

수종 치근단 역충전 재료가 배양된 치주인대 섬유모세포 및 뼈모세포의 활성화에 미치는 영향

양미영 · 최기운 · 민병순 · 박상진 · 최호영
경희대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

EFFECT OF ROOT-END FILLING MATERIALS ON THE ACTIVITY OF CULTURED PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS AND OSTEOBLASTS

Mi-Young Yang, Gi-woon Choi, Byung-Soon Min, Sang-Jin Park, Ho-Young Choi
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The effect of retrograde root-end filling materials(IRM, Super-EBA, Vitremer, MTA) on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts was observed. The cell activities were evaluated by MTT assay, protein assay and alkaline phosphatase activity examination.

The results as follows :

1. After 24hrs culture, both E1 cells & PDL fibroblast adding root-end filling materials were suppressed cell activities but after 48hrs, cell activities were recovered.
2. Cell activity was lowest in Vitremer followed by IRM, MTA, Super-EBA.
3. Cell activity depression by Vitremer was not concerned with pH changes.
4. Protein synthesis by root-end filling materials were not significant difference in Both E1 cell & PDL fibroblasts but protein synthesis were a little increased by Super-EBA.
5. Alkaline phosphatase activity was increased in E1 cell by Super-EBA & MTA but was not significant differences in E1 cell by IRM & Vitremer. Alkaline phosphatase activity was a little depressed in PDL fibroblast by Vitremer.

This findings suggest that these root-end filling materials may have important roles in promotion of PDL healing and consequently may be useful for clinical application in apical surgery.

I. 서 론

근관치료의 목적은 근관내 세균과 세균산물 그리고 독소와 같은 자극원을 제거하고 근관계를 삼차원적으로 충전하는 것이다. 그러나 근관계가 복잡하고 근관기구와 근관 기구조작술로는 근관내의 모든 잔사를 완전히 제거하는 것은 매우 어렵다. 통법의 근관치료와 외과적 근관치료는 근관계를 효과적으로 폐쇄하여 자극원에 의한 치근단 조직의 감염을 방지하는 것이다. 그러나 근관치료의 실패는 부적절한 근관세척과 형성, 불충분한 근관충전으로 발생되므로 치근단 절제술 후 치근단 역충전을 시행한다^{1,2)}. 치근단 역충전

의 목적은 근관내에 남아있던 괴사조직, 세균과 세균산물과 같은 자극원이 치근단 주위조직으로 파급되지 않도록 근단부를 폐쇄하는 것이다. 그러나 치근단 절제술 후 치근단 역충전이 불완전한 경우 근관치료는 실패하게 되므로 치근단 절제술시 근단부 폐쇄가 치근단 절제술의 성공을 결정하는 중요한 요소이다³⁾. 역충전재의 기능은 적절하게 근관충전되지 않은 근관계를 폐쇄하여 근관으로부터 자극원이 치근단 조직으로 누출되는 것을 방지하는 것이다. 치근을 둘러싸고 있는 치주조직은 백악질, 치주인대 및 치조골로 구성되며, 이들 조직에 의해 치아는 치조골에 단단히 부착하게 된다. 이러한 치주조직이 치주염이나 기타 외과적 처치과정에 의

해 파괴된 경우, 치주조직이 재생되기 위해서는 치주조직의 형성세포들이 손상부위로 이주하고 증식하여 기질을 합성하는 과정을 필요로 하게 된다. 치주조직을 구성하는 세포로는 백악모세포, 치주인대 섬유모세포 및 뼈모세포를 비롯하여 Malassez 상피잔사를 구성하는 상피세포와 신경 및 혈관의 세포 등이 있다⁴⁾. 그런데 치주인대에서 유래한 세포들이 치주질환이나 외과적 시술에 의해 파괴된 치주조직을 재생시킬 수 있는 가능성을 가진다고 보고되어지고 있다⁵⁾. 이러한 치주조직의 재생에 관여하는 세포는 치주인대의 혈관주위에 존재하는 미분화 중간엽세포⁶⁾, 치조골의 뼈막 혹은 뼈내막에 존재하는 뼈모세포의 전구세포⁷⁾인 것으로 알려져 있다. 치주조직 부착은 항상 치유동안 치주인대에서 유래된 세포가 접촉하면 티타늄⁸⁾, 수산화인회석⁹⁾, 복합레진¹⁰⁾의 표면에서도 일어난다고 보고되고 있다. 이런 사실은 치주조직 재생을 도울 수 있는 생체적합성이 있는 재료가 개발될 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

치근단 역충전 재료에 필요한 성질은 근관 충전재가 필요로 하는 성질과 같다. Hirsch 등¹¹⁾은 치근단 수술 후에 충전재의 성질이 치유에 중요한 인자라고 하였다. 이상적인 치근단 역충전 재료의 성질¹²⁾로는 치근단 와동벽에 잘 부착하여 근관계를 잘 폐쇄해야 하며, 섬유모세포가 백악모세포로 분화하여 근단부에서 백악질과 같은 치질의 형성을 가능하게 하고 치주인대가 다시 형성될 수 있는 생체적합성이 있어야 하고 치근단 조직에 독성이 없어야 하며 치유를 촉진시켜야 한다. 치근단 역충전재¹³⁾로는 아말감, 산화아연 유지놀 시멘트, 글라스 아이오노머 시멘트, 복합레진¹⁴⁾, Mineral Trioxide Aggregate(MTA), Cavit¹⁵⁾, 폴리카복실레이트 시멘트¹⁶⁾, gold foil¹⁷⁾, Teflon¹⁸⁾, Gutta Percha¹⁹⁾, 티타늄^{20,21)} 등 여러 가지 재료가 있다. 대부분의 이 재료들은 다양한 미세누출을 보이며 이들 중 많은 재료가 임상가의 숙련된 기술과 정확성을 요구한다.

근관치료후의 치근단 역충전 시술은 치근단을 근관계와 완전히 봉쇄하여 치근단 조직의 재생을 도와 치근단 결합조직의 재부착을 유도하는 것이 일차적 치료목표이다. 따라서 이상적인 치근단 역충전 재료는 치질에 대한 접착성이나 조직의 용이성 못지 않게 뼈형성 능력이나 치근단 조직에 대한 독성의 유무를 비롯한 생체적합성이 크게 요구된다²²⁾. 아말감, 산화아연 유지놀 시멘트, 글라스 아이오노머 시멘트와 같이 임상에서 손쉽게 사용되는 치근단 역충전 재료들은 임상적으로 다양한 정도의 염증을 유발시키기는 하지만 결과적으로는 치근단 조직의 치유를 돕는 것으로 알려져 있다²³⁾. 이에 따라 이들 재료의 기계적, 화학적 성질에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있는 실정이다.

Torabinejad 등²⁴⁻²⁶⁾은 아말감, Super-EBA, IRM, MTA의 치근단 봉쇄능 평가에서 MTA의 누출이 가장 적었으며 혈액 오염에 따른 누출의 차이는 보이지 않았다고 하였다.

Chong 등²⁷⁾은 산화아연 유지놀계 시멘트와 글라스 아이오노머 시멘트가 아말감보다 더 나은 봉쇄능을 가진다고 하였고, Bates 등²⁸⁾도 MTA와 Super-EBA가 아말감보다 누출이 적었다고 보고하였다. 또한 Thirawat와 Edmunds²⁹⁾, Gerhards와 Wagner³⁰⁾, Fischer 등³¹⁾도 여러 가지 역충전 재료의 치근단 봉쇄능을 평가한 바 있다.

Osorio 등³²⁾은 MTT assay와 Crystal violet assay를 이용한 세포독성 검사에서 MTA는 독성이 없는 반면 Super-EBA는 높은 독성을 가진다고 하였고 Torabinejad 등³³⁾은 agar overlay법과 radiochromium법을 이용한 세포독성 검사에서 아말감과 MTA가 Super-EBA와 IRM보다 세포독성이 적다고 했으며 Chong 등²³⁾, Bruce 등³⁴⁾, Peltora 등³⁵⁾도 역충전재의 세포독성 검사를 했다.

Torabinejad 등³⁶⁾은 여러 가지 치근단 역충전재의 항균 효과에 대한 연구에서 Super-EBA, IRM, MTA가 약간의 항균효과를 가지나 어떤 재료도 치근단 역충전 재료에 요구되는 항균효과를 가지지는 않는다고 하였고, Chong 등³⁷⁾은 산화아연 유지놀계 시멘트보다 글라스 아이오노머 시멘트의 항균효과가 더 우수하다고 보고하였다. Kettering과 Torabinejad³⁸⁾는 치근단 역충전재의 mutagenicity에 대해 연구하였고, Torabinejad 등³⁹⁻⁴¹⁾은 개, 원숭이, 돼지에서 치근단 역충전재의 조직반응을 비교한 바 있고 Pitt Ford와 Roberts⁴²⁾는 치근단 역충전재로 사용된 글라스 아이오노머 시멘트의 조직반응을 조사하였다. 글라스 아이오노머 시멘트는 치질에 대한 접착성을 가지며, 불소가 유리되므로 충전용으로 사용하였을 때 이차 우식을 예방하는 효과를 가진다. 그러나 생체 내에서 시간이 지남에 따라 불소를 유리시키거나 pH를 변화시켜, 주변 조직에 대한 생체적합성에 영향을 미칠 수 있음이 보고되는 등⁴³⁾ 최근 글라스 아이오노머 시멘트의 생체적합성에 대한 생물학적 연구가 요구되어지고 있다. 또한 임상에서 흔히 사용되는 Super-EBA와 IRM, 그리고 비교적 최근에 소개된 MTA의 생체적합성에 대한 보다 많은 연구가 필요하다. 이에 본 연구는 치근단 주위를 구성하는 세포인 치주인대 섬유모세포와 뼈모세포의 증식, 기질의 합성 및 석회화에 이들 재료가 미치는 영향을 살펴보고자 세포의 활성검사와 함께, 조직의 재생과정 중 유기기질이 되는 단백질의 합성능력과 무기질 침착에 관여하는 알칼리성 인산효소의 활성에 이들 재료들이 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 세포

본 실험에는 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포를 사용하였

다. 뼈모세포로는 마우스 두개관으로부터 얻은 뼈모세포양 세포주 (osteoblast-like cell line)인 MC3T3-E1 (E1) 세포를, 치주인대 섬유모세포로는 건강한 성인의 치주인대 조직을 일차 배양하여 얻은 사람 치주인대 섬유모세포를 사용하였다.

사람 치주인대 섬유모세포를 얻기 위하여, 교정목적으로 발거된 소구치 치주인대 조직을 잇몸이나 치수의 조직에 의해 오염되지 않도록 치근의 중앙 1/3 부위에서만 취하여, penicillin (100unit/ml) - streptomycin (100 μ g/ml) (Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; Gibco, USA)로 세정한 후 면도날로 잘게 잘랐다. 치주인대 조직 조각을 배양접시에 위치시키고 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 항생제가 포함된 DMEM을 최소량 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소하에서 배양하여 배양접시에 조직 조각이 부착되도록 하였다. 조직의 부착이 확인되면 동일한 배양액을 첨가하여 동일조건에서 배양하였다. 세포가 조직으로부터 충분히 자라 나오면 배양접시에서 조직을 제거하였다. 세포가 배양접시에 어느 정도 차게 되면 배양접시에서 배양액을 제거하고, 칼슘과 마그네슘이 포함되지 않은 Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco, USA)으로 세정하고 0.05% trypsin - 0.53mM tetrasodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; Gibco, USA)를 넣어 세포가 배양접시 바닥에서 떨어지도록 하였다. 이렇게 얻은 세포는 1:3의 비율로 계대 배양하였다. 세포는 일주일에 3회 배양액을 교환하면서 동일한 조건에서 배양하면서 계대 배양 제5대의 세포를 실험에 사용하였다.

E1 세포는 10% FBS가 포함된 minimum essential medium (MEM; Gibco, USA)을 배양액으로 하여 치주인대 섬유모세포와 동일한 조건에서 배양하였다.

2) 치근단 역충전 재료

본 실험에 사용한 치근단 역충전 재료는 산화아연 유지놀 시멘트 계열의 IRM (Dentsply International Inc., USA)과 Super-EBA (Harry J. Bosworth Co., USA)와 충전용 글라스 아이오노머 시멘트인 Vitremer (3M, USA), 그리고 Mineral Trioxide Aggregate (MTA; Loma Linda Univ., Loma Linda, USA)였다.

2. 실험방법

실험은 세포활성의 평가, 단백질 합성능의 평가, 그리고 알칼리성 인산효소 (alkaline phosphatase) 활성의 평가로 나누어 시행하였다.

1) 치근단 역충전 재료의 준비

각 치근단 역충전 재료는 제조자의 지시에 따라 혼합한 후 길이 6mm, 내경 2mm의 속이 빈 튜브에 넣어 경화시켰다. 경화된 재료는 1.5ml 에펜도르프 튜브에 넣고 0.5ml의 멸균증류수를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에 10일간 방치하여 각 재료의 수용성 성분이 빠져 나오도록 하였다. 이렇게 준비한 추출물은 0.2 μ m 필터로 여과하여 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2) 세포활성의 평가

세포활성의 평가를 위해 MTT(3-[4,5-Dimethyl thiazol-2-yl]-2,5 di-phenyltetrazolium bromide: Thiazolyl blue) 분석을 시행하였다. 먼저 각 세포를 96-well 배양판 (Falcon, USA)에 well당 1000개가 되도록 분주하고, 10% FBS가 포함된 배양액으로 24시간 배양하여 배양판 바닥에 세포가 부착하도록 하였다. 그 후 동일한 배양액으로 교환하고 각 치근단 역충전재료의 추출물을 well당 20 μ 씩 첨가한 후 24시간 혹은 48시간 동일한 조건에서 배양하였다. 대조군의 경우에는 멸균증류수를 동량 첨가하여 동일한 방법으로 배양하였다. 이렇게 배양하는 중 마지막 4시간은 0.01M phosphate buffered saline (PBS)에 5mg/ml의 농도로 녹인 MTT (Sigma) 용액을 필터로 여과하여 well당 10 μ 씩 첨가하여 함께 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 0.04N 염산이 포함된 iso-propanol을 well당 100 μ 씩 첨가한 후 Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad, USA)로 650nm 파장을 reference로 하여 540nm의 파장에서 측정하였다.

3) 단백질 합성능의 평가

단백질 합성능의 평가를 위해 Bio-Rad 사의 protein assay kit를 이용하여 총 단백질 합성량을 측정하였다. 먼저 각 세포를 24-well 배양판 (Falcon, USA)에 well당 2 \times 10⁵개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된 배양액으로 세포가 well에 가득 찰 때까지 배양한 후 각 치근단 역충전 재료의 추출물을 well당 100 μ 씩 첨가하고 24시간 혹은 48시간동안 동일한 조건에서 배양한 후 각 well에서 10 μ 씩을 취한 후 protein assay dye를 첨가하고 실온에서 20분간 방치하였다. 대조군의 경우에는 동량의 멸균증류수를 첨가하고 동일한 과정을 거쳤다. 그 후 Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad, USA)로 595nm의 파장에서 측정하였다.

4) 알칼리성 인산효소 활성의 평가

단백질 합성능 평가의 경우와 동일하게 세포를 분주하고 배양한 후 각 치근단 역충전 재료의 추출물을 첨가하였으며, 대조군의 경우에는 동량의 멸균증류수를 첨가하였다. 그 후 24시간 또는 48시간동안 동일한 조건에서 배양하고

배양액을 제거한 후 세포층을 PBS로 2회 수세하였다. 그 후 각 well에 생리식염수에 0.1%의 농도로 희석한 Triton X-100 (Polyscience)을 첨가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 0.1M glycine-NaOH 완충액 (pH 10.4)에 100 mM 농도로 용해시킨 p-nitrophenyl phosphate를 각 well에 첨가한 후 37°C에서 10분간 배양하였다. 이후 Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad, USA)로 405 nm의 파장에서 측정하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 세포활성의 평가

세포활성의 평가를 위해 MTT 분석을 시행한 결과는 다음과 같다 (Table 1, 2, Fig. 1, 2).

E1 세포의 경우, 추출물 첨가 24시간 후 모든 실험군에서 세포활성이 저하되었는데 그 정도는 Super-EBA가 대조군에 비해 약 89%의 활성을 보여 가장 적었고, MTA (85%), IRM (80%) 순이었으며, Vitremer의 경우 대조군에 비해 약 4%로 활성이 크게 저하되었다. 추출물을 첨가하고 48시간이 경과한 후 IRM (82%)과 Vitremer (3%)의 경우에는 세포활성의 변화가 거의 나타나지 않았으나, Super-EBA와 MTA는 대조군에 비해 각각 115%와 103%로 대조군보다도 세포활성이 증가되었다 (Table 1, Fig. 1).

치주인대 섬유모세포의 경우에도 E1 세포의 경우와 마찬가지로, 추출물을 첨가하고 24시간이 경과한 후 모든 실험군에서 세포활성의 저하를 관찰할 수 있었다. 세포활성 저하의 정도는 Super-EBA가 대조군에 비해 약 84%의 활성을 보여 가장 적었고, MTA (82%), IRM (78%)의 순이었

Table 1. The changes of the cell activity of E1 cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Materials		Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	0.160	0.129	0.143	0.007	0.137
	SD	0.007	0.005	0.004	0.001	0.004
	t-test		0.000	0.000	0.000	0.000
48H	AVG	0.163	0.134	0.188	0.005	0.168
	SD	0.014	0.001	0.009	0.001	0.005
	t-test		0.000	0.019	0.000	0.152

AVG : Average
S.D : Standard Deviation
Significance values: p<0.05

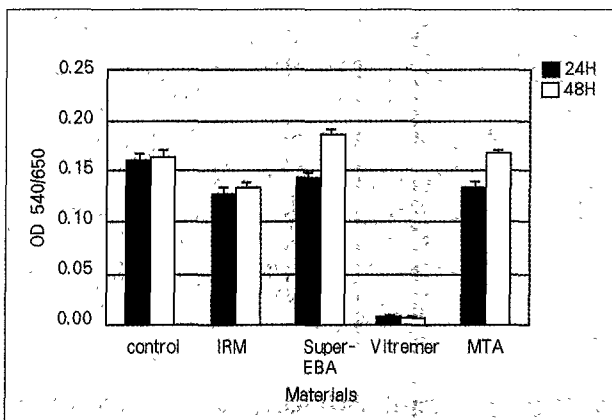


Fig. 1. The changes of the cell activity of E1 cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.
OD: Optical Density

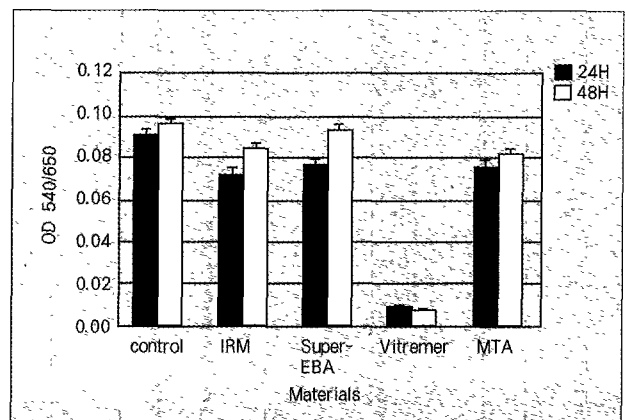


Fig. 2. The changes of the cell activity of PDL cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.
OD: Optical Density

Table 2. The changes of the cell activity of PDL cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Materials		Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	0.092	0.072	0.077	0.009	0.076
	SD	0.002	0.002	0.003	0.001	0.002
	t-test		0.000	0.000	0.000	0.000
48H	AVG	0.097	0.084	0.081	0.007	0.095
	SD	0.004	0.002	0.001	0.001	0.002
	t-test		0.000	0.000	0.000	0.105

AVG : Average
 S.D : Standard Deviation
 Significance values: $p < 0.05$

Table 3. The amount of the total protein in the media after incubation of E1 cells with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Materials		Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	0.435	0.431	0.442	0.429	0.424
	SD	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002
	t-test		0.000	0.000	0.000	0.000
48H	AVG	0.512	0.511	0.517	0.510	0.508
	SD	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
	t-test		0.001	0.001	0.000	0.000

AVG : Average(mg/ml)
 S.D : Standard Deviation
 Significance values: $p < 0.05$

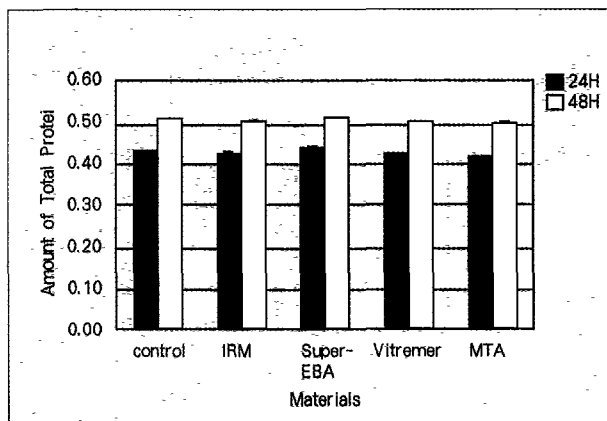


Fig. 3. The amount of the total protein in the media after incubation of E1 cells with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.

으며, Vitremer의 경우 약 10%로 세포활성이 가장 크게 저하되었다. 추출물을 첨가하고 48시간이 경과한 후 MTA (84%)의 경우에는 세포활성의 변화가 거의 나타나지 않았으나, Super-EBA (98%)와 IRM (87%)의 경우에는 초기에 저하되었던 세포활성이 회복되는 양상을 보였다. Vitremer의 경우에는 대조군에 비해 약 7%의 세포활성을 보여 24시간군보다 활성이 약간 저하되는 양상을 관찰할 수 있었다 (Table 2, Fig. 2).

2. 단백질 합성능의 평가

단백질 합성능 평가를 위해 protein assay를 시행한 결과는 다음과 같다 (Table 3, 4, Fig. 3, 4).

E1 세포의 경우, 치근단 역충전 재료의 추출물을 첨가하고 24시간이 지난 후 배양액 내에 존재하는 총단백질의 양은 대조군과 거의 차이를 보이지 않았다. Super-EBA의 경우 대조군에 비해 102%를 보였고, IRM (99%)과

Table 4. The amount of the total protein in the media after incubation of PDL cells with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Group	Materials	Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	0.425	0.420	0.423	0.416	0.423
	SD	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002
	t-test		0.000	0.008	0.000	0.004
48H	AVG	0.433	0.429	0.426	0.428	0.430
	SD	0.000	0.003	0.002	0.001	0.001
	t-test		0.000	0.000	0.000	0.000

AVG : Average(mg/ml)
 S.D : Standard Deviation
 Significance values: $p < 0.05$

Table 5. The changes of the ALP activity of E1 cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Group	Materials	Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	1.256	1.253	1.312	1.251	1.450
	SD	0.028	0.089	0.187	0.114	0.099
	t-test		0.018	0.011	0.434	0.000
48H	AVG	1.425	1.342	1.476	1.235	1.479
	SD	0.115	0.113	0.050	0.086	0.007
	t-test		0.037	0.000	0.000	0.000

AVG : Average
 S.D : Standard Deviation
 Significance values: $p < 0.05$

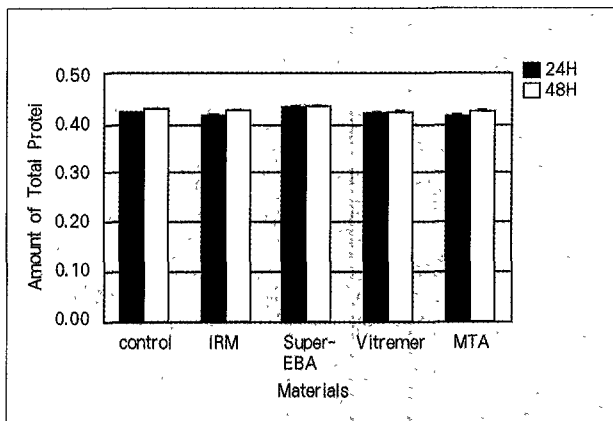


Fig. 4. The amount of the total protein in the media after incubation of PDL cells with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.

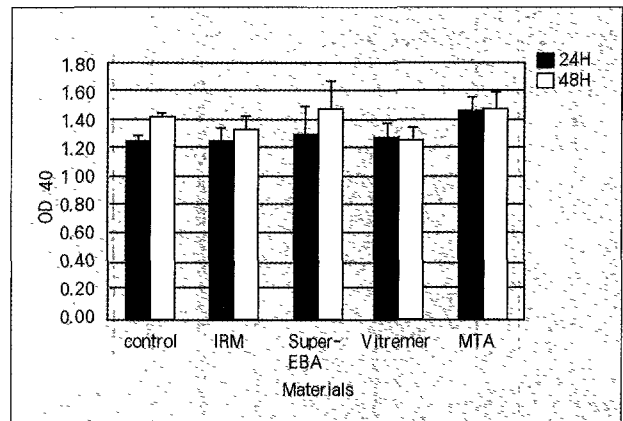


Fig. 5. The changes of the ALP activity of E1 cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.

OD: Optical Density

Table 6. The changes of the ALP activity of PDL cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials. (N=12)

Materials		Control	IRM	Super-EBA	Vitremer	MTA
24H	AVG	1.198	1.173	1.188	1.094	1.152
	SD	0.129	0.134	0.149	0.102	0.253
	t-test		0.003	0.145	0.000	0.000
48H	AVG	1.307	1.305	1.341	1.102	1.253
	SD	0.137	0.061	0.121	0.048	0.074
	t-test		0.007	0.001	0.000	0.001

AVG : Average
 S.D : Standard Deviation
 Significance values: $p < 0.05$

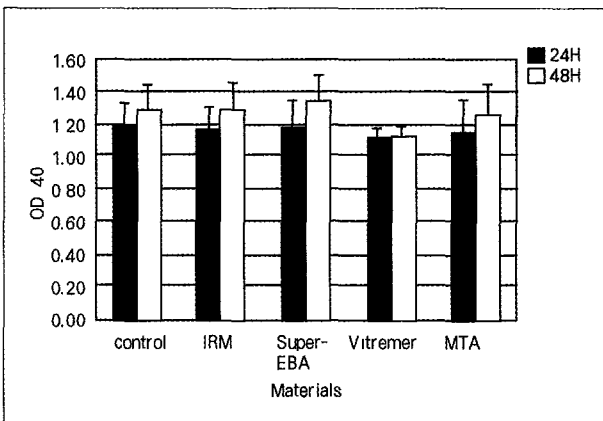


Fig. 6. The changes of the ALP activity of PDL cells after incubation with the extracts of water-soluble components of various root end-filling materials.

OD: Optical Density

Vitremer (99%)는 대조군과 거의 같았으며, MTA (97%)에서는 약간 감소하였다. 추출물을 첨가하고 48시간 배양한 경우, 전체적으로 24시간 군에 비해 총단백질의 양이 증가하였으나, 대조군과 비교할 때 거의 변화가 없었다 (Table 3, Fig. 3).

치주인대 섬유모세포의 경우에도 치근단 역충전 재료의 추출물을 첨가하고 24시간이 지난 후 배양액 내의 총 단백질의 양은 대조군과 거의 차이를 보이지 않았다. Super-EBA의 경우 대조군보다 3% 증가하였으나 (103%), IRM (99%), Vitremer (100%), MTA (98%) 모두 대조군과 거의 같았다. 추출물을 첨가하고 48시간 배양한 경우, 전체적으로 24시간 배양한 군에 비해 총 단백질의 양이 약간 증가하였으나, 48시간 대조군과 비교할 때 실험군에서 총 단

백질의 양은 거의 변화가 없었다 (Table 4, Fig. 4).

3. 알칼리성 인산효소 활성의 평가

p-nitrophenyl phosphate를 기질로 하여 알칼리성 인산효소 활성의 평가를 시행한 결과는 다음과 같다 (Table 5, 6, Fig. 5, 6).

E1 세포의 경우, 치근단 역충전 재료의 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 경우, IRM (100%)과 Vitremer (100%)는 대조군과 차이가 없었으나, Super-EBA (104%)와 MTA (115%)의 경우 대조군보다 증가된 효소 활성을 나타내었다. 48시간 후에는 전체적으로 알칼리성 인산효소의 활성은 증가하였으나 IRM의 경우 대조군에 비해 효소활성이 감소 (94%)하였으며, Vitremer의 경우 더욱 크게 감소하였다 (87%) (Table 5, Fig. 5). 치주인대 섬유모세포의 경우에는 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 후 모든 실험군에서 알칼리성 인산효소 활성이 감소하는 양상을 보였다. Super-EBA (99%)와 IRM (98%)은 대조군과 거의 같은 효소활성을 보였으나, MTA는 대조군에 비해 96%의 활성을 보였고, Vitremer는 91%로 가장 크게 효소활성이 감소하였다. 48시간 배양한 후에는 Vitremer를 제외하고는 24시간군에 비해 효소활성이 증가하였다. Vitremer는 48시간 대조군에 대해 84%로 가장 낮은 효소활성을 보였다. Super-EBA의 경우에는 103%의 효소활성을 보였으며, IRM은 대조군과 같은 수준의 효소활성을 보였다 (100%). MTA의 경우에는 24시간 배양시에 비해서는 증가하였으나 대조군에 비해 96%로 효소활성이 크게 회복되지 않음을 볼 수 있었다 (Table 6, Fig. 6).

IV. 총괄 및 고안

치근단 역충전 시술의 일차적 목표는 역충전 재료에 의해 치근단부위를 폐쇄하고 치근단 치주조직의 재생을 유도하는 것이다. 치근단 역충전술을 시술할 때는 재료가 경화되기 전에 조직액에 노출되는 것을 막기 위해 시술부위를 건조시키는 것이 통상적인 방법이지만, 이들 재료는 곧 치근단 부위의 조직 및 조직액과 직접 접촉하게 되면 오랜 시간에 걸쳐 이들 조직과 상호작용을 하게 된다. 따라서 이상적인 치근단 역충전 재료는 기계적 강도나 치질에 대한 접착성, 그리고 조직의 용이성 못지 않게 치근단 조직에 대한 생체적합성이 크게 요구된다. 이들 재료가 치근단부에 존재하면서 뼈의 형성을 촉진한다면 더욱 바람직한 예후를 보이게 될 것이다. 치근단 치주조직의 재생과정에는 손상부위로 치주조직 생성세포가 이주하고 증식한 후 유기기질을 분비하고, 이 기질이 석회화되는 과정들이 포함된다⁴⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 치근단 조직의 재생에 가장 큰 역할을 하는 치주인대 섬유모세포와 뼈모세포를 이용하여, 각종 치근단 역충전 재료가 이들 세포의 증식, 유기기질인 단백질 합성, 석회화에 관여하는 알칼리성 인산효소의 활성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 임상에서 통상적으로 사용되고 있는 각종 치근단 역충전 재료의 성질을 규명하고자 하였다.

최근 치근단 역충전 시술에 많이 사용되고 있는 강화된 산화아연 유지놀 시멘트의 일종인 Super-EBA와 IRM, 글라스 아이오노머 시멘트 그리고 MTA 등은 치면에 대한 접착력을 포함하여 기계적, 화학적으로 우수한 치근단 역충전 재료로 알려져 왔다. 본 실험에서는 임상에서 가장 흔히 사용되는 재료로서 산화아연 유지놀 시멘트의 일종인 Super-EBA와 IRM을 사용하였다.

IRM은 polymethylmethacrylate resin을 이용한 강화 산화아연 유지놀 시멘트로, 분말의 70~80%가 산화아연, 20~25%는 polymethylmethacrylate, 0.1~0.5%는 zinc acetate이며 액의 성분은 99~100%가 유지놀이고 1%미만의 아세트산을 포함한다. 이 재료는 전통적인 산화아연 유지놀 시멘트에 비해 강도가 개선되었으며 용해도와 경화시간이 감소되었다.

Super-EBA는 aluminum oxide를 이용한 강화 산화아연 유지놀 시멘트⁴⁵⁾로, 분말은 60%의 산화아연, 34%의 alumina, 그리고 6%의 natural resin으로 구성되며, 액은 62.5%의 Ortho-ethoxybenzoic acid와 37.5%의 유지놀로 구성된다. 이 재료는 결합조직 세포의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는 유지놀의 양을 감소시킴으로써 치근단 조직에 대한 적합성이 향상된 것으로 알려져 있다.

아연 (zinc)은 세포배양 실험에서 뼈형성을 촉진하는 성질을 가지며⁴⁶⁾ 섬유모세포와 대식세포에 독성이 있는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 산화아연 유지놀 시멘트 계열에서 액체성

분을 이루는 유지놀은 농도증가에 따라 세포독성을 나타내며 osteocalcin이나 osteopontin과 같은 뼈기질 합성에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁾. 본 실험에서 IRM과 Super-EBA의 추출물을 첨가한 경우 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 세포활성이 저하된 것이 관찰되었지만, IRM에 비해 Super-EBA에서 세포활성이 적게 저하된 것으로 보아 시멘트내에 존재하는 유지놀의 양이 세포활성에 영향을 미치는 것으로 생각되었다^{23,34)}. 이들 재료의 추출물을 첨가하고 48시간 배양한 후 E1세포의 경우에는 대조군보다도 세포활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 치주인대 섬유모세포의 경우에도 대조군과 거의 같은 수준의 세포활성을 보여, 실험에 사용한 재료 중 가장 좋은 세포활성을 나타내었다.

Super-EBA는 또한 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 단백질 합성을 억제하지 않아, 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 경우 E1세포의 경우 대조군 대비 102%, 치주인대 섬유모세포의 경우 대조군 대비 103%로 대조군보다 높은 단백질 합성능을 보였으며, 48시간 배양 후에도 대조군과 거의 같은 정도의 단백질 합성을 나타내었다. 이 결과는 유지놀이 세포외기질 합성을 방해할 수 있다는 연구결과에 부합하여, IRM에 비해 유지놀 양이 감소된 Super-EBA에서 단백질 합성능이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었다. 뼈형성과정 중 유기기질의 석회화 과정에 기여하는 알칼리성 인산효소의 활성을 평가한 결과에서도 Super-EBA와 IRM은 우수한 성적을 보였다. Super-EBA의 경우 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포의 경우 모두에서 대조군과 같은 정도 혹은 증가된 알칼리성 인산효소 활성을 보였다. IRM은 대조군과 거의 같은 수준의 알칼리성 인산효소 활성을 보였으나, E1세포의 경우 추출물을 첨가하고 48시간 배양한 후 효소활성이 약간 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 실험을 통해서 이 두 재료에 함유된 아연의 양이 뼈형성에 미치는 영향의 차이를 발견할 수는 없었다.

글라스 아이오노머 시멘트는 1970년대에 Wilson과 kent⁴⁹⁾에 의해 처음 소개된 이래 계속 개발을 거듭하여 물성이 점점 개선되고 있다. 본 실험에서는 비교적 최근에 소개된 Tri-cure glass ionomer system⁵⁰⁾을 가지는 Vitremer를 사용하였다. Vitremer는 심미성 충전재와 core용으로 개발된 글라스 아이오노머 시멘트로, 분말은 95%가 strontium fluoroaluminosilicate glass, 4%의 silanol, 그리고 1% 미만의 cellulose polymer, 산화제, 색소, 환원제로 구성되며, 액은 50~55%의 polycarboxylic acid copolymer, 28%의 물, 그리고 18~20%의 HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate), 1% 광개시제, 1% 미만의 photosensitizer와 억제제로 구성되어 있다.

Vitremer는 레진이 첨가된 글라스 아이오노머 시멘트^{51,52)}로 불소를 유리하여 항우식성이 있고 치질에의 접착력이 있

으며 수분에 취약하지 않은 장점을 가진다. 종래의 글라스 아이오노머 시멘트는 분말과 액을 혼합했을 때 산-염기 반응이 일어나는 conventional 글라스 아이오노머 시멘트와 산-염기 반응과 광중합 반응이 같이 일어나는 광중합 글라스 아이오노머 시멘트였다. conventional 글라스 아이오노머 시멘트는 작업시간이 짧고 경화시간이 길며 초기 수분에 취약하다는 단점이 있는 반면 광중합 글라스 아이오노머 시멘트는 두가지 중합반응에 의해 경화반응이 일어나므로 conventional 글라스 아이오노머 시멘트에 비해 경화시간이 짧고 작업시간이 길며 물성이 향상되었다. 그러나 광중합 글라스 아이오노머 시멘트는 가시광선이 일정길이만 도달되어 외동이 깊을 경우 laying technique이 필요하므로 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. Vitremer는 산-염기 반응, 광중합반응에 더하여 chemically initiated free radical methacrylate cure of the polymer system & HEMA의 세 번째 중합반응을 가지므로 광중합 글라스 아이오노머 시멘트의 단점을 극복한 재료이다. Vitremer는 분말에 존재하는 fluoroaluminosilicate glass로부터 불소가 유리될 수 있으며, 액의 polycarboxylic acid에 의해 약산성을 띠게 된다. 또한 Vitremer는 primer와 함께 사용할 것을 권하고 있는데 이는 primer 사용유무에 따른 치질에의 접착력이 상당히 차이가 있기 때문이다⁴⁸⁾. primer는 Vitrebond copolymer, HEMA, ethanol, 광기시제로 구성되어 있으며 치면을 wetting시켜 글라스 아이오노머 시멘트가 잘 접착할 수 있게 해준다. 그러나 primer 역시 산성이며 HEMA성분을 포함하므로 세포활성이나 단백질 합성에 영향을 미칠 수 있을 것이다.

이들이 생체내에서 주변 조직에 대한 생체적합성에 미칠 수 있는 영향에 대해서는 많은 이견들이 있으나, 대체로 글라스 아이오노머 시멘트는 세포의 성장^{35,53)}과 단백질 합성⁴³⁾을 저해하고, 여러 효소활성³⁾과 세포부착⁵⁴⁾을 방해하며, 세포 형태도 변화⁵⁵⁾시키는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 Vitremer는 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 세포활성을 크게 저하시켜, 대조군 대비 3~10%의 활성밖에 보이지 않았다. 실험성적에는 나타나있지 않으나, 역조명 현미경을 통해 육안으로 관찰한 바에 따르면, Vitremer 추출물을 첨가하고 배양하면 세포의 수가 크게 감소함을 관찰할 수 있었다. 이는 Vitremer가 세포독성을 가지기 때문인 것으로 생각되는데, 이러한 현상이 pH의 변화에 의한 것인지 살펴보기 위해, 배양액에 Vitremer의 추출물을 첨가했을 때의 배양액의 pH를 측정 한 후, 동일한 배양액에 염산으로 동일한 pH를 만들어 동일한 방법으로 실험한 결과, 세포활성이 저하되긴 했지만 Vitremer를 첨가한 경우보다는 높은 세포활성을 보여 (실험결과에는 나타나지 않았다), 이러한 세포활성 저하가 pH 변화에 의해서만 일어나는 것은 아닌 것으로 생각되었다. 글라스 아이오노머

시멘트는 세포활성 뿐 아니라 세포에 의한 단백질 합성도 저해⁴³⁾하는 것으로 알려져 있는데, pH의 변화는 세포에 손상을 주어⁵⁶⁾ 단백질 합성을 저해한다고 한다. 그러나 글라스 아이오노머 시멘트에 의한 단백질 합성의 저해는 pH 변화 뿐 아니라, 시멘트로부터 유리되는 불소나, 레진이 첨가된 광중합형 글라스 아이오노머 시멘트에서 유리되는 HEMA에 의해서도 일어날 수 있다. HEMA는 마우스 섬유모세포⁵⁷⁾와 원숭이 신장세포(VERO세포)³⁴⁾에 독성을 가지고 있다. 따라서 레진이 첨가된 광중합형인 글라스 아이오노머 시멘트에서는 이 시멘트에서 유리되는 불소와 HEMA의 합동작용에 의해 단백질 합성이 방해될 수 있다.

본 연구에서 배양액내의 총단백질의 양을 측정한 결과에 따르면, Vitremer에 의해 세포활성이 크게 저하되는데 비해 단백질의 양은 대조군과 거의 같은 수준을 보이는 것으로 나타났다. 이 결과는 글라스 아이오노머 시멘트가 단백질 합성을 저해한다는 여러 보고들과 일치하지 않는 것이었다. 이것은 실험방법의 차이에 의한 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용한 방법은 배양액내에 존재하는 총단백질의 양을 측정한 것이었으므로, 합성된 단백질이 아니더라도 배양액내에 존재하는 단백질은 모두 검출되었다. Vitremer의 경우 세포활성이 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 세포독성에 의해 세포에 손상을 주었기 때문인 것으로 생각되었다. 이렇게 손상된 세포는 세포막이 손상되어 세포내에 존재하던 여러 단백질이 세포외로 유출되어 배양액내에 존재할 수 있음을 의미하므로 이렇게 배양액내로 유출된 단백질이 모두 검출된 것으로 생각된다.

알칼리성 인산효소의 활성을 관찰한 결과에서도, Vitremer는 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 대조군은 물론 다른 실험군과 비교해서도 가장 낮은 효소활성을 보였다. 또한 48시간 배양한 경우, 다른 실험군에서는 효소활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, Vitremer 추출물을 첨가한 경우에는 효소활성에 변화가 없었다.

MTA는 tricalcium silicate, tricalcium aluminate, tricalcium oxide와 silicate oxide의 혼합물로, amalgam이나 Super-EBA에 비해 조직에 대한 자극이 적고³⁹⁻⁴¹⁾, 치근단 역충진이나 치근천공⁵⁸⁾의 치유에 보다 적합한 것으로 보고되고 있다. 또한 여러 가지 충전재를 이용한 세포독성 실험에서도 세포독성이 가장 적은 것으로 보고된 바 있으며³²⁾ 치근단 봉쇄능 평가에서도 아말감, Super-EBA, IRM보다 미세누출이 훨씬 적은 것으로 보고된 바 있다²⁵⁾.

본 실험에서 E1세포의 경우 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 경우 대조군에 비해 세포활성이 저하되었지만, 48시간 배양한 후 세포활성이 증가하여 대조군에 비해 103%까지 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 치주인대 섬유모세포의 경우에는 대조군보다는 저하된 활성을 보였으나 IRM과 유사한 세포활성을 보였다.

MTA는 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 단백질 합성에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. E1 세포의 경우 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 경우 단백질 합성이 대조군에 비해 약간 감소하는 것이 관찰되었으나, 48시간 후에는 대조군과 같은 수준을 보여, 시간이 지나면서 곧 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 알칼리성 인산효소의 활성을 관찰한 바에 따르면, E1 세포의 경우 MTA 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 후 대조군에 비해 증가된 효소활성을 보였으며, 이는 다른 어느 재료보다 우수한 효소활성 촉진효과였다. 48시간 후에도 대조군보다 높은 효소활성을 보여서 Super-EBA와 함께 알칼리성 인산효소 활성에 촉진효과를 가지는 것으로 생각되었다. 그러나 치주인대 섬유모세포의 경우에는 대조군에 비해 약간 낮은 효소활성을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 치근단 역충전에 사용되는 재료 중 Vitremer는 세포독성을 가져 뼈모세포와 치주인대 섬유모세포에 대해 세포활성을 크게 저하시키며, 단백질 합성 및 알칼리성 인산효소의 활성도 저해시키는 것을 알 수 있었다. 산화아연 유지놀 시멘트는 우수한 생체적합성을 보였는데, 특히 Super-EBA의 경우 초기에는 세포활성을 저하시켰지만, 곧 회복되어 48시간 배양한 후에는 대조군보다 높은 세포활성을 보였으며, 단백질 합성능이나 알칼리성 인산효소 활성도 저하시키지 않고 오히려 촉진하는 성질을 보였다. MTA도 우수한 생체적합성을 보였는데, 세포활성이나 단백질 합성을 크게 저하시키지 않았으며, 특히 뼈모세포인 E1세포에 있어서 알칼리성 인산효소 활성을 가장 크게 증가시켜, 뼈조직의 석회화를 촉진하는 능력을 가진 것으로 생각되었다.

본 실험은 각 재료의 수용성 성분을 첨가하여 세포에 미치는 영향을 관찰한 것으로, 기계적, 물리적 성질과 같은 치근단 역충전 재료에 요구되는 다른 여러 가지 성질은 관찰할 수 없었다. 경화된 후 재료의 표면 질감의 차이에 따른 세포 부착성 등도 치근단 조직의 재생에 영향을 미칠 수 있으므로, 이러한 부분의 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

치근단 주위를 구성하는 세포인 치주인대 섬유모세포와 뼈모세포의 증식, 기질의 합성 및 석회화에 치근단 역충전 재료가 미치는 영향을 규명하고자, 산화아연 유지놀 시멘트인 IRM과 Super-EBA, 글라스 아이오노머 시멘트, 그리고 MTA를 이용하여 세포의 활성검사와 함께, 조직의 재생과정 중 유기기질이 되는 단백질의 합성능력과 무기질 침착에 관여하는 알칼리성 인산효소의 활성에 이들 재료들이 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치근단 역충전 재료의 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 경우 E1 세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 세포활성이 저하되었는데, 저하되었던 세포활성은 48시간 후 회복되었다.
2. 세포활성은 Vitremer에 의해 가장 크게 저하되었으며, IRM, MTA, Super-EBA 순이었다.
3. Vitremer에 의한 세포활성의 저하는 산도변화와 관계가 없었다.
4. 치근단 역충전 재료는 E1 세포와 치주인대 섬유모세포 모두에서 단백질 합성에 큰 변화를 일으키지 않았으나, Super-EBA에 의해 단백질 합성이 약간 증가되었다.
5. Super-EBA와 MTA는 E1 세포에서 알칼리성 인산효소 활성을 증가시켰으나, IRM과 Vitremer에서는 큰 변화가 없었다. 치주인대 섬유모세포의 경우 Vitremer에 의해 효소활성이 약간 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Friedman, S.: Retrograde approaches in endodontic therapy., *Endod. Dent. Traumatol.*, 7:97-107, 1991.
2. Lin, L., Skribner, J., Shovlin, F., and Lengeland, K.: Periapical surgery of mandibular posterior teeth: anatomical and surgical considerations. *J. Endodon.*, 9:496-501, 1983.
3. Harty, F.J., Parkins, B.J., and Wengraf, A.M.: The success rate of apicectomy: a retrospective study of 1,016 cases. *Br. Dent. J.*, 3:407-413, 1970.
4. McCulloch C.A.G., Bordin, S.: Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology *J. Periodont. Res.*, 26:144-154, 1991.
5. Aukhil, I., Nishimura, K., and Fernyhough, W.: Experimental regeneration of the periodontium. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1:101-105, 1990.
6. Gould, T.R., Melcher, A.H., and Brunette, D.M.: Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat. Rec.*, 188:133-142, 1976.
7. McCulloch, C.A.G., Nemeth, E., Lowenberg, B.: Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal cell populations. *Anat. Rec.*, 219:2233-2242, 1987.
8. Buser, D., Warrer, K., Karring, T.: Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J. Periodontol.*, 61: 597-601, 1990.
9. Takata, T., Katauchi, K., Miyauchi, M.: Periodontal tissue regeneration on the surface of synthetic hydroxyapatite implanted into root surface. *J. Periodontol.*, 66: 125-30, 1995.
10. Andreasen, J.O., Munksgaard, E.C., Fredebo, L., and Rud, J.: Periodontal tissue regeneration including cementogenesis adjacent to dentin-bonded retrograde composite fillings in humans. *J. Endodon.*, 19: 151-153, 1993.
11. Hirsch, J.M., Ahlstrom, U., Henirkson, P.A., Heyden, G., and Peterson, L.E.: Periapical surgery. *Int. J. Oral. Surg.*, 8: 173-185, 1979.
12. Pathways of the pulp, sixth edition, Mosby, 531-567.
13. Nicholls, E.: Retrograde filling of the root canal. *Oral. Surg.*, 15: 463-473, 1962.

14. Rud, J., Rud, V., and Munksgaard, E.C.: Long-term evaluation of retrograde root filling with dentin-bonded resin composite. *J. Endodon.*, 22:90-93, 1996.
15. Delivanis, P., and Tabibi, A.: A comparative sealability study of different retrofilling materials. *Oral Surg.*, 45: 273-281, 1978.
16. Barry, G.N., Selbst, A.G., D'Anton, E.W., and Madden, R.M.: Sealing quality of polycarboxylate cements when compared to amalgam as retrofilling material. *Oral Surg.*, 42: 109-116, 1976.
17. Waikakul, A., and Punroutikorn, J.: Gold leaf as an alternative retrograde filling material. *Oral Surg.*, 67: 746-9, 1989.
18. Smee, G., Bolanos, O.R., Morse, D.R., Furst, M.L., and Yesilsoy, C.: A comparative leakage study of P-30 resin bonded ceramic, teflon, amalgam, and IRM as retrofilling seals. *J. Endodon.*, 13:117-121, 1987.
19. Kos, W.L., Aulozzi, D.P., and Gerstein, H.: A comparative bacterial microleakage study of retrofilling materials. *J. Endodon.*, 8: 355-358, 1982.
20. Luomanen, M., and Tuompo, H.: Study of titanium screws as retrograde fillings using bacteria and dye. *Scand. J. Dent. Res.*, 93: 555-9, 1985.
21. Sumi, Y., Hattori, H., Hayashi, K., and Ueda, M.: Titanium-inlay-A new filling material. *J. Endodon.*, 33: 121-123, 1997.
22. Levin, M.P., Getter, L., Cutright D.E., and Bhaskar, S.N.: Biodegradable ceramic in periodontal defects. *Oral Surg.*, 38:344-351, 1974.
23. Chong, B.S., Owadally, I.D., Pitt Ford, T.R., and Wilson, R.F.: Cytotoxicity of potential retrograde root-filling materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, 10:129-133, 1994.
24. Torabinejad, M., Watson, T.F., and Pitt Ford, T.R.: Sealing ability of a Mineral Trioxide Aggregate when used as a root end filling material. *J. Endodon.*, 19:591-595, 1993.
25. Torabinejad, M., Higa, R.C., Mckendy, D.J., and Pitt Ford, T.R.: Dye leakage of four root end filling materials: Effects of blood contamination. *J. Endodon.*, 20:159-163, 1994.
26. Torabinejad, M., Rastegar, A.F., Kettering, J.D., and Pitt Ford, T.R.: Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J. Endodon.*, 21:109-112, 1995.
27. Chong, B.S., Pitt Ford, T.R., Watson, T.F., and Wilson, R.F.: Sealing ability of potential retrograde root filling materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, 11:264-269, 1995.
28. Bates, C.F., Carnes, D.L., and Rio, C.E.: Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J. Endodon.*, 22:575-578, 1996.
29. Thirawat, J., and Edmunds, D.H.: The sealing ability of materials used as retrograde root fillings in endodontic surgery. *Int. Endo. J.*, 22:295-298, 1989.
30. Gerhards, F., and Wagner, W.: Sealing ability of five different retrograde filling materials. *J. Endodon.*, 22: 463-466, 1996.
31. Fischer, E., Arens, D.E., and Miller, C.H.: Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative materials, and Super-EBA as a root-end filling material. *J. Endodon.*, 24:176-179, 1998.
32. Osorio, R.M., Hefti, A., Vertucci, F.J., and Shawley, A.L.: Cytotoxicity of endodontic materials. *J. Endodon.*, 24:91-96, 1998.
33. Torabinejad, M., Hong, C.U., Pitt Ford, T.R., and Kettering, J.D.: Cytotoxicity of four root end filling materials. *J. Endodon.*, 21:489-492, 1995.
34. Bruce, G.R., McDonald, W.J., and Sydiskis, R.J.: Cytotoxicity of retrofill materials. *J. Endodon.*, 19:288-292, 1993.
35. Peltola, M., Salo, T., Oikarinen, K.: Toxic effects of various retrograde root filling materials on gingival fibroblasts and rat sarcoma cells. *Endod. Dent. Traumatol.*, 8:120-124, 1992.
36. Torabinejad, M., Hong, C.U., Pitt Ford, T.R., and Kettering, J.D.: Antibacterial effects of some root end filling materials. *J. Endodon.*, 21:403-406, 1995.
37. Chong, B.S., Owadally, I.D., Pitt Ford, T.R., and Wilson, R.F.: Antibacterial activity of potential retrograde root filling materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, 10:66-70, 1994.
38. Kettering, J., and Torabinejad, M.: Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J. Endodon.*, 21:537-539, 1995.
39. Torabinejad, M., Hong, C.U., Lee, S.J., Monsef, M., and Pitt Ford, T.R.: Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J. Endodon.*, 21:603-608, 1995.
40. Torabinejad, M., Pitt Ford, T.R., Mckendy, D.J., Abedi, H.R., Miller, D.A., and Kariyawasam, S.P.: Histologic assessment of Mineral Trioxide Aggregate as a root-end filling in monkeys. *J. Endodon.*, 23:225-228, 1997.
41. Torabinejad, M., Hong, C.U., Pitt Ford, T.R., and Kariyawasam, S.K.: Tissue reaction to implanted Super-EBA and Mineral Trioxide Aggregate in the mandible of Guinea pigs: A preliminary report. *J. Endodon.*, 21:567-571, 1995.
42. Pitt Ford, T.R., and Roberts, G.J.: Tissue response to glass ionomer retrograde root fillings. *Int. Endo. J.*, 23:233-238, 1990.
43. Consiglio, R., Rengo, S., Liguoro, D., Riccitiello, F., Formisano, S., Palumbo, G., and Di Jeso, B.: Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Archs. Oral Biol.*, 43:65-71, 1998.
44. Craig, K.G., and Harrison, J.W.: Wound healing following demineralization of resected root ends in periradicular surgery. *J. Endodon.*, 19:339-347, 1993.
45. Brauer, G.M., McLaughlin, R., and Huget, E.F.: Aluminum oxide as a reinforcing agent for zinc oxide eugenol-o-ethoxybenzoic acid cements. *J. Dent. Res.*, 47: 622-628, 1968.
46. Yamaguchi, M., Oishi, H., and Suketa, Y.: Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. *Biochem. Pharmacol.*, 36:4007-4012, 1987.
47. Meryon, S.D., and Jakeman, K.J.: The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. *Int. Endo. J.*, 18:191-198, 1985.
48. Snyder, W.R., Hoover, J., Khoury, R., and Farach - Carson, M.C.: Effect of agents used in perforation repair on osteoblastic cells. *J. Endodon.*, 23:158-161, 1997.
49. Wilson, A.D., and Kent, B.E.: A new translucent cement for dentistry. *Br. Dent. J.*, 132:133-135, 1972.
50. Technical Product Profile: 3M Vitremer: Tri-cure glass ionomer System. p.3-34, 1992.
51. Sidhu, S.K., and Watson, T.F.: Resin-modified glass ionomer materials. *Am. J. Dent.*, 8: 59-67, 1995.
52. Burgess, J., NorLing, B., and Summitt, J.: Resin ionomer restorative materials: The new generation. *J. Esthet. Dent.*, 6:207-214, 1994.

53. Meryon, S.D., Stephens, P.G., and Browne, R.M.: A comparison of the in vitro cytotoxicity of two glass ionomer cements. *J. Dent. Res.*, 6:769-777, 1983.
54. Muller, J., Horz, W., Bruckner, G., and Kraft, E.: An experimental study on the biocompatibility of lining cements based on glass ionomer as compared with calcium hydroxide. *Dent. Mater.*, 6:35-40, 1990.
55. Hanks, C.T., Anderson, M., and Craig, R.G.: Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture system. *J. Oral Path.*, 10:101-112, 1981.
56. Hume, W.R., and Mount, G.J.: In vitro studies on the potential for pulpal cytotoxicity of glass ionomer cements. *J. Dent. Res.*, 6:915-918, 1988.
57. Ratanasathien, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T., and Dennison, J.B.: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J. Dent. Res.*, 74:1602-1606, 1995.
58. Pitt Ford, T.R., Torabinejad, M., McKendry, D.J., Hong, C.U., and Kariyawasam, S.P.: Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg.*, 79:756-762, 1995.