

## Bonding agent의 치수 섬유아세포에 대한 독성 연구

경희대학교 치과대학 보존학교실

박선희 · 민병순 · 최호영 · 박상진 · 최기운

### 목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고 문헌
- 영문 초록
- 사진 부도

### I. 서 론

보존수복재료는 장기간 구강내에서 치아 경조직, 치주조직 및 구강점막 등의 생체조직과 접촉하고 있으므로, 물리적 성질 평가이외에 이들 재료가 야기시킬 수 있는 생물학적 독성의 평가가 중요시 되고 있다<sup>1)</sup>.

재료의 기계적, 물리적 성질에 대해서는 오래전부터 그 중요성이 인식되어 이들에 대한 평가 방법이 연구 개발되어 왔으며, 최근 독성이 강한 중금속 등이 함유된 치과재료의 사용이 증가되므로, 생물학적으로 생체 친화성이 있는 재료의 필요성이 대두되고 있다<sup>2)</sup>.

새로운 재료 혹은 개량된 재료에 대한 생물학적 독성 검사방법으로써 screening tests와 usage tests등이 이용되고 있으나<sup>2)</sup>, 이 중, 실험동물 및 사람의 치아에 와동을 형성하여 재료를 충전하고 일정기간 경과 후, 치수에 나타난 조직학적 변화를 관찰하는 usage tests에 의하여 독성평가가 이루어지고 있다<sup>3)</sup>. 그러나 이 방법은 와동의 깊이와 와동 형성 방법에 따른 결과의 차이가 존재하고, 잔존 상아질의 두께, smear layer의 존재, 변연누출에 의한 영향을 배제할 수 없으며, 결과에 대한 평가 기준이 주관적이라는 한계점을 갖고 있다<sup>3,4,5,6)</sup>.

이에 비하여 시험관 내의 실험 방법은, 정확하게 실험조건을 조절할 수 있고, 동물 실험시 불가피한 여러가지 조건의 차이에 의한 영향을 피할 수 있으므로 재현성이 높으며, 동물 실험에 비해 반응에 대한 신속한 평가를 할 수 있고, 통계적 평가가 가능하며, 염증반응, 면역반응, 신경 호르몬계에 의한 영향이 없으므로 자극물에 의한 순수 반응을 확인할 수 있다<sup>1,4)</sup>.

이에 비하여 시험관 내의 실험 방법은, 정확하게 실험조건을 조절할 수 있고, 동물 실험시 불가피한 여러가지 조건의 차이에 의한 영향을 피할 수 있으므로 재현성이 높으며, 동물 실험에 비해 반응에 대한 신속한 평가를 할 수 있고, 통계적 평가가 가능하며, 염증반응, 면역반응, 신경 호르몬계에 의한 영향이 없으므로 자극물에 의한 순수 반응을 확인할 수 있다<sup>1,4)</sup>.

근래 심미적 요구의 증가로 복합레진을 많이 사용하고 있다. 그러나, 중합반응시 발생하는 복합레진의 수축으로 인하여<sup>7,8,9)</sup>, 수복물과 와동벽간의 간격이 발생되어, 수복물 변연부위의 변색, 세균의 침투, 이차우식증 및 수복 후 지각과민증 등으로 치수의 병변을 야기시키기도 한다<sup>10,11)</sup>.

복합레진과 와동벽과의 접착을 증진시키기 위하여 1955년 Buonocore<sup>12)</sup>가 산부식 방법을

소개한 이후, 법랑질에 대한 접착강도는 크게 증가되었으나 상아질에서는 이와같은 기계적인 interlocking 효과를 크게 기대할 수 없었다<sup>13)</sup>. 그러나 Fusayama<sup>14)</sup>는 법랑질과 상아질에 산 처리후 Clearfil을 충전하여, 상아질에서도 접착강도가 증가되었음을 보고한 바 있으나, Stanley등<sup>15)</sup>은 상아질을 산부식 시, 산에 의한 치수 자극이 있을 수 있으며, 상아세관을 노출 시킴으로써 상아질의 투과성이 증가하여 세균 및 화학적 독성물질이 쉽게 치수에 도달할 수 있으므로 바람직하지 못하다고 보고하였다.

상아질에서는 물리 화학적 요인으로 복합레진의 접착이 방해받게 된다. 즉, 법랑질에 비하여 수분과 유기질이 차지하는 비율이 높고, 무기질의 함량이 낮으며, 수많은 상아세관 내에는 odontoblastic process와 dentinal fluid가 존재하고 있어 상아질 표면의 건조한 상태를 얻기 어려우므로 법랑질에 비하여 복합레진의 접착강도가 낮게 된다고 보고된 바 있다<sup>16,17)</sup>.

따라서 최근 수년간 상아질과의 접착을 향상시키기 위한 방법이 연구되어 왔다<sup>18-26)</sup>. Ferric oxalate, NTG-GMA, PMDM을 사용함으로써 상아질에 대한 접착강도가 크게 증가되었음이 보고되었으며<sup>21,22)</sup>, Munksgaard와 Asmussen<sup>26)</sup>은 glutaraldehyde와 HEMA를 혼합한 bonding agent로 농도 변화에 따른 접착강도를 측정하여, 5% glutaraldehyde와 35% HEMA의 혼합 수용액을 사용했을 때 가장 우수함을 보고하였다.

치수는 조상아세포와 섬유아세포 그리고 세포외 기질등으로 구성되어 있으며, 조상아세포는 고도로 분화된 세포로서 배양이 어려우나 섬유아세포는 비교적 배양이 용이하므로 독성 검사에 주로 이용된다<sup>27)</sup>.

세포 배양법을 이용한 독성 검사시 평가방법은 세포수 산정법<sup>28-30)</sup>, 방사성 동위원소 방출에 의한 세포막 투과성 변화 측정법<sup>28,29)</sup>, 세포의 형태학적 변화의 현미경적 관찰법<sup>30,31)</sup>, DNA합성 측정법<sup>32)</sup> 및 효소의 활성화도 측정법<sup>33-37)</sup> 등이 이용된다.

상아질은 치수의 석회화된 일부분으로<sup>15)</sup>, 상

아질과 접촉되는 bonding agent의 경우, 접착이 우수할 뿐만 아니라 치수에 대한 생물학적 위해성이 없는 재료가 요구되어진다. bonding agent에 대한 접착강도 및 변연 적합성등의 기계적, 물리적 성질에 관한 연구는 활발히 진행되었으나<sup>38-48)</sup>, 생물학적 독성에 관한 평가는 현재 미약한 상태이므로, 이에 저자는 세포 배양에 의한 세포수 산정법, 섬유아세포의 형태변화 관찰 및 섬유아세포의 총단백질량 측정 등에 의하여 수종 bonding agents의 독성에 관한 실험 결과, 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 섬유아세포의 배양

#### 1) 1차 배양

치수의 섬유아세포를 배양하기 위하여 교정 치료를 위해 발거한 치수 질환이 없는 소구치의 치수조직을 무균적으로 채취하여 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Flow laboratories)에 25% FBS(fetal bovine serum, Hyclone laboratories)와 antibiotic-antimycotic(GIBCO laboratories)을 혼합한 배양액에 넣은 후, 치수조직이 약 1mm<sup>3</sup> 정도 되도록 세분하였다.

세분된 치수조직이 Petri dish에 잘 부착될 수 있도록, Pasteur pipette끝을 이용하여 직경 50mm의 Petri dish 바닥표면에 흠집을 낸 후 치수조직을 올려 놓았다. 5분정도 경과 후 치수조직 절편이 Petri dish 바닥에 부착된 것을 확인한 다음, DMEM/25% FBS 배양액을 5ml넣고, 5% CO<sub>2</sub> 온도 37°C 습도 100%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

세포의 성장을 관찰한 후, 치수조직 절편을 제거하였고, 단일세포층이 형성될 때까지 3-4일 간격으로 DMEM/10% FBS 배양액을 교환하였다.

#### 2) 2차 배양

Petri dish에 부착된 세포를 분리하기 위하

여 배양용 flask의 배양액을 제거하고 EDTA가 함유된 0.25% Trypsin(Hazleton Co.)으로 처리한 후, Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척하여, 37°C에서 1, 200rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층부의 PBS를 제거하고 DMEM/10% FBS 배양액을 넣어 세포 부유액을 만든 다음 25cm<sup>2</sup>의 배양용 flask에 분주하였으며, 단일 세포층이 형성된 것을 확인한 후에 Trypsin으로 처리하고 75cm<sup>2</sup>의 배양용 flask에 분주하여 세포를 증식시켰다. 상기 방법으로 섬유아세포를 8회 계대배양(subculture)하여 실험에 사용하였다.

## 2. 실험재료

본 실험에서는 bonding agent의 세포독성을 평가하기 위해 1종의 화학 중합형 bonding agent와 3종의 광 중합형 bonding agents를 제조회사의 지시에 따라 사용하였으며, 광 중합형 bonding agents는 광조사기(Optilux, Demetron research Co.)를 이용하여 20초간 광조사하여 사용하였다(Table 1).

## 3. 세포독성의 실험방법

### 1) 세포수 산정

직경 50mm의 Petri dish에 세포밀도가 10×10<sup>4</sup>cells/ml인 세포부유액을 3ml씩 분주하여 온도 37°C 습도 100%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간동안 배양한 후, 세포의 부착을 관찰한 후 부착하지 않고 죽은 원형 세포를 제거하기 위하여 모든 배양액을 교환하였다.

실험군은 직경 47mm, 세공크기(pore size)

0.22μm의 millipore filter(Gelman sciences Inc.)를 배양액 위에 조심스럽게 놓고, 직경 6mm의 Whatman filter paper disc(Whatman Ltd.)위에 4종의 bonding agents를 각각 제조회사의 지시대로 혼합하여 2μl씩 도포한 후 millipore filter 중앙에 올려 놓았다. 그리고 광중합형 bonding agent인 경우 20초간 광조사 실시하였으며, 실험재료를 작용시키지 않은 군을 대조군으로 하였다.

Bonding agent의 작용시간에 따른 세포독성의 정도를 평가하기 위하여, 각각 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 4일 및 7일동안 실험재료를 작용시키며 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하여, 1일, 4일 및 7일에 세포수를 산정하였다. 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간 및 24시간동안 작용시킨 시편들은, 실험재료를 작용시키기 시작한 시각으로부터 24시간동안 배양하여 세포수를 산정하였으며, 각각의 작용시간 경과후 millipore filter와 Whatman filter paper disc를 제거하고 새로운 배양액으로 교환하여, 배양액내에 잔존하는 bonding agent의 영향을 배제하였다.

세포수를 산정하기 위해 Trypsin으로 처리하여 Petri dish의 기저부에 부착되어 있는 세포를 분리한 후 세포부유액을 만들고, 8μl씩 취하여 현미경하에서 hemocytometer로 세포수를 산정하였다.

### 2) 섬유아세포의 형태 변화

Bonding agent의 세포독성에 의한 세포의 형태학적 변화를 100배의 도립위상차 현미경(Inverted phase-contrast microscope)을 이용하여 1일, 4일 및 7일에 관찰 비교하였다.

### 3) 섬유아세포의 총단백질량 측정

세포의 분열 증식에 따라 세포수가 증가하고, 세포의 총 단백질량도 증가하게 되므로, bonding agent의 세포독성에 의한 세포수 감소와 세포의 총 단백질량의 감소를 비교 분석하였다. 즉, Polytron Homogenizer(Brinkmann Instrument, Switzerland)로 20초간 분쇄시켜 균질액을 만들었으며, 1cm의 cuvette

**Table 1.** Bonding agents used in this study

Group	Code	Materials	Manufacturer
1	CF	CLEARFIL NEW BOND	Kuraray Co.
2	LF	LITE-FIL BOND	Shofu Inc.
3	GS	GLUMA 4 Sealer	Bayer Dental
4	GP	GLUMA 3 Primer	Bayer Dental

을 사용하여 750nm에서 Spectrophotometer를 이용하여 Lowry등의 방법으로 bovine serum albumin를 표준용액으로 하여 섬유아세포의 총단백질량을 측정하였다.

### III. 실험성적

#### 1. 세포수 산정

##### 1) 대조군

24시간, 4일 및 7일에서 대조군의 세포수는 Tabel 2와 같다. 24시간에  $(9.4 \pm 1.8) \times 10^4$  cells/ml, 4일에  $(19.2 \pm 4.1) \times 10^4$  cells/ml, 7일에  $(27.8 \pm 5.3) \times 10^4$  cells/ml로 시간이 경과함에 따라 증가되었으나, 시간 경과에 따른 세포증식률은 둔화되었다(Fig. 2).

##### 2) 실험군

가) Group 1(CLEARFIL NEW BOND 작용군)

10분간 작용시킨 경우  $(5.9 \pm 1.2) \times 10^4$  cells/ml로  $(9.4 \pm 1.8) \times 10^4$  cell/ml인 대조군이 비해 크게 감소되었으며, 30분에  $(4.7 \pm 0.8) \times 10^4$  cells/ml, 1시간에  $(5.4 \pm 0.9) \times 10^4$  cells/ml, 6시간에  $(4.8 \pm 1.1) \times 10^4$  cells/ml, 12시간에  $(3.2 \pm 0.6) \times 10^4$  cells/ml, 24시간에  $(1.9 \pm 0.4) \times 10^4$  cells/ml로 작용시간이 증가함에 따라 세포수의 감소를 보여 7일에  $(1.0 \pm 0.2) \times 10^4$  cells/ml로 나타났다(Table 2).

나) Group 2(LITE-FIL BOND 작용군)

10분간 작용시킨 경우  $(4.2 \pm 0.7) \times 10^4$  cells/ml로 대조군에 비해 크게 감소되었으며 (Table 2), 24시간까지는 완만한 감소를 보여  $(1.4 \pm 0.3) \times 10^4$  cells/ml로 나타났으나 4일에  $(3.8 \pm 0.7) \times 10^4$  cell/ml로 다소 증가되었고, 7일에는  $(2.8 \pm 0.5) \times 10^4$  cells/ml로 다시 감소되었다(Table 2, Fig. 1, 2).

다) Group 3(GLUMA 4 Sealer 작용군)

10분간 작용시킨 경우  $(8.7 \pm 1.6) \times 10^4$  cells/ml로 대조군과 비교해 큰 차이는 보이지 않았으나 6시간에는 많이 감소하여  $(5.6 \pm 1.2) \times 10^4$  cells/ml로 나타났고, 4일에  $(6.1 \pm 1.4) \times 10^4$  cells/ml로 약간의 증가를 보였으나, 7일에  $(4.7 \pm 0.7) \times 10^4$  cells/ml로 다시 감소되었다(Table 2).

라) Group 4(GLUMA 3 Primer 작용군)

본 실험군에서는 Trypsin 처리에 의해 Petri dish로부터 세포가 분리되지 않아 세포수 산정을 할 수 없었다.

#### 3. 섬유아세포의 형태 변화

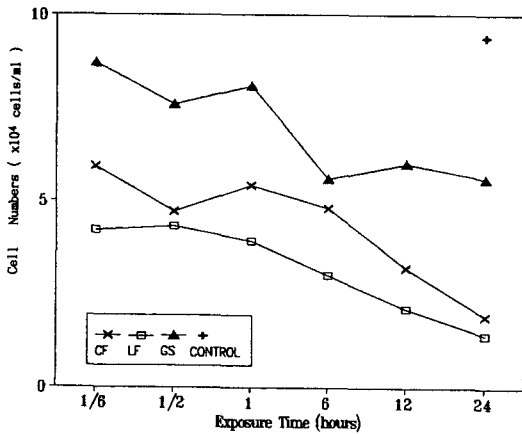
##### 1) 대조군

섬유아세포의 부유액을 분주한 후, 원형의 섬유아세포는 24시간 후 Petri dish 기저부에 부착하여 방추형의 정상형태를 보였으며, 4일에서는 세포가 증식하여 단일세포층을 형성하였고, 7일에서는 세포밀도가 더욱 치밀하게 나타났다(Fig. 5, 6, 7).

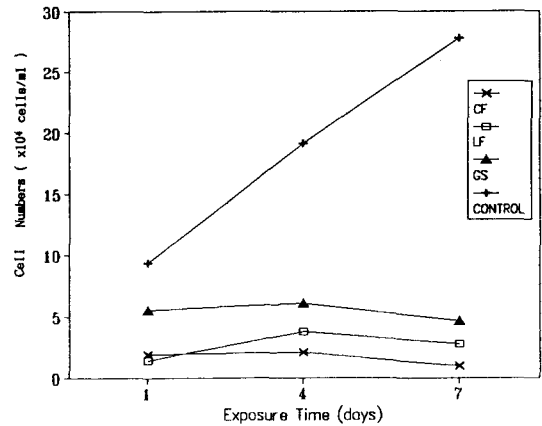
**Table 2.** Effect of different bonding agents on cell multiplication following exposure time ( $\times 10^4$  cells/ml)

Group	Exposure Time							
	10 min.	30 min.	1 hr.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.	4 days	7 days
Control						9.4±1.8	19.2±4.1	27.8±5.3
1 (CF)	5.9±1.2	4.7±0.8	5.4±0.9	4.8±1.1	3.2±0.6	1.9±0.4	2.1±0.4	1.0±0.2
2 (LF)	4.2±0.7	4.3±0.8	3.9±0.6	3.0±0.6	2.1±0.5	1.4±0.3	3.8±0.7	2.8±0.5
3 (GS)	8.7±1.6	7.6±1.1	8.1±1.7	5.6±1.2	6.0±1.3	5.6±1.1	6.1±1.4	4.7±0.7
4 (GP)	-	-	-	-	-	-	-	-

Mean ± SD



**Fig. 1.** Effect of different bonding agents on growth of human pulp fibroblasts during 24 hours



**Fig. 2.** Effect of different bonding agents on growth of human pulp fibroblasts after 1, 4 and 7 days

## 2) 실험군

### 가) Group 1(CLEARFIL NEW BOND 작용군)

10분, 30분 및 1시간에 대부분의 세포는 정상형태였으나(Fig. 8, 9, 10), 6시간에서부터 세포돌기가 감소되는 변화를 보이기 시작하였다(Fig. 11).

12시간, 24시간 및 4일에서 죽은 원형세포가 관찰되었고(Fig. 12, 13, 14), 7일에서는 부착된 세포의 수가 매우 감소하였으며 중심부에서는 세포가 변성괴사된 흔적이 관찰되었다(Fig. 15).

### 나) Group 2(LITE-FIL BOND 작용군)

10분, 30분에서 대부분의 세포는 정상형태를 보였고(Fig. 16, 17), 1시간, 6시간에서는 세포의 위축과 세포수의 감소를 나타내었다(Fig. 18, 19). 12시간, 24시간에서는 중심부 인접부위에서 변성되어 죽은 원형세포가 관찰되었으나 원심부에서는 정상세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 20, 21). 4일, 7일에서는 세포수가 매우 감소되었으며, 세포돌기가 사라지고 변성되는 세포를 많이 관찰할 수 있었다(Fig. 22, 23).

### 다) Group 3(GLUMA 4 Sealer 작용군)

10분, 30분 및 1시간에서 대조군에 비하여 큰 차이는 없었고(Fig. 24, 25, 26), 6시간에서

는 중심부에 죽은 원형세포가 보이기 시작하였으며(Fig. 27), 12시간에는 세포돌기가 감소되었다(Fig. 28). 24시간 및 4일에서 중심부 주위의 세포가 넓어지며 사각형의 형태변화를 나타내고 많은 과립을 보였으며(Fig. 29, 30), 7일에서는 세포수가 크게 감소되고 중심부에서 변성괴사된 원형세포를 관찰할 수 있었으며(Fig. 31), 원심부에서는 정상 형태의 세포를 관찰할 수 있었다.

### 라) Group 4(GRUMA 3 Primer 작용군)

10분, 30분 및 1시간에서 대조군과 유사한 세포 형태를 보였으며(Fig. 32, 33, 34), 6시간에서부터 세포돌기가 사라지는 세포변성을 보이기 시작하였고(Fig. 35), 12시간, 24시간에서는 변성된 많은 세포가 관찰되었다(Fig. 36, 37). 4일과 7일의 중심부에서는 변성되어 죽은 원형세포와 수개의 vacuole을 가지는 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 38, 39).

## 3. 섬유아세포의 총단백질량 측정

### 1) 대조군

대조군의 총 단백질량은 24시간에  $190.4 \pm 15.8 \mu\text{g/ml}$ , 4일에  $280.8 \pm 27.4 \mu\text{g/ml}$ , 7일에  $325 \pm 30.6 \mu\text{g/ml}$ 로 시간경과에 따라 증가되어 세포수 산정 결과와 유사한 양상을 나타내었다(Table 3, Fig. 4).

2) 실험군

가) Group 1(CLEARFIL NEW BOND 작용군)

10분간 작용시킨 경우  $122.5 \pm 7.3 \mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 크게 감소되기 시작하여, 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간에 각각  $100.1 \pm 6.3 \mu\text{g/ml}$ ,  $103.0 \pm 7.1 \mu\text{g/ml}$ ,  $55.1 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ ,  $32.5 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$ ,  $10.2 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ 로 시간 경과에 따라 감소를 보였으나(Table 3, Fig. 3), 4일에  $32.1 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ 로 다소 증가되었다가, 7일에는  $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ 로 크게 감소되었다(Table 3, Fig. 4).

나) Group 2(LITE-FIL BOND 작용군)

24시간이내에는 시간경과에 따라 총단백질량

이 점차 감소되었다(Table 3, Fig. 3). 4일에는  $53.1 \pm 2.7 \mu\text{g/ml}$ 로 24시간에 비하여 큰 폭으로 증가되었으며, 7일에  $9.8 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ 로 다시 크게 감소되었다(Table 3, Fig. 4).

다) Group 3(GLUMA 4 Sealer 작용군)

10분과 30분에 각각  $145.0 \pm 10.1 \mu\text{g/ml}$ ,  $143.2 \pm 9.8 \mu\text{g/ml}$ 로 비교적 높게 나타났으나 1시간, 6시간, 12시간, 24시간에는 각각  $122.5 \pm 9.7 \mu\text{g/ml}$ ,  $101.1 \pm 6.8 \mu\text{g/ml}$ ,  $97.2 \pm 6.3 \mu\text{g/ml}$ ,  $77.5 \pm 5.2 \mu\text{g/ml}$ 로 시간 경과에 따라 점차 감소되었으며(Table 3, Fig. 3), 4일에  $95.2 \pm 7.6 \mu\text{g/ml}$ 로 약간 증가되었다가 7일에는  $54.8 \pm 4.1 \mu\text{g/ml}$ 로 다시 감소되었다(Table 3, Fig. 4).

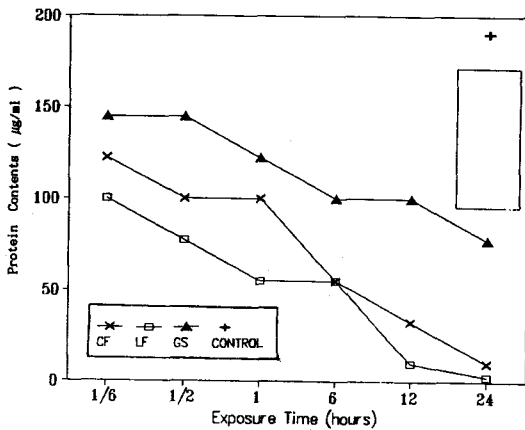


Fig. 3. Effect of different bonding agents on protein contents in fibroblasts during 24 hours

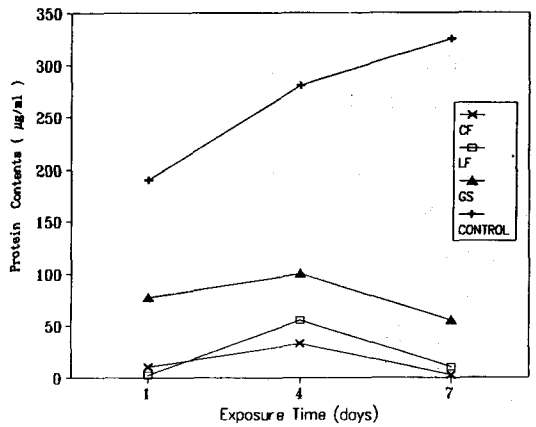


Fig. 4. Effect of different bonding agents on protein contents in fibroblasts after 1, 4 and 7 days

Table 3. Protein contents of cultured fibroblasts following exposure time ( $\mu\text{g/ml}$ )

Group	Exposure Time							
	10 min.	30 min.	1 hr.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.	4 days	7 days
Control						$190.4 \pm 15.8$	$280.8 \pm 27.4$	$325.0 \pm 30.6$
1 (CF)	$122.5 \pm 7.3$	$100.1 \pm 6.3$	$103.0 \pm 7.1$	$55.1 \pm 4.9$	$32.5 \pm 2.0$	$10.2 \pm 1.1$	$32.1 \pm 1.9$	$2.5 \pm 0.2$
2 (LF)	$101.2 \pm 7.2$	$77.5 \pm 6.8$	$54.0 \pm 3.1$	$53.2 \pm 2.8$	$11.0 \pm 0.8$	$2.4 \pm 0.3$	$53.1 \pm 2.7$	$9.8 \pm 0.7$
3 (GS)	$145.0 \pm 10.1$	$143.2 \pm 9.8$	$122.5 \pm 9.7$	$101.1 \pm 6.8$	$97.2 \pm 6.3$	$77.5 \pm 5.2$	$95.2 \pm 7.6$	$54.8 \pm 4.1$
4 (GP)	-	-	-	-	-	-	-	-

Mean  $\pm$  SD

#### 라) Group 4(GLUMA 3 Primer 작용군)

본 실험군에서는 Petri dish로부터 세포가 분리되지 않아 총단백질량 측정을 할 수 없었다.

#### IV. 총괄 및 고안

수복재료와 치아 경조직간의 접착은 보존 수복에 있어서 대단히 중요하므로 이 분야에 대해 연구가 지속되어 왔다. 즉 수복재료와 치아 경조직간에 접착이 이루어진다면, 유지형태의 형성이 필요없게 되므로 치질의 삭제량을 적게 할 수 있고, 변연누출이 방지되어 세균과 색소의 침투를 막을 수 있으며, 이차우식증을 예방할 수 있어 궁극적으로 수복물의 수명을 연장할 수 있다<sup>48)</sup>.

산부식법을 복합레진과 함께 사용함으로써 법랑질에 대한 접착성은 증가되었으나, 상아질에 대한 접착은 해결되지 못하여, 최근 연구를 통해, 상아질과의 화학적 결합을 유도함으로써 높은 접착강도를 얻을 수 있는 새로운 bonding agent들이 소개되었다. 즉, mordant ion과 여러가지 intermediary monomer를 이용한 새로운 방법으로 법랑질과 유사한 정도의 높은 인장접착강도를 얻을 수 있었음이 보고되었으며<sup>21,22)</sup>, 또한 상아질 표면이 dentinal tubule내의 dentinal fluid때문에 완전한 건조가 불가능하므로 이와 같은 수성상태의 환경 조건하에서는 수용액 상태의 bonding agent가 효과적임을 착안하여, glutaraldehyde와 HEMA(hydroxyethyl-methacrylate)를 혼합한 수용액을 상아질 표면에 사용한 결과, 높은 접착강도와 우수한 변연 적합성이 있음이 보고되었다<sup>24,25,26)</sup>.

Glutaraldehyde와 HEMA의 혼합 수용액 즉, GLUMA와 상아질이 화학적 결합을 이루는 기전은, glutaraldehyde가 상아질 collagen의 amino기, amine기 및 amido기와 반응하여 N-hydroxymethyl compounds를 형성하고, 이 compounds가 다시 HEMA분자의 OH기와 반응함으로써, 상아질 표면은 이중결합을 가진 극성기를 갖는 표면이 되어 bonding agent와

결합하고, 다시 수복레진과 반응함으로써 상아질 표면의 collagen과 화학적 결합을 이루는 것으로 설명하였다<sup>23)</sup>.

Bonding agent는 이장재없이 상아질 와동에 사용되는 경우가 많으므로 접착 강도뿐만 아니라, 치수에 대한 생물학적 적합성에 대한 평가도 대단히 중요시되고 있다.

약품이나 재료에 대한 시험관내에서의 생물학적 독성평가는 주로 세포배양 및 조직배양 방법에 의해서 이루어졌다<sup>27)</sup>.

Dentin bonding agent는 와동내에서 작용하므로 이에 의한 직접적인 영향은 와동하방의 치수, 특히 조상아세포와 섬유아세포에 미치게 되며, 조상아세포는 고도로 분화된 세포로서 배양이 어려운 반면, 섬유아세포는 비교적 배양이 용이하므로, 독성 검사시 주로 섬유아세포를 많이 사용하여<sup>27)</sup>, 본 연구에서도 사람 치수의 섬유아세포를 배양하여 독성실험을 시행하였다.

Freshney<sup>49)</sup>는 섬유아세포가 독성물질에 의해 변성되면, 세포의 핵 주변에 과립들이 나타나고, cytoplasmic vacuolation이 발생되며, 세포형태가 둥글게 되면서 기질로부터 탈락되는 양상을 보인다고 보고하였다. 본 실험에서, CLEARFIL NEW BOND, LITE-FIL BOND, GLUMA 3 Primer 및 GLUMA 4 Sealer군 모두에서 이와 같은 변성을 확인할 수 있었으므로, 이들 재료가 독성을 갖고 있는 것으로 사료된다.

대부분의 치과수복 재료는 수복시 재료를 즉시 혼합하여 소성인 상태로 와동에 충전하게 되므로 혼합 초기에 독성이 높은 것으로 알려져 있어<sup>1)</sup>, 혼합 직후의 재료를 실험에 사용하는 것이 보다 정확한 결과를 예상할 수 있으며, usage tests보다는 실험실내에서의 세포 독성 실험이, 실험재료에 대한 초기의 독성 평가에 특히 적합하다고 볼 수 있다.

지금까지 대부분의 연구에서는 재료의 독성을 충분히 나타내기 위해서 가능한 실험재료와 세포간의 긴밀한 접촉이 이루어져야 한다는 관점에서, 경화된 시편을 직접 배양액에 넣거나, 재료를 혼합직후 용액으로 제조하여 배양액에

넣어서 관찰하였으나, bonding agent의 경우, 잔존 상아질에 의해 치수와 직접 접촉되지 않으므로, 잔존 상아질의 역할을 고려해야 한다. 따라서 임상에서의 상아질의 역할을 정확하게 재현할 수는 없으나 agar overlay method<sup>50)</sup>와 millipore filter method<sup>33)</sup>를 통하여 그에 근접하려는 시도가 이루어졌으며, 이중 agar overlay method는 agar가 독성물질을 흡수하여 확산을 방해할 수 있으나, millipore filter method는 압력이나 다른 물리적 장애를 주지 않고 세포와 재료간의 가장 우수한 접촉관계를 얻을 수 있음이 보고된 바 있으므로<sup>37)</sup>, 본 연구에서도 millipore filter를 사용하여 세포와 재료가 직접 접촉되는 것을 방지하였다.

복합레진은 독성이 있는 수복재료로 분류되었으나<sup>5)</sup> 최근 그 독성에 관해서는 논란이 많다. 즉, Qvist<sup>51)</sup>는 silicate cement, unfilled resin 및 복합레진의 치수반응을 관찰한 결과, 수복물 주변의 변연누출로 인한 치수반응이 독성의 주원인으로 설명하였고, Stanley등<sup>52)</sup>은 원숭이를 이용하여 복합레진의 각 구성성분에 대한 치수반응을 관찰한 결과, 심한 자극을 유발하는 성분은 확인할 수 없었음을 보고하였으며, Brännström등<sup>53)</sup>도 치수의 염증반응을 나타낸 경우, 항상 세균이 관찰되므로, 재료자체의 독성보다는 변연누출로 인한 세균 침투로 치수에 대한 위해작용이 나타난다고 주장하였다.

Bonding agent의 세포 독성 실험은 최소하여, 본 연구결과와의 비교가 곤란하나, 본 실험결과 24시간까지는 LITE-FIL BOND가 독성이 가장 크게 나타났고, 4일과 7일에는 CLEARFIL NEW BOND가 가장 독성이 크게 나타났으며, 전 실험기간에 걸쳐 GLUMA 4 Sealer가 가장 적은 독성을 나타내었다. 이는 polyfunctional methacrylic esters를 주성분으로 하는 GLUMA 4 Sealer에 비하여, phenyl-P계 monomer인 CLEARFIL NEW BOND는 지속적으로 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

Hörsted-Bindslev<sup>54)</sup>는 원숭이의 치아에 gluma를 이용하여 복합레진을 수복한 후 치수

의 반응을 관찰한 결과, 경미한 염증반응을 나타내었음을 보고하였으며, Felton등<sup>55)</sup>도 원숭이 치아에 lining을 하지 않고 gluma와 복합레진을 수복하였을 때, 초기에는 경미한 치수반응을 나타냈으나, 90일후 와동하방에 reparative dentin이 형성되었음을 보고하였으며, 이는 효과적인 변연봉쇄와 glutaraldehyde의 세균증식 억제효과 때문이라고 설명하였다.

Hörsted-Bindslev<sup>54)</sup>는 Glutaraldehyde를 와동에 사용시, dentinal fluid내의 단백질 성분을 변화시켜 protein plugs를 형성하게 되므로 인해 상아질에 대한 복합레진과의 접착이 향상되어, 복합레진의 중합수축으로 인한 변연누출을 감소시키어, 세균의 침투를 억제하고, 상아질의 투과성이 감소되는 기전으로 치수에 대한 양호한 반응이 나타난다고 주장하였다. 본 실험에서, gluma 즉 GLUMA Bonding System의 GLUMA 3 Primer를 사용한 실험군에서 배양접시 저면의 세포들이 trypsin 처리를 하여도 분리되지 않아 세포수 산정과 총 단백질량 측정이 불가능하게 나타난 것은, glutaraldehyde의 세포내 단백질에 대한 고정효과때문인 것으로 사료된다.

본 연구에서 초기의 영향을 관찰하기 위하여 24시간 이내 실험한 것을 다시 세분하여, 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 실험재료를 작용시킨 후 세포수를 산정하였다. GLUMA 4 Sealer군은 10분간 작용시킨 경우, 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나, CLEARFIL NEW BOND군과 LITE-FIL BOND군은 대조군에 비해 크게 감소되어 초기부터 심한 독성을 유발하는 것으로 나타났으며, 이후, GLUMA 4 Sealer군은 6시간에 가장 큰 폭으로 감소되었으며, 4일까지 큰 변화를 보이지 않았으나, 7일에는 약간의 감소를 나타내었다.

이와같은 결과는, 손상받은 세포들이 시간이 경과되어도 회복되지 못하고 생활력을 소실한 때문인 것으로 사료된다.

이에 비해 CLEARFIL NEW BOND군은 시간 경과에 따라 지속적으로 독성이 나타나 세포수의 감소를 보인 반면, LITE-FIL BOND



군은 24시간 까지는 세포수가 감소하나 그 이후 약간의 세포수 증가를 보였다. 이와같은 결과는, LITE-FIL BOND의 독성이 더이상 증가하지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

미중합된 resin(carboxylic acid)은 중합반응이 진행되면서 세포독성이 4일까지는 감소되었으나, 중합이 된 bonding agent의 독성은 7일 경과 후에도 잔존되어 있다. 이는 중합 후 장기간에 걸쳐 bonding agent가 계속 섬유아세포에 자극을 가한다고 보고한 Kawahara 등<sup>30)</sup>의 연구결과로 설명될 수 있으며, 본 연구에서 관찰하지 못한 7일 후에도 세포독성이 계속 증가할 경우 임상에서 사용이 곤란할 것으로 사료된다. 그러나, Kawahara 등<sup>30)</sup>에 의하면, 경미한 자극은 이차 상아질의 형성을 유도할 수 있으나, 치수의 생존 능력보다 강한 자극은 치수의 괴사를 초래할 수 있다고 보고하였다.

세포수 산정법은 세포의 분포가 균일하지 못하거나, 덩어리로 되어 있는 세포를 계산하는 것과 같은 오차가 있을 수 있으므로, 본 연구에서는 세포의 총 단백질량을 측정하여 세포수 산정결과와 비교 분석하였으며, 이는 세포가 분열 증식함에 따라 세포의 총 단백질량도 증가함에 근거한 것으로, 두가지 결과가 유사한 양상을 나타내어, 세포의 총 단백질량을 측정하는 것은, 세포수 산정법의 결과를 확인할 수 있는 유용한 방법으로 사료된다.

이와 같이 세포 배양법을 이용한 독성 평가 방법은 표준화가 가능하고 재현성이 높다는 장점은 있으나 너무 민감하므로, Hensten-Pettersen과 Helgeland<sup>28)</sup>는 세포 배양법을 무분별하게 사용할 경우, 실제 임상에서 사용했을 때의 치수에 대한 독성의 유무를 판정하는데 잘못 사용할 수 있다고 경고한 바 있다.

실제로 와동에서는 잔존상아질이 존재하므로, 이를 통과하여 치수에 도달하는 독성 물질의 양은, 본 실험의 millipore filter를 통과한 양에 비하여 적을 것으로 사료되어, 보다 양호한 반응이 나타날 것으로 사료된다. 그러나 본 실험 결과, 사용된 bonding agent는 어느 정도의 독성을 가지고 있으므로, 와동에 사용시,

치수와 가까운 부위에서는 적절한 이장재를 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료되며, 잔존상아질의 역할을 정확히 재현시킬 수 있는 체외실험방법이 계속 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Bonding agent의 세포독성을 관찰하기 위해, 배양된 치수의 섬유아세포에 실험재료를 작용시키지 않은 군을 대조군으로 하고, CLEARFIL NEW BOND, LITE-FIL BOND, GLUMA 4 Sealer 및 GLUMA 3 Primer를 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 4일 및 7일간 작용시킨 군을 실험군으로 하여 1일, 4일 및 7일에 각각의 세포수와 총단백질량을 측정하고, 세포의 형태를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CLEARFIL NEW BOND군, LITE-FIL BOND군 및 GLUMA 4 Sealer군 모두 대조군에 비해 시간이 경과함에 따라 세포수와 총단백질량이 크게 감소되어, 독성이 나타남을 인지하였다.

2. GLUMA 4 Sealer군이 CLEARFIL NEW BOND군 및 LITE-FIL BOND군에 비해 독성이 적게 나타남을 인지하였다.

3. 세포수 산정결과와 총단백질량 측정결과가 유사한 양상을 나타내었다.

4. LITE-FIL BOND 작용군은 1일까지 독성이 크게 나타났으나, 1일에 비해 4일 및 7일에는 회복됨을 인지하였다.

5. GLUMA 3 Primer군은 세포수의 산정과 총단백질량 측정을 할 수 없었으나, 현미경적 관찰을 통해서 세포의 변성을 관찰하였다.

## REFERENCES

1. Browne, R.M.: The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does

- it have a role? *Int. Endod. J.*, 21:50-58, 1988.
2. Beagrie, G.S., Main, J.H.P. and Smith, D.C.: Inflammatory reaction evoked by zinc polyacrylate and zinc eugenate cements. *Brit. Dent. J.*, 132:351-357, 1972.
  3. Tyas, M.J.: A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, 56:1285-1290, 1977.
  4. Tyas, M.J. and Browne, R.M.: Biological testing of dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.*, 4:275-290, 1977.
  5. Spangberg, L., Rodrigues, H., Langeland, L. and Langeland, K.: Biologic effects of dental materials: 2. Toxicity of anterior tooth restorative materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg.*, 36:713-724, 1973.
  6. Outhwaite, W.C., Livingston, M.J. and Pashley, D.H.: Effects of changes in surface area, thickness, temperature and post-extraction time on human dentine permeability. *Arch. Oral Biol.*, 21:599-603, 1976.
  7. Arikawa, H., et al.: Composite restorative resins. Part 1. Setting characteristics of UV and visible light-activated composite resins. *Dent. Mater. J.*, 5:246-251, 1986.
  8. Jørgensen, K.D., Itoh, K., Munksgaard, E.C. and Asmussen, E.: Composite wall-to-wall polymerization contraction in dentin cavities treated with various bonding agents. *Scand. J. Dent. Res.*, 93:276-279, 1985.
  9. Bowen, R.L., Nemoto, K. and Rapson, J.E.: Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues: Forces developing in composite materials during hardening. *J. Am Dent. Assoc.*, 106:475-477, 1983.
  10. Pintado, M.R. and Douglas, W.H.: The comparison of microleakage between two different dentin bonding resin systems. *Quintessence Int.*, 19:905-907, 1988.
  11. Mjör, I.A., Hensten-Pettersen, A.H. and Skogedal, O.: Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture technique, implantation tests and pulp studies, *Int. Dent. J.*, 27:124-129, 1977.
  12. Buonocore, M.G.: A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J. Dent. Res.*, 34:849-853, 1955.
  13. Munksgaard, E.C., Hansen, E.K. and Asmussen, E.: Effect of five adhesives on adaptation of resin in dentin cavities. *Scand. J. Dent. Res.*, 92:544-548, 1984.
  14. Fusayama, K., Nakamura, M., Kurosaki, N. and Iwaku, M.: Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J. Dent. Res.*, 58:1364-1370, 1979.
  15. Stanley, H.R., Going, R.E. and Chauncey, H.H.: Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J. Am. Dent. Assoc.*, 91:817-825, 1975.
  16. Douglas, W.H.: Clinical status of dentin bonding agents. *J. Dent.*, 17:209-215, 1989.
  17. Tao, L., Pashley, D.H. and Boyd, L.: Effect of different types of smear layers on dentin and enamel shear bond strengths. *Dent. Mater.*, 4:208-216, 1988.
  18. Hansen, E.K. and Asmussen, E.: Effect of postponed polishing on marginal adaptation of resin used with dentin-bonding agent. *Scand. J. Dent. Res.*, 96:260-264, 1988.
  19. Hansen, E.K. and Asmussen, E.: Comparative study of dentin adhesives. *Scand. J. Dent. Res.*, 93:280-287, 1985.
  20. Hansen, E.K.: Effect of Scotchbond dependent on cavity cleaning, cavity diameter and cavosurface angle. *Scand. J. Dent. Res.*, 92:141-147, 1984.

21. Bowen, R.L. and Cobb, E.N.: A method for bonding to dentin and enamel. *J. Am. Dent. Assoc.*, 107:734-736, 1983.
22. Bowen, R.L., Cobb, E.N. and Rapson, J.E.: Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues: Improvement in bond strength to dentin. *J. Dent. Res.*, 61:1070-1076, 1982.
23. Asmussen, E. and Munksgaard, E.C.: Formaldehyde as bonding agent between dentin and restorative resins. *Scand. J. Dent. Res.*, 92:480-483, 1984.
24. Asmussen, E. and Munksgaard, E.C.: Bonding of restorative resins to dentin promoted by aqueous mixtures of aldehydes and active monomers. *Int. Dent. J.*, 35:160-165, 1985.
25. Munksgaard, E.C. and Asmussen, E.: Dentin-polymer bond mediated by glutaraldehyde/HEMA. *Scand. J. Dent. Res.*, 93:463-466, 1985.
26. Munksgaard, E.C. and Asmussen, E.: Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. *J. Dent. Res.*, 63:1087-1089, 1984.
27. Browne, R.M. and Tyas, M.J.: Biological testing of dental restorative materials in vitro - a review. *J. Oral Rehabil.*, 6:365-374, 1979.
28. Hensten-Pettersen, A. and Helgeland, K.: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand. J. Dent. Res.*, 85:291-296, 1977.
29. Hensten-Pettersen, A. and Helgeland, K.: Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand. J. Dent. Res.*, 89:102-107, 1981.
30. Kawahara, H., Imanishi, Y. and Oshima, H.: Biological evaluation on glass ionomer cement. *J. Dent. Res.*, 58:1080-1086, 1979.
31. Das, S.: Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg.*, 52:76-84, 1981.
32. Wennberg, A.: An in vitro method for toxicity evaluation of water-soluble substances. *Acta. Odont. Scand.*, 34:33-41, 1976.
33. Meryon, S.D., Stephens, P.G. and Browne, R.M.: A modification of the Millipore method for screening restorative materials. *Int. Endod. J.*, 15:197-202, 1982.
34. Tronstad, L., Wennberg, A. and Hasselgren, G.: Screening tests for dental materials. *J. Endod.* 4:304-307, 1978.
35. Tyas, M.J.: An in vitro method for the toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, 56, Abstr. No. 122, 1977.
36. Wennberg, A.: Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo methods. *J. Endod.*, 6:784-787, 1980.
37. Yesilsoy, C. and Feigal, R.J.: Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. *J. Endod.*, 11:401-406, 1985.
38. Hansen, E.K.: Effect of three dentin adhesives on marginal adaptation of two light-cured composites. *Scand. J. Dent. Res.*, 94:82-86, 1986.
39. Chohayeb, A.A. and Rupp, N.W.: Comparison of microleakage of experimental and selected commercially available bonding systems. *Dent. Mater.*, 5:241-243, 1989.
40. Eliades, G.C., Caputo, A.A. and Vougiouklakis, G.J.: Composition, wetting properties and bond strength with dentin of 6 new dentin adhesives. *Dent. Mater.*, 1:170-176, 1985.
41. Finger, W.J., Manabe, A. and Alker, B.:

- Dentin surface roughness vs. bond strength of dentin adhesives. *Dent. Mater.*, 5:319-323, 1989.
42. Hansen, E.K. and Asmussen, E.: Marginal adaptation of posterior resins: Effect of dentin-bonding agent and hygroscopic expansion. *Dent. Mater.*, 5:122-126, 1989.
  43. Hasegawa, T., Manabe, A., Itoh, K. and Wakumoto, S.: Bonding stability and shelf life of GLUMA. *Dent. Mater.*, 5:150-152, 1989.
  44. Kanka III, J.: The effect on microleakage of four dentin-enamel bonding systems. *Quintessence Int.*, 20:359-361, 1989.
  45. Suzuki, M., Gwinnett, A.J. and Jordan, R.E.: Relationship between composite resins and dentin treated with bonding agents. *J. Am. Dent. Assoc.*, 118:75-77, 1989.
  46. Munksgaard, E.C., Itoh, K., Asmussen, E. and Jørgensen, K.D.: Effect of combining dentin bonding agents. *Scand. J. Dent. Res.*, 93:377-380, 1985.
  47. Tao, L. and Pashley, D.H.: Dentin perfusion effects on the shear bond strengths of bonding agents to dentin. *Dent. Mater.*, 5: 181-184, 1989.
  48. Van Dijken, J.W.V. and Hörstedt, P.: The effects of GLUMA and GLUMA/Scotchbond on in vitro marginal adaptation of a composite resin to dentin. *Dent. Mater.*, 5:165-167, 1989.
  49. Freshney, R.I.: *Culture of animal cells*, pp. 127-134, 2nd ed. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987.
  50. Imai, Y., Watanabe, A., Chang, P.I. and Masuhara, E.: Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J. Dent. Res.*, 61:1024-1027, 1982.
  51. Qvist, V.: Pulp reactions in human teeth to tooth colored filling materials. *Scand. J. Dent. Res.*, 83:54-66, 1975.
  52. Stanley, H.R., Bowen, R.L. and Folio, J.: Compatibility of various materials with oral tissues. II: Pulp responses to composite ingredients. *J. Dent. Res.*, 58:1507-1517, 1979.
  53. Brännström, M. and Nordenvall, K.J.: Bacterial penetration, pulpal reaction and the inner surface of Concise enamel bond. Composite fillings in etched and unetched cavities. *J. Dent. Res.*, 57:3-10, 1978.
  54. Hörsted-Bindslev, P.: Monkey pulp reactions to cavities treated with Gluma dentin bond and restored with microfilled composite. *Scand. J. Dent. Res.*, 95:347-355, 1987.
  55. Felton, D., Bergenholtz, G. and Cox, C.F.: Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J. Dent. Res.*, 68:491-495, 1989.

– ABSTRACT –

## THE CYTOTOXIC EFFECTS OF BONDING AGENTS ON THE HUMAN PULP FIBROBLASTS

Sun Hee Park, Byung Soon Min, Ho Young Choi, Sang Jin Park, Gi Woon Choi

*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University*

The purpose of this study is to evaluate the effects of dentin bonding agents on the fibroblasts cultivated from human pulp tissue.

The fibroblasts were cultured in DMEM/10%FBS medium. Whatman filter paper discs (6mm diameter) soaked with 2 $\mu$ l of dentin bonding agents were placed on a millipore filter (pore size 0.22 $\mu$ m) contained in a 50mm Petri dish, and then, exposed for 10 minutes, 30 minutes, 1 hour, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 4 days and 7 days in 37.°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator.

The results of the experiments were analyzed by counting the cells and measuring the protein contents at 1 day, 4 days and 7 days.

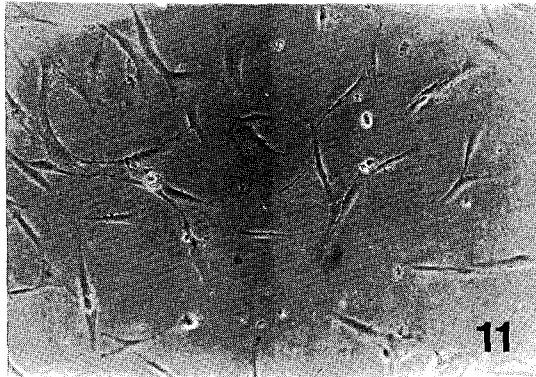
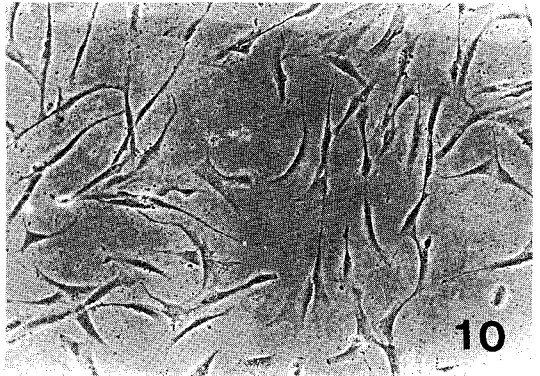
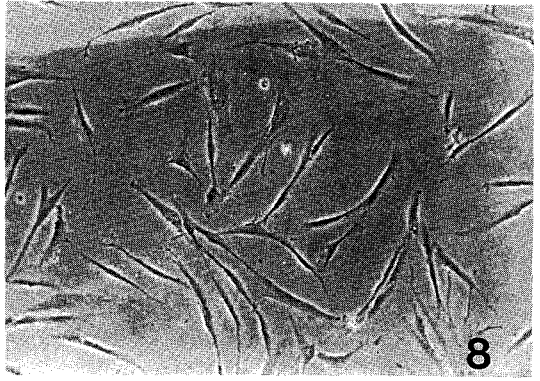
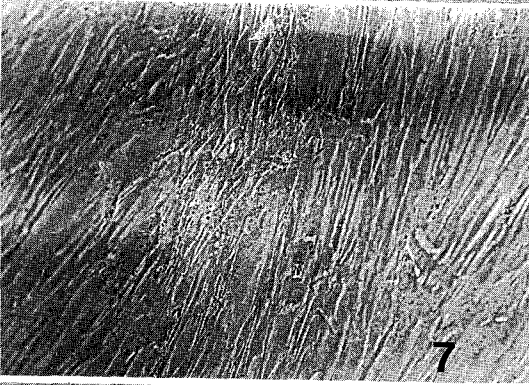
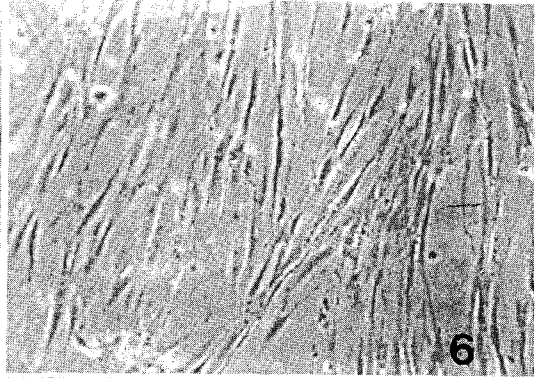
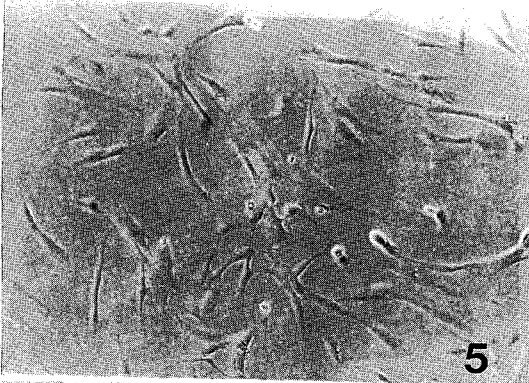
The results of this study were as follows:

1. CLEARFIL NEW BOND, LITE-FIL BOND, GLUMA 3 Primer and GLUMA 4 Sealer showed cytotoxicity compared to the control group in the cell counts and the protein contents.
2. GLUMA 4 Sealer showed the least cytotoxicity among the three dentin bonding agents.
3. The results of the cell count were similar to the results of protein content measurement.
4. LITE-FIL BOND exhibited marked cytotoxicity during 1 day, but, the cytotoxicity was slightly reduced after 4 and 7 days.
5. In GLUMA 3 Primer group, it was not possible to count the cell numbers and measure the protein contents, but the degeneration of cells was observed under the inverted phase-contrast microscope.

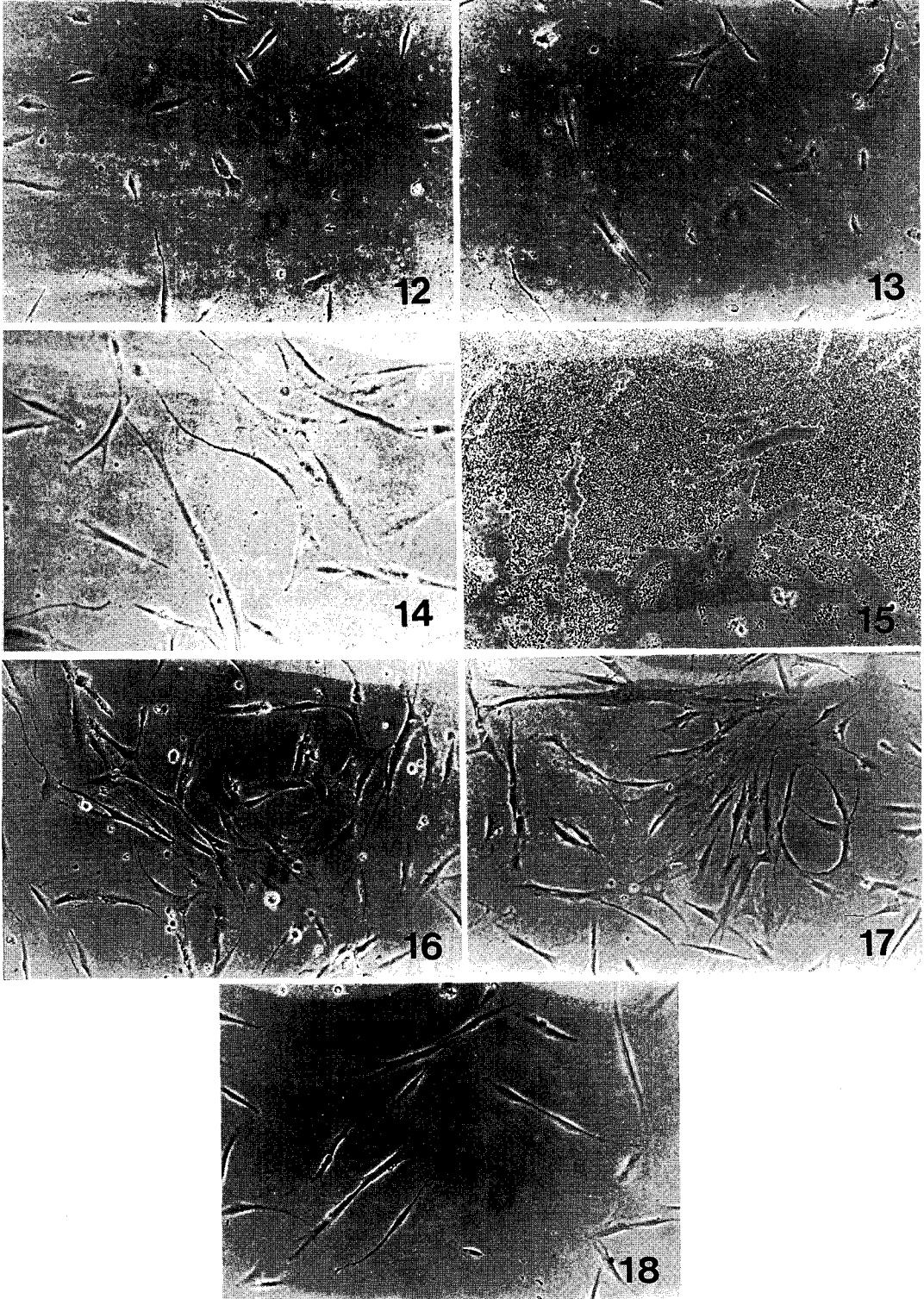
## EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 5.** Fibroblasts cultured for 1 day in control culture. (x100)
- Fig. 6.** Fibroblasts cultured for 4 days in control culture. (x100)
- Fig. 7.** Fibroblasts cultured for 7 days in control culture. (x100)
- Fig. 8.** Fibroblasts exposed for 10 minutes in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 9.** Fibroblasts exposed for 30 minutes in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 10.** Fibroblasts exposed for 1 hour in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 11.** Fibroblasts exposed for 6 hours in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 12.** Fibroblasts exposed for 12 hours in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 13.** Fibroblasts exposed for 1 day in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 14.** Fibroblasts exposed for 4 days in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 15.** Fibroblasts exposed for 7 days in CLEARFIL NEW BOND. (x100)
- Fig. 16.** Fibroblasts exposed for 10 minutes in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 17.** Fibroblasts exposed for 30 minutes in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 18.** Fibroblasts exposed for 1 hour in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 19.** Fibroblasts exposed for 6 hours in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 20.** Fibroblasts exposed for 12 hours in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 21.** Fibroblasts exposed for 1 day in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 22.** Fibroblasts exposed for 4 days in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 23.** Fibroblasts exposed for 7 days in LITE-FIL BOND. (x100)
- Fig. 24.** Fibroblasts exposed for 10 minutes in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 25.** Fibroblasts exposed for 30 minutes in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 26.** Fibroblasts exposed for 1 hour in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 27.** Fibroblasts exposed for 6 hours in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 28.** Fibroblasts exposed for 12 hours in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 29.** Fibroblasts exposed for 1 day in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 30.** Fibroblasts exposed for 4 days in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 31.** Fibroblasts exposed for 7 days in GLUMA 4 Sealer (x100)
- Fig. 32.** Fibroblasts exposed for 10 minutes in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 33.** Fibroblasts exposed for 30 minutes in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 34.** Fibroblasts exposed for 1 hour in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 35.** Fibroblasts exposed for 6 hours in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 36.** Fibroblasts exposed for 12 hours in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 37.** Fibroblasts exposed for 1 day in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 38.** Fibroblasts exposed for 4 days in GLUMA 3 Primer (x100)
- Fig. 39.** Fibroblasts exposed for 7 days in GLUMA 3 Primer (x100)

논문 사진부도 ①

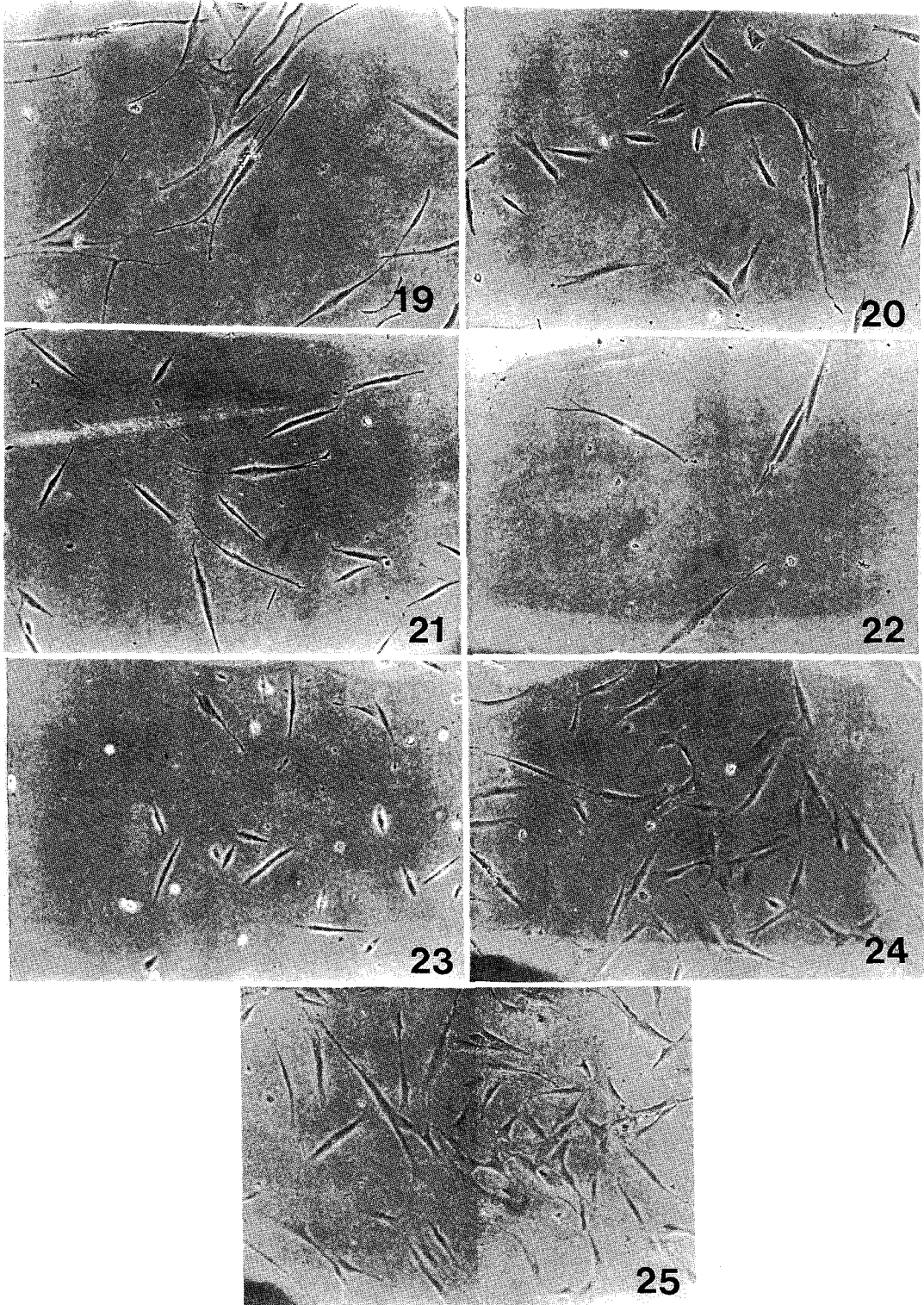


논문 사진부도 ②

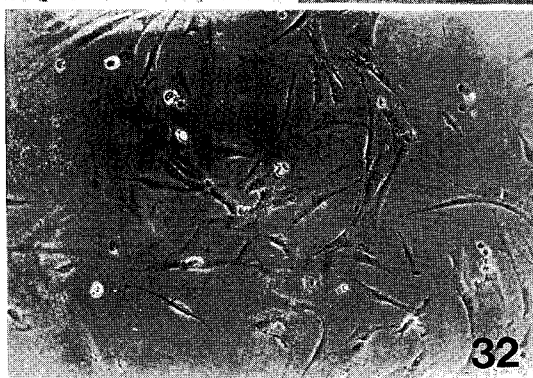
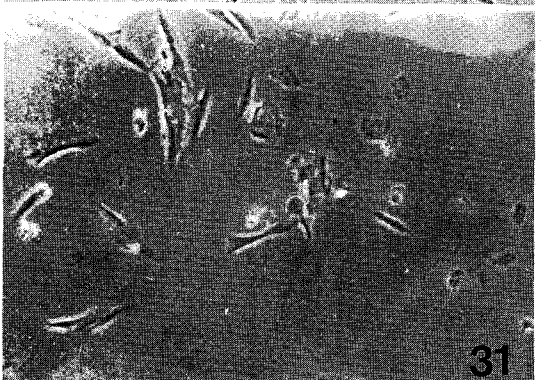
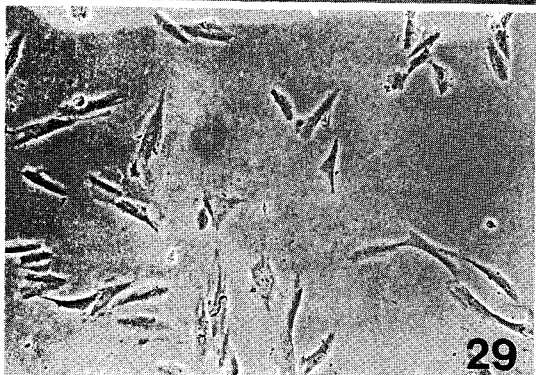
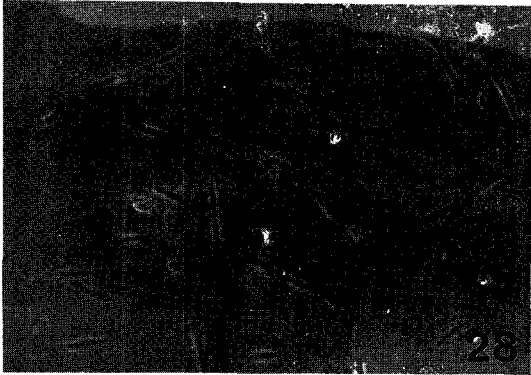
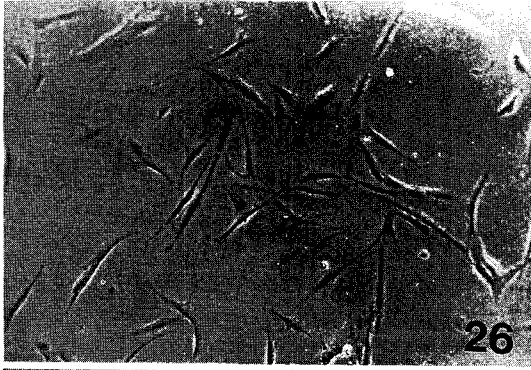




논문 사진부도 ③



논문 사진부도 ④



논문 사진부도 ⑤

