مقایسه آثار سمیت سلولی و التهابی چهار عامل اتصال‌دهنده بر سلول‌های فیبروبلاست L929 موش[□]

دکتر زهرا جابری انصاری[*]، دکتر ماندانا ستاری[**]، دکتر آناهیتا ترابی[***]

چکیده

سابقه و هدف: *حفظ وایتالیتی پالپ به هنگام بازشدگی مکانیکی حین اعمال ترمیمی یا در دندانهای ضربه خورده، در دندانپزشکی ترمیمی همواره مورد توجه بوده است. در دندان‌های بدون علامت اگر اکسپوژر کوچک بوده و در محیط غیرآلوده به بزاق صورت گرفته باشد، می‌توان عمل پوشش مستقیم پالپی را انجام داد. ماده پوشاننده مورد استفاده باید از سازگاری بافتی بالا یی برخوردار بوده و برای بافت‌های مجاور محرک نباشد. هدف از انجام این تحقیق مقایسه سمیت سلولی و التهابی چهار عامل اتصال دهنده بر سلول فیبروبلاست L929 موش می‌باشد.*

مواد و روشها: *در این تحقیق تجربی، پس از کشت و پاساژ سلول‌های مورد نظر و اثر دادن چهار عامل اتصال دهنده بر روی آنها، میزان سمیت سلولی برای سلول‌های ذکر شده در مقاطع زمانی ۱ و ۲۴ و ۷ روز پس از کشت با روش MTT محاسبه شد. هم‌چنین تأثیر مواد مورد مطالعه در میزان تولید IL-6 پس از گذشت ۲۴ ساعت توسط ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. اطلاعات به دست آمده توسط آزمون‌های Kruskal Wallis و Mann Whitney U بررسی شدند.*

یافته‌ها: *بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر سمیت سلولی پس از گذشت ۱ ساعت و ۲۴ ساعت اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۱ و P=۰/۰۲۹) ولی پس از گذشت ۷ روز هیچ اختلاف آماری معنی‌داری بین گروههای مطالعه مشاهده نشد. همچنین در میزان تولید IL-6 از سلولها، بین گروههای مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت.*

نتیجه‌گیری: *در این تحقیق میزان سمیت سلولی i Bond از مواد دیگر مورد آزمایش کمتر بود. همهٔ گروهها قادر به القای ترشح IL-6 از فیبروبلاست‌ها بودند.*

کلید واژگان: *عامل اتصال دهنده، فیبروبلاست، IL - 6*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۹/۸ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۳/۸ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸٤/۳/۲۱

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۸٦، ۱٦٦-۱٦۲

مقدمه

حفظ وایتالیتی پالپ به هنگام اکسپوژر مکانیکی حین ترمیم یا در دندانهای ضربه خورده در دندانپزشکی ترمیمی همواره مورد توجه بوده است. از بین مواد حفاظت کننده در موارد بازشدگی پالپی، کلسیم هیدروکساید انتخاب اول می‌باشد. اما این ماده زیر مواد ترمیمی نرم و حل می‌شود(۱). انقباض حین سخت شدن کامپازیت رزین‌ها هم می‌تواند باعث جدا شدن کلسیم هیدروکساید از سطح عاج شده و درزی بین این دو سطح ایجاد کند(۲). اسید اچ هم می‌تواند سمان را تجزیه کند(۳). همچنین در پل‌های عاجی شکل گرفته زیر کلسیم هیدروکساید، نقایص مجاری مانندی یافت شده است که سیل پیوسته‌ای را ایجاد نکرده در نتیجه ممکن است باعث نشت باکتری‌ها شود(٤). در سال‌های اخیر پیشنهاد استفاده از مواد اتصال دهنده جهت پوشش پالپی مستقیم و غیرمستقیم مطرح شده است.

منطقی که پشت این عقیده نهفته است مبتنی بر فراهم شدن سیل دائمی در برابر تهاجم باکتری‌ها و افزایش التیام پالپی است. نتایج حاصل از پوشش پالپ با مواد اتصال دهنده بسیار در تناقض است. از آنجایی که عامل اتصال دهنده در

□ طرح مصوب مرکز تحقیقات دندانپزشکی

[*]نویسنده مسئول: استادیار گروه دندانپزشکی ترمیمی، مرکز تحقیقات دندانپزشکی و دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
E-mail:zjansari@dent.sbmu.ac.ir

[**]دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

[***]استادیار گروه دندانپزشکی ترمیمی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان.

Archive of SID

www.SID.ir

پوشش مستقیم پالپی در تماس با پالپ دندان می‌باشد، مونومرهای واکنش نیافته و سایر اجزای آنها می‌توانند در ترمیم و روند پیشرفت بیماری پالپ نقش مهمی را ایفا کنند. از سوی دیگر بافت پالپی واجد انواع متعددی از سلولهای ایمنی، خونی، ترمیمی و . . . می‌باشد. فیبروبلاست‌ها بیشترین سلول‌های بافت همبندی بوده و توانایی ساختن و نگهداری ماتریکس همبندی را دارا بوده، نقش کلیدی در مراحل ترمیم دارند.

تحقیقات در مورد خواص مواد اتصال دهنده و سمیت سلولی و واکنش التهابی آنها بسیار است اما نتایج به دست آمده بسیار متناقض هستند. لذا در این تحقیق از دو عامل اتصال دهنده توتال اچ یعنی One Step Plus (با پایه استون) و Excite (با پایه الکل) و دو عامل اتصال دهندهٔ سلف اچ یعنی SE Bond و i Bond (تک قسمتی) جهت بررسی و مقایسهٔ اثرات سمیت سلولی و التهابی آنها بر روی فیبروبلاست L929 موش استفاده شده است.

مواد و روشها

در مطالعه حاضر که به صورت تجربی آزمایشگاهی انجام شد، مواد مورد استفاده عبارت بودند از: i Bond، Excite، SE Bond و One Step Plus (جدول ۱).

جهت آماده‌سازی مواد ابتدا لوله‌های موئینه به طول‌های مساوی ۵mm برش داده شدند و پس از مغروق‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر، با اتوکلاو استریل شدند. مواد مورد مطالعه در شرایطی کاملاً استریل و در زیر هود درون هر یک از لوله‌ها قرار داده شده، طبق دستور کارخانه سازنده سخت گردیدند. جهت تهیه نمونه‌های کنترل منفی از لولهٔ موئینه خالی و جهت تهیه نمونه‌های کنترل مثبت از آب مقطر استفاده شد. به این طریق که حجم سوسپانسیون سلولی به جای محیط کشت با آب مقطر به ۱ میلی‌متر رسانده شد. برای هر یک از مواد مورد مطالعه، ۱۰ لوله هماتوکریت در نظر گرفته شد.

نمونه‌های فیبروبلاست موش ردهٔ سلولی L929 NCBI 161 از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. ابتدا سلول‌ها از وضعیت منجمد خارج شده و با محیط CMC در فلاسک‌های مخصوص، کشت داده شدند. در این مطالعه از passage چهارم به بعد سلول‌ها استفاده شد. پس از اطمینان از حیات سلولی، ۳×۱۰^{۵} عدد سلول درون هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای (Nunc، دانمارک) قرار داده شده، حجم آن با محیط کشت کامل یعنی RPMI (Gibco، اسکاتلند) ۱۰٪ FBS (Gibco، اسکاتلند) جهت تغذیه سلولها + پنی‌سیلین ۱۰۰U/ml استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml (Sigma، میسوری، آمریکا) جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها به یک میلی‌متر رسانیده شد. سپس نمونه‌های تهیه شده تحت شرایط استریل در مجاورت سلول‌ها قرار گرفتند. آنگاه پلیت‌های مذکور درون انکوباتور با حرارت ۳۷ °C، رطوبت ۹۵٪ و Co_2 ۵٪ قرار داده شدند. تست سمیت سلولی پس از ۱ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷ روز با استفاده از آزمون MTT انجام شد. برای بررسی واکنش التهابی هم از سوپ سلولی ۲۴ ساعته استفاده شد. برای این کار محلول رویی محیط کشت، جمع‌آوری شده و درون میکروتیوب‌های مخصوص (Nunc، دانمارک) نگهداری شد. میکروتیوب‌ها تا زمان انجام آزمایش در (۲۰°C–) فریز شدند.

انجام تست MTT: برای این کار از ۵mg/ml رنگ در بافر فسفات نمکی (PBS) استفاده شد. پس از حل شدن رنگ MTT (Merk, Darmstadt، آلمان) در PBS، توسط فیلتر ۰/۲ میکرونی، عمل فیلتراسیون صورت گرفت. سپس رنگ MTT به میزان ۱/۱۰ حجم محیط کشت (۱۰۰µl) به سوسپانسیون سلولی درون هر چاهک افزوده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور با حرارت ۳۷ °C، رطوبت ۹۵٪ و

جدول ۱- اجزا، اصلی مواد اتصال دهندهٔ مورد استفاده در این تحقیق

کارخانه سازنده	اجزای تشکیل دهندهٔ اصلی	ماده اتصال دهنده
Heraeus Kulzer, South Bend, USA	UDMA, 4-META, HEMA، استون و آب و گلوتارآلدئید	i Bond
Ivoclar Vivadent, Schaan/ Lichtenstein	فسفونیک اسیدآکریلات، HEMA، دی متاکریلات و اتانول	Excite
Bisco – INC, Schaumburg, USA	استون، Bis – GMA، HEMA و BPDM	One Step Plus
Kurary America, New York, USA	الکل، HEMA، Bis – GMA و MDP	Clearfil SE Bond

www.SID.ir

و Co_2 ۵٪ قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان مورد نظر، جهت تعیین شدت رنگ آبی ابتدا محلول رویی هر چاهک خارج شده و ۴۰۰λ ایزوپروپانول اسیدی به هر چاهک اضافه شد. در نهایت از هر چاهک ۱۰۰λ برداشته شد و به پلیت مخصوص قرائت الیزا منتقل شد. در طول موج ۵۳۰nm توسط دستگاه ELISA میزان دانسیته نوری (OD) قرائت شده بدست آمد.

روش اندازه‌گیری سایتوکاین: برای بررسی واکنش التهابی از کیت IL-6 (Bender Med System، اتریش) استفاده شد. هر چاهک پلیت الیزا توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IL-6 پوشیده شد.استانداردها و نمونه‌هایی که احتمالاً حاوی IL-6 بودند به هر چاهک اضافه شد. سپس آنتی‌بادی ضد IL-6 کونژوگه شده با بیوتین افزوده شده و برای مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. عمل شستشو جهت خارج کردن ترکیبات باند نشده انجام گرفت. سپس استرپتاویدین – HRP جهت اتصال با بیوتین کنژوگهٔ باند شده به IL-6 اضافه شد. پس از انکوباسیون یک ساعته در دمای اتاق مراحل شستشو انجام گردید. جذب رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۵۰nm قرائت شد. رنگ ایجاد شده با غلظت IL-6 نسبت مستقیم دارد.

از آزمون‌های Kruskal Wallis و Mann – Whitney U برای مقایسه تفاوت بین سمیت سلولی مواد مورد مطالعه استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار سمیت سلولی مواد مورد مطالعه پس از ۱ و ۲۴ ساعت و ۷ روز مواجهه با محیط کشت در جدول ۱ آمده است (جدول ۱).

میانگین و انحراف معیار IL-6 تولید شده از سلول‌های فیبروبلاست به ترتیب برای i Bond، Excite، One Step Plus و SE Bond به صورت ۰/۰۰۵±۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵±۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۶±۰/۰۵۳ و ۰/۰۰۵±۰/۰۵۰ بدست آمد. با استفاده از آزمون Kruskal Wallis مشخص شد که بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر سمیت سلولی پس از گذشت ۱ ساعت و ۲۴ ساعت، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۲۹)، ولی پس از گذشت ۷ روز هیچ اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. در مقایسه دو به دو گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون Mann – Whitney U مشخص شد که i Bond پس از ۱ ساعت و ۲۴ ساعت سمیت سلولی کمتری در مقایسه با سایر مواد مورد مطالعه داشت و این اختلاف معنی‌دار بود. هم‌چنین در میزان تولید IL-6 از سلول‌های فیبروبلاست بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۰۶۳).

بحث

در این تحقیق جهت ارزیابی و مقایسهٔ سمیت سلولی و واکنش التهابی از چهار مادهٔ اتصال دهنده روی سلول‌های فیبروبلاست L929 موش در سه زمان مختلف استفاده شد. از نسل پنجم یا همان سیستم‌های توتال اچ، Excite و One Step Plus انتخاب شدند. از سیستم‌های سلف اچ هم i Bond (تک قسمتی- نسل هفتم) و SE Bond (دوقسمتی- نسل ششم) انتخاب شدند. جهت ارزیابی سمیت سلولی از سلول‌های مختلفی استفاده می‌شود. از آنجا که فیبروبلاست، بیشترین سلولی است که در پالپ دندان وجود دارد و پاسخ‌های آن در محیط آزمایشگاهی قابل تعمیم به محیط بدن می‌باشد، در این تحقیق از سلولهای فیبروبلاست L929 موش استفاده شد. دلیل انتخاب این ردهٔ سلولی، شباهت به

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار سمیت سلولی مواد مورد مطالعه در زمان‌های مورد نظر

زمان / مواد مورد آزمایش	یک ساعت	۲۴ ساعت	۷ روز
i Bond	۰/۱۹۱ ± ۰/۰۳۶	۰/۲۷ ± ۰/۱۴۳	۰/۱۸۳ ± ۰/۰۲۶
Excite	۰/۱۳۹ ± ۰/۰۱۶	۰/۱۵۷ ± ۰/۰۳۱	۰/۱۵۷ ± ۰/۰۳۱
One Step	۰/۱۳۷ ± ۰/۰۱۵	۰/۱۶۴ ± ۰/۰۵۶	۰/۱۷۹ ± ۰/۰۳۲
SE Bond	۰/۱۳۷ ± ۰/۰۱۵	۰/۲۱۰ ± ۰/۱۶۲	۰/۱۷۴ ± ۰/۰۳۰

Archive of SID
www.SID.ir

مدل انسانی و دسترسی راحت آن بود. جهت ارزیابی اثرات سمیت سلولی، سه زمان مختلف ۱ ساعت جهت واکنش‌های فوری، ۲٤ ساعت جهت واکنش‌های حاد و ۷ روز جهت واکنش‌های مزمن مد نظر قرار گرفت.

گر چه IL-1 و IL-6 و IL-8 از مهم‌ترین اجزاء سایتوکاین‌های دخیل در واکنش‌های التهاب پالپ و پری‌اپیکال می‌باشند ولی به دلیل داشتن اثر سینرژیستیک IL-6 روی IL-1 و ردیابی راحت‌تر این سایتوکاین در محیط کشت و هم‌چنین نیاز به وسایل و کیت ساده‌تر در مقایسه با سایر سایتوکاین‌ها، معیار ارزیابی اثرات التهابی بر میزان تولید IL-6 گذاشته شد. از آنجا که مواد اتصال دهنده در حین دورهٔ سخت شدن و پا پس از آن به دنبال هیدرولیز جزء رزینی، از خود مونومر آزاد می‌کنند(۵)، ارزیابی اثرات سمیت سلولی مونومرهای نشت پیدا کرده حائز اهمیت است. نشت مونومرها حین سخت شدن به درجهٔ تبدیل الیگومرها حین پلیمریزاسیون بر می‌گردد. لذا فعال‌سازی نوری کافی باعث کاهش آزادسازی مونومرها در محیط کشت می‌شود.

با توجه به آنکه مواد اتصال‌دهنده حاوی اجزای گوناگون با سمیت سلولی متفاوت می‌باشند، دانستن اثر سمیت سلولی هر یک از اجزاء ضروی به نظر می‌رسد. Geurtsen و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش دادند که Bis-GMA و UDMA برای سلولهای فیبروبلاست بسیار سمی می‌باشند، در حالی که کامفورکینون و HEMA سمیت نسبی دارند(٦).

از آنجا که غلظت هر یک از این مواد در میزان سمیت سلولی آنها موثر است، لذا اکثر تحقیقات انجام شده در این زمینه، به بررسی میزان سمیت سلولی مواد براساس غلظت‌های مختلف آنها اختصاص داده شده است. Rathanasathien و همکاران در سال ۱۹۵۵، میزان TC50 (غلظتی از ماده که به میزان ۵۰٪ باعث القای مرگ سلولی می‌شود) را برای Bis-GMA و UDMA و TEGDMA و HEMA اعلام نمودند. آنها در مقالهٔ خود ترتیب سمیت سلولی مواد را براساس TC50 به صورت: EMA، TEGDMA، UDMA و Bis-GMA بیان کردند(۷).

باندینگ‌ها حاوی اجزای گوناگونی از مونومرها می‌باشند، بنابراین ممکن است این اجزاء بر روی یکدیگر اثرات آنتاگونیسم یا سینرژیسم داشته باشند. Wataha و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثرات ترکیبات دوتایی مونومرها را به صورت آنتاگونیستی، سینرژیستی و افزایشی ساده مورد بررسی قرار دادند(۷). وقوع هر یک از این حالات بستگی به دوز هر یک از دو مونومر دارد. برای مثال، ترکیب HEMA و Bis-GMA در غلظت‌های پائین Bis-GMA اثر آنتاگونیستی با HEMA داشته در حالی که غلظت‌های بالای Bis-GMA اثر سینرژیسم با HEMA دارد. می‌توان چنین بیان نمود که چون HEMA، مولکولی هیدروفیل و کوچک با وزن مولکولی کم و حلالیت بالا می‌باشد، حرکت مونومرهای هیدروفوبی نظیر UDMA و Bis-GMA را تسهیل می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد سمیت سلولی مونومرهای هیدروفوب در حضور HEMA در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌یابد(۸). براساس یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، سمیت سلولی i Bond Gluma Inside، پس از گذشت ۱ ساعت و ۲٤ ساعت از بقیه گروه‌ها به طور معنی‌داری کمتر بود. برطبق ادعای کارخانه سازنده اجزاء اصلی تشکیل دهندهٔ i Bond شامل 4-META، گلوتارآلدئید، آب، UDMA و HEMA می‌باشد.

Felton و همکاران در سال ۱۹۸۹ چنین گزارش کردند که گلوتارآلدئید موجود در گلوما، آسیب اولیهٔ خیلی کمی به پالپ وارد می‌کند و پس از گذشت ۹ روز، عاج ترمیمی وسیعی مجاور پالپ تشکیل می‌شود(۹).

با توجه به مشابهت ساختمانی i Bond و گلوما از جنبهٔ گلوتارآلدئید می‌توان سمیت کمتر i Bond را تا حدی به محتوای گلوتارآلدئید آن نسبت داد. Imaisumi و همکاران در سال ۲۰۰٤ در ارزیابی غلظتهای مختلف مادهٔ اتصال دهندهٔ Super Bond C & B که محتوی 4- META می‌باشد، نشان دادند که این رزین روی نسبت سلول‌های مرده به زنده بی‌تأثیر است(۱۰). به این ترتیب، این مطالعه نیز می‌تواند تا حدی در تأیید نتایج حاصل از تحقیق حاضر مبنی بر سمیت سلولی کمتر i Bond (محتوی 4-META) باشد. احتمالاً حضور میزان قابل ملاحظه‌ای از آب در i Bond که به راحتی هم تبخیر نمی‌شود، غلظت عوامل سمی را در مجموعهٔ نمونه‌های این گروه در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش می‌دهد. حال آنکه حلال‌های سه گروه دیگر به

Archive of SID
www.SID.ir

سرعت تبخیر و غلظت عوامل ذکر شده را افزایش می‌دهند. همچنین عدم حضور Bis–GMA در i Bond در مقایسه با سایر گروه‌ها احتمالاً می‌تواند دلیلی دیگر برای کمتر بودن سمیت سلولی این ماده محسوب شود.

در ارزیابی واکنش التهابی در تحقیق حاضر، مشخص شد که تمام مواد مورد مطالعه باعث تحریک ترشح اینترلوکین شدند و میزان تولید IL–6 میان چهار گروه مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. Rakich و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثر مونومرهای HEMA و Bis–GMA و UDMA و META -4 را روی واسطه‌های التهابی IL–1β و TNF–α از ماکروفاژها مورد بررسی قرار دادند(۱۱). تنها META -4 به میزان کمی باعث تحریک ترشح IL–1B شد. یافته‌های آنها با نتایج مطالعه حاضر دارای تفاوت‌هایی است که احتمالاً به دلیل تفاوت در سایتوکاین مورد بررسی و همچنین نوع سلولها و روش کار می‌باشد. حتی اگر خطر سمیت سلولی مواد هم مورد قبول واقع شود، احتمال بروز سایر انواع واکنش‌های محرک نظیر ازدیاد حساسیت، فعال‌سازی کمپلمان، تغییر تفسیر ژنی در سلول‌ها و . . . را هم باید مورد بررسی قرار داد. بنابراین برای آگاهی کامل از اینکه کدام مادهٔ اتصال دهنده، سازگاری بیولوژیک بهتری با محیط بدن دارد نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

به طور خلاصه مواد اتصال دهندهٔ قادر به آزادسازی مداوم اجزاء مونومری خویش هنگام مواجهه با محیط آبی می‌باشند که احتمالاً باعث واکنش سایتوتوکسیک و تحریک پالپی می‌گردد. سمیت سلولی این مواد بسته به نوع ماده و بخصوص کیفیت اجزاء نشت پیدا کرده از آن متفاوت است. لذا پلیمریزاسیون بهینهٔ برای این مواد لازم است و تا حد امکان باید میزان اجزاء نشت یابنده را کم کرد یا در صورت امکان آنها را با اجزایی با سمیت سلولی کمتر جایگزین نمود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که i Bond از لحاظ سمیت سلولی به مراتب بهتر از سایر مواد مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. در عین حال این ماده باعث القای تولید IL–6 به عنوان یک سایتوکاین التهابی مهم می‌شود که شاید اثرات سمی آن را کاهش دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات اساتید گرانقدر، جناب آقایان دکتر بهنام اسلامی، دکتر حسن ترابزاده، دکتر امیر قاسمی، دکتر فرهاد شفیعی و سعید خلیلی که در اجرای این تحقیق نهایت همکاری و مساعدت را مبذول داشتند، نهایت سپاس و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Pereia JC: Clinical evaluation of Dycal under amalgam restorations. Am J Dent 1990;3:67-70.
2. Goracci G: Scanning electron microscopic evaluation of resin – dentin and calcium hydroxide – dentin interface with resin composite restorations. Quintssence Int 1996;27:129-135.
3. McComb D: Comparison of physical properties of commercial calcium hydroxide lining cements. J Am Dent Assoc 1983;107:610-613.
4. Cox CF: Reparative dentin: factors affecting its deposition. Quintessence Int 1992;23:257-270.
5. Ferracan JL: Elution of leachable components from composites. J Oral Rehabil 1994;21:441-452.
6. Geurtsen W: Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res 1998;41:474-480.
7. Ratanasathien S, Wataha JC: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 1995;74:1602-6.
8. Hanks CT, Wataha JC: In vitro models of biocompatibility. A review. Dent Mater 1996;12:186-93.
9. Felton D, Cox CF: Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. J Dent Res 1989;68:491-495.
10. Imaizumi N: Effects of an adhesive resin on pulp cell viability. IADR 82nd General Session Hawaii. 2004;11-13.
11. Rakich DR: Effects of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. J Endod 1999;25:114-117.

Archive of SID
www.SID.ir