

ÜÇ FARKLI DOLGU MATERYALİNİN FİBROBLAST ATAŞMANINA ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ*

Effect of Three Different Filling Materials on Fibroblast Attachment:*In vitro* Evaluation

Duygu KILIÇ¹, Servet KESİM², Zeynep SÜMER³, Ahmet ÖZTÜRK⁴

Özet: Bu *in vitro* çalışmada, klinikte yaygın olarak kullanılan cam iyonomer simanın, rezin modifiye cam iyonomer simanın ve poliasit modifiye kompozit rezinin gingival fibroblast ataşmanına etkisi araştırılmıştır. MTT[3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] testi için, üç farklı dolgu materyali gingival fibroblast hücreleri ile 24 ve 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. MTT test sonuçlarına göre, 24 saat sonunda poliasit modifiye rezin kompozit yüzeyinde fibroblast ataşmanın fazla olduğu ancak 72 saat sonunda fibroblast ataşmanın azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Yetmiş iki saat sonunda rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyindeki fibroblast ataşmanın diğer dolgu maddelerine göre anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Tüm dolgu materyalleri 24 ve 72 saat sonunda kontrol (cam) grubu ile hücre proliferasyon yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Yaptığımız *in vitro* araştırma sonuçlarına ek olarak kimyasal yüzey analiz teknikleri, element salınımının ölçülmesi ve fiziksel yüzey karakterizasyonu ile mikroyapı ve pörözitenin incelenmesi dolgu materyallerinin biyolojik yanıtının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Gingival fibroblast, sitotoksosite, Cam iyonomer siman

Abstract: In this *in vitro* study, the effects of glass ionomer cement, resin modified glass ionomer cement and polyacid modified resin composite used in clinical practice on gingival fibroblast cells were investigated. For MTT test, the substructures of three different filling materials' were incubated with gingival fibroblast cells for 24 and 72 hours. In MTT test analysis, fibroblast attachment on polyacid modified resin composite filling material was excessive after 24 hours but decreased after 72 hours ($p<0,05$). Fibroblast attachment on resin modified glass ionomer cement was lower than other filling materials after 72 hours. When cell proliferation percentages of all filling materials were compared with control group (glass) after 24, 72 hours, it was observed that difference was statistically significant ($p>0,05$). In addition to our *in vitro* research results, the chemical surface analysis techniques, measurement of release of elements and physical surface characterization and analysis of microstructure and porosity can provide a better understanding of the biological response of filling materials.

Keywords: Gingival fibroblast, cytotoxicity, glass ionomer cement

¹ Uzman Dt.Erc.Ün.Sağ. Bil.Ens.Periodontoloji AD, Kayseri

² Yrd.Doç.Dr.Erc.Ün.Diş Hek Fak.Periodontoloji AD, Kayseri

³ Prof.Dr.Cumhuriyet Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Sivas

⁴ Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Biyoistatistik BD, Kayseri

Geliş Tarihi : 23.03.2011 Kabul Tarihi : 21.08.2012

*Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından B.591 nolu proje ile doktora tezi olarak desteklenmiştir .

Serbest dişeti kenarının apikale migrasyonu ile kök yüzeyinin klinik olarak açığa çıkmasına dişeti çekilmesi denir (1). Bir araştırmada 9869 kişilik bir topluluktaki toplam dişeti çekilmesi prevalansı % 58 olarak tespit edilmiştir (2). Dişeti çekilmesi sonucu, organik içeriği fazla olan sementle kaplı kök yüzeyi açığa çıkar. Bu durum, kök yüzeyi üzerinde çürüksüz servikal defektlerin, kök çürüklerinin oluşmasına ve kök hassasiyetine yol açabilir (3, 4).

Subepitelial bağ dokusu grefti, koronalle pozisyone flep gibi çeşitli kök örtümü yöntemleri ile açık kök yüzeylerinin başarılı bir şekilde kapatılabildiği gösterilmiştir (5, 6). Ancak dişeti çekilmesi ve kök çürüklerinin ya da çürüksüz servikal lezyonların bir arada görüldüğü bazı komplike vakalarda restoratif ve periodontal plastik cerrahi işlemlerin bir arada uygulanması gerekebilmektedir. Böyle durumlarda kök çürüğü temizlenir ve oluşan kavite ya da çürüksüz servikal lezyon bölgesi uygun bir restoratif materyal ile restore edilir ve bir mukoperiosteal flep ve/veya greft ile üzeri örtülür (7, 8). Çürüksüz servikal lezyonların restorasyonunda cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman ve kompomere gibi flor salınımı yapan materyallerin kullanımı önerilmiştir (9).

Bu materyallerle restore edilen kök yüzeylerinin periodontal plastik cerrahi işlemlerle örtülmesi sonrası dişeti fibroblastlarının dolgu materyallerine ataşmanı oldukça önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalarda, rezin modifiye cam iyonomer siman, mikrofil kompozit rezinler ve kompozit rezinler ile restore edilen kök yüzeylerinin farklı periodontal plastik cerrahi işlemler ile örtümlerinin karşılaştırılması sonucunda kök örtümü oranlarının başarılı bulunduğu rapor edilmiştir (7, 8, 10, 11). Ancak hangi materyal yüzeyinde daha fazla örtüm sağlandığı ya da daha fazla fibroblast ataşmanı olduğu belirtilmemiştir.

Bu çalışmanın amacı, cam iyonomer siman (CIS), rezin modifiye cam iyonomer siman (RMCIS) ve poliasit modifiye kompozit rezinden (PMKR) oluşan üç farklı dolgu materyalinin fibroblast proliferasyonuna etkisinin değerlendirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Test Materyalleri ve Hazırlanması

Çalışmada cam iyonomer siman (Ketac Molar Quick Aplicap, 3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya), rezin modifiye cam iyonomer siman (Photac Quick, 3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya) ve poliasit modifiye kompozit rezin (Dyract Extra, Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) dolgu materyalleri, kontrol grubu olarak ise cam kullanıldı. Kullanılan test materyallerinden 10'arlık 4 grup olmak üzere toplam 40 adet örnek hazırlandı. Test materyallerinden disklerin hazırlanmasında ISO 10993-5 standardına uygun bir adet silindirik teflon kalıp kullanıldı (12). Teflon kalıbın üzerinde her seferinde 8 adet disk hazırlayabilmek için 6×2 mm boyutlarında boşluklar bulunmaktaydı (Resim 1). Her dolgu materyali üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı ve elde edilen karışımlar teflon kalıba yerleştirildi. Daha sonra bu örnekler yüzeyin düzgün olması için iki siman camı arasında sıkıştırıldı. Kimyasal olarak sertleşen CIS, kalıp içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra, ışıkla sertleşen RMCIS ve PMKR ise 10 sn süre ile ışıkla polimerize edildikten sonra kalıptan çıkartıldı. Fazlalıklar, elmas frezlerle alındı ve konturlar düzeltildi. Daha sonra Sof-Lex (3M-Espe, Amerika) diskleri ile düşük devirde mikromotor yardımıyla hafif basınç altında 30 sn süreyle polisaj yapıldı.

Hücre Kültürü

Araştırmada hücre kültürünün oluşturulmasında L929 fare fibroblast hücre hattı (ŞAP Enstitüsü) kullanıldı. Hücreler saklama ortamı olan $-80^{\circ}C$ 'den çıkartılarak $37^{\circ}C$ 'deki su banyosunda çözdürüldü. Hücre kültüründe kullanılacak besi yeri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine penicilin-streptomycin, L-glutamin ve Fetal bovine serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı. Çözdürülen hücreler besi yeri ortamı ile hücre kültürü üretme kaplarına alındı. Hücreler yüzeyi tamamen kapladıklarında tripsinizasyon işlemi yapıldı. DMEM ilave edilerek hücre süspansiyonu oluşturuldu ve kültür kaplarına bölünerek pasajlandı. Çalışmada L929 fibroblast hücre serisinin 6 ile 11. pasajlar arasındaki hücreleri kullanıldı.

Fibroblast Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

L929 hücreleri, pasajlama işleminde olduğu gibi tripsinizasyonla kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı ve DMEM ilave edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu içerisinde örnek disklerin olduğu 24 kuyucuklu hücre üretme kaplarına her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu (~2×10⁵ hücre/ml) olacak şekilde taksim edildi. Hücre kültürü üretme kapları, 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde hücrelerin disk yüzeylerine yapışması için 24 ve 72 saat inkübe edildi.

MTT (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, USA) solüsyonu hazırlandı ve her bir kuyucuğa 10 µl ilave edildi ve hücreler karanlık bir ortamda, 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edildi. Sonrasında MTT solüsyonu içeren sıvılar aspire edildi ve her bir kuyucuğa oda ısısında 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi. Formazan kristallerinin tamamen çözünmesi ile kuyucuklardaki diskler çıkartıldı, kültür üretme kapları ELISA okuyucusuna (Bio-tek EL 312, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) yerleştirildi ve 450 nanometrede okundu. Optik okuyucudan elde edilen değerler aşağıdaki formüle konularak, test materyallerinin ayrı ayrı hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplandı.

$$A - B$$

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

$$C - B$$

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 sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında hücre proliferasyonu bakımından farklılığın istatistiksel değerlendirilmesinde 24 saat sonundaki veriler normal dağılıma uymadığı için Kruskal-

Wallis varyans analizi, 72 saat sonunda tek yönlü ANOVA kullanıldı, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına ise sırasıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi ve Duncan Methodu ile bakıldı. Grupların 1. ve 3. gündeki hücre proliferasyonu değerlerinin karşılaştırılması için eşleştirilmiş *t* testi kullanıldı. Çalışmada kullanılan her bir dolgu materyalinin hücre proliferasyonu değerlerinin ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılması ise veriler normal dağılıma uymadığı için Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Hücre Proliferasyonu Deneyi Sonuçları

Çalışmada kullanılan üç farklı dolgu materyalinin MTT testine ait hücre proliferasyonu ortanca ve ortalama değerleri Tablo I'de verilmektedir.

Yirmi dört saat sonunda poliasit modifiye kompozit rezin yüzeyindeki hücre proliferasyon düzeyinin diğer dolgu materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu gözlenmiştir (P<0.05) (Tablo II).

Yetmiş iki saat sonunda rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyindeki hücre proliferasyon düzeyinin cam iyonomer siman ve poliasit modifiye kompozit rezine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu (P<0.05), bu iki materyal yüzeyindeki hücre proliferasyon düzeylerinin ise istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlenmiştir (P>0.05) (Tablo III).

Yirmi dört ve 72 saat sonunda cam iyonomer ve rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeylerinde hücre proliferasyonu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Poliasit modifiye kompozit rezin yüzeyinde ise 72 saat sonunda hücre proliferasyonu değerlerinin 24 saate oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir (P<0.05) (Tablo IV).

Çalışmada kullanılan her bir dolgu materyalinin hücre proliferasyonu değerleri 24 ve 72 saat sonunda ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kontrol grubu değerlerinin anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (P<0.05) (Tablo V).

Tablo I. Üç farklı dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortanca ve ortalama değerleri (%) (Optik Yoğunluk Değerleri)

| Test Grupları | Zaman | $\bar{X} \pm S.S$ Ort(%25-%75) |
|---------------|---------|-----------------------------------|
| CIS Grubu | 24 saat | 53.8±5.07 53(49-58) |
| CIS Grubu | 72 saat | 56±11.3 56.5(48.75-63) |
| RMCIS Grubu | 24 saat | 43±9.92 42(32.75-50.5) |
| RMCIS Grubu | 72 saat | 45.7±6.14 47.5(40-50.25) |
| PMKR Grubu | 24 saat | 80.3±23.7 77.50(61-91.75) |
| PMKR Grubu | 72 saat | 58.3±6.41 58(52-63.75) |
| Kontrol Grubu | 24 saat | 100 |
| Kontrol Grubu | 72 saat | 100 |

Tablo II. Yirmi dört saat sonunda test gruplarının hücre proliferasyonu ortanca ölçüm değerlerinin karşılaştırması

| Test Grupları | 24 saat Ort(%25-%75) |
|---------------|------------------------------|
| K Grubu | 53(49-58) ^a |
| P Grubu | 42(32.75-50.5) ^a |
| D Grubu | 77.50(61-91.75) ^b |

^a ve ^b harfleri gruplar arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05)

Tablo III. Yetmiş iki saat sonunda test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması

| Test grupları | 72 saat $\bar{X} \pm S.S$ |
|---------------|------------------------------|
| K Grubu | 56±11.3 ^a |
| P Grubu | 45.7±6.14 ^b |
| D Grubu | 58.3±6.41 ^a |

^a ve ^b harfleri gruplar arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05)

Tablo IV. 1. ve 3. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması

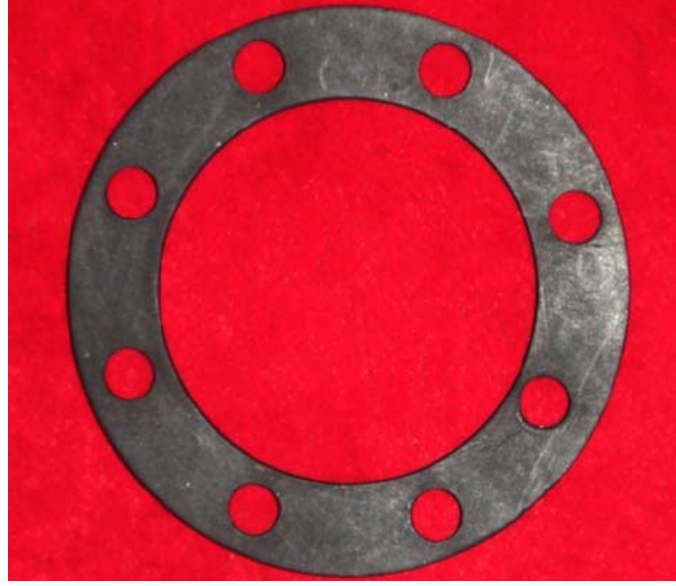
| Zaman | CIS Grubu $\bar{X} \pm S.S$ | RMCIS Grubu $\bar{X} \pm S.S$ | PMKR Grubu $\bar{X} \pm S.S$ |
|--------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1. gün | 53.8±5.07 | 43±9.92 | 80.3±23.7 |
| 3. gün | 56±11.3 | 45.7±6.14 | 58.3±6.41 |
| P | 0.597 | 0.506 | 0.02* |

* Gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir (P<0.05)

Tablo V. Dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortanca değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

| Test Grupları | 1. gün Ort(%25-%75) | 3. gün Ort(%25-%75) |
|---------------|------------------------|------------------------|
| CIS Grubu | 53(49-58)* | 56.5(48.75-63)* |
| RMCIS Grubu | 42(32.75-50.5)* | 58(52-50.25)* |
| PMKR Grubu | 77.50(61-91.75)* | 47.5(40-63.75)* |

* (P<0.05)'i ifade eder.



Resim 1. Çalışmada kullanılan teflon kalıp

TARTIŞMA

Restoratif materyaller periodontal dokularda direkt temas nedeniyle oluşan yıkıcı etkilerin en aza indirilebilmesi için biyouyumlu olmalıdırlar (13). Dental materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için *in vitro* test yöntemleri tercih edilmektedir. Bu materyaller üzerinde hücre proliferasyonu olması materyallerin biyouyumluluğunu işaret etmektedir (14). Kolay uygulanan çalışmalar olsalar da *in vitro* çalışmaların doğruluğu özenle yapılan *in vivo* araştırmalar ile belirlenebilir. (15, 16)

Mevcut çalışmada, diğer bazı çalışmalarda tanımlandığı gibi dehidrogenaz aktivitesinin ölçülmesi ile fibroblast hücre canlılığının ve proliferasyon oranının değerlendirildiği bir *in vitro* test yöntemi olan MTT test yöntemi kullanılmıştır. (17, 18, 19, 20)

ISO 10993-5 ‘Sitotoksikite Testleri-*In Vitro* Yöntemler’ standardına göre; *in vitro* çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında ve fibroblast ataşmanının değerlendirilme-

sinde, standart olarak L929 ya da Balbc3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılması önerilmektedir (12). Bu nedenle mevcut çalışmada L929 fare fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları fibroblastların test edilen tüm dolgu materyali yüzeylerine ataşmanlarının iyi olduğunu göstermiştir. Poliasit modifiye kompozit rezin yüzeyinde 24 saatlik inkübasyon periyodundan sonra hücre proliferasyon düzeyinin diğer dolgu materyallerinden daha yüksek olduğu bulundu. Yetmiş iki saatlik inkübasyon periyodundan sonra ise rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyinde hücre proliferasyon düzeyinin diğer dolgu materyallerinden düşük olduğu gözlemlendi, aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Al-Qathami ve ark.’nın sonuçlarına benzer şekilde, rezin modifiye ve geleneksel cam iyonomer siman yüzeyinde, poliasit modifiye kompozit rezine oranla daha az sayıda fibroblast proliferasyonu meydana gelmesi, cam iyonomer siman yüzeyinin kompozit yüzeyine oranla daha pürüzlü olmasına bağlanabilir (14). Ancak bu sonuçlardan farklı olarak Al-Sabek ve ark, Camp ve ark. ise yaptıkları

çalışmalarda rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyinde diğer test materyallerine oranla daha fazla fibroblast ataşmanı olduğunu rapor etmişlerdir (21, 22). Aynı kategorideki materyaller her zaman aynı tepkileri vermeyebilirler. Materyallerin kimyasal bileşenleri, partikül büyüklükleri, polimerizasyon zamanları ve uygulama özelliklerine göre farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (15).

Resin modifiye ve geleneksel cam iyonomer siman yüzeylerinde, 24 ve 72 saat sonunda hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken, poliasit modifiye kompozit rezin grubu için, 24 saate oranla 72 saatte anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu durum Al-Qathami ve ark.'nın da belirttiği gibi inkübasyon periodunun uzaması ile materyalden besiyerine artık madde salınımının artmasıyla açıklanabilir (14).

Tüm dolgu materyalleri 24 ve 72 saat sonunda kontrol grubu ile hücre proliferasyon yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında, kontrol grubu yüzeyinde gözlenen hücre proliferasyonunun anlamlı oranda yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Bu sonuçlar kontrol grubunun yüzey karakterizasyonu ve kimyasal yapısı ile ilişkilendirilebilir (21). Kontrol grubu olarak kullanılan cam yüzeyi, üç dolgu materyalinden de daha düzgün yüzeye sahiptir. Dolayısıyla cam yüzeyine fibroblast ataşmanı daha fazla olmuştur.

Periodontal plastik cerrahi işlemler ile restoratif işlemlerin bir arada başarıyla kullanılmaları için gelecekteki çalışmalar, dolgu materyallerinin karakterizasyonuna odaklanmalıdır. Kimyasal yüzey analiz teknikleri, element salınımının ölçülmesi ve fiziksel yüzey karakterizasyonu ile mikro yapı ve porözitenin incelenmesi dolgu materyallerinin biyolojik yanıtının anlaşılabilmesini sağlayabilir. Sonuçta çok daha iyi biyolojik özelliklere sahip dolgu materyallerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. American Academy of Periodontology. *Glossary of Periodontology Terms. (3th ed)*, Chicago; 2001
2. Albandar, J. M, Kingman, A. *Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. J Periodontol* 1999; 70(1): 30–43.
3. Addy M, Mostafa P, Newcombe RG. *Dentine hypersensitivity: the distribution of recession, sensitivity and plaque. J Dent.* 1987; 15(6): 242-8.
4. Orchardson R, Collins WJ. *Clinical features of hypersensitive teeth. Br Dent J.* 1987; 162(7): 253-6.
5. Zucchelli G, De Sanctis M. *Treatment of multiple recession type defects in patients with esthetic demands. J Periodontol* 2000; 71: 1506–1514.
6. Langer B, Langer L. *Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. J Periodontol* 1985; 56: 715–720.
7. Alkan A, Keskiner I, Yuzbasioglu E. *Connective tissue grafting on resin ionomer in localized gingival recession. J Periodontol.* 2006; 77(8): 1446-51.
8. Lucchesi JA, Santos VR, Amaral CM, Peruzzo DC, Duarte PM. *Coronally positioned flap for treatment of restored root surfaces: a 6-month clinical evaluation. J Periodontol.* 2007;78(4): 615-23.
9. Douglas A.T, Micheal K.M, Edward, M, et al. *Perioesthetic approach to the diagnosis and treatment of carious and noncarious cervical lesions: Part 2. J Esthet Restor Dent,* 2003; 15: 284-296.

10. Martins TM, Bosco AF, Nóbrega FJ, et al. Periodontal tissue response to coverage of root cavities restored with resin materials: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2007; 78(6): 1075-82.
11. Dragoo MR. Resin-ionomer and hybrid-ionomer cements: part II, human clinical and histologic wound healing responses in specific periodontal lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997; 17(1): 75-87.
12. SO 10993 part 5, 1999. International Standard 10993 "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods." International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999
13. Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int. Endod. J.* 2006; 39: 40-47.
14. Al-Qathami H, Balto H, Al-Nazhan S, Siddiqui Y. Effect of root perforation repair materials on morphology and attachment behaviour of human PDL fibroblasts invitro. *Saudi Dental Journal,* 2004; 16: 113-117.
15. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials. Advantages and limitations. *J Dent.* 1994; 2: 6-11.
16. Sidhu SK, Schmalz G. The biocompatibility of glass ionomer cement materials. A status report for the African Journal of Dentistry. *Am. J. Dent.* 2001; 14: 387-396.
17. Pourabbas R, Chitsazi MT, Kosarieh E, Olyae P. Coronally advanced flap in combination with acellular dermal matrix with or without enamel matrix derivatives for root coverage. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(3): 320-5.
18. Raffaelli L, Rossi Iommetti P, Piccioni E, et al. 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.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55-63.
20. Huang FM, Tai KW, Chou My, Chang YC. Resinous perforation-repair materials inhibit the growth, attachment, and proliferation of human gingival fibroblasts. *J. Endod.* 2002; 28: 291-294.
21. Al-Sabek F, Shostad S, Kirkwood KL. Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer Geristore. *J. Endod.* 2005; 31: 205-208.
22. Camp MA, Jeansonne BG, Lallier T. Adhesion of human fibroblasts to root-and-filling materials. *J. Endod.* 2003; 29: 602-607.