



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

**Zastosowanie w leczeniu endodontycznym zaawansowanej fibryny
bogatopłytkowej (A-PRF) w aspekcie gojenia tkanek przyzębia
okolowierzchołkowego.**

Katarzyna Machut

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

PROMOTOR

dr hab. n. med. Agata Żółtowska

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

GDAŃSK 2023

Pragnę serdecznie podziękować:

*Mojemu Promotorowi Pani dr hab. n. med. Agacie Żółtowskiej
za umożliwienie mi podjęcia studiów w Pierwszej Szkole Doktorskiej,
zaangażowanie, okazane wsparcie oraz opiekę naukową.*

*Współautorom artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej
za owocną współpracę.*

*Koleżankom i Kolegom z Poradni Stomatologii Zachowawczej GUMed Sp.z.o.o.
za wsparcie w trakcie trwania projektu badawczego.*

*Moim najbliższym – Rodzicom,
siostrze Paulinie oraz narzeczonemu Kacprowi –
dziękuję Wam za to, że zawsze i wszędzie mogłam
liczyć na Waszą bezwarunkową pomoc,
wsparcie i zrozumienie.*

*Pracę dedykuję moim Rodzicom –
Bożenie i Piotrowi Machut.*

Spis treści

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 1. Indeks skrótów | 3 |
| 2. Wprowadzenie | 6 |
| 3. Wstęp | 7 |
| 4. Cele | 18 |
| 5. Materiały i metody | 19 |
| 5.1. Publikacja 1 i 3 | 19 |
| 5.2. Publikacja 2 | 24 |
| 6. Omówienie publikacji | 26 |
| 6.1. Publikacja 1 | 26 |
| 6.2. Publikacja 2 | 31 |
| 6.3. Publikacja 3 | 34 |
| 7. Wnioski | 42 |
| 8. Streszczenie | 43 |
| 9. Abstract | 45 |
| 10. Piśmiennictwo | 47 |
| 11. Publikacje | 52 |
| 11.1. Publikacja 1 | 52 |
| 11.2. Publikacja 2 | 64 |
| 11.3. Publikacja 3 | 84 |

1. Indeks skrótów

| | |
|----------|--|
| A-PRF | zaawansowana fibryna bogatopłytkowa (ang. advanced platelet rich fibrin) |
| A-PRF+ | zaawansowana fibryna bogatopłytkowa plus (ang. advanced platelet rich fibrin plus) |
| AAC | bezkomórkowy cement bezwłóknisty (ang. acellular afibrillar cementum) |
| AEFC | bezkomórkowy cement obcowłóknisty (ang. acellular extrinsic fiber cementum) |
| AG | średnica fizjologicznego otworu wierzchołkowego (ang. apical gauging) |
| ALARA | (ekspozycja promieniowania) zminimalizowana jak jest to realnie możliwe (ang. As Low As Reasonably Achievable) |
| AP | zapalenie przyzębia okołowierzchołkowego (ang. apical periodontitis) |
| APCs | autologiczne koncentraty płytek krwi (ang. autologous platelet concentrates) |
| APG | autologiczny żel płytkowy (ang. autologous platelet gel) |
| bFGF | czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor) |
| CA | kwasy cytrynowy (ang. citric acid) |
| CBCT | tomografia komputerowa wiązki stożkowej (ang. cone-beam computed tomography) |
| CBCT-ERI | endodontyczny wskaźnik przejaśnienia CBCT (ang. CBCT-endodontic radiolucency index) |
| CBCT-PAI | indeks okołowierzchołkowy CBCT (ang. CBCT-periapical index) |
| CGF | skoncentrowane czynniki wzrostu (ang. concentrated growth factors) |
| CIFC | komórkowy cement własn włóknisty (ang. cellular intrinsic fiber cementum) |
| CMSC | komórkowy cement warstwowy mieszany (ang. cellular mixed stratified cementum) |
| DNA | kwasy deoksyrybonukleinowy. |
| ESE | Europejskie Towarzystwo Endodontyczne (ang. European Society of Endodontology) |
| FOV | pole widzenia (ang. field of view) |
| GUMed | Gdański Uniwersytet Medyczny |

| | |
|----------|---|
| hDPSCs | ludzkie komórki macierzyste miazgi zębowej (ang. Human dental pulp stem cells) |
| IAF | początkowe narzędzie (Initial Apical File) |
| ITK-SNAP | darmowe oprogramowanie na licencji GNU General Public License, opracowane przez National Institutes of Health, National Institute of Biomedical Imaging and BioEngineering, National Library of Medicine USA, Uniwersytet Pensylwanii i Północnej Karoliny i niezależną grupę |
| MAC | ćwiek główny (ang. master cone) |
| MAF | pilnik główny (ang. master file) |
| MDA | aktywacją manualną ćwiekiem gutaperkowym (ang. manual-dynamic activation) |
| Me | mediana |
| miRNA | mikroRNA (ang. microRNA) |
| NaOCl | podchloryn sodu (ang. sodium hypochlorite) |
| NiTi | stop niklowo-tytanowy |
| obr/min | prędkość wirowania - oznacza ilość obrotów na minutę |
| okw | okołowierzchołkowe |
| PD | głębokość kieszonki przyzębnej (ang. pocket depth) |
| PD-EGF | naskórkowy czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. platelet-derived epidermal growth factor) |
| PDGF | czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. platelet-derived growth factor) |
| PDLSCs | komórki macierzyste więzadeł ozębnej (ang. periodontal ligament stem cells) |
| PEP | ból po leczeniu endodontycznym (ang. post-endodontic pain) |
| pH | jednostka miary kwasowości lub zasadowości związków chemicznych |
| PLT | płytki krwi, trombocyty (ang. platelet) |
| PRF | fibryna bogatopłytkowa (ang. platelet rich fibrin) |
| PRP | osocze bogatopłytkowe (ang. platelet rich plasma) |
| PUI | pasywna aktywacja ultradźwiękami (ang. passive ultrasonic activation) |
| RTG | rentgenogram |
| SCAP | komórki macierzyste brodawki wierzchołkowej (ang. stem cells from apical papilla) |
| SD | odchylenie standardowe |

| | |
|---------------|---|
| TGF- β | transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta) |
| TLR | Toll-podobny receptor – transbłonowe białka błony komórkowej komórek rozpoznających antygen |
| UCS | Uniwersyteckie Centrum Stomatologiczne Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego Sp.z.o.o. |
| VAS | wizualna skala analogowa (ang. visual analogue scale) |
| VEGF | czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor) |
| \bar{X} | średnia arytmetyczna |
| μm | mikrometr |

2. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska pt.: *Zastosowanie w leczeniu endodontycznym zaawansowanej fibryny bogatopłytkowej (A-PRF) w aspekcie gojenia tkanek przyzębia okołowierzchołkowego*. powstała w oparciu o monotematyczny cykl trzech artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopismach naukowych, indeksowanych w bazie PubMed.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

| | Tytuł publikacji, autorzy, tytuł czasopisma | Punkty MEiN | Impact Factor |
|------------------------------|--|--------------------|----------------------|
| 1. | <u>Machut Katarzyna</u> , Żółtowska Agata, Pawłowska Elżbieta, Derwich Marcin. Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . 2021; 22(17):9458. Published: 2021-08-31. | 140,000 | 6,208 |
| 2. | Żółtowska Agata, <u>Machut Katarzyna</u> , Pawłowska Elżbieta, Derwich Marcin. Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: A Narrative Review. <i>Pharmaceuticals</i> . 2021; 14(10):1041. Published: 2021-10-13. | 100,000 | 5,215 |
| 3. | <u>Machut Katarzyna</u> , Żółtowska Agata. 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. <i>Journal of Clinical Medicine</i> . 2022; 11(20):6092. Published: 2022-10-16. | 140,000 | 4,964 |
| Podsumowanie punktów: | | 380,000 | 16,387 |

3. Wstęp

Przyzębie okołowierzchołkowe zęba to wspólna nazwa dla tkanek wokół korzenia zęba, stanowiących część jego aparatu zawieszeniowego. Składa się ono z cementu, ozębnej oraz kości wyrostka zębodołowego wraz z okostną¹. Cement korzeniowy to zmineralizowana tkanka łączna pokrywająca powierzchnię zębiny korzeniowej, o budowie chemicznej zbliżonej do tkanki kostnej, jednak nie ulega remodelingowi, a nawarstwieniu wraz z wiekiem. Tkanka ta jest nieunerwiona i nieunaczyniona. Wyróżniamy różne rodzaje cementu: bezkomórkowy cement obcowłóknisty, komórkowy cement warstwowy mieszany, komórkowy cement własnówłóknisty oraz bezkomórkowy cement bezwłóknisty². Bezkomórkowy cement obcowłóknisty (ang. acellular extrinsic fiber cementum, AEFC) pokrywa powierzchnię całkowitej długości korzeni w zębach jednokorzeniowych i od 1/2 do 1/3 przyszyjkowej w zębach wielokorzeniowych. Jego grubość zwiększa się wraz z wiekiem i waha się od 50 do 200 μm . Komórkowy cement warstwowy mieszany (ang. cellular mixed stratified cementum, CMSC) występuje w okolicy międzykorzeniowej oraz w okolicy wierzchołkowej korzenia. Grubość CMSC jest różna i wynosi od około 400 μm w zębach siecznych do 1500 μm w zębach trzonowych. Komórkowy cement własnówłóknisty (ang. cellular intrinsic fiber cementum, CIFIC) zazwyczaj wchodzi w skład CMSC³. Bezkomórkowy cement bezwłóknisty (acellular afibrillar cementum, AAC) to zmineralizowana macierz, która nie zawiera włókien kolagenowych ani cementocytów. AAC najczęściej znajduje się tuż przy połączeniu cementowo-szkliwnym⁴. Funkcją cementu korzeniowego jest mocowanie włókien ozębnej. Ponadto, cement posiada funkcję reperacyjną np. wypełnianie jam porowatych oraz kompensacyjną – nawarstwianie cementu na skutek przeciążenia zgryzowego².

Ozębna to nazwa określająca przestrzeń znajdującą się pomiędzy cementem korzeniowym a okostną kością wyrostka zębodołowego⁵. W jej skład wchodzi więzadła ozębnej – głównie zbudowane z włókien kolagenowych typu I, które mocują ząb w zębodole. Ozębna bogata jest w komórki, które pełnią ważną rolę w procesach naprawczych i regeneracyjnych. Najliczniejszymi komórkami ozębnej są fibroblasty. Oprócz nich w ozębnej występują osteoblasty, cementoblasty, osteoklasty oraz pozostałe po rozwoju komórki nabłonkowe Malasseza⁶. Obecnie uważa się, że ozębna zawiera mezenchymalne komórki macierzyste np. komórki macierzyste więzadeł ozębnej (PDLSCs), które mogą zregenerować przyzębie¹. W skład ozębnej wchodzi również naczynia włosowate, włókna nerwowe oraz włókna oksytalanowe.

Kość wyrostka zębodołowego składa się z trzech elementów anatomicznych: blaszki zbitej z drobnymi otworkami dla naczyń, nerwów blaszki zewnętrznej zbitej oraz znajdującej się pomiędzy blaszkami kości gąbczastej⁷.

Zapalenie przyzębia okołowierzchołkowego (ang. Apical Periodontitis, AP) jest chorobą tkanek przyzębia okołowierzchołkowego i rozwija się jako odpowiedź immunologiczna organizmu na obecność drobnoustrojów oraz wytwarzanych przez nie substancji w systemie kanałowym⁸. W większości przypadków zapalenie przyzębia okołowierzchołkowego jest pośrednim skutkiem choroby próchnicowej, która wywołuje choroby miazgi. Do jednej z głównych przyczyn rozwoju zapalenia tkanek okołowierzchołkowych należy również niepoprawne leczenie endodontyczne^{9,10}. Na niepowodzenie leczenia endodontycznego mają wpływ zarówno nieprawidłowa instrumentacja, niedostateczna irygacja oraz zły jakości wypełnienie systemu kanałowego, jak i niewłaściwa odbudowa korony zęba¹¹. Jakovljevic i wsp.¹⁰ w swoich badaniach stwierdzili wzrost częstości występowania przewlekłego zapalenia tkanek okołowierzchołkowych w populacji osób dorosłych, dotyczyło to zarówno zębów nieleczonych, jak i zębów uprzednio leczonych endodontycznie¹⁰. W badaniach Riccuciego i wsp.⁸ zębów ze zmianami okołowierzchołkowymi leczonych uprzednio endodontycznie lub nie, bakterie znaleziono we wszystkich przypadkach, z wyjątkiem jednej próbki. Wewnątrzkorzeniowy biofilm bakteryjny w odcinku wierzchołkowym zaobserwowano w niemal 80% kanałów korzeniowych, zarówno nieleczonych, jak i leczonych endodontycznie. Ponadto, biofilm zidentyfikowano na ścianach ramifikacji, czyli w kanałach bocznych oraz dodatkowych zlokalizowanych wierzchołkowo i w furkacji oraz tzw. *isthmus*'ów – czyli cieśni pomiędzy kanałami znajdującymi się w jednym korzeniu. Częściej biofilm bakteryjny obserwowano w kanałach korzeniowych zębów z dużymi obszarami przejaśnienia w obrazowaniach radiologicznych. Autorom udało się potwierdzić występowanie biofilmu na powierzchni zewnętrznej korzenia, w części wierzchołkowej tylko w 6% przypadków⁸. Wyniki badań Riccuciego i wsp.⁸ oraz Jakovljevic i wsp.¹⁰ podkreślają konieczność przeprowadzenia większej ilości eksperymentów dotyczących czynników ryzyka rozwoju zapalenia tkanek okołowierzchołkowych w zębach leczonych uprzednio endodontycznie, jak i próbach ich eliminacji, szczególnie ze względu na wzrost dowodów naukowych potwierdzających współzależność rozwoju chorób sercowo-naczyniowych¹², ale i cukrzycy¹³ z zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych. Przewlekłe procesy zapalne zlokalizowane w jamie ustnej stanowią ryzyko rozwoju chorób odogniskowych¹⁴ oraz mają wpływ na przebieg ciąży i ryzyko wczesnego porodu¹⁵.

Celem leczenia endodontycznego jest wyeliminowanie mikroorganizmów w systemie kanałów korzeniowych poprzez chemomechaniczne opracowanie, a następnie szczelne, homogenne wypełnienie kanałów korzeniowych¹⁶.

W obrębie zmiany przewlekle zapalnej znajdują się komórki bakteryjne niezmienione lub rozpuszczone składniki ich błon komórkowych, zwane endotoksynami oraz podwyższony poziom markerów stanu zapalnego, w tym prozapalnych cytokin – IL-1 β , IL-6, TNF- α . Ostre oraz zaostrzone zapalenie przyzębia okołowierzchołkowego może manifestować się bólem, tkliwością i obrzękiem. Resorpcja tkanek okw w przebiegu zapaleń przewlekłych jest widoczna w badaniach radiologicznych jako przejaśnienie. Resorpcja ta utożsamiona jest ze zniszczeniem tkanki, jednak występuje też jako część procesu obronnego, aby ograniczyć zasięg zapalenia. W większości przypadków, wyeliminowanie czynnika bakteryjnego z zakażonego kanału wpływa na naprawę tkanek przyzębia okw, a zatem na powodzenie terapii^{17,18}.

Częstość występowania przewlekłego zapalenia tkanek okw waha się od 16 do 86%¹⁹. W badaniu Tiburicio-Machado i wsp.¹⁹ analizie poddano 114 badań, w których łącznie uczestniczyło 34 668 osób potwierdzono wysoką częstość występowania zmian okołowierzchołkowych¹⁹. W 52% zebranych przypadków zidentyfikowano co najmniej jeden ząb z zapaleniem tkanek okw. Autorzy twierdzą, że wysoki odsetek przypadków występowania zmian okw wynika z braku podstawowej edukacji prozdrowotnej, utrudnionego dostępu do opieki stomatologicznej w krajach rozwijających się, wieku pacjenta, występowania chorób ogólnoustrojowych wśród badanych, oraz zastosowania specjalistycznych metod diagnostycznych¹⁹.

Współcześnie można wyróżnić kilka metod leczenia przewlekłych zapaleń tkanek okołowierzchołkowych: zachowawczą terapię endodontyczną, mikrochirurgię endodontyczną i ekstrakcję zęba. W dostępnym piśmiennictwie zarówno polsko-, jak i anglojęzycznym pojawiają się doniesienia o zastosowaniu leczenia zachowawczego wraz z fizykoterapią, za pomocą m.in lasera biostymulacyjnego, jonoforezy oraz pola magnetycznego o niskiej indukcji (magnetostymulacja). Metody te mają na celu polepszenie skuteczności leczenia podstawowego oraz zintensyfikowanie procesów regeneracji lub reperacji^{20,21}.

Leczenie endodontyczne może być jedno- lub dwuseansowe. Współczesny rozwój endodoncji – możliwość zaplanowania leczenia na podstawie analizy budowy systemu kanałowego w obrazowaniach CBCT, praca z urządzeniami optycznymi (lupy, mikroskop), stosowanie maszynowych narzędzi endodontycznych oraz podkreślenie znaczenia irygacji

wraz z aktywacją płynów płuczających, zwiększyło zakres wskazań do leczenia jednoseansowego.

Do niewątpliwych zalet leczenia jednoseansowego należą: likwidacja mikroprzecieku opatrunku tymczasowego pomiędzy wizytami, lepsza akceptacja leczenia przez pacjenta oraz zmniejszenie kosztów leczenia²². Mechaniczne opracowanie kanału wraz z irygacją 0,5% roztworem podchlorynu sodu powoduje redukcję biofilmu kanałowego w 40-60% leczonych zębów²³. W leczeniu dwuseansowym, na czas między wizytami kanał zostaje czasowo wypełniony, najczęściej preparatem na bazie nietwardniejącego wodorotlenku wapnia.

Wodorotlenek wapnia ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) wykazuje działanie bakteriobójcze oraz odontotropowe (pobudza mineralizację tkanek zmineralizowanych). Wodorotlenek wapnia dysocjuje w środowisku wodnym do jonów wapniowych i hydroksylowych. Jony hydroksylowe są odpowiedzialne za wysoko alkaliczną naturę wodorotlenku wapnia (pH tego związku wynosi około 12,5). Ponadto, są wolnymi rodnikami, które uszkadzają błonę cytoplazmatyczną komórek bakteryjnych oraz niszczą białka m.in. cytokiny prozapalne oraz DNA komórek bakteryjnych²⁴.

W świetle najnowszych doniesień, długotrwałe, wielomiesięczne działanie wodorotlenku wapnia jest negowane. Jednakże w piśmiennictwie brakuje zgodności w ustaleniu odpowiedniego okresu pozostawiania preparatu wodorotlenku wapnia w kanale pomiędzy wizytami^{25,26,27}. Niektórzy autorzy twierdzą, że wystarczające jest tymczasowe wypełnienie kanału preparatem na bazie nietwardniejącego wodorotlenku wapnia na okres nie krótszy niż 2 tygodnie²⁵, a nie dłuższy niż miesiąc²⁶, celem eliminacji mikrobioty. Inni badacze potwierdzają skuteczność leczenia jednotygodniowego²⁷. Czasowe wypełnienie kanału preparatem wodorotlenku wapnia na 1 tydzień eliminuje do 70% bakterii pozostałych po chemomechanicznym opracowaniu kanału²³.

W dostępnym piśmiennictwie potwierdzona jest dobra skuteczność niechirurgicznego leczenia zmian okołowierzchołkowych, a sukces terapeutyczny uzyskuje się od 80 do niemal 90% przypadków^{28, 29, 30}.

W przypadkach, kiedy leczenie endodontyczne zębów ze zmianami okw kończy się niepowodzeniem – występują silne dolegliwości bólowe, brak widocznych oznak gojenia w badaniu klinicznym i radiologicznym (wielkości przejaśnienia w tkankach okołowierzchołkowych nie ulegają zmianie lub powiększają się w ciągu 4 lat po leczeniu endodontycznym) — przeprowadzane jest chirurgiczne leczenie zmian okołowierzchołkowych. Polega ono na zaplanowaniu, a następnie preparacji płata śluzówkowo-okostnowego wraz z osteotomią wyrostka zębodołowego z odsłonięciem

korzenia zęba i zmiany zlokalizowanej okołowierzchołkowo. Celem zabiegu jest radykalne usunięcie zmiany zapalnej oraz związanej z nią wierzchołkowej części korzenia, czyli przeprowadzenie resekcji wierzchołka korzenia. W zębach wielokorzeniowych można przeprowadzić zabieg usunięcia jednego korzenia, pominięciem pozostałych nieuszkodzonych korzeni, czyli hemisekcję^{31,32}. Leczenie chirurgiczne wiąże się z podwyższonym ryzykiem jego niepowodzenia. Nadmierna utrata tkanki kostnej, zwiększone ryzyko krwawienia w trakcie zabiegu, ograniczony dostęp do pola zabiegowego, uszkodzenie sąsiadujących struktur anatomicznych (np. pęczków nerwowych), ryzyko powikłań periodontologicznych w postaci recesji czy powstania ściągającej blizny to tylko niektóre z możliwych powikłań związanych z tym leczeniem³³. Alternatywną metodą dla konwencjonalnej chirurgii są zabiegi mikrochirurgiczne wykonywane z użyciem przyrządów optycznych oraz zastosowanie szablonów chirurgicznych. W przypadku tej metody ilość koniecznej do usunięcia tkanki kostnej jest mniejsza w porównaniu do tradycyjnego zabiegu resekcji. Dzięki dokładnej rewizji pola operacyjnego możliwe jest precyzyjne przeprowadzanie zabiegu, a co za tym idzie zmniejszenie częstości występowania powikłań³³.

³⁴.

Ból po leczeniu endodontycznym (ang. post-endodontic pain, PEP) występuje w 25-40% wszystkich przypadków leczenia endodontycznego³⁵. W ciągu pierwszych 48 godzin po zabiegu ból osiąga największe nasilenie i stopniowo zmniejsza się wraz z upływem czasu i trwa zwykle do 7 dni³⁵. W badaniach Konagala i wsp.³⁵ oraz Levin i wsp.³⁶ połowa pacjentów określiła ten ból jako silny^{35,36}. Ból po zabiegu jest głównym objawem ostrego stanu zapalnego, wywołanego przepchnięciem bakterii, resztek zębiny lub/i miazgi, ale także chemicznym i mechanicznym drażnieniem tkanek okołowierzchołkowych podczas opracowywania kanałów korzeniowych³⁷. Technika opracowywania kanałów, która charakteryzuje się najmniejszym ryzykiem ekstruzji zawartości kanału poza otwór wierzchołkowy to metoda crown-down³⁸. W przeglądzie systematycznym Vishwanathaiah S. i wsp.³⁹, w większości analizowanych badań nie stwierdzili istotnych różnic w występowaniu PEP między jedno- i wielowizytowym leczeniem kanałowym³⁹. W przeglądzie systematycznym, który przeprowadzili Wonga i wsp.⁴⁰ indukcja bólu pooperacyjnego była taka sama w leczeniu endodontycznym jedno- i wieloseansowym. Zarówno leczenie jedno-, jak i dwuwizytowe wykazały podobne wskaźniki gojenia i powodzenia⁴⁰.

Ocena stanu tkanek okołowierzchołkowych jest istotnym elementem diagnostyki, który pozwala na właściwy dobór metody leczenia i ewaluację efektów. Obraz radiologiczny okolicy przyzębia okołowierzchołkowego oceniany jest na zdjęciach zębowych za pomocą

kryteriów znanych jako wskaźnik okołowierzchołkowy (ang. Periapical Index, PAI)⁴¹, zdefiniowanych przez Ørstavik i wsp.⁴¹ (Tabela 1). W piśmiennictwie znane są inne skale stosowane do oceny wyników gojenia zmian okołowierzchołkowych na podstawie zdjęć zębowych po zabiegach mikrochirurgii endodontycznej np. kryteria Ruda i Molvena⁴². Wszystkie te klasyfikacje oparte są na obrazowaniach dwuwymiarowych. Nakładanie się struktur anatomicznych, deformacje geometryczne w zależności od zastosowanej projekcji i szumy tła nierzadko mogą utrudniać interpretację obrazu radiologicznego, a tym samym prowadzić do błędnej diagnozy^{43,44}.

Tabela nr 1. Wskaźnik okołowierzchołkowy (Periapical Index, PAI)

| | INDEKS OKOŁOWIERZCHOŁKOWY (PERIAPICAL INDEX) |
|----------|---|
| 1 | Prawidłowe tkanki okołowierzchołkowe |
| 2 | Niewielkie zmiany w tkankach okołowierzchołkowych bez uszkodzenia kości |
| 3 | Zmiany w strukturze kości z widoczną utratą substancji mineralnej |
| 4 | Ograniczone uszkodzenie struktury kostnej z dobrze zaznaczonymi granicami obszaru przezierności |
| 5 | Duże uszkodzenie kości w okolicy okołowierzchołkowej, z cechami zatarcia granicy pomiędzy obszarem przezierności a zdrową tkanką kostną |

Tomografia komputerowa wiązki stożkowej (ang. Cone Beam Computed Tomography, CBCT) jest stosowana w każdej dziedzinie stomatologii jako ważne narzędzie w diagnostyce, planowaniu i późniejszej ewaluacji leczenia⁴⁵. Ze względu na wyższy koszt i większą ekspozycję na promieniowanie niż w przypadku radiowizjografii, CBCT wciąż nie jest powszechnie stosowana do diagnostyki i oceny wyników leczenia kanałowego⁴². Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Endodontycznego (ang. European Society of Endodontology, ESE) zastosowanie CBCT należy rozważyć po przeprowadzeniu skrupulatnego badania klinicznego, w tym innych badań, takich jak konwencjonalne zdjęcia rentgenowskie z poszanowaniem zasady ALARA (ang. As Low As Reasonably Achievable, czyli tak zminimalizowana ekspozycja promieniowa jak jest to realnie możliwe)⁴⁶. Decyzję o zastosowaniu CBCT należy podejmować indywidualnie, gdy zdjęcia RTG okolicy wierzchołkowej są niewystarczające. W endodoncji, CBCT należy dostosować tak, aby zminimalizować efektywną dawkę promieniowania, stosując wysoką rozdzielczość i małe pole widzenia (FOV). Najbardziej optymalne jest pole obrazowania 5 x 5 cm⁴⁶.

Obrazowanie CBCT jest szczególnie zalecane w diagnostyce urazów, a także w wykrywaniu zmian okołowierzchołkowych i różnicowaniu pomiędzy ziarniniakami a torbielami korzeniowymi. To narzędzie diagnostyczne jest również cenne w rozpoznawaniu złożonych systemów kanałów korzeniowych, możliwych obliteracji/resorpcji, wcześniejszych powikłań/błędów leczenia oraz w planowaniu zabiegów mikrochirurgii endodontycznej⁴⁷.

CBCT jest jedną z bardziej wiarygodnych metod oceny przezierności okołowierzchołkowej, z ponad 90% czułością i swoistością⁴⁸. Liniowe pomiary zmian okołowierzchołkowych w trzech płaszczyznach przestrzennych w obrazowaniu CBCT są dokładniejsze niż pomiary na radiogramach 2D⁴⁹.

Wskaźnikiem do oceny zaawansowania przezierności okołowierzchołkowej jest indeks okołowierzchołkowy CBCT – CBCT-PAI⁵¹. Wskaźnik ten został opracowany przez Estrela C. i wsp.⁵¹ na podstawie pomiarów obszaru przejaśnienia w obrazowaniu CBCT. CBCT-PAI określa największy wymiar zmiany w milimetrach, w jednej wybranej płaszczyźnie oraz ewentualne zniszczenie blaszki korowej wyrostka zębodołowego⁵¹. CBCT-PAI jest podobne do klasycznego PAI, a zatem odnosi się do zmian okołowierzchołkowych nadal w dwóch wymiarach. Zastosowano 6-punktowy system punktacji (0-5) z dwoma dodatkowymi zmiennymi: E – ekspansja zmiany w obrębie blaszki zbitej kości wyrostka i D- zniszczenie blaszki zbitej kości wyrostka⁵¹. W tabeli 2 przedstawiono skalę punktacji CBCT-PAI.

Tabela nr 2. Skala CBCT-PAI.

| | ILOŚCIOWE OZNACZENIE OBSZARÓW PRZEJAŚNIENIA W STRUKTURZE KOSTNEJ WYROSTKA ZĘBODOŁOWEGO |
|----------------|---|
| 0 | Nienaruszone struktury kostne przyzębia okołowierzchołkowego |
| 1 | Średnica przejaśnienia okołowierzchołkowego > 0.5-1 mm |
| 2 | Średnica przejaśnienia okołowierzchołkowego > 1-2 mm |
| 3 | Średnica przejaśnienia okołowierzchołkowego > 2-4 mm |
| 4 | Średnica przejaśnienia okołowierzchołkowego > 4-8 mm |
| 5 | Średnica przejaśnienia okołowierzchołkowego > 8 mm |
| (n) + E | Naruszenie blaszki zbitej kości wyrostka zębodołowego |
| (n) + D | Zniszczenie blaszki zbitej kości wyrostka zębodołowego (dehiscencja). |

Innym wskaźnikiem, który został opracowany przez Torabinejad i wsp. jest CBCT – endodontyczny wskaźnik przejaśnienia (ang. CBCT-endodontic radiolucency index, CBCT-ERI), który mierzy szerokość szpary ozębnej od 0.5 mm do 2.5 mm i większych⁵².

W dostępnych badaniach, CBCT-PAI oraz CBCT-ERI charakteryzują się najwyższym odsetkiem różnicowania między obserwatorami⁴⁹. W badaniach przeprowadzonych przez Cotti i wsp. zaproponowano zamianę pomiarów liniowych na pomiar objętości⁴⁹. W badaniach Boubaris i wsp.⁵⁰ zastosowano półautomatyczną segmentację przejaśnień okołowierzchołkowych w obrazowaniu CBCT w trzech płaszczyznach – strzałkowej, horyzontalnej i czołowej. Metoda ta odznaczyła się wysoką czułością – 98%⁵⁰. Cotti i wsp.⁴⁹ oraz Boubaris i wsp.⁵⁰ uznali metodę wolumetryczną obszarów przejaśnień w CBCT jako obecnie najdokładniejszą technikę pomiaru przejaśnień w przyzębiu okołowierzchołkowym^{49,50}.

Płytki krwi (PLT, trombocyty) to najmniejsze elementy morfotyczne krwi o średnicy ok. 2,5 μm , będące fragmentami cytoplazmy megakariocytów, otoczone błoną komórkową. Są one pozbawione jądra komórkowego. Pozostałe organelle komórkowe są typowe dla komórek eukariotycznych. Trombocyty charakteryzują się: aktywnym metabolizmem, wysoce zorganizowanym cytoszkieletem, obecnością swoistych ziarnistości wewnątrzkomórkowych (ziarnistości alfa oraz gęste) oraz białek adhezyjnych, umieszczonych na powierzchni płytek krwi. PLT nie są zdolne do dalszych podziałów komórkowych z powodu braku jądra komórkowego – są komórkami terminalnie zróżnicowanymi^{53,54}.

Do najbardziej znanych funkcji płytek krwi należy: udział w utrzymaniu hemostazy w przypadku przerwania ciągłości naczynia krwionośnego, poprzez aktywację, adhezję i agregację z uwalnianiem substancji zawartych w ziarnistościach oraz udział w procesie krzepnięcia krwi. Oprócz tej funkcji, trombocyty są również komórkami efektorowymi wrodzonego układu odpornościowego. Posiadają zdolność do bezpośredniego wiązania patogenów lub pośrednio za pomocą białek receptorowych (m.in. TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 itd.), w celu zaprezentowania ich neutrofilom oraz komórkom układu retikuloendotelialnego^{54,55}.

Potencjalne działanie regeneracyjne płytek krwi zostało po raz pierwszy opisane przez Ross R i wsp. w 1974 roku⁵⁶. Płytki krwi wywierają również wpływ na proces angiogenezy poprzez uwalnianie czynników wzrostu z ziarnistości alfa, takich jak: naskórkowy czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. platelet-derived epidermal growth factor – PD-EGF), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. platelet-derived growth factor – PDGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor – VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor – bFGF) czy transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta – TGF- β)⁵⁷.

W wyniku odwirowania krwi obwodowej pacjenta, następuje rozdzielenie jej składników. Zgodnie z zasadą grawitacji – cięższe elementy opadają na dno probówki, natomiast lżejsze unoszą nad nimi. Dolną warstwę stanowią erytrocyty, górną – osocze. Pomiędzy tymi dwiema frakcjami znajduje się warstwa leukocytno-płytkowa. W porównaniu do nieodwirowanej krwi, stężenie płytek krwi jest kilkukrotnie większe. Zagęszczenie płytek krwi powoduje wzrost stężenia PDGF i TGF- β , integryn i innych cząsteczek adhezyjnych^{57,58}.

Autologiczne koncentraty płytek krwi (ang. autologous platelet concentrates, APCs) są często stosowane jako biomateriały w medycynie i stomatologii regeneracyjnej. Mogą być stosowane samodzielnie – jako forma naturalnego „rusztowania” lub razem z innymi materiałami kościodostępczymi⁵⁹. Do pierwszej generacji autologicznych koncentratów płytek (APCs) zalicza się osocze bogatopłytkowe (ang. platelet rich plasma, PRP) oraz osocze bogate w czynniki wzrostu, zwane autologicznym żelem płytkowym (ang. autologous platelet gel, APG). W porównaniu do krwi nieodwirowanej, zawartość płytek krwi we frakcji osocza bogatopłytkowego jest kilkukrotnie większa (od 160 do 300% powyżej wartości wyjściowej). Zagęszczenie płytek krwi powoduje wzrost stężenia PDGF i TGF β , integryn i innych cząsteczek adhezyjnych⁶⁰. Jednak do przygotowania PRP i APG wymagane jest dodatkowe zastosowanie trombiny bydlęcej lub innych czynników krzepnięcia. Ponadto roztwór należy wirować w dwóch oddzielnych etapach, aby zwiększyć stężenie płytek krwi bez włączania leukocytów (czasami wymaga to 1 godziny)⁵⁹. Regeneracja tkanki kostnej po zastosowaniu PRP lub APG jest ograniczona, z powodu krótkiego czasu uwalniania czynników wzrostu⁶¹.

Do drugiej generacji APCs należy fibryna bogatopłytkowa (ang. platelet rich fibrin, PRF). To materiał autogeny pozyskiwany z krwi pacjenta nie poddanej działaniu antykoagulantów, powstały w wyniku jej odwirowania⁵⁷. Pierwszy protokół pozyskiwania PRF został opracowany w 2001 roku przez francuskiego chirurga Josepha Choukrouna, natomiast technologia pozyskiwania, właściwości i zastosowanie szczegółowo zostały opisane przez Dohan i wsp.⁵⁷. PRF zawiera wiele komórek krwi – w tym płytki krwi, limfocyty B i T, monocyty, granulocyty obojętnochłonne i komórki macierzyste – jak również czynniki wzrostu⁶². PRF jest otrzymywany, dzięki wirowaniu przy 2700 obr./min w czasie 12 minut. Cechami, które przeważają na korzyść wykorzystywania PRF w porównaniu do PRP to łatwiejszy protokół przygotowywania, brak konieczności modyfikacji preparatu (poprzez dodanie trombiny bydlęcej czy antykoagulantów)⁶³.

Obecność leukocytów może mieć znaczącą rolę przeciwdrobnoustrojową zarówno w działaniu bezpośrednim⁶⁴, jak i immunomodulacyjnym⁶⁵.

Główną rolą fibryny w gojeniu jest hemostaza, ale pełni ona również rolę pomocniczą w migracji fibroblastów i komórek śródbłonna, które biorą udział w angiogenezie i są odpowiedzialne za wytwarzanie nowych tkanek. Ważną cechą PRF jest przedłużony czas uwalniania czynników wzrostu w miejscu aplikacji przez co najmniej 7 dni⁶⁶.

W celu uzyskania dalszej poprawy regeneracji tkanek, sformułowano nowy protokół wirowania – zmniejszając prędkość z 2700 obr./min do 1500 obr./min, przy jednoczesnym wydłużeniu czasu wirowania do 14 minut. Uzyskany zmodyfikowany PRF nazywano zaawansowaną fibryną bogatopłytkową (ang. advanced platelet rich fibrin, A-PRF)⁶⁷. Ta modyfikacja protokołu wirowania wykazała istotny wzrost uwalniania czynników wzrostu (PDGF, TGF- β 1, EGF, IGF), większą ilość komórek progenitorowych wraz z zachowaniem takiej samej liczby monocytów/makrofagów. Zmniejszając prędkość do 1200 obr./min i skracając czas wirowania krwi do 8 minut, opracowano nową modyfikację PRF, znaną obecnie jako zaawansowana fibryna bogatopłytkowa plus (ang. advanced platelet rich fibrin plus, A-PRF+). Dzięki tej modyfikacji uzyskano wzrost, zwłaszcza liczby neutrofilii i limfocytów⁶⁸. Wszystkie komórki zawieszono w trójwymiarowej siatce fibrynowej, co opóźnia resorpcję błony i umożliwia od 7 do 10 dni trwałe uwalnianie czynników wzrostu. Większa liczba komórek odpornościowych sprzyja różnicowaniu i dojrzewaniu makrofagów. Wzrost liczby makrofagów prowadzi do zwiększenia produkcji czynników wzrostu. Ponadto liczba płytek krwi jest również wyższa w A-PRF+, w związku z powyższym całkowita ilość uwolnionych czynników wzrostu (TGF- β 1, VEGF, PDGF, EGF i IGF1) jest znacznie wyższa w porównaniu do innych APC. A-PRF+ ma zdolność indukowania angiogenezy i działa jak rusztowanie, które może przyspieszyć gojenie i regenerację uszkodzonej tkanki⁶⁹. Dodatkowo, A-PRF+ ma zdolność do zwiększania proliferacji ludzkich fibroblastów dziąseł, które odgrywają istotną rolę w regeneracji przyzębia okołowierzchołkowego⁷⁰. Ponadto, preparaty APC II generacji, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, w tym na jeden z głównych periopatogenów *Porphyromonas gingivalis*⁷¹.

PRF znajduje zastosowanie w stomatologii: w leczeniu endodontycznym zębów stałych z niezakończonym rozwojem wierzchołka – pulpotomii, rewaskularyzacji i apeksyfikacji, w przygotowywaniu przed implantologicznym, w augmentacji kości wyrostka zębodołowego, w chirurgicznym podnoszeniu dna zatoki szczękowej, w sterowanej regeneracji kości oraz w leczeniu periodontologicznym – plastycznej chirurgii periodontologicznej^{63, 64, 72, 73, 74, 75}.

W związku z powyższym można sądzić, że zastosowanie A-PRF+ w okolicy wierzchołkowej, przed ostatecznym wypełnieniem systemu kanałów korzeniowych, może przyspieszyć gojenie tkanek okołowierzchołkowych. W piśmiennictwie brakuje doniesień o zastosowaniu PRF w leczeniu endodontycznym zębów stałych z zakończonym rozwojem wierzchołka w przebiegu przewlekłych zapaleń przyzębia okołowierzchołkowego poprzez aplikację materiału przez kanał.

4. Cele

Celem pracy jest ocena wpływu A-PRF+ na gojenie tkanek przyzębia okołowierzchołkowego, poprzez:

1. Ocenę natężenia dolegliwości bólowych samoistnych, jak i na podstawie skali VAS i zapotrzebowania na środki przeciwbólowe w okresie pozabiegowym (do 7 dni po ostatecznym wypełnieniu kanału).
2. Ocenę kliniczną zęba przed rozpoczęciem leczenia oraz po 7 dniach i 6 miesiącach po wypełnieniu ostatecznym kanału z aplikacją A-PRF+.
3. Ocenę radiologiczną przed rozpoczęciem leczenia, bezpośrednio po wypełnieniu ostatecznym kanału oraz po 6 miesiącach po ostatecznym wypełnieniu kanału.

5. Materiały i metody

5.1. Publikacja 1 i 3

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym o numerze NKBBN/607/2019, z dn. 5 listopada 2019 r.

W publikacji nr 1. opisano leczenie dwóch pacjentów (kobieta, lat 45 oraz mężczyzna, lat 42), u których zdiagnozowano przewlekłe zapalenie tkanek okołowierzchołkowych wraz z martwą miazgą. Opis przypadków przedstawia wyniki badania pilotażowego, w którym ustalono procedurę aplikacji A-PRF+.

W publikacji nr 3 udział wzięło 36 pacjentów, u których przeprowadzono leczenie endodontyczne (n=40 zębów) 18 kobiet oraz 18 mężczyzn w dwóch grupach: badanej i kontrolnej, do każdej grupy zakwalifikowano 20 zębów. Średni wiek w grupie badanej wynosił: 33.7, w grupie kontrolnej: 30.0.

Uczestnikami badania w publikacji nr 1 i 3 byli pacjenci Poradni Stomatologii Zachowawczej Uniwersyteckiego Centrum Stomatologicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego Sp.z.o.o., zdiagnozowani z przewlekłym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych. Badanie pacjentów obejmowało wywiad ogólnolekarski oraz stomatologiczny. Badanie przedmiotowe opierało się na badaniu stomatologicznym – zewnątrzustnym i wewnątrzustnym. Ocenie poddawano stan uzębienia, przyzębia i błony śluzowej jamy ustnej, wady zgryzu oraz stan higieny jamy ustnej. Badanie szczegółowe dotyczyło oceny klinicznej zęba, za pomocą testu na żywotność miazgi chlorkiem etylu oraz test elektryczny (PULP TESTER C-Pulse Yusendent, COXO, China), badanie reakcji na perkusję pionową i poziomą, oraz diagnostykę obrazową – z użyciem radiowizjografii (RVG) oraz komputerowej tomografii wiązki stożkowej (CBCT) (CS 3D Imaging v3.5.18 Software (Carestream Health Inc., Trophy, Croissy-Beaubourg, Francja)).

W publikacji nr 3 przydział uczestników do poszczególnych grup odbywał się z wykorzystaniem randomizacji blokowej, z wyjątkiem braku zgody pacjenta na pobranie krwi żyłnej. W powyższym przypadku pacjent kwalifikowany był do grupy kontrolnej. Uczestnicy musieli spełnić kryteria włączenia i wykluczenia.

Kryteria włączenia:

- Pacjenci ogólnie zdrowi, obojga płci, w wieku od 20 do 50 roku życia.
- Pacjenci, u których przeprowadzono niechirurgiczne leczenie przewlekłego zapalenia tkanek okołowierzchołkowych oraz przeprowadzono kontrolę kliniczną po 7 dniach oraz kontrolę kliniczną i radiologiczną po 6 miesiącach.
- Odpowiednia ilość zmineralizowanych tkanek zęba wymagana do końcowej odbudowy korony zęba.
- Pacjenci z nienaruszonym wypełnieniem tymczasowym oraz odbudową korony zęba podczas wizyty kontrolnej.

Kryteria wykluczenia:

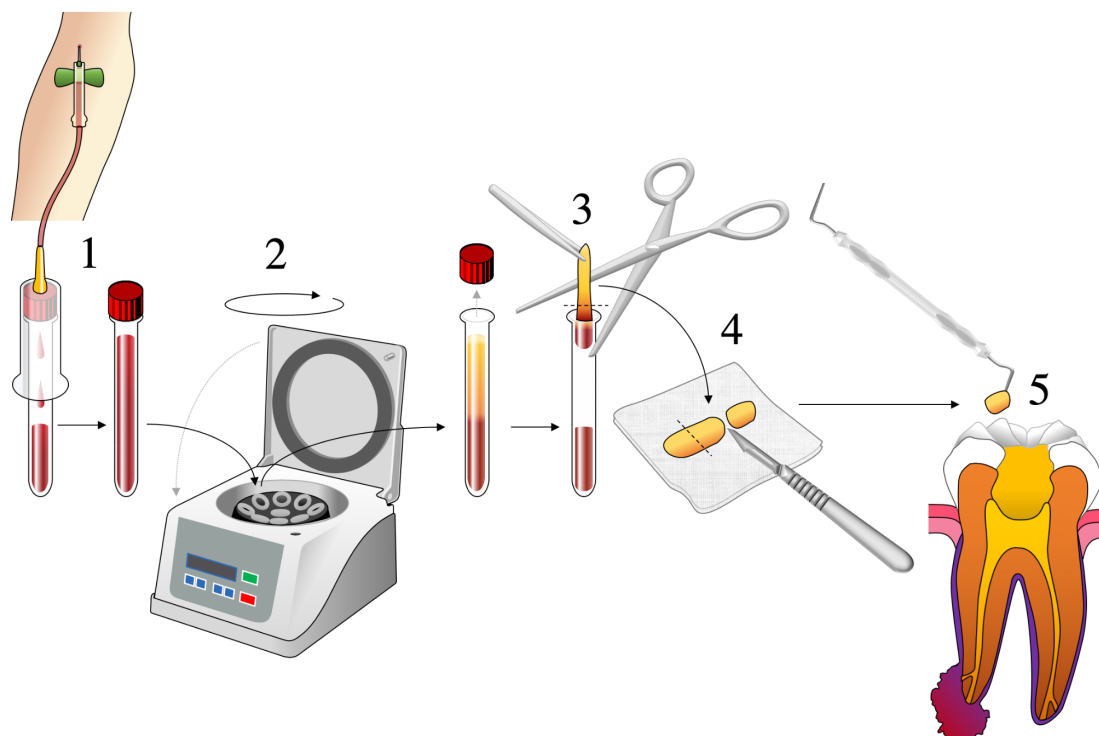
- Zęby ze złamaniem lub perforacją korzenia.
- Zęby wcześniej leczone endodontycznie.

Leczenia endodontyczne zostały wykonane w izolowanym polu zabiegowym – w koferdamie oraz w znieczuleniu nasiękowym. W każdym przypadku po uzyskaniu dostępu do jamy zęba oraz usunięciu zawartości kanału, została ustalona długość robocza na podstawie pomiaru endometru (Raypex 5, VDW, Monachium, Niemcy) potwierdzona następnie radiologicznie – zdjęciem zębowym z narzędziem początkowym. W leczeniu endodontycznym kanały zostały opracowane zmodyfikowaną metodą koronowo-wierzchołkową (ang. crown-down) z użyciem narzędzi rotacyjnych niklowo-tytanowych o rozszerzalności .04 K3 (Kerr, Glendora, CA, USA). Protokół irygacji zastosowany w badaniu: pomiędzy poszczególnymi instrumentami kanał był płukany 5,25% NaOCl (ok. 2 ml) z aktywacją ultradźwiękową (ang. passive ultrasonic activation, PUI) lub aktywacją manualną ćwiekiem gutaperkowym (ang. manual-dynamic activation, MDA) z następową rekapitulacją początkowym narzędziem (ang. initial apical file, IAF). Finalnie kanał był płukany 5,25% NaOCl (10ml), 40% CA (5 ml), 5,25% NaOCl (2ml) oraz wodą destylowaną 2 ml.

W publikacji nr 1 oraz w grupie badanej w artykule nr 3, po osuszeniu kanału, do szklanej probówki została pobrana krew pacjenta z żyły środkowej łokcia. Następnie, materiał został odwirowany w wirówce Neuation iFuge D06 Premium Edition (Neuation Technologies Pvt., Gandhinagar, Gujarat, Indie) przy użyciu parametrów: 1200 obrotów/min przez 8 min. Uzyskany materiał A-PRF+ został odsączony przy użyciu sterylnych gazików, następnie podzielony sterylnym skalpelem

na mniejsze fragmenty. Tak przygotowany A-PRF+ został zaaplikowany poniżej fizjologicznego otworu wierzchołkowego z użyciem upychaczy ręcznych Machtou – początkowo rozmiar 3/4 (szary), a później przy aplikacji końcowej rozmiar 1/2 NiTi (czerwony). Rycina nr 1 przedstawia schemat otrzymywania A-PRF+ i jego aplikacji przez kanał w okolicę okołowierzchołkową.

Rycina nr 1. Schemat metody aplikacji A-PRF+.



Opis Ryciny nr 1:

1. Pobranie krwi żyłnej z żyły środkowej łokcia.
2. Umieszczenie probówki w wirówce i odwirowanie krwi zgodnie z protokołem wirowania (1200 obrotów/min przez 8 min.)
3. Wyzolowanie A-PRF+ z probówki.
4. Odsączenie A-PRF+ przy użyciu sterylnej gazy i podział A-PRF+ na mniejsze fragmenty skalpelem.
5. Aplikacja fragmentu A-PRF+ przez kanał poza otwór wierzchołkowy fizjologiczny.

Po etapie aplikacji A-PRF+, kanał został wypełniony metodą termoplastyczną – ciągłej fali (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmbH, Monachium, Niemcy). Po wypełnieniu kanału, jego ujście zostało zabezpieczone materiałem kompozytowym oraz wykonano odbudowę kompozytową zęba.

W grupie kontrolnej, podczas pierwszej wizyty, po chemomechanicznym opracowaniu oraz po osuszeniu kanału został on czasowo wypełniony nietwardniejącym wodorotlenkiem wapnia – Biopulp, a ubytek w koronie został

zabezpieczony wypełnieniem tymczasowym. Po okresie 2 tygodni, kanał po przeprowadzeniu ostatecznej irygacji: 5,25% NaOCl (10ml), 40% CA (2 ml), 5,25% NaOCl (2ml) oraz wodą destylowaną 2 ml, został ostatecznie wypełniony metodą termoplastyczną – ciągłej fali (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmbH, Monachium, Niemcy). Po wypełnieniu kanału, jego ujście zostało zabezpieczone materiałem kompozytowym oraz wykonano odbudowę kompozytową zęba.

W publikacji nr 1 wizyty kontrolne kliniczne były przeprowadzane po 1 tygodniu, 3 miesiącach oraz około 6 miesiącach. Kontrola radiologiczna – wykonanie CBCT wraz z pomiarami liniowymi w trzech wymiarach została przeprowadzona po okresie 6 miesięcy w przypadku pacjentki nr 1 oraz po 5 miesiącach u pacjenta nr 2.

W publikacji nr 3, pacjenci zgłaszali się na wizytę kontrolną 7 dni po leczeniu endodontycznym, na której zostali poproszeni o wskazanie odczuwanego bólu po leczeniu na poziomej wizualnej skali analogowej (ang. visual analogue scale, VAS). Wartości przypisane na skali VAS mieściły się w przedziale od 0 do 10. Opis natężenia bólu przedstawiany pacjentowi przez badającego przedstawiał się następująco: 0: brak bólu; 1–3: łagodny ból; 4–6: umiarkowany ból; 7–10: silny ból. Pacjenci zaznaczali poziom bólu kooperacyjnego w obecności lekarza, aby upewnić się, że rozumieją instrukcje.

Oceny gojenia oparto na analizie skanów CBCT oraz kryteriach CBCT-PAI, które były wykonywane przez dwóch badaczy (doktorantkę lek. dent. Katarzynę Machut oraz promotora dr hab. n. med Agatę Żółtowską), którzy omówili rozbieżności w swoich ocenach i w każdym przypadku osiągnęli porozumienie. Kryteria oceny gojenia metodą CBCT-PAI przedstawione są w tabeli nr 3.

Tabela nr 3. Kryteria oceny gojenia metodą CBCT-PAI

| | | CBCT-PAI przed leczeniem | CBCT-PAI po 6 miesiącach |
|---------------------------|--------------------|--|--|
| Korzystny wynik | zmiana wygojona | 3, 4, 5 (+E/D) | 0, 1, 2 |
| | w trakcie gojenia | 3, 4, 5 (+E/D) | zmiana uległa zmniejszeniu, ale nie wynosi 0, 1, 2 |
| Niekorzystny wynik | brak oznak gojenia | CBCT-PAI przed leczeniem pozostaje taka sama podczas wizyty kontrolnej lub widoczne jest pogorszenie stanu tkanek okw. | |

Inna klasyfikacja radiologicznej oceny gojenia zmian okołowierzchołkowych po operacjach mikrochirurgicznych w obrazowaniach 3D, stosowana w dostępnym piśmiennictwie, to PENN 3D. Ze względu na brak takiej klasyfikacji gojenia zmian okołowierzchołkowych po niechirurgicznym leczeniu endodontycznym, w niniejszym badaniu kryteria te zmodyfikowano, uwzględniając zmiany objętości w przebiegu badania. Powyższa klasyfikacja została przedstawiona w tabeli nr 4.

Tabela nr 4. Klasyfikacja gojenia zmian okołowierzchołkowych na podstawie CBCT uwzględniająca zmiany objętości.

| | Gojenie | Opis |
|----------|----------------------|--|
| 1 | Całkowite | <ul style="list-style-type: none"> ● Mały ubytek kości wokół wierzchołka korzenia – powiększenie szpary ozębnej do 1 mm. ● Całkowita odbudowa kości. Wokół wierzchołka korzenia widoczne tkanki zmineralizowane. ● Objętość zmiany zmniejszona o 90 – 100%. |
| 2 | Częściowe | <ul style="list-style-type: none"> ● Obszar przejaśnienia pozostaje zlokalizowany wokół wierzchołka i jest połączony ze szparą ozębnej. ● Kość wyrostka zębodołowego nie jest całkowicie odtworzona. ● Objętość zmiany zmniejszona o 70-89%. |
| 3 | Ograniczone | <ul style="list-style-type: none"> ● Obszar przejaśnienia uległ zmniejszeniu. Objętość zmiany zmniejszona od 50% do 69%. |
| 4 | Niesatysfakcjonujące | <ul style="list-style-type: none"> ● Objętość obszaru przepuszczalności promieni rentgenowskich jest powiększona lub niezmieniona lub zmniejszenie objętości jest poniżej 50%. |

Do oceny gojenia zastosowano pomiary objętości przejaśnień na obrazach CBCT przed leczeniem i po 6 miesiącach, po ostatecznym wypełnieniu kanału. Obrazy CBCT z programu CS 3D Imaging v3.5.18 Software (Carestream Health Inc., Trophy, Croissy-Beaubourg, Francji) zostały zapisane jako pliki DICOM w najwyższej rozdzielczości. Objętości zmian chorobowych obliczono za pomocą aplikacji ITK-SNAP (darmowe oprogramowanie na licencji GNU General Public License, opracowanego przez National Institutes of Health, National Institute of Biomedical Imaging and BioEngineering, National Library of Medicine USA, Uniwersytet Pensylwanii i Północnej Karoliny i niezależną grupę programistów). Obrazy CBCT zostały zaimportowane do programu ITK-SNAP. Wykonano ręczne określenie obszarów przejaśnień wokół wierzchołka korzenia/wierzchołków korzeni

w płaszczyźnie horyzontalnej. Następnie, wykonano automatyczną segmentację zmiany w trzech płaszczyznach. Po sprawdzeniu poprawności zaznaczenia obszaru zmiany w trzech płaszczyznach, czyli potwierdzeniu odpowiedniej identyfikacji granicy pomiędzy sąsiednimi strukturami, wykonano automatyczną kalkulację objętości w mm³.

W celu porównania oceny gojenia i dolegliwości bólowych po leczeniu endodontycznym w grupie badanej i kontrolnej, przeprowadzono testy nieparametryczne U Manna-Whitneya i Kołmogorowa-Smirnowa oraz jednokierunkowe testy parametryczne ANOVA. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu SPSS Statistics v.28.0.1.1(14) (IBM, Armonk, NY, USA) z ustalonym poziomem istotności $p < 0,05$.

5.2. Publikacja 2

Pytanie badawcze przeglądu piśmiennictwa brzmiało: Jaka jest skuteczność kliniczna zastosowania w okolicy okołowierzchołkowej autologicznego preparatu bogatopłytkowego w czynniki wzrostu jako uzupełnienie niechirurgicznego leczenia endodontycznego zębów stałych z zakończonym rozwojem wierzchołka, u których rozpoznano zmiany okołowierzchołkowe?

Ustalono poniższe kryteria włączenia do przeglądu piśmiennictwa:

- randomizowane kontrolowane badania kliniczne;
- randomizowane badania kliniczne;
- opisy przypadków;
- badania kliniczno-kontrolne;
- badania populacyjne: dorośli pacjenci (wiek: 18 lat lub więcej); zęby stałe z zakończonym rozwojem wierzchołków korzeni, ze zdiagnozowanymi zmianami okołowierzchołkowymi);
- metody leczenia: niechirurgiczne leczenie endodontyczne z zastosowaniem PRGF.

Kryteria wykluczenia:

- przeglądy systematyczne i metaanalizy;
- uwagi;

- badania na zwierzętach;
- badania populacyjne: dzieci z zębami mlecznymi, dzieci i młodzież z zębami niedojrzałymi (zęby z otwartymi wierzchołkami), zęby bez zmian okołowierzchołkowych.;
- metody leczenia: zabiegi endodontyczne bez zastosowania PRGF, chirurgia endodontyczna.;
- artykuły napisane w językach innych niż angielski.

Do prawidłowego wyszukiwania odpowiednich pozycji piśmiennictwa wykorzystano strategię **PICO**:

Population – Populacja: badania przeprowadzone wśród populacji nastoletnich oraz dorosłych pacjentów, tylko zęby dojrzałe z zamkniętymi wierzchołkami ze zdiagnozowaną zmianą okołowierzchołkową.

Intervention – Interwencja: leczenie endodontyczne z dodatkową aplikacją PRGF lub leczenie endodontyczne z chirurgią endodontyczną z dodatkową bezpośrednią aplikacją PRGF.

Comparison – Porównanie: leczenie endodontyczne bez dodatkowej aplikacji PRGF; leczenie endodontyczne z chirurgią endodontyczną bez dodatkowej aplikacji PRGF; placebo.

Outcomes – Efekt: wygojenie zmiany okołowierzchołkowej i zmniejszenie dolegliwości bólowych (w przypadku objawowego zapalenia okołowierzchołkowego).

Baza danych PubMed została przeanalizowana pod kątem następujących słów kluczowych: ((PRP) OR (PRF) OR (PRGF) OR (CGF)) AND (endodoncja) AND ((leczenie) OR (terapia)). Po przeanalizowaniu 155 wyników, do przeglądu włączono 14 pozycji piśmiennictwa (randomizowane kontrolowane badanie kliniczne i 13 opisów przypadków).

6. Omówienie publikacji

Pracę doktorską zaplanowano jako cykl trzech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych należących do kwartyłu: Q1 oraz Q2 – jednej pogładowej i dwóch oryginalnych.

6.1. Publikacja 1

Machut Katarzyna, Żółtowska Agata, Pawłowska Elżbieta, Derwich Marcin. **Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(17):9458. Published: 2021-08-31.

DOI:10.3390/ijms22179458

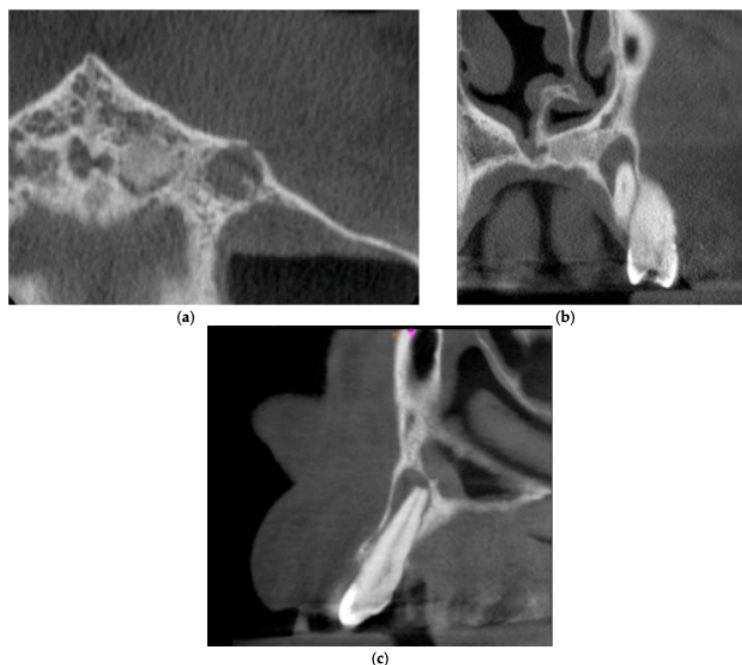
W publikacji przedstawiono opis leczenia endodontycznego oraz jego efekt po okresie 5 oraz 6 miesięcy dwóch przypadków stałych zębów dojrzałych u pacjentów ogólnie zdrowych, zdiagnozowanych z przewlekłym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych, u których zastosowano leczenie jednowizytowe z aplikacją A-PRF+ poza otwór fizjologiczny.

Pierwszy przypadek: kobieta lat 45, zgłosiła się do Poradni Stomatologii Zachowawczej Uniwersyteckiego Centrum Stomatologicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego Sp.z.o.o z powodu silnych samoistnych dolegliwości bólowych zęba 23. Przeprowadzono badanie zewnątrz- i wewnątrzustne. W badaniu zewnątrzustnym nie stwierdzono nieprawidłowości. W badaniu wewnątrzustnym: w rzucie wierzchołka stwierdzono ograniczony obrzęk dziąsła wolnego wraz z zaczerwienieniem, które było bolesne w badaniu palpacyjnym. Ząb 23 wykazywał wzmożoną ruchomość - 3 stopień. Przy sondowaniu kieszonek przyzębnych wykazano wysięk ropno-krwisty, a głębokość kieszonki wynosiła maksymalnie 9 mm (mezjalnie). W badaniu żywotności miazgi testem elektrycznym z wykorzystaniem prądu zmiennego (Pulp Tester) uzyskano pomiar > 80 , wskazujący na martwicę miazgi. W badaniu perkusji pionowej i poziomej – reakcja była dodatnia.

Wykonano CBCT – stwierdzono przejaśnienie wokół korzenia d. 23 o wymiarach $9.0 \times 7.2 \times 9.9$ mm (Rycina nr 2).

Diagnoza: przewlekłe zapalenie tkanek przyzębia okołowierzchołkowego zaostrome (*periodontitis chronica periapicalis exacerbata*).

Rycina nr 2. Obrazowanie CBCT przedstawiające zmianę okołowierzchołkową wokół korzenia zęba 23 (data badania CBCT: 22.05.2020 r.):
a) przekrój osiowy; (b) przekrój koronalny; (c) przekrój strzałkowy.



Po uzyskaniu zgody ustnej i pisemnej na leczenie endodontyczne, wykonano trepanację komory wraz z udroźnieniem kanału na długość roboczą 27 mm. Kanał został opracowany zmodyfikowaną metodą crown-down. Średnica fizjologicznego otworu wierzchołkowego (ang. apical gauging, AG) wynosiła 0,30 mm – została zmierzona narzędziem ręcznym .02 ISO30. Kanał został chemomechanicznie poszerzony narzędziami rotacyjnymi K3 – MAF 30.04. Przeprowadzono irygację zgodnie z przyjętym protokołem. Kanał został osuszony – ze względu na brak wysięku zdecydowano się na końcową obturację kanału.

Pobrano krew, która została odwirowana przy prędkości 1200 obr/min przez 8 minut. Przed ostatecznym wypełnieniem kanału został zaaplikowany A-PRF+ poza otwór wierzchołkowy. Kanał został wypełniony metodą ciągłej fali – MAC ISO 30.04 (kalibracja) z dodatkiem uszczelnacza AH plus.

Pierwsza wizyta kontrolna odbyła się 7 dni po zakończeniu leczenia. Pacjentka podała, że ból po zabiegu utrzymywał się przez 24 godziny. Nie było objawów ostrego stanu zapalnego w badaniu wewnątrzustnym. Dziąsło było gładkie, różowe i wilgotne, bez bólu przy badaniu palpacyjnym oraz bez wykwitów patologicznych. Ruchomość

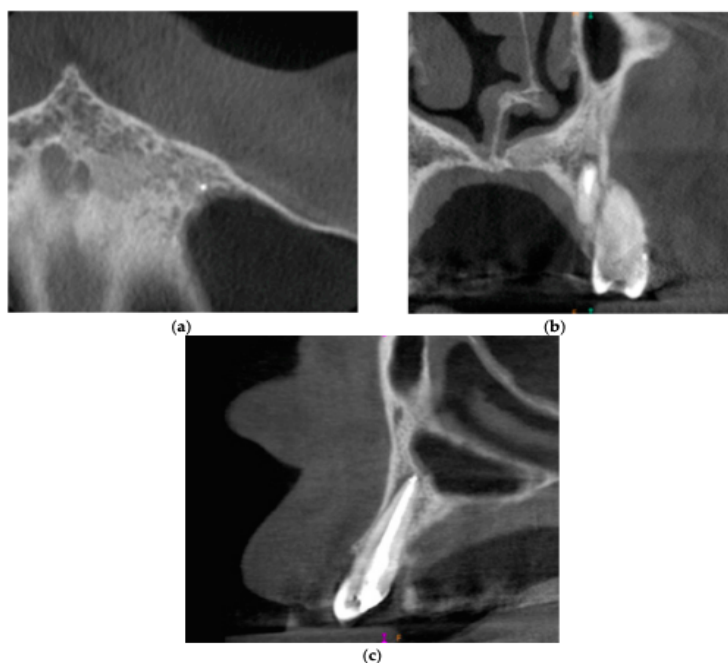
zęba została ograniczona do stopnia 2. PD maks. = 9 mm. Reakcje w badaniu pionowej i poziomej perkusji były nadal dodatnie.

Po 3 miesiącach od zakończenia leczenia przeprowadzono drugie badanie kontrolne. Pacjentka zgłaszała, że w tym okresie nie występowały dolegliwości bólowe. Podczas badania wewnątrzustnego nie stwierdzono cech stanu zapalnego. Dziąsło było gładkie, różowe i wilgotne, bez bólu przy badaniu palpacyjnym. Ruchomość zęba była fizjologiczna. PD maks. = 7 mm. Reakcja na perkusję pionową był dodatnia, ale reakcja na perkusję poziomą była ujemna.

Trzecia i ostatnia wizyta kontrolna odbyła się 6 miesięcy po zakończeniu leczenia kanałowego. Badanie wewnątrzustne wykazało postęp gojenia. Dziąsło było gładkie, różowe i wilgotne, bez bólu przy badaniu palpacyjnym, bez wykwitów patologicznych. Nie stwierdzono patologicznej ruchomości zęba. Reakcja zęba 23 na pionową i poziomą perkusję była ujemna. PD maks. = 4 mm. W obrazowaniu CBCT widoczne było zmniejszenie zakresu przejaśnienia okołowierzchołkowego, a wymiary w trzech płaszczyznach wynosiły odpowiednio: $2,6 \times 1,0 \times 0,6$ mm (Rycina nr 3).

Rycina nr 3. Obrazowanie CBCT przedstawiające proces gojenia zmiany okołowierzchołkowej wokół korzenia zęba 23 (data badania CBCT: 8 grudnia 2020 r.):

a) przekrój osiowy; (b) przekrój koronalny; (c) przekrój strzałkowy.



Drugi przypadek: mężczyzna lat 43, zgłosił się do Poradni Stomatologii Zachowawczej UCS GUMed Sp.z.o.o celem sanacji jamy ustnej. Przeprowadzono badanie zewnątrz- i wewnątrzustne. W badaniu zewnątrzustnym nie stwierdzono

nieprawidłowości. W badaniu wewnątrzustnym: nie stwierdzono nieprawidłowości śluzówkowo-dziąsłowych. Ząb 23 - widoczny ubytek próchnicowy na powierzchni dystalno-podniebiennej. Ząb wykazywał wzmożoną ruchomość 2. stopnia. Przy sondowaniu kieszonek przyzębnych nie stwierdzono wysięku, a ich głębokość wynosiła maksymalnie 3 mm. W badaniu żywotności miazgi testem elektrycznym z wykorzystaniem prądu zmiennego (Pulp Tester) uzyskano pomiar > 80 , wskazujący na martwicę miazgi. W badaniu perkusji pionowej reakcja była dodatnia, a dla poziomej ujemna.

Wykonano CBCT - stwierdzono przejaśnienie wokół korzenia d.23 o wymiarach $12.7 \times 8.7 \times 6.4$ mm (Rycina nr 4).

Diagnoza: przewlekłe zapalenie tkanek przyzębia okołowierzchołkowego ziarninowe (*periodontitis chronica periapicalis granulosa*)

Rycina nr 4. Obrazowanie CBCT przedstawiające zmianę okołowierzchołkową wokół korzenia zęba 23 (data badania CBCT: 19.01.2021 r.):
a) przekrój osiowy; (b) przekrój koronalny; (c) przekrój strzałkowy.



Po uzyskaniu zgody ustnej i pisemnej na leczenie endodontyczne, przeprowadzono opracowanie ubytku próchnicowego wraz z odbudową utraconych tkanek zmineralizowanych materiałem kompozytowym (Charisma Classic, Heraeus Kulzer, Niemcy). Następnie, wykonano trepanację komory miazgi wraz z usunięciem zawartości kanału. Następnie udrożniono kanał, wyznaczając jednocześnie długość

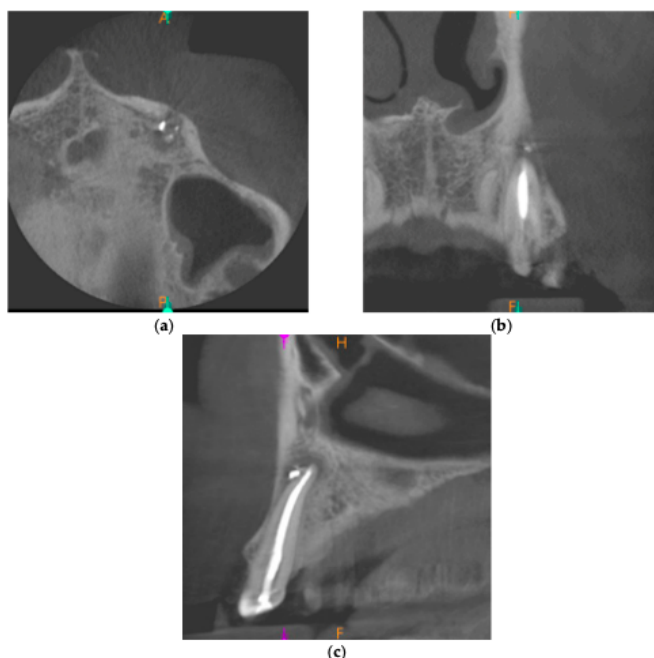
roboczą – 29 mm. AG został zmierzony narzędziem ręcznym .02 ISO 30 oraz 35, czyli fizjologiczny otwór wierzchołkowy miał średnicę pomiędzy 0.30 a 0.35 mm. Kanał został chemomechanicznie poszerzony – MAF 35.04 z wykorzystaniem narzędzi maszynowych K3 oraz płukano kanał w trakcie instrumentacji 5,25% NaOCl. Końcowa irygacja została przeprowadzona zgodnie z przyjętym protokołem. Kanał został osuszony – ze względu na brak wysięku zdecydowano się na końcową obturację kanału. Pobrano krew, która została odwirowana przy prędkości 1200 obr/min przez 8 minut. Przed ostatecznym wypełnieniem kanału został zaaplikowany A-PRF+ poza otwór wierzchołkowy. Kanał został wypełniony metodą ciągłej fali – MAC ISO 35.04 (kalibracja) z dodatkiem uszczelnacza AH plus.

Pierwsza wizyta kontrolna odbyła się 7 dni po zakończeniu leczenia. Pacjent nie podawał dolegliwości bólowych po leczeniu endodontycznym. Nie było objawów ostrego stanu zapalnego w badaniu wewnątrzustnym. Ruchomość zęba mieściła się w granicach fizjologicznych. Reakcja na perkusję pionową była dodatnia, a na poziomą ujemna.

Wizyta kontrolna po 3 miesiącach po zabiegu: pacjent nie zaobserwował żadnych dolegliwości bólowych. W badaniu wewnątrzustnym dziąsło było gładkie, różowe, wilgotne i bezbolesne, a ruchomość zęba mieściła się w granicach fizjologicznych. Reakcja na perkusję pionową i poziomą była ujemna.

Ze względu na wyjazd Pacjenta, wizyta kontrolna została przeprowadzona po 5 miesiącach od zakończenia leczenia, ząb pozostawał bezbolesny. Reakcja na perkusję pionową i poziomą była ujemna, nie stwierdzono ruchomości patologicznej. W obrazowaniu CBCT widoczny był niewielki obszar przezierności wokół wierzchołka korzenia d. 23, a wymiary zmiany uległy zmniejszeniu i wynosiły $4,6 \times 4,6 \times 2,1$ mm (Rycina nr 5).

Rycina nr 5. Obrazowanie CBCT przedstawiające proces gojenia zmiany okołowierzchołkowej wokół korzenia zęba 23 (data badania CBCT: 29 czerwca 2021 r.):
a) przekrój osiowy; (b) przekrój koronalny; (c) przekrój strzałkowy.



Wniosek: Leczenie endodontyczne w połączeniu z dodatkową aplikacją A-PRF+ (przez otwór wierzchołkowy do okolicy okołowierzchołkowej), wykonane w zębach stałych, dojrzałych ze stwierdzonymi zmianami okołowierzchołkowymi, doprowadziło do znacznego zmniejszenia wielkości zmian okołowierzchołkowych w okresie 5 i 6 miesięcy.

6.2. Publikacja 2

Żółtowska Agata, Machut Katarzyna, Pawłowska Elżbieta, Derwich Marcin.
Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(10):1041.
Published: 2021-10-13.

DOI: 10.3390/ph14101041

W pracy podjęto próbę oceny skuteczności fibryny bogatopłytkowej (PRF) w leczeniu endodontycznych zmian okołowierzchołkowych u dorosłych pacjentów na podstawie piśmiennictwa. Różne rodzaje autologicznych koncentratów płytek krwi są w stanie stymulować procesy proliferacji i różnicowania mezenchymalnych komórek

macierzystych. Fibryna bogatopłytkowa ma udowodnione uwalnianie czynników wzrostu w miejscu podania przez co najmniej 7 dni. Ponadto, czynniki wzrostu uwalniane z PRF przyspieszają regenerację tkanek poprzez stymulację aktywności osteoblastów oraz zwiększenie migracji fibroblastów.

W celu podkreślenia wyższości PRF nad pozostałymi autologicznymi koncentratami płytek oraz z polecenia zmiany nazewnictwa przez recenzentów i redakcję, na potrzeby przeglądu piśmiennictwa, w artykule synonimicznie używane jest osocze bogate w czynniki wzrostu (PRGF). Niemniej jednak, nazwa ta stosowana w wyżej wymienionym przeglądzie piśmiennictwa nie dotyczy odmiany osocza bogatopłytkowego.

W pracy wyeksponowano molekularne aspekty etiopatogenezy zmian okołowierzchołkowych, poprzez opis uwalnianych cytokin pro- i przeciwzapalnych. W artykule zwrócono uwagę na udział endogennych, krótkich, niekodujących nukleotydów microRNA (miRNA), które mogą pełnić znaczącą rolę w powstawaniu zmian okołowierzchołkowych. W piśmiennictwie potwierdzono udział miRNA w osteoklastogenezie. Ponadto, miRNA reguluje procesy zapalenia oraz stresu oksydacyjnego, negatywnie wpływając na gojenie tkanki kostnej.

W dalszej części wstępu, opisano metody leczenia zmian okołowierzchołkowych: niechirurgiczne jedno- oraz dwuwizytowe leczenie endodontyczne oraz mikrochirurgię endodontyczną.

Ponadto, w artykule podsumowano najważniejsze informacje dotyczące autologicznych koncentratów płytkowych oraz ich potencjalnych zdolności regeneracyjnych, w tym stymulację mezenchymalnych komórek macierzystych, takich jak hDPSC czy SCAP.

Wyniki leczenia endodontycznego z dodatkową aplikacją PRF w leczeniu zębów stałych z zamkniętymi wierzchołkami, u których zdiagnozowano zmiany okołowierzchołkowe, zostały po raz pierwszy przedstawione w opisie przypadków, który wchodzi w skład niniejszej rozprawy doktorskiej – artykuł nr 1: Machut Katarzyna, Żółtowska Agata, Pawłowska Elżbieta, Derwich Marcin. Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(17):9458.

W pozostałych artykułach, które zostały przeanalizowane w trakcie przygotowywania przeglądu piśmiennictwa, stałe, dojrzałe zęby z zamkniętymi wierzchołkami były w większości leczone różnymi rodzajami PRF stosowanymi jako

preparaty kośćcozastępcze (samodzielnie lub w połączeniu z substytutami kości) i/lub membranami służącymi do wypełniania ubytków kostnych w chirurgii endodontycznej.

W randomizowanym badaniu klinicznym Soto-Peñaloza i wsp.⁷⁶ oceniano efekty kliniczne zastosowania membran A-PRF+ w chirurgii endodontycznej⁷⁶. Jest to jedyne randomizowane badanie kliniczne, które analizuje efekty zastosowania PRF w leczeniu zębów stałych z zamkniętymi wierzchołkami. Autorzy nie zaobserwowali istotnych różnic między grupami w zakresie bólu pooperacyjnego⁷⁶.

We wszystkich analizowanych opisach przypadków stwierdzono zadowalające gojenie kości po umieszczeniu jedynie koncentratu płytkowego lub zmieszanego z materiałami kośćcozastępczymi. W badaniu Parikh i wsp.⁷⁷, opisano jednostronne zastosowanie osocza bogatopłytkowego w obustronnej zmianie okołowierzchołkowej u tego samego pacjenta, zlokalizowanej przy zębach 11 i 21⁷⁷. Okolica okołowierzchołkowa zęba 21, w którą zaaplikowano PRP, wykazywała lepsze gojenie niż okolica zęba 11. Zostało to potwierdzone pomiarem gęstości tkanki kostnej w jednostkach Hounsfielda w tomografii komputerowej (CT). Autorzy, postawili hipotezę, że PRP może promować regenerację tkanek i naprawę kości wyrostka zębodołowego⁷⁷.

Wniosek: Ocena skuteczności zastosowania PRF w leczeniu endodontycznych zmian okołowierzchołkowych w zębach stałych, dojrzałych z zamkniętymi wierzchołkami nie była możliwa, ze względu na brak dobrze zaprojektowanych badań naukowych. W związku z powyższym, ważnym wnioskiem przeprowadzonego przeglądu piśmiennictwa była konieczność prowadzenia dalszych badań w celu przeanalizowania wpływu PRF na procesy gojenia w okolicy okołowierzchołkowej.

6.3. Publikacja 3

Machut Katarzyna, Żółtowska Agata. 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. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11(20):6092.

DOI: 10.3390/jcm11206092. Published: 2022-10-16.

W pracy przedstawiono wyniki gojenia zmian okołowierzchołkowych w dwóch grupach: w grupie badanej, w której przeprowadzono jednowizytowe leczenie kanałowe z zastosowaniem A-PRF+ oraz w grupie kontrolnej, gdzie u pacjentów przeprowadzono leczenie dwuwizytowe z czasowym wypełnieniem kanału preparatem wodorotlenku wapnia pomiędzy wizytami. Okres obserwacji w obu grupach wynosił 6 miesięcy.

Porównania dokonano na podstawie pomiarów objętości zmian okołowierzchołkowych [w mm³] oraz wartości wskaźnika CBCT-PAI przed zabiegiem oraz po upływie 6 miesięcy po leczeniu. Dodatkowo, w badaniu oceniano częstość występowania bólu pozabiegowego wraz z koniecznością stosowania leczenia przeciwbólowego.

Analizie poddano 40 zębów leczonych endodontycznie u 36 pacjentów, w tak samo licznych grupach: badanej i kontrolnej (Tabela nr 5). Zarówno przedoperacyjne, jak i pooperacyjne objętości zmian okołowierzchołkowych obliczono przy użyciu oprogramowania ITK-SNAP. Dokonano manualnej segmentacji każdej zmiany okołowierzchołkowej w projekcji horyzontalnej. Następnie ubytek tkanki kostnej został automatycznie zrekonstruowany jako obiekt 3D i uzyskano wartość objętości zmiany. Przykłady rekonstrukcji 3D przedstawiono na Rycinach nr 6-9.

Tabela nr 5. Porównanie grupy badanej i kontrolnej.

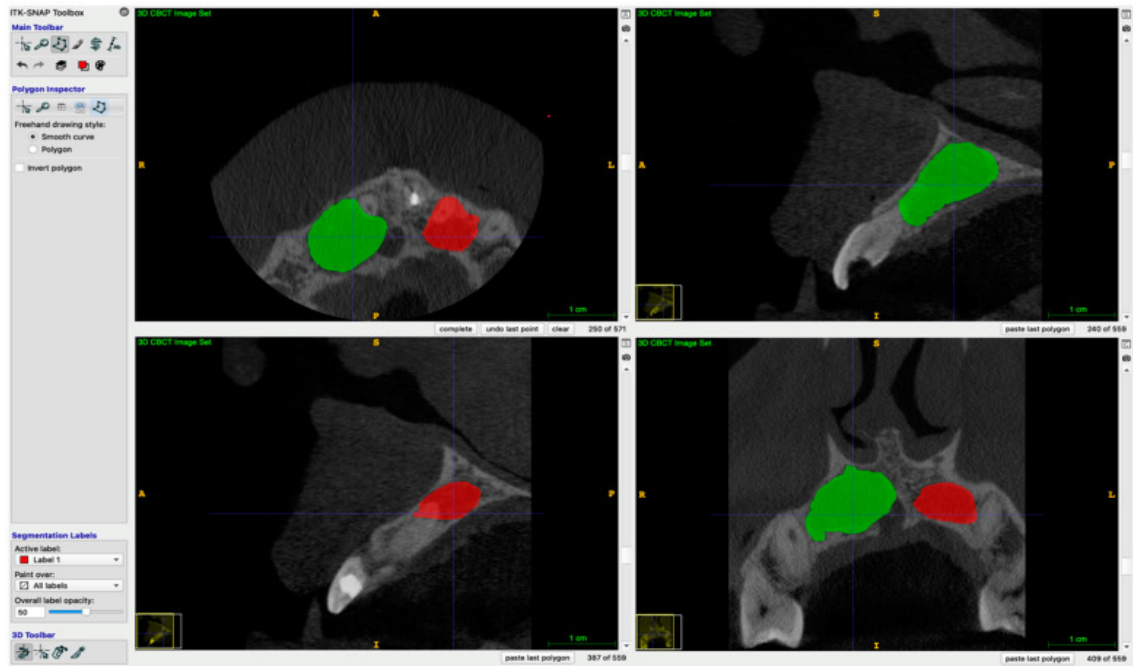
| | | | Grupa Badana | Grupa Kontrolna |
|-----------------------------|-----------|-----------------|---------------------|------------------------|
| Płeć | kobieta | | 52.6% (n=10) | 45.0% (n=9) |
| | mężczyzna | | 47.4% (n=9) | 55.0% (n=11) |
| Wiek (średnia)** | | | 33.7 | 30.0 |
| API (średnia) [%]*** | | | 54.3 | 65.0 |
| Ząb | łuk górny | siekacze | N=10 | N=8 |
| | | kieł | N=2 | N=2 |
| | | przedtrzonowiec | N=3 | N=4 |
| | | trzonowiec | N=0 | N=0 |
| | łuk dolny | siekacze | N=1 | N=1 |
| | | kieł | N=1 | N=0 |
| | | przedtrzonowiec | N=1 | N=2 |
| | | trzonowiec | N=2 | N=3 |

* Trzech pacjentów zakwalifikowano do obydwu grup (każdy z pacjentów miał leczony endodontycznie z A-PRF+ pierwszy ząb, a drugi endodontycznie metodą dwuwizytową). Dodatkowo, jeden pacjent miał jednocześnie leczone dwa zęby z osobnymi zmianami okołowierzchołkowymi z dodatkiem A-PRF+.

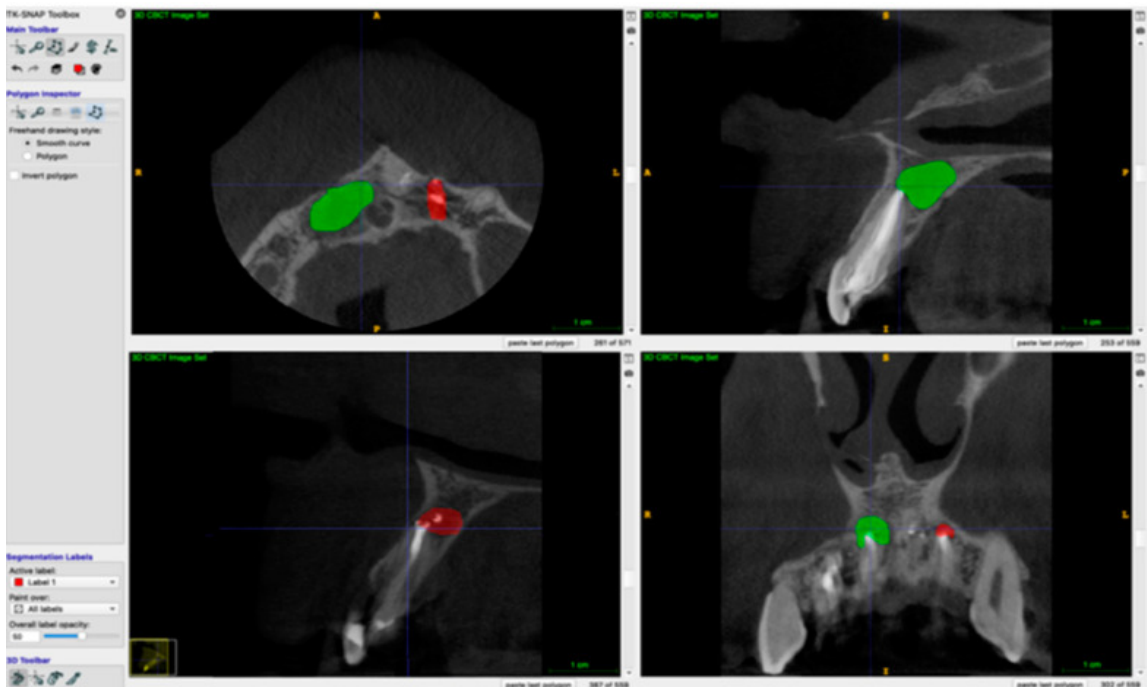
** Wiek pacjentów w trakcie przeprowadzonego leczenia.

*** API – Approximal Plaque Index – wskaźnik odnoszący się do stanu higieny jamy ustnej.

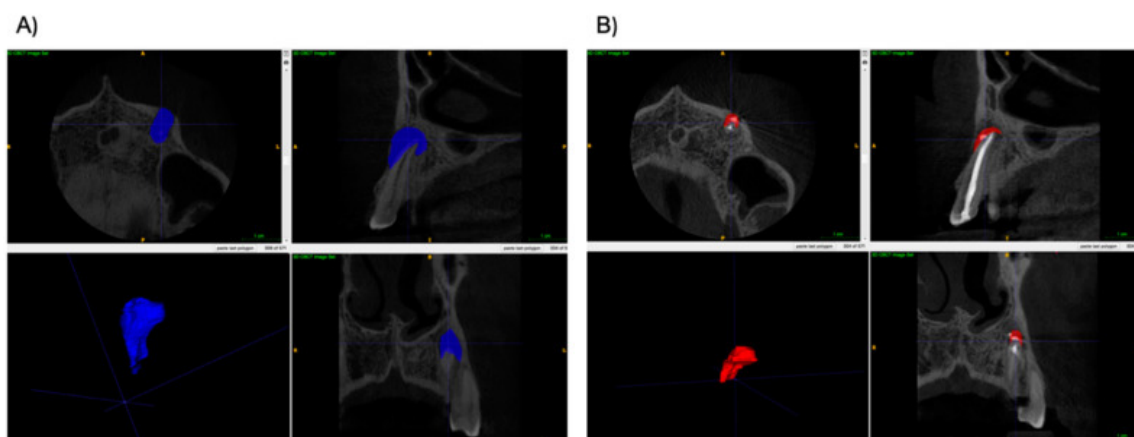
Rycina nr 6. Obraz przed leczeniem endodontycznym d. 12 (grupa badana; kolor zielony) i d. 22 (grupa kontrolna; kolor czerwony).



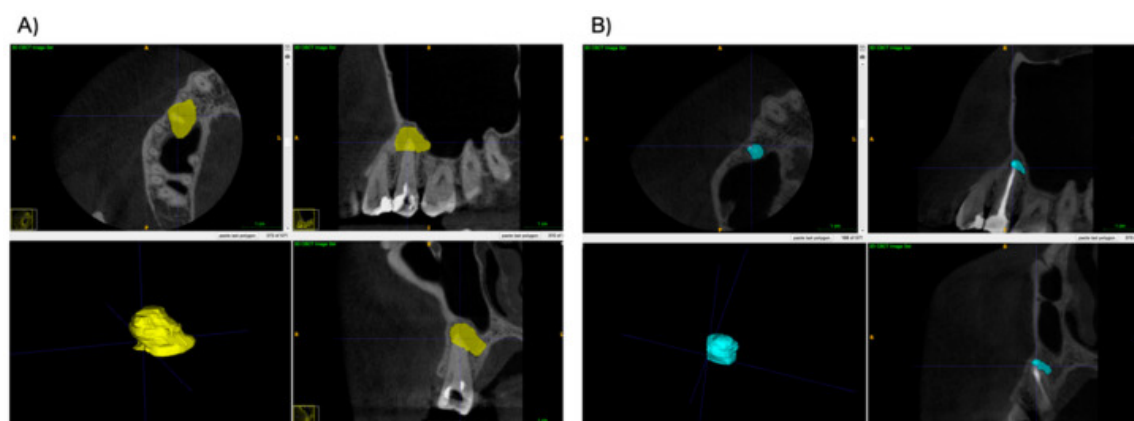
Rycina nr 7. Obraz po 6 miesiącach po leczeniu endodontycznym d. 12 (grupa badana; kolor zielony) i d. 22 (grupa kontrolna; kolor czerwony).



Rycina nr 8. Przykład rekonstrukcji 3D pacjenta z grupy badanej: A) obraz przedzabiegowy d.23 ($V = 237.2 \text{ mm}^3$). B) badanie wykonane 6 miesięcy po leczeniu endodontycznym d.23 ($V = 51.5 \text{ mm}^3$).



Rycina nr 9. Przykład rekonstrukcji 3D Pacjenta z grupy kontrolnej: A) obraz przedzabiegowy d.15 ($V = 237.0 \text{ mm}^3$). B) badanie wykonane 6 miesięcy po leczeniu endodontycznym d.15 ($V = 56,1 \text{ mm}^3$).



Objętości zmian okołowierzchołkowych po 6 miesiącach od leczenia endodontycznego w grupie A-PRF zmniejszyły się średnio o 85,93%, a w grupie kontrolnej o 72,31%. Zarówno dla grupy badanej, jak i kontrolnej zmiany objętości były istotne statystycznie (Rycina nr 10 oraz Tabela nr 6). Istotność została potwierdzona w jednokierunkowej analizie ANOVA ($p < 0,05$), dla danych nieparametrycznych.

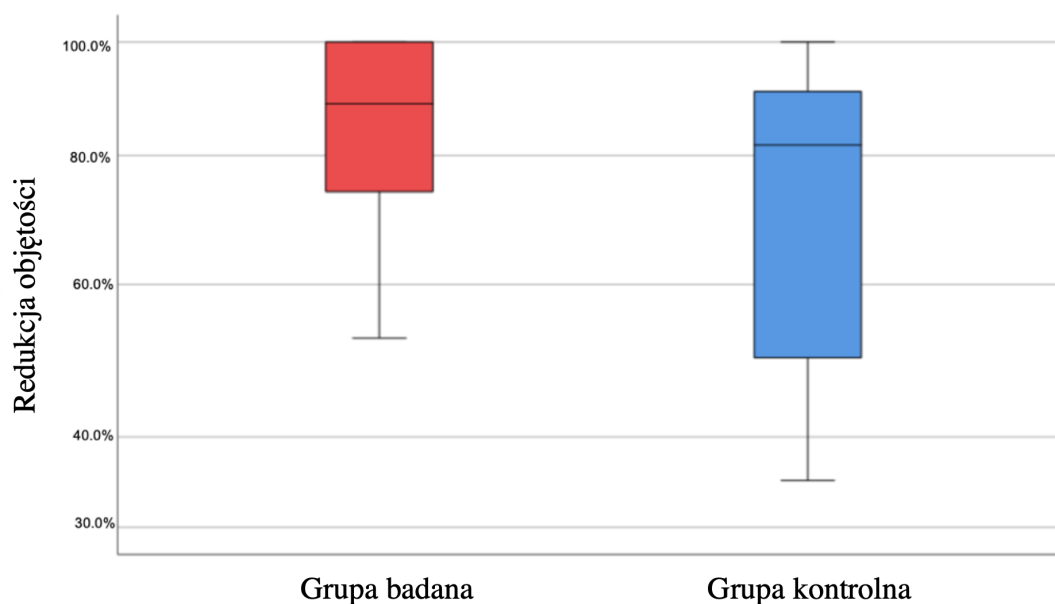
Tabela nr 6. Zmiany objętości oraz wskaźników CBCT-PAI przed leczeniem oraz po 6 miesiącach po ostatecznej obturacji kanału/kanałów.

| Grupa | Objętości przed leczeniem (mm ³) | | CBCT-PAI przed leczeniem | Objętości 6 miesięcy po leczeniu (mm ³) | | CBCT-PAI 6 miesięcy po leczeniu |
|------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|---|------------------------------|---------------------------------|
| | \bar{x} (SD) * | Me (Zakres) | Me (Zakres) ** | \bar{x} (SD) * | Me (Zakres) | Me (Zakres) ** |
| Badana | 392,70 _a (478,64) | 205,35 (21,87 - 1706,35) | 5E _c (3-5D) | 81,07 _a (129,16) | 35,01 (0,00 - 522,48) | 3 _c (0-5) |
| Kontrolna | 233,69 _b (223,60) | 128,13 (17,45 - 696,10) | 5E _d (4-5D) | 103,47 _b (135,33) | 29,15 (0,00 - 452,30) | 3 _d (0-5D) |

* Istotność statystyczna różnic oceniana i potwierdzona w jednokierunkowej analizie ANOVA dla danych nieparametrycznych w programie SPSS Statistics v.28.0.1.1 (14) (IBM) ($p < 0,05$ a-a, b-b)

** Istotność statystyczna różnic oceniana i potwierdzona w teście nieparametrycznym Kołmogorova-Smirnova w programie SPSS Statistics v.28.0.1.1 (14) (IBM) ($p < 0,05$ c-c, d-d)

Rycina nr 10. Wykres box-plot przedstawiający zmniejszenie objętości w grupach: badanej i kontrolnej.

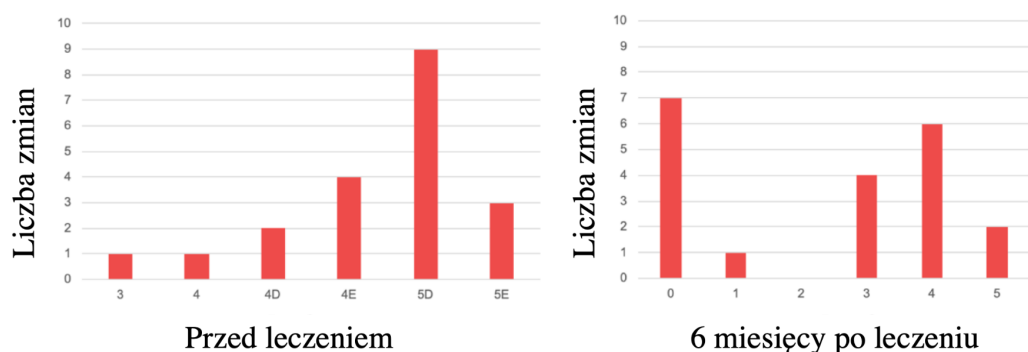


Na podstawie kryteriów oceny radiologicznego gojenia 3D w grupie badanej 9 zębów sklasyfikowano jako całkowicie wyleczone, 8 zębów jako częściowo wygojone zmiany okołowierzchołkowe, a 3 zęby jako wygojone tylko w ograniczonym stopniu. W grupie kontrolnej 6 zębów sklasyfikowano jako całkowicie wyleczone, 5 zębów jako częściowo wyleczone, 4 zęby jako wygojone tylko w ograniczonym stopniu i w 5 przypadkach stwierdzono gojenie niesatysfakcjonujące. Wyniki te były istotne statystycznie, zarówno dla grupy badanej, jak i kontrolnej.

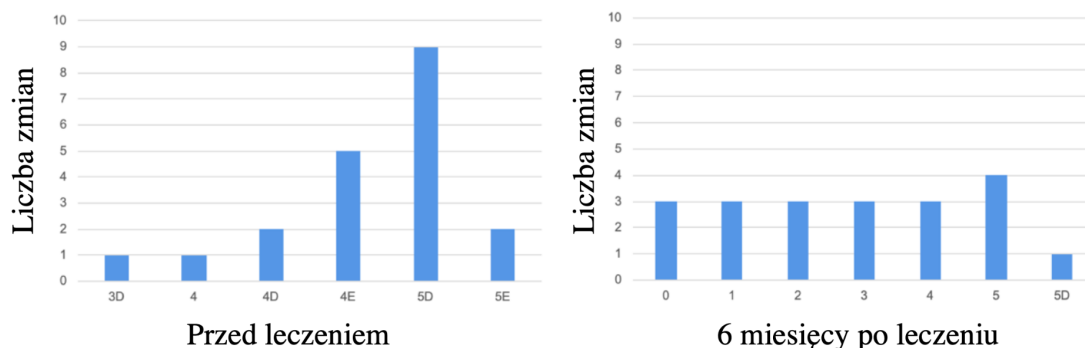
Nie stwierdzono jakichkolwiek dolegliwości bólowych samoistnych, obrzęku ani przetoki, a także zwiększenia przezierności okołowierzchołkowej w żadnym z przypadków, więc żaden z zabiegów nie został uznany za nieskuteczny.

Na podstawie kryteriów oceny gojenia CBCT-PAI w grupie badanej, 8 przypadków sklasyfikowano jako wyleczone, a w 12 przypadkach proces gojenia nadal trwał. W grupie kontrolnej 9 przypadków zostało sklasyfikowanych jako wyleczone, w 9 przypadkach proces gojenia trwał, natomiast 2 przypadki zostały oznaczone jako niewyleczone. Porównanie CBCT-PAI przed, jak i po 6 miesiącach leczenia przedstawiono na rycinie nr 11 dla grupy badanej oraz na rycinie nr 12 dla grupy kontrolnej.

Rycina nr 11. Wartości CBCT-PAI przed leczeniem i na wizycie kontrolnej po 6 miesiącach w grupie badanej.

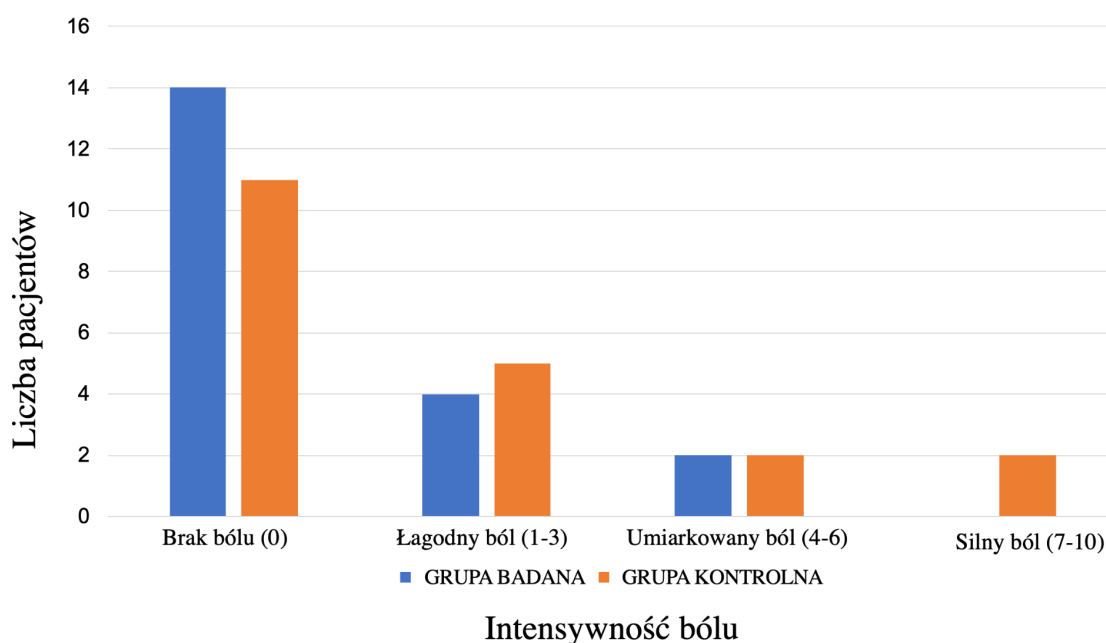


Rycina nr 12. Wartości CBCT-PAI przed leczeniem i na wizycie kontrolnej po 6 miesiącach w grupie kontrolnej.



W celu oceny częstości występowania incydentu bólu po leczeniu endodontycznym, każdy pacjent z grupy badanej i kontrolnej odbył wizytę kontrolną po 7 dniach po leczeniu endodontycznym. Ból pozabiegowy występował częściej w grupie kontrolnej niż w grupie badanej (test U Manna-Whitneya $p > 0,05$). W grupie badanej jeden pacjent zgłaszał dolegliwości bólowe łagodne (wynik: 5 wg skali VAS), natomiast w grupie kontrolnej dwóch pacjentów oceniało swoje dolegliwości bólowe po leczeniu jako silne (wartość 8 wg skali VAS) – rycina nr 13.

Rycina nr 13. Wykres przedstawiający występowanie pozabiegowych dolegliwości bólowych w grupie badanej i kontrolnej.



Ponadto, po leczeniu endodontycznym 5 pacjentów z grupy kontrolnej i 1 pacjent z grupy badanej wymagało dodatkowej terapii przeciwbólowej (test U Manna-Whitneya $p > 0,05$). Wszyscy Pacjenci przyjmowali niesteroidowy lek przeciwzapalny – Ibuprofen przez 2 doby (400 mg–1 tabletka/kapsułka co 4-6 h, ale nie więcej niż 3 tabletki/kapsułki na dobę), zgodnie z wydanymi zaleceniami pozabiegowymi.

Wniosek: wyniki radiologicznej oceny gojenia 3D opartej na kryteriach zmiany objętości różniły się od wyników CBCT-PAI. W oparciu o stworzone na potrzeby badania radiologiczne kryteria oceny gojenia z uwzględnieniem zmian objętości – 9 przypadków z grupy badanej i 6 przypadków z grupy kontrolnej określono jako całkowicie wygojone. Na podstawie kryteriów CBCT-PAI, 8 przypadków z grupy badanej i 9 przypadków z grupy kontrolnej zostało sklasyfikowanych jako całkowicie wygojone. W grupie badanej zauważono większą redukcję objętości przezierności wierzchołkowej niż w grupie kontrolnej.

7. Wnioski

1. U pacjentów, u których zastosowano A-PRF+ częstość występowania bólu pozabiegowego do 7 dni była niższa niż w grupie kontrolnej, jednak różnice te nie były istotne statystycznie.
2. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej, stan kliniczny badanego zęba uległ poprawie. Po upływie 7 dni od wypełnienia kanału do czasu zakończenia obserwacji po 6 miesiącach nie stwierdzono jakichkolwiek dolegliwości bólowych samoistnych, obrzęku, ani przetok.
3. Zastosowanie A-PRF+ w jednoseansowym leczeniu endodontycznym zębów z przewlekłym zapaleniem tkanek przyzębia okołowierzchołkowego wspomaga istotnie statystycznie szybsze zmniejszenie obszaru przezierności okołowierzchołkowej w obrazowaniach CBCT w porównaniu do zębów leczonych endodontycznie z czasowym wypełnieniem kanału preparatem nietwardniejącym wodorotlenku wapnia.

8. Streszczenie

Wstęp: Przewlekłe zapalenie tkanek przyzębia okołowierzchołkowego jest jednym z najczęstszych powodów leczenia endodontycznego w gabinetach stomatologicznych. Wysoki odsetek przypadków występowania zmian okołowierzchołkowych wynika z braku podstawowej edukacji prozdrowotnej, wieku i występowania chorób ogólnoustrojowych pacjenta, ale jest też efektem błędów poprzedniego leczenia zachowawczo-endodontycznego. Autologiczne koncentraty płytek krwi, w tym zaawansowana fibryna bogatopłytkowa (A-PRF, A-PRF+) mają udowodnione działanie regeneracyjne w medycynie i stomatologii. W piśmiennictwie brakuje doniesień o zastosowaniu PRF w leczeniu endodontycznym zębów stałych z zakończonym rozwojem wierzchołka w przebiegu przewlekłych zapaleń przyzębia okołowierzchołkowego poprzez aplikację materiału przez kanał.

Cel pracy: Ocena wpływu A-PRF+ na gojenie tkanek przyzębia okołowierzchołkowego poprzez ocenę kliniczną i radiologiczną zęba przed rozpoczęciem leczenia oraz po 6 miesiącach po wypełnieniu ostatecznym kanału z aplikacją A-PRF+ wraz z oceną występowania pozabiegowych dolegliwości bólowych samoistnych.

Materiały i metody: Przedmiotem pracy jest cykl trzech publikacji. Badaniem objęto pacjentów Poradni Stomatologii Zachowawczej UCS GUMed Sp.z.o.o. zdiagnozowanych z przewlekłym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych, u których wykonano badanie stomatologiczne podmiotowe i przedmiotowe oraz przeprowadzono diagnostykę obrazową – CBCT przed leczeniem oraz w okresie 6 miesięcy po zastosowanym leczeniu. W pierwszej publikacji – w badaniu pilotażowym – analizowano dwa przypadki zastosowania A-PRF+ w leczeniu endodontycznym zmian okołowierzchołkowych. Przedmiotem drugiej pracy był przegląd piśmiennictwa na temat zastosowania płytkowych preparatów autologicznych, szczególnie fibryny bogatopłytkowej w okolicy okołowierzchołkowej jako uzupełnienia niechirurgicznego leczenia endodontycznego zębów stałych z zakończonym rozwojem wierzchołka. W ostatniej pracy przedstawiono wyniki gojenia zmian okołowierzchołkowych w dwóch grupach: w grupie badanej z zastosowaniem A-PRF+ oraz w grupie kontrolnej z zastosowaniem preparatu nietwardniejącego wodorotlenku wapnia. Okres obserwacji w obu grupach wynosił 6 miesięcy. Porównania dokonano na podstawie pomiarów objętości zmian okołowierzchołkowych [w mm³] oraz wartości wskaźnika CBCT-PAI przed zabiegiem oraz po upływie 6 miesięcy po leczeniu. Dodatkowo, w badaniu oceniano częstość występowania bólu pozabiegowego wraz z koniecznością stosowania leczenia przeciwbólowego.

Wyniki: W publikacji nr 1 w obydwu przypadkach nastąpiło znaczne zmniejszenie wielkości zmian okołowierzchołkowych w okresie 5 i 6 miesięcy. W publikacji nr 2 ocena skuteczności zastosowania PRF w leczeniu endodontycznych zmian okołowierzchołkowych w zębach stałych nie była możliwa, ze względu na brak dobrze zaprojektowanych badań naukowych. W publikacji nr 3 objętości zmian okołowierzchołkowych po 6 miesiącach od leczenia endodontycznego w grupie A-PRF zmniejszyły się średnio o 85,93%, a w grupie kontrolnej o 72,31%. Na podstawie kryteriów oceny radiologicznego gojenia 3D w grupie badanej 9 zębów sklasyfikowano jako całkowicie wyleczone, a w grupie kontrolnej 6 zębów sklasyfikowano jako całkowicie wyleczone. Wyniki te były istotne statystycznie, zarówno dla grupy badanej, jak i kontrolnej. Na podstawie kryteriów oceny gojenia CBCT-PAI w grupie kontrolnej 2 przypadki zostały oznaczone jako niewyleczone, pozostałe przypadki w grupie kontrolnej i badanej zakwalifikowano jako wygojone albo w trakcie gojenia. Ból pozabiegowy występował częściej w grupie kontrolnej niż w grupie badanej oraz 5 pacjentów z grupy kontrolnej i 1 pacjent z grupy badanej wymagało dodatkowej terapii przeciwbólowej, jednak różnice te nie były istotne statystycznie.

Wnioski:

1. Częstość występowania dolegliwości bólowych po ostatecznym wypełnieniu kanału/kanałów w grupie badanej była niższa niż w grupie kontrolnej.
2. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej, stan kliniczny badanego zęba uległ poprawie. Po upływie 7 dni od wypełnienia kanału do czasu zakończenia obserwacji po 6 miesiącach nie stwierdzono jakichkolwiek dolegliwości bólowych samoistnych, obrzęku, ani przetok.
3. W grupie badanej z aplikacją A-PRF+ zauważono szybsze oznaki gojenia zmiany oraz większą redukcję obszaru przezierności okołowierzchołkowej w porównaniu do zębów leczonych w grupie kontrolnej, na podstawie obrazowań CBCT.

9. Abstract

Introduction: Chronic periapical periodontitis is one of the most common reasons for endodontic treatment in dental practice. The high prevalence of periapical lesions is caused by lack of pro-health education, the patient's age and systemic diseases, but it is also the result of inadequate restorative and endodontic treatment. Autologous platelet concentrates, including advanced platelet-rich fibrin (A-PRF, A-PRF+) have a proven regenerative effect in medicine and dentistry. In the literature there are no reports of PRF being used in the endodontic treatment of permanent teeth with completed apical development in the chronic periapical periodontitis by the application via the canal. The aim of the study is to assess the effect of A-PRF+ on the healing of periapical lesions.

Aims: Evaluation of the impact of A-PRF+ on the periapical lesion healing by clinical and radiological assessment of the tooth before treatment and 6 months after the final canal obturation with the A-PRF+ application and by the assessment of the post-endodontic pain occurrence.

Materials and methods: The dissertation is based on three publications. The participants of the study are patients of the Conservative Dentistry Clinic UCS GUMed Sp. z.o.o. diagnosed with chronic periapical inflammation, who underwent a dental examination and imaging diagnostics – CBCT – before treatment and within 6 months after the treatment. In the first publication – a pilot study – two cases of A-PRF+ application in the endodontic treatment of periapical lesions were analyzed. The second paper was a narrative review of the literature about autologous platelet preparations, especially PRF application in the periapical area as a supplement to non-surgical endodontic treatment of permanent teeth with closed apex. The last paper presents the results of the healing of periapical lesions in two groups: in the study group with the use of A-PRF+ and in the control group with the temporary filling with non-hardening calcium hydroxide. The observation period in both groups was 6 months. The comparison was made on the basis of periapical lesion volume measurements [in mm³] and CBCT-PAI values before and 6 months after treatment. In addition, the study assessed the incidence of post-endodontic pain with the need for analgesic treatment.

Results: In the first publication, in both cases, there was a significant reduction in the size of periapical lesions at 5 and 6 months. In publication no. 2, the assessment of the effectiveness of PRF in the endodontic treatment of periapical lesions in permanent teeth was not possible due to the lack of well-designed scientific studies. The volume of periapical lesions after 6 months from endodontic treatment in the A-PRF group decreased on average

by 85.93%, and in the control group by 72.31%. Based on the criteria for assessing 3D radiological healing, 9 teeth in the study group and 6 teeth in the control group were classified as healed. These results were statistically significant for both the study group and the control group. Based on CBCT-PAI healing assessment criteria, 2 cases in the control group were not healed, the remaining cases in the control and study group were classified as healed or healing. Post-endodontic pain was more common in the control group than in the study group. Also 5 patients from the control group and 1 patient from the study group required additional analgesic therapy, but these differences were not statistically significant.

Conclusions:

1. Post-endodontic pain occurred less frequently in the study group in contrast to the control group.
2. Both in the study group and in the control group, the clinical condition of the examined tooth improved. After 7 days from the filling of the canal until the end of the observation after 6 months, no spontaneous pain, edema or fistulas were found.
3. In the study group with A-PRF+ application noticed were better healing and greater reduction of the apical translucency volume in CBCT imaging than in the control group.

10. Piśmiennictwo

1. Maeda, H.; Tomokiyo, A.; Fujii, S.; Wada, N.; Akamine, A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. *Stem Cell Res Ther.* **2011**, *2*, 33.
2. Gonçalves, P.; Sallum, E.; Sallum, A.; Casati, M.; Toledo, S.; Nociti, F. Dental cementum reviewed: Development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* **2005**, *4*, 651-658.
3. Yamamoto, T.; Hasegawa, T.; Yamamoto, T.; Hongo, H.; Amizuka, N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev.* **2016**, *52(3)*, 63-74.
4. Bosshardt, D.D.; Selvig, K.A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology 2000.* **1997**, *13*, 41-75.
5. Mihály, A.; Mihály, E. Histological structure of the human and rodent periodontium. *Acta Biol Szeged.* **2015**, *59(Suppl.3)*, 345-352.
6. Zanoni, J. N.; Lucas, N. M.; Trevizan, A. R.; Souza, I. D. Histological evaluation of the periodontal ligament from aged Wistar rats supplemented with ascorbic acid. *An Acad Bras Cienc.* **2013**, *85(1)*, 327-335.
7. Józwiak, M.; Kopański, Z. Rozwój i budowa przyzębia. *JCHC.* **2014**, *1*, 25-29.
8. Ricucci, D.; Siqueira, J.F. Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* **2010**, *36(8)*:1277-1288.
9. El Ouarti, I.; Chala, S.; Sakout, M.; Abdallaoui, F. Prevalence and risk factors of Apical periodontitis in endodontically treated teeth: cross-sectional study in an Adult Moroccan subpopulation. *BMC Oral Health* **2021**, *21*, 124.
10. Jakovljevic, A.; Nikolic, N.; Jacimovic, J.; Pavlovic, O.; Milicic, B.; Beljic-Ivanovic, K.; Miletic, M.; Andric, M.; Milasin J. Prevalence of apical periodontitis and conventional nonsurgical root canal treatment in general adult population: an updated systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies published between 2012-2020. *J Endod.* **2020**, *46(10)*, 1371-1386.
11. Al-Nuaimi, N.; Patel, S.; Austin, R.; Mannocci, F. A prospective study assessing the effect of coronal tooth structure loss on the outcome of root canal retreatment. *Int Endod J.* **2017**, *50(12)*, 1143-1157.
12. Jiménez-Sánchez, M.C.; Cabanillas-Balsera, D.; Areal-Quecuty, V.; Velasco-Ortega, E.; Martín-González, J.; Segura-Egea, J.J. Cardiovascular diseases and apical periodontitis: association not always implies causality. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* **2020**, *25(5)*, 652-659.
13. Pérez-Losada, F.L.; Estrugo-Devesa, A.; Castellanos-Cosano, L.; Segura-Egea, J.J.; López-López, J.; Velasco-Ortega E. Apical Periodontitis and Diabetes Mellitus Type 2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med.* **2020**, *9(2)*, 540.
14. Bascones-Martinez, A.; Muñoz-Corcuera, M.; Meurman, J.H. Odontogenic infections in the etiology of infective endocarditis. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **2009**, *9*, 231-235.
15. Jeffcoat, M.; Parry, S.; Sammel, M.; Clothier, B.; Catlin, A.; Macones, G. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. *BJOG.* **2011**, *118(2)*, 250-256.
16. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J.* **2006**, *39*, 921-930.

17. Jankowska-Antczak, E.; Wojtowicz, A. Aktualne poglądy na temat patogenezy zapalenia tkanek okołowierzchołkowych. *Nowa Stomatol.* **2005**, *2*, 94-97.
18. Piątowska, D. Rola cytokin w patogenezie przewlekłych zapaleń tkanek okołowierzchołkowych zębów na podstawie piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.* **2002**, *55*, 8, 491-495.
19. Tibúrcio-Machado, C.S.; Michelon, C.; Zanatta, F.B.; Gomes, M.S.; Marin, J.A.; Bier, C.A. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* **2021**, *54*, 712-735.
20. Opalko, K.; Dojs, A. Zastosowanie pól magnetycznych generowanych przez aparat Vioform JPS w wybranych przypadkach stomatologicznych. *Mag. Stom.* **2003**, *9*, 59-62.
21. Kobus, A.; Kierklo, A.; Waszkiel, D. Magnetostymulacja jako leczenie wspomagające przewlekłych zapaleń tkanek okołowierzchołkowych zębów – doniesienie wstępne. *Ann Acad Med Stetin.* **2007**, *53* (Suppl. 3), 70-73.
22. Singla, R.; Marwah, N.; Dutta, S. Single Visit versus Multiple Visit Root Canal Therapy. *Int J Clin Pediatr Dent.* **2008**, *1*(1), 17-24.
23. Sathorn, C.; Parashos, P.; Messer, H.H. Effectiveness of single- versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* **2005**, *38*, 347-355.
24. Kim, D.; Kim, E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod.* **2014**, *39*(4), 241-252.
25. Lacević, A.; Vranić, E.; Zulić, I. Clinical application of calcium hydroxide in dental pathology and endodontics. *Bosn J Basic Med Sci.* **2003**, *3*(4), 26-29.
26. Lee, Y. Effect of calcium hydroxide application time on dentin. *Restor Dent Endod.* **2013**, *38*(3), 186.
27. Sjögren, U.; Figdor, D.; Spångberg, L.; Sundqvist, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int. Endod. J.* **1991**, *24*, 119-125.
28. Fernandes, M.; de Ataide, I. Nonsurgical management of periapical lesions. *J Conserv Dent.* **2010**, *13*(4), 240-245.
29. Shah, N. Nonsurgical management of periapical lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1988**, *66*(3), 365-71.
30. Gusiyska, A.; Gateva, N.; Kabaktchieva, R.; Stanimirov, P.; Raychev, I. Retrospective study of the healing processes of endodontically treated teeth characterized by osteolytic defects of the periapical area: four-year follow-up, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2017**, *31*, 1, 187-192.
31. Setzer, F.C. Endodontic microsurgery – A technique for the 21st century. *J Orofac Sci.* **2018**, *10*, 1-2
32. Bendyk-Szeffer, M.; Łagocka, R.; Szmida M. Wykorzystanie zabiegu hemisekcji w interdyscyplinarnym leczeniu powikłań terapii endodontycznej. Opis dwóch przypadków. *Mag. Stomatol.* **2013**, *23*, 28-32.
33. Ananad, S.; Soujanya, E.; Raju, A.; Swathi, A. Endodontic microsurgery: An overview. *Dent Med Res.* **2015**, *3*, 31-37.
34. Kratchman, S. Endodontic Microsurgery. *Compendium.* **2007**, *28*(6), 324-331
35. Konagala, R.K.; Mandava, J.; Pabbati, R.K.; Anupreeta, A.; Borugadda, R.; Ravi, R. Effect of pretreatment medication on postendodontic pain: A double-blind, placebo-controlled study. *J. Conserv. Dent.* **2019**, *22*, 54-58.
36. Levin, L.; Amit, A.; Ashkenazi, M. Post-operative pain and use of analgesic agents following various dental procedures. *Am. J. Dent.* **2006**, *19*, 245-247.

37. Seltezer, S.; Naidorf, I.J. Flare-ups in endodontics: I. Etiological factors. *J. Endod.* **2004**, *30*, 476–481.
38. Al-Nahlawi, T.; Alabdullah, A.; Othman, A.; Sukkar, R.; Doumani, M. Postendodontic pain in asymptomatic necrotic teeth prepared with different rotary instrumentation techniques. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2020**, *9*, 3474–3479.
39. Vishwanathaiah, S.; Maganur, P.C.; Khanagar, S.B.; Chohan, H.; Testarelli, L.; Mazzoni, A.; Gupta, A.A.; Raj, A.T.; Bhandi, S.; Mehta, D.; et al. The Incidence and Intensity of Postendodontic Pain and Flareup in Single and Multiple Visit Root Canal Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3358.
40. Wong, A.W.Y.; Zhang, C.; Chu, C.-H. A systematic review of nonsurgical single-visit versus multiple-visit endodontic treatment. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2014**, *6*, 45–56.
41. Orstavik, D.; Kerekes, K.; Eriksen, H.M. The periapical index: A scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod. Dent. Traumatol.* **1986**, *2*, 20–34.
42. Kang, S.; Ha, S.W.; Kim, U.; Kim, S.; Kim, E. A One-Year Radiographic Healing Assessment after Endodontic Microsurgery Using Cone-Beam Computed Tomographic Scans. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3714.
43. Lo Giudice, R.; Nicita, F.; Puleio, F.; Alibrandi, A.; Cervino, G.; Lizio, A.S.; Pantaleo, G. Accuracy of Periapical Radiography and CBCT in Endodontic Evaluation. *Int. J. Dent.* **2018**, *2018*, 2514243.
44. Sha, X.; Jin, L.; Han, J.; Li, Y.; Zhang, L.; Qi, S. Comparison of periapical radiography and cone beam computed tomography for the diagnosis of anterior maxillary trauma in children and adolescents. *Dent. Traumatol.* **2022**, *38*, 62–70.
45. Shukla, S.; Chug, A.; Afrashtehfar, K.I. Role of Cone Beam Computed Tomography in Diagnosis and Treatment Planning in Dentistry: An Update. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2017**, *7*, 125–136.
46. Patel, S.; Brown, J.; Semper, M.; Abella, F.; Mannocci, F. European Society of Endodontology position statement: Use of cone beam computed tomography in Endodontics: European Society of Endodontology (ESE) developed by. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1675–1678.
47. Patel, S.; Patel, R.; Foschi, F.; Mannocci, F. The impact of different diagnostic imaging modalities on the evaluation of root canal anatomy and endodontic residents' stress levels: A clinical study. *J. Endod.* **2019**, *45*, 406–413.
48. Mostafapoor, M.; Hemmatian, S. Evaluation of the accuracy values of cone-beam CT regarding apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Oral Radiol.* **2022**, *38*, 309–314.
49. Cotti, E.; Schirru, E. Present status and future directions: Imaging techniques for the detection of periapical lesions. *Int. Endod. J.* **2022**, 1–15.
50. Boubaris, M.; Chan, K.L.; Zhao, W.; Cameron, A.; Sun, J.; Love, R.; George, R. A novel volume-based cone-beam computed tomographic periapical index. *J. Endod.* **2021**, *47*, 1308–1313.
51. Estrela, C.; Bueno, M.R.; Azevedo, B.C.; Azevedo, J.R.; Pécora, J.D. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J. Endod.* **2008**, *34*, 1325–1331.
52. Torabinejad, M.; Rice, D.D.; Maktabi, O.; Oyoyo, U.; Abramovitch, K. Prevalence and Size of Periapical Radiolucencies Using Cone-beam Computed Tomography in Teeth without Apparent Intraoral Radiographic Lesions: A New Periapical Index with a Clinical Recommendation. *J. Endod.* **2018**, *44*, 389–394.

53. Thon, J.N.; Italiano, J.E. Platelet formation. *Semin Hematol.* **2010**, *47*(3), 220–226.
54. Wazna, E. Platelet-mediated regulation of immunity. *Postepy Hig Med Dosw.* **2006**, *60*, 265.
55. Cognasse, F.; Hamzeh, H.; Chavarin, P.; Acquart, S.; Genin, C.; Garraud, O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell. Biol.* **2005**, *83*, 196–198.
56. Ross, R.; Glomset, J.; Kariya, B.; Harker, L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* **1974**, *71*(4), 1207–1210.
57. Dohan, D. M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S. L.; Dohan, A. J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2006**, *101*(3), 37–44.
58. El-Sharkawy, H.; Kantarci, A.; Deady, J.; Hasturk, H.; Liu, H.; Alshahat, M.; Van Dyke, T.E. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.* **2007**, *78*, 661–669.
59. Marchetti, E.; Mancini, L.; Bernardi, S.; Bianchi, S.; Cristiano, L.; Torge, D.; Marzo, G.; Macchiarelli, G. Evaluation of Different Autologous Platelet Concentrate Biomaterials: Morphological and Biological Comparisons and Considerations. *Materials.* **2020**, *13*(10), 2282.
60. Pocaterra, A.; Caruso, S.; Bernardi, S.; Scagnoli, L.; Continenza, M.A.; Gatto, R. Effectiveness of platelet-rich plasma as an adjunctive material to bone graft: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Surg.* **2016**, *45*(8), 1027–1034.
61. Kobayashi, E.; Fluckiger, L.; Fujioka-Kobayashi, M.; Sawada, K.; Sculean, A.; Schaller, B.; Miron, R. J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* **2016**, *20*, 2353–2360.
62. Choukroun, J.; Diss, A.; Simonpieri, A.; Girard, M.O.; Schoeffler, C.; Dohan, S. L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Dohan, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2006**, *101*, 299–303.
63. Shivashankar, V.Y.; Johns, D.A.; Maroli, R.K.; Sekar, M.; Chandrasekaran, R.; Karthikeyan, S.; Renganathan, S. K. Comparison of the Effect of PRP, PRF and Induced Bleeding in the Revascularization of Teeth with Necrotic Pulp and Open Apex: A Triple Blind Randomized Clinical Trial. *J Clin Diagn Res.* **2017**, *11*(6), 34–39.
64. Moojen, D.J.; Everts, P.A.; Schure, R.M.; Overvest, E.P.; van Zunder, A.; Knape, J.T.; Castelein, R.M.; Creemers, L.B.; Dhert, W.J. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* **2008**, *26*(3), 404–410.
65. Dohan, D. M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S. L.; Dohan, A. J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Doustnie Radiol Endod.* **2006**, *101*, 51 – 55.
66. Fujioka-Kobayashi, M.; Miron, R.J.; 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*, 112–121

67. Ghanaati, S.; Booms, P.; Orłowska, A.; Kubesch, A.; Loren, J.; Rutkowski, J.; Landes, C.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.; Choukroun, J. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* **2014**, *40*, 679–689.
68. Pavlovic, V.; Ciric, M.; Jovanovic, V.; Trandafilovic, M.; Stojanovic, P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med.* **2021**, *16*, 446–454.
69. Masuki, H.; Okudera, T.; Watanebe, T.; Suzuki, M.; Nishiyama, K.; Okudera, H.; Nakata, K.; Uematsu, K.; Su, C.-Y.; Kawase, T. Growth Factor and Pro-Inflammatory Cytokine Contents in Platelet-Rich Plasma (PRP), Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF), and Concentrated Growth Factors (CGF). *Int. J. Implant Dent.* **2016**, *2*, 19.
70. Strauss, F.J.; Nasirzade, J.; Kargarpoor, Z.; Stähli, A.; Gruber, R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: A systematic review of in vitro studies. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 569–584.
71. Kour, P.; Pudakalkatti, P.S.; Vas, A.M.; Das, S.; Padmanabhan, S. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemp Clin Dent.* **2018**, *9* (Suppl 2), 325-330.
72. Borie, E.; Oliví, D.G.; Orsi, I.A.; Garlet, K.; Weber, B.; Beltrán, V.; Fuentes, R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med.* **2015**, *8*(5), 7922–7929.
73. Hamdoun, R.; Ennibi, O.K.; Ismaili, Z. PRF in Oral Surgery: A Literature Review. *J Med Imp Surg*, **2016**, *1*, 110.
74. Metlerska, J.; Fagogeni, I.; Nowicka, A. Efficacy of Autologous Platelet Concentrates in Regenerative Endodontic Treatment: A Systematic Review of Human Studies. *J Endod.* **2019**, *45*, 20-30.
75. Wang, X.; Zhang, Y.; Choukroun, J.; Ghanaati, S.; Miron, R. J. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets.* **2018**, *29*, 48-55.
76. Soto-Peñaloza, D.; Peñarrocha-Diago, M.; Cervera-Ballester, J.; Peñarrocha-Diago, M.; Tarazona-Alvarez, B.; Peñarrocha-Oltra, D. Pain and quality of life after endodontic surgery with or without advanced platelet-rich fibrin membrane application: A randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1727–1738.
77. Parikh, B.; Navin, S.; Vaishali, P. A comparative evaluation of healing with a computed tomography scan of bilateral periapical lesions treated with and without the use of platelet-rich plasma. *Indian J. Dent. Res.* **2011**, *22*, 497–498

11. Publikacje

11.1 Publikacja 1



International Journal of
Molecular Sciences



Case Report

Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports

Katarzyna Machut, Agata Zoltowska, Elzbieta Pawlowska and Marcin Derwich

Special Issue

Bridging the Gap between the Clinical and Regulatory Use of Plasma Rich in Growth Factors. Where Are We?

Edited by

Dr. Eduardo Anitua, Dr. Mohammad Hamdan Alkhraisat and Dr. Sabino Padilla





Case Report

Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports

Katarzyna Machut ¹, Agata Zoltowska ¹, Elzbieta Pawlowska ² and Marcin Derwich ^{3,*}

¹ Department of Endodontic Dentistry, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland; katarzyna.machut@gumed.edu.pl (K.M.); agata.zoltowska@gumed.edu.pl (A.Z.)

² Department of Orthodontics, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; elzbieta.pawlowska@umed.lodz.pl

³ ORTODENT Specialist Orthodontic Private Practice in Grudziadz, 86-300 Grudziadz, Poland

* Correspondence: marcin.derwich@ortodent-grudziadz.pl; Tel.: +48-660-723-164

Abstract: Platelet-rich fibrin (PRF) is an autologous blood concentrate obtained without anticoagulants by centrifugation of patients' peripheral venous blood. PRF is considered to enhance the formation of new bone. The aim of this manuscript was to present two case reports of permanent teeth with closed apices with periapical lesions, treated endodontically with the use of PRF. The root canals were mechanically cleaned and shaped with NiTi files and irrigated with 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl), 40% citric acid (CA), and triple distilled water. Before the canal systems were obturated, A-PRF was used as a scaffold and was placed below the cementodentinal junction with hand pluggers. Cone beam computerized tomography (CBCT) was used to assess the resolutions of periapical radiolucencies. After 6 months, the measurements of both periapical lesions were significantly reduced. Although the performed root canal treatments (RCTs) can definitely be recognized as successful, it must be emphasized that mechanical shaping and cleaning of the root canals with special disinfecting solutions significantly affect the clinical efficacy of RCT. It seems impossible to state that PRF played a leading role in the healing process of the presented periapical lesions. Further studies must be performed to assess whether RCT of mature teeth with an additional PRF application is superior to RCT performed alone.

Keywords: plasma rich in growth factors; platelet-rich fibrin; advanced platelet-rich fibrin; apical periodontitis; endodontics; endodontic treatment; bone regeneration



Citation: Machut, K.; Zoltowska, A.; Pawlowska, E.; Derwich, M. Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9458. <https://doi.org/10.3390/ijms22179458>

Academic Editor: Marco Tatullo

Received: 4 August 2021

Accepted: 30 August 2021

Published: 31 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Root canal treatment (RCT) is performed to eliminate pulpal infection, which may be the consequence of severe caries lesions or non-carious conditions, including traumas. The aim of RCT is to remove the inflamed or necrotic pulp, to chemo-mechanically debride the root canal system, and finally to hermetically fill the root canal system with biocompatible material [1].

Four conditions have been found that significantly improve the final outcome of primary RCT, including lack of the periapical radiolucency, homogenous filling of the root canal system, filling of the root canal system that extends to 2 mm within the radiographic apex, and well-sealing post-endodontic restoration [1]. Similar factors improve the final outcome of secondary RCT [2]. The major difficulty, which is related to secondary RCT, is the access to the apical infection. The final outcomes of primary and secondary RCT are similar when the access to the apical infection is restored [2].

RCT of teeth diagnosed with endodontic periapical lesions is associated with 49% lower odds of success compared with teeth without periapical lesions [2]. Therefore, it seems mandatory to search for new methods of treatment that may help the clinicians to achieve better outcomes in complicated clinical conditions.

Regenerative endodontic procedures (REPs) are based on biology and aim to replace impaired dental tissues, including dentin, pulp–dentin complex, and root structures. The major domains that affect regenerative endodontics are growth factors; stem cells; tissue engineering materials; and cell, tissue, and organ culture [3]. Several different techniques have been invented for regenerative endodontics; namely, injectable scaffold delivery, stem cell therapy, root canal revascularization, pulp implantation, scaffold implantation, three-dimensional cell printing, and gene delivery [3]. Nowadays, REPs are mostly performed in pediatric dentistry to treat immature teeth diagnosed with pulpal necrosis [4]. Although REPs for adult patients have also been discussed in the literature, little is known about their efficacy [5].

There are three major types of biological scaffolds used in REPs: blood clot revascularization (BCR), platelet-rich plasma (PRP), and platelet-rich fibrin (PRF) [6,7]. PRF is a second-generation platelet concentrate, which was developed by Choukroun in 2001 as a scaffold in maxillofacial surgery [8]. The fibrin in PRF has a structure of a three-dimensional network, which is a flexible, elastic, and makes a very strong core, in which platelets and leukocytes are suspended [8].

According to the available literature, PRF seems to be very effective in regenerative dentistry [9]. It is considered to enhance the formation of a new bone [10]. Therefore, it may be speculated that the application of PRF in the apical region, before final obturation of the root canal system, may accelerate the regeneration of periapical tissue. There is no evidence of data in the worldwide literature concerning the use of PRF in the endodontic treatment of mature permanent teeth with diagnosed chronic periapical periodontitis.

The aim of this manuscript was to present two case reports of permanent teeth with closed apices diagnosed with periapical lesions, treated endodontically with the use of PRF.

2. Case Report—Patient A: Pulp Necrosis with Symptomatic Apical Periodontitis

A 45-year old female patient came to the Department of Endodontic Dentistry Medical University of Gdansk for a severe pain of tooth 23 (upper left canine, according to the Federation Dentaire Internationale (FDI) dental numbering system). Extraoral and intraoral examinations were carried out. The gingiva above tooth 23 was found to be swollen, reddish, and painful to palpation. Tooth 23 showed Grade 3 mobility (Miller's index of mobility). Examination of the periodontal pocket revealed the presence of exudation, which mostly consisted of pus. The pocket depth (PD) was PD max = 9 mm. Diagnostic examination of a pulp viability was performed with faradic current. Tooth 23 did not respond to electric stimuli, which is typical for nonvital teeth. The periapical tissue condition was additionally tested by the reaction to vertical and horizontal percussion. Both of the reactions were positive.

Cone-beam computed tomography (CBCT) was performed. The periapical lesion was measured with the use of CS 3D Imaging v3.5.18 Software (Carestream Health Inc., Trophy, Croissy-Beaubourg, France). The measured dimensions of the lesion were $9.0 \times 7.2 \times 9.9$ mm. The CBCT images of the periapical lesion are presented in Figure 1.

The patient was diagnosed with pulp necrosis with symptomatic apical periodontitis of tooth 23 and qualified for an endodontic treatment. Patient informed consent to perform root canal treatment was obtained. The endodontic treatment was performed under local anesthesia. The rubber dam was placed before the onset of the endodontic treatment. The root canal was prepared chemo-mechanically with the modified crown-down technique using Nickel Titanium (NiTi) 0.04 rotary instruments (K3, Kerr, Glendora, CA, USA) on a working length. The working length (WL) was 27 mm and was confirmed both with the indication of the endometer (Raypex 5, VDW, Munich, Germany) and radiologically. Apical gauging was determined with 0.02 hand K-file NiTi ISO 30, so the diameter of apical foramen measured 0.30 mm. The root canal irrigation protocol along with ultrasonic activation (PUI) included the following: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl), 40% citric acid (CA), and triple distilled water. Between the following instruments, the root canal

was irrigated with 2 mL of NaOCl with PUI. After the final shape was completed, the root canal was rinsed with 10 mL of NaOCl and 5 mL of CA. The final rinse was carried out with 2 mL of NaOCl and 2 mL of triple distilled water. Every time, the irrigation needle was placed at a depth of 2 mm from the apex.

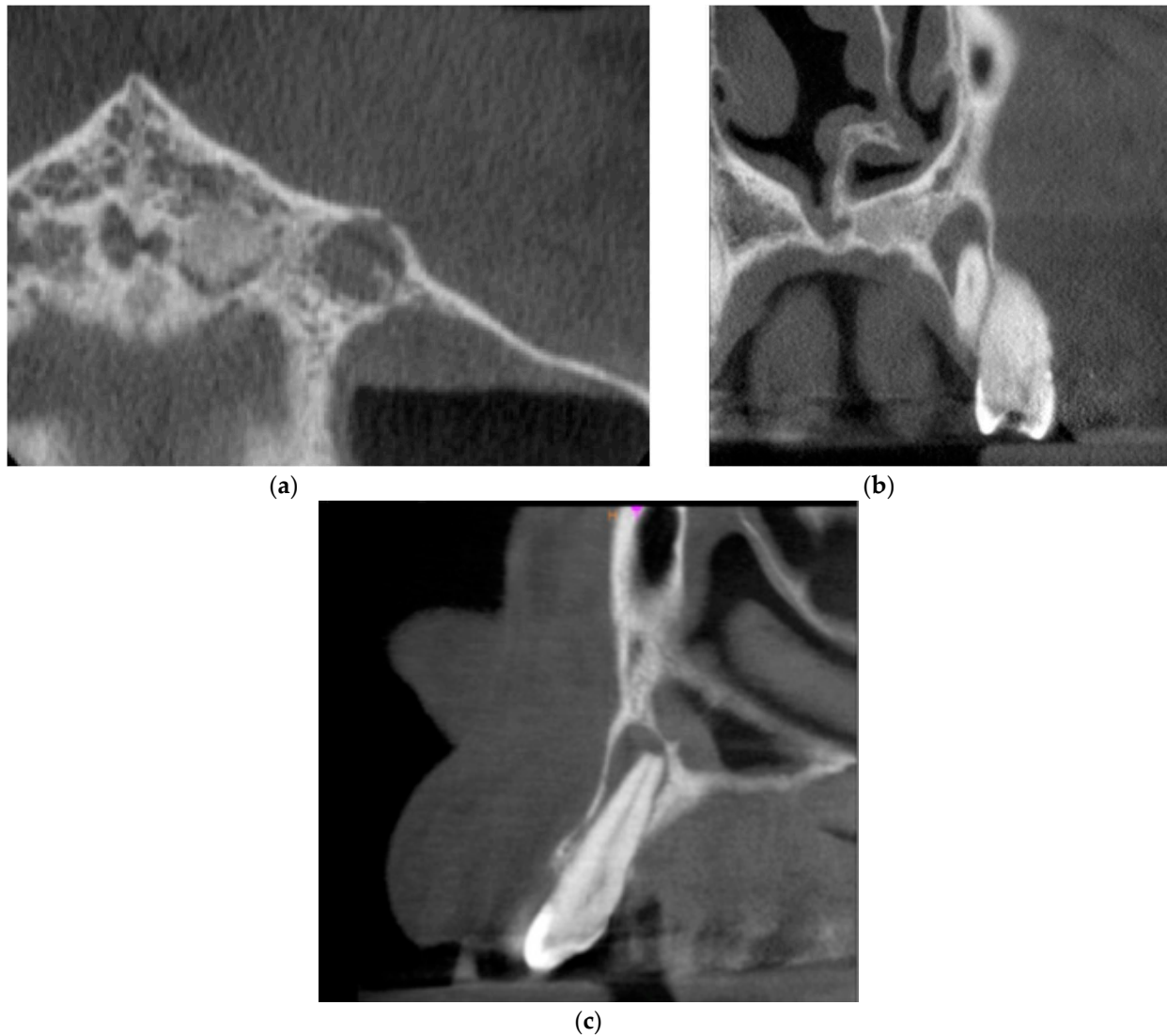


Figure 1. Preoperative cone beam computerized tomography (CBCT) images presenting the periapical lesion around the root of tooth no. 23 (date of CBCT examination: 22 May 2020): (a) axial view; (b) coronal view; and (c) sagittal view.

The patient's blood was drawn from a median cubital vein and collected in glass tubes (each 10 mL). Next, the patient's blood was centrifugated at 1200 rpm for 8 min in the Neuation iFuge D06 Premium Edition (Neuation Technologies Pvt., Gandhinagar, Gujarat, India) centrifuge to obtain advanced platelet-rich fibrin (A-PRF). Figure 2 presents the probe with the obtained A-PRF after centrifugation.



Figure 2. The probe with the obtained advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) after centrifugation.

Using sterile tweezers, the fibrin clot was squeezed between two gauze pieces to create an autologous fibrin membrane. After the root canal was dried with paper cones, the freshly prepared A-PRF membrane was placed into the apex and then pushed below the level of the cementodentinal junction using Machtou hand pluggers—size 1/2 NiTi (red) and 3/4 (grey).

Figure 3 presents the application of the A-PRF into the root apex of tooth no. 23.

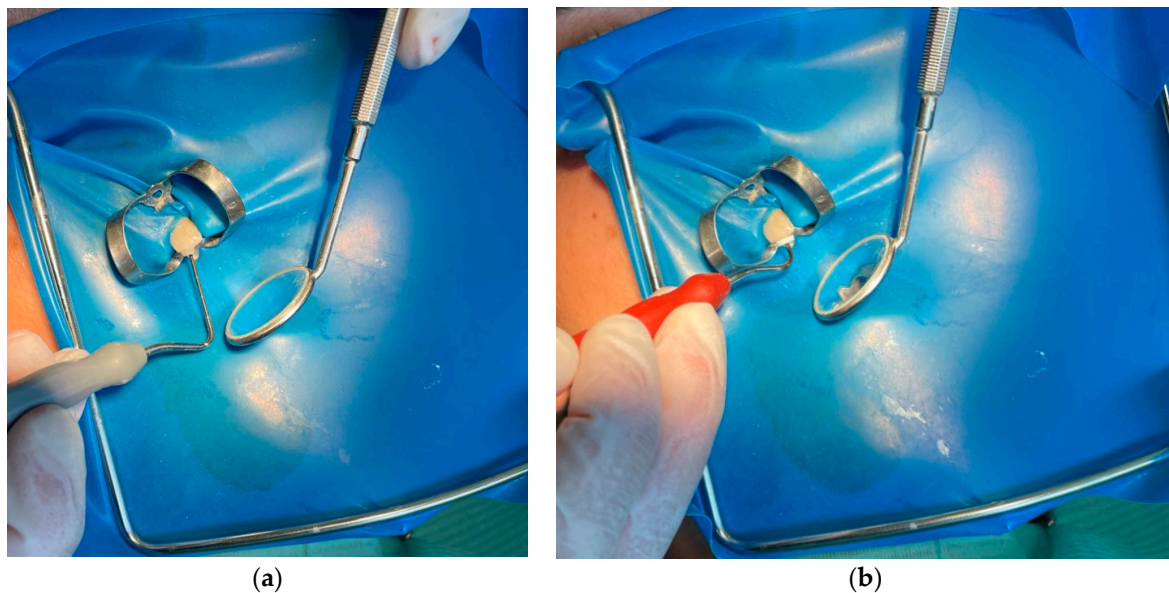


Figure 3. Application of A-PRF with a Machtou hand plugger: (a) initial A-PRF application with a grey Machtou hand plugger; (b) application of A-PRF with a red Machtou hand plugger below the cementodentinal junction.

Finally, the root canal was filled by a thermoplastic method (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmBH, Munchen, Germany) with calibrated gutta-percha cone MAC ISO 30.04 and AH-plus sealer (Dentsply DeTrey GmbH, Philadelphia, PA, USA), using the combination of a Downpack heat source with a Backfill extruder. The methodology of the endodontic treatment was based on the guidelines of the American Association of Endodontists and the European Society of Endodontology [11,12]. Follow-up appointments took place after 1 week, 3 months, and 6 months.

The first follow-up appointment was conducted 1 week after the end of the treatment. The patient reported that the pain after the treatment lasted for 24 h. There were no symptoms of an acute inflammation in the intraoral examination. The gingiva was smooth, pink, and humid, with no pain on palpation. The mobility of the tooth was reduced to Grade 2 Miller mobility index. PD max = 9 mm. The reaction to vertical and horizontal percussion was still positive.

The second check-up was carried out 3 months after the end of the treatment. The patient reported that there had been no incidents of pain during that period. No features of inflammation were noticed during the examination. The gingiva was smooth, pink, and humid, with no pain on palpation. The mobility of the tooth was within the physiological limits (Grade 1 Miller mobility index). PD max = 7 mm. The reaction to vertical percussion was positive, but the reaction to horizontal percussion was negative.

The third and final appointment was scheduled 6 months after the end of root canal treatment. Intraoral examination revealed healing progression. The gingiva was smooth, pink, and humid, with no pain on palpation. The mobility of the tooth was within the physiological limits (Grade 1 Miller mobility index). The reaction of tooth 23 to vertical and horizontal percussion was negative. PD max = 4 mm. The CBCT images presented healing of the periapical lesion. There was a small area of radiolucency around tooth no. 23 with the dimensions of $2.6 \times 1.0 \times 0.6$ mm. Figure 4 presents the CBCT images of the periapical lesion healing process 6 months after the end of endodontic treatment.

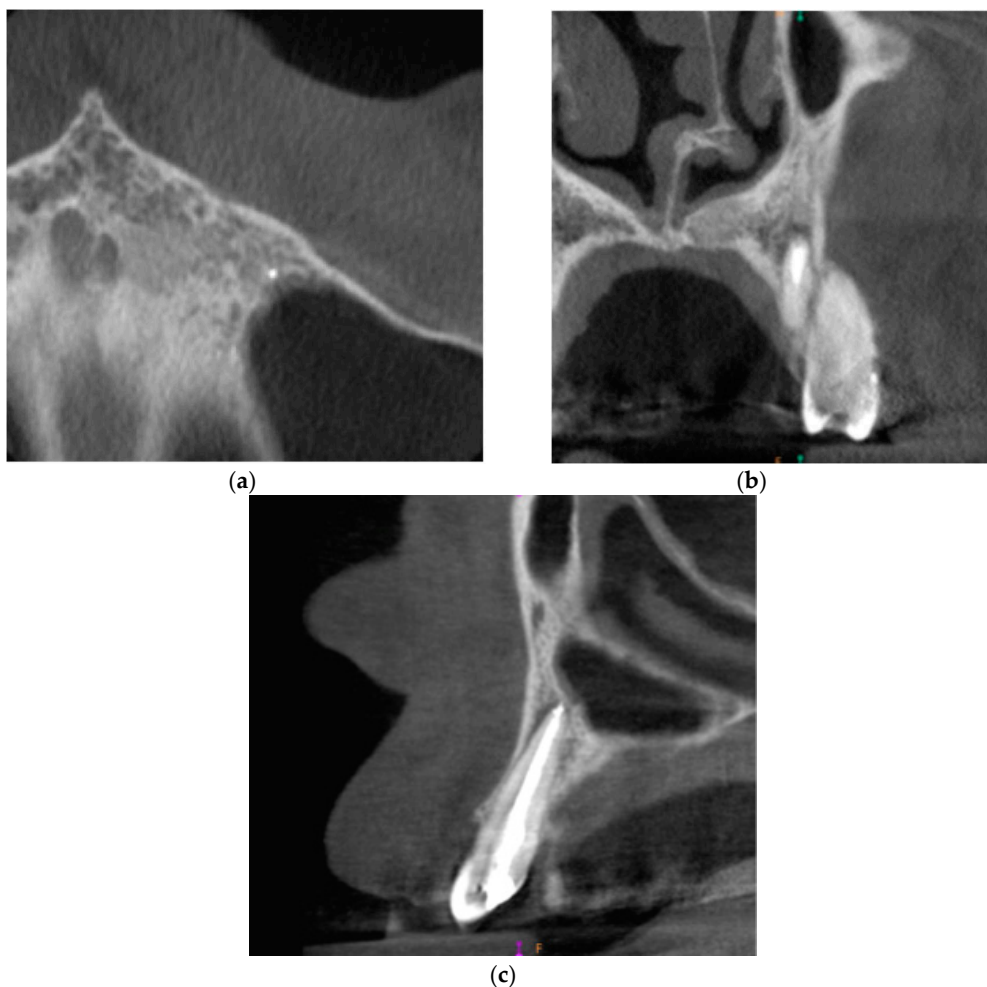


Figure 4. CBCT images presenting the healing process of the periapical lesion around the root of tooth no. 23 (date of CBCT examination: 8 December 2020): (a) axial view; (b) coronal view; and (c) sagittal view.

3. Case Report—Patient B: Pulp Necrosis with Asymptomatic Apical Periodontitis

A 42-year old male patient came to the Department of Endodontic Dentistry Medical University of Gdansk because of caries in tooth 23 (upper left canine, according to the FDI dental numbering system). The patient was generally healthy. Medical history and extraoral examination were not significant. No soft-tissue abnormality was found in the intraoral examination. Tooth 23 presented Grade 2 Miller mobility index. There was no exudation from the periodontal pocket. The pocket depth was measured; PD max = 3 mm. Tooth no. 23 did not respond to the electric stimuli, which confirmed the tooth was not vital. The reaction to vertical percussion was positive, whereas the reaction to horizontal percussion was negative.

The CBCT of tooth 23 was taken. The periapical lesion was also measured with the use of CS 3D Imaging v3.5.18 Software (Carestream Health Inc., Trophy, Croissy-Beaubourg, France). The measured dimensions of the lesion were $12.7 \times 8.7 \times 6.4$ mm. The CBCT images of the periapical lesion are presented in Figure 5.



Figure 5. Preoperative CBCT images presenting the periapical lesion around the root of tooth no. 23 (date of CBCT examination: 19 January 2021): (a) axial view; (b) coronal view; and (c) sagittal view.

The patient was diagnosed with pulp necrosis with asymptomatic apical periodontitis of tooth 23. The endodontic treatment was performed with the modified crown-down technique, using NiTi 0.04 rotary instruments (K3, Kerr, Glendora, California, USA) on a working length. The working length (WL) in this case was 29 mm and apical gauging was

measured by hand 0.02 K-file ISO 30 and 35, so the diameter of the apical foramen was larger than 0.3 mm, but smaller than 0.35 mm. A-PRF was applied in the same manner as in Patient A. Then, the root canal was filled by a thermoplastic method (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmbH, Munchen, Germany) with calibrated gutta-percha cone MAC ISO 35.04 and AH-plus sealer (Dentsply DeTrey GmbH, Philadelphia, PA, USA). There were also three follow-up appointments, after 1 week, 3 months, and 5 months.

One-week follow-up: no pain after the treatment was reported. No abnormalities of the soft tissue were noticed. The mobility of the tooth was within the physiological limits (Grade 1 Miller mobility index). The reaction to vertical percussion was positive.

Three months after the treatment: no incidents of pain were observed by the patient. During intraoral examination, the gingiva was smooth, pink, humid, and painless. The mobility of the tooth was within the physiological limits (Grade 1 Miller mobility index). The reaction to vertical percussion was negative.

Finally, 5 months after the end of the treatment, there was no evidence of any pathological symptoms. The CBCT images revealed the process of healing of the periapical lesion. There was a small area of radiolucency around tooth no. 23 with the reduced dimensions of $4.6 \times 4.6 \times 2.1$ mm. Figure 6 presents the CBCT images of the healing process of the periapical lesion 5 months after the end of endodontic treatment.

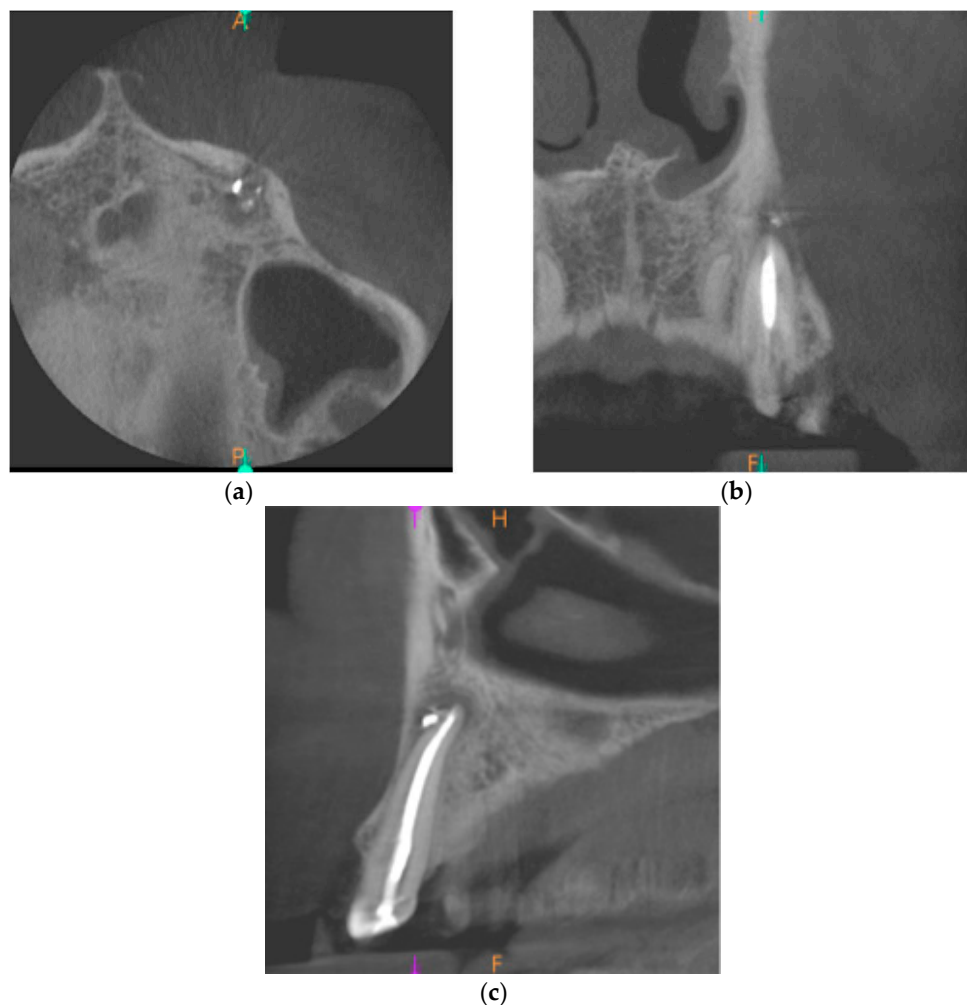


Figure 6. CBCT images presenting the healing process of the periapical lesion around the root of tooth no. 23 (date of CBCT examination: 29 June 2021): (a) axial view; (b) coronal view; and (c) sagittal view.

4. Discussion

Within this article, two clinical cases diagnosed with periapical lesions are presented. Both of the cases were treated with conventional RCT (with the principles of the American Association of Endodontists and the European Society of Endodontology) with an additional A-PRF application by the apical foramen to the periapical area. Six months after the end of the performed endodontic treatment, healing of the periapical lesions was noticed.

Despite the fact that the performed endodontic treatments can definitely be recognized as successful, it must be emphasized that mechanical shaping and cleaning of the root canals with special disinfecting solutions significantly affect the clinical efficacy of the endodontic treatment. These procedures lead to elimination of the pathogens from the root canals [13–15]. Sabeti et al. [16] emphasized that healing of the periapical tissues strongly depends on the proper decontamination of root canal systems, host immune response, and good coronal seal, which may be obtained with the properly prepared crown restoration.

Moreover, it is known that apical papilla stem cells (SCAPs) are able to survive at apical periodontitis and may even further develop after an endodontic infection [17,18]. SCAPs promote the growth of new tissues [18,19]. They present osteogenic potential and increase angiogenesis [18]. On the basis of the presented cases, it seems impossible to state if and how PRF affected SCAPs' activity, as well as what exactly the role of SCAPs was in the healing process of the periapical lesions.

Therefore, although the presented cases look very promising, it seems impossible to state that PRF played the leading role in the healing process of the presented periapical lesions. Further studies, especially randomized, double-blind controlled trials, must be performed to assess if the endodontic treatment of permanent, mature teeth with periapical lesions with an additional PRF application is superior to the endodontic treatment performed alone.

According to the guidelines of the European Society of Endodontology, periapical lesions should be observed for a minimum of four years. If the area of radiolucency remained the same size or the size changes are indiscernible, the endodontic treatment is recognized as a failure and an additional treatment is required, including endodontic surgery, or even tooth extraction [11]. Zhang et al. [20] radiographically analyzed the size of the periapical lesions for two years after RCT had been completed. The authors noticed that 92% of the examined teeth presented reduced areas of radiolucency 1 year after RCT. Two years after RCT, in 63% of cases, further reduction of the periapical lesions was observed; in 33% of cases, the periapical lesions remained unchanged; and in 3% of the analyzed cases, the volume of periapical lesions increased. Zhang et al. [20] concluded that healing of periapical lesions is a dynamic, long-lasting process.

Autologous platelet concentrates have been widely used in regenerative endodontics for the treatment of immature teeth. It has been proven that platelet concentrates are able to stimulate apical closure [21]. Although the impact of PRF on healing of the periapical lesions in immature necrotic teeth has been discussed by many researchers, the results are not unequivocal [22,23]. PRF may be considered as an ideal bioscaffold to increase proliferation and differentiation of cells that take part in the process of tissue repair [24]. Moreover, it has been found that reduction of the relative centrifugal force improves the regenerative potential of the PRF-based matrices [25]. A-PRF and A-PRF+ are the modifications of PRF that are obtained with the principles of the low speed centrifugation concept (LSCC) [26].

So far, there have not been any manuscripts published analyzing the clinical effects of conventional RCT with supplementary PRF application in the treatment of periapical lesions in mature teeth. Only few case reports have been presented of permanent, mature teeth with periapical lesions treated with RCT combined with surgical procedures, including curettage of the defect and sometimes apical resection [27–38]. The defects were filled with either platelet concentrate alone or platelet concentrate mixed with bone substitutes [27–38]. Despite the fact that all of the published cases were successful, they do not support the exact role of PRF in the process of healing. Parikh et al. [38] presented an

interesting case of a patient with exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth 11 and 21, treated with RCT and curettage of the defect. PRP gel was placed only at the site of the larger defect (left side). The authors observed that the side with PRP healed better compared with the other side.

5. Conclusions

RCT combined with an additional application of A-PRF (by the apical foramen to the periapical area), performed in permanent, mature teeth diagnosed with periapical lesions, led to a significant decrease in the periapical lesions' size within six months. However, these observations do not explain the exact role of the A-PRF in the process of healing.

Author Contributions: Conceptualization, K.M. and A.Z.; methodology, K.M., A.Z. and M.D.; validation, K.M., A.Z. and M.D.; formal analysis, K.M. and M.D.; investigation, K.M.; resources, K.M. and M.D.; writing—original draft preparation, K.M.; writing—review and editing, A.Z., M.D. and E.P.; visualization, K.M.; supervision, M.D., A.Z. and E.P.; project administration, K.M., A.Z. and M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the Department of Endodontic Dentistry, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, Poland.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Independent Bioethics Committee for Scientific Research at Medical University of Gdansk (protocol code: NKBBN/607/2019, date of approval: 5 November 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ng, Y.L.; Mann, V.; Rahbaran, S.; Lewsey, J.; Gulabivala, K. Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature—Part 2. Influence of clinical factors. *Int. Endod. J.* **2008**, *41*, 6–31. [[CrossRef](#)]
- Ng, Y.L.; Mann, V.; Gulabivala, K. Outcome of secondary root canal treatment: A systematic review of the literature. *Int. Endod. J.* **2008**, *41*, 1026–1046. [[CrossRef](#)]
- Murray, P.E.; Garcia-Godoy, F.; Hargreaves, K.M. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. *J. Endod.* **2007**, *33*, 377–390. [[CrossRef](#)]
- Diogenes, A.; Ruparel, N.B.; Shiloah, Y.; Hargreaves, K.M. Regenerative endodontics: A way forward. *J. Am. Dent. Assoc.* **2016**, *147*, 372–380. [[CrossRef](#)]
- He, L.; Kim, S.G.; Gong, Q.; Zhong, J.; Wang, S.; Zhou, X.; Ye, L.; Ling, J.; Mao, J.J. Regenerative Endodontics for Adult Patients. *J. Endod.* **2017**, *43*, S57–S64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gathani, K.M.; Raghavendra, S.S. Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dent. Res. J.* **2016**, *13*, 379–386. [[CrossRef](#)]
- Liang, Y.; Ma, R.; Chen, L.; Dai, X.; Zuo, S.; Jiang, W.; Hu, N.; Deng, Z.; Zhao, W. 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*, 436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, e37–e44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miron, R.J.; Zucchelli, G.; Pikos, M.A.; Salama, M.; Lee, S.; Guillemette, V.; Fujioka-Kobayashi, M.; Bishara, M.; Zhang, Y.; Wang, H.L.; et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 1913–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, Y.; Sun, X.; Yu, J.; Wang, J.; Zhai, P.; Chen, S.; Liu, M.; Zhou, Y. Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 3295756. [[CrossRef](#)]
- European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: Consensus report of the European Society of Endodontology. *Int. Endod. J.* **2006**, *39*, 921–930. [[CrossRef](#)]

12. Guide to Clinical Endodontics. Available online: <https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/guide-clinical-endodontics/> (accessed on 17 July 2021).
13. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 299–303. [[CrossRef](#)]
14. Rodrigues, R.C.; Antunes, H.S.; Neves, M.A.; Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Infection Control in Retreatment Cases: In Vivo Antibacterial Effects of 2 Instrumentation Systems. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1600–1605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nagendrababu, V.; Jayaraman, J.; Suresh, A.; Kalyanasundaram, S.; Neelakantan, P. Effectiveness of ultrasonically activated irrigation on root canal disinfection: A systematic review of in vitro studies. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 655–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sabeti, M.A.; Nekofar, M.; Motahhary, P.; Ghandi, M.; Simon, J.H. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment with and without obturation in dogs. *J. Endod.* **2006**, *32*, 628–633. [[CrossRef](#)]
17. Palma, P.J.; Martins, J.; Diogo, P.; Sequeira, D.; Ramos, J.C.; Diogenes, A.; Santos, J.M. Does Apical Papilla Survive and Develop in Apical Periodontitis Presence after Regenerative Endodontic Procedures? *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 3942. [[CrossRef](#)]
18. Chrepa, V.; Pitcher, B.; Henry, M.A.; Diogenes, A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *J. Endod.* **2017**, *43*, 561–567. [[CrossRef](#)]
19. Palma, P.J.; Ramos, J.C.; Martins, J.B.; Diogenes, A.; Figueiredo, M.H.; Ferreira, P.; Viegas, C.; Santos, J.M. Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J. Endod.* **2017**, *43*, 1279–1287. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, M.M.; Liang, Y.H.; Gao, X.J.; Jiang, L.; van der Sluis, L.; Wu, M.K. Management of Apical Periodontitis: Healing of Post-treatment Periapical Lesions Present 1 Year after Endodontic Treatment. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1020–1025. [[CrossRef](#)]
21. Murray, P.E. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Joshi, S.R.; Palekar, A.U.; Pendyala, G.S.; Mopagar, V.; Padmawar, N.; Shah, P. Clinical Success of Platelet-rich Fibrin and Mineral Trioxide Aggregate (MTA) or MTA-like Agents in Healing of Periapical Lesion in Nonsurgically Treated Pulpless Immature Permanent Teeth: A Systematic Review. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2020**, *10*, 379–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Karan, N.B.; Aricioğlu, B. Assessment of bone healing after mineral trioxide aggregate and platelet-rich fibrin application in periapical lesions using cone-beam computed tomographic imaging. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1065–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rizk, H.M.; Salah Al-Deen, M.S.M.; Emam, A.A. Comparative evaluation of Platelet Rich Plasma (PRP) versus Platelet Rich Fibrin (PRF) scaffolds in regenerative endodontic treatment of immature necrotic permanent maxillary central incisors: A double blinded randomized controlled trial. *Saudi Dent. J.* **2020**, *32*, 224–231. [[CrossRef](#)]
25. Wend, S.; Kubesch, A.; Orłowska, A.; Al-Maawi, S.; Zender, N.; Dias, A.; Miron, R.J.; Sader, R.; Booms, P.; Kirkpatrick, C.J.; et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28*, 188. [[CrossRef](#)]
26. El Bagdadi, K.; Kubesch, A.; Yu, X.; Al-Maawi, S.; Orłowska, A.; Dias, A.; Booms, P.; Dohle, E.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.J.; et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: A proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* **2019**, *45*, 467–479. [[CrossRef](#)]
27. Kavitha, M.; Krishnaveni, R.; Swathi, A.M.; Abubacker, M.H.M. Evaluation of healing by Cone Beam Computed Tomography (CBCT) using Platelet-Rich Plasma (PRP) + β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) and Platelet Rich Fibrin (PRF) + β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) in periapical lesions: Case report. *Niger. J. Clin. Pract.* **2020**, *23*, 1026–1029. [[CrossRef](#)]
28. Sureshbabu, N.M.; Ranganath, A.; Jacob, B. Concentrated Growth Factor—Surgical Management of Large Periapical Lesion Using a Novel Platelet Concentrate in Combination with Bone Graft. *Ann. Maxillofac. Surg.* **2020**, *10*, 246–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Taschieri, S.; Rosano, G.; Weinstein, T.; Bortolin, M.; Del Fabbro, M. Treatment of through-and-through bone lesion using autologous growth factors and xenogeneic bone graft: A case report. *Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *16*, 57–64. [[CrossRef](#)]
30. Shivashankar, V.Y.; Johns, D.A.; Vidyanath, S.; Sam, G. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. *J. Conserv. Dent.* **2013**, *16*, 261–264. [[CrossRef](#)]
31. Zhao, J.H.; Tsai, C.H.; Chang, Y.C. Management of radicular cysts using platelet-rich fibrin and bioactive glass: A report of two cases. *J. Formos. Med. Assoc.* **2014**, *113*, 470–476. [[CrossRef](#)]
32. Dudeja, P.G.; Dudeja, K.K.; Garg, A.; Srivastava, D.; Grover, S. Management of a Previously Treated, Calcified, and Dilacerated Maxillary Lateral Incisor: A Combined Nonsurgical/Surgical Approach Assisted by Cone-beam Computed Tomography. *J. Endod.* **2016**, *42*, 984–988. [[CrossRef](#)]
33. Wadhwa, J.; Gupta, A.; Hans, S. Evaluation of Periapical Healing of Apicomarginal Defect in Mandibular First Molar Treated with Platelet Rich Fibrin: A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **2017**, *11*, ZD01–ZD03. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vidhale, G.; Jain, D.; Jain, S.; Godhane, A.V.; Pawar, G.R. Management of Radicular Cyst Using Platelet-Rich Fibrin & Iliac Bone Graft—A Case Report. *J. Clin. Diagn Res.* **2015**, *9*, ZD34–ZD36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bains, R.; Bains, V.K.; Loomba, K.; Verma, K.; Nasir, A. Management of pulpal floor perforation and grade II Furcation involvement using mineral trioxide aggregate and platelet rich fibrin: A clinical report. *Contemp. Clin. Dent.* **2012**, *3* (Suppl. 2), S223–S227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Demiralp, B.; Keleşli, H.G.; Muhtarović, M.; Serper, A.; Demiralp, B.; Eratalay, K. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: A case report. *J. Endod.* **2004**, *30*, 796–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hiremath, H.; Motiwala, T.; Jain, P.; Kulkarni, S. Use of second-generation platelet concentrate (platelet-rich fibrin) and hydroxyapatite in the management of large periapical inflammatory lesion: A computed tomography scan analysis. *Indian J. Dent. Res.* **2014**, *25*, 517–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Parikh, B.; Navin, S.; Vaishali, P. A comparative evaluation of healing with a computed tomography scan of bilateral periapical lesions treated with and without the use of platelet-rich plasma. *Indian J. Dent. Res.* **2011**, *22*, 497–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Review

Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: A Narrative Review

Agata Zoltowska, Katarzyna Machut, Elzbieta Pawlowska and Marcin Derwich





Review

Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: A Narrative Review

Agata Zoltowska ¹, Katarzyna Machut ¹, Elzbieta Pawlowska ² and Marcin Derwich ^{3,*}

¹ Department of Endodontic Dentistry, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland; azolt@gumed.edu.pl (A.Z.); katarzyna.machut@gumed.edu.pl (K.M.)

² Department of Orthodontics, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; elzbieta.pawlowska@umed.lodz.pl

³ ORTODENT, Specialist Orthodontic Private Practice in Grudziadz, 86-300 Grudziadz, Poland

* Correspondence: derwichm@tlen.pl; Tel.: +48-660-723-164

Abstract: Platelet concentrates have been widely used in regenerative medicine, including endodontics. The aim of this manuscript was to assess critically the efficacy of PRF in the treatment of endodontic periapical lesions in adult patients on the basis of the literature. The PICO approach was used to properly develop literature search strategies. The PubMed database was analyzed with the keywords: “((PRP) OR (PRF) OR (PRGF) OR (CGF)) AND (endodontic) AND ((treatment) OR (therapy))”. After screening of 155 results, 14 articles were included in this review. Different types of platelet concentrates are able to stimulate the processes of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. Platelet rich fibrin (PRF) releases growth factors for at least 7 days at the application site. Growth factors and released cytokines stimulate the activity of osteoblasts. Moreover, the release of growth factors accelerates tissue regeneration by increasing the migration of fibroblasts. It was not possible to assess the efficacy of PRF supplementation in the treatment of endodontic periapical lesions in permanent, mature teeth with closed apices, due to the lack of well-designed scientific research. Further studies are needed to analyze the effect of PRF on the healing processes in the periapical region.

Keywords: plasma rich in growth factors; platelet rich fibrin; advanced platelet rich fibrin; apical periodontitis; endodontics; endodontic treatment; bone regeneration



Citation: 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*, 1041. <https://doi.org/10.3390/ph14101041>

Academic Editor: Bin Duan

Received: 30 September 2021

Accepted: 12 October 2021

Published: 13 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The term “periapical periodontium” encompasses all of the periradicular tissues localized in the area of the apex of the root, including periodontal ligaments, cementum and alveolar bone. Periapical periodontium is a part of the tooth suspension apparatus [1]. Apical periodontitis is the inflammatory process localized within the periapical periodontium, which is known as the host defense to the invasive microflora localized in the root canal system [2,3]. Nair describes the apical periodontitis as a dynamic encounter between root canal infection and host response [3]. There have been listed several different etiological factors which may cause the periapical periodontitis, namely: pulp pathology (infection, necrosis), tooth trauma, and also chemical, mechanical and bacterial factors related to the performed endodontic treatment (also known as root canal treatment) [2–8].

The onset of the inflammation within the periapical tissues depends on the time, the type of the pathological stimulus, and the susceptibility of the tissues [9]. Inflamed periapical tissues are considered to be free from bacteria [7]. However, there have also been published some studies, which confirm the presence of the bacteria biofilms on the root surfaces outside of the apical foramen. Noguchi et al. [10] detected *Fusobacterium nucleatum* (in all samples), *Porphyromonas gingivalis* (in 12 of 14 cases) and *Tannerella forsythensis* (in 8 of 14 samples) within the periradicular biofilms taken from the patients diagnosed with the resistant periapical periodontitis.

There are a few different treatment methods of chronic periradicular inflammatory processes, including root canal treatment (RCT), combination of conservative and surgical treatment (endodontic microsurgery), and sometimes, in non-prognostic cases—tooth extraction [4,8,11–14]. Moreover, some authors also recommend combination of above-mentioned methods of treatment with the physical therapy (biostimulation with laser therapy, iontophoresis, induction of low magnetic field, i.e., magnetostimulation). In authors' opinions additional physical therapy improves the effectiveness of a basic treatment and intensifies the regeneration processes and repairs [15–18].

Autologous platelets concentrate (APC) can be additionally used in the endodontic and surgical treatment, as well as after tooth extraction. APC has been found to be a biomaterial with a proven regeneration and repair improvement effect [19,20]. Platelets affect the process of angiogenesis by releasing growth factors from alpha-granules. The exemplary growth factors released from platelets alpha-granules are platelet-derived epidermal growth factor (PD-EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor-beta (TGF- β) [21–23].

There can be obtained various types of APC, depending on the exact method of centrifugation. Platelet rich plasma (PRP) is an exemplary type of APC, which is formed by mixing platelet concentrate, derived from the centrifugation of autologous whole blood, with thrombin and calcium chloride [24]. Contrary to PRP, to obtain platelet rich fibrin (PRF) no additional anticoagulants are needed. Apart from platelets, PRF contains many blood cells, including B and T lymphocytes, monocytes, neutrophils, stem cells, as well as growth factors [25].

So far, PRF has been widely discussed in the field of oral surgery and pediatric dentistry. However, very little is known about the efficacy of PRF in the treatment of periapical lesions in mature, permanent teeth with closed apices. Therefore, the aim of this manuscript was to assess critically the efficacy of PRF in the treatment of endodontic periapical lesions in adult patients on the basis of the literature.

2. Molecular Background of the Endodontic Periapical Lesions

2.1. Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines

The majority of the studies acknowledge that the periapical inflammation with the following bone destruction are mainly induced by the cytokines secreted in response to the bacterial infection within the root canal. Bacteria stimulate the secretion of proinflammatory cytokines, including: IL-1 β , IL-6, TNF- α [26–28].

There are pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines present within the periapical periodontitis. Both groups of cytokines play a significant role in the pathophysiology of the chronic inflammation in the area of periapical periodontium [29,30]. The pro-inflammatory cytokines (i.e., IL-1 α , IL-2 or TNF- α) are mainly produced by the Th1 cells, macrophages and neutrophils. They take part in bacterially-induced bone resorption. In contrast, the anti-inflammatory cytokines (i.e., IL-4, IL-10) are produced by the Th2 cells and protect bone against destruction. Moreover, the anti-inflammatory cytokines participate in the healing process of the periapical lesions [28–31].

De Carvalho Fraga et al. [32] analyzed the levels of different cytokines in human radicular cysts and periapical granulomas. The authors found that IFN- γ concentrations were increased in radicular cysts, whereas the expression of IL-4 was stronger in periapical granulomas. Furthermore, Walker KF et al. [33] showed, that Th2 cells and their products predominated in periapical lesions. In authors' opinion, the suppression of the inflammatory response combined with the increased number of Th2 lymphocyte subsets may directly affect the final outcome of the periapical pathological process.

Table 1 presents the general characteristics and functions of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines which occur within the periapical lesions on the basis of the literature [28,29,34–50].

Table 1. General characteristics and functions of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines which occur within the periapical lesions on the basis of the literature [28,29,34–50].

| Cytokine (Abbreviation) | Cytokine Receptors | Cytokine-Secreting Cells | Target Cells | Functions | Bone Effect |
|--|--|--|---|--|--|
| Interleukin-1 alpha (IL-1 α) | Interleukin-1 receptor (IL-1R): type I (IL1R1) and type II (IL1R2) | monocytes, macrophages, polymorphonuclear leucocytes (PMNs), fibroblasts, osteoclasts, epithelial cells, endothelial cells, B cells | T-cells, B-cells, neutrophils, osteoblasts, tissue cells | Induces the inflammation and regulates immune system by chemotactically activation of PMN. Stimulates the production of PG, proteolytic enzymes and proinflammatory cytokines IL-6, IL-8. | Bone destruction: stimulates bone resorption and inhibits bone formation. Inhibits osteoblasts differentiation and probably induces apoptosis of osteoblasts. |
| Interleukin-1 beta (IL-1 β) | Interleukin-1 receptor (IL-1R): type I (IL1R1) and type II (IL1R2) | macrophages, dendritic cells, osteoblasts, fibroblasts (i.e., gingival fibroblasts, periodontal ligament cells), osteoblasts, epithelial and endothelial cells | T-cells, fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells | Induces the inflammation: accelerates blood flow in inflamed tissue, supports leucocyte recruitment and neutrophil diffusion and accumulation. | Bone destruction: promotes bone resorption by stimulating production of MMPs, (mainly MMP-9), RANKL, IL-6. |
| Interleukin-18 (IL-18) | Interleukin-18 receptor (IL-18R, CD218a) | macrophages, dendritic cells, monocytes, keratinocytes, CNS cells, osteoblasts, endothelial cells | T-cells (CD4 and CD8), NK-cells, basophils, mast cells | Induces the production of IFN γ by T-cells and NK-cells. Induces Th cell-mediated immunity. Promotes proliferation of Th1. | Bone destruction: promotes osteoclastogenesis by regulation of RANKL production. |
| Interleukin-6 (IL-6) | Interleukin-6 receptor (IL-6R, CD126) | monocytes, polymorphonuclear leucocytes (PMNs), osteoclasts, macrophages, T-cells (Th2), B-cells, fibroblasts, endothelial cells | T-cells, B-cells, neutrophils, osteoblasts, tissue cells | Acute phase of inflammation: activates PMNs and T-cells. Stimulates B-lymphocytes differentiation into plasma cell. Induces protein synthesis. Suppresses the production of IL-1. | Bone destruction: induces bone resorption by promoting osteoclast differentiation. |
| Interleukin-8 (IL-8) | Interleukin-8 receptor A (IL-8RA, CXCR1) and interleukin-8 receptor B (IL-8RB, CXCR2) | monocytes, macrophages, PMNs, bone marrow stromal cells, osteoblasts, osteoclasts, synovial fibroblasts, chondrocytes | neutrophils, basophils | Chemotactic factor: attracts and activates PMNs and osteoclasts. | Bone destruction (potentially): stimulates osteoclastogenesis by osteoclasts differentiation and production, by stimulating RANKL expression and directly by stimulation of osteoclasts production and activation. |
| Interleukin-10 (IL-10) | Interleukin-10 receptor: (IL-10R) type I (IL-10R1) and type II (IL-10R2) | T-cells, monocytes, dendritic cells, B-cells, mast-cells, eosinophils | Th1, macrophages, NK-cells | Inhibits the production of cytokines by Th1: IL-1, IL-6 and IFN γ . Inhibits synthesis of NO and proteases (such as collagenases). Stimulates the secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases and osteoprotegerin. | Inhibits bone resorption, suppresses the osteoclastogenesis and activates proliferation of osteoblasts. |
| Interleukin-17 | Interleukin-17 receptor (IL-17R) | Th17, Tregs | T-cells, B-cells, osteoblasts, tissue cells | Induces the inflammation. Activates secretion of IL-1, IL-6, TNF α , GCP-2 and IL-8. Induces migration of neutrophils. | Bone destruction: stimulates bone resorption, stimulates the production of RANKL by osteoblast and mesenchymal stem cells, disturbs balance of RANKL/OPG, which promotes osteoclastogenesis. |
| Tumor Necrosis Factor α (TNF α) | Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1, CD120a); Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2, CD120b) | macrophages, monocytes, lymphocytes (Th1), mast cells | macrophages, granulocytes, endothelial cells | Induces the inflammation by activating lymphocytes and monocytes. | Bone destruction: stimulates bone resorption, supports osteoclastogenesis with RANKL, promotes differentiation of osteoclasts and suppresses formation of osteoblasts. |

Table 1. Cont.

| Cytokine (Abbreviation) | Cytokine Receptors | Cytokine-Secreting Cells | Target Cells | Functions | Bone Effect |
|--|--|--|---|---|---|
| Interferon gamma (IFN γ) | Interferon gamma receptor 1 (IFNGR1, CD119) and Interferon gamma receptor 2 (IFNGR2) | T-cells (CD4+, CD8+), Treg cells, B-cells, NK cells | monocytes, lymphocytes, tissue cells, mesenchymal stem cells (MSCs) | Activation of macrophages and differentiation of B-cells. Induces production of IL-1, NO and oxygen. | Inhibits bone resorption: inhibits production and differentiation of osteoclasts, activates apoptosis of osteoclasts. Indirectly down-regulates RANKL-dependent osteoclastogenesis. Promotes differentiation of osteoblast from MSCs. |
| Interleukin-4 (IL-4) | Interleukin-4 receptor (IL-4, CD124) | Th2 | Th17 | Suppresses Th17 formation and production of IL-1. Stimulates the secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases and osteoprotegerin. | Inhibits bone resorption, inhibits the osteoclast differentiation. It may promote osteoprotegerin production. |
| Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF aka CSF2) | GM-CSF receptor (GM-CSFR) | macrophages, mast cells, T-cells, fibroblasts, NK cells, endothelial cells | bone marrow stem cells, macrophages, neutrophils | Takes part in hematopoiesis. Induces production of granulocytes (neutrophils, basophils, eosinophils) and monocytes from bone marrow stem cells. Activates macrophages. Enhances neutrophils migration. | Inhibits formation of osteoclasts from progenitor cells, reduces the RANKL/RANK activity. The increased level of dendritic cells makes GM-CSF activate osteoclastogenesis. |

B-cell-lymphocyte type B, CD-cluster of differentiation, CNS cells-central nervous system cells, GCP-2-granulocyte chemotactic protein-2, IFN γ -interferon γ , IL-interleukin, MMP-matrix metalloproteinase, MSC-mesenchymal stem cell, NK-natural killer T-cell, NO-nitrous oxide, OPG-osteoprotegerin, PG-prostaglandin, PMN-polymorphonuclear leucocytes, RANK-Receptor Activator for Nuclear Factor κ B, RANKL-Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand, T-cell-lymphocyte type T, Th-T helper lymphocyte, TNF α -tumor necrosis factor α , Treg cell-regulatory T cell.

2.2. The Role of MicroRNA (miRNA) in Bone Resorption and Pathogenesis of Apical Periodontitis

MicroRNA (miRNA) is an endogenous, single-stranded, short (21 to 25 nucleotides), non-coding RNA that modulates post-transcriptional gene expression [51]. miRNA can bind to multiple mRNAs and lead to inhibition of protein translation or interfere with mRNA splicing. One mRNA can have multiple miRNA binding sites [52]. miRNA binds to the mRNA target sites, which are located in the 3' untranslated regions (3'UTR). This binding may stop the expression of transcripts, and consequently reduce the proteins quantity [53,54].

Genes of miRNA are transcribed by RNA polymerase II into primary miRNAs (pri-miRNAs) [55]. pri-miRNAs are processed by Drosha/DGCR8 nuclear RNase III to a pre-miRNA. Then, this product is exported by Exportin-5 to the cytoplasm in a Ran-GTP-dependent manner. In the cytoplasm the pre-miRNAs are transformed by RNase III Dicer to acquire the mature miRNAs [56,57].

Here, miRNA may quickly reduce the amount of proteins present within the cell by lowering their expression from the transcripts. miRNAs regulate the majority of cellular processes, including cell division, differentiation, aging, the course of their metabolism and finally apoptosis [58,59]. Furthermore, there may be a link between the miRNA activity and regulation of inflammation and oxidative stress [60].

In this case, miRNA was also found to play a significant role in the pathogenesis of apical periodontitis. Chan et al. [61] compared the expression of miRNAs in periapical lesions and healthy control tissues (normal periodontal ligament and pulp tissues). The material from periapical lesions was curetted from the bony cavity during the procedure of apicoectomy, performed in teeth with non-healing periapical lesions after root canal treatment. The authors identified 381 different miRNAs in periapical tissues, among which 24 miRNAs were down-regulated. One of the very important miRNAs' families, which appeared to be down-regulated, was the family of miR-181. The increase in the target messenger RNAs is the consequence of miRNAs downregulation. There have been listed several different miRNA targets, which affect both the inflammatory and immune response, including toll-like receptor-4 (TLR-4), interleukin-6 and -10 (IL-6, IL-10), chemokine ligand

8 (CCL8), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor α (VEGF- α) and metalloproteinase-9 (MMP-9) [61]. The miR-181a, miR-181b and miR-181c, miR-24-1, miR-95, miR-149 and miR-455-3p were detected in altered periapical tissues [61].

miRNA is also believed to regulate osteoclastogenesis [62]. The mineralized bone matrix is degraded by osteoclasts. Metalloproteinases (MMPs), which are one of the targets of the miRNA, were found to be able to degrade bone organic matrix [61,63]. Lack of miRNA activity inhibits osteoclast precursor cells to produce osteoclasts. Without the presence of miRNAs, the number of osteoclasts becomes reduced. Therefore, the amount of resorbed bone is limited [62]. miRNA-21 is a well-known miRNA, that promotes osteoclastogenesis and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [64,65]. It also regulates skin wound healing and affects collagen deposition [66]. Moreover, mi-RNA-21 is also a marker of chronic inflammation in diabetes mellitus (DM) [67]. miRNAs have been found to regulate the inflammation and oxidative stress, two processes which affect bone healing in the course of DM [65]. Baćević et al. [65] found that the usage of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) improved cranial bone healing in diabetics rabbits, by increasing expression levels of miRNA-21 and by reducing oxidative stress. It seems that L-PRF used either alone or with Bio-Oss as bone graft may be efficient in DM, because of affecting the expression of miRNA-21 [65].

Table 2 presents the exemplary miRNA occurring within the periapical lesions on the basis of the literature [61,68–72].

Table 2. Exemplary miRNA occurring within the periapical lesions on the basis of the literature [61,68–72].

| MicroRNA (miRNA) | Gene | Effect |
|------------------|----------|--|
| miRNA-155 | 21q21.3 | Inhibition of SEMA3A. Decreased expression of SEMA3A contributes to bone resorption. |
| miRNA-335-5p | 7q32.2 | In inflamed HPDLFs promotes bone resorption (RANKL). |
| miRNA-181b-5p | 1q32.1 | Positive regulation of: acute inflammation (activation of NK-cells, monocytes, T-cells), angiogenesis, macrophages differentiation. Cementoblasts apoptosis. |
| miRNA-146a | 5q33.3 | Anti-inflammatory activity. Negative regulation of IL-6, IL-1 β and TNF- α . |
| miRNA-10a-5p | 17q21.32 | Reduction of inflammation. Healing of apical periodontitis. |

SEMA3A–Semaphorin 3A, HPDLFs–Human Periodontal Ligament Fibroblasts, RANKL–Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand, T-cell-lymphocyte type T, NK–natural killer T-cell, IL-6–Interleukin 6, IL-1 β –Interleukin 1 beta, TNF α –Tumor Necrosis Factor.

3. Endodontic Treatment of Periapical Lesions

Endodontic periapical lesions are typically one of the indications for an endodontic treatment. In case of larger lesions, with a diameter greater than or equal to 8 mm, it is recommended to perform two-visit therapy [8]. In two-stands treatment, the root canal is temporarily filled between visits, usually with a medication based on a non-hardening calcium hydroxide (Ca(OH)₂).

Non-hardening Ca(OH)₂ has a bactericidal effect, stimulates tissue mineralization and finally induces the processes of regeneration and repair of periapical lesions [73–75]. A temporary Ca(OH)₂ filling is typically left in the root canal for 3 weeks, and should not be left for longer than 3 months. This period of time seems to be sufficient to observe healing of periapical lesions, both clinically and radiologically. Finally, after this period of time, the temporary filling material is removed from the root canal, and the endodontic treatment can be completed [8]. According to the recent researches, a long-lasting effect of Ca(OH)₂ for many months is denied. To eliminate sufficiently microbiota from root canal, it is enough to temporarily fill the root canal with non-hardening Ca(OH)₂ for one week [76]. Peters and Wesselink [77] compared the efficacy of two visit endodontic treatment (with the use of Ca(OH)₂ as a temporal filler of the root canal) with the single visit root canal treatment (canals were obturated with gutta-percha and AH-26 sealer without the use of

any temporal fillers). The authors did not notice any significant differences regarding the process of periapical lesions' healing.

However, it should be emphasized that mechanical removal of infected dentin and proper irrigation with antibacterial agents (most commonly used: sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine (CHX), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and mixture of tetracycline, acid and detergent (MTDA)) lead to almost complete elimination of bacteria from the root canal system [78]. Rodrigues et al. [79] conducted the clinical trial among patients who underwent endodontic treatment of the teeth due to chronic periodontitis and found that chemomechanical root canal preparation is highly efficient method of root canal eradication (eradication at the level of 83.7 to 96.7%). The efficiency of the irrigation process may be even increased with the ultrasonic activation of irrigants [80]. The recommended protocol for the final root canal irrigation is the combination of 5.25% sodium hypochlorite (in two cycles with ultrasonic activation), 40% citric acid and distilled water to reduce sodium hypochlorite and to neutralize citric acid [81].

Orstavik [82] found that almost 85% of periapical lesions healed within 48 months. However, only 42.5% of the lesions were in the process of healing 6 months after the end of endodontic treatment. According to the European Society of Endodontology guidelines, it is recommended to observe the periapical lesion for at least 4 years before further, more radical procedures will be performed. Healing of the periapical lesions is considered to be a prolonged process [26].

When RCT is not successful, the surgical procedures are performed. The aim of the endodontic surgical procedure is to remove the root apex with the adjacent inflammatory periapical lesion. There are different surgical procedures used for the treatment of periapical lesions, including the resection of the root apex, and hemisection, which aims to remove one root (in case of multi-rooted teeth), leaving the remaining ones undamaged [83,84]. Unfortunately, there are several complications related to the endodontic surgical procedures, including excessive bone loss, bleeding, damage to the adjacent anatomical structures (e.g., nerve bundles), periodontal complications such as a gingival recession or formation of an astringent scar [85]. As an alternative to a conventional surgery, microsurgical procedures can be carried out with the use of operating microscopy. The biggest advantage of microsurgical endodontics is minimizing the amount of a removed bone tissue. Due to the careful revision of the operation area, it is possible to perform the procedure precisely, and reduce the incidence of complications [85–87]. In addition, the retro preparation field and selection of the ultrasonic tip allow a more conservative approach to preserve more bone tissues [88].

When none of the abovementioned groups of methods of treatment is successful, the tooth is qualified for extraction [89,90]. The missing tooth always needs to be restored to maintain the stability of the entire stomatognathic system. If the missing tooth is not restored, the neighboring and opposite teeth start moving towards the space after the extracted tooth. Therefore, the disturbances in occlusion become created [89–91].

4. Platelet Concentrates—General Characteristics, and Role in the Endodontic Treatment

Platelets (PLT, thrombocytes) are the smallest blood components with a diameter of about 2.5 μm . They are fragments of megakaryocyte cytoplasm, surrounded by a cell membrane, devoid of a cell nucleus. The remaining cell organelles are typical for eukaryotic cells. Thrombocytes are characterized by an active metabolism, a highly organized cytoskeleton, as well as a presence of specific intracellular granules and adhesive proteins located on the surface of the PLT. Thrombocytes are terminally differentiated cells [21,92].

Platelets play a significant role in hemostasis. After a blood vessel interruption, platelets participate in the processes of activation, adhesion and aggregation. They also release substances contained in their granules. Platelets are also effector cells of the innate immune system. They can bind pathogens directly or indirectly through the receptor proteins (including TLR2, TLR4, TLR7, TLR9, etc.), to present them to neutrophils and cells

of the reticuloendothelial system [21,92,93]. The potential regenerative effect of platelets was first described by Ross et al. in 1974 [94].

In order to separate platelets from other blood elements, a centrifugation is carried out. Heavier elements fall down to the bottom of the tube, whereas the lighter ones float above. The lower layer consists of erythrocytes, while the upper one is composed of plasma. A platelet-leukocyte layer forms between these two fractions. The concentration of platelets in plasma is several times higher than in a non-centrifuged blood. This directly leads to an increased concentration of: PDGF, TGF β , integrins and other adhesion molecules [23].

There are two major types of PRF according to the current classification of platelet concentrates from 2009: P-PRF (pure platelet rich fibrin) and L-PRF (leukocyte and platelet rich fibrin) [95].

P-PRF, also known as leukocyte-poor platelet-rich fibrin, is an autologous material without leukocytes and with a high-density fibrin network. It only exists in a strongly activated gel form, therefore it cannot be injected. On the basis of the literature, there is currently only one commercially available P-PRF product—Fibrinet PRFM (Platelet-Rich Fibrin Matrix, Cascade Medical, Wayne, NJ, USA), which is mostly used in orthopedics and sports medicine. The huge disadvantage of using P-PRF is its cost comparing to L-PRF [95–97].

Leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) consists of leukocytes and a high-density fibrin network. There are two subcategories of L-PRF: A-PRF (advanced platelet rich fibrin) and i-PRF (injectable platelet rich fibrin) [96,97]. Their newest generations are named: A-PRF+ and i-PRF+. The novelty in obtaining platelet-rich fibrin refers to reduced centrifugation speed and time [98,99].

Newly invented PRF centrifugation protocols improve tissue regeneration [100]. The standard PRF is centrifuged at 2700 rpm for 12 min. Whereas to obtain the A-PRF, the blood is centrifuged at lower speeds, namely: 1500 rpm for 14 min. This modification of the centrifugation protocol leads to significant increase in the release of growth factors (PDGF, TGF- β 1, epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF)) in the application area, with a higher number of progenitor cells [99–101].

The main role of fibrin in the process of healing is hemostasis. However, it also regulates migration of fibroblasts and endothelial cells, which are involved in angiogenesis and are responsible for the new tissue formation. An important feature of PRF is the prolonged release of growth factors for at least 7 days at the application site [98]. Growth factors and released cytokines stimulate the activity of osteoblasts. The release of growth factors accelerates tissue regeneration by increasing the migration of fibroblasts [92,98,102,103]. VEGF stimulates angiogenesis, which is a crucial part of bone regeneration, as the blood supply promotes osteogenesis. It has been shown that angiogenesis occurs before osteogenesis in the healing of bone defects. VEGF can induce the mobilization, recruitment, proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) as well osteoblast recruitment and survival [104].

The leukocytes within L-PRF present antimicrobial properties. They can act directly (i.e., phagocytosis) [105] or indirectly, presenting immunomodulatory activity (i.e., antibodies production) [106]. Kour et al. [107] found that three different platelet concentrates, namely: PRP, PRF and i-PRF, show antibacterial ability against periopathogens present in the oral cavity, including *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.). The authors measured the width of inhibition zones to assess the antimicrobial properties of particular platelet concentrates. In case of P.g., i-PRF and PRP had significantly wider zones of inhibition comparing to PRF. In case of A.a., PRP had bigger zone of inhibition than PRF and i-PRF. Regarding the antibacterial properties against A.a., there were no significant differences between PRF and i-PRF [107].

Platelet concentrates, including PRF and PRP, are widely used in regenerative medicine, as well as in dentistry [108,109]. PRF can be used alone or in combination with other biomaterials. There are several different uses of platelet concentrates in dentistry, including: endodontic treatment of permanent teeth with incomplete apex development (pulpotomy,

revascularization and apexification), guided bone regeneration (alveolar bone augmentation, sinus lifting), periodontal treatment (plastic periodontology surgery, treatment of bone loss defects). Moreover, the use of PRF in guided tissue regeneration scaffold has been the subject of extended investigations [110–115].

5. Mesenchymal Stem Cells and Platelet Concentrates

Mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent, which means they can differentiate into various types of cells, i.e., osteoblasts, chondrocytes or adipocytes [116]. MSCs suppress the immune response. MSCs reduce the lymphocytes' immunological responses, affect antigen-presenting cells by inhibiting their maturation, and finally reduce the immune activity of NK cells [116,117]. The above presented features of MSCs allow mesenchymal cells to take part in the regeneration processes [116,118]. There are several different types of stem cells involved into the regeneration processes of dental pulp cells, including stem cells of the apical papilla (SCAPs), periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and human dental pulp cells (hDPCs) [119,120]. It has already been proven that autologous platelet concentrate may be a carrier for bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) [121] and may stimulate the processes of proliferation and differentiation of BMSCs [122]. Sequeira et al. [123] used PRP as a scaffold for SCAPs and found that SCAPs induced formation of dentin-like and pulp-like tissues.

Xu et al. [124] analyzed the effects of concentrated growth factor (CGF) on human dental pulp stem cells (hDPSCs), which were exposed to lipopolysaccharide (LPS). The authors found that LPS stimulates the expression of proinflammatory cytokines in hDPSCs. Dental pulp cells chronically exposed to proinflammatory cytokines lose their ability to differentiate to osteoblasts. Xu et al. [124] noticed that CGF limited the release of proinflammatory cytokines and stimulated proliferation, migration and differentiation of hDPSCs. Rochira et al. [125] observed that CGF alone can stimulate osteogenic differentiation of human Bone Marrow Stem Cells (hBMSCs). According to the study by Zhang et al. [126], both the CGF and L-PRF release growth factors, including bFGF, TGF- β 1 and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), which affect the differentiation of mesenchymal stem cells and lead to bone formation. The authors noticed that BMP-2 is released slowly for at least 7 days in CGF and L-PRF. Finally, Li et al. [127] summarized that CGF stimulates proliferation of different types of mesenchymal stem cells, including DPSCs, PDLSCs, as well as human mesenchymal stem cells (hTERT-E6/E7) in a dose-dependent manner.

6. PRF in the Endodontic Treatment of Permanent Teeth with Closed Apexes

The clinical effects of conventional RCT with an additional supplementation of PRF in the treatment of permanent teeth with closed apexes, diagnosed with periapical lesions, have been examined only by Machut et al. [128]. The authors presented two case reports with satisfactory bone healing 6 months after the end of RCT. The authors applied A-PRF membrane by the apical foramen to the periapical area. Permanent, mature teeth with closed apexes have mostly been treated with different types of PRF used as bone fillers (either alone or mixed with bone substitutes), and/or membranes placed over the bone defects in terms of endodontic surgery.

Soto-Peñaloza et al. [129] presented randomized clinical trial, which assessed the clinical effects of the use of A-PRF+ membranes in the endodontic surgery. This is the only one randomized clinical trial which analyzes the outcomes of PRF use in endodontic treatment of permanent teeth with closed apexes. The authors did not observe significant differences between the groups regarding postoperative pain. Moreover, only sleep and speech functions presented more limitations in control group.

All of the published case reports [130–141] revealed satisfactory bone healing after placing PRF or PRF mixed with bone substitutes inside the bone defects. However, they do not explain and answer the fundamental question if additional use of PRF in endodontic surgery is more beneficial for the patient than the conventional surgical procedures performed without any additional supplementation. Only Parikh et al. [141] compared the

results of RCT and curettage of the defect with the results of RCT and curettage of the defect and additional PRF gel supplementation, performed in two upper central incisors in one patient. The authors noticed that additional use of PRF led to better bone healing.

Table 3 presents the use of PRF in the endodontic treatment of permanent teeth with closed apices on the basis of the literature [128–141].

Table 3. PRF in the endodontic treatment of permanent teeth with closed apices on the basis of the literature [128–141].

| Reference | Study Design | Participants and Intervention | Endpoint and Results |
|-----------------------------------|---------------------------|--|---|
| Machut et al. (2021) [128] | Case report | <p><i>Case no 1:</i> Patient: 45-year-old female Tooth/teeth: 23 Diagnosis: pulp necrosis with symptomatic apical periodontitis of tooth 23 Type of treatment: RCT with A-PRF membrane placed by the apical foramen to the periapical area Protocol to obtain A-PRF: (1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 1200 rpm for 8 min</p> <p><i>Case no 2:</i> Patient: 42-year-old male Tooth/teeth: 23 Diagnosis: pulp necrosis with asymptomatic apical periodontitis of tooth 23 Type of treatment: RCT with A-PRF membrane placed by the apical foramen to the periapical area Protocol to obtain PRF: (1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 1200 rpm for 8 min</p> | <p><i>Endpoint:</i> 6 months Additional application of A-PRF led to a significant decrease in the periapical lesions' size.</p> |
| Soto-Peñalosa et al. (2020) [129] | Randomized clinical trial | <p>Patient: 50 patients who needed endodontic surgery of upper maxillary teeth; age range: 44.2–52.4 years old Tooth/teeth: upper maxillary teeth (second premolar to second premolar) Diagnosis: chronic apical periodontitis Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: control group: n/a; study group: A-PRF+ membranes (approximately: 2 + additional 1 over the osteotomy) Protocol to obtain PRF: (1) venous blood was drawn (no information about amount) (2) centrifugation: 1300 rpm for 8 min (tubes without AC) Sutures: 4–0 polyamide</p> | <p><i>Endpoint:</i> 7 days No significant differences between the groups regarding postoperative pain. Only sleep and speech functions presented more limitations in control group.</p> |
| Kavitha et al. (2020) [130] | Case report | <p><i>Case no 1:</i> Patient: 23-year-old female Tooth/teeth: 11,12 Diagnosis: chronic periapical abscess in relation to nonvital teeth: 11, 12 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: Glass Ionomer Cement (GC Fuji IX) Bony defect filler: PRP + small amount of bovine thrombin + a few drops of 10% calcium chloride + β-TCP Protocol to obtain PRP: (1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 5000 rpm for 15 min (tubes with EDTA) (3) second centrifugation of superior plasma: 2000 rpm for 10 min (4) PPP was discarded Sutures: 3–0 nonabsorbable black silk</p> <p><i>Case no 2:</i> Patient: 23-year-old female Tooth/teeth: 22 Diagnosis: periapical abscess in relation to nonvital 22 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: Glass Ionomer Cement (GC Fuji IX) Bony defect filler: PRF + β-TCP Protocol to obtain PRF: (1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 3000 rpm for 15 min (tubes without AC) Sutures: 3–0 nonabsorbable black silk</p> | <p><i>Endpoint:</i> 1 year Both PRP and PRF mixed with β-TCP were effective in the treatment of periapical defects.</p> |

Table 3. Cont.

| Reference | Study Design | Participants and Intervention | Endpoint and Results |
|----------------------------------|--------------|--|---|
| Sureshbabu et al. (2020) [131] | Case report | <p>Patient: 26-year-old male Tooth/teeth: 43,44,45 Diagnosis: pulpal necrosis with a chronic apical abscess in 43, 44, 45 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: CGF + osseograft + CGF membrane Protocol to obtain CGF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 20 mL of venous blood was drawn (2) acceleration for 30 s; centrifugation at 2700 rpm for 2 min, 2400 rpm for 4 min, 2700 rpm for 4 min, 3000 rpm for 3 min; deceleration for 36 s (3) centrifugation of superior plasma: 2000 rpm for 10 min <p>Sutures: 3–0 vicryl</p> | <p>Endpoint: 1 year and 2 years After 1 year, lesion reduction size was found to be 79%.</p> |
| Taschieri et al. (2012) [132] | Case report | <p>Patient: 28-year-old male Tooth/teeth: 21,22 Diagnosis: periradicular lesion of endodontic origin, vestibular sinus tract and an abscess on the palatal side, nonvital tooth 22, tooth 21 after RCT with large endodontic post Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: n/a Bony defect filler: PRGF + 50 µL of 10% CaCl₂ were added per cubic centimeter of PRGF concentrate + Bio-Oss mixed with PRGF + BioGide membrane Protocol to obtain PRGF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 5 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 460 × g for 8 min (tubes with 3.8% trisodium citrate) <p>Sutures: non-absorbable silk 5–0</p> | <p>Endpoint: 1 year After 1 year the authors noticed complete healing and functionality.</p> |
| Shivashankar et al. (2013) [133] | Case report | <p>Patient: 45-year-old male Tooth/teeth: 12,11 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 11, 12 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: PRF + HA bone graft crystals + PRF membrane Protocol to obtain PRF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 20 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 3000 rpm for 10 min <p>Sutures: 3–0 black silk suture material</p> | <p>Endpoint: 2 years The authors noticed complete bone healing after 2 years.</p> |
| Zhao et al. (2014) [134] | Case report | <p>Case no 1: Patient: 28-year-old female Tooth/teeth: 13,12,21,22 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 13,12, 21,22; incomplete root canal fillings of teeth no: 12,21,22 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: amalgam Bony defect filler: minced PRF mixed with resorbable bioactive glass + PRF membrane Protocol to obtain PRF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) venous blood was drawn (no information about amount) (2) centrifugation: 3000 rpm for 12 min (tubes without anticoagulant) <p>Sutures: 4–0 silk</p> <p>Case no 2: Patient: 27-year-old female Tooth/teeth: 14,13,12,21,22 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 14,13, 12,11,21; incomplete root canal fillings of teeth no: 14,13,12,11,21 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: amalgam Bony defect filler: minced PRF mixed with resorbable BG + PRF membrane Protocol to obtain PRF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) venous blood was drawn (no information about amount) (2) centrifugation: 3000 rpm for 12 min (tubes without anticoagulant) <p>Sutures: 4–0 silk</p> | <p>Endpoint: 7 months (1st case) 4 months (2nd case) The authors noticed satisfactory bone healing at the endpoint examination.</p> |
| Dudeja et al. (2017) [135] | Case report | <p>Patient: 26-year-old female Tooth/teeth: 21,22 Diagnosis: chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 21,22; suppurative sinus tract between teeth 22 and 23 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: PRF membrane + PRF mixed with an irradiated FDDBA + collagen membrane Protocol to obtain PRF:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) venous blood was drawn (no information about amount) (2) centrifugation: n/a <p>Sutures: 3–0 silk</p> | <p>Endpoint: 1 year After 1 year the authors observed continuation of healing process and decrease in the size of radiolucency.</p> |

Table 3. Cont.

| Reference | Study Design | Participants and Intervention | Endpoint and Results |
|------------------------------|--------------|---|---|
| Wadhwa et al. (2017) [136] | Case report | <p>Patient: 25-year-old male Tooth/teeth: 46 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital tooth: 46 Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: PRF membrane Protocol to obtain PRF:</p> <p>(1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 3000 rpm for 10 min (tube without anticoagulant)</p> <p>Sutures: 4–0 monofilament</p> | <p>Endpoint: 18 months After 18 months the authors observed successful outcome of the healing process.</p> |
| Vidhale et al. (2015) [137] | Case report | <p>Patient: 22-year-old male Tooth/teeth: 21,22,23 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 21,22, 23, radicular cyst Type of treatment: RCT + endodontic surgery (resection) Retrograde filling material: n/a Bony defect filler: PRF + iliac bone graft Protocol to obtain PRF:</p> <p>(1) 5 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 3000 rpm for 10 min (tube without anticoagulant)</p> <p>Sutures: n/a</p> | <p>Endpoint: 3 months The authors noticed the presence of bone healing.</p> |
| Bains et al. (2012) [138] | Case report | <p>Patient: 39-year-old male Tooth/teeth: 46 Diagnosis: retrograde periodontitis along with Grade II furcation involvement with definitive pulpal perforation in the tooth 46, incomplete root canal treatment of tooth 47 Type of treatment: RCT + regenerative periodontal surgery Retrograde filling material: n/a Bony defect filler: PRF gel mixed with hydroxyapatite graft material + PRF membrane Protocol to obtain PRF:</p> <p>(1) 10 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: 3000 rpm for 12 min (tube without anticoagulant)</p> <p>Sutures: n/a</p> | <p>Endpoint: 1.5 years The authors noticed significant limitation of the radiolucency area.</p> |
| Demiralp et al. (2004) [139] | Case report | <p>Patient: 45-year-old male Tooth/teeth: 11,21 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 11,21 Type of treatment: RCT + surgery (scaling and root-planning, resection was not performed) Retrograde filling material: n/a Bony defect filler: PRP gel + PRP gel mixed with TCP + PRP gel Protocol to obtain PRP:</p> <p>(1) 30 mL of venous blood was drawn (2) centrifugation: n/a</p> <p>Sutures: 4–0 silk</p> | <p>Endpoint: 1 year The authors noticed almost complete resorption of TCP particles and new bone formation.</p> |
| Hiremath et al. (2014) [140] | Case report | <p>Patient: 20-year-old male Tooth/teeth: 11,21,22 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 11,21,22 Type of treatment: RCT + surgery (curettage of the defect) Retrograde filling material: n/a Bony defect filler: PRF mixed with HA Protocol to obtain PRP:</p> <p>(1) venous blood was drawn (no information about amount of blood, tube without anticoagulant) (2) centrifugation: 571.54 × g for 12 min</p> <p>Sutures: 4–0 silk</p> | <p>Endpoint: 18 months After 18 months the authors observed complete bone healing.</p> |
| Parikh et al. (2011) [141] | Case report | <p>Patient: 24-year-old male Tooth/teeth: 11,21 Diagnosis: exacerbated chronic periodontitis in relation to nonvital teeth: 11,21 Type of treatment: RCT + surgery (curettage of the defect) Retrograde filling material: MTA Bony defect filler: PRP gel was placed at the site of larger defect (left side) Protocol to obtain PRP:</p> <p>(1) 8.5 mL of venous blood was drawn (tube with anticoagulant) (2) centrifugation: n/a</p> <p>Sutures: 4–0 Mersilk</p> | <p>Endpoint: 2 years After 8 weeks the authors observed better bone healing at the site treated with PRP.</p> |

AC—anticoagulant, BG—bioactive glass, β -TCP— β -tricalcium phosphate, CGF—concentrated growth factor, EDTA—Ethylene diamine tetraacetic acid, FDBA—freeze-dried bone allograft, HA—hydroxyapatite, MTA—Mineral Trioxide Aggregate, n/a—not applicable, PPP—platelet poor plasma, RCT—root canal treatment, TCP—tricalcium phosphate.

7. Materials and Methods

7.1. Clinical Question

What is the clinical efficacy of plasma rich in growth factors (PRGF) applied in the periapical region supplementary to conventional root canal treatment (RCT) of permanent teeth with closed apices, diagnosed with periapical lesions, on the basis of the literature?

7.2. Inclusion and Exclusion Criteria for the Narrative Review

Table 4 presents inclusion and exclusion criteria for the narrative review.

Table 4. Inclusion and exclusion criteria for the narrative review.

| Criteria | List of Specific Criteria |
|--------------------|--|
| Inclusion criteria | randomized controlled trials |
| | randomized clinical trials |
| | case reports |
| | case-control studies |
| | study population: adult patients (aged: 18 years old or more); permanent teeth with closed apices, diagnosed with periapical lesions |
| Exclusion criteria | methods of treatment: RCT with application of PRGF |
| | systematic reviews and meta-analyses |
| | comments |
| | animal studies |
| | study population: children with deciduous teeth, children and adolescents with immature teeth (teeth with opened apices), teeth without periapical lesions |
| | methods of treatment: endodontic procedures without application of PRGF, endodontic surgery |
| | papers written in languages other than English |

PRGF—plasma rich in growth factors; RCT—root canal treatment.

7.3. The PICO Approach

We used the PICO approach to properly develop literature search strategies for this review:

Population: adolescents and adult patients; only mature teeth with closed apices diagnosed with periapical lesion.

Intervention: RCT with additional application of PRGF or RCT with endodontic surgery with additional direct application of PRGF.

Comparison: RCT without additional application of PRGF; RCT with endodontic surgery without additional application of PRGF; placebo.

Outcome: healing of the periapical lesion and tooth pain reduction (in case of symptomatic periapical periodontitis).

7.4. Search Strategy

The PubMed database was analyzed with the following keywords: ((PRP) OR (PRF) OR (PRGF) OR (CGF)) AND (endodontic) AND ((treatment) OR (therapy)). After screening of 155 results, 14 studies were included in this review (one randomized controlled trial and 13 case reports).

Figure 1 presents the PRISMA flow diagram for a review of the literature.

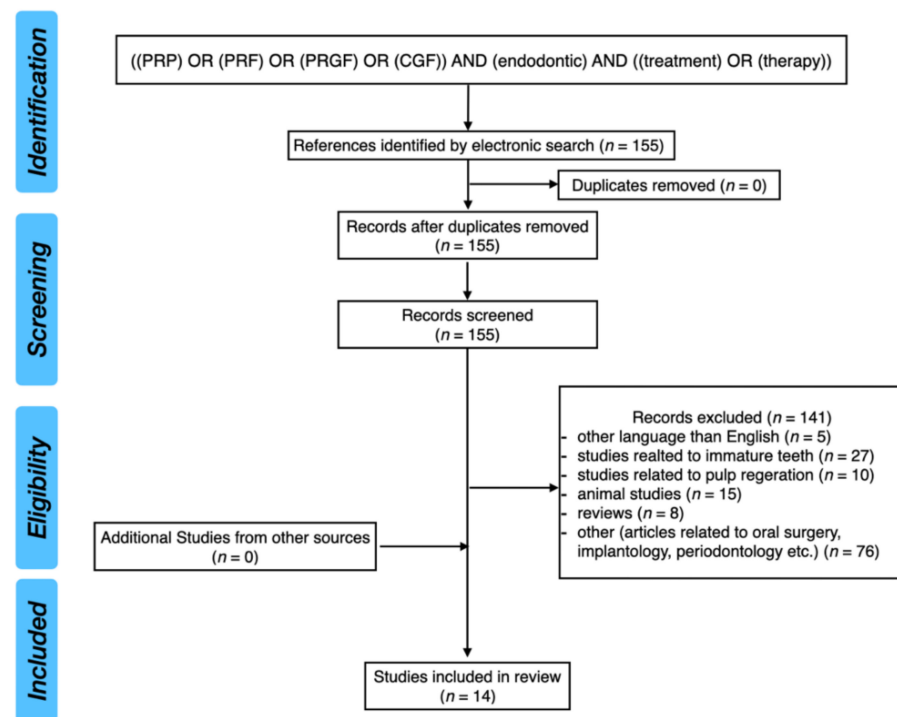


Figure 1. PRISMA flow diagram for review of the literature.

8. Conclusions

Different types of platelet concentrates, especially L-PRF and CGF, are able to stimulate the processes of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. They induce the bone regeneration processes. Moreover, it has also been proven that L-PRF may affect the expression of miRNA-21.

Despite the fact, that PRF seems to promote bone healing and to reduce healing time, it was not possible to assess the efficacy of PRF supplementation in the treatment of endodontic periapical lesions in permanent, mature teeth with closed apices, due to the lack of well-designed scientific research. Further studies, especially randomized double-blind controlled trials, are needed to assess whether the RCT with additional application of PRF is superior to RCT performed alone in the treatment of permanent mature teeth with closed apices diagnosed with periapical lesions.

Author Contributions: Conceptualization, K.M., M.D. and A.Z.; methodology, K.M., A.Z. and M.D.; validation, K.M., A.Z. and M.D.; formal analysis, K.M. and M.D.; investigation, K.M., M.D. and A.Z.; resources, K.M. and M.D.; writing—original draft preparation, K.M. and M.D.; writing—review and editing, A.Z., M.D. and E.P.; supervision, M.D., A.Z. and E.P.; project administration, K.M., A.Z. and M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cho, M.I.; Garant, P.R. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000* **2000**, *24*, 9–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Abbott, P.V. The periapical space—A dynamic interface. *Aust. Endod. J.* **2002**, *28*, 96–107. [[CrossRef](#)]

3. Nair, P.N. Apical periodontitis: A dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology 2000* **1997**, *13*, 121–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N.; Ricucci, D.; Hülsmann, M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 305–312. [[CrossRef](#)]
5. Wang, J.; Jiang, Y.; Chen, W.; Zhu, C.; Liang, J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J. Endod.* **2012**, *38*, 954–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ricucci, D.; Candeiro, G.T.; Bugea, C.; Siqueira, J.F., Jr. Complex Apical Intraradicular Infection and Extraradicular Mineralized Biofilms as the Cause of Wet Canals and Treatment Failure: Report of 2 Cases. *J. Endod.* **2016**, *42*, 509–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nair, P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2004**, *15*, 348–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Karamifar, K.; Tondari, A.; Saghiri, M.A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur. Endod. J.* **2020**, *5*, 54–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cekici, A.; Kantarci, A.; Hasturk, H.; Van Dyke, T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000* **2014**, *64*, 57–80. [[CrossRef](#)]
10. Noguchi, N.; Noiri, Y.; Narimatsu, M.; Ebisu, S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8738–8743. [[CrossRef](#)]
11. Del Fabbro, M.; Corbella, S.; Sequeira-Byron, P.; Tsesis, I.; Rosen, E.; Lolato, A.; Taschieri, S. Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions. *Cochrane Database Syst Rev.* **2016**, *10*, CD005511. [[CrossRef](#)]
12. Alghamdi, F.; Alhaddad, A.J.; Abuzinadah, S. Healing of Periapical Lesions After Surgical Endodontic Retreatment: A Systematic Review. *Cureus* **2020**, *12*, e6916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Uppada, U.K.; Kalakonda, B.; Koppolu, P.; Varma, N.; Palakurthy, K.; Manchikanti, V.; Prasad, S.; Samar, S.; Swapna, L.A. Combination of hydroxyapatite, platelet rich fibrin and amnion membrane as a novel therapeutic option in regenerative periapical endodontic surgery: Case series. *Int. J. Surg. Case Rep.* **2017**, *37*, 139–144. [[CrossRef](#)]
14. Restrepo-Restrepo, F.A.; Cañas-Jiménez, S.J.; Romero-Albarracín, R.D.; Villa-Machado, P.A.; Pérez-Cano, M.I.; Tobón-Arroyave, S.I. Prognosis of root canal treatment in teeth with preoperative apical periodontitis: A study with cone-beam computed tomography and digital periapical radiography. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1533–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Metin, R.; Tatli, U.; Evlice, B. Effects of low-level laser therapy on soft and hard tissue healing after endodontic surgery. *Lasers Med. Sci.* **2018**, *33*, 1699–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yadav, S.; Nawal, R.R.; Talwar, S.; Verma, M. Low-level laser therapy for management of large periapical lesions associated with open apex cases. *Indian J. Dent. Res.* **2020**, *31*, 334–336. [[CrossRef](#)]
17. Kitchens, J.A.; Schwartz, S.A.; Schindler, W.G.; Hargreaves, K.M. Iontophoresis significantly increases the trans-dentinal delivery of osteoprotegerin, alendronate, and calcitonin. *J. Endod.* **2007**, *33*, 1208–1211. [[CrossRef](#)]
18. Lietz-Kijak, D.; Kijak, E.; Śliwiński, Z.; Opalko, K. The use of physiotherapy in the regeneration of periapical bone structures of the teeth, prepared to load the prosthetic. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **2013**, *67*, 643–647. [[CrossRef](#)]
19. Del Fabbro, M.; Bortolin, M.; Taschieri, S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *40*, 891–900. [[CrossRef](#)]
20. Panda, S.; Doraiswamy, J.; Malaiappan, S.; Varghese, S.S.; Del Fabbro, M. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: A systematic review and meta-analysis. *J. Investig. Clin. Dent.* **2016**, *7*, 13–26. [[CrossRef](#)]
21. Gremmel, T.; Frelinger, A.L., 3rd; Michelson, A.D. Platelet Physiology. *Semin. Thromb. Hemost.* **2016**, *42*, 191–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. King, S.M.; Reed, G.L. Development of platelet secretory granules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2002**, *13*, 293–302. [[CrossRef](#)]
23. Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, e37–e44. [[CrossRef](#)]
24. Kao, R.T.; Murakami, S.; Beirne, O.R. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontology 2000* **2009**, *50*, 127–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Choukroun, J.; Diss, A.; Simonpieri, A.; Girard, M.O.; Schoeffler, C.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Dohan, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, 299–303. [[CrossRef](#)]
26. Handal, T.; Caugant, D.A.; Olsen, I.; Sunde, P.T. Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth. *J. Oral Microbiol.* **2009**, *1*, 1946. [[CrossRef](#)]
27. Eriksen, H.M.; Kirkevang, L.-L.; Petersson, K. Endodontic epidemiology and treatment outcome: General considerations. *Endod. Top.* **2002**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
28. Colić, M.; Gazivoda, D.; Vučević, D.; Vasilijčić, S.; Rudolf, R.; Lukić, A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Dessaune Neto, N.; Porpino, M.T.M.; Antunes, H.D.S.; Rodrigues, R.C.V.; Perez, A.R.; Pires, F.R.; Siqueira, J.F., Jr.; Armada, L. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. *J. Appl. Oral Sci.* **2018**, *26*, e20170455. [[CrossRef](#)]

30. Gazivoda, D.; Dzopalic, T.; Bozic, B.; Tatomirovic, Z.; Brkic, Z.; Colic, M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J. Oral Pathol. Med.* **2009**, *38*, 605–611. [[CrossRef](#)]
31. Jakovljevic, A.; Knezevic, A.; Karalic, D.; Soldatovic, I.; Popovic, B.; Milasin, J.; Andric, M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust. Endod. J.* **2015**, *41*, 72–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. De Carvalho Fraga, C.A.; Alves, L.R.; de Sousa, A.A.; de Jesus, S.F.; Vilela, D.N.; Pereira, C.S.; Batista Domingos, P.L.; Viana, A.G.; Jham, B.C.; Batista de Paula, A.M.; et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J. Endod.* **2013**, *39*, 453–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Walker, K.F.; Lappin, D.F.; Takahashi, K.; Hope, J.; Macdonald, D.G.; Kinane, D.F. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur. J. Oral Sci.* **2000**, *108*, 195–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, C.; Yang, X.G.; Wang, F.; Ma, X.Y. IL-1 α induces apoptosis and inhibits the osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells through the JNK and p38 MAPK pathways. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 319–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Matsuzaki, E.; Anan, H.; Matsumoto, N.; Hatakeyama, J.; Minakami, M.; Izumi, T. Immunopathology of Apical Periodontitis and Refractory Cases. *J. Tissue Sci. Eng.* **2016**, *7*, 184. [[CrossRef](#)]
36. Garlet, G.P.; Aranha, A.M.F.; Silveira, E.M.; Vieira, A.E.; Queiroz-Junior, C.M.; Madeira, M.F.M.; Fukada, S.Y.; Silva, T.A. The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts. In *Inflammation, Chronic Diseases and Cancer—Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases*, 1st ed.; Khatami, M., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2012; Volume 1, pp. 219–241. [[CrossRef](#)]
37. Braz-Silva, P.H.; Bergamini, M.L.; Mardegan, A.P.; De Rosa, C.S.; Hasseus, B.; Jonasson, P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: A literature review. *Acta Odontol. Scand.* **2019**, *77*, 173–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Graunaite, I.; Lodiene, G.; Maciulskiene, V. Pathogenesis of apical periodontitis: A literature review. *J. Oral Maxillofac. Res.* **2012**, *2*, e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cheng, R.; Wu, Z.; Li, M.; Shao, M.; Hu, T. Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: A narrative review. *Int. J. Oral Sci.* **2020**, *12*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kaneko, N.; Kurata, M.; Yamamoto, T.; Morikawa, S.; Masumoto, J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm. Regen.* **2019**, *39*, 12. [[CrossRef](#)]
41. Yamada, A.; Takami, M.; Kawawa, T.; Yasuhara, R.; Zhao, B.; Mochizuki, A.; Miyamoto, Y.; Eto, T.; Yasuda, H.; Nakamichi, Y.; et al. Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. *Immunology* **2007**, *120*, 573–579. [[CrossRef](#)]
42. AlShwaimi, E.; Berggreen, E.; Furusho, H.; Rossall, J.C.; Dobeck, J.; Yoganathan, S.; Stashenko, P.; Sasaki, H. IL-17 receptor A signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 1785–1791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fettelschoss, A.; Kistowska, M.; LeibundGut-Landmann, S.; Beer, H.D.; Johansen, P.; Senti, G.; Contassot, E.; Bachmann, M.F.; French, L.E.; Oxenius, A.; et al. Inflammasome activation and IL-1 β target IL-1 α for secretion as opposed to surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18055–18060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dai, S.M.; Nishioka, K.; Yudoh, K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: Comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Ann. Rheum. Dis.* **2004**, *63*, 1379–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, Q.; Chen, B.; Yan, F.; Guo, J.; Zhu, X.; Ma, S.; Yang, W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: A potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 284836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bendre, M.S.; Montague, D.C.; Peery, T.; Akel, N.S.; Gaddy, D.; Suva, L.J. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* **2003**, *33*, 28–37. [[CrossRef](#)]
47. Ruef, N.; Dolder, S.; Aeberli, D.; Seitz, M.; Balani, D.; Hofstetter, W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent CD11c-positive cells differentiate into active osteoclasts. *Bone* **2017**, *97*, 267–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lee, M.S.; Kim, H.S.; Yeon, J.T.; Choi, S.W.; Chun, C.H.; Kwak, H.B.; Oh, J. GM-CSF regulates fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts by activating the Ras/ERK pathway. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 3390–3399. [[CrossRef](#)]
49. Zhao, B. TNF and Bone Remodeling. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2017**, *15*, 126–134. [[CrossRef](#)]
50. Scheffler, J.M.; Grahemo, L.; Engdahl, C.; Drevinge, C.; Gustafsson, K.L.; Corciulo, C.; Lawenius, L.; Iwakura, Y.; Sjögren, K.; Lagerquist, M.K.; et al. Interleukin 17A: A Janus-faced regulator of osteoporosis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5692. [[CrossRef](#)]
51. He, L.; Hannon, G.J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531. [[CrossRef](#)]
52. Kaeuferle, T.; Bartel, S.; Dehmel, S.; Krauss-Etschmann, S. MicroRNA methodology: Advances in miRNA technologies. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1169*, 121–130. [[CrossRef](#)]
53. Sontheimer, E.J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gu, S.; Jin, L.; Zhang, F.; Sarnow, P.; Kay, M.A. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 144–150. [[CrossRef](#)]
55. Bracht, J.; Hunter, S.; Eachus, R.; Weeks, P.; Pasquinelli, A.E. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA* **2004**, *10*, 1586–1594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Macfarlane, L.A.; Murphy, P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genom.* **2010**, *11*, 537–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Shapiro, J.S.; Langlois, R.A.; Pham, A.M.; Tenover, B.R. Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. *RNA* **2012**, *18*, 1338–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bushati, N.; Cohen, S.M. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 175–205. [[CrossRef](#)]
59. Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F.D.; Gygi, S.P.; Bartel, D.P. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **2008**, *455*, 64–71. [[CrossRef](#)]
60. Dave, R.S.; Khalili, K. Morphine treatment of human monocyte-derived macrophages induces differential miRNA and protein expression: Impact on inflammation and oxidative stress in the central nervous system. *J. Cell Biochem.* **2010**, *110*, 834–845. [[CrossRef](#)]
61. Chan, L.T.; Zhong, S.; Naqvi, A.R.; Self-Fordham, J.; Nares, S.; Bair, E.; Khan, A.A. MicroRNAs: New insights into the pathogenesis of endodontic periapical disease. *J. Endod.* **2013**, *39*, 1498–1503. [[CrossRef](#)]
62. Gao, B.; Zheng, L. microRNA Expression in Rat Apical Periodontitis Bone Lesion. *Bone Res.* **2013**, *1*, 170–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Henriksen, K.; Sørensen, M.G.; Nielsen, R.H.; Gram, J.; Schaller, S.; Dziegiel, M.H.; Everts, V.; Bollerslev, J.; Karsdal, M.A. Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: A secondary role for lysosomal acidification. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 58–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hu, C.H.; Sui, B.D.; Du, F.Y.; Shuai, Y.; Zheng, C.X.; Zhao, P.; Yu, X.R.; Jin, Y. miR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43191. [[CrossRef](#)]
65. Bačević, M.; Brković, B.; Lambert, F.; Djukić, L.; Petrović, N.; Roganović, J. Leukocyte- and platelet-rich fibrin as graft material improves microRNA-21 expression and decreases oxidative stress in the calvarial defects of diabetic rabbits. *Arch. Oral Biol.* **2019**, *102*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wang, T.; Feng, Y.; Sun, H.; Zhang, L.; Hao, L.; Shi, C.; Wang, J.; Li, R.; Ran, X.; Su, Y.; et al. miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 1911–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Chien, H.Y.; Lee, T.P.; Chen, C.Y.; Chiu, Y.H.; Lin, Y.C.; Lee, L.S.; Li, W.C. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J. Chin. Med. Assoc.* **2015**, *78*, 204–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yue, J.; Song, D.; Lu, W.; Lu, Y.; Zhou, W.; Tan, X.; Zhang, L.; Huang, D. Expression Profiles of Inflammation-associated microRNAs in Periapical Lesions and Human Periodontal Ligament Fibroblasts Inflammation. *J. Endod.* **2016**, *42*, 1773–1778. [[CrossRef](#)]
69. Wang, X.; Sun, H.; Liu, H.; Ma, L.; Jiang, C.; Liao, H.; Xu, S.; Xiang, J.; Cao, Z. MicroRNA-181b-5p modulates tumor necrosis factor- α -induced inflammatory responses by targeting interleukin-6 in cementoblasts. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 22719–22730. [[CrossRef](#)]
70. Shen, Z.; Silva, R.M. MicroRNAs: Emerging players in apical periodontitis. *J. Appl. Oral Sci.* **2021**, *29*, e20201058. [[CrossRef](#)]
71. Lin, Y.; Xing, Q.; Qin, W.; de Melo, M.A.S.; Zou, R.; Xu, M.; Zhang, X.; Xu, H.H.K.; Lin, Z. Decreased Expression of Semaphorin3A/Neuropilin-1 Signaling Axis in Apical Periodontitis. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 8724503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Shen, Z.; Wichnieski, C.; Carneiro, E.; Garlet, G.P.; Letra, A.; Silva, R.M. Expression Profiling and Functional Characterization of MicroRNAs in Apical Periodontitis. *J. Endod.* **2021**, *47*, 263–271. [[CrossRef](#)]
73. Mohammadi, Z.; Dummer, P.M. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int. Endod. J.* **2011**, *44*, 697–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Sathorn, C.; Parashos, P.; Messer, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: A systematic review and meta-analysis. *Int. Endod. J.* **2007**, *40*, 2–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Peters, L.B.; Wesselink, P.R. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int. Endod. J.* **2002**, *35*, 660–667. [[CrossRef](#)]
76. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 299–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Rodrigues, R.C.; Antunes, H.S.; Neves, M.A.; Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Infection Control in Retreatment Cases: In Vivo Antibacterial Effects of 2 Instrumentation Systems. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1600–1605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Nagendrababu, V.; Jayaraman, J.; Suresh, A.; Kalyanasundaram, S.; Neelakantan, P. Effectiveness of ultrasonically activated irrigation on root canal disinfection: A systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig.* **2018**, *22*, 655–670. [[CrossRef](#)]
79. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N.; Favieri, A.; Lima, K.C. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J. Endod.* **2000**, *26*, 331–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Orstavik, D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int. Endod. J.* **1996**, *29*, 150–155. [[CrossRef](#)]
81. Mokbel, N.; Kassir, A.R.; Naaman, N.; Megarbane, J.M. Root Resection and Hemisection Revisited. Part I: A Systematic Review. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2019**, *39*, e11–e31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Jadun, S.; Monaghan, L.; Darcey, J. Endodontic microsurgery. Part two: Armamentarium and technique. *Br. Dent. J.* **2019**, *227*, 101–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Von Arx, T. Apical surgery: A review of current techniques and outcome. *Saudi Dent. J.* **2011**, *23*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Floratos, S.; Kim, S. Modern Endodontic Microsurgery Concepts: A Clinical Update. *Dent. Clin. N. Am.* **2017**, *61*, 81–91. [[CrossRef](#)]
85. Hawkins, T.K.; Wealleans, J.A.; Pratt, A.M.; Ray, J.J. Targeted endodontic microsurgery and endodontic microsurgery: A surgical simulation comparison. *Int. Endod. J.* **2020**, *53*, 715–722. [[CrossRef](#)]
86. Pinto, D.; Marques, A.; Pereira, J.F.; Palma, P.J.; Santos, J.M. Long-Term Prognosis of Endodontic Microsurgery-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicina* **2020**, *56*, 447. [[CrossRef](#)]

87. Sebring, D.; Kvist, T.; Derks, J. Indications for Extraction before Implant Therapy: Focus on Endodontic Status. *J. Endod.* **2019**, *45*, 532–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Palma, P.J.; Marques, J.A.; Casau, M.; Santos, A.; Caramelo, F.; Falacho, R.I.; Santos, J.M. Evaluation of Root-End Preparation with Two Different Endodontic Microsurgery Ultrasonic Tips. *Biomedicines* **2020**, *8*, 383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Craddock, H.L.; Youngson, C.C.; Manogue, M.; Blance, A. Occlusal changes following posterior tooth loss in adults. Part 1: A study of clinical parameters associated with the extent and type of supraeruption in unopposed posterior teeth. *J. Prosthodont.* **2007**, *16*, 485–494. [[CrossRef](#)]
90. Craddock, H.L.; Youngson, C.C.; Manogue, M.; Blance, A. Occlusal changes following posterior tooth loss in adults. Part 2. Clinical parameters associated with movement of teeth adjacent to the site of posterior tooth loss. *J. Prosthodont.* **2007**, *16*, 495–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Craddock, H.L. Occlusal changes following posterior tooth loss in adults. Part 3. A study of clinical parameters associated with the presence of occlusal interferences following posterior tooth loss. *J. Prosthodont.* **2008**, *17*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Thon, J.N.; Italiano, J.E. Platelet formation. *Semin. Hematol.* **2010**, *47*, 220–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Cognasse, F.; Hamzeh, H.; Chavarin, P.; Acquart, S.; Genin, C.; Garraud, O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83*, 196–198. [[CrossRef](#)]
94. Ross, R.; Glomset, J.; Kariya, B.; Harker, L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 1207–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Dohan Ehrenfest, D.M.; Rasmussen, L.; Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 158–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Dohan Ehrenfest, D.M.; Del Corso, M.; Diss, A.; Mouhyi, J.; Charrier, J.B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 546–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Dohan Ehrenfest, D.M.; Andia, I.; Zumstein, M.A.; Zhang, C.Q.; Pinto, N.R.; Bielecki, T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* **2014**, *4*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Fujioka-Kobayashi, M.; Miron, R.J.; 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*, 112–121. [[CrossRef](#)]
99. Miron, R.J.; Xu, H.; Chai, J.; Wang, J.; Zheng, S.; Feng, M.; Zhang, X.; Wei, Y.; Chen, Y.; Mourão, C.F.A.B.; et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~700 g) and low (~200 g) relative centrifugation forces. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1171–1182. [[CrossRef](#)]
100. Ghanaati, S.; Booms, P.; Orłowska, A.; Kubesch, A.; Lorenz, J.; Rutkowski, J.; Landes, C.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.; Choukroun, J. Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J. Oral Implantol.* **2014**, *40*, 679–689. [[CrossRef](#)]
101. Kobayashi, E.; Flückiger, L.; Fujioka-Kobayashi, M.; Sawada, K.; Sculean, A.; Schaller, B.; Miron, R.J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 2353–2360. [[CrossRef](#)]
102. Canellas, J.V.D.S.; Medeiros, P.J.D.; Figueredo, C.M.D.S.; Fischer, R.G.; Ritto, F.G. Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *48*, 395–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Wang, X.; Zhang, Y.; Choukroun, J.; Ghanaati, S.; Miron, R.J. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets* **2018**, *29*, 48–55. [[CrossRef](#)]
104. Hu, K.; Olsen, B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* **2016**, *91*, 30–38. [[CrossRef](#)]
105. Moojen, D.J.; Everts, P.A.; Schure, R.M.; Overdevest, E.P.; van Zundert, A.; Knape, J.T.; Castelein, R.M.; Creemers, L.B.; Dhert, W.J. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26*, 404–410. [[CrossRef](#)]
106. Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, e51–e55. [[CrossRef](#)]
107. Kour, P.; Pudukalkatti, P.S.; Vas, A.M.; Das, S.; Padmanabhan, S. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemp. Clin. Dent.* **2018**, *9* (Suppl. S2), S325–S330. [[CrossRef](#)]
108. Everts, P.; Onishi, K.; Jayaram, P.; Lana, J.F.; Mautner, K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Xu, J.; Gou, L.; Zhang, P.; Li, H.; Qiu, S. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Aust. Dent. J.* **2020**, *65*, 131–142. [[CrossRef](#)]
110. Borie, E.; Oliví, D.G.; Orsi, I.A.; Garlet, K.; Weber, B.; Beltrán, V.; Fuentes, R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: A literature review. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 7922–7929.
111. Miron, R.J.; Zucchelli, G.; Pikos, M.A.; Salama, M.; Lee, S.; Guillemette, V.; Fujioka-Kobayashi, M.; Bishara, M.; Zhang, Y.; Wang, H.L.; et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 1913–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

112. Liu, Y.; Sun, X.; Yu, J.; Wang, J.; Zhai, P.; Chen, S.; Liu, M.; Zhou, Y. Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *Biomed Res. Int.* **2019**, *2019*, 3295756. [[CrossRef](#)]
113. Fan, Y.; Perez, K.; Dym, H. Clinical Uses of Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillofacial Surgery. *Dent. Clin. N. Am.* **2020**, *64*, 291–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Metlerska, J.; Fagogeni, I.; Nowicka, A. Efficacy of Autologous Platelet Concentrates in Regenerative Endodontic Treatment: A Systematic Review of Human Studies. *J. Endod.* **2019**, *45*, 20–30.e1. [[CrossRef](#)]
115. Kim, S.G.; Malek, M.; Sigurdsson, A.; Lin, L.M.; Kahler, B. Regenerative endodontics: A comprehensive review. *Int. Endod. J.* **2018**, *51*, 1367–1388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Qin, Y.; Guan, J.; Zhang, C. Mesenchymal stem cells: Mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad. Med. J.* **2014**, *90*, 643–647. [[CrossRef](#)]
117. Yagi, H.; Soto-Gutierrez, A.; Parekkadan, B.; Kitagawa, Y.; Tompkins, R.G.; Kobayashi, N.; Yarmush, M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 667–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Maria, O.M.; Khosravi, R.; Mezey, E.; Tran, S.D. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis.* **2007**, *13*, 11–16. [[CrossRef](#)]
119. Tian, S.; Wang, J.; Dong, F.; Du, N.; Li, W.; Song, P.; Liu, Y. Concentrated Growth Factor Promotes Dental Pulp Cells Proliferation and Mineralization and Facilitates Recovery of Dental Pulp Tissue. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 10016–10028. [[CrossRef](#)]
120. Hu, L.; Zhao, B.; Gao, Z.; Xu, J.; Fan, Z.; Zhang, C.; Wang, J.; Wang, S. Regeneration characteristics of different dental derived stem cell sheets. *J. Oral Rehabil.* **2020**, *47* (Suppl. S1), 66–72. [[CrossRef](#)]
121. Salamanna, F.; Del Piccolo, N.; Sartori, M.; Giavaresi, G.; Martini, L.; Di Sante, G.; Stagni, C.; Dallari, D.; Fini, M. Effects of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration and Osseointegration of a Hydroxyapatite-Coated Titanium Implant. *Coatings* **2021**, *11*, 840. [[CrossRef](#)]
122. Dohan Ehrenfest, D.M.; Doglioli, P.; de Peppo, G.M.; Del Corso, M.; Charrier, J.B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch. Oral Biol.* **2010**, *55*, 185–194. [[CrossRef](#)]
123. Sequeira, D.B.; Oliveira, A.R.; Seabra, C.M.; Palma, P.J.; Ramos, C.; Figueiredo, M.H.; Santos, A.C.; Cardoso, A.L.; Peça, J.; Santos, J.M. Regeneration of pulp-dentin complex using human stem cells of the apical papilla: In vivo interaction with two bioactive materials. *Clin. Oral Investig.* **2021**, *25*, 5317–5329. [[CrossRef](#)]
124. Xu, F.; Qiao, L.; Zhao, Y.; Chen, W.; Hong, S.; Pan, J.; Jiang, B. The potential application of concentrated growth factor in pulp regeneration: An in vitro and in vivo study. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Rochira, A.; Siculella, L.; Damiano, F.; Palermo, A.; Ferrante, F.; Carluccio, M.A.; Calabriso, N.; Giannotti, L.; Stanca, E. Concentrated Growth Factors (CGF) Induce Osteogenic Differentiation in Human Bone Marrow Stem Cells. *Biology* **2020**, *9*, 370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Zhang, Z.; Li, X.; Zhao, J.; Jia, W.; Wang, Z. Effect of autogenous growth factors released from platelet concentrates on the osteogenic differentiation of periodontal ligament fibroblasts: A comparative study. *PeerJ* **2019**, *7*, e7984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. 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*, 357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Machut, K.; Zoltowska, A.; Pawlowska, E.; Derwich, M. Plasma Rich in Growth Factors in the Treatment of Endodontic Periapical Lesions in Adult Patients: Case Reports. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Soto-Peñalozza, D.; Peñarrocha-Diago, M.; Cervera-Ballester, J.; Peñarrocha-Diago, M.; Tarazona-Alvarez, B.; Peñarrocha-Oltra, D. Pain and quality of life after endodontic surgery with or without advanced platelet-rich fibrin membrane application: A randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1727–1738. [[CrossRef](#)]
130. Kavitha, M.; Krishnaveni, R.; Swathi, A.M.; Abubacker, M.H.M. Evaluation of healing by Cone Beam Computed Tomography (CBCT) using Platelet-Rich Plasma (PRP) + β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) and Platelet Rich Fibrin (PRF) + β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) in periapical lesions: Case report. *Niger J. Clin. Pract.* **2020**, *23*, 1026–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Sureshbabu, N.M.; Ranganath, A.; Jacob, B. Concentrated Growth Factor—Surgical Management of Large Periapical Lesion Using a Novel Platelet Concentrate in Combination with Bone Graft. *Ann. Maxillofac. Surg.* **2020**, *10*, 246–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Taschieri, S.; Rosano, G.; Weinstein, T.; Bortolin, M.; Del Fabbro, M. Treatment of through-and-through bone lesion using autologous growth factors and xenogeneic bone graft: A case report. *Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *16*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Shivashankar, V.Y.; Johns, D.A.; Vidyanath, S.; Sam, G. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. *J. Conserv. Dent.* **2013**, *16*, 261–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zhao, J.H.; Tsai, C.H.; Chang, Y.C. Management of radicular cysts using platelet-rich fibrin and bioactive glass: A report of two cases. *J. Formos. Med. Assoc.* **2014**, *113*, 470–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Dudeja, P.G.; Dudeja, K.K.; Garg, A.; Srivastava, D.; Grover, S. Management of a Previously Treated, Calcified, and Dilacerated Maxillary Lateral Incisor: A Combined Nonsurgical/Surgical Approach Assisted by Cone-beam Computed Tomography. *J. Endod.* **2016**, *42*, 984–988. [[CrossRef](#)]
136. Wadhwa, J.; Gupta, A.; Hans, S. Evaluation of Periapical Healing of Apicomarginal Defect in Mandibular First Molar Treated with Platelet Rich Fibrin: A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **2017**, *11*, ZD01–ZD03. [[CrossRef](#)]

137. Vidhale, G.; Jain, D.; Jain, S.; Godhane, A.V.; Pawar, G.R. Management of Radicular Cyst Using Platelet-Rich Fibrin & Iliac Bone Graft—A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, *9*, ZD34–ZD36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Bains, R.; Bains, V.K.; Loomba, K.; Verma, K.; Nasir, A. Management of pulpal floor perforation and grade II Furcation involvement using mineral trioxide aggregate and platelet rich fibrin: A clinical report. *Contemp. Clin. Dent.* **2012**, *3* (Suppl. S2), S223–S227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Demiralp, B.; Keleşli, H.G.; Muhtaroullar, M.; Serper, A.; Demiralp, B.; Eratalay, K. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: A case report. *J. Endod.* **2004**, *30*, 796–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Hiremath, H.; Motiwala, T.; Jain, P.; Kulkarni, S. Use of second-generation platelet concentrate (platelet-rich fibrin) and hydroxyapatite in the management of large periapical inflammatory lesion: A computed tomography scan analysis. *Indian J. Dent. Res.* **2014**, *25*, 517–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Parikh, B.; Navin, S.; Vaishali, P. A comparative evaluation of healing with a computed tomography scan of bilateral periapical lesions treated with and without the use of platelet-rich plasma. *Indian J. Dent. Res.* **2011**, *22*, 497–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

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

Katarzyna Machut and Agata Żółtowska

Special Issue

Advances in the Diagnosis and Treatment of Endodontic Diseases

Edited by

Prof. Dr. Falk Schwendicke and Dr. Sascha Herbst





Article

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

Katarzyna Machut * and Agata Żółtowska

Department of Conservative Dentistry, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, 80-208 Gdansk, Poland

* Correspondence: katarzyna.machut@gumed.edu.pl; Tel.: +48-511-762-339



Citation: 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*, 6092. <https://doi.org/10.3390/jcm11206092>

Academic Editors: Falk Schwendicke and Sascha Herbst

Received: 7 September 2022

Accepted: 14 October 2022

Published: 16 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The study presents results of periapical lesion healing after one-visit root canal treatment (RCT) with Advanced Platelet Rich Fibrin plus (A-PRF+) application compared to a two-visit RCT with an inter-appointment calcium hydroxide filling. The comparison was made based on CBCT-Periapical Index (PAI) lesion volume changes and the occurrence of post endodontic pain. The results of 3D radiographic healing assessments based on volume reduction criteria were different from the CBCT-PAI. Based on volume changes, the healing assessment criteria—9 cases from the Study Group and six cases in the Control Group were defined as healed. Based on the CBCT-PAI healing assessment criteria, 8 cases from the Study Group and 9 cases from the Control Group were categorized as healed. The volumes of apical radiolucency were, on average, reduced by 85.93% in the Study Group and by 72.31% in the Control Group. Post-endodontic pain occurred more frequently in the Control than in the Study Group. The highest score of pain in the Study Group was five (moderate pain, $n = 1$), while in the Control Group, the highest score was eight (severe pain, $n = 2$). In the 6-month follow-up, CBCT scans showed a better healing tendency for patients in the Study Group.

Keywords: advanced platelet rich fibrin plus; biomaterials; endodontics; root canal preparation; periapical lesion healing; cone-beam computed tomography (CBCT)

1. Introduction

The periapical lesion, also known as symptomatic or asymptomatic apical periodontitis, is local inflammation that is caused by pulpal infection or traumas but can also be due to accidental over-instrumentation or chemical irritation of periapical tissues during root canal treatment [1]. The local inflammation is a result of disturbed stability between the infected root canal and host defense [2]. It may lead to the destruction of periodontal ligaments and to resorption of the mineralized tissue of both the tooth and/or alveolar bone. Mainly, periapical lesions are manifested as abscesses, granuloma, or cysts, which are radiolucent [3–6].

Several treatment methods have been described in the management of periapical lesions, such as: non-surgical root canal treatment (RCT), periradicular surgery, or tooth extraction. If possible, non-surgical approaches should be the treatment of choice. If the RCT is unsuccessful or impracticable, apicoectomy should be recommended. In the case that both the RCT and apicoectomy are ineffective, a tooth extraction would be suggested [7,8]. There are supplementary procedures that may probably enhance periapical lesion healing, such as: using a triple antibiotic paste (Hoshino paste containing Ciprofloxacin 500 mg, Metronidazole 400 mg, and Minocycline 100 mg) as a canal dressing, photo-activated disinfection (PAD) or magnetostimulation. However, there is still a need for further study

in order to confirm their abilities [8,9]. RCT with a mineral trioxide aggregate (MTA) as an apical closure can be used for the apexification of an immature tooth with a large periapical lesion [10].

The main aim of apical periodontitis treatment is to remove the cause—eliminate bacteria from the root canal [11]. Mechanical debridement is not enough to eradicate microorganisms from a canal, so chemical irrigation with sodium hypochlorite 1–6% during and after instrumentation is recommended as it increases the effectiveness of bacteria reduction [12,13].

Non-hardening calcium hydroxide is used as an intracanal dressing with the highest activity during the first 2 weeks in two- or multi-visit RCT [14]. Due to an alkaline pH, it has a good proven eradication effectiveness of 80–100% of bacteria [15]. In addition, calcium hydroxide improves periapical tissue healing due to ionic effects: chemical dissociation into calcium and hydroxyl ions. Those ions have antimicrobial properties as they neutralize endotoxins produced by anaerobic bacteria. Calcium groups take part in bone tissue mineralization, while hydroxyl groups disintegrate the cytoplasmic membrane structure of bacteria cells and enhance tissue enzymes activity [16]. The main disadvantage of a two-visit treatment is a risk of the leakage of a temporary filling which may cause canal reinfection and impede the periapical lesions healing [17].

By definition, in a single-visit treatment, there is no risk of reinfection between the appointments. This approach additionally brings economical profits since some dental procedures, such as local anesthesia or the sterilization of tools, do not need to be repeated. Some studies suggested that a single-visit treatment is burdened with a higher risk of flare-ups, complications, or more frequent post-operative pain; however, the systematic reviews of Schwendicke et al. and Wong et al. did not confirm this statement arguing that there are no significant differences in a flare-up incidence between single and two-visit RCT [18,19].

Platelet-rich fibrin (PRF) is a second generation of autologous platelet concentrations (APCs). Except for platelets, PRF also contains other blood particles—B and T lymphocytes, monocytes, neutrophils, and stem cells, as well as growth factors (such as the platelet-derived epidermal growth factor (PD-EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and transforming growth factor-beta (TGF- β)) [20,21]. An important property of PRF is the prolonged release of growth factors at the application site, typically for more than 7 days [22]. Growth factors and released cytokines stimulate the activity of osteoblasts. The release of growth factors additionally expedites tissue regeneration by increasing the migration of fibroblasts [23,24]. PRF is commonly used in medicine and dentistry and has a proven ability to reduce postoperative pain and discomfort as well as accelerating recovery [25]. PRF seems to be particularly effective in regenerative dentistry as it is considered to enhance the formation of new bone tissue [26].

By decreasing the speed and shortening the time of the centrifugation of blood, a new modification of APCs was developed, and it is now known as advanced platelet rich fibrin plus (A-PRF+). A-PRF+ has regenerative abilities, which have been proved to be higher than other formulations of PRF [27]. A-PRF+ also has a significantly increased level of released growth factors (TGF- β 1, VEGF, PDGF, EGF, and IGF1) compared to the A-PRF and PRF. In addition, A-PRF+ promoted the enhanced migration and proliferation of human gingival fibroblasts [27,28]. Therefore, it may be speculated that the application of A-PRF+ in the apical region, before the final obturation of the root canal system, may accelerate the repair of periapical tissues.

The evaluation of a periradicular tissue condition is a vital element of the diagnosis, which allows the appropriate selection of a treatment method and an assessment of its results. The radiographic image of chronic apical periodontitis healing has been traditionally evaluated using the criteria known as the Periapical Index (PAI) [29] defined by Ørstavik et al. This scoring system uses a scale from one to five [Table 1] and is based on periapical radiographs. A score between one and two is recognized as healthy, and

a score between three and five—as diseased. Other scales used to assess the outcome of periapical lesions healing after endodontic microsurgery based on periapical radiographs are Rud’s and Molven’s criteria [30]. All of these three scales are based on 2D imagery, which is a simplified representation of three-dimensional structures [30]. The overlapping of anatomical structures, geometric deformations, and background noise can thus impede the correct diagnosis [31,32].

Table 1. Periapical Index (PAI).

| Periapical Index | |
|------------------|--|
| 1 | Normal periapical structures |
| 2 | Small changes in bone structures |
| 3 | Change in bone structure with mineral loss |
| 4 | Periodontitis with well-defined radiolucent area |
| 5 | Severe periodontitis with exacerbating features |

Nowadays, cone-beam computed tomography (CBCT) is widely used in dentistry as an important tool in diagnostics and treatment planning [33]. Due to the cost and the exposure to radiation levels higher than in conventional radiographs, CBCT is still not commonly used for assessing root canal treatment outcomes [30]. According to the guidelines of the European Society of Endodontology (ESE), the use of CBCT should be considered after scrupulous clinical examination, including other tests such as conventional radiographs, in accordance to the ALARA (as low as reasonably achievable) principle [34]. The decision to use CBCT should be made individually when the periapical radiographs are not sufficient. In endodontics, CBCT must be adjusted to minimize the effective radiation dose by applying a high resolution and small FOV (field of view) (<5 cm) [34].

Based on clinical experience, CBCT is particularly recommended for diagnosing traumas as well as for the detection of periapical lesions and their differentiation between semi-solid granulomas and fluid-containing cavities (radicular cysts). This diagnostic tool is also valuable in identifying complex root canal systems, possible obliterations/resorptions, previous treatment complications/errors, and in planning periradicular surgery [35].

An index for periapical area evaluation was developed by Estrela C. et al. based on measurements of radiolucency interpreted on CBCT scans. It is known as CBCT-Periapical Index (CBCT-PAI). The CBCT-PAI is determined by the largest lesion extension in the 3 planes [36]. Table 2 presents the scoring scale of CBCT-PAI.

Table 2. Periapical tissue evaluation: CBCT-PAI.

| Score | Quantitative Radiolucency in Alveolar Bone Structures |
|---------------|---|
| 0 | Undisturbed periapical bone structures |
| 1 | Diameter of periapical radiolucency > 0.5–1 mm |
| 2 | Diameter of periapical radiolucency > 1–2 mm |
| 3 | Diameter of periapical radiolucency > 2–4 mm |
| 4 | Diameter of periapical radiolucency > 4–8 mm |
| 5 | Diameter of periapical radiolucency > 8 mm |
| Score (n) + E | Expansion of periapical cortical bone |
| Score (n) + D | Destruction of periapical cortical bone |

The aim of this study is to compare six-month follow-ups of periapical lesion healings after one-visit RCT with A-PRF+ application vs. two-visit RCT with inter-appointment calcium hydroxide dressings. The comparison will be made based on CBCT-PAI criteria, lesion volume changes, and the occurrence of PEP (post endodontic pain).

2. Materials and Methods

2.1. Case Selection

This retrospective cohort study was approved by the Independent Bioethics Committee for Scientific Research at the Medical University of Gdansk (No. NKBBN/607/2019) and was carried out in the Conservative Dentistry Clinic in the University Dental Center of the Medical University of Gdansk, Poland. The research was conducted between December 2019 and January 2022, and root canal treatments were performed by the same endodontist (K.M.). The primary sample size was determined by the limits imposed in the Bioethics Committee decision. Figure 1 shows, as a Consort 2010 Flow Chart, the distribution of participants and sample size at the time of the study. All RCTs were performed with a modified crown-down technique using nickel-titanium (NiTi) 0.04 rotary instruments (K3, Kerr, Glendora, CA, USA). The root canal irrigation protocol, along with manual-dynamic-activation (MDA) including: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl), 40% citric acid (CA), and distilled water.

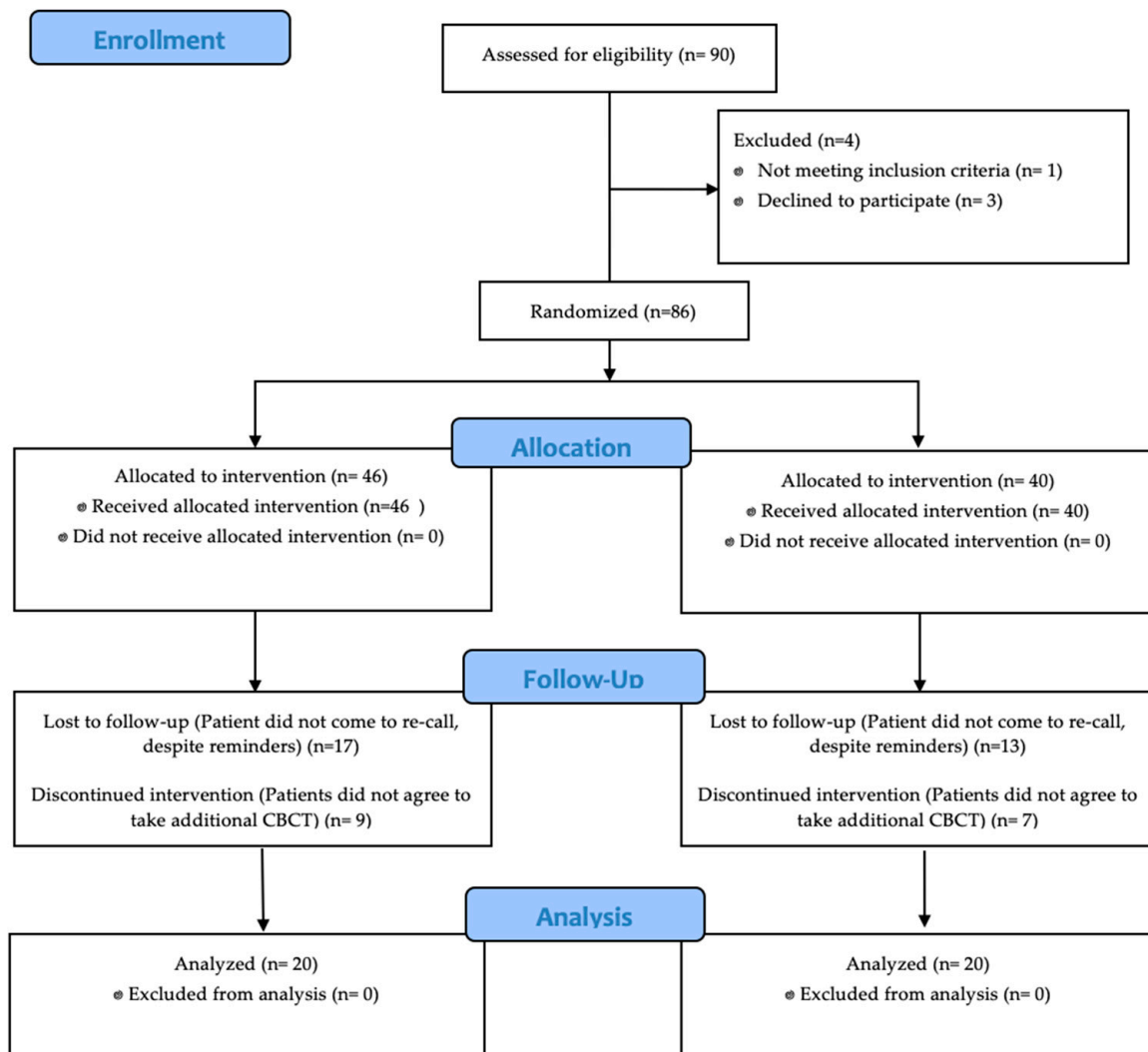


Figure 1. Consort 2010 Flow Chart.

Cases were selected using inclusion and exclusion criteria as described below. The inclusion criteria were as follows:

1. Generally healthy patients, both sexes, aged from 20 to 50 years old.
2. Root canal treatments of apical periodontitis cases with both preoperative and 6-month follow-up CBCT images.

3. Teeth with appropriate amount of hard tooth tissue to be restored.
4. Patients who had an intact restoration at follow-up.

The exclusion criteria were as follows:

1. Teeth with root fractures or perforations.
2. Teeth which were previously endodontically treated.

In the study group (A-PRF+ group), after root canal preparation, blood was drawn from a median cubital vein and collected in glass tubes (10 mL). The blood was then centrifugated at 1200 rpm for 8 min in the Neuation iFuge D06 Premium Edition (Neuation Technologies Pvt., Gandhinagar, India) centrifuge to obtain advanced platelet-rich fibrin plus (A-PRF+), according to the technical documentation. The fibrin clot was squeezed between 2 sterile gauze pieces to remove the liquid and create a fibrin membrane. The prepared A-PRF+ membrane was then placed into the apex and pushed below the level of the cementodentinal junction by using Machtou hand pluggers-size 1/2 NiTi (red) and 3/4 (grey). Next, the canals were finally obturated and filled by a thermoplastic method (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmbH, Munchen, Germany) with a calibrated gutta-percha cone and AH-plus sealer (Dentsply DeTrey GmbH, Philadelphia, PA, USA).

In the control group (Ca(OH)₂ group), after root canal preparation, the canal was temporarily filled with a calcium hydroxide dressing for 2-weeks. After that period, the canals were finally filled using a thermoplastic method (BeeFill 2in1 Obturation Kit, VDW GmbH, Munchen, Germany) with a calibrated gutta-percha cone and AH-plus sealer (Dentsply DeTrey GmbH, Philadelphia, PA, USA).

The methods and materials are summarized in Table 3.

Table 3. Summary of materials and methods.

| Study Group | Control Group |
|--|--|
| All patients were treated by one investigator according to a standard regimen including elements of access, rubber dam, and establishment of asepsis. Local anesthesia (4% articaine with 1:100,000 epinephrine) was administered to the patient. | |
| Initial canal working length was established by using the electronic apex locator and a stainless-steel K-file (Endostar, Poldent LLC, Warsaw, Poland). Working length was confirmed by using radiographs. Canals were chemomechanically prepared with the modified crown-down technique using NiTi 0.04 rotary instruments (K3, Kerr, Glendora, CA, USA). Canals were irrigated with 5% sodium hypochlorite after each instrumentation cycle. All canals were irrigated with 40% citric acid (CA) for 1 min followed by a final irrigation with 5% sodium hypochlorite, and distilled water with the manual dynamic activation (MDA) and gutta-percha cone. Canals were then dried with sterile paper points. | The canal was temporarily filled with non-hardening calcium hydroxide for 2 weeks. At the second appointment, the canal was obturated at the same appointment by using the thermoplastic method with a calibrated gutta-percha cone and AH-plus sealer, using the combination of a down-pack heat source with a Backfill extruder. |
| Application of A-PRF below the cementodentinal junction. Final obturation by the thermoplastic method with calibrated gutta-percha cone and AH-plus sealer, using the combination of a down-pack heat source with a Backfill extruder. | |

2.2. Pain Assessment

Patients were recalled 7 days after RCT. They were asked to indicate their perceived post-treatment pain on a horizontal visual analog scale (VAS). The values assigned on VAS were between 0 and 10. The description of pain intensity was presented to the patient by the examiner and was as follows: 0: No pain; 1–3: Mild pain; 4–6: Moderate pain; 7–10: Severe pain. Patients marked their post-operative pain levels in the presence of the clinician to ensure that they understood the instructions.

2.3. Healing Assessment

In the study, healing assessments were based on radiographic CBCT scans and CBCT-PAI criteria. Healing assessments were performed by two examiners (K.M. and A.Ž) who discussed discrepancies in the evaluation and reached an agreement in each case. The criteria of CBCT-PAI healing assessments [9] were as follows:

Favorable result:

- Healed lesion: CBCT-PAI from 3, 4, 5 (+E/D) pre-operatively to CBCT-PAI 0, 1, 2 after 6-months.
- Healing lesion: CBCT-PAI from 3, 4, 5 (+E/D) pre-operatively improved, but is not 0, 1, 2 at a follow up CBCT.

Unfavorable result:

- Diseased (not healed/healing): CBCT-PAI pre-operatively stays the same at follow up or is enlarged.

Another 3D radiographic healing assessment classification that is used in the literature and in evaluation after periradicular surgery is known as PENN 3D. Due to the lack of such classification for periapical lesion healing after non-surgical RCT, for this study these criteria were modified with the addition of volume changes. The criteria modified for RCT 3D with lesions volume reduction [31] are presented in Table 4.

Table 4. 3D Radiographic Healing Assessment Criteria.

| Score | Healing | Description |
|-------|----------------|---|
| 1 | Complete | <ul style="list-style-type: none"> • Small defect in bone surrounding the root apex- has widened the periodontal space up to 1 mm. • Complete bone repair. Hard tissue surrounds the root apex • The lesions volume reducing is from 90 to 100%. |
| 2 | Limited | <ul style="list-style-type: none"> • A radiolucent area remains located around the apex and is connected with the periodontal space. • Alveolar bone has not fully repaired. • The lesions volume reducing is from 70 to 89%. |
| 3 | Uncertain | <ul style="list-style-type: none"> • The volume of the low-density area appears decreased. The lesions volume is reducing from 50% to 69%. |
| 4 | Unsatisfactory | <ul style="list-style-type: none"> • The volume of the radiolucency area is enlarged or unchanged or the volume reduce is lower than 50%. |

2.4. Calculation of Lesion Volume in CBCT

The measurements of preoperative and postoperative volumes of the lesion in CBCT images were required to evaluate healing. The lesion volumes were calculated using the ITK-SNAP (free software under the GNU General Public License developed by the National Institutes of Health, the US National Institute of Biomedical Imaging and BioEngineering, the US National Library of Medicine, the Universities of Pennsylvania and North Carolina, and an independent developer group). Defect area segmentation and volume calculation were manipulated using the volumes at the highest resolution in CS 3D Imaging v3.5.18 Software (Carestream Health Inc., Trophy, Croissy-Beaubourg, France).

2.5. Statistical Analysis

The Mann-Whitney U and Kolmogorov-Smirnov non-parametric tests, as well as one-way ANOVA parametric tests were carried out to compare the healing and PEP assessment of the study and control groups. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics v.28.0.1.1(14) (IBM, Armonk, NY, USA) with a significance level of *p* values < 0.05.

3. Results

A total of 40 teeth from 36 patients were evaluated six months after the endodontic treatment by using preoperative and recall CBCT scans. Cases are summarized in Table 5.

Table 5. Case distribution of patients (n = 36) and treated teeth (n = 40) *.

| | | Study Group | Control Group | |
|-----------------------|------------|----------------|----------------|-------|
| Sex | female | 52.6% (n = 10) | 45.0% (n = 9) | |
| | male | 47.4% (n = 9) | 55.0% (n = 11) | |
| Age (average) ** | | 33.7 | 30.0 | |
| API (average) [%] *** | | 54.3 | 65.0 | |
| Tooth | maxillary | incisors | N = 10 | N = 8 |
| | | canines | N = 2 | N = 2 |
| | | premolars | N = 3 | N = 4 |
| | | molars | N = 0 | N = 0 |
| | mandibular | incisors | N = 1 | N = 1 |
| | | canines | N = 1 | N = 0 |
| | | premolars | N = 1 | N = 2 |
| | | molars | N = 2 | N = 3 |

* Three patients fell into both groups (as each of them had one tooth treated with A-PRF+ and another tooth treated using a two-visit approach). In addition, one patient had two teeth treated simultaneously with the same method (A-PRF+). ** Participants' age at the moment of RCT. *** API-Aproximal Plaque Index is used to assess oral hygiene by determining plaque presence in the first and third quadrants linguallly and in the second and fourth quadrants buccally.

Both preoperative and postoperative lesion volumes were calculated using the free software ITK-SNAP version 3.8.0. The manual segmentation of the periapical defect was made in sagittal, axial and coronal views. Next, the defect was automatically reconstructed as a 3D object, and the lesions' volumes were calculated. Examples of 3D reconstructions are shown in a Figures 2 and 3, which present two lesions of one patient, and Figures 4 and 5, which present two lesions from different groups with similar volume.

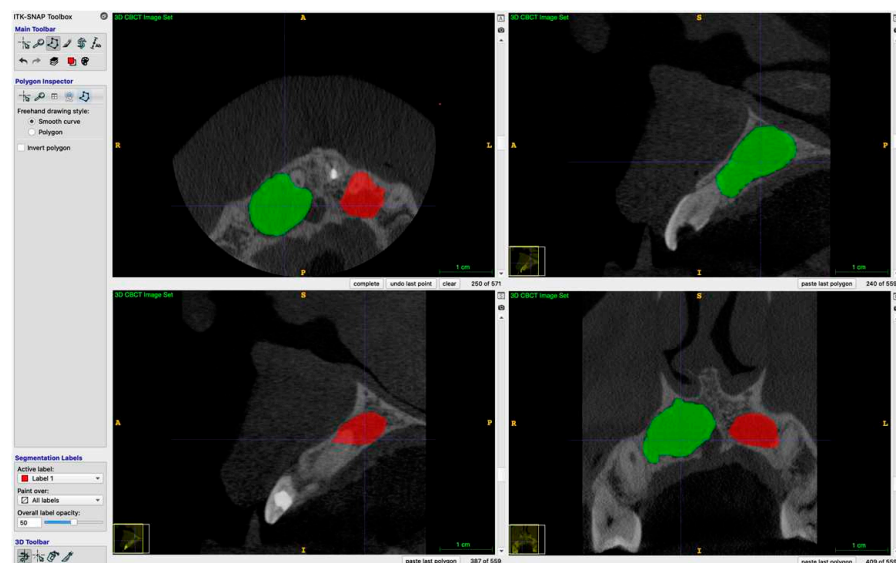


Figure 2. Example of a 3D reconstruction of two lesions pre-operatively. The lesion marked green was classified to the A-PRF+ group, and the one marked red was assigned to the control group.

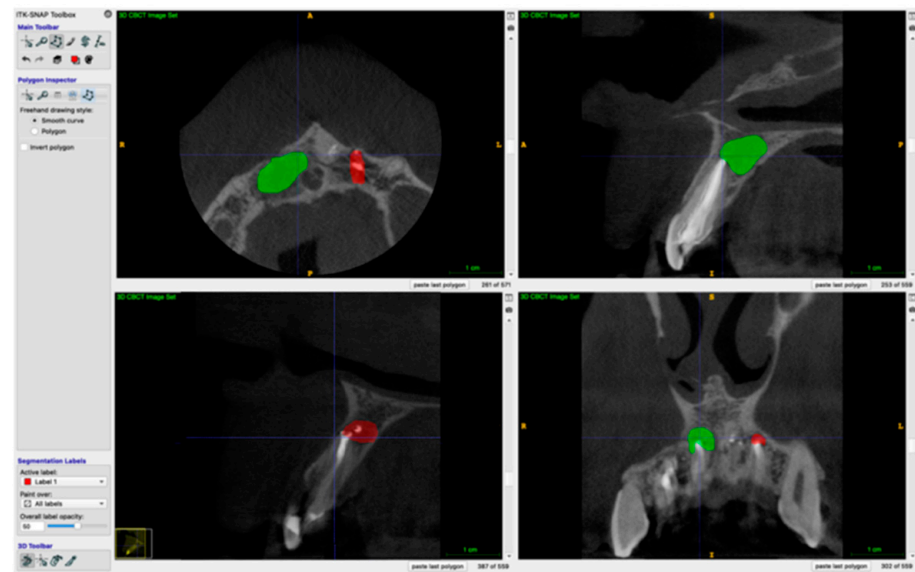


Figure 3. Example of a 3D reconstruction of two lesions at 6-month re-call.

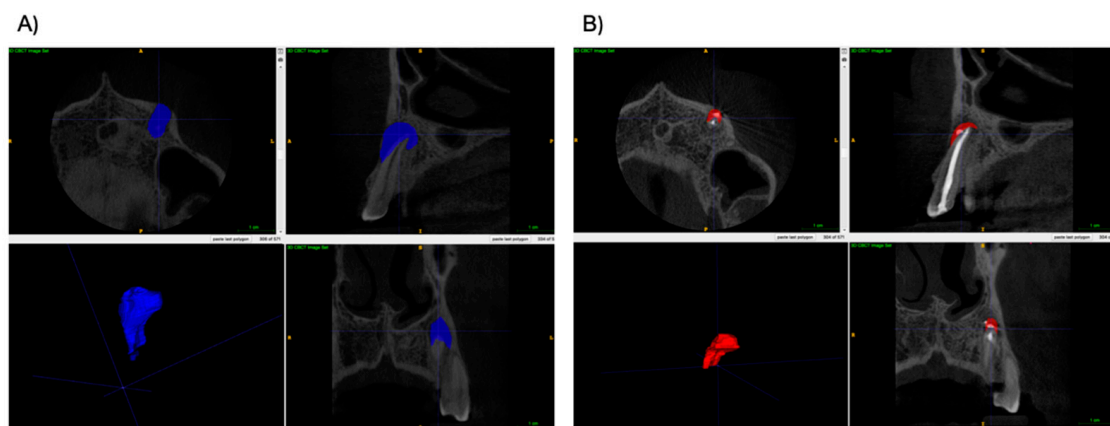


Figure 4. Example of a 3D reconstruction of lesions from the A-PRF+ group. (A) Reconstruction pre-operatively (Volume = 237.2 mm³), and (B) The lesion's reconstruction at 6-month re-call. (Volume = 51.5 mm³).

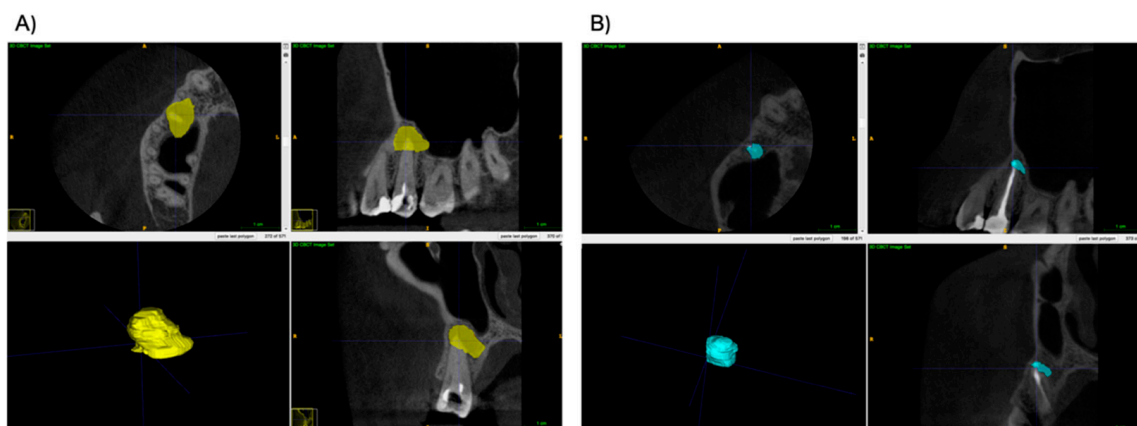


Figure 5. Example of a 3D reconstruction of lesions from the control group. (A) Reconstruction pre-operatively (Volume = 237.0 mm³), and (B) The lesion's reconstruction at 6-month re-call. (Volume = 56.1 mm³).

The volumes of apical radiolucency six months after endodontic treatment in the A-PRF group were, on average, reduced by 85.93% and in the control group by 72.31%. A statistically significant difference was confirmed in one-way ANOVA ($p = 0.049$). Volume reduction is presented in the box plot Figure 6.

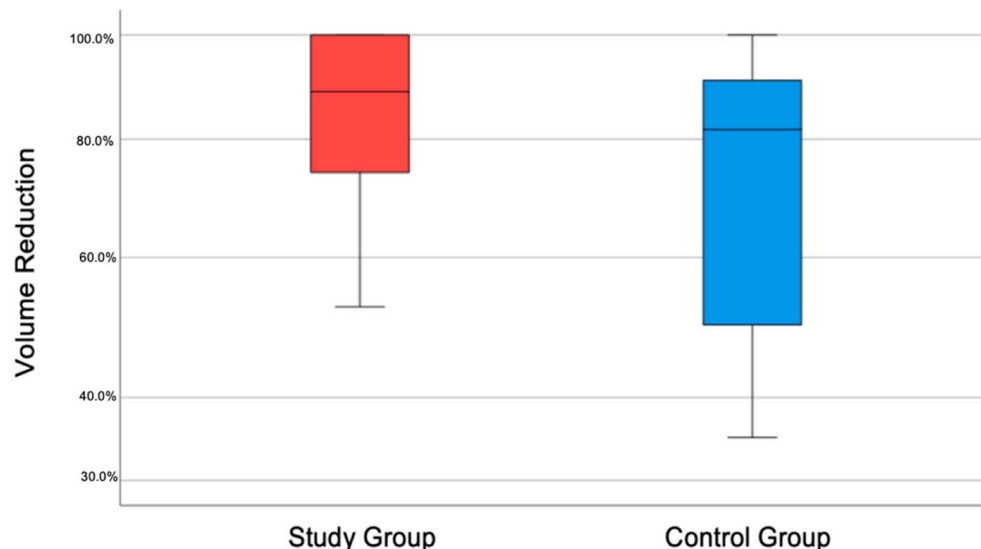


Figure 6. Lesion volume reduction box plot.

Based on 3D Radiographic Healing Assessment Criteria in the Study Group, 9 teeth were categorized as completely healed, 8 teeth as being healed to a good standard, and 3 teeth as having only limited healing. In the Control Group 6 teeth were categorized as completely healed, 5 teeth as being healed to a good standard, 4 teeth as having only limited healing, and five teeth with uncertain healing. Results are presented in Table 6, and there was a statistically significant difference of $p < 0.05$. There was no incidence of any persistent pain, swelling, or fistula, and there was no reduction in periapical radiolucency in any of the cases, so none of the treatments were considered to have failed.

Table 6. Results of 3D Radiographic Healing Assessment and CBCT-PAI healing assessment.

| Healing Assessment | Study Group | Control Group |
|-----------------------|-------------|---------------|
| Completely healed | N = 9 | N = 6 |
| Good healing | N = 8 | N = 5 |
| Limited healing | N = 3 | N = 4 |
| Uncertain healing | N = 0 | N = 5 |
| Healed | N = 8 | N = 9 |
| Healing | N = 12 | N = 9 |
| Not Healed/No Healing | N = 0 | N = 2 |

Based on CBCT-PAI healing assessment criteria in the Study Group, 8 cases were categorized as healed and, 12 cases were categorized as healing. In the Control Group, 9 cases were categorized as healed, 9 cases as healing, and 2 cases as not healed. The comparison of the post-operative vs. re-call CBCT-PAI's in the Study and Control Groups are presented in Figures 7 and 8 (Study and Control Groups respectively). Results are shown in Table 6.

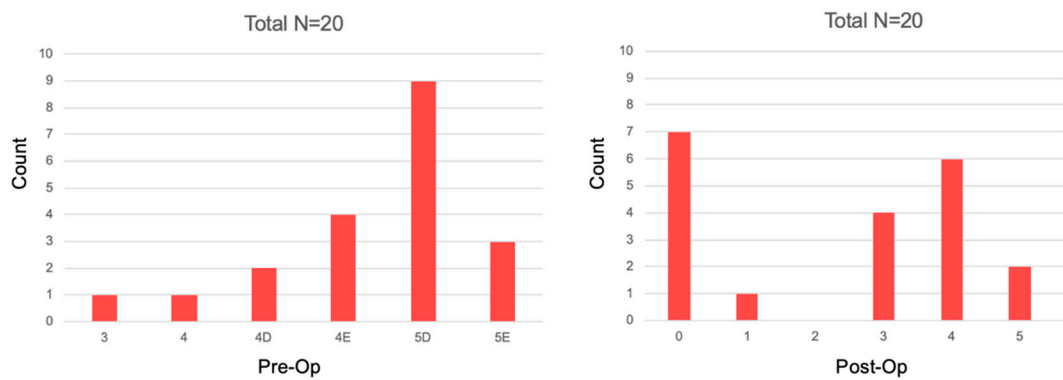


Figure 7. CBCT-PAI before and six months after the treatment in the Study Group.

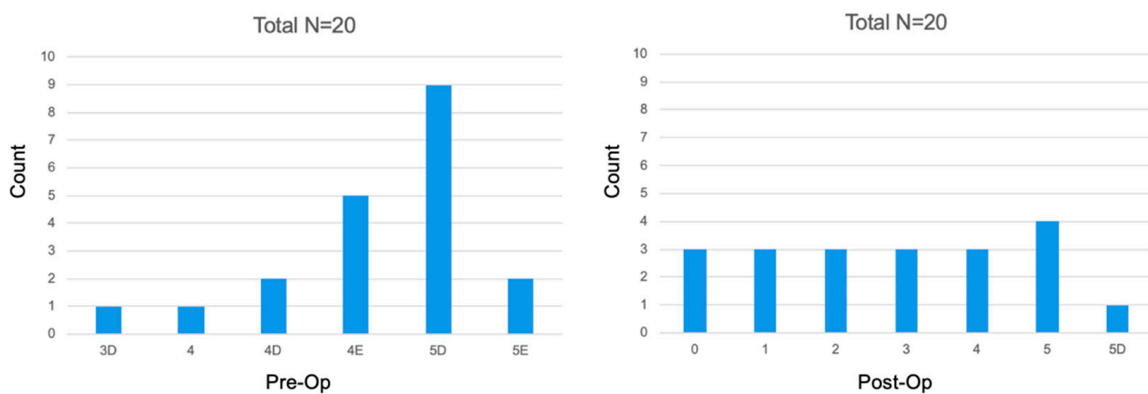


Figure 8. CBCT-PAI before and six months after the treatment in the Control Group.

To evaluate the incidence of post-endodontic pain, every patient from the Study and Control Group was invited to a re-call 1-week post root canal treatment. Post-endodontic pain occurred more frequently in the Control Group than in the Study Group (Mann-Whitney U test $p = 0.221$), but there was no statistically significant difference. The highest score in the Study Group was 5 (mild pain, $n = 1$), while in the Control Group, the highest score was 8 (severe pain, $n = 2$). Results are presented in Figure 9. In addition, after root canal treatment, 5 patients from the Control Group and 1 patient from the Study Group required additional analgesic therapy (Mann-Whitney U test $p = 0.289$), but there was no statistically significant difference. All of the patients were taking NSAID Ibuprofen for 2-days (400 mg^{-1} tablet/capsule every 4–6 h, but no more than 3 tablets/capsules in 24 h).

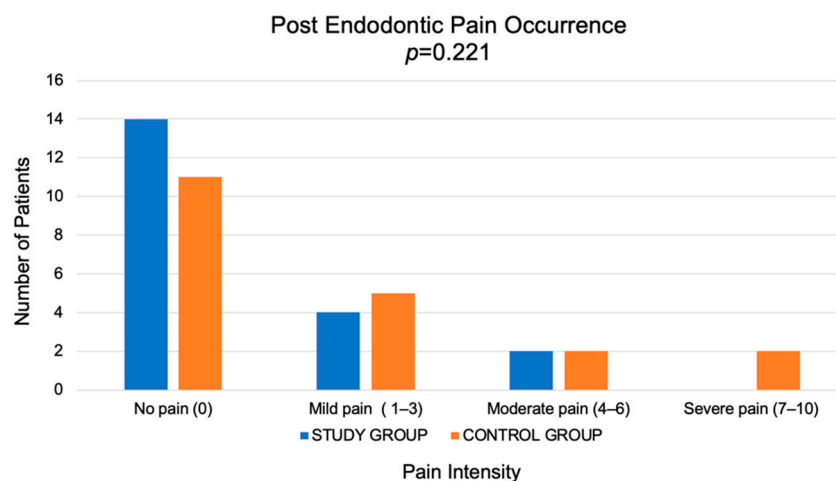


Figure 9. Results of post endodontic pain incidence in study and control groups.

4. Discussion

The periapical area can be divided into two parts: (1) the inner—around the root apex and (2) the outer—surrounding the inner one [5]. The most frequently occurring microbes in the infected radicular system are Gram-negative anaerobes. Anaerobes produce endotoxin (aka lipopolysaccharide, LPS), which can activate the complement system by producing factor C5a [2,37]. This factor has an impact on generating chemotactic peptides. Due to chemotaxis in the inner part, the innate immune system cells—granulocytes (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) and mainly the neutrophils prevail. Another known chemotactic factors for PMNs are interleukin-8 (IL-8), granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-17 (IL-17) [5,38]. The first symptoms of inflammation are limited to hyperemia, edema, and the formation of exudate in the periodontal ligaments area [2,5]. It is interesting to note that in 95% of acute periapical periodontitis IL-8 was detectable in the exudate. This suggests that IL-8 may play a crucial role in the development of those lesions [39]. In the outer area of apical periodontitis, the macrophages and T lymphocytes are predominant. The migration of macrophages into the area of inflammation is much slower than PMNs [40]. Endotoxins stimulate macrophages to produce IL-1 and TNF- α . Those cytokines are pivotal in bone resorption.

Due to the decreased speed of centrifugation the total number of cells is higher in A-PRF+, compared to the standard PRF. An increase, especially in the number of neutrophils and lymphocytes was obtained [27]. All the cells were suspended in fibrin mesh, which stimulated the delayed resorption of the membrane and enabled typically 7–10 days lasting release of growth factors. A greater number of immune cells promote macrophage differentiation and maturation. The increase in the number of macrophages leads to an increase in the production of growth factors, which promotes the regeneration of bones and soft tissues [27]. In addition, the number of platelets is also higher, so the total amount of released growth factors (TGF- β 1, VEGF, PDGF, EGF, and IGF1) is much higher in A-PRF+. A-PRF+ has the ability to induce angiogenesis and to act as a scaffold, which may accelerate the healing and regeneration of the damaged tissue [41]. PRF has proven its ability to enhance the proliferation of mesenchymal stem cells, such as periodontal ligament fibroblasts (PDLFs), dental pulp stem cells (DPSCs), human dental pulp cells (HDPCs), and human gingival fibroblasts, that play vital role in the regeneration of periapical periodontium [42]. Furthermore, PRF membranes had an antimicrobial effect, even against one of the main periopathogens of *Porphyromonas gingivalis* [42]. All the proven abilities of A-PRF+ in repair and the regeneration of hard and soft tissues seem to be beneficial as an additional key in RCT.

Moreover, there is evidence that calcium hydroxide has an application in endodontic regeneration [43]. Calcium hydroxide may induce the proliferation of mesenchymal stem cells, for example, PDLFs and DPSCs [43,44]. The exposure of DPSCs to calcium hydroxide induces their proliferation, differentiation to osteogenic cells, and also mineralization [44]. Alsalleeh et al. and Bhandi et al. studied present similar results, highlighting that both the concentration and time of exposure to calcium hydroxide contribute to its cytotoxic effect on cell viability [43,45]. In the Alsalleeh et al. study there is a suggestion that commercial calcium hydroxide preparations may be more toxic than calcium hydroxide and made *ex tempore*, especially Metapaste [43].

The healing of periapical lesions starts from the periphery, with size reduction caused by the new bone formation. The lesion becomes smaller in the radiographic image, and bone trabeculae with different radiopacities which fill the space of the lesion [46]. The majority of periapical lesion healing should be assessed at least between 6 [47] and 12-months [48] after the root canal treatment. Orstavik D. reported that half of cases present experienced advanced and complete healing at the 6-month visit, and after 12 months, 88% of these lesions were completely healed. The periapical lesion healing after RCT may take up to four years in some cases [48]. Prediction of RCT treatment success for teeth with periapical lesions is about 10–15% lower than for teeth treated with RCT for other reasons [49]. The

reason for varying results among these studies may be: the extension of periapical lesions, the patients' age, and some local or systemic factors that may interfere the healing of the lesion. Moreover, the using technique of mechanical debridement, appropriate irrigation, homogeneous root canal filling, but also good and sealed post-treatment restoration are crucial in resolving periapical lesions. The volume measurement of periapical lesions is one of the advantages of evaluating radiographic lesion healing processes using CBCT. In this study, after six months on the basis of 3D Radiographic Healing Assessments of volume changes, 9 cases from the Study Group and 6 cases from the Control Group were defined as healed (a total of 15). Based on the CBCT-PAI healing assessment criteria, 8 cases from the Study Group and 9 cases from the Control Group were categorized as healed (a total of 17). The difference between the results of these two classifications is due to the fact that a significant reduction of up to 90% in the periapical lesion volume may appear, even when one of the dimensions remains at a value that classifies as unfavorable in CBCT-PAI criteria.

CBCT is one of the most predictable methods of periapical radiolucency findings, with over 90% sensitivity and specificity [50]. Linear measurements of periapical lesions in three spatial planes on CBCT are more accurate than the measurements on conventional 2D radiographs [51]. The indicators to evaluate the periapical radiolucency advancement are: CBCT-PAI [36] or the CBCT-endodontic radiolucency index (CBCT-ERI), which measure the periodontal ligaments' widths [52]. The above-mentioned scores in the available studies have the highest percentage of diversity between the observers [51]. Cotti et al. proposed the semiautomated segmentation of the volumes of the radiolucency on CBCT as a more accurate technique [51]. This conclusion seems to be corresponding with our results. Nevertheless, more studies have to be conducted, especially with the promising use of artificial intelligence detection of periapical lesions [51].

Post endodontic pain (PEP) has been reported in 25–40% of all endodontic cases. During the first 48 h after treatment, the pain reaches its greatest intensity and gradually decreases with time and typically lasts up to 7-days [53]. More than 50% of patients that suffer from PEP defined it as a severe pain [53,54]. The pain after the treatment is a main symptom of inflammation that may be caused by the extrusion of bacteria and dentinal or pulpal debris, but also irritants to the periapical tissues during root canal preparation [55].

Among all known preparation techniques, the least debris is extruded in the crown-down method [56].

In the Vishwanathaiah S. et al. review, in the majority of analyzed studies there were no significant differences in the occurrence of PEP between the single and multiple visit RCT [57]. One of the authors' observations was that the studies conducted after April 2020 found no significant difference between the two procedures, in contrary to older studies [57]. The possible reason of this change is improvement of the root canal preparation and obturation technique, as well as the recognition of the importance of irrigation which has improved the quality of single visit treatment [57]. In the systemic review made by Wong et al., the induction of postoperative pain is the same in the single- and multiple-visit endodontic treatment. Both single and two-visit treatments showed similar healing and success rates [18]. Schwendicke and Göstemeyer in their studies, however, found that the single-visit treatment significantly increased the risk of flare-up (swelling), but they agreed that there is a similar incidence of postoperative pain or success rate, no matter what method is used [19].

Among the participants of this study, PEP occurred in 8 cases in the Control group and 5 cases in the Study Group. This study found no significant difference in the incidence of postoperative pain between the single-visit with the use of A-PRF+ and the two-visit treatment group ($p > 0.05$). Nevertheless, the intensity of pain was probably greater in the Control Group compared to the Study Group.

In the study, patients were assigned randomly to Study and Control Groups with block randomization methods to prevent selection bias and to ensure a balance in sample size across groups over time. This study reached the minimum number of necessary samples required to meet the desired statistical constraints to have a confidence level of 95% that the

real value is within $\pm 5\%$ of the measured value. The power of the statistical tests used in this study was not high. A larger sample size would give more power in statistical analysis, but it is often difficult to achieve it in clinical practice, where the number of patients meeting the inclusion criteria is limited and where patients do not always attend re-call visits. A multicenter clinical trial might be ideal. Conducting research independently in several centers and a subsequent meta-analysis of results may be an alternative method of testing; however, the results of meta-analysis may be inaccurate due to different treatment protocols and methods of evaluation.

5. Conclusions

The results of 3D radiographic healing assessments of RCT using modified criteria were different from those based on CBCT-PAI criteria. In the 6-month follow-up, CBCT scans showed a better healing tendency in patients in the Study Group than in the Control Group. The volumes of apical radiolucency were, on average, reduced by 85.93% in the Study Group and by 72.31% in the Control Group.

Author Contributions: Conceptualization, K.M. and A.Ž.; methodology, K.M. and A.Ž.; software, K.M.; validation, K.M. and A.Ž.; formal analysis, K.M.; investigation, K.M. and A.Ž.; resources, K.M.; data curation, K.M.; writing—original draft preparation, K.M.; writing—review and editing, A.Ž.; visualization, K.M.; supervision—A.Ž.; project administration, K.M. and A.Ž.; funding acquisition, K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received funding for equipment from financial support program for the Young Scientists Fund in 2021, at a Medical University of Gdansk, the funding from account no. 01-0500/08/643.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abbott, P.V. Classification, diagnosis and clinical manifestation of apical periodontitis. *Endod. Top.* **2004**, *8*, 36–54. [[CrossRef](#)]
2. Nair, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2004**, *15*, 348–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Braz-Silva, P.H.; Bergamini, M.L.; Mardegan, A.P.; de Rosa, C.S.; Hasseus, B.; Jonasson, P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: A literature review. *Acta Odontol Scand.* **2019**, *77*, 173–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Koivisto, T.; Bowles, W.R.; Rohrer, M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: A retrospective analysis of 9723 cases. *J. Endod.* **2012**, *38*, 729–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Akinyamoju, A.O.; Gbadebo, S.O.; Adeyemi, B.F. Periapical lesions of the jaws: A review of 104 cases in ibadan. *Ann. Ib. Postgrad. Med.* **2014**, *12*, 115–119. [[PubMed](#)]
6. Karamifar, K.; Tondari, A.; Saghiri, M.A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur. Endod. J.* **2020**, *5*, 54–67. [[CrossRef](#)]
7. Fernandes, M.; de Ataide, I. Nonsurgical management of periapical lesions. *J. Conserv. Dent.* **2010**, *13*, 240–245. [[CrossRef](#)]
8. 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*, 1041. [[CrossRef](#)]
9. Johns, D.A.; Varughese, J.M.; Thomas, K.; Abraham, A.; James, E.P.; Maroli, R.K. Clinical and radiographical evaluation of the healing of large periapical lesions using triple antibiotic paste, photo activated disinfection and calcium hydroxide when used as root canal disinfectant. *J. Clin. Exp. Dent.* **2014**, *6*, 230–236. [[CrossRef](#)]
10. Demiriz, L.; Bodrumlu, E.H. Retrospective Evaluation of Healing of Periapical Lesions after Unintentional Extrusion of Mineral Trioxide Aggregate. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2017**, *15*, 382–386. [[CrossRef](#)]
11. Nair, P.N.R.; Henry, S.; Cano, V.; Vera, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after ‘one-visit’ endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2005**, *99*, 231–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tashkandi, N.; Alghamdi, F. Effect of Chemical Debridement and Irrigant Activation on Endodontic Treatment Outcomes: An Updated Overview. *Cureus* **2022**, *14*, 21525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Pinheiro, E.T.; Karygianni, L.; Attin, T.; Thurnheer, T. Antibacterial Effect of Sodium Hypochlorite and EDTA in Combination with High-Purity Nisin on an Endodontic-like Biofilm Model. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1141. [[CrossRef](#)]
14. Hosoya, N.; Takahashi, G.; Arai, T.; Nakamura, J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J. Endod.* **2001**, *27*, 343–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gill, G.S.; Bhuyan, A.C.; Kalita, C.; Das, L.; Katak, R.; Bhuyan, D. Single Versus Multi-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: An in vivo Study with 1-year Evaluation. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **2016**, *6*, 19–26. [[CrossRef](#)]
16. Mohammadi, Z.; Shalavi, S.; Yazdizadeh, M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: A review. *Chonnam Med. J.* **2012**, *48*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Balaji, S.; Kumar, K.; Venkatesan, R.; Krishnamoorthy, S.; Manoharan, V.; Marimuthu, S. Assessment of Coronal Leakage with Two Intracanal Medicaments After Exposure to Human Saliva—An In Vitro Study. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.* **2018**, *11*, 406–411. [[CrossRef](#)]
18. Wong, A.W.Y.; Zhang, C.; Chu, C.-H. A systematic review of nonsurgical single-visit versus multiple-visit endodontic treatment. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2014**, *6*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schwendicke, F.; Göstemeyer, G. Single-visit or multiple-visit root canal treatment: Systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ Open* **2017**, *7*, 013115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, 37–44. [[CrossRef](#)]
21. Choukroun, J.; Diss, A.; Simonpieri, A. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *101*, 299–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fujioka-Kobayashi, M.; Miron, R.J.; Hernandez, M. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: Growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 112–121. [[CrossRef](#)]
23. Canellas, J.V.D.S.; Medeiros, P.J.D.; Figueredo, C.M.D.S.; Fischer, R.G.; Ritto, F.G. Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *48*, 395–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, X.; Zhang, Y.; Choukroun, J.; Ghanaati, S.; Miron, R.J. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets* **2018**, *29*, 48–55. [[CrossRef](#)]
25. Lektemur Alpan, A.; Torumtay Cin, G. PRF improves wound healing and postoperative discomfort after harvesting subepithelial connective tissue graft from palate: A randomized controlled trial. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 425–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Miron, R.J.; Zucchelli, G.; Pikos, M.A.; Salama, M.; Lee, S.; Guillemette, V.; Fujioka-Kobayashi, M.; Bishara, M.; Zhang, Y.; Wang, H.L.; et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 1913–1927. [[CrossRef](#)]
27. Pavlovic, V.; Ciric, M.; Jovanovic, V.; Trandafilovic, M.; Stojanovic, P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med.* **2021**, *16*, 446–454. [[CrossRef](#)]
28. Sterczala, B.; Chwiłkowska, A.; Szwedowicz, U.; Kobielarz, M.; Chwiłkowski, B.; Dominiak, M. Impact of APRF+ in Combination with Autogenous Fibroblasts on Release Growth Factors, Collagen, and Proliferation and Migration of Gingival Fibroblasts: An In Vitro Study. *Materials* **2022**, *15*, 796. [[CrossRef](#)]
29. Orstavik, D.; Kerekes, K.; Eriksen, H.M. The periapical index: A scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod. Dent. Traumatol.* **1986**, *2*, 20–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kang, S.; Ha, S.W.; Kim, U.; Kim, S.; Kim, E. A One-Year Radiographic Healing Assessment after Endodontic Microsurgery Using Cone-Beam Computed Tomographic Scans. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lo Giudice, R.; Nicita, F.; Puleio, F.; Alibrandi, A.; Cervino, G.; Lizio, A.S.; Pantaleo, G. Accuracy of Periapical Radiography and CBCT in Endodontic Evaluation. *Int. J. Dent.* **2018**, *2018*, 2514243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sha, X.; Jin, L.; Han, J.; Li, Y.; Zhang, L.; Qi, S. Comparison of periapical radiography and cone beam computed tomography for the diagnosis of anterior maxillary trauma in children and adolescents. *Dent. Traumatol.* **2022**, *38*, 62–70. [[CrossRef](#)]
33. Shukla, S.; Chug, A.; Afrashtehfar, K.I. Role of Cone Beam Computed Tomography in Diagnosis and Treatment Planning in Dentistry: An Update. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2017**, *7*, 125–136. [[CrossRef](#)]
34. Patel, S.; Brown, J.; Semper, M.; Abella, F.; Mannocci, F. European Society of Endodontology position statement: Use of cone beam computed tomography in Endodontics: European Society of Endodontology (ESE) developed by. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1675–1678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Patel, S.; Patel, R.; Foschi, F.; Mannocci, F. The impact of different diagnostic imaging modalities on the evaluation of root canal anatomy and endodontic residents' stress levels: A clinical study. *J. Endod.* **2019**, *45*, 406–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Estrela, C.; Bueno, M.R.; Azevedo, B.C.; Azevedo, J.R.; Pécora, J.D. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J. Endod.* **2008**, *34*, 1325–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Graunaitė, I.; Lodiene, G.; Maciulskiene, V. Pathogenesis of apical periodontitis: A literature review. *J. Oral Maxillofac. Res.* **2012**, *2*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bracks, I.V.; Armada, L.; Gonçalves, L.S.; Pires, F.R. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J. Endod.* **2014**, *40*, 63–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Altaie, A.M.; Venkatachalam, T.; Samaranyake, L.P.; Soliman, S.S.M.; Hamoudi, R. Comparative Metabolomics Reveals the Microenvironment of Common T-Helper Cells and Differential Immune Cells Linked to Unique Periapical Lesions. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 707267. [[CrossRef](#)]
40. Metzger, Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.* **2000**, *16*, 1–8. [[CrossRef](#)]
41. Masuki, H.; Okudera, T.; Watanebe, T.; Suzuki, M.; Nishiyama, K.; Okudera, H.; Nakata, K.; Uematsu, K.; Su, C.-Y.; Kawase, T. Growth Factor and Pro-Inflammatory Cytokine Contents in Platelet-Rich Plasma (PRP), Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF), and Concentrated Growth Factors (CGF). *Int. J. Implant Dent.* **2016**, *2*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Strauss, F.J.; Nasirzade, J.; Kargarpoor, Z.; Stähli, A.; Gruber, R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: A systematic review of in vitro studies. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 569–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alsalleeh, F.; Stephenson, L.; Lyons, N.; Young, A.; Williams, S. Human Periodontal Ligament Cells Response to Commercially Available Calcium Hydroxide Pastes. *Int. J. Dent. Oral Sci.* **2014**, *2*, 6–9. [[CrossRef](#)]
44. Chen, L.; Zheng, L.; Jiang, J.; Gui, J.; Zhang, L.; Huang, Y.; Chen, X.; Ji, J.; Fan, Y. Calcium Hydroxide-Induced Proliferation, Migration, Osteogenic Differentiation, and Mineralization via the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Human Dental Pulp Stem Cells. *J. Endod.* **2016**, *42*, 1355–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bhandi, S.; Patil, S.; Boreak, N.; Chohan, H.; AbuMelha, A.S.; Alkahtany, M.F.; Almadi, K.H.; Vinothkumar, T.S.; Raj, A.T.; Testarelli, L. Effect of Different Intracanal Medicaments on the Viability and Survival of Dental Pulp Stem Cells. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Talpos-Niculescu, R.M.; Popa, M.; Rusu, L.C.; Pricop, M.O.; Nica, L.M.; Talpos-Niculescu, S. Conservative Approach in the Management of Large Periapical Cyst-Like Lesions. A Report of Two Cases. *Medicina* **2021**, *57*, 497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Torres-Lagares, D.; Segura-Egea, J.J.; Rodríguez-Caballero, A.; Llamas-Carreras, J.M.; Gutiérrez-Pérez, J.L. Treatment of a large maxillary cyst with marsupialization, decompression, surgical endodontic therapy and enucleation. *J. Can. Dent. Assoc.* **2011**, *77*, 87.
48. Orstavik, D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int. Endod. J.* **1996**, *29*, 150–155. [[CrossRef](#)]
49. Verma, A.; Yadav, R.K.; Tikku, A.P.; Chandra, A.; Verma, P.; Bharti, R.; Shakya, V.K. A randomized controlled trial of endodontic treatment using ultrasonic irrigation and laser activated irrigation to evaluate healing in chronic apical periodontitis. *J Clin Exp Dent.* **2020**, *12*, 821–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Mostafapoor, M.; Hemmatian, S. Evaluation of the accuracy values of cone-beam CT regarding apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Oral Radiol.* **2022**, *38*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Cotti, E.; Schirru, E. Present status and future directions: Imaging techniques for the detection of periapical lesions. *Int. Endod. J.* **2022**, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Torabinejad, M.; Rice, D.D.; Maktabi, O.; Oyoyo, U.; Abramovitch, K. Prevalence and Size of Periapical Radiolucencies Using Cone-beam Computed Tomography in Teeth without Apparent Intraoral Radiographic Lesions: A New Periapical Index with a Clinical Recommendation. *J. Endod.* **2018**, *44*, 389–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Konagala, R.K.; Mandava, J.; Pabbati, R.K.; Anupreeta, A.; Borugadda, R.; Ravi, R. Effect of pretreatment medication on postendodontic pain: A double-blind, placebo-controlled study. *J. Conserv. Dent.* **2019**, *22*, 54–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Levin, L.; Amit, A.; Ashkenazi, M. Post-operative pain and use of analgesic agents following various dental procedures. *Am. J. Dent.* **2006**, *19*, 245–247. [[PubMed](#)]
55. Seltezer, S.; Naidorf, I.J. Flare-ups in endodontics: I. Etiological factors. *J. Endod.* **2004**, *30*, 476–481. [[CrossRef](#)]
56. Al-Nahlawi, T.; Alabdullah, A.; Othman, A.; Sukkar, R.; Doumani, M. Postendodontic pain in asymptomatic necrotic teeth prepared with different rotary instrumentation techniques. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2020**, *9*, 3474–3479. [[CrossRef](#)]
57. Vishwanathaiah, S.; Maganur, P.C.; Khanagar, S.B.; Chohan, H.; Testarelli, L.; Mazzoni, A.; Gupta, A.A.; Raj, A.T.; Bhandi, S.; Mehta, D.; et al. The Incidence and Intensity of Postendodontic Pain and Flareup in Single and Multiple Visit Root Canal Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3358. [[CrossRef](#)]