



## Histološka evaluacija efekata plazme bogate trombocitima i hidroksiapatita u procesu apeksogeneze: studija na eksperimentalnim životinjama

### Histological evaluation of platelet rich plasma and hydroxyapatite in apexogenesis: study on experimental animals

Vesna Danilović\*, Vanja Petrović†, Dejan Marković‡, Zoran Aleksić‡

Stomatološki fakultet, \*Institut za histologiju i embriologiju, †Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju, ‡Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu, Beograd

#### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Podaci o primeni endogenih faktora rasta u terapiji vitalne pulpe zuba sa nezavršenim rastom korena su veoma oskudni i često kontradiktorni. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj plazme bogate trombocitima (PRP) u kombinaciji sa hidroksiapatitom (HAP), kao materijala za direktno prekrivanje pulpe, na završetak rasta korena i formiranje okolnog parodontijuma. **Metode.** Istraživanje je obavljeno na osam mladih majmuna *Cercopithecus Aethiops*. Sve životinje imale su zube stalne denticije, sa nezavršenim rastom korena. Nakon trepanacije pulpnog prostora, pulpa je uklonjena do nivoa gledno-cementnog spoja, a lezija u pulpi prekrivena je kalcijum hidrok-sidom (kontrolna grupa), hidroksiapatitom (eksperimentna grupa I) i hidroksiapatitom u kombinaciji sa autogenim PRP faktorom (eksperimentna grupa II). Šest meseci nakon amputacije pulpe, životinje su žrtvovane, a tkivo za histološku analizu uzeto je u obliku blok sekcije i pripremljeno za mikroskopsku analizu. **Rezultati.** Zarastanje rane u pulpno-dentinskom kompleksu u obe eksperimentne i u kontrolnoj grupi bilo je karakterisano stvaranjem dentinskog mostića procesom reparativne dentinogeneze, očuvanjem morfološkog i funkcijskog integriteta pulpe, kao i završetkom rasta korena i stvaranjem okolnog parodontijuma. U većini uzoraka obe grupe, zapaljenska reakcija ocenjena je kao blaga do umerena, što govori u prilog biokompatibilnosti primenjenih materijala. **Zaključak.** Svi primenjeni materijali pogodni su za direktno prekrivanje pulpe, doprinose očuvanju njenog morfološkog i funkcionalnog integriteta i omogućavaju završetak rasta korena i formiranje okolnog parodontijuma. Ipak, povoljniji rezultati dobijeni su u grupi koja je tretirana HAP/PRP, pa se može reći da HAP obogaćen endogenim faktorima rasta predstavlja superiorniju alternativu u odnosu na ostale materijale primenjene u ovoj studiji.

#### Ključne reči:

zub, koren; periodoncijum; trombociti; plazma; hidroksiapatiti; majmuni; faktori rasta.

#### Abstract

**Background/Aim.** There are very few data about the effects of endogenous growth factors in vital pulp therapy, and still they are often controversial. The aim of the study was to evaluate the effects of platelet rich plasma (PRP) in conjugation with hydroxyapatite (HAP), as pulp capping materials, to root and periodontium formation. **Methods.** Eight young monkeys (*Cercopithecus Aethiops*) with permanent dentition and incomplete root formation were involved in this study. After pulpotomy, the pulp lesion was capped with calcium hydroxide (control), hydroxyapatite (experimental group I) or hydroxyapatite in conjugation with PRP (experimental group II). Six months later, the animals were sacrificed, the tissue was removed *en block*, and prepared for the histological analysis in a routine way. **Results.** The results of the histological analysis revealed that healing process was characterised by dentin bridge formation, maintained morphological and functional integrity of dental pulp and complete formation of dental root and surrounding periodontium. The inflammatory reaction was scored as mild to moderate, in almost all the samples in all groups, suggesting the biocompatibility of the used materials. **Conclusion.** Materials used in this study are convenient as capping agents, contributing maintaining the integrity of the pulp tissue and facilitating root and periodontium formation. According to histological data it could be suggested that hydroxyapatite in conjugation with endogenous growth factors, represents superior alternative to other materials used in this study.

#### Key words:

tooth root; periodontium; platelet-rich plasma; durapatite; haplorhini; intercellular signaling peptides and proteins.

## Uvod

Povrede stalnih zuba sa nezavršenim rastom korena česte su i pogađaju oko 30% dece<sup>1</sup>. Većina tih povreda ima za posledicu inflamaciju pulpe i njenu nekrozu<sup>2</sup>. Hertwigova košuljica, iako osetljiva na povredu, zahvaljujući dobroj prokrvljenosti i prisustvu velikog broja nedovoljno diferentovanih ćelija u neposrednoj okolini, može da doprinese daljem razvoju korena, pod uslovom da ne postoji infekcija i nekroza pulpe<sup>3</sup>. Uloga Hertwigove košuljice je višestruka i kompleksna. Ona predstavlja stalan izvor ćelija, pod čijim induktivnim uticajem se odvija diferencijacija mezenhimnih ćelija u pravcu ćelija odgovornih za stvaranje mineralizovanih tkiva korena zuba. Takođe, predstavlja mehaničku barijeru koja sprečava migraciju nedovoljno diferentovanih ćelija periodoncijuma u pulpni prostor, preko vrha korena zuba. Na taj način ona sprečava stvaranje koštanog tkiva unutar pulpnog prostora, što bi u potpunosti onemogućilo dalji razvoj korena zuba<sup>4</sup>.

Webber<sup>4</sup> je u svojoj studiji sugerisao da se povoljan terapijski ishod i završetak rasta korena i formiranje okolnog parodontnog tkiva može očekivati samo u slučaju kada je očuvan integritet pulpe i postojećih odontoblasta koji bi stvorili reparativni dentin i doprineli zatvaranju pulpnog prostora. Proces reparativne dentinogeneze dodatno je komplikovan činjenicom da u njoj učestvuju ili primarni odontoblasti, ili odontoblastima slične ćelije, sposobne da sekretuju ekstracelularni matriks i iniciraju njegovu mineralizaciju, čime se stvara tkivo slično dentinu<sup>5</sup>. Nakon mehaničkog otvaranja pulpnog prostora obično dolazi do ireverzibilnog oštećenja primarnih odontoblasta. S obzirom da su oni terminalni postmitotici, ne postoji mogućnost da se njihovom deobom i proliferacijom nadoknadi nastali gubitak. Poreklo odontoblastima sličnih ćelija, koje učestvuju u procesu reparativne dentinogeneze nakon nekroze primarnih odontoblasta, predmet je brojnih studija. Rezultati ranijih studija pokazali su da se slabo diferentovane perivaskularne ćelije mogu diferentovati u pravcu odontoblastima sličnih ćelija<sup>6</sup>. Mehanizam diferencijacije ovih ćelija u novim uslovima, bez prisustva bazalne membrane i induktivnog uticaja ćelija unutrašnjeg gleđnog epitela nije sasvim jasan<sup>7</sup>.

Kalcijum hidroksid predstavlja najbolje proučen materijal za direktno prekrivanje pulpe<sup>8-10</sup>. Kao jaka baza, kalcijum hidroksid izaziva nekrozu površinskih slojeva pulpe, pre svega originalnih odontoblasta i subodontoblastnog sloja. U kasnijim fazama makrofagi odstranjuju nekrotični debrisi, a mesto odontoblasta zauzimaju odontoblastima slične ćelije, koje kao i originalni odontoblasti imaju sposobnost sinteze i sekrecije organskom matriksa. Njegovom mineralizacijom nastaje tkivo slično dentinu<sup>9, 10</sup>. Hidroksiapatit (HAP) kao materijal za direktno prekrivanje pulpe u upotrebi je poslednje dve decenije. Rezultati kliničkih studija pokazali su da HAP ima visok stepen biokompatibilnosti u odnosu na dentinsko-pulpni kompleks, ne izaziva nekrozu odontoblasta, niti zapaljensku reakciju većeg stepena u pulpi. Takođe, poseduje visok stepen mehaničke stabilnosti i adhezivnosti u odnosu na okolni dentin<sup>10</sup>.

Faktori rasta su biološki medijatori koji regulišu ključne procese u reparaciji tkiva, uključujući ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, sintezu ekstracelularnog matriksa i angiogenezu. Trombociti, osim učesća u hemostazi i inflamaciji, daju doprinos reparaciji mineralizovanih i mekih tkiva. Oni u svojim alfa granulama sadrže mnoštvo faktora rasta: trombocitni faktor rasta (PDGF), transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ), faktor rasta sličan insulinu (IGF), epidermi faktor rasta (EGF) i druge<sup>11</sup>. Istraživanja su pokazala da se lokalnom primenom plazme sa koncentrovanim trombocitima mogu postići bolji rezultati u reparativnim procesima, nego lokalnom primenom samo faktora rasta<sup>12</sup>.

Uticaj plazme bogate trombocitima (PRP) na diferencijaciju i proliferaciju pojedinih ćelija bolje je proučen u *in vitro* uslovima, a dobijeni rezultati često su u međusobnoj koliziji<sup>13-15</sup>. Neke kliničke studije pokazale su da primena PRP ima pozitivne efekte na procese reparacije<sup>16</sup>, dok se u drugim takav efekat ne uočava<sup>17</sup>. Ovako kontradiktorni podaci mogu se objasniti različitim metodama pripreme i posledično različitom koncentracijom PRP. Zapravo, još uvek je nejasno koja koncentracija PRP je optimalna za procese reparacije i regeneracije tkiva<sup>17</sup>.

Cilj rada bio je da ispita uticaj PRP u kombinaciji sa hidroksiapatitom, kao materijala za direktno prekrivanje pulpe, na završetak rasta korena i formiranje okolnog parodonticijuma kod stalnih zuba sa nezavršenim rastom korena.

## Metode

Eksperimentno istraživanje obavljeno je na Institutu za virusologiju i imunologiju Torlak, uz saglasnost Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta br. 509/4. Dizajn istraživanja bio je eksperimentalni model u koji je bilo uključeno osam mladih vervet majmuna (*Cercopithecus Aethiops*), prosečne telesne mase 1 500 g. Sve životinje imale su zube stalne denticije, sa nezavršenim rastom korena. Eksperiment je bio izveden u skladu sa Evropskim principima dobre laboratorijske prakse (86/609/EEC), koji su podrazumevali da životinje ne trpe ni fizički ni duševni bol, u uslovima asepsa i antiseptice, u minimalno potrebnom vremenu<sup>18</sup>. Životinje su anestetizirane intramuskularnom primenom ketamin-hlorida (Ralatek, Hemofarm, Vršac), u dozi od 11–55 mg/kg telesne mase. Nakon uvođenja životinja u anesteziju i postavljanja izolacije od koferdam gume, zubi su očišćeni 70% etanolom. Na vestibularnoj površini očnjaka napravljena je preparacija V klase, uz korišćenje malog okruglog svrdla. Sve vreme kaviteti su ispirani sterilnim fiziološkim rastvorom, u cilju otklanjanja tkivnog debrisa, nastalog preparacijom kaviteta. Nakon trepanacije pulpnog prostora, pulpa je uklonjena do nivoa gleđno-cementnog spoja, a lezija u pulpi prekrivena je kalcijum hidroksidom (Life<sup>®</sup> Kerr Co, Orange County, CA, USA; kontrolna grupa, n = 10), hidroksiapatitom (Apatec<sup>®</sup> Stomygen; eksperimentalna grupa I, n = 10) i hidroksiapatitom u kombinaciji sa autogenim PRP faktorom (eksperimentalna grupa II, n = 10). Kalcijum hidroksid je korišćen kao materijal za direktno prekrivanje pulpe u kontrolnoj grupi, kao najbolje proučen materijal za direktno prekrivanje pulpe<sup>8-10</sup>. Nakon toga kaviteti su restaurirani glesjonomer cementom i

amalgamom. Šest meseci nakon amputacije pulpe, životinje su žrtvovane prekomernom dozom ketamin-hlorida.

Plazma bogata trombocitima dobijena je iz krvi eksperimentne životinje po modifikovanoj metodi Weibricha i Kleisa<sup>19</sup>. Ukupno 4,5 ml krvi životinje uzeto je venepunkcijom i stavljeno u sterilnu epruvetu u kojoj se nalazilo 0,5 ml Na-citrata. Krv je centrifugirana u aparatu (MSE, England) na 1 200 o/min u trajanju od 20 min, pri čemu su se izdvojile dve frakcije: žuta, koju je činio krvni serum i crvena koju su činili uobličeni krvni elementi. U crvenoj frakciji postojale su dve zone: zona sa najvećom koncentracijom trombocita locirana u gornjih 6–7 mm i zona uobličениh krvnih elemenata 7 mm ispod granice frakcije seruma i krvnih ćelija. Nakon prvog centrifugiranja određeno je mesto 6 mm ispod granice frakcija i označeno belim papirom. Sadržaj ispod označenog markera aspiriran je špricom i postavljen u novu sterilnu epruvetu, nakon čega je usledilo drugo centrifugiranje, koje je obavljeno na 2 000 o/min u trajanju od 15 min. Kao rezultat drugog centrifugiranja dobijene su dve jasno izdvojene frakcije: gornja, koju je činio serum siromašan trombocitima i donja koju su činili koncentrovani trombociti. Špricom i sterilnom iglom odstranjen je serum, čime su dobijeni koncentrovani trombociti, spremni za aplikovanje.

Tkivo za histološku analizu uzeto je u obliku blok sekcije koja je obuhvatala tretirani zub sa okolnom alveolnom kosti i pripremljeno za analizu pomoću svetlosnog mikroskopa na uobičajeni način. Fiksacija je obavljena u 10% pufisanom formalinu, a dekalifikacija u 5% sirćetnoj kiselini u trajanju 40–50 dana. Parafinski isečci debljine 6 mm bojani su hematoksilin-eozinom i metodom po Gramu, za identifikaciju bakterija. Histološka analiza obavljena je pomoću svetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss Inc, Oberkochen, Germany).

U histološkoj analizi ispitivani su sledeći parametri: formiranje dentinskog mostića procesom reparativne dentinogeneze (kontinuitet sa okolnim dentinom, debljina, lokalizacija, morfološki aspekti); očuvanost morfološkog integriteta pulpnog tkiva, posebno odontoblasta i njima sličnih ćelija; znaci inflamatorne reakcije (hronične ili akutne, intenzitet i lokalizacija), vaskularne reakcije u smislu venske dilatacije i staze, kao i znaci neoangiogeneze, završetak rasta korena i okolnog paradoncijuma.

Intenzitet zapaljenske reakcije ocenjivan je sa 4 stepena: bez zapaljenske reakcije (0), blaga (1), umerena (2) i intenzivna (3)<sup>20</sup>. Ocenom (0) ocenjeni su uzorci kod kojih nisu uočene ćelije zapaljenskog infiltrata ili je njihov broj bio minimalan, ocenom (1) ocenjeni su uzorci kod kojih su ćelije zapaljenskog infiltrata bile locirane u zoni neposredno ispod aplikovanog materijala, ocenom (2) ocenjeni su uzorci kod kojih su zapaljenske ćelije zahvatale više od jedne trećine pulpe i ocenom (3) ocenjeni su uzorci kod kojih je čitava pulpa bila infiltrisana ćelijama zapaljenskog infiltrata, uz kompletno narušavanje njenog morfološkog integriteta.

## Rezultati

Rezultati mikroskopske analize pokazali su da je u svim ispitivanim uzorcima obe eksperimentne grupe na mestu am-

putacije pulpe došlo do stvaranja dentinskog mostića. Novostvoreni dentin imao je karakteristike reparativnog dentina sa malim brojem iregularno postavljenih dentinskih kanalića, koji su ostvarivali kontinuitet sa postojećim dentinom (slika 1). U četiri uzorka grupe I i osam uzoraka grupe II dentinski mostić pokrivaio je čitavu površinu amputacijske rane, zatvarajući u potpunosti pulpni prostor i stvarajući uslove za završetak rasta korena. U svim ispitivanim uzorcima obe eksperimentne grupe uočili smo intimnu vezu između HAP-a i okolnog dentina, bez interponiranja vezivnog tkiva. Može se pretpostaviti da ovakav oblik veze između dentina i HAP-a obezbeđuje uspešan reparativni odgovor pulpe u smislu stvaranja mineralizovanog dentinskog mostića. Dobro rubno zatvaranje kaviteta i prevencija kontaminacije pulpe bakterijama jedan je od važnih preduslova za reparaciju dentinskopulpnog kompleksa.

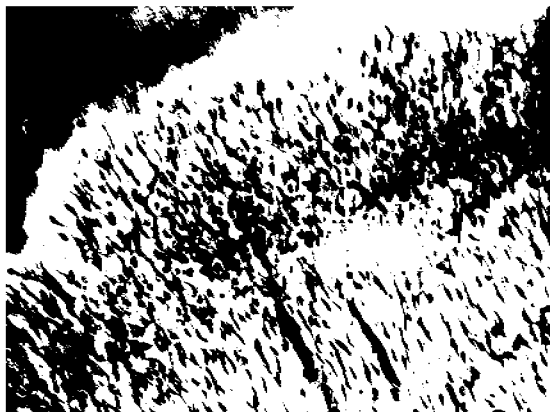


Sl. 1 – Hidroksiapatit/plazma bogata trombocitima.

Dentinski mostić ostvarivao je kontakt sa postojećim dentinom i u potpunosti zatvarao pulpni prostor, što je sprečavalo kontaminaciju pulpe i stvaralo uslove za očuvanje njenog integriteta. Ovo su bili neophodni uslovi za uspešnu apeksogenezu (HE, 100 ×).

U svim ispitivanim uzorcima ispod mineralizovanog mostića uočavali su se odontoblasti sa manje ili više izraženim strukturnim promenama. Na mestu amputacije, strukturne promene odontoblasta varirale su od vrlo blagih, jedva primetnih, pa do kompletne destrukcije. Može se pretpostaviti da na mestu amputacije i aplikacije materijala za prekrivanje pulpe zapravo i nema originalnih odontoblasta, već se umesto njih nalaze odontoblastima-slične ćelije, premda su za njihovu identifikaciju potrebne dodatne imunohistohemijske studije. One, kao i originalni odontoblasti, imaju izdužen oblik, palisadnu orijentaciju i jasno su polarizovane sa bazalno postavljenim jedrom. Takođe, slično odontoblastima, imaju sposobnost sinteze i sekrecije ekstracelularnog matriksa čijom mineralizacijom nastaje reparativni dentin. Ovakav terapijski ishod može se smatrati povoljnim, jer dovodi do zatvaranja pulpnog prostora, što je neophodan uslov za očuvanje integriteta pulpe i završetak rasta korena, što je utvrđeno u većini uzoraka kod obe eksperimentne grupe. S obzirom da je histološki nalaz bio sličan u obe grupe uzoraka, može se pretpostaviti da se mehanizam inicijacije reparativne dentinogeneze odvijao na sličan ili identičan način, nezavisno od aplikovanog materijala. Uočili smo da je debljina dentinskog

mostića bila povezana sa gustinom odontoblastima sličnih ćelija, što sugerira da ove ćelije zapravo imaju ključnu ulogu u procesu reparativne dentinogeneze. Takođe je uočena veza između gustine odontoblastima sličnih ćelija i strukturne organizacije dubljih slojeva pulpe. Uzorci kod kojih je uočena veća gustina odontoblastima sličnih ćelija pokazivali su viši nivo strukturne očuvanosti dubljih slojeva pulpe (slika 2).



Sl. 2 – Hidroksiapatit/plazma bogata trombocitima.

U eksperimentalnoj grupi tretiranoj HAP/PRP uočena je veća gustina ćelija sličnih odontoblastima i veća debljina dentinskog mostića, što sugerira da PRP ima uticaja na proliferaciju i diferencijaciju ćelija (HE, 100 ×).

U centralnom delu pulpe posmatrana je vrsta i broj ćelija inflamatornog infiltrata, angiogeni odgovor, prisustvo bakterija i struktura ekstracelularnog matriksa, pre svega očuvanost kolagenih vlakana. Inflamatorna reakcija tkiva jedan je od glavnih parametara za procenu biokompatibilnosti materijala *in vivo*.

U najvećem broju (sedam uzoraka grupe I i osam uzoraka grupe II) nisu uočene ćelije zapaljenskog infiltrata, što govori u prilog visokog stepena biokompatibilnosti primenjenog materijala. U ostalim uzorcima uočene su ćelije zapaljenskog infiltrata koji su pretežno sačinjavali limfociti, plazmociti i makrofagi, što govori u prilog hronične zapaljenske reakcije. Na osnovu definisanih kriterijuma, intenzitet zapaljenske reakcije u obe eksperimentalne grupe mogao se proceniti od blage do umerene u većini ispitivanih uzoraka obe grupe. Masivnu infiltraciju neutrofilnim granulocitima, kao i prisustvo apscesa, što je pokazatelj akutne zapaljenske reakcije, nismo uočili ni u jednom od ispitivanih uzoraka.

Promene na krvnim sudovima uočene su u najvećem broju ispitivanih uzoraka obe grupe. U svim ispitivanim uzorcima grupe I ove promene manifestovale su se proliferacijom i stvaranjem novih krvnih sudova, dok je u grupi tretiranoj HAP-om ovakav nalaz bio prisutan samo u šest uzoraka (slika 3). Ovakav nalaz mogao se oceniti kao povoljan, sugerirajući da je u periodu zarastanja ostvarena potpuna revascularizacija tkiva. Neoangiogeneza upućuje na regenerativne procese koji su se odvijali u pulpi nakon primene materijala, budući da je angiogeneza jedan od bitnih parametara procene regeneracije i remodelacije tkiva.

Mikroskopskom analizom uočeno je da je u osam uzoraka grupe I i devet uzoraka grupe II izgled apeksnog parodonticijuma upućivao da se proces apeksogeneze završio ili je

bio u završnim fazama. Kao što je i očekivano, znaci apeksifikacije nisu primećeni ni u jednom od ispitivanih uzoraka, odnosno rast korena je nastavljen, što govori u prilog apeksogeneze (slika 4). U svim uzorcima vrh korena bio je široko otvoren i u komunikaciji sa okolnim parodonticijumom.



Sl. 3 – Hidroksiapatit.

U većini uzoraka obe eksperimentalne grupe nisu uočene ćelije zapaljenskog infiltrata ili je njihov broj bio minimalan. Ova činjenica govori u prilog biokompatibilnosti aplikovanih materijala. U novoformiranoj pulpi uočeni su brojni krvni sudovi. Angiogeneza govori u prilog reparacije i remodelacije tkiva (HE, 100 ×).

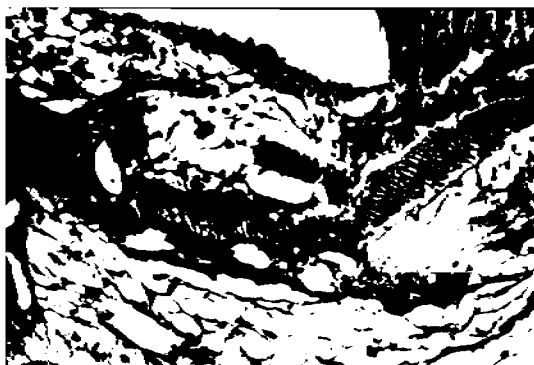


Sl. 4 – Hidroksiapatit/plazma bogata trombocitima.

Histološka slika upućuje na završnu fazu apeksogeneze. Uočavaju se nakupine mezenhimnih ćelija koje se diferenciraju u pravcu cementoblasta. Prisutni su i znaci formiranja parodonticijuma i nezrele alveolne kosti (HE, 100 ×).

Rezultati histološke analize pokazali su da je u svim ispitivanim uzorcima šest meseci nakon amputacije pulpe i aplikacije kalcijum hidroksida kao materijala za prekrivanje pulpe, zarastanje defekata u pulpno-dentinskom kompleksu proticalo bez komplikacija i bilo karakterisano stvaranjem dentinskog mostića. Dentinski mostić je u četiri uzorka u potpunosti zatvarao pulpni prostor i ostvarivao kontakt sa okolnim dentinom. U ostalim uzorcima dentinski mostić je bio nekompletan i samo delimično zatvarao pulpni prostor. U ovim uzorcima u dentinskom mostiću uočene su partikule kalcijum hidroksida, kao i elementi vezivnog tkiva. U dva uzorka kontrolne grupe u dentinskom mostiću bili su prisutni defekti u obliku tunela, ispunjeni vezivnim

tkivom (slika 5). U osam uzoraka kontrolne grupe pulpa zuba je neposredno ispod mostića bila narušene strukture, dok su perifernija područja bila intaktna sa očuvanim odontoblastima, koji su ispoljavali sekretornu aktivnost. Promene u pulpi ispod mostića varirale su od minimalnih do vrlo izraženih i zahvatale su sve slojeve pulpe, od odontoblasta do centralne zone. Promene u centralnoj zoni manifestovale su se pojavom venske staze, krvarenja i inflamacije (slika 6). U svim zonama pulpe moglo se uočiti prisustvo manjeg broja limfocita i plazmocita, što govori u prilog hronične zapaljenske reakcije, koja se mogla definisati kao blaga ili umerena. Zanimljivo je zapažanje da su ćelije zapaljenskog infiltrata bile prisutnije u centralnim, nego u perifernim delovima pulpe i da se ne mogu dovesti u vezu sa prisustvom bakterija u pulpi.



Sl. 5 – Kontrolna grupa.

U uzorcima eksperimentne grupe došlo je do stvaranja dentinskog mostića. U manjem broju uzoraka ove grupe mostić je bio nekompletan sa brojnim defektima ispunjenim vezivnim tkivom (HE, 100 ×).



Sl. 6 – Kontrolna grupa.

Venska staza se manifestovala pojavom dilatiranih krvnih sudova. S obzirom da ovakav nalaz nije bio praćen nalazom bakterijskih ćelija u pulpi, može se pretpostaviti da je bio u vezi sa hemijskom iritacijom izazvanom aplikovanim materijalima (HE, 100 ×).

U šest uzoraka kontrolne grupe, koren je u celini ostvario svoj rast. U devet ispitivanih uzoraka u predelu vrha korena postojala je nekalcifikovana vezivno-tkivna barijera, koja je ograničavala komunikaciju između pulpnog prostora i okolnog parodontijuma (slika 7).



Sl. 7 – Kontrolna grupa.

Apeksni deo korena šest meseci nakon amputacije pulpe i aplikacije kalcijum hidroksida. Koren je u većini ispitivanih uzoraka ostvario svoj rast. U predelu apeksa uočava se nekalcifikovana vezivno-tkivna barijera (HE, 100 ×).

### Diskusija

Rezultati istraživanja pokazali su da je u obe eksperimentne, kao i kontrolnoj grupi, zarastanje arteficialno napravljene defekta u dentinsko-pulpnom kompleksu proticalo bez komplikacija. Formiranje apscesa i nekrozu pulpe nismo uočili ni u jednom od ispitivanih uzoraka, što se može objasniti aseptičnim uslovima rada. Jedini izvor bakterijske kontaminacije pulpe mogao je nastati usled lošeg rubnog zatvaranja kaviteta. Povoljnim terapijskim rezultatom smatrali smo stvaranje mostića procesom reparativne dentinogeneze, čiji je cilj bio zatvaranje pulpnog prostora i održanje morfološkog i funkcionalnog integriteta pulpe, kao i kompletan završetak rasta korena, praćen adekvatnim razvojem apeksnog parodontijuma. Ovakav rezultat ostvaren je u obe eksperimentne i u kontrolnoj grupi, što sugerise da je vrsta primenjenog materijala od sekundarnog značaja, dok je od najveće važnosti stepen očuvanosti zubne pulpe, posebno odontoblasta, kao i odsustvo infekcije i nekroze, što je u skladu sa nalazima Murraya i sar.<sup>21</sup> Rezultati naših istraživanja pokazali su da je gustina odontoblasta bila od velike važnosti za proces reparativne dentinogeneze. U uzorcima u kojima je uočena povećana gustina ćelija, postojali su veća debljina i strukturna pravilnost reparativnog mostića. U tom smislu najpovoljniji rezultati postignuti su u grupi koja je tretirana HAP/ PRP. Može se pretpostaviti da PRP favorizuje proliferaciju i diferencijaciju odontoblasta. Podaci o mitogenom efektu PRP na odontoblaste su veoma oskudni. Nasuprot tome, poznato je da PRP favorizuje mitotičku deobu velikog broja ćelija, uključujući ćelije koštanog tkiva, koštane srži, mezenhimne ćelije, endotelne ćelije, kao i ćelije osteosarkoma<sup>15, 22-25</sup>

Veis<sup>25</sup> je ustanovio da odontoblastima slične ćelije zahtevaju adheziju za odgovarajuću površinu pre nego što započnu svoju diferencijaciju i ispolje sekretornu aktivnost. Ustanovljeno je da PRP stimuliše adheziju i proliferaciju mezenhimnih ćelija periodoncijuma<sup>17</sup>. Može se pretpostaviti da sličan efekat ispoljava i na odontoblaste, stimulišući tako reparativnu dentinogenezu. Rezultati naših istraživanja ukazivali su da je u zonama u kojima je postojala veća gustina ćelija uočena veća pravilnost u organizaciji dubljih slojeva

pulpe i veći broj ćelija u subodontoblastnim slojevima, posebno fibroblasta. Ovakav nalaz u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora<sup>26</sup>.

Prikazana studija nije direktno imala za cilj da rasvetli mehanizme uključene u diferencijaciju odontoblasta i reparativnu dentinogenezu. Rezultati prethodnih studija pokazali su da primena pojedinih faktora rasta, posebno TGF- $\beta$ , stimuliše diferencijaciju odontoblasta i dovodi do oslobađanja endogenih faktora rasta sadržanih u organskom matriksu dentina, što dodatno stimuliše dentinogenezu<sup>7</sup>.

Rezultati naših istraživanja pokazali su da kod većine uzoraka u obe eksperimentne i u kontrolnoj grupi, ćelije zapaljenskog infiltrata nisu uočene ili je njihov broj bio minimalan. Odsustvo ćelija zapaljenskog infiltrata jedan je od najvažnijih parametara za ispitivanje biokompatibilnosti *in vivo*<sup>27</sup>. Ovakav nalaz govori u prilog biokompatibilnosti primenjenih materijala za direktno prekrivanje pulpe.

U velikom broju uzoraka svih grupa uočili smo završetak rasta korena i razvoj apeksnog parodonticijuma. Iako postoje brojni podaci o uticaju faktora rasta na regeneraciju i reparaciju parodonticijuma, naša eksperimentna studija bila je

tako dizajnirana da teško možemo reći da su faktori rasta bili značajni u završetku rasta korena i razvoju okolnog parodonticijuma<sup>28, 29</sup>. Ovakvo povoljan terapijski rezultat pre se može protumačiti činjenicom da je Hertwigova košuljica gotovo u svim ispitivanim uzorcima bila očuvanog integriteta, kao i činjenicom da u pulpi i okolnom parodonticijumu nije postojala infekcija i zapaljenska reakcija.

### Zaključak

Zarastanje rane u pulpno-dentinskom kompleksu u obe eksperimentne i u kontrolnoj grupi bilo je karakterisano stvaranjem dentinskog mostića procesom reparativne dentinogeneze, očuvanjem morfološkog i funkcionalnog integriteta pulpe, kao i završetkom rasta korena i stvaranjem okolnog parodonticijuma. Mikroskopskom analizom utvrđeno je da su povoljniji terapijski rezultati dobijeni u eksperimentnoj grupi u kojoj je korišćen HAP/PRP, pa se stoga može zaključiti da ovaj materijal predstavlja superiorniju alternativu u odnosu na HAP i kalcijum hidroksid.

### L I T E R A T U R A

1. *Andreasen JO, Andreasen FM*, editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard Int Pub Ltd.; 1994.
2. *Cvek M*. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8(2): 45–55.
3. *Rafter M*. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005; 21(1): 1–8.
4. *Webber RT*. Apexogenesis versus apexification. *Dent Clin North Am* 1984; 28(4): 669–97.
5. *Gronthos S, Brambilla J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A*, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81(8): 531–5.
6. *Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M*. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* 2001; 46(3): 221–8.
7. *Tziafas D*. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J* 1994; 27(2): 61–74.
8. *Schröder U*. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64 Spec No: 541–8.
9. *Cox CF, Bergenholz G*. Healing sequence in capped inflamed dental pulps of Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Int Endod J* 1986; 19(3): 113–20.
10. *D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M*. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res* 1995; 74(2): 702–9.
11. *Gentry P.A*. The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J Comp Pathol* 1992; 107(3): 243–70.
12. *Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC*. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17(1): 86–94.
13. *Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M*. The *in vitro* effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(2): 212–9.
14. *Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T*. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63(3): 362–9.
15. *Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R*, et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells *in vitro*. *Eur J Med Res* 2004; 9(7): 337–44.
16. *Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J*. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent* 2004; 13(1): 65–72.
17. *Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC*. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22(1): 45–53.
18. ISO 7405:1997. Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. Geneva: International Organization for Standardization; 1997.
19. *Weibrich G, Kleis WK*. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(4): 437–43.
20. *Stanley HR*. Design for a human pulp study. II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25(5): 756–64.
21. *Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Windsor LJ, Cox CF*. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. *Int Endod J* 2003; 36(2): 106–16.
22. *Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G*. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(5): 529–35.
23. *Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE*. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment *in vitro*. *J Craniofac Surg* 2003; 14(3): 292–300.
24. *Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM*, et al. Platelet-derived growth factors enhance pro-

- liferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24(18): 3095–100.
25. *Veis A.* The role of dental pulp – thoughts on the session on pulp repair processes. *J Dent Res* 1985; 64 Spec No: 552–4.
26. *Mjör LA, Dahl E, Cox CF.* Healing of pulp exposures: an ultra-structural study. *J Oral Pathol Med* 1991; 20(10): 496–501.
27. *Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J.* Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* 2003; 36(12): 831–9.
28. *Regan JD, Gutmann JL, Iacopino AM, Diekwisch T.* Response of periradicular tissues to growth factors introduced into the surgical site in the root-end filling material. *Int Endod J* 1999; 32(3): 171–82.
29. *Nakamura T, Yamamoto M, Tamura M, Izumi Y.* Effects of growth/differentiation factor-5 on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2003; 38(6): 597–605.

Rad je primljen 1. VIII 2007.