بسم الله الرحمن الرحيم
إنه من سليمان وإنه

دانشگاه فردوسی مشهد

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی

با عنوان:

بررسی هیستولوژیک برهم‌کنش سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت ویستار با داربست لثه انسان در شرایط *in vitro*

تهیه و تنظیم:

زهرا یارجانلی

استادان راهنما:

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر مریم مقدم متین

استاد مشاور:

دکتر مسعود فریدونی

تابستان ۱۳۹۰

تقدیم به:

آستان پر مهر علی بن موسی الرضا

که شوق زیارتش سختی این راه را بر من هموار نمود.

سپاس

شکرگزاری از خدای متعال به موجب این موهبت ارزنده که سبب فزونی دانش و تجربه‌ام گردید، تکلیفی است که در توان این حقیر نمی‌گنجد.

از گران‌بهاترین سرمایه‌های زندگی‌ام، خانواده عزیز و مهربانم که حضورشان همواره آرامش‌بخش زندگی‌ام بوده است، صمیمانه سپاسگزارم.

زحمات اساتید گرانقدر و بزرگوارم، جناب آقای دکتر مهدوی شهری و سرکار خانم دکتر مقدم متین را ارج نهاده و از جناب آقای دکتر فریدونی، جناب آقای دکتر بنی‌هاشم راد و جناب آقای دکتر بهرامی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و محبت‌های بی‌دریغشان که پشتوانه من در این مهم بوده است، کمال تشکر را دارم.

در پایان، برای تمام کسانی که در انجام این امر مرا یاری رساندند، به ویژه خانم‌ها ساعی نسب، ناصری، هاشمیان، پسیان، دکتر خیرآبادی، طبسی، شهابی پور و آقایان نخعی و توسلی از درگاه ایزد تعالی آرزوی توفیق و سربلندی دارم.

بررسی هیستولوژیک برهم‌کنش‌های میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت ویستار با داربست لثه انسان در شرایط *in vitro*

مقدمه: اهمیت مهندسی بافت در دندانپزشکی برگرفته از نیازهای بی‌شمار آن در بافت‌های حفره دهانی از جمله استخوان، غضروف، مخاط دهانی، پالپ و غدد بزاقی می‌باشد. با اینکه چندین نوع داربست از جمله ماتریکس‌های کلاژنی و درم سلول‌زدایی شده انسان برای مهندسی بافت دهان تولید شده‌اند، اما هیچ کدام از داربست‌های موجود از منشأ بافت‌های دهانی نمی‌باشند. تفاوت در منشأ بافت ممکن است رفتارهای سلول‌های کشت شده بر روی داربست را تحت تأثیر قرار دهد. بدین ترتیب تهیه داربستی با منشأ بافت‌های دهانی مانند لثه و کام ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: برای وصول به این هدف، بافت‌های لثه از درمان‌های دندانپزشکی، ترمیمی-پروتز و جراحی‌های دندان عقل نهفته در کلینیک تخصصی دندانپزشکی تهیه شدند. برای تهیه داربست، بافت‌ها با استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی مورد مطالعه قرار گرفتند. استفاده از انجماد آهسته در دمای صفر درجه و انجماد سریع در ازت مایع، سپس سدیم دودسیل سولفات ۱٪ به مدت ۲۴ ساعت و تریتون X-100 ۱٪ به مدت ۱۲ ساعت به عنوان بهترین روش سلول‌زدایی برای تهیه داربست از لثه انسان، در نظر گرفته شدند. داربست‌ها پس از مراحل شستشو و استریلیزاسیون، با دو میزان متفاوت ۸×۱۰^{۴} و ۸×۱۰^{۵} cells /cm^2 از سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت کشت شدند. از داربست‌های تهیه شده قبل و پس از گذشت ۱، ۲، ۴ و ۶ هفته از کشت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقاطع میکروسکوپی تهیه و با رنگ‌آمیزی‌های مختلف بررسی گردید. همچنین تعدادی از داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: مشاهده مقاطع رنگ‌آمیزی شده حاصل با میکروسکوپ نوری روشن کرد که هسته‌ها و اجزای سلولی از بافت خارج گردیده و اپیتلیوم به شکل یک توری خالی از سلول باقی مانده است. بررسی با رنگ‌آمیزی‌های مختلف، همچنین با میکروسکوپ الکترونی نگاره مشخص کرد که طی فرآیند

سلول‌زدایی، رشته‌های کلاژن در بافت همبند سالم مانده‌اند. مطالعه داربست‌ها پس از کشت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی نفوذ سلولی، مهاجرت سلول‌ها به مجاورت پاپیلاهای بافت همبند و بقایای عروق خونی، تشکیل ساختارهایی شبیه اپیتلیوم و تقسیم سلولی را نشان داد. بررسی‌های آماری داربست‌ها ۱، ۲، ۴ و ۶ هفته پس از کشت نشان داد که تراکم سلولی در هفته اول و دوم در داربست‌های کشت شده با 8×10^5 cells /cm^2 (HD) نسبت به داربست‌های کشت شده با 8×10^4 cells /cm^2 (LD) بطور معناداری ($P<0.05$) بیشتر می‌باشد. تراکم سلولی در هر دو داربست در هفته دوم افزایش معنادار و در هفته چهارم و ششم پس از کشت نیز کاهش معناداری ($P<0.05$) را نشان داد.

بحث: با توجه به نتایج حاصل، داربست تهیه شده از لثه انسان طی مراحل آماده‌سازی سالم مانده و توانست موجب القای تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت گردد. از اینرو داربست حاصل از لثه انسان، می‌تواند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی باشد. البته آزمایشات بیشتر جهت تعیین ماهیت سلول‌های تمایزیافته می‌توانند به پیشرفت دانش ما در رابطه با برهم‌کنش‌های سلول-ماتریکس کمک کنند.

کلمات کلیدی: داربست، لثه انسان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ماتریکس خارج سلولی، سلول‌زدایی

مقدمه..... I
علامت اختصاری..... IV

فصل اول: کلیات

۱-۱ لثه انسان..... ۲
۱-۱-۲ پیوند آزاد لثه..... ۵
۱-۲ سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مهاجرت از مغز استخوان و تمایز..... ۶
۱-۲-۱ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان..... ۶
۱-۲-۲ مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان به سایر بافت‌های بدن..... ۸
۱-۲-۳ تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی..... ۹
۱-۳ برهم‌کنش‌های میان سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی..... ۱۲
۱-۳-۱ ترکیب ماتریکس خارج سلولی..... ۱۲
۱-۳-۲ گیرنده‌های ماتریکس خارج سلولی..... ۱۶
۱-۳-۳ اثر ویژگی‌های سوبسترا بر رفتار سلول..... ۱۸
۱-۳-۳-۱ اثر ویژگی‌های شیمیایی سطح بر رفتار سلول..... ۱۸
۱-۳-۳-۲ اثر توپوگرافی سطح بر رفتار سلول..... ۱۹
۱-۳-۳-۳ اثر مکانیک سطح بر رفتار سلول..... ۱۹
۱-۳-۳-۴ اثر تراکم داربست بر رفتار سلول..... ۲۰
۱-۳-۴ تغییرشکل سوبسترا توسط سلول..... ۲۱
۱-۴ داربست‌های ECM..... ۲۲
۱-۴-۱ اثر روش‌های آماده‌سازی بر داربست‌های ECM..... ۲۳
۱-۴-۱-۱ اثر روش‌های سلول‌زدایی..... ۲۴
۱-۵ مهاجرت..... ۲۶
۱-۵-۱ شیوه‌های مهاجرت در محیط‌های سه‌بعدی..... ۲۷
۱-۵-۲ مقایسه مهاجرت سلول‌ها در محیط‌های دوبعدی و سه بعدی..... ۲۹
۱-۶ سوابق پژوهشی..... ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ وسایل و مواد مورد استفاده در این پژوهش..... ۳۴
۲-۱-۱ وسایل مورد استفاده در این پژوهش..... ۳۴
۲-۱-۲ مواد مورد استفاده در این پژوهش..... ۳۵

۲-۲ آماده‌سازی مواد و محلول‌های مورد استفاده ۳۷
۲-۲-۱ تهیه PBS ۳۷
۲-۲-۲ تهیه غلظت های مختلف از محلول SDS و تریتون X-100 ..... ۳۷
۲-۲-۳ تهیه محیط کشت ذخیره ۳۸
۲-۲-۴ تهیه محیط کشت مصرفی ۳۹
۲-۲-۵ استریلیزاسیون وسایل ۳۹
۲-۳ آماده‌سازی داربست از بافت لثه انسان ۴۰
۲-۳ استحصال و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت با داربست ۴۲
۲-۳-۱ استحصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت ویستار ۴۲
۲-۳-۲ پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت ۴۳
۲-۳-۳ رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با DiI ۴۴
۲-۳-۴ کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داربست لثه انسان ۴۵
۲-۴ آماده‌سازی نمونه جهت مطالعات بافت‌شناسی ۴۵
۲-۴-۱ پاساژ بافت ۴۵
۲-۴-۱-۱ ثابت کردن ۴۵
۲-۴-۱-۲ آبگیری ۴۶
۲-۴-۱-۳ آغشتگی با پارافین ۴۶
۲-۴-۱-۴ قالب‌گیری ۴۶
۲-۴-۲ تهیه مقاطع بافتی ۴۷
۲-۴-۲-۱ ژلاتینه‌کردن لام‌ها ۴۷
۲-۴-۲-۲ برش‌گیری ۴۷
۲-۴-۳ رنگ‌آمیزی ۴۸
۲-۴-۳-۱ رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین هاریس - ائوزین (H&E) ۴۸
۲-۴-۳-۲ رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین وایگرت – پیک‌ایندیگو کارمین (H&P) ۴۹
۲-۴-۳-۳ رنگ آمیزی پیکروسیروس رِد ۵۰
۲-۴-۳-۴ رنگ‌آمیزی پیکروفوشین ۵۰
۲-۴-۳-۵ رنگ آمیزی با کارمین ۵۱
۲-۴-۳-۶ رنگ‌آمیزی با DAPI ۵۱
۲-۵ آماده سازی نمونه‌ها جهت مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره ۵۲
۲-۶ آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعات میکروسکوپ الکترونی گذاره ۵۳

۲-۷ محاسبات آماری ۵۴
فصل سوم: نتایج
۳-۱ مطالعه اثر فرآیند سلول‌زدایی بر بافت لثه ۵۵
۳-۱-۱ مطالعه بافت‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری ۵۵
۳-۱-۲ مطالعه بافت‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره ۶۲
۳-۲ مطالعه داربست‌های کشت شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۶۳
۳-۲-۱ مطالعه داربست‌های با استفاده از میکروسکوپ نوری ۶۳
۳-۲-۱-۱ نمونه‌های هفته اول ۶۳
۳-۲-۱-۲ نمونه‌های هفته دوم ۶۶
۳-۲-۱-۳ نمونه‌های هفته چهارم ۶۸
۳-۲-۱-۴ نمونه‌های هفته ششم ۷۱
۳-۲-۲ مطالعه داربست‌های کشت شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ۷۲
۳-۲-۲-۱ مطالعه داربست‌های هفته اول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره ۷۲
۳-۲-۲-۲ مطالعه داربست‌های هفته دوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره ۷۲
۳-۳ آنالیزهای آماری ۷۳
فصل چهارم: بحث
۴-۱ اثر فرآیند سلول زدایی بر بافت لثه انسان ۷۶
۴-۲ استقرار و نفوذ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست لثه انسان ۷۹
۴-۳ اثر میتوژنیک داربست لثه انسان بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۸۰
۴-۴ برهم‌کنش سلول‌های بنیادی مزانشیمی با اپیتلیوم داربست لثه انسان ۸۱
۴-۵ مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بقایای حوضچه‌های خونی داربست ۸۳
۴-۶ تخریب بافت همبند داربست توسط سلوهای بنیادی مزانشیمی ۸۵
۴-۷ کاهش تراکم سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هفته‌های آخر کشت ۸۶
۴-۸ مقایسه دو داربست کم تراکم و پرتراکم ۸۷
۴-۹ پیشنهاد استفاده از داربست لثه انسان در مهندسی بافت ۸۸
منابع فارسی ۹۰

در سال‌های اخیر، واژه ماتریکس زیستی جایگاه مهمی در تحقیقات زیست شناسی و پزشکی کسب نموده است. تلاش در جهت شناخت بیشتر ماتریکس بافت‌ها و بررسی امکان بکارگیری مواد موجود در آن در تحقیقات مهندسی بافت[۱]، یکی از اهداف تجاری سازی اینگونه تحقیقات می‌باشد. در این پروژه سعی شده است، برهم‌کنش[۲]های سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت با داربستی از ماتریکس بافت لثه، مطالعه و بررسی گردد.

در سال ۱۹۹۳ میلادی Langer و Vacanti مهندسی بافت را به عنوان یک حوزه مطالعاتی جدید معرفی نمودند که در آن، اصول مهندسی و زیست شناسی جهت اصلاح بافت آسیب دیده بکار گرفته می‌شود و موجب تجدید، ترمیم و حفظ عمل بافت می‌گردد (۴). سلول‌ها، داربست‌های سلولی و فاکتورهای رشد، ارکان اصلی در مهندسی بافت می‌باشند. انتخاب داربست از این جهت ضروری می‌باشد که بستری جهت اتصال سلول‌ها فراهم نموده (۵) و سلول‌ها را قادر می‌سازد تا رفتارهای موردنیاز جهت تولید بافت‌ها و اندام‌ها با اندازه و شکل مطلوب را بروز دهند (۶).

لثه که گردن دندان‌ها و بخشی از استخوان آلوئولار[۳] را می‌پوشاند، بافت نرمی است که از هجوم عوامل بیگانه و باکتری‌ها به داخل بافت‌های زیرین جلوگیری می‌کند. لثه از نظر آناتومی به سه ناحیه لثه آزاد[۴]، متصل[۵] و بین دندانی[۶] تقسیم می‌گردد (۷).

۱- Tissue engineering
۲- Interaction
۳- Alveolar bone
۴- Free gingiva
۵- Connected gingiva
۷- Interdental gingiva

لثه آزاد، ناحیه‌ای از لثه است که در سطح مجاور دندان‌ها تقریباً ۲ mm به داخل و عمق پیشروی نموده و از سطح دندان‌ها توسط ناحیه ساکولار[۱] یا سرویکس[۲] جدا و آزاد می‌باشد (۱).

فیبرهای بافت لثه برخلاف فیبرهای لیگامنت پریودنتال[۳] که دندان را به استخوان آلوئولار متصل می‌کند، به نگهداری لثه در مجاورت دندان کمک می‌کند و اساساً از کلاژن نوع I تشکیل شده است. البته کلاژن نوع III نیز در ساختار لثه مشارکت دارد (۸). کلاژن به عنوان داربست[۴] طبیعی از سازش‌پذیری بالایی برخوردار می‌باشد. سازش‌پذیری یکی از مزیت‌های داربست طبیعی است و امکان جایگزینی آسان سلول‌ها و فاکتورهای رشد را فراهم می‌کند (۹). وجود کلاژن، لثه را در مقابل پیشرفت آماس مقاومتر از مخاط آلوئول نموده و می‌توان اذعان داشت که وجود لثه کراتینیزه برای حفظ سلامتی لثه اهمیت دارد (۱۰).

مهندسی بافت‌های فیبردار مانند تاندون و رباط، به استفاده از داربست‌هایی با قاعده فیبری نیاز دارد. این داربست‌ها باید از ویژگی‌های مکانیکی مناسب و تخلخل[۵] بالا برخوردار باشند تا به سلول‌های کشت شده اجازه تکثیر و ترمیم بافت را بدهند (۱۱). مهندسی بافت لثه نیز به دلیل وجود مقادیر زیاد الیاف کلاژن در لثه، به چنین داربست‌هایی نیاز دارد.

از جمله سلول‌هایی که در مهندسی بافت کاربرد شایانی دارد، سلول‌های بنیادی بالغ[۶] (ASC) می‌باشند که نقش مهمی در هموستاز و ترمیم بافت‌های بالغ ایفا می‌کنند (۱۲). زیر مجموعه‌ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) در داخل جمعیت متنوع سلول‌های استرومای مغز استخوان

۱- Sucular
۲- Cervix
۳- Periodontal ligament
۴- Scaffold
۵- Porosity
۶- Adult Stem Cells (ASCs)

وجود دارد که ویژگی‌های تعیین کننده یک سلول بنیادی (چندتوانی[۱] و تمایز) را حفظ نموده و قادر به خودتجدیدی[۲] و تمایز به چندین نوع سلول شامل استخوان، غضروف، ادیپوسیت و استرومای حمایت کننده استخوان می‌باشد (۱۳).

از اولین کاربردهای بالینی مهندسی بافت می‌توان به مهندسی بافت پوست با استفاده از فیبروبلاست‌ها[۳]، کراتینوسیت‌ها[۴] و داربست اشاره نمود که در سال ۱۹۸۰ انجام شد. اندکی پس از آن، آن، تلاش‌هایی جهت بازسازی بافت‌های دهانی، استخوان اسفنجی و پریودنتال صورت گرفت (۱۴). اهمیت مهندسی بافت در دندانپزشکی برگرفته از نیازهای بی‌شمار آن در بافت‌های حفره دهانی[۵] از جمله استخوان، غضروف، مخاط دهانی، پالپ[۶] و غدد بزاقی می‌باشد (۱۵).

از آنجا که مشکلات مربوط به ضایعات بافت‌های دهانی و دندانی، سالیانه میلیون‌ها انسان را مبتلا می‌سازد، لذا تلاش در جهت شناخت اجزای سازنده ماتریکس و بررسی تجربی اثر عوامل مذکور جهت القا و یا کنترل فعالیت‌های ژنومی[۷] در زمینه دندانپزشکی ضروری می‌باشد.

تلاش این پژوهش در جهت پاسخ به این سئوالات بوده است:

۱. آیا داربست تهیه شده طی مراحل آماده‌سازی دچار تخریب گردیده است؟

۲. آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی به داربست لثه نفوذ می‌کنند و پس از گذشت ۶ هفته از کشت زنده می‌مانند؟

۳. آیا داربست لثه موجب القای مهاجرت و تمایز در سلول‌های بنیادی می‌گردد؟

۱- Multipotential
۲- Self-renewal
۳- Fibroblasts
۴- Keratinocytes
۵- Oral cavity
۶- Pulp
۷- Genomic

Abbreviations:

α-SMA: α-Smooth Muscle Actin

2D: 2 Dimensional

3D: 3 Dimensional

Ang-1: Angiopoitin-1

BM-MSCs: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

BMPR-1A: Bone Morphogenetic Protein Receptor-1A

CFU-Fs: Colony-Forming Unit Fibroblasts

Col-I: Collagen type I

Col-III: Collagen type III

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

CTSB: Cathepsin B

CTSD: Cathepsin D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECM: Extracellular Matrix

EMT: Endothelial /or Epithelial Mesenchymal Transition

ETO: Ethylene Oxide

FA: Focal Adhesion

FBS: Fetal Bovine Serum

FG: Fibrinogen

FGF: Fibroblast Growth Factor

FN: Fibronectin

FSP1: Fibroblast-Specific Protein 1

GAG: Glycosamino Glycan

GRP75: Glucose-Regulated Protein 75

HD: High Density

H&E: Harris Hematoxylin & Eosin

H&P: Wigert Hematoxylin & Pik indigo carmin

HSC-3: Human oral Squamous carcinoma Cell line 3

LD: Low Density

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MMP: Matrix Methalo Proteinase

MnSOD: Manganese Superoxide Dismutase

MSC: Mesechymal Stem Cell

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor

PAS: Periodic Acid Schiff

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PGA: Poly Glycolic Acid

PHB: Prohibitin Blocking peptide

P-MSC: Placental Mesenchymal Stem Cell

RGD: arginine-glysine-aspartic acid

Sca1: Spinocerebellar Ataxia type1

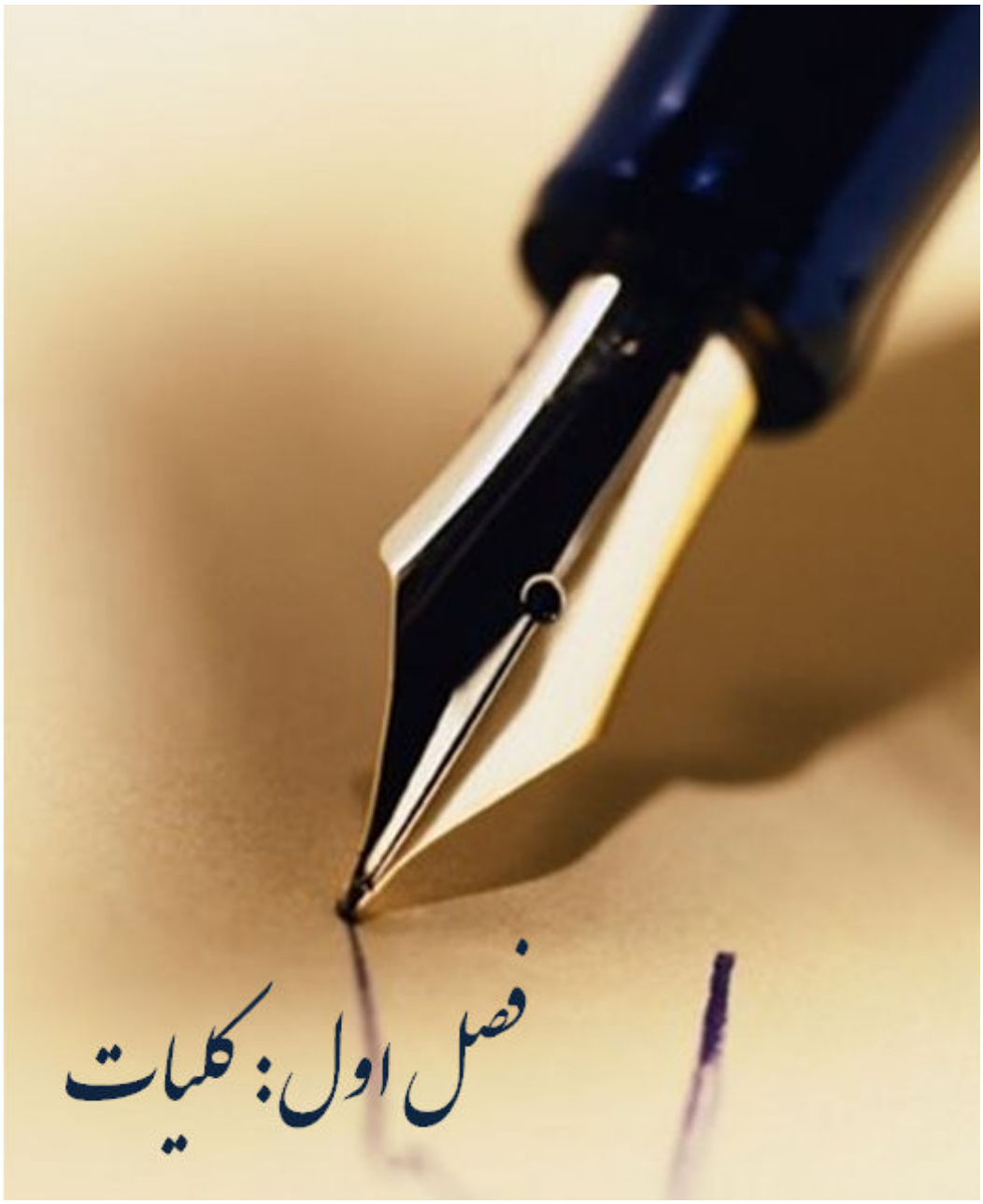
TGF-β: Transforming Growth Factor-β

Tn-C: Tenasin C

UC-MSC: Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell



فصل اول: کلیات

۱-۱ لثه انسان

۱-۱-۱ بافت شناسی لثه انسان

مخاط دهان از سه ناحیه مخاط جونده[۱]، مخاط تخصص‌یافته[۲] و مخاط پوشاننده[۳] دهان تشکیل شده است. مخاط جونده شامل لثه و بخش‌های پوشاننده کام سخت می‌باشد، مخاط تخصص‌یافته پشت زبان را می‌پوشاند و سایر نواحی باقی مانده در حفره دهان توسط مخاط پوشاننده پوشیده می‌شود.

لثه بخشی از مخاط جونده است که زواید آلوئولی فک‌ها را می‌پوشاند و گردن دندان‌ها را احاطه می‌کند. درمقایسه با بافت نرم پوشاننده لب‌ها و گونه‌ها، اغلب لثه اتصال محکمی به استخوان زیرین تشکیل می‌دهد که به مقاومت در برابر سایش با مواد غذایی کمک می‌کند (۷). لثه سالم بطور معمول ارغوانی رنگ می‌باشد. تغییر رنگ به ویژه افزایش قرمزی، همراه با تورم و افزایش تمایل به خونریزی، نشان دهنده وجود التهاب است که احتمالاً در نتیجه تجمع پلاک باکتریایی ایجاد گردیده است (۹).

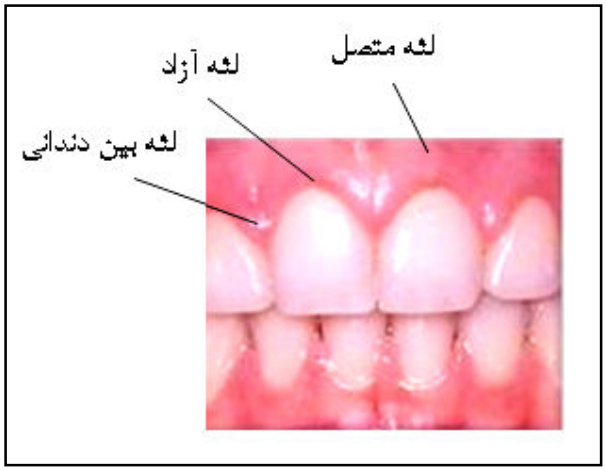
لثه از نظر آناتومیکی به سه ناحیه مارژینال[۴] (آزاد)، متصل (چسبیده[۵]) و بین دندانی تقسیم می‌گردد (شکل ۱).

لثه آزاد: حاشیه یا لبه پایانی لثه است که دندان‌ها را مانند یقه احاطه می‌کند. در حدود ۵۰٪ از افراد، لثه آزاد توسط یک شیار خطی کم عمق به نام شیار لثه آزاد از لثه متصل مجاور جدا می‌گردد.

۱- Masticatory mucosa
۲- Specialized mucosa
۳- Lining mucosa
۴- Marginal gingiva
۵- Attached gingiva

لثه متصل: لثه متصل سخت، کشسان و چسبیده به لثه آزاد می‌باشد؛ همچنین اتصال محکمی به پریوستئوم[۱] استخوان آلوئولی زیرین دارد.

لثه بین‌دندانی: لثه بین‌دندانی بخشی از لثه است که بین دندان‌ها قرار گرفته و می‌تواند به شکل هرم یا گردنه‌ای باشد.



شکل ۱-۱ لثه از ۳ بخش لثه متصل، لثه آزاد و لثه بین دندانی تشکیل شده است (۱۶).

بافت مخاط دهان از دو جزء اپیتلیوم سنگفرشی مطبق و بافت همبند در زیر آن، تشکیل شده است. اپیتلیوم سنگفرشی مطبق پوشاننده دهان را اپیتلیوم دهان می‌نامند که سلول اصلی آن مانند سایر اپیتلیوم‌های سنگفرشی مطبق، کراتینوسیت می‌باشد. اپیتلیوم مخاط جونده در مقایسه با سایر مناطق حفره دهان ضخامت متوسطی دارد، این اپیتلیوم اغلب از نوع ارتوکراتینیزه[۲] و به ندرت پاراکراتینیزه[۳] می‌باشد. در اپیتلیوم ارتوکراتینیزه لایه دانه‌دار وجود داشته و سلول‌های لایه شاخی مرده‌اند اما اپیتلیوم پاراکراتینیزه فاقد لایه دانه‌دار می‌باشد و هسته‌های پیکنوزی در لایه شاخی حفظ می‌شوند.

۱- Periosteom
۲- Orthokeratinized
۳- Parakeratinized

عملکرد اصلی اپیتلیوم لثه حفاظت از ساختارهای عمقی است، درحالی‌که اجازه تبادل انتخابی با محیط دهان را می‌دهد (۷).

بافت همبند پشتیبانی کننده اپیتلیوم دهان، لامینا پروپریا[۱] (کوریون) نامیده می‌شود که از سلول‌ها، عروق خونی، عناصر عصبی و رشته‌ها تشکیل شده است. لامینا پروپریا ضخیم است و شامل شبکه متراکمی از رشته‌های کلاژن می‌باشد که این رشته‌ها به شکل دسته‌های بزرگ نزدیک هم قرار گرفته‌اند. لامینا پروپریا شامل انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله فیبروبلاست‌ها، ماکروفاژها، ماست‌سل‌ها و سلول‌های التهابی می‌باشد. سلول اصلی لامینا پروپریا در مخاط دهان فیبروبلاست است که مسئول ساخت و تجدید سازمان پیش‌سازهای رشته‌ها و ماده بنیادی می‌باشد. منطقه اتصال بافت همبند لامینا پروپریا به اپیتلیوم پوشاننده دهان دارای چین خوردگی هایی می‌باشد که در آن پاپیلای بافت همبندی و برجستگی‌های اپیتلیالی به صورت اتصالات انگشتی به هم جفت می‌شوند. این آرایش باعث می‌شود نیروهای وارد بر سطح اپیتلیوم، بر روی ناحیه وسیعتری از بافت همبند انتشار یابند.

ماتریکس بین سلولی لامینا پروپریا از دو نوع رشته اصلی کلاژن و الاستین[۲] همراه با فیبرونکتین[۳] تشکیل شده است. در آستر مخاط بیشتر کلاژن نوع I و III و در غشای پایه[۴] کلاژن نوع IV و VII دیده می‌شود. در بسیاری از مناطق مخاط دهان برخی از رشته‌های الاستیک قابل رؤیت می‌باشند، اما بطور معمول این رشته‌ها در مخاط پوشاننده که قابلیت انعطاف دارد، دیده می‌شوند.

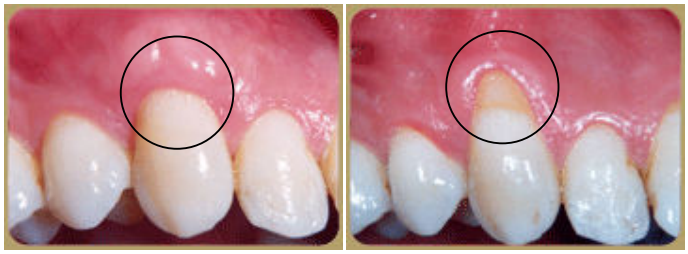
ماده بنیادی لامینا پروپریا در زیر میکروسکوپ نوری و الکترونی بی‌شکل است و از نظر مولکولی شامل کمپلکس‌های ناهمگونی از پروتئین–کربوهیدرات می‌باشد. پروتئوگلیکان‌های مخاط دهان شامل

۱- Lamina propria
۲- Elastin
۳- Fibronectin
۴- Basal lamina

هیالورونان[۱]، هپاران سولفات[۲]، biglycan، syndecan، versican و decorin می‌باشد. پروتئوگلیکان‌های موجود در ماتریکس با پروتئوگلیکان‌های سطح سلول متفاوتند و واکنش متقابل بین آن‌ها و مولکول‌های سطحی سلول (مانند اینتگرین[۳]ها) در تنظیم و تعدیل رفتار و فعالیت سلولی حائز اهمیت می‌باشد (۲).

۱-۱-۲ پیوند آزاد لثه[۴]

تکنیک پیوند آزاد لثه (شکل ۲-۲) به منظور افزایش عرض لثه متصل و پوشاندن ریشه دندان صورت می‌گیرد و شامل انتقال تکه‌ای از مخاط دهانی کراتینیزه (لثه یا کام سخت) به جایگاه گیرنده می‌باشد. این تکنیک اولین بار توسط Bjorn در سال ۱۹۶۳ انجام شد. به دلیل زخم‌های وسیعی که گاهی در جایگاه دهنده ایجاد می‌گردد، در بعضی از مطالعات از مواد دیگری از جمله سخت شامه و صلبیه لیوفیلیزه[۵] برای جایگزینی بافت لثه استفاده شده که نتایج رضایت بخشی را به همراه داشته‌اند (۷).



شکل ۲-۲ لثه را قبل و بعد از پیوند آزاد لثه نشان می‌دهد (۱۷).

۱- Hyaluronan
۲- Heparan sulfate
۳- Integrin
۴- Free gingival grafting
۵- Lyophilized

۱-۲ سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مهاجرت[۱] از مغز استخوان و تمایز

۱-۲-۱ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان[۲]

برای اولین بار آسیب شناس آلمانی Julius Cohnheim در سال ۱۸۶۷ حضور سلول‌های بنیادی غیرخونساز[۳] در مغز استخوان را بر اساس مشاهداتش پیشنهاد کرد. بیش از یک قرن بعد، Alexander Friedenstein، MSC را از استرومای مغزاستخوان استخراج و به عنوان فیبروبلاست‌های تشکیل دهنده واحد کلنی[۴] (CFU-Fs) معرفی نمود و قدرت تمایز آن‌ها به سلول‌های تشکیل دهنده استخوان را نشان داد. بعدها Pittenger و همکارانش نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی غیرخونساز مغز استخوان، هنگامی که در معرض تنظیم کننده‌هایی مانند فاکتورهای رشد و شرایط کشت خاص قرار می‌گیرند، پتانسیل تمایز به کندروسیت[۵]، استئوبلاست[۶] و ادیپوسیت را دارند. Caplan سلول‌های سلول‌های بنیادی غیرخونساز مغز استخوان را سلول‌های بنیادی مزانشیمی نامید. بعدها گروه‌های پژوهشی مختلفی برای بازسازی بافت‌ها و اندام‌های ناکارآمد، پتانسیل تمایز MSC به بافت‌های همبند متعدد را بطور گسترده بررسی نمودند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر مورفولوژیکی با یک جسم سلولی کوچک با چند زایده سلولی باریک و طویل مشخص می‌شوند. جسم سلولی آن‌ها دارای یک هسته بزرگ و گرد با یک هستک مشخص و حاوی مقادیر اندکی از اندامک‌های سلولی می‌باشد (۱۸).

۱- Immobilization

۲- Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs)

۳- Non hematopoitic

۴- Colony-Forming Unit Fibroblasts (CFU-Fs)

۵- Chondrocyte

۶- Osteoblast