

Reakcija zubne pulpe na izravno prekrivanje kolagenom bioresorbirajućom membranom

Teuta Maršan¹
Goranka Prpić-Mehićić¹
Ivana Karlović¹
Branko Šoštarčić²
Ivica Anić¹
Zoran Karlović¹

¹Zavod za bolesti zuba
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
²Veterinarski institut, Zagreb

Sažetak

Ispitalo se je djelovanje kolagena na zubnu pulpu i njegova moguća uporaba u dentalnoj patologiji. Pokusi su izvedeni na psima mješancima. Oni su bili anestezirani, a zubi izolirani gumenom plahticom. S bukalne su strane na dva gornja i donja sjekutića svih životinja izrađeni klasični kaviteti petoga razreda i trepanirana je pulpna komorica. U jednoj je skupini zuba na pulpnu ranu stavljena bioresorbirajuća kolagena membrana, u drugoj sterilni teflonski disk, a u trećoj su kaviteti zatvoreni samo Ketac-Silver cementom. Kaviteti su u prvim dvjema skupinama trajno zatvoreni Ketac-Silver cementom. Nakon šest tjedana zubi su izvađeni i priređeni za histološku obradbu. Histološka slika pripravka tretiranih samim Ketac-Silver cementom pokazala je potpunu nekrozu tkiva, a građa pulpe histološki se nije dala razaznati. Od osam pripravaka tretiranih teflonskim diskovima dva su pokazala potpunu nekrozu, a na šest se vidio djelomičan gubitak morfološke građe. Na pripravcima tretiranim kolagenim bioresorbirajućim membranama pulpno je tkivo u većoj mjeri sačuvalo vitalitet i morfologiju. Opažena je pojačana prokrvljenost i porast broja krvožilnih elemenata. Ni na jednom se pripravku nije opazilo stvaranje dentinskoga reparatornog mosta.

Ključne riječi: kolagena bioresorbirajuća membrana, zubna pulpa, odontoplasti, dentinski reparatorni most.

Acta Stomat Croat
2003; 51-57

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 6. lipnja 2002.

Adresa za dopisivanje:

Ivica Anić
Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb
Fax: +38514802159
E-mail: ivica.anic1@zg.tel.hr

Uvod

Jedno od osnovnih načela u kliničkoj stomatologiji jest sačuvati vitalnost zuba kada god je to moguće. Nastane li oštećenje zubne pulpe i ona se izloži, stomatolog mora izabrati odgovarajući postupak kojim će sačuvati njezinu vitalnost (1). Prigodom takva postupka nastoji se postići cijeljenje pulpe

i stvaranje reparatornoga dentinskoga mosta iznad pulpne rane (2). Najčešće rabljen materijal za izravno prekrivanje pulpe jest kalcij-hidroksid.

No pri uporabi toga materijala na žalost ponekad bude i određenih nuspojava kao što je stvaranje nekrotičnih, te akutnih ili kroničnih upalnih područja, te distrofičnih kalcifikacija u pulpi (3). Kalcij-hidroksid kaustično djeluje na pulpu izazivajući

nekrozu njezina površnog sloja (4), a jedan od najvećih nedostataka toga materijala jest i mogući nastanak internih resorpcija korijena nakon izravnoga prekrivanja. Danas se zna da dentinski reparatorni most ne nastaje samo ispod kalcij-hidroksida nego i ispod drugih materijala za izravno prekrivanje pulpe (5). Kolagen ima hemostatička svojstva i izaziva agregaciju trombocita, te pospješuje stvaranje fibrinskoga ugruška i cijeljenje tkiva (6). Dokazano je kemotaktičan za fibroblaste i uvjetuje njihovu migraciju i slaganje unutar svoje mrežaste strukture (7). Takva bi svojstva mogla pospješiti migraciju stanica između kolagena i pulpne rane te tako olakšati cijeljenje pulpno-g tkiva. Kolagen potiče mineralizaciju tkiva i utječe na prostorni raspored kristala hidroksiapatita koji se slažu unutar mrežaste kolagene matrice, iako o samome mehanizmu još uvijek nemamo sve spoznaje. Prednosti su kolagene bioresorbirajuće membrane što se njome lako rukuje i jednostavno postavlja na pulpnu ranu, te što je biorazgradiva, a to ne zahtijeva poseban operativni zahvat kako bi se uklonila membrana. Kolagen je prirodni protein i humani enzimi ga razgrađuju u aminokiseline. U ovome istraživanju rabljena je kolagena bioresorbirajuća membrana kao sredstvo za izravno prekrivanje prigodom čega se je ispitivalo njezino djelovanje na zubnu pulpu.

Materijali i postupci

Klinički dio eksperimenta

Za eksperiment je uzeto šest zdravih pasa mješancu muškoga spola, u prosjeku teških oko 20 kg, starih 2 godine. Prije eksperimenta svi su psi veterinarski pregledani. Anestezirani su s medetomidin-hidrokloridom (38 µg po kg tjelesne težine) i ketamin-hidrokloridom (3 mg po kg tjelesne težine), te je po potrebi dodavana dodatna količina anestetika. Za vrijeme zahvata usta životinja držana su otvorena držačem čeljusti na strani suprotnoj od radne. Na obrađivane zube postavljena je gumena platicica (engl: rubber dam), a zatim su očišćeni 2,5%-tnom otopinom natrij-hipoklorita.

Na dva gornja i dva donja sjekutića, s bukalne strane, pola milimetra iznad marginalne gingive, okruglim dijamantnim svrdlom umetnutim na visokoturažnu vrtaljku izrađeni su klasični kaviteti petoga razreda, veličine 2x2 mm. Odgovarajuće mjesto

izradbe kaviteta izabrano je zbog smještaja zubne pulpe i jednostavnosti pristupa.

Čeličnim svrdlima br. 1/2 umetnutima na niskoturažnu vrtaljku, uz vodeno hlađenje, u istim kavitetima je trepanirana pulpna komorica. Pulpna rana ispirala se je s 10 ccm destilirane fiziološke otopine do potpunoga prestanka krvarenja. Nakon toga su kaviteti lagano posušeni stlačenim zrakom.

Psi su podijeljeni u tri skupine po dva psa.

- Prvoj skupini pasa na pulpnu je ranu postavljen sterilizirani teflonski disk promjera 1 mm, a kaviteti su zatvoreni Ketac-Silver Aplicap staklenoionomernim cementom (ESPE, Dental-Medizin GmbH&Co. KG D-82229 Seefeld).
- Drugoj skupini pasa na pulpnu je ranu postavljena bioresorbirajuća kolagena membrana BIO-GIDE (ED.GEISTLICH SOHNE AG CH-6110 WOLHUSEN, Švicarska) veličine 1x1 mm. Konfekcijska BIO-GIDE bioresorbirajuća kolagena membrana ima veličinu 25 x 25 mm, a manji su se komadi izrezivali sterilnim škarićama. Kaviteti su zatvoreni Ketac-Silver staklenoionomernim cementom.
- Trećoj skupini pasa kaviteti su zatvoreni samo Ketac-Silver staklenoionomernim cementom.

Ispun je na svim zubima ispoliran plamenastim dijamantnim svrdlima umetnutima na visokoturažnu vrtaljku uz hlađenje sterilnom destiliranom vodom kako bi se postigli što vrsniji rubni odnosi i tako smanjila mogućnost naknadne infekcije.

Za buđenje životinja iz opće anestezije rabljen je atipamezol-hidroklorid (38 µg po kg tjelesne težine).

Psi su po skupinama obilježeni s pomoću posebnih medaljica. Za vrijeme pokusa svi su bili pod istim uvjetima, te pod stalnim veterinarskim nadzorom. Nije primijećena nikakva znatnija promjena tjelesne težine ili zdravstvenoga stanja.

Nakon 45 dana psi su ponovno anestezirani prije navedenim postupkom, te su im izvađeni zubi koji su bili rabljeni kao uzorci. Za vađenje zuba rabila su se gornja i donja incizivna kliješta i Beinove poluge za gornje i donje zube. Svi su zubi izvađeni u cijelosti.

Zbog posebnosti zubala u pasa defekt prouzročen vađenjem nije od kliničkoga značenja, pa nijedna životinja nije bila žrtvovana.

Histološka obradba uzoraka

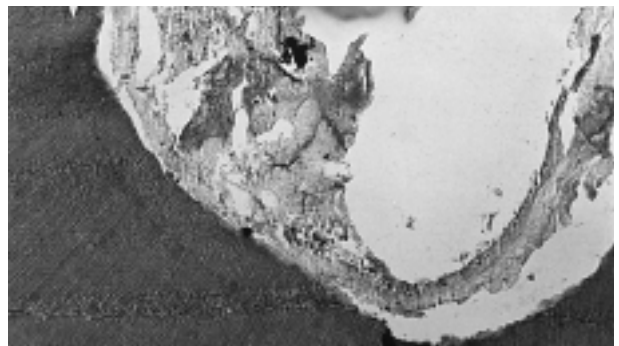
Neposredno nakon vađenja, zubi su fiksirani u 10%-tnom puferiranom formalinu u kojemu je omjer između količine fiksativa i mase zuba bio 1 : 50 u korist fiksativa. Prije toga svakom je zubu malim osteotomom odsječen vršak korijena kako bi se olakšalo prodiranje fiksativa, a samim time i postigla bolja kakvoća fiksacije. Tijekom dvotjednoga postupka dva je puta promijenjen fiksativ, a u prvome tjednu zubi su bili pohranjeni u hladnjaku da bi se moguće postmortalne autolitičke promjene svele na najmanju mjeru. Po završetku fiksacije zubi su bili podvrgnuti postupku demineralizacije. Pri tome je uporabljena posebna tehnika za demineralizaciju zuba mravljom i dušičnom kiselinom, koja je opisana i preporučena u literaturi (8). Tijekom postupka demineralizacijske su se otopine mijenjale svakoga dana, a nakon dva tjedna rendgenski je provjeren stupanj demineralizacije na svim uzorcima. Uzorci su zatim rezani na manje komadiće koji su obuhvaćali ispreparirani kavitet, te zahvaćali 3 - 4 mm koronarno i apikalno od njega. Tako dobiveni uzorci dodatno su demineralizirani tijekom sljedeća tri dana, nakon toga nekoliko sati ispirani u tekućoj vodi, a onda bili refiksirani u 10%-tnom puferiranom formalinu. Nakon završene dodatne fiksacije uzorci su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola i kloroforma, te su nakon toga prožeti parafinom u termostatu i konačno uklopljeni u parafinske blokove. Od tih su blokova na kliznome mikrotomu Reinhart 2000 napravljeni vodoravni rezovi debljine 6 μ koji su potom namontirani na predmetna stakalca, deparafinirani i obojeni hematoxylin-eosinofilnim bojenjem metodom po Harrisu. Jedanput obojeni pripravci prekriveni su s pomoću kanada balzama pokrovnim stakalcima i proučavani pod optičkim mikroskopom pod povećanjem 1000x, 2000x i 4000x. Znatnije promjene fotografirane su pod različitim povećanjima.

Rezultati

Histološka slika preparata tretiranih samo Ketac-Silver cementom

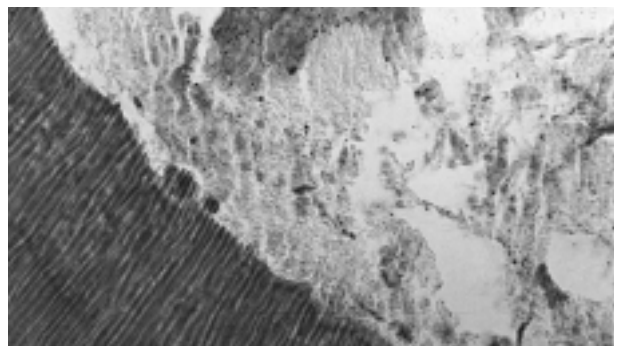
Karakterističan nalaz jest potpuna nekroza zubne pulpe i potpuno nepostojanje odontoblastičnoga sloja, koji se zajedno sa zubnom pulpom slijeva u amorfnu

masu odumrloga tkiva. Neravnomjerni sloj predentina omeđuje pulpnu komoricu u kojoj su vidljivi još samo odumrli ostatci nekad vitalne pulpe. Tamni pigment koji se opaža u pojedinim dijelovima tih pripravaka razbija jednoličnu strukturu odumrloga tkiva, a vjerojatno potječe od ostataka materijala rabljenog za izravno prekrivanje tih uzoraka (Ketac-Silver). Na takvu histološkom nalazu nemoguće je prepoznati bilo kakvu jasnu morfološku strukturu stanice i cijelim nalazom prevladava samo slika postojeće amorfnе mase. Jedino prepoznatljivo tkivo jest dentin, koji se jasno vidi na periferiji pripravka (Slika 1 i 2).



Slika 1. *Histološka slika pripravka zubne pulpe tretirane samo Ketac-Silver cementom. Pulpno je tkivo nekrotično i ne mogu se razaznati pojedini stanični elementi. Tamni pigment u pulpnoj komorici ostatak je Ketac-Silver cementa. HE, x100.*

Figure 1. *Photomicrograph of exposed pulp treated with Ketac-silver cementum. Pulp tissue showing total necrosis with loss of cellular organization. Black pigment in the pulp chamber is probably a remnant of the capping agent. HE, x100.*



Slika 2. *Veće povećanje istoga histološkog pripravka. Jasnije se vidi amorfnа masa u pulpnoj komorici i potpun izostanak svih prepoznatljivih staničnih elemenata. HE, x400.*

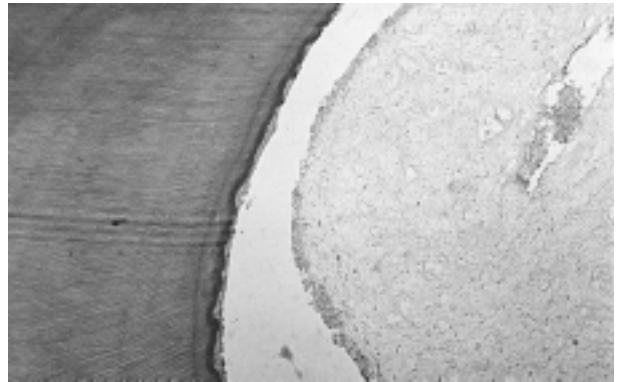
Figure 2. *Higher magnification of the same histological site. There is no presence of any pulpal cells, including the odontoblastic layer. HE, x400.*

Histološka slika uzoraka tretiranih teflonskim diskovima

U pripravcima životinja tretiranih s teflonskim diskovima vidljive su promjene slične onima koje su netom opisane. Ipak u šest od sveukupno osam pripravaka iz te skupine odumrla pulpa zadržava prepoznatljivu unutarnju građu. Iako su morfološke osobine vitalnih stanica nestale, u pulpinu se tkivu ipak opaža njegova temeljna građa. U prilog tome govori pojavljivanje bazofilnih čestica na samoj periferiji pojedinih pripravaka, koje svojim smještajem, te veličinom i oblikom navode na mišljenje da se radi o ostacima još uvijek nepotpuno odumrlih odontoblasta. Premda u središnjim dijelovima uzoraka prevladava amorfnu masu odumrle tkiva, ipak takav nalaz nije apsolutan kao kod pripravaka koji su tretirani samo Ketac-silverom. Preostale strukture, kao što je sloj predentina i sam dentin, pojavljuju se uglavnom na isti način kao i na histološkim nalazima uzoraka iz prethodne skupine (Slika 3 i 4).

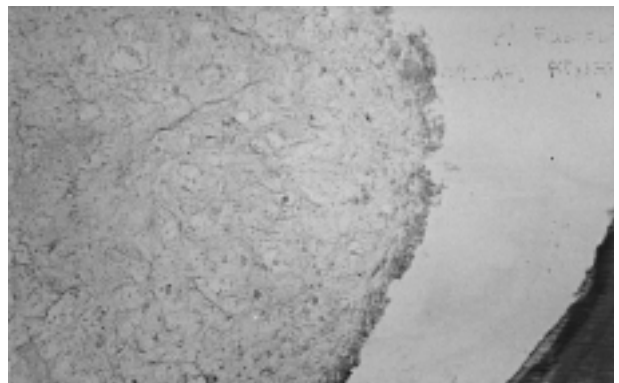
Histološka slika uzoraka tretiranih bioresorbirajućim kolagenim membranama

U pulpnoj komorici nalazi se slobodna veća količina ekstravaziranih vitalnih eritrocita i pulpno tkivo u ranoj fazi odumiranja u pravilu sa svugdje još prepoznatljivim odontoblastima. Općenito je za uzorke iz te skupine tipično da je građa pulpna tkiva razmjerno vrlo dobro sačuvana i da pokazuje tek izrazito rane znakove odumiranja. Gotovo su sve strukture pulpe jasno vidljive i još uvijek se mogu dobro razaznati. Duž cijele periferije pulpne komorice jasno se opaža vrlo izražen sloj odontoblasta koji priliježe uz samu crtu predentina. On je pak vrlo jednoličan i pravilno raspoređen omeđujući pulpnu komoricu, tako da nas neminovno navodi na mišljenje o dosta dugo zadržanom vitalitetu odontoblasta, kojega je predentin izravan proizvod. Za tu je skupinu uzoraka vrlo tipičan nalaz pojavljivanje neobično velike količine vitalnih ekstravaziranih eritrocita i puno krvnih žila, što jasno upućuje na iznimno dobru prokrvljenost tih pripravaka. Uz tako izraženu vaskularizaciju pojavljuje se povećani broj fibroblasta i sklonost prema stvaranju granulacijskoga tkiva. Vrlo velik broj stanica, izrazit i za intaktnu pulpu, neuobičajeno velika prokrvljenost i posebno jasna vidljivost građe tkiva osnovna su svojstva te skupine uzoraka, a ujedno i ono što ju



Slika 3. Histološka slika pripravka zubne pulpe tretirane teflonskim diskom. Vidljiva je nekroza pulpna tkiva, ali i uočljiv sloj bazofilnih čestica na periferiji pulpne komorice. HE, x100.

Figure 3. Exposure site after capping with Teflon disc. Pulp tissue showing necrosis. Note the discontinuous layer of basophilic particles peripherally in the pulp chamber. HE, x100.



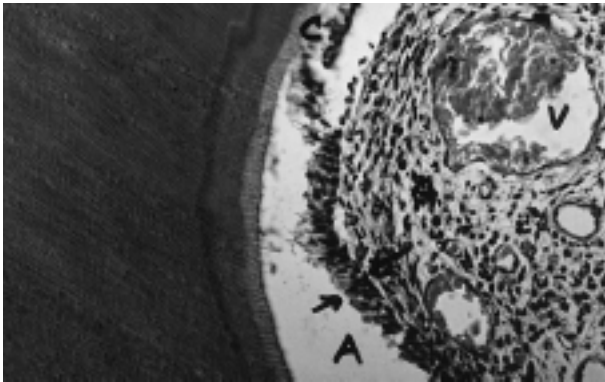
Slika 4. Veće povećanje istoga histološkog pripravka. Osobito je uočljiv sloj bazofilnih čestica na periferiji koje bi po svojem smještaju i obliku mogle biti ostatci odontoblastičnoga sloja. HE, x400.

Figure 4. Higher magnification of the same histological site. The basophilic particles are more visible, and may be a remnant of the odontoblastic layer. HE, x200.

čini jedinstvenom u usporedbi s dvjema prije opisanim (Slika 5, 6 i 7).

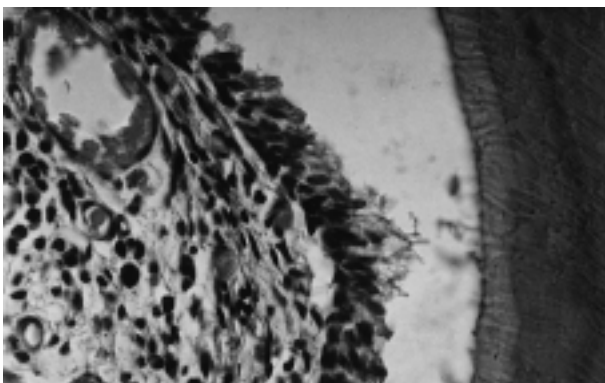
Rasprava

Kolagen je vrlo važan za regulaciju razvoja tkiva i njegova cijeljenja. Različite grane medicine već dugo rabe kolagen u terapijske svrhe. Bimstein i Shoshan (9) su godine 1981. upotrijebili kolagen kao



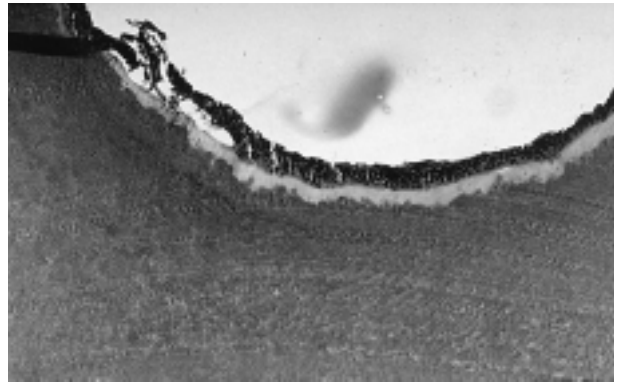
Slika 5. *Histološka slika pulpe tretirane kolagenom bioresorbirajućom membranom. Pulpno je tkivo sačuvalo svoju vitalnost. Odontoblasti periferno u pulpnoj komorici (strelice) i njihova uska povezanost s dentinom (C). Fibroblasti i granulacijsko tkivo (G). U pulpi ima mnogo krvnih žila (V). Prostor između odontoblasta i predentina (A) je artefakt nastao prigodom histološke obradbe uzoraka. HE, x200.*

Figure 5. *Photomicrograph of exposed pulp treated with bioresorbable collagen membrane. Pulp tissue preserved its vitality. Note the layer of odontoblast-like cells peripherally in the pulp chamber (arrows) and its connection with dentine (C). There are many vital fibroblasts in hypervascular granulation tissue (G). Pulp showing dilatation and proliferation of blood vessels (V). Empty space between layer of odontoblast-like cells and preentin (A) is an artifact which appeared during histological preparation. HE, x200.*



Slika 6. *Veće povećanje istoga histološkog pripravka. Osobito su uočljivi krvožilni elementi - krvne žile i eritrociti. Dobro se vidi sloj bazofilnih čestica koje odgovaraju odontoblastima. HE, x400.*

Figure 6. *Higher magnification of the same histological site. Particularly noticeable are blood elements - vessels and erythrocytes - and basophilic cells which correspond to odontoblasts. HE, x400.*



Slika 7. *Opaža se normalan odnos između odontoblastičnoga sloja i predentina te njihova uska povezanost. HE, x200.*

Figure 7. *Normal relation between tubular dentine and odontoblast-like cells: their very close connection. HE, x200.*

sredstvo za izravno prekrivanje zubne pulpe. U razdoblju od mjesec dana pulpe ispitivanih zuba ostale su vitalne i histološki slične pulpi intaktnih zuba. Na svim ispitivanim uzorcima nađen je tanak, novostvoreni dentinski most reparatornoga dentina. U studiji iz godine 1984. slične rezultate dobila je i Fuks sa suradnicima (10). Ona je provela ispitivanje na 25 majmunskih zuba koji su bili podvrgnuti vitalnoj amputaciji i poslije tretirani otopinom kolagena. Dentinske mostove dokazala je u 73% ispitivanih zuba. Takvi su rezultati potaknuli mnoge autore na daljnje ispitivanje toga materijala, no njihovi rezultati gotovo se mahom nisu podudarali s gore navedenim. Rutheford je 1993. (11) godine ispitivao odgovor pulpe na izravno prekrivanje s humanim osteogenim proteinom. Pri tome je za njegovu uporabu kao materijal nosač rabio kolageni matriks. Dok je humani osteogeni protein pokazao dobra svojstva kao materijal za izravno prekrivanje zubne pulpe, kolageni matriks uopće nije potaknuo mineralizaciju niti stvaranje reparatornoga dentina, odnosno dentinskoga mosta. Objašnjenje takvih razlika možemo potražiti u tvrdnji koju je godine 1987. dao Cox (12). Prema autoru, za razvijanje obrambene reakcije traumatizirane zubne pulpe sisavaca prijeko je potreban nekakav podražajni kemijski čimbenik i nije dovoljan sam doticaj s biokompatibilnom nepodražajnom tvari koja će prekriti pulpnu ranu. Razlike između podataka koje su dobili Shoshan i Fuksova s jedne strane, te Rutheford s druge strane, možemo protumačiti činje-

nicom da su Shoshan i Fuksova u oba slučaja rabili obogaćenu otopinu kolagena, poznatu pod nazivom Medij 199. Ta otopina osim kolagena sadržava i neke vitamine, aminokiseline, te ostale nutritivne čimbenike. Moguće je da su upravo te sporedne tvari u njihovim ispitivanjima bili važniji inicijatori pozitivne pulpne reakcije nego sam kolagen.

Ipak, rezultati ovog istraživanja razlikuju se od svih gore navedenih rezultata. Tipično je da kod nijednog uzorka tretiranoga kolagenim bioresorbirajućim membranama nije nastala nekroza tkiva. Primijećena je izrazita, vrlo pojačana vaskularizacija tkiva. Takva je slika u skladu s do sada poznatim svojstvima kolagena i njegovim djelovanjem na tkiva općenito. No u ovim uvjetima kolagen je očito doveo do nastajanja novih krvnih žila, te pojačao ekstravazaciju eritrocita. U ovome radu nismo primijetili nastanak reparatornoga dentina, odnosno dentinskoga mosta. Premda kolagen ima sposobnost da potiče mineralizaciju *in vitro*, ne pokazuje to svojstvo i u *in vivo* uvjetima. Mogući razlog što se reparatorni dentin nije pojavio jest sam pripravak kolagena koji je rabljen. Bioresorbirajuće membrane sadržavale su kolagen tip I i kolagen tip III. Kolagen tip III. nije primijećen u dentinu, i po nekim istraživanjima čak može inhibirati mineralizaciju (13). Zanimljiva je i činjenica da je upravo kolagen tip III. u oko 50% zastupljen u zubnoj pulpi, zajedno sa kolagenom tip I., ali pulpa je meko tkivo i u normalnim uvjetima ne mineralizira.

Iako su postojale sumnje da kolagen može djelovati kao antigen i često su se mogući neuspjesi pripisivali baš tome, danas se rabi posebno obrađeni kolagen i njegova je imunološka aktivnost klinički bez značenja. U kliničkom ispitivanju (14) 13% pacijenata, kod kojih je povećavan alveolarni greben pripravkom kolagena i kalcij-hidroksiapatita, stvorilo je antitijela na goveđi kolagen. Ona nisu bila reaktivna na humani kolagen niti su izazivala bilo kakav tip alergijske reakcije. Temeljem navedenih kliničkih pokazatelja možemo isključiti moguću antigenost kolagena koji se rabi u terapijske svrhe kao uzrok eventualnih neuspjeha.

Kod uzoraka tretiranih teflonskim diskovima nađena je sveobuhvatna nekroza pulpe, što je sukladno rezultatima prijašnjih istraživanja sličnih materijala za izravno prekrivanje pulpe (15-20). Činjenica je da izostanak kemijskoga podražaja umanjuje pozitivan odgovor pulpe na traumu i da se

ne stvara dentinski most. U najboljem slučaju pulpna se rana počinje zatvarati tankom opnom mekoga tkiva, i nastaju veće ili manje naznake pulpna odumiranja (17). Sübay (15) je u svojem ispitivanju kalcij-hidroksiapatita 1993 godine potvrdio da se radi o visoko biokompatibilnom materijalu koji se uspješno, poput kolagena, rabi u parodontologiji i u oralnoj kirurgiji, ali nema dentinogenetsku aktivnost koja bi bila klinički važna. To je potvrdilo rezultate ispitivanja Jabera (17) iz godine 1991. i Stanleya (19) iz 1989.

Za razliku od gore navedenih, materijali koji na neki način kemijski podražuju pulpno tkivo u mnogobrojnim su istraživanjima davali mnogo bolje rezultate kao sredstva za izravno prekrivanje. Premda sam mehanizam odontoblastičnoga pokretanja na proizvodnju reparatornog dentina do danas još uvijek nije dovoljno poznat, ipak je činjenica da tomu procesu pogoduje inicijalna kemijska iritacija.

Zaključak

Iz rezultata dobivenih u ovoj studiji možemo zaključiti da kolagen, iako visokobiokompatibilan materijal, nije prikladno sredstvo za izravno prekrivanje pulpe. Uzrok ovakvim rezultatima vjerojatno je kemijska inertnost kolagena i nedostatak kemijskoga podražaja na pulpno tkivo, koji je ipak prijeko potreban da pokrene oštećenu pulpu na cijeljenje i stvaranje dentinskoga reparatornog mosta.

Literatura

1. HEYS D.R, FITZGERALD M, HEYS R.J, CHIEGO D. J. Healing of primate dental pulps capped with Teflon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 227-37.
2. SCHUURS AHB, GRUYTHUYSEN RJM, WESSELINK PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide (review). *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 240-50.
3. SASAKI T, KAWAMATA-KIDO H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Archs Oral Biol* 1995; 40: 209-19.
4. RANLY DM, GARCIA-GODOY F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth (review). *J Dent* 2000; 28: 153-61.
5. HEITMANN T, UNTERBRINK G. Direct pulp capping with a dentinal adhesive resin system: A pilot study. *Quintessence Int* 1995; 26: 765-70.

6. WANG HL, O'NEAL RB, THOMAS CL, SHYR Y, MACNEIL RL. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating class II furcation defects. *J Periodontol* 1994; 65: 1029-36.
7. CHEN CC, WANG HL, SMITH F, GLICKMAN GN, SHYR Y, O'NEAL RB. Evaluation of a collagen membrane with and without bone grafts in treating periodontal intra-bony defects. *J Periodontol* 1995; 66: 838-47.
8. LUNA LG. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York, Toronto, London, Sydney: The Blakiston Division McGraw-Hill Book Company, 1979.
9. BIMSTEIN E, SHOSHAN S. Enhanced healing of tooth-pulp wounds in the dog by enriched collagen solution as a capping agent. *Arch Oral Biol* 1981; 26: 97-101.
10. FUKS AB, MICHAELI Y, SOFER-SAKS B, SHOSHAN S. Enriched collagen solution as a pulp dressing in pulp-tomized teeth in monkeys. *Pediatr Dent* 1984; 6: 243-7.
11. RUTHEFORD RB, WAHLE J, TUCKER M, RUEGER D, CHARETTE M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 571-6.
12. COX CF, KEALL CL, KEALL HJ, OSTRO E, BERGEN-HOLTZ G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent* 1987; 57:1-8.
13. GAGE JP, FRANCIS MJO, TRIFFITT JT. Collagen and Dental Matrices. London: Butterworth & Co., 1989.
14. MEHLISCH D. Collagen/hydroxyapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges: a 24-month clinical and histologic summary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 68: 505-12.
15. SÜBAY K, ASCI S. Human pulpal response to hydroxyapatite and calcium hydroxide material as direct capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76: 485-92.
16. HEYS DR, COX CF, HEYS RJ, AVERY JK. Histological considerations of direct pulp capping agents. *J Dent Res* 1981;60:1371-1379.
17. JABER L, MASCRES C, DONOHUE WB. Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxyapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 502-8.
18. JABER L, MASCRES C, DONOHUE WB. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 92-8.
19. STANLEY HR. Pulp capping:Conserving the dental pulp - Can it be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 68: 628-39.
20. PITT FORD TR, TORABINEJAD M, ABEDI HR, BAKLAND LK, KARIYAWASAM SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *JADA* 1996; 127: 1491-4.