

**TAM SERAMİK MATERYALLERİNİN BİYOUYUMLULUĞUNUN
MTT TESTİ İLE İNCELENMESİ***

Evaluation of Biocompatibility of Full Ceramics with MTT

**Kerem KILIÇ¹, Bülent KESİM², Zeynep SÜMER³, Zübeyde POLAT⁴,
Ahmet ÖZTÜRK⁵**

Özet: Bu *in vitro* çalışmada, klinikte yaygın olarak kullanılan tam seramik alt yapı materyallerinin gingival fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. MTT [3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromid] hücre proliferasyon testi için, altı farklı tam seramik seramik alt yapı materyali; In-Ceram Alumina, In-Ceram Zirkonya, Turkom Cera, Finesse, Zirkozahn, IPS E.max gingival fibroblast hücreleri ile farklı sürelerde inkübe edilmiştir. MTT test analizinde, DMSO (Dimetil Sülfoksit) negatif kontrol grubu olarak ve gingival fibroblast hücreleri içeren kuyucuklardaki fenol red içermeyen DMEM (Dulbeco's Modified Eagles Medium) pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda, Zirkozahn grubunun hücre proliferasyon düzeyinin IPS E.max, Turkom Cera ve In-Ceram Zirkonya gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden yüksek olduğu ve farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($P<0.05$) tespit edildi. Hücre proliferasyon bulgularına göre IPS E.max'in en sitotoksik, Zirkozahn'ın ise en az sitotoksik materyal olduğu bulunmuştur. Yaptığımız *in vitro* araştırmada, sabit protez restorasyonunda kullanılan yeni nesil tam seramik sistemlerin biyolojik olarak daha güvenli bir hale gelebilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Gingival fibroblast, MTT, tam seramik

¹ Arş.Gör.Erc.Ün.Diş Hek.Fak.Protetik Diş Ted.AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc.Ün.Diş Hek.Fak.Protetik Diş Ted.AD, Kayseri

³ Doç.Dr.Cum.Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Sivas

⁴ Doç.Dr.Cum.Ün.Tıp Fak.Araştırma Merkezi, Sivas

⁵ Öğr.Gör.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Biyostatistik AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 11.02.2010 Kabul Tarihi : 26.07.2010

Summary: In this *in vitro* study, the cytotoxic effects of new generation metal free full ceramics on gingival fibroblast cells intensively used in clinical practice, were investigated. For MTT cell proliferation test, six different full ceramic substructures In-Ceram Alumina, In-Ceram Zirconia, Turkom Cera, Finesse, Zirkozahn, IPS E.max were incubated with gingival fibroblast cells in different periods. In MTT test analysis, DMSO were used as negative controls and DMEM without fenolred in wells containing gingival fibroblast cells were used as positive control. The intergroup comparisons revealed that the level of cell proliferation in zirkozahn group was higher than those of the cell proliferation in IPS E.max, Turkom Cera and In-Ceram Zirconia groups, the difference being statistically significant ($p < 0.05$). According to cell proliferation results, IPS E.max was the most cytotoxic material and Zirkozahn was the least cytotoxic material. It was concluded that the biocompatibility of new generation full ceramic systems used the restoration of prosthetic devices has to be enhanced to reach a safer biologic structure.

Keywords: Gingival fibroblast, MTT, full ceramic

Diş hekimliğinde kaybolan diş dokusunu yenilemek, estetik, fonksiyon ve biyolojik uyumu sağlamak için yoğun çalışmalar devam etmektedir (1).

Seramiklerin gerilim kuvvetlerine karşı dirençlerinin düşük olması sebebiyle metal bir alt yapı ile desteklenerek, zayıf gerilim dirençleri artırılmaya

*** Bu çalışma aynı adlı Doktora tezinden özetlenmiştir.**

çalışılmıştır ve bu hususta da başarılı olunmuştur. Metal alt yapılı seramiklerin; ışık geçirgenliğinin olmaması, renk derinliğinin yetersizliği, istenilen estetiğin sağlanamaması, seramiklerin metal alaşımındaki gümüş nedeniyle bağlanma dayanıklılığının azalması, fırınlama sonrası metal yüzeyinde ortaya çıkan oksit tabakasının metal-seramik birleşmesini etkilemesi gibi bazı dezavantajları vardır (1,2).

Bu nedenlerden dolayı tam seramik sistemler diş hekimliğinin kullanımına sunulmuş bir seçenektir. Hastaların, doğal diş renginde restorasyonlar istemesi ve yeni tam seramik sistemlerin geliştirilmesi çeşitli restoratif durumlarda tam seramik materyallerinin kullanılmasını arttırmıştır (3,4).

Canlı dokular ile yapay materyalleri yakın temasta kullanma gereksinimi biyolojik uyumluluk kavramını beraberinde getirmektedir. Tam seramik restorasyonlar periodontal dokularla uzun süreler yakın temasta bulunmaktadır (5). Bu nedenle tam seramikleri güçlendirmek için kullanılan alt yapı sistemlerinin biyouyumluluğu merak konusudur.

Bu çalışmanın amacı, günümüzde sıklıkla kullanılan altı adet tam seramik alt yapı materyalinin sitotoksitesilerinin incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tam seramikler ve üretici firmalar Tablo I'de gösterilmiştir. Kullanılan tam seramiklerden 12'şerli 6 grup olmak üzere toplam 72 adet örnek, üretici firma talimatlarına uygun

olarak 6 × 3 mm boyutlarında hazırlandı. Örneklerin standardizasyonunu sağlamak amacıyla, özel metal kalıp kullanılmıştır. Metal kalıpların üzerinde her seferinde 3 adet tam seramik disk hazırlayabilmek için 6 × 3 mm boyutlarında boşluklar bulunmaktadır.

Elde edilen 72 örneğin yüzeyleri 600'den 1200 gritliğe kadar silikon karbit aşındırıcılarla (3M, St. Paul, MN, Amerika) su kullanılarak ve bir piyasemen yardımıyla dikkatlice polisajlandı. Daha sonra örnekler ultrasonik su banyosundaki (Whaledent Biosonic Jr., Whaledent International, Newyork, Amerika) ultrasonik temizleme likitinde (Pro-Portion; Sultan, Amerika) 10 dakika temizlenip, hava ile kurutuldu.

Hücre Kültürü

Araştırmada hücre kültürünün oluşturulmasında L929 fare fibroblast hücre serisi (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, Amerika) kullanıldı.

Hücre kültüründe kullanılacak besi yeri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine penisilin – streptomisin, L-glutamin ve Fetal bovine serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı. Çözdürülen hücreler hücre kültürü üretme kaplarına (flask) alındı. Hücrelerin üremeleri ve flask yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları inverted ışık mikroskobu (Nikon ECLIPSE TS 100, Japonya) kullanılarak kontrol edildi.

Çalışmada L929 fibroblast hücre serisinin 6 ile 11. pasajlar arasındaki hücreleri kullanıldı.

Tablo I. Çalışmada kullanılan tam seramik sistemleri

Seramik Sistemi	Üretici Firma
IPS E.max	Ivoclar-Vivadent, Schaan /Liechtenstein
In-Ceram Alumina	Vita-Zahnfabrik, Almanya
In-Ceram Zirkonya	Vita-Zahnfabrik, Almanya
Finesse	Dentsply International Inc., Ceramco, NJ, Amerika
Zirkonzahn (CAD-CAM)	ICE Zirkon, ZirkonZahn, İtalya
Turkom Cera	Turkom-Ceramic SDN-BHD, Kuala Lumpur, Malezya

Sızıntı Ürünlerinin Toplanması

Tam seramik alt yapı materyallerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan ve enzimatik bir test olan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi tercih edildi. MTT testi ile, tam seramik alt yapı örneklerinden açığa çıkan sızıntı ürünlerinin direkt temas ile farklı zaman aralıklarında oluşturduğu toksik etkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sızıntı ürünlerinin toplandığı solüsyon, ISO 10993-5 numaralı protokolünde belirtildiği üzere fenolred içermeyen DMEM içerisine, FBS, L-glutamin ve penisilin/streptomisin ilave edilerek hazırlandı.

Tüm örnekler her tüpte 3'er adet örnek olacak şekilde tüplere alınarak üzerlerine 5 ml fenolred içermeyen DMEM ilave edildi. Disk şeklindeki örneklerin yüzey alanının fenolred içermeyen DMEM'in hacmine oranı 0.65 cm²/ml olarak hesaplandı. Bu oran ISO'nun tavsiye ettiği 0.5-6.0 cm²/ml. oranına uygundur. 1. gün, 2. gün, 1. hafta ve 2. hafta sonunda sızıntı ürünlerini içeren DMEM toplandı. Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak fenol red içermeyen DMEM kullanıldı.

Sitotoksiste Testinin Yapılması

Logaritmik üreme tarzında olan, aktif ve yüzeyi % 90-95 oranında kaplamış L929 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre üretme kaplarına (mikroplate) her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu (~2×10⁵ hücre/ml) olacak şekilde taksim edildi. Mikroplate kuyucuklarındaki hücre çoğalması istenilen yoğunluğa geldikten sonra kuyucuklardaki fenolred içermeyen DMEM aspire edilerek dört farklı zaman dilimine ait her örnek grubu için 10 kuyucuk kullanılarak sızıntı ürünü içeren DMEM'den 100 µl ilave edildi. Mikroplateler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sızıntı ürünlerini içeren DMEM, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra mikroplatelerden uzaklaştırıldı ve mikroplate üzerindeki her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edildi. Mikroplate kuyucuklarındaki hücreler karanlık bir ortamda, 37° C' de 4 saat süreyle inkübe edildi. Inkübasyon sonrası MTT solüsyonu içeren sıvılar aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa oda ısısında 100 µl

dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi. Formazan kristallerinin tamamen çözünmesi ile mavi/mor renge dönüşümünü takiben plateler ELISA okuyucusuna (Bio-tek EL 312, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Amerika) yerleştirildi. Oluşan formazanın optik yoğunluğu 450 nanometrede okunarak belirlendi.

Optik okuyucudan elde edilen değerler aşağıdaki formüle konularak, test materyallerinin ayrı ayrı hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplandı.

$$\text{Hücre Proliferasyon Yüzdesi} = \frac{A-B}{C-D} \times 100$$

A: Test örneklerine ait kuyucuklardaki optik değerlerin ortalaması

B: Kör olarak kullanılan kuyucuklardaki optik değerlerin ortalaması

C: Pozitif kontrol grubuna ait değerlerin optik değerlerin ortalaması

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma verileri SigmaStat 3.0 (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, Amerika) istatistik paket programında değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis varyans analizi ile yapıldı. Fark çıkan grupların belirlenmesinde parametrik olmayan Tukey testi kullanıldı. P<0.05 değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan altı farklı tam seramik alt yapı materyalinin 1. gün, 2. gün, 1. hafta ve 2. hafta sitotoksiste değerlendirmesinden elde edilen hücrelerin proliferasyon yüzdeleri ortanca değerleri Tablo II'de verilmektedir.

Şekil 1 ve 2'de gösterilen hücrelerin proliferasyon yüzdeleri, pozitif kontrol grubunun değeri % 100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeridir ve canlı hücre oranını simgelemektedir.

1. gün;

1. günde çalışmada kullanılan altı materyalin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü ($P<0.05$).

IPS E.max grubunun hücre proliferasyon düzeyinin Zirkozahn, Finesse ve Turkom Cera gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu ($P<0.05$),

Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

2. gün;

2. günde çalışmada kullanılan altı materyalin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü ($P<0.05$).

Zirkozahn grubunun hücre proliferasyon düzeyinin IPS E.max, Turkom Cera ve In-Ceram Zirkonya gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden yüksek olduğu ve farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($P<0.05$),

Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

1. hafta;

1. haftada çalışmada kullanılan altı materyalin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü ($P<0.05$).

Zirkozahn grubunun hücre proliferasyon düzeyinin IPS E.max, Turkom Cera ve In-Ceram Zirkonya gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden yüksek olduğu ve farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($P<0.05$),

Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

2. hafta;

2. haftada çalışmada kullanılan altı materyalin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü ($P<0.05$).

Zirkozahn grubunun hücre proliferasyon düzeyinin IPS E.max, Turkom Cera ve In-Ceram Zirkonya gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden yüksek olduğu ve farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($P<0.05$),

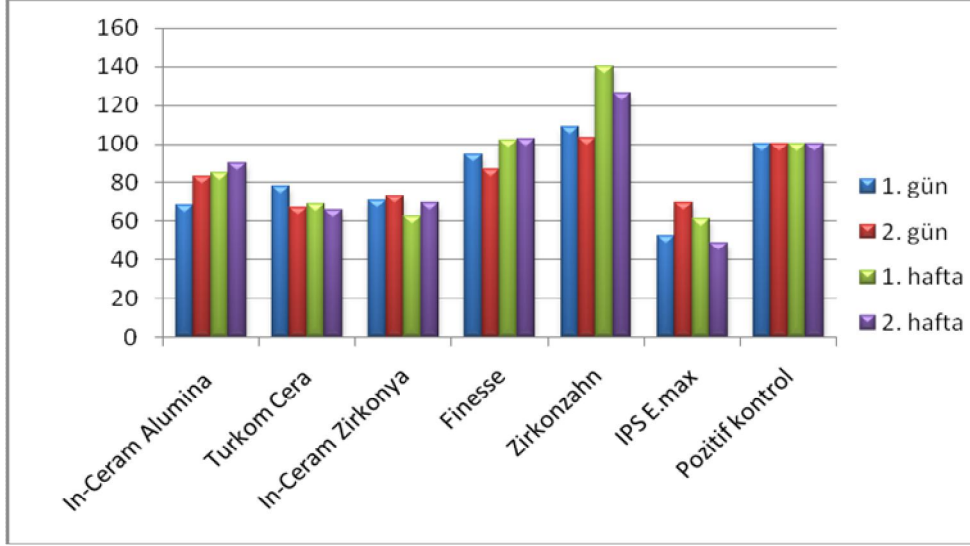
Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

TARTIŞMA

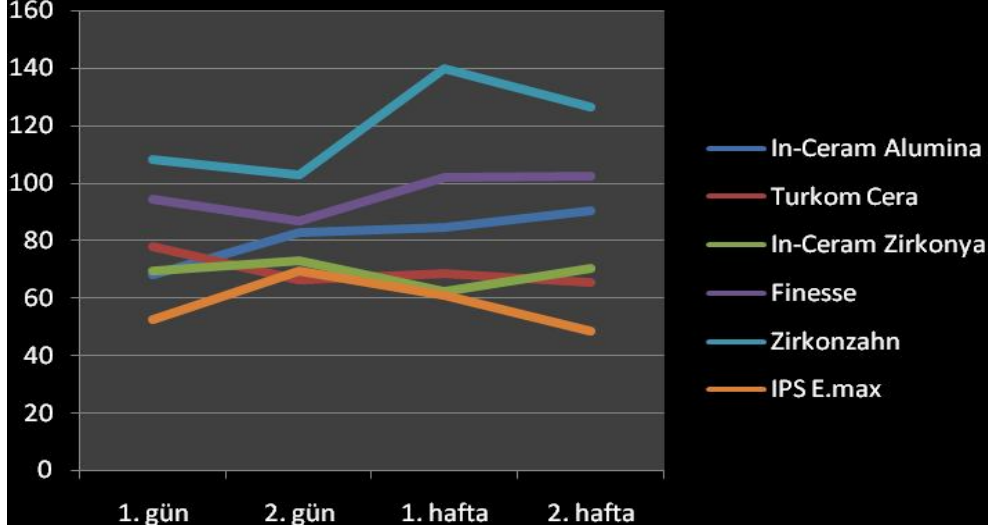
Tablo II. Test gruplarının farklı zaman dilimlerindeki hücre proliferasyonu ölçüm değerlerinin karşılaştırması

Gruplar	1. gün Ort(%25-%75)	2. gün Ort(%25-%75)	1. hafta Ort(%25-%75)	2. hafta Ort(%25-%75)
In-Ceram Alumina	67.9(61.5-85.5) ^{abd}	82.8(73.1-107.8) ^{ab}	84.6(65.7-93.8) ^{ab}	90.2(83.8-102) ^{ab}
Turcom Cera	78(69-88) ^{ab}	66.5(58-79) ^b	68.5(61-76) ^b	65.5(57-71) ^b
In-Ceram Zirkonya	70.5(67-74) ^{ac}	73(65-77) ^b	62.5(60-72) ^b	69.5(63-81) ^b
Finesse	94.5(71-103) ^{ab}	87(51-101) ^{ab}	102(60-159) ^{ab}	102.5(82-146) ^{ab}
Zirkozahn	108.5(83-147) ^b	103(86-129) ^a	140(114-180) ^a	126.5(119-165) ^a
IPS E.max	52.5(47-63) ^{cd}	69.5(50-81) ^b	61(49-67) ^b	48.5(45-59) ^b

Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil I. Tam seramik altyapı materyallerinin 1. gün, 2. gün, 1. hafta ve 2. haftadaki hücre proliferasyon yüzdeleri



Şekil II. Test gruplarının farklı zaman dilimlerindeki hücre proliferasyonu ortanca ölçüm değerleri

MTT test yöntemi, biyoyumluluk testleri içerisinde, hızlı sonuç alınması ve çok hassas olmasının yanı sıra materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin dahi değerlendirilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir (6,7). Bu nedenle çalışmamızda tam seramik alt yapı materyallerinin sitotoksik özellikleri MTT testi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan tam seramik alt yapı materyallerinin seçilmesinin nedeni, hem güncel olmaları hem de hazırlanış teknikleri bakımından birbirlerinden farklılık göstermeleridir. Dental materyaller değerlendirilirken çoğunlukla fiziksel ve mekanik özellikler hedeflenmekte, biyolojik özellikler ise geri planda kalmaktadır. Ancak son yıllarda yeni geliştirilen materyallerin klinik uygulamaları öncesinde biyoyumluluk değerlendirilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır (8).

Tam seramiklerin sitotoksitesite özelliklerinin değerlendirildiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda bu materyallerin genel olarak biyoyumlu materyaller olduğu bildirilmekle birlikte (9-13) bazı çalışmalarda toksik olduklarını belirtmişlerdir (14-16).

Pera ve arkadaşları, In-Ceram, Cerigo, IPS Empress II, Cercon ZrO₂, Finesse All Ceram tam seramiklerin sitotoksitesitelerini fare fibroblast hücrelerinin (L929) kullandığı hücre kültüründe MTT test yöntemi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak bu beş tam seramik alt yapı materyalinin hiçbirinin sitotoksik olmadığı sonucuna ulaşmışlardır (9).

Rafaelli ve arkadaşları Lava CAD-CAM sistemi kullanılarak hazırladıkları zirkonya disklerin sitotoksitesitesini MTT yöntemi ile in vitro olarak araştırdıkları çalışmalarında, zirkonyanın biyoyumlu bir materyal olduğunu belirtmişlerdir (12).

Özen ve arkadaşları, In-ceram alüminanın sitotoksitesitesini MTT analizi yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, In-ceram alüminanın sitotoksik bir materyal olmadığını belirtmişlerdir (13).

Messer ve arkadaşları, 2 feldspatik seramik (Vita Omega ve Duceragold), 2 lityum disilikat içerikli tam seramik (Stylepress ve IPS Empress 2) ve bir lösit içerikli tam seramiğin (IPS Empress 1) sito-

toksitetlerini Balb/c 3T3 fare fibroblastı kullanarak, oluşturdukları hücre kültüründe, MTT analizi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, IPS Empress 1, Stylepress ve IPS Empress 2 gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve seramik grupları içerisinde en toksik olan materyalin lityum disilikat içerikli Empress 2 olduğunu bildirmişlerdir (15).

Brackett ve arkadaşları, üçü preslenerek, ikisi ise CAD-CAM sistemi ile üretilen 5 farklı lityum disilikat içeren tam seramiğin sitotoksik özelliklerine yaşlandırma ve polisaj işleminin etkisini MTT analizi ile in vitro olarak incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, tüm lityum disilikat materyallerinde, başlangıç olarak, %50-70 oranında hücresel mitokondriyel aktivitenin baskılandığını bulmuşlardır (16).

Bizim çalışmamızda gruplar arasındaki sitotoksitesite değerleri karşılaştırıldığında 2. gün hariç diğer tüm zaman dilimlerinde IPS E.max grubunun sitotoksitesitesi en yüksek görülürken, sitotoksitesitesi en düşük olan grup Zirkonzahn'dır. 2. günde ise, Turkom Cera grubunun sitotoksitesite değeri, IPS E.max'ın sitotoksitesite değerinden daha yüksektir. Çalışmamızın sonuçları Messer ve arkadaşlarının ve Brackett ve arkadaşlarının sonuçlarına paralel olarak, seramik materyallerinden biyolojik ortamda salınan düşük molekül ağırlıklı komponent ve iyonların hedef hücrelerin metabolik aktivitesini değiştirdiğini göstermesi bakımından benzerlik göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda sitotoksitesite testleri sırasında en sık karşılaşılan hücresel bozulma, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları ve sitoplazmik büzülme nedeniyle iğ şeklindeki fibroblast hücrelerinin yuvarlaklaşması, mikrovillusların kaybolması, vakuol oluşumu, hücre organellerinin sitoplazmada dağılması sonunda hücrenin parçalanması olarak belirlenmiştir (7,17). Taira ve arkadaşları, bu tarz değişikliklerin faz-kontrast mikroskobu kullanılarak da tespit edilebileceğini bildirmişlerdir (18).

Bizim çalışmamızda da, sitoplazma büzülmesi nedeniyle hücrelerin yuvarlak şekil aldığı, mikrovillusların kaybolduğu, hücre organellerinin dağılıp sitoplazma içerisinde toplanarak apoptik yapı oluş-

turdukları, nukleusun çok parçalı yapı oluşturması, hücre zarında katlanma nedeniyle oluşan kalın görüntü ve son olarak hücre zarının parçalanması ile hücre içeriğinin dağıldığı gözlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, bazı tam seramik materyallerin in vivo sitotoksosite risklerinin bulunabileceğini ve klinikte sıklıkla kullanılan çeşitli tam seramiklere hücresel düzeydeki cevabın eşit olmadığını ve her zaman istenilen düzeyde olmadığını göstermiştir. Çalışmada kullanılan materyallerden Finesse ve Zirkonzahn'ın biyouyumlu materyaller olduğu söylenebilirken, IPS E.max'ın biyouyumlu bir materyal olduğu söylenemez.

Bu çalışmanın sonuçlarından allerji, inflamasyon ve mutagenite gibi diğer biyolojik cevapların gelişip gelişmeyeceği tahmin edilemez.

Gelecekteki çalışmalar, gözlenen sitotoksitedeki değişikliğin sebebinin anlaşılabilmesi için ve bu değişikliklerin klinik pratiğe yorumlanabilmesi için tam seramik alt yapı materyallerinin karakterizasyonunu içermelidir. Kimyasal yüzey analiz teknikleri, element salımının ölçülmesi ve fiziksel yüzey karakterizasyonu ile mikroyapı ve pörözitenin incelenmesi tam seramik alt yapı materyallerinin biyolojik yanıtının anlaşılabilmesini sağlayabilir. Bu durumun anlaşılması çok daha iyi biyolojik özelliklere sahip tam seramiklerin geliştirilmesine imkan verebilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın gerçekleştirilmesindeki katkılarından ötürü Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Hondrum SO. A review of the strenght properties of dental ceramics. *J Prosthet Dent* 1992; 67:859-865.
2. Rosenblum MA, Schulman A. A review of all ceramic restoration. *JADA* 1997; 128:297-307.
3. McLean JW, Odont D. Evolution of dental ceramics in the 20 th century. *J Prosthet Dent* 2001; 85:61-66.
4. O'Brien WJ. *Dental Materials and their selection* (2nd ed). Quintessence Publishing Co Inc, Chicago 1997; 97-106.
5. Robert GC. *Restorative Dental Materials* (9th Ed). Mosby Year Book Inc, London 1993.
6. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and New Methods for Testing In Vitro Alloy Cytotoxicity. *Dent Mater* 1992; 8:65-70.
7. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of Tetrzolium Colorimetric and 51Cr Release Assays for Cytotoxicity Determination of Dental Biomaterials. *Dent Mater* 1995; 11:327-331.
8. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1997; 1:154-162.
9. Pera P, Conserva E, Pin D, Acquaviva A, Riboldi A, Mariottini GL, Pane L. Cytotoxicity in vitro analysis of ceramic materials for "metal free" prosthetic substructures. *Minerva Stomatol* 2005; 54(6):363-71.
10. Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 2003; 19(6):487-92.
11. Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(4):481-93.

12. Raffaelli L. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspatic ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2008; 86(4):959-68.
13. Özen J, Atay A, Beydemir B, Serdar MA, Ural AU, Dalkız M, Soysal Y. In vitro IL-1beta release from gingival fibroblasts in response to pure metals, dental alloys and ceramic. *J Oral Rehabil* 2005; 32(7):511-17
14. Kokoti M, Sivropoulou A, Koidis P, Garefis P. Comparison of cell proliferation on modified dental ceramics. *J Oral Rehabil* 2001; 28:880-87.
15. Messer RL, Lockwood PE, Wataha JC, Lewis JB, Norris S, Bouillaguet S. In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J Prosthet Dent* 2003; 90(5):452-8.
16. Brackett MG, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent Mater* 2008; 24(4):450-6.
17. Al-Nazhan S, Spanberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 1990; 16:129-134.
18. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic Effect of Methyl Methacrylate on 4 Cultured Fibroblasts. *Int J Prosthodont* 2000; 13:311-315.