근관 충전용 Sealer가 수종의 세포에 미치는 독성효과에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

임미경 · 이정식

목 차

Ⅰ. 서 론
Ⅱ. 실험재료 및 방법
Ⅲ. 실험성적
Ⅳ. 총괄 및 고찰
Ⅴ. 결 론
참고문헌
사진부도
영문초록

Ⅰ. 서 론

성공적인 근관치료를 위해서는 기계화학적인 방법으로 형성된 근관을 습기가 침입할 수 없도록 완벽하게 폐쇄해야 하며, 불완전한 근관충전은 근관치료 실패의 60%를 차지한다고 보고된 바 있다[1]. 근관을 충전하면 근관충전재는 치근단 조직과 접촉하게 되며, 특히 과잉충전된 경우에서 근관 충전용 sealer는 근첨공을 넘어서 치근단 조직을 자극하여 염증반응을 유발한다[2-5]. 따라서 근관충전용 sealer가 구비하여야 할 이상적인 성질 중에서 특히 생체 적합성은 근단부 조직의 치유에 영향을 미칠 수 있다[6].

치과에서 사용되는 재료는 임상에서 사용되기 전에 생체적합성을 평가하게 되며, 평가방법은 생체외(in vitro)방법과 생체내(in vivo) 방법으로 대별할 수 있다.

생체내 방법은 장기간의 실험기간이 소요되어 최소한 3개월 이상이 걸리며, 비용이 많이 들고 실험동물의 사육이나 희생등 여러 제한요소가 있다[7]. 또한 조직표본을 제작하는 과정에서 표본을 자르고 선택하는 방법에 대하여도 이견이 있으며, 실험결과를 정량적으로 측정하기 어렵다[8-9]. 이에 비하여 생체외 방법은 실험의 재현성과 표준화 및 소요되는 비용과 시간면에서 생체내 방법보다 유리하며 결과를 판독하기 쉽다[7].

근관 충전용 sealer의 독성을 생체외에서 평가하는 방법으로 세포배양 방법이 많이 사용되어 왔는데 인체내 조직은 독성물질과 접촉하면 조직내의 세포 뿐만이 아니라 인접한 주위 조직에서 유래한 여러 종류의 세포들이 동시에 작용하여 다양한 대사, 염증 및 면역반응이 복합적으로 일어나므로 한가지 세포만을 사용하는 생체외 방법은 실제 임상에서 일어나는 상황과는 다르며, 그 결과를 임상에 적용하기 어렵다[10,11].

생체외 방법은 실험재료를 희석시키는 농도에 따라서 독성이 전혀 없는 결과로부터 강한 독성을 나타내는 결과까지 얻어낼 수 있으

이 연구는 1991년도 서울대학교병원 특진연구비 지원에 의한 결과임.

며[12], 이러한 관점에서 본다면 어떤 재료의 독성의 정도를 판정하기 보다는 독성의 유무만을 판정하고자 할 때 사용되는 방법으로서 아직까지는 재료를 검사할 때 초기에 사용되는 방법으로 적용되고 있다.

세포배양을 이용한 독성 검사는 최근 30여년 동안 연구되어 왔으며, 세포성장을 측정하거나, 세포막의 투과도 변화 및 세포내에 나타나는 병적 소견을 관찰하는 등 20여가지 이상의 방법이 사용되어 왔다[13]. BSI표준규격[14]은 세포독성검사에 관해 언급하지 않은 반면, ISO[15]는 technical report를 제시하고 추후 이들을 기준(standard)으로 확립하려 하였으며, ANSI/ADA는^{51}Cr방출을 측정하는 방법을 추천하였고[16], FDI[17]와 DNI/ND[18]는 세포막 투과도 변화, 대사변화, 모델 와동법(model cavity method)등 3가지 실험법을 제시하고 이중에서 재료 및 실험자와 주관에 의해 실험방법을 선택하도록 하였다.

근관치료에 사용되는 재료의 독성 실험에 사용된 세포의 종류는 다양하게 보고된 바 있다[19]. 그러나 정상적인 이배엽세포(diploid cell) 또는 변형세포(transformed cell)를 선택해야 하는지의 여부에 대하여 명확한 기준이 없으며, 배양상태(culture condition)에 대해서도 기준이 설정되어 있지 않다. 정상 이배엽세포는 영구세포 또는 변형세포와 여러가지 측면에서 그 성질이 다르다. 즉 분열속도나 밀도에 의한 성장조절 효과, 세포의 노화와 배지의 선택, mitochondria의 기능과 성장기질 및 열에 대한 반응등에서 각기 다른 성상을 보이므로 정상 이배엽세포는 독성물질과 접촉시에 변형세포와는 다른 반응을 나타낼 수 있다고 보고된 바 있다[20]. 근관충전용 sealer의 독성 실험에서 재료의 물리적인 상태뿐만 아니라 세포에 접촉한 정도가 실험결과에 영향을 미칠 수 있다[19]. Sealer는 임상에서 유동성인 반고형상태로 사용되며, 근관내에서 서서히 경화되는데 혼합한 직후 독성이 가장 강하고, 시간 경과에 따라 독성이 감소되는 것으로 알려져 있다[21-22].

또한 sealer의 독성 실험에서는 sealer를 녹여서 사용하기도 하고[22], 일정 시간동안 방치하여 경화시킨 후에 고형 상태로 직접 실험에 사용하기도 하며[23], agar overlay법에서는 세포와 독성물질 사이에 다른 물질을 매개하기도 한다[24]. 근관 충전에 사용되는 sealer는 크게 zinc oxide eugenol제재, 레진 제재, calcium hydroxide제재 등으로 대별 할 수 있는데, 이들간의 세포독성에 관하여는 연구마다 다양하며 이들을 서로 비교하기는 어렵다[19].

MTT방법은 세포내 효소활성을 이용한 방법으로 ^{51}Cr측정법이나 ^{3}H uptake 측정법에 비하여 인체에 대한 위해성이 적고 방사성 물질의 폐기등과 같은 문제가 없을 뿐 아니라, 기계를 이용하여 단 시간내에 실험결과를 정량적으로 측정할 수 있으므로 편리하다[25].

이에 저자는 zinc oxide eugenol 제재인 Tubliseal, 레진 계통의 AH-26, formaldehyde와 ZOE 성분이 포함된 N2, calcium hydroxide 제재인 Sealapex와 Vitapex등 5종의 근관 충전용 sealer의 세포독성을 세포배양법을 이용하여 비교하고자 하였다. 표준세포 3종을 사용하여 표준세포들 사이에도 독성발현에 차이가 있는지를 관찰하고, 또한 구강내에서 분리한 치은의 섬유아세포를 배양하여 정상조직 세포에 대한 독성 효과를 비교하였다.

또한 치수 및 치근단 질환의 진행 및 치유에 관여하는 혈액세포가 sealer와 접촉할 때 나타내는 반응을 관찰하기 위하여 사람의 혈액에서 단핵구를 분리하여 실험하였다. 이들 세포에 대하여 MTT를 이용한 ELISA READER법 및 역상현미경 관찰법, lactate dehydrogenase 활성도등을 이용하여 실험 방법에 따른 세포독성에 차이가 있는지를 비교하였다.

II. 실험 재료 및 방법

I. 실험 재료

실험재료는 AH-26(De Trey AG Co., Zurich, Switzerland), N2(N2 Universal AGSA Co., Japan), Tubliseal(Kerr Manufacturing Co., Romulus, U.S.A),

Sealapex(Kerr Manufacturing Co., Romulus, U.S.A), Vitapex(Neo Dental Chemical products Co. Tokyo, Japan)등 근관충전용 sealer 5종을 사용하였다.

II. 실험 방법

1. 실험용액의 준비

각각의 근관충전용 sealer를 제조 회사의 지시대로 혼합하여, 직경이 16mm인 세포배양용 24-well plate(Corning, U.S.A. lot No. 14831)에 높이가 1.5mm가 되도록 넣은 후, 1 ml의 세포성장배지를 첨가하였다. 성장배지는 10% fetal calf serum, penicillin 2500 U/ml, gentamicin 250μg/ml, bacitracin 2.5U/ml이 포함된 minimum essential medium(MEM, GIBCO Co., U.S.A.)용액을 사용하였다. 실험용액은 3가지 군으로 나누어 독성효과를 비교하였는데, 혼합직후 배양액을 첨가한 군과 혼합한 뒤 3일 후 배양액을 첨가한 군(3일군), 혼합한 뒤 7일 방치 후 배양액을 첨가한 군(7일군)으로 분류하였다.

배양액을 첨가한 후 24시간동안 37°C, 5% CO_2배양기(Forma Scientific, CH/P Waters-Jacketed Incubator, U.S.A.)에서 배양하였다. 배양액을 0.45μm의 syringe filter(Gelman Sciences, lot No.4184, U.S.A.)로 여과시킨 뒤, 실험용액으로 사용하였다.

2. Established cell line에 대한 세포 독성 실험

가) Established cell line의 배양

실험에 사용한 세포는 HEp-2 cell(ATCC No. CCL23, Passage No. 363), McCoy cell(ATCC No. CRL1696, Passage No. unknown), MRC-5(ATCC No. CCL171)등 3종을 사용하였다. Established cell line의 배양은 세포배양용 플라스크(80cm^2, Nunclon, Denmark)를 사용하여 배양액을 버린 다음 MEM으로 1회 세척하여 0.1% trypsin을 10 ml 넣고 실온에서 30초간 방치 후 버렸다. 바닥에 trypsin이 약간 남은 플라스크를 37°C 5% CO_2 배양기에 5분간 둔 후 세포를 플라스크 바닥에서 떼어 5% fetal bovine serum, 3% L-glutamine이 포함된 MEM 10ml을 넣고 세포를 회수하였다. 세포 부유액 0.2 ml과 동량의 0.2% trypan blue를 섞어 hemocytometer로 세포수를 약 1×10^6/ml로 산정하여 5ml씩 플라스크에 나누어 분주하고 5% fetal bovine serum, 3% L-glutamine이 든 MEM 20ml을 첨가한 뒤 다시 37°C, 5% CO_2배양기에 배양하였다.

MRC-5세포는 약 10일만에 계대 배양하고, HEp-2 및 McCoy 세포는 2-3일만에 계대배양하였다. 세포가 충분히 자라면 성장배지(MEM with 10% fetal bovine serum, 3% L-glutamine)를 넣고 실험에 사용하였다.

나) Established cell line의 독성 실험

성장배지가 든 플라스크의 배양액을 제거하고 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하였는데 1회 세척시에는 20ml, 2회 세척시에는 10ml을 사용하고 잔여액은 pipette로 제거하였다. 1% trypsin(Life Technologies Inc. U.S.A.) 5 ml을 넣고 30초간 실온에 둔 후 Trypsin용액을 버리고 바닥에 잔여액 약 1ml이 든 플라스크를 37°C, 5% CO_2배양기에 5분간 두었다. 성장배지 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000rpm(VS-5500, Vision Co., Korea)에 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 성장배지로 세포수를 2×10^6cell/ml 로 조정하였다. 96-well plate(NUNC, Denmark)에 well당 100μl씩 분주한후, 37°C, 5% CO_2배양기에서 24시간 배양후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 1회 세척한 후, 각 well에 성장배지를 50μl씩 첨가하였다.

실험용액은 성장배지로 희석하여 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8희석용액을 준비하고 실험용액을 넣지 않은 배양액을 대조군 용액으로 사용하여 각 well에 50μl씩 첨가한 후 37°C, 5% CO_2배양기에서 24시간 배양하였다.

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-dimeth-

yltetrazolium bromide(MTT, 98%, Jensen Chemical MW 414, $C_{18}H_{16}BrN_5S$, Belgium)를 인산완충용액에 2mg/ml이 되도록 녹인 후, 각 well에 50μl씩 첨가하여 4시간동안 37°C, 5% CO_2배양기에서 배양한 후 MTT용액을 버리고, DMSO(Dimethyl Sulfoxide, So $(CH_3)_2$, MW 78.1, Merck)용액을 well당 50μl씩 넣고, Tray Mixer(Fujizoki Pharmaceutical Co.FM 5-1, Japan)로 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA READER II (Behring, Serial No. 350610, Germany)에서 측정파장 570nm, 참고파장 650nm로 흡광도를 측정하였다. 흡광도 비교는 one-way ANOVA로 통계처리하였다(P value=0.05).

3. 구강내 섬유아세포에 대한 세포독성 실험

가) 일차배양

교정치료를 위하여 원광대학교 병원에 내원한 10대 환자의 제일 소구치를 발치하면서 발치와 주위의 치은을 절제하여 40% FBS(fetal bovine serum, GIBCO Co, U.S.A.)와 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., U.S.A.)가 첨가된 MEM(-minimum essential medium, L-glutamine포함, GIBCO Co, U.S.A.)에서 3회 세척하였다. 세척된 치은 조직을 60mm세포배양용 Petri dish(Corning Co, U.S.A.)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No. 15 scalpel 2개를 이용하여 1mm²로 세절한 후 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 편 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37°C, 5% CO_2, 습도 100%인 배양기(Model-8409C, Vision Co., Korea)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1% 항생제를 첨가한 MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일간격으로 교환하였다.

나) 이차배양

Petri dish내의 배양액을 제거하고 HBSS (Hank's buffered salt solution, GIBCO Co., U.S.A.)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin EDTA(GIBCO Co., U.S.A.)를 dish당 2ml씩 넣고, 3분간 실온에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용하여 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 1 : 3내지 1 : 4비율로 분주하고 같은 방법으로 5회 내지 7회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

다) 독성실험

60×15mm²의 둥근 세포배양접시(Corning, U.S.A.)에서 trypsin을 이용하여 섬유아세포를 수거하여 최종 세포수를 2×10^5/ml로 조정한 뒤 96-well microplate 각 well에 100μl씩 분주한 후, 3일군 실험용액(AH-26, Sealapex, Tubliseal, N2)을 50μl씩 넣었다. 16시간동안 37°C, CO_2 배양기에서 배양한 후 MTT(2mg/ml)용액을 넣고, 4시간후 DMSO를 넣어 발색반응을 관찰하고 역상현미경으로 formazan이 형성된 세포수를 산정하였다.

4. 단핵구 독성실험

건강한 성인으로 부터 정맥혈을 약 30ml채혈하여, 방부제가 들어있지 않은 헤파린(preservative free heparin 20mg/ml)과 섞어 동량의 생리식염수로 희석한 후 Lymphoprep (NXCOMED AS, Norway, s.g 1.077g/ml)에 Pasteur pipette을 이용해 혈액과 Lymphoprep의 비율은 3 : 1정도로 중첩시켰다. 400g에서 30분간 원심분리하여(DAMON/IEC DIVISION, CRU-5000 Centrifuge, U.S.A.), 비중차에 의해 생긴 단핵구층을 pipette을 이용해 분리 후 10% fetal calf serum이든 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)으로 2회 세척하여, 세포수를 1×10^6/ml로 조정하였다. 세포수는 세포부유액과 동

량의 1% trypan blue용액을 섞은 후, hemocytometer에서 현미경으로 관찰하였으며, 이때 생존도(viability)와 순수도(purity)를 구하여 생존도, 순수도가 각각 95%이상의 단핵구를 대상으로 하였다.

준비한 실험용액중 3일군을 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8로 각각 희석하여 96-well microplate에 첨가하여 실험에 사용하였으며 대조군으로는 실험 용액을 첨가하지 않은 동량의 세포배양액(IMDM with 10%FCS)을 사용하였다. Tray mixer(Fujuzoki Pharmaceutical Co. FM5-1, Japan)로 잘 섞은 후, 37°C, 5%CO_2 배양기에서 약 16시간동안 두었다.

첫 번째 plate에서 100μl를 취하여, 생리식염수로 2배 희석 후 sample cup에 넣고 생화학 자동분석기(Hitachi, 747 Automatic Analyzer, Japan)로 lactate dehydrogenase (LD, Daiichi Purechemicals Co., LTD, Japan) 효소의 활성도를 측정하였다.

두번째 plate는 MTT법으로 세포독성효과를 판정하기 위해, MTT in PBS(pH 7.2)를 50 ml씩 분주하고 4시간동안 CO_2배양기에 배양한 후 DMSO를 넣고 발색여부를 관찰후 역상현미경(OLYMPUS OPTICAL Co., LTD, IMT-2, Japan)으로 formazan이 형성된 세포수를 검산하였다.

III. 실험 성적

1. Established Cell Line에 대한 세포독성

가) HEp-2 세포에 대한 독성(Table 1-3)

혼합직후 배양액을 첨가한 군에서는 5종의 근관충전용 sealer 모두에서 대조군에 비하여 유의하게 HEp-2세포에 대한 독성을 나타내었다($p<0.05$).

AH-26과 Tubliseal에서는 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군과 3일군, 7일군 사이에서 시간경과에 따른 세포독성의 감소가 나타나지 않았고 N2와 Sealapex에서도 시간경과에 따른 독

Table 1. Absorbance of HEp-2 cells on solutions of five root canal sealers of the immediate group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 2.112 (.0281).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.1733* (.0027**)	.0730 (.0012)	.8637 (.0178)	.9367 (.0009)
N2	.0406 (.0006)	.0473 (.0007)	.0873 (.0003)	.2410 (.0000)
Tubliseal	.0527 (.0013)	.0290 (.0006)	.7977 (.0027)	1.4510 (.0120)
Sealapex	.0203 (.0009)	.0463 (.0021)	.0417 (.0023)	.0673 (.0009)
Vitapex	1.0377 (.0092)	2.2257 (.0267)	2.3783 (.0619)	2.5000 (.0000)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 2. Absorbance of HEp-2 cells in solutions of five root canal sealers of the third day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 2.112 (.0281).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.3580* (.0010**)	.1447 (.0012)	.9070 (.0015)	.8180 (.0050)
N2	.0447 (.0009)	.1140 (.0006)	.1167 (.0009)	.0823 (.0003)
Tubliseal	.0990 (.0012)	.0923 (.0003)	.5120 (.0030)	1.7260 (.0332)
Sealapex	.1047 (.0023)	.0560 (.0000)	.1323 (.0030)	.7807 (.0020)
Vitapex	.9508 (.4601)	2.3300 (.0859)	2.3457 (.0786)	2.2725 (.0975)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 3. Absorbance of HEp-2 cells in solutions of five root canal sealers of the seventh day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 2.112 (.0281).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.8457* (.0087**)	.3693 (.0019)	.3233 (.0009)	.8457 (.0087)
N2	.0473 (.0012)	.0237 (.0003)	.0270 (.0006)	.0227 (.0003)
Tubliseal	.0380 (.0012)	.0270 (.0006)	1.1367 (.0048)	1.5727 (.0132)
Sealapex	.0197 (.0003)	.0290 (.0006)	.0470 (.0010)	.8927 (.0090)
Vitapex	1.5640 (.0174)	1.7233 (.0103)	1.9277 (.0108)	2.1867 (.0452)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

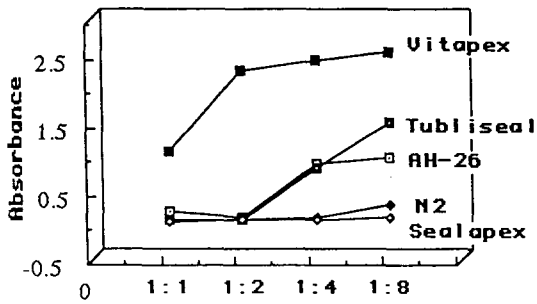


Fig. 1. Absorbance of HEp-2 cells (The immediate group)

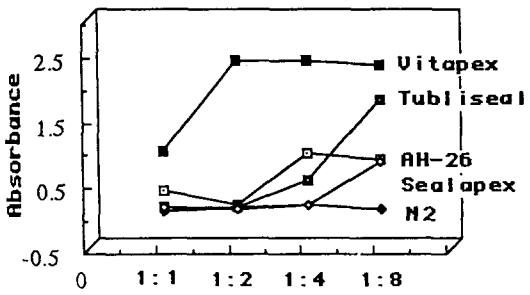


Fig. 2. Absorbance of HEp-2 cells (The third day group)

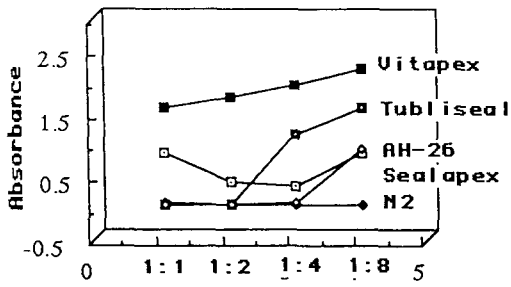


Fig. 3. Absorbance of HEp-2 cells (The seventh day group)

성감소가 유의하게 나타나지 않았으며 대조군에 비하여 7일군에서도 강한 세포독성을 보였다($p<0.05$).

N2는 혼합즉시 배양액을 첨가한 군과 3일군 및 7일군 모두에서 1:8로 희석시킨 군에서도 독성이 강했다. Vitapex에서는 대조군보다 1:8로 희석시킨 군이 더 큰 흡광도를 나타내어 오히려 HEp-2세포의 성장이 촉진되었으며, 3일군 모두에서 1:2로 희석시킨 군에서는 대조군과 비슷한 흡입광도가 나타나 Vitapex는 HEp-2세포에 대해 세포 독성 효과가 약했다.

혼합 직후 배양액을 첨가한 군에서는 1:1과 1:2용액에서는 Vitapex가 가장 약한 세포독성을 나타내었으며, 기타 4종의 sealer는 비슷한 정도의 강한 세포독성을 보였다($p<0.05$).

1:4로 희석한 용액에서는 Vitapex가 가장 독성이 약하였고, Tubliseal과 AH-26은 중등도의 세포독성을 보인 반면, N2와 Sealapex는 강한 세포독성을 나타내었다.

1:8 희석용액에서는 Vitapex, Tubliseal, AH-26, N2, Sealapex순으로 흡광도 값이 감소되었다. Vitapex와 Tubliseal, AH-26은 1:1에서 1:8로 농도가 희석될 수록 세포독성

이 감소되었으나, N2와 Sealapex는 강한 독성이 유지되었다.

3일군 용액에서도 모든 농도에서 Vitapex의 세포독성이 가장 약하게 나타났다($p<0.05$).

1 : 1과 1 : 2용액에서는 Vitapex를 제외하면 각 sealer의 독성차이가 나타나지 않은 반면, 1 : 4와 1 : 8로 희석시에는 독성 차이가 나타나, N2가 가장 강한 세포독성을 보였다($p<0.05$).

8일군 용액에서는 모든 농도에서 각 sealer의 독성차이가 나타났는데, N2는 모든 농도에서 세포독성이 강하게 유지되었다.

나) McCoy세포에 대한 독성(Table 4-6)

5종의 근관충전용 sealer가 모두 대조군에 비하여 유의하게 McCoy세포에 대하여 독성을 보였다($p<0.05$). 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군의 1 : 1용액에서는 vitapex가 가장 약한 세

Table 4. Absorbance of McCoy cells in solutions of five root canal sealers the immediate group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 1.9967 (.0718).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.0593* (.0015**)	.0750 (.0031)	.1583 (.0037)	.7493 (.0241)
N2	.0587 (.0009)	.0520 (.0006)	.0667 (.0003)	.2857 (.0091)
Tubliseal	.0513 (.0009)	.0573 (.0020)	.5077 (.0200)	1.8883 (.0200)
Sealapex	.0443 (.0009)	.0527 (.0009)	.0800 (.0000)	.0760 (.0006)
Vitapex	.3020 (.0040)	.6140 (.0118)	.7077 (.0105)	1.4013 (.0067)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 5. Absorbance of McCoy cells on solutions of five root canal sealers of the third day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 1.9967 (.0718).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.0647* (.0015**)	.0950 (.0015)	.2180 (.0006)	1.4940 (.0318)
N2	.0497 (.0013)	.0517 (.0047)	.3557 (.2937)	.8605 (.0195)
Tubliseal	.0510 (.0006)	.0500 (.0021)	.2343 (.0013)	1.2370 (.0013)
Sealapex	.0500 (.0006)	.0587 (.0003)	.0850(.0000)	.0793 (.0003)
Vitapex	.3473 (.0039)	.2410 (.0026)	.2980 (.0030)	1.9797 (.0787)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 6. Absorbance of McCoy cell in solutions of five root canal sealers of the seventh day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 2.112 (.0281).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.1113* (.0013**)	.1090 (.0330)	.2010 (.0006)	.7013 (.0078)
N2	.0557 (.0015)	.0560 (.0006)	.2510 (.0006)	.6840 (.0125)
Tubliseal	.0690 (.0006)	.0683 (.0019)	.6950 (.3473)	1.7733 (.0371)
Sealapex	.0450 (.0006)	.0407 (.0003)	.0607 (.0003)	.0677 (.0003)
Vitapex	.3730 (.0023)	.4397 (.0065)	.6217 (.0038)	1.9657 (.0857)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

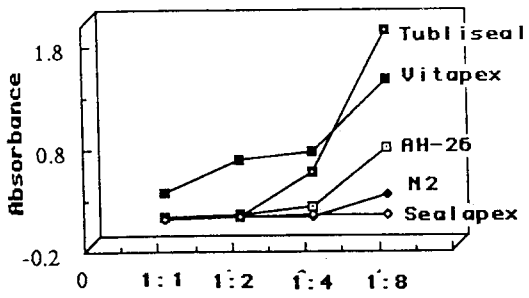


Fig. 4. Absorbance of McCoy cells (The immediate group)

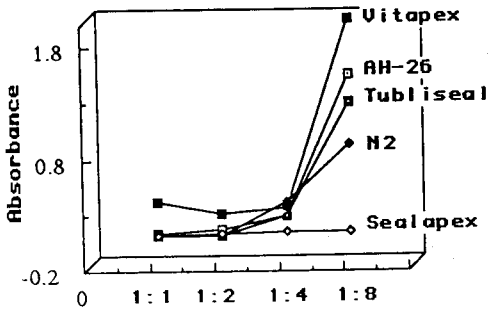


Fig. 5. Absorbance of McCoy cells (The third day group)

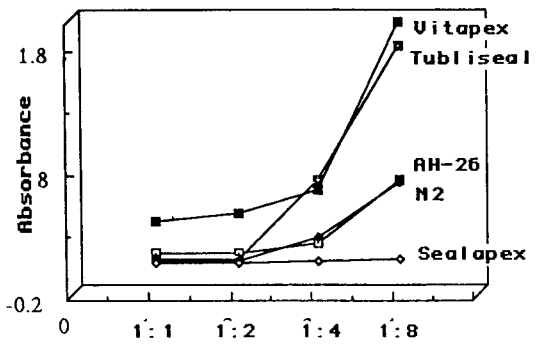


Fig. 6. Absorbance of McCoy cells (The seventh day group)

포독성을 보였으며, AH-26, N2, Tubliseal, Sealapex순으로 흡광도가 감소되어 나타났지만 이들의 독성차이에 대하여는 통계적인 유의성이 없었다. 각 sealer별로 비교하면 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군, 3일군, 및 7일군으로 갈수록 세포독성의 감소는 나타나지 않았으며, 불규칙한 흡광도 수치를 보여서 5종의 sealer의 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군, 3일군, 7일군 각각에서 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8로 희석한 경우에 대부분 농도가 희석될수록 sealer의 독성은 약화되어, 많은 formazan결정을 형성하였다. Vitapex에서는 혼합 즉시 배양액을 첨가하고 1 : 8로 희석시킨 군에서는 대조군과 유사한 흡광도 수치가 나타났으며, N2는 3일군과 7일군에서 1 : 8로 희석하면 상당히 독성이 약화되어 나타났고 Sealapex는 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군, 3일군, 7일군 모두에서 1 : 8로 희석하여도 독성이 강해서 희석에 의한 독성감소효과가 가장 적었다.

혼합 즉시 배양액을 첨가한 군에서는 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4용액에서는 Vitapex가 가장 약한 세포독성을 나타내었으나, 1 : 8로 희석한 군에서는 Tubliseal의 세포 독성이 가장 약하게 나타났으며($p<0.05$), N2와 Sealapex는 모든 농도에서 낮은 흡광도 수치를 보여서 희석에 따른 독성 감소 효과가 없이 모든 농도에서 강한 세포독성을 보였다. Tubiseal은 1 : 1과 1 : 2용액에서는 독성이 강했으나, 1 : 4와 1 : 8로 희석하면 독성이 현저히 감소되어 1 : 8용액에서는 약한 세포독성을 보였다. 3일군에서는 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4로 희석시킨 용액에서는 각 sealer의 독성차이가 크게 나타나지 않았으나, 1 : 8로 희석시킨 용액에서는 5종의 sealer에서 흡광도 수치의 차이가 나타났는데 모든 농도에서 Vitapex는 가장 높은 흡광도 값을 나타냈고, Sealapex는 1 : 8로 희석하여도 계속 강한 세포독성이 나타났다. 7일군에서는 1 : 4와 1 : 8로 희석한 용액에서 sealer간의 흡광도 차이가 나타나서, Vitapex와 Tubliseal이 미약한 세포독성을 AH-26과 N 2가 중등도의 세포독성을 나타내었고 Sealapex는 세포독성이 강하게 나타나 모든 농도에서 강한 세포독성을 보

였다.

다) MRC-5에 대한 세포독성(Table 7-9)

4종의 sealer에서 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군, 3일군, 7일군의 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8로 희석시킨 군 모두 대조군에 비하여 MRC-5에 대해 독성을 나타내었다($p<0.05$).

AH-26, Tubliseal, Vitapex등 3종의 sealer는 7일군이 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군과 3일군에 비하여 유의하게 독성이 감소하였다. Sealapex와 Tubliseal, Vitapex등 3종의 sealer는 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군, 3일군, 7일군 모두에서 1 : 8희석용액에서 대조군과 비슷한 정도로 formazan결정이 형성되어 세포독성이 미약하였고, 3가지 실험군 모두에서 1 : 1에서 1 : 8로 희석됨에 따라서 MRC-5에 대한 독성은 감소되었다.

혼합 즉시 배양액을 첨가한 군에서는 1 : 1용액에서는 4종의 sealer가 모두 세포독성이 강하게 나타났으나, 1 : 2희석 용액부터 독성차이가 나타나 Tubliseal과 Sealapex는 흡광도값이 감소되었고, AH-26과 N2는 강한 세포독성을 나타내었으며, 3일 군에서는 1 : 8용액에서만 독성차이가 나타났고 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4용

Table 7. Absorbance of MRC-5 cell in solutions of five root canal sealers of the immediate group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 2.112 (.0281).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.0260* (.0006**)	.0257 (.0003)	.0400 (.0000)	.0573 (.0152)
N2	.0350 (.0006)	.0370 (.0006)	.0370 (.0006)	.0303 (.0009)
Tubliseal	.0247 (.0003)	.0787 (.0012)	.8630 (.0173)	.9060 (.0121)
Sealapex	.0640 (.0006)	.2637 (.0003)	.7380 (.0021)	.8090 (.0021)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 8. Absorbance of MRC-5 cells in solutions of five root canal sealers of the third day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 0.931 (.0113).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.0317* (.0003**)	.0323 (.0003)	.0537 (.0003)	1.0467 (.0032)
N2	.0367 (.0009)	.0400 (.0010)	.0293 (.0007)	.0423 (.0009)
Tubliseal	.0280 (.0000)	.0297 (.0003)	.0460 (.0000)	.3580 (.0053)
Sealapex	.0370 (.0006)	.0443 (.0003)	.0503 (.0009)	.7370 (.0032)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 9. Absorbance of MRC-5 cells in solutions of five root canal sealers of the seventh day group. The values were read by ELISA-READER and the value of control group was 0.931 (.0113).

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.1313* (.0015**)	.1867 (.0009)	.2907 (.0019)	.3517 (.0007)
N2	.0340 (.0006)	.1547 (.0009)	.5980 (.0031)	.7497 (.0202)
Tubliseal	.1570 (.0006)	.7077 (.0009)	.7257 (.0026)	.9750 (.0015)
Sealapex	.3813 (.0003)	.7071 (.0023)	.8640 (.0026)	.7017 (.0006)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

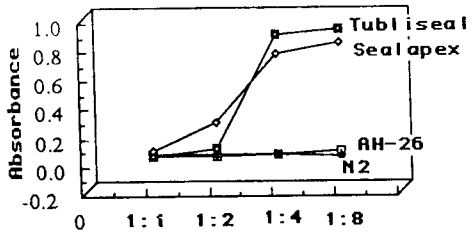


Fig. 7. Absorbance of MRC-5 cells (The immediate group)

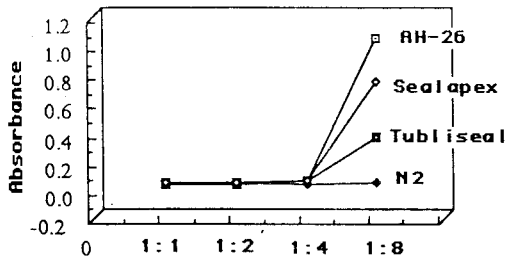


Fig. 8. Absorbance of MRC-5 cells (The third day group)

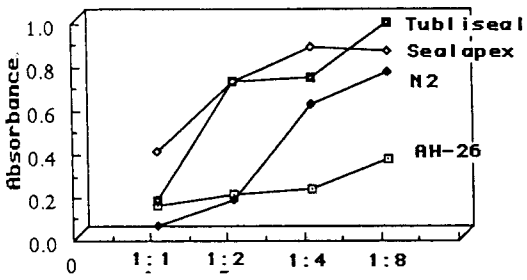


Fig. 9. Absorbance of MRC-5 cells (The seventh day group)

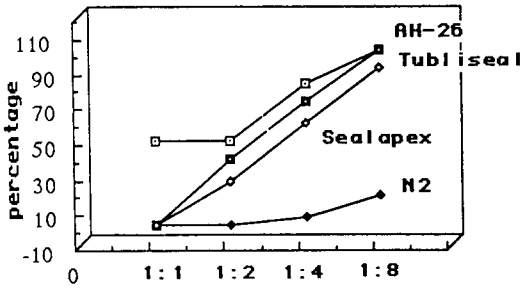


Fig. 10. Relative % of formazan formed cell (Gingival fibroblast)

액에서는 4종의 sealer가 모두 강한 세포독성을 나타내었다.

7일군에서는 모든 농도에서 4종의 sealer가 각각 다른 흡광도값을 보였고, AH-26은 희석에 의해서도 흡광도 값이 증가되지 않아 세포독성이 계속 강하게 유지되었다.

2. 구강내 섬유아세포에 대한 독성 (Table 10)

대조군 100%에 비하여 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군에서는 AH-26은 47.50%의 세포가 formazan결정을 생성하여 가장 약한 세포독성

Table 10. Cytotoxicity of five root canal sealers (the third day group) on human gingival fibroblasts in relative percentage of formazan forming cells. The value of control group was 100%

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	47.50* (12.50**)	47.50 (6.29)	80.00 (.00)	100.00 (.00)
N2	.00 (.00)	.00 (.00)	5.00 (5.77)	17.50 (2.50)
Tubliseal	.00 (.00)	37.50 (6.29)	70.00 (7.07)	100.00 (.00)
Sealapex	.00 (.00)	25.00 (5.77)	57.50 (9.57)	90.00 (4.08)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

이 나타났으며, N2, Sealapex, Tubliseal등 3종의 sealer는 formazan 결정을 생성하는 세포가 관찰되지 않았다. 1 : 2로 희석한 용액에서 AH-26는 47.5%, Tubliseal은 37.5%, Sealapex는 25%로 formazan형성 세포가 관찰되었으나 N2와 접촉한 세포들은 formazan을 형성하지 못하였으며 1 : 4로 희석시킨 용액에서는 AH-26에서 80%, Tubliseal에서는 70%, Sealapex에 57.5%, N2에서 5%로 나타났다.

1 : 8로 희석시킨 용액에서는 AH-26과 Tubliseal에서 모든 세포에서 formazan이 형성된 반면, Sealapex는 90%, N2는 17.5%의 formazan결정을 형성하였다.

AH-26은 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8로 희석시킴에 따라서 각각 47.5%에서 100%까지 formazam을 형성한 세포수가 증가하였고, N2에서는 1 : 4로 희석된 용액에서 formazan을 형성한 세포수가 5%로 보이며, 1 : 8로 희석시키면 17.5%로 나타나서 1 : 8희석 용액에서도 강한 독성이 관찰되었다.

Sealapex에서는 1 : 2로 희석시킨 용액부터 formazan결정이 생성되기 시작하여 1 : 4, 1 : 8로 희석됨에 따라서 formazan을 형성한 후 세포수는 각각 25%, 57.5%, 90%로 증가되어 나타났으며, Tubliseal에서도 1 : 2로 희석시킨 용액부터 formazan형성이 관찰되기 시작하여, 각각 37.5%, 70%, 100%로 증가되었다.

3. 단핵구에 대한 독성(Table 11, 12)

단핵구를 분리하여 sealer용액을 넣고 세포독성의 효과를 판정하기 위해, 세포가 용해되면서 유리되는 lactate dehydrogenase(LD)의 활성도를 측정하였다(Table 12). 1 : 1용액에서 LD활성도는 Tubliseal(92.3 IU/l), Sealpex(81.0 IU/l), Vitapex(63.0 IU/l), N2(58.5 IU/l), AH-26(53.3 IU/l)순으로 높았으며, 1 : 2희석액에서는 N2(53.3 IU/l), Tubliseal(57.8 IU/l), Sealapex(54.8 IU/l),

Table 11. Cytotoxicity of five root canal sealers (the third day group) on human mononuclear cells in relative percentage of formazan forming cells. The value of control group was 55%.

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	.00* (.00**)	7.50 (1.44)	11.25 (3.15)	15.00 (2.89)
N2	.00 (.00)	.00 (.00)	.00 (.00)	.00 (.00)
Tubliseal	.00 (.00)	.00 (.00)	1.00 (.58)	4.50 (.50)
Sealapex	.00 (.00)	.00 (.00)	22.75 (.03)	4.75 (1.75)
Vitapex	11.25 (3.75)	25.00 (2.89)	35.00 (8.66)	50.00 (4.08)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

Table 12. Lactate dehydrogenase levels (IU/1) of human mononuclear cells in solutions of five root canal sealers (the third day group). The value of control group was 16.5.

Sealers	1:1	1:2	1:4	1:8 (dilutions)
AH-26	53.25* (1.89**)	40.50 (1.50)	36.75 (1.89)	28.50 (1.50)
N2	58.50 (2.87)	53.25 (2.56)	42.00 (4.06)	36.75 (3.94)
Tubliseal	92.25 (3.75)	57.75 (1.44)	39.00 (2.45)	27.75 (3.32)
Sealapex	81.00 (2.12)	54.75 (.75)	39.00 (2.45)	33.75 (2.84)
Vitapex	63.00 (4.41)	33.75 (4.30)	19.50 (2.60)	19.50 (1.94)

n (number of analysis) = 3, * mean, ** SE

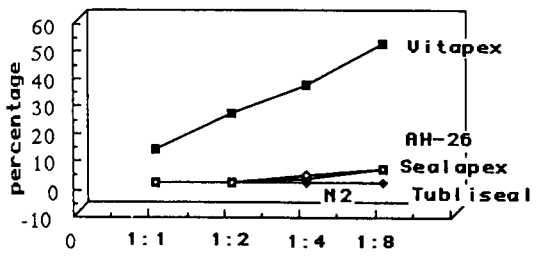


Fig. 11. Relative % of formazan formed cells (mononuclear cells, The third day group)

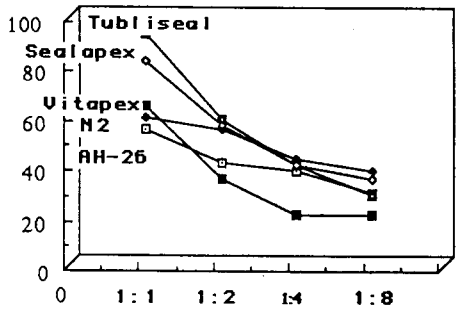


Fig. 12. LD levels of Mononuclear cells (The third day group)

AH-26(40.5 IU/l), Vitapex(33.8 IU/l)로 Vitapex가 가장 낮은 값을 보였고, 1 : 4, 1 : 8 희석액도 1 : 2희석액과 비슷한 순서를 보였다.

Vitapex의 1 : 4(19.5 IU/l), 1 : 8(19.5 IU/l) 희석액은 대조군(16.5 IU/l)과 비해 비슷한 결과를 보였다.

희석에 의한 효과를 보면 5종의 sealer모두에서 1 : 1에서 1 : 8로 희석함에 따라서 모두 독성이 감소되는 결과가 나타났는데, 이중 Sealapex, Tubliseal과 Vitapex의 세포독성효과가 유의하게 감소하였다($p<0.05$).

역상현미경으로 formazan형성하는 단핵구를 관찰한 결과, N2가 가장 세포독성이 강하여 1 : 8희석액에서도 formazan을 형성하지 않았으며, Sealapex와 Tubliseal은 비슷한 정도로 세포독성이 강했는데, 1 : 2희석액에서도 5% 미만의 세포만 formazan을 형성하였다.

AH-26은 1 : 1용액에서는 formazan을 형성하지 않았고, 그외는 10%내외의 formazan형성세포가 관찰되었고, Vitapex는 1 : 1용액에서는 약 10%, 1 : 2희석액에서 25%, 1 : 4희석액에서는 35%, 1 : 8희석액에서 50%의 formazan형성세포를 보여, 가장 세포독성이 적은 것으로 판정하였다. 대조군은 55%의 formazan형성세포를 보여, Vitapex 1 : 8희석액은 대조군과 비슷한 결과를 보였다. 4종의 실험용액중 N2가 가장 독성이 강하여 1 : 1, 1 : 2에서는 0%, 1 : 8에서는 17.5%의 formazan형성 세포를 보였고, Sealapex와 Vitapex는 비슷한 정도의 독성을 보였고, AH-26은 이보다 약간 독성이 강하게 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

여러 종류의 selaer가 사용되었으나, 이들은 대부분 생체에 유해한 영향을 미쳐서[26], selaer와 하치조신경이 접촉하게 되면 지각이상(paresthesia)이 일어나는데 그 원인은 paraformaldehyde를 포함하고 있거나, 경화과정 중에 formaldehyde가 생성되기 때문이다[2].

Zinc oxide eugenol이 생체외 실험에서 독성을 나타내는 원인은 주로 eugenol성분으로 보고되었으며[27], 또한 경화후에도 반응하지 않고 남은 eugenol성분이 독성을 일으키는 것으로 알려져 있고[28] 여러 농도의 zinc를 섬유아세포 및 대식세포에 첨가하여 배양하면 유해효과를 보인다[29]. 또한 zinc oxide와 eugenol뿐만아니라, resin이 세포독성을 더욱 강화시키는 것으로 보고된 바 있는데 분자량이 작고 휘발성인 resin자체가 원인이거나, resin이 방출되어 eugenol의 방출을 촉진시키기 때문으로 생각하였다[30].

Tubliseal의 독성에 대해서는 강하다는 보고[31-33]와 약하다는 보고[34-35]가 상반되게 발표되었다. $Ca(OH)_2$는 Ca^{++}과 $(OH)^-$가 일정한 속도로 지속적으로 분해되어 독성을 나타낸다[36]. $Ca(OH)_2$를 base로 하는 selaer중에는

resin, paraformaldehyde, eugenol, iodine이 포함된 것도 있어서 치근단 조직에 자극을 유발한다[37].

$Ca(OH)_2$계통 selaer의 세포 독성은 높은 알칼리성이 원인으로 생각되며 이로 인하여 조직이 괴사되고 효소 활성이 저해된다[38,39]. 또 고농도의 Ca^{++}이온은 신경세포의 흥분도를 감소시킨다[40]. 반면 Takahara등은 $Ca(OH)_2$계통 selaer에서 큰 pH변화를 발견해 내지 못하면서 독성의 원인을 polyresin, zinc oxide, Ba^{2+}로 생각하였다[34]. $Ca(OH)_2$용액(0.001137 g/ml)이 생체외 실험에서 돼지의 치수 섬유아세포에 미치는 DNA 합성능에 대한 영향을 연구하기 위해 ^3H uptake를 이용한 실험에서 calcium hydroxide가 어떤 농도에서는 치수 섬유아세포에 대하여 과다한 성장촉진 효과가 있다고 설명하였다[41].

Sealapex를 매식하여 조직반응을 연구한 결과 염증반응이 실험기간(90일) 내내 증가되었다고 보고된 바 있는데[42,43], 시간 경과에 따라 증가되는 이러한 이물반응은 Sealapex의 구성성분 중 titanium dioxide가 그원인으로 지목된 바 있다[44].

한편 titanium oxide를 제거하고 피하조직에 매식 한후 조직반응을 관찰하면 대식세포와 foreign body giant cell의 세포질내에서 발견되는 검은 입자는 주로 titanium과 barium으로 구성되어, 이들이 독성물질로 작용한다[27].

AH-26의 독성은 경화반응을 촉진시키는 역할을 하는 amine으로 추정되며[2], 경화시간은 37°C에서 24-40시간이나 Briseno등[45]의 실험에서 보면 독성물질의 방출은 더 오랜 시간에 걸쳐서 일어나는 것으로 보인다. Safavi등[46]의 실험에서 쥐의 섬유아세포에 대하여 초기에는 강한 독성이 나타났으나 차츰 회복되는 양상을 보였다.

또한 사람의 구강 섬유아세포에 대한 독성실험에서는 실험기간(15일) 동안 N2는 강한 세포독성을 보였는데 AH-26주변에서 세포가 일부 회복하였고, CRCS, ZOE에서는 거의 모두 회복되었다[47].

사람의 혈액 단구는 생체적합성이 있는 물질의 표면에 부착하여 자란다. 독성을 나타내는 근관 치료용 재료에 대해 사람의 단구, 림프구는 표면에 세포의 손상뿐아니라 표면 부착이나 퍼지는 성질에 전반적인 억제가 나타나지만 독성이 낮은 물질의 표면에는 부착하여 성장한다[48,49]. 또한 Gutta-percha와 ZOE제재를 실험동물에 매식하면 이물질로 인지되어 많은 수의 백혈구와 대식세포 및 세포질내부에 충전재 입자를 함유한 다핵거대세포가 나타난다고 보고된 바 있다[50].

표준세포를 실험재료로 사용하는 이유는 표준세포는 세포성장 속도를 예측할 수 있고 구하기 쉬우며, 실험실마다 사용하는 세포주가 다를 때 세포독성효과를 판정하는 기준을 설정하는데 유용하다. Feigal등[20]은 인체 치수로부터 6종류의 각각 다른 이배엽세포와 변형세포인 L929를 6종의 근관 충전용 selaer와 1종의 치수복조재(capping agent)에 대한 세포독성 실험에서 정상 이배엽세포가 변형세포보다 감수성이 크다고 하면서 인체에 사용하기 위한 재료를 평가할 때에는 사람의 이배엽 세포를 사용하는 것이 타당하다고 하였다.

생체재료를 세포배양 방법을 이용하여 독성을 평가시 세포의 종류, 배양배지, 실험방법등 여러가지를 고려해야 한다. 가장 중요한 인자는 배지와 혈청 농도로 알려져 있다[51]

또한 세포주가 다른 세포주에 비해 감수성의 우열 순서가 없다는 보고가 있는 반면[21,52,53], Spangberg는[54] HeLa세포와 사람의 태아에서 분리한 상피 섬유아세포에 대해 Tween 80추출물의 독성 효과를 연구하여 미약한 차이지만 established cell line이 감수성이 높다고 보고하였고, Johnson은[55] 매식할 수 있는 생체재료에 대해서는 세포의 종류에 따라 다양한 예민도가 나타나며, 이중 가장 반응성이 높은 세포는 영구세포주 및 일정한 수명을 갖는 세포 두종류 모두 열거하였다.

이상과 같이 근관 충전재의 생체 적합성을 평가하기 위하여 많은 연구자에 의하여 여러방법으로 다양한 연구가 이루어졌으나 이들 결과를 비교하는 것은 어렵다. 따라서 세포배양에 의한 독성검사시 세포는 궁극적으로 관심의 대

상이 되는 종과 유사한 이배엽세포를 선택하는 것이 이상적일 것으로 사료된다. 또한 세포배양액의 부피에 대한 시편의 비가 모든 검사에서 동일해야 한다[56]. 이 비율을 변화시키면 세포독성이 없는 결과로부터 심한 세포 독성 결과까지 다양한 결과를 얻을 수 있기 때문이다.

또 여러 종류의 세포가 독성물질과 접촉하여 나타나는 감수성은 실험에 사용된 세포의 종류나 실험방법뿐만 아니라 영양분, 배지의 혈청농도, pH, 배양 온도등의 변수에 의해 결정된다[51].

독성물질은 용해도에 따라 조직배양액이나, 간질액(interstitial fluid)에 녹아 독성반응을 유발하게 되는데 조직에서 농도차(concentration gradient)가 형성되어, 그 농도에서 세포에 대한 독성이 나타난다. Eugenol을 녹이는 방법으로 고주파로 분쇄시켜 미세한 입자로 만들어 mthanol등의 용매로 사용하여 실험한 경우도 있고[57], 인산완충용액에 AH-26, Tubliseal을 녹여 실험한 보고도 있다[37].

그러나 녹이는 경우는 재료의 일부분을 녹일 수는 있으나, 녹지않는 잔여부분이 남게되며 실험용액에는 녹은 재료, 고형입자 등이 포함되어 있다. 고형의 재료와 비교시 예측 불가능한 형태로 성분이 용해되며 세포배양시 이들 성분들은 생물학적으로 다양한 활성을 나타낸다.

또 수용성이나 확산이 가능한 물질만이 독성인자가 아니고, 오히려 독성발현에서 큰 역할을 담당하지 않을 수도 있기 때문이다. 따라서 세포독성을 정확히 측정하기 위해서는 모든 성분을 다 포함시켜서 측정해야 할 것으로 사료된다.

MTT검정법은 살아있는 세포가 mitochondiria의 효소를 이용하여 녹색의 formazan결정을 형성하는 것을 이용한 방법[25]으로 국내에서도 세포독성 실험에 사용된 바 있다[58]. 발색된 보라색의 formazan결정체는 ELISA READER를 이용하여 기계적으로 단시간내에 세포의 독성정도를 측정할 수 있는데 이 방법은 세포의 생존도를 보기위해 흔히 사용되는 방사능 동위원소를 이용한 측정보다 예민도(sensitivity), 특이도(specitivity)가 떨어지나 방사능 물질의 오염 및 폐기문제, 인체에 미치는 위험등을 고려하면, 결과판독이 빠르고 저렴하며 조작이 간편한 장점이 있다.

MTT-formazan관찰법은 세포수를 정확히 산정하기 어렵지만, 직접 눈으로 formazan 형성정도 및 세포상태를 관찰하기 때문에 신속하나 형태학적인 것을 주로 관찰하기 때문에 독성에 의한 세포의 기능적인 변화는 관찰할 수 없는 단점이 있다.

HEp-2세포는 사람의 후두에 발생한 epidermoid carcinoma에서 기원된 영구 변형 세포주이며, McCoy세포는 원숭이에서 온 영구 세포주이며, MRC-5는 사람의 태아의 허파에서 기원한 세포주이다.

HEp-2세포에서는 원액을 사용하여 실험한 모둔 군에서 대조군에 비해 세포독성이 나타났으며 혼합 즉시 배양액을 넣은 군과 3일군, 7일군, 모두 vitapex가 HEp-2세포에 대해 약한 세포독성을 나타냈다.

또한 3가지 군 모두에서 Sealapex와 N2는 강한 세포독성을 보여 희석에 의한 독성 감소 효과가 나타나지 않았고 3가지 군 모두에서 각 selaer에 대한 흡광도 수치는 비슷하게 나타났는데, selaer를 혼합한 직후, 3일, 7일을 경과하여도 MEM에는 각 sealer에서 용해되는 독성성분이 감소되지 않음을 의미하였다. 본 실험에서는 배양액을 사용해 sealer의 추출액을 수거하여 실험용액으로 하였으나 AH-26의 독성이 약하게 나타난 것은 세포 배양이나 매식방법을 이용한 경우와 일치한다[59,60].

혼합 즉시 배양액을 첨가한 군에서, 3일군, 7일군으로 갈수록 각 sealer는 세포독성이 약해져야 할 것으로 사료되나, 본 실험에서는 일정하게 감소되는 경향이 나타나지 않았는데 sealer를 혼합할 때 분말과 용액의 비율이 표준화되지 않았고 well에 충전한 부피에 약간의 차이가 있기 때문으로 생각된다. Vitapex는 1 : 2희석액부터 대조군과 비슷한 정도로 세포성장이 나타났고 1 : 8로 희석하면 3가지 군에서 모두 대조군에 비해 오히려 세포성장이 촉진되어 Vitapex의 calcium hydroxide가 일정

농도에서는 mutagenic하다는 연구결과와 일치한다고 보여진다[44].

McCoy세포에서는 Vitapex가 가장 약한 독성을 나타냈으며 나머지 4종의 sealer사이에는 유의한 독성의 순위가 나타나지 않았으나, 3가지 군 모두에서 Vitapex다음으로 AH-26, Tubliseal, N2와 Sealapex순으로 나타났다. 3가지 군 모두에서 1 : 1에서 1 : 8로 희석하면 독성이 약화되어 formazan결정이 많이 생성되었으며 Vitapex와 Tubliseal은 3가지 군 모두에서 희석에 의한 독성 감소 효과가 크게 나타난 반면 Sealapex는 독성 감소 효과가 나타나지 않았다.

혼합즉시 배양액을 첨가한 1 : 8희석액에서는 대조군과 유사한 정도로 세포가 성장되었으나 HEp-2세포에서와 같은 mutagenic한 효과는 나타나지 않아서 세포주에 따라서 mutagenic한 농도가 다른 것으로 사료된다.

MRC-5세포에 대한 독성에서는 3가지 군에서 독성변화의 형태가 다르게 나타나 혼합 즉시 배양액을 첨가한 군에서는 1 : 1과 1 : 8희석용액에서 Tubliseal과 Sealapex는 독성이 현저히 감소된 반면, AH-26과 N2는 독성이 강하게 유지되었다. 이에 비해 3일군에서는 1 : 8에서만 독성 순위가 나타났고, 7일군에서는 모든 농도에서 독성변화를 보였으며 혼합즉시 배양액을 첨가한 1 : 1용액군에서는 Sealapex가 가장 약한 독성을 보였으나 나머지 4종의 군에서는 순위차이가 나타나지 않았다.

7일군의 1 : 1용액군에서는 Vitapex, Sealapex, Tubliseal, AH-26, N2순으로 독성 감소가 나타났다. 또 MRC-5세포에서는 혼합즉시 배양액을 첨가한 군과 3일군이 7일군에 비해 독성 감소효과가 나타나 시간 경과에 따라 sealer의 독성이 감소됨을 관찰하였으며 HEp-2나 McCoy세포와는 달리 각 sealer에 대한 독성이 다르게 나타났다.

MRC-5세포는 섬유아세포 계열로서 HEp-2나 McCoy세포에 비하여 성장 속도가 느리고 배양하기 어려웠지만 Vitapex가 약한 독성을 보였다는 점은 HEp-2나 McCoy세포에서 나타난 결과와 유사했다. 또 AH-26이 독성이 강한 것으로 보고되어 다른 연구 결과와 일치한다[62].

MRC-5세포는 HEp-2, McCoy등과 같은 영구적인 세포이지만 섬유아세포 계열이므로 독성물질에 대해 이 두가지 세포주와 다른 반응을 나타내는 것으로 사료되어, 영구적인 세포주 내부에서도 세포의 감수성 차이가 있는 것으로 보이며 또한 배양시 세포 성장이 안정되지 않고 불규칙한 점도 원인으로 사료된다.

HEp-2와 McCoy세포 2종은 5종의 sealer에 대하여 대략적으로 비슷한 독성 순위를 보여서 Vitapex가 가장 미약한 세포독성을 보였고, Selapex와 N2는 세포독성이 강하게 나타났다.

MRC-5세포에 대한 sealer의 독성순위가 농도나 실험군에 따라 다르게 나타났으며, 이러한 점이 세포배양에 의한 독성실험시 반드시 고려해야 할 점으로 생각된다. 즉 혼합즉시 배양액을 첨가한 1 : 1용액에서 5가지 sealer간의 독성순위는 명확하지 않으나, 3일군과 7일군의 1 : 8희석시에는 각각의 독성순위가 나타났다.

세가지 영구세포주에서 시간이 경과함에 따라 독성은 혼합초기와 달라져서, 초기에 강한 독성이 유지되는 N2와 Selapex같은 sealer가 있는 반면, 독성이 지속적으로 감소되는 sealer도 있는 등 시간에 따라 독성이 다양하게 변화됨을 관찰하였다.

구강내 섬유아세포에 대한 독성 실험에서는 3일군 실험용액을 임의로 선택하여 MTT법으로 formazan을 형성시킨 후 96well에 나타난 발색의 정도를 ELISA READER로 판독하기 어려워 역상현미경으로 formazan을 형성한 세포수를 세었다.

1 : 1용액에서는 AH-26을 제외하면 3종의 sealer 모두에서 formazan결정이 형성되지 않아서 모두 독성이 강하였으나 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8로 희석함에 따라서 독성발현에 차이가 나타났다.

Vitapex를 제외한 4종의 sealer중에서 1 : 1용액에서는 AH-26만이 47.5%세포에서 formazan결정을 형성하여 가장 미약한 세포독성을 보였으며, N2, Sealapex, Tubliseal은 form-

azan결정이 전혀 형성되지 않았다.

그러나 1 : 2희석액에서는 N2가 가장 강한 독성을 보여 formazan을 형성한 세포가 관찰되지 않았으며, Sealapex, Tubliseal, AH-26 순으로 독성이 약화되어 독성의 차이가 나타났고, 1 : 4희석액에서도 역시 N2가 독성이 강하여 세포의 5%만이 formazan결정을 보였고, Sealapex, Tubliseal, AH-26순으로 독성이 감소하였다. 그러나 1 : 8로 희석된 실험군에서는 AH-26과 Tubliseal에서 모든 세포가 formazan결정을 형성하였고, Sealapex는 90%, N2는 17.5%의 formazan결정이 형성되어 N2가 가장 강한 독성을 보여서 치은 섬유아세포에 대한 독성의 차이도 실험용액의 희석비율에 따라 각각 다른 독성순위를 나타내었다.

사람의 말초혈액에서 단핵구를 분리하여 3일군 5종의 실험용액을 대상으로 한 독성실험에서도 MTT법으로 formazan결정을 형성시킨 다음 ELISA READER로 흡광도를 측정하려 하였으나 단핵구들이 U자형으로 함몰된 96-well의 중앙 기저부에 모인 상태가 되어 측정이 불가능하여 역상 현미경으로 formazan이 형성된 세포수를 세었다. Vitapex는 모든 농도에서 세포독성이 약하게 나타났고 나머지 4종의 sealer는 모든 농도에서 단핵구에 대해 강한 독성을 나타냈다.

1 : 1용액에서는 Vitapex에서만 11.25%의 formazan이 형성되었고, 나머지 4종의 실험용액에서는 formazan이 관찰되지 않은 반면 1 : 2용액에서는 Vitapex에서 25%, AH-26에서 7.5%의 formazan결정이 형성되었고, N2, Sealapex, Tubliseal은 formazan결정을 형성하지 않았다. 1 : 4용액에서는 Vitapex, AH-26, Sealapex, Tubliseal순서로 독성이 강하게 나타났으며, N2는 formazan결정을 형성하지 않아서 가장 강한 세포독성이 나타났으며 1 : 8용액에서는 Vitapex가 가장 많은 formazan을 형성하였고, Sealapex와 Tubliseal은 중등도의 독성을 나타내었고, AH-26은 세포독성이 약하였고, N2는 역시 formazan결정을 생성하지 않았다. N2는 4가지 희석용액에서 강한 독성을 보였으며 Vitapex와 AH-26은 세포독성이 미약하였다.

반면 LD값으로 본 독성의 순위에서는 1 : 1에서는 AH-26이 가장 낮은 LD값을 보여 약한 독성을 나타내었고, Tubliseal이 강한 독성을 나타내었다.

이러한 독성차이는 1 : 8로 희석됨에 따라서 감소되어 Vitapex는 가장 약한 독성을 나타내고 나머지 4종의 sealer의 독성도 약화되어 비슷하게 나타나서 단핵구에 대한 독성은 2가지 실험 방법에 따라 다르게 나타남을 관찰하였다.

Vitapex는 동일한 수산화 칼슘 제재인 Sealapex가 5종의 세포에서 중등도 이상의 독성을 나타낸 반면, 5종의 세포에 대하여 세포독성이 약하게 나타난 경우가 대부분이었는데 Vitapex자체가 독성이 약한 sealer이기 때문일 수도 있으나 이 제재의 독성 성분이 MEM에 대한 용해성이 낮은 것도 원인으로 생각할 수 있다.

세포배양법을 사용하여 독성실험에는 영구세포주보다는 정상이배엽 세포가 독성발현에 있어서 감수성이 좋은 것으로 사료되며, 영구세포주를 선택할 때에도 가능하면 그 재료가 접촉하게 되는 세포와 같은 종류를 사용하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이며 실제로 인체에서 근관충전용 sealer의 실험에서는 치은의 섬유아세포나, 치근막 세포등을 배양하여 실험하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

또한 세포독성 실험에서 세포의 종류뿐만아니라 시편을 세포와 접촉시키는 방법이나 실험용액의 농도에 따라서 독성의 정도나 각 실험재료간의 독성순위가 다양하게 나타날 수 있으며 치근단부에서 sealer와 접촉하는 세포는 정상 섬유아세포가 아니라, 손상을 받은 세포가 반응하며, 한 가지 종류의 세포만이 반응에 관여하는 것이 아니라, 여러 종류의 세포가 동시에 역동적으로 반응하여 생체외 실험과는 다른 형태의 반응이 나타나므로 실제 환자의 상태와 비슷한 실험 모델을 설정하는 노력을 배가해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

AH-26, N2, Tubliseal, Sealapex, Vitapex등 5종의 근관 충전용 sealer에 대한 세포독성을 관찰하기 위하여 M-TT-ELISA READER를 이용한 세포 독성실험 및 MTT -formazan관찰법, lactate dehydrogenase효소 활성도 측정을 이용해 세포독성 효과를 비교관찰하였다. 또 세포독성 효과를 판정할 때 사용하는 세포주에 따라 결과가 달라지는 지의 여부를 관찰하기 위하여 HEp-2, McCoy, MRC -5, human gingival fibroblast, human monomuclear cell등 5종의 세포를 사용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Vitapex는 HEp-2세포와 McCoy, MRC -5세포에서 5종의 sealer중 가장 약한 세포독성을 보였다.
2. AH-26은 HEp-2, 구강의 섬유아세포, 단핵구에 대해 약한 세포독성을 나타내었다.
3. N2는 치은의 섬유아세포에서 가장 강한 독성을 보였으며, HEp-2, McCoy, MRC-5세포에서 강한 독성을 보였다.
4. Tubliseal은 HEp-2, McCoy, MRC-5 세포, 단핵구에서 강한 독성을 나타냈다.
5. Sealapex는 HEp-2, McCoy, 구강 섬유아세포, 단핵구에서 강한 세포독성을 나타내었다.

REFERENCES

1. Ingle JI, Taintor JF: Endodontics, Philadelphia, 3rd ed. Lea & Febiger, 1985, p. 37.
2. Brodin P.: Neurotoxic and analgesic effects of root canal cements and pulp-protecting dental materials. Endod Dent Traumatol 4:1-11, 1988.
3. Pascon EA, Leonardo MR, Safavi K, Langeland K: Tissue reaction to endodontic materials: Methods, criteria, assessment, and observations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 72:222-37, 1991.
4. Negm MM, Sherif SH: Biological evaluation of SPAD Oral Surg Oral Med Oral Pathol 63:478-86, 1987.
5. Olsson B, Siliwkowski A, Langeland K: Intraosseous implantation for biological evaluation of endodontic materials. J Endod 7:253-65, 1981.
6. Grossman LI: Endodontic practice, 10th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1980, p. 321.
7. Browne RM: The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental material-does it have a role? Int Endo J 21:50-58, 1988.
8. Tyas MJ, Browne RM: Biological testing of dental restorative materials. J Oral Rehab 4:275-290, 1977.
9. Browne RM, Plant CG & Tobias RS: Quantification of the histological features of pulpal damage. Int Endod J 13:104-11, 1980.
10. Wennberg A, Mjor IA & Hensten-Pettersen A: Biological evaluation of dental restorative materials- a comparison of different test methods. J Biomed Mat Res 17:23-36, 1983.
11. Hensten-Pettersen A: Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity Int Endod J 21:89-99, 1988.
12. Mjor IA, Hensten-Pettersen A & Skogedal O: Biological evaluation of filling materials- a comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. Int Dent J 27:124-9, 1977.
13. Hegeland K: In vitro testing of dental cements. In biocompatibility of dental materials (Smith DC and Williams DF), vol 2, pp. 201-15, CRC Press, Boca Raton, 1982.

14. British Standards Institution (BSI): Methods of biological assessment of dental materials. BS technical report series documents 5828, 1980.
15. ISO (the International Organization for Standardization) International Standard 6876 Dental root canal sealing materials. ISO/TR 7405, 1986.
16. American Dental Association (ADA): ANSI/ADA document No. 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. J Am Dent Assoc: 99, 697-8, 1979.
17. Federation Dentaire Internationale (FDI): Recommended standard practices for biological evaluation of dental material. Int Dent J 30: 140-88, 1980.
18. Din-Normenausschuss Dental DNI-Entwurf 13930, Pforzheim 1986.
19. Murphy WM: The testing of endodontic materials in vitro. Int Endod J 21:170-7, 1988.
20. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J: Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. Archs Oral Biol 30:609-13, 1985.
21. Mohammad AR, Mincer HH, Younis O, Dillingham E & Siskin M: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. Oral Surg Oral Med Oral Path 45:768-73, 1978.
22. Wennberg A, Hasselgren G, Trostad L: A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. J Biomed Mat Res 13:109-20, 1979.
23. Spangberg LC: Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Path 35:389-401, 1973.
24. Schmalz G: Agar overlay method. Int Endo J 21:59-66, 1988.
25. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method 65:55-63, 1983.
26. Holland R, Nery MJ, de Mello W, de Souza V, Bernabe PFE, Otoboni JA: Root canal treatment with calcium hydroxide I. Effect of overfilling and refilling. Oral Surg 47:87-92, 1979.
27. Lindqvist L, Otteskog P: Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. Scand J Dent Res 89:552, 1981.
28. McComb D, Smith DC: Comparison of physical properties of polycarboxylate-based and conventional root canal sealers. J Endod 2:228-35, 1976.
29. Meryon SD, Jakeman KJ: The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. Int Endod J 18:191-8, 1985.
30. Sakai Y, Sakakibara H, Yamaguti M, Saijo Y, Hayakawa H, Nakamura H: A study of the cytotoxicities of root canal filling materials. (2) On the cytotoxic factors of zinc oxide eugenol sealer. Japan J Cons Dent 26:931-7, 1983.
31. Wennberg A: Biological evaluation of root canal sealers using in vitro methods J Endod 6:784-7, 1980.
32. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH: Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. J Archs Oral Biol 30:609-13, 1980.
33. Yesilsoy C, Feigal RJ: Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filter. J Endod 11:401-7, 1985.
34. Takahara K, Onodera A, Matsumoto K:

Toxicity of root canal sealers of rat bone cells in primary culture. Endod Dent Traumatol 6:200-7, 1990.

35. Mohamad AR, Mincer HH, Younis O, Dillingham E, Milton M.: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture- agar overlay technique. Oral Surg 45: 768-73, 1978.
36. Tronstad L, Barnett F, Flax M: Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. Endod Dent Traumatol 4:152-9, 1988.
37. Nakamura H, Sakakibara F, Matsunoto Y, Hirano S, Hayakawa H, Sakai M, Yip M: Study of the cytotoxicity of root canal filling materials. J Endod 12:156-60, 1986.
38. Zmener O, Goldberg F, Cabrini RL: Effects of two gutta-percha formulations and one zinc oxide-eugenol and Canada balsam mixture on human blood monocytes and lymphocytes. Endod Dent Traumatol 5:73-7, 1989.
39. Gordon TM, Ranly DM, Boyan BD: The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variation in pH and calcium concentration. J Endod 11:156-60, 1985.
40. Brink F.: The role of calcium ions in neural process. Pharmacol Rev 6:243-98, 1954.
41. Torneck CD, Moe H, Howley TP.: The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. J Endod 9:131-6, 1983.
42. Zmener O, Gulielmotti. MB, Cabrini MD: Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers; a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of rat. J Endod 14:229-35, 1988.
43. Rasmussen P, Mjor IA: Calcium hydroxide as an ectopic bone inductor in rats. Scand J Dent Res 79:24-30, 1971.
44. Erausquin J: Periapical tissue reaction to root canal filling with zinc, titanium, lead, and aluminum oxides. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 30:545-54, 1970.
45. Briseno BM, Dent M, Willershausen B, Chem D, Dent M: Root Canal Sealer Cytotoxicity in human gingival fibroblasts: II. silicone- and resin-based sealers. J Endod 17:537-40, 1991.
46. Safavi KE, Pascon EA, Langeland K: Evaluation of tissue reaction to endodontic materials. J Endod 9:421-9, 1983.
47. Arenholt-Bindslev D, Horrsted-Bindslev P.: A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. Endod Dent Traumatol 5:219-26, 1989
48. Parakkal P, Pinto J, Hanfin JM: Surface mophology of human mononuclear phagocytes during maturation and phagocytosis. J Ultrastruct Res 48:216-26, 1974.
49. Territo MC, Cline MJ.: Monocyte function in man. J Immunol 118:187-91, 1977.
50. Guttuso J: Histopathologic study of rat connective tissue responses to endodontic materials. Oral Surg Oral Med Oral Patol 16:713-27, 1963.
51. Pettersen AH, Helgeland K: Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. Scand J Dent Res 89:102-7, 1981.
52. Spangberg LS: Correlation of in vitro and in vivo screening tests. J Endod 4:296, 1978.
53. Leiskar J, Hegeland K: A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. Scand J Dent Res 80:120, 1972.
54. Spangberg LS: Biological effects of root

canal filling materials. 5. Toxic effects in vitro of root canal filling materials of HeLa cells and human skin fibroblasts. Odontol Revy 20:427-36, 1969.

55. Johnson H, Northup S, Seagraves P, Thomas J: Development of test procedures for the evaluation of implantable biomaterials in vitro. Final Technical Report 1978, Travenol Laboratories, Inc., Morton grove, IL, USA.
56. Pettersen AH, Helgeland K: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. Scand J. Dent. Res. 85:291-6, 1977.
57. Hanks CT, Diehl ML, Craig RG, Makinen P-L, Pashley DH.: Characterization of the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol. J Oral Pathol Med 18:97-107, 1989.
58. 근관 충전용, selaer의 세포독성에 관한 연구 : 이승종, 김영해. 대한치과보존학회지, Vol.16, No.1, 25-40, 1991.
59. Torabinejad M, Kettering JD, Barkland LK: Evaluation of systemic immunologic reactions to AH-26 root canal sealer. J Endod 5:196-200, 1979.
60. Spangberg L, Langeland K: Biologic effects of dental materials 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. Oral Surg 35:402-14, 1973.
61. Hensten-Pettersen A, Orstavik D, Wennberg A: Allergenic potential of root canal sealers. Endod Dent Traumatol 11:61-5, 1985.
62. Olsson B, Wennberg A: Early tissue reaction to endodontic filling materials. Endod Dent Traumatol 1:138-41, 1985.

EXPLANATION OF PICTURES

Pic. 1. The wells in the 24-well plate were filled with 5 root canal sealers according to the manufacturer's direction about 1.5mm height.

Pic. 2. 1ml of minimum essential medium were added to each wells in the 24-well plate.

Pic. 3. Control group of HEp-2 cells, x100.

Pic. 4. Control group of McCoy cells, x100.

Pic. 5. Control group of MRC-5 cells, x100.

Pic. 6. Control group of human gingival fibroblasts, x200.

Pic. 7. Control group of human peripheral mononuclear cells, x100.

Pic. 8. HEp-2 cells challenged by the immediate group of N2 sealer solutions, x100.

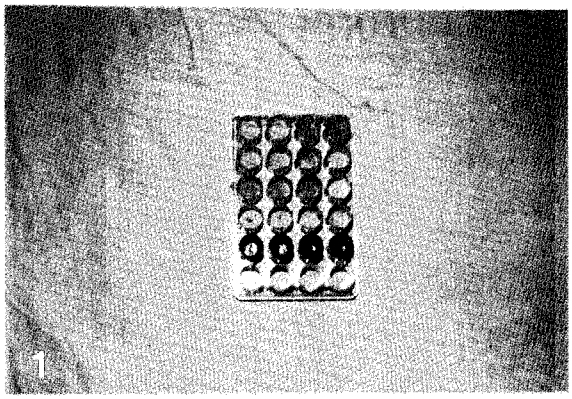
Pic. 9. McCoy cells challenged by the immediate group of N2 sealer solutions, x100.

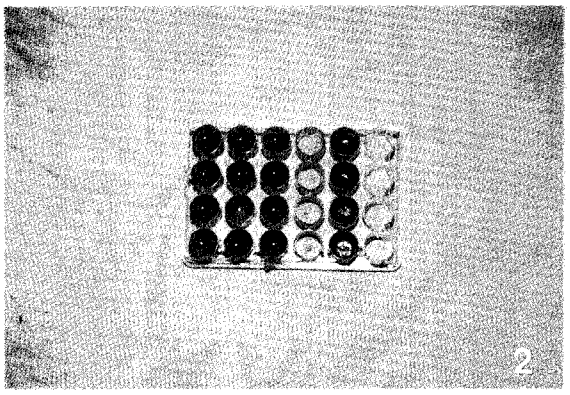
Pic. 10. MRC-5 cells challenged by the immediate group of N2 sealer solutions, x100.

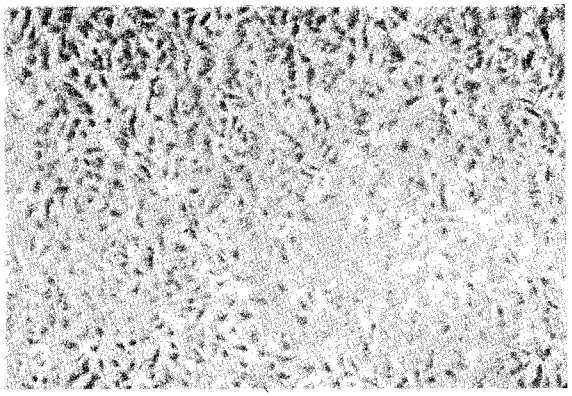
Pic. 11. Human peripheral mononuclear cells challenged by the immediate group of N2 sealer solutions, x100.

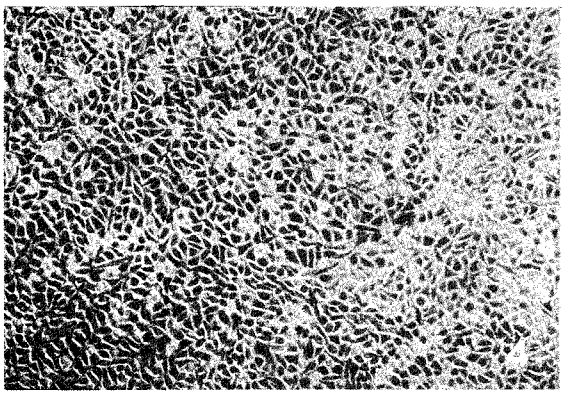
Pic. 12. Control group of formazan formed human gingival fibroblasts, x40.

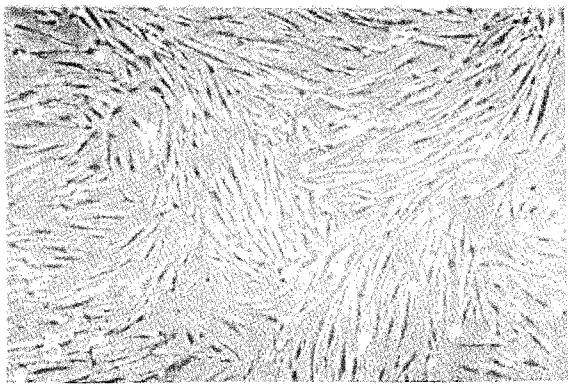
사진부도 ①

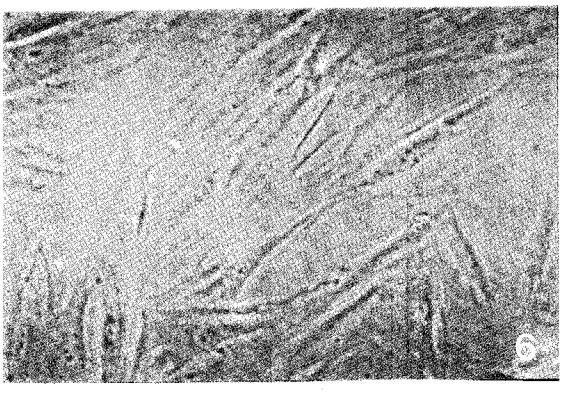




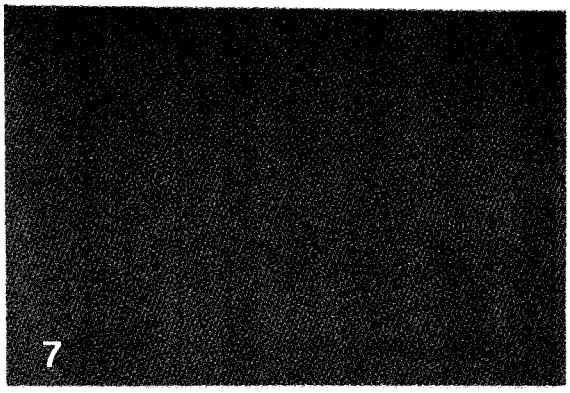




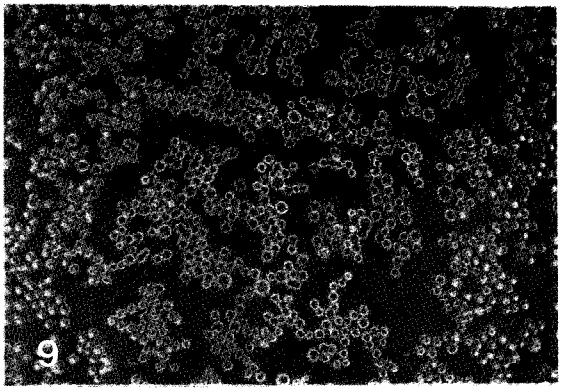


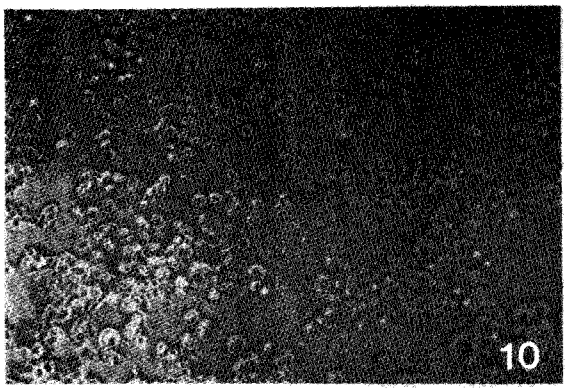


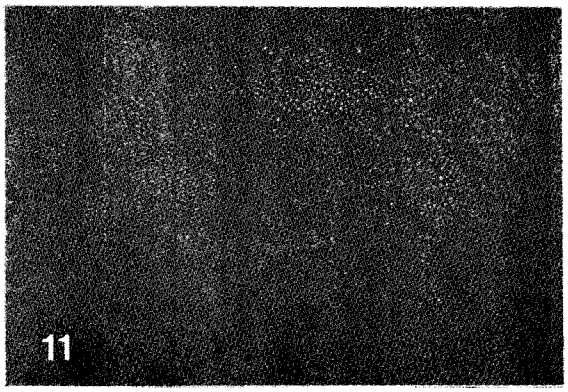
사진부도 ②

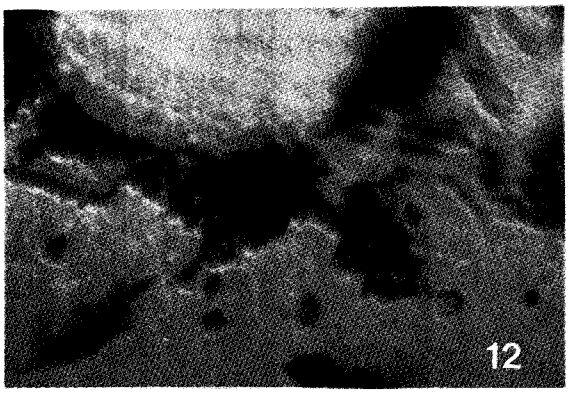

7

8


9


10


11


12

—Abstract—

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF ROOT CANNAL SEALERS TO SEVERAL CELL LINES

Mi - Kyung Im, D. D. S., M. S. D., Chung - Sik Lee, D. D. S., Ph. D.
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

This study was performed to evaluate and compare the cytotoxic effects of five root canal sealers to several different cell lines.

Five root canal sealers were AH-26, N2, Sealapex, Tubliseal, and Vitapex.

Each sealers were mixed according to the manufacturer's instructions, and culture media were added to each sealers immediately after mixing (the immediate group) and after three days (the third day group) and seven days (the seventh day group) respectively.

And every sealer solutions were diluted to 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4.

Three different permanent cell lines (HEp-2, McCoy, MRC-5) and human gingival fibroblasts and mononuclear cells were challenged by each sealer solution and the cytopathic effects were evaluated using MTT-ELISA, MTT-microscopy, and lactate dehydrogenase (LD) activity.

The results were as follows:

1. In HEp-2 and MRC-5 cells, Vitapex was the least cytotoxic sealers.
2. AH-26 showed mild cytotoxic effects to HEp-2, gingival fibroblast and mononuclear cells.
3. N2 was the most toxic sealer to gingival fibroblast and it showed relatively strong cytotoxicity to HEp-2, McCoy and MRC-5 cells.
4. Tubliseal showed strong cytotoxic effects to HEp-2, McCoy, MRC-5, and mononuclear cells.
5. Sealapex showed strong cytotoxic effect to HEp-2, McCoy, and gingival fibroblasts.