

**İNŞAN TİP I KOLAJENİ VE BİR CAM İYONOMER SİMAN
MATERYALİNİN FİBROBLASTLAR ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİSİTELERİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Altan DOĞAN*, Andrea MUNKLEY**, Dr. Sharon THOMAS**,
Dr. John MORAN**

ÖZET

Bu çalışma insan Tip I kolajeni ve bir cam iyonomer siman materyalinin in vitro olarak fibroblastlar üzerindeki sitotoksitesini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Materyaller içindeki muhtemel toksit maddelerin ekstraksiyonu için kolajen sponj parçaları ve 24 saat önceden karıştırılarak sertleşmesi sağlanmış cam iyonomer siman blokları Dulbeco modifiye Eagle medium (DMEM) içinde 37°C'de 96 saat süreyle çalkalandılar. Elde edilen ekstraterden saf solüsyon, 1/5, 1/10 ve 1/50 sulandırmalar hazırlanarak 96 çukurcuklu plaklara yerleştirilmiş olan 5. pasaj fibroblastlarma ilave edildi. Hücreler % 10 veya % 0.4 fötal buzağı serumu (FCS) varlığında eksterlerle 48 saat enkübe edildikten sonra çukurcuklara 0.5 uCi/100 ul [³H]timidin ilave edildi. Toplam 64 saat enkübasyonu takiben her iki FCS konsantrasyonundaki (% 10, % 0.4 FCS) ekstre sulandırmalarının fibroblastlar üzerindeki toksik veya proliferatif etkisi dakika başına sayım (counts per minute-cpm) olarak ölçüldü. Ayrıca hiç ekstre katılmamış % 10 veya % 0.4 FCS ve DMEM içeren kontrol mediumları da çalışmaya katıldı. % 10 FCS içeren kolajen ekstresinin saf solüsyonunun hücre kültürlerinde inhibisyon oluşturduğu 1/5, 1/10 ve 1/50 ekstre sulandırmalarının ise proliferasyon oluşturduğu bulgulandı (p<0.05). % 0.4 FCS ile yapılan çalışmada kolajenin ekstre sulandırmalarının fibroblast kültürleri üzerinde

(*) G.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara.

(**) University of Wales College of Medicine Dental School Department of Periodontology, Cardiff.

ÇEŞİTLİ MATERYALLERİN İN VİTRO SİTOTOKSİTESİ

toksik etki oluşturmadığı bulundu. Cam iyonomer siman ekstraksiyonlarının % 10 FCS varlığında stimülasyona neden olduğu ($p < 0.05$), ancak % 0.4 FCS varlığında deney ve kontrol kültürleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler : Sitotoksitesite, in vitro, kolajen, cam iyonomer siman, [^3H]timidin.

SUMMARY

ASSESSMENT OF THE IN VITRO CYTOTOXICITY OF HUMAN COLLAGEN TYPE I AND A GLASS IONOMER CEMENT MATERIAL ON FIBROBLASTS

This study was undertaken to assess the in vitro cytotoxicity of human collagen Type I and a glass ionomer cement material on fibroblasts. Soluble materials were extracted by incubating human collagen Type I and glass ionomer cement blocks in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) at 37°C water bath for 96 h. The extract was sterile-filtered and prepared in different dilutions (neat, 1/5, 1/10 and 1/50). Cell cultures from 5th passage fibroblasts were seeded into 96-well plates and dilutions of the extracts were added in triplicate to the 96-well plates in the presence of 10 % or 0.4 % fetal calf serum (FCS), and were incubated for 48h under same conditions as described above. [^3H]thymidine was added to the plates and incubated for further 16 h. The controls in triplicate which contained only FCS (10 % or 0.4 %) and DMEM (without extract), were also included. The cells were then harvested on Whatman filter paper discs and counted in a liquid scintillation counter. Cytotoxicity or proliferation of fibroblasts with two different concentration of FCS in DMEM were expressed as counts per minute (cpm). Mixed results were obtained from fibroblast cultures. The neat dilution of the collagen extract was found to inhibit the thymidine uptake of fibroblasts ($p < 0.05$) whereas 1/50, 1/10 and 1/5 dilutions produced stimulatory effect ($p < 0.05$) on cultures in the presence of 10 % FCS. However, no statistical significance was observed between experimental and control cultures incubated in the presence of 0.4 % FCS. Dilutions (neat, 1/5, 1/10, 1/50) of glass ionomer cement extract were found to stimulate fibroblast in the

presence of 10 % FCS ($p < 0.05$). However, no statistical significance was found between experimental and control cultures incubated in the presence of 0.4 % FCS.

Key Words : Cytotoxicity, in vitro, collagen, glass ionomer cement, [^3H] thymidine.

GİRİŞ

Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle birçok yeni materyal tıbbın ve dişhekimliğinin hizmetine sunulmaktadır. Bu yeni materyallerden kolajen cerrahi uygulamalarda (7, 8, 13), kullanım alanı bulurken cam iyonomer siman da konservatif ve protetik tedavi uygulamalarında tercih edilen bir materyal olarak yerini almıştır (1). Bilindiği gibi insan vücudunun en önemli protein yapılarından olan kolajen aynı zamanda kemikle diş arasındaki organik bağlantının sağlanmasında da rol oynar. Daha önce yapılan çalışmalarda kolajen esaslı çeşitli greft materyalinin biyokompatibilite, immünite ve rezorbsiyon karakteristikleri incelenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (4, 6, 10, 11, 16).

Kolajenden yapılmış çeşitli greft materyallerinin yaraların örtülmesinde ve kanama kontrolünün sağlanmasında etkili olduğu ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (12, 13, 14, 19). Buna ek olarak periodontal dokuların iyileşmesi sırasında epitelin apikale migrasyonunu engellemesi ve impante edildiği dokularda rezorbe edilmesi nedeniyle seçilmiş hücre repopülasyonun sağlanması amacıyla da kullanılmaktadır (7, 8).

Cam iyonomer simanlar, silikat simanlar, kompozit rezinler ve polikarboksilatların en mükemmel özelliklerinin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır (1, 17). Bu özellikler; düşük termal genişleme; abrazyona ve asitlere karşı direnç; floridleri bağlaması nedeniyle antikaryojenik etki; diş yüzeyine iyi tutunarak mikrosızıntıyı engellemesidir (13). Ancak bu konuda yapılan in vitro araştırmalarda cam iyonomerlerin sertleşme süresiyle ilişkili olarak hücre kültürleri üzerinde toksik etki oluşturduğu bildirilmiştir (3, 5).

Hücre ve doku kültürleri günümüzde çeşitli tıbbi materyalin incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hayvan modelleri, bu materyallerin dokuda oluşturduğu reaksiyonların anlaşılmasında ge-

rekli olmakla birlikte, iyileşme sırasında birçok faktörün karışması nedeniyle olayın hücresel seviyede açık olarak incelemesine fırsat vermemektedir. Bu nedenle hayvan modeli öncesinde hücre kültürlerinin materyallerin hücresel seviyede incelenmesi amacıyla kullanılması uygun bir yaklaşım olmaktadır. Çalışmamız insan plasentasından ekstrakte edilen Tip I kolajen materyali ve bir cam iyonmer siman materyalinden elde edilen ekstrelerin insan dişeti fibroblastları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İnsan dişeti fibroblast kültürlerinin hazırlanması

İnsan dişeti fibroblastları gingivektomi operasyonu sırasında elde edilen dişeti biopsilerinden izole edildi. Dişeti biopsileri yüzeyel epitel dokusundan bisturi yardımıyla arındırılarak % 10 fetal buzağı serumu (fetal calf serum - FCS), 100U/ml penisilin, 100 ug/ml streptomisin ve 1.16 g/mL-glutamin içeren Dulbecco modifiye Eagle mediumu (DMEM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) konulmuş Petri kutularına konularak üzerlerine cam lameller yerleştirildi ve % 5 CO₂'li ortamda, 37°C da enkübe edildi. İnsan dişeti fibroblastlarının Petri kutusu yüzeyini kaplamasını takiben cam lameller dışarı alındı ve hücreler steril fosfat tamponlu solüsyonla (PBS) üç defa yıkandı. Bunu takiben hücreler 2.5 ml, 4mM etilen diaminotetraasetic asit (EDTA) içeren % 0.25'lik tripsin solüsyonuyla 1 dakika süreyle oda ısısında muamele edildi. Petri yüzeyinden hücrelerin mobilizasyonunu takiben elde edilen süspansiyona 2.5 ml, % 10 FCS içeren DMEM ilave edildi ve bu hücre süspansiyonu 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde kültür kablarına konularak 37°C de enkübe edildi.

Materyallerin Hazırlanması

İnsan Tip Kolajeni: İnsan Tip I kolajeni Chung ve Miller (2) tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu olan yöntemle insan plasentasından ekstrakte edildi ve standart insan Tip I kolajeni kullanılarak sodium dedosil sulfat-poliakrilamid jel elektrofores (SDS PAGE) yöntemi ile karakterize edildi. Elde edilen kolajenden sponjlar hazırlandıktan sonra Quteish ve ark (11) tarafından tarif edilen yöntemle bunların çapraz bağlantı oluşturması sağlan-

dı. Sponjlar kullanımdan önce gama ışınlarıyla sterilize edildi (520 grays).

Cam iyonomer siman : Cam iyonomer siman (Chemfil-II, AD International, De Trey Division, U.K.) üretici firmanın önerdiği şekilde karıştırılarak sertleşme gerçekleşmeden önce küçük dikdörtgen bloklara ayrıldı. Bloklar daha sonra oda ısısında, kapalı bir ortamda 24 saat bekletildiler.

Çözünür toksit maddelerin elde edilmesi

Daha önce anlatılan şekilde hazırlanmış olan kolajen (5 mg/ml) ve cam iyonomer siman örnekleri (10 mg/ml) 10 ml DMEM içeren şişelere ayrı ayrı yerleştirildi ve 37°C'deki su balyosunda 96 saat süreyle çalkalandı. Daha sonra örnekler şişelerden çıkartıldı ve elde edilen ekstralar filtreden geçirilerek steril edildi ve farklı konsantrasyonlarda sulandırıldı (saf solüsyon, 1/5, 1/10 ve 1/50). Ekstreler kullanılacakları güne kadar -20°C'de dondurularak saklandı.

[³H]timidin alımını (uptake) yöntemiyle toksisitenin saptanması

5. pasaj fibroblast hücre kültürleri tripsinizasyonu takiben hemasitometreyle sayılarak hücre süspansiyonu % 10 FCS içeren DMEM içinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre süspansiyonu multipipet yardımıyla 96 çukurcuklu plaklara 100 ul/ çukurcuk olacak şekilde konuldu ve 24 saat enkübe edildi. Bu süre sonunda çukurcuklardaki vasat dışarı alınarak hücreler steril PBS ile 3 defa yıkandı. Çukurcuklardan yarısına % 10 FCS içeren ve diğer yarısına % 0.4 FCS içeren ekstre sulandırmaları üç kez tekrar edilerek konuldu ve hücreler bu şekilde 48 saat süreyle enkübe edildi. Bu süre sonunda çukurcuklara 0.5 uCi/100 ul [³H]timidin ilave edildi ve 16 saat enkübe edildi. Ayrıca hiç ekstre eklenmemiş % 10 ve % 0.4 FCS ve DMEM içeren kontrol vasatları da çalışmaya katıldı. Bu süre sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsinize edilerek multiple otomatik harvester (Dynatech Automash 2000) yardımıyla "Whatman filtre kağıdı disklerine geçirildiler. Daha sonra diskler 6 ml sintilasyon sıvısı içeren (Scintran-T, Merck) tüplere yerleştirildi ve sıvı sintilasyon sayacında (Rack Beta 219, LKB) sayıldı. Her iki FCS konsantrasyonundaki (% 10, % 0.4 FCS) ekstre sulandırmalarının fibroblastlar üzerindeki toksik veya proliferatif etkisi dakika başına sayım (counts per minute-cpm) olarak ölçüldü.

İstatistik Analizi

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen ölçüm değerlerinin (cpm) ortalamaları (mean) ve standart sapmaları (sd) bir bilgisayar istatistik programı yardımıyla hesaplandı. Ekstre sulandırmaları ilave edilmiş veya edilmemiş (kontrol) gruplararası karşılaştırmaların yapılmasında eşleştirilmemiş (unpaired) t-testi kullanıldı.

Sonuçlar

Kolajen ve cam iyonomer siman ekstrelerinin fibroblast proliferasyonuna etkisi hücre kültürlerinde [³H]timidin alınımı yöntemiyle değerlendirildi. Kolajen ekstrelerine karşı oluşan hücresel cevap Tablo 1'de gösterildi. Buradan da anlaşılacağı gibi % 10 FCS varlığında 1/50, 1/10 ve 1/5 ekstre sulandırmaları hücrelerde blastojenik etki oluştururken saf kolajen ekstre solüsyonu hücrelerde supresif etki oluşturdu. 1/50 sulandırma dışındaki ekstre (saf solüsyon, 1/5 ve 1/10) değerleri istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulundu. Bununla birlikte % 0.4 FCS varlığında elde edilen deney ve kontrol değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı.

Sulandırma	mean - sd (cpm) (% 10 FCS)	mean - sd (cpm) (% 0.4 FCS)
1/50 =	5551 - 205	731 - 6
1/10 =	6855 - 642*	859 - 215
1/5 =	5328 - 1093*	1056 - 262
Saf solüs. =	2035 - 528*	602 - 514
Kontrol =	4391 - 205	1079 - 23

Eşleştirilmemiş t-testi

* <0.05

Tablo 1. Kolajen ekstrelerinin saf solüsyon, 1/5, 1/10 ve 1/50 sulandırmalarda hücre kültürlerine uygulanmasını takiben 64. saatte insan dişeti fibroblastların çoğalmasına etkisi cpm (counts per minute) olarak gösterilmiştir. Deney ve kontrol grubu örneklerin-

den elde edilen ölçüm değerleri t-testi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar $p < 0.05$ seviyesinde önemli sayılmıştır.

Cam iyonomer siman ekstrilerinin 64 saatlik dönemde fibroblast kültürleri üzerindeki etkisi Tablo 2. de gösterildi. % 10 FCS varlığında bütün ekstre sulandırmaları ve saf solüsyonun fibroblastlarda proliferatif etki oluşturduğu saptandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında saf ekstre solüsyonu ile 1/5 ve 1/10 sulandırma ölçüm değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Ancak % 0.4 FCS varlığında elde edilen ölçüm değerlerinden hiç biri kontrol grubuyla istatistiksel olarak önemli bir farklılık taşımamaktaydı.

Sulandırma	mean - sd (cpm) % 10 FCS	mean - sd (cpm) % 0.4 FCS
1/50	= 6685 - 1047	1572 - 337
1/10	= 6335 - 458*	1293 - 47
1/5	= 7215 - 779*	1219 - 149
Saf solüs.	= 5716 - 46*	147 - 88
Kontrol	= 4391 - 205	1079 - 232

Eşleştirilmemiş t-testi

* < 0.05

Tablo 2. Cam iyonomer siman ekstrilerinin saf solüsyon, 1/5, 1/10 ve 1/50 sulandırmalarda hücre kültürlerine uygulanmasını takiben 64. saatte insan dişeti fibroblastların çoğalmasına etkisi cpm olarak gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu in vitro sitotoksosite çalışmasında glutaraldehitte çapraz bağlantısı oluşturulmuş insan Tip I kolajen sponj parçaları ve daha önceden üretici firmanın önerdiği şekilde karıştırılarak 24 saat tam sertleşmesi sağlanmış ticari bir cam iyonomer siman preparatının DMEM içinde 96 saat süreyle enkübe edilmesi sonucunda

bu materyaller içindeki muhtemel toksik maddelerin vasata geçeceği düşünülmüştür. Daha sonra, elde edilen ekstrelerin çeşitli sulandırmalarının (saf solüsyon, 1/5, 1/10 ve 1/50) insan gingival fibroblastları üzerindeki etkileri [³H]timidin alınımı yöntemiyle değerlendirilmiştir. Beta-sayacında radyoaktivite (cpm) olarak okunan ölçüm değerlerinin istatistiksel analizleri çeşitlendirilmemiş t-testi yardımıyla yapılmıştır.

Fötal buzağı serumunun hücre kültürleri üzerindeki stimulan etkisi göz önünde bulundurularak bu faktörün ölçüm değerleri üzerindeki rolünün tespit edilebilmesi amacıyla çalışma hem % 10 hem de % 0.4 FCS ile tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda FCS içeren kontrol örneklerinden elde edilen ölçüm değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli bulunması (P<0.05) bu düşüncemizi doğrulamıştır. % 10 FCS içeren kolajen ve cam iyonomer siman ekstrelerinin fibroblast kültürleri üzerinde farklı cevaplar oluşturduğu görülmüştür. Kolajen ekstresinin 1/5, 1/10 ve 1/50 sulandırmalarda blastojenik etki oluşturduğu ancak saf solüsyonun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. 1/5 ve 1/10 sulandırmalar ile saf solüsyondan elde edilen ölçüm değerleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. % 0.4 FCS'nun kullanıldığı çalışmamızın ikinci kısmında kolajen ekstrelerine karşı oluşan hücresel cevapla kontrol örneklerine karşı oluşan cevap arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. BU konuda yapılmış diğer çalışmalarda kolajenin benzer şekilde hücre kültürlerinde toksisiteye neden olduğu ancak bunun istatistiksel olarak önemli bulunmadığı bildirilmiştir (11). Kolajenin çapraz bağlanmasında kullanılan glutaraldehitin kültür ortamında çözünerek toksisiteye neden olabileceği düşünülmüştür (11). Ekstrelerin değerlendirildiği bu çalışmalar yanında, kolajen sponj parçalarını doğrudan kültür ortamına koyduğumuz bir çalışmamızda materyalin hem fibroblastlar hem de osteoblastlar tarafından kabul gördüğü, ayrıca elektron mikroskopik değerlendirmede hücrelerin sponja ataşman sağlayarak sponjun gözenekleri arasına girdikleri gözlenmiştir (4). Bu olumlu bulgulara rağmen hekimlerin antijenik özelliğe sahip bu materyali insanlarda kullanırken oluşabilecek immünolojik reaksiyonlar bakımından (6, 10) dikkatli davranması gerektiği unutulmamalıdır.

Cam iyonomer siman ekstrelerin % 10 FCS varlığında fibroblastlar üzerinde proliferatif etki oluşturduğu (p<0.05), % 0.4 FCS

varlığında ise kontrol ve deney kültürleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı saptanmıştır. Cam iyonomer simanlarla yapılan in vitro çalışmalarda materyallerin sertleşme süresiyle ilişkili olarak birkaç saatle birkaç gün arasında hücre kültürlerinde sitopatik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (3, 5, 15). İn vivo çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında materyalin sığ kavitelere güvenle kullanılabilmesi, ancak derin kavitelere pulpayı koruyucu bir kaide maddesi üzerine konulması gerektiği anlaşılmaktadır (18). Yaptığımız literatür araştırmamızda genel olarak bu materyallerden çoğunun 24 saat içinde sertliğe ulaştığı (1) ve bu süre sonunda toksisitesini büyük ölçüde yitirdikleri saptanmıştır (3, 5, 17). Çalışmamızda da ekstrelerin elde edilmesi öncesinde cam iyonomer siman tam sertliğe ulaşana kadar 24 saat oda ısısında bekletilmiştir. Sonuçlar literatürle uyum halinde olup 24 saatlik süre sonunda elde edilen cam iyonomer siman ekstrelerinin insan dişeti fibroblastlarına toksik olmadığını bulgulanmıştır. Son yıllarda cam iyonomer simanların diş dokularına iyi adaptasyonları, mikrosızıntıyı engellemeleri ve fiziksel ve kimyasal etkilere dirençli olmaları nedeniyle konvansiyonel yöntemlerle tedavinin zor olduğu kole kavitelere daimi restorasyon materyali olarak tercih edilmeleri dikkat çekmektedir (1). Bu tür kavitelelerin dişeti dokularına yakınlığı nedeniyle konunun periodontoloji yönünden de klinik ve histolojik olarak araştırılmasında fayda vardır.

KAYNAKLAR

- (1) Bowen, R.L., Majenhoff, W.A. : Dental composites/glass ionomers : The materials. Adv. Dent. Res., 6 : 44-49,1992.
- (2) Chung, E., Miller, E.J. : Collagen polymorphism : Characterization of molecules with the chain composition (a-1 (III)3)3 in human tissue. Science, 183 : 1200-1201, 1974.
- (3) Dahl, B.L., Tronstad, L.: Biological test of an experimental glass ionomer (silicopolyacrylate) cement. J. Oral Rehabil., 3 : 19-24, 1976.
- (4) Doğan, A., Munkley, A., Thomas, S., Moran, J. : Microscopic evaluation of biocompatibility of osteoblast impregnated human collagen sponges. J. Dent. Res., 71 : 637, 1992, (IADR abstract, 977).
- (5) Hanks, G.T., Anderson, M., Craig, R.G. : Cytotoxic effects of dental cements on two celi culture systems. J. Oral Pathol. 10 : 101-112, 1981.

ÇEŞİTLİ MATERYALLERİN İN VİTRO SİTOTOKSİTESİ

- (6) Hyder, p.R., Dowell, G., Sing, G., Dolby, A.E.: Freezed-dried, crosslinked bovine type I collagen: analysis of properties. *J. Periodontol.*, 1992; 63 : 182-186, 1992.
- (7) Pitaru, S., Tal, H., Soldinger, M., Azar-Avidan, O., Noff, M. : Collagen membranes prevent apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *J. Periodontal Res.*, 22 : 331-333, 1987.
- (8) Pitaru, S., Tal, H.: Soldinger, M., Grosskepf, A., Noff, M. : Partial regeneration of periodontal tissues using barriers. *J. Periodontol.* 59, 380-386, 1988.
- (9) Quteish, D., Singh, G., Dolby, AE. : Development and testing of a human collagen graft material. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 : 749-760, 1990.
- (10) Quteish, D., Dolby, A.E. : Lmmune responses to implanted human collagen graft in rats. *J. Periodontal Res.*, 26 : 114-121, 1991.
- (11) Quteish, D., Singrao, S., Dolby, A.E.: Light and electron microscopic evaluation of biocompatibility, resorption and penetration characteristics of human collagen graft material. *J. Clin. Periodontol.* 18 : 305-311, 1991.
- (12) Saroff, S.A., Chasens, A.I., Etsen, S.F., Levey, S.H.: Free sof t tissue Autografts. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. *J. Periodontol.*, 53 : 425-428, 1982.
- (13) Seher, K.S., Coil, J.A. : Effects of oxidized cellulose and microfibrillar collagen on infection Surgery, 91 : 301-304, 1981.
- (14) Silverstein, M.E., Chuapil, M. : Experimental and clinical experiences with collagen fleece as a hemostatic agent. *J. Trauma.*, 21 : 388-393, 1981.
- (15) Kawahara, H., Imanishi, Y., Oshima, H.: Biological evaluation on glass ionomer cement. *Br. Dent. J.*, 58 : 1080-1086,1979.
- (16) Mclean, J.W., Wilson, A.D. : The clinical development of the glass ionomer cements. I. formulations and properties. *Aust. Dent. J.* 22 : 31-36, 1977.
- (17) Meryon, S.D., Stephens, P.G., Browne, R.M. : A. comparison of the in vitro cytotoxicity of two glass-ionomer cements. *J. Dent. Res.*, 62 : 769-773, 1983.
- (18) Tobias, R.S., Browne, R.M., Plant, C.G., Ingram, D.W. : Pulpal response to a glass ionomer cement. *Br. Dent. J.*, 144 : 345-350, 1978.
- (19) Wirtlin, M.R., Vernino, A.R., Hancock, E.B. : The use of a topical hemostatic agent. *J. Periodontol.*, 51 : 225-227, 1980.