

بررسی سازگاری غشاهای غیر قابل جذب در برابر سلول‌های فیبروبلاست

لیگامان پریودنتال انسانی

دکتر محمود قاسمی^۱، دکتر طاهره فروتن^{۲*}، دکتر ملیحه نیکزاد^۳

۱. دانشیار، گروه پریودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

۳. دندانپزشک عمومی

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون انواع مختلفی از غشاهای غیر قابل جذب به منظور بازسازی ساختار بافت پریودنتال آسیب دیده مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از مطالعه‌ی تجربی حاضر، مقایسه‌ی انواع غشاهای غیر قابل جذب از نظر میزان و نحوه‌ی چسبندگی سلول‌های (PDL) (perio dental ligament) انسانی در محیط آزمایشگاهی می‌باشد. برای نیل به این هدف، میزان نرخ بقاء، واکنش آلکالین فسفاتاز و مورفولوژی سلول‌ها پس از مجاورت با غشاهای مورد نظر، بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: سه غشای غیر قابل جذب GBR-200، TXT-200 و IMTEC OVID مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از PDL دندانهای پرمولر با دانسیته‌ی 104 cell/ml در محیط کشت بر روی غشاها با ابعاد ۳۳ میلی‌متر در ۱۵ چاهک برای ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس نمونه‌ها برای ارزیابی توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی فیکس شدند. داده‌ها بوسیله‌ی آزمون آماری one-way ANOVA آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که از ۳ غشای مورد بررسی، غشاهای GBR-200 و TXT-200 بیشترین میزان چسبندگی را به لحاظ مورفولوژی داشته و کمترین چسبندگی مربوط به غشای IMTEC OVID بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0/02$). همچنین، میزان چسبندگی سلول‌ها از نظر شاخص ALP (alkaline phosphatase) و MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) بر روی غشاهای GBR-200 و TXT-200 بیشتر از گروه دیگر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (به ترتیب $p=0/08$ و $p=0/2$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد غشاهای GBR-200 و TXT-200 نتایج بهتری را در تغییرات مورفولوژیک سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت نشان دادند. شاید علت معنی‌دار نبودن شاخص‌های ALP و MTT، کم بودن تعداد سلول‌های چسبیده به غشاها باشد که در نتیجه امکان اندازه‌گیری دقیق این شاخص‌ها را میسر نمی‌ساخت.

واژگان کلیدی: غشای غیر قابل جذب، چسبندگی سلولی، بازسازی پریودنتال، نرخ بقای سلولی، فعالیت آلکالین فسفاتاز

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ghasemi M, Foroutan T, Nikzad M. The study of non-absorbable membrane compatibility to human fibroblast periodontal ligament. *Pejouhandeh* 2013;18(3):128-132.

مقدمه

است. اعمال فوق به همراه بهداشت مناسب بیمار غالباً باعث ثبات بافت باقیمانده پریودنشیوم می‌گردد (۱-۳). این در حالی است که مهمترین هدف درمان‌های پریودنتال، در راستای فراهم کردن شرایط بازسازی مجدد پریودنشیوم آسیب دیده و یا از دست رفته می‌باشد (۱).

روش‌های درمانی متداول بیماری‌های پریودنتال در جهت حذف پلاک میکروبی و التهاب معطوف گشته است. این روش‌ها تقریباً همیشه شامل جرم‌گیری و صاف و صیقلی نمودن سطح ریشه و گاهی هم جراحی‌های پریودنتال بوده

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر طاهره فروتن؛ استادیار گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی؛ پست الکترونیک:

foroutan@khu.ac.ir

سپس، آنها در مدت زمان کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شده و سلول‌های فیبروبلاست پس از جداسازی در طی سه- چهار پاساژ، با دانسیته‌ی 10^4 cell/cm^2 بر روی غشاهای موجود در پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی محیط کشت که از ۲۴ ساعت قبل با اشعه UV استریل شده بودند، ریخته شدند. ابعاد غشاهای قابل جذب مورد استفاده در این تحقیق 3×3 میلی‌متر و شامل انواع GBR-200، TXT-200، و IMTEC OVID بود. شش خانه از پلیت‌ها به هر یک از ۴ غشای قابل جذب اختصاص یافت. تمامی خانه‌ها پس از شستشو با محلول بافر، توسط محلول DMEM جایگزین شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه و در هوای مرطوب با ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

تست آلكالین فسفاتاز:

تست فعالیت آلكالین فسفاتاز به عنوان یک پارامتر برای فعالیت سلولی به خصوص سلول‌های استئوبلاستی مطرح است. برای این منظور از کیت سنجش آلكالین فسفاتاز (Product No. 85, Sigma-Aldrich) استفاده گردید. در روش فوق، سلول‌ها بوسیله‌ی محلول تثبیت‌کننده‌ی سترات-استن، به مدت ۳۰ ثانیه تثبیت شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول نمک دیازونیوم قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها دو بار با آب مقطر شسته شده و به مدت ۳ دقیقه با محلول همتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. سپس سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. در تجزیه و تحلیل آماری و به منظور بررسی اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده گردید.

تست MTT:

به منظور سنجش نرخ بقای سلول‌ها، از تست MTT استفاده گردید. این تست برای سنجش میزان یا نسبت تکثیر سلولی کاربرد داشته و بر اساس روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی احیا و شکسته شدن کریستال‌های آبی رنگ فورمازان انجام می‌گیرد. لازم به ذکر است که حساسیت این روش بالای ۹۸٪ می‌باشد. پس از اتمام انکوباسیون، تست MTT به شرح زیر انجام گرفت: ابتدا محیط کشت رویی دور ریخته شد و هر کدام از خانه‌های حاوی غشاها به طور کامل با PBS استریل شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ لاند محیط حاوی MTT به هرخانه اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در طی انکوباسیون، محلول MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز، احیا شد. پس از ۴ ساعت، مایع روی هر غشا

مطالعات نشان داده است که پس از انجام جراحی‌های پریدنتال، سلول‌های اپیتلیال سریعترین رشد را داشته و در حالی زودتر از سایر سلول‌های پریدنشیوم در سطح عریان ریشه تجمع می‌یابند که این امر بازسازی بافتی را به همراه نداشته و باعث می‌شود بافتی با یک اپی‌تلیوم طولی چسبیده بر روی سطح ریشه ترمیم شود (۴-۱).

Victo و همکارانش طی تحقیقی در سال ۱۹۸۲ نشان دادند سلول‌هایی از پریدنشیوم که از لیگامان پریدنتال منشاء گرفته‌اند (به ویژه فیبروبلاست‌ها) می‌توانند بهترین نوع چسبندگی و بازسازی بافتی را ایجاد کنند (۵). در این خصوص استفاده از غشاهای مختلف پیشنهاده گردیده است. غشاها دارای خصوصیات همچون یکپارچگی، سازگاری زیستی، مسدودکنندگی سلولی برای سلول‌های non-regenerative، فضا سازی جهت مهاجرت سلول‌ها و قابلیت سازگاری با بافت می‌باشند (۶). با توجه به این خصوصیات، می‌توان با قرار دادن غشاء بین سطح عریان ریشه و بافت همبند در طی ترمیم متعاقب جراحی پریدنتال، از رشد اپیکالی سلول‌های اپی‌تلیوم و بافت همبند جلوگیری کرده و با ایجاد فضا، به مهاجرت و تجمع سلول‌هایی مانند فیبروبلاست‌ها که منشا لیگمان پریدنتالی داشته و توانایی لازم جهت بازسازی را دارند، کمک نمود (۷-۹). این امر برای نخستین بار توسط Lindehy و karring Nyman در سال ۱۹۸۲ مورد تأیید قرار گرفت (۱۰). در تحقیقاتی که طی سال‌های اخیر صورت گرفته، مشخص شده است که پارامترهای غشاها از جمله نحوه‌ی قرارگیری فایبرها، ضخامت فایبرها و میزان خلل و فرج موجود در آنها می‌توانند مقادیر متفاوتی از میزان چسبندگی و تکثیر فیبروبلاستی را در سطح غشاها ایجاد کنند (۱، ۲ و ۱۱). در تحقیقی که توسط Kasaj و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی انواع غشاهای قابل جذب و غیر قابل جذب صورت گرفت نشان داده شد که مقادیر متفاوتی از چسبندگی بر روی هر یک از انواع غشاها رخ می‌دهد. لذا در این تحقیق بر آن شدیم که تأثیر ۳ نوع از غشاهای غیر قابل جذب را در میزان و نحوه‌ی چسبندگی فیبروبلاست‌های لیگامان پریدنتال انسانی در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار دهیم. مطالعه‌ی حاضر در سال ۱۳۸۹ در آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه خوارزمی انجام شد.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی، لیگامان پریدنتال ۴ دندان پره مولر با کورت جدا شده و در محلول DMEM (double modified eagle medium) که شامل ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم گاوی جنینی است، قرار داده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از سه نوع غشای غیر قابل جذب به نام‌های GBR-200، TXT-200 و IMTEC OVID استفاده گردید. در میان غشاهای، بیشترین تعداد سلول‌های پهن در غشاهای TXT 200 به تعداد $8 \pm 2/64$ و GBR-200 به تعداد $8 \pm 1/58$ ، و کمترین آنها در غشای IMTEC OVID به تعداد $4/2 \pm 1/92$ مشاهده گردید (جدول ۱). آزمون آماری one way ANOVA اختلاف بین گروه‌ها را از نظر مورفولوژی معنی‌دار نشان داد ($p < 0/001$) (شکل ۱). سه گروه ذکر شده از نظر نرخ بقا و میزان تکثیر سلولی و واکنش نسبت به رنگ‌آمیزی آلكالین فسفاتاز، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (به ترتیب $p = 0/08$ و $p = 0/12$) (جدول ۲ و شکل ۲).

مجدداً برداشته و با PBS استریل شستشو داده شد و سپس ۱۰۰ لاندا ایزوپروپانول اسیدیک ۰/۴٪ همراه با اسید هیدروکلریک به هر خانه اضافه گردید. انکوباسیون در حرارت اتاق و دور از نور به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکل باعث لیز سیتوپلاسم سلولی شده و در نتیجه فورمازان غیر محلول از سیتوپلاسم سلول خارج می‌گردد. به این ترتیب، رنگ تشکیل شده را محلول نموده و باعث رنگی شدن محیط می‌شود. در نهایت، جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان طول موج مرجع و ۵۷۰ نانومتر به عنوان طول موج سنجش جهت اطمینان از صحت نتایج، در دستگاه Elisa Reader به ثبت رسید. در تجزیه و تحلیل آماری و به منظور بررسی اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده گردید.

جدول ۱. توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب مورفولوژی سلولی به تفکیک غشاها.

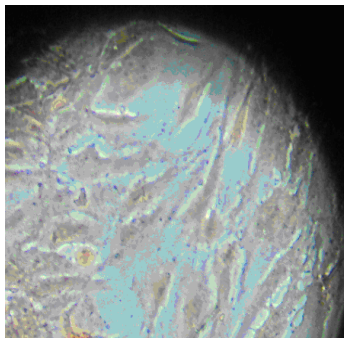
نام غشاء	میزان سلولهای پهن	میزان سلولهای گرد	میزان سلولهای دوکی
TXT 200	$8 \pm 2/64$	$8/40 \pm 4/50$	$3/60 \pm 2/70$
GBR-200	$8 \pm 1/58$	$3/40 \pm 2/30$	$11/20 \pm 2/38$
IMTEC OVID	$4/2 \pm 1/92$	$2/20 \pm 1/92$	$18 \pm 3/53$
CD	$18/40 \pm 2/96$	$8/40 \pm 4/61$	$18/80 \pm 4/08$

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده‌اند.

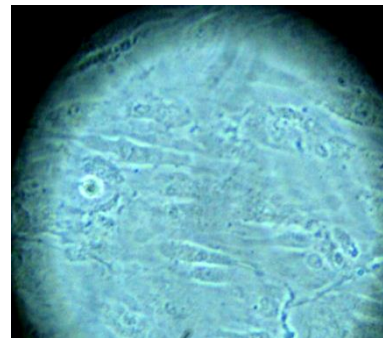
جدول شماره ۲. توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب شاخص MTT و آلكالین فسفاتاز به تفکیک غشاها.

نام غشاء	میزان MTT	میزان ALP
TXT 200	$0/304 \pm 0/17$	$26/6 \pm 7/70$
GBR-200	$0/262 \pm 0/340$	$23/8 \pm 13/73$
IMTEC OVID	$0/285 \pm 0/252$	$34 \pm 6/67$
CD	$0/318 \pm 0/04$	

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده‌اند. ALP: آلكالین فسفاتاز.



شکل ۲. سلولهای فیبروبلاست دندان پره مولر رنگ شده با آلكالین فسفاتاز. توده‌های رنگی نشان‌دهنده واکنش مثبت به کیت آلكالین فسفاتاز می‌باشد. بزرگنمایی $\times 200$.



شکل ۱. سلولهای فیبروبلاست دندان پره مولر کشت شده در محیط DMEM. بزرگنمایی $\times 100$.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر انواع غشاهای غیر قابل جذب شامل ۳ غشای GBR-200، TXT 200 و IMTEC OVID بر مقدار و نحوه‌ی چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست لیگمان پرپوندنتال انسانی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این تحقیق مبین آن است که غشاهای GBR-200 و TXT 200 نتایج بهتری در تغییرات مورفولوژیک سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت از خود نشان می‌دهند.

Change و همکارانش چسبندگی سلولی فیبروبلاست را به غشاهای قابل جذب Inion GTRX با بیس‌پلی‌لاکتیک اسید و غشای غیر قابل جذب GTN1 (gore-Tex) با بیس ePTFE (expanded Polytetrafluoroethylene) بررسی کرده و نشان دادند که چگونه چسبندگی فیبروبلاست‌ها به غشاهای مختلف تحت تأثیر فاکتورهای خارجی مثل PRP (platelet rich plasma) می‌باشد. در میان غشاهای بررسی شده، غشای Inion بیشترین میزان چسبندگی و غشای ePTFE کمترین میزان چسبندگی را نشان داد (۱). سلول‌های ستاره‌ای شکل پهن با فاصله کم در سراسر غشای Inion مشاهده گردید (محدوده هر دو سلول کمتر از ۲۰ سلول بود). این چسبندگی متفاوت سلول‌ها به غشاها، به علت ساختار میکروسکوپی غشاها بود. به این معنی که سطوح ناصاف و دارای تخلخل، میزان چسبندگی را به طور خاصی تحت تأثیر قرار داده و غشای Inion با سایز متفاوت فایبرها و ساختار شبکه‌ای با خشونت سطحی، مطلوب‌ترین چسبندگی سلول‌ها را از خود نشان داد. همچنین سمیت غشاها، اثر مہاری روی چسبندگی سلول‌ها داشته و غشای ePTFE دارای سمیت متوسط بوده که سبب کاهش پتانسیل چسبندگی شده است. در تحقیق حاضر، غشاهای غیر قابل جذب به دلیل بیس ePTFE و سمیت، دارای کمترین چسبندگی سلولی بودند ولی با این وجود، بیشترین میزان چسبندگی سلولی به لحاظ مورفولوژی سلولی بر روی غشاهای GBR-200 و TXT-200 و کمترین میزان چسبندگی در غشای IMTEC OVID مشاهده گردید. Takata و همکارانش چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست به غشاهای قابل جذب Bio و Tissue guide (TG) و resoulole Epiguide (BM) را با بیس کلاژن و غشای غیر قابل جذب Gortex را با بیس لاکتیک اسید و غشای غیر قابل جذب مقایسه و نشان دادند که میزان چسبندگی فیبروبلاست‌ها به غشاهای قابل جذب بیشتر از غشاهای غیر قابل جذب است (۶). در مطالعه‌ی حاضر، مهم‌ترین فاکتور در بین خصوصیات غشاها که منجر به چسبندگی ایده‌آل می‌شود، سازگاری بافتی

غشاها بود، اما حضور عوامل دیگر مانند سمیت غشاها، محتویات غشاء، شکل و ساختار آنها، و همچنین سایز تخلخل غشاها را نیز مؤثر می‌دانیم.

در میان غشاهای قابل جذب، GBR-200 به دلیل تخلخل بیشتر، میزان چسبندگی بیشتری از خود نشان داد. بنابراین شکل و ساختار سطحی غشاء به عنوان عاملی در چسبندگی مورد بررسی قرار گرفت. در واقع، تخلخل‌ها به عنوان بستری جهت به دام انداختن لخته‌ی خونی عمل کرده و تهاجم سلول‌ها به بستر را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۲). در مطالعه حاضر نیز چسبندگی بیشتر فیبروبلاست‌ها به غشاهای غیر قابل جذب GBR-200 و TXT-200 تأیید گردید و فعالیت آلکالین فسفاتاز و MTT به علت چسبندگی کمتر سلول‌ها در نتیجه‌ی سمیت متوسط غشاهای ePTFE، معنی‌دار نبود.

Adrian Kasaj و همکارانش، چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست را بر روی غشاهای قابل جذب Totudent (TD)، Resodont (RD) و Bio Gide (BG) را با بیس کلاژنی و غشاهای غیر قابل جذب را با بیس ePTFE مورد مقایسه قرار داده و دریافتند که غشاهای قابل جذب همگی افزایش قابل توجهی در میزان چسبندگی سلول‌ها از خود نشان می‌دهند. در در همین ارتباط، غشای TD بیشترین میزان چسبندگی سلولی را در بین غشاها به خود اختصاص داده است (۲). علت این امر را تشدید تکثیر سلولی و ماکرومولکول‌های خارج سلولی توسط غشاهای قابل جذب کلاژنه دانسته‌اند (۱۳). این تحقیق همچنین سایز تخلخل‌ها و خشونت سطحی را در چسبندگی سلول‌ها مؤثر دانسته و همچنین بیان می‌کند که محیط *in vitro* نمی‌تواند نقش شرایط *in vivo* را بازسازی کند. در مطالعه‌ی حاضر نیز چسبندگی کمتر فیبروبلاست‌ها به غشاهای غیر قابل جذب تأیید گردید و فعالیت آلکالین فسفاتاز و MTT به علت چسبندگی کمتر سلول‌ها ناشی از سمیت متوسط غشاهای ePTFE معنی‌دار نبود.

Alpar و همکارانش، سازگاری زیستی دو نوع غشای قابل جذب شامل guide و Bio guide و غشای غیر قابل جذب Gor-Tex را با کلاژن مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق نیز مشخص شد که غشاهای قابل جذب سازگاری بافتی بسیار خوبی از خود نشان می‌دهند، در حالی که غشاهای ePTFE و پلی لاکتیک اسید، سازگاری بافتی متوسط تا خفیف داشته و باعث مرگ سلولی می‌شوند. این غشاها همچنین سبب واکنش جسم خارجی توسط میزبان شده و رشد اپیکالی اپیتلیال و میکروبی را روی این دو غشاء تسهیل می‌کنند که این امر باعث ایجاد فاصله بین سلول‌ها و غشاء شده و هدف GTR را

کاهش می‌دهند (۷).

در تحقیق حاضر نیز به دلیل سمیت غشاهای غیر قابل جذب با بیس ePTFE، سنتز DNA و ماکرومولکول‌های خارج سلولی توسط غشاها مختل شده و چسبندگی سلولی کمتری رخ می‌دهد. همچنین به علت کم بودن تعداد سلول‌های چسبیده، آزمون MTT و آلكالین فسفاتاز از نظر آماری معنی‌دار نبود.

از جمله نقاط ضعف مطالعه‌ی حاضر می‌توان به آزمایشگاهی بودن نتایج آن اشاره نمود که لزوم تکرار آن در محیط *in vivo* ضروری بنظر می‌رسد. همچنین در صورت بیشتر بودن تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، اطمینان به صحت نتایج نیز افزایش خواهد یافت. ضمناً در پژوهش حاضر از حمایت مالی هیچ شرکت سازنده‌ی مواد مورد آزمایش، استفاده نگردید.

REFERENCES

1. Chang T, Liu Q, Marino V, Bartold PM. Attachment of periodontal fibroblasts to barrier membranes coated with platelet-rich plasma. *Aust Dent J* 2007;52(3):227–33.
2. Kasaj A, Reichert C, Gots H, Rohrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4(22).
3. Teixeira LN, Crippa GE, Trabuco AC, Gimenes R, Zaghete MA, Palioto DB, et al. In vitro biocompatibility of Poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene) barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. *Acta Biomater* 2010;6(3):979–89.
4. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002;23(6):1461–9.
5. Terranova VP, Martin GR. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J Periodontal Res* 1982; 17:530–3.
6. Takta T, Wang H-L, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontal Res* 2001;36:322–7.
7. Alpar B, Leyhausen G, Geurtsen H. Compatibility of resorbable and non resorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast like cells. *Clin Oral Investig* 2000;4:219–26.
8. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:443–9.
9. Kozlovsky A, Artzi Z, Tal H, Moses O, Weirneb M, Nemocovsky CE. Bio-degradation of a resorbable collagen membranes (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1116–23.
10. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11(8):494–503.
11. Nieminen T, Kallela I, Keranen J, Hiidenheimo I, Kainulainen H, Wuolijoki E, et al. In vivo and in vitro degradation of a novel bioactive guided tissue regeneration membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:727–32.
12. World workshop in clinical periodontics. Proceedings published by the American academy of periodontology: Chicago: 1989.
13. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected root in to bone tissue. *J Clin Periodontol* 1980;7:96–105.