

بررسی تأثیر غلظت های مختلف ترکیب موكوزامين بر میزان چگالی و رشد سلول های فیبروبلاست انسانی

مرتضی جعفری تهرانی[#]، دکتر بهزاد هوشمند^۱، دکتر حسن سمیاری^۲، حسین سمیاری^۱

۱- دانشجوی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهد، تهران، ایران

۲- استاد گروه پرودونتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه پرودونتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهد، تهران، ایران

خلاصه:

سابقه و هدف: یکی از موارد مهم در درمانهای دندانپزشکی مدیریت زخم بافت نرم است و از آنجایی که شواهد علمی در ارتباط با کاربرد ترکیبات موضعی جهت تسریع در ترمیم موجود است برآن شدیم اثر ترکیب موكوزامين را بر رشد و تکثیر سلولهای محیط کشت فیبروبلاستی قرار دهیم.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی، اثر دارو بر میزان رشد سلولهای فیبروبلاست انسانی کشت شده بررسی شد، به این منظور سلولهای کشت شده در بازه زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته درسه پلیت جداگانه با غلظتهای ۰/۱٪ تا ۱٪ از ترکیب موكوزامين در سه تکرار تیمار گردیدند. همچنین به منظور بررسی اثر غلظت های بالای ترکیب موكوزامين، سلولهای فیبروبلاست انسانی توسط غلظت های ۱ تا ۱۵ درصد از ترکیب موكوزامين در طی ۴۸ ساعت در پلیت های جداگانه و در سه تکرار مورد تیمار واقع شدند. در نهایت میزان چگالی نوری رشد سلولهای فیبروبلاست در طول موج ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد. داده های بدست آمده توسط آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و دوطرفه در نرم افزار SPSS مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: ترکیب موكوزامين با ماده موثره اسید هیالورونیک و اسید آمینه در غلظت های کمتر از ۱ درصد در ترمیم زخم و رشد سلولهای فیبروبلاستی تأثیری ندارد در عین حال افزایش طول دوره تا ۹۶ ساعت موجب افزایش رشد سلولی و یا چگالی نوری سلولهای فیبروبلاستی گردیده است.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان داد غلظت های بالای یک درصد اسپری موكوزامين اثر سمیت بر روی سلولهای فیبروبلاستی دارد. البته برای تأثیر عملکرد این ترکیب در بهبود ترمیم زخم و رشد سلولهای فیبروبلاستی و کاربرد بالینی آن نیاز به بررسی بافت شناختی و بالینی بیشتری می باشد.

کلمات کلیدی: ترکیب موكوزامين، سلولهای فیبروبلاست، ترمیم بافت، مهندسی بافت، بیومتریال، MTT

وصول مقاله: ۹۵/۹/۲۱ اصلاح نهایی: ۹۶/۱/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۶/۳/۲۰

مقدمه:

پوشش داده می شود. پکها احتمال عفونی شدن پس از جراحی و خونریزی را کاهش داده و ترمیم بافت را با جلوگیری از ترومای سطحی در هنگام جویدن آسان می نمایند. (۲،۳) عموماً پکها بدون خواص درمانی بوده و دارای «عامل بهبودی» نمی باشند. (۴-۶) یکی از روشهایی که منجر به تسریع در ترمیم می شود، استفاده از بیومتریال ها می باشد. از جمله بیومتریال ها می توان به اسید هیالورونیک (هیالورونان) اشاره نمود که مولکول بسیار بزرگی است که هسته پروتئینی ندارد و از بخشهای گوناگون تکرار شونده دی ساکراید تشکیل شده

ترمیم بافت در حفره دهان تنها محدود به ترمیم بعد از تروما و یا ایجاد زخم نمی باشد. (۱) ترمیم زخم می تواند به تشکیل بافت زخم بیانجامد. در این مرحله ترمیم زخم نه تنها به صورت سنتی در زخم های پوستی مورد تایید می باشد بلکه در مورد درمان های پرودونتال نیز مشاهده شده است. هدف نهایی در درمان بافت نرم در بیماران حفظ سلامت پرودونتال به منظور حفظ دندان ها می باشد. در بیشتر موارد پس از ایجاد زخم پرودونتال، ناحیه مورد عمل به وسیله پک بهبود دهنده زخم،

مطالعاتی آزمایشگاهی بهره برده و اثر بخشی این ماده را در تکثیر و چسبندگی سلولهای محیط کشت فیبروبلاستی مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها:

در این پژوهش تجربی - آزمایشگاهی، تأثیر ترکیب موکوزامین بر روی سلولهای فیبروبلاست توسط آزمون Multi-Table Tournament (MTT) صورت پذیرفت. این آزمون یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستالهای زرد رنگ تترازولیوم 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium Bromide (MTT) می باشد که پیشتر توسط اسلاتر و همکاران (۱۹۶۳) شرح داده شده است.^(۲۲) اساساً آزمون (MTT) روشی مبتنی بر رنگ سنجی بوده که برای تعیین زیست پذیری و سمیت سلولی مواد استفاده می شود و بر اساس احیای محلول زرد رنگ ماده (MTT) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهای زنده و تشکیل کریستالهای محلول ارغوانی رنگ فورمازان می باشد که پس از حلالیت در دیمتیل سولفوکساید می توان با اندازه گیری جذب نور در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه طیف سنج ماورا بنفش - مرئی و به کمک منحنی استاندارد، تعداد نسبی سلولهای زنده را تعیین و به تبع آن میزان دوز مؤثره ترکیب موکوزامین محاسبه نمود.

آماده سازی محلول ها

ابتدا محلول پایه (MTT) با ترکیب (MTT) با ترکیب ۵۰ میلیگرم ام.تی.تی در ۱۰ میلی لیتر محلول نمکی فسفات بافر Phosphate Buffer Saline (PBS) تهیه شد (۵ میلیگرم در میلی لیتر (MTT) محلول حاصل با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرومتری استریل شده و تا زمان استفاده در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. همچنین محلول حلال (MTT) به صورت ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات در کلرید هیدروژن ۱۰ میلی مولار حاصل شد.

است.^(۶،۷) اسید هیالورونیک یکی از ترکیبات خارج سلولی می باشد و بیشتر سلولها توانایی ساخت آن را در طی چند مرحله از چرخه سلولی خود دارند. مهمترین عملکرد اسید هیالورونیک در ترمیم بافتها می باشد.^(۸،۹) این ماده تکثیر سلولی، مهاجرت و آنژیوژنز را تحریک می کند. راپیتالیازاسیون و تکثیر سلولهای کراتینوسیت بازال را فعال کرده و قرارگیری کلاژن و متعاقبا تشکیل اسکار را کاهش می دهد.^(۱۱،۱۰) از جمله ویژگیهای بیومتریالها تشکیل یک ماده زمینه ای، شبه ژلاتین می باشد که در صورت پیدایش آسیب، عوامل رشد موجود در آن به آسانی با گیرنده سطح سلول اتصال برقرار نموده و آغاز روند ترمیم را موجب می شود.^(۱۲) اگرچه برخی نتایج نشان داده است که اسید هیالورونیک در پیشبرد روند التهاب و تسریع ترمیم زخم نقش بسزایی ندارد.^(۱۳-۱۵) از دیگر بیومتریالهای موثر بر ترمیم زخم می توان به "ماده جی" اشاره کرد که مهمترین اجزا این ماده شامل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع، اسید لیونولیک، اسید اولئیک می باشد.^(۱۶) اسیدهای چرب غیر اشباع نقش مهمی در انتقال و تنظیم سیگنالهای بین سلولی و تکثیر سلولهای اپی تلیال دارند و پیش ساز اصلی برای عوامل التهابی موثر در ترمیم زخم می باشند و همچنین موجب بسته شدن سریعتر زخم نسبت به گروه کنترل می گردد.^(۱۷-۱۹) همچنین از جمله بیومتریالهایی که می تواند باعث تسریع در ترمیم زخم شود می توان به ترکیب موکوزامین اشاره کرد. این ترکیب شامل هیالورونیک اسید و آمینو اسید می باشد.^(۲۰،۲۱) در راستای ادعای شرکت سازنده ترکیب این مواد دارای ویژگی ترمیم کننده مخاط دهانی، کاهش درد و بهبود سریع نواحی آسیب دیده در دهان و رفع التهابات مخاط دهانی ناشی از شیمی درمانی و پرتودرمانی می باشد.^(۴،۵) یکی از موارد مهم در درمانهای دندانپزشکی مدیریت زخم بافت نرم است و از آنجایی که شواهد علمی در ارتباط با کاربرد ترکیبات موضعی جهت تسریع در ترمیم موجود است، به دنبال استفاده از این روش برای تسریع در ترمیم بوده و برآن شدیم تا در این مطالعه از ترکیب موکوزامین در فاز

روش انجام آزمون

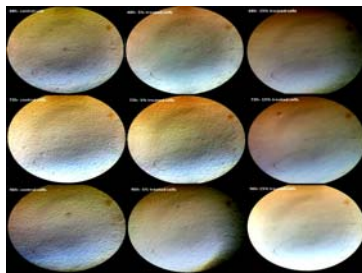
استثنای سلول می‌باشد). سپس درپوش قرار داده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه تکان دهنده دوار، تکان داده شد. در نهایت مقدار جذب نوری در طول موج ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت اسپکتروفوتومتری ثبت شد.^(۲۳)

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفوتومتری به نرم افزار SPSS وارد شده و آزمون واریانس یک طرفه، واریانس دوطرفه و مقایسه میانگین، بر روی گروه‌های مورد مطالعه انجام پذیرفت. مقدار عدد پی کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد و نمودارهای مربوطه توسط ماکروسافت اکسل ۲۰۱۳ رسم شد.

یافته‌ها:

نتایج آزمون آماری نشان داد غلظت‌های مختلف ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلول‌های فیبروبلاست انسانی دارای اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشند. نتایج نشان داد حتی غلظت‌های ۱ درصد موزامین در طی دوره باعث کاهش چگالی نوری سلول‌های فیبروبلاست انسانی گردیده است و در نتیجه نشان دهنده اثر سمیت ترکیب موزامین می‌باشد. (شکل ۱)



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف ترکیب موزامین بر روی سلول‌های فیبروبلاست تیمار شده در بازه زمانی مختلف. به ترتیب از چپ به راست شامل نمونه شاهد، ۵٪ و ۱۵٪ ترکیب موزامین و از بالا به پایین به ترتیب ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت. نتایج نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت می‌باشد.

همچنین نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد اختلاف معنی داری در اثر سمیت غلظت‌های مختلف موزامین بر روی رشد سلول‌های فیبروبلاست وجود دارد. نتایج نشان داد با

در این روش رده سلولی فیبروبلاست انسانی با استفاده از محیط کشت دالبکو بهینه شده حاوی ۱۰٪ FBS در فلاسک ۷۵ سانتیمتری در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۰٪ رطوبت کشت داده شده و پس از رسیدن به تراکم ۲۰٪ (معادل 1×10^5 سلول) جهت تیمار آماده شدند. سلول‌ها با استفاده از فرمول $C_1V_1=C_2V_2$ به مقدار ۵۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر رقیق شدند. برای افزایش رقت محلول از محیط رشد غذایی استفاده شد.

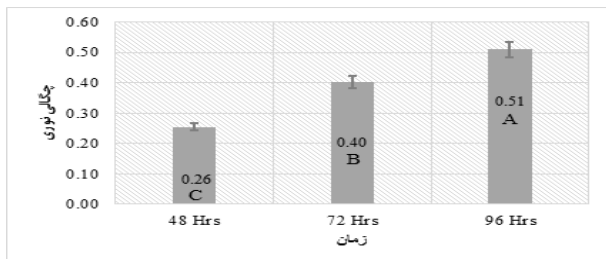
۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی محیط دالبکو بهینه شده و ۱۰ درصد FBS و درصد‌های مشخصی از داروی موزامین تعویض گردید. به دلیل ناپایداری ترکیبات دارو در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتیگراد محیط کشت سلول‌ها هر ۲۴ ساعت با محیط جدید تعویض گردید.^(۲۳)

به منظور بررسی اثر دارو بر میزان رشد سلول‌های فیبروبلاست انسانی، سلول‌ها در بازه زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته در سه پلیت جداگانه برای غلظت‌های ۰/۱٪ تا ۱٪ از داروی موزامین در سه تکرار تیمار گردید. همچنین به منظور بررسی اثر غلظت‌های ۱ درصد تا ۱۵ درصد داروی موزامین در طی ۴۸ ساعت در پلیت‌های جداگانه سلول‌های فیبروبلاست انسانی در سه تکرار تیمار گردیدند.

در پایان مدت زمان تیمار، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی ۱۰ درصد (MTT) جایگزین گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و غلظت دی‌اکسید کربن ۵ درصد تا شکل‌گیری کریستال‌های نامحلول فورمازان نگهداری گردید. (سلول‌ها توسط محلول نمکی فسفات بافر شستشو نشد).

سپس به هر چاهک از پلیت کشت سلول ۱۰۰ ماکرولیتر حلال (MTT) معادل حجم محیط کشت اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. به یکی از چاهک‌های پلیت کشت سلول به عنوان نمونه خالی محیط کشت، محلول (MTT) و حلال اضافه گردید (نمونه‌های خالی حاوی تمام ترکیبات تست (MTT) به

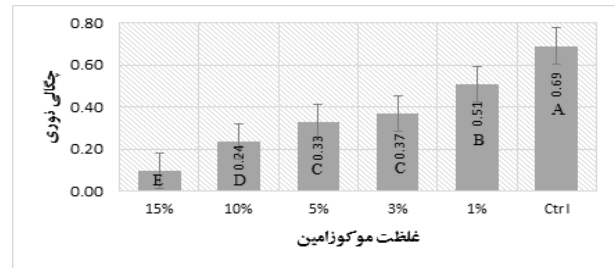
همچنین نتایج آماری نشان داد غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست در بازه زمانی ۴۸ تا ۹۶ ساعت دارای اختلاف معنی داری می باشد. ($P < 0.01$) نتایج مقایسه میانگین نشان داد با افزایش زمان تیمار سلولهای فیروبلاست، چگالی نوری سلولهای فیروبلاست افزایش پیدا کرده است. بیشترین افزایش چگالی نوری بعد از ۹۶ ساعت تیمار سلولهای فیروبلاست می باشد و کمترین میزان چگالی نوری بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلولهای فیروبلاست وجود داشته است (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثر ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست در طی دوره ۴۸ تا ۹۶ ساعت. میانگین های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۱ می باشند.

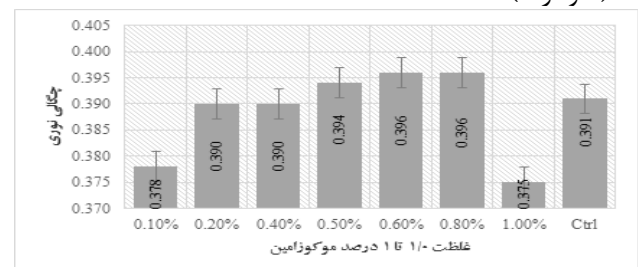
افزایش چگالی نوری سلولهای فیروبلاست به علت رشد سلولهای فیروبلاست تحت تاثیر محیط غذایی روزانه و ترمیم سلولها می باشد. نتایج تحلیل آماری نشان داد اثر متقابل زمان و غلظت مختلف ترکیب موزامین معنی دار نمی باشد. ($P < 0.001$) نتایج نشان داد در تمامی گروه های مورد آزمون با افزایش غلظت ترکیب موزامین اثر معنی داری بر روی رشد سلولهای فیروبلاست نداشته است و در بازه های زمانی مختلف همگام با افزایش رشد سلولی در گروه کنترل افزایش رشد سلولی در گروه های مورد تیمار مشاهده شده است. همچنین نتایج نشان داد با افزایش مدت زمان تیمار سلولهای فیروبلاست چگالی نوری سلولهای فیروبلاست انسانی افزایش پیدا کرده است. (نمودار ۴)

افزایش غلظت موزامین، چگالی نوری سلولهای فیروبلاست انسانی به نحو معنی داری کاهش یافت. نتایج نشان داد بیشترین کاهش چگالی نوری سلولهای فیروبلاست انسانی در غلظت ۱۵ درصد ترکیب موزامین مشاهده گردید (نمودار ۱)



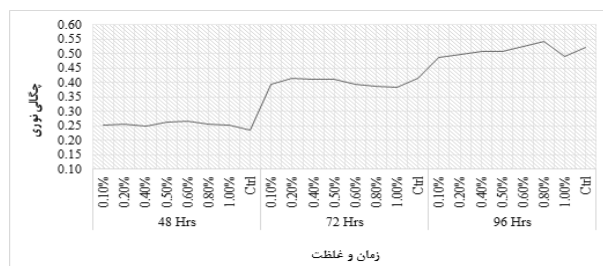
نمودار ۱- اثر متقابل غلظت های ۰/۱ تا ۱ درصد ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست در بازه زمانی ۴۸ تا ۹۶ ساعت

همچنین نتایج تجزیه آماری نشان داد غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست اثر اختلاف معنی داری ندارد. ($P < 0.041$) اگرچه نتایج نشان داد در مقایسه با گروه شاهد، غلظت ۱ درصد ترکیب موزامین موجب کاهش چگالی نوری سلولهای فیروبلاست گردید. این نتیجه در آزمون قبلی در مورد اثر غلظت های ۱ تا ۱۵ درصد ترکیب موزامین گزارش گردیده است و تایید کننده اثر سمیت غلظت ۱ درصد ترکیب موزامین بر روی رشد سلولهای فیروبلاست می باشد. نتایج مقایسه میانگین ها نشان می دهد به طور کلی غلظت های ۰/۵ تا ۰/۸ به صورت جزئی اثر افزایش بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست دارند و غلظت های پایین تر ترکیب موزامین اثر افزایش دهنده بر روی رشد سلولهای فیروبلاست نداشته است (نمودار ۲).



نمودار ۲- اثر غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد ترکیب موزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیروبلاست

آسیب پریدونتال خواهد شد.^(۲۶) در حالی که بر خلاف این نتایج در برخی گزارش‌ها عنوان شده است که اسید هیالورونیک در پیشبرد روند التهاب و تسریع ترمیم زخم نقش بسزایی ندارد.^(۱۴، ۲۵)



نتیجه گیری:

بر پایه یافته‌های این پژوهش ترکیب موکوزامین با ماده موثره اسید هیالورونیک و اسید آمینه در غلظت‌های کمتر از ۱ درصد نقش بسزایی در ترمیم زخم و رشد سلولهای فیبروبلاستی ندارد در عین حال افزایش طول دوره تا ۹۶ ساعت موجب افزایش رشد سلولی و یا چگالی نوری سلولهای فیبروبلاستی گردیده است. همچنین یافته‌های این پژوهش نشان داد غلظت‌های بالای یک درصد اسپری موکوزامین اثر سمیت بر روی سلولهای فیبروبلاستی دارد. البته برای اثبات عملکرد این ترکیب در بهبود ترمیم زخم و رشد سلولهای فیبروبلاستی و کاربرد بالینی آن نیاز به بررسی بافت شناختی و بالینی بیشتری می‌باشد.

پیشنهادات

با توجه به یافته‌های این مطالعه اثر دیگر ترکیب‌های بهبود دهنده زخم بر روی سلولهای فیبروبلاستی پیشنهاد می‌گردد. همچنین مطالعه اثر ترکیب موکوزامین بر روی میکروارگانسیم‌های حفره دهان پیشنهاد می‌گردد. همچنین تاثیر ترکیب موکوزامین در بهبود ترمیم زخم و رشد سلولهای فیبروبلاستی در تیمار بالینی پیشنهاد می‌گردد.

نمودار ۴- اثر متقابل غلظتهای ۰/۱ تا ۱ درصد ترکیب موکوزامین بر روی چگالی نوری سلولهای فیبروبلاست در بازه زمانی ۴۸ تا ۹۶ ساعت

بحث:

امروزه برای کاهش عوارض جراحی پریدونتال و سرعت در روند بهبودی زخم از اسید هیالورونیک استفاده می‌شود. همچنین امروزه از بیومتریال‌ها در استفاده جایگزین اسید هیالورونیک پیشنهاد شده است و بسیاری از آنها اثر بهتری در تسریع روند ترمیم زخم و کاهش التهاب زخم داشته‌اند.^(۴) فرآیند بهبودی شامل دو فاز التهاب و ترمیم است. التهاب در واقع پاسخ محافظتی است که برای برطرف نمودن دلیل آسیب سلولی و پیامدهای این آسیب که سلولها و بافتهای نکروزه هستند، عمل می‌کند. این پاسخ، زمانی پایان می‌یابد که محرک مذکور بر طرف گردیده و واسطه‌های التهابی تجزیه شوند. سلولهای التهابی فراخوانده شده به محل، بقایای نکروتیک را پاکسازی نموده و فرایند سنتز ماده زمینه‌ای خارج سلولی تازه را نیز فعال می‌کنند.

در نتیجه ترمیم، در فرآیند آماسی بسیار زود هنگام آغاز شده و شامل فرایندهای پاسخ التهابی، فیبروپلازی، نوواسکولاریزاسیون و بازسازی سطح زخم بوسیله اپی-تلیزاسیون می‌باشد.^(۲۵-۲۲) در برخی مطالعات آمده است که استفاده موضعی اسید هیالورونیک بر روی زخم تکثیر و مهاجرت سلولی را در بافت در حال ترمیم القا نموده و موجب سرعت بخشیدن در روند بهبودی می‌گردد.^(۲۶، ۲۷) همچنین در برخی مطالعات دیگر آمده است که کاربرد موضعی اسید هیالورونیک بر موضع زخم موجب سرعت در روند بهبودی و

References:

- Gurtner, GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193), 314-21.
- Farnoush A. Techniques for the protection and coverage of the donor sites in free soft tissue grafts. *J Periodontol* 1978; 49(8): 403-5.
- Sachs HA, Farnoush A, Checchi L, Joseph CE. Current status of periodontal dressing. *J Periodontol* 1984; 55(12): 689-96.
- Ghanbari H, Sagharvanian N, Zakeri M, Mahdavisahri N, Baradarannasari E, Zarian E. Histological examination of Curcuma longa-Ghee in mixture with Hyaluronic acid on gingiva repair after gingivectomy in dog. *J Dent Shiraz Univ Med Sci* 1387; 9(3): 222-234
- Loe H, Silness J. Tissue reaction to a new gingivectomy pack. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961; 14: 1305-14.
- Pesson G, Thilander H. Experimental studies of surgical packs. 1. In vitro experiments on antimicrobial effect. *Odontol Tidskr* 1968; 76(2): 147-55.
- Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6(6): 393-402.
- Laurent TC. Structure of hyaluronic acid. In: Balazs EA, editor. *Chemistry and molecular biology of the intracellular matrix*. London, New York: Academic Press 1970; p.703-732.
- Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 1999; 7(2):79-89.
- Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2 (5):839-44.
- LeBaron RG, Zimmermann DR, Rouslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 1992; 267(14): 10003-10.
- Xu Y, Hofling K, Fimmers R, Frentzen M, Jervoe-storm PM. Clinical and microbiological effects of topical subgingival application of hyaluronic acid gel adjunctive to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *J periodontol* 2004; 75(8): 1114-18.
- Rajspaksa SP, Cowin A, Adams D, Wormald PJ. The effect of a hyaluronic acid – based pack on mucosal healing in a sheep model of sinusitis. *Am J Rhinol* 2005; 19(6): 572-6.
- Nezwek RA, Caffesse RG, Bergenholtz A, Nasjleti CE. Connective tissue response to periodontal dressing. *J periodontal* 1980; 51(9): 521-9.
- Bhavbhuti M. Ragi (Eleusine coracana L.)- a natural antioxidant for ghee (butter oil). *International Journal of Food Science and Technology* 2006; 41: 86-89.
- Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002;87:31-48.
- Cardoso CR, Souza MA, Ferro EA, Favoreto S Jr, Pena JD. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acid on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2004; 12(2): 235-43.
- Prasad V, Dorle AK. Evaluation of ghee based formulation for wound healing activity. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(1): 38-47.
- Mansouri SS, Ghasemi M, Salmani Z, Shams N. Clinical Evaluation of Hyaluronic acid gel on reprim of tooth papilla and aesthetic regions. *J Dent*. 1392; 25(2) 191-196 [Persian]
- Martin P, Hopkinson-wooley J, McClusky J. Growth factor and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res*1992; 4(1): 25-44.
- Hunt TK. A retrospective perspective on the nature of wound in growth factor and other aspects of wound healing. In: Barbul A, Pines E, Caldwell M, Hunt TK, editors. *Biological and clinical implication*. Philadelphia: Alan R Liss, 1988: XIII-XX.
- Skalli O, Gabbiani G. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. In: Clark RAF, Henson PM, editors. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press 1998; 373-402.
- Nezwek RA, Caffesse RG, Bergenholtz A, Nasjleti CE. Connective tissue response to periodontal dressing. *J Periodontol* 1980; 51(9): 521-9.
- Ren GY, Dong FS, Wang J, Shi PK. The effect of hyaluronic acid external film on rats wound healing. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004; 20(5): 380-3.
- King SR, Hickerson WL, Proctor KG. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery* 1991; 109(1); 76-84.
- Moseley R, Waddington RJ, Embery G. Hyaluronan and its potential role in periodontal healing. *Dent Update* 2002; 29(3): 144-48.
- Slater, T. et al. *Biochem. Biophys. Acta* 77:383. van de Loosdrecht, A.A., et al. *Journal of Immunology. Methods* 174: 311-320, 1994. Alley, M.C., et al. *Cancer Res.* 48: 589-601, 1988.