

BADANIA SEM, EDS ORAZ DYFRAKCJI RENTGENOWSKIEJ MATERIAŁU MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE W SYMULOWANYCH WARUNKACH KLINICZNYCH

ALEKSANDRA PALATYŃSKA-ULATOWSKA^{1*}, LESZEK KLIMEK^{2,3}

¹ ZAKŁAD ENDODONCJI, KATEDRA STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ, ENDODONCJI I PERIODONTOLOGII UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI, UL. POMORSKA 251, 92-213 ŁÓDŹ

² INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ, UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

³ KATEDRA NAUK PODSTAWOWYCH I KLINICZNYCH UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI, PL. HALLERA 1, 90-647 ŁÓDŹ

* E-MAIL: KLIWIAPU@POCZTA.ONET.PL

Streszczenie

Mineral trioxide aggregate (MTA) jest materiałem, którego zastosowanie wywołuje odpowiedź biologiczną polegającą na regeneracji przyczepu łącznotkankowego tkanek przyzębia oraz odbudowie kości. Jednakże hipoteza wpływu MTA na procesy gojenia i odbudowy tkanek okołożębowych oraz mechanizmu tworzenia cementu korzeniowego pozostaje niejasna. Celem pracy było zbadanie wpływu płynu tkankowego SBF (Simulated Body Fluid) na materiał Pro Root MTA Grey w obecności twardych tkanek zęba. Z 10 zębów byłych uzyskano 20 bloczków cementu korzeniowego. Po opracowaniu próbek i nałożeniu preparatu MTA Grey podzielono je na trzy równe grupy (I, II i III), po 6 próbek każda. Bloczki zębiny z grupy I zanurzono w 0,9% roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl), bloczki z grupy II i III inkubowano w syntetycznym płynie tkankowym (roztwór SBF) odpowiednio przez 2 i 10 miesięcy. Wszystkie próbki umieszczono w temp. 37°C oraz 100% wilgotności. Po okresie inkubacji próbki poddano badaniu w elektronowym mikroskopie skaningowym, wykonano analizę spektroskopową EDS oraz badanie metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Na powierzchniach próbek inkubowanych w SBF stwierdzono obecność związków fosforu i wapnia, jednak nie stwierdzono obecności kryształków hydroksyapatytu.

Słowa kluczowe: Mineral trioxide aggregate, elektronowy mikroskop skaningowy, dyfrakcja rentgenowska, SBF, cementogeneza

[Inżynieria Biomateriałów, 85, (2009), 13-18]

Wstęp

Mineral trioxide aggregate (MTA) jest materiałem mającym zastosowanie w endodoncji w zabiegach wstecznego wypełniania kanałów [1], w naprawach perforacji oraz w leczeniu ubytków resorpcyjnych [2]. Jest wykorzystywany w różnych sytuacjach klinicznych takich jak zabiegi apeksyfikacji [3], w bezpośrednim i pośrednim przykryciu miazgi [4,5], w leczeniu perforacji w miejscach furkacji korzeni oraz innych procedurach chirurgii okolicy zęba [7].

SEM, EDS AND X-RAY DIFFRACTION INVESTIGATION OF MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE PROPERTIES IN SIMULATED CLINICAL CONDITIONS

ALEKSANDRA PALATYŃSKA-ULATOWSKA^{1*}, LESZEK KLIMEK^{2,3}

¹ DEPARTMENT OF ENDODONTICS, CHAIR OF CONSERVATIVE DENTISTRY, ENDODONTICS AND PERIODONTOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, UL. POMORSKA 251, 92-217 LODZ, POLAND

² INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 LODZ, POLAND

³ DEPARTMENT OF BASIC AND PRE-CLINICAL SCIENCE, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, PL. HALLERA 1, 90-647 LODZ, POLAND

* E-MAIL: KLIWIAPU@POCZTA.ONET.PL

Abstract

Mineral trioxide aggregate (MTA) is a material provoking a good biological reaction which may facilitate the regeneration of the periodontal ligament and formation of bone. However, the hypothesis of the dental alveolar healing and cement formation by the application of MTA has not been proven. The purpose of this study was to investigate the probable influence of the Simulated Body Fluid (SBF) on Grey Pro Root Mineral Trioxide Aggregate (GMTA) in the presence of the dental hard tissue. From 10 bovine extracted teeth, 20 samples of hard dental tissue were obtained. After the preparation and application of the GMTA material all of the samples were divided randomly into three groups (I, II, III), of 6 samples each. Dentine blocks in group I were incubated in 0.9% NaCl whilst those in groups II and III were incubated in SBF for 2 and 10 months, respectively, at 37°C, 100% humidity. SEM investigation, energy dispersive spectroscopy elemental analysis (EDS) and X-ray diffraction analysis of the samples were performed. On the surfaces of SBF incubated samples precipitation of phosphorus and calcium was indicated but no hydroxyapatite crystals were found.

Keywords: mineral trioxide aggregate, SEM, X-ray diffraction, SBF, cementogenesis

[Engineering of Biomaterials, 85, (2009), 13-18]

Introduction

Mineral trioxide aggregate (MTA) has been proposed as one of the materials which can be used in endodontics as a root-end filling [1], in perforations and resorptive defect repairs [2]. It is clinically viable material for a wide variety of indications including apexification [3], pulp capping [4,5], furcal perforations [6] and other procedures of periapical surgery [7].

Biocompatibility of periapical tissue with MTA affects its ability to repair and regenerate itself. Many investigations confirmed faster cells growth, increased matrix gene expression in osteoblasts [8] and stimulation of the hard

Biokompatybilność MTA w stosunku do tkanek okółowierzchołkowych ma wpływ na zdolność ich naprawy i regeneracji. Wiele doniesień potwierdza szybszy wzrost komórek oraz zwiększoną ekspresję macierzystego genu w osteoblastach [8] oraz stymulację odkładania tkanek twardych na poziomie wierzchołka korzenia po wypełnieniu kanału materiałem MTA [9]. Według Gandolfi i wsp. [10] MTA jest materiałem o niskiej toksyczności [11], pobudzającym biologicznie aktywny substrat dla komórek kości, oraz stymulującym produkcję interleukin. Także Pelliccioni i wsp. [12] w swoich badaniach *in vitro* wskazują na aktywność MTA w stosunku do komórek indukujących odbudowę kości oraz na fakt, że oddziaływanie to może być częściowo odpowiedzialne za satysfakcjonujący efekt kliniczny. Dwunastomiesięczne obserwacje kliniczne Joffe'a [13] wykazały apozycję nowo uformowanej kości oraz utworzenie periodontium po aplikacji MTA.

Mineral trioxide aggregate posiada dwie specyficzne fazy zawierające tlenki i fosforany wapnia [14,15]. Z tlenku wapnia w obecności płynów tkankowych tworzy się wodorotlenek wapnia [2,16], który jest uwalniany przez MTA. Ozdemir i wsp. spekulują, że dyfuzja jonów Ca^{2+} z MTA może wpływać na pożądany efekt leczenia [9].

Materiał MTA, będący pochodną cementu portlandzkiego, jest biokompatybilny poprzez jego zdolność tworzenia hydroksyapatytu w obecności płynów fizjologicznych [17,18]. Bozeman i wsp. [19] w podsumowaniu swoich badań podają, iż MTA uwalnia jony wapnia oraz, zanurzony w roztworze buforu fosforanowego Phosphate Buffered Saline (PBS), indukuje powstawanie kryształków chemicznie i strukturalnie podobnych do hydroksyapatytu (HA).

Zatem, opierając się na cytowanych danych wykonano badania dyfrakcji rentgenowskiej oraz analizę EDS dla potwierdzenia powyższej hipotezy tworzenia hydroksyapatytu na powierzchni MTA w obecności płynu tkankowego, który to mechanizm może mieć wpływ na lecznicze właściwości tego materiału.

Cel

Celem pracy było zbadanie wpływu płynu tkankowego SBF (Simulated Body Fluid) na materiał Pro Root Mineral Trioxide Aggregate Grey w obecności twardych tkanek zęba poprzez porównanie reakcji chemicznej zachodzącej na powierzchni MTA w kontakcie z 0.9% NaCl i roztworem SBF.

Materiał i metody

10 zębów bydlęcych pocięto na równe 3 części. Z każdego zęba uzyskano 2 bloczki cementu korzeniowego o średnicy i wysokości ok. 10 mm. Następnie przygotowano i nałożono Grey Pro Root Mineral Trioxide Aggregate (Dentsply Tulsa Dental, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę inkubowano przez 12 godzin w temp. 37°C i 100% wilgotności dla stwardnienia materiału. Wszystkie bloczki podzielono losowo na trzy grupy (I, II, III), po 6 prób każda. Bloczki z grupy I zanurzono w 0,9% roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl), bloczki z grup II i III w syntetycznym płynie tkankowym (Simulated Body Fluid SBF) odpowiednio na okres 2 i 10 miesięcy. Skład płynu tkankowego został przygotowany według receptury Kim i wsp. [20]. Próbkę inkubowano w temp. 37°C i 100% wilgotności. Pozostałe dwa bloczki nie były inkubowane i zostały wykorzystane jako próbki kontrolne. Po okresie inkubacji wykonano obserwacje w SEM oraz analizę składu chemicznego badanych próbek. Do badań wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy HITACHI S – 3000N. Użyto powiększeń od powyżej stu do kilku tysięcy razy przy napięciu przyspieszającym 5 kV.

tissue deposition at the apical level after root canal filling in the presence of MTA [9]. According to Gandolfi et al. [10] MTA is a material of low toxicity, which offers a biologically active substrate for bone cells and stimulates interleukines production [11]. Also Pelliccioni et al. [12] in their *in vitro* study indicated that the ProRoot MTA showed a good interaction with bone-forming cells and that this behavior may partially account for its satisfactory clinical performance. Joffe's 12-month clinical recall revealed the apposition of newly formed bone and creation of periodontal membrane after MTA application [13].

Mineral trioxide aggregate has two specific phases, comprising calcium oxide and calcium phosphate [14,15]. Calcium oxide in the presence of tissue fluids forms calcium hydroxide [2,16], which is released by MTA. Ozdemir et al. speculate that this diffusion of Ca^{2+} ions from MTA could yield a desirable clinical effect [9].

MTA material is derived from Portland cement parent compound and has been demonstrated to be biocompatible by its ability to form hydroxyapatite when exposed to physiological solutions [17,18]. Bozeman et al. [19] in their research concluded that MTA releases calcium ions and, when immersed in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution, it induces the crystals formation, chemically and structurally similar to hydroxyapatite HA.

Therefore, on the basis of cited data, the following EDS and XRD microanalysis have been performed to confirm the above hypothesis of hydroxyapatite formation on the MTA in the presence of body fluids, what mechanism might be responsible for healing properties of that material.

Aim

The aim of the present study was to investigate the influence of Simulated Body Fluid (SBF) on Grey Pro Root Mineral Trioxide Aggregate in the presence of the dental hard tissues, and to compare the chemical reaction occurring on MTA surfaces when placed in contact with 0.9% NaCl or SBF in simulated clinical conditions.

Materials and method

Ten bovine extracted teeth were sectioned into three parts. Two blocks of hard dental tissue with the diameter and height of around 10 mm were obtained from each tooth. The Grey Pro Root Mineral Trioxide Aggregate material (Dentsply Tulsa Dental, USA) was prepared according to producer guidelines and was dispensed on the dentine blocks. Samples were incubated for 12 hours at 37°C and 100% humidity for material hardening. All of the blocks were divided randomly into three groups (I, II, III), consisting of 6 samples each. Blocks in group I were placed in 0.9% sodium chloride (0.9% NaCl), whilst samples in group II and III were placed in the Simulated Body Fluid (SBF) for a period of 2 and 10 months, respectively. Composition of the body fluid was prepared according to Kim et al. [20]. The samples were incubated in 37°C and 100% humidity. Remaining two blocks were not incubated and then used as a control. After the period of incubation, SEM investigation and elemental analysis of the prepared samples were performed. A scanning electron microscope HITACHI S – 3000N was used. Magnifications from over a dozen times to several thousand times with accelerating voltage of 5 kV were used. For the better quality of the acquired images, all the blocks were sputtered with a layer of gold. The chemical composition analysis of the precipitates found on the surfaces of the observed samples was conducted in SEM using the Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) method.

W celu poprawienia jakości obserwowanych obrazów, wszystkie białki napyłono warstwą złota. Analizę składu chemicznego precipitatów wykrytych na powierzchni próbek przeprowadzono w SEM przy użyciu metody EDS.

Wcześniejsze wyniki badań [21] wykazały miejsca o zwiększonej koncentracji wapnia i fosforu w badanych próbkach. Ponieważ analiza składu chemicznego metodą EDS nie pozwala jednoznacznie określić rodzaju wytrąconej substancji w pracy tej wykonano badanie dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) przy użyciu dyfraktometru D-500 (SIEMENS), identyfikujące obecne w próbce fazy [22].

Wyniki

Obrazy powierzchni próbek we wszystkich badanych grupach w większości nie różniły się (RYS. 1,2,3). Jednakże, na próbkach MTA inkubowanych w SBF w obu grupach (II i III) zaobserwowano miejsca ze zwiększoną zawartością Ca i P (RYS. 4). Mimo, że czasy inkubacji białek różniły się, za pomocą mikroanalizy składu chemicznego nie wykazano różnic pomiędzy grupami inkubowanymi przez 2 i 10 miesięcy w roztworze SBF.

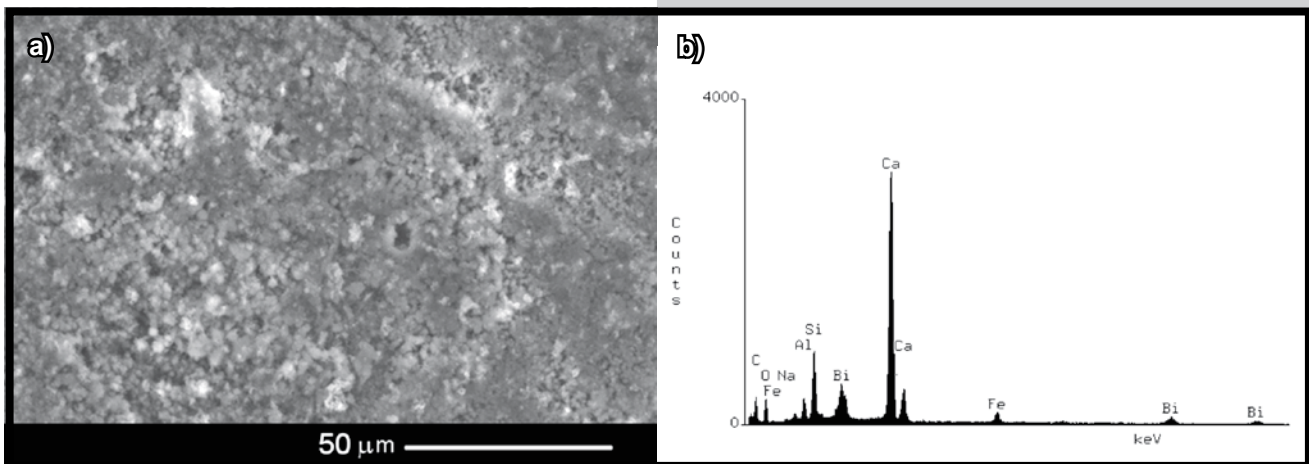
Otrzymane dyfraktogramy widoczne na RYS. 5 obrazują podobny skład fazowy we wszystkich próbkach. Jednakże, we wszystkich białkach zębiny pokrytych MTA wielkości refleksów w każdej próbce są różne.

The earliest EDS analysis [21] had shown the increase of Ca and P concentration on the investigated samples, but EDS analysis does not determine phase composition of the samples. In this study an X-ray diffraction (XRD), using diffractometer D-500 (SIEMENS), was performed to identify the phase composition of the precipitates [22].

Results

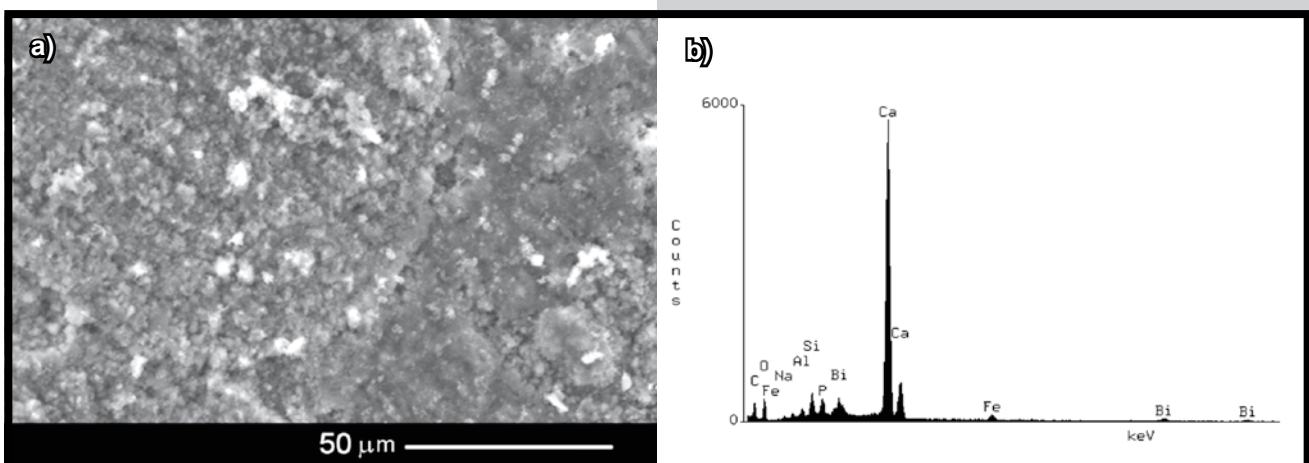
Appearance of samples surfaces in all the investigated groups mostly have not differed from each other (FIG. 1,2,3.) However, on the MTA samples in both groups (II and III) incubated in SBF some sites enriched in Ca and P were observed (FIG. 4). Although the incubation times differed, in the microanalysis of chemical composition between the groups immersed in SBF for 2 and 10 months the differences were not detected.

Obtained diffractograms in FIG. 5 show similar phase composition of all the samples. However, in all the dentin blocks coated with MTA the intensity of the peaks in each sample were different.



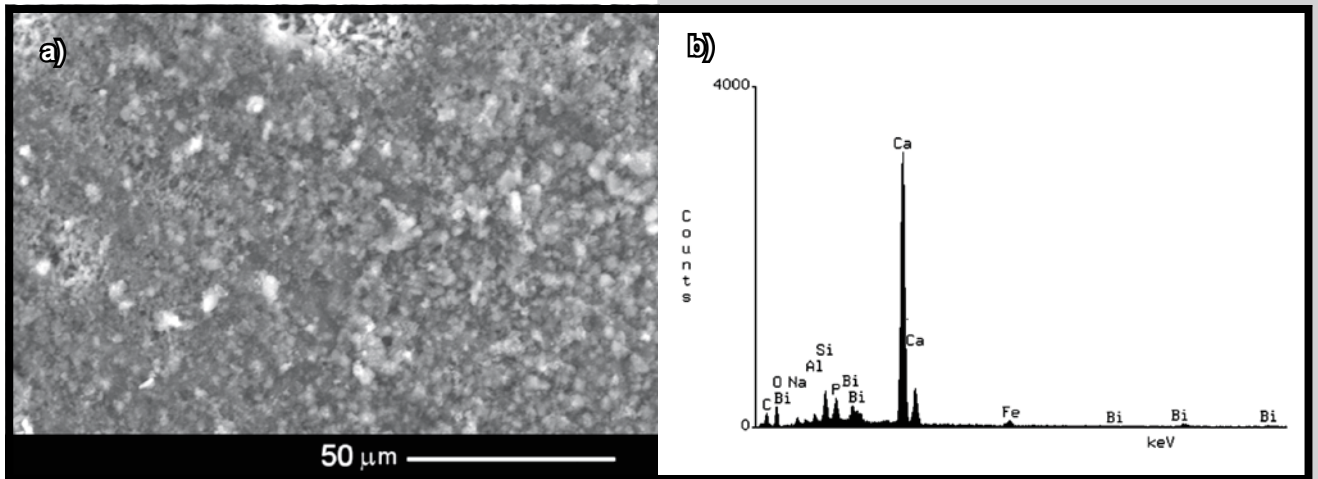
RYS. 1. Obrazy mikroskopowe oraz analiza EDS powierzchni materiału MTA - próbki nieinkubowanej (kontrola); a) obraz SEM, b) analiza EDS składu chemicznego.

FIG. 1. SEM micrographs and EDS spectrograms of the MTA not incubated sample (control sample); a) SEM image, b) chemical EDS analysis.



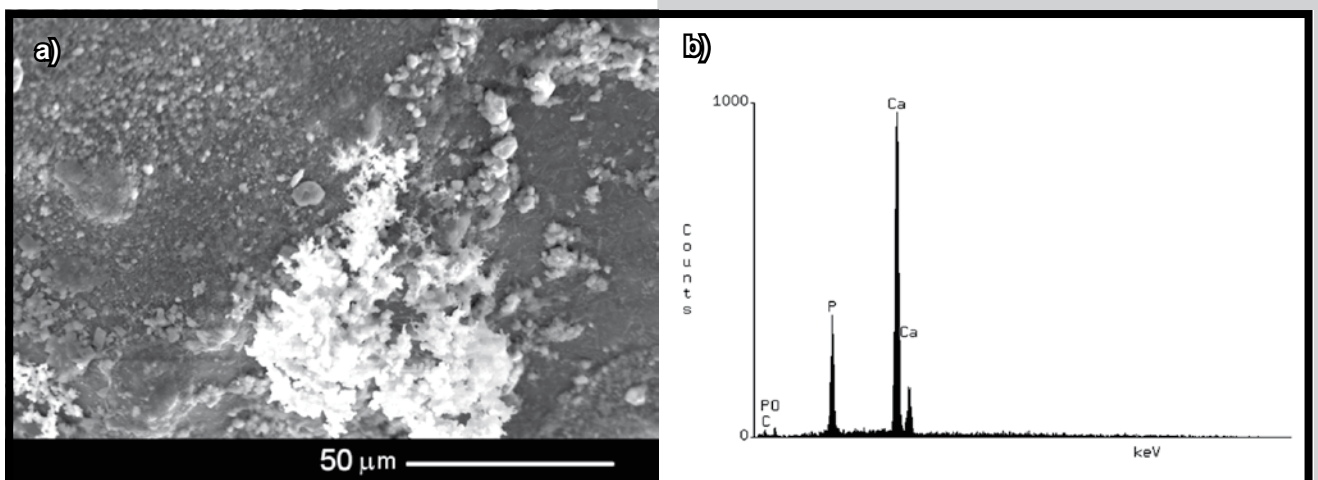
RYS. 2. Obrazy mikroskopowe oraz analiza EDS powierzchni materiału MTA po inkubacji w roztworze 0,9% NaCl po 10 miesiącach; a) obraz SEM, b) analiza EDS składu chemicznego.

FIG. 2. SEM micrographs and EDS spectrograms of the MTA samples incubated in 0.9% NaCl solution for 10 months; a) SEM image, b) chemical EDS analysis.



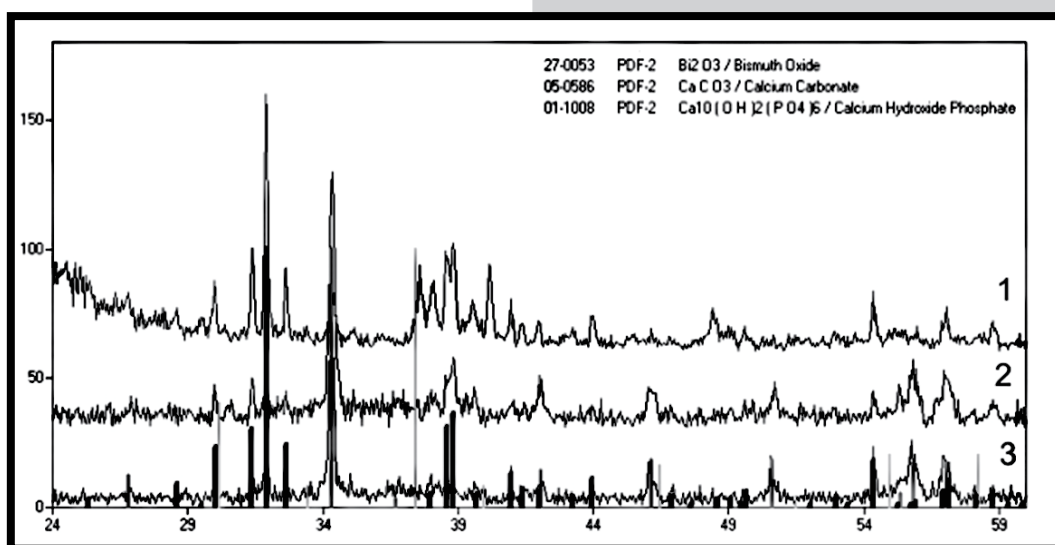
RYS. 3. Obrazy mikroskopowe oraz analiza EDS powierzchni materiału MTA po inkubacji w roztworze SBF po 10 miesiącach; a) obraz SEM, b) analiza EDS składu chemicznego.

FIG. 3. SEM micrographs and EDS spectrograms of the MTA samples incubated in SBF for 10 months; a) SEM image, b) chemical EDS analysis.



RYS. 4. Obrazy mikroskopowe oraz analiza EDS powierzchni materiału MTA po inkubacji w roztworze SBF po 10 miesiącach; a) obraz SEM precipitatu, b) analiza EDS składu chemicznego precipitatu.

FIG. 4. SEM micrographs and EDS spectrograms of the MTA samples incubated in SBF for 10 months; a) SEM image of precipitation, b) chemical EDS analysis of precipitation.



RYS. 5. Dyfraktogramy rentgenowskie materiału MTA po inkubacjach w różnych płynach: 1) próbka kontrolna, 2) po inkubacji w 0,9% NaCl, 3) po inkubacji w roztworze SBF.

FIG. 5. Diffractograms obtained from the MTA samples incubated in different solutions: 1) control sample, 2) incubated in 0.9% NaCl solution, 3) incubated in SBF.

Dyskusja

Obrazy powierzchni materiału MTA po inkubacjach w obu płynach ustrojowych w zasadzie nie wykazują różnicy. Nieco zróżnicowana topografia powierzchni MTA wynika tylko z nakładania materiału na podłoże. Jedynie na próbkach inkubowanych w roztworze SBF występują miejsca bogatsze w wapń i fosfor. Ich ilość jednak jest bardzo niewielka i można przypuszczać, iż praktycznie nie powinny one mieć znaczenia klinicznego. Wydaje się, że czas inkubacji nie miał wpływu na wielkość wytrąconego precipitatu.

Badanie metodą dyfrakcji rentgenowskiej nie wykazało obecności hydroksyapatytu w drugiej i trzeciej grupie. Skład fazowy próbek z grupy III po inkubacji w SBF nie zmienił się w stosunku do tych nieinkubowanych i obu pozostałych grup (I, II). Na podstawie otrzymanych dyfraktogramów widać, że skład fazowy poszczególnych próbek nie wykazuje istotnych różnic jakościowych i jest zbliżony z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [23]. Wykazują oni, że w skład MTA wchodzi głównie wapń, krzem, bizmut i tlen z niewielkim dodatkiem żelaza i glinu [24]. We wszystkich próbkach stwierdzono obecność tych samych faz. Jednak intensywności refleksów w poszczególnych próbkach wykazują różnicę, co wskazuje na różnicę w ilości poszczególnych faz. Także stosunki intensywności refleksów w próbkach wykazują zróżnicowanie, które jest prawdopodobnie wynikiem różnej tekstury materiału uzyskanej podczas nakładania.

Według Tay i wsp. [15], wstępnie utworzona amorficzna faza fosforanu wapnia przekształca się w fazę apatytu i jest kluczowa dla przebiegu biologicznych procesów formowania apatytów w mineralizacji szkieletu. W przeciwieństwie do innych badaczy [15,19,25] wynik przeprowadzonych badań może świadczyć o tym, że kryształki hydroksyapatytu nie powstają, lub jest ich tak mała ilość, że nie można go wykryć zastosowaną metodą XRD. Jeśli nawet hydroksyapatyt jest wytrączany w tak małej ilości prawdopodobnie nie ma to znaczenia biologicznego. Wzbogacenie pewnych obszarów próbki w fosfor może być wynikiem jego adsorpcji z SBF.

Także typ płynu z zawartością fosforu użytego do tego rodzaju badań może mieć wpływ na otrzymane wyniki. W pracach Tay i wsp. oraz Bozeman'a i wsp. użyto Phosphate Buffered Saline (PBS) a nie roztwór Simulated Body Fluid (SBF). Być może potrzebne byłyby szersze rozważania na temat zastosowania obu płynów.

Duża liczba doniesień wskazuje, że MTA stymuluje osadzanie się nowoutworzonego cementu korzeniowego, jednakże autorzy podkreślają znaczenie mechanizmów cementogenezy indukowanych odpowiedzią komórkową ludzkiego organizmu. Tworzenie się cementu korzeniowego poprzez wytrącanie kryształków hydroksyapatytów przez materiał Pro Root Mineral Trioxide Aggregate w obecności płynów tkankowych pozostaje ciągle niejasne.

Wnioski

1. Na powierzchni próbek z materiałem Mineral Trioxide Aggregate umieszczonych w roztworze Simulated Body Fluid zaobserwowano obecność Ca i P.
2. Nie ma znaczących różnic między próbkami inkubowanymi w SBF w obu badanych grupach (II i III). Wydaje się, że przedłużony czas inkubacji nie ma wpływu na ilość wytrąconego precipitatu.
3. Badania dyfrakcji rentgenowskiej nie potwierdziły obecności hydroksyapatytu w badanych próbkach.

Discussion

SEM investigation of the MTA samples after the incubation in different fluids detected almost no differences. Slightly diverse topography of their surfaces can be an effect of material application into the substructure. Only in the SBF incubated samples some sites enriched in calcium and phosphorus are observed. Times of incubation have no influence on the amount of precipitates. We speculate that so small quantity of precipitates practically should not have a clinical significance.

An X-ray diffraction investigation has not indicated the presence of hydroxyapatite in the second and third investigated group. Phase composition of the III group samples after the incubation has not changed in comparison with the control sample and both remaining (I, II) groups. On the basis of the obtained diffractograms phase composition analysis of each sample has not revealed significant qualitative differences and that converge with the results of the other authors [23]. They showed the MTA to be composed primarily of calcium, silicon, bismuth and oxygen with the addition of iron and aluminium [24]. In all the samples the presence of the same phases has been observed. However the intensity of the peaks of the samples were different suggesting different phase composition of the samples. Also the relations of the peaks intensity diverse, what is probably due to the texture of an applied material.

According to Tay et al. [15] an initially formed amorphous calcium phosphate phase transforms to an apatite phase and it plays a key role for biological apatite formation in skeletal calcification. On the contrary to the other researchers [15,19,25], findings of this study may indicate that the hydroxyapatite crystals do not precipitate, or that there is so small quantity of hydroxyapatite that the XRD method cannot detect it. Even if so, that small quantity of HA is not able to induce any biological effect. Phosphorus enrichment in some of the investigated sites of the samples can be the result of its adsorption from SBF. Also a type of the phosphate-containing fluid used in this kind of study may have some implications. Phosphate Buffered Saline (PBS) not Simulated Body Fluid (SBF) has been used in the research of Tay and Bozeman. The wider considerations about the fluid type utility would be necessary.

A large number of studies have shown that MTA stimulates the deposition of a newly formed cementum, although the authors have emphasized the significance of cementogenesis mechanisms induced by human cellular response. Dental cement formation process by producing hydroxyapatite crystals in the presence of tissue fluid by Pro Root Mineral Trioxide Aggregate still remains unclear.

Conclusions

1. On the surface of Mineral Trioxide Aggregate samples placed in the Simulated Body Fluid solution the precipitation of Ca and P was detected.
2. There are no significant differences between samples in both investigated groups immersed in SBF (II and III). It seems that prolonged time of incubation has no influence on the amount of precipitates.
3. X-Ray diffraction analysis has not confirmed the presence of hydroxyapatites in the investigated samples.

Piśmiennictwo

- [1] Torabinejad M. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod* 21 (1995) 603-608.
- [2] Torabinejad M., Hong C.U., McDonald F., Ford T.R.: Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 21(1995) 349-353.
- [3] Shah N, Logani A., Bhaskar U., Aggarwal V.: Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 34 (2008) 919-25.
- [4] Caicedo R., Abbott P.V., Alongi D.J., Alarcon M.Y.: Clinical, radiographic and Histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Aust Dent J* 51(2006) 297-305.
- [5] Aeinehchi M., Eslami B., Ghanbariha M., Saffar A.S.: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 36 (2003) 225-231.
- [6] Yildirim T, Gençođlu N, Firat I, Perk C, Guzel O.: Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100 (2005) 120-124.
- [7] Schwartz R. S. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *I Am Dent Assoc* 130 (1999) 967-75.
- [8] Tani-Ishii N., Hamada N., Watanabe K., Tujimoto Y., Teranaka T., Umemoto T.: Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 33 (2007) 836-839.
- [9] Ozdemir H.O., Ozcelik B., Karabucak B., Cehreli Z.C. Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. *Dental Traumatol* 24 (2008) 70-73.
- [10] Gandolfi M.G., Pagani S., Perut F., Ciapetti G., Baldini N., Mongiorgi R., Prati C.: Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblasts-like cell response. *J Biomed Mater Res A* 87 (2008) 477-486.
- [11] Koh E.T., McDonald T.R., Ford M., Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 24 (1998) 543-547.
- [12] Pellicioni G.A., Ciapetti G., Cenni E., Granchi D., Nanni M., Pagani S., Giunti A.: Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mater Sci Mater Med* 15 (2004) 167-173.

References

- [13] Joffe E.: Use of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) in root repairs. *N Y State Dent J* 68 (2002) 34-36.
- [14] Fridland M., Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod* 29 (2003) 814-817.
- [15] Tay F.R., Pashley D.H., Rueggeberg F.A., Loushine R.J., Weller R.N.: Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod* 33 (2007) 1347-1351.
- [16] Holland R., De Souza V., Nerrym. J., Filho J.A.O., Bernabe P.F.E., Dezane. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 25 (1999) 161-166.
- [17] Roberts H.W., Toth J.M., Berzins D.W., Charlton D.G.: Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent Mater* 24 (2008) 149-64.
- [18] Song J-S., Mante F.K., Romanow W., Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray proroot MTA, white proroot MTA and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 102 (2006) 809-815.
- [19] Bozeman T.B. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod.* 32 (2006) 425-428.
- [20] Kim H.M., Miyazaki T., Kokubo T., Nakamura T. Revised Simulated Body Fluid. *Key Engineering Mat* 192-195 (2001) 47-50.
- [21] Palatyńska-Ulatowska A., Klimek L.: *In vitro* SEM study of the tissue fluid influence on the mineral trioxide aggregate properties – preliminary report. *Pol J Environ Stud* (2008) in press.
- [22] Klimek L. Applications of modern materials engineering methods in biomedical research (in polish). *Praca habilitacyjna*. Lodz (2005).
- [23] Camillieri J.: Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endo J* 41 (2008) 408-417.
- [24] Camillieri J., Montesin F.E., Brady K., Sweeney R., Curtis R.V., Ford T.R.: The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 21 (2005) 297-303.
- [25] Ding S.J., Kao C.T., Hung C. Jr., Huang T.H.: The physical and cytological properties of white MTA mixed with Na₂HPO₄ as an accelerant. *J Endod* 34 (2008) 748 -751.