

감염 근관에서 분리한 세균 배양액이 배양된 세포에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 보존학교실

임미경

Abstract

EFFECT OF CULTURE SUPERNATANT OF BACTERIA ISOLATED FROM INFECTED ROOT CANALS ON CELL LINES

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

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, WonKwang University

Microorganisms and their by-products are considered to be the major causes of pulpal and periapical pathosis. The role of microorganisms in endodontic infection has been studied regarding the prevalence of particular organisms found in root canal and periapical lesions.

The aim of this study was to investigate the effect of culture supernatants of several oral microorganisms isolated from infected root canals on the viability of cultured cell lines using colorimetric assay.

S. simulans, *S. sciuri*, *E. faecium*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguis* and *S. uberis* were incubated in Todd-Hewitt broth for 16 hours. 20 and 100ul of filtered bacterial cell culture supernatants were added to MK and Hep-2 cells. Cell viability was measured using MTT colorimetric assay. 20ul and 100ul of *S. sanguis* supernatant showed significant cytotoxicity compared to control on MK cells. 100ul of *S. sanguis* supernatant significantly depressed viability of HEp-2 cells. *E. faecium* and *S. intermedius* did not affect the viability of MK and HEp-2 cells.

“이 논문은 1997년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨”

세균과 이의 산물은 치수 및 치근단 질환의 주요한 원인이다¹⁾. 근관으로부터 세균과 이들의 산물이 지속적으로 작용하여 치근단 병변이 발생되며 근첨부의 조직과의 상호 작용으로 인하여 근첨부에 병변이 생긴다²⁾. Hahn 등³⁾은 비가역성 치수염 치아에서 세균을 조사한 결과 세균 중 90% 이상이 lactobacilli이고 그 다음으로 많은 세균은 그람 양성 구균이라고 하였다. Moller 등⁴⁾은 원숭이를 이용한 실험에서 치수를 노출시킨 상태로 7일간 방치한 후에 폐쇄하고 6개월 동안 관찰하였다. 노출된 모든 치아의 근관에서는 사람의 근관에서와 유사한 세균이 발견되었으며 이들 치아 중 90%에서는 치근단 병소를 유발하였다. 또한 Tani-Ishii 등⁵⁾은 주의 치수를 구강에 노출시켜서 치근단 병소를 유발하였으며 이 병소의 크기는 7일에서 15~20일이 경과시 가장 급속하게 확장되었고 그 이후로는 느린 속도로 성장한다고 보고하였다. 염증 상태에서는 염증에 인접한 부위의 골세포, 치수 및 치주 세포등이 cytokine, kinin, thrombin과 급성단계반응물 (acute-phase reactant)에 의해서도 영향을 받는다⁶⁾. 또한 치근단 병소의 형성에는 모든 형태의 면역 반응에 관여하는 매개체가 발현된다고 보고되었다⁷⁾.

감염된 근관에서 근첨공을 통하여 치근단 조직에 병소를 형성하는 것은 세균 및 이의 산물과 이들에 대한 숙주의 염증 및 면역 반응이 상호 복합적으로 반응하여 일어나는 총체적인 과정이다. 치근단 특정 질환과 근관에서 발견되는 세균과의 상관성을 연구한 시도가 있어 왔으나^{8,9)}, 이들간의 명확한 상관관계는 더 많은 연구가 필요한 단계에 있다. 본 연구는 감염 근관에서 분리 배양된 수종의 세균의 세균 배양액을 영구 세포주에 첨가하여 배양함으로써 세균의 대사 산물이 배양된 세포에 미치는 독성이 세균간에 차이가 있는지를 비교해 보고하였다.

1. 세포의 준비 및 배양

세포로는 영구 세포주인 MK 세포 (ATCC CCL-7)과 HEp-2 세포 (ATCC CCL-23)를 사용하였다. 이들 세포는 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium (MEM)에 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2 mg/ml, streptomycin 50 ug/ml, penicillin 100 U/ml을 첨가하였다. 세포의 충밀도 (confluency)가 약 80~90%일 때 계대하여 실험에 사용하였으며, 배양배지는 실험하기 하루전에 새로운 배지로 배양하였다. 실험 당일에 배양액이 든 75cm² 플라스크의 배양액을 버리고 인산 완충용액으로 2회 세척한 후 잔여액을 파이펫 으로 제거하였다. 0.25% trypsin 5ml을 넣고 30초간 실온에 방치한 후 trypsin 용액을 버린 후 플라스크를 CO₂ 배양기에 5분간 두어서 플라스크 바닥에 있는 세포를 회수하였다. 배양액 10ml로 분리된 세포를 회수한 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거하였다. 배양액 10ml을 넣고 세포를 부유시킨 후 다시 1000rpm으로 10분간 원심분리하여 세척한 후 새 배양액을 첨가하여 세포수를 조정하였다.

2. 세균 및 세균 배양상청액의 준비

영하 70도의 초저온 냉동고에 보관된 각 세균을 루프로 취하여 면양혈액천천배지에 옮겨서 10% CO₂배양기에서 1~3일간 배양하였다. 이들 세균은 원광대학교 치과병원 보존과에 근관치료를 위하여 내원한 환자의 감염된 근관에서 분리되었다. 환자의 근관에서 분리된 세균을 각각 순수배양한 후 그람 염색 및 Vitek Systems를 이용하여 세균을 동정한 후 보관된 세균이었다. 각 균의 집락을 형성한 각 세균을 Todd-Hewitt 액체 배지가 든 시험관에 옮기고 CO₂배양기에 16시간 동안 배양하여 증균시켰다. 본 실험에 사용된 세균은 표1과 같다. 배양이 끝난 시험관을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 0.22um의 필터 주사기로 여과하였다.

Table 1. Bacteria used in this study

<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>Streptococcus uberis</i>

3. 배양상청액의 세포 독성 검사

MK와 HEp-2 세포 모두 세포의 수를 2×10^6 /ml로 조정하여 실험에 사용하였다. 96-well microplate (Corning, U.S.A)에 well당 100ul씩 세포를 분주하여 CO₂배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 세균당 8개의 well을 사용하였으며 세균의 배양 상청액을 첨가하지 않은 8개의 well을 대조군으로 하였다. 각 세균의 배양 상청액을 20ul와 100ul를 각각 첨가한 후 CO₂배양기에 24시간 동안 배양하였다. tetrazolim dye (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl) -2,5-diphenyl-dimethyltetrazolium bromide (MTT, Sigma USA) 를 인산 완충용액에 2mg/ml이 되도록 녹인 후 각 well에 50ul씩 첨가하여 4시간 동안 CO₂배양기에서 배양하였다. MTT용액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, SO(CH₃)₂)용액을 well당 50ul씩 넣고 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA Reader로 측정 파장 570nm, 참고 파장 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군

에 대한 실험군의 세포의 활성은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{Mean absorbance of experimental cells}}{\text{Mean absorbance of control cells}} \times 100$$

III. 실험 성적

MK세포에 대하여 각 세균의 배양 상청액을 20 ul와 100 ul씩 접종하여 세포독성 효과를 비교하였다 (Table 2). 상청액 20 ul를 접종한 경우 대조군에 비하여 *S. sanguis* (72.7%)와 *S. uberis* (77.3%)는 다른 세균에 비해 유의하게 세포독성 효과를 보였다. 상청액 100 ul를 접종한 경우 *S. sanguis* (58.3%)는 가장 강한 세포독성 효과를 보였고, *S. mitis* (72.7%), *S. simulans* (73.7%) 순으로 세포독성 효과를 보였다. 그러나 *S. uberis* (81.0%)는 100 ul를 접종한 경우 약한 세포독성 효과를 보였다. 반면 *S. sciuri*, *E. faecium*, *S. intermedius*는 거의 세포독성 효과를 보이지 않았다.

HEp-2 세포에 대하여 각 세균의 배양 상청액을 20 ul와 100 ul씩 접종하여 Table 3의 결과를 얻었다. 상청액 양이 20 ul인 경우 *S. uberis* (82.0%)가 유의하게 세포독성 효과를 보였다. 상청액 100 ul인 경우 *S. sanguis* (59.7

Table 2. Relative absorbance (%) of MK cells exposed to bacterial supernatant for 24 hours compared to control

Bacteria	volume of bacterial supernatant			
	20ul		100ul	
	mean	SD	mean	SD
<i>S. simulans</i>	93.7	2.9	73.7 *	2.1
<i>S. sciuri</i>	88.7	5.8	82.0	3.5
<i>E. faecium</i>	92.6	12.9	89.3	3.8
<i>S. intermedius</i>	90.0	4.6	90.7	4.0
<i>S. mitis</i>	86.0	3.6	72.7 *	4.0
<i>S. sanguis</i>	72.7 *	5.0	58.3 *	2.3
<i>S. uberis</i>	77.3 *	7.8	81.0	0

* : p<0.05 by t-test compared to control

Table 3. Relative absorbance (%) of HEp-2 cells exposed to bacterial supernatant for 24 hours compared to control

Bactreia	volume of bacterial supernatant			
	20ul		100ul	
	mean	SD	mean	SD
<i>S. simulans</i>	101.0	10.8	72.0	1.7
<i>S. sciuri</i>	93.0	2.6	74.7	5.5
<i>E. faecium</i>	96.7	14.8	86.0	4.4
<i>S. intermedius</i>	87.0	8.0	83.7	5.5
<i>S. mitis</i>	90.3	1.5	77.7	7.5
<i>S. sanguis</i>	91.7	2.1	59.7*	4.5
<i>S. uberis</i>	82.0	1.0	80.0	2.6

* ; $p < 0.05$ by t-test compared to control

%)가 가장 강한 세포독성 효과를 보였다. *S. simulans* (72.0%)와 *S. sciuri* (74.7%) 등 포도상 구균에서도 약한 세포독성 효과가 관찰되었다. 그러나 *E. faecium*과 *S. intermedius*는 거의 세포독성 효과를 보이지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

근관 감염 연구에서 혐기성 세균을 배양하는 술식이 도입됨에 따라서 과거에는 호기성 세균이나 통성 혐기성 세균이 원인으로 인식되었던 많은 감염이 혼합 감염으로서 알려지고 있다¹⁰⁻¹². Fabricius 등¹³의 연구에 의하면 처음 90일 동안은 혐기성 세균과 호기성 세균의 발현 비율이 3.9 : 1이지만 1060일이 경과하면 이 비율은 11.3 : 1로서 혐기성 세균의 상대적인 비율이 크게 증가한다고 보고하였다. 또한 혐기성 세균의 중요성이 인식됨에 따라서 환자의 증례에서 특정한 혐기성 세균의 존재와 동통, 부종, 누공의 형성 및 악취 등과 같은 임상 증상 간의 연관성을 연구하여 보고하였다^{8,9}. Baumgartner와 Falker¹⁴는 치아 우식으로 인하여 치수가 노출되고 치근단에 병소가 생성된 치아에 대하여 호기성 및 혐기성 세균 배양 술식으로 근침 5mm부위의 세균을 분리한 결과 이중 68%가 혐기성 세균이라고 보고하였다. 또한 Tronstad 등¹⁵은 비외과적인 근관 치료 이후에 치유되지 않은 8증례에서 세균 배양을

시행한 결과 이들 모든 증례에서 세균의 성장을 관찰하였다. 이들 증례 중 5증례에서는 혐기성 세균이 우세하였으며 2증례에서는 혐기성 세균만이 배양되었다. Iwu 등¹⁶은 최대한 무균 상태에서 16증례의 치근단 육아종에서 세균을 배양한 결과 이들 증례의 88%에서 양성 배양을 얻었다. 모두 47가지의 균주 중 55%는 통성 혐기성 세균이었고 45%는 절대 혐기성 세균으로 나타났다.

이러한 연구의 결과 구강내에 많은 세균 중 제한된 수의 세균만이 감염된 근관에서 성장할 수 있으며 시간 경과에 따라 혐기성 세균의 비율이 증가하는 것은 피사된 조직에 혈류의 흐름이 없고 산화-환원 전위가 낮으며 다른 세균과의 상호 연관성으로 인하여 상승작용이 있는 것도 원인으로 간주된다. 치근단 질환을 유발함에 있어서 어떤 특정 세균이나 특정 세균의 집단이 다른 세균에 비하여 강한 원인 세균으로서 인식되고 있지는 않다. 현재로서는 그람 음성 혐기성 세균이 중요한 역할을 담당한다고 간주되고 있기는 하지만 근관 감염의 원인과 치료에 관해서는 복합 감염의 형태로서 이해되고 치료해야 한다. 감염된 근관의 세균 및 그의 산물이 치근단공을 통하여 치근단 조직에 염증 및 면역 반응을 유발하며 이 과정에는 숙주와의 상호 작용에 따라서 다양한 형태의 질환 및 임상 증상이 발생된다.

치수 및 치근단 질환의 염증반응의 측면에서

숙주와의 반응에서 다형핵중성구는 손상에 대하여 즉시 반응하며 급성 염증 반응에서 주요한 염증세포이다. Rauschenberger 등¹⁷⁾은 정상, 미약한 염증 및 중등도와 심한 염증이 있는 치수에서 lactoferrin, elastase와 cathepsin G의 수준을 조사한 결과 중등도에서 심한 정도의 염증이 있는 치수에서는 다형핵 중성구의 이차 과립이 포함하고 있는 elastase와 lactoferrin의 수위가 정상 치수에 비하여 유의하게 높다고 보고하였다. 또한 다형핵 중성구는 NADPH 산화효소계를 이용하여 세균을 죽이는 기전을 가지는데 염증이 있는 치수에서는 정상 치수에 비하여 superoxide dismutase의 수준이 유의하게 높게 나타나므로 이는 다형핵중성구의 수가 증가하고 NADPH 산화 효소계가 활성화되기 때문이라고 하였다¹⁸⁾.

아라키돈산 대사 과정에서 생성되는 프로스타글란딘 E₂는 치근단 병소 형성 뿐 아니라 골 흡수와동 밀접하게 연관되어 있다¹⁹⁾. Nicholas 등²⁰⁾에 의하면 임상 증상을 나타내지 않은 병소나 정상적인 치근단 조직인 경우에 비하여 프로스타글란딘 E₂가 높은 경우에는 방사선 투과성 병소, 동통 및 부종이 있다고 보고하였다. 이는 Oguntebi 등²¹⁾이 쥐에서 실험적으로 치근단 육아종을 형성시킨 후 프로스타글란딘을 차단하는 약제인 인도메타신으로 처리한 결과 염증 반응이 좀 더 미약하고 치조골의 흡수도 적었다고 보고하는 것과 연관성이 있다.

치근단 질환에서 면역 반응에 관한 측면의 연구에서는 먼저 cytokine 중 interleukin 과 tumor necrosis factor에 관하여 연구되어왔으며 이들이 골 흡수를 매개하는 것으로 알려져 있다²²⁾. Artese 등²³⁾은 사람의 치근단 육아종에서 Interleukin-1B와 necrosis factor -a를 발견하였으며 이들 단일클론항체를 이용한 면역조직화학 분석방법으로 관찰한 결과 이들 항체로 표식된 세포가 적었으며 이들은 대식 세포인 것으로 보고하였다. 표식된 세포가 적은 이유는 이 병소가 많은 양의 치근단 골 흡수를 유발하지 않는 치근단 육아종이기 때문으로 분석하였다. 또한 Safavi와 Rossomando 등²⁴⁾도 치근단 염증삼출액에서 tumor necrosis factor의 존재를 보고

하였다.

사람의 치근단 조직에서 면역 복합체에 관한 연구에서 Torabinejad와 Kettering 등²⁵⁾은 항보체 면역 형광술식을 사용하여 사람의 치근단 병소에서 면역 복합체의 존재에 관하여 연구하였다. 또한 Torabinejad등은 만성 치근단 병소에서 형성되는 면역 복합체는 최소이거나 병소에 국한되어 있으며 전신적인 혈류로는 유입되지 않는다고 하였다. 이에 비하여 급성 농양이 있는 환자에서 순환하는 면역 복합체의 혈청 농도를 급성 농양이 없는 환자와 비교시에는 농양이 있는 환자에서 이들 복합체의 농도가 유의하게 높아서 이들 두 군간에 차이가 있다고 하였다^{26, 27)}. Stashenko와 Yu 등²⁸⁾은 쥐의 병소에서 병소가 확장되는 급성 시기에는 TS 세포보다 TH 세포의 수가 더 많은 반면, 병소가 확립된 후반기에서는 TS세포의 수가 더 많다고 하였다. 이러한 결과에 따라 TH세포가 치근단 병소의 생성에 기여하는 반면 TS세포는 과도한 면역 반응성을 감소시켜서 병소의 성장을 중지시키는 것으로 생각할 수 있다고 하였다. 또한 치근단 병소에서 T 임파구의 역할에 관한 연구에서 Waterman²⁹⁾은 정상적인 쥐와 면역 기능이 억제된 쥐에서 치근단 병소의 형성 정도를 비교하였다. 이 연구에서는 두 군간에 조직학적인 차이가 없는 것으로 나타나 치근단 병소의 생성은 림프구의 존재 여부에만 전적으로 의존되는 것이 아니라 여러 가지 인자가 복합적으로 작용하여 나타나는 현상으로서 이해하여야 한다.

본 실험에 사용한 MK세포는 원숭이의 신장에서 분리된 세포이고, HEp-2세포는 사람 인두의 상피암 세포에서 기원된 세포이다. 이들 세포는 감염 근관의 세균이 실제 환자에서 영향을 미치는 정상적인 이배엽 세포와는 다소 다른 반응을 나타낼 수 있다. 본 연구는 감염 근관내의 세균의 배양액이 대조군에 비하여 세포에 대하여 독성 반응을 유발하는지를 먼저 관찰하고 또한 각 세균간에 독성 발현에 차이가 있는지를 관찰하고자 하였다. 실험에 사용한 7가지의 세균 들은 대조군에 대하여 세포에 대한 독성을 유의하게 나타낸 경우도 있고 나타내지

않은 경우도 있었다. 물론 세포에 대하여 이들 세균 배양액의 접촉 시간을 증가시키거나 접촉하는 양을 증가시키므로서 독성 반응을 증가시킬 수도 있을 것으로 사료되나 MTT와 같은 색을 이용한 세포의 생활력을 측정하는 방법에서 통상적으로 사용하는 노출시간과 노출 부피를 사용하여 이와 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과는 치과에서 사용하는 생체 재료의 배양액이 배양된 세포에 나타내는 세포 독성과 비교하여 보면 강한 독성을 보이는 것은 아니고 오히려 미약한 독성을 나타낸다고 해석하는 것이 더욱 타당할 듯하다. MK세포에 대하여 세균 배양액을 20ul를 첨가한 경우에 있어서 *S. sanguis*와 *S. uberis*는 각각 대조군에 대한 상대 흡광도가 각각 72.7과 77.3으로서 대조군 및 기타 종류의 세균에 대하여는 유의한 상대 흡광도의 차이가 있으나 세포의 생활력을 아주 강하게 억제하지는 않았다. 또한 세균 배양액의 부피를 100ul로 증가시킨 경우에는 *S. sanguis*가 58.3으로 가장 낮은 상대흡광도를 보였음에 비하여 *S. uberis*는 세포 독성의 정도가 미미하였다.

HEp-2세포에 대하여는 20ul를 접종한 경우는 7가지 세균에 대하여 HEp-2세포는 영향을 받지 않았다. 반면 100ul로 부피를 증가시키면 *S. sanguis*의 상대 흡광도는 59.7로서 대조군이나 기타 몇 종의 세균에 비하여 유의하게 세포의 생활력을 억제하였다. 그러나 *E. faecium*과 *S. intermedius*는 MK 및 HEp-2세포에 대하여 세포 독성을 보이지 않았다. 본 실험에서 사용한 세균의 배양액에는 세균이 내는 여러 가지 대사 산물로 구성되어 있으며, 각 성분 에 대한 구체적인 분석을 시행한 이후에 어떤 성분이 이와 같은 독성의 원인이었는지를 지적할 수 있을 것이다.

여러 연구자들이 지적한 바와 같은 치수 및 치근단 질환의 발생은 세균 개개의 독성에도 원인이 있을 수 있으나, 이보다는 여러 세균이 복합적으로 상호작용하면서 나타내는 역동적인 과정으로서 개개의 세균이 하나의 치근단 질환을 유발하는 특징적인 요소가 된다고 보기는 인체의 다른 부위와 마찬가지로 손상에 대한

염증 반응 및 면역 반응의 일례로서 접근하는 것이 더욱 타당할 것이다. 그러나 임상 증상과 세균간의 관계가 아직도 관심의 대상으로 연구가 계속되고 있으므로 특정 세균이 나타낼 수 있는 숙주에 대한 반응도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

감염된 환자의 근관에서 분리 배양된 수종 세균의 배양액이 세포주에 미치는 영향을 관찰하였다. 세포로는 영구세포주인 MK세포와 HEp-2세포를 사용하여 세균 배양액을 20ul와 100ul를 각각 첨가하고 24시간 동안 배양하여 MTT를 이용하여 세포의 생활력을 측정하였다.

MK세포에 대하여 *S. sanguis*는 20ul와 100 ul를 첨가시 유의하게 강한 세포 독성을 보였다.

100ul를 첨가시는 HEp-2세포에 대하여 *S. sanguis*는 유의하게 강한 세포독성을 보였다. *E. faecium*과 *S. intermedius*는 MK와 HEp-2세포에 대하여 모두 세포 독성을 보이지 않았다.

참 고 문 헌

1. Nair PNR, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE and Sundqvist G : Intraradicular bacteria and fungi in root filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions : a long term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 16 : 580-8, 1990.
2. Microbiologic pathologic aspects of endodontics Current opinion in Dentistry 1 : 737-43, 1991.
3. Hahn CL, Falker WA Jr and Minah GE : Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. Arch Oral Biol 36 : 147-153, 1991.
4. Moller A, Fabricius L, Dahlen G, Ohman A and Heyden G : Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scand J

- Dent Res 89 : 475–84,1981.
5. Tani-Ishii N, Wang CY, Taner A and Stashenko P : Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 9 : 129–35, 1994.
 6. Lerner UH : Regulation of bone metabolism by kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78 : 481–93, 1994
 7. Torabinejad M : Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78 : 511–21, 1994.
 8. Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH and Newton CW : The relationship of *Bacteroides melanogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 50 : 457–61,1980.
 9. Yoshida M, Fukushima J, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T and Sagawa H : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 13 : 24–8, 1987.
 10. Haapasalo M : *Bacteroides* spp. in dental root canal infection. *Endod Dent Traumatol* 5 : 1–10, 1989.
 11. Sundqvist G, Johansson E and Sjogren U : Prevalence of black pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod* 15 : 13–9, 1989.
 12. Wayman BE, Murara SM, Almeoda RJ and Fowler CB : A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod* 18 : 152–5,1992.
 13. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE and Moller AJR : Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 90 : 134–44, 1982.
 14. Baumgartner JC, Falker WA Jr : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J Endod* 17 : 380–83, 1991.
 15. Tronstad L, Barnett F, Riso K and Slots J : Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 3 : 86–90, 1987.
 16. Iwu D, MacFarlane TW, MacKenzie D and Stenhouse D : The microbiology of periapical granulomas. *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 50 : 457–61.
 17. Rauschenberger CR, Turner DW, Kaminiski EJ and Osetek EM : Human polymorphonuclear granule components : relative levels detected by a modified enzyme-linked immunosorbent assay in normal and inflamed dental pulps. *J Endod* 17 : 531–36, 1991.
 18. Davis WL, Jacoby BH, Craig KR, Wagner G and Harrison JW : Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue. *J Endod* 17 : 316–8, 1991.
 19. Haris M : Odontogenic cyst growth and prostaglandin-induced bone resorption. *Ann R Coll Surg Engl* 60 : 85–91, 1978.
 20. Nicholas S, Torabinejad M, Blankenship J and Bakland L : The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod* 17 : 97–100, 1991.
 21. Ogumtebi BR, Barker BF, Anderson DM and Sakumura J : The effect of indomethacin on experimental dental periapical lesions in rats. *J Endod* 15 : 117–121, 1989.
 22. Stashenko P, Deshirst FE, Peros WJ, Kent RL and Ago JM : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 138 : 1464–8, 1987.
 23. Artese L, Piattellin A, Quaranta M, Colasante A and Musiani P : Immunoreactivity for interleukin 1B and tumor necrosis fac-

- tor-a and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 17 : 483-7, 1991.
24. Safavi KE and Rossomando EF : Tumor necrosis factor identified in periapical tissues exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 17 : 12-4, 1991.
 25. Torabinejad M, Kettering JD : Detection of immune complexes in human periapical lesions by anticomplement immunofluorescence technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 48 : 256-61, 1979.
 26. Torabinejad M, Theofilopoulos AN, Kettering JD and Bakland LK : Quantitation of circulating immune complexes, immunoglobulins G and M, and C3 complement in patients with large periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55 : 186-90, 1983.
 27. Kettering JD and Torabinejad M : Concentration of immune complexes, IgG, IgM, IgE, and C3 in patients with acute apical abscesses. *J Endod* 10 : 417-21, 1984.
 28. Stashenko P and Yu SM : T-helper and T-suppressor cells reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 68 : 763-6, 1988.
 29. Waterman PA : Development of periapical lesions in immunosuppressed rats. [Thesis] Loma Linda, California : Loma Linda University, 1992.