مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۵ صفحات ۴۸-۴۵

تاثیر فنی توئین بر توانایی تکثیر فیبروبلاستهای لیگامان پریودنتال و لثه ای در محیط کشت سلولی

دکتر رضا پورعباس: دانشیارگروه پریودنتیکس دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر بهروز نیک نفس:استادیارگروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر عدیله شیرمحمدی: استادیارگروه پریودنتیکس دانشگاه علوم پزشکی تبریز نویسنده رابط
E-mail: shirmohamadia@yahoo.com

چکیده

زمینه واهداف: سلولهای فیبروبلاست پریودنتال لیگامنت(periodontal ligament fibroblast) PDLF دارای نقش کلیدی در روند رژنراسیون پریو دنشیوم می‌باشند، بعلاوه مطالعات نشان می‌دهد که دی فنیل هیدانتوئین(فنی‌توئین) باعث افزایش رشد سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای می‌گردد. چنانچه این تأثیر بر روی سلولهای فیبروبلاست (periodontal ligament) PDL نیز وجود داشته باشد، ممکن است بتوان از آن جهت رژنراسیون بافتهای پریودنتال استفاده کرد. بر این اساس، هدف از این مطالعه مقایسه تأثیر فنی‌توئین بر میزان رشد سلولهای فیبروبلاست لثه وPDL در محیط کشت سلولی می‌باشد.

مواد و روش ها: ۱۰ عدد موش از نژاد Wistar Rat انتخاب شده و نمونه مربوط به لثه از ناحیه بین دنداهای ثنایایی بالا و نمونهٔ مربوط به PDL از ثلث میانی ریشه دندانهای ثنایایی پائین بدست آمد. پس از انتقال نمونه‌ها به محیط کشت مناسب جهت کشت فیبروبلاستهای PDL و لثه‌ای، هرکدام از نمونه‌ها به دو گروه تست و کنترل تقسیم گردیدند. در نمونه‌های گروه تست، فنی‌توئین به غلظت ۲۰mg/ml که در هیدروکسید سدیم حل شده بود افزوده شد. بعد از ٤٨ ساعت پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست توسط کیت پرولیفراسیون سلولی WST-1بروش الیزا مورد سنجش قرارگرفت. میزان پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای و PDL ،دردوگروه تست وکنترل توسطآنالیز Independent –sample T-test مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: تأثیر فنی‌توئین بر میزان تکثیر سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای و سلولهای فیبروبلاستPDL معنی دار می‌باشد.همچنین میزان تکثیر سلولهای PDL در گروه تست نسبت به سلولهای لثه‌ای در گروه تست تفاوت معنی‌داری داشته($P< ۰/۰۰۱$) ودر مورد سلولهای PDL بیشتر است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص گردید که فنی‌توئین در محیط invitro نیز همانند invivo قادر به افزایش پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای بوده و این اثر فنی توئین روی سلولهای فیبروبلاست PDL نیز وجود دارد.

کلیدواژه ها: رژنراسیون پریودنتال، لثه، فنی توئین، فیبروبلاست، پریودنتال لیگامنت

مقدمه

هدف نهایی ازدرمانهای پریودنتال متوقف نمودن تخریب بافتی و بازسازی بافتهای از دست رفته می‌باشد (۱). در فرایند بازسازی بافتهای نگهدارنده دندان، رده‌های مختلف سلولی می‌توانند سهیم باشند. این رده‌ها شامل: سلولهای اپی تلیال لثه، سلولهای بافت همبند لثه، سلولهای بافت همبند لیگامنت پریودنتال (PDL) و سلولهای استخوانی می‌باشند. بر طبق نظریه Melcher در یک زخم پریودنتال، سلولهای با منشا خاص می‌توانند باعث ایجاد نوع بخصوصی از ترمیم شوند (۲).

مطلوبترین حالت زمانی است که سلولهای تجمع یافته در زخم پریودنتال، از منشا بافت همبند پریودنتال لیگامنت باشند. دراین صورت رژنراسیون کامل پریودنتال بصورت New connective tissue attachment حاصل خواهد شد. رژنراسیون هدایت شده بافتی، Guided tissue regeneration (GTR) که توسط Nyman ارائه شد بر همین مبنا بوده و بطریقی از حرکت سلولهای اپی‌تلیالی و بافت همبند لثه به زخم پریودنتال ممانعت کرده و باعث تجمع سلولهای بافت همبند PDL و در نهایت، New connective tissue attachment می‌شود (۳).

روشهای رایج کنونی برای درمانهای رژنراتیو، محدودیتهای زیادی داشته وفاقد نتایج قابل پیش بینی می‌باشد.(٤) لذا جهت بهتر نمودن نتایج حاصل از این روندها محققین مواد و روشهای مختلفی را ارائه نموده‌اند که براساس تحریک رشد، پرولیفراسیون و تمایز سلولی عمل می‌نمایند.

فنی توئین (سدیم دی فنیل هیدانتوئین) اولین بار در سال ۱۹۳۸ بعنوان یک داروی ضد صرع معرفی شد. یکی از اثرات جانبی این ماده هیپرپلازی لثه است که در اثر تشدید تکثیر فیبروبلاستهای لثه و نیز افزایش فعالیت بعضی از زیرگروههای فیبروبلاست (تولید بیش از حد کلاژن) ایجاد می شود. لذا از این خاصیت فنی‌توئین جهت پیشبرد روند ترمیم زخم در طب استفاده گردیده است(۵).اثر فنی‌توئین بر روی تکثیر و عملکرد فیبروبلاستهای لثه در In vitro نیز به اثبات رسیده است(٦). با

توجه به مطالب فوق، اگر فنی‌توئین بتواند باعث تشدید تکثیر فیبروبلاستهای PDL نیز شود، می‌توان از آن در جهت تحریک تکثیر و تجمع سلولهای فیبروبلاست لیگامان پریودنتال در روند GTR بهره گرفت. هدف ازاین مطالعه بررسی تاثیر فنی‌توئین در محیط کشت سلولی بر فیبروبلاستهای لثه و PDL می‌باشد.

مواد و روش ها

نمونه‌ها از ۱۰ عدد موش از نژاد wistar rat ٤ هفته‌ای(با وزن ۱۵۰ گرم) گرفته شدند. ابتدا حیوان بروش Ether inhalation بیهوش شده و بلافاصله با جدا نمودن سر حیوان به زیر هود استریل انتقال یافت. آنگاه با محلول کلرهگزیدین محیط دهان و دندانها تحت شستشو قرار گرفت و با سرم شستشو کلرهگزیدین روی بافت شسته شد. سپس با یک تیغ بیستوری استریل، لثه اینتردنتال بین دندانهای ثنایای بالا برش داده شد و بداخل مدیوم اولیه انتقال یافت. دندانهای ثنایای پایین همراه با استخوان آلوئول از بافتهای سخت و نرم اطراف جدا شدند، آلوئول و دندان با سرم شستشو داده شده و آنگاه توسط تیغ بیستوری دندان از آلوئول مربوطه بآرامی جدا شد و بلافاصله، از ثلث میانی ریشه، باکورت، بیوپسی از PDL برداشته شده و نمونه‌های لثه و PDL به مدیوم انتقال یافت. مدیوم اولیه شامل :

DMEM (Dulbeccos Modifid Eagle Medium)، جنتامایسن سولفات۵۰ mg/ml ،L– گلوتامات، پنی‌سیلین۱۰۰ UNIT/M، استرپتومایسین۱۰۰mg/ml و Fetal calf serum (FCS) ۱۰٪ بود(٦). نمونه‌های تهیه شده در زیر هود استریل خرد شده و در فلاسکهای مخصوص، درانکوباتور حاوی CO_2 با دمای۳۷ درجه سانتیگراد قرا داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت سلولهای کشت داده شده در مدیوم ثانویه که شامل DMEM + آنتی‌بیوتیک+ FCS ۱۰٪ قرار داده شد. در روزهای بعد نمونه‌ها مرتباً از نظر آلودگی و رشد سلولی کنترل شده و در صورت لزوم مدیوم آنها عوض می‌شد. بمحض پخش شدن فیبروبلاستها در سطح فلاسک کشت و پرشدن آنها، سلولها از سطح کشت با تریپسینه(رقت۱/۳ تریپسین ۲/۵٪) کردن جدا می‌شد(٦). بعد از چندین پاساژ و رشد خوب سلولها، نمونه‌ها مجدداً تریپسینه شده و در حجم مشخصی جهت تعیین سلولها در حجم بالام نئوبار شمارش می شدند و براساس شمارش سلولی، تعداد ۲۰۰۰ سلول، در هر خانهٔ پلیت ۹٦ تائی کشت داده می‌شدند. بعد از ۷۲ ساعت خانه‌های کشت به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شده که در خانه‌های آزمایشی فنی‌توئین به میزان۲۰ mg/ml (محلول در هیدروکسید سدیم) افزوده شده و در خانه‌های گروه شاهد به همان میزان هیدروکسید سدیم به همان PH افزوده شد. این امر در هر دو مورد نمونه‌های مربوط به PDL و لثه انجام گرفت. بعد از ٤٨ ساعت ار انکوباسیون دارو، سلولها از دارو شسته شده و با استفاده از کیت پرولیفراسیون سلولی× wst-1[1]، پرولیفراسیون سلولی در هر زیر گروه بروش ELISA اندازه گیری شد.در اینجا لازم به ذکر است، با توجه به محدودیت‌های ذاتی موجود در primary cell culture تعدادی ار نمونه‌های مربوط به PDL در این آزمایش از دست رفتند،بنحوی که در مجموع ۱۰ نمونه مربوط به لثه و ٦ نمونه مربوط به PDL بوده است. بررسی و تحلیلهای آماری: در این تحقیق، اعداد بدست آمده از اندازه‌گیری ELISA، با استفاده از آزمون Kolmogrov-smirnov ابتدا میزان بهنجاری جمعیت سلولهای لثه و PDL آزمون شد و سپس نظر به هنجار بودن این داده‌ها، میزان پرولیفراسیون سلولی در گروه تست با کنترل با استفاده از آنالیز independent-T-test مقایسه و آزمون شد. مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

میزان پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لثه با اضافه نمودن محلول فنی‌توئین به محیط کشت بصورت معنی‌داری افزایش یافت(جدول ۱). همچنین سلولهای فیبروبلاست لیگامان پریودنتال نیز در حضور فنی‌توئین درمحیط کشت سلولی افزایش قابل‌توجهی را در میزان پرولیفراسیون خود داشتند.(جدول۱)

تأثیر فنی‌توئین برپرولیفراسیون سلولهای PDL بیش از لثه می‌باشد($p<۰/۰۰۱$) و لذا در محیطهای کشت سلولی که به مقدار مساوی و تحت شرایط یکسان فنی‌توئین به محیط کشت اضافه شده بود، میزان پرولیفراسیون سلولهای PDL بطورمعنی‌داری بیش از سلولهای لثه‌ای بوده است.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آنست که فنی‌توئین باعث افزایش پرولیفراسیون فیبروبلاستهای لثه در محیط کشت سلولی می‌شود و میزان پرولیفراسیون فیبروبلاستهای لثه‌ای که به مدت ٤٨ ساعت در معرض فنی‌توئین قرار داشتند (گروه آزمایشی) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد($P<۰/۰۵$). این یافته مطابق با یافته حاصل از مطالعه Al-ubaidy و همکاران می‌باشد (۷)، این محققین اثر فنی‌توئین را روی فعالیت میتوتیک فیبروبلاستهای لثه انسان بررسی کرده و نشان دادند که Mitotic index در گروه فنی‌توئین (PHT) بیشتر از کنترل است.

جدول ۱: مقایسه میزان برولیفراسیون فیبروبلاستهای لثه و PDL در گروههای آزمایشی و شاهد (mean±SD)

نوع سلول	شاهد	آزمایشی	P
فیبروبلاست لثه (n=۱۰)	۰/۱۳۹۴۵±۰/۰۱۱۱	۰/۱۲۸۲±۰/۰۱۱۳	<۰/۰۱
فیبرو بلاست PDL	۰/۱۶۵۹±۰/۰۳۳۱	۰/۱۷۸۸۳±۰/۰۷۵۴	<۰/۰۵

1. Wst-1: Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

همچنین یوشیزومی نشان داده بود که فنی‌توئین باعث تحریک رشد فیبروبلاستهای لثه ای گربه در in vitro می‌شود(۸). هر چند برخی محققین بدین نتیجه رسیده‌اند که فنی‌توئین اثری بر روی تحریک رشد فیبروبلاستهای لثه‌ای ندارد. این محققین (Salo و همکاران) فنی توئین(۱۰mg/ml–۵)و نیفیدیپین (۲۰۰mg/ml–۱۰۰) را روی فیبروبلاستها افزوده و نشان دادند که این مواد دارای اثر ویژه‌ای روی کاهش بیشتر پروتئین کل و کلاژن می باشد(۹). همچنین فیبروبلاستهای حاصل از بیماران باافزایش حجم ناشی از مصرف فنی‌توئین افزایش در سنتزگلیکوآمنیو گلیکن سولفاته را در in vitro نشان می‌دهند (۱۰).

در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شده است که کاربرد فنی‌توئین باعث کاهش در تجزیه کلاژن می‌شود که این امر در نتیجه تولید یک کلاژناز فیبروبلاستیک غیرفعال می‌باشد(۱۱).

افزودن فنی توئین به فیبروبلاستهای لثه ،باعث افزایش سطح Translatable collagen mRNA می شود (۱۲). همچنین ماتریکس خارج سلولی تولید شده بوسیله فیبروبلاستهای مشتق ازلثه افزایش حجم یافته(ناشی از مصرف فنی‌توئین) باعث تسهیل Fibroblast spreading می‌شود که اینهم پیش نیاز رشد سلولها می باشد (۱۳).بعلاوه، بررسی مکانیسم اثر فنی توئین بر روی فیبروبلاستهای لثه در یک مطالعه in vitro نشان داده است که این ماده باعث مهار جذب ca_{2+}توسط این سلولها می شودواین امر با سرعت پرولیفراسیون فیبروبلاستها رابطه دارد(۱٤).

در این مطالعه مشخص گردید که اثر فنی‌توئین بر روی پرولیفراسیون سلولهای PDL معنی دار می باشد(p=۰/۰۵). از آنجاییکه مطالعه دیگری درمورد اثر فنی‌توئین بر روی فیبروبلاستهای PDL چه در in vitro و چه در in vivo گزارش نشده، مکانیسم اثر آن روی فیبروبلاستهای PDL مبهم می باشد. معهذا این تحقیق نشان داد که فنی‌توئین موجب افزایش تکثیر سلولهای PDL در in vitro می‌شود. بعلاوه،با توجه به اثر فنی توئین بر روی مهار جذب ca_{2+}توسط فیبروبلاستهای لثه می توان استنباط کرد که این امر در مورد فیبروبلاستهای PDL نیز صدق نماید و فنی توئین با اثر بر روی سیکل سلولی و نیز کانالهای کلسیم بر روی فیبروبلاستهایPDL نیز مؤثر باشد.

البته پرولیفراسیون فیبروبلاستهای PDL نسبت به لثه در مطالعات مختلف سرعت بیشتر نشان داده است . اوگاتا و همکاران کشت سلولهای فیبروبلاست لثه انسانی را در in vitro مورد مقایسه قرار داده و نشان دادند که سلولهای PDL انسانی (HPDL) دارای سرعت بیشتری نسبت به سلولهای لثه‌ای انسان (HGF) می باشند بعلاوه، HPDL نسبت به HGF مقدار بیشتری از c AMP تولید کرده و فعالیت الکالین فسفاتاز بیشتری نشان می‌دهند(۱۵).نکته دیگری که بایستی در اینجا ذکر شود اینست که در مطالعه سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای در rat زودتر از سلولهای فیبروبلاست PDL این حیوان به حالت Confloant رسیدند، این امر مطابق با یافته حاصل از مطالعه ماریوتی و همکاران می‌باشد(۱٦).آنها با مطالعه بر روی فیبروبلاستهای PDL و لثه‌ای انسان نشان دادند که فیبروبلاستهای PDL سریعتر به حالت confloant می‌رسند. به عقیده آنان علت این امر، بزرگتر بودن اندازه سلولهای لثه نسبت به سلولهای PDL می باشد که آنهم ناشی ازمحتوی DNA و پروتئین بیشتر فیبروبلاستهای لثه‌ای نسبت به فیبروبلاستهای PDL می‌باشد.

در این مطالعه از حیوان rat استفاده شد، هرچند بعضی از محققین بر این عقیده‌اند که این حیوان نسبت به افزایش حجم لثه‌ای ناشی از مصرف فنی‌توئین مقاوم است، ولی در مطالعات زیادی از این حیوان جهت بررسی فعالیت متابولیک و اتصال بافتی این دارو استفاده شده است(۱۷).در این مطالعه نیز فنی‌توئین باعث تشدید پرولیفراسیون فیبروبلاستهای لثه‌ای حیوان شد که نشان می دهد فیبروبلاستهای لثه ای Rat نسبت به فنی توئین مقاوم نمی باشند. بعلاوه مشخص گردید که فنی‌توئین نه تنها در محیط in vivo بلکه در محیط in vitro نیز قادر به افزایش رشد سلولهای فیبروبلاست می‌گردد.

در روند رژنراسیون هر بافتی در بدن، لازم است سلولهای موجود در آن بافت رشد و تمایز یافته و مواد پروتئینهای خارج سلولی ساخته شود. در این مطالعه فقط به یکی از جنبه‌های رژنراسیون یعنی پرولیفراسیون سلولی پرداخته شده است و مسئله تمایز سلولها و تولید مواد خارج سلولی مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به اینکه برخی مطالعات نشان داده‌اند که فنی‌توئین بطور غیرمستقیم از طریق کاهش توانایی تجزیه ماتریکس خارج سلولی (بویژه توسط کاتپسینL) و یا تولید یک نوع کلاناژ فیبروبلاستیک غیرفعال، باعث افزایش کلاژن و در نتیجه افزایش حجم بافت می‌شود، بایستی این جنبه از رژنراسیون نیز مورد بررسی قرار گیرد تا اثر فنی‌توئین بر روی ماتریکس خارج سلولی فیبروبلاستهای خارج سلولی فیبروبلاستهای PDL نیز مشخص می‌شود.

نکته دیگری که باید خاطر نشان نمود اینست که فیبروبلاستهای PDL برخلاف فیبروبلاستهای بافت همبند سایر نقاط بدن بوده و شامل انواع مختلف با فنوتیپ‌های مشخص می‌باشند. یکی ازاین انواع فیبروبلاست بصورت classic, soft tissue –like مشابه به انواع موجود در پوست و لثه بود و یک نوع آن بصورت osteoblast –like cell می‌باشد که دارای محتوای آلکالین فسفاتاز است. این نوع از فیبروبلاستهای PDL بعلت شرکت در تشکیل بافت مینرالیزه و توانایی در تمایز به سمنتوبلاستها اهمیت ویژه‌ای در رژنراسیون پریودنشیوم دارند (۱۸،۱۹،۲۰).با توجه به اهمیت این مساله، لازم است که اثر فنی‌توئین روی زیرگونه‌ها و فنوتیپهای متعدد فیبروبلاستهای PDL نیز مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود که آیا افزایش پرولیفراسیون حاصله فقط مربوط به افزایش رشد فیبروبلاستهای معمولی موجود در PDL بوده است یا شامل نوع شبه استئوبلاستی

آن نیـز مـی‌شـود. کاربرد فنی‌توئین بعنوان یک ماده کمکی در روند تـرمیم زخـم بایسـتی مـورد توجه ویژه قرار گیرد، چرا که امروزه از فنـی‌توئـین بصـورت موضعی جهت ترمیم زخمها استفاده می‌شود. داکوسـتاو همکاران نشان داده‌اند که فنی‌توئین با افزایش انفیلتراسیون فیبروبلاسـتها و ایجـاد نئوواسکولاریزاسـیون، باعـث تغییر در روند ترمیم زخم می‌شود. نتیجه کلی، کاربرد فنی‌توئین mg/ml ۲۰ بمدت ٤٨ سـاعت در محـیط کشـت سلولهای فیبروبلاست PDL می‌تواند باعـث افـزایش شـدت پرولیفراسـیون آنها می‌شود. بنابراین با انجام مطالعـات مشـابه مـی‌تـوان ایـن مـاده را بعنوان یک ماده کمکی در تحریک رژنراسیون پریودنشیوم در روند GTR معرفی نمود.

نتیجه گیری

در ایـن مطالعه مشخص گردید که فنی توئین در محیط in vitro نیـز همانـند محـیط in vivo قادر به افزایش پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاسـت لـثه‌ای بـوده و ایـن اثـر فنی توئین در روی سلولهای فیبروبلاسـت PDL نیـز وجـود دارد. چـون فیبروبلاستهای PDL ، سـلولهای کلـیدی در روند GTR محسوب می‌شوند هر ماده‌ای که بـتواند باعث تحریک پرولیفراسیون آنها شود، در حصول رژنراسیون کمـک‌کنـنده خـواهد بـود. فلـذا بـا انجـام مطالعات کنترل شده در in vivo امکـان کاربـرد ایـن دارو بعنوان یک مادهٔ ارزان قیمت و در دسترس جهت اهداف وجود داد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولین محترم مرکز تحقیقات داروئی کاربردی جهت تامین امکانات و محل انجام پژوهش و از جناب آقای دکتر سلیمانی راد به جهت راهنمائی های علمی ارزشمندشان تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Takeshi F, Tsunehiro E, Koji and K: Periodontal occluding effects of non absorbable membranes on ingrowth of cultured gingival /connective tissue cells. *J Periodontol* 2002; **71**: 1680-6.
2. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissue. *J Periodontol* 1976; 47: 256-60.
3. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. *J Clin Periodontol*. 1982; **9**: 257-65.
4. Hogng AM, Oates TW and Cohran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2000; **71**: 1270-7.
5. DaCosta ML, Regan MC, al Sader M, Leader M, Bouchier-Hayes D. Diphenylhydantoin sodium promotes early and marked angiogenesis and results in increased collagen deposition and tensile strength in healing wounds.. *Surgery* 1998; **123**(3): 287-93.
6. Vernillo AT, Nartz NB: The effect of pheny toin (5,5-Diphenylhydantion) on human gingival fibroblasts in culture. *J Periodontol* 1987; **22**: 307-12.
7. Al – ubaidy SS, Al-Janabi NY, Al –Tai SA: Effect of pheny toin on mitotic activity of gingival tissue and cultured fibroblasts. *J Periodontal* 1981; **52** (12): 747-9.
8. Yoshizumi T. Experimental study of tissue culture relating to the etiology of 5, 5 – Diphenyl hydantoin Gingival hyperplasia. Shikwa Cacuho 1971; **71**: 183-207.
9. Salo T, Oikarinen Ks, oikarinen AI. Effect of pheny toin and nifedipin on collagen gene expression in normal human gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med 1990; **19**(9): 904-7.
10. Ten cate AR, Mills GC, Solomon G. The development of the periodontium. A Transplantation and autoradiographic study. *Anat Rec* 1971 **170**: 365.
11. Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ, Hanes PJ, Lapp CA, Lewis JB Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. J Clin Periodontol 1995; **22**: 679-85.
12. Beneveniste K, Bitar M. Effects of pheny toin on cultured human gingival fibroblasts. Phenytoin induced teratology and gingival pathology. New york, Raven Press, pp. 199-213.
13. Modeer T. Dahllof G,Ottesco P:potentiation of fibroblast Spreading by extra cellular matrix from fibroblasts derived from pheny toin – induced gingival overgrowth. *Acta Odont scand* 1988; **46**: 101-4.
14. Symour RA, Thomason JM and Ellis JS: The pathogenesis of drug – induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996; **23**: 165-175.
15. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H: *Comparison* of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 1995; **66**(12): 1025-31.
16. Mariotti A, Cochrant DL:Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingival. *J Periodontol* 1990; **61**: 103-11.
17. Wortel JP,Hefferren JJ,Rao GS. Metabolic activation and covalent binding of phenytoin in the rat gingival. *J Periodontal* Res 1979; **14**: 178-81.
18. Cho MI, matsuda N, Lin WL, Moshier A: In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. Calcif Tissue Int 1992; **50**: 459.
19. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Itasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal* Res 1990; **25**: 179.
20. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 66- 67.