration caused by repair cements in a simulated regenerative endodontic procedure. *Braz J Oral Sci.* 2025;24:e256411.
172. Ateş MO, Uğur Aydın Z. Evaluation of the effectiveness of different treatment approaches in preventing coronal discoloration caused by regenerative endodontic treatment. *Clin Oral Investig.* 2023;27(8):4595–603.
173. Lu J, Cai Q, Chen K, Kahler B, Yao J, Zhang Y, et al. Machine learning models for prognosis prediction in regenerative endodontic procedures. *BMC Oral Health.* 2025;25(1):234.
174. Kawthar BS, Fatma B, Hanen B, Imen G, Souha BY. Regenerative endodontics in the treatment of periapical lesions of endodontic origin: a systematic review of randomized controlled trials. *J Contemp Dent Pract.* 2025;26(6):623–31.

175. Nicholson JW, Sidhu SK, Czarnecka B. Can glass polyalkenoate (glass-ionomer) dental cements be considered bioactive? A review. *Heliyon*. 2024;10(3):e25239.
176. Tsuzuki FM, Pascotto RC, Malacarne LC, Bento AC, Medina Neto A, de Castro-Hoshino LV, et al. Studies of the early stages of the dynamic setting process of chemically activated restorative glass-ionomer cements. *Biomater Investig Dent*. 2021;8(1):39–47.
177. Lopes L, Terada R, de Castro-Hoshino LV, de Oliveira B, Pascotto RC, Baesso ML, et al. In vitro evaluation of the stabilization time of chemical bonds during setting reaction and microhardness of preheated glass-ionomer cements. *Oper Dent*. 2021;46(2):208–18.
178. Nicholson JW. Maturation processes in glass-ionomer dental cements. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2018;4(1):63–71.
179. Moheet IA, Luddin N, Ab Rahman I, Masudi SM, Kannan TP, Nik Abd Ghani NR. Analysis of ionic-exchange of selected elements between novel nano-hydroxyapatite-silica added glass ionomer cement and natural teeth. *Polymers*. 2021;13(20):3504.
180. Murugan R, Yazid F, Nasruddin NS, Anuar NNM. Effects of nanohydroxyapatite incorporation into glass ionomer cement (GIC). *Minerals*. 2021;12(1):9.
181. Kaczmarek K, Leniart A, Lapinska B, Skrzypek S, Lukomska-Szymanska M. Selected spectroscopic techniques for surface analysis of dental materials: a narrative review. *Materials*. 2021;14(10):2624.
182. Kuru E, Eronat N, Türkün M, Çoğulu D. Comparison of remineralization ability of tricalcium silicate and of glass ionomer cement on residual dentin: an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2024;24(1):732.
183. Saxena K, Ann CM, Azwar MABM, Banavar SR, Matinlinna J, Peters OA, et al. Effect of strontium fluoride on mechanical and remineralization properties of enamel: an in-vitro study on a modified orthodontic adhesive. *Dent Mater*. 2024;40(5):811–23.

184. Tromp RM. Energy-dispersive X-ray spectroscopy in a low energy electron microscope. *Ultramicroscopy*. 2024;259:113935.
185. Sarna-Boś K, Boguta P, Skic K, Wiącek D, Maksymiuk P, Sobieszczański J, et al. Physicochemical properties and surface characteristics of ground human teeth. *Molecules*. 2022;27(18):5852.
186. Sampaio FC, Oliveira AFB, Fernandes NLS, Gentile ACC, Marinho GB, Bönecker MJS, et al. Silicon-, silica-, and silicate-toothpastes for remineralization and repair of teeth: a scoping review. *Oral*. 2024;4(4):467–86.
187. Bezerra AC, Novaes RC, Faber J, Frencken JE, Leal SC. Ion concentration adjacent to glass-ionomer restorations in primary molars. *Dent Mater*. 2012;28(11):e259–63.
188. Ajcharanukul O, Kosakarn P, Sujjapong M, Berkbandee S, Bussabong P. Increased fluorohydroxyapatite across dentin after fluoride iontophoresis. *J Dent Res*. 2024;103(8):830–8.
189. Abdalla MM, Sayed O, Lung CYK, Rajasekar V, Yiu CKY. Applications of bioactive strontium compounds in dentistry. *J Funct Biomater*. 2024;15(8):216.

8. ŽIVOTOPIS S POPISOM RADOVA

ŽIVOTOPIS

Dubravka Turjanski rođena je 19. listopada 1981. godine u Subotici. Nakon završetka osnovnoškolskog obrazovanja upisuje prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije u Subotici, koju završava 2000. godine. Iste godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje 2007. diplomira izradom rada pod naslovom *Imunološki aspekti bolesti periapeksa*, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Miletić.

Tijekom studija dodijeljena joj je Povelja dekana za postignuća u akademskoj 2000./2001. Bila je demonstratorica na vježbama iz Morfologije zuba s dentalnom antropologijom, Dentalne patologije, Mobilne protetike i Fiksne protetike. Na temelju završnog prosjeka ocjena svrstana je među 10 % najuspješnijih studenata generacije.

Pripravnički staž obavlja u Domu zdravlja Željezničara u Zagrebu, a nakon položenog stručnog ispita i stjecanja licence za samostalan rad zapošljava se u ordinaciji dentalne medicine dr. Ivane Galeković Goričanac u Vinici, gdje neprekidno radi pune četiri godine.

Godine 2016. započinje specijalizaciju iz dječje i preventivne dentalne medicine pod mentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Glavine. Tijekom specijalizacije upisuje Poslijediplomski doktorski studij *Dentalna medicina* na matičnom fakultetu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Glavine, uz komentorstvo prof. dr. sc. Suzane Jakovljević.

Nakon položenog specijalističkog ispita 2019. godine zapošljava se u Stomatološkoj poliklinici Zagreb, gdje radi kao specijalistica. Redovito se stručno usavršava sudjelovanjem na stručnim kongresima u zemlji i inozemstvu.

POPIS RADOVA

i) Radovi objavljeni u časopisima u WoS Science Citation Indexu Expanded (WoS SCIE)

1. **Turjanski D**, Lisjak D, Bučević Sojčić P, Valpotić J, Borojević Renić T, Goršeta K, Glavina D. Advanced platelet-rich fibrin plus sealed exclusively with glass ionomer cement: setting a new standard for healing, aesthetics and predictive modelling in regenerative endodontics. *Materials*. 2025;18(18):4421. (Q2) ***rad proizašao iz doktorskog istraživanja***
2. **Turjanski D**, Jakovljević S, Lisjak D, Bučević Sojčić P, Glavina F, Goršeta K, Glavina D. Bioactivity of glass carbomer versus conventional GICs in sound enamel and dentine: a 12-month SEM-EDS study. *Materials*. 2025;18(15):3580. (Q2) ***rad proizašao iz doktorskog istraživanja***
3. Bučević Sojčić P, Leder Horina J, Bočkaj N, Borojević Renić T, **Turjanski D**, Goršeta K, Jurčević Lulić T, Jurić H. Stress behaviour of an immature maxillary central incisor: a 3D finite element analysis. *Materials*. 2025;18(10):2305. (Q2)

ii) Sažetci s međunarodnih i domaćih kongresa

1. **Turjanski D**, Glavina D. A-PRF revascularization of immature teeth: success rate after 6 months. CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Vienna, Austria, 21–23 September 2017 (*međunarodni, oralna prezentacija rezultata doktorata*)
2. **Turjanski D**, Glavina D. Revaskularizacija mladih trajnih avitalnih zubi primjenom A-PRF autolognog biomaterijala. Hrvatski dani dječje stomatologije 2017, Zagreb, Hrvatska, 1.–2. prosinca 2017. (*međunarodni, oralna prezentacija rezultata doktorata*)
3. **Turjanski D**, Jakovljević S, Lisjak D, Glavina D. Interakcija stakleno-ionomernih dentalnih materijala i tvrdih zubnih tkiva: SEM/EDS analiza. 26. Međunarodno savjetovanje o zaštiti materijala i industrijskom finišu, Zagreb, Hrvatska, 10. travnja 2024. (*međunarodni, oralna prezentacija rezultata doktorata*)

PRILOG A

Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija M

Tablica A1. Maseni udjeli elemenata (wt. %) F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji M za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; prema Turjanski i sur. (161)

Regija M	F	Al	Si	P	Ca	Sr	Ostalo
K1	10,12	9,97	14,07	1,85	0,60	15,83	47,56
K6	10,58	10,45	14,17	2,20	1,18	15,76	45,66
K12	12,42	9,67	12,16	2,01	0,69	15,21	47,84
F1	11,10	12,44	12,70	2,33	1,36	19,10	40,97
F6	14,78	11,26	11,02	2,88	2,46	16,81	40,79
F12	12,04	11,44	11,33	2,40	0,99	19,27	43,53
E1	14,74	12,44	12,91	2,46	1,28	11,80	44,37
E6	19,19	11,79	11,25	2,22	1,50	10,43	40,62
E12	21,08	10,96	9,62	2,05	0,68	10,24	45,37
G1	13,24	9,12	9,02	3,48	2,89	16,08	46,17
G6	8,36	9,88	16,02	2,55	3,58	8,88	50,73
G12	12,25	8,53	12,33	2,35	2,18	7,98	54,38

Tablica A2. Aritmetičke sredine (AS), standardne devijacije (SD) i 95-postotni intervali pouzdanosti (CI) za masene udjele (wt. %) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u materijalima K, F, E i G u regiji M tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja; prema Turjanski i sur. (161)

Regija M	Element	AS (wt. %)	SD	Donja granica 95 % CI	Gornja granica 95 % CI
K	F	11,04	1,22	10,12	12,42
	Al	10,03	0,39	9,67	10,45
	Si	13,47	1,13	12,16	14,17
	P	2,02	0,18	1,85	2,20
	Ca	0,82	0,31	0,60	1,18
	Sr	15,60	0,34	15,21	15,83
F	F	12,64	1,91	11,10	12,78
	Al	11,71	0,64	11,26	12,84
	Si	11,68	0,89	11,02	12,70
	P	2,54	0,30	2,33	2,88
	Ca	1,60	0,76	0,99	2,46
	Sr	18,39	1,37	16,81	19,27
E	F	18,34	3,26	14,78	21,90
	Al	11,73	0,74	10,95	12,51
	Si	11,26	1,65	9,62	12,90
	P	2,24	0,21	2,05	2,42
	Ca	1,15	0,42	0,68	1,62
	Sr	10,82	0,85	10,24	11,80
G	F	11,28	2,58	8,36	14,20
	Al	9,18	0,68	8,53	9,83
	Si	12,46	3,50	9,02	15,90
	P	2,79	0,60	2,35	3,48
	Ca	2,88	0,70	2,18	3,58
	Sr	10,98	4,44	7,98	16,08

Tablica A3. Statistička dijagnostika izvornih podataka za regiju M

Parametar / Element	F	Al	Si	P	Ca	Sr
ANOVA p-vrijednost	0,0172	0,0002	0,5985	0,1244	0,0114	0,0111
jednakost aritmetičkih sredina	Ne	Ne	Da	Da	Ne	Ne
Cohenov f	2,62	3,726	0,865	1,709	2,852	2,806
snaga testa	1,00	1,00	0,486	0,979	1,00	1,00
normalnost (Shapiro–Wilk)	Da	Da	Da	Da	Da	Da
homogenost varijanci (Levene)	Da	Da	Da	Da	Da	Da
preporučan Kruskal–Wallisov test	Da	Da	Ne	Da	Da	Da
preporučena <i>bootstrap</i> analiza	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Ne

Tablica A4. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji M, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja

Element	Materijal 1	Materijal 2	Razlika AS	95 % CI (donja)	95 % CI (gornja)	p-vrijednost
F	E	F	-5,6967	-11,8823	0,4890	0,0715
	E	G	-7,0533	-13,2390	-0,8677	0,0267 *
	E	K	-7,2967	-13,4823	-1,1110	0,0225 *
	F	G	-1,3567	-7,5423	4,8290	0,8934
	F	K	-1,6000	-7,7856	4,5856	0,8398
	G	K	-0,2433	-6,4290	5,9423	0,9992
Al	E	F	-0,0167	-1,6534	1,6200	1,0000
	E	G	-2,5533	-4,1900	-0,9166	0,0046 **
	E	K	-1,7000	-3,3367	-0,0633	0,0420 *
	F	G	-2,5367	-4,1734	-0,9000	0,0048 **
	F	K	-1,6833	-3,3200	-0,0466	0,0440 *
	G	K	0,8533	-0,7834	2,4900	0,3969
Si	E	F	0,4233	-4,9750	5,8217	0,9940
	E	G	1,1967	-4,2017	6,5950	0,8905
	E	K	2,2067	-3,1917	7,6050	0,5827
	F	G	0,7733	-4,6250	6,1717	0,9660
	F	K	1,7833	-3,6150	7,1817	0,7226
	G	K	1,0100	-4,3883	6,4083	0,9295
P	E	F	0,2933	-0,6552	1,2419	0,7590
	E	G	0,5500	-0,3985	1,4985	0,3167
	E	K	-0,2233	-1,1719	0,7252	0,8726
	F	G	0,2567	-0,6919	1,2052	0,8217
	F	K	-0,5167	-1,4652	0,4319	0,3634
	G	K	-0,7733	-1,7219	0,1752	0,1151
Ca	E	F	0,4500	-1,0703	1,9703	0,7811
	E	G	1,7300	0,2097	3,2503	0,0270 *
	E	K	-0,3300	-1,8503	1,1903	0,8961
	F	G	1,2800	-0,2403	2,8003	0,1021
	F	K	-0,7800	-2,3003	0,7403	0,4093
	G	K	-2,0600	-3,5803	-0,5397	0,0106 **
Sr	E	F	7,5700	1,3773	13,7627	0,0187 *
	E	G	0,1567	-6,0360	6,3493	0,9998
	E	K	4,7767	-1,4160	10,9693	0,1401
	F	G	-7,4133	-13,6060	-1,2207	0,0208 *
	F	K	-2,7933	-8,9860	3,3993	0,5091
	G	K	4,6200	-1,5727	10,8127	0,1567

† Statistička značajnost (Tukeyjev HSD *post hoc* test): * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Tablica A5. Kruskal–Wallisov test – usporedba masenih udjela elemenata u regiji M, temeljem prosjeka svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog praćenja

Element	Test statistika	p-vrijednost	Statistički značajna razlika
F	6,9310	0,0741	Ne
Al	2,7403	0,4334	Ne
P	2,2137	0,5299	Ne
Ca	5,6101	0,1326	Ne
Sr	5,0102	0,1705	Ne

Tablica A6. *Bootstrap* analiza – razlike medijana masenih udjela silicija (Si) između parova materijala u regiji M

Element	Materijal 1	Materijal 2	Izvorna razlika medijana	<i>Bootstrap</i> razlika medijana	95 % CI	Statistički značajno
Si	K	F	2,74	2,74	[-0,54...3,15]	Ne
	K	E	2,82	2,82	[-0,75...4,55]	Ne
	K	G	1,74	1,74	[-3,86...5,15]	Ne
	F	E	0,08	0,08	[-1,89...3,08]	Ne
	F	G	-1,00	-1,00	[-5,00...3,68]	Ne
	E	G	-1,08	-1,08	[-6,40...3,89]	Ne

PRILOG B

Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija CM

Tablica B1. Maseni udjeli (wt. %) i standardne devijacije (SD) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji CM za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; inicijalni sastav cakline (C₀) prikazan je kao referentna vrijednost. Prema Turjanski i sur. (161)

CM	F	Al	Si	P	Ca	Sr	Ostatak
C ₀	0,18 ± 0,21	0,04 ± 0,08	0,24 ± 0,02	17,95 ± 0,29	33,27 ± 0,87	1,12 ± 0,20	47,29 ± 0,95
K1	0,91 ± 0,13	0,59 ± 0,14	0,85 ± 0,25	17,28 ± 0,82	31,27 ± 1,28	2,77 ± 0,44	46,33 ± 1,74
K6	1,27 ± 0,06	0,53 ± 0,05	0,88 ± 0,13	16,15 ± 0,62	26,31 ± 0,44	2,11 ± 0,40	52,77 ± 1,30
K12	0,77 ± 0,28	0,69 ± 0,27	0,87 ± 0,58	15,24 ± 0,95	30,86 ± 7,78	4,19 ± 1,25	47,37 ± 6,97
F1	0,50 ± 0,09	0,22 ± 0,21	0,50 ± 0,37	16,97 ± 0,49	29,24 ± 3,94	2,12 ± 0,39	50,46 ± 4,03
F6	3,58 ± 0,32	1,03 ± 0,55	1,14 ± 0,57	16,54 ± 0,54	29,12 ± 0,19	3,22 ± 0,94	45,37 ± 1,01
F12	1,99 ± 1,06	1,33 ± 0,43	0,67 ± 0,17	16,97 ± 0,93	28,77 ± 6,95	3,69 ± 1,11	46,59 ± 5,27
E1	0,57 ± 0,23	0,31 ± 0,11	0,29 ± 0,02	18,17 ± 0,75	33,75 ± 0,89	1,36 ± 0,04	45,54 ± 1,59
E6	2,87 ± 0,68	0,74 ± 0,09	0,54 ± 0,11	17,11 ± 0,18	29,13 ± 0,41	1,98 ± 0,10	47,64 ± 0,97
E12	2,11 ± 0,37	1,22 ± 0,36	0,62 ± 0,27	16,58 ± 0,54	30,67 ± 0,97	2,34 ± 0,23	46,45 ± 0,31
G1	2,43 ± 2,42	1,37 ± 1,24	1,32 ± 1,10	13,91 ± 4,26	21,84 ± 9,17	4,37 ± 2,95	54,77 ± 6,99
G6	2,93 ± 2,43	0,59 ± 0,40	1,37 ± 0,90	17,71 ± 1,03	36,38 ± 5,86	2,34 ± 0,48	39,65 ± 5,92
G12	2,39 ± 0,84	3,02 ± 1,30	4,82 ± 1,79	13,00 ± 1,47	23,17 ± 2,99	3,60 ± 1,31	49,99 ± 1,18

Tablica B2. Aritmetičke sredine (AS), standardne devijacije (SD) i 95-postotni intervali pouzdanosti (CI) za masene udjele (wt. %) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u materijalima K, F, E i G tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja – regija CM; prema Turjanski i sur. (161)

CM	Element	AS (wt. %)	SD	95 % CI (donja)	95 % CI (gornja)
K	F	0,98	0,26	0,34	1,62
	Al	0,60	0,08	0,40	0,80
	Si	0,87	0,02	0,83	0,90
	P	16,22	1,02	13,68	8,76
	Ca	29,48	2,75	22,64	36,32
	Sr	2,12	0,64	0,53	3,71
F	F	2,02	1,54	-1,80	5,85
	Al	0,86	0,57	-0,57	2,29
	Si	0,77	0,33	-0,05	1,59
	P	16,83	0,25	16,21	17,44
	Ca	29,04	0,24	28,44	29,65
	Sr	3,01	0,80	1,03	5,00
E	F	1,85	1,17	-1,06	4,76
	Al	0,69	0,36	-0,20	1,58
	Si	0,51	0,21	-0,01	1,04
	P	16,99	1,27	13,83	20,16
	Ca	31,14	2,37	25,26	37,02
	Sr	2,21	0,80	0,23	4,19
G	F	2,58	0,30	1,84	3,33
	Al	1,66	1,24	-1,42	4,74
	Si	2,38	2,12	-2,88	7,64
	P	15,64	2,41	9,66	21,62
	Ca	27,13	8,04	7,16	47,10
	Sr	3,44	1,03	0,89	5,99

Tablica B3. Statistička dijagnostika izvornih podataka za regiju CM

Parametar / Element	F	Al	Si	P	Ca	Sr
ANOVA p-vrijednost	0,3250	0,3126	0,2174	0,6707	0,7445	0,1139
jednakost srednjih vrijednosti	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Cohenov f	0,712	0,724	0,832	0,448	0,396	1,012
snaga testa	0,343	0,354	0,454	0,156	0,131	0,627
normalnost (Shapiro–Wilk)	Da	Ne	Ne	Da	Da	Da
homogenost varijanci (Levene)	Da	Da	Da	Da	Da	Da
preporučen Kruskal–Wallisov test	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
preporučena <i>bootstrap</i> analiza	Da	Da	Da	Da	Da	Da

Tablica B4. Kruskal–Wallisov test – usporedba masenih udjela elemenata u regiji CM, temeljem prosjeka svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog praćenja

Element	Test statistika	p-vrijednost	Statistički značajna razlika
Al	2,7403	0,4334	Ne
Si	7,2051	0,0656	Ne

Tablica B5. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji CM, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja

Element	Materijal 1	Materijal 2	Razlika AS	95 % CI (donja)	95 % CI (gornja)	p-vrijednost
F	E	F	0,1733	-2,4094	2,7560	0,9962
	E	G	0,7333	-1,8494	3,3160	0,8008
	E	K	-0,8667	-3,4494	1,7160	0,7135
	F	G	0,5600	-2,0227	3,1427	0,8964
	F	K	-1,0400	-3,6227	1,5427	0,5936
	G	K	-1,6000	-4,1827	0,9827	0,2696
Al	E	F	0,1700	-1,6805	2,0205	0,9905
	E	G	0,9700	-0,8805	2,8205	0,3928
	E	K	-0,0867	-1,9371	1,7638	0,9987
	F	G	0,8000	-1,0505	2,6505	0,5413
	F	K	-0,2567	-2,1071	1,5938	0,9689
	G	K	-1,0567	-2,9071	0,7938	0,3280
Si	E	F	0,2567	-2,5612	3,0745	0,9907
	E	G	1,8667	-0,9512	4,6845	0,2252
	E	K	0,3533	-2,4645	3,1712	0,9766
	F	G	1,6100	-1,2078	4,4278	0,3275
	F	K	0,0967	-2,7212	2,9145	0,9995
	G	K	-1,5133	-4,3312	1,3045	0,3741
P	E	F	-0,1667	-3,9827	3,6494	0,9989
	E	G	-1,3533	-5,1694	2,4627	0,6796
	E	K	-0,7700	-4,5860	3,0460	0,9140
	F	G	-1,1867	-5,0027	2,6294	0,7561
	F	K	-0,6033	-4,4194	3,2127	0,9553
	G	K	0,5833	-3,2327	4,3994	0,9593
Ca	E	F	-2,0967	-13,6324	9,4391	0,9347
	E	G	-4,0100	-15,5458	7,5258	0,6921
	E	K	-1,6600	-13,1958	9,8758	0,9656
	F	G	-1,9133	-13,4491	9,6224	0,9490
	F	K	0,4367	-11,0991	11,9724	0,9993
	G	K	2,3500	-9,1858	13,8858	0,9118
Sr	E	F	0,7467	-1,4654	2,9588	0,7100
	E	G	1,1733	-1,0388	3,3854	0,3837
	E	K	-0,1433	-2,3554	2,0688	0,9966
	F	G	0,4267	-1,7854	2,6388	0,9236
	F	K	-0,8900	-3,1021	1,3221	0,5942
	G	K	-1,3167	-3,5288	0,8954	0,2977

Tablica B6. *Bootstrap* analiza razlika medijana među skupinama materijala – regija CM

Element	Materijal 1	Materijal 2 †	Izvorna razlika medijana	<i>Bootstrap</i> razlika medijana	95 % CI (donja)	95 % CI (gornja)
F	K	F	-1,08	-1,08	-2,81	0,77
	K	E	-1,20	-1,20	-2,10	0,70
	K	G †	-1,52	-1,52	-2,16	1,12
	F	E	-0,12	-0,12	-2,37	3,01
	F	G	-0,44	-0,44	-2,43	1,19
	E	G	-0,32	-0,32	-2,36	0,48
Al	K	F	-0,44	-0,44	-0,80	0,4,
	K	E	-0,15	-0,15	-0,49	0,38
	K	G	-0,78	-0,78	-2,49	0,10
	F	E	0,29	0,29	-0,80	1,02
	F	G	-0,34	-0,34	-2,80	0,74
	E	G	-0,63	-0,63	-2,71	0,43
Si	K	F	0,20	0,20	-0,29	0,38
	K	E †	0,33	0,33	0,14	0,59
	K	G †	-0,45	-0,45	-3,97	0,12
	F	E	0,13	0,13	-0,21	0,85
	F	G	-0,65	-0,65	-4,32	0,14
	E	G †	-0,78	-0,78	-4,53	0,29
P	K	F	-0,82	-0,82	-1,73	0,74
	K	E	-1,13	-1,13	-2,86	1,68
	K	G	-0,06	-0,06	-2,47	4,28
	F	E	-0,31	-0,31	-1,56	1,37
	F	G	0,76	0,76	-1,17	3,97
	E	G	1,07	1,07	-2,11	5,10
Ca	K	F	1,74	1,74	-2,93	2,50
	K	E	0,32	0,32	-7,44	2,14
	K	G	7,69	7,69	-10,07	9,43
	F	E	-1,42	-1,42	-4,98	0,11
	F	G	5,95	5,95	-7,61	7,40
	E	G	7,37	7,37	-7,25	11,91
Sr	K	F	-1,11	-1,11	-2,20	0,64
	K	E	0,13	0,13	-0,85	1,41
	K	G	-1,50	-1,50	-2,88	0,43
	F	E	1,24	1,24	-0,21	2,33
	F	G	-0,39	-0,39	-2,24	1,35
	E	G	-1,63	-1,63	-3,01	0,00

† Statistički značajna razlika među skupinama materijala prema *bootstrap* analizi (95 % CI ne uključuje nulu).

PRILOG C

Detaljni rezultati EDS analize i statističke obrade podataka – regija DM

Tablica C1. Maseni udjeli (wt. %) i standardne devijacije (SD) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u regiji DM za materijale K, F, E i G nakon 1 tjedna te nakon 6 i 12 mjeseci maturacije; inicijalni sastav dentina (D_0) prikazan je kao referentna vrijednost. Prema Turjanski i sur. (161)

DM	F	Al	Si	P	Ca	Sr	Ostatak
D_0	$0,49 \pm 0,19$	$0,00 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,08$	$15,43 \pm 0,46$	$24,25 \pm 1,98$	$1,20 \pm 0,18$	$59,39 \pm 2,23$
K1	$4,88 \pm 0,83$	$3,40 \pm 2,01$	$2,77 \pm 2,01$	$12,91 \pm 1,05$	$17,52 \pm 0,94$	$7,70 \pm 3,35$	$50,83 \pm 6,21$
K6	$1,99 \pm 0,26$	$1,14 \pm 1,15$	$1,33 \pm 1,37$	$13,41 \pm 0,68$	$15,54 \pm 2,64$	$3,49 \pm 2,26$	$63,10 \pm 4,44$
K12	$2,75 \pm 1,16$	$3,40 \pm 0,72$	$4,80 \pm 2,41$	$11,30 \pm 2,73$	$16,63 \pm 5,09$	$9,79 \pm 2,12$	$51,31 \pm 4,07$
F1	$1,49 \pm 0,28$	$0,54 \pm 0,14$	$0,33 \pm 0,03$	$15,78 \pm 0,83$	$24,48 \pm 3,19$	$3,07 \pm 0,94$	$54,30 \pm 4,23$
F6	$6,16 \pm 1,41$	$0,62 \pm 0,49$	$0,39 \pm 0,49$	$13,86 \pm 1,99$	$21,82 \pm 3,49$	$3,47 \pm 1,72$	$53,67 \pm 2,81$
F12	$4,01 \pm 0,91$	$4,16 \pm 0,79$	$2,51 \pm 1,36$	$13,28 \pm 1,00$	$19,80 \pm 3,09$	$9,02 \pm 0,20$	$47,22 \pm 2,31$
E1	$6,10 \pm 1,54$	$2,81 \pm 0,66$	$1,94 \pm 0,58$	$13,70 \pm 1,05$	$19,90 \pm 1,12$	$5,73 \pm 0,91$	$49,84 \pm 1,52$
E6	$23,75 \pm 1,49$	$8,38 \pm 1,07$	$6,05 \pm 0,63$	$4,96 \pm 1,33$	$3,16 \pm 1,41$	$6,31 \pm 0,04$	$47,41 \pm 0,41$
E12	$3,48 \pm 0,62$	$1,58 \pm 1,16$	$0,56 \pm 0,35$	$15,10 \pm 0,21$	$22,46 \pm 2,66$	$4,26 \pm 1,41$	$52,57 \pm 6,41$
G1	$2,00 \pm 0,22$	$0,98 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,24$	$15,66 \pm 0,66$	$27,45 \pm 1,21$	$6,14 \pm 0,28$	$46,91 \pm 1,37$
G6	$3,07 \pm 0,65$	$2,67 \pm 0,88$	$2,68 \pm 1,16$	$13,56 \pm 0,65$	$19,15 \pm 0,86$	$5,75 \pm 0,65$	$53,11 \pm 3,37$
G12	$4,47 \pm 0,59$	$5,23 \pm 1,53$	$6,57 \pm 1,60$	$10,12 \pm 1,36$	$12,21 \pm 3,28$	$6,70 \pm 0,64$	$54,71 \pm 0,30$

Tablica C2. Aritmetičke sredine (AS), standardne devijacije (SD) i 95-postotni intervali pouzdanosti (CI) za masene udjele (wt. %) elemenata F, Al, Si, P, Ca i Sr u materijalima K, F, E i G tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja – regija DM; prema Turjanski i sur. (161)

DM	Element	AS (wt. %)	SD	95% CI (donja)	95% CI (gornja)
K	F	3,21	1,50	-0,51	6,93
	Al	2,65	1,30	-0,59	5,89
	Si	2,97	1,74	-1,36	7,30
	P	12,54	1,10	9,80	15,28
	Ca	16,56	0,99	14,10	19,03
	Sr	5,66	2,11	0,42	10,90
F	F	3,89	2,34	-1,92	9,69
	Al	1,77	2,07	-3,36	6,91
	Si	1,08	1,24	-2,01	4,16
	P	14,31	1,31	11,06	7,56
	Ca	22,03	2,35	16,20	27,86
	Sr	5,19	3,33	-3,08	13,45
E	F	11,11	11,02	-16,28	38,50
	Al	4,26	3,62	-4,74	13,26
	Si	2,85	2,86	-4,24	9,94
	P	11,25	5,49	-2,40	24,90
	Ca	15,17	10,48	-10,87	41,21
	Sr	5,43	1,06	2,81	8,06
G	F	3,18	1,24	0,10	6,26
	Al	2,96	2,14	-2,36	8,28
	Si	3,37	2,92	3,88	10,62
	P	13,11	2,80	6,17	20,06
	Ca	19,60	7,63	0,65	38,56
	Sr	6,20	0,48	5,01	7,38

Tablica C3. Statistička dijagnostika izvornih podataka za regiju DM

Parametar / Element	F	Al	Si	P	Ca	Sr
ANOVA p-vrijednost	0,3213	0,6702	0,6417	0,7104	0,6042	0,9382
jednakost srednjih vrijednosti	da	da	da	da	da	da
Cohenov f	0,715	0,449	0,468	0,421	0,494	0,223
snaga testa	0,346	0,156	0,167	0,142	0,181	0,074
normalnost (Shapiro–Wilk)	da	ne	ne	da	da	da
homogenost varijanci (Levene)	da	da	da	da	da	da
preporučen Kruskal–Wallisov test	ne	da	da	ne	ne	ne
preporučena <i>bootstrap</i> analiza	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tablica C4. Kruskal–Wallisov test – usporedba masenih udjela elemenata u regiji DM, temeljem prosjeka svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog praćenja

Element	Test statistika	p-vrijednost	Statistički značajna razlika
Al	1,6725	0,6431	ne
Si	3,3590	0,3395	ne

Tablica C5. Tukeyjev HSD *post hoc* test – razlike aritmetičkih sredina masenih udjela elemenata s 95-postotnim intervalima pouzdanosti (CI) u regiji DM, izračunane kao prosjeci svih vremenskih točaka tijekom 12-mjesečnog razdoblja praćenja

Element	Materijal 1	Materijal 2	Razlika AS	95 % CI (donja)	95 % CI (gornja)	p-vrijednost
F	E	F	-7,2233	0,4560	-22,1744	7,7278
	E	G	-7,9300	0,3837	-22,8811	7,0211
	E	K	-7,9033	0,3863	-22,8544	7,0478
	F	G	-0,7067	0,9987	-15,6578	14,2444
	F	K	-0,6800	0,9988	-15,6311	14,2711
	G	K	0,0267	1,0000	-14,9244	14,9778
Al	E	F	-2,4833	0,6157	-8,8458	3,8791
	E	G	-1,2967	0,9117	-7,6591	5,0658
	E	K	-1,6100	0,8480	-7,9725	4,7525
	F	G	1,1867	0,9301	-5,1758	7,5491
	F	K	0,8733	0,9698	-5,4891	7,2358
	G	K	-0,3133	0,9985	-6,6758	6,0491
Si	E	F	-1,7733	0,7840	-7,7993	4,2526
	E	G	0,5200	0,9921	-5,5059	6,5459
	E	K	0,1167	0,9999	-5,9093	6,1426
	F	G	2,2933	0,6331	-3,7326	8,3193
	F	K	1,8900	0,7515	-4,1359	7,9159
	G	K	-0,4033	0,9962	-6,4293	5,6226
P	E	F	3,0533	0,6611	-5,3122	11,4189
	E	G	1,8600	0,8896	-6,5055	10,2255
	E	K	1,2867	0,9586	-7,0789	9,6522
	F	G	-1,1933	0,9664	-9,5589	7,1722
	F	K	-1,7667	0,9032	-10,1322	6,5989
	G	K	-0,5733	0,9960	-8,9389	7,7922
Ca	E	F	6,8600	0,6035	-10,4144	24,1344
	E	G	4,4300	0,8430	-12,8444	21,7044
	E	K	1,3900	0,9935	-15,8844	18,6644
	F	G	-2,4300	0,9677	-19,7044	14,8444
	F	K	-5,4700	0,7463	-22,7444	11,8044
	G	K	-3,0400	0,9402	-20,3144	14,2344
Sr	E	F	-0,2467	0,9988	-5,6131	5,1197
	E	G	0,7633	0,9667	-4,6031	6,1297
	E	K	0,2267	0,9990	-5,1397	5,5931
	F	G	1,0100	0,9284	-4,3564	6,3764
	F	K	0,4733	0,9915	-4,8931	5,8397
	G	K	-0,5367	0,9878	-5,9031	4,8297

PRILOG D

Obrazac informiranog pristanka

Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za dječju i preventivnu stomatologiju

Gundulićeva 5, 10 000 Zagreb

Tel.: +385 (0)1 4802 110

INFORMIRANI PRISTANAK

Pristajem da dijete _____,
rođeno _____, čiji sam roditelj/staratelj,
sudjeluje u istraživanju pod naslovom:

Primjena trombocitima obogaćenoga fibrina u revaskularizaciji mladih trajnih zuba

te izjavljujem da sam upoznat/a sa svrhom istraživanja i načinom na koji će dijete u njemu sudjelovati. Suglasan/na sam s uporabom dobivenih podataka u znanstvene, stručne i obrazovne svrhe, pri čemu identitet djeteta neće biti objavljen.

Potvrđujem da sam imao/la mogućnost postavljanja pitanja, da sam dobio/la zadovoljavajuće odgovore te da sam sve navedene informacije razumio/la.

Svojevoljno pristajem na sudjelovanje djeteta u ovom istraživanju.

Ime i prezime roditelja/staratelja: _____

Potpis: _____

Mjesto i datum: _____

PRILOG E

Pisane informacije za pacijente (ispitanike)

Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za dječju i preventivnu stomatologiju

Gundulićeva 5, 10 000 Zagreb

Tel.: +385 (0)1 4802 110

INFORMACIJA ZA ISPITANIKE

Poštovani pacijenti, roditelji, skrbnici i zakonski zastupnici,

bilo bi nam drago da se odazovete pozivu i sudjelujete u istraživanju koje ima za cilj ispitati primjenu biološkog postupka u liječenju mladih trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijena.

Istraživanje pod naslovom:

Primjena trombocitima obogaćenoga fibrina u revaskularizaciji mladih trajnih zuba

provodi se u sklopu doktorske disertacije dr. med. dent. Dubravke Turjanski, specijalizantice Zavoda za dječju i preventivnu stomatologiju KBC-a Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Glavine, redovitog profesora u trajnom zvanju na istom Zavodu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje će obuhvatiti oko 50 pacijenata.

Cilj ovog postupka je ispitati učinkovitost metode revaskularizacije mladih trajnih zuba s avitalnom pulpom korištenjem vlastitog krvnog pripravka bez dodatka ikakvih tvari, što ga čini sigurnim za primjenu u kliničkoj praksi. PRF je prirodni krvni pripravak bogat čimbenicima koji potiču stanice da se umnažaju, razvijaju i usmjeravaju prema mjestu gdje su potrebne za obnovu oštećenog tkiva.

Kod mladog trajnog zuba čija je pulpa izgubila vitalnost dolazi do prekida rasta i razvoja korijena. Takav zub postaje oslabljen, nestabilan i sklon lomovima, a klasičnim terapijskim postupcima ga nije moguće u potpunosti i pravilno izliječiti. Ugradnjom krvnog pripravka u korijenski kanal potiče se aktivacija okolnih stanica, čime se može omogućiti nastavak razvoja zuba i obnova njegovih struktura.

Tijek postupka:

1. Tijekom prvog dolaska zub se otvara i korijenski kanali se očiste, a zatim se zub zatvara lijekom na bazi kalcijeva hidroksida.
2. Na drugom posjetu privremeni lijek se uklanja i u kanale se stavlja triantibiotska pasta.
3. Tjedan dana kasnije, na trećem posjetu, provodi se PRF postupak.

Za pripremu krvnog pripravka uzima se 2×10 mL venske krvi iz ruke. Krv se zatim obrađuje u posebnoj centrifugi kako bi se dobio krvni pripravak bogat trombocitima i čimbenicima rasta. PRF postupak je bezbolan jer se provodi u lokalnoj anesteziji, pri čemu se upotrebljava anestetik bez vazokonstriktora. Zub se ponovno otvara, ispire fiziološkom otopinom, a zatim se potiče lagano krvarenje iz područja oko vrha korijena. Dobiveni krvni pripravak postavlja se u korijenski kanal, a zub se zatim trajno zatvara ispunom.

Kontrolni pregledi:

Nakon provedenog postupka, predviđeni su kontrolni pregledi kako bi se pratio tijek cijeljenja i uspješnost terapije. Prva kontrola planirana je tjedan dana nakon zahvata, a zatim će se redoviti pregledi obavljati nakon 1, 3, 6, 9 i 12 mjeseci.

Tijekom kontrolnih pregleda provodit će se klinički pregled zuba, koji uključuje vizualnu procjenu (inspekciju), pregled osjetljivosti na dodir (palpaciju) te lagano kuckanje zuba (perkusiju). Također će se izrađivati radiološke (RTG) snimke i provoditi testovi vitaliteta kako bi se procijenilo je li došlo do obnove živčane funkcije u zubu.

U slučaju potrebe, mogu se zakazati i dodatni pregledi izvan navedenih termina, o čemu će pacijent ili roditelj/skrbnik biti pravodobno obaviješteni.

Ostale informacije:

- Pacijent u svakom trenutku može zatražiti dodatno pojašnjenje i/ili tumačenje rezultata.
- Sudjelovanje je dobrovoljno, a iz istraživanja se može povući u bilo kojem trenutku, bez navođenja razloga.
- Prikupljeni podatci koristit će se za potrebe izrade doktorske disertacije te eventualne dodatne studije povezane s ovim istraživanjem.
- Podatci se neće dijeliti s trećim osobama bez prethodne obavijesti i nove, potpisane suglasnosti.
- Sudjelovanje nije honorirano – ne uključuje novčanu ni drugu naknadu.

Potvrdom suglasnosti izjavljujete da:

- U potpunosti razumijete gore navedene informacije.
- Ne postoje zdravstvene ili druge zapreke za Vaše sudjelovanje.
- Niste alergični na sastojke triantibiotske paste niti na korišteni anestetik.
- Svojevoljno pristajete na sudjelovanje u ovom istraživanju.

Za dodatna pitanja ili nejasnoće slobodno se obratite:

Dubravka Turjanski, dr. dent. med.

e-mail: dubravkadjuric81@gmail.com