

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

## تأثیر فنی توئین بر توانایی تکثیر فیبروبلاستهای لیگامان پریودنتال و لته ای در محیط کشت سلولی

دکتر رضا پورعباس: دانشیار گروه پریودنتیکس دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
دکتر بهروز نیک نفس: استادیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
دکتر عدیله شیرمحمدی: استادیار گروه پریودنتیکس دانشگاه علوم پزشکی تبریز نویسنده رابط

E-mail: shirmohamadia@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و اهداف:** سلولهای فیبروبلاست پریودنتال لیگامنت (PDLF (periodontal ligament fibroblast دارای نقش کلیدی در روند رژنراسیون پریو دنشیوم می باشند، بعلاوه مطالعات نشان می دهد که دی فنیل هیدانتوئین (فنی توئین) باعث افزایش رشد سلولهای فیبروبلاست لته ای می گردد. چنانچه این تأثیر بر روی سلولهای فیبروبلاست (PDL (periodontal ligament نیز وجود داشته باشد، ممکن است بتوان از آن جهت رژنراسیون بافتی پریودنتال استفاده کرد. بر این اساس، هدف از این مطالعه مقایسه تأثیر فنی توئین بر میزان رشد سلولهای فیبروبلاست لته و PDL در محیط کشت سلولی می باشد.

**مواد و روش ها:** ۱۰ عدد موش از نژاد Wistar Rat انتخاب شده و نمونه مربوط به لته از ناحیه بین دندانهای ثنایی بالا و نمونه مربوط به PDL از ثلث میانی ریشه دندانهای ثنایی پائین بدست آمد. پس از انتقال نمونه ها به محیط کشت مناسب جهت کشت فیبروبلاستهای PDL و لته ای، هر کدام از نمونه ها به دو گروه تست و کنترل تقسیم گردیدند. در نمونه های گروه تست، فنی توئین به غلظت ۲۰ mg/ml که در هیدروکسید سدیم حل شده بود افزوده شد. بعد از ۴۸ ساعت پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست توسط کیت پرولیفراسیون سلولی WST-1 بروش الیزا مورد سنجش قرار گرفت. میزان پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لته ای و PDL، در دو گروه تست و کنترل توسط آنالیز Independent-sample T-test مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

**یافته ها:** تأثیر فنی توئین بر میزان تکثیر سلولهای فیبروبلاست لته ای و سلولهای فیبروبلاست PDL معنی دار می باشد. همچنین میزان تکثیر سلولهای PDL در گروه تست نسبت به سلولهای لته ای در گروه تست تفاوت معنی داری داشته (P < ۰/۰۰۱) و در مورد سلولهای PDL بیشتر است.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه مشخص گردید که فنی توئین در محیط *in vitro* نیز همانند *in vivo* قادر به افزایش پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لته ای بوده و این اثر فنی توئین روی سلولهای فیبروبلاست PDL نیز وجود دارد.

**کلیدواژه ها:** رژنراسیون پریودنتال، لته، فنی توئین، فیبروبلاست، پریودنتال لیگامنت

### مقدمه

هدف نهایی از درمانهای پریودنتال متوقف نمودن تخریب بافتی و بازسازی بافتهای از دست رفته می باشد (۱). در فرایند بازسازی بافتهای نگهدارنده دندان، رده های مختلف سلولی می توانند سهیم باشند. این رده ها شامل: سلولهای اپی تلیال لته، سلولهای بافت همبند لته، سلولهای بافت همبند لیگامنت پریودنتال (PDL) و سلولهای استخوانی می باشند. بر طبق نظریه Melcher در یک زخم پریودنتال، سلولهای با منشا خاص می توانند 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. در این 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 اپی تلیالی و بافت همبند لته به زخم پریودنتال ممانعت کرده و باعث تجمع سلولهای بافت همبند PDL و در نهایت، New connective tissue attachment می شود (۳).

روشهای رایج کنونی برای درمانهای رژنراتیو، محدودیتهای زیادی داشته و فاقد نتایج قابل پیش بینی می باشد. (۴) لذا جهت بهتر نمودن نتایج حاصل از این روندها محققین مواد و روشهای مختلفی را ارائه نموده اند که براساس تحریک رشد، پرولیفراسیون و تمایز سلولی عمل می نمایند.

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 لته است که در اثر تشدید تکثیر فیبروبلاستهای لته و نیز افزایش فعالیت بعضی از زیرگروههای فیبروبلاست (تولید بیش از حد کلاژن) ایجاد می شود. لذا از این خاصیت فنی توئین جهت پیشبرد روند ترمیم زخم در طب استفاده گردیده است (۵). اثر فنی توئین بر روی تکثیر و عملکرد فیبروبلاستهای لته در *In vitro* نیز به اثبات رسیده است (۶). با

هدف نهایی از درمانهای پریودنتال متوقف نمودن تخریب بافتی و بازسازی بافتهای از دست رفته می باشد (۱). در فرایند بازسازی بافتهای نگهدارنده دندان، رده های مختلف سلولی می توانند سهیم باشند. این رده ها شامل: سلولهای اپی تلیال لته، سلولهای بافت همبند لته، سلولهای بافت همبند لیگامنت پریودنتال (PDL) و سلولهای استخوانی می باشند. بر طبق نظریه Melcher در یک زخم پریودنتال، سلولهای با منشا خاص می توانند 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. در این 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 اپی تلیالی و بافت همبند لته به زخم پریودنتال ممانعت کرده و باعث تجمع سلولهای بافت همبند PDL و در نهایت، New connective tissue attachment می شود (۳).

سدیم به همان PH افزوده شد. این امر در هر دو مورد نمونه‌های مربوط به PDL و لته انجام گرفت. بعد از ۴۸ ساعت از انکوباسیون دارو، سلولها از دارو شسته شده و با استفاده از کیت پرولیفراسیون سلولی  $wst-1 \times$ ، 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 از نمونه‌های مربوط به PDL در این آزمایش از دست رفتند، بنحوی که در مجموع ۱۰ نمونه مربوط به لته و ۶ نمونه مربوط به PDL بوده است. بررسی و تحلیل‌های آماری: در این تحقیق، اعداد بدست آمده از اندازه‌گیری ELISA، با استفاده از آزمون Kolmogrov-smimov ابتدا میزان بهنجاری جمعیت سلولهای لته 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 لته با اضافه نمودن محلول فنی توئین به محیط کشت بصورت معنی داری افزایش یافت (جدول ۱). همچنین سلولهای فیبروبلاست لیگامان پریدونتال نیز در حضور فنی توئین در محیط کشت سلولی افزایش قابل توجهی را در میزان پرولیفراسیون خود داشتند. (جدول ۱) تاثیر فنی توئین بر پرولیفراسیون سلولهای PDL بیش از لته می‌باشد ( $p < 0/01$ ) و لذا در محیطهای کشت سلولی که به مقدار مساوی و تحت شرایط یکسان فنی توئین به محیط کشت اضافه شده بود، میزان پرولیفراسیون سلولهای PDL بطور معنی داری بیش از سلولهای لته‌ای بوده است.

### بحث

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آنست که فنی توئین باعث افزایش پرولیفراسیون فیبروبلاستهای لته در محیط کشت سلولی می‌شود و میزان پرولیفراسیون فیبروبلاستهای لته‌ای که به مدت ۴۸ ساعت در معرض فنی توئین قرار داشتند (گروه آزمایشی) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). این یافته مطابق با یافته حاصل از مطالعه Al-ubaidy و همکاران می‌باشد (۷)، این محققین اثر فنی توئین را روی فعالیت میتوتیک فیبروبلاستهای لته انسان بررسی کرده و نشان دادند که Mitotic index در گروه فنی توئین (PHT) بیشتر از کنترل است.

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

### مواد و روش ها

نمونه‌ها از ۱۰ عدد موش از نژاد wistar rat ۴ 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 کلرگزیدین محیط دهان و دندانها تحت شستشو قرار گرفت و با سرم شستشو کلرگزیدین روی بافت شسته شد. سپس با یک تیغ بیستوری استریل، لته 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 لته میانی ریشه، باکورت، بیوپسی از PDL برداشته شده و نمونه‌های لته و PDL به مدیوم انتقال یافت. مدیوم اولیه شامل:

DMEM (Dulbeccos Modifid Eagle Medium)، جتامایسن سولفات ۵۰ mg/ml، L-گلوتامات، پنی سیلین ۱۰۰ UNIT/M، استریتومایسین ۱۰۰ mg/ml و Fetal calf serum (FCS) ۱۰٪ بود (۶). نمونه‌های تهیه شده در زیر هود استریل خرد شده و در فلاسکهای مخصوص، در انکوباتور حاوی CO<sub>2</sub> با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت سلولهای کشت داده شده در مدیوم ثانویه که شامل DMEM + آنتی بیوتیک + 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 تریپسین (رقت ۱/۳ تریپسین ۰/۲۵٪) کردن جدا می‌شد (۶). بعد از چندین پاساژ و رشد خوب سلولها، نمونه‌ها مجدداً تریپسین شده و در حجم مشخصی جهت تعیین سلولها در حجم بالام نئوبار شمارش می شدند و براساس شمارش سلولی، تعداد ۲۰۰۰ سلول، در هر خانه پلیت ۹۶ تائی کشت داده می‌شدند. بعد از ۷۲ ساعت خانه‌های کشت به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شده که در خانه‌های آزمایشی فنی توئین به میزان ۲۰ mg/ml (محلول در هیدروکسید سدیم) افزوده شده و در خانه‌های گروه شاهد به همان میزان هیدروکسید

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

نوع سلول	شاهد	آزمایشی	P
فیبروبلاست لته (n=10)	۰/۱۳۹۴۵±۰/۰۱۱۱	۰/۱۲۸۲±۰/۰۱۱۳	<۰/۰۱
فیبروبلاست PDL	۰/۱۶۵۹±۰/۰۳۳۱	۰/۱۷۸۸۳±۰/۰۷۵۴	<۰/۰۵

یافته حاصل از مطالعه ماریوتی و همکاران می باشد (۱۶). آنها با مطالعه بر روی فیروبلاستهای PDL و لتهای انسان نشان دادند که فیروبلاستهای PDL سریعتر به حالت confluent می رسند. به عقیده آنان علت این امر، بزرگتر بودن اندازه سلولهای لته نسبت به سلولهای PDL می باشد که آنها ناشی از محتوی DNA و پروتئین بیشتر فیروبلاستهای لتهای نسبت به فیروبلاستهای PDL می باشد. در این مطالعه از حیوان rat استفاده شد، هرچند بعضی از محققین بر این عقیده اند که این حیوان نسبت به افزایش حجم لتهای ناشی از مصرف فنی توئین 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 فنی توئین باعث تشدید پرولیفراسیون فیروبلاستهای لتهای حیوان شد که نشان می دهد فیروبلاستهای لتهای Rat نسبت به فنی توئین مقاوم نمی باشند. بعلاوه مشخص گردید که فنی توئین نه تنها در محیط in vivo بلکه در محیط in vitro نیز قادر به افزایش رشد سلولهای فیروبلاست می گردد.

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 جنبه های 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 داده اند که فنی توئین بطور غیرمستقیم از طریق کاهش توانایی تجزیه ماتریکس خارج سلولی (بویژه توسط کاتپسین L) و یا تولید یک نوع کلاناژ فیروبلاستیک غیرفعال، باعث افزایش کلانژن و در نتیجه افزایش حجم بافت می شود، بایستی این جنبه از رژنراسیون نیز مورد بررسی قرار گیرد تا اثر فنی توئین بر روی ماتریکس خارج سلولی فیروبلاستهای خارج سلولی PDL نیز مشخص می شود.

نکته دیگری که باید خاطر نشان نمود اینست که فیروبلاستهای PDL برخلاف فیروبلاستهای بافت همبند سایر نقاط بدن بوده و شامل انواع مختلف بافتی با فنوتیپهای مشخص می باشند. یکی از این انواع فیروبلاست بصورت classic, soft tissue-like مشابه به انواع موجود در پوست و لته بود و یک نوع آن بصورت osteoblast-like cell می باشد که دارای محتوای آکالین فسفاتاز است. این نوع از فیروبلاستهای PDL بعلت شرکت در تشکیل بافت میزالیزه و توانایی در تمایز به سمیتوبلاستها اهمیت ویژه ای در رژنراسیون پرودنشیوم دارند (۱۸، ۱۹، ۲۰). با توجه به اهمیت این مساله، لازم است که اثر فنی توئین روی زیرگونه ها و فنوتیپهای متعدد فیروبلاستهای PDL نیز مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود که آیا افزایش پرولیفراسیون حاصله فقط مربوط به افزایش رشد فیروبلاستهای معمولی موجود در PDL بوده است یا شامل نوع شبه استئوبلاستی

همچنین یوشیزومی نشان داده بود که فنی توئین باعث تحریک رشد فیروبلاستهای لته ای گربه در *in vitro* می شود (۸). هر چند برخی محققین بدین نتیجه رسیده اند که فنی توئین اثری بر روی تحریک رشد فیروبلاستهای لتهای ندارد. این محققین (Salo و همکاران) فنی توئین (۱۰-۵ mg/ml) و نیفیدپین (۲۰۰-۱۰۰ mg/ml) را روی فیروبلاستها افزوده و نشان دادند که این مواد دارای اثر ویژه ای روی کاهش بیشتر پروتئین کل و کلانژن می باشد (۹). همچنین فیروبلاستهای حاصل از بیماران با افزایش حجم ناشی از مصرف فنی توئین افزایش در سنتز گلیکوآمینو گلیکن سولفات را در *in vitro* نشان می دهند (۱۰).

در مطالعه ای دیگر نیز نشان داده شده است که کاربرد فنی توئین باعث کاهش در تجزیه کلانژن می شود که این امر در نتیجه تولید یک کلانژن فیروبلاستیک غیرفعال می باشد (۱۱).

افزودن فنی توئین به فیروبلاستهای لته، باعث افزایش سطح *Translatable collagen mRNA* می شود (۱۲). همچنین ماتریکس خارج سلولی تولید شده بوسیله فیروبلاستهای مشتق از لته افزایش حجم یافته (ناشی از مصرف فنی توئین) باعث تسهیل *Fibroblast spreading* می شود که اینهم پیش نیاز رشد سلولها می باشد (۱۳). بعلاوه، بررسی مکانیسم اثر فنی توئین بر روی فیروبلاستهای لته در یک مطالعه *in vitro* نشان داده است که این ماده باعث مهار جذب  $Ca^{2+}$  توسط این سلولها می شود و این امر با سرعت پرولیفراسیون فیروبلاستها رابطه دارد (۱۴).

در این مطالعه مشخص گردید که اثر فنی توئین بر روی پرولیفراسیون سلولهای PDL معنی دار می باشد ( $p=0/05$ ). از آنجاییکه مطالعه دیگری در مورد اثر فنی توئین بر روی فیروبلاستهای PDL چه در *in vitro* و چه در *in vivo* گزارش نشده، مکانیسم اثر آن روی فیروبلاستهای PDL مبهم می باشد. معهدا این تحقیق نشان داد که فنی توئین موجب افزایش تکثیر سلولهای PDL در *in vitro* می شود. بعلاوه، با توجه به اثر فنی توئین بر روی مهار جذب  $Ca^{2+}$  توسط فیروبلاستهای لته می توان استنباط کرد که این امر در مورد فیروبلاستهای PDL نیز صدق نماید و فنی توئین با اثر بر روی سیکل سلولی و نیز کانالهای کلسیم بر روی فیروبلاستهای PDL نیز مؤثر باشد.

البته پرولیفراسیون فیروبلاستهای PDL نسبت به لته در مطالعات مختلف سرعت بیشتر نشان داده است. اوگاتا و همکاران کشت سلولهای فیروبلاست لته انسانی را در *in vitro* مورد مقایسه قرار داده و نشان دادند که سلولهای PDL انسانی (HPDL) دارای سرعت بیشتری نسبت به سلولهای لتهای انسان (HGF) می باشند بعلاوه، HPDL نسبت به HGF مقدار بیشتری از cAMP تولید کرده و فعالیت الکالین فسفاتاز بیشتری نشان می دهند (۱۵). نکته دیگری که بایستی در اینجا ذکر شود اینست که در مطالعه سلولهای فیروبلاست لتهای در rat زودتر از سلولهای فیروبلاست PDL این حیوان به حالت Confluent رسیدند، این امر مطابق با

### نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید که فنی توئین در محیط *in vitro* نیز همانند محیط *in vivo* قادر به افزایش پرولیفراسیون سلولهای فیبروبلاست لثه‌ای بوده و این اثر فنی توئین در روی سلولهای فیبروبلاست PDL نیز وجود دارد. چون فیبروبلاستهای PDL، سلولهای کلیدی در روند GTR محسوب می‌شوند هر ماده‌ای که بتواند باعث تحریک پرولیفراسیون آنها شود، در حصول رژنراسیون کمک‌کننده خواهد بود. فلذا با انجام مطالعات کنترل شده در *in vivo* امکان کاربرد این دارو بعنوان یک ماده ارزان قیمت و در دسترس جهت اهداف وجود داد.

آن نیز می‌شود. کاربرد فنی توئین بعنوان یک ماده کمکی در روند ترمیم زخم بایستی مورد توجه ویژه قرار گیرد، چرا که امروزه از فنی توئین بصورت موضعی جهت ترمیم زخمها استفاده می‌شود. داکوستاو همکاران نشان داده‌اند که فنی توئین با افزایش انفیلتراسیون فیبروبلاستها و ایجاد نئوواسکولاریزاسیون، باعث تغییر در روند ترمیم زخم می‌شود. نتیجه کلی، کاربرد فنی توئین ۲۰ mg/ml بمدت ۴۸ ساعت در محیط کشت سلولهای فیبروبلاست PDL می‌تواند باعث افزایش شدت پرولیفراسیون آنها می‌شود. بنابراین با انجام مطالعات مشابه می‌توان این ماده را بعنوان یک ماده کمکی در تحریک رژنراسیون پریدنشیوم در روند GTR معرفی نمود.

### 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 and Nartz NB: The effect of phenytoin (5,5-Diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J Periodontol* 1987; **22**: 307-12.
7. Al – ubaidy SS, Al-Janabi NY, Al – Tai SA: Effect of phenytoin on mitotic activity of gingival tissue and cultured fibroblasts. *J Periodontol* 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 phenytoin 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 phenytoin on cultured human gingival fibroblasts. Phenytoin induced teratology and gingival pathology. New York, Raven Press, pp. 199-213.
13. Modeer T, Dahllof G, Ottosson P: potentiation of fibroblast Spreading by extra cellular matrix from fibroblasts derived from phenytoin – induced gingival overgrowth. *Acta Odont scand* 1988; **46**: 101-4.
14. Seymour 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, Cochran 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 Periodontol 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 Periodontol 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.