

투과전자현미경을 이용한 수종의 수복재가 L292세포의 미세구조 변화에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치과보존학교실
임 미 경

Abstract

EFFECT OF SEVERAL RESTORATIVE MATERIALS ON ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF L929 CELLS USING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE

Mi-Kyung Im, D. D. S., M. S. D., Ph. D.

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Wonkwang University

Cytotoxicity of dental restorative materials using cell culture technique has been extensively studied by various quantitative assays. The aim of this study was to investigate the microstructural change of damaged L292 cells which could not be observed with light microscope. Cytotoxic effect of ZOE, Prisma APH(Densply International Inc., U.S.A.), Clearfil FII(Kuraray Co., Japan), Fuji II(GC Co., Japan) and Fuji II LC(GC Co., Japan) on cultured L292 cells were observed.

Irreversible cell damage and cytolysis were found in ZOE and Fuji II groups. In Clearfil FII, mild to moderate cell damage was observed. APH group showed variable cytotoxicity. Moderate cell damage was found in Fuji II LC group. Cytotoxic effects were as follows: A condensation of the chromatin occurred along or adjacent to the inner membrane of the nuclear envelope. The nuclear envelope remained reasonably intact but the contents were partially or completely lost. The cell nucleus contains clusters of markedly electron-dense interchromatin granules. The rough endoplasmic reticulum was dilated. In some mitochondria, matrix was disoriented and fused cristae were discernible. Mitochondrial swelling and woolly appearance were recognized. Large vacuoles and autolysosomes were found in cytoplasm. Some breaks of the cytoplasmic membrane and even cytolysis could be seen in dying cells.

* 본 논문은 1995년도 원광대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌음.

I. 서 론

수복재는 상아질이나 치수등과 같은 생활 조직에 장기간 접촉되므로 이들에 대한 생물학적인 평가가 반드시 필요하다. 수복재의 세포 독성 평가에 있어서 세포와 수복재를 직접 접촉시켜 평가하는 방법은 임상에서 수복재가 사용되는 방법과 다르기 때문에 구강내에서 사용되는 생체재료의 독성 평가에 일반적으로 적용되는 방법과 수복재는 그 평가 방법을 변형하여 적용해야 한다. Tyas¹⁾에 의하여 처음으로 고안된 모델 외동 방법은 수복재의 독성을 평가하기 위하여 개발되었다. 이 방법은 임상에서 사용되는 상황과 유사하도록 고안되었으며 독성 효과는 효소활성을 측정하여 검사하였으며 이후 Meryon²⁾에 의하여 변형 발전되었다. Hume³⁾은 ZOE의 세포 독성에 관한 연구에서 유지질의 방출 뿐 아니라 확산도 상아질에 의하여 영향을 받는다고 하였다. 상아질은 제한된 젖음성을 갖고 있으므로 ZOE의 방출되는 기전인 수화 기전의 속도를 제한한다. 따라서 다른 수복재료의 수용성 성분의 단순한 용해의 속도도 제한할 수 있다.

수복재는 혼합된 직후에 재료에 따라서는 불완전하게 중합된 상태에서 구강내에 충전되므로 임상에서 사용하기 이전에 위해 효과의 가능성을 평가하는 과정이 필수적이다. 대부분의 재료는 혼합된 직후 단기간 동안의 가장 자극성이 강하며 이 기간 동안 부분적으로 반응하거나 반응에 관여하지 않은 성분들이 조직 손상을 유발한다. 그러나 경화된 후에도 재료로부터 유해한 성분이 지속적으로 용출될 수 있다⁴⁾. 수복재의 세포독성에 대한 연구는 주로 세포 배양 방법으로 이루어졌으며 사용된 세포는 사람의 치성 조직에서 기원된 이배수체(diploid)세포보다는 사람에서 기원되지 않은 이수배수체(aneuploid)세포를 대상으로 많은 연구가 이루어져 왔다⁵⁻⁷⁾. 대부분의 생체의 실험 연구는 검사 대상과 세포를 단시간 동안만 접촉시켜 초기 급성 반응을 주로 평가하였다. 최근 Adams⁸⁾에 의한 연구에서 수복재에 대한 독성 평가를 실제 임상에서 사용되는 조건과

유사하도록 사람의 치주인대에서 기원된 세포를 사용하고 milipore filter를 사용한 결과 세포가 수복재와 비교적 장시간 접촉되면 기존의 다른 연구와는 다른 결과를 나타낸 수복재도 있다고 보고하였다.

본 연구는 구강내 외동에서 수복재로 사용되는 Clearfil FII, 화학중합형 글라스아이오노머, 광중합 글라스아이오노머, 광중합형 복합 레진인 Prisma APH 및 임시 충전재로 사용되는 ZOE 등 5가지 재료가 배양된 L929 세포에 대하여 나타내는 독성을 측정하였다. 이들 재료의 독성에 관하여는 기존의 연구에서 충분히 인지되어 왔으나 주로 생화학적인 검사 방법을 통한 효소 활성이나 생존능을 중심으로 정량적으로 연구되어 왔고 세포의 변화에 관한 형태학적인 연구는 광학 현미경을 통한 세포의 전반적인 병적 변화만을 관찰하였다. 따라서 본 연구는 투과전자현미경을 이용하여 각 재료의 추출용액이 L292 세포에 대하여 미치는 독성의 결과로서 나타나는 세포내 각 소기관의 미세한 변화를 관찰하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1) 실험 재료

본 실험에 사용된 수복재료는 ZOE 시멘트, 광중합 복합레진인 Prisma APH(Densply International Inc., U.S.A.), 화학중합 복합레진인 Clearfil FII(Kuraray Co., Japan), 화학중합 글라스아이오노머인 Fuji II(GC Co., Japan), 광중합 글라스아이오노머인 Fuji II LC(GC Co., Japan) 등을 사용하였으며 세포는 영구세포주인 L929세포(한국세포주은행)를 사용하였다.

2) 실험 방법

가) 수복재의 준비

수복재료의 독성평가를 위하여 각 역충전재를 직경이 16mm인 24-well 세포배양용 plate(Corning, NY, U.S.A.)의 바닥으로부터 높이가 약 1.5mm가 되도록 혼합하였다. 수복재를 추출한 용액(이하 추출용액)의 평가를 위하여 혼합직후 배양액 2ml을 첨가하여 37°C, 5% CO₂배양기

에서 24시간 동안 방치하여 독성성분을 추출하였다. 또한 각 재료를 혼합하여 24시간, 1주일간 배양기에 방치하여 경화시킨 후 배양 배지를 첨가하여 24시간 동안 추출하였다. 실험용액은 0.2 μ m(Nalgene, U.S.A.)의 여과주사기(syringe filter)로 여과시킨 후 추출용액으로 사용하였다.

나) 세포의 준비

L292 세포를 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium(MEM)에 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2mg/ml, streptomycin 50ug/ml, penicillin 100u/ml을 첨가하였다. 세포의 충밀도(confluency)가 약 80-90%일 때 계대하여 실험에 사용하였으며, 배양배지는 실험하기 3일과 하루전에 각각 새로운 배지로 교환하였다. 실험 당일에 배양액이 든 75cm² 플라스크의 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였는데 1회 세척시에는 20ml, 2회 세척시에는 10ml을 사용하고 전여액은 파이펫으로 제거하였다. 플라스크 바닥에서 세포를 제거하기 위하여 0.25% trypsin 5ml을 넣고 30초간 실온에 방치한 후 trypsin용액을 버린 후 플라스크를 CO₂배양기에 5분간 방치하였다. 배양액 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 세포를 배양액으로 부유시켜 세포수를 조정하였다.

다) 추출용액을 세포에 첨가

각 수복제당 25cm²의 세포배양용 플라스크 1개씩을 각각 사용하였으며 세포수는 약 5 \times 10⁶으로 조정된 후 플라스크를 배양기에 넣고 1일간 배양하였다. 추출용액을 1ml 첨가한 후 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 0.25% trypsin 5ml을 넣고 30초간 실온에 방치한 후 trypsin용액을 버린 후 플라스크를 CO₂배양기에 5분간 방치하여 세포를 회수한 후 15ml conical tube에 옮기고 1500rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버렸다.

라) 투과전자현미경 관찰

수복제가 배양된 L292세포에 나타나는 독성 효과를 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였

다. 2.5% glutaraldehyde를 플라스크 당 1ml씩 넣어 2시간 동안 전고정하고 pH가 7.2-7.4인 인산완충용액으로 30분에서 1시간 30분 동안 3-6회 정도 세척하였다. 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 후고정한 후 탈수하였다. 탈수 과정은 60%와 70% 에탄올에서 각각 5분간 시행한 후 80%와 90% 에탄올에서 10분간 시행하고 95%와 100% 에탄올에서는 2회씩 15분간 탈수하고 propylene oxide로 15분간 2회 처리하였다. 포매과정은 epon mixture와 propylene oxide의 비율이 1:1로 하여 2시간 처리한 후, 다시 epon mixture와 propylene oxide의 비율이 2:1이 되도록 하여 하룻밤 동안 반응시키고 2시간 동안 epon mixture로 포매를 완결하였다.

35 $^{\circ}$ C에서 12시간, 45 $^{\circ}$ C에서 12시간, 60 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 경화시켰다. 0.35 μ m의 박절편(semi-thin section)한 후 toluidine blue로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하여 투과전자현미경으로 관찰하기에 적절한지를 판단하여 70 nm의 초박절편(ultrathin section)을 제작하였다. 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 세포의 변화를 투과전자현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

III. 실험 성적

L292세포를 배양하여 수복제의 추출 용액을 첨가하지 않은 경우의 세포의 형태는 Fig. 1과 같다. 핵은 세포의 중심부에 위치하였고 세포의 대부분을 차지하였다. 핵막의 형태는 비교적 균일하게 유지되었고 heterochromatin과 euchromatin이 핵내에 각기 산재하였다. 핵내부에는 변연부 chromatin 및 chromatin centre가 관찰되었다. 세포막은 다수의 microvilli가 나타났으며 소소의 vesicle에 이물질이 함유된 양상도 관찰되었다.

Fig 2와 3은 Clearfil즉시균 용액을 첨가한 후 나타난 L292세포의 소견이다. Fig. 2에서 핵은 이중막 구조가 유지되었고 염색질이 변연부로 이동되어 있으나 심한 염색질 농축은 나타나지 않았으며 대조군 세포에 비하여 핵의 크기가

작게 나타났다. 세포질 내부는 사립체가 팽윤되어 다수 나타나며 전자밀도가 강한 양털 모양의 응집 형태도 관찰되었고 내부의 cristae의 배열이 손상되거나 수가 감소되는 등의 변화를 보였다. 또한 세포질 내부는 공포(vacuole)가 다수 관찰되었고 내부에 이물질이 채워진 자가용해소체(autolysosome)로 보이는 구조물도 발견되었다. 세포막의 형태는 microvilli보다는 변연이 불규칙하며 파괴되거나 내부 물질이 외부로 유출되는 변화를 보였다. 배울을 확대한 Fig. 3의 소견에서 팽창된 사립체내에는 cristae의 형태가 변위되고 소실되었으며 전자밀도가 강한 양털 같은 모양을 보였다. 소포체는 팽윤된 형태로 다수 관찰되었다.

Fig 4-6은 화학 중합형 글라스아이오노머를 첨가한 균의 사진이다. Fig. 4에서 핵은 극단적으로 위축되어 크기가 아주 작아진 핵 농축(pyknosis)의 소견을 보였다. 세포질막은 파괴되어 세포는 외형을 유지할 수 없었고 세포의 대부분은 큰 공포로 채워져 있어서 심한 세포 손상을 관찰하였다. 자가용해소체나 부종을 보이는 사립체 및 팽윤된 소포체가 관찰되었다. Fig. 6에서는 다수의 세포를 동시에 관찰하였다. 중앙에 위치한 세포는 세포의 독성이 심하게 나타난 반면 좌, 우측의 세포들은 중앙의 세포에 비하여 손상된 형태가 약하였다. 중앙의 세포와 우측의 세포에서는 핵의 이중막 구조가 파괴되는 양상도 관찰하였다. 3개의 세포 중 2개의 세포의 핵 내부에서 interchromatin granule이 관찰되었다. Interchromatin granule은 군집을 이루어 한 세포내에 3군락 및 1군락이 관찰되었다. 군락을 보이지 않고 산재한 interchromatin granule로 보이는 구조물도 관찰되었으나 본 사진과 같은 낮은 배율에서는 확인하기 어려웠다.

Fig. 7은 즉시군 ZOE를 첨가한 세포 소견이다. Fig. 7은 핵의 말굽화 현상이 심해져서 두 개의 핵으로 보이며 이 사이에 큰 공포가 개재되어 보였다. 핵은 염색질의 변연화가 심하게 나타났고 농축화되어 보였다. 세포질 내부는 세포내 소기관이 심한 손상형태를 보여서 사립체는 부종을 나타내었으며 cristae는 형태가

변형되고 부어있었으며 기질내에 전자밀도가 비교적 강한 양털과 같은 모양이 나타나기도 하였으며 세포막은 이중막의 구조가 파괴되어 심한 세포 손상을 보였다. Fig. 8은 세포질내에는 형태가 일정하지 않은 큰 공포가 다수 관찰하였으며 팽윤된 사립체 및 이들 사립체가 다수 함유된 lysosome형태도 관찰되었다. 세포내 소기관을 확인할 수 없는 비가역적인 세포 손상을 보였다.

Fig. 9와 10은 즉시군 APH를 첨가한 세포의 소견이다. Fig. 9에서는 핵은 세포의 중앙에 위치하였으며 대조군에 비하여 핵의 크기가 작아졌으며 염색질이 변연부로 이동하고 농축된 부위도 나타났다. 핵막은 이중막의 사이 부분이 팽윤된 부분도 관찰되었으며 핵의 형태는 불규칙하였다. 세포질내에서는 팽윤된 사립체가 다수 나타났으며 부종이 되어 팽창된 부위도 보였다. 소포나 공포의 형태는 관찰되지 않았으나 변성된 사립체와 소포체, 기타 이물질을 포함하는 자가용해소체를 보였다. 세포막의 형태는 microvilli가 보존되어 있는 부위도 관찰되었다. Fig. 10은 Fig. 9에 비하여 심한 세포 손상을 보였다. 핵은 대부분의 염색질이 변연부로 이동된 현상을 보였고 크기가 수축되는 핵농축의 현상이 나타났다. 사립체는 다양한 크기로 다수 나타났는데 모두 부종을 보였다. Cristae의 구조가 비교적 잘 보존된 경우도 있었고 방향이 변형된 경우, 파괴된 경우 등 다양한 형태의 손상이 보였다. 내부에 양털 모양의 전자밀도가 강한 형태가 보여 비가역적인 세포 손상을 나타냈다. 소포체는 팽윤되어 구형의 형태로 관찰되었다. 세포질에는 공포가 다수 관찰되었는데 변성된 소포체 및 사립체를 용해하는 자가용해소체가 관찰되었다. Fig. 9와 10을 비교하면 같은 군내에서도 세포 손상이 중등도인 경우로부터 비가역적인 손상을 보이는 경우까지 다양한 정도를 보였다.

Fig. 11과 12는 광중합 글라스아이오노머를 첨가한 소견이다. Fig. 11은 핵의 크기가 대조군에 비하여 크기가 작았으며 염색질의 농축이 핵 변연에 치우쳐서 나타나서 핵의 농축화가 관찰되었다. 사립체에서는 cristae의 형태가

변형되거나 구조가 소실된 형태로 보였다. 이 세포에는 특징적으로 소포체의 팽윤이 광범위하고 크게 나타났으며 큰 공포도 관찰되었다. 세포막의 microvilli 형태는 보이지 않았으며 세포막은 불규칙하고 손상되어 관찰되었다. Fig. 12는 고배율로 세포의 일부분을 관찰하였다. 사립체는 전자 밀도가 강하게 나타나 세포 손상의 정도가 심한 것을 보였다. 소포체는 팽윤되었고 부분적으로 파괴되어 보였으며 이물질이 함유된 큰 공포도 관찰되었다.

Fig. 13은 1일군 Clearfil을 첨가한 균이다. 핵은 세포의 대부분을 차지하여 상당히 크게 나타났으며 핵의 외형은 심하게 불규칙하였고 염색질이 농축된 부위도 관찰되었다. 핵의 이중막은 팽윤되었으며 일부는 연결성이 없이 파괴되었다. 세포질 내부는 다수의 공포 및 변성된 이물질을 다수 함유한 큰 자가용해소체가 나타났다. 세포막은 형태가 불규칙하여 세포가 용해되는 모양을 보였다.

Fig. 14는 1일군 ZOE를 첨가한 균이다. 핵은 염색질의 변연부 이동이 보이고 두 부분으로 나누어 나타났으며 핵막의 이중막 구조도 파괴되어 심한 핵의 손상을 보였다. 사립체는 cristae의 형태가 완전히 파괴되어 양털 모양의 전자밀도가 강한 물질로 채워져 있었다. 공포는 크게 발달되었으며 세포는 완전히 용해되어 세포의 죽음을 보였다.

Fig. 15는 1일군 APH를 첨가한 균이다. 핵은 대부분 농축된 염색질로 채워져 있었고 interchromatin granule이 관찰되었다. 핵의 이중막도 팽윤되었다. 세포질 내부는 공포나 자가용해체로 채워지고 건전한 구조물을 관찰할 수 없었다. 세포막의 파괴로 인해 세포질 내용물이 세포막 외부로 유출되어 세포는 죽은 상태임을 보였다.

Fig. 16은 1일군 광중합 글라스아이오노머를 첨가한 균이다. 핵은 중앙 부위에 염색질의 농축현상 및 이중막의 팽윤을 보였다. 세포질 내부는 비교적 큰 다수의 공포가 나타났으며 공포내에 이물질이 함유된 것도 다수 나타났다. 세포질 전반에 걸쳐 소포체가 다수 관찰되었으며 팽윤된 형태 및 정상적인 형태도 다수

나타났다. 세포막의 일부는 연속성을 상실하여 파괴된 부위도 관찰되었다.

Fig. 17과 18은 7일군 Clearfil을 첨가한 소견이다. Fig. 17에서 핵의 크기는 대조군과 비교시 감소되지 않았으나 핵의 외형이 말굽 형태로 불규칙하게 변형되었다. 세포막은 microvilli가 소실된 외형을 보였다. 세포질 내부는 팽윤된 소포체와 사립체 및 다수의 공포가 보였으나 다른 세포들의 소견에 비하면 세포 손상의 정도는 비교적 비약하였다. Fig. 18은 심한 세포 손상을 보이는 부분을 고배율로 확대하여 관찰한 소견이다. 핵의 이중막의 구조는 유지되었다.

세포질막의 외형은 microvilli가 소실된 부분 및 복잡하게 변형된 부분도 관찰되었다. 소포체는 팽윤되어 구형으로 보였고 이물질을 포식한 자가용해체도 관찰되었다.

Fig. 19는 7일군 화학 중합형 글라스아이오노머를 첨가한 균이다. 핵의 크기는 위축되지 않았으나 염색질을 중앙 부위에서 농축되었다. 세포막은 파괴되어 세포질내 물질이 외부로 개통되어 유출된 상을 보였다. 세포질의 대부분은 큰 공포와 자가용해체로 채워져 세포는 비가역적인 세포 손상 이후에 세포의 죽음을 반영하였다.

Fig. 10과 21은 7일군 ZOE를 첨가한 균이다. Fig. 20에서 핵의 이중막 구조는 명확하지 않으며 막 구조가 파괴된 부위도 관찰되었다. 세포막은 완전히 파괴되었고 세포의 내부는 변성된 세포내 소기관과 공포로 가득 채워져 있어서 세포의 비가역적인 심한 손상 소견을 보였다. Fig. 21에서는 핵은 염색질의 변연 이동을 보였으며 핵막이 파괴되어 핵의 용해를 보였다. 세포질 내부는 변성된 세포 소기관과 공포로 가득 채워져 있었으며 세포막의 구조도 완전히 파괴되어 세포의 용해를 관찰하였다.

Fig. 22와 23은 7일군 APH를 첨가한 균이다. Fig. 22에서 핵은 염색질의 변연부 이동을 나타내지 않았으나 염색질의 농축 부위가 중앙에 위치하였으며 핵막의 구조는 유지되었다. 세포 외형은 유지되었으며 세포내에는 다소 팽윤된 소포체 및 사립체가 발견되었다. 비교적 정상

적인 구조를 가진 소포체도 나타나 세포 손상의 정도는 중등도였다. Fig. 23에서는 Fig. 22에서와 같이 핵막 구조는 건전하고 핵의 변연부 이동은 나타나지 않았으나 중심부에 염색질의 농축이 강하게 나타났다. 그러나 Fig. 22의 소견과는 달리 세포질에는 큰 공포나 이물이 채워진 자가용해체가 나타나 Fig. 22보다는 심한 세포 손상을 관찰하였다. 소포체 및 사립체의 부종도 심하게 나타났다. 사립체는 팽윤되어 나타나고 crissae는 소실되거나 형태가 변형되어 나타났다. 또한 사립체의 내부에 구름이 낀 것 같은 형태의 부종(cloudy swelling) 및 기질의 밀도도 증가되어 보였다.

Fig. 24는 7일군 광중합형 글라스아이오노머를 첨가한 군이다. 핵은 불규칙한 형태를 보였으나 핵막의 형태는 유지되었다. 세포질에는 공포가 관찰되었으나 기타 세포내 소기관의 형태를 확인할 수 있어서 세포의 손상은 가역적으로 판정되었다.

IV. 총괄 및 고찰

수복재의 독성을 평가하기 위해서 사용된 연구방법으로는 치아에 와동을 형성하여 수복재로 충전한 후 조직학적인 변화를 관찰하는 방법을 사용하였다. 이 경우 여러가지 인자가 영향을 미친다. 잔존 상아질의 두께는 수복재의 화학적인 독성과 유사한 치수 독성을 보이는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 상아질은 여러 분자의 침투에 대한 확산의 장벽으로 작용한다^{10,11)}. 또한 재료 중의 독성 성분이 상아질과 반응하여 결합한다고 보고되기도 하였다. 도말층도 독성에 영향을 미치며 재료를 충전하기 전에 산으로 도말층을 제거한 경우에서는 심한 염증 반응을 유발하였다¹³⁻¹⁵⁾. 그러나 건전한 도말층도 세균의 외독소 등을 포함한 여러가지 물질에 대하여 다양한 정도의 투과성을 보이므로 도말층의 효과를 단정적으로 설명하기는 어렵다¹⁶⁾. 재료와 와동벽 사이의 계면에서 발생하는 세균의 미세누출도 중요한 요소이다. 재료가 충전된 와동의 변연에서 세균의 미세누출과 치수 염증 정도와는 상관성이 있음이 보고되

었다¹⁸⁾. 재료의 독성 성분의 유출에 대하여는 구강내에서 사용되는 재료는 경화된 직후 뿐 아니라 경화반응이 완결된 후에도 재료로부터 용출되어 타액이나 상아 세관액으로 들어갈 수 있으며 불소가 포함된 수복재인 규산시멘트나 글라스아이오노머 시멘트 및 일부 아말감에서 불소가 이들 수복재로 충전된 와동의 주변에서 관찰되었으며 저작 기능 동안 수은이 구강내로 방출된다고 알려진 바 있다¹⁹⁻²³⁾.

일반적으로 생체의 실험과 생체내 실험결과는 상호 상관성이 없으며 여러 비교연구가 이를 검증하였다^{24,25)}. 생체의 실험 방법은 예민하여 결과의 신뢰성이 떨어지며 그 이유는 검사하는 재료와 대상으로 하는 세포와의 최대한 접촉되도록 고안되었기 때문이다. 임상적인 상황에서 이는 불가능하며 따라서 세포 독성 검사는 독성 검사의 초기단계의 검사로서만 작용되고 있다. 특히 수복재의 경우는 세포 독성 검사의 결과가 실제 임상에서 적용한 경우와 상관성이 없는 경우가 많아서 Neryon의 모델 와동 방법²⁶⁾과 Hume의 치아 와동 방법^{27,28)}은 이를 보완하여 임상과의 상관성을 증진시키고자 하였다. Meryon²⁹⁾이 모델 와동 방법으로 상아질을 매개한 경우와 매개하지 않은 경우로 비교하여 아말감을 비롯한 9종의 수복재의 독성을 BHK-21 세포주를 이용하여 검사하였다. 상아질을 매개하지 않은 경우는 아말감, 복합레진인 Concise, ZPC와 규산시멘트인 Silicap이 세포독성을 보이지 않았고, 글라스아이오노머인 Chembond, ASPA, Chemfil 등 3종과 Poly-F Plus 및 ZOE는 세포 독성을 나타내었다. 그러나 상아질을 매개하면 Chembond와 ZOE만이 유의한 세포독성을 보였다. 또한 상아질의 두께와 충전에 따른 세포 독성 효과를 차이로 연구하여 상아질의 두께가 클수록 ZOE의 세포독성은 감소하였으나 Chembond에는 차이가 없다고 보고하였다. 따라서 세포의 독성은 잔존 상아질과 이의 두께에 영향을 받는다.

전자 현미경 표본하에서 핵은 광학 현미경 하에서 보이는 둥글고 일정한 형태가 아닌 다소 불규칙한 형태로 나타난다. 그 이유는 전자 현미경 표본을 제작하기 위해서는 초박절편을

만들어야 하므로 작은 돌출부나 함몰부가 이차원적으로는 크게 나타나며 광학현미경하에서는 이들이 서로 겹쳐져서 상쇄되어 보이기 때문이다. 핵의 형태가 복잡한 것은 세포의 성숙이나 노화 현상과 연관된다^{30,31}. 또한 대사 활동이 왕성한 경우에도 핵의 형태가 복잡하여 암세포에서는 핵의 형태가 복잡하게 나타난다³². 두 종류의 염색질(chromatin)이 세포간기(interphase)의 핵내에서 발견된다. 농축되고 불활성 형태가 heterochromatin이며 전자 현미경 표본에서는 전자가 강한 불규칙한 과립 형태로 보인다. euchromatin으로 불리는 활성 형태는 핵질내에 분산되어 있으며 전자 현미경 표본에서 명확히 확인하기 어렵다. Euchromatin은 DNA와 RNA의 합성이 활발한 반면 heterochromatin은 복제나 전사의 주형으로서 작용하지 않는다³³. 세포의 괴사는 세포가 죽게 되는 치명적인 손상 이후에 나타나는 세포의 형태 변화를 지칭할 때 사용되는 용어이다. 세포가 괴사되면 핵은 핵 농축(pyknosis), 핵 붕괴(karyorrhexis) 및 핵 용해(karyolysis)와 같은 형태학적 변화를 보인다. 핵 농축은 핵의 수축과 염색질의 농축되는 현상이며 핵 용해는 염색질이 응집되고 다수의 피를 형성하는 현상을 의미한다. 핵 붕괴는 핵막은 비교적 건전하나 내용물이 부분적으로 혹은 전체적으로 소실되면서 후에 핵막이 터지면서 용출된다. 일반적으로 괴사되는 세포에서는 염색질의 변연부 이동이 관찰되며 이 경우 염색질은 핵막의 내부를 따라서만 존재하고 다른 부위에서는 나타나지 않는다. 이러한 농축 현상은 전자 현미경 표본에서는 핵막을 따라서 혹은 인접하여 완전한 원형이나 초생달과 같은 괴사 혹은 핵의 변연부에 염색질의 불규칙한 덩어리로서 관찰된다. 염색질의 변연부 이동은 세포를 죽게 하는 비가역적 손상 후에 핵에 나타나는 아주 초기의 변화로 생각된다^{34,35}. Interchromatin granule은 전자 밀도가 아주 강하며 직경은 15-20nm이며 모난 형태가 많다. 핵질내에 뭉쳐져서 나타나기도 하지만 과립이 한 개나 한 줄로 늘어선 형태로 나타나는 형태도 흔하다³⁶. Interchromatin granule은 여러 종양 세포에서 많이

나타난다고 보고되었다³⁷.

병적 상태에서의 사립체의 변화는 위해 자극에 의하여 손상된 세포내 소기관을 제거하기 위한 정상적인 기전으로서 받아들여지고 있으며 사립체의 pyknosis 및 부종, cytolysosome형성 및 intracisternal sequestration의 현상으로 나타난다. 사립체의 부종은 뿌연 상태로 나타나며 그 반대의 형상인 pyknosis는 기질의 밀도가 증가하고 크기가 감소한다³⁸. 이러한 pyknosis는 미소체(microbody)와 비슷한 형태를 보이며 실제 미소체로 인식된 경우도 있었다³⁹. 어떤 경우 소포체는 확장되지 않고 대부분의 사립체는 부은 소견이 보이지 않지만 핵은 심한 염색질의 변연부 이동을 보인다. 따라서 이는 잘 알려진 세포질의 변화인 광학 현미경하에서의 소포체의 팽창과 소립화 및 사립체의 부종이 항상 염색질의 변연부 이동보다 먼저 일어나는 것은 아니라는 것을 의미한다. 소포체의 팽창과 사립체의 부종 및 미약한 정도의 염색질의 변연부 이동은 가역적인 세포의 손상이다. 따라서 이러한 변화가 항상 치명적인 손상이나 세포의 죽음을 시사하지는 않는다. Myagkaya 등⁴⁰은 세포가 치명적인 손상을 받거나 죽은 세포에서는 사립체내에 양털모양의 덩어리가 미약한 정도에서는 사립체의 크기가 약간 증가하고 기질이 엷어져서 밀도가 감소되어 확인하기 어렵다고 하였다. 그러나 cristae는 변연부로 이동되고 방향이 바뀌고 짧아지고 그 수가 감소된다. 이러한 초기에서 기질은 좀 더 창백하지만 균질적인 특성을 갖는다. 그러나 수화가 진행되면 다수의 전자밀도가 약한 점이 생겨 patchy와 같은 모양을 보인다. 기질의 밀도 소실이 처음에는 회색에 의하지만 후에는 기질 물질의 소실 때문이다. 사립체막의 파괴가 보이며 특히 사립체의 부종이 심한 경우 나타난다. 사립체내에 양털 모양이 보이는 현상은 변성된 사립체 기질 단백질이나 파괴된 cristae로부터 방출된 단백질과 지방의 침전물로 받아들여지고 있다. 그러나 상당한 양의 사립체에서 이러한 현상이 나타나야 비가역적 손상으로 인정한다⁴¹. 예를 들어 몇 개의 사립체에서는 이러한 양털 모양이 나타나지만 나머지 사립체에서는 정상

적인 구조가 보이면 가역적인 손상이다.

본 연구에서 적용한 방법은 각 수복재를 혼합한 즉시 나타내는 초기의 독성 및 경화된 이후인 즉 24시간이 경과된 후에 나타내는 독성 및 일주일이 경과하여 나타내는 독성에 차이가 있는지를 비교 관찰하였다. 용매로 사용한 세포 배양용 배지는 대조군과 비교가 가능하기 위하여 사용하였다. 수복재의 독성을 평가하고자 할 때에는 수복재가 치수내의 세포와 직접 접촉되는 것이 아니므로 수복재와 재료를 직접 접촉시키는 이전의 연구 방법은 최근에는 더 이상 받아들여지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 와동내에서 충전된 경우 구강액에 의하여 용출되는 성분이 상아세관의 경로를 거쳐서 치수내로 작용할 수 있을 것이라는 가정하에 배양 배지로 24시간 동안 용출된 성분을 실험 용액으로서 사용하였다. 이는 방법론적인 측면에서 상아질편을 매개하여 이루어진 연구와 같은 정교한 방법에 비하면 세포 배양 배지가 가능한 독성 성분을 모두 용출할 수 있는지 또는 이들 성분의 농도가 적절한지의 여부 및 용출 시간이 적절한지에 대한 확인이 필요할 것이다.

Clearfil의 즉시군, 1일군 및 7일군의 소견을 각각 비교하면 즉시군과 7일군에서는 핵막의 형태가 비교적 균일하게 유지되고 염색질의 농축도 심하지 않았다. 세포질내 팽윤된 소포체 및 다양한 크기의 공포도 관찰되었으나 기타 세포내 소기관의 형태 특히 사립체의 구조를 확인할 수 있어서 세포 손상이 비교적 미약함을 보였다. 1일군 세포는 1일군 중에서 비교적 심한 세포의 손상을 보인 것을 촬영하였다. 핵의 변화는 외형이 변형되었으나 이중막의 구조는 유지되었고 세포내에 큰 공포가 발견되어서 중등도의 세포 손상을 보였다. 그러나 1일군의 모든 세포에서 이러한 심한 손상을 보이지는 않았다. 세포 손상의 정도가 각 실험군의 모든 세포에서 일정하게 나타나는 것은 아니며 이는 화학 중합형 글라스아이오노머 실험군에서 두드러지게 나타났다. Fig. 6에서는 3개의 세포가 보이며 중앙에 위치한 세포에서는 핵질내의 interchromatin granule이나 큰 자가용해소체가 보이는 구조물이 있어서 세포의 손상이 심하

지만 주변의 2개의 세포는 각기 손상의 정도가 중등도와 미약한 정도로 다양하였다. 그러나 전반적으로 화학 중합형 글라스아이오노머 실험군에서는 세포막이 파괴되는 등의 심한 양상을 보였다. 핵막과 세포막이 모두 파괴되었으며 세포질의 내부는 형태를 확인할 수 없는 구조물과 공포들로 가득 채워져 있었다. APH는 비교적 정상으로부터 세포막의 파괴와 핵의 수축에 이르기까지 다양한 손상을 보였다. 본 실험에서는 비교적 손상이 심한 세포를 중심으로 관찰하였으므로 이 세포군에서는 손상의 정도가 ZOE나 화학중합형 GI보다는 미약한 것으로 사료되었다. 광중합형 글라스아이오노머에서는 Fig. 11에서는 특징적으로 사립체가 크게 팽윤되어 관찰되었으며 세포내에 다수의 공포와 부종을 보이는 소포체가 관찰되어 중등도의 세포 독성을 보였다. 광학 현미경을 통하여 세포의 전반적인 형태를 관찰한 후 전자현미경 표본 제작을 위한 고정 과정을 시행하였다. 즉시군에서 세포의 손상이 가장 심하게 나타났다. 화학 중합형 글라스아이오노머와 광중합형 글라스아이오노머는 세포의 소견이 대조군과 거의 비슷하여 세포는 비교적 정상적인 형태를 유지하여 광학 현미경상으로는 세포 독성 효과를 관찰할 수 없었다. 반면 APH군에서는 개개 세포의 형태는 비교적 정상적인 형태를 유지한 경우가 대부분이었으나 세포간 간격이 다수 관찰되었다. Clearfil군은 세포의 밀집도는 APH에 비하면 비교적 정상 상태를 유지하였으나 각 세포의 형태가 일그러진 경우가 대부분이었다. 또한 가장 심한 세포 독성 효과를 나타낸 ZOE군은 세포의 형태가 등글어져 있고 바닥에서 떨어져 있었다. 전자현미경 사진에서 나타난 바와 같은 심한 세포 손상을 보인 ZOE가 첨가된 세포군의 경우는 7일군에서도 세포의 부착 상태가 현저히 저하되어 trypsin등으로 처리하지 않아도 세포가 거의 모두 바닥에서 떨어지는 등의 심한 세포의 손상을 관찰할 수 있었다. 그러나 전자현미경을 위한 한 시편내에서 관찰되는 모든 세포가 그 손상의 정도가 완전히 일치되는 것은 아니었다. 극심한 세포 손상을 보이는 경우는 대부분의

세포가 세포막의 파괴등을 보이는 형태로 일치되었으나 중등도의 손상을 보이는 경우에 있어서는 손상된 세포 및 비교적 건강한 상태의 세포 형태를 유지하는 경우도 있었다. 이러한 관점에서는 개개 세포 손상의 정도를 비교 평가하는 것도 중요할 뿐 아니라 손상된 세포와 비교적 건전한 세포의 비율도 반영하여야 하며 반드시 광학 현미경이나 기타 세포 독성 검사에 사용되는 기법들을 동시에 적용하여야 정확한 세포 손상을 평가하는 척도로서 전자현미경 관찰 방법을 적용할 수 있을 것이라고 사료되었다.

본 실험에서 사용된 5가지의 모든 재료들은 현재 와동내에서 임상적으로 사용되는 재료로서 실험의 결과로서 나타난 바와 같은 인체내에서 유해성이 아직까지는 보고된 바 없다. 그 중 ZOE는 세포 독성이 강한 대표적인 재료로 보고되어 왔으나 이는 실험실에서 적용되는 실험 방법의 일치된 결과이며 실제 임상적으로는 광범위하게 사용되고 있다. 이러한 관점에서 수복재의 세포 독성을 평가하는 기존의 연구 방법 뿐 아니라 본 실험에서 적용한 방법도 각 수복재의 독성을 정확히 반영한다고 볼 수는 없을 것이다. 그러나 세포 독성의 검사가 기존의 재료에 대한 재평가라는 측면보다는 새로운 재료를 임상에 적용하고자 할 때 이미 독성의 정도가 알려져 있고 임상에서 오랜 기간 동안 사용된 재료와 비교하여 그 새로운 재료의 독성의 정도를 비교하여 장차 사용 가능성을 확인하기 위한 부가적인 사용 검사 등을 계속할 수 있는가를 결정하는 중요하고도 필수적인 단계로서 계속 그 중요성을 유지할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 적용한 세포의 미세구조 변화를 관찰하는 기법은 세포 독성 검사를 적용시 가장 기본이 되는 역상 현미경을 통한 세포의 독성 효과는 미약한 손상과 심한 세포 손상을 명확히 관찰되나 중등도의 손상의 경우에는 관찰하기 어려운 점을 보완하는 방법으로서 사용하였다. 또한 각 실험에서 적용한 독성 검사의 방법이 달라서 각 연구자의 결과를 상호 비교하기 어려운 세포 독성 검사의 단점을 보완할 수 있을 뿐 아니라 한 연구자에 의하여

수행된 연구에서도 각 검사 방법마다 독성 검사의 결과가 다를 때 이들을 비교시 유용할 것이다. 전자 현미경을 통한 관찰로서 세포내 각 기관 중 특정하게 어떤 부위가 손상을 일으키는지를 관찰 가능하므로 추후 독성 물질에 의한 손상의 기전을 파악하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

V. 결 론

수복재가 나타내는 세포 독성을 평가하기 위하여 수복재의 추출 용액이 배양한 L929 세포에 대하여 미치는 세포독성 효과를 관찰하였다. 심한 세포의 손상은 광학 현미경하에서도 판정되나 세포가 중등도나 미약한 손상을 보이는 경우에 광학현미경하에서 관찰하기 어려운 세포내 각 소기관이 나타내는 변화를 투과전자현미경으로 관찰하였다. 수복재로는 ZOE, 광중합 복합레진인 Prisma APH, 화학중합 복합레진인 Clearfil FII, 화학중합 글라스아이오노머인 Fuji II, 광중합 글라스아이오노머인 Fuji II LC 등 5종을 사용하였으며 세포는 영구 세포주인 L929 세포를 사용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Clearfil FII는 3가지군 모두에서 세포 손상의 정도가 다양하여 미약한 정도에서 중등도로 나타났다. 화학중합형 글라스아이오노머는 세포내 큰 공포가 형성되고 세포막이 파괴되는 등 3가지군에서 모두 심한 세포의 손상을 보였다. ZOE는 3가지군 모두에서 핵의 농축 및 세포질내 공포 형성과 세포막이 파괴되는 등의 변화를 보여 세포의 비가역적인 심한 손상을 보였다. APH는 세포의 정상적인 구조가 유지되는 경우부터 세포막의 파괴가 나타나는 등의 심한 세포 변화에 이르기까지 다양한 세포의 변화를 보였다. 광중합형 글라스아이오노머는 3가지군 모두에서 중등도의 세포독성을 보였다. 각 세포에서 독성 변화로 나타난 소견으로는 핵의 변연부로 염색질이 이동되거나 외형이 불규칙한 형태로 나타나고 핵이 농축되거나 핵막이 파괴된 소견도 관찰되었다. 세포체에서 cristae의 배열 방향이 바뀌고 수가 감소되거나

소실되며 양털모양의 전자밀도가 강한 현상이 나타나고 전반적인 부종이 관찰되었다. 사립체는 확장된 소견을 보였으며 세포내 공포가 다수 형성되고 이물을 포함한 거대한 자가용해체가 관찰되기도 하였다. 세포막은 연결성이 소실되거나 이중막의 구조가 완전히 파괴되어 세포의 용해 현상도 관찰되었다.

참고 문헌

1. Tyas MJ : A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 56 : 1285, 1977.
2. Meryon SD and Browne BM : Test methods for assessing the cytotoxicity of dental restorative materials using an in vitro model cavity system. In *Ceramics in Surgery* (ed.P. vincenini), pp127-35, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1983.
3. Hume WR : An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zine oxide-eugenol mixtures. *J Dent Res* 63 : 881, 1984.
4. Browne RM : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role ? *Int Endod J* 21 : 50, 1988.
5. Browne RM : In vitro cytotoxicity study testing of dental restorative materials. *CRC Critical Reviews in biocompatibility* 1 : 85, 1985.
6. Hensten-Pettersen A : Comparision of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 21 : 89, 1988.
7. Wennberg A : Cell culture in the biological evaluation of dental materials : a review. *Alternatives to Laboratory Animals* 13 : 194, 1986.
8. Adams AM, Soames JV and Searle RF : Cytotoxicity studies of dental restorative materials using human periodontal ligament cells in vitro. *Int Endod J* 27 : 171, 1994.
9. Browne RM, Tobias RS, Crombie IK and Platn CG : Quantification of the histological features of pulpal damage. *Int Endod J* 13 : 104, 1980.
10. Pashley DH, Michelich V and Kehl T : Dentine permeability : effects of smear layer removal. *J Pros Dent* 46 : 531, 1981.
11. Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derson ME and Kalathoor SE : Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol* 32 : 519, 1987.
12. Meryon SD : The influence of dentine on the in vitro cytotoxicity testing of dental restorative materials. *J Biomed Mat Res* 18 : 771, 1984.
13. Vojinovic O, Nyborg H and Brannstrom M : Acid treatment of cavities under resin fillings : bacterial growth in dentinal tubules and pulpal reactions. *J Dent Res* 52 : 1189, 1973.
14. Ericksen HM : Pulpal response of monkeys to a composite resin cement. *J Dent Res* 53 : 565, 1974.
15. Stanley HR, Going RE and Chauncey HH : Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Ssso* 91 : 817, 1975.
16. Bergenholtz G and Lindhe J : Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 83 : 153, 1975.
17. Bergenholtz G : Effect of baterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Det Res* 85 : 122, 1977.
18. Browne RM, Tobias RS, Crombit IK and Plant CG : Bacterial microleakage and pulpal inflammation in experimental cavities. *Int Endod J* 16 : 147, 1983.
19. Swartz ML, Philips RW, Clark HE, Normal RD and Potter R : Fluoride distribution in teeth using a silicate model. *J Dent Res* 59 : 1596, 1980.

20. Souganidis DJ, Athanassouli TMN and Papastathopoulos DS : A study of *in vitro* fluoride uptake by dental tissues from fluoride-containing silver amalgams. *J Dent Res* 60 : 105, 1981.
21. Tveit A and Totdal B : Fluoride uptake by cavity walls from fluoride-containing amalgam *in vitro*. An electron microprobe analysis. *Acta Odntol Scand* 39 : 107, 1981.
22. Gay DD, Cox RD and Reinhardt JW : Chewing releases mercury from fillings. *Lancet* 1 : 985, 1979.
23. Sware CW, Peteraen LC and Reinhardt JW : The effect of dental amalgams on mercury levels in expired air. *J Dent Res* 60 : 1668, 1981.
24. Mjor IA, Hensten-Pettersen A and Skogedal O : Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture technique, implantation tests and pulp studies. *Int Endod J* 27 : 124, 1977.
25. Wennberg A, Mjor IA and Hensten-Pettersen A : Biological evaluation of dental restorative materials-a comparison of different test methods *J Biomed Mat Res* 17 : 23, 1983.
26. Meryon SD and Browne RM : Evaluation of the cytotoxicity of four dental cements *in vitro* assessed by cell viability and enzyme cytochemistry. *J Oral Rehab* 10 : 363, 1983.
27. Hume WR : A new technique for screening chemical toxicity to the pulp of dental restorative materials and procedures. *J Dent Res* 64 : 1322, 1985.
28. Hume WR : Methods of assessment *in vitro* of restorative material cytotoxicity using an intact human dentine diffusion step. *Int Endod J* 21 : 85, 1988.
29. Meryon SD : the model cavity method incorporating dentine. *Int Endod J* 21 : 79, 1988.
30. Barnett CH, Cochrane W and Palfrey AJ : Age changes in articular cartilage of rabbits. *Ann Rheum Dis* 22 : 389, 1963.
31. Kleinfeld R and Koulis S : Cytological aspects of mouse and rat liver containing nuclear inclusions. *Anat Rec* 128 : 433, 1957.
32. Hasimoto K, Brounstein MH and Jakobiec FA : Dermatofibrosarcoma protuberans. A tumor with perineural and endoneural cell features. *Arch Dermatol* 110 : 874, 1974.
33. Frenster JH : Ultrastructure and function of heterochromatin and euchromatin. *The Cell Nucleus Vol I*. Ed. by H Busch New York. London : Academic Press, 1974.
34. Trump BF and Goldblatt PJ and Stowell RE : Studies on necrosis of mouse liver *in vitro*. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. *Lab Invest* 14 : 343, 1965.
35. Trump BF and Goldblatt PJ and Stowell Re : Studies of necrosis *in vitro* of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi's apparatus, plasma membrane and lipid droplets. *Lab Invest* 14 : 2000, 1965.
36. Bernhard W and Granboulan N : The fine structure of the cancer cell nucleus. *Exp Cell Res(suppl. 9)* 19, 1963.
37. Granboulan N, Tournier P, Wicker R and Bernherd W : An electron microscopic study of the development of SV40 virus. *J Cell Biol* 17 : 423, 1963.
38. Wachstein M and Besen M : Electron microscopy of renal coagulative necrosis due to *dl*-serine with special reference to mitochondrial pyknosis. *Am J Path* 44 : 383, 1964.
39. Pavel I, Bonaparte H and Perovici A : In-volution of liver mitochondria in viral hepatitis. *Arch Path* 91 : 294, 1971.
40. Myakaya GL, van Veen H and James K

: Quantitative analysis of mitochondrial flocculent densities in rat hepatocytes during normothermic and hythermic ischemia in vitro. *Virchows Arch B Cell Path* 49 : 61, 1985.

41. Collan Y, McDowell E and Trump BF : Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. VI. Mitochondrial flocculant densities in autolysis. *Virchows Arch B cell Pathol* 35 : 189, 1981.

Explanation of Figures

- Fig. 1. Control group L929 cell($\times 15,600$).
- Fig. 2. Immediate Clearfil group($\times 15,600$). In the nucleus a shrinkage and condensation of the chromatin are seen. Swollen mitochondria and vacuoles are observed.
- Fig. 3. Immediate Clearfil group($\times 26,000$). The rough endoplasmic reticulum are dilated and mitochondria have woolly appearance.
- Fig. 4. Immediate Glass ionomer group($\times 7,800$). Dying cell showing pyknotic nucleus and large vacuoles in cytoplasm.
- Fig. 5. Immediate Glass ionomer group($\times 20,800$). Chromatin condensation and autolysosome are found.
- Fig. 6. Immediate Glass ionomer group($\times 9,100$). Three cells showing different degree of cell damage.
- Fig. 7. Immediate ZOE group($\times 15,600$). Severe chromatin condensation and lobation in nucleus are found. Large vacuole, swollen mitochondria and breaks of cell membrane are observed.
- Fig. 8. Immediate ZOE group($\times 31,200$) Large vacuole and autolysosome are found.
- Fig. 9. Immediate APH group($\times 15,600$). Lobation and chromatin condensation in nucleus and swollen mitochondria and dilated endoplasmic reticulum are found.
- Fig. 10. Immediate APH group($\times 15,600$). Pyknotic nucleus, mitochondria and autolysosome are found.
- Fig. 11. Immediate light-cured glass ionomer group($\times 20,800$). Dilated rough endoplasmic reticulum are typically found.
- Fig. 12. Immediate light-cured glass ionomer group($\times 44,200$). Woolly mitochondria and large autolysosome are observed.
- Fig. 13. One-day Clearfil group($\times 15,600$). Irregular nucleus and large vacuole are found.
- Fig. 14. One-day ZOE group($\times 15,600$) Cytolytic cell showing chromatin margination and breaks of cytoplasmic membrane.
- Fig. 15. One-day APH group($\times 13,000$). Cytolysis showing breaks of cytoplasmic membrane and large vacuoles.
- Fig. 16. One-day light cured glass ionomer group($\times 15,600$). Moderately damaged cell shows chromatin condensation and large vacuoles.
- Fig. 17. Seven-day Clearfil group($\times 15,600$). Mild cell damage showing irregularly shaped nucleus, swollen mitochondria and moderately dilated rough endoplasmic reticulum.
- Fig. 18. Seven-day Clearfil group($\times 26,000$). Relatively intact nuclear envelope and dilated rough endoplasmic reticulum are found.
- Fig. 19. Seven-day glass ionomer group($\times 13,000$) Dying cell showing large vacuoles and cytolysis.

- Fig. 20. Seven-day ZOE group($\times 15,600$). Breaks of cytoplasmic membrane, degenerated organelles and vacuoles indicate cytolysis.
- Fig. 21. Seven-day ZOE group($\times 15,600$). Dying cell showing both karyolysis and cytolysis.
- Fig. 22. Seven-day APH group(13,000). Swollen mitochondria and dilated rough endoplasmic reticulum indicate moderately damaged cell.
- Fig. 23. Seven-day APH group($\times 10,400$). Large vacuoles and swollen mitochondria indicate moderate cell damage.
- Fig. 24. Seven-day light cured glass ionomer group(15,600). Mild cell damage showing relatively intact nuclear envelope and cytoplasmic membrane.

사진부도①

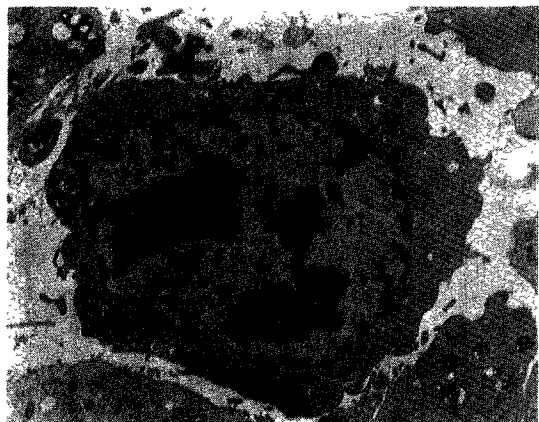


Fig. 1

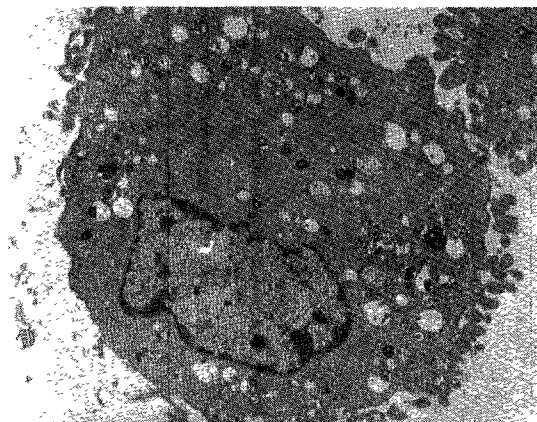


Fig. 2

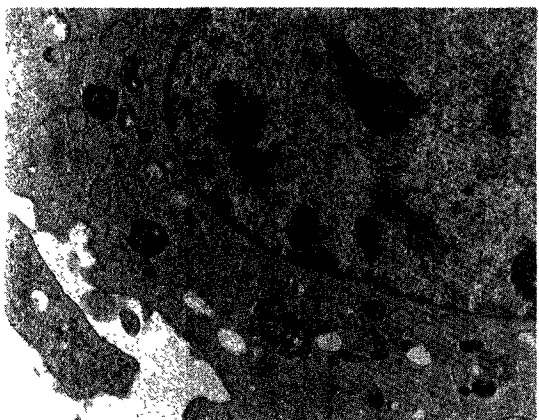


Fig. 3

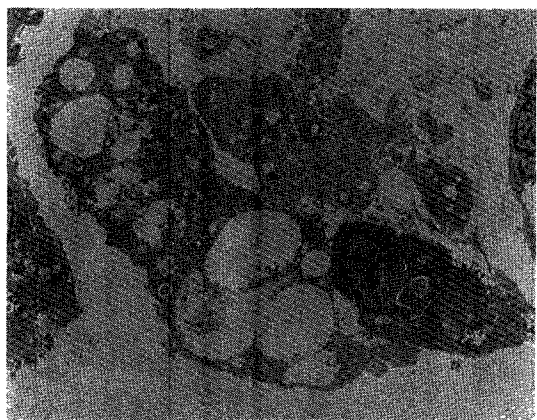


Fig. 4

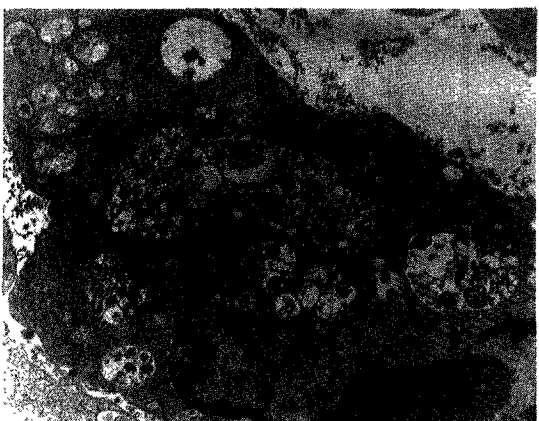


Fig. 5

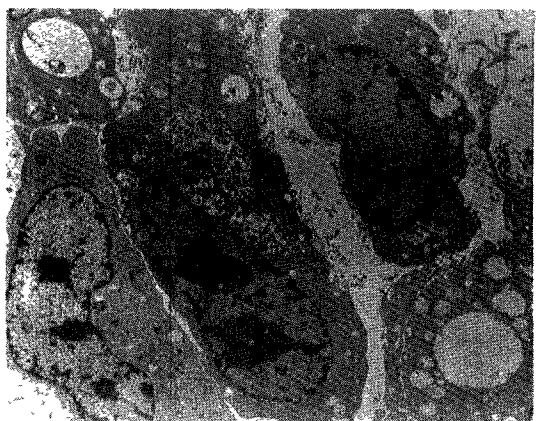


Fig. 6

사진부도②

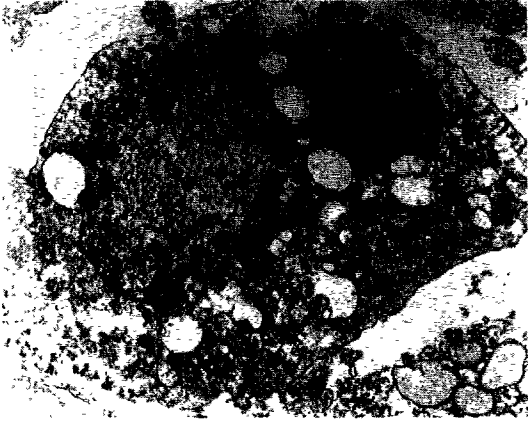


Fig. 7

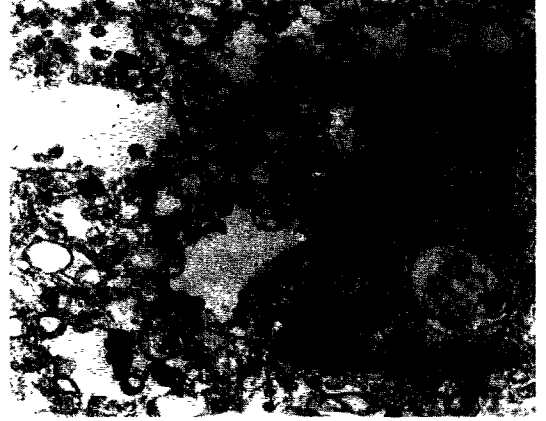


Fig. 8

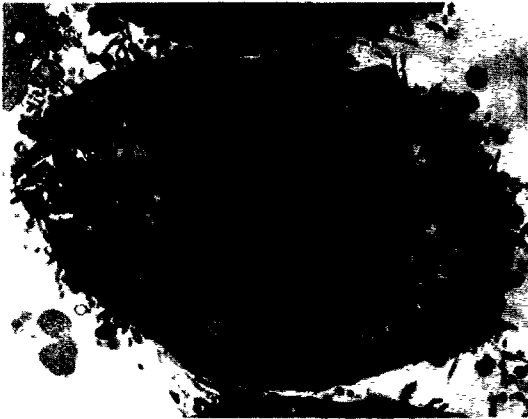


Fig. 9

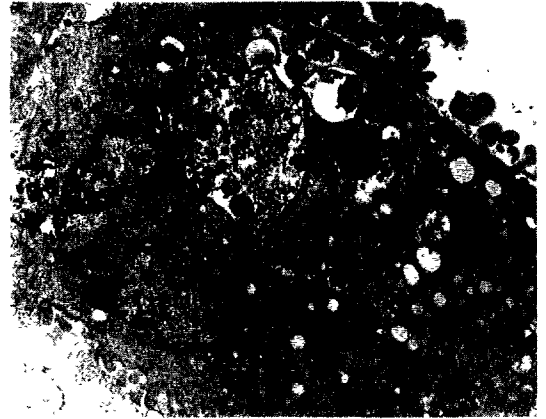


Fig. 10



Fig. 11

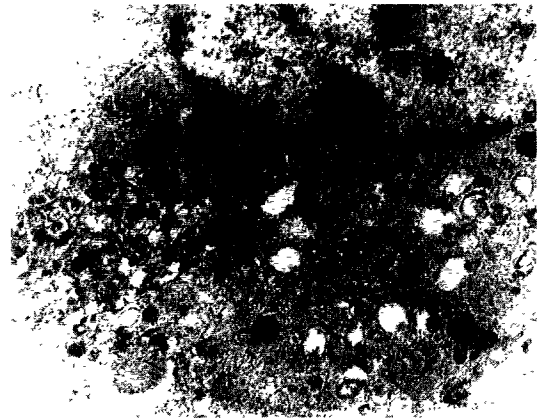


Fig. 12

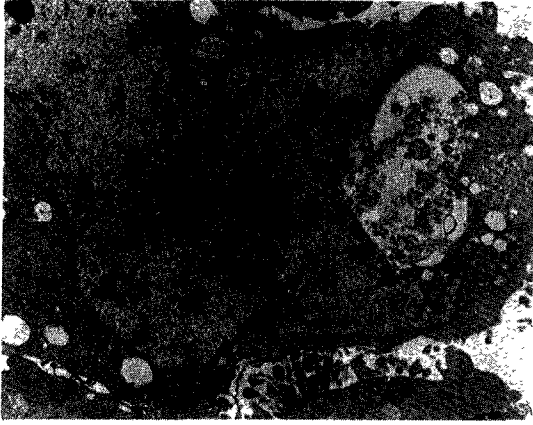


Fig. 13

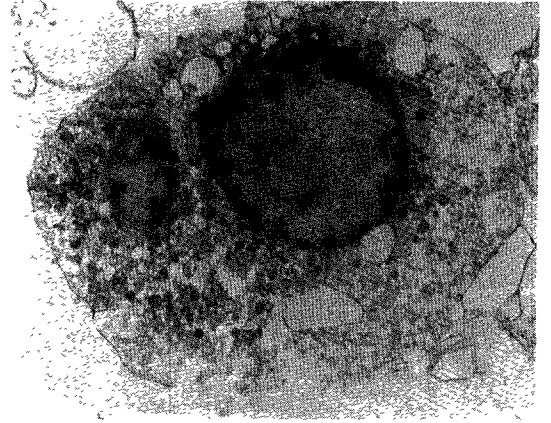


Fig. 14

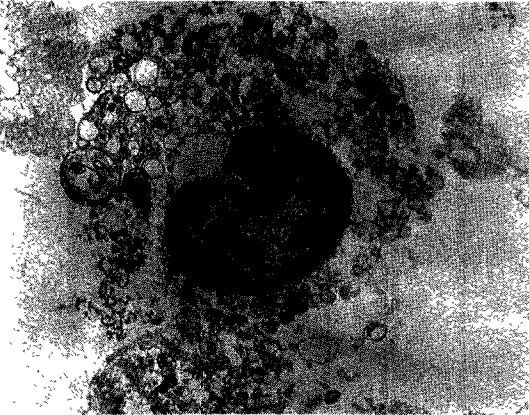


Fig. 15

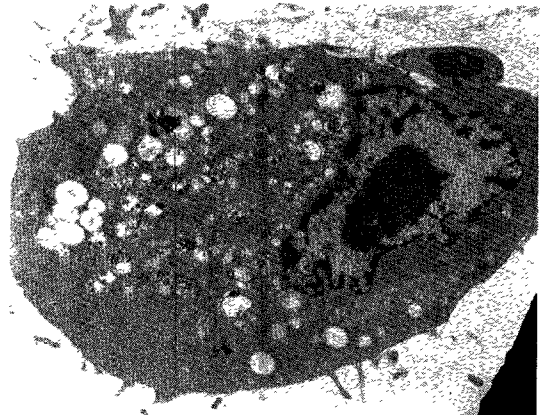


Fig. 16

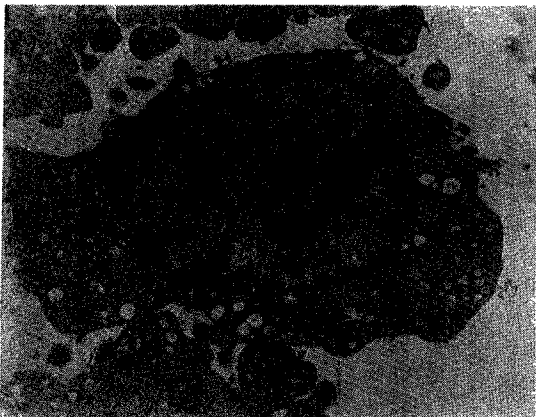


Fig. 17

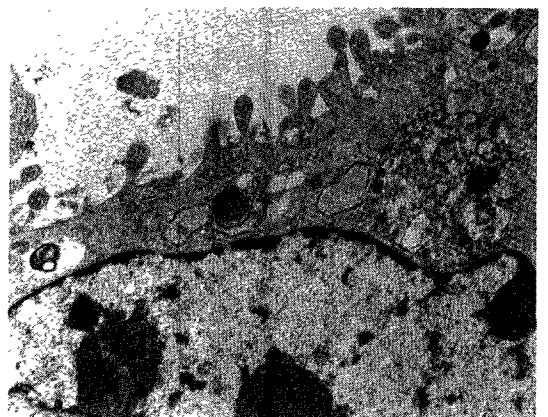


Fig. 18

사진부도④



Fig. 19

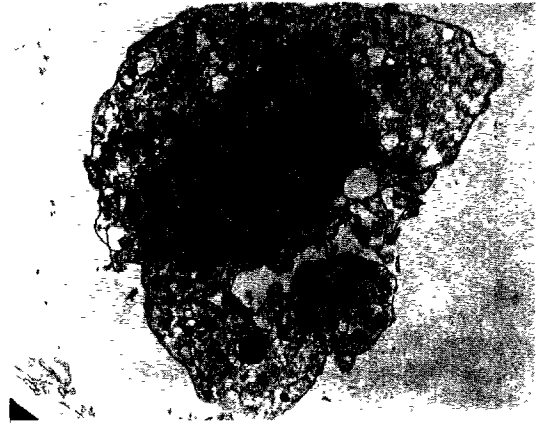


Fig. 20



Fig. 21

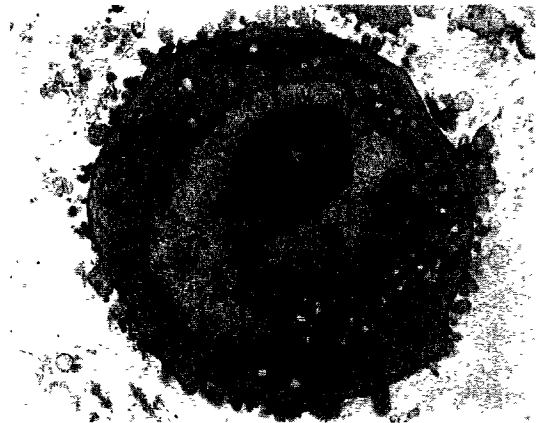


Fig. 22

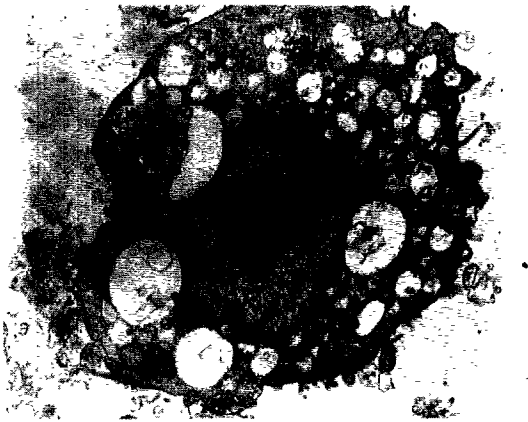


Fig. 23



Fig. 24