

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W
SZCZECINIE**



lek. dent. Irini Fagogeni

**ANALIZA ZMIANY BARWY ZMINERALIZOWANYCH TKANEK
ZĘBA PO ZASTOSOWANIU TERAPII ENDODONCJI
REGENERACYJNEJ ORAZ OCENA SKUTECZNOŚCI ICH
WYBIELANIA W BADANIACH *IN VITRO***

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Alicja Nowicka

Szczecin 2022

Na powstanie i ostateczny kształt mojej pracy doktorskiej miało wpływ wiele osób, którym chciałabym w tym miejscu podziękować:

Pani dr hab. n. med. Alicji Nowickiej, mojej promotorki za nieoceniony wkład w mój rozwój naukowy, za okazaną mi życzliwość i wyrozumiałość, za poświęcony czas, jak również wszelkie wskazówki i pomoc oraz wsparcie, dzięki którym niniejsza praca mogła powstać.

Współautorom powstałych publikacji za zaangażowanie i pomoc merytoryczną.

Narzeczonemu Tomaszowi za wiarę we mnie i motywację, które przyczyniły się do zapoczątkowania mojego rozwoju naukowego oraz ogromne wsparcie i pomoc na każdym etapie powstawania tej pracy.

Mamie, która wierzyła we mnie i wspierała mnie na każdym etapie mojej edukacji.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	5
1. Informacja.....	6
1.1. Opinia Komisji Bioetycznej oraz zgoda wydana przez Inspekcję Weterynaryjną.....	6
2. Wstęp.....	9
2.1. Endodoncja regeneracyjna.....	9
2.2. Przebarwienia zębów występujące po zabiegach endodoncji regeneracyjnej.....	11
2.2.1. Wpływ past dezynfekujących na kolor zęba.....	13
2.2.2. Wpływ krwi na kolor zęba.....	14
2.2.3. Wpływ materiału barierowego na kolor zęba.....	15
2.2.4. Metody poprawy estetyki przebarwionych zębów.....	18
2.3. Wybielanie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej.....	19
2.3.1. Wybielanie zębów u osób poniżej 18. roku życia.....	19
2.3.2. Wybielanie zębów u osób powyżej 18. roku życia.....	19
2.3.3. Stosowane techniki wybielania.....	20
2.3.4. Mechanizm wybielania zębów.....	21
2.3.5. Preparaty/środki wybielające stosowane po zabiegach endodoncji regeneracyjnej	23
3. Główne założenia i cele pracy doktorskiej.....	27
4. Streszczenia publikacji stanowiące rozprawę doktorską.....	28
4.1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration.....	28
4.2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review.....	30
4.3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an <i>in vitro</i> study.....	32
5. Wnioski.....	35
6. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	37
6.1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration.....	37

6.2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review.....	44
6.3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an <i>in vitro</i> study.....	60
7. Oświadczenia współautorów publikacji.....	80
8. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim.....	86
9. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim.....	92
10. Piśmiennictwo.....	98

Wykaz stosowanych skrótów

AAE – Amerykańskie Stowarzyszenie Endodontów

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

NaCl – sól fizjologiczna

NaOCl – podchloryn sodu

TAP(A) – pasta trójantybiotykowa zawierająca amoksycylinę

TAP(C) – pasta trójantybiotykowa zawierająca cefaklor

TAP(D) – pasta trójantybiotykowa zawierająca doksycylinę

TAP(K) – pasta trójantybiotykowa zawierająca klindamycynę

TAP(M) – pasta trójantybiotykowa zawierająca minocyklinę

1. INFORMACJA

Rozprawę doktorską pt. „Analiza zmiany barwy zmineralizowanych tkanek zęba po zastosowaniu terapii endodoncji regeneracyjnej oraz ocena skuteczności wybielania w badaniach *in vitro*” stanowi cykl trzech publikacji:

1. Fagogeni I, Metlerska J, Lipski M, Falgowski T, Górski M, Nowicka A. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnusd.18-0467 (IF: 1.200; MEiN: 40.000).
2. Fagogeni I, Falgowski T, Metlerska J, Lipski M, Górski M, Nowicka A. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316 (IF: 4.964; MEiN: 140.000).
3. Fagogeni I, Metlerska J, Falgowski T, Górski M, Lipski M, Nowicka A. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an *in vitro* study. J Clin Med. 2022;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016 (IF: 4.964; MEiN: 140.000).

Publikacje te zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych znajdujących się na liście filadelfijskiej. Łączna wartość ich współczynnika oddziaływania (Impact Factor – IF) wyniosła 11,128. Cykl wspomnianych prac uzyskał 320 punktów według wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych ogłoszonego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEiN).

Do pracy zostały dołączone oświadczenia kandydata oraz pozostałych współautorów publikacji określające indywidualny wkład w powstawanie prac stanowiących rozprawę doktorską.

1.1. Opinia Komisji Bioetycznej oraz zgoda wydana przez Inspekcję Weterynaryjną

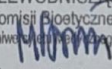
Uzyskano zaświadczenia: Komisji Bioetycznej o nr KB-0012/53/01/18 dnia 18 stycznia 2018 r. oraz inspekcji weterynaryjnej o nr PIW.HP.9260/Uppz/Bad./2/2017 dnia 5 grudnia 2017 r.

Sz.P.

lek. dent. Irini Fagogeni
Katedra i Zakład Stomatologii
Zachowawczej i Endodoncji
PUM w Szczecinie

W związku ze zgłoszeniem badania do Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie pt.: "Przebarwienia zębów po zastosowaniu terapii endodoncji regeneracyjnej. Badania in vitro.", stwierdza, iż z przedłożonej dokumentacji wynika, że przedmiotowe badanie nie wymaga opinii Komisji Bioetycznej.

Z poważaniem

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

prof. dr hab. n. med. Marok Drożdżik



Stargard , dnia 05 grudnia 2017 r.

INSPEKCJA WETERYNARYJNA

POWIATOWY LEKARZ WETERYNARII

w Stargardzie

Zygmunt Gabryś

Pani
Irini Fagogeni
Studium Doktoranckie
Wydział Lekarsko-Stomatologiczny
Pomorski Uniwersytet Medyczny
ul. Piotra Skargi 15
71-422 Szczecin

Nasz znak: PIW.HP.9260/Uppz/Bad./2/2017

Dot. sprawy nr:

pismo z dnia: 23.11.2017 r.

Powiatowy Lekarz Weterynarii w Stargardzie w związku ze złożonym pismem z dnia 23.11.2017 r. dotyczącym wydania pozwolenia na wykorzystanie zębów przedtrzonowych i trzonowych bydłych do badań naukowych w ramach pracy doktoranckiej, zezwala zgodnie z Rozdziałem III art. 11 *Rozporządzenia Komisji (UE) nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, oraz w sprawie wykonania dyrektywy Rady 97/78/WE w odniesieniu do niektórych próbek i przedmiotów zwolnionych z kontroli weterynaryjnych na granicach w myśl tej dyrektywy na transport, stosowanie i usuwanie próbek badawczych na warunkach zapewniających opanowanie zagrożeń dla zdrowia publicznego i zdrowia zwierząt.*

W związku z powyższym zobowiązuję Panią w szczególności do przestrzegania wymogów określonych w załączniku VI rozdział I sekcja 1 w /w rozporządzenia, a także wymogów zawartych zgodnie z art. 17 ust. 1 lit. a, b i ust. 2 *Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego).*

Po zakończeniu badań naukowych należy poinformować Powiatowego Lekarza Weterynarii w Stargardzie, o zutilizowanym materiale i przesłać kserokopii dokumentu handlowego potwierdzającego utylizację w/w materiału.

Otrzymują:

1.adresat,
2.a/a

IK

POWIATOWY LEKARZ WETERYNARII
W STARGARDZIE

lek. wet. *Zygmunt Gabryś*



Powiatowy Inspektorat Weterynarii ul. Broniewskiego 1,
73-110 Stargard tel.: (91) 577-00-36, fax: (91) 577-10-72,
e-mail: stargardsz.piw@wetgiw.gov.pl, <http://piwstargardszczecinski.ibip.pl>

-1-

2. WSTĘP

2.1. Endodoncja regeneracyjna

Regeneracja oznacza zdolność organizmu do odtworzenia utraconych lub uszkodzonych tkanek lub organów oraz powrót do ich pierwotnej formy i funkcji (Galler 2016). Zabiegi endodoncji regeneracyjnej to biologiczne procedury mające na celu zastąpienie zdrową tkanką uszkodzonej zębiny, struktur korzenia oraz komórek kompleksu miazgowo-zębinowego (Murray i wsp. 2007). Endodoncja regeneracyjna obejmuje: rewaskularyzację, terapię z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej, terapię genową oraz terapię z wykorzystaniem komórek macierzystych. Pierwszy opis przypadku, w którym celem leczenia była regeneracja miazgi, został przedstawiony w 2001 r. przez Iwaya i wsp. (Iwaya i wsp. 2001), natomiast pierwsze badania kliniczne obejmujące leczenie zębów niedojrzałych z wykorzystaniem techniki regeneracyjnej, zwanej wówczas rewaskularyzacją, wykonali i opublikowali w 2004 r. Banchs i Trope (Banchs i Trope 2004).

Najczęściej stosowaną techniką endodoncji regeneracyjnej jest wspomniana rewaskularyzacja miazgi, aktualnie nazywana rewitalizacją, ponieważ obejmuje nie tylko ponowne unaczynienie, ale także inercję i odtworzenie kompletnej, nowej miazgopodobnej tkanki (Galler 2016, Lin i Kahler 2017). Rewitalizacja miazgi, zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Stowarzyszenia Endodontów (AAE), powinna być przeprowadzana podczas dwóch wizyt. Jednak jak wynika z niektórych badań, można osiągnąć zadowalający efekt leczniczy już w czasie jednej wizyty (McCabe 2015, Aldakak i wsp. 2016, Hafez i wsp. 2021). Taka jednowizytowa procedura posiada wiele zalet, m.in.: zmniejsza ryzyko powtórnej infekcji kanału korzeniowego, skraca czas leczenia, co jest istotne zwłaszcza w przypadku pacjentów nieprzestrzegających harmonogramu zaplanowanych wizyt, oraz zmniejsza ryzyko pęknięcia zęba (Aldakak i wsp. 2016). Ograniczenie liczby wizyt obniża również koszt leczenia. Rewitalizacja miazgi jest szeroko stosowana szczególnie w trakcie leczenia zębów niedojrzałych u młodych pacjentów.

Leczenie chorób miazgi zębów niedojrzałych to ogromne wyzwanie dla lekarzy dentystów. Zęby te cechują się niezakończonym rozwojem korzenia, w którym występuje szeroki otwór wierzchołkowy oraz cienkie ściany, co utrudnia prawidłowy pomiar długości kanału oraz jego wypełnienie, zwłaszcza w okolicy przywierzchołkowej. Z tego

powodu podczas tradycyjnego leczenia endodontycznego trudno jest osiągnąć optymalny efekt terapeutyczny. Przeprowadzane jest także inne postępowanie niż w przypadku zębów dojrzałych.

W leczeniu zębów niedojrzałych z niezakończonym rozwojem korzenia, w których rozpoznano martwicę miazgi, powszechnie stosuje się technikę apeksyfikacji (Rafter i wsp. 2005). Głównym celem tej techniki jest wytworzenie bariery z tkanki twardej w okolicy wierzchołka zęba poprzez długotrwałe stosowanie wodorotlenku wapnia lub zamknięcie okolicy wierzchołka korzenia preparatem typu MTA, a następnie ostateczne wypełnienie kanału. Powikłaniem, które może wystąpić po użyciu tej techniki, jest pęknięcie korzenia zęba, ponieważ nie powoduje ona pobudzenia rozwoju korzenia, a co się z tym wiąże – pogrubienia ścian kanału korzeniowego oraz zakończenia rozwoju wierzchołka korzenia, następujących w warunkach fizjologicznych. Pobudzenie rozwoju korzenia i jego dalszy wzrost jest możliwy dzięki procesowi apeksogenezy (Rafter 2005), jednak do jego rozpoczęcia konieczna jest obecność żywej miazgi w kanale korzeniowym. Gdy ten warunek nie może być spełniony, stosuje się procedury endodoncji regeneracyjnej, które dzięki uzyskaniu żywej tkanki miazgopodobnej w kanale korzeniowym pozwalają na dalszy jego rozwój.

Głównym celem procedury rewitalizacji miazgi jest eliminacja objawów oraz gojenie się kości. Cel drugorzędowy oraz trzeciorzędowy to zwiększenie grubości i długości ściany korzenia oraz pozytywna reakcja w badaniu wrażliwości miazgi. Jak wspomniano wyżej, metoda rewitalizacji miazgi najczęściej jest przeprowadzana podczas dwóch wizyt. Zgodnie z zaleceniami AAE z 2021 r., podczas pierwszej wizyty należy znieczulić pacjenta, założyć koferdam i usunąć zainfekowaną miazgę, obficie przepłukać kanał 1,5–3-procentowym podchlorynem sodu – NaOCl (20 ml/5 min/kanał), minimalizując możliwość wtłoczenia środków płuczących w okolice przestrzeni okołowierzchołkowej, a następnie trzeba wypłukać kanał solą fizjologiczną (NaCl) lub kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) (20 ml/5 min/kanał), wysuszyć kanał sączkami papierowymi i założyć do kanału pastę wodorotlenkowo-wapniową lub trójantybiotykową o niskim stężeniu (1–5 mg/ml) poniżej granicy szkliwno-cementowej. Pasta trójantybiotykowa, która składa się z ciprofloksacyny, mertonidazolu i minocykliny – TAP(M), zmieszanych w stosunku 1:1:1, może powodować przebarwienia tkanek zęba. Aby je zminimalizować, należy rozważyć przed jej zastosowaniem uszczelnienie komory zęba systemem wiążącym. Można użyć również pasty dwuantybiotykowej, która nie zawiera minocykliny lub zastąpić minocyklinę innym antybiotykiem, tj. klindamycyną –

TAP(K), amoksyliną – TAP(A) czy cefaklorem – TAP(C). Następnie należy założyć wypełnienie tymczasowe (np. cement szkło-jonomerowy lub inny materiał tymczasowy). Na drugiej wizycie, po 1–4 tygodniach, jeżeli nie wystąpiły objawy infekcji, trzeba znieczulić pacjenta 3-procentową mepiwakainą niezawierającą środka zwężającego naczynia, założyć koferdam, z kanału korzeniowego usunąć pastę dezynfekującą, a następnie wypłukać kanał przy użyciu 20 ml 17-procentowego EDTA i NaCl, wysuszyć sączkami papierowymi i, przechodząc pilnikiem Kerra 2 mm poza otwór wierzchołkowy, spowodować krwawienie do kanału, po czym poczekać około 15 min, aż wytworzy się skrzep. W przypadkach, w których nie da się uzyskać krwawienia z kanału, można zastosować osocze bogatopłytkowe, fibrynę bogatopłytkową lub autologiczną matrycę fibrynową pozyskaną z krwi pacjenta. Następnie skrzep krwi zaleca się przykryć kolejno resorbowalną gąbką kolagenową (np. CollaPlug, Collacote, CollaTape), materiałem White MTA i światłoutwardzalnym cementem szkło-jonomerowym. W związku z doniesieniami, że MTA ma wpływ na przebarwienie tkanek zęba, należy rozważyć zastosowanie takich materiałów, jak: Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA) lub EndoSequence (BC RRM-Fast Set Putty, Brasseler, USA), zwłaszcza w zębach przednich, których efekt estetyczny jest bardzo ważny. Następnie trzeba odbudować koronę zęba przy użyciu materiału kompozytowego. Badanie kontrolne po zabiegu należy wykonać po 6, 12 i 24 miesiącach. Procedura rewitalizacji przeprowadzana podczas jednej wizyty jest podobna do dwuwizytowej z pominięciem zastosowania pasty wodorotlenkowo-wapniowej lub antybiotykowej.

2.2. Przebarwienia zębów występujące po zabiegach endodoncji regeneracyjnej

Współcześnie w leczeniu stomatologicznym oprócz aspektu zdrowotnego istotną rolę odgrywa również estetyka uzębienia. Ma ona wpływ nie tylko na postrzeganie siebie, ale także na jakość życia pacjentów. Kolor zębów jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o zadowoleniu z wyglądu własnego uzębienia (Tin-Oo i wsp. 2011, Samorodnitzky-Naveh i wsp. 2007). Wraz z pojawieniem się i wzrostem intensywności przebarwień zębów poziom zadowolenia spada (Tin-Oo i wsp. 2011). Należy nadmienić, iż przebarwienia według ich pochodzenia możemy podzielić na: egzogenne (przyleganie do powierzchni szkliska czynników chromogennych) oraz endogenne (barwniki przenikają w strukturę tkanek zęba) lub miejscowe

i ogólnoustrojowe (Jańczuk i wsp. 2015). Przyczyny przebarwień miejscowych i ogólnoustrojowych opisano w tabeli 1.

Przebarwienie korony zęba odnotowuje się również po zabiegach endodoncji regeneracyjnej (Kahler i Rossi-Fedele 2016). Dyskoloracja tkanek może wystąpić na początku leczenia, w którym istotny wpływ na kolor zęba ma pasta dezynfekująca, lub w późniejszym czasie, czyli po skrwawieniu okolicy okołowierzchołkowej oraz po aplikacji materiału barierowego. Badania oceniające wpływ procedur endodoncji regeneracyjnej na zmianę koloru zęba dowodzą, że zarówno pasty dezynfekujące, krew, jak i użyte materiały barierowe nie są dla niego obojętne.

Tabela 1. Przyczyny przebarwień zębów (Jańczuk i wsp. 2015)

Przebarwienia miejscowe		Przebarwienia ogólnoustrojowe
endogenne	egzogenne	endogenne
<ul style="list-style-type: none"> • leki i materiały stosowane do wypełniania kanałów korzeniowych w trakcie leczenia endodontycznego, • mineralizacja komory zęba w wyniku urazu mechanicznego, • pozostawienie martwej miazgi w komorze, • leki i materiały stosowane do wypełnienia zębów, • uszkodzenie zawiązków zębów stałych, • urazy zębów, • resorpcja wewnętrzna, • krwotok miazgi w trakcie ekstirpacji miazgi w znieczuleniu, • próchnica, • patologiczne ścieranie się zębów, • nieszczelna odbudowa zęba po leczeniu endodontycznym powodująca wnikanie bakterii oraz barwników egzogennych do jamy zęba 	<ul style="list-style-type: none"> • barwniki z pożywienia, • płukanki antyseptyczne, • używki 	<ul style="list-style-type: none"> • przedawkowanie antybiotyków z grupy tetracyklin, • przedawkowanie fluoru, • choroby ogólnoustrojowe t.j.: <ul style="list-style-type: none"> ○ zwłóknienie torbielowate trzustki, ○ niedoczynność nadnerczy, ○ nadczynność tarczycy, ○ niedoczynność tarczycy, ○ nadczynność przedniego płata przysadki, ○ osteodystrofia Albrighta, ○ choroby genetyczne, np.: wrodzona porfiria, ○ choroby dziedziczne, np.: dziedziczna dysplazja szkliwa i zębiny

2.2.1. Wpływ past dezynfekujących na kolor zęba

Wielu badaczy zwróciło uwagę na przebarwienie korony zęba po zabiegu rewitalizacji miazgi. Może się ono pojawić już na pierwszym etapie leczenia, czyli po dezynfekcji kanału korzeniowego, co zostało opisane w badaniach *in vitro* (Lenherr i wsp. 2012, Akcay i wsp. 2014, Kohli i wsp. 2015, Santos i wsp. 2017) oraz *in vivo* (Kim i wsp. 2010), zwłaszcza po zastosowaniu TAP(M). Zalecana przez AAE pasta wodorotlenkowo-wapniowa może ograniczać przebarwienia po zabiegach endodoncji regeneracyjnej (Kahler i Rossi-Fedele 2016), jednak autorzy podają, że nie jest ona obojętna dla koloru zębów (Chen i wsp. 2012). Przebarwienie spowodowane TAP(M) może pojawić się już po 24 godzinach od zastosowania tej pasty (Kim i wsp. 2010). Kirchhoff i wsp. zauważyli, że wypłukanie jej NaOCl nie powoduje wybielenia przebarwionych tkanek zęba (Kirchhoff i wsp. 2015). Niezależnie od używanej techniki płukania, 88% TAP(M) pozostaje w kanale korzeniowym, a około 350 μm jest obecne obwodowo w obrębie zębiny (Berkhoff i wsp. 2014). Również Kim i wsp. badali wpływ opisywanej pasty oraz jej poszczególnych składników na kolor zęba i stwierdzili, że największy potencjał przebarwiający posiada minocyklina, która jest półsyntetyczną pochodną tetracykliny. Chelatacja jonów wapnia przez minocyklinę i tworzenie nierozpuszczalnego kompleksu (Kim i wsp. 2010), jej łączenie z kolagenem, oksydacja oraz transformacja w produkty uboczne są potencjalną przyczyną przebarwienia tkanek zębów (Žižka i wsp. 2018). Aby zmniejszyć możliwość dyskoloracji, AAE zaleca, aby przed użyciem TAP(M) zaaplikować system wiążący na zębinę koronową, zmniejszyć stężenie TAP(M) i zastosować pastę poniżej połączenia szklwno-cementowego (AAE 2021). Zauważono, że system wiążący ogranicza przebarwienie tkanek zębów, natomiast nie eliminuje go całkowicie (Kim i wsp. 2010, Shokouhinejad i wsp. 2018).

Badano także wpływ zastąpienia minocykliny innym antybiotykiem, tj. klindamycyną, amoksycyliną, cefaklorem, lub jej całkowitego pominięcia. Kim i wsp. zastosowali TAP(K) w dwóch klinicznych przypadkach, w których doszło do martwicy miazgi, i zauważyli, że zęby po zabiegach endodoncji regeneracyjnej nie uległy przebarwieniu (Kim i wsp. 2014). Podobny wynik uzyskali Venkataraman i wsp. w przeprowadzonym przez siebie badaniu *in vitro* (Venkataraman i wsp. 2019). Z kolei potencjał przebarwiający TAP(A) jest różnie opisywany. Akcay i wsp. zaobserwowali, że pasta ta powoduje przebarwienie tkanek zębów (Akcay i wsp. 2014), co jest sprzeczne z wynikami Santosa i wsp. (Santos i wsp. 2017). Badania te różniły się jednak metodyką.

Akçay i wsp. przed wprowadzeniem pasty płukali kanał 10 ml 5,25-procentowego NaOCl, a następnie umieszczali TAP(A) przez wierzchołkową część korzenia. Autorzy nie zawarli w publikacji informacji o stężeniu pasty (Akçay i wsp. 2014). Natomiast Santos i wsp. płukali kanał 3 ml 1,5-procentowego NaOCl, a następnie wprowadzili 0,1 mg/ml TAP(A) przez otwór dostępowy do kanału zęba (Santos i wsp. 2017). Po zastosowaniu TAP(C) odnotowano zmianę koloru zęba (Akçay i wsp. 2014), natomiast pasta dwuantybiotykowa nie powodowała przebarwień jego korony zauważalnych okiem nieuzbrojonym (Akçay i wsp. 2014, Santos i wsp. 2017, Fundaoğlu Küçükkekenci i wsp. 2019).

2.2.2. Wpływ krwi na kolor zęba

Przebarwienie tkanek zębów może pojawić się w kolejnym etapie leczenia regeneracyjnego, czyli po skrwawieniu okolicy okołowierzchołkowej lub – jeżeli skrwawienie nie jest możliwe – po zastosowaniu fibryny bogatopłytkowej, a następnie materiału barierowego. Badacze zauważyli, że krew ma silny potencjał przebarwiający (Lenherr i wsp. 2012, Felman i Parashos 2013, Dettwiler i wsp. 2016, Shokouhinejad i wsp. 2016), co może być spowodowane wnikaniem barwników pochodzących z erytrocytów do tkanek zęba (Felman i Parashos 2013) oraz akumulacją ich produktów rozkładu w kanalikach zębinowych (Marin i wsp. 1997). W badaniu histochemicznym, przeprowadzonym i opisanym przez Marin i wsp., największe przebarwienie wystąpiło w zębinie znajdującej się najbliżej komory miazgi, a jego intensywność malała w kierunku zewnętrznej powierzchni zęba (Marin i wsp. 1997). Shokouhinejad i wsp. dowiedli, że po 1 miesiącu próbki zawierające krew przebarwiły się bardziej niż te, w których zastosowano fibrynę bogatopłytkową. Przyczyną mniejszego potencjału przebarwiającego tkanki zęba może być brak erytrocytów w fibrynie bogatopłytkowej (Shokouhinejad i wsp. 2019). Po zaaplikowaniu materiału barierowego na skrzep krwi dyskoloracja zęba może się zwiększyć, co zauważył Lenherr i wsp. po zastosowaniu Portland Cement (Medcem GmbH, Weinfelden, Switzerland) oraz White MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) (Lenherr i wsp. 2012). Do podobnych wniosków doszli Shokouhinejad i wsp., porównując dyskolorację zębów po użyciu Biodentine, ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA), Orto MTA (BioMTA, Seul, Republika Korei) i EndoSequence Root Repair Material w obecności krwi oraz soli fizjologicznej

(Shokouhinejad i wsp. 2016). W grupach, w których zastosowano krew, wystąpiło większe przebarwienie tkanek.

2.2.3. Wpływ materiału barierowego na kolor zęba

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na kolor zęba są cementy krzemowo-wapniowe, stosowane jako materiały barierowe. Ich skład (zawierają one m.in.: bizmut, żelazo, tlenki glinu i magnezu) może powodować zmianę koloru zęba (Shokouhinejad i wsp. 2016, Kang i wsp. 2015). Pierwsza formuacja MTA miała szary kolor (Marciano i wsp. 2014, Możyńska i wsp. 2017), co sprawiało, że zastosowanie jej w obszarach estetycznych było ograniczone. Aby zminimalizować ryzyko przebarwienia, wprowadzono White MTA, w którym zredukowano ilość tlenków: magnezu, glinu i żelaza, co spowodowało redukcję fazy glino-ferrytowej, odpowiadającej za szary kolor Grey MTA (Marciano i wsp. 2014).

Jak wynika z aktualnych badań, White MTA ma silny potencjał przebarwiający tkanki zęba. Jest to najprawdopodobniej spowodowane obecnością w cemencie tlenku bizmutu – składnika, który daje kontrast w obrazie rentgenowskim. Mechanizm przebarwień zębów wywołanych tlenkiem bizmutu jest oparty na utlenianiu tlenku bizmutu do węglanu bizmutu. Reakcja ta zachodzi wtedy, gdy bizmut ma kontakt z dwutlenkiem węgla z powietrza. Redukcja tlenku bizmutu do bizmutu również może powodować przebarwienia. Marciano i wsp. zaobserwowali, że tlenek bizmutu w kontakcie z kolagenem przekształca się w czarny osad (Marciano i wsp. 2014), natomiast Camilleri zauważyła, że White MTA zmienia kolor po zanurzeniu w NaOCl, właśnie ze względu na to, że zawiera w składzie tlenek bizmutu (Camilleri 2014).

Analizowano również, czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem tlenku bizmutu a zmianą koloru w cementach krzemowo-wapniowych. Odnotowano, że pomimo zwiększającej się nieprzepuszczalności dla promieni rentgenowskich, stężenie tlenku bizmutu nie wpływa na intensywność przebarwień (Marciano i wsp. 2013). Jednym z cementów zawierających tlenek bizmutu jako substancję dającą kontrast radiologiczny jest Ortho MTA. Jego producent twierdzi, że skład Ortho MTA jest podobny do składu ProRoot MTA, ale zawiera mniejszą ilość metali ciężkich (BioMTA technologies). Niestety, badacze zauważyli, że cement ten ma wpływ na zmianę koloru leczonych zębów (Możyńska i wsp. 2017, Shokouhinejad i wsp. 2018), a przebarwienie widoczne jest okiem nieuzbrojonym nawet już po 7 dniach obserwacji (Metlerska i wsp. 2021). Wiąże

się to najprawdopodobniej z obecnością tlenku bizmutu. Wielu producentów zmodyfikowało już skład cementów krzemowo-wapniowych poprzez zmniejszenie ilości tlenku bizmutu lub zastąpienie go tlenkiem cyrkonu, tlenkiem tantalum lub wolframianem wapnia, które również są składnikami dającymi kontrast radiologiczny. Amerykańskie Stowarzyszenie Endodontów zaleca jednak, aby podczas leczenia zębów przednich, których efekt estetyczny jest istotny, stosować takie cementy krzemowo-wapniowe, jak Biodentine oraz EndoSequence BC RRM-Fast Set Putty jako alternatywę dla MTA (AAE 2021). W tabeli nr 2 przedstawiono cementy krzemowo-wapniowe wraz ze środkiem kontrastującym.

Tabela 2. Cementy krzemowo-wapniowe oraz zawarty w nich środek kontrastujący

Środek kontrastujący	Material	Producent
Tlenek bizmutu	MTA Angelous,	Angelus, Londrina, PR, Brazil,
	MTA Plus	Avalon Biomed Inc, by Prevest Denpro Limited, Jammu, India
	Ortho MTA, ProRoot MTA gray and white,	BioMTA, Seoul, Korea, Dentsply, Tulsa, OK, USA,
Tlenek cyrkonu	Biodentine	Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France
Tlenek tantalum	Endosequence BC RRM,	Brasseler USA, Savannah, GA, USA,
	NEO MTA Plus	Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA
Wolframian wapnia	MTA Repair HP	Angelus, Londrina, PR, Brazil

W analizowanym badaniu Biodentine, MTA Repair HP (Angelus, Londrina, PR, Brazil) oraz Ortho MTA zostały zastosowane jako materiały barierowe. Biodentine to substytut zębiny, który wykazuje wysoką bioaktywność i biokompatybilność oraz wytrzymałość na ściskanie (Kaur i wsp. 2017). Dzięki modyfikacji składu cement ten wyróżnia się skróconym czasem wiązania oraz łatwiejszym sposobem aplikacji w porównaniu z MTA. Znaczne zmniejszenie potencjału przebarwiającego opisywanego materiału wiąże się z zastąpieniem tlenku bizmutu tlenkiem cyrkonu (Możyńska i wsp. 2017, Kang i wsp. 2015). Część badań *in vitro* wykazała, że po zastosowaniu Biodentine tkanki zębów nie zmieniły swojego koloru, aczkolwiek Dettwiler i wsp. opisują umieszczanie materiału w bloczkach szklino-zębinowych (Dettwiler i wsp. 2016), zaś

Kohli i wsp. – w kanale korzeniowym (Kohli i wsp. 2015). Z kolei Metlerska i wsp. zauważyli, że Biodentine po 3 i 6 miesiącach przebarwił tkanki zębów. Materiał umieszczono w zębach bydlęcych w komorze miazgi po uprzednim odcięciu korzenia (Metlerska i wsp. 2021).

W badaniach *in vivo* Biodentine został użyty w procedurze pulpotomii. Abuelniel i wsp. odnotowali, że po 18 miesiącach od zabiegu zęby nie zmieniły koloru (Abuelniel i wsp. 2020), natomiast Haikal i wsp. oraz Uesrichai i wsp. zaobserwowali odpowiednio nieznaczne wizualne przebarwienie w 17% zębów (Haikal i wsp. 2020) oraz szare przebarwienie w 27% zębów leczonych Biodentine (Uesrichai i wsp. 2019). Po zabiegu endodoncji regeneracyjnej, w której została zastosowana pasta dwuantybiotykowa, w 1 z 13 zębów leczonych przy użyciu Biodentine zauważono dyskolację zęba rok po zabiegu (Aly i wsp. 2019). Jednak w tym przypadku na zmianę koloru tkanek mogły mieć wpływ inne czynniki, tj. użyta pasta dwuantybiotykowa czy obecność krwi.

Jak już wspomiano, AAE rekomenduje stosowanie Biodentine podczas leczenia zębów przednich (AAE 2021), natomiast inni badacze sugerują również użycie MTA Repair HP (Metlerska i wsp. 2021). Najnowsze badania wykazały, że nie powoduje on przebarwień zębów widocznych okiem nieuzbrojonym (Aguiar i wsp. 2019, Metlerska i wsp. 2021). Co więcej, Metlerska i wsp. zauważyli, że po zmieszaniu MTA Repair HP ma kolor delikatnie niebieski, to zaś może sprawiać, że wizualny odbiór koloru zęba przez pacjenta po zabiegu będzie pozytywny (Metlerska i wsp. 2021). Przez producenta materiał ten opisywany jest jako cement o wysokiej plastyczności, który w środowisku wilgotnym nie traci swoich właściwości. Dodatkowo czas jego wiązania wynosi 15 min, co może być zaletą, zwłaszcza w trakcie zabiegów endodoncji regeneracyjnej.

Pomimo tego, że niektóre cementy krzemowo-wapniowe mają niski potencjał przebarwiający, należy wziąć pod uwagę, iż podczas zabiegów endodoncji regeneracyjnej mają styczność z krwią lub z fibryną bogatopłytkową. Wielu badaczy porównywało wpływ cementów krzemowo-wapniowych, stosowanych jako materiały barierowe, na kolor leczonego zęba w kontakcie z krwią oraz z solą fizjologiczną. Stwierdzili oni, że krew prowadzi do większych przebarwień (Felman i Parashos 2013, Shokouhinejad i wsp. 2016, Madani i wsp. 2019, Al-Hiyasat i wsp. 2021), co jest zgodne z wynikami Shokouhinejad i wsp., którzy badali potencjał przebarwiający omawianych materiałów w obecności fibryny bogatopłytkowej i krwi (Shokouhinejad i wsp. 2019). Natomiast Namazikhah i wsp. zauważyli w mikrostrukturze cementów krzemowo-wapniowych porowatość (Namazikhah i wsp. 2008), mogące absorbować składniki krwi, powodujące

przebarwienie materiału, a w związku z tym – przebarwienie tkanek zęba. Ponadto możliwe jest, że w czasie wiązania cementów krzemowo-wapniowych dojdzie do interakcji pomiędzy erytrocytami z krwi a niezwiązanym cementem. Powolny proces wiązania może umożliwić penetrację erytrocytów do tkanek zęba i struktury cementu, a późniejsza hemoliza spowoduje zarówno przebarwienie zęba, jak i samego cementu (Torabinejad i wsp. 2018, Yoldaş i wsp. 2016, Slaboseviciute i wsp. 2021). Zatem istotnym czynnikiem w trakcie wyboru materiału barierowego jest czas wiązania, który waha się w przedziale od kilkunastu minut do kilku godzin.

2.2.4. Metody poprawy estetyki przebarwionych zębów

Przebarwione zęby, zwłaszcza w odcinku przednim, są jednym z powodów zgłaszania się pacjentów do stomatologa. Celem leczenia jest poprawa estetyki, czyli zmiana koloru zęba. W zależności od pochodzenia przebarwienia i ilości zachowanych tkanek, zęba można wybielić, zamaskować przebarwienie materiałem kompozytowym, wykonać licówkę lub koronę porcelanową.

Jednym z warunków kwalifikacji do leczenia regeneracyjnego jest zachowana odpowiednia ilość tkanek własnych zęba. Zaleca się, aby korona zęba nie wymagała późniejszej odbudowy z wykorzystaniem wkładu korono-korzeniowego (AAE 2021). Co więcej, leczenie przebarwionych zębów po zabiegu endodoncji regeneracyjnej powinno się odbywać przy użyciu techniki minimalnie inwazyjnej, która nie spowoduje kolejnej utraty tkanek własnych pacjenta. Przykładem może być wybielanie. Badania wskazują, że jest ono możliwe do osiągnięcia (Kahler i wsp. 2018, Parthiban i wsp. 2018, Timmerman i Parashos 2018), aczkolwiek nie zawsze udaje się uzyskać pierwotny odcień leczonego zęba (Kim i wsp. 2010, McTigue i wsp. 2013, Antov i wsp. 2019). Gdy wybielanie nie jest satysfakcjonujące dla pacjenta lub gdy nie jest możliwe (np. z powodu uczulenia na środek wybielający), można zamaskować przebarwienie zęba kompozytem.

Najlepszym rozwiązaniem podczas stosowania procedur endodoncji regeneracyjnej jest użycie odpowiednich materiałów, aby zminimalizować ryzyko wystąpienia zmiany koloru zęba po zabiegu, a tym samym uchronić pacjenta przed nieestetycznym przebarwieniem – zwłaszcza gdy ząb znajduje się w odcinku przednim uzębienia.

2.3. Wybielanie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej

Przebarwienie zębów może niekorzystnie wpływać na jakość życia pacjentów (Viegas i wsp. 2014), dlatego zaleca się ograniczenie ryzyka jego powstania. Jeżeli pomimo stosowania się do zaleceń AAE dochodzi do przebarwienia leczonych zębów, należy rozważyć zastosowanie prostej, niedrogiej, a zarazem małoinwazyjnej techniki, jaką jest wybielanie.

2.3.1. Wybielanie zębów u osób poniżej 18. roku życia

Wybielanie zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej może być nie lada wyzwaniem dla klinicystów, szczególnie w przypadku doboru środka wybielającego i jego stężenia, a także sposobu wykonania zabiegu. Przepisy odnoszące się do bezpieczeństwa produktów kosmetycznych z 2012 r. zezwalają na stosowanie <0,1-procentowego nadtlenu wodoru i innych związków lub mieszanin uwalniających nadtlenek wodoru (The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations 2012, Greenwall-Cohen i wsp. 2018) u pacjentów w wieku poniżej 18 lat. Jednak nowe zalecenia, zawarte w General Dental Council Position Statement, dotyczące wybielania zębów, stanowią, że produkty zawierające lub uwalniające 0,1–6% nadtlenu wodoru nie mogą być używane u tej grupy pacjentów, chyba że celem wybielania jest leczenie lub zapobieganie chorobom (General Dental Council 2016). Nie istnieją dokładne wytyczne, w jaki sposób należy przeprowadzić procedurę wybielania po zabiegach endodoncji regeneracyjnej (Fagogeni i wsp. 2021).

2.3.2. Wybielanie zębów u osób powyżej 18. roku życia

Wybielanie zębów u osób dorosłych, regulowane przepisami zawartymi w General Dental Council Position Statement, The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations oraz Rozporządzeniem Komisji (UE) 2019/831 z dnia 22 maja 2019 r., znajdującym się w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej, jest możliwe z użyciem nadtlenu wodoru lub środków wydzielających nadtlenek wodoru o stężeniu 0,1–6% (General Dental Council Position Statement 2016, The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations 2012, Rozporządzenie Komisji (UE) 2019/831 z dnia 22 maja 2019 r.).

2.3.3. Stosowane techniki wybielania zębów

Ze względu na specyfikę endodoncji regeneracyjnej oraz ograniczenia związane ze stężeniem materiału wybielającego trudno jest określić odpowiedni czas oraz technikę wybielania, która będzie skuteczna i efektywna, a zarazem bezpieczna dla nowopowstałej tkanki miazgopodobnej w kanale korzeniowym. Jak wynika z badań, przebarwione zęby były wybielane przy użyciu różnych technik: wewnętrznej (D'Mello i Moloney 2017, De-Jesus-Soares i wsp. 2018, Parthiban i wsp. 2018), zewnętrznej (Antov i wsp. 2019) lub łącząc obie te techniki (Antov i wsp. 2019).

Wybielanie wewnętrzne (wewnątrzkoronowe) jest techniką podobną do metody stopniowego wybielania (tzw. *walking bleach*) zębów bezmiazgowych. Materiał wybielający umieszcza się w komorze miazgi, a nowopowstała miazgopodobna tkanka w kanale korzeniowym jest chroniona przez materiał barierowy (Santos i wsp. 2017) oraz przez most zębinowy, jeżeli się wytworzy. Badacze umieszczali preparat wybielający bezpośrednio na materiale barierowym (Akbulut i wsp. 2017) lub na warstwie cementu szkło-jonomerowego, który został założony na materiale barierowym (Kim i wsp. 2010, D'Mello i Moloney 2017, Parthiban i wsp. 2018, Antov i wsp. 2019). Dodatkowa, szczelnie założona warstwa materiału jest wykorzystywana w technice stopniowego wybielania, aby zapobiec przenikaniu środków wybielających do okolicy przyszyjkowej oraz przywierzchołkowej zęba (Plotino i wsp. 2008). W tym celu szerokie zastosowanie ma cement szkło-jonomerowy, aczkolwiek obecnie analizuje się również właściwości uszczelniające cementów krzemowo-wapniowych. W badaniu, w którym oceniano mikroprzeciek w zębach leczonych endodontycznie, odnotowano, że zarówno Biodentine, jak i MTA skutecznie zapewniały odpowiednią szczelność koronową (Ramezani i wsp. 2017). Natomiast w badaniu przeprowadzonym przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego oraz dzięki wykorzystaniu spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii zauważono, że środki wybielające mają niekorzystny wpływ na właściwości powierzchniowe MTA, takie jak: chropowatość, mikrotwardość oraz rozkład pierwiastków w materiale (Serin Kalay 2019). Wybielanie wewnętrzne to często stosowana technika po zabiegach endodoncji regeneracyjnej (D'Mello i Moloney 2017, De-Jesus-Soares i wsp. 2018, Kahler i wsp. 2018, Parthiban i wsp. 2018, Timmerman i Parashos 2018). Zauważono, że dzięki użyciu tej techniki możliwe jest wybielenie zębów (Kahler i wsp. 2018), uzyskanie koloru podobnego do zębów sąsiednich (D'Mello i Moloney 2017, De-Jesus-Soares i wsp. 2018) oraz osiągnięcie

satysfakcjonującego dla pacjenta efektu (Timmermann i Parashos 2018). Być może to wynik działania preparatów wybielających, które wydzielają bądź zawierają duże stężenia nadtlenu wodoru – często niezgodne z zaleceniami General Dental Council Position Statement, określającymi maksymalne stężenie środków wybielających, jakie mogą być stosowane u osób poniżej 18. roku życia.

Wybielanie zewnętrzne (zewnątrzkoronowe) najczęściej stosuje się w przypadku zębów żywych. Przed zabiegiem należy wykonać indywidualnie dopasowane nakładki oraz dobrać odpowiedni preparat wybielający. Technika wybielania zewnętrznego polega na tym, że pacjent nakłada preparat wybielający na nakładkę, którą umieszcza na zębach. W 2019 r. podjęto próbę wykonania wybielania zewnętrznego przebarwionego zęba po zabiegu endodoncji regeneracyjnej 10-procentowym nadtlakiem mocznika przez 4 godzinny dziennie w ciągu 2 tygodni. Zauważono poprawę odcienia zęba, natomiast pacjent nie był w pełni zadowolony z ostatecznego efektu. W kolejnych dwóch przypadkach autorzy zastosowali połączenie obu technik wybielania: wewnętrznego oraz zewnętrznego. Materiał wybielający (10-procentowy nadtlak mocznika) umieszczali zarówno w komorze, jak i na zewnątrz zęba (przy użyciu nakładki wybielającej). W pierwszym przypadku ząb zmienił kolor z C3 na B1, natomiast w drugim zauważono minimalną poprawę odcienia, jednakże pacjent nie był tym zaniepokojony (Antov i wsp. 2019). W tabeli nr 3 przedstawiono wady i zalety wybielania wewnątrz- oraz zewnątrzkoronowego, a także połączenia obu tych technik.

2.3.4. Mechanizm wybielania zębów

Wybielanie zębów to każdy proces, którego efektem jest rozjaśnienie koloru zęba (Carey 2014). Barwniki zmieniające jego kolor to najczęściej związki organiczne posiadające sprzężone łańcuchy naprzemiennych pojedynczych lub podwójnych wiązań, często zawierające heteroatomy oraz pierścienie fenyłowe i karbonyłowe, i są określane jako chromofory (Joshi 2016, Joiner 2006). Wybielanie następuje poprzez rozpad wiązań podwójnych, utlenienie innych cząstek chemicznych w łańcuchu sprzężonym albo poprzez rozszczepienie łańcucha sprzężonego (Joiner 2006). Jest to spowodowane działaniem nadtlenu wodoru, który może być stosowany bezpośrednio jako substancja wybielająca lub też może być uwalniany z nadboranu sodu albo nadtlenu karbamidu (Plotino i wsp. 2008). Nadtlak wodoru, dyfundując w struktury zęba, dysocjuje, wytwarzając wolne rodniki tlenowe (Joshi 2016). Dokładny opis reakcji przedstawiono

w tabeli 4 (Perchyonok i Grobler 2015). Temperatura, pH, światło i obecność kationów metali wpływają na reaktywność wspomnianych rodników. W wyniku reakcji wysoce reaktywnych rodników tlenowych z chromoforami powstają produkty, które mają charakter polarny, mniejszą masę cząsteczkową i są łatwo usuwane z zęba w środowisku wodnym (Kwon i Wertz 2015). Dodatkowo nowopowstałe produkty są jaśniejsze (Joshi 2016).

Tabela 3. Wady i zalety wybielania wewnętrznego, zewnętrznego oraz połączenia obu tych technik (Antov i wsp. 2019)

Wybielanie	Zalety	Wady
Wybielanie wewnętrzne	<ul style="list-style-type: none"> • skuteczne w leczeniu przebarwień wewnętrznych, • wymagane mniejsze zaangażowanie pacjenta 	<ul style="list-style-type: none"> • może wystąpić resorpcja przyszyjkowa, • potrzeba kilku wizyt, aby uzyskać optymalny efekt wybielania, • z czasem może wystąpić regresja koloru zęba
Wybielanie zewnętrzne	<ul style="list-style-type: none"> • pacjent kontroluje stopień wybielania, aż uzyska pożądany efekt 	<ul style="list-style-type: none"> • mniejsza efektywność w porównaniu do wybielania wewnątrzkoronowego, • wymagane zaangażowanie pacjenta, • ograniczony stopień wybielania zębów, • może wystąpić resorpcja przyszyjkowa, • z czasem może wystąpić regresja koloru zęba, • może wystąpić nadwrażliwość
Połączenie wybielania wewnętrznego i zewnętrznego	<ul style="list-style-type: none"> • uzyskanie maksymalnego efektu wybielającego, • pacjent kontroluje stopień wybielania, aż uzyska pożądany efekt 	<ul style="list-style-type: none"> • wymagane bardzo duże zaangażowanie pacjenta, • z czasem może wystąpić regresja koloru zęba, • może wystąpić resorpcja przyszyjkowa, • może wystąpić nadwrażliwość

Tabela 4. Powstawanie nadtlenu wodoru oraz formowanie się wolnych rodników (Perchyonok i Grobler 2015)

	Wzór
Powstawanie nadtlenu wodoru z nadboranu sodu	$\text{Na}_2[\text{B}_2(\text{O}_2)_2(\text{OH})_4]+2\text{H}_2\text{O}\rightarrow 2\text{NaBO}_3+2\text{H}_2\text{O}_2$
Powstawanie nadtlenu wodoru z nadtlenu karbamidu	$\text{H}_2\text{NCONH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}_2\rightarrow\text{H}_2\text{NCONH}_2+\text{H}_2\text{O}_2$
Nadtlenek wodoru tworzy wolne rodniki, takie jak rodniki hydroksylowe i perhydroksylowe oraz aniony ponadtlenkowe	$\text{H}_2\text{O}_2\rightarrow 2\text{HO}\cdot$ $\text{HO}\cdot+\text{H}_2\text{O}_2\rightarrow\text{H}_2\text{O}+\text{HO}_2\cdot$ $\text{HO}_2\cdot\leftrightarrow\text{H}^++\text{O}_2\cdot$
Reaktywne cząsteczki tlenu, które są niestabilne i przekształcają się w tlen	$2\text{H}_2\text{O}_2\leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}+2\{\text{O}\}\leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}+\text{O}_2$
Aniony nadtlenu wodoru	$\text{H}_2\text{O}_2\leftrightarrow\text{H}^++\text{HOO}\cdot$

2.3.5. Preparaty/środki wybielające stosowane po zabiegach endodoncji regeneracyjnej

W celu wybielenia przebarwionych tkanek zęba stosowane są różne środki wybielające, które składają się ze składników aktywnych oraz nieaktywnych. Składniki aktywne to nadtlenek wodoru lub składowe nadtlenu mocznika, natomiast do składników nieaktywnych zalicza się: środki zagęszczające, nośnik, środki powierzchniowo czynne i dyspergatory barwnika, konserwanty oraz substancje smakowe (Malpani i wsp. 2019). W tabeli nr 5 przedstawiono składniki nieaktywne oraz ich funkcje w materiale wybielającym.

Autorzy w swoich badaniach stosowali różne rodzaje środków wybielających, takich jak: nadtlenek wodoru (Akbulut i wsp. 2017), nadtlenek karbamidu (Antov i wsp. 2019, Khedmat i wsp. 2021), nadboran sodu (Kim i wsp. 2010, D'Mello i Moloney 2017, De-Jesus-Soares i wsp. 2018) lub mieszaninę tych materiałów (McTigue i wsp. 2013, Jiménez-Padilla i wsp. 2021).

Nadtlenek wodoru jest substancją o silnych właściwościach utleniających (Chng i wsp. 2005). W wyniku jego rozkładu dochodzi do powstania wolnych rodników, reaktywnych cząsteczek tlenu lub anionów nadtlenu wodoru (Perchyonok i Grobler 2015) – tabela nr 4. Nadtlenek wodoru może być stosowany bezpośrednio lub może też być uwalniany z nadtlenu karbamidu lub nadboranu sodu. W stomatologii stosowany jest w stężeniu 5–35-procentowym (Plotino i wsp. 2008).

Akbulut i wsp. przeprowadzili badanie *in vitro*, w którym wybielano zęby ludzkie 35-procentowym nadtlenu wodoru po zabiegu endodoncji regeneracyjnej, w którym,

zastosowano TAP(C), a następnie krew i odpowiedni materiał barierowy (Pro Root MTA, Biodentine, MM-MTA). Autorzy zauważyli, że próbki w grupie, w której użyty był cement Biodentine, wybieliły się znacznie bardziej w stosunku do innych grup (Akbulut i wsp. 2017). Natomiast Kahler i wsp. wykonali badanie *in vivo*. W tym celu wykorzystali 35-procentowy nadtlenek wodoru i efektywnie wybielili 2 przebarwione zęby po zabiegu endodoncji regeneracyjnej (Kahler i wsp. 2018). Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez McTigue i wsp. skutecznie wybielono 11 z 14 zębów dzięki zastosowaniu 35-procentowego nadtlenku wodoru przez 3 min, a następnie nadboranu sodu zmieszanego z 10-procentowym nadtlenkiem wodoru (McTigue i wsp. 2013).

Tabela 5. Składniki nieaktywne oraz ich funkcje w materiale wybielającym (Malpani i wsp. 2019)

Składniki nieaktywne	Funkcja
Środki zagęszczające: <ul style="list-style-type: none"> Karbopol (karboksypolimetylen, 0.5–1.5%) 	<ul style="list-style-type: none"> zwiększa lepkość materiału wybielającego, zwiększa do czterech razy czas uwalniania aktywnego tlenu z materiału wybielającego
Nośnik: <ul style="list-style-type: none"> gliceryna, glikol propylenowy 	<ul style="list-style-type: none"> utrzymuje wilgotne środowisko, rozpuszczają się w nim inne składniki
Surfaktant	<ul style="list-style-type: none"> środek zwilżający powierzchnię, umożliwia dyfuzję składnika wybielającego,
Dyspergator barwnika	<ul style="list-style-type: none"> utrzymuje pigmenty w zawiesinie
Konserwanty: <ul style="list-style-type: none"> metyl, propyloparaben, benzoesan sodu 	<ul style="list-style-type: none"> zapobiegają rozwojowi bakterii w materiałach wybielających, przyspieszają rozkład nadtlenku wodoru przez uwolnienie metali przejściowych, takich jak: żelazo, miedź i magnez
Substancje smakowe: <ul style="list-style-type: none"> mięta, anyż, słodzik (np. sacharyna) 	<ul style="list-style-type: none"> poprawiają smak produktu wybielającego

Nadbora sodu to biały krystaliczny proszek, który zawiera ok. 95% nadboranu wydzielającego 9,9% tlenu. Rozkłada się do H_2O_2 , metaboranu sodu i tlenu w kontakcie z wodą, kwaśnym środowiskiem czy ciepłym powietrzem (Özer i Kapısz 2021, Doumani

i wsp. 2019). Wyróżniamy kilka rodzajów nadboranu sodu: monohydrat, trihydrat i tetrahydrat – różnią się one zawartością tlenu (Weiger i wsp. 1994).

Nadboran sodu zmieszany z wodą destylowaną (Kim i wsp. 2010, De-Jesus-Soares i wsp. 2018, Timmerman i wsp. 2018), solą fizjologiczną (Miller i wsp. 2012) lub 30-procentowym nadtlentkiem wodoru (Parthiban i wsp. 2018) stosowano jako środek wybielający przebarwione zęby po zabiegach endodoncji regeneracyjnej. Najczęściej przeprowadzano wybielanie wewnętrzne (Kim i wsp. 2010, De-JesusSoares i wsp. 2018, Parthiban i wsp. 2018, Timmerman i Parashos 2018). W cytowanych badaniach zęby wybielono skutecznie, uzyskując podobny kolor do innych zębów własnych (D’Mello i Moloney 2017, De-JesusSoares i wsp. 2018) i osiągając satysfakcjonujący wynik wybielania (Parthiban i wsp. 2018, Timmerman i Parashos 2018) – poza przypadkiem opisanym przez Kim i wsp., którzy zauważyli, że odcień zęba wybielanego poprawił się, aczkolwiek nie udało się osiągnąć jego pierwotnego koloru (Kim i wsp. 2010). Warto jednak zauważyć, że nadboran sodu został zakazany w Europie na mocy Cosmetics Regulation 1223/2009 (European Commission Website 2020) i sklasyfikowany jako środek rakotwórczy, mutageny oraz działający szkodliwie na rozrodczość.

Nadtlenek karbamidu jest krystalicznym ciałem stałym, który w obecności wody uwalnia tlen. To roztwór niestabilny. Gdy ma kontakt ze śliną lub tkankami jamy ustnej, dysocjuje na nadtlenek wodoru oraz mocznik (Rea i wsp. 2019). Najczęściej stosowany jest do wybielania zębów żywych z użyciem nakładek indywidualnych w technice zewnętrznej. Przeprowadzono badanie *in vitro*, w którym wybielano zęby przebarwione po zabiegach endodoncji regeneracyjnej. W tym celu użyto 10-procentowego nadtlenu karbamidu.

Z 3 wybielanych zębów, skutecznie wybielono 1, w 2 zauważono poprawę odcienia, z czego w jednym przypadku pacjent nie był do końca zadowolony z uzyskanego efektu (Antov i wsp. 2019).

W piśmiennictwie brakuje obszernych badań *in vitro*, wykonanych na dużych grupach badawczych, które analizowałyby wybielanie przebarwionych zębów po jedno- i dwuwizytowych zabiegach endodoncji regeneracyjnej w kontekście różnych past dezynfekujących, krwi/ fibryny bogatopłytkowej i materiałów barierowych. Kilku autorów podjęło próbę takiej analizy po umieszczeniu w kanale korzeniowym krwi i wybranego materiału barierowego (Akbulut i wsp. 2017, Jiménez-Padilla i wsp. 2021, Khedmat i wsp. 2021), ale w żadnych badaniach nie dokonano oceny wybielania po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, w której zastosowano fibrynę bogatopłytkową.

Ponadto większość badaczy stosowała wysokie stężenie środków wybielających, co jest niezgodne z wymaganiami dotyczącymi leczenia stomatologicznego pacjentów poniżej 18. roku życia. Wszystkie te czynniki zostały uwzględnione w niniejszej pracy, która została przeprowadzona na dużej grupie badawczej. Oceniono w niej wybielanie po zastosowaniu różnych past dezynfekujących i krwi/ fibryny bogatopłytkowej oraz materiałów barierowych, w tym najnowszych cementów na bazie krzemianu wapnia, m.in. MTA Repair HP.

3. GŁÓWNE ZAŁOŻENIA I CELE PRACY DOKTORSKIEJ

Zabiegi endodoncji regeneracyjnej mogą być przyczyną przebarwień korony leczonych zębów. Zarówno materiały stosowane podczas leczenia, jak i krew oraz preparaty krwiopochodne nie są obojętne dla tkanek zęba. Bardzo ważne jest określenie przyczyny zmiany ich koloru, zwłaszcza gdy wspomniany zabieg zostaje przeprowadzony w odcinku przednim uzębienia, w którym bardzo istotne jest zachowanie zadowolającej pacjenta estetyki. Z tego powodu podjęto próbę oceny zmiany koloru zębów po wykonanych zabiegach endodoncji regeneracyjnej i możliwości ich wybielenia.

Cele pracy doktorskiej:

1. Przegląd systematyczny piśmiennictwa obejmujący analizę potencjału przebarwiającego materiałów stosowanych w endodoncji regeneracyjnej na podstawie opublikowanych badań *in vitro*.
2. Przegląd systematyczny piśmiennictwa obejmujący analizę skuteczności wybielenia przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej na podstawie opublikowanych badań *in vitro* oraz *in vivo*.
3. Analiza wpływu jedno- oraz dwuwizytowych zabiegów endodoncji regeneracyjnej na kolor leczonych zębów oraz ocena efektywności ich wybielenia.

W pracy doktorskiej postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Zabiegi endodoncji regeneracyjnej powodują przebarwienia tkanek zęba.
2. Przebarwione po zabiegach endodoncji regeneracyjnej zęby można efektywnie wybielić.

4. STRESZCZENIA PUBLIKACJI STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

4.1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration

Endodoncja regeneracyjna ma na celu zastąpienie zdrową tkanką uszkodzonej zębiny, struktur korzenia oraz komórek kompleksu miazgowo-zębinowego. Klinicznie najczęściej stosowaną techniką endodoncji regeneracyjnej jest rewitalizacja miazgi. Według AAE zabieg ten obejmuje: usunięcie zainfekowanej miazgi, dezynfekcję kanału korzeniowego przy użyciu past dezynfekujących, skrwawienie okolicy przywierzchołkowej korzenia i uzyskanie krwi w kanale korzeniowym lub – gdy nie jest ono możliwe – zastosowanie osocza bogatopłytkowego, fibryny bogatopłytkowej lub autologicznej matrycy fibrynowej pozyskanej z krwi pacjenta oraz aplikację materiału barierowego. Zalecane jest wykorzystanie cementu White MTA jako materiału barierowego, aczkolwiek powoduje on przebarwienie tkanek zębów. Aby zminimalizować ryzyko wystąpienia przebarwienia, zwłaszcza jeżeli leczony ząb znajduje się w odcinku przednim uzębienia, AAE zaleca użycie cementów krzemowo-wapniowych Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA) lub EndoSequence BC RRM-Fast Set Putty (BC RRM-Fast Set Putty, Brasseler, USA). Badacze zauważyli, że materiały stosowane w endodoncji regeneracyjnej mogą powodować widoczne przebarwienia zębów, negatywnie wpływające na jakość życia pacjentów, którzy oczekują zarówno skutecznego leczenia, jak i zadowalającego efektu estetycznego – zwłaszcza jeżeli leczone są zęby przednie. Z tego powodu tak ważne jest wykorzystywanie materiałów, które nie spowodują przebarwienia tkanek zęba.

Celem pracy była ocena potencjału przebarwiającego materiałów stosowanych w endodoncji regeneracyjnej na podstawie opublikowanych badań *in vitro*.

Przegląd piśmiennictwa został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi PRISMA. Dnia 18 lutego 2018 r. przeszukano sześć baz danych: MEDLINE (PubMed), Google Scholar, the Cochrane Library, Scopus, Lilacs i Web of Science. Kryteria włączenia obejmowały: badania *in vitro*, badania, w których materiały umieszczane były w tkankach zęba oraz publikacje opisujące zabiegi endodoncji regeneracyjnej. Artykuły, które nie spełniały kryteriów włączenia, zostały wykluczone. Ostatecznie do analizy zakwalifikowano 11 prac napisanych w języku angielskim.

Przebarwienie tkanek zęba po zabiegu endodoncji regeneracyjnej może pojawić się na każdym etapie leczenia – zarówno po zastosowaniu past dezynfekujących, jak i krwi oraz materiału barierowego. Pasta trójantybiotykowa, która w swoim składzie zawiera minocyklinę, ma silny potencjał przebarwiający, w przeciwieństwie do wodorotlenku wapnia. W poddanych analizie badaniach *in vitro* wykazano, że krew przebarwia tkanki zęba. Przebarwienie to zauważono zarówno w zębach, w których była stosowana tylko krew, ale także w tych, w których na krew aplikowano materiał barierowy. Cementy krzemowo-wapniowe używane jako materiały barierowe, zawierające w składzie tlenek bizmutu, również przebarwiły tkanki zęba. Po zastosowaniu systemu wiążącego na zębinę badanych zębów odnotowano mniejszą dyskolację w porównaniu z grupami, w których system wiążący nie został zastosowany, aczkolwiek nie wyeliminowano jej całkowicie.

Analiza badań wykazała, że większość materiałów stosowanych w zabiegach endodoncji regeneracyjnej ma potencjał do przebarwiania tkanek zęba. W celu zmniejszenia ryzyka przebarwień zębów, przed aplikacją środka dezynfekującego czy materiału barierowego zalecane jest uszczelnienie zębiny systemem wiążącym i użycie pasty trójantybiotykowej poniżej granicy szkliwno-cementowej. Przeprowadzono niewielką liczbę badań *in vitro* z zakresu tego zagadnienia, dlatego dalsze badania są uzasadnione.

4.2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review

Endodoncja regeneracyjna jest bardzo prężnie rozwijającą się dziedziną, szeroko wykorzystywaną w celu leczenia niedojrzałych zębów stałych, w których wystąpiła martwica miazgi. Jednak niekorzystnym wynikiem tych zabiegów może być przebarwienie leczonych zębów, zwłaszcza w przypadku odcinka przedniego uzębienia. Przyczyną obserwowanych przebarwień mogą być krew oraz stosowane materiały. Aby zmniejszyć lub zniwelować przebarwienie wyleczonego tą metodą zęba, można zamaskować je materiałem kompozytowym lub ząb wybielić. Wybielanie to technika prosta, niedroga i małoinwazyjna, aczkolwiek brakuje dokładnych wytycznych dotyczących procedury, środka i czasu trwania wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, co może być dużym problemem dla lekarzy klinicystów, zwłaszcza że pacjent oczekuje, aby zabieg ten był bezpieczny i przewidywalny. Kilku badaczy wykazało, że wybielenie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej może być osiągalne, a uzyskany efekt – satysfakcjonujący dla pacjenta, jednakże nie jest to w pełni przewidywalna procedura.

Celem przeglądu piśmiennictwa była analiza skuteczności wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej na podstawie przeanalizowanych badań *in vitro* oraz *in vivo*.

Przegląd piśmiennictwa został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi PRISMA. Dnia 30 stycznia 2020 r. przeszukano cztery bazy danych: MEDLINE (PubMed), Web of Science, the Cochrane Library i Scopus. Kryteria włączenia obejmowały: badania *in vitro* oraz *in vivo*, w których analizowano wybielanie zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej oraz takie, w których stosowano środek wybielający w tkankach zębów. Publikacje niespełniające kryteriów włączenia zostały wykluczone. Ostatecznie do analizy zakwalifikowano 15 prac, w tym: 6 badań *in vitro* i 9 badań *in vivo*. Zakwalifikowane artykuły zostały napisane w języku angielskim.

Badania *in vitro* dotyczyły wybielania zębów bydlęcych oraz ludzkich. Przebarwione zęby, w których stosowana była TAP(M), wybieliły się bardziej niż te, w których użyto TAP(D) i TAP(A). W badaniu, w którym w procedurze regeneracyjnej wykorzystano TAP(C), krew i materiały barierowe, takie jak: Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA), MM-MTA (Micro Mega, Besancon Cedex, France) lub ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA) zauważono, że zęby, w których zaaplikowano

Biodentine, wybieliły się istotnie bardziej w porównaniu z zębami z innych grup. Spośród 26 leczonych zębów w badaniach *in vivo* wybielono 17 zębów. W sześciu przypadkach nastąpiła poprawa koloru, natomiast w trzech – wybielanie nie było wystarczające. Środek wybielający, technika i czas wybielania pomiędzy analizowanymi badaniami różniły się. Stosowano wybielanie wewnętrzne, zewnętrzne oraz połączenie obu tych technik. Do przeprowadzenia zabiegu użyto nadtlenu wodoru, nadtlenu mocznika, nadboranu sodu lub połączenia nadtlenu wodoru z nadboranem sodu.

Wybielanie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej jest osiągalne. Jednak ze względu na stosowanie podczas badań różnych materiałów i technik nie jest możliwe wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Aby stworzyć dokładne wytyczne, które określałyby odpowiednią technikę, materiał i czas trwania wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, wymagane są dalsze, długoterminowe badania.

4.3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an *in vitro* study

Przebarwienia zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej mogą negatywnie wpływać na jakość życia młodych pacjentów i ich rodzin, dlatego należy przeprowadzić procedurę regeneracyjną w taki sposób, aby zminimalizować ryzyko powstania przebarwienia. Jednak w przypadku jego wystąpienia można zastosować minimalnie inwazyjną technikę poprawy koloru zęba, jaką jest wybielanie. Obecnie nie ma dokładnych wytycznych dla lekarzy klinicystów odnośnie zalecanego środka wybielającego, techniki oraz czasu wybielania zębów po przeprowadzonej procedurze endodoncji regeneracyjnej, tak aby zabieg był bezpieczny dla nowopowstałej tkanki miazgopodobnej w kanale korzeniowym, a zarazem skuteczny i efektywny.

Celem pracy była analiza wpływu jedno- oraz dwuwizytowych zabiegów endodoncji regeneracyjnej na kolor leczonych zębów oraz ocena efektywności ich wybielania.

Postawiono dwie hipotezy badawcze:

1. Zabiegi endodoncji regeneracyjnej powodują przebarwienia tkanek zęba.
2. Przebarwione po zabiegach endodoncji regeneracyjnej zęby można efektywnie wybielić.

Do badania włączono 200 jednokorzeniowych zębów bydlęcych żuchwy, w których wykonano dostęp endodontyczny, usunięto miazgę z komory i kanału korzeniowego, następnie odcięto część wierzchołkową korzenia 15 mm od połączenia szklwno-cementowego za pomocą wiertła diamentowego z chłodzeniem wodnym, a 4-milimetrową część wierzchołkową korzenia uszczelniono cementem szkło-jonomerowym (GI, Kromoglass 2, LASCOD, Włochy). Kanały korzeniowe poszerzono, po czym wypłukano NaOCl oraz EDTA i osuszono sączkami papierowymi. Wszystkie zęby losowo podzielono na dwadzieścia grup ($n = 10$). W badaniu uwzględniono dwie grupy kontrolne, w których kanały korzeniowe wypełniono NaCl i krwią. Na wewnętrzne ściany komory zębów zastosowano system wiążący (Tokuyama Universal Bond, Tokuyama Dental, Tokio, Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. W dwunastu badanych grupach wykonano dwuwizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej. W sześciu z dwunastu opisywanych grup użyto TAP(M), a w kolejnych sześciu pastę wodorotlenkowo-wapniową (Biopulp, Chema-Elektromet, Rzeszów, Polska). Po 3 tygodniach z kanału usunięto pastę dezynfekującą, kanał płukano EDTA, NaCl i osuszono

sączkami papierowymi. Następnie do kanału zaaplikowano krew lub fibrynę bogatopłytkową 4 mm poniżej połączenia szklwno-cementowego i założono 3-milimetrową warstwę materiału barierowego: Biodentine, MTA Repair HP lub Ortho MTA.

Podsumowując, po wypłukaniu TAP(M) do kanałów w trzech grupach zaaplikowano krew i założono odpowiedni materiał barierowy: Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP, a w kolejnych trzech grupach – fibrynę bogatopłytkową i Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP. Analogicznie postąpiono w próbkach, w których wypłukano pastę wodorotlenkowo-wapniową: zaaplikowano krew i założono Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP oraz fibrynę bogatopłytkową i Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP. W sześciu grupach nie zastosowano pasty dezynfekującej, ponieważ zaplanowano jednowizytową endodontyczną procedurę regeneracyjną. Krew lub fibryna bogatopłytkowa oraz materiał barierowy zostały zaaplikowane podobnie jak w grupach dwuwizytowych: krew + Biodentine, krew + OrthoMTA, krew + MTA Repair HP, fibryna bogatopłytkowa + Biodentine, fibryna bogatopłytkowa + OrthoMTA, fibryna bogatopłytkowa + MTA Repair HP. Po zaaplikowaniu krwi lub fibryny bogatopłytkowej oraz założeniu materiału barierowego do kanału korzeniowego poniżej granicy szklwno-cementowej i upewnieniu się, że cement związał, otwór dostępowy zamknięto cementem szkło-jonomerowym na okres 4 tygodni. Po 4 tygodniach usunięto cement szkło-jonomerowy oraz 2 mm materiału barierowego, po czym założono około 2 mm cementu szkło-jonomerowego. Następnie do komory miazgi wprowadzono nadtlenek karbamidu (Peroxidon, Chema-Elektromet, Rzeszów, Polska) i watkę, a ubytek zamknięto cementem szkło-jonomerowym. Środek wybielający założono na 1 tydzień. Zabieg wybielania wykonano dwukrotnie w odstępie 7 dni. W trakcie badań próbki przechowywano w inkubatorze (220 V, 50 Hz, Carbolab Electronic, Warszawa) w 100-procentowej wilgotności w 37°C. Do pomiaru zmiany koloru zębów użyto spektrofotometru. Pomiaru zostały wykonane: przed leczeniem, 3 tygodnie po założeniu pasty dezynfekującej, 4 tygodnie po założeniu krwi/ fibryny bogatopłytkowej i materiału barierowego, 1 tydzień po pierwszym wybielaniu oraz 1 tydzień po drugim wybielaniu. Na każdym etapie badania wykonano zdjęcia zębów aparatem EyeSpecial C-II.

We wszystkich grupach, w których zastosowano pastę dezynfekującą, zaobserwowano zmianę koloru leczonych zębów. Większe przebarwienie wystąpiło w zębach po użyciu TAP(M). Prawie wszystkie zęby po zabiegach endodoncji regeneracyjnej uległy przebarwieniu, z wyjątkiem tych, w których w trakcie

jednowizytowego zabiegu zastosowano fibrynę bogatopłytkową i cement MTA Repair HP. Po pierwszym i drugim wybieleniu w każdej z badanych grup wykazano zmianę koloru zęba w porównaniu z jego pierwotnym kolorem, co było zauważalne okiem nieuzbrojonym. Po drugim wybieleniu zęby, w których w dwuwizytowym zabiegu endodoncji regeneracyjnej zastosowano wodorotlenek wapnia, oraz te, w których przeprowadzono jednowizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej, stały się jaśniejsze, natomiast zęby po zabiegu dwuwizytowym z zastosowaniem TAP(M) stały się ciemniejsze w porównaniu z kolorem sprzed leczenia.

Przebarwienie tkanek zęba po zabiegu endodoncji regeneracyjnej jest niemal nieuniknione. Jeśli to możliwe, sugerowane są jednowizytowe zabiegi. W trakcie zabiegów dwuwizytowych zaleca się wykorzystywanie pasty wodorotlenkowo-wapniowej jako pasty dezynfekującej ze względu na niższy potencjał przebarwiający tkanki zęba. W kontekście występowania przebarwień wskazane jest zastosowanie fibryny bogatopłytkowej. Warto rozważyć wybielenie przebarwionych zębów, w których przeprowadzono jednowizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej, oraz zębów po zabiegu dwuwizytowym wykonanym przy użyciu wodorotlenku wapnia, ponieważ jest ono możliwe, ale nie gwarantuje powrotu do pierwotnego koloru. Nie zaleca się wybielenia zębów poddanych dwuwizytowemu zabiegowi endodoncji regeneracyjnej z zastosowaniem TAP(M) nadtlenkiem karbamidu, gdyż efekt może być odwrotny do zamierzonego. W celu ustalenia wytycznych dotyczących procedury wybielenia zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej wskazane jest przeprowadzenie dalszych badań.

5. WNIOSKI

1. Analiza badań wykazała, że większość materiałów stosowanych w zabiegach endodoncji regeneracyjnej ma potencjał do przebarwiania tkanek zęba. W celu zmniejszenia ryzyka przebarwień zębów przed aplikacją środka dezynfekującego czy materiału barierowego zalecane jest uszczelnienie zębiny systemem wiążącym i użycie TAP(M) poniżej granicy szkliwno-cementowej. Przeprowadzono niewielką liczbę badań *in vitro* z zakresu tego zagadnienia; dlatego dalsze badania są uzasadnione.
2. Analiza badań wykazała także, że wybielenie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej jest osiągalne. W badaniach dominowała metoda wewnętrzna, ale ze względu na niedostateczną liczbę publikacji dotyczących alternatywnych metod wybielania ich porównanie było utrudnione. Użycie różnych metod i środków wybielających oraz czasu wybielania powoduje, że nie jest możliwe wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Konieczne są dalsze badania w celu stworzenia precyzyjnych wytycznych określających odpowiednią technikę, materiał i czas trwania wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej.
3. Przebarwienie tkanek zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej jest niemal nieuniknione. W przeprowadzonym badaniu zmiana koloru tkanek zębów dotyczyła wszystkich grup z wyjątkiem tej, w której zastosowano fibrynę bogatopłytkową oraz cement MTA Repair HP. Jeśli to możliwe, sugerowane są jednowizytowe zabiegi endodoncji regeneracyjnej. W trakcie zabiegów dwuwizytowych zaleca się wykorzystywanie pasty wodorotlenkowo-wapniowej jako pasty dezynfekującej ze względu na niższy potencjał przebarwiający tkanki zęba. W kontekście występowania przebarwień wskazane jest zastosowanie fibryny bogatopłytkowej oraz nieimplikującego przebarwień materiału barierowego, np. cementu MTA Repair HP. Warto rozważyć wybielenie przebarwionych zębów, w których przeprowadzono jednowizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej oraz zębów po zabiegu dwuwizytowym wykonanym z użyciem wodorotlenku wapnia, ponieważ jest ono możliwe, ale nie gwarantuje powrotu do pierwotnego koloru. Nie zaleca się wybielania zębów poddanych dwuwizytowemu zabiegowi endodoncji regeneracyjnej z zastosowaniem TAP(M) nadtlaniem karbamidu, gdyż efekt

wybielenia może być odwrotny do zamierzonego. W celu ustalenia wytycznych dotyczących procedury wybielenia zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej wskazane jest przeprowadzenie dalszych badań.

Hipotezy badawcze

1. Wyniki badania były w większości zgodne z pierwszą hipotezą dotyczącą przebarwień zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej. Pierwsza hipoteza zerowa została zaakceptowana.
2. Wyniki badania były niezgodne z założeniami drugiej hipotezy dotyczącej wybielenia zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, ponieważ efekt wybielenia nie zawsze był osiągalny. Druga hipoteza zerowa została odrzucona.

6. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

6.1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration

379

Journal of Oral Science, Vol. 61, No. 3, 379-385, 2019

Review

Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration

Irini Fagogeni¹⁾, Joanna Metlerska¹⁾, Mariusz Lipski²⁾, Tomasz Falgowski³⁾,
Górski Maciej⁴⁾, and Alicja Nowicka⁴⁾

¹⁾Faculty of Dentistry, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

²⁾Department of Preclinical Conservative Dentistry and Preclinical Endodontics,
Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁾Faculty of Medicine Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

⁴⁾Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Pomeranian Medical University in Szczecin,
Szczecin, Poland

(Received December 18, 2018; Accepted March 29, 2019)

Abstract: There is some evidence of tooth discoloration after regenerative endodontic procedures. The aim of this review is to determine which materials used in regenerative procedures induce tooth discoloration. The authors searched six digital databases in February 2018: PubMed, Google Scholar, the Cochrane Library, Scopus, Web of Science, and Lilacs. As a result, 353 studies were found. Eleven studies that met the established criteria were selected. Analysis of the selected studies showed that most materials used in regenerative endodontic procedures have the potential to stain tooth tissues. To decrease tooth discoloration, sealing dentin with a dentin-bonding agent before the placement of a disinfectant paste and barrier materials should be considered. Only a small number of *in vitro* studies have been performed; therefore, further studies on this topic are warranted.

Keywords: calcium silicate-based cements;
discoloration; regenerative endodontic
procedures; revitalization.

Correspondence to Dr. Nowicka Alicja, Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Al. Powstańców Wlkp. 72, Szczecin 70-111, Poland
Fax: +48-91-480-0705 E-mail: nowicka6@gmail.com

J-STAGE Advance Publication: August 3, 2019
Color figures can be viewed in the online issue at J-STAGE.
doi.org/10.2334/josnusd.18-0467
DN/JST.JSTAGE/josnusd/18-0467

Introduction

Regenerative endodontics, the newest branch of stomatology, studies the potential for the regeneration of damaged pulp as well as the creation and delivery of replacement pulp-dentin tissues (1). Potential regenerative endodontic techniques include root canal revascularization, pulp implants, three-dimensional cell printing, postnatal (adult) stem cell therapy, scaffold implants, injectable scaffolds, and gene therapy (1). The most common technique used is root canal revascularization, also called revitalization (2), which is used for the treatment of nonvital, infected, and immature permanent teeth (3).

Pulp necrosis of immature permanent teeth in children is commonly caused by injuries and caries (4) and often affects anterior teeth. The treatment of immature permanent teeth is particularly challenging for dentists, because these teeth are characterized by thin root walls and a wide apical opening. These attributes hinder correct root length measurement and airtight root filling, particularly in the apex. This increases the risk of tooth breaking. To date, cases of irreversible inflammation or pulp necrosis with incomplete root development are treated via the production of a mineralized barrier near the apex of the root during the process of apexification; however, this process does not induce tooth length growth, thickening of root walls, or the formation of the root apex (4,5), which occurs under physiological conditions, described

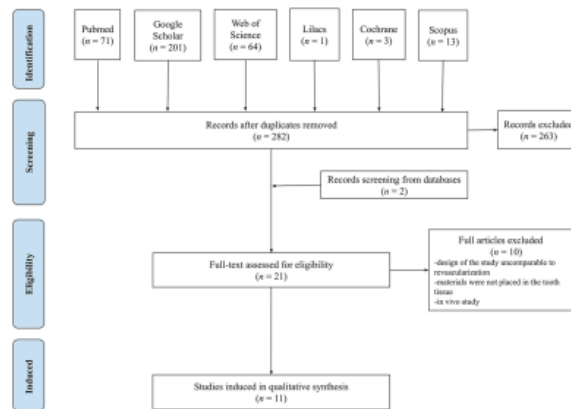


Fig. 1 Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) flow diagram of the search strategy.

as apexogenesis (6). Apexogenesis is possible only when the vital pulp or pulp-like tissue is present in the canal. Using regenerative endodontics, it is possible to recreate this process. According to the American Association of Endodontists (AAE), the regenerative process consists of removal of the infected pulp, disinfection of the root canal with disinfectant pastes, promotion of bleeding into the canal system by over-instrumenting, and placement of the barrier material over a blood clot (<http://www.aae.org/regenerativeendo/>, accessed on May 7, 2018). White mineral trioxide aggregate (WMTA) is recommended by AAE as a barrier material. However, mineral trioxide aggregate is associated with discoloration; therefore, bioceramics or tricalcium silicate cements (e.g., Biodentine, Septodont, Lancaster, PA, USA and EndoSequence BC RRM-Fast Set Putty, Brasseler USA [RRM]) should be considered in the esthetic zone. In some cases, promotion of bleeding is not possible, and AAE recommends the application of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, or autologous fibrin matrix as an alternative therapy (<http://www.aae.org/regenerativeendo/>, accessed on May 7, 2018).

There are reports in the literature (7) that materials used in regenerative endodontic therapy have the potential to cause visible tooth discoloration, which may significantly and negatively impact the quality of life in children. Patients desire both successful treatment and an esthetic outcome, particularly for their front teeth; therefore, materials and procedures with the lowest possible staining potential must be carefully chosen.

Visual spectrophotometry is a widely and successfully used method of color evaluation in dentistry (8) and is currently considered the gold standard method. The delta

E value defines the color difference between the final and initial values. The aim of this review is to evaluate the discoloration potential of factors and materials used in regenerative endodontic procedures based on published *in vitro* studies.

Materials and Methods

The main question aimed to answer in this paper was whether the materials and procedures used in regenerative endodontic procedures could cause discoloration of the hard tissues of the teeth. Publications were searched without a year limit in PubMed, Google Scholar, the Cochrane Library, Scopus, Lilacs, and Web of Science databases. The search phrases included “((regenerative endodontics OR regenerative procedure OR pulp therapy OR revascularization OR revitalization) AND (bioceramic OR biodentine OR mta OR mineral trioxide aggregate OR triple antibiotic paste OR tap OR blood OR prf OR prp) AND discolo*)”.

The final search was performed on February 18, 2018. Inclusion criteria comprised the following types of articles: *in vitro* studies, studies that used preparations placed into the tooth tissues, and those that described revitalization procedures.

Results

A total of 353 titles were retrieved by the query (71 in PubMed, 201 in Google Scholar, one in Lilacs, three in the Cochrane Library, 13 in Scopus, and 64 in Web of Science). Eleven studies were chosen according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) standards (Fig. 1). Table 1 shows information regarding the analyzed materials,

Table 1 Data pertaining to analyzed studies

Author and year	No. of teeth/ type of teeth	Irrigant(s)	Sample preparation method	Measurement method/ Measurement time	Material	Discoloration							
						Yes/No	Final considerations						
Lenherr et al. 2012 (9)	210 Bovine teeth	1% NaOCl 20% EDTA, tap water	Material placed in cuboid enamel- dentine blocks	Vita Easyshade Compact Before and after placement of material, 1 w, 1 m, 3 m, 6 m, 12 m	CG	Yes	Specimens with TAP(m) were the most discolored.						
					Blood	Yes							
					CH	No							
					ApexCal	Yes							
					Ultrasal XS	No							
					TAP(m)	Yes							
					GMTA	Yes							
					GMTA + blood	Yes							
					WMTA	Yes							
					WMTA + blood	Yes							
PC	No												
PC + blood	Yes												
Akcay et al. 2013 (10)	70 Bovine teeth	10 mL 5.25% NaOCl 10 mL 17% EDTA 10 mL distilled water	Canal filled with material	Spectro Shade Micro After placement of material, 1 d, 1 w, 2 w, 3 w	CG	No	Specimens with TAP(m) were the most discolored.						
					CH	No							
					DAP	No							
					TAP(m)	Yes							
					TAP(d)	Yes							
					TAP(a)	Yes							
TAP(c)	Yes												
Felman et al. 2013 (11)	44 Human teeth	6 mL 4% NaOCl, 4 mL 15% EDTA 1 mL, 4% NaOCl	Canal filled with material	Photoshop CS4 - Canon EOS 450D - CIE Lab Before placement of material, 1 d, 35 d	Saline	No	Specimens with blood were the most discolored.						
					Blood	Yes							
					WMTA + saline	Yes							
WMTA + blood	Yes												
Kirchhoff et al. 2014 (12)	20 Human teeth	Distilled water 5 mL of 2.5% NaOCl	Materials placed into the pulp chamber	Vita Easyshade Advance 4.0 Before placement of material, after 3 w of placement of TAP(m), after rinsing out TAP(m)	TAP(m)	Yes	Discoloration was observed in all specimens.						
					After rinsing out TAP(m)	Yes							
Kohli et al. 2013 (13)	80 Human teeth	10 mL 3% NaOCl 10 mL 17% EDTA, 10 mL distilled water	Canal filled with material	Ocean Optics Before placement of material, 1 w, 1 m, 2 m, 6 m	RRM	No	Specimens with TAP(m) were the most discolored.						
					RRMF	No							
					BD	No							
					WMTA	Yes							
					GMTA	Yes							
					TAP(m)	Yes							
CG	No												
Dettwiler et al. 2016 (14)	330 Bovine teeth	1% NaOCl 20% EDTA saline solution	Material placed in enamel-dentine block	Vita EasyShade Before and after placement of material 1 w, 1 m, 3 m, 6 m, 12 m	Empty	No	Specimens with blood were the most discolored.						
					Blood	Yes							
					Ledermix MTA	No							
					MM-MTA	No							
					BD	No							
					Odontocem	No							
					PC	No							
					PC Bi ₂ O ₃	Yes							
					PC ZrO	No							
					TAP(cf)	Yes							
					DAP	Yes							
					Shokoubinejad et al. 2016 (15)	104 Human teeth		5.25% NaOCl 17% EDTA	Canal filled with material	Konika CS2000 Before placement of material, 1 d, 1 m, 6 m	PMTA + saline	Yes	All specimens with blood were more discolored than those with saline.
											Ortho MTA + saline	Yes	
RRM + saline	Yes												
BD + saline	Yes												
PMTA + blood	Yes												
Ortho MTA + blood	Yes												
RRM + blood	Yes												
BD + blood	Yes												
Blood	Yes												
Saline solution	Yes												
Santos et al. 2016 (16)	50 Bovine teeth	3 mL 1.5% NaOCl, 3 mL 17% EDTA distilled water	Canal filled with material	Vita Easyshade, VITA Classical A1-D4 Shade Guide 1 d, 3 d, 1 w, 2 w, 3 w, 1 m, 2 m, 3 m, 4 m after antibiotic paste placement. 1 d, 3 d, 1 w, 2 w, 3 w, 1 m, 2 m after material GIC/WMTA placement	CG	No	Specimens with WMTA were discolored more than those with GIC.						
					TAP(a)	No							
					TAP(m)	Yes							
					DAP	No							
					CH	No							
					TAP(m)/WMTA	Yes							
					TAP(a)/WMTA	Yes							
					DAP/WMTA	Yes							
					CH/WMTA	Yes							
					TAP(m)/GIC	Yes							
					TAP(a)/GIC	Yes							
					DAP/GIC	Yes							
					CH/GIC	Yes							
Akbulut et al. 2017 (17)	42 Human teeth	17% EDTA, 2.5% NaOCl	Canal filled with material	Vita Easyshade Advance Baseline, 3 w (TAP(c)) 4 w (PMTA; DB; MM-MTA + blood)	TAP(c)	Yes	Discoloration was observed in all specimens.						
					PMTA + blood	Yes							
					BD + blood	Yes							
					MM-MTA + blood	Yes							

Table 1 continuation

Author and year	No. of teeth/ type of teeth	Irrigant(s)	Sample preparation method	Measurement method/ Measurement time	Material	Discoloration	
						Yes/No	Final considerations
Shokouhinejad et al. 2017 (18)	96 Bovine teeth	20 mL 1.5% NaOCl 20 mL 17% EDTA	Canal filled with material. In some groups, the access cavity walls were sealed with DBA before placement of the material	Vita Easyshade	TAP(m), PMTA + blood	Yes	Specimens without DBA discolored more than those with DBA.
				Before placement of materials, 4 w after placement of antibiotic paste	TAP(m), OrthoMTA + blood	Yes	
				After placement of barrier material	TAP(m), RetroMTA + blood	Yes	
					TAP(m), BD + blood	Yes	
					TAP(m), PMTA + blood/DBA	Yes	
					TAP(m), OrthoMTA + blood/DBA	Yes	
Iriboz et al. 2017 (8)	85 Human teeth	2 mL 5.25% NaOCl, 10 mL 5.25% NaOCl, 10 mL 17% EDTA 10 mL 5.25% NaOCl, 10 mL distilled water	Canal filled with material	Vita Easyshade	TAP(m)	Yes	Discoloration was observed in specimens with TAP(m) and MP.
				0 d, 1 w, 2 w, 3 w, 4 w	MP	Yes	
					CH	No	

CG: control group; CH: calcium hydroxide; DAP: double antibiotic paste; TAP(m): triple antibiotic paste with minocycline; TAP(d): triple antibiotic paste with doxycycline; TAP(a): triple antibiotic paste with amoxicillin; TAP(c): triple antibiotic paste with cefaclor; TAP(cf): triple antibiotic paste with cefuroxime; BD: Biodentine; RRM: EndoSequence Root Repair Material putty; RRMF: EndoSequence Root Repair Material fast set paste; WMTA: white MTA; GMTA: grey MTA; MP: minocycline paste; PMTA: Pro Root MTA; PC: Portland Cement; PC Bi₂O₃: Portland cement with added bismuth oxide; PC ZrO: Portland cement with added zirconium oxide; GIC: glass ionomer cement; MTA: mineral trioxide aggregate; DBA: dentin-bonding agent; d: day; m: month; w: week.

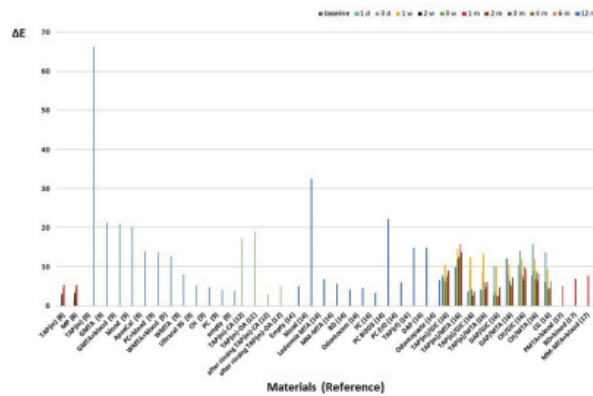


Fig. 2 Delta E values defining the color changes of materials in reviewed studies. The numbers in parentheses are reference citations.

CG: control group; CH: calcium hydroxide; DAP: double antibiotic paste; TAP(m): triple antibiotic paste with minocycline; TAP(a): triple antibiotic paste with amoxicillin; TAP(cf): triple antibiotic paste with cefuroxime; BD: Biodentine; WMTA: white MTA; GMTA: grey MTA; MP: minocycline paste; PMTA: Pro Root MTA; PC: Portland cement; PC Bi₂O₃: Portland cement with added bismuth oxide; PC ZrO: Portland cement with added zirconium oxide; GIC: glass ionomer cement; MTA: mineral trioxide aggregate; OA: teeth with open apices; CA: teeth with closed apices.

irrigants, tooth type, sample preparation method, measurement time, measurement method, and discoloration (8-18). Figure 2 presents delta E values from studies that included its value in results (8,9,12,14,16,17); however, not all studies included numeric delta E values. A statistical analysis could not be performed because of different parameters used by reviewed studies. The risk of bias was evaluated according to the modified Methodologi-

cal Index for Non-randomized Studies (MINORS) scale (Fig. 3). All the analyzed studies presented a low risk of bias.

Discussion

This review identified 11 *in vitro* studies that have reported tooth discoloration induced by materials used in regenerative endodontic techniques. Notably, most of

Methodological Index for non-randomized studies (MINORS)	Lenherr 2012	Akay 2013	Felmann 2013	Kirchhoff 2014	KOH 2015	Schokouhinejad 2015	Dettwiler 2016	Santos 2016	Ackay 2017	Schokouhinejad 2017	Jobse 2017
A clearly stated aim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Inclusion of consecutive specimens	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Prospective collection of data	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Endpoints appropriate to the size of the study	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Unbiased assessment of the study endpoint	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Follow-up period appropriate to the size of the study	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Loss to follow up less than 5%	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Prospective calculation of the study size	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
An adequate control group	2	2	2	0	2	0	2	2	2	0	2
Contemporary groups	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Baseline equivalence of groups	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adequate statistical analyses	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Total	20	20	22	18	22	18	28	20	18	18	28

Fig. 3 Risk of bias according to the modified Methodological Index for Non-randomized Studies (MINORS) scale.

the studies analyzed in this review used different sample preparation procedures. For instance, Lenherr et al. (9) and Dettwiler et al. (14) placed the studied materials in cuboid enamel-dentine blocks, whereas Kirchhoff et al. (12) used pulp chambers. However, some researchers studied materials in the root canal (8,10,13,16,18). Different methodologies in some instances led to different results.

A vast amount of research has measured tooth discoloration using a spectrophotometer and evaluated discoloration with the CIELAB color space technique (defined by the International Commission on Illumination (CIE)) (9,10,12-14,16-18). Felman et al. (11) obtained images with a digital camera and used Adobe Photoshop CS4 to perform shade analysis with a CIELAB color space. Schokouhinejad et al. (15) measured discoloration with a spectroradiometer. Analysis of all the retrieved data showed that tooth discoloration could occur at any stage of treatment, such as after the use of a disinfectant paste, promotion of bleeding, or placement of barrier materials.

Disinfectant pastes are intracanal medications used to disinfect the canal during pulp revitalization. Seven papers studying triple antibiotic paste (TAP) with minocycline were found (8-10,12,13,16,18). Four of them compared TAP to different materials and found it to be the most potent in terms of staining ability (9,10,13,16), with minocycline having the greatest staining potential of the other three antibiotics (19). One of the studies found that discoloration was permanent despite rinsing out the paste (12). Berkhoff et al. (20) noted that regardless of the irrigation techniques used, around 88% of TAP with minocycline was found in the root canal system.

TAP with minocycline was circumferentially presented up to 350 μ m within the dentin (20). Minocycline is semi-synthetic tetracycline derivative which staining potential was likely related to its chelation of calcium ions (19) and incorporation into the tooth tissue (12) as well as the formation of an oxidation product (21). TAP with minocycline caused the greatest tooth discoloration (9,10,13,16), even when compared to specimens containing only blood (9). Kirchhoff et al. (12) studied the ability of sodium hypochlorite (NaOCl) to bleach teeth by rinsing out TAP with minocycline from the canal. They found that NaOCl was not enough to cause bleaching. According to the AAE, minocycline could be omitted from or replaced with other antibiotics in TAP, such as cefaclor, clindamycin and amoxicillin (<http://www.aae.org/regenerativeendo/>, accessed on May 7, 2018). The staining potential of TAP with amoxicillin was evaluated by two studies, which showed a discrepancy in their outcomes (10,16). Ackay et al. (10) observed the staining potential of TAP with amoxicillin; this result was in contradiction with findings by Santos et al. (16). There was also a difference in methodologies of these studies. Ackay et al. (10) rinsed root canals with 10 mL of 5.25% NaOCl, and Santos et al. (16) rinsed them with 3 mL 1.5% NaOCl before placement of the antibiotic paste. In addition, Ackay et al. (10) placed TAP with amoxicillin through the apical aspect of teeth and did not include information about the concentration of the antibiotic paste. Alternatively, Santos et al. (16) used 0.1 mg/mL TAP with amoxicillin that was placed into the root canal through endodontic access. Some authors have reported that TAP with cefaclor induced tooth discoloration (10,17). Ackay et al. (10) and Santos et al. (16) claimed that double antibiotic paste placed in the root canal was not the cause of tooth discoloration; this was in contrast with findings by Dettwiler et al. (14), who used enamel-dentin blocks as samples, which did not fully correspond to real teeth. Calcium hydroxide exhibited no staining potential in the reviewed studies (8-10,16), but it was noted that ApexCal (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), which is a calcium hydroxide-based product with bismuth carbonate, showed the ability to discolor teeth (9). Bismuth ions, which are derivatives of bismuth carbonate, could be responsible for ApexCal's staining potential.

The next stage of revitalization was the promotion of bleeding into the root canal by over-instrumenting the apex, followed by the placement of a coronal barrier material over the blood clot. A blood clot formed inside the canal could affect the color of the teeth. This discoloration was most likely caused by the distribu-

tion of blood products, such as hemoglobin, hematin, and erythrocytes, which penetrated the dentinal tubules (22). In a histochemical study, Martin et al. (22) noted that most discoloration could occur in the dentine layer near the pulp chamber and its intensity is decreasing towards the outer tooth surface. Blood had high staining potential which occurred with (9,11,15,17) and without contact with barrier materials (9,11,14,15). Lenherr et al. (9) stated that after blood contamination of Portland Cement (PC; Medcem GmbH, Weinfelden, Switzerland) and WMTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil), increased discoloration was observed. Shokouhinejad et al. (15) compared the effect of blood contamination of barrier materials on tooth color and concluded that all materials that were in contact with the blood presented higher staining potential than materials that were in contact with saline. The materials included Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fosses, France); ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA); Ortho MTA (BioMTA, Seoul, Republic of Korea); and RRM. Only one study examined the influence of plasma and platelet concentrate on tooth discoloration. Marin et al. (22) reported that teeth with a pulp chamber filled with plasma and platelet concentrates did not demonstrate color changes compared to teeth filled with sterile saline.

Many authors noted that materials used in regenerative procedures as barrier materials caused tooth discoloration. Discoloration was largely related to the composition of materials used, such as bismuth, iron, aluminum, and magnesium oxides (15,23). The mechanism of tooth discoloration caused by bismuth oxide was based on the oxidation of bismuth oxide into bismuth carbonate. This reaction occurred when bismuth was in contact with carbon dioxide from the air. Reduction of bismuth oxide to bismuth metal could also cause discoloration (24). Marciano et al. (24) reported that when in contact with collagen, bismuth oxide changed to a black sediment. Camilleri observed discoloration of WMTA after immersing material in NaOCl (25). WMTA contained bismuth oxide, which was discolored after contact with NaOCl. WMTA in contact with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) showed significant discoloration compared to samples of material immersed in normal saline and samples left in dry condition. This was in disagreement to situations when Biodentine was used and color stability was observed (26). Grey MTA (GMTA; Angelus, Londrina, PR, Brazil) (9,13) and WMTA (9,13) cements also caused discoloration, which was probably induced by their radiopacifying component, bismuth oxide.

Many manufacturers modified the composition of

materials by reducing the content of bismuth oxide or replacing it with zirconium oxide, which is also used as a contrasting material (27). Some studies report that zirconium oxide does not have a high staining potential (14,23,28). Dettwilet et al. (14) evaluated PC, PC with bismuth oxide, and PC with zirconium oxide. In this study, discoloration was observed in PC with bismuth oxide, but not in MM-MTA (Micro Mega, Besancon Cedex, France) and Ledermix MTA (Riemser Pharma GmbH, Greifswald-Insel Riems, Germany), although these two products contained bismuth oxide. The authors did not provide an explanation of this phenomenon. They noted that the occurrence and concentration of bismuth oxide in calcium silicate cements was not a reliable indicator of the possibility of discoloration. Marciano et al. (29) further investigated whether there was a correlation between the concentration of bismuth oxide and color change in calcium silicate cements. Authors noticed that despite increasing radiopacity, bismuth oxide did not influence intensity of discoloration (29). It was probable that composition of the calcium silicate cements could affect tooth discoloration. Biodentine (13,14), RRM, and EndoSequence Root Repair Material fast set paste (RRMF; Brasseler USA, Savannah, GA, USA) (13), which contain zirconium oxide, did not produce discoloration in separate samples. Discoloration was induced with ProRoot MTA (15), OrthoMTA (15), RRM (15), Biodentine (15), and WMTA (11) evaluated in samples with blood and saline. Blood contamination had a strong impact on tooth color. WMTA and GMTA caused visible tooth discoloration after 6 months, as opposed to Biodentine, RRM and RRMF (13). The difference was related to the replacement of bismuth oxide with zirconium oxide in Biodentine, RRM, and RRMF. Shokouhinejad et al. (15) reported that OrthoMTA in contact with saline presented greater tooth discoloration after 6 months than Biodentine and RRM did. WMTA also had staining potential, but it was greater when the material was contaminated with blood (11). Uptake of blood components in porosities of barrier materials could be a potential mechanism of color change (9).

AAE recommends using a dentin-bonding agent on dentin in the pulp chamber and using TAP below the cemento-enamel junction to mitigate tooth discoloration. Shokouhinejad et al. (18) evaluated the impact of the use of pulp chamber dentin insulation with a dentin-bonding agent before placing TAP with minocycline into a root canal and before placing blood and barrier materials on staining potential (18). The authors stated that this procedure decreased tooth discoloration but did not eliminate the problem (18,19).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest related to this study.



References

- Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 33, 377-390.
- Lin LM, Kahler B (2017) A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *J Istanbul Univ Fac Dent* 51, 41-51.
- Aggarwal V, Miglani S, Singla M (2012) Conventional apexification and revascularization induced maturogenesis of two non-vital, immature teeth in same patient: 24 months follow up of a case. *J Conserv Dent* 15, 68-72.
- Flanagan TA (2014) What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth. *Aust Endod J* 40, 95-100.
- Kahler B, Chugal N, Lin LM (2017) Alkaline materials and regenerative endodontics: a review. *Materials (Basel)* 5, 10.
- Rafter M (2005) Apexification: a review. *Dent Traumatol* 21, 1-8.
- Kahler B, Rossi-Fedeles G (2016) A review of tooth discoloration after regenerative endodontic therapy. *J Endod* 42, 563-569.
- Iriboz E, Öztürk BA, Körklü S, Tarcin B, Berker YG, Öveçoğlu HS (2017) Comparison of intracoronal bleaching methods on teeth discolored by different antibiotic pastes. *Niger J Clin Pract* 20, 700-706.
- Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G (2012) Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J* 45, 942-949.
- Akcaay M, Arslan H, Yasa B, Kavrak F, Yasa E (2014) Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J Endod* 40, 845-848.
- Felman D, Parashos P (2013) Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 39, 484-487.
- Kirchhoff AL, Raldi DP, Salles AC, Cunha RS, Mello I (2015) Tooth discoloration and internal bleaching after the use of triple antibiotic paste. *Int Endod J* 48, 1181-1187.
- Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B (2015) Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *J Endod* 41, 1862-1866.
- Dettwiler C, Walter M, Zaugg LK, Lenherr P, Weiger R, Krastl G (2016) In vitro assessment of the tooth staining potential of endodontic materials in a bovine tooth model. *Dent Traumatol* 32, 480-487.
- Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Pirmoazen S, Shamshiri AR, Dummer PM (2016) Evaluation and comparison of occurrence of tooth discoloration after the application of various calcium silicate-based cements: an ex vivo study. *J Endod* 42, 140-144.
- Santos LG, Felipe WT, Souza BD, Konrath AC, Cordeiro MM, Felipe MC (2017) Crown discoloration promoted by materials used in regenerative endodontic procedures and effect of dental bleaching: spectrophotometric analysis. *J Appl Oral Sci* 25, 234-242.
- Akbulut BM, Terlemeç A, Akman M, Buyukerkmen B, Guneser MB, Eldeniz AU (2017) Tooth discoloration effects of calcium silicate based barrier materials used in revascularization and treatment with internal bleaching. *J Dent Sci* 12, 347-353.
- Shokouhinejad N, Khoshkhounejad M, Alikhasi M, Bagheri P, Camilleri J (2018) Prevention of coronal discoloration induced by regenerative endodontic treatment in an ex vivo model. *Clin Oral Investig* 22, 1725-1731.
- Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY (2010) Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod* 36, 1086-1091.
- Berkhoff J, Chen P, Teixeira F, Diogenes A (2014) Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod* 40, 1172-1177.
- Cheek CC, Heymann HO (1999) Dental and oral discolorations associated with minocycline and other tetracycline analogs. *J Esthet Dent* 11, 43-48.
- Marin PD, Bartold PM, Heithersay GS (1997) Tooth discoloration by blood: an in vitro histochemical study. *Endod Dent Traumatol* 13, 132-138.
- Kang SH, Shin YS, Lee HS, Kim SO, Shin Y, Jung IY et al. (2015) Color changes of teeth after treatment with various mineral trioxide aggregate-based materials: an ex vivo study. *J Endod* 41, 737-741.
- Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA (2014) Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod* 40, 1235-1240.
- Camilleri J (2014) Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod* 40, 436-440.
- Sobhnamayan F, Adl A, Ghanbaran S (2017) Effect of different irrigation solutions on the colour stability of three calcium silicate-based materials. *J Dent Biomater* 4, 373-378.
- Lipski M, Nowicka A, Kot K, Postek-Stefańska L, Wysoczańska-Jankowicz I, Borkowski L et al. (2018) Factors affecting the outcomes of direct pulp capping using Biodentine. *Clin Oral Investig* 22, 2021-2029.
- Mozyńska J, Metlerski M, Lipski M, Nowicka A (2017) Tooth discoloration induced by different calcium silicate-based cements: a systematic review of in vitro studies. *J Endod* 43, 1593-1601.
- Marciano MA, Estrela C, Mondelli RF, Ordinola-Zapata R, Duarte MA (2013) Analysis of the color alteration and radiopacity promoted by bismuth oxide in calcium silicate cement. *Braz Oral Res* 27, 318-323.

6.2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review

Review

Efficiency of Teeth Bleaching after Regenerative Endodontic Treatment: A Systematic Review

Irini Fagogeni ¹, Tomasz Falgowski ², Joanna Metlerska ¹ , Mariusz Lipski ³, Maciej Górski ⁴
and Alicja Nowicka ^{4,*} 

- ¹ Doctoral Studies of the Faculty of Dentistry, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; irini.fagogeni@gmail.com (I.F.); asimoza@wp.pl (J.M.)
 - ² General, Minimally Invasive and Gastrointestinal Surgery Department, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; falgowski.tomasz@gmail.com
 - ³ Department of Preclinical Conservative Dentistry and Preclinical Endodontics, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; lipam@pum.edu.pl
 - ⁴ Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; maciek@dentist.szczecin.pl
- * Correspondence: nowicka6@gmail.com; Tel.: +48-91-466-16-48

Abstract: The aim of this review is to evaluate of effectiveness of bleaching procedures used to treat discolored teeth subsequent to regenerative endodontic procedures (REPs) based on the review of in vitro and in vivo studies. This literature review was carried out according to the PRISMA guidelines. Four databases (PubMed, Scopus, the Cochrane Library, and Web of Science databases) were searched electronically, until 30 January 2020 without a year limit. The quality of studies was assessed using a modified methodological index for non-randomized studies. After analyzing 1405 studies, 6 in vitro and 9 in vivo studies were eligible for this review. In in vitro studies, effectiveness of bleaching was assessed in teeth discolored by antibiotic pastes, blood, and barrier materials in various combinations. In all analyzed studies, bleaching was effective in teeth discolored by antibiotic pastes as well as by blood and barrier materials. Of 26 treated teeth in the in vivo studies, 17 teeth were bleached successfully. In six cases, there was improvement of the shade. In three cases, bleaching was not sufficient. Bleaching material, techniques, and times differed between studies. Whitening of discolored teeth after REPs is achievable. However, to establish precise guidelines, further long-term clinical studies should be performed.

Keywords: bleaching; carbamide peroxide; hydrogen peroxide; regenerative endodontic treatment; revascularization; sodium perborate



Citation: Fagogeni, I.; Falgowski, T.; Metlerska, J.; Lipski, M.; Górski, M.; Nowicka, A. Efficiency of Teeth Bleaching after Regenerative Endodontic Treatment: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 316. <https://doi.org/10.3390/jcm10020316>

Received: 20 November 2020
Accepted: 13 January 2021
Published: 16 January 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

Regenerative endodontic procedures (REPs) are a recently expanding field in endodontics. They are “biologically based procedures designed to physiologically replace damaged tooth structures” [1]. Regeneration of damaged dentin and root structures, as well as the pulp-dentin complex, are fundamental goals of these procedures [1]. REPs are increasingly applied in immature permanent teeth with pulpal necrosis (with or without apical periodontitis) as an alternative treatment option to apexification. Unlike traditional apexification, physiological root development and maturation represent the greatest advantages of this method [2]. However, some studies report the occurrence of tooth discoloration subsequent to REPs [3,4], which is an unfavorable outcome of these procedures [5,6]. The potential causes of observed discoloration are respectively: intracanal medicaments, distribution of blood products, and compositions of barrier materials used in REPs.

Teeth discoloration may negatively impact the quality of life in young patients and their families [7], especially if the problem concerns anterior teeth. To minimize the risk of discoloration, placing of triple antibiotic paste (TAP) containing minocycline (TAPM)

below the cemento-enamel junction and sealing the pulp chamber with a dentin bonding agent should be considered [8]. However, authors have stated that this recent procedure could not completely eliminate the problem [9,10].

Masking the discoloration with composite resin veneer or internal bleaching are the treatment options used to reduce or eliminate tooth discoloration after REPs [11]. Simple, viable, and minimally invasive procedures should be considered as a treatment of choice. The ideal option would be dental bleaching. However, the 2012 Cosmetic Products Safety Amendment Regulations allowed the use of <0.1% hydrogen peroxide and other compounds or mixtures that release hydrogen peroxide on a group of patients under 18 years old [12,13]. This is a problematic situation faced by dentists, when there are indications for performing bleaching, but the procedure is illicit [13]. Fortunately, a new regulation in the General Dental Council's Position Statement on Tooth Whitening currently available on their website claims that products containing or releasing between 0.1% and 6% hydrogen peroxide cannot be used in young patients under 18 years old, but the exception is when the whitening is aimed at treating or preventing disease [14].

Hydrogen peroxide is an active ingredient in bleaching materials [15]. It can penetrate the dentin and release oxygen, which breaks double bonds of the organic and inorganic compounds inside dental tubules [15,16]. Hydrogen peroxide is applied directly or might be formed as a result of a chemical reaction from sodium perborate or carbamide peroxide [15].

Whitening improves the color of the discolored tooth. However, not always to a sufficient degree [17]. There are currently no precise guidelines for dental bleaching of discolored teeth subsequent to REPs. The bleaching procedure differs across the currently available studies. The aim of this review was to identify the effectiveness of teeth whitening after REPs.

2. Materials and Methods

2.1. Review Questions

The literature review was performed in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) standards (Figure 1) [18]. This review aims to find an answer for the questions listed below:

1. Is whitening of discolored teeth after REPs effective?
2. What kind of bleaching techniques should be used after REPs?
3. What kind of bleaching agents should be applied in bleaching techniques after REPs?
4. How long should bleaching last?

2.2. Search Strategy and Study Selection

Four databases (PubMed, Scopus, the Cochrane Library, and Web of Science databases) were searched electronically by two independent reviewers (I.F. and T.F.) for publications involving bleaching of teeth discolored after REPs. Publications were searched without a year limit. The last search was conducted on 30 January 2020. The search phrases are presented in Table 1. After removing duplicates all titles and abstracts were examined.

Publications were extracted based on the inclusion criteria listed below:

1. In vitro and in vivo studies that evaluated bleaching of tooth discoloration after REPs.
2. Publications in which bleaching material was placed in the tooth tissues.

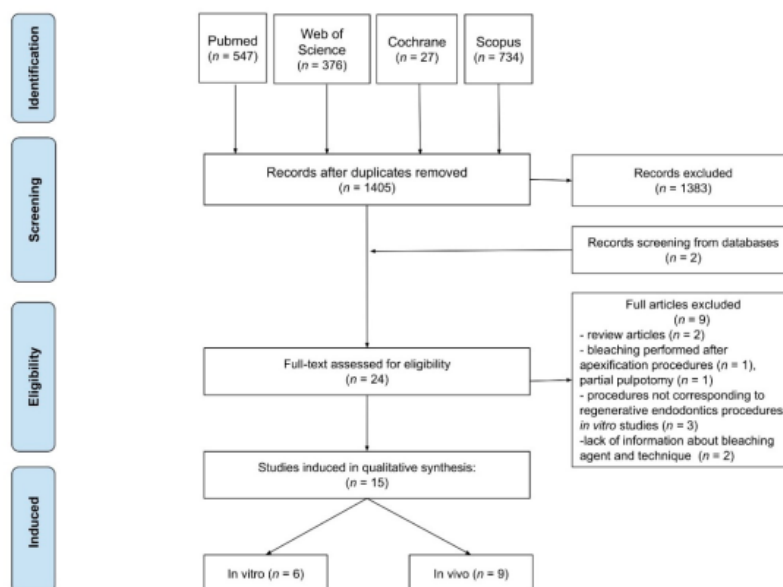


Figure 1. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) flow diagram of the search strategy.

Table 1. The search phrases.

Database	Search Phrases
Medline [PubMed] (547)	1 (((((((((regenerative endodontic procedures) OR regenerative endodontic treatment) OR revascularization) OR revitalization) OR Biodentine) OR mineral trioxide aggregate) OR triple antibiotic paste) OR blood) OR platelet rich fibrin) OR platelet rich plasma) OR PRP) OR PRF (discolo*) OR stain*
	2 (((bleach* OR whiten*) OR sodium perborate) OR hydrogen peroxide) OR carbamide peroxide
	3 (((((((((((regenerative endodontic procedures) OR regenerative endodontic treatment) OR revascularization) OR revitalization) OR Biodentine) OR mineral trioxide aggregate) OR triple antibiotic paste) OR blood) OR platelet rich fibrin) OR platelet rich plasma) OR PRP) OR PRF) AND ((discolo*) OR stain*)) AND (((bleach*) OR whiten*) OR sodium perborate) OR hydrogen peroxide) OR carbamide peroxide)
Scopus (734)	1 (ALL ("tooth") OR ALL ("teeth"))
	2 (ALL ("regenerative endodontic procedures") OR ALL ("regenerative endodontic treatment") OR ALL ("revascularization") OR ALL ("revitalization") OR ALL ("Biodentine") OR ALL ("mineral trioxide aggregate") OR ALL ("triple antibiotic paste") OR ALL ("blood") OR ALL ("platelet rich fibrin") OR ALL ("platelet rich plasma") OR ALL ("PRP") OR ALL ("PRF"))
	3 (ALL (discolo*) OR ALL (stain*))
	4 (ALL (bleach*) OR ALL (whiten*) OR ALL ("sodium perborate") OR ALL ("hydrogen peroxide") OR ALL ("carbamide peroxide"))
All	((ALL ("tooth") OR ALL ("teeth")) AND ((ALL ("regenerative endodontic procedures") OR ALL ("regenerative endodontic treatment") OR ALL ("revascularization") OR ALL ("revitalization") OR ALL ("Biodentine") OR ALL ("mineral trioxide aggregate") OR ALL ("triple antibiotic paste") OR ALL ("blood") OR ALL ("platelet rich fibrin") OR ALL ("platelet rich plasma") OR ALL ("PRP") OR ALL ("PRF")) AND ((ALL (discolo*) OR ALL (stain*)) AND ((ALL (bleach*) OR ALL (whiten*) OR ALL ("sodium perborate") OR ALL ("hydrogen peroxide") OR ALL ("carbamide peroxide"))))

Table 1. Cont.

Database		Search Phrases
Web of Science (376)	1	ALL FIELDS: (regenerative endodontic procedures) OR ALL FIELDS: (regenerative endodontic treatment) OR ALL FIELDS: (revascularization) OR ALL FIELDS: (revitalization) OR ALL FIELDS: (Biodentine) OR ALL FIELDS: (mineral trioxide aggregate) OR ALL FIELDS: (triple antibiotic paste) OR ALL FIELDS: (blood) OR ALL FIELDS: (platelet rich fibrin) OR ALL FIELDS: (platelet rich plasma) OR ALL FIELDS: (PRP) OR ALL FIELDS: (PRF)
	2	ALL FIELDS: (discolo*) OR ALL FIELDS: (stain*)
	3	ALL FIELDS: (bleach*) OR ALL FIELDS: (whiten*) OR ALL FIELDS: (sodium perborate) OR ALL FIELDS: (hydrogen peroxide) OR ALL FIELDS: (carbamide peroxide)
	All	-
Cohrane (27)	1	(regenerative endodontic procedures OR regenerative endodontic treatment OR revascularization OR revitalization OR Biodentine OR mineral trioxide aggregate OR triple antibiotic paste OR blood OR Platelet rich fibrin OR Platelet rich plasma OR PRP OR PRF)
	2	(discolo* OR stain*)
	3	(bleach* OR whiten* OR sodium perborate OR hydrogen peroxide OR carbamide peroxide)
All		(regenerative endodontic procedures OR regenerative endodontic treatment OR revascularization OR revitalization OR Biodentine OR mineral trioxide aggregate OR triple antibiotic paste OR blood OR Platelet rich fibrin OR Platelet rich plasma OR PRP OR PRF) in All Text AND (discolo* OR stain*) in All Text AND (bleach* OR whiten* OR sodium perborate OR hydrogen peroxide OR carbamide peroxide) in All Text

2.3. Quality Assessment

The quality of in vitro and in vivo studies was assessed using a modified methodological index for non-randomized studies (MINORS) [19]. This index includes twelve items: the first eight items pertain to non-comparative studies and an additional four concern comparative studies. Search results of in vivo studies including case series and case reports. The risk of bias assessment tool to evaluate the methodological quality of case reports was not developed [20]. To show an overview and standardize different types of studies including case reports and case series a modified MINORS scale was used analogous to that of Benetti et al. [21]. The modified MINORS scale items were as follows: clear aim, clear REPs protocol, clear bleaching protocol, prospective collection of data, justification of sample size, follow-up period appropriate to the aim of the study, endpoints appropriate to the aim of the study, blinded analysis, an adequate control group, contemporary groups, baseline equivalence of groups, and adequate statistical analyses. The items were scored: 0, not reported; 1, reported but inadequate; and 2, reported and adequate. All twelve items were used to assess in vitro studies, of which the first eight items were used to evaluate the in vivo studies. The ideal score for comparative studies is 24 and for non-comparative studies 16 [19]. The classification of quality of the in vivo studies was made on according to that of Elkhadem et al. [20] into poor (0–5), fair (6–10), and good (11–16) and analogously a similar classification was used for in vitro studies: poor (0–8), fair (9–16), and good (17–24). The results of each item, total score, and study quality are presented in Tables 2 and 3 for the in vitro and in vivo studies, respectively.

Table 2. Risk of bias according to the modified Methodological Index for Non-randomized Studies (MINORS) scale in in vitro studies.

	Kirchhoff et al. [22]	Yasa et al. [16]	Akbulut et al. [23]	Iriboz et al. [24]	Santos et al. [25]	Fundaoglu Küçükekenci et al. [26]
Clear aim	2	2	2	2	2	2
Clear REPs protocol	1	1	2	1	1	1
Clear bleaching protocol	2	2	2	2	2	2
Prospective collection of data	2	2	2	2	2	2
Justification of sample size	0	2	0	0	0	2
Follow-up period appropriate to the aim of the study	2	2	2	2	2	2
Endpoints appropriate to the aim of the study	2	2	2	2	2	2
Blinded analysis	0	0	0	0	0	0
An adequate control group	0	0	0	1	2	2
Contemporary groups	0	0	0	2	2	2
Baseline equivalence of groups	2	2	2	2	2	2
Adequate statistical analyses	2	2	2	2	2	2
Total score	15	17	16	18	19	21
Study quality	fair	good	fair	good	good	good

Numbers coding: 2, reported and adequate; 1, reported but inadequate; 0, not reported.

Table 3. Risk of bias according to the modified Methodological Index for Non-randomized Studies (MINORS) scale in in vivo studies.

	Kim et al. [9]	Miller et al. [27]	McTigue et al. [17]	D’Mello et al. [11]	De-Jesus-Soares et al. [28]	Kahler et al. [29]	Parthiban et al. [30]	Timmerman et al. [31]	Antov et al. [32]
Clear aim	1	2	1	2	2	1	2	2	1
Clear REPs protocol	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Clear bleaching protocol	2	1	1	2	2	1	1	2	2
Prospective collection of data	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Justification of sample size	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Follow-up period appropriate to the aim of the study	1	2	2	0	2	0	2	0	1
Endpoints appropriate to the aim of the study	1	1	1	2	2	1	2	1	2
Blinded analysis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total score	9	10	9	10	12	7	11	9	10
Study quality	fair	fair	fair	fair	good	fair	good	fair	fair

Numbers coding: 2, reported and adequate; 1, reported but inadequate; 0, not reported.

3. Results

After analyzing 1405 studies retrieved from the query of all databases, six in vitro and nine in vivo studies were qualified on using the PRISMA criteria (Figure 1). Two of the included studies were searched from additional sources [11,30]. Articles excluded were studies in which the procedure did not correspond to REPs in in vitro studies [33–35]; studies where bleaching was performed after apexification [36] or partial pulpotomy [37] in in vivo studies; studies lacking information about bleaching agent and technique [38,39]; and review articles [4,40].

3.1. Results of In Vitro Studies

In six in vitro studies, both bovine teeth [16,25] and human teeth [22–24,26] were bleached. Bleaching was carried out in discolored teeth after the application of antibiotic pastes, blood, and barrier materials in various combinations. Sodium perborate [16,22,24], hydrogen peroxide [16,23,26], and carbamide peroxide [25] were used as bleaching agents.

Bleaching material was placed inside [16,22–26] or inside and outside [25] dental crowns. The authors evaluated color changes using spectrophotometric measurements [16,22–26] which allows to obtain the CIELAB color coordinates for a quantitative evaluation of color changes and based on the VITA Classical A1–D4® Shade Guide, a standard and reference system used worldwide in tooth shade determination [25]. In studies in which antibiotic pastes were used, a tooth stained with TAPM bleached more than a tooth stained with TAP with doxycycline (TAPD) and amoxicillin (TAPA) using both 35% hydrogen peroxide and sodium perborate [16,26]. In studies in which TAP with cefaclor (TAPC), blood and barrier material such as Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA), MM-MTA, (Micro Mega, Besancon Cedex, France), and ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA) were used and bleaching was performed with 35% hydrogen peroxide, the group treated with Biodentine bleached significantly more than in other groups [23]. Information extracted from qualified in vitro studies including number and teeth type, intracanal medicament or/and coronal barrier, discoloration, bleaching material and technique, the measurement method, and time as well as bleaching effect are listed in Table 4. Figure 2 presents delta E values from studies, which included its value among the results.

Table 4. Data pertaining to analyzed in vitro studies.

Author/Year	No. of Teeth/Teeth Type	Intracanal Medicament or/and Coronal Barrier	Discoloration Yes/No	Bleaching Material	Bleaching Method	Measurement Method	Measurement Time	Bleaching Effect
Kirchhoff et al., 2015 [22]	20 human teeth	TAPM/in teeth with CA	Yes	SP +DW	Material placed in the pulp chamber	Vita EasyShade Advance 4.0	1 w, 2 w, 3 w	The bleaching effect was similar between CA and OA groups
		TAPM/in teeth with OA	Yes					
Yasa et al., 2015 [16]	40 bovine teeth	TAPM	Yes	35% HP SP +DW	Material placed in the pulp chamber	Spectro Shade Micro	4 d, 8 d, 12 d	The whitening effect of the 35%HP was superior than SP. Discoloration caused by the TAPM and TAPC was more bleached compared to TAPD and TAPA. The group with BD was more significantly whitened than the groups with PMTA and MM-MTA
		TAPD	Yes					
		TAPA	Yes					
		TAPC	Yes					
Akbulut et al., 2017 [23]	42 human teeth	TAPC	Yes	35% HP	Material placed over coronal barrier	Vita EasyShade Advance	1 w	
		PMTA + blood	Yes					
		BD + blood	Yes					
		MM-MTA + blood	Yes					
Iriboz et al., 2017 [24]	85 human teeth	TAPM	Yes	SP SP +Heat SP +Ultrasonic instrument 30 s, 29k Hz SP +Ultrasonic instrument 60 s, 28k Hz	Material placed in the pulp chamber	Vita EaSyshade	3 d, 1 w	Bleaching was observed in all groups
		MP	Yes					
Santos et al., 2017 [25]	50 bovine teeth	TAPM/WMTA	Yes	37% CP	Bleaching gel was applied inside and outside dental crowns for 45 min. Two bleaching sessions were performed at 1-week interval	Vita EasyShade VITA Classical A1–D4 Shade Guide	1 d, 8 d	No difference was found between first and second bleaching within the same group
		TAPA/WMTA	Yes					
		DAP/WMTA	Yes					
		CH/WMTA	Yes					
		TAPM/GIC	Yes					
		TAPA/GIC	Yes					
		DAP/GIC	Yes					
		CH/GIC	Yes					
CG	No							
Fundaoğlu Küçükçekenci et al., 2019 [26]	120 human teeth	TAPM	Yes	35% HP 35%HP +Nd-YAG laser irradiation	Material placed in the pulp chamber	Vita EasyShade Advance 4.0	4 d, 8 d, 12 d	The bleaching effect was superior in TAPM group than in other groups
		DAP	No					
		TAPA	Yes					
		TAPC	Yes					
		TAPD	Yes					

Abbreviations: BD, Biodentine; CA, closed apices; CG, control group; CH, calcium hydroxide; CP, carbamide peroxide; d, day; DAP, double antibiotic paste; DW, distilled water; GIC, glass ionomer cement; HP, hydrogen peroxide; MP, minocycline paste; OA, open apices; PMTA, Pro Root MTA; SP, sodium perborate; TAPA, triple antibiotic paste with amoxicillin; TAPC, triple antibiotic paste with cefaclor; TAPD, triple antibiotic paste with doxycycline; TAPM, triple antibiotic paste with minocycline; w, week; WMTA, white MTA.

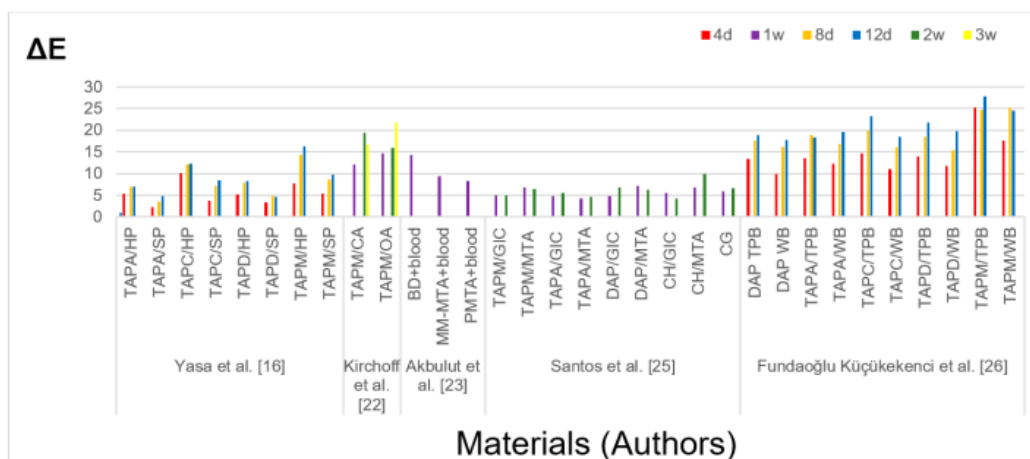


Figure 2. Delta E values defining the color changes of the tooth induced by bleaching materials reported in in vitro studies. Abbreviations: BD, Biodentine; CA, closed apices; CG, control group; d, day; DAP, double antibiotic paste; GIC, glass ionomer cement; HP, hydrogen peroxide; MTA, mineral trioxide aggregate; OA, open apices; PMTA, Pro Root MTA; SP, sodium perborate; TAPA, triple antibiotic paste with amoxicillin; TAPC, triple antibiotic paste with cefaclor; TAPD, triple antibiotic paste with doxycycline; TAPM, triple antibiotic paste with minocycline; TPB, thermo/photo bleaching; w, week; WB, walking bleaching; WMTA, white MTA.

3.2. Results of In Vivo Studies

Nine in vivo studies related to bleaching after REPs were identified in this review, seven of which were case reports [9,11,27–31] and two case series [17,32]. Of the 26 treated teeth, 23 were anterior teeth [9,11,17,27,28,30,32] and three involved premolar teeth [29,31]. Bleaching was performed in teeth in which discoloration was caused by intracanal pastes (e.g., TAP with clindamycin [TAPK], TAPM, TAPA, Odontopaste, double antibiotic paste [DAP], calcium hydroxide [CH] and chlorhexidine gel) and barrier materials (e.g., mineral trioxide aggregate [MTA], white MTA [WMTA], grey MTA [GMTA], and Portland Cement [PC]). Internal, external and both of techniques were carried out to bleach discolored teeth. In the studies discolored teeth were bleached with different bleaching agents: sodium perborate [9,11,27,28,31], hydrogen peroxide [29], and carbamide peroxide [32]. Two authors used the combination of sodium perborate and hydrogen peroxide [17,30]. Sodium perborate was the most frequent bleaching agent used in the in vivo studies. Whitening improved the color of the discolored teeth [11,28–30] both without [32] and with patient satisfaction [27,31]. However, teeth did not always return to their original shade [9]. Of all the analyzed studies, three cases did not bleach sufficiently [17]. Table 5 contains details from in vivo studies including patient ages, tooth type, injury, preoperative diagnosis, medicaments applied in REPs, discoloration, bleaching material and methods, as well as bleaching outcome.

A statistical analysis could not be performed because of different parameters used by reviewed studies.

Table 5. Data pertaining to analyzed in vivo studies.

Author/Year	Patient Age	Tooth Type	Injury	Preoperative Diagnosis	Intracanal Medicament	Coronal Barrier	Discoloration Yes/No/Color	Bleaching Material	Bleaching Method	Bleaching Effect Yes/No
Kim et al., 2010 [9]	7 y	11	Uncomp. fracture	NP, SAP	TAPM	MTA	Yes Blue-greyish discoloration	SP + DW	3 × 1 w Cervical sealing with GIC 4 mm of MTA was left in canal	Yes The cervical shade improved, the tooth did not return to its original shade, patient was satisfied with the tooth whitening
Miller et al., 2012 [27]	9 y	11	Avulsion	AIP, AAP	TAPM	WMTA	Yes Grey discoloration	SP + S	1 × 1 w	Yes The patient and child were pleased with the final tooth color
McTigue et al., 2013 [17]	7 y	11	Intrusion	NP, CAA	TAPM	GMTA	Yes	Cotton pellet saturated with 35% HP for 3 min, SP + 10% HP	1 × 1 w	11 teeth were successfully bleached 3 cases could not be bleached sufficiently
	7 y	21	Intrusion	NP, CAA	TAPM	GMTA	Yes			
	7 y	21	Palatal luxation	NP, AAP	TAPM	GMTA	Yes			
	7 y	21	Avulsion	NP, AAP	TAPM	GMTA	Yes			
	10 y	22	Dens evaginatus	NP, AAP	TAPM	GMTA	Yes			
	8 y	21	Extrusion	NP, CAA	TAPM	GMTA	Yes			
	11 y	21	Extrusion	NP, AAP	TAPM	GMTA	Yes			
	7 y	21	Avulsion	NP, AAP	TAPK	WMTA	Yes			
	6 y	11	Compl. fracture	NP, AAP	TAPK	WMTA	Yes			
	9 y	21	Extrusion	NP, CAA	TAPK	WMTA	Yes			
	6 y	31	Uncomp. fracture	NP, CAA	TAPK	WMTA	Yes			
	9 y	11	Avulsion	NP, CAA	TAPK	WMTA	Yes			
	9 y	21	Avulsion	NP, CAA	TAPK	WMTA	Yes			
8 y	11	Uncomp. fracture	NP, AAA	TAPK	WMTA	Yes				

Table 5. Cont.

Author/Year	Patient Age	Tooth Type	Injury	Preoperative Diagnosis	Intracanal Medicament	Coronal Barrier	Discoloration Yes/No/Color	Bleaching Material	Bleaching Method	Bleaching Effect Yes/No
D'Mello et al., 2017 [11]	7 y	11	Uncomp. fracture	NP, APP, FC	Odontopaste	Surgicel WMTA	Yes Grey discoloration	SP + SW	1 × 2 w Cervical sealing with GIC 3 mm of WMTA was left in canal	Yes The tooth achieved a natural tooth color similar to the adjacent tooth
De-Jesus-Soares et al., 2018 [28]	8 y	11 21	Compl. fracture Uncomp. fracture	NP NP	TAPM CH+2% chlorhexidine gel	MTA MTA	Yes Yes	SP + DW	2 × 1 w Cervical sealing with Coltosol. MTA was left in canal	Yes Yes Both teeth were similar to the color of the other teeth
Kahler et al., 2018 [29]	11 y	35	-	NP, CAA	TAPA	WMTA	Yes	35% HP	Internal bleaching	Yes
		45	-	NP, APP	TAPA	WMTA	Yes	35% HP	Internal bleaching	Yes Both teeth were successfully bleached
Parthiban et al., 2018 [30]	14 y	21	Crown fracture	NP, AAP	TAPM	PRF MTA	Yes Blue-greyish discoloration	SP + 30% HP	Cervical sealing with GIC CH was placed in the access cavity after bleaching	Yes Satisfactory results were achieved
Timmerman et al., 2018 [31]	12 y	45	IP	APP	-	Surgicel, WMTA	Yes greyish-blue discoloration	SP + DW	1 × 3 w Cervical sealing with Cavit W. WMTA was removed from canal	Yes Patient was satisfied with the tooth color after bleaching

Table 5. Cont.

Author/Year	Patient Age	Tooth Type	Injury	Preoperative Diagnosis	Intracanal Medicament	Coronal Barrier	Discoloration Yes/No/Color	Bleaching Material	Bleaching Method	Bleaching Effect Yes/No
Antov et al., 2019 [32]	15 y	11	Uncomp. fracture	NP, CAP	DAP	WMTA	Yes	10% CP	1 × 2 w (4 h per day) Internal/external bleaching Cervical sealing with GIC Part of WMTA was left in canal	Yes Tooth had lightened from C3 to B1 shade
	9 y	22	-	NP, CAP	DAP	PC	Yes	10% CP	2 × 2 w (4 h per day) Internal/external bleaching cervical sealing with GIC Part of PC was left in canal	Yes There was minimal improvement of the shade, patient was no longer concerned about the discoloration
	14 y	21	Uncomp. Fracture	NP, CAP	DAP	PC	Yes	10%CP	1 × 2 w (4 h per day) External bleaching	Yes Improvement of shade was noted, the patient was not fully satisfied with the shade

Abbreviations: AAA, acute alveolar abscess; AAP, asymptomatic apical periodontitis; AIP, asymptomatic irreversible pulpitis; APP, acute periapical periodontitis; CAA, chronic alveolar abscess; CAP, chronic apical periodontitis; CH, calcium hydroxide; Compl. Fracture, complicated crown fracture; CP, calcium perborate; DAP, double antibiotic paste; DW, distilled water; FC, facial cellulitis; GIC, glass ionomer cement; GMTA, grey MTA; h, hours; HP, hydrogen peroxide; IP, irreversible pulpitis; MTA, mineral trioxide aggregate; NP, necrotic pulp; PC, portland cement; PRF, platelet rich fibrin; S, saline; SAP, symptomatic apical periodontitis; SP, sodium perborate; SW, sterile water; TAPA, triple antibiotic paste with amoxicillin; TAPK, triple antibiotic paste with clindamycin; TAPM, triple antibiotic paste with minocycline; Uncomp. Fracture, uncomplicated crown fracture; w, week; WMTA, white MTA; y, year.

4. Discussion

This review investigated the efficiency of bleaching tooth discoloration after REPs. All qualified studies were divided into two groups, *in vitro* and *in vivo* studies, and were discussed separately.

4.1. Analysis of *In Vitro* Studies

Most of the analyzed studies evaluated the whitening effect of tooth discoloration caused by disinfectant pastes [16,22,24,26] because root canal disinfection is the most important and initial stage in the revascularization procedure in which discoloration could be observed. In the *in vitro* studies included in this analysis where TAPM was used, coronal discoloration was observed more often than when other disinfectant pastes were applied [16,25,26]. A tooth stained by TAPM whitened more compared to teeth discolored by TAPD, TAPA, TAPC, or DAP [26]. Yasa et al. [16] found that the whitening effect was greater when teeth were discolored by TAPM and TAPC compared to groups with TAPD and TAPA. However, the number of teeth in the groups was smaller ($n = 5$) than in the study by Fundaoğlu Küçükkekenci et al. [26] and there was no information on the concentration of TAPC used [16].

Effective bleaching was achieved using 35% hydrogen peroxide [16,26], sodium perborate [16,22,24], and 37% carbamide peroxide [25]. The whitening effect of 35% hydrogen peroxide was greater than that of sodium perborate [16]. The bleaching effect of 35% hydrogen peroxide exceeded the perceptibility threshold from the 4th day of the evaluation and increased over time [26]. The highest bleaching effect was noticed on the 12th day [26], but another study showed no statistically significant difference ($P = 0.175$) between the 8th and 12th day of measurements [16]. The number of teeth in the test groups differed between studies [16,26]. Nd-YAG laser irradiation on a 35% hydrogen peroxide increased the efficacy of internal bleaching, but there was no significant difference between the walking bleach technique and the thermo/photo bleaching technique ($P = 0.19$) [26]. Akbulut et al. [23] assessed the effectiveness of whitening teeth in which discoloration was induced respectively by TAPC, blood, and barrier materials, such as Biodentine, MM-MTA, or ProRoot MTA. In this study, 35% hydrogen peroxide was applied over the coronal barrier. The group with teeth discolored by Biodentine was bleached significantly more than with MM-MTA and ProRoot MTA, while no statistically significant difference was observed between specimens in groups treated with MM-MTA and ProRoot MTA [23]. The differences could be related to the composition of barrier materials such as calcium silicate cements. Biodentine contains zirconium oxide as a radiopacifying component, while ProRoot MTA and MM-MTA contained bismuth oxide, which is associated with tooth discoloration. Calcium silicate cements with zirconium oxide exhibited less discoloration [41]. This may be attributed to it being a finer sized particle [42] and, therefore, its effect on calcium silicate material diffusion into dentin tubules [43]. Moreover, Biodentine has also a highly specific surface area [42], which possibly increases the effectiveness of the bleaching agent [23]. However, overoxidation of bismuth oxide contained in ProRoot MTA and MM-MTA could result in discoloration [41] and thus, may lead to a reduction in whitening efficiency.

Sodium perborate is effective as a whitening agent and improves discoloration caused by TAPM [22,24]. Kirchhoff et al. [22] studied the ability of sodium perborate to bleach stained teeth with open and closed apices. The results indicated that the group with open apices bleach was similar to groups with closed apices, which is an interesting result, especially since younger teeth have potentially wider dentinal tubules [44]. Iriboz et al. [24] observed that there were no significant differences in bleaching on stained teeth with TAPM and minocycline paste when sodium perborate was used without or with activation by heat from a hand instrument, using an ultrasonic instrument for 30 s at a frequency at 29 kHz or 60 s at a frequency at 28 kHz. Increasing the temperature of bleaching agent with a heated hand instrument has been historically described [45], although excessive heating may damage the dental pulp in vital tooth bleaching [46] and increases the risk of external cervical resorption in non-vital tooth bleaching [47]. Currently in clinical procedures

bleaching agents' activation by heat from a hand instrument is not performed. Santos et al. [25] bleached specimens using 37% carbamide peroxide gel. Bleaching agent was placed two times with 1-week interval inside and outside the dental crown for 45 min. In the same group no difference was found between first and second bleaching. It may suggest that only one session of bleaching is effective to improve color shade.

4.2. Analysis of In Vivo Studies

Regenerative endodontic procedures involved all treated teeth, of which only one was completed in a single visit [31]. In analyzed studies, a change in color was noticed some time after the disinfectant paste was placed or post-treatment. In two of the included studies, grey and blue-greyish discoloration was observed six weeks after placing TAPM [9,27]. TAPM was most frequently used as an intracanal disinfectant [9,17,27,28,30]. However, other materials were also used (e.g., TAPK, Odontopaste, TAPA, DAP, CH, and 2% chlorhexidine gel). Parthiban et al. [30] noticed mild discoloration 28 days after TAPM placement and blue-greyish discoloration three months post-treatment. In other cases, post-treatment discoloration time occurrence varied between studies. It is worth mentioning that not all studies contained information about the color of the discoloration.

The research methodology differed between studies. Bleaching was performed after one week [9], 39 weeks [27], 3 months [30], 39 months [11], and 58 months [31]. Some authors [17,28,29] did not include information about the post-treatment time before starting whitening in their studies. Bleaching was carried out using different techniques: internal, external, or both of these techniques.

Internal bleaching in which the bleaching material was placed into the pulp chamber was similar to the walking bleach technique carried out for non-vital teeth. Although vital pulp-like tissue is formed in root canal following REPs, the coronal pulp space is empty. This allows using the non-vital teeth bleaching technique to treat discolored teeth after REPs because cervical sealing material protects the new vital pulp-like tissue from the bleaching agent [25].

Bleaching techniques were carried out in asymptomatic patients immediately after the regeneration procedure had been performed in the teeth in which the hard tissue bridge did not manage to form [9] or after some time from bleaching when continued lateral wall thickening [11], periapical healing and maturation of the root apex [31] was observed. Kim et al. [9] performed bleaching one week post-treatment. The barrier material (MTA) was left in canal and the bleaching agent was placed over the cervical sealant with glass ionomer cement (GI). Eight months after bleaching the radiograph showed evidence of continuation of apical closure. Despite the only barriers separating the newly formed pulp-like tissue were MTA and GI, respectively, revascularization procedures were successful, which was a very meaningful result, especially since bleaching materials may damage the pulp tissue and cause pulp inflammation [21]. However, it is worth noticing that Tsujimoto et al. [48] using a scanning electron microscope observed changes in surface structure of MTA after application of hydrogen peroxide as a bleaching agent. Discovered structural alterations described as e.g., globular structures, woodpecker holes and creases were dependent on hydrogen peroxide concentration and may predispose to microleakage occurrence. Although the findings suggest that MTA is an insufficient barrier against tooth bleaching, an in vitro study of 2-mm intra-orifice barriers of GMTA, WMTA and GI showed similar coronal leakage in all tested materials [49]. The studies with a fluid transport model [49] and protein leakage test [50] showed that cervical sealing material significantly reduces leakage even when bleaching agent is in use. Therefore, seeing the fact that sealing materials are highly required as they reduce the possibility of resorption further investigation is essential. The formation of the dentin bridge underneath the barrier material could act as an additional biological seal. The formation of the dentin bridge underneath the barrier material could act as an additional biological seal. Additionally, studies that analyzed the thickness of the dentin bridge formation after direct pulp capping showed that the mean thicknesses of the hard-tissue dentin bridge depended on the material used [51].

Unfortunately, there are risks associated with internal bleaching of non-vital teeth, such as weakening of the physical properties of dental hard tissues, penetration of the bleaching agent in the dentinal tubules, dental fracture during treatment, and the most serious, external cervical root resorption [52]. No information on the above-mentioned complications was included in the *in vivo* studies analyzed. To avoid cervical root resorption in the treatment of non-vital tooth discoloration, a cervical barrier should be placed to prevent diffusion of the bleaching agent throughout the dentinal tubules [53]. Similar to this technique, the authors in the analyzed studies also applied cervical sealing materials such as GI [9,11,30,32], Cawit W (3M, St Paul, MN, USA) [31], or Coltosol (Coltene Whaledent, Mahwah, NJ, USA) [28] which was placed in cases when barrier material (e.g., MTA, WMTA, PC) was removed [31] or left [9,11,28,32] in the canal. Some authors did not report on the cervical sealing material [17,27,29].

Among the widely used bleaching materials such as carbamide peroxide, hydrogen peroxide, and sodium perborate, the last one was mainly used. Sodium perborate has been classified as carcinogenic, mutagenic, or toxic to reproduction (CMR substances) and its use is prohibited in Europe (Cosmetics Regulation 1223/2009) [54]. In analyzed studies, sodium perborate was mixed with hydrogen peroxide [17,30], distilled water [9,28,31], sterile water [11], or saline [27] and was placed in the pulp chamber. McTigue et al. [17] also applied a cotton pellet saturated with Superoxol (Sultan Healthcare, Hackensack, NJ, USA) for 3 min. The duration of whitening time varied from one to three weeks. The bleaching agent was placed in the pulp chamber once [11,17,27,31], twice [28], and three times [9] depending on the study. Only in one study was calcium hydroxide placed in the access cavity after bleaching for one week [30] and in one study was the evaluation of color changes made using a digital spectrophotometer [28].

Antov et al. [32] showed three cases in which 10% carbamide peroxide was used in the bleaching procedure. In two cases, two weeks of internal/external bleaching was performed using vacuum formed bleaching trays with a reservoir over the labial surface of the bleached teeth. Before bleaching reduction of the barrier material and cervical sealing with GI were performed. Bleaching showed a satisfactory final result in the first case and minimal improvement of shade in the second case. In the third case, because of the lack of radiographic evidence of Portland cement and calcific barriers, and therefore, the risk of damage to revitalized tissue upon reduction of cement, two weeks of external bleaching was performed. Shade was improved but the patient was not fully satisfied with the result, which was why a direct composite veneer was provided.

From 26 treated teeth 17 teeth were bleached successfully [11,17,28,29,32]. In six cases, there was an improvement of the shade [9,27,30–32] of which, in one case presented by Antov et al. [32], the effect was minimal and, in a case presented by Kim et al. [9], the tooth did not return to its original shade. In three cases bleaching was not sufficient [17].

The clinicians who perform REPs should be aware of the high-risk of post-treatment discoloration [32] and all procedures ought to be performed with minimal risk of potential discoloration. If the discoloration appears, bleaching should be considered ultimately to improve shade or in the transitional period before more invasive procedures were planned such as porcelain veneers or crowns.

There are no exact guidelines for dental bleaching of discolored teeth after REPs. There are no randomized trials on this topic. However, based on analyzed studies a summary of the current bleaching procedure was presented below.

Three different bleaching techniques were used in the analyzed studies: internal, internal-external, and external bleaching technique, of which internal bleaching was the most frequently used method in an asymptomatic patient [9,11,27,30,31]. It is worth mentioning that internal bleaching technique is commonly used in non-vital teeth and analyzed studies provide insufficient information about follow-up and long-term observations after this method was applied in terms of its effect on the outcome of teeth regeneration procedure. The barrier material was usually left in the canal [9,11,28,32], which may affect the additional seal and minimize the risk of damage to dentin bridge or revitalized pulp.

Cervical sealing with GI cement was frequently applied to the barrier material [9,11,32]. The bleaching agent was placed inside the dental crown analogously to a non-vital tooth bleaching technique [9,11,17,27–31]. As a bleaching agent, three different substances were used: hydrogen peroxide, sodium perborate, and carbamide peroxide. It is impossible to conclude which bleaching agent should be recommended owing to high variability in the investigated studies—different bleaching agents, its concentration, time, and technique of application, but also inconsistent outcome evaluation. The problem with evaluation is especially seen in *in vivo* studies, where a quantitative method was used only once and qualitative methods were not standardized, because such a standardization does not exist. Difference in local legal permissibility is also a major issue in terms of guidelines preparation e.g., the use of sodium perborate is not legal in the Europe. Calcium hydroxide was placed in the pulp cavity after bleaching [30] only in one case. The access cavity was restored with composite [9,27,29,30].

Taking the above into consideration, a standardized protocol for the bleaching procedure and assessment should be introduced to obtain the most reliable results.

5. Conclusions

This systematic review indicated that whitening of discolored teeth after REPs is achievable. The internal method was the dominant one, but due to alternative method usage shortfall, it is hard to make a comprehensive comparison. Similar to difference in bleaching agent usage observed in analyzed studies, there is a wide difference in bleaching duration. Therefore, it is not possible to make a suitable conclusion. For the creation of precise guidelines that would define the appropriate bleaching technique, material, and duration in discolored teeth after REPs, further studies are required.

Author Contributions: Conceptualization, I.F. and A.N.; methodology, I.F. and T.F. and J.M. and M.G.; validation, I.F., formal analysis, I.F. and A.N. and M.L.; investigation, I.F. and T.F. and M.G.; data curation, I.F. and J.M.; writing—original draft preparation, I.F. and T.F.; writing—review and editing, I.F. and A.N.; visualization, I.F.; supervision, A.N. and M.L.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. 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] [PubMed]
2. Iwaya, S.-I.; Ikawa, M.; Kubota, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent. Traumatol.* **2001**, *17*, 185–187. [CrossRef] [PubMed]
3. Petrino, J.A.; Boda, K.K.; Shambarger, S.; Bowles, W.R.; McClanahan, S.B. Challenges in Regenerative Endodontics: A Case Series. *J. Endod.* **2010**, *36*, 536–541. [CrossRef] [PubMed]
4. Kahler, B.; Rossi-Fedeles, G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *J. Endod.* **2016**, *42*, 563–569. [CrossRef] [PubMed]
5. Žižka, R.; Šedý, J.; Gregor, L.; Voborná, I. Discoloration after Regenerative Endodontic Procedures: A Critical Review. *Iran. Endod. J.* **2018**, *13*, 278–284.
6. Fagogeni, I.; Metlerska, J.; Lipski, M.; Falgowski, T.; Maciej, G.; Nowicka, A. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. *J. Oral Sci.* **2019**, *61*, 379–385. [CrossRef]
7. Viegas, C.M.; Paiva, S.M.; Carvalho, A.C.; Scarpelli, A.C.; Ferreira, F.M.; Pordeus, I.A. Influence of traumatic dental injury on quality of life of Brazilian preschool children and their families. *Dent. Traumatol.* **2014**, *30*, 338–347. [CrossRef]
8. American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Available online: https://f3f142zs0k2w1kg84k5p9i1o-wpengine.netdna-ssl.com/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf (accessed on 26 February 2020).
9. Kim, J.-H.; Kim, Y.; Shin, S.-J.; Park, J.-W.; Jung, I.-Y. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. *J. Endod.* **2010**, *36*, 1086–1091. [CrossRef]
10. Shokouhinejad, N.; Khoshkhounejad, M.; Alikhasi, M.; Bagheri, P.; Camilleri, J. Prevention of coronal discoloration induced by regenerative endodontic treatment in an *ex vivo* model. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *22*, 1725–1731. [CrossRef]

11. D'Mello, G.; Moloney, L. Management of coronal discoloration following a regenerative endodontic procedure in a maxillary incisor. *Aust. Dent. J.* **2017**, *62*, 111–116. [CrossRef]
12. The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations 2012. Available online: <http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2012/2263/made> (accessed on 26 February 2020).
13. Greenwall-Cohen, J.; Greenwall, L.; Haywood, V.; Harley, K. Tooth whitening for the under-18-year-old patient. *Br. Dent. J.* **2018**, *225*, 19–26. [CrossRef] [PubMed]
14. General Dental Council, Position Statement on Tooth Whitening. 2016. Available online: <https://www.gdc-uk.org/docs/default-source/what-is-the-legal-position/tooth-whitening-position-statement.pdf?sfvrsn=16f71e9> (accessed on 26 February 2020).
15. Plotino, G.; Buono, L.; Grande, N.M.; Pameijer, C.H.; Somma, F. Nonvital Tooth Bleaching: A Review of the Literature and Clinical Procedures. *J. Endod.* **2008**, *34*, 394–407. [CrossRef] [PubMed]
16. Yasa, B.; Arslan, H.; Akcay, M.; Kavrik, F.; Hatirli, H.; Özkan, B. Comparison of bleaching efficacy of two bleaching agents on teeth discoloured by different antibiotic combinations used in revascularization. *Clin. Oral Investig.* **2014**, *19*, 1437–1442. [CrossRef]
17. McTigue, D.J.; Subramanian, K.; Kumar, A. Case series: Management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: A case series. *Pediatr. Dent.* **2013**, *35*, 55–60. [PubMed]
18. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *J. Clin. Epidemiol.* **2009**, *62*, 1006–1012. [CrossRef]
19. Slim, K.; Nini, E.; Forestier, D.; Kwiatkowski, F.; Panis, Y.; Chipponi, J. Methodological index for non-randomized studies (MINORS): Development and validation of a new instrument. *ANZ J. Surg.* **2003**, *73*, 712–716. [CrossRef]
20. Elkhadem, A.; Mickan, S.; Richards, D. Adverse events of surgical extrusion in treatment for crown-root and cervical root fractures: A systematic review of case series/reports. *Dent. Traumatol.* **2013**, *30*, 1–14. [CrossRef]
21. Benetti, F.; Lemos, C.A.A.; Gallinari, M.D.O.; Terayama, A.M.; Briso, A.L.F.; Jacinto, R.D.C.; Araújo, L.C.A.; Cintra, L.T.A. Influence of different types of light on the response of the pulp tissue in dental bleaching: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1825–1837. [CrossRef]
22. Kirchoff, A.L.; Raldi, D.P.; Salles, A.C.; Cunha, R.S.; Mello, I. Tooth discoloration and internal bleaching after the use of triple antibiotic paste. *Int. Endod. J.* **2015**, *48*, 1181–1187. [CrossRef]
23. Akbulut, M.B.; Terlemeç, A.; Akman, M.; Buyukerkmen, B.; Gunese, M.B.; Eldeniz, A.U. Tooth discoloration effects of calcium silicate based barrier materials used in revascularization and treatment with internal bleaching. *J. Dent. Sci.* **2017**, *12*, 347–353. [CrossRef]
24. Iriboz, E.; Öztürk, B.A.; Körklü, S.; Tarcin, B.; Berker, Y.G.; Öveçoğlu, H.S. Comparison of intracoronal bleaching methods on teeth discolored by different antibiotic pastes. *Niger. J. Clin. Pract.* **2017**, *20*, 700–706. [CrossRef] [PubMed]
25. Dos Santos, L.G.P.; Felipe, W.T.; De Souza, B.D.M.; Konrath, A.C.; Cordeiro, M.M.R.; Felipe, M.C.S. Crown discoloration promoted by materials used in regenerative endodontic procedures and effect of dental bleaching: Spectrophotometric analysis. *J. Appl. Oral Sci.* **2017**, *25*, 234–242. [CrossRef] [PubMed]
26. Küçükkekenci, F.F.; Çakici, F.; Kucukekenci, A.S. Spectrophotometric analysis of discoloration and internal bleaching after use of different antibiotic pastes. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *23*, 161–167. [CrossRef] [PubMed]
27. Miller, E.K.; Lee, J.; Tawil, P.Z.; Teixeira, F.B.; Vann, W.F. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr. Dent.* **2012**, *34*, 66–69.
28. De-Jesus-Soares, A.; Prado, M.; Nagata, J.Y.; Pini, N.I.P.; Cardoso, R.A.; Vargas-Neto, J.; Figueiredo de Almeida Gomes, B.P.; Lima, D.A.N. Internal bleaching after pulp revascularization using two intracanal medicaments: A case report. *Int. J. Clin. Dent.* **2018**, *11*, 127–135.
29. Kahler, B.; Kahler, S.L.; Lin, L.M. Revascularization-associated intracanal calcification: A case report with an 8-year re-view. *J. Endod.* **2018**, *44*, 1792–1795. [CrossRef]
30. Parthiban, G.; Karale, R.; Kumar, V.; Br, P. Tooth Discoloration and Internal Bleaching after the use of Triple Antibiotic Paste for Regenerative Endodontic Treatment of an Immature Necrotic Permanent Tooth: A Case Report. *Dentistry* **2018**, *8*, 1–4. [CrossRef]
31. Timmerman, A.; Parashos, P. Bleaching of a Discolored Tooth with Retrieval of Remnants after Successful Regenerative Endodontics. *J. Endod.* **2018**, *44*, 93–97. [CrossRef]
32. Antov, H.; Duggal, M.S.; Nazzal, H. Management of discoloration following revitalization endodontic procedures: A case series. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1660–1670. [CrossRef]
33. Ari, H.; Ungör, M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronal bleaching of discoloured teeth. *Int. Endod. J.* **2002**, *35*, 433–436. [CrossRef]
34. Ji-Hyun, J.; Minji, K.; Soyeon, A.; Soyeon, K.; Wooksung, K.; Yaelim, K.; Euseong, K. Tooth discoloration after the use of new pozzolan cement (Endocem) and mineral trioxide aggregate and the effects of internal bleaching. *J. Endod.* **2013**, *39*, 1598–1602.
35. Oliveira, L.S.J.; Silva, P.F.D.; Figueiredo, F.E.D.; Brito-Junior, M.; Sousa-Neto, M.D.; Faria-E-Silva, A.L. In vitro evaluation of tooth discoloration induced by regenerative endodontic therapy and the effectiveness of the walking bleach technique. *Int. J. Esthet. Dent.* **2019**, *14*, 300–309. [PubMed]
36. Srinivasan, R.; Bandyopadhyay, T.K.; Bhagabatiet, N.; Jayad, R. Aesthetic management of a discoloured non-vital immature maxillary central incisor. *Med. J. Armed. Forces India* **2015**, *7*, 462–465. [CrossRef] [PubMed]
37. Belobrov, I.; Parashos, P. Treatment of Tooth Discoloration after the Use of White Mineral Trioxide Aggregate. *J. Endod.* **2011**, *37*, 1017–1020. [CrossRef]

38. Alobaid, A.S.; Cortes, L.M.; Lo, J.; Nguyen, T.T.; Albert, J.; Abu-Melha, A.S.; Lin, L.M.; Gibbs, J.L. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: A pilot retrospective cohort study. *J. Endod.* **2014**, *40*, 1063–1070. [[CrossRef](#)]
39. Orduña, J.F.G.; Caviedes-Bucheli, J.; Manzanares, M.-C.; Jimeno, E.B.; Biedma, B.M.; Segura-Egea, J.J.; López-López, J. Use of Platelet-rich Plasma in Endodontic Procedures in Adults: Regeneration or Repair? A Report of 3 Cases with 5 Years of Follow-up. *J. Endod.* **2017**, *43*, 1294–1301. [[CrossRef](#)]
40. Pena Dos Santos, L.G.; Chisini, L.A.; Springmann, C.G.; de Souza, B.D.M.; Pappen, F.G.; Demarco, F.F.; Santos Felipe, M.C.; Felipe, W.T. Alternative to avoid tooth discoloration after regenerative endodontic procedure: A systematic re-view. *Braz. Dent. J.* **2018**, *29*, 409–418. [[CrossRef](#)]
41. Kang, S.-H.; Shin, Y.-S.; Lee, H.-S.; Kim, S.-O.; Shin, Y.; Jung, I.-Y.; Song, J.S. Color Changes of Teeth after Treatment with Various Mineral Trioxide Aggregate-based Materials: An Ex Vivo Study. *J. Endod.* **2015**, *41*, 737–741. [[CrossRef](#)]
42. Camilleri, J.; Sorrentino, F.; Damidot, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, biodentine and mta angelus. *Dent. Mater.* **2013**, *29*, 580–593. [[CrossRef](#)]
43. Han, L.; Okiji, T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int. Endod. J.* **2011**, *44*, 1081–1087. [[CrossRef](#)]
44. Fagrell, T.G.; Lingström, P.; Olsson, S.; Steiniger, F.; Norén, J.G. Bacterial invasion of dentinal tubules beneath apparently intact but hypomineralized enamel in molar teeth with molar incisor hypomineralization. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2008**, *18*, 333–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Greenwall, L. (Ed.) *Bleaching Techniques in Restorative Dentistry*; Informa UK Limited: London, UK, 1988; p. 25.
46. Joiner, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J. Dent.* **2006**, *34*, 412–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Attin, T.; Paqué, F.; Ajam, F.; Lennon, Á.M. Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. *Int. Endod. J.* **2003**, *36*, 313–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tsujimoto, M.; Ookubo, A.; Wada, Y.; Matsunaga, T.; Tsujimoto, Y.; Hayashi, Y. Surface changes of mineral trioxide aggregate after the application of bleaching agents: Electron microscopy and an energy-dispersive X-ray microanalysis. *J. Endod.* **2011**, *37*, 231–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. John, A.D.; Webb, T.D.; Imamura, G.; Goodell, G.G. Fluid Flow Evaluation of Fuji Triage and Gray and White ProRoot Mineral Trioxide Aggregate Intraorifice Barriers. *J. Endod.* **2008**, *34*, 830–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Vosoughhosseini, S.; Lotfi, M.; Shahmoradi, K.; Saghiri, M.-A.; Zand, V.; Mehdipor, M.; Ranjesh, B.; Mokhtari, H.; Salemmilani, D.A.S. Microleakage comparison of glass-ionomer and white mineral trioxide aggregate used as a coronal barrier in nonvital bleaching. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* **2011**, *16*, e1017–e1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nowicka, A.; Wilk, G.; Lipski, M.; Kolečki, J.; Buczkowska-Radlińska, J. Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1234–1240. [[CrossRef](#)]
52. Coelho, A.; Garrido, L.; Mota, M.; Marto, C.M.; Amaro, I.; Carrilho, E.; Paula, A. Non-Vital Tooth Bleaching Techniques: A Systematic Review. *Coatings* **2020**, *10*, 61. [[CrossRef](#)]
53. Bahuguna, N. Cervical root resorption and non vital bleaching. *Endodontology* **2013**, *25*, 106–111.
54. European Commission Website. Available online: <https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/cmr-substances/> (accessed on 9 December 2020).

6.3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an *in vitro* study

Article

Effectiveness of Teeth Whitening after Regenerative Endodontics Procedures: An In Vitro Study

Irini Fagogeni ^{1,*}, Joanna Metlerska ², Tomasz Falgowski ³, Maciej Górski ⁴, Mariusz Lipski ⁵ and Alicja Nowicka ²

¹ Doctoral Studies of the Faculty of Dentistry, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland

² Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland

³ General, Minimally Invasive and Gastrointestinal Surgery Department, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland

⁴ University Dental Clinic, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland

⁵ Department of Preclinical Conservative Dentistry and Preclinical Endodontics, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland

* Correspondence: irini.fagogeni@gmail.com; Tel.: +48-91-466-16-48



Citation: Fagogeni, I.; Metlerska, J.; Falgowski, T.; Górski, M.; Lipski, M.; Nowicka, A. Effectiveness of Teeth Whitening after Regenerative Endodontics Procedures: An In Vitro Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 7016. <https://doi.org/10.3390/jcm11237016>

Academic Editor: Peter Bottenberg

Received: 23 October 2022

Accepted: 24 November 2022

Published: 28 November 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: Discolouration resulting from regenerative endodontic procedures may have a negative impact on the quality of life of treated patients; therefore, it is recommended to minimize this risk by selecting appropriate scaffolds and barrier materials, and if discolouration occurs, the use of a simple, cost-effective and minimally invasive technique, such as whitening, should be considered. This *in vitro* study aimed to evaluate tooth discolouration after two- and single-visit regenerative endodontic procedures and the effectiveness of subsequent whitening procedures with carbamide peroxide. Two hundred bovine incisors were included in this study and divided into twenty groups based on the tested material combinations. Two groups were control groups, one with saline and the other group with blood. In the 12 groups, the experiment was designed to be consistent with the two-visit regenerative endodontic procedures. Triple antibiotic paste or calcium hydroxide were placed in the root canal, and then scaffolds (e.g., blood or platelet-rich fibrin) and barrier materials (Biodentine, OrthoMTA or MTA Repair HP) were applied after rinsing the disinfectant pastes. In the six groups that corresponded to the single-visit regenerative endodontic procedure, the use of a disinfectant paste was omitted. Subsequently, the specimens were bleached twice with carbamide peroxide at a 7-day interval. Colour change measurements were performed using a spectrophotometer (VITA Easyshade Compact 5.0, VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Statistical analysis was performed with the Kruskal–Wallis H test, the independent *t*-test and *t*-test for related samples. Tooth discolouration was noticed after two- and single-visit regenerative endodontic procedures, except for the platelet-rich fibrin+MTA Repair HP group. After the first and second whitening procedures, all of the tested two- and single-visit regenerative endodontic procedures groups showed a change in the colour of the crown, which was noticeable to the naked eye ($\Delta E > 3.3$). When analysing the ΔE value between the first and second bleaching procedures, no changes in the colour of teeth were visually noticed in the calcium hydroxide and platelet-rich fibrin +MTA Repair HP groups ($\Delta E < 3.3$). Single-visit regenerative endodontic procedures are suggested if possible; however, if two-visit regenerative endodontic procedures are performed, it is recommended to use calcium hydroxide as the disinfectant paste because of the lower staining potential. In the context of discolouration, platelet-rich fibrin is advisable for use as a scaffold. The whitening procedure is worth considering, but does not guarantee a return to the original tooth colour, especially when triple antibiotic paste is used.

Keywords: regenerative endodontic treatment; bleaching; discolouration; whitening; carbamide peroxide; platelet-rich fibrin

1. Introduction

Regenerative endodontic treatment is a dynamically developing field in endodontics that allows regeneration of damaged dentin and root structures, as well as the pulp–dentin complex [1] in immature permanent teeth with pulpal necrosis (with or without apical periodontitis) [2]. Continued root development and maturation are important advantages of regenerative endodontic procedures [3]; however, tooth discolouration is an unfavourable outcome of these procedures [4–6]. According to the American Association of Endodontists, regenerative endodontic procedures involve the removal of the infected pulp, disinfection of the root canal with disinfectant pastes, promotion of bleeding into the canal system by over-instrumenting, and placement of the barrier material over a blood clot [7]. If intracanal bleeding is not attainable, platelet-rich fibrin can be used as a scaffold [8,9].

Many authors have noticed crown discolouration after regenerative endodontic procedures, which may negatively affect the quality of life of treated patients [10]; therefore, it is recommended to reduce this risk as much as possible. To minimise the risk of discolouration, the American Association of Endodontists suggests sealing the pulp chamber with a dentin bonding agent prior to the application of the disinfectant pastes, although some authors have shown that this technique counteracts, but does not eliminate, the problem [11,12].

The American Association of Endodontists recommends the use of calcium hydroxide as a disinfectant paste. Calcium hydroxide may limit discolouration after regenerative endodontic procedures [4]; however, Chen et al. [13] reported that it is not indifferent for tooth colour. Triple antibiotic paste should be placed below the cemento-enamel junction [7]. The concentration of triple antibiotic paste should be reduced, or minocycline, which has the greatest staining potential, should be replaced with another antibiotic (e.g., clindamycin, amoxicillin and cefaclor) or omitted [7]; nevertheless, *in vitro* [14–16] and *in vivo* [11] studies have shown that despite following the American Association of Endodontists recommendations, discolouration could not always be avoided.

It has been noted that white ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA) has a strong staining potential [17], and it is recommended to use Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France) or EndoSequence BC RRM-Fast Set Putty (Brasseler, Savannah, GA, USA) as barrier materials, especially if regenerative endodontic procedures are performed in the anterior teeth [7]. If tooth discolouration occurs despite the use of the aforementioned techniques, the use of a simple, cost-effective, minimally invasive technique, such as whitening, should be considered. Teeth whitening is a process that lightens the colour of the tooth [18]. Materials that affect the colour of the tooth are most often organic compounds with conjugated chains of alternating single or double bonds, often containing heteroatoms and phenyl and carbonyl rings, and are referred to as chromophores [19,20]. In the context of chemical processes, bleaching occurs due to the breakdown of double bonds, cleavage of conjugated chains or oxidation of other chemical molecules in the conjugated chain [19]. This is due to the action of hydrogen peroxide, which can be used directly as a bleaching agent or can be released from sodium perborate or carbamide peroxide [21]. Hydrogen peroxide diffuses into the tooth structure, dissociates and generates oxygen free radicals [20]. As a result of the reaction of highly reactive oxygen radicals with chromophores, products are formed that are polar and have a lower molecular weight and are easily removed from the tooth in an aqueous environment [22]. Additionally, *de novo* products are brighter [20].

Teeth whitening after regenerative endodontic procedures can be a challenge for clinicians, especially with regard to the selection of the material used and its concentration, as well as the method of performing the procedure. In a group of patients younger than 18 years of age, the 2012 Cosmetic Products Safety Amendment Regulations allowed the use of <0.1% hydrogen peroxide and other compounds or mixtures that release hydrogen peroxide [23,24]. Yet, a new regulation in the General Dental Council's Position Statement on Tooth Whitening asserts that products that contain or release between 0.1% and 6% hydrogen peroxide cannot be used in patients younger than 18 years of age, unless the purpose of bleaching is to treat or prevent disease [25]. There are no designated guide-

lines on how bleaching procedures should be performed [26]. Researchers have bleached discoloured teeth using different techniques, including internal [27–29] and external [30] techniques, or both [30]. The internal bleaching technique is similar to the walking bleach technique, which is used to bleach non-vital teeth. The bleaching material is placed in the pulp chamber, and the newly created pulp-like tissue in the root canal is protected by a barrier material [16]. Different types of bleaching agents have been used in previous studies, including hydrogen peroxide [31], carbamide peroxide [30,32] and sodium perborate [11,27,28], or a mixture of these materials [33,34]. Sodium perborate is prohibited in Europe [35] and is classified as toxic to reproduction, carcinogenic, or mutagenic.

Several case reports have shown that whitening of discoloured teeth after regenerative endodontic procedures is achievable and satisfactory for the patient [36,37], and even the colour of adjacent or other teeth can be achieved [27], although this is not a fully predictable procedure. There is a lack of extensive *in vitro* studies on large research materials that analyse the whitening of discoloured teeth after single- and two-visit regenerative endodontic procedures in the context of different disinfectant pastes, scaffolds, and barrier materials. Several authors have analysed bleached teeth after single- or two-visit regenerative endodontic procedures in which blood and a selected barrier material are placed into the root canal [31,32,34], but no studies have evaluated bleaching after regenerative endodontic procedures during which platelet-rich fibrin is used. Additionally, most of the authors used a high concentration of whitening agents that did not meet the requirements for dental treatment in patients younger than 18 years of age. All these factors were considered in the present study, which was performed using extensive researched materials and was designed to evaluate bleaching after the use of various disinfectant pastes and subsequent scaffolds (blood and platelet-rich fibrin) and barrier materials, including the latest calcium silicate-based cements, e.g., MTA Repair HP. This study aimed to examine tooth crown discoloration after two- and single-visit regenerative endodontic procedures and the effectiveness of the whitening procedure. The null hypotheses assume that, first, tooth tissue discoloration occurs after regenerative endodontic procedures, and second, whitening would be achievable.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statements

The manuscript of this laboratory study has been written according to the Preferred Reporting Items for Laboratory Studies in Endodontology (PRILE) 2021 guidelines [38]. The PRILE 2021 flowchart is presented in Figure 1. The use of single-rooted mandibular bovine incisors in this study was approved by the local ethics committee (no. KB-0012/53/01/18). The teeth were collected from bovine heads from a local meat processing plant that were to be disposed of. The procedure was approved by the local Sanitary and Epidemiological Station (No. PIW.HP.9260/Uppz/Bad./2/2017).

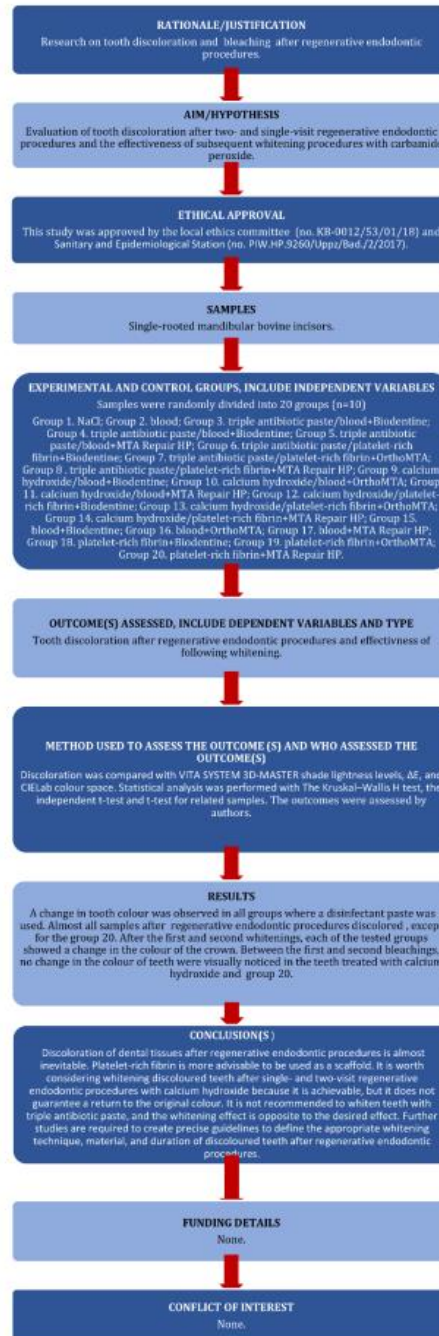
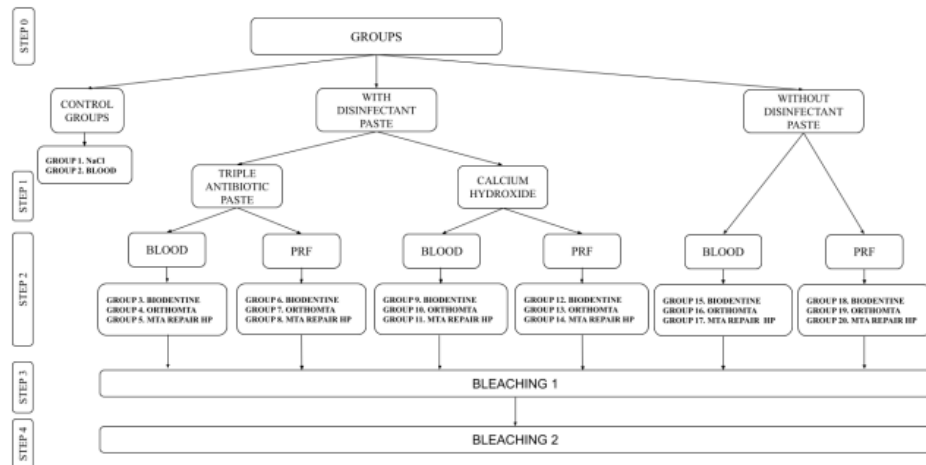


Figure 1. The PRILE 2021 flowchart.

2.2. Sample Preparation

After the extraction of 230 teeth, the specimens were stored in 1% chloramine solution for 24 h at 22 °C. All teeth were cleaned of plaque, sediment and stains using an ultrasonic scaler, and polished with water and pumice paste. Thirty teeth were excluded because of dental abnormalities or caries. Two-hundred teeth were included in the study and prepared for further research, similar to Shokouhinejad et al.’s study [39]. Endodontic access was prepared, and the pulp was removed from the pulp chambers and root canals using a barbed broach. To simulate immature teeth and standardise the length of the roots, the apical part of the root was removed 15 mm from the cementoenamel junction with a diamond bur in a high-speed hand piece under water cooling, and 4 mm of the apical part was sealed with glass ionomer cement (Kromoglass 2, LASCOD, Sesto Fiorentino, Italy). The root canals were shaped using 1#–6# Gates Glidden drills. The canals were irrigated with 1.5% NaOCl (20 mL/5 min), followed by 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (20 mL/5 min) and dried with absorbent paper points. The teeth were randomly divided into 20 groups ($n = 10$) (Figure 2). Two of the groups were control groups in which the root canals were filled with 0.9% NaCl (group 1) or blood (group 2). The internal walls of the pulp chambers of the remaining specimens were sealed with a dentin bonding agent (Tokuyama Universal Bond, Tokuyama Dental, Tokyo, Japan), according to the manufacturer’s instructions.



Biodentine (group 3), OrthoMTA (group 4), or MTA Repair HP (group 5), and the next three groups were treated with platelet-rich fibrin and the following barrier material: Biodentine (group 6), OrthoMTA (group 7), or MTA Repair HP (group 8). The same procedure was performed for the samples with calcium hydroxide. After disinfection, calcium hydroxide was replaced with blood and the following barrier material: Biodentine (group 9), OrthoMTA (group 10), or MTA Repair HP (group 11) in the three groups, and in the next three groups, teeth were treated with platelet-rich fibrin and the following barrier material: Biodentine (group 12), OrthoMTA (group 13), or MTA Repair HP (group 14).

Table 1. Compositions of barrier materials.

Material	Manufacturer	Compounds	Radiopacifier	Mixing
Biodentine	Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, calcium carbonate and oxide filler, iron oxide shade, and zirconium oxide Liquid: calcium chloride as accelerator, hydrosoluble polymer water-reducing agent, and water	Zirconium oxide	0.7 g capsule of powder + 5 drops of liquid (triturator): 4000–4200 rpm; 30 s
OrthoMTA	BioMTA, Seoul, Korea	Powder: calcium carbonate, silicon dioxide, aluminium oxide, and dibismuth trioxide	Dibismuth trioxide	0.2 g pouches of powder + 2 drops of water mixed manually
MTA Repair HP	Angelus, Londrina, PR, Brazil	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, calcium oxide, and calcium tungstate Liquid: water and plasticizer	Calcium tungstate	0.085 g capsules of powder + 2 drops of liquid mixed manually

In six groups, disinfectant pastes were not used, which is consistent with the single-visit regenerative endodontic procedures. Scaffold and intracanal barrier materials were applied to the root canal, in a similar way to the following previous groups: blood + Biodentine (group 15), blood + OrthoMTA (group 16), blood + MTA Repair HP (group 17), platelet-rich fibrin + Biodentine (group 18), platelet-rich fibrin + OrthoMTA (group 19), and platelet-rich fibrin + MTA Repair HP (group 20). Blood was collected from a healthy author. Cement was placed on the scaffold 15 min after the blood clot had formed. For platelet-rich fibrin preparation, human blood was collected from the cephalic vein in sterile tubes and centrifuged for 14 min at 1500 rpm using a Dr. Choukroun DUO Quattro PRF centrifuge (Mount Pleasant, SC, USA). After centrifugation, three layers formed inside the tube, including platelet-poor plasma, platelet-rich fibrin, and erythrocytes from which the platelet-rich fibrin layer was selected. After application of the scaffolds and barrier materials, the cavity was sealed with glass ionomer cement. After the setting of the cement was confirmed, the access cavity was filled with glass ionomer cement for 4 weeks. After 4 weeks, glass ionomer cement and 2 mm of the barrier material were removed, and cervical sealing with glass ionomer cement was performed. Then, carbamide peroxide (Peroxidon, Chema—Elektromet, Rzeszów, Poland) was placed into the pulp chamber and covered with a small cotton pellet, and the access cavity was closed with glass ionomer cement. The bleaching agent was applied for 1 week. The whitening procedure was performed twice at a 7-day interval. During the study, the samples were stored in an incubator (220 V, 50 Hz; Carbolab Electronic, Warsaw, Poland) at 100% humidity and 37 °C.

2.3. Colour Assessment

To measure the colour of the specimens, two blinded operators used a spectrophotometer (VITA Easyshade Compact 5.0, VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). The specimens were placed at the level of the measuring tip of the device. Then, impression

materials molds were made (Aquasil Soft Putty, Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) on the labial surface of the teeth, with an oval hole cut-out in the area of the cervical third of each tooth with a diameter of 6 mm, corresponding to the diameter of the spectrophotometer’s measuring probe tip. Before the measurement, the specimens were dried for 3 s with a blower. Each measurement was repeated thrice, and the spectrophotometer was calibrated before each measurement. The measurement time points for each step are listed in Table 2.

Table 2. Measurement time points for a specific step.

Step	Measurement Time Points
0	Before treatment
1	3 weeks after placement of disinfectant pastes
2	4 weeks after application of scaffold and coronal barrier
3	1 week after first bleaching procedure
4	1 week after second bleaching procedure

The use of a spectrophotometer allowed the measurement of the values of L, a and b and evaluation of the shade of the tooth in accordance with the international VITA SYSTEM 3D-MASTER shade systems. As suggested by the manufacturer (Vita-Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), the 26 shades of the Toothguide 3D Master were grouped into 5 groups of lightness levels [40] and are presented in Table 3. The authors performed qualitative measurements and assigned them to the appropriate lightness levels.

Table 3. Shades of the Toothguide 3D Master grouped into five groups of lightness levels.

Lightness Level	Shade
0	0M1, 0M2, and 0M3
1	1M1 and 1M2
2	2M1, 2L1.5, 2R1.5, 2M2, 2L2.5, 2R2.5, and 2M3
3	3M1, 3L1.5, 3R1.5, 3M2, 3L2.5, 3R2.5, and 3M3
4	4M1, 4L1.5, 4R1.5, 4M2, 4L2.5, 4R2.5, and 4M3
5	5M1, 5M2, and 5M3

To evaluate the exact colour changes, the authors carried out quantitative measurements of L, a, and b and used the ΔE values in the CIELab colour space. ΔE is the difference between the following and initial values, and was calculated according to the formula

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

L is the lightness, which ranges from 0 (black) to 100 (white), a represents red (+) to green (−), and b represents yellow (+) to blue (−).

A calculated ΔE value of ≥3.3 is considered as clinically perceptible [41]. Photographs of samples were taken at each stage of the study with a specially designed EyeSpecial C-II device (Shofu, Inc., Kyoto, Japan), which is a professional camera created for dental practice with autoflash adjustment to reflect true colour. Photographs were taken in a specially designed form that allows the same distance between the camera and the sample to be obtained. Photos were taken in the automatic mode provided by the manufacturer. No further modifications or enhancements were applied to the images.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using NumPy [42], SciPy [43], Pandas [44], and Scikit-learn [45] libraries for the Python programming language. Graphs were generated using the Matplotlib [46] and Seaborn [47] Python libraries. Basic statistical descriptive tests were performed, and data are presented as the mean and standard deviation. The Kruskal–Wallis H test was used to evaluate the qualitative results from the VITA SYSTEM 3D-MASTER shade lightness levels. The independent *t*-test and *t*-test for related samples

were used to compare the numerical values between the groups and steps in the quantitative analysis. Hierarchical clustering was performed using the Ward method with Euclidean affinity. A statistically significant test result threshold was set at $p < 0.005$ [48].

3. Results

Before the intervention, one tooth from each of the following groups was rejected: groups 4, 13 and 20, due to a significant deviation from the initial colour. The lightness level distribution of the VITA SYSTEM 3D-MASTER across the steps is presented in Figure 3. In the qualitative analysis of group 1, no significant differences were observed between the steps ($p = 1$). The level of lightness in group 2 significantly differed between the initial and subsequent test steps. Means and standard deviations of the L, a, and b parameters for all groups for each step are presented in Table 4. The ΔE , ΔL , L, a, and b values for all groups and steps are shown in Figures 4–8, respectively. Group 1 with NaCl did not present clinically perceptible discolouration at any stage of the study ($\Delta E < 3.3$), unlike group 2 with blood ($\Delta E > 3.3$). Photographs of all samples taken with the EyeSpecial C-II camera are shown in Figure 9.

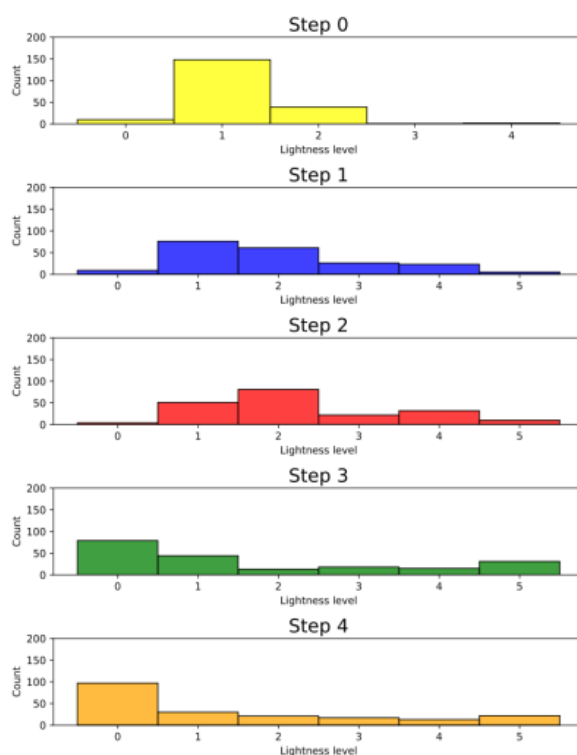


Figure 3. Lightness level distribution of the VITA SYSTEM 3D-MASTER for each step.

Table 4. Means and standard deviations of L, a, and b values for all groups for each specified step.

	Step 0	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
L (mean ± SD)	92.617 ± 3.220	88.211 ± 7.083	81.544 ± 9.870	85.480 ± 15.439	87.598 ± 14.999
a (mean ± SD)	−0.879 ± 1.170	−1.632 ± 1.499	0.022 ± 2.585	−1.755 ± 2.361	−1.724 ± 2.866
b (mean ± SD)	23.484 ± 3.640	28.252 ± 10.248	25.143 ± 5.499	20.856 ± 4.775	18.452 ± 4.937

SD, standard deviation.

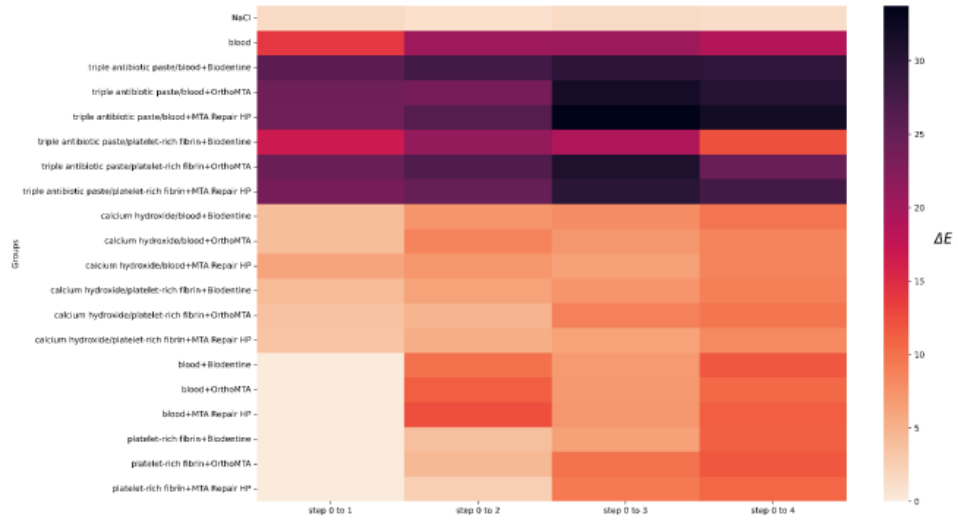


Figure 4. Values of ΔE for all groups and steps.

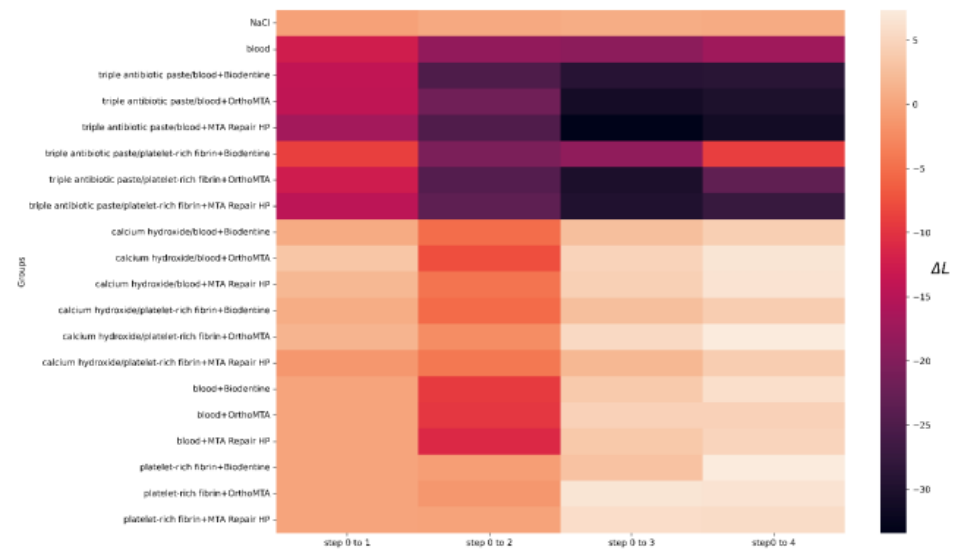


Figure 5. Values of ΔL for all groups and steps.

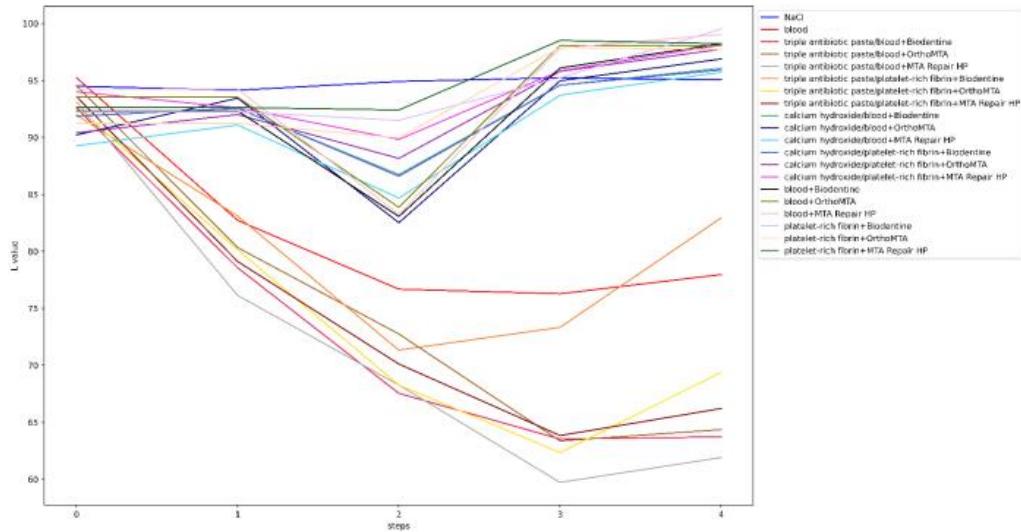


Figure 6. Values of L for all groups and steps.

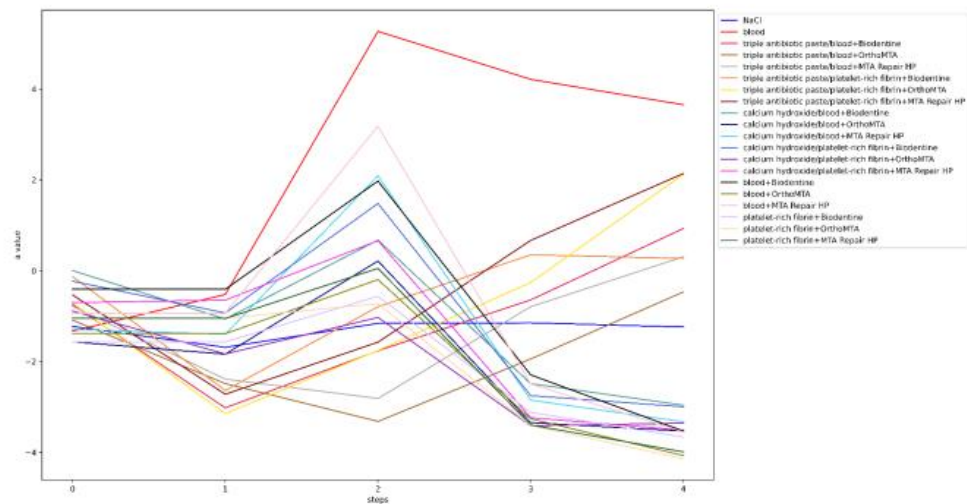


Figure 7. Values of a for all groups and steps.

Step 0 corresponds to the samples without any interference. In the qualitative analysis, most teeth were defined as lightness level 1 (Figure 3). The means and standard deviations for the values of L, a, and b are presented in Table 4.

In step 1, visible tooth discoloration was observed in all groups in which the disinfectant pastes were applied. The mean value of ΔE for the groups with calcium hydroxide was 4.27, and for the groups with triple antibiotic paste, $\Delta E = 23.13$. Significant differences in ΔE were found between the calcium hydroxide groups, triple antibiotic paste groups, and groups where the disinfectant pastes were omitted, but not within the groups themselves.

Figure 10 shows the samples arranged in the first step in the three-dimensional CIELab colour space.

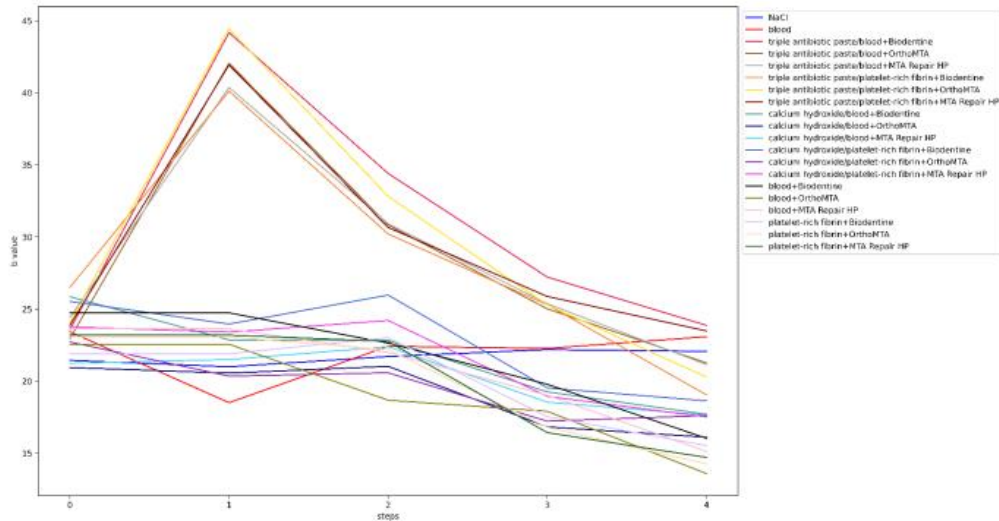


Figure 8. Values of b for all groups and steps.

In step 2, after applying the scaffold and barrier material, the specimens of only one group, that is, group 20, showed no visible colour change ($\Delta E = 2.62$). Between steps 1 and 2, the highest ΔE value was reported for the groups in which triple antibiotic paste was used earlier. Despite the use of different scaffolds and barrier materials, no significant colour change was observed between the groups with triple antibiotic paste ($p > 0.005$). In step 2, the L value for groups with triple antibiotic paste decreased significantly compared with that in step 1. The ΔE value did not differ significantly in the triple antibiotic paste groups in which blood was applied as a scaffold, in comparison to the equivalent groups with calcium hydroxide and single-visit regenerative endodontic procedure groups. In the triple antibiotic paste groups in which platelet-rich fibrin was used, when compared to the matching groups without triple antibiotic paste, statistical significance was noted. When comparing the ΔE value in groups in which calcium hydroxide was applied previously and replaced with a scaffold and barrier material to the corresponding single-visit regenerative endodontic procedures groups, no significant statistical changes were noticed between steps 1 and 2. The lowest ΔE values in step 2 were achieved in the single-visit regenerative endodontic procedures groups with platelet-rich fibrin (group 20, $\Delta E = 2.62$; group 18, $\Delta E = 3.94$; group 19, $\Delta E = 4.40$). Comparing the single-visit regenerative endodontic procedures groups between steps 1 and 2, a significant difference was noticed between the blood and platelet-rich fibrin groups. The BB, BO, and BM groups showed significantly more discolouration than the corresponding platelet-rich fibrin groups, but it was not significant compared to the positive control group (group 2).



Figure 9. Representative images of the experimental groups. (Left), the first tooth after step 0; (right), the steps increase to step 4.

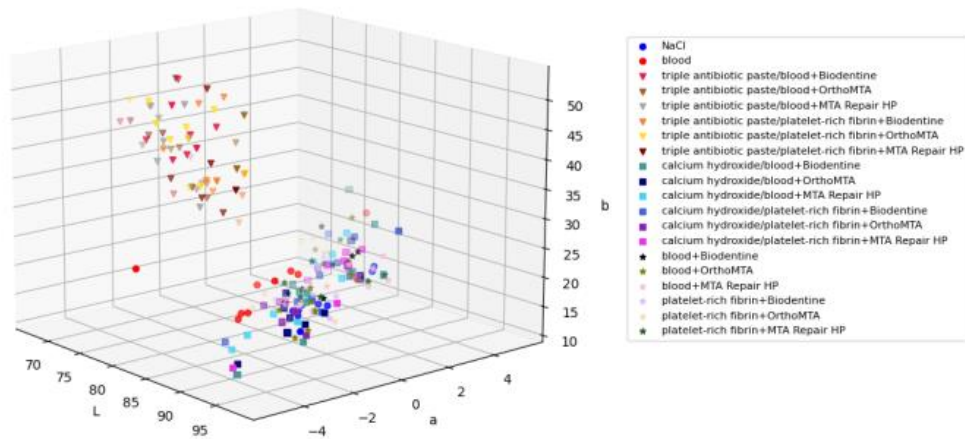


Figure 10. Three-dimensional scatter plot in the CIELab colour space (L, a, and b coordinates) of mean colour distribution of the groups after applying the disinfectant paste.

In steps 3 and 4, after the first and second bleaching procedure, each test group showed a visible change in the colour of the crown ($\Delta E > 3.3$) compared to the original shade. The L value decreased significantly in step 4 when compared to step 0 for the triple antibiotic paste groups. However, when comparing steps 4 to 0, we found that the L value in the groups with calcium hydroxide and single-visit regenerative endodontic procedures increased significantly. When analysing the ΔE value between steps 3 and 4, no changes in the colour of teeth were visually noticeable in the calcium hydroxide groups and group 20 ($\Delta E < 3.3$). Hierarchical clustering analysis was used to identify the colour groups formed from the L, a, and b values and to evaluate the colour change after the first bleaching procedure. Figure 11 shows the cluster dendrogram for L, a, and b values. Hierarchical clustering was used to group the samples according to the similar values of L, a and b in step 3. Group 1 and groups 3–8 formed one set. The second set included group 1 and groups 9–20. Each set was then divided into subsets to form the dendrogram in Figure 11.

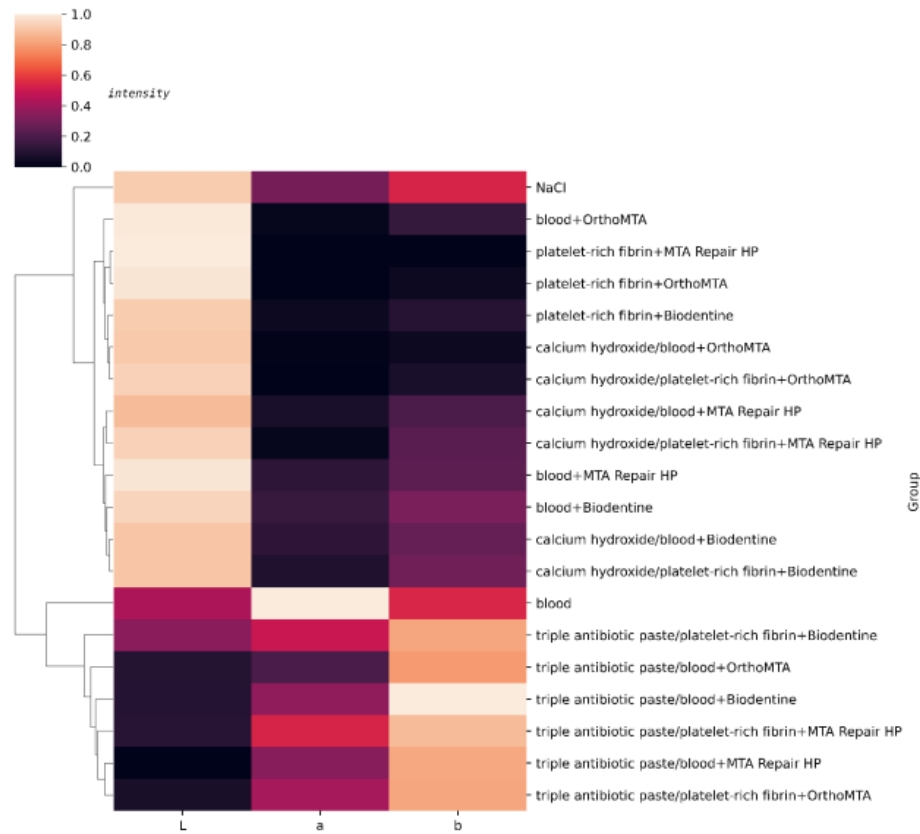


Figure 11. Hierarchical clustering dendrogram and heatmap for L, a, and b values after first bleaching procedure.

4. Discussion

This study assessed the discolouration after regenerative endodontic procedures and the whitening effect after two-visit and single-visit regenerative endodontic procedures. The regenerative endodontic procedures were performed in accordance with the latest American Association of Endodontists guidelines of 2021, and the bleaching agent used in two sessions of whitening was in line with the General Dental Council’s Position Statement on Tooth Whitening guidelines for patients younger than 18 years of age. In this study, bleaching efficacy was analysed not only as tooth changes in brightness and colour, but also in terms of the possibility of returning to the original shade. Our study’s results were mostly in agreement with the null hypothesis of tooth discolouration after regenerative endodontic procedures and inconsistent with the whitening effects, which is not always achievable.

Human [31,32,34,49,50] and bovine [12,16,39,51] teeth are used in in vitro studies to evaluate tooth discolouration. Bovine incisors were used as the specimens in the present study. The diameter of the tubules in crown dentin and the number of dentinal tubules per mm² in bovine teeth are similar to those in human teeth [52]; therefore, they can be used for studies in which the change in tooth colour is evaluated [53]. Additionally, the great advantage of using bovine teeth is the possibility of obtaining the appropriate number of teeth for extensive study. Changes in the colour of the teeth in the study were

measured using a spectrophotometer. A similar technique has been used in other *in vitro* studies [31,32].

In the first step of this study, the colour of the teeth was evaluated 3 weeks after the application of disinfectant pastes. Specimens with triple antibiotic paste showed more significant crown discolouration than specimens with calcium hydroxide ($p < 0.005$). This finding is in agreement with the results obtained by other researchers that studied the discolouration potential of triple antibiotic paste [14,16,51]. It was noticed that despite rinsing the paste out of the root canal, the crown remained discoloured [54]; this may have been due to the fact that, regardless of the irrigation techniques used, 88% of the triple antibiotic paste remains in the root canal and is present at 350 μm in the dentin [55]. The authors noticed that discolouration appeared even 24 h after introducing the paste, which suggests that reducing the duration of antibiotic therapy does not prevent tooth crown discolouration [11,12,56]. The triple antibiotic paste samples had lower L and a values and higher b values, which made them darker, greener, and more yellow than the calcium hydroxide samples (Figure 10). Calcium hydroxide caused minor but perceptible changes in colour ($\Delta E = 4.27$). In an *in vivo* study, Chen et al. [13] observed discolouration in 2 out of 20 treated teeth using calcium hydroxide as a disinfectant paste in revascularisation procedures. Nagata et al. [57] used calcium hydroxide and chlorhexidine gel in 11 incisors, 3 of which were stained. However, *in vitro* studies using calcium hydroxide have shown that calcium hydroxide does not cause a colour change [14,16,51,58]. Before the disinfectant pastes were placed in the root canal, a dentin bonding agent was applied to the dentin in the pulp chamber to seal the dentinal tubules to create a surface that prevents any contamination [59] that may arise during the application of disinfectant paste and also prevents paste penetration into dentinal tubules. Despite the application of a dentin bonding agent, the tooth crowns became stained. This finding is in line with the results of studies by Kim et al. [11] and Shokouhinejad et al. [12], who noticed that applying a dentin bonding agent before placing triple antibiotic paste into the tooth does not completely eliminate discolouration, but reduces it. It is not fully known why dentin bonding agents do not prevent discolouration [60].

In the second step of this study, the colour of the teeth was evaluated 4 weeks after the scaffold (e.g., blood or platelet-rich fibrin) and barrier material (e.g., Biodentine, OrthoMTA or MTA Repair HP) applications. After this time, only group 20 showed no visible colour change ($\Delta E = 2.62$). ΔE values between steps 1 and 2 in the groups 3–8 were the highest and did not differ significantly between the groups. This finding is in line with the results presented by Shokouhinejad et al. [12], who observed that after replacing triple antibiotic paste with blood and barrier material, the teeth did not differ significantly between the groups. In all triple antibiotic paste groups, the L value decreased significantly and the teeth became darker in the second step, when compared to the first step. The lowest ΔE value in step 2 was observed in the groups 18–20. Out of these three groups, group 19 has the highest ΔE value. This may be due to the presence of bismuth oxide in OrthoMTA. Bismuth oxide is used as a radiopacifier and is associated with discolouration of dental tissues [61–63]. Oxidising agents, such as the amino acids present in dentin collagen or sodium hypochlorite, in contact with bismuth oxide destabilise it, which is associated with discolouration [64,65]. For the single-visit regenerative endodontic procedures groups, groups 15–17 showed more discolouration than the corresponding platelet-rich fibrin groups between step 1 and 2. Additionally, the results for groups 15–17 were not significantly different when compared to group 2. Based on these results, it can be concluded that blood has a greater staining potential than platelet-rich fibrin, regardless of the barrier material. Blood discolouration may be caused by the penetration of erythrocyte pigments into tooth tissues and the accumulation of decomposition products in the dentinal tubules [66]. The factor that increases ΔE may be the absorption of blood components by the freshly applied and unset barrier material [51]. Namazikhah et al. [67] noticed porosities in the microstructure of calcium silicate-based cement, which may take up blood components and cause discolouration of the material, and thus tooth discolouration [51]. The absence

of erythrocytes in platelet-rich fibrin may be the cause of the decreased discolouration potential of platelet derivatives [39]. This result is in agreement with that reported by Shokouhinejad et al. [39], who found that the groups treated with blood showed more discolouration than the platelet-rich fibrin groups after 1 month. The difference between the studies was that Shokouhinejad et al. [39] used a double antibiotic paste that consisted of ciprofloxacin and metronidazole, but after 4 weeks, there was no visible change in tooth colour ($\Delta E \leq 3.3$). Statistical significance was noted in the triple antibiotic paste groups, in which platelet-rich fibrin was used as a scaffold, compared with the corresponding calcium hydroxide and single-visit regenerative endodontic procedures groups. This is due to the strong staining potential of triple antibiotic paste and the inability to completely rinse out the triple antibiotic paste, which means that it remains in the dentinal tubules [55] and could affect the colour changes in the tooth tissues. When comparing the triple antibiotic paste group, in which blood was applied as a scaffold, with the corresponding calcium hydroxide and single-visit regenerative endodontic procedures groups, the authors noticed that ΔE was higher in the triple antibiotic paste group, but it did not change significantly. The authors concluded that there may be a possible interfering effect of the triple antibiotic paste and blood staining potential due to a significant change in ΔE in the groups with platelet-rich fibrin when triple antibiotic paste was applied, but the difference was not significant in groups where blood was used. When comparing the colour change in the calcium hydroxide groups with the corresponding single-visit regenerative endodontic procedures groups, there was no statistical differences between steps 1 and 2; thus, it could be concluded that calcium hydroxide had no effect on further discolouration in step 2.

In the third and fourth steps of this study, the colour of the teeth was evaluated 1 week after the application of the bleaching material, which was applied twice. A 15% carbamide peroxide gel was selected for the study, which releases 5.25% hydrogen peroxide and urea [68] and is in line with the General Dental Council's Position Statement on Tooth Whitening [25], assuming that regenerative techniques are most often conducted in children. Compared with other bleaching agents, carbamide peroxide is less cytotoxic to human dental pulp stem cells [69]. In the qualitative analysis, most of the teeth were defined as lightness level 0 in steps 3 and 4. Additionally, there were samples with lightness level 5 in step 1 (after disinfectant paste application), and their number increased in the following steps. Comparing steps 3 and 4 to step 0, in which most of the teeth were defined as lightness level 1, the authors concluded that after the first and second whitening procedures, the teeth did not return to their original colour. Most of the samples whitened too intensely, while some darkened. When analysing individual colour components, such as L, a, and b (Figures 6–8), it was noticed that in the groups with triple antibiotic paste, the values of L and b decreased, whereas the value of a increased, which may mean that after the second whitening procedure, the teeth became darker, redder, and less yellow than the original colour. Based on a comparison of the brightness of the teeth colour before treatment and after the second whitening procedure, we concluded that in the groups with calcium hydroxide and single-visit regenerative endodontic procedures groups, the teeth became brighter, whereas in the triple antibiotic paste groups, the teeth became darker (Figures 5 and 6). The results for the single-visit regenerative endodontic procedures groups were in line with those of Khedmat et al.'s study [32], which showed that the ΔL value increased after the second bleaching session in specimens in which blood and OrthoMTA were applied. The difference between the studies was the concentration of the bleaching agent, as Khedmat et al. [32] used 37% carbamide peroxide. The authors did not notice any visible ($\Delta E < 3.3$) or statistically significant ($p > 0.005$) differences in the colour change in the tooth crown for any of the groups where calcium hydroxide was used, including group 20, between the first and second whitening procedure, which may mean that one whitening session is sufficient with this combination. In the remaining single-visit regenerative endodontic procedures groups, ΔE between steps 0 and 3 and steps 0 and 4 increased, suggesting an unfavourable whitening effect by increasing the colour change from the original colour.

Several *in vitro* studies have assessed tooth whitening after regenerative endodontic procedures. It is difficult to directly compare these studies with this study because different materials, specimen types, bleaching agents, and methods were used. Three authors used hydrogen peroxide [31,34,50], and one of the authors included the addition of sodium perborate [34]. Shokouhinejad et al. [50] analysed laser-assisted protocols. Only two studies analysed the effectiveness of carbamide peroxide in whitening discoloured teeth after regenerative endodontic procedures [30,32]. In an *in vitro* study using 37% carbamide peroxide gel, the authors found that reducing the size of the barrier material and placing glass ionomer cement as a cervical barrier in single-visit regenerative endodontic procedures may be helpful in reducing the number of whitening sessions [32]. Antov et al. [30] conducted an *in vivo* study in which teeth were whitened after regenerative endodontic procedures with 10% carbamide peroxide. In two cases, they used the technique of internal/external whitening using vacuum-formed bleaching trays. In the first case, the patient was satisfied with the whitening result; in the second case, there was minimal improvement in the shade, but the patient was no longer concerned about the discolouration. In the third case, the patient underwent an external bleaching technique, in which an improvement in the shade was noticed; however, the patient was not fully satisfied with the effect.

The extensive research group of 200 bovine teeth and the analysis of tooth discolouration after both single- and two-visit regenerative endodontic procedures, in which various scaffolds were used, including blood or platelet-rich fibrin and barrier materials such as Biodentine, OrthoMTA or MTA Repair HP, are the strengths of the study. Evaluation of teeth whitening for such an extensive research group with the use of a bleaching agent that is permitted for patients younger than 18 years of age is another advantage of this research.

This study has several limitations. *In vitro* conditions are not entirely compatible with *in vivo* conditions. Regenerative endodontic procedures are also performed under specific, controlled conditions, but they are not identical to those in the oral cavity; however, a sincere attempt was made to recreate a real-life situation. Additionally, in this study, the authors used triple antibiotic paste and calcium hydroxide as disinfectant pastes and three barrier materials in contact with blood and platelet-rich fibrin, which limits the assessment of discolouration and whitening to several combinations. Bleaching was carried out using the internal technique with the use of one bleaching material at a specific concentration. It is recommended that further studies carry out a procedure using other bleaching agents with an acceptable concentration and with a different whitening technique. Randomised clinical trials and long-term studies are needed to establish accurate post-regenerative endodontic procedure tooth-whitening guidelines.

5. Conclusions

Discolouration of dental tissues after regenerative endodontic procedures is almost inevitable. It is more advisable to use platelet-rich fibrin as a scaffold. It is worth considering whitening discoloured teeth after single- and two-visit regenerative endodontic procedures with calcium hydroxide because it is achievable, but it does not guarantee a return to the original colour. It is not recommended to whiten teeth that have undergone treatment with triple antibiotic paste, as the whitening effect will be opposite to the desired effect. Further studies are required to create precise guidelines to define the appropriate whitening technique, material, and duration of discolouration after regenerative endodontic procedures.

Author Contributions: Conceptualization, I.F., J.M., T.F. and A.N.; methodology, I.F., J.M. and T.F.; validation, A.N.; formal analysis, I.F. and T.F.; investigation, I.F.; data curation, resources, I.F. and T.F.; data curation, T.F.; writing—original draft preparation, I.F.; writing—review and editing, J.M., T.F., M.G., M.L. and A.N.; visualization, T.F.; supervision, A.N.; project administration, I.F. and A.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The use of single-rooted mandibular bovine incisors in this study was approved by the local ethics committee (no. KB-0012/53/01/18). The teeth were collected from bovine heads from a local meat processing plant that were disposed of. The procedures were approved by the local Sanitary and Epidemiological Station (no. PIW.HP:9260/Uppz/Bad./2/2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available upon request due to restrictions, e.g., privacy or ethical. The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to technical and logistic issues.

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

References

- 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] [PubMed]
- Iwaya, S.I.; Ikawa, M.; Kubota, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent. Traumatol.* **2001**, *17*, 185–187. [CrossRef] [PubMed]
- Ulusoy, A.T.; Turedi, I.; Cimen, M.; Cehreli, Z.C. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J. Endod.* **2019**, *45*, 560–566. [CrossRef] [PubMed]
- Kahler, B.; Rossi-Fedele, G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *J. Endod.* **2016**, *42*, 563–569. [CrossRef]
- Žižka, R.; Šedý, J.; Gregor, L.; Voborná, I. Discoloration after Regenerative Endodontic Procedures: A Critical Review. *Iran. Endod. J.* **2018**, *13*, 278–284. [PubMed]
- Fagogeni, I.; Metlerska, J.; Lipski, M.; Falgowski, T.; Maciej, G.; Nowicka, A. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. *J. Oral Sci.* **2019**, *61*, 379–385. [CrossRef] [PubMed]
- American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Available online: <https://f3f142zs0k2w1kg84k5p9i1o-wpengine.netdna-ssl.com/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2021/08/ClinicalConsiderationsApprovedByREC062921.pdf> (accessed on 20 August 2022).
- 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]
- 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. [CrossRef] [PubMed]
- Viegas, C.M.; Paiva, S.M.; Carvalho, A.C.; Scarpelli, A.C.; Ferreira, F.M.; Pordeus, I.A. Influence of traumatic dental injury on quality of life of Brazilian preschool children and their families. *Dent. Traumatol.* **2014**, *30*, 338–347. [CrossRef] [PubMed]
- Kim, J.H.; Kim, Y.; Shin, S.J.; Park, J.W.; Jung, I.Y. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: A case report. *J. Endod.* **2010**, *36*, 1086–1091. [CrossRef] [PubMed]
- Shokouhinejad, N.; Khoshkhounejad, M.; Alikhasi, M.; Bagheri, P.; Camilleri, J. Prevention of coronal discoloration induced by regenerative endodontic treatment in an ex vivo model. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *22*, 1725–1731. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, M.Y.; Chen, K.L.; Chen, C.A.; Tayebaty, F. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int. Endod. J.* **2012**, *45*, 294–305. [CrossRef] [PubMed]
- Akcay, M.; Arslan, H.; Yasa, B.; Kavrik, F.; Yasa, E. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J. Endod.* **2014**, *40*, 845–848. [CrossRef]
- Dettwiler, C.; Walter, M.; Zaugg, L.K.; Lenherr, P.; Weiger, R.; Krastl, G. In vitro assessment of the tooth staining potential of endodontic materials in a bovine tooth model. *Dent. Traumatol.* **2016**, *32*, 480–487. [CrossRef] [PubMed]
- Dos Santos, L.G.P.; Felipe, W.T.; De Souza, B.D.M.; Konrath, A.C.; Cordeiro, M.M.R.; Felipe, M.C.S. Crown discoloration promoted by materials used in regenerative endodontic procedures and effect of dental bleaching: Spectrophotometric analysis. *J. Appl. Oral Sci.* **2017**, *25*, 234–242. [CrossRef] [PubMed]
- Mozyńska, J.; Metlerski, M.; Lipski, M.; Nowicka, A. Tooth discoloration induced by different calcium silicate-based cements: A systematic review of in vitro studies. *J. Endod.* **2017**, *43*, 1593–1601. [CrossRef]
- Carey, C.M. Tooth whitening: What we now know. *J. Evid. Based. Dent. Pract.* **2014**, *14*, 70–76. [CrossRef] [PubMed]
- Joiner, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J. Dent.* **2006**, *34*, 412–419. [CrossRef] [PubMed]
- Joshi, S.B. An overview of vital teeth bleaching. *J. Interdiscip. Dent.* **2016**, *6*, 3–13. [CrossRef]
- Plotino, G.; Buono, L.; Grande, N.M.; Pameijer, C.H.; Somma, F. Non Vital tooth bleaching: A review of the literature and clinical procedures. *J. Endod.* **2008**, *34*, 394–407. [CrossRef] [PubMed]
- Kwon, S.R.; Wertz, P.W. Review of the mechanism of tooth whitening. *J. Esthet. Restor. Dent.* **2015**, *27*, 240–257. [CrossRef] [PubMed]
- The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations 2012. Available online: <https://www.legislation.gov.uk/uksi/2012/2263/schedule/made> (accessed on 20 August 2022).

24. Greenwall-Cohen, J.; Greenwall, L.; Haywood, V.; Harley, K. Tooth whitening for the under-18-year-old patient. *Br. Dent. J.* **2018**, *225*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. General Dental Council, Position Statement on Tooth Whitening. Available online: <https://www.gdc-uk.org/docs/default-source/what-is-the-legal-position/tooth-whitening-position-statement.pdf> (accessed on 20 August 2022).
26. Fagogeni, I.; Falgowski, T.; Metlerska, J.; Lipski, M.; Górski, M.; Nowicka, A. Efficiency of Teeth Bleaching after Regenerative Endodontic Treatment: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. D'Mello, G.; Moloney, L. Management of coronal discoloration following a regenerative endodontic procedure in a maxillary incisor. *Aust. Dent. J.* **2017**, *62*, 111–116. [[CrossRef](#)]
28. De-Jesus-Soares, A.; Prado, M.; Nagata, J.Y.; Pini, N.I.P.; Cardoso, R.A.; Vargas-Neto, J.; Figueiredo de Almeida Gomes, B.P.; Lima, D.A.N. Internal bleaching after pulp revascularization using two intracanal medicaments: A case report. *Int. J. Clin. Dent.* **2018**, *11*, 127–135.
29. Parthiban, G.; Karale, R.; Kumar, V.; Br, P. Tooth Discoloration and Internal Bleaching after the use of Triple Antibiotic Paste for Regenerative Endodontic Treatment of an Immature Necrotic Permanent Tooth: A Case Report. *Dentistry* **2018**, *8*, 528. [[CrossRef](#)]
30. Antov, H.; Duggal, M.S.; Nazzal, H. Management of discoloration following revitalization endodontic procedures: A case series. *Int. Endod. J.* **2019**, *52*, 1660–1670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Akbulut, M.B.; Terlemeç, A.; Akman, M.; Buyukerkmen, B.; Guner, M.B.; Eldeniz, A.U. Tooth discoloration effects of calcium silicate based barrier materials used in revascularization and treatment with internal bleaching. *J. Dent. Sci.* **2017**, *12*, 347–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Khedmat, S.; Ahmadi, E.; Meraji, N.; Fallah, Z.F. Colorimetric Comparison of Internal Bleaching with and without Removing Mineral Trioxide Aggregate (MTA) on Induced Coronal Tooth Discoloration by MTA. *Int. J. Dent.* **2021**, *27*, 8319986. [[CrossRef](#)]
33. McTigue, D.J.; Subramanian, K.; Kumar, A. Case series: Management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: A case series. *Pediatr. Dent.* **2013**, *35*, 55–60.
34. Jiménez-Padilla, J.L.; Benavides-Reyes, C.; Viqueira-Pérez, V.E.; Martínez-Verdú, F.M.; Bolaños, M.V.; Gonzalez-Lopez, S. Effect of internal bleaching on the reversal of coronal discoloration induced by triple-antibiotic-paste or Biodentine use in regenerative endodontic procedures. *Color. Res. Appl.* **2021**, *47*, 518–527. [[CrossRef](#)]
35. European Commission Website. Available online: <https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/cmr-substances/> (accessed on 20 August 2022).
36. Miller, E.K.; Lee, J.; Tawil, P.Z.; Teixeira, F.B.; Vann, W.F. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr. Dent.* **2012**, *34*, 66–69.
37. Timmerman, A.; Parashos, P. Bleaching of a Discolored Tooth with Retrieval of Remnants after Successful Regenerative Endodontics. *J. Endod.* **2018**, *44*, 93–97. [[CrossRef](#)]
38. Nagendrababu, V.; Murray, P.E.; Ordinala-Zapata, R.; Peters, O.A.; Rôças, I.N.; Siqueira, J.F., Jr.; Priya, E.; Jayaraman, J.; Pulikkotil, S.J.; Camilleri, J.; et al. PRILE 2021 guidelines for reporting laboratory studies in Endodontology: A consensus-based development. *Int. Endod. J.* **2021**, *54*, 1482–1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Shokouhinejad, N.; Razmi, H.; Farbod, M.; Alikhasi, M.; Camilleri, J. Coronal tooth discoloration induced by regenerative endodontic treatment using different scaffolds and intracanal coronal barriers: A 6-month ex vivo study. *Restor. Dent. Endod.* **2019**, *44*, 25. [[CrossRef](#)]
40. Gómez-Polo, C.; Gómez-Polo, M.; Vázquez De Parga, J.A.M.; Celemin-Viñuela, A. Study of the shade tabs of the toothguide 3D master through cluster analysis. *Color. Res. Appl.* **2014**, *40*, 194–200. [[CrossRef](#)]
41. Marconyak, L.J., Jr.; Kirkpatrick, T.C.; Roberts, H.W.; Roberts, M.D.; Aparicio, A.; Himel, V.T.; Sabey, K.A. A Comparison of Coronal Tooth Discoloration Elicited by Various Endodontic Reparative Materials. *J. Endod.* **2016**, *42*, 470–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Harris, C.R.; Millman, K.J.; van der Walt, S.J.; Gommers, R.; Virtanen, P.; Cournapeau, D.; Wieser, E.; Taylor, J.; Berg, S.; Smith, N.J.; et al. Array programming with NumPy. *Nature* **2020**, *585*, 357–362. [[CrossRef](#)]
43. Virtanen, P.; Gommers, R.; Oliphant, T.E.; Haberland, M.; Reddy, T.; Cournapeau, D.; Burovski, E.; Peterson, P.; Weckesser, W.; Bright, J.; et al. SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 261–272. [[CrossRef](#)]
44. The Pandas Development Team. Pandas-dev/pandas: Pandas. *Zenodo* **2020**. Available online: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3509134> (accessed on 20 August 2022).
45. Pedregosa, F.; Varoquaux, G.; Gramfort, A.; Michel, V.; Thirion, B.; Grisel, O. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **2011**, *12*, 2825–2830.
46. Hunter, J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* **2007**, *9*, 90–95. [[CrossRef](#)]
47. Waskom, M.L. Seaborn: Statistical data visualization. *J. Open. Source Softw.* **2021**, *6*, 3021. [[CrossRef](#)]
48. Benjamin, D.J.; Berger, J.O.; Johannesson, M.; Nosek, B.A.; Wagenmakers, E.J.; Berk, R.; Bollen, K.A.; Brembs, B.; Brown, L.; Camerer, C.; et al. Redefine statistical significance. *Nat. Hum. Behav.* **2018**, *2*, 6–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Palma, P.J.; Marques, J.A.; Santos, J.; Falacho, R.L.; Sequeira, D.; Diogo, P.; Caramelo, F.; Ramos, J.C.; dos Santos, J.M.M. Tooth discoloration after regenerative endodontic procedures with calcium silicate-based cements—An ex vivo study. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 5793. [[CrossRef](#)]
50. Shokouhinejad, N.; Khoshkhounejad, M.; Hamidzadeh, F. Evaluation of the Effectiveness of Laser-Assisted Bleaching of the Teeth Discolored due to Regenerative Endodontic Treatment. *Int. J. Dent.* **2022**, *2022*, 3589609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Lenherr, P.; Allgayer, N.; Weiger, R.; Filippi, A.; Attin, T.; Krastl, G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: A laboratory study. *Int. Endod. J.* **2012**, *45*, 942–949. [[CrossRef](#)]
52. Schilke, R.; Lisson, J.A.; Bauss, O.; Geurtsen, W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch. Oral Biol.* **2000**, *45*, 355–361. [[CrossRef](#)]
53. Metlerska, J.; Fagogeni, I.; Metlerski, M.; Nowicka, A. Vital Pulp Therapy in Aesthetic Zone—Identifying the Biomaterial That Reduces the Risk of Tooth Discolouration. *Materials* **2021**, *14*, 6026. [[CrossRef](#)]
54. Kirchhoff, A.L.; Raldi, D.P.; Salles, A.C.; Cunha, R.S.; Mello, I. Tooth discoloration and internal bleaching after the use of triple antibiotic paste. *Int. Endod. J.* **2015**, *48*, 1181–1187. [[CrossRef](#)]
55. Berkhoff, J.; Chen, P.; Teixeira, F.; Diogenes, A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J. Endod.* **2014**, *40*, 1172–1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Porter, M.L.; Munchow, E.A.; Albuquerque, M.T.; Spolnik, K.J.; Hara, A.T.; Bottino, M.C. Effects of novel 3-dimensional antibiotic-containing electrospun scaffolds on dentin discoloration. *J. Endod.* **2016**, *42*, 106–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Nagata, J.Y.; Gomes, B.P.; Rocha Lima, T.F.; Murakami, L.S.; de Faria, D.E.; Campos, G.R.; de Souza-Filho, F.J.; Soares Ade, J. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J. Endod.* **2014**, *40*, 606–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Iriboz, E.; Öztürk, B.A.; Körklü, S.; Tarcin, B.; Berker, Y.G.; Öveçoğlu, H.S. Comparison of intracoronal bleaching methods on teeth discolored by different antibiotic pastes. *Niger. J. Clin. Pract.* **2017**, *20*, 700–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Akbari, M.; Rouhani, A.; Samiee, S.; Jafarzadeh, H. Effect of dentin bonding agent on the prevention of tooth discoloration produced by mineral trioxide aggregate. *Int. J. Dent.* **2012**, *2012*, 563203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Khim, T.P.; Sanggar, V.; Shan, T.W.; Peng, K.C.; Western, J.S.; Dickson, D.D. Prevention of coronal discoloration induced by root canal sealer remnants using Dentin Bonding agent: An in vitro study. *J. Conserv. Dent.* **2018**, *21*, 562–568. [[PubMed](#)]
61. Camilleri, J.; Borg, J.; Damidot, D.; Salvadori, E.; Pilecki, P.; Zaslansky, P.; Darvell, B.W. Colour and chemical stability of bismuth oxide in dental materials with solutions used in routine clinical practice. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0240634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Pelepenko, L.E.; Saavedra, F.; Antunes, T.B.M.; Bombarda, G.F.; Gomes, B.P.F.A.; Zaia, A.A.; Camilleri, J.; Marciano, M.A. Physicochemical, antimicrobial, and biological properties of White-MTAFlow. *Clin. Oral. Investig.* **2021**, *25*, 663–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Krug, R.; Ortmann, C.; Reich, S.; Hahn, B.; Krastl, G.; Soliman, S. Tooth discoloration induced by apical plugs with hydraulic calcium silicate-based cements in teeth with open apices—a 2-year in vitro study. *Clin. Oral. Investig.* **2022**, *26*, 375–383. [[CrossRef](#)]
64. Marciano, M.A.; Camilleri, J.; Costa, R.M.; Matsumoto, M.A.; Guimarães, B.M.; Duarte, M.A.H. Zinc Oxide Inhibits Dental Discoloration Caused by White Mineral Trioxide Aggregate Angelus. *J. Endod.* **2017**, *43*, 1001–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Marciano, M.A.; Camilleri, J.; Lucateli, R.L.; Costa, R.M.; Matsumoto, M.A.; Duarte, M.A.H. Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF₃. *Clin. Oral. Investig.* **2019**, *23*, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Marin, P.D.; Bartold, P.M.; Heithersay, G.S. Tooth discoloration by blood: An in vitro histochemical study. *Endod. Dent. Traumatol.* **1997**, *13*, 132–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Namazikhah, M.S.; Nekoofar, M.H.; Sheykhrezae, M.S.; Salariyeh, S.; Hayes, S.J.; Bryant, S.T.; Mohammadi, M.M.; Dummer, P.M. The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int. Endod. J.* **2008**, *41*, 108–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Cooper, J.S.; Bokmeyer, T.J.; Bowle, W.H. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J. Endod.* **1992**, *18*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Llana, C.; Collado-González, M.; Tomás-Catalá, C.J.; García-Bernal, D.; Oñate-Sánchez, R.E.; Rodríguez-Lozano, F.J.; Forner, L. Human dental pulp stem cells exhibit different biological behaviours in response to commercial bleaching products. *Materials* **2018**, *11*, 1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Szczecin, 24.11.2022r.

lek. dent. Irini Fagogeni
Studium Doktoranckie Wydział Medycyny i Stomatologii
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnusd.18-0467.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badania, analizie zebranych danych i przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 60%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badania, analizie zebranych danych i przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 61%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badania, analizie zebranych danych, zorganizowaniu materiałów badawczych w tym pozyskaniu zębów wołowych i administracji projektem oraz ostatecznie na przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 60%.

Irini Fagogeni

Szczecin, 24.11.2022r.

dr hab. n. med. Alicja Nowicka, prof. PUM
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnurd.18-0467.

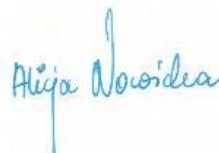
Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu badania, analizie i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 22%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu badania, analizie i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 19%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu badania i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 20%.



Szczecin, 24.11.2022r.

lek. Tomasz Falgowski
Klinika Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Gastroenterologicznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnurd.18-0467.

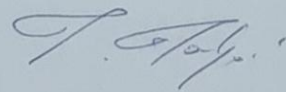
Mój wkład pracy polegał na analizie zebranych danych i przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 5%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na przeprowadzeniu badania, analizie zebranych danych i przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 7%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu badania, analizie zebranych danych i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 7%.



Szczecin, 24.11.2022r.

lek. dent. Joanna Metlerska
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnurd.18-0467.

Mój wkład pracy polegał na zebraniu i analizie danych i wyniósł 5%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na zebraniu oraz analizie danych i wyniósł 4%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na zaprojektowaniu badania pozyskaniu zębów wołowych i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 4%.



Szczecin, 24.11.2022r

dr n. med. Maciej Górski
Uniwersytecka Klinika Stomatologiczna
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnusd.18-0467.

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 4%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na zebraniu danych i opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 4%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 5%.

4896475
Dr n. med. Maciej M. Górski
Leczący
specjalista
stomatologii
70-111 77 50 70

Szczecin, 24.11.2022r

prof. dr hab. n. med. Mariusz Lipski
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej Przedklinicznej
i Endodoncji Przedklinicznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Oświadczenie

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

1. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. J Oral Sci. 2019 Aug 28;61(3):379-385. doi: 10.2334/josnurd.18-0467.

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 4%.

2. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: A systematic review. J Clin Med. 2021 Jan 16;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 5%.

3. Effectiveness of teeth whitening after regenerative endodontics procedures: an in vitro study. J Clin Med. 2022 Nov 28;11(23):7016. doi: 10.3390/jcm11237016.

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej nad przeprowadzonym badaniem i wyniósł 4%.



prof. dr hab. n. med. Mariusz Lipski

8. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp

Endodoncja regeneracyjna to rozwijająca się dziedzina endodoncji pozwalająca na regenerację uszkodzonej zębiny i struktur korzenia oraz kompleksu miazgowo-zębinowego. Procedury endodoncji regeneracyjnej obejmują: rewaskularyzację, terapię z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej, terapię genową oraz terapię z wykorzystaniem komórek macierzystych. Najczęściej stosowaną techniką endodoncji regeneracyjnej jest rewaskularyzacja miazgi, aktualnie nazywana rewitalizacją. To szeroko stosowana technika służąca leczeniu zębów niedojrzałych u młodych pacjentów.

Wielu badaczy odnotowało występowanie przebarwień korony po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, co może niekorzystnie wpływać na jakość życia leczonych pacjentów. Zalecane jest zmniejszenie ryzyka powstawania przebarwień zębów po omawianych zabiegach. W przypadku ich wystąpienia należy rozważyć zastosowanie prostej, niedrogiej i małoinwazyjnej techniki, jaką jest wybielanie. Może ono jednak być wyzwaniem dla lekarzy klinicyistów, szczególnie w przypadku doboru użytego materiału i jego stężenia, a także sposobu wykonania zabiegu.

W piśmiennictwie brakuje obszernych badań, które analizowałyby wybielanie przebarwionych zębów po jedno- i dwuwizytowych zabiegach endodoncji regeneracyjnej na dużych grupach badawczych. Wszystkie te czynniki zostały uwzględnione w niniejszej pracy, przeprowadzonej na dużej grupie badawczej z zastosowaniem różnych past dezynfekujących i krwi/ fibryny bogatopłytkowej oraz materiałów barierowych, w tym najnowszych bioaktywnych cementów, m.in. MTA Repair HP. Podjęto także próbę oceny zmiany koloru zębów po przeprowadzonych zabiegach endodoncji regeneracyjnej oraz możliwości ich wybielenia.

Cele pracy doktorskiej

1. Przegląd systematyczny piśmiennictwa obejmujący analizę potencjału przebarwiającego materiałów stosowanych w endodoncji regeneracyjnej na podstawie opublikowanych badań *in vitro*.

2. Przegląd systematyczny piśmiennictwa obejmujący analizę skuteczności wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej na podstawie opublikowanych badań *in vitro* oraz *in vivo*.
3. Analiza wpływu jedno- oraz dwuwizytowych zabiegów endodoncji regeneracyjnej na kolor leczonych zębów oraz ocena efektywności ich wybielania.

W pracy doktorskiej przedstawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Zabiegi endodoncji regeneracyjnej powodują przebarwienia tkanek zęba.
2. Przebarwione po zabiegach endodoncji regeneracyjnej zęby można efektywnie wybielić.

Material i metody

W pierwszej części badania przegląd piśmiennictwa został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi PRISMA. Dnia 18 lutego 2018 r. przeszukano sześć baz danych: MEDLINE (PubMed), Google Scholar, the Cochrane Library, Scopus, Lilacs i Web of Science. Kryteria włączenia obejmowały: badania *in vitro*, badania, w których materiały były umieszczane w tkankach zęba, oraz publikacje opisujące zabiegi endodoncji regeneracyjnej. Artykuły niespełniające kryteriów włączenia zostały wykluczone. Ostatecznie do analizy zakwalifikowano 11 prac napisanych w języku angielskim.

W drugiej części badania przegląd piśmiennictwa również został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi PRISMA. Wyszukiwanie publikacji przeprowadzono dnia 30 stycznia 2020 r. Przeszukano cztery bazy danych: MEDLINE (PubMed), Web of Science, the Cochrane Library i Scopus. Kryteria włączenia obejmowały: badania *in vitro* oraz *in vivo*, w których analizowano wybielanie zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej oraz takie, w których stosowano środek wybielający w tkankach zębów. Publikacje niespełniające kryteriów włączenia zostały wykluczone. Ostatecznie do analizy zakwalifikowano 15 prac, w tym: 6 badań *in vitro* i 9 badań *in vivo*. Zakwalifikowane artykuły zostały napisane w języku angielskim.

W trzeciej części pracy badaniu zostały poddane jednokorzeniowe zęby bydlęce żuchwy. Do badania włączono 200 zębów, w których wykonano dostęp endodontyczny, usunięto miazgę z komory i kanału korzeniowego, następnie odcięto część

wierzchołkową korzenia 15 mm od połączenia szklwno-cementowego za pomocą wiertła diamentowego z chłodzeniem wodnym, a 4-milimetrową część wierzchołkową korzenia uszczelniono cementem szkło-jonomerowym (GI, Kromoglass 2, LASCOD, Włochy). Kanały korzeniowe poszerzono, a następnie wypłukano 1,5-procentowym podchlorynem sodu (NaOCl) oraz 17-procentowym kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) i osuszono sączkami papierowymi. Wszystkie zęby losowo podzielono na dwadzieścia grup (n = 10). W badaniu uwzględniono dwie grupy kontrolne, w których kanały korzeniowe wypełniono solą fizjologiczną (NaCl) i krwią. Na wewnętrzne ściany komory zębów zastosowano system wiążący (Tokuyama Universal Bond, Tokuyama Dental, Tokio, Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. W dwunastu badanych grupach wykonano dwuwizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej. W sześciu z dwunastu opisywanych grup zastosowano pastę trójantybiotykową zawierającą minocyklinę – TAP(M), a w kolejnych sześciu – pastę wodorotlenkowo-wapniową (Biopulp, Chema-Elektromet, Rzeszów, Polska). Po 3 tygodniach z kanału usunięto pastę dezynfekującą, kanał płukano EDTA, NaCl i osuszono sączkami papierowymi. Następnie do kanału zaaplikowano krew lub fibrynę bogatopłytkową 4 mm poniżej połączenia szklwno-cementowego i założono 3-milimetrową warstwę materiału barierowego. Materiały barierowe, które zastosowano w badaniu, to: Biodentine, MTA Repair HP i Ortho MTA.

Podsumowując, po wypłukaniu TAP(M) do kanałów w trzech grupach zaaplikowano krew i odpowiedni materiał barierowy: Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP, a w kolejnych trzech grupach założono fibrynę bogatopłytkową i Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP. Analogicznie postąpiono w próbkach, w których wypłukano pastę wodorotlenkowo-wapniową: założono krew i Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP oraz fibrynę bogatopłytkową i Biodentine, OrthoMTA lub MTA Repair HP. W sześciu grupach nie zastosowano pasty dezynfekującej, ponieważ zaplanowano jednowizytową endodontyczną procedurę regeneracyjną. Krew lub fibrynę bogatopłytkową oraz materiał barierowy zaaplikowano podobnie jak w grupach dwuwizytowych: krew + Biodentine, krew + OrthoMTA, krew + MTA Repair HP, fibryna bogatopłytkowa + Biodentine, fibryna bogatopłytkowa + OrthoMTA, fibryna bogatopłytkowa + MTA Repair HP. Po zaaplikowaniu krwi lub fibryny bogatopłytkowej oraz materiału barierowego do kanału korzeniowego poniżej granicy szklwno-cementowej i upewnieniu się, że cement związał, otwór dostępowy zamknięto cementem szkło-jonomerowym na okres 4 tygodni. Po 4 tygodniach usunięto cement szkło-jonomerowy oraz 2 mm materiału barierowego i założono około 2 mm cementu szkło-

jonomerowego. Następnie do komory miazgi wprowadzono nadtlenek karbamidu (Peroxidon, Chema-Elektromet, Rzeszów, Polska), watkę, a ubytek zamknięto cementem szkło-jonomerowym. Środek wybielający założono na 1 tydzień. Zabieg wybielania wykonano dwukrotnie w odstępie 7 dni. W trakcie badań próbki przechowywano w inkubatorze (220 V, 50 Hz, Carbolab Electronic, Warszawa) w 100-procentowej wilgotności i 37°C. Do pomiaru zmiany koloru zębów użyto spektrofotometru. Pomiarzy zostały wykonane: przed leczeniem, 3 tygodnie po założeniu pasty dezynfekującej, 4 tygodnie po założeniu krwi/ fibryny bogatopłytkowej i materiału barierowego, 1 tydzień po pierwszym wybielaniu oraz 1 tydzień po drugim wybielaniu. Na każdym etapie badania wykonano zdjęcia zębów aparatem EyeSpecial C-II.

Wyniki

W pierwszej części badania wykazano, że przebarwienie tkanek zęba po zabiegu endodoncji regeneracyjnej może pojawić się na każdym etapie leczenia, zarówno po zastosowaniu past dezynfekujących, jak i krwi oraz materiału barierowego. Pasta trójantybiotykowa, która w swoim składzie zawiera minocyklinę, ma silny potencjał przebarwiający, w przeciwieństwie do wodorotlenku wapnia. W poddanych analizie badaniach *in vitro*, wykazano, że krew przebarwia tkanki zęba. Przebarwienie to zauważono w zębach, w których była stosowana tylko krew, ale także w tych, w których na krew aplikowano materiał barierowy. Cementy krzemowo-wapniowe używane jako materiały barierowe, zawierające w składzie tlenek bizmutu, również przebarwiły tkanki zęba. Po zastosowaniu systemu wiążącego na zębinę badanych zębów odnotowano mniejszą dyskolorację w porównaniu z grupami, w których system wiążący nie został zastosowany, aczkolwiek nie wyeliminowano jej całkowicie.

W drugiej części pracy w przeprowadzonych badaniach *in vitro* wybielano zęby bydłce oraz ludzkie. Przebarwione zęby, w których stosowana była TAP(M), wybieliły się bardziej niż te, w których użyto pastę trójantybiotykową z doksycykliną – TAP(D) i amoksycyliną – TAP(A). W badaniu, w którym w procedurze regeneracyjnej wykorzystano pastę trójantybiotykową z cefaklorem – TAP(C), krew i materiały barierowe, takie jak: Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA), MM-MTA (Micro Mega, Besancon Cedex, France) lub ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA) zauważono, że zęby, w których zaaplikowano Biodentine, wybieliły się istotnie bardziej w porównaniu z zębami z innych grup. Spośród 26 leczonych zębów w badaniach *in vivo*

wybielono 17 zębów. W sześciu przypadkach nastąpiła poprawa koloru zęba, natomiast w trzech – wybielanie nie było wystarczające. Środek wybielający, technika i czas wybielania różniły się pomiędzy analizowanymi badaniami. Stosowano wybielanie wewnętrzne, zewnętrzne oraz połączenie obu tych technik. Do przeprowadzenia zabiegu użyto nadtlenu wodoru, nadtlenu mocznika, nadboranu sodu lub połączenia nadtlenu wodoru i nadboranu sodu.

W trzeciej części badania we wszystkich grupach, w których wykorzystano pastę dezynfekującą, zaobserwowano zmianę koloru leczonych zębów. Większe przebarwienie wystąpiło po zastosowaniu TAP(M). Prawie wszystkie zęby po zabiegach endodoncji regeneracyjnej uległy przebarwieniu, z wyjątkiem tych, w których w jednowizytowym zabiegu zaaplikowano fibrynę bogatopłytkową i cement MTA Repair HP. Po pierwszym i drugim wybieleniu każda z badanych grup wykazała zmianę koloru zęba w porównaniu z jego pierwotnym kolorem, co było zauważalne okiem nieuzbrojonym. Po drugim wybieleniu zęby, w których w dwuwizytowym zabiegu endodoncji regeneracyjnej zastosowano wodorotlenek wapnia, oraz te, w których przeprowadzono jednowizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej, stały się jaśniejsze, natomiast zęby po zabiegu dwuwizytowym przy użyciu TAP(M) stały się ciemniejsze w porównaniu z kolorem sprzed leczenia.

Wnioski

1. Analiza badań wykazała, że większość materiałów stosowanych w zabiegach endodoncji regeneracyjnej ma potencjał do przebarwiania tkanek zęba. W celu zmniejszenia ryzyka przebarwień zębów, przed aplikacją środka dezynfekującego czy materiału barierowego zalecane jest uszczelnienie zębiny systemem wiążącym i użycie pasty trójantybiotykowej poniżej granicy szkliwno-cementowej. Przeprowadzono niewielką liczbę badań *in vitro* z zakresu tego zagadnienia, dlatego dalsze badania są uzasadnione.
2. Analiza badań wykazała także, że wybielenie przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej jest osiągalne. W badaniach dominowała metoda wewnętrzna, ale ze względu na niedostateczną liczbę publikacji dotyczących alternatywnych metod wybielania ich porównanie było utrudnione. Użycie różnych metod i środków wybielających oraz czasu wybielania powoduje, że nie jest możliwe wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Konieczne są dalsze badania w celu

stworzenia precyzyjnych wytycznych określających odpowiednią technikę, materiał i czas trwania wybielania przebarwionych zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej.

3. Przebarwienie tkanek zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej jest niemal nieuniknione. W przeprowadzonym badaniu zmiana koloru tkanek zębów dotyczyła wszystkich grup z wyjątkiem tej, w której zastosowano fibrynę bogatopłytkową oraz cement MTA Repair HP. Jeśli to możliwe, sugerowane są jednowizytowe zabiegi endodoncji regeneracyjnej. W trakcie zabiegów dwuwizytowych zaleca się stosowanie pasty wodorotlenkowo-wapniowej jako pasty dezynfekującej ze względu na niższy potencjał przebarwiający tkanki zęba. W kontekście występowania przebarwień wskazane jest zastosowanie fibryny bogatopłytkowej oraz nieimplikującego przebarwień materiału barierowego, np. cementu MTA Repair HP. Warto rozważyć wybielanie przebarwionych zębów, w których przeprowadzono jednowizytowy zabieg endodoncji regeneracyjnej, oraz zębów po zabiegu dwuwizytowym wykonanym z użyciem wodorotlenku wapnia, ponieważ jest ono możliwe, ale nie gwarantuje powrotu do pierwotnego koloru. Nie zaleca się wybielania zębów poddanych dwuwizytowemu zabiegowi endodoncji regeneracyjnej z zastosowaniem TAP(M) nadtlakiem karbamidu, gdyż efekt może być odwrotny do zamierzonego. W celu ustalenia wytycznych dotyczących procedury wybielania zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej wskazane jest przeprowadzenie dalszych badań.

Hipotezy badawcze

1. Wyniki badania były w większości zgodne z pierwszą hipotezą dotyczącą przebarwień zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej. Pierwsza hipoteza zerowa została zaakceptowana.
2. Wyniki badania były niezgodne z założeniami drugiej hipotezy dotyczącej wybielania zębów po zabiegach endodoncji regeneracyjnej, ponieważ efekt wybielania nie zawsze był osiągalny. Druga hipoteza zerowa została odrzucona.

9. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU ANGIELSKIM

Introduction

Regenerative endodontic treatment is a dynamically developing field in endodontics that allows regeneration of damaged dentine and root structures, as well as the pulp-dentin complex.

Regenerative endodontic techniques include revascularization, tissue engineering, stem cell-based and gene therapy. The most common technique used is root canal revascularization, also called revitalization, which is used for the treatment of immature permanent teeth.

Many authors have noticed crown discoloration after regenerative endodontic procedures, which may negatively affect the quality of life of treated patients – therefore, it is recommended to reduce this risk as much as possible. If tooth discoloration occurs the use of a simple, cost-effective, minimally invasive technique, such as whitening, should be considered. Teeth whitening after regenerative endodontic procedures can be a challenge for clinicians, especially with regard to the selection of the material used and its concentration, as well as the method of performing the procedure.

There is a lack of extensive *in vitro* studies on large research materials that analysed the whitening of discoloured teeth after single- and two-visit regenerative endodontic procedures. All these factors were considered in the present study, which was performed using extensive research material and was designed to evaluate bleaching after the use of various disinfectant pastes and subsequent scaffolds (blood and platelet-rich fibrin) and barrier materials, including the latest calcium silicate-based cements, e.g. MTA Repair HP. In the study, an attempt was made to evaluate the change in the color of teeth after regenerative endodontics and the possibility of their whitening.

Objectives of the dissertation

1. A systematic review of the literature including an analysis of the discoloration potential of materials used in regenerative endodontic procedures based on published *in vitro* studies.

2. Systematic review of the literature including the analysis of the effectiveness of whitening discolored teeth after regenerative endodontic procedures based on published *in vitro* and *in vivo* studies.
3. Analysis of single- and two-visit regenerative endodontic procedures on the color of the treated teeth and the effectiveness of their whitening.

Research hypothesis:

1. The null hypothesis assumes that tooth tissue discoloration occurs after regenerative endodontic treatment.
2. The null hypothesis assumes that tooth whitening after regenerative endodontic treatment would be achievable.

Material and methods

In the first part of the study, the literature review was conducted in accordance with the PRISMA guidelines. Publications were searched without a year limit in: MEDLINE (PubMed), Google Scholar, the Cochrane Library, Scopus, Lilacs, and Web of Science databases. The final search was performed on February 18, 2018. Inclusion criteria comprised the following types of articles: *in vitro* studies, studies that used preparations placed into the tooth tissues, and those that described revitalization procedures. Publications that did not meet the inclusion criteria were excluded. Ultimately, 11 papers written in English were qualified for the analysis.

In the second part of the study, the literature review was also performed in accordance with the PRISMA guidelines. Four databases – MEDLINE (PubMed), Scopus, the Cochrane Library, and Web of Science – were searched electronically. Publications were searched without a year limit. The last search was conducted on 30 January 2020. Publications were extracted based on the inclusion criteria: *in vitro* and *in vivo* studies that evaluated bleaching of tooth discoloration after regenerative endodontic procedures and publications in which bleaching material was placed in the tooth tissues. Publications that did not meet the inclusion criteria were excluded. Finally, 15 publications were qualified for the analysis, including: 6 *in vitro* and 9 *in vivo* studies. Qualified articles were written in English.

In the third part of the study, single-rooted bovine teeth of the lower jaw were examined. Two-hundred bovine teeth were included in the study and prepared for further research. Endodontic access was prepared and the pulp was removed from the pulp chambers and root canal. The apical part of the root was removed 15 mm from the cemento-enamel junction with a diamond bur in a high-speed hand piece under water cooling, and 4 mm of the apical part was sealed with glass ionomer cement (GI, Kromoglass 2, LASCOD, Sesto Fiorentino, Italy). The root canals were shaped using 1#–6# Gates-Glidden drills. The canals were irrigated with 1.5% sodium hypochlorite (NaOCl) followed by 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and dried with absorbent paper points. The teeth were randomly divided into twenty groups (n = 10). Two of them were control groups in which the root canals were filled with 0.9% saline (NaCl) or blood. The internal walls of the pulp chambers of the remaining specimens were sealed with dentin bonding agent (Tokuyama Universal Bond, Tokuyama Dental, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Twelve studied groups were designed to be consistent with two-visit regenerative endodontic procedures. Six groups were treated with triple antibiotic paste with minocycline – TAP(M), and other six groups were treated with calcium hydroxide. After 3 weeks, disinfectant paste was rinsed out from canal with EDTA, NaCl and dried with absorbent paper points. Next, blood or platelet-rich fibrin was applied to the canal 4 mm below the cemento-enamel junction, and 3 mm of barrier material was placed on the scaffold. The barrier materials used were Biodentine, OrthoMTA, or MTA Repair HP. Finally, after rinsing TAP(M) from the canal, three groups were treated with blood and the following barrier material: Biodentine, OrthoMTA, or MTA Repair HP, and the next three groups were treated with platelet-rich fibrin and the following barrier material: Biodentine, OrthoMTA, or MTA Repair HP. The same procedure was performed for the samples with calcium hydroxide. After disinfection, calcium hydroxide was replaced with blood and the following barrier material: Biodentine, OrthoMTA, or MTA Repair HP in the three groups, and in the next three groups teeth were treated with platelet-rich fibrin and the following barrier material: Biodentine, OrthoMTA, or MTA Repair HP. In six groups, disinfectant pastes was not used, which is consistent with the single-visit regenerative endodontic procedures. Scaffold and intracanal barrier materials were applied to the root canal, similar to previous groups: blood + Biodentine, blood + OrthoMTA, blood + MTA Repair HP, platelet-rich fibrin + Biodentine, platelet-rich fibrin + OrthoMTA, and platelet-rich fibrin + MTA Repair HP. After application of the scaffolds (blood or platelet rich fibrin)

and barrier materials and after the setting of the cement was confirmed, the access cavity was filled with glass ionomer cement for 4 weeks. After 4 weeks, glass ionomer cement and 2 mm of the barrier material were removed and cervical sealing with glass ionomer cement was performed. Then, carbamide peroxide (Peroxidon, Chema-Elektromet, Rzeszów, Poland) was placed into the pulp chamber and covered with a small cotton pellet, and the access cavity was closed with glass ionomer cement. The bleaching agent was applied for 1 week. The whitening procedure was performed twice at a 7-day interval. During the study, the samples were stored in an incubator (220 V, 50 Hz; Carbolab Electronic, Warsaw, Poland) at 100% humidity and 37°C.

To measure the colour of the specimens, author used spectrophotometer (VITA Easyshade Compact 5.0, VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Measurements were taken before treatment, 3 weeks after disinfectant paste application, 4 weeks after application of blood/platelet-rich fibrin and barrier material, 1 week after first whitening and 1 week after second whitening. Photographs of samples were taken at each stage of the study with a EyeSpecial C-II camera (Shofu, Inc., Kyoto, Japan).

Results

The first part of the study showed that discoloration of tooth tissues after regenerative endodontic treatment may occur at any stage of treatment, both after the use of disinfectant pastes, as well as blood and barrier materials. The TAP(M), has a strong staining potential, unlike to calcium hydroxide. In *in vitro* studies, blood has been shown to stain tooth tissue. This discoloration was observed both in teeth where only blood was used and in those where a barrier material was applied to the blood clot. Barrier materials containing bismuth oxide could discolored tooth tissues. After applying the dentin bonding agent to the dentin of the examined teeth, the discoloration was lower compared to the groups in which the bonding system was not applied, although it was not completely eliminated.

The second part of the study showed that in *in vitro* studies both, bovine teeth and human teeth, were bleached. In studies in which antibiotic pastes were used, a tooth stained with TAP(M) bleached more than a tooth stained with triple antibiotic paste with doxycycline – TAP(D) or triple antibiotic paste with amoxicillin – TAP(A). In studies in which triple antibiotic paste with cefaclor – TAP(C), blood and barrier material such as Biodentine (Septodont, Lancasted, PA, USA), MM-MTA, (Micro Mega, Besancon

Cedex, France), and ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA) were used and bleaching was performed, the group treated with Biodentine bleached significantly more than in other groups. Of 26 treated teeth in the *in vivo* studies, 17 teeth were bleached successfully. In six cases, there was improvement of the shade. In three cases, bleaching was not sufficient. Bleaching agent, technique and time of bleaching were different between studies. Internal, external and a combination of both of these techniques were performed. Discolored teeth were bleached with different bleaching agents: sodium perborate, hydrogen peroxide, carbamide peroxide or combination of sodium perborate and hydrogen peroxide.

The third part of the study showed that in all groups in which the disinfectant paste was used, a change in the color of the treated teeth was observed. More discoloration occurred in the teeth treated with the TAP(M). Tooth discoloration was noticed after two- and single-visit regenerative endodontic procedures, except for the platelet-rich fibrin + MTA Repair HP group. After the first and second whitening procedures, all of the tested two- and single-visit regenerative endodontic procedures groups showed a change in the colour of the crown, which was noticeable to the naked eye. After the second whitening, the teeth in which calcium hydroxide was used in the two-visit regenerative endodontic procedure and in the teeth in which the one-visit regenerative endodontic procedure was performed became lighter, while the teeth in which the TAP(M) was used in the two-visit regenerative endodontic procedure became darker compared to the original color before treatment.

Conclusions

1. Research analysis has shown that most of the materials used in regenerative endodontic treatment have the potential to discolor tooth tissues. In order to reduce tooth discoloration, before applying a disinfectant paste or barrier material, it is recommended to seal the dentin with a dentin bonding agent and applied a TAP(M) below the cemento-enamel junction. A small number of *in vitro* studies have been conducted on this topic, therefore, further research is warranted.
2. The analysis of the research showed that whitening of discolored teeth after regenerative endodontic treatment is achievable. The internal method was the dominant one, but due to alternative method usage shortfall, it is hard to make a

comprehensive comparison. Similar to difference in bleaching agent usage observed in analyzed studies, there is a wide difference in bleaching duration. Therefore, it is not possible to make a suitable conclusion. For the creation of precise guidelines that would define the appropriate bleaching technique, material, and duration in discolored teeth after regenerative endodontic procedures, further studies are required.

3. Discoloration of tooth tissues after regenerative endodontics is almost inevitable. Tooth discoloration was noticed after single- and two-visit regenerative endodontic procedures, except for the platelet-rich fibrin + MTA Repair HP group. If possible, one-visit regenerative endodontic procedure is suggested; however, if two-visit regenerative endodontics are performed, the use of calcium hydroxide paste as a disinfectant paste is recommended due to the lower discoloration potential of the tooth tissue. Analyzing in the context of discoloration, the use of platelet-rich fibrin and barrier material that does not imply discoloration, e.g. MTA Repair HP cement is recommended. It is worth considering whitening discolored teeth after single- and two-visit regenerative endodontic procedures with calcium hydroxide because it is achievable, but it does not guarantee a return to the original colour. It is not recommended to whiten teeth that have undergone treatment with TAP(M), as the whitening effect will be opposite to the desired effect. Further studies are required to create precise guidelines to define the appropriate whitening technique after regenerative endodontic procedures.

Research hypothesis

1. The study's results were mostly in agreement with the first null hypothesis of tooth discoloration after regenerative endodontic procedures. The first null hypothesis was accepted.
2. The study's results were inconsistent with the null hypothesis and the whitening effect is not always achievable. The second null hypothesis was rejected.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Abuelniel GM, Duggal MS, Kabel N. A comparison of MTA and Biodentine as medicaments for pulpotomy in traumatized anterior immature permanent teeth: A randomized clinical trial. *Dent Traumatol.* 2020;36(4):400-410. doi: 10.1111/edt.12553.
2. Aguiar BA, Frota LMA, Taguatinga DT, Vivian RR, Camilleri J, Duarte MAH, de Vasconcelos BC. Influence of ultrasonic agitation on bond strength, marginal adaptation, and tooth discoloration provided by three coronary barrier endodontic materials. *Clin Oral Investig.* 2019;23(11):4113-4122. doi: 10.1007/s00784-019-02850-y.
3. Akbulut MB, Terlemez A, Akman M, Buyukerkmen B, Guneser MB, Eldeniz AU. Tooth discoloration effects of calcium silicate based barrier materials used in revascularization and treatment with internal bleaching. *J Dent Sci.* 2017;12(4):347-353. doi: 10.1016/j.jds.2017.03.009.
4. Akcay M, Arslan H, Yasa B, Kavruk F, Yasa E. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J Endod.* 2014;40(6):845-848. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.019.
5. Al-Hiyasat AS, Ahmad DM, Khader YS. The effect of different calcium silicate-based pulp capping materials on tooth discoloration: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):330. doi: 10.1186/s12903-021-01677-y.
6. Aldakak MM, Capar ID, Rekab MS, Abboud S. Single-visit pulp revascularization of a nonvital immature permanent tooth using Biodentine. *Iran Endod J.* 2016;11(3):246-249. doi: 10.7508/iej.2016.03.020.
7. Aly MM, Taha SEE, El Sayed MA, Youssef R, Omar HM. Clinical and radiographic evaluation of Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate in revascularization of non-vital immature permanent anterior teeth (randomized clinical study). *Int J Paediatr Dent.* 2019;29(4):464-473. doi: 10.1111/ipd.12474.
8. American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. 2021 [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: <https://www.aae.org/specialty/wp->

content/uploads/sites/2/2021/08/ClinicalConsiderationsApprovedByREC062921.pdf.

9. Antov H, Duggal MS, Nazzal H. Management of discolouration following revitalization endodontic procedures: A case series. *Int Endod J*. 2019;52(11):1660-1670. doi: 10.1111/iej.13160.
10. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30(4):196-200. doi: 10.1097/00004770-200404000-00003.
11. Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod*. 2014;40(8):1172-1177. doi: 10.1016/j.joen.2013.12.027.
12. BioMTA technologies. Physicochemical analysis. [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: www.biomta.com.
13. Camilleri J. Color srycility of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod*. 2014;40(3):436-440. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.040.
14. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract*. 2014;14:70-76. doi: 10.1016/j.jebdp.2014.02.006.
15. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J*. 2012;45(3):294-305. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01978.x.
16. Chng HK, Ramli HN, Yap AU, Lim CT. Effect of hydrogen peroxide on intertubular dentine. *J Dent*. 2005;33(5):363-369. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.012.
17. D'Mello G, Moloney L. Management of coronal discolouration following a regenerative endodontic procedure in a maxillary incisor. *Aust Dent J*. 2017;62(1):111-116. doi: 10.1111/adj.12462.
18. De-Jesus-Soares A, Prado M, Nagata JY, Pini NIP, Cardoso RA, Vargas-Neto J, Figueiredo de Almeida Gomes BP, Lima DAN. Internal bleaching after pulp revascularization using two intracanal medicaments: A case report. *Int J Clin Dent*. 2018;11(2):127-135.

19. Dettwiler CA, Walter M, Zaugg LK, Lenherr P, Weiger R, Krastl G. In vitro assessment of the tooth staining potential of endodontic materials in a bovine tooth model. *Dent Traumatol.* 2016;32(6):480-487. doi: 10.1111/edt.12285.
20. Doumani M, Alotaibi AN, Hussain FA, Alswaed AA, Mandorah AO, Qaddoura KA, Alanazi SM. Internal bleaching of endodontically treated teeth: a dental practitioner's perspective from Kingdom of Saudi Arabia. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(10):1141-1145.
21. European Commission Website. 2020 [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: <https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/cmr-substances/>.
22. Fagogeni I, Falgowski T, Metlerska J, Lipski M, Górski M, Nowicka A. Efficiency of teeth bleaching after regenerative endodontic treatment: a systematic review. *J Clin Med.* 2021;10(2):316. doi: 10.3390/jcm10020316.
23. Felman D, Parashos P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(4):484-487. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.053.
24. Fundaoğlu Küçükkekenci F, Çakici F, Küçükkekenci AS. Spectrophotometric analysis of discoloration and internal bleaching after use of different antibiotic pastes. *Clin Oral Investig.* 2019;23(1):161-167. doi: 10.1007/s00784-018-2422-1.
25. Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J.* 2016;49(10):926-936. doi: 10.1111/iej.12606.
26. General Dental Council, Position Statement on Tooth Whitening. 2016 [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: <https://www.gdc-uk.org/docs/default-source/what-is-the-legal-position/tooth-whitening-position-statement.pdf>.
27. Greenwall-Cohen J, Greenwall L, Haywood V, Harley K. Tooth whitening for the under-18-year-old patient. *Br Dent J.* 2018;225(1):19-26. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.527.
28. Hafez MS, Makhless NA, Abdallah AM, Ibrahim MM. Single visit revascularization of mature teeth using sonic activation protocol (A case series). *Alex Dent J.* 2021;46(3):129-135. doi: 10.21608/adjalexu.2020.38283.1097.

29. Haikal L, Ferraz Dos Santos B, Vu DD, Braniste M, Dabbagh B. Biodentine pulpotomies on permanent traumatized teeth with complicated crown fractures. *J Endod.* 2020;46(9):1204-1209. doi: 10.1016/j.joen.2020.06.003.
30. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001;17(4):185-187. doi: 10.1034/j.1600-9657.2001.017004185.x.
31. Jańczuk Z, Kaczmarek U, Lipski M. *Stomatologia zachowawcza z endodoncją. Zarys kliniczny. Podręcznik dla studentów stomatologii.* Wydanie IV-3 dodruk. Warszawa 2015.
32. Jiménez-Padilla JL, Benavides-Reyes C, Viqueira-Pérez VE, Martínez-Verdú FM, Bolaños MV, Gonzalez-Lopez S. Effect of internal bleaching on the reversal of coronal discoloration induced by triple-antibiotic-paste or Biodentine use in regenerative endodontic procedures. *Color Research & Application.* 2021;47(2):518–527. doi: 10.1002/col.22733.
33. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent.* 2006;34(7):412-419. doi: 10.1016/j.jdent.2006.02.002.
34. Joshi SB. An overview of vital teeth bleaching. *J Interdiscip Dent.* 2016;6(1):3-13. doi: 10.4103/2229-5194.188155.
35. Kahler B, Kahler SL, Lin LM. Revascularization-associated intracanal calcification: a case report with an 8-year review. *J Endod.* 2018;44(12):1792-1795. doi: 10.1016/j.joen.2018.08.009.
36. Kahler B, Rossi-Fedele G. A review of tooth discoloration after regenerative endodontic therapy. *J Endod.* 2016;42(4):563-569. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.022.
37. Kang SH, Shin YS, Lee HS, Kim SO, Shin Y, Jung IY, Song JS. Color changes of teeth after treatment with various mineral trioxide aggregate-based materials: an ex vivo study. *J Endod.* 2015;41(5):737-741. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.019.
38. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: review of literature with a comparative analysis. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(8):ZG01-ZG05. doi: 10.7860/JCDR/2017/25840.10374.
39. Khedmat S, Ahmadi E, Meraji N, Fallah ZF. Colorimetric comparison of internal bleaching with and without removing mineral trioxide aggregate

- (MTA) on induced coronal tooth discoloration by MTA. *Int J Dent.* 2021;2021:8319986. doi: 10.1155/2021/8319986.
40. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010;36(6):1086-1091. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.031.
41. Kim Y, Kim S, Choi N. Regenerative endodontic treatment without discoloration of infected immature permanent teeth using Retro MTA: two case reports. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2014;41(4):335-343. doi: 10.5933/JKAPD.2014.41.4.335.
42. Kirchhoff AL, Raldi DP, Salles AC, Cunha RS, Mello I. Tooth discolouration and internal bleaching after the use of triple antibiotic paste. *Int Endod J.* 2015;48(12):1181-1187. doi: 10.1111/iej.12423.
43. Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B. Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *J Endod.* 2015;41(11):1862-1866. doi: 10.1016/j.joen.2015.07.003.
44. Kwon SR, Wertz PW. Review of the mechanism of tooth whitening. *J Esthet Restor Dent.* 2015;27(5):240-257. doi: 10.1111/jerd.12152.
45. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(10):942-949. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02053.x.
46. Lin LM, Kahler B. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2017;51(3 Suppl 1):S41-S51. doi: 10.17096/jiufd.53911.
47. Madani Z, Alvandifar S, Bizhani A. Evaluation of tooth discoloration after treatment with mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture, and Biodentine® in the presence and absence of blood. *Dent Res J (Isfahan).* 2019;16(6):377-383.
48. Malpani S, Shiraguppi VL, Deosarkar B, Das M, Nagargoje G, Gadge P. Bleaching of discolored teeth: a review. *J Interdiscip Dent Sci.* 2019;8(1):15-22.
49. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus

- and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod.* 2014;40(8):1235-1240. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.044.
50. Marciano MA, Estrela C, Mondelli RF, Ordinola-Zapata R, Duarte MA. Analysis of the color alteration and radiopacity promoted by bismuth oxide in calcium silicate cement. *Braz. Oral. Res.* 2013;27(4):318-323. doi: 10.1590/S1806-83242013000400005.
51. Marin PD, Bartold PM, Heithersay GS. Tooth discoloration by blood: an in vitro histochemical study. *Endod Dent Traumatol.* 1997;13(3):132-138. doi: 10.1111/j.1600-9657.1997.tb00026.x.
52. McCabe P. Revascularization of an immature tooth with apical periodontitis using a single visit protocol: a case report. *Int Endod J.* 2015;48(5):484-497. doi: 10.1111/iej.12344.
53. McTigue DJ, Subramanian K, Kumar A. Case series: management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Pediatr Dent.* 2013;35(1):55-60.
54. Metlerska J, Dammaschke T, Lipski M, Fagogeni I, Machoy-Mokrzyńska A, Nowicka A. Effect of citric acid on color changes of calcium silicate-based cements an in vitro study. *Appl Sci* 2021;11(5):2339. doi: 10.3390/app11052339.
55. Metlerska J, Fagogeni I, Metlerski M, Nowicka A. Vital pulp therapy in aesthetic zone-identifying the biomaterial that reduces the risk of tooth discolouration. *Materials (Basel).* 2021;14(20):6026. doi: 10.3390/ma14206026.
56. Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, Teixeira FB, Vann WF Jr. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr Dent.* 2012;34(1):66-69.
57. Możyńska J, Metlerski M, Lipski M, Nowicka A. Tooth discoloration induced by different calcium silicate-based cements: a systematic review of in vitro studies. *J Endod.* 2017;43(10):1593-1601. doi: 10.1016/j.joen.2017.04.002.
58. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-390. doi: 10.1016/j.joen.2006.09.013.
59. Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST, Mohammadi MM, Dummer PM. The effect of pH on surface

- hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2008;41(2):108-116. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01325.x.
60. Özer SY, Kapısız E. Comparison of walking-bleaching and photon-initiated photoacoustic streaming techniques in tooth color change of artificially colored teeth. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2021;39(5):355-361. doi: 10.1089/photob.2020.4914.
 61. Parthiban G, Karale R, Kumar V, Br P. Tooth discoloration and internal bleaching after the use of triple antibiotic paste for regenerative endodontic treatment of an immature necrotic permanent tooth: a case report. *Dentistry.* 2018;8(12):1-4.
 62. Perchyonok VT, Grobler SR. Tooth-bleaching: mechanism, biological aspects and antioxidants. *Int J Dent Oral Health.* 2015;1(3). doi: 10.16966/2378-7090.116.
 63. Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F. Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. *J Endod.* 2008;34(4):394-407. doi: 10.1016/j.joen.2007.12.020.
 64. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):1-8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2004.00284.x.
 65. Ramezani F, Aryanezhad S, Mohammadian F, Dibaji F, Kharazifard MJ. In vitro microleakage of mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture cement and Biodentine intra-orifice barriers. *Iran Endod J.* 2017;12(2):211-215. doi: 10.22037/iej.2017.41.
 66. Rea FT, Roque ACC, Macedo AP, de Almeida RP. Effect of carbamide peroxide bleaching agent on the surface roughness and gloss of a pressable ceramic. *J Esthet Restor Dent.* 2019;31(5):451-456. doi: 10.1111/jerd.12469.
 67. Rozporządzenie Komisji (UE) 2019/831 z dnia 22 maja 2019. [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0831&from=BG>.
 68. Samorodnitzky-Naveh GR, Geiger SB, Levin L. Patients' satisfaction with dental esthetics. *J Am Dent Assoc.* 2007;138(6):805-808. doi: 10.14219/jada.archive.2007.0269.
 69. Santos LG, Felipe WT, Souza BD, Konrath AC, Cordeiro MM, Felipe MC. Crown discoloration promoted by materials used in regenerative endodontic

- procedures and effect of dental bleaching: spectrophotometric analysis. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(2):234-242. doi: 10.1590/1678-77572016-0398.
70. Serin Kalay T. Effects of intracoronal bleaching agents on the surface properties of mineral trioxide aggregate. *Odontology.* 2019;107(4):465-472. doi: 10.1007/s10266-019-00418-6.
71. Shokouhinejad N, Khoshkhounejad M, Alikhasi M, Bagheri P, Camilleri J. Prevention of coronal discoloration induced by regenerative endodontic treatment in an *ex vivo* model. *Clin Oral Investig.* 2018;22(4):1725-1731. doi: 10.1007/s00784-017-2266-0.
72. Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Pirmoazen S, Shamshiri AR, Dummer PM. Evaluation and comparison of occurrence of tooth discoloration after the application of various calcium silicate-based cements: An *Ex Vivo* Study. *J Endod.* 2016;42(1):140-144. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.034.
73. Shokouhinejad N, Razmi H, Farbod M, Alikhasi M, Camilleri J. Coronal tooth discoloration induced by regenerative endodontic treatment using different scaffolds and intracanal coronal barriers: a 6-month *ex vivo* study. *Restor Dent Endod.* 2019;44(3):e25. doi: 10.5395/rde.2019.44.e25.
74. Slaboseviciute M, Vasiliauskaite N, Drukteinis S, Martens L, Rajasekharan S. Discoloration potential of Biodentine: a systematic review. *Materials (Basel).* 2021;14(22):6861. doi: 10.3390/ma14226861.
75. The Cosmetic Products (Safety) (Amendment) Regulations 2012. [cytowany 7 listopada 2022]. Adres URL: <https://www.legislation.gov.uk/uksi/2012/2263/made>.
76. Timmerman A, Parashos P. Bleaching of a discolored tooth with retrieval of remnants after successful regenerative endodontics. *J Endod.* 2018;44(1):93-97. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.032.
77. Tin-Oo MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health.* 2011;11:6. doi: 10.1186/1472-6831-11-6.
78. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J.* 2018;51(3):284-317. doi: 10.1111/iej.12843.

79. Uesrichai N, Nirunsittirat A, Chuveera P, Srisuwan T, Sastraruji T, Chompu-Inwai P. Partial pulpotomy with two bioactive cements in permanent teeth of 6- to 18-year-old patients with signs and symptoms indicative of irreversible pulpitis: a noninferiority randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2019;52(6):749-759. doi: 10.1111/iej.13071.
80. Venkataraman M, Singhal S, Tikku AP, Chandra A. Comparative analysis of tooth discoloration induced by conventional and modified triple antibiotic pastes used in regenerative endodontics. *Indian J Dent Res*. 2019;30(6):933-936. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_782_18.
81. Viegas CM, Paiva SM, Carvalho AC, Scarpelli AC, Ferreira FM, Pordeus IA. Influence of traumatic dental injury on quality of life of Brazilian preschool children and their families. *Dent Traumatol*. 2014;30(5):338-347. doi: 10.1111/edt.12091.
82. Weiger R, Kuhn A, Löst C. In vitro comparison of various types of sodium perborate used for intracoronary bleaching of discolored teeth. *J Endod*. 1994;20(7):338-341. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80096-8.
83. Yoldaş SE, Bani M, Atabek D, Bodur H. Comparison of the potential discoloration effect of Bioaggregate, Biodentine, and White Mineral Trioxide Aggregate on bovine teeth: in vitro research. *J Endod*. 2016;42(12):1815-1818. doi: 10.1016/j.joen.2016.08.020.
84. Žižka R, Šedý J, Gregor L, Voborná I. Discoloration after regenerative endodontic procedures: a critical review. *Iran Endod J*. 2018;13(3):278-284. doi: 10.22037/iej.v13i3.21271.