

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ZOOLOGIE A ORNITOLOGICKÁ LABORATOŘ



## Vývoj zubu během erupce

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Bc. Radka Dudková**

Studijní program: Tělesná výchova a sport  
Studijní obor: Tělesná výchova – učitelství biologie pro střední školy  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: RNDr. Vlasta Lungová Ph.D.**

**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití uvedené literatury, vlastních poznatků a po konzultacích s vedoucí práce RNDr. Vlastou Lungovou Ph.D..

V Olomouci dne 5. 1. 2013

.....

Radka Dudková

**Poděkování:**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí práce RNDr. Vlastě Lungové Ph.D. za odborné vedení, konzultace, vstřícný přístup a cenné rady, které mi poskytla během zpracovávání této práce. Také bych chtěla poděkovat Laboratoři embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v. v. i. v Brně za finanční podporu této práce. Poděkování také patří panu Jaroslavu Pechovi za pomoc při grafickém zpracování. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a přátelům za psychickou a morální podporu.

## **Bibliografická identifikace:**

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Radka Dudková

**Název práce:** Vývoj zubu během erupce

**Typ práce:** Diplomová práce

**Pracoviště:** Katedra zoologie a ornitologická laboratoř

**Vedoucí práce:** RNDr. Vlasta Lungová Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2013

## **Abstrakt:**

Aby zub mohl splňovat svou funkci, musí se dostat do okluzní roviny, k čemuž dochází během jednoho ze základních vývojových stádií zubu, při jevu zvaném erupce.

Tato práce se zabývá postnatálním vývojem myšního mandibulárního moláru M1, se zaměřením na procesy probíhající právě během erupce. K hlavním procesům patří prodlužování zubního kořene v souvislosti s cementogenezí a depozicí kořenového dentinu, dále integrace zubu do okolní alveolární kosti, tvorba a upevnění periodontálních vazů a vznik epitelové manžety.

Cílem práce bylo sledovat pomocí imunohistochemických, biochemických a substrátových metod hlavní morfogenetické procesy, které určují finální morfologii a ukotvení myšního mandibulárního moláru M1 do okolní alveolární kosti. Experimentálně byla zpracována zejména stadia při erupci zubu a to postnatální stadium P16, P20 a P22. Časoprostorové hodnocení proliferace, apoptózy a jejich korelace s aktivitou osteoklastů ukázalo, že intenzivní dělení buněk probíhá především v oblasti tvořící se epitelové manžety a rozšiřujícího se periodontia. Apoptóza se sporadicky vyskytovala v okolní alveolární kosti, ale i v oblasti dentální pulpy. Neustále se vyvíjející periodontium společně s epiteliální manžetou tlačí na stěny zubního lůžka. Toto zjištění koreluje s pokračující remodelací okolní kosti. Detekce aktivních osteoklastů podél vnitřního okraje alveolu potvrdila pokračující resorpci a remodelaci zubního lůžka. Nejzajímavější výsledky se však týkají především funkční přestavby závěsného aparátu zubu. K definitivnímu napojení vláken periodontálních vazů na povrch zubu a okolní kosti dochází postupně - nejprve na linguální a posléze i na bukální straně zubu.

**Klíčová slova:** Molár, erupce, proliferace, apoptóza, osteoklasty

**Počet stran:** 56

**Počet příloh:** 8

**Jazyk:** Čeština

Souhlasím s půjčováním diplomové práce v rámci knihovních služeb.

**Bibliographical identification:**

**Author's first name and surname:** Bc. Radka Dudková

**Title:** Tooth development during eruption

**Type of thesis:** master

**Department:** Department of zoology and laboratory of orinthology

**Supervisor:** RNDr. Vlasta Lungová Ph.D.

**The year of presentation:** 2013

**Abstract:**

In order to fulfill its function, a tooth must get into occlusal plane. This happens during one of the basic evolutionary phases which is called eruption.

This Thesis deals with the postnatal development of mouse mandibular molar M1 with a focus on processes, which take place during the phase of eruption. Lengthening of the main root in connection with cementogenesis and deposition of root dentin, integration of a tooth into the environment of alveolar bone, formation and attachment of periodontal ligaments, and creation of junctional epithelium are amongst the main processes.

The aim of the Thesis was to observe main morphogenetic processes which determine final morphology and anchoring of mouse mandibular molar M1 into surrounding alveolar bone with the help of immunohistochemical, biochemical, and substrate methods. An experiment was used mainly for the eruption of the tooth which is postnatal stages P16, P20 and P22. Space-time evaluation of proliferation, apoptosis, and their correlation with osteoclasts has shown that intensive division of cells take places mainly in the area of forming junctional epithelium and broadening periodontium. Apoptosis occurred sporadically in the environment of alveolar bone as well as around dental pulp. Continuously evolving periodontium, along with junctional epithelium presses on sides of the alveolar crypts. This finding correlates with continuing remodeling of the surrounding bone. Detection of active osteoclasts along the inner margin of alveolar crypt confirmed continuing resorption and remodelation of alveolar process. Nevertheless, the most interesting results concern mainly functional reconstruction of pendant tooth apparatus. Definitive connection of fibers of periodontal

ligaments on a surface of a tooth and a surrounding bone takes place progressively – at first on lingual and then also buccal side of the tooth.

**Keywords:** Molar, eruption, proliferation, apoptosis, osteoclasts

**Number of pages:** 56

**Number of appendices:** 8

**Language:** Czech

I agree the thesis paper to be lent within the library service.

## SEZNAM ZKRATEK

ab	alveolární kost (Alveolar Bone)
am	ameloblasty (AMeloblasts)
CAM	celulární adhezivní molekuly (Cell Adhesion Molecules)
cd	dentin korunky (Crown Dentin)
cem	cement (CEMent)
DAB	3,3'- diaminobenzidin tetrachloride
DNA	deoxyribonukleová kyselina (DeoxyriboNucleic Acid)
E	embryonální den (Embryonic Day)
e	sklovina (Enamel)
EDTA	pufrovaná kyselina ethylendiamintetraoctová (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EFA	zóny bez skloviny (Enamel Free Areas)
ff	okrajová vlákna cementu (Fringe Fibers)
g	dáseň (Gingiva)
G <sub>1</sub>	první růstová fáze, postmitotická (Gap 1 phase)
HE	Hematoxilin – Eosin
HERS	Hertwigova epiteliální kořenová pochva (Hertwig's Epithelial Root Sheath)
je	epitelová manžeta (Junctional Epithelium)
M1	první molár (the first Molar)
Mc	Meckelova chrupavka (Meckel's Cartilage)
od	odontoblasty (ODnotoblasts)
oe	orální epitel (Oral Epithelium)
OPG	osteoprotegerin
P	postnatální den (Postnatal Day)
PBS	pufrovaný fosfátový pufr
PCNA	antigen proliferujících buněk (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
pdl	periodontální vazy (PerioDontal Ligaments)
PEK	primární sklovinný uzel (Primary Enamel Knot)
POD	křenová peroxidáza (Horse Raddish Peroxidase)
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B
RANKL	RANK Ligand
rd	dentin kořene (Root Dentin)



ree	redukovaný sklovinný orgán (Reduced Enamel Epithelium)
RT	laboratorní teplota (Room Temperature)
S	syntetická fáze (Synthesis phase)
SABC	streptavidin biotinový komplex (StreptAvidin Biotin Complex)
SEK	sekundární sklovinný uzel (Secondary Enamel Knot)
TEK	terciární sklovinný uzel (Tertiary Enamel Knot)
TRAP	tartrát rezistentní kyselá fosfatáza (Tartrat Resistant Acid Phosphatase)
TUNEL	enzymatické značení fragmentů DNA (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling)

## Obsah

1 ÚVOD .....	12
2 SYNTÉZA POZNATKŮ .....	13
2.1 Zuby .....	13
2.2 Rozdíly mezi myší a lidskou denticí .....	13
2.3 Obecná morfologie savčích zubů .....	15
2.4 Vývoj myšího moláru M1 .....	16
2.4.1 Prenatální vývoj myšího M1 .....	16
2.4.2 Postnatální vývoj myšího M1 .....	18
2.5 Vývoj a remodelace alveolární kosti .....	20
2.6 Erupce .....	21
2.6.1 Stadia erupce .....	22
2.6.2 Mechanismy ovlivňující erupci zubů .....	22
2.6.3 Procesy probíhající během erupce .....	23
2.7 Hodnocení morfogenetických procesů uplatňujících se při vývoji a erupci myšího mandibulárního M1 a remodelaci alveolu .....	24
2.7.1 Proliferace .....	24
2.7.1.1 Proliferace v odontogenezi .....	25
2.7.1.2 Detekce proliferace – PCNA .....	25
2.7.2 Buněčná diferenciaci .....	26
2.7.3 Apoptóza .....	27
2.7.3.1 Apoptóza v odontogenezi .....	28
2.7.3.2 Detekce apoptózy .....	28
2.7.4 Buněčná migrace .....	29
2.7.5 Buněčná asociace .....	30
2.7.6 Remodelace kosti v odontogenezi .....	30
2.7.6.1 Osteoblasty .....	30
2.7.6.2 Detekce aktivity osteoblastů .....	31
2.7.6.3 Osteoklasty .....	31
2.7.6.4 Detekce aktivity osteoklastů .....	32
3 CÍL A ÚKOLY .....	34
3.1 Cíl práce .....	34
3.2 Úkoly .....	34

4 METODIKA.....	35
4.1 Zvířata .....	35
4.2 PCNA (proliferating cell nuclear antigen).....	35
4.3 TUNEL test.....	36
4.4 TRAP test .....	37
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1 Výsledky.....	38
5.2 Diskuze.....	45
6 ZÁVĚR .....	49
7 REFERENCE .....	50
PŘÍLOHY	

# 1 ÚVOD

Každý živočišný druh má svou unikátní sadu zubů, známou jako chrup. Pomineme-li jeho primární a nejdůležitější roli získávání, oddělování a rozměňování potravy, pak v dnešní době má pro člověka především význam estetický a sociální.

Jako nejběžnější model pro studium vývoje zubů neboli odontogenezi byl nejméně 100 let používán první myší mandibulární molár M1. Tudíž většina našich znalostí o vývoji zubů pochází z experimentů a studií právě na těchto zubech. Díky snadné manipulaci s myšími embryi, ale i neustálému pokroku v této oblasti se výzkumy přesunuly od původního morfologického a histologického vyšetření na funkční studie spojující morfogenezi s klíčovými geny. Výhodou výzkumů myších molárů M1 je úspěšná aplikace získaných znalostí na lidskou odontogenezi a stomatologii týkající se jednak diagnostiky zubních abnormalit, ale také využití kmenových buněk při regeneraci a reparaci zubů.

Dlouhou dobu byla pozornost věnována pouze studiu zubu jako takovému, ale v současnosti je odontogeneze sledována v souvislosti s interakcemi s okolními tkáněmi. Tento přístup je při studiu postnatální odontogeneze naprosto nezbytný. V postnatálním období je totiž histogeneze a morfogeneze zubu dokončena a nejdůležitější procesy, jako jsou vývoj kořene, cementogeneze, erupce a pevné ukotvení zubu v čelisti, musí být synchronizovány s přestavbou kosti.

Tato práce navazuje na studii Lungové *et al.*, (2011), která se zabývala přehledem postnatálního vývoje myšího mandibulárního moláru M1 od narození myši až po období zahájení erupce zubu. Experimentální zpracování pokročilejších stadií odontogeneze během erupce zubu v literatuře zatím chybí. Cílem této práce tedy bylo zhodnotit hlavní morfogenetické mechanismy určující finální morfologii myšího mandibulárního moláru M1 od stadia zahájení erupce zubu (stadium P16) až po stadium P22, kdy dochází k vytvoření funkčního komplexu zubu a kosti a zub se dostává do funkční okluze.

## 2 SYNTÉZA POZNATKŮ

### 2.1 Zuby

Zub (latinsky *dens, dentis*; řecky *odus, odontos*) je tvrdý útvar vyskytující se v dutině ústní většiny obratlovců, vznikající procesem odontogeneze. Zuby slouží nejen k obranně a útoku, ale hlavně k uchopování, oddělování a rozměňování potravy (Dostálová *et al.*, 2008). Lidské zuby mají rovněž velký význam pro tvorbu řeči a nezanedbatelné je i jejich estetické a sociální působení. Soubor zubů se označuje jako chrup nebo též dentice (Stejskalová *et al.*, 2008).

Jako nejběžnější model pro studium molekulární a buněčné podstaty vývoje zubů se zpravidla využívá první myši mandibulární či maxilární molár M1 (Peterková *et al.*, 1996; Viriot *et al.*, 1997; Fleischmannová *et al.*, 2008).

Myši jsou využívány jako modelový organismus pro svůj snadný chov, jednoduchou manipulaci, vysoký počet potomků a krátkou délku generační doby. Myší čelisti se rovněž snadno odvádějí, pro výzkum je dostupné široké spektrum protilátek a sond. Základy myších zubů se dají navíc, vzhledem ke své velikosti, kultivovat jako explantátové kultury, což umožňuje jejich experimentální manipulace. V roce 2002 byla zveřejněna kompletní genetická mapa genomu myši (Gregory *et al.*, 2002). Pro zapojení jednotlivých genů lze tedy v současnosti využít širokou škálu různých transgenních nebo knock-outových linií (Macholán, 1997; Jebavý *et al.*, 2011).

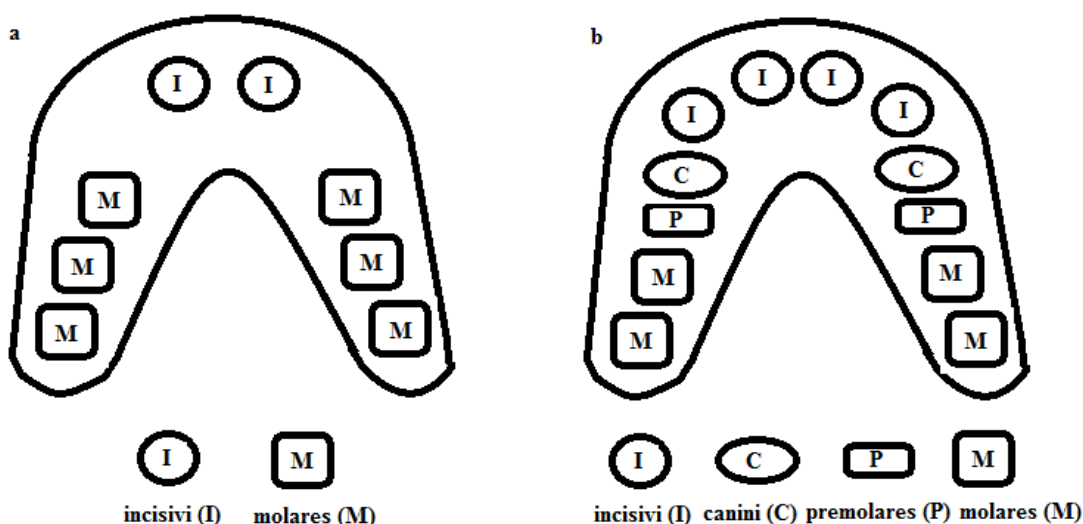
### 2.2 Rozdíly mezi myší a lidskou denticí

Myš má vysoce specializovaný chrup uzpůsobený k hlodání (obr. 1). Myší dentice je monofyodontní, tedy pouze s jednou sadou zubů (Tucker & Sharpe, 2004), jejich chrup je složený ze tří molárů v zadní části ústní dutiny, které jsou odděleny mezerou neboli diastemou od jednoho řezáku v přední části každého kvadrantu.

Na rozdíl od myšího chrupu je lidská dentice difyodontní, tedy dočasný chrup je nahrazen chrupem trvalým. Lidé mají navíc čtyři typy zubů v každém kvadrantu, jsou to 2 řezáky, špičák, 2 zuby třenové a 3 stoličky (Streelman *et al.*, 2003; Tucker & Sharpe, 2004). I přes tyto rozdíly mezi lidským a myším chrupem lze výsledky získané studiem

myších molárů do jisté míry extrapolovat na lidskou dentici. Hlavní signální interakce, které se uplatňují především v prenatalním vývoji zubních základů, jsou totiž u savců vysoce konzervativní. Proto studium zapojení jednotlivých genů v prenatalní odontogenezi může výrazně přispět k objasnění vývojových anomálií lidské dentice (Fleischmannová *et al.*, 2008).

V postnatálním období odontogeneze, kdy dochází u molárů k vývoji kořene, cementogenezi, tvorbě a ukotvení periodontálních vazů, již dochází k jistým druhově specifickým odlišnostem. Tyto zvláštnosti souvisí především s rozdílnou velikostí myších a lidských molárů. Zatímco u myši se molár dostává do funkční okluze zhruba po 3 týdnech od zahájení tvorby kořene a jednotlivé procesy jako je iniciace tvorby zubního kořene, cementogeneze i ukotvení periodontálních vláken k zubnímu kořeni a okolní alveolární kosti se překrývají (Bosshardt & Schroeder, 1996; Cho & Garant, 2000), u člověka se moláry vyvíjí díky své velikosti pět až šest let a jednotlivé procesy v postnatální odontogenezi tak mohou probíhat velmi pomalu a přesně na sebe navazovat (Bosshardt & Schroeder, 1996).



**Obr. 1** Schéma dentice myši a člověka **a)** Myš má tři stoličky oddělené mezerou od jednoho řezáku v každém kvadrantu **b)** Schéma lidské dentice ukazuje 6 zubů v každém kvadrantu.

## 2.3 Obecná morfologie savčích zubů

Obecná morfologie savčích zubů je u různých typů zubů prakticky stejná. Na jednotlivých zubech, tedy i myším mandibulárním moláru M1, rozlišujeme korunku, krček a kořen (obr. 2). Zubní korunka je umístěna v dutině ústní, kořen zakotvuje zub v kosti. Přechod mezi korunkou a kořenem tvoří zúžená krčková část (Stejskalová *et al.*, 2008). Podle tvaru korunky se dělí zuby na jednotlivé typy: řezáky – *dentis incisivi* (I), špičáky – *dentis canini* (C), zuby třenové – *dentis premolares* (P) a stoličky – *dentis molares* (M) (Merglová *et al.*, 2000).

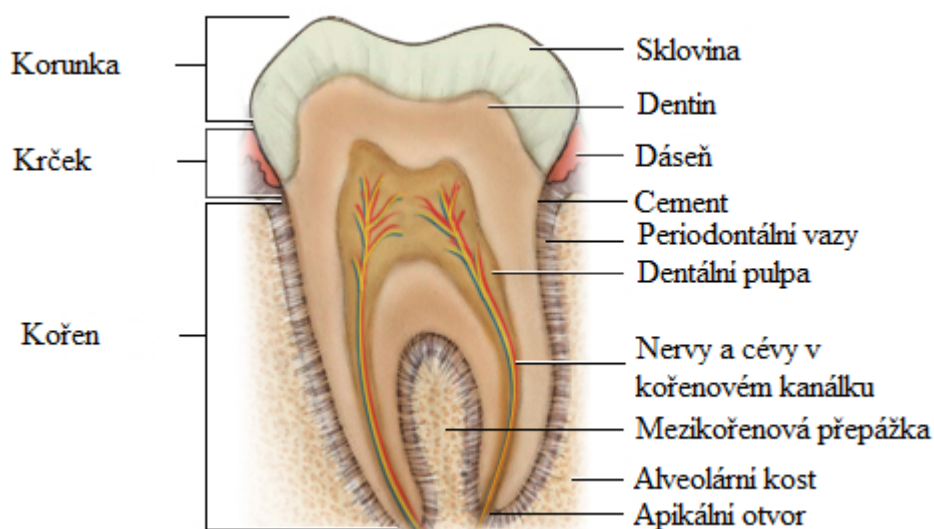
Zub se skládá ze tří rozdílných tvrdých tkání (obr. 2), skloviny - *email*, zuboviny – *dentin* a cementu – *cementum*. Zajímavostí u myších mandibulárních molárů je fakt, že sklovina nepokrývá celou korunku kompletně, ale nachází se zde tzv. zóny bez skloviny (Luukko *et al.*, 2003) – EFA - enamel free areas. Uvnitř zubu se nachází dřevná dutina vyplněná zubní pulpou – *pulpa dentis* mezenchymálního původu. Do zubní dřevě kanálkem pronikají drobné cévy a také nervy, které jsou příčinou citlivosti zubu (Stejskalová *et al.*, 2008).

Vlastní upevnění zubu v kosti zajišťují periodontální vazy. Hlavní složku tvoří kolagenní vlákna s fibrocyty a malé množství amorfnní základní hmoty. Součástí jsou také nediferenciované buňky typu progenitorových buněk, které se mohou diferencovat na fibroblasty, osteoblasty a cementoblasty nebo na osteoklasty. Periodontální vlákna mají důležitý význam při vyrovnávání tlakových sil, které působí na zub při kousání. K upevnění a udržení zubu ve správné pozici slouží různé typy periodontálních vazů: gingivální, transseptální a alveolární (Bosshardt & Schroeder, 1996; Cho & Grant, 1989, 2000; Malinský *et al.*, 2005).

Zuby jsou zasazeny do alveolárních výběžků horní a dolní čelisti se zubními lůžky - *alveolus* v podobě vklínění - *gomphosis*. Mezi jednotlivými alveoly jsou přepážky, mezialveolární septa – *septa intralveolaria*. Linguální a bukální stěny alveolu tvoří alveolární hřebeny. Alveolární kost je typická svou schopností přestavby, probíhají zde procesy resorpce i novotvorby (Vacek, 2006; Šedý & Foltán 2009).

Dáseň (gingiva) je stejně jako ostatní sliznice dutiny ústní kryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Dáseň je pevně přirostlá k okraji alveolárního výběžku a tvoří

připojenou gingivu, v blízkosti krčku je pak proužek tzv. volná gingiva (Merglová *et al.*, 2000).



**Obr. 2** Schéma anatomie zubu (převzato a upraveno z Thompson, 2011 URL1).

## 2.4 Vývoj myšního moláru M1

Růst a vývoj zubu jsou výsledkem vzájemných interakcí mezi mezenchymovou a ektodermovou komponentou zubního základu (Tucker & Sharpe, 2004). Jde o složitý kvalitativní i kvantitativní proces, probíhající prenatalně i postnatálně. V prenatalním období dochází k vytvoření zubního základu a k zahájení mineralizace zubní korunky. V postnatálním období potom vývoj pokračuje iniciací a růstem zubního kořene a tvorbou okolního periodontia za současné přestavby okolní alveolární kosti. Po vytvoření zubního alveolu se zub postupně začíná prořezávat do dutiny ústní a dostává se do funkční pozice (Fialová & Nováková, 2004).

### 2.4.1 Prenatální vývoj myšního M1

Z hlediska morfologie začíná vývoj mandibulárního M1 moláru stadiem iniciace neboli fází dentální plakody v E11 (obr. 3) (Tucker & Sharpe, 2004; Fleischmannová *et al.*, 2008), kdy dochází k nápadnému množení epitelových buněk (Nedorost *et al.*, 2009 URL2). Proliferací ústního epitelu ve stadiu E13 se vytváří zubní pupen, kolem kterého je pozorovatelný kondenzovaný mezenchym. Postupující proliferací epitelu do hloubky

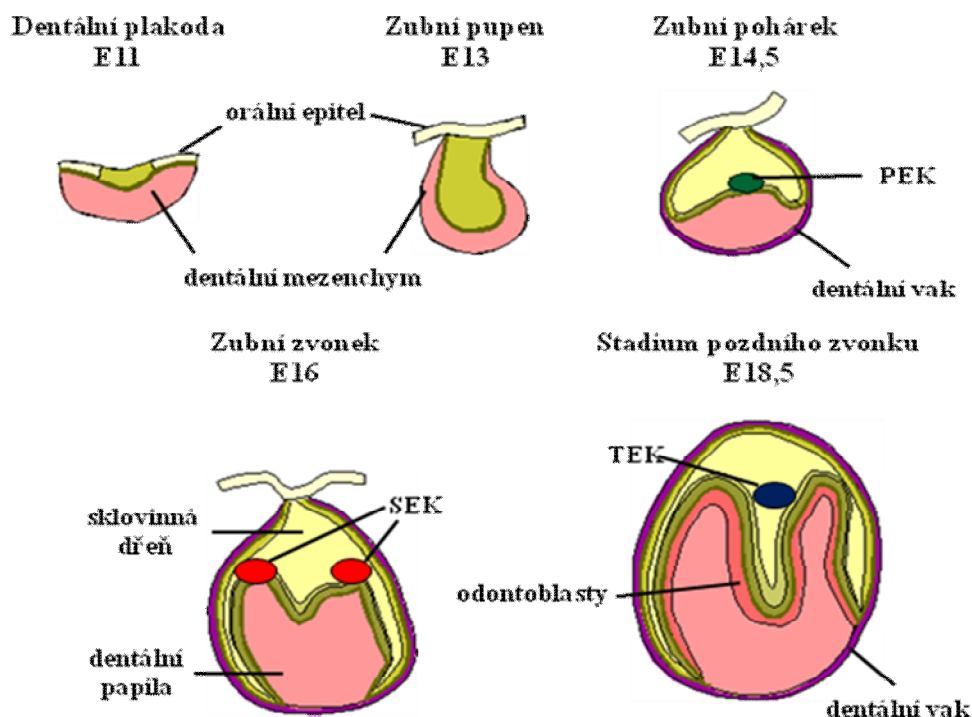


se v E14,5 vytváří zubní pohárek, který přechází v E16 v zubní zvonek (Tucker & Sharpe, 2004; Fleischmannová *et al.*, 2008). Přejít mezi jednotlivými stadii prenatální odontogeneze je kontrolován signálními centry tzv. sklovinnými uzly – PEK, SEK a TEK. PEK řídí přechod mezi stadiem pupene a pohárku (Jernvall *et al.*, 1994), SEK se u vícehrbolkových zubů podílí na formování korunky a tvorbu zubních hrbolů (Coin *et al.*, 1999). Postnatálně se ze zbytků buněk SEK vyvíjí TEK, který řídí u myšičího mandibulárního M1 vytváření výsledného tvaru korunky a tvorbu zón bez skloviny (Luukko *et al.*, 2003).

Ve stadiu pozdního zvonku (obr. 3) E18,5 dochází k diferenciaci buněk orgánu skloviny na 4 vrstvy: zevní sklovinný epitel, sklovinnou dřev, stratum intermedium a vnitřní sklovinný epitel. Buňky vnitřního epitelu se v dalším vývoji diferencují v ameloblasty produkující zubní sklovinu, buňky vrstvy stratum intermedium jsou důležité pro mineralizaci a obnovu ameloblastů, buňky sklovinné dřevě tvoří ochrannou vrstvu pro buňky vnitřního sklovinného epitelu a zároveň umožňují snadnou difuzi živin k dalším vrstvám orgánu skloviny, buňky vnějšího sklovinného epitelu tvoří ochrannou vrstvu celého orgánu skloviny. V oblasti krčku se zevní a vnitřní sklovinný epitel dostává do přímého kontaktu a vzniká cervikální klička.

Z vchlípeného mezenchymu vzniká ve stadiu zvonku E16 dentální papila. Ve stadiu pozdního zvonku E18,5 je zahájena dentinogeneze, kdy mezenchymální buňky vnější části dentální papily poskládané podél bazální membrány sklovinného orgánu se diferencují v odontoblasty. Dochází k zahájení tvorby korunky a k počátku mineralizace zubních tkání (Tucker & Sharpe, 2004; Fleischmannová *et al.*, 2008). Z buněk z vnitřní části dentální papily vzniká zubní pulpa.

Mezenchym, obklopující orgán skloviny s dentální papilou se mění v souvislou vrstvu – dentální vak (Malinský *et al.*, 2005). Postnatálně se dentální vak diferencuje v tzv. paradont skládající se z cementoblastů produkujících zubní cement, z fibroblastů vytvářejících periodontální vazy a z osteoblastů tvořících alveolární kost. Kromě toho, se z dentálního vaku diferencuje i vazivová část dásně – gingivy (Nedorost *et al.*, 2009 URL2).



**Obr. 3** Embryonální vývojová stádia myšího zubu. (Převzato a upraveno z Gene expression in tooth URL3).

## 2.4.2 Postnatální vývoj myšího M1

### Vývoj korunky

Rané fáze postnatálního vývoje jsou spojeny s dokončením vývoje zubní korunky (P0 a P2). Pod indukčním vlivem odontoblastů, které ve stadiu pozdního zvonku začínají sekretovat predentin je v P0 zahájena amelogeneze. Diferenciace ameloblastů začíná na špičkách hrotů korunky (linguální hrot první) a postupně se šíří směrem dolů bukálně a linguálně (Lungová *et al.*, 2011). Postupnou depozicí tvrdých tkání (tj. skloviny a dentinu) se zubní korunka zvětšuje do všech stran (Diamond & Applebaum, 1942) a dostává se blíže k okluzní linii, čímž tlačí na okolní tkáň zubu a zapříčiňuje tak apoptickou eliminaci buněk. Amelogeneze je ukončena před prořezáním zubu, kdy dochází k apoptické eliminaci až 50 % ameloblastů, sklovinný orgán atrofuje a vytváří se redukovaný sklovinný epitel. V pokročilých stádiích vývoje zubu se apoptóza podílí na eliminaci redukovaného sklovinného epitelu a přilehlých tkání nacházejících se v erupční dráze zubu (Lungová *et al.*, 2011).

## Vývoj kořene

Ve stadiu P4 dochází k zahájení vývoje kořene (Lungová *et al.*, 2011). Z cervikální smyčky na bazálním konci zubní korunky vzniká přiložením buněk zevního a vnitřního sklovinného epitelu Hertwigova epiteliální kořenová pochva (HERS) (Zeichner-David *et al.*, 2003). Proliferací Hertwigovy pochvy se zubní kořen aktivně prodlužuje a zanořuje hlouběji do okolní kosti. HERS se tak posunuje apikálním směrem a určuje tvar kořene až do jeho úplného vytvoření (Nedorost *et al.*, 2009 URL2). HERS rovněž řídí proliferaci mezenchymálních buněk kořenové zubní pulpy a vyvíjejícího se dentálního vaku. Dále indukuje diferenciaci odontoblastů k produkci kořenového dentinu a diferenciaci cementoblastů k produkci zubního cementu.

K zahájení sekrece kořenového dentinu u myšího mandibulárního M1 dochází ve stadiu P8. Po vytvoření první vrstvy dentinu dochází postupně k fenestraci Hertwigovy pochvy (Lungová *et al.*, 2011), její zbytky ztrácejí těsný kontakt s povrchem kořene (Klika *et al.*, 1988), což otevírá prostor pro migraci mezenchymálních buněk vnitřního dentálního vaku (budoucích cementoblastů) k povrchu kořenového dentinu. Paralelně s migrací cementoblastů produkují tyto buňky kolagenní vlákna nutná k uchycení cementu ke kořenovému dentinu a posléze i k napojení cementu na vlákna periodontia. K diferenciaci cementoblastů dochází ve stadiu P12, k diferenciaci fibroblastů periodontia dochází ve stadiu P14 (Bosshardt & Schroeder, 1996; Diekwisch, 2001; Shimazu *et al.*, 2009; Lungová *et al.*, 2011). Po skončení své funkce je HERS následně eliminována apoptózou (Cerri *et al.*, 2000), některé buňky mohou podstoupit epitelomezenchymální transformaci na fibroblasty a cementoblasty (Thomas, 1995; Zeichner-David *et al.*, 2003). Dalším možným osudem je začlenění buněk HERS do vyvíjejícího se cementu (Luan *et al.*, 2006). Zbytky HERS také nacházíme po skončení vývoje zubu jako Malassezovy ostrůvky v periodontálních vazech (Klika *et al.*, 1988). Tyto ostrůvky si částečně uchovávají proliferační schopnost a mohou být základem pozdějšího nádorového bujení v ozubici (Klepáček *et al.*, 2001). Ve stadiu P16 se myší mandibulární molár M1 začíná prořezávat do dutiny ústní (Lungová *et al.*, 2011).

## 2.5 Vývoj a remodelace alveolární kosti

Během postnatálního vývoje musí dojít k remodelaci neboli přestavbě alveolární kosti, tak aby se zub mohl prořezat do ústní dutiny. K remodelaci kosti jsou zapotřebí osteoklasty a osteoblasty (Marks & Schroeder, 1996; Suda *et al.*, 2003; Malinský *et al.*, 2005). Koordinovaná aktivita těchto dvou typů buněk vede k resorpci či ukládání kostní hmoty jako odpověď na růst kořene a mechanickou zátěž, která na kost působí (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

Vývoj alveolární kosti začíná v embryonálním období ve stadiu zubního pohárku (E13) (Fleischmannová *et al.*, 2010), kdy dochází k diferenciaci mezenchymálních buněk vnější vrstvy dentálního vaku a vzniku osteoblastů (Diep *et al.*, 2009). Tyto osteoblasty začínají přímo produkovat kostní matrix. Alveolární kost tedy vzniká přímou osifikací mezenchymu, jedná se o tzv. desmogenní typ osifikace. Ve stadiu pozdního zvonku E18,5 postupně dochází k nárůstu zubní hmoty, až je zubní zárodek téměř zcela obklopen alveolární kostí (Fleischmannová *et al.*, 2010). V tomto stadiu je zahájena přestavba kostního lůžka, což dokazuje detekce osteoklastů podél vnitřního okraje alveolu (Kitahara *et al.*, 2002). Na vnějších okrajích bukalního a linguálního hřebenu naopak dochází k tvorbě kosti, aby byly dostatečně pevné a chránily vyvíjející se zárodek.

Postnatálně se nově vzniklá kost hromadí i v mezizubním prostoru (mezi M1 a M2) na vytvoření mezizubní přepážky a mezi jednotlivými kořeny zubu při bifurkaci kořenů na vytvoření mezikořenového septa. Oblasti resorpce kosti se nadále nachází především podél vnitřního okraje zubního lůžka na vrcholech alveolárních hřebenů. V pokročilých fázích postnatální odontogeneze před erupcí zubu se alveolární hřebeny postupně snižují až na úroveň cemento-sklovinné hranice a bazální část alveolu se dále rozšiřuje, což umožňuje rychlý růst periodontálních vazů nutných k upevnění zubu v alveolu. Tímto způsobem se zub postupně ukotvuje do alveolární kosti jak v průběhu, tak i po prořezání zubu. Před prořezáním zubu se tvorba kosti přesouvá na bázi zubního lůžka, což přispívá k posunu zubu do ústní dutiny. Současně ustává kostní resorpce, která je ještě patrná na vrcholech alveolárních hřebenů (Lungová *et al.*, 2011).

## 2.6 Erupce

Prořezání zubů neboli erupce je jev, zahrnující obnažování zubů z dásní a jejich vstup do okluze (Klepáček *et al.*, 2001). Z obecného hlediska proces prořezávání nezahrnuje jen období vystoupení korunky do ústní dutiny, ale je to doba od vývoje korunky až do zániku zubu (Malinský *et al.*, 2005). Aktivní erupce začíná resorpcí kostí díky koordinovanému kostnímu metabolismu (Marks & Schroeder, 1996), tedy vytvořením erupční dráhy, dále dochází k vertikálnímu pohybu zubu do dutiny ústní (Suda *et al.*, 2003). Proces erupce a vývoj kořene je koordinován, ale ne nutně synchronizován s vývojem dentálního vaku a orgánem skloviny (Marks & Schroeder, 1996; Chlastáková *et al.*, 2011).

Při erupci dochází rovněž k eliminaci buněk orální sliznice a k redukci vazivové tkáně, která kryje korunku prořezávajícího se zubu (Fialová & Nováková, 2004).

Pohyb hrotu korunky směrem k povrchu se děje dvěma mechanismy – za první lineárním prostorovým posunem. Lineární pohyb způsobuje postupná osifikace a ukládání kostní hmoty na bázi kostěného alveolu, díky čemuž je zub posunován směrem k povrchu. Za druhé excentrickým růstem, jelikož korunka zvětšuje svůj objem a její bazální část spočívá na pevné podložce, dochází tak k excentrickému posunu hrotu směrem k povrchu. (Malinský *et al.*, 2005). Prorážení korunky epitelovým krytem probíhá bez krvácení. Současně dochází k vytvoření dentino-gingiválního spojení. Na jeho vytvoření se tedy podílí jednak orální a jednak sklovinný epitel. Proces erupce pak trvá tak dlouho, pokud zub nedosáhne antagonisty (Fialová & Nováková, 2004).

Během života potom dochází k postupnému obrušování povrchu korunky kousáním a žvýkáním, a tím k postupnému zmenšování zubu, což je kompenzováno pozvolným dorůstáním kořene, tak je zachován neustále stejný skus. V případě ztráty zubu, zub v protilehlé čelisti pokračuje v růstu, takže vyčnívá nad linii okluze. Tento jev se nazývá supraerupce zubu (Malinský *et al.*, 2005). Při ztrátě zubu dochází také ke změnám mechanického zatížení na alveolární kost. Díky pokračující resorpci kosti dochází k redukci alveolárních hřebenů (Fleischmannová *et al.*, 2010).

### 2.6.1 Stadia erupce

Jelikož je tato práce věnována vývoji zubů během erupce, tak se následující část práce věnuje erupci detailněji. Podle Fialové & Novákové (2004) můžeme průběh erupce zubů rozdělit do tří stádií:

1. Preerupční stádium - začíná formováním kořene a počátkem pohybu zubu směrem okluzním s resorpcí kostního valu.
2. Erupční stádium prefunkční - časově je ohraničeno od prořezání zubu do dutiny ústní po dosažení okluze.
3. Erupční stádium funkční - začíná po zařazení zubu do okluze, kterou se snaží zub udržet i při atrici nebo po extrakci antagonisty.

Marks & Schroeder (1996) rozdělují erupci dokonce na pět fází:

1. preeruptivní pohyby – vývoj zubů probíhá v alveolární kosti a během vývoje korunky dochází v čelistech k malým preeruptivním krouživým pohybům.
2. nitrokostní erupce - po vytvoření korunky začíná aktivní erupce. Zub se musí dostat skrz kost, a tedy dochází ke kostní resorpci.
3. slizniční penetrace – v této fázi se erupce začne zrychlovat. Dochází k prořezání zubu přes měkké tkáně.
4. preokluzární erupce – v době dosažení okluzární roviny dochází k erupční zastávce.
5. postokluzární erupce – na začátku této fáze dochází k upevnění periodontálních vazů a k uzavření kořenového hrotu, později dochází k pozvolnému růstu alveolární kosti a pomalé erupci, čímž se kompenzuje okluzárně opotřebením.

### 2.6.2 Mechanismy ovlivňující erupci zubů

Na prořezávání zubů se uplatňuje hned několik mechanismů a dle různých teorií je jim přisuzován rozdílný význam (Malinský *et al.*, 2005). Erupce je doprovázena celou řadou změn tkání - vývojem kořene zubu a periodontálních vazů, resorpcí a apozicí

alveolární kosti, simultánním růstem čelisti a tlaku svalů. Při erupci zubu je třeba rovněž brát v úvahu různé vlivy. Příkladem jsou růst kořene zubu (Fialová & Nováková, 2004), existují totiž případy, kdy došlo k poruše a zastavení růstu kořene, ale k erupci došlo. Naproti tomu nezdědka pozorujeme u třetích molárů plně vytvořené kořeny a přesto se zuby neprořezaly (Malinský *et al.*, 2005). K dalším vlivům patří proliferace Hertwigovy pochvy a proliferace pojivové tkáně zubní pulpy (Fialová & Nováková, 2004), která díky postupující dentinogenezi je vytlačována směrem k povrchu a zapřičiňuje tak posun zubu. I proti této teorii jsou námitky, jelikož i po odstranění pulpy může dojít k erupci (Malinský *et al.*, 2005). Je pravděpodobné, že v prvních fázích erupce je důležitým regulátorem jednak selektivní resorpce kosti koronárně a jednak apozice kosti na bázi alveolu indukovaná zubním folikulem. Tah periodontálních vláken a eventuálně vaskulární tlak se mohou podílet na axiálním tahu při erupci zubu do dutiny ústní a zřejmě i na aktivované erupci v pozdějším věkovém období (Fialová & Nováková, 2004). Někteří autoři přisuzují tomuto vlivu nejdůležitější úlohu (Malinský *et al.*, 2005).

### **2.6.3 Procesy probíhající během erupce**

Během erupce dochází k apozici dentinu, jak v oblasti zubní korunky, tak v oblasti kořene, cementogenezi, tvorbě periodontálních vazů a remodelaci alveolární kosti. Apozice dentinu je způsobena sekreční aktivitou odontoblastů. Dochází ke ztlušťování dentinové vrstvy ve směru k dentální pulpě, což způsobuje zvětšování zubní korunky a pasivní prodlužování kořene. Do právě vzniklého kořenového dentinu se současně ukotvuje zubní cement. Cementogeneze je zahájena diferenciací cementoprogenitorových buněk (Bosshardt & Schroeder, 1996) na precementoblasty, které jednosměrně migrují k predentinu, přičemž dochází k syntéze a ukládání kolagenních fibril a tvorbě Sharpeyových vláken. Při kontaktu s povrchem predentinu se protáhlé precementoblasty mění na kubické a diferencují se na cementoblasty. Po zahájení sekrece cementu se cementoblasty odpojují od nově vzniklého cementu a připojují se k fibroblastům v periodontálních vláknech, postupně tak ztrácejí kubický tvar a opět se protahují (Cho & Garant, 1989). Data publikovaná v literatuře ukazují, že u myšího mandibulárního moláru mezi kořenovým dentinem a cementem vzniká tzv. přechodná vrstva (intermediate layer), jež je primárním místem ukotvení cementu k dentinu (Yamamoto, 1986; Cho & Garant, 1989; Yamamoto & Wakita, 1990). V této

vrstvě byly imunohistochemicky lokalizovány signální molekuly – jako je kostní sialoprotein (BSP) nebo osteopontin. Kostní sialoprotein pravděpodobně řídí migraci, diferenciaci a/nebo ukotvení precementoblastů (MacNeil *et al.*, 1994) k povrchu kořenového dentinu a osteopontin „balí“ vlákna cementové matrix k sobě, což vzbuzuje dojem, že mezi cementem a dentinem je vrstva organického materiálu (Bosshardt *et al.*, 1995). Přesná role těchto glykoproteinů není ještě zcela určena. Vývoj hlavních vláken periodontálních vazů začíná při tvorbě kořene před prořezáním zubu. Vývoj okrajových vláken cementu je v úzkém vztahu k prodlouženým vysoce polarizovaným fibroblastům. Fibroblasty jsou nejhojnějšími buňkami v periodontálních vazech a obklopují jak okrajová, tak periodontální vlákna. Během erupce zubu dochází ke zrání periodontálních vláken a k jejich napojení na vlákna okrajová. Postupujícím vývojem dochází k napojení vláken k alveolární kosti, čímž se je zub ukotven v alveolu (Cho & Garant, 1988). Formace a resorpce kostí jsou významné události v erupci zubu a úspěšný průběh prořezávání zubů záleží na včasném vytvoření volného prostoru pro eruptující zub a tedy na aktivitě osteoklastů (Marks & Schroeder, 1996).

## **2.7 Hodnocení morfogenetických procesů uplatňujících se při vývoji a erupci myšího mandibulárního M1 a remodelaci alveolu.**

Je tedy zřejmé, že hlavní morfogenetické mechanismy, které určují finální morfologii myšího mandibulárního moláru M1 a okolní kosti, zahrnují především proliferaci a diferenciaci jednotlivých typů buněk, jejich migraci a vzájemné spojování do vyšších celků (asociaci buněk) i apoptotickou eliminaci v případě ukončení jejich funkce (Purevsuren *et al.*, 2010). Dynamika i časoprostorové rozložení těchto událostí jsou přesně koordinovány a synchronizovány s vývojem a remodelací okolní alveolární kosti.

### **2.7.1 Proliferace**

Proliferace neboli mitotická aktivita je proces intenzivního množení buněk pozorovatelný především v embryonálním období, kdy dochází k zvětšení populace buněk, které se diferencují do jednotlivých buněčných linií. Místa intenzivního



rozmnožování buněk jsou zpravidla soustředěna do tzv. proliferačních center. Proliferací pak tyto orgány rostou a zvětšují se. Postnatálně dochází k postupnému útlumu proliferace, která se omezuje pouze na obnovu mechanicky namáhaných nebo poškozených tkání (Jelínek *et al.* URL4).

### **2.7.1.1 Proliferace v odontogenezi**

V prenatálním období dochází k proliferaci prorůstajícího epitelu a okolního mezenchymu, a to ve stadiu iniciace, dentální plakody, pupene, pohárku a zvonku, a to především v oblasti tzv. cervikální smyčky. Mezenchymální buňky nejdříve kondenzují a ve stadiu zubního pupene zahajují intenzivní dělení, čímž dávají vznik mezenchymovým buňkám dentální papily a okolního dentálního vaku.

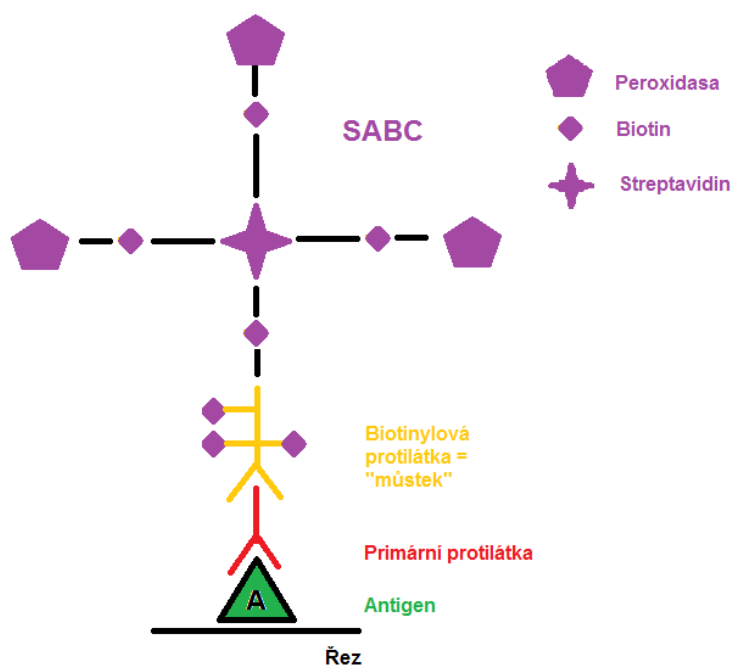
Postnatálně proliferuje především oblast cervikální kličky, která přechází při zahájení tvorby kořene v HERS. Proliferací HERS se kořen zanořuje do okolní kosti (Luckett, 1993; Malinský *et al.*, 2005; Fleischmannová *et al.*, 2010; Chlastáková *et al.*, 2011; Lungová *et al.*, 2011). Souběžně s vývojem kořene se intenzivně dělí i mezenchymové buňky kořenové pulpy a okolního dentálního vaku. Proliferace HERS a okolních mezenchymových buněk kulminuje ve stadiu P12. Detekce proliferace probíhá imunohistochemicky.

### **2.7.1.2 Detekce proliferace – PCNA**

Imunohistochemické stanovení PCNA se užívá k detekci proliferující frakce buněčné populace. PCNA-proliferační buněčný jaderný antigen je syntetizovaný v rané G1 a S fázi buněčného cyklu. PCNA antigen slouží jako svorka, která upevňuje DNA polymerázu k řetězci DNA. Vzhledem k tomu, že tato reakce probíhá hlavně při replikaci DNA, tak PCNA antigen slouží jako marker pro syntézu DNA a tedy pro detekci proliferujících buněk (Tsurimoto, 1999). Pro detekci PCNA se používá nepřímá trojstupňová metoda (obr. 4), přičemž první stupeň je vazba neznačené (primární) protilátky na antigen, další stupeň představuje vazbu sekundární protilátky na primární protilátku. Na sekundární protilátku (můstek) se naváže komplex SABC (streptavidinový biotinový komplex) (Malinský *et al.*, 2002). Princip trojstupňové

metody spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě se streptavidin-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita této peroxidázy nám pak indikuje ta místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci (Beranová & Tonar, 2002 URL5).

Vizualizace komplexu se provádí pomocí chromogenního barviva DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid). Výsledkem činnosti křenové peroxidázy a DAB je pak stabilní hnědý produkt nerozpustný ve vodě i alkoholu, jenž indikuje ta místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci (Zádvorská, URL6).



**Obr. 4** Nepřímá třístupňová metoda využívající streptavidin biotin komplex (SABC).

### 2.7.2 Buněčná diferenciacce

Proliferace zvyšuje počet buněk v dané oblasti, naproti tomu diferenciacce vede ke specializaci buněk při jejich funkčním zapojení v tkáních. Na vývojové specializaci každé z buněk se podílí velké množství specifických genů (Lesot & Brook, 2009). Diferenciacce není následkem ztráty či přírůstku chromosomového materiálu a jen výjimečně je spojena s nezvratnou změnou genomové DNA. Diferenciacce je nejčastěji kontrolována na úrovni chromosomů pomocí mechanismů regulujících transkripci specifických genů (Jelínek *et al.* URL4).

V odontogenezi probíhá diferenciaci jak prenatalně, tak postnatalně. Jako první se začínají diferencovat odontoblasty (stadium zubního zvonku E18,5), které díky dentinogenezi dávají vzniku dentinu (Tucker & Sharpe, 2004; Fleischmannová *et al.*, 2008). Následuje perinatální diferenciaci ameloblastů (P0), které při amelogenezi produkují sklovinu, v pozdějších stadiích dochází k diferenciaci cementoblastů (P12). Cementoblasty svou aktivitou při cementogenezi vytváří cement. V P14 podstupují diferenciaci fibroblasty, díky nimž vzniká periodontium a kořenová pulpa (Lungová *et al.*, 2011).

### 2.7.3 Apoptóza

Mezi další morfogenetické procesy, které doprovází vývoj jednotlivých orgánů tedy i zubu patří apoptóza. Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je proces, který umožňuje odstranění buněk za fyziologických podmínek, tj. bez hrozby zánětu. V prenatalním období se především účastní tvarování jednotlivých struktur, postnatalně se účastní udržování homeostázy – tj. likvidace buněk, kterých už není potřeba nebo pro které už není místo (Kerr *et al.*, 1972; Malinský *et al.*, 2002).

Na mechanismu apoptózy se účastní tzv. proteolytická kaskáda. Její princip spočívá v tom, že signály indukující apoptózu aktivují proteolytické enzymy tzv. iniciátorové kaspázy, které štěpením aktivují další členy ze skupiny proteáz tzv. efektorové kaspázy, ty pak štěpí stavební buněčné proteiny a zabíjejí buňku rychle a uspořádaně (Malinský *et al.*, 2002). Řada signálů může vyvolat různé typy apoptóz, jakou jsou buněčná smrt aktivací receptorů cytoplazmatické membrány (vnější cesta), mitochondriální buněčná smrt a apoptóza endoplazmatického retikula (vnitřní cesta) (Ekert & Vaux, 2005).

Morfologicky se apoptóza projevuje nejprve zmenšováním objemu a kondenzací cytoplazmy. Povrchová buněčná membrána se nerozpadá, ale dochází (bez ztráty integrity) k odškrcování váčků, které se označují jako apoptická tělíška. Dochází k odbourávání cytoskeletu, což se projevuje rozpadem jaderných laminů a fragmentací jádra na malé úseky. Jaderný chromatin se kondenzuje na okraji jádra (Malinský *et al.*, 2002). Zdá se, že štěpení chromatinu je nejcharakterističtější biochemická vlastnost tohoto procesu (Shi *et al.*, 1990; Tian *et al.*, 1991). Buněčné organely (mitochondrie) zůstávají inaktivní. Vzhledem k tomu, že nedochází ke ztrátě integrity povrchové

cytoplazmatické membrány, nedochází k vylití buněčného obsahu do okolí a na rozdíl od nekrózy (smrt buňky vyvolaná patologickými podněty) buňky odumírají samostatně a nedochází k zánětlivé reakci. I když nedochází k rozpadu cytolemy, buněčný povrch je změněn tak, že aktivuje povrchové receptory okolních buněk, což způsobuje rychlou fagocytózu umírající buňky buď sousedními buňkami, nebo specializovanými makrofágy (Malinský *et al.*, 2002). Právě fragmentace DNA a tvorba apoptotických tělísek se využívá při detekci apoptózy.

### **2.7.3.1 Apoptóza v odontogenezi**

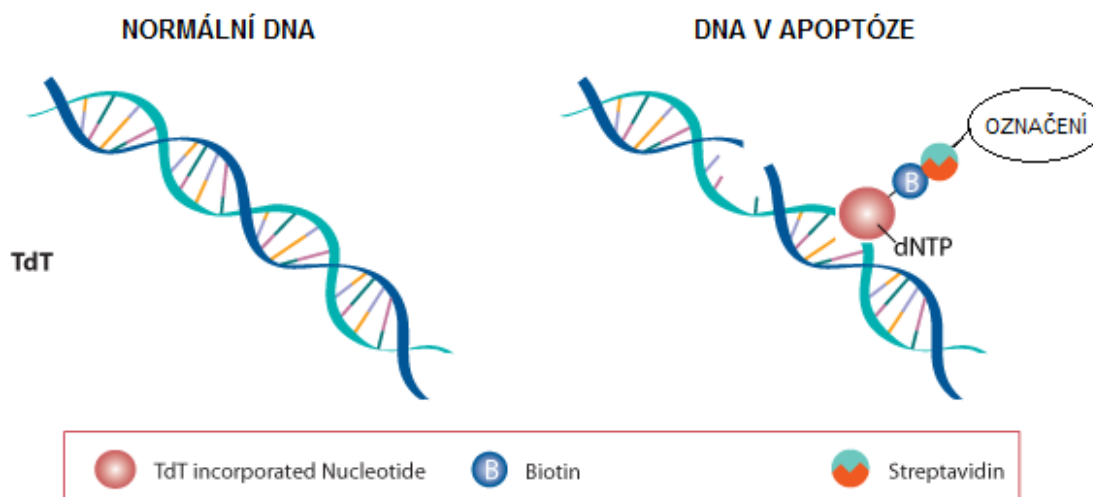
Během vývoje moláru se apoptóza vyskytuje v charakteristických strukturách, což naznačuje hned několik rolí buněčné smrti v odontogenezi. Během prenatalní odontogeneze se apoptóza především účastní eliminace sklovinných uzlů (PEK, SEK a TEK) a odbourání diastemálních a antemolárních pozůstatků v diastémě, ale nevedou k tvorbě funkčního zubu (Jernvall *et al.*, 1998; Matalová *et al.*, 2004).

Postnatálně se apoptóza vyskytuje především v dozrávajících ameloblastech před erupcí zubu (Bronckers *et al.*, 2000), při eliminaci buněk HERS při vývoji zubního kořene a při přestavbě zubního lůžka. Korelaci časoprostorového rozložení apoptózy a proliferace v myším mandibulárním moláru M1 i okolní kosti je věnována první část této práce.

### **2.7.3.2 Detekce apoptózy**

Jeden ze způsobů detekce apoptózy je biochemická metoda TUNEL test (TdT mediated Nick End labeling). Tato metoda byla použita i v této práci, jelikož slouží k prokázání fragmentované DNA prostřednictvím specificky navázaných molekul na místa jedno i dvouřetězcových zlomů v DNA. Terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT – Terminal deoxynucleotidyl Transferase) se připojuje na 3'-OH konec fragmentované DNA modifikovaný analog báze (Gavrieli *et al.*, 1992). Tímto analogem je biotin-dUTP. Biotinylovaný dUTP se detekuje pomocí streptavidin-peroxidasy, která zesiluje signál. Vizualizace se provádí pomocí DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid) (obr. 5).

Podrobnější analýza ukázala, že proces fragmentace DNA je zahájen v jaderné periférii a je relativně krátký (1-3 hod od zahájení do buněčné eliminace). Počty odhalených apoptóz jsou daleko větší, jelikož DNA fragmentaci můžeme prokázat i v morfologicky intaktních buňkách procházející procesem programované buněčné smrti. (Gavrieli *et al.*, 1992).



**Obr. 5** Princip metody TUNEL (převzato a upraveno z URL7).

#### 2.7.4 Buněčná migrace

Při buněčné migraci dochází k přemístování jednotlivých buněk či skupin buněk. Rozlišujeme ji na pasivní a aktivní. V proliferačních centrech dochází k pasivní migraci, kdy nově vzniklé buňky vytlačují do periferie buňky stávající. V případě zapojení vlastního lokomočního aparátu buňky mluvíme o migraci aktivní. Při změně pozice jsou buňky vystaveny daným podmínkám okolního prostředí, reagují na různé signály, které určují, jak se budou buňky dále diferencovat. Cytoplazmatická membrána vodícího pólu buňky vysílá tenká filopodia, která navazují přechodné kontakty s okolními strukturami. Po navázání kontaktu se buňka přesune, vyše další filopodia a proces se opakuje. Typickými migrujícími buňkami uplatňující se v prenatalní odontogenezi jsou buňky neurální lišty (Jelínek *et al.* URL4), postnatálně jsou to především cementoblasty při zahájení cementogeneze či buňky HERS, které po rozpadu HERS migrují do okolního periodontia.

### **2.7.5 Buněčná asociace**

Buněčná asociace plní dvě funkce. Za prvé spojuje jednotlivé buňky ve vyšší funkční celky a za druhé umožňuje buňkám vzájemné ovlivňování. Jde o základní podmínky pro jejich budoucí určení a synchronizaci aktivity. Spojování buněk se uskutečňuje pomocí celulárních adhezivních molekul (CAM), které jsou součástí cytoplazmatické membrány a později i morfologicky prokazatelnou formou bodových a plošných buněčných spojení, jak je známe z cytologie (Jelínek *et al.* URL4). Tento proces probíhá během celé odontogeneze a to jak prenatalně, tak postnatalně.

### **2.7.6 Remodelace kosti v odontogenezi**

Současně s vývojem zubu dochází k remodelaci okolní kosti. Vývoj kosti je obvykle spojen s částečnou resorpcí preformované tkáně a současnou výstavbou nové kosti. Paralelnost obou procesů zajišťuje zachování tvaru kosti. Na tvorbě kosti se podílí svojí aktivitou osteoblasty, které produkují kostní hmotu především v oblastech vystavených tahu, kde tkáně rostou odlišnou rychlostí. U alveolární kosti je to především na vnějším okraji alveolárních hřebenu a v mezikořenových a mezizubních přepážkách. Resorpci kosti způsobují svou aktivitou osteoklasty. U remodelace alveolární kosti jsou detekovány především podél vnitřního okraje alveolu (Lungová *et al.*, 2011).

#### **2.7.6.1 Osteoblasty**

Osteoblasty jsou buňky specializované k syntéze organické součásti kostní matrix (kolagen I., proteoglykany a glykoproteiny) a anorganických látek. Osteoblasty se diferencují z mezenchymálních buněk vnější vrstvy dentálního vaku (intramembrální osifikace) (Diep *et al.*, 2009). Osteoblasty se nachází na povrchu kostní tkáně. Když jsou tyto buňky zapojeny do syntézy matrix, mají kubický až cylindrický tvar, bazofilní cytoplazmu a pozitivní aktivitu alkalické fosfatázy. Když jejich aktivita klesá, snižuje se bazofilie cytoplazmy i aktivita alkalické fosfatázy. Osteoblasty mají poměrně dlouhé cytoplazmatické výběžky, kterými jsou v kontaktu se sousedními osteoblasty. Pomocí těchto kontaktů se realizuje látková výměna kosti. V průběhu vývoje osteoblastů

dochází k redukci organel a výběžků a při jejich zalití do nově vytvořené matrix se mění na osteocyty.

Během syntézy mají osteoblasty vzhled proteosynteticky aktivních buněk: světlé velké jádro, velký Golgiho komplex, rozsáhlé granulární endoplazmatické retikulum. Osteoblasty jsou polarizované. Na jednom pólu, přivráceném ke kostní hmotě, jsou uvolňovány produkty buněk, jádro se nachází na pólu buňky odvráceném od kosti. Nově syntetizovanou, ještě nekalcifikovanou organickou komponentu matrix označujeme jako osteoid (Jelínek *et al.* URL4).

### **2.7.6.2 Detekce aktivity osteoblastů**

Osteoblasty jsou markery apozice kosti. Pro detekci aktivity osteoblastů se běžně používá imunohistochemické stanovení osteokalcinu, který je nejdůležitějším nekolagenovým proteinem v kostní matrix, který váže vápník a je závislý na vitamínu K. Syntetizovaný a posttranslačně upravený osteokalcin je inkorporován do kostní matrice, kde je pevně vázán s hydroxyapatitem, a podílí se tak na mineralizaci kosti. Po jeho uvolnění z osteoblastů není osteokalcin jen prostě zařazen do kostní matrix, ale je také vylučován do krevního řečiště. Hladina osteokalcinu v séru (plazmě) odráží tudíž rychlost kostního obratu při různých poruchách metabolismu kostí (Palička *et al.*, 2003 URL8). V této práci byla apozice kosti hodnocena jednak morfologicky – příkládáním osteoblastů k povrchu kosti a jednak detekcí proliferace osteoblastů opět na povrchu kosti (PCNA).

### **2.7.6.3 Osteoklasty**

Osteoklasty jsou specializované buňky uzpůsobené k resorpci zvápenatělých tkání. Tyto buňky se vyvíjejí z hematopoetických linie kmenových buněk řady monocytů makrofágů a apoptickou eliminací osteoblastů/osteocytů (Suda *et al.*, 2003). Osteoklast je mnohojaderná buňka, dosahující velikosti 100  $\mu\text{m}$ . V cytoplazmě je přítomno 5-50 jader, dále obsahuje početné mitochondrie, Golgiho komplex a nepříliš výrazné granální endoplazmatické retikulum (Klika *et al.*, 1988).

Výběžky buněk jsou zcela nepravidelné a mají různou tloušťku i tvar. V úsecích, kde je kost resorbována, najdeme části gigantických osteoklastů, které leží v enzymaticky vyleptaných proláklínách matrix, známých jako Howshipovy lakuny. V aktivních osteoklastech je povrch buňky obrácen k matrix zprohýbán v hrubý kartáčový lem. Tento útvar usnadňuje záchyt i enzymatické natrávení malých částíček a kromě toho i zvětšuje aktivní resorpční plochu.

V prostorech mezi záhyby jsou přítomny krystalky obsahující vápník, které se také vyskytují v cytoplazmatických vakuolách, vznikajících pravděpodobně z povrchové membrány osteoklastu. Osteoklasty vylučují kyselou fosfatázu, kolagenózu a ostatní proteolytické enzymy, které aktivují kostní matrix a uvolňují zvápenatělou základní hmotu. Buňky se aktivně účastní likvidace "odpadu" vznikajícího při resorpci kosti (Junqueira *et al.*, 1997).

Osteoklasty vznikají splýváním preosteoblastů. Je pravděpodobné, že i monocyty poté, co opustily krevní oběh, mohou vytvářet splýnutím tyto obrovské buňky. Osteocyty uvolněné z kostních lakun se mohou nediferencovat a rovněž splýnout v osteoklasty (Klika *et al.*, 1988). Osteoklasty vzniklé splýnutím krevních monocytů jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému (Junqueira *et al.*, 1997).

Identifikace OPG / RANKL / RANK systému (OPG Osteoprotegerin, RANKL receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) jako dominantního mediátoru osteoklastogeneze představuje významný pokrok v biologii kostí. Skončilo tak dlouhodobé hledání konkrétního faktoru vyráběného preosteoblastickými / stromatálními (stromatálními) buňkami, který je nezbytný pro rozvoj osteoklastů. Rozhodující role těchto faktorů v regulaci kostního metabolismu byla prokázána při výzkumu osteoporózy vs osteopetrozy u myši se změněnou expresí těchto molekul (Khosla, 2001).

#### **2.7.6.4 Detekce aktivity osteoklastů**

TRAP (tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza) substrát reakce je používán k cytologické demonstraci aktivity kyselé fosfatázy a tedy k detekci resorpční aktivity osteoklastů. TRAP je enzym, nacházející se v buňkách osteoklastů, který katalyzuje



hydrolyzu monoesterů fosforečnanu při kyselém pH (Alatalo *et al.*, 2004). Aktivní enzym TRAP v cytoplazmě buněk se barví červeně.

Na časoprostorové rozložení proliferace osteoblastů a jejich korelace s aktivitou osteoklastů při vývoji myšího mandibulárního M1 je zaměřena druhá část této práce.

## **3 CÍL A ÚKOLY**

### **3.1 Cíl práce**

Tato práce se zabývá sledováním dynamiky morfogenetických procesů, uplatňujících se během postnatálního vývoje myšího mandibulárního moláru M1 a okolní alveolární kosti, se zaměřením na postnatální vývoj M1 při erupci zubu. Cílem teoretické části práce bylo provést rešerši dostupné literatury zabývající se touto problematikou. Praktická část se věnuje výzkumu a sledování korelace časoprostorového rozložení proliferace, apoptózy a aktivity osteoklastů u vyvíjejícího se zubu a okolní alveolární kosti ve stádiích P16, P20 a P22.

### **3.2 Úkoly**

1. Sledovat a popsat morfogenezi M1 na histologických řezech barvených hematoxylinem-eosinem (HE) v postnatálních stádiích odontogeneze během erupce zubu P16, P20 a P22.
2. Sledovat a popsat morfogenezi okolní alveolární kosti na histologických řezech barvených HE ve stádiích P16, P20 a P22.
3. Sledovat časoprostorovou korelaci proliferace a apoptózy při vývoji zubu ve výše zmíněných stádiích.
4. Sledovat časoprostorovou korelaci proliferace, apoptózy a aktivity osteoklastů při remodelaci okolní alveolární kosti ve výše zmíněných stádiích.
5. Na základě výsledků a po jejich konfrontaci s jinými autory vyvodit patřičné závěry.

## 4 METODIKA

### 4.1 Zvířata

Myši (kmen CD-1) byly usmrceny postnatální den (P16, P20 a P22) podle schváleného projektu pokusů ÚŽFG AV ČR, v.v.i. Myši hlavy byly bezprostředně fixovány ve 4% pufrovaném roztoku paraformaldehydu a odvápněny v pufrovaném roztoku kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), (55g EDTA rozpuštěné v 270ml 40% formaldehydu a 730ml destilované vody). Dolní čelist byla poté rozdělena na jednotlivé kvadranty, ty pak byly dehydrovány ve vzestupné alkoholové řadě (70%-100% alkohol), prosyceny xylenem, následně fixovány v parafínu a zality do parafinových bloků.

Z parafinových bloků byly zhotoveny sériové frontální řezy o velikosti 4 $\mu$ m, které byly rozděleny do čtyř sad:

1. sada - barvení hematoxylin-eosinem (HE) pro sledování morfologie
2. sada – imunohistochemie PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – marker proliferace buněk
3. sada – TUNEL test (TdT mediated Nick End labeling) – enzymatické značení fragmentů DNA, marker apoptózy buněk
4. sada – TRAP (tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza) k barvení aktivity osteoklastů, marker resorpce kosti.

### 4.2 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

Imunohistochemické stanovení PCNA se užívá k detekci proliferujících buněk. Buněčná proliferace byla sledována jednak na histologických řezech (HE) a jednak imunohistochemickou detekcí PCNA v jádrech buněk. Sériové frontální řezy M1 moláru byly nejprve odparafinovány v roztoku xylenu a zavodněny v sestupné alkoholové řadě (100%-50%). Po oplachu preparátů v destilované vodě následovala blokace endogenní peroxidázy ponořením do kyvety s 0,3% roztokem peroxidu vodíku

ve fosfátovém pufru PBS. Po promytí vzorků v PBS se preparáty inkubovaly v blokačním séru (VECTASTAIN) o koncentraci 15 $\mu$ l v 1ml PBS. Následně byla aplikována primární protilátka anti-PCNA (SC-7907, Santa Cruz) o koncentraci 4 $\mu$ g/ml 4°C/noc. Po opětovném oplachu v PBS následovala reakce se spojovací (sekundární) biotinylovanou protilátkou Ab (VECTASTAIN) o koncentraci 5 $\mu$ l v 1ml PBS 30min/RT, která se váže specificky k Ig primární protilátky. Dalším krokem byla aplikace ABC reagentu z detekční soupravy. ABC komplex (VECTASTAIN) byl předem připraven z 1ml PBS a 10  $\mu$ l Reagent A (avidin DH) a 10  $\mu$ l Reagent B (biotinylový enzym) a směs byla ponechána 30 min/RT. Před aplikací chromogenního barviva 3,3'-diaminobenzidinu (DAB, K3466, Dako, Dánsko) zředěného 1 kapka do 1 ml ředidla DABu způsobujícího pozitivní zbarvení buněčných jader dohněda byly preparáty opět opláchnuty v PBS. Zastavení působení DABu bylo provedeno ponořením preparátů do destilované vody. K jasnému rozlišení negativních buněčných jader bylo použito protibarvení hematoxylinem, které způsobuje zbarvení negativních buněčných jader modře. Po odstranění nadbytečného barviva tekoucí vodou byly preparáty odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (70%-100%) a poté ponořeny do xylenu. Zamontování preparátu bylo provedeno pomocí eukitu s následným překrytím krycím sklíčkem. Detailní protokol viz příloha č. 1.

### **4.3 TUNEL test**

Biochemická metoda TUNEL test (TdT mediated Nick End labeling) (TUNEL, S7100; Chemicon-Millipore, USA) spolu se zjišťováním apoptických tělísek v HE části byly použity k detekci apoptózy.

Sériové frontální řezy M1 moláru byly nejprve odparafinovány v roztoku xylenu a zavodněny v sestupné alkoholové řadě (100%-70%). Po oplachu preparátů v PBS bylo zapotřebí rozrušit jadernou membránu pomocí roztoku proteinázy K (Chemicon-Millipore) o koncentraci 20 $\mu$ g/ml 15min/RT. Po opláchnutí vzorků v destilované vodě následovala blokáce endogenní peroxidázy ponořením do kyvety s 0,3% roztokem peroxidu vodíku. Před aplikací equilibračního pufru (Chemicon-Millipore) byl opět proveden oplach v PBS. Poté byla na základě manuálu připravena reakční směs. (Tdt enzym 3 $\mu$ l (Chemicon-Millipore) a reaktivní pufr 77 $\mu$ l (Chemicon-Millipore) ve 30 $\mu$ l

destilované vody) 45/50 min / 37°C. Po aplikaci Stop pufru (Chemicon-Millipore) 2ml v 68ml destilované vody 10 min/RT a propláchnutí preparátů v PBS byly vzorky překryty anti-digoxigeninovým konjugátem s POD (Chemicon-Millipore) 30 min/RT. Následoval další oplach v PBS a aplikace chromogenního barviva DAB. Chromogenní barvivo 3,3'-diaminobenzidinu (DAB, K3466, Dako, Dánsko) zředěné 1 kapka do 1 ml ředidla DABu způsobuje po reakci s POD pozitivní zbarvení buněčných jader dohněda. Zastavení působení DABu bylo provedeno ponořením preparátů do destilované vody. K jasnému rozlišení negativních buněčných jader bylo použito protibarvení hematoxylinem, které způsobuje zbarvení buněčných jader modře. Po vyprání nadbytečného barviva tekoucí vodou byly preparáty odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (70%-100%) a poté ponořeny do xylenu. Preparáty byly poté zamontovány (uzavřeny) do eukitu a překryty krycím sklíčkem. Detailní protokol viz příloha č. 2.

#### **4.4 TRAP test**

TRAP (tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza) substrátová reakce byla použita k detekci resorpční aktivity osteoklastů. Osteoklasty byly též potvrzeny na základě morfologie v HE části. Aktivní enzym TRAP v cytoplazmě buněk se substrátovou reakcí barví růžově.

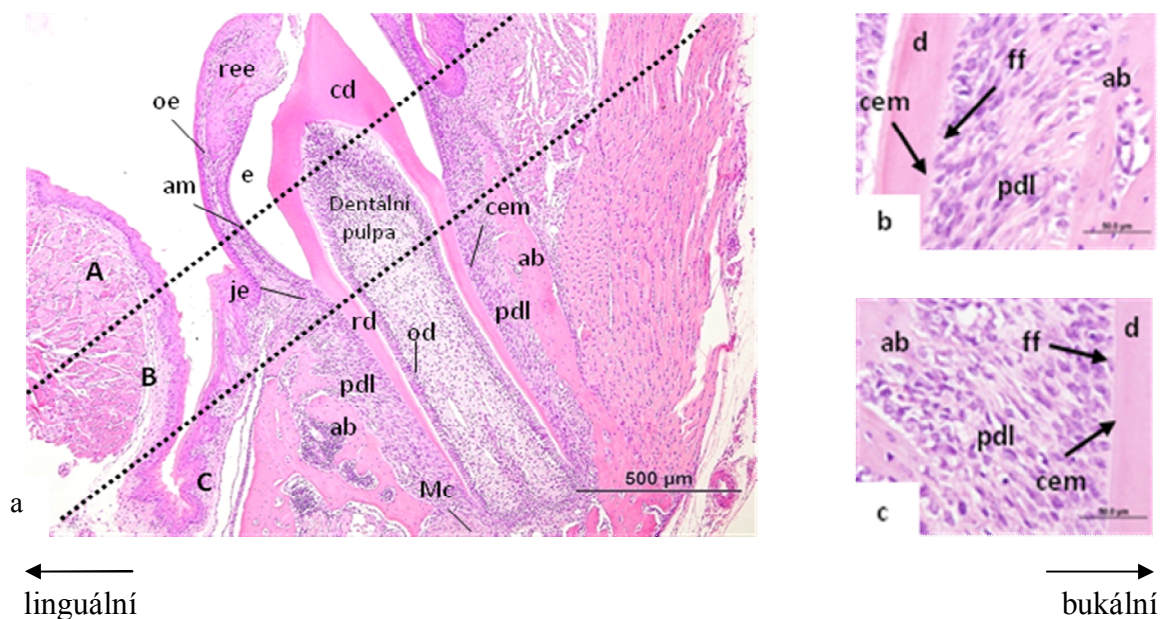
Sériové frontální řezy M1 moláru byly nejprve odparafinovány v roztoku xylenu a zavodněny v sestupné alkoholové řadě (100% - 30%). Po oplachu preparátů v destilované vodě byly vzorky ponořeny do reakční směsi připravené v souladu s pokyny výrobce (387A-1KT; Sigma-Aldrich, AR-MED Ltd., UK) (destilovaná voda 45 ml + naftol 0,5 ml + roztok octanu 2 ml + roztok tartrátu 1 ml + Fast garnet GBC base 0,5 ml + roztoku dusičnanu sodného 0,5 ml) pro dosažení barevné reakce s Fast Red substrátem 2 hod/37°C. Cytoplazma aktivních osteoklastů se zbarvila do růžova. Po opětovném opláchnutí v destilované vodě bylo použito protibarvení hematoxylinem, které způsobuje zbarvení buněčných jader modře. Po vyprání nadbytečného barviva v destilované vodě byly preparáty ponechány přes noc uschnout. Preparáty byly poté zamontovány (uzavřeny) do eukitu a překryty krycím sklíčkem. Detailní protokol viz příloha č. 3.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Výsledky

Díky dlouhodobému odvápnění zubů byla v této práci použita postnatální stadia P16, P20 a P22. Na jednotlivých frontálních řezech myšího mandibulárního moláru M1 byla sledována časoprostorová korelace proliferace, apoptózy a aktivity osteoklastů. Pozornost byla zaměřena na oblasti korunky (redukovaný sklovinný epitel, ameloblasty, ústní epitel), krčku (epitelová manžeta) a kořene (alveolární kost, periodontální vazy, cementoblasty, odontoblasty, dentální pulpa) (obr. 6).

Ve stadiu P16 je patrný redukovaný sklovinný orgán transformovaný ze sklovinného orgánu. V tomto stádiu se zub začíná prořezávat do dutiny ústní. Po stranách zubního krčku se začíná tvořit epitelová manžeta. Na detailu periodontálních vláken (obr. 6, b, c) je vidět tenká vrstva cementu, z níž vybíhají okrajová vlákna, která prorůstají do prostoru periodontálních vláken.

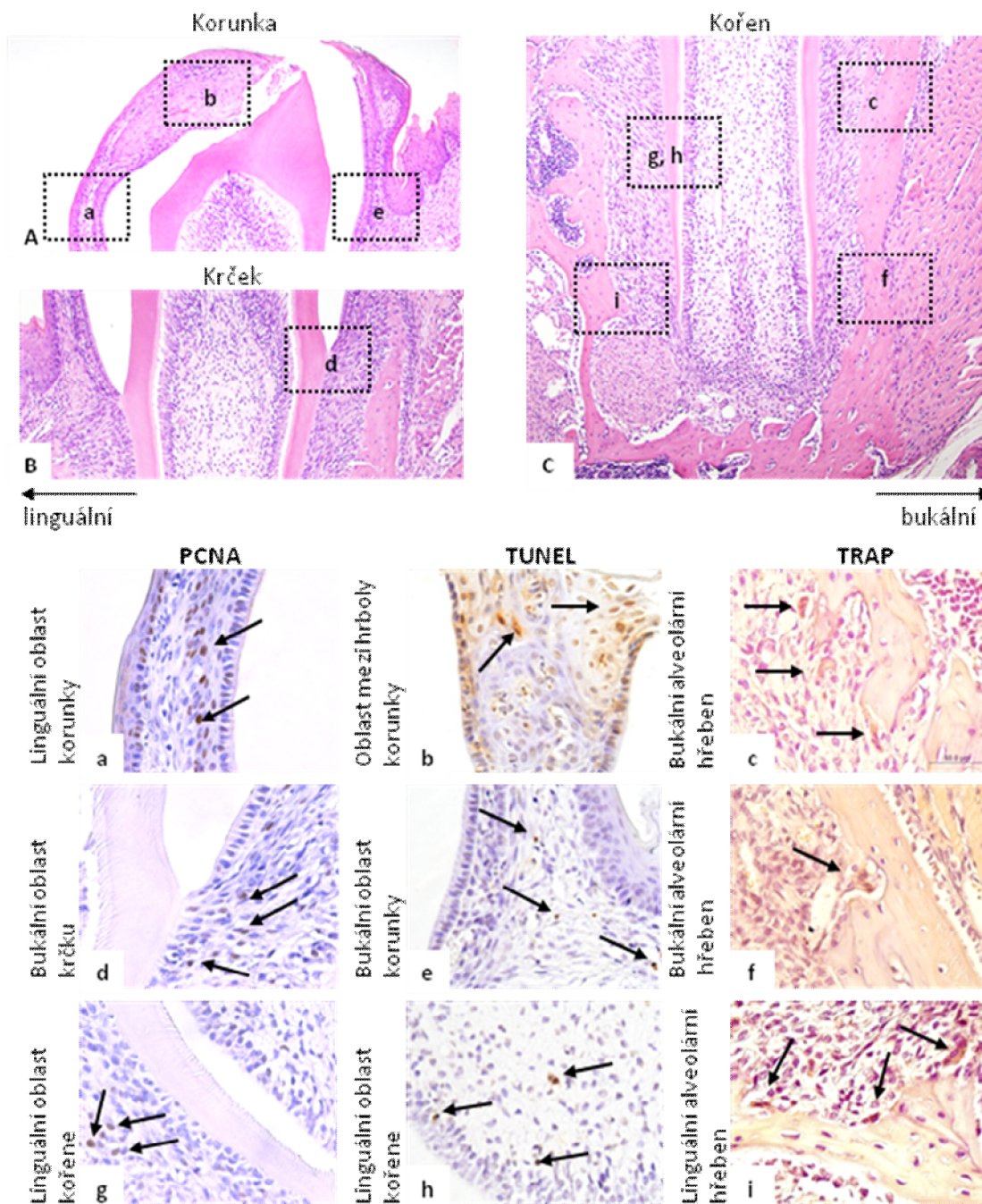


**Obr. 6** Myší mandibulární molár M1 stadium P16. Hematoxilin-eosinové barvení (a) morfologie moláru M1 s vyznačením jednotlivých sledovaných oblastí: A – korunka, B – krček, C – kořen (ree – redukovaný orgán skloviny, oe – orální epitel, am – ameloblasty, e – sklovina, cd – dentin korunky, rd – dentin kořene, od – odontoblasty, je – epitelová manžeta, cem – cement, ff – okrajová vlákna cementu, pdl – periodontální vazy, ab – alveolární kost, Mc - Meckelova chrupavka). Zvětšeno 40x. Detail periodontálních vláken b – bukální, c – linguální část kořene. Zvětšeno 400x.

Okrajová vlákna jsou směřována kolmo k povrchu kořene. Šikmo k povrchu kořene jsou pozorovatelná periodontální vlákna, která ještě nejsou napojena na okrajová vlákna cementu. Alveolus je široce otevřen a alveolární hřebeny dosahují oblasti krčku.

Ve stadiu P16 je buněčná proliferace je nízká. Je pozorovatelná především v oblasti orálního epitelu (obr. 7, a) a periodontálních vazů (obr. 7, g). Začíná proliferovat oblast epitelové manžety (obr. 7, d). V dentální pulpě byly nalezeny PCNA pozitivní buňky. Jelikož dochází k erupci zubu TUNEL pozitivní apoptické buňky byly pozorovány v měkkých tkáních nad hrbolky zubu, především u redukovaného sklovinného orgánu (obr. 7, b), buněk orálního epitelu (obr. 7, e) a v alveolární kosti. Výjimečně byly TUNEL pozitivní buňky nalezeny v dentální pulpě (obr. 7, h), kde díky odstranění buněk dochází k udržování homeostázy a uvolnění prostoru pro buňky nové. Kostní resorpce je velmi nízká. Několik pozitivních osteoklastů bylo detekováno podél vnitřního okraje bukalní i linguální strany alveolu. Další TRAP pozitivní buňky byly pozorovány na bázi kostní krypty pod kořenem zubu. (obr. 7, c, f, i).

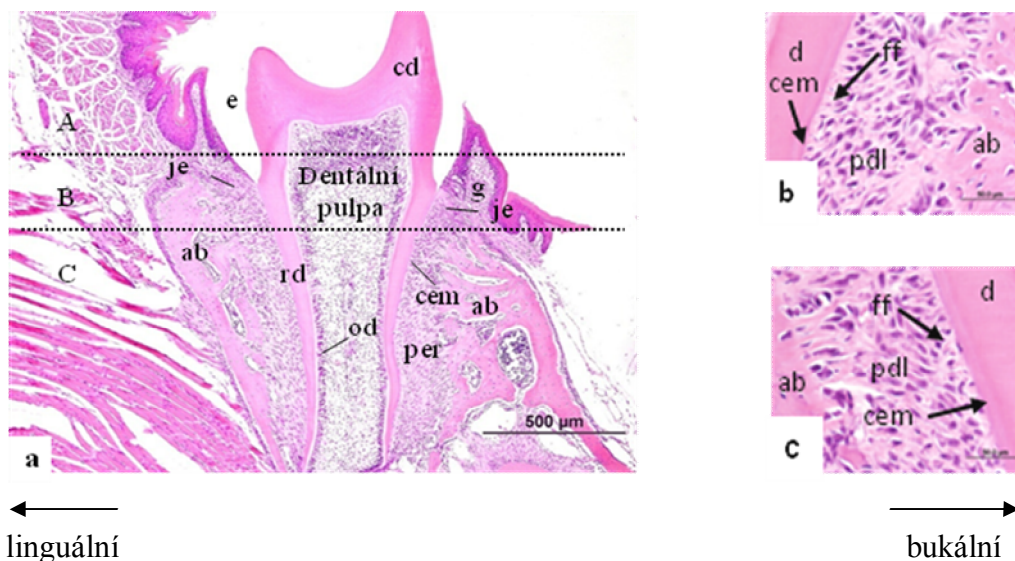
## Stadium P16 Hematoxylin-eosin



**Obr. 7** Myší mandibulární molár M1 v postnatálním stadiu P16. Hematoxylin-eosin barvení zubu: sledované oblasti A – korunka, B – krček, C - kořen s určením jednotlivých detailů (a-i). Zvětšeno 40x. PCNA imunohistochemie (a, d, g), šipky ukazují pozitivně zbarvené buňky do hněda. TUNEL test (b, e, h), šipky označují apoptické buňky zbarvené hnědě. TRAP pozitivní osteoklasty (c, f, i) zbarvené do růžova jsou naznačeny šipkami. Zvětšeno 400x.



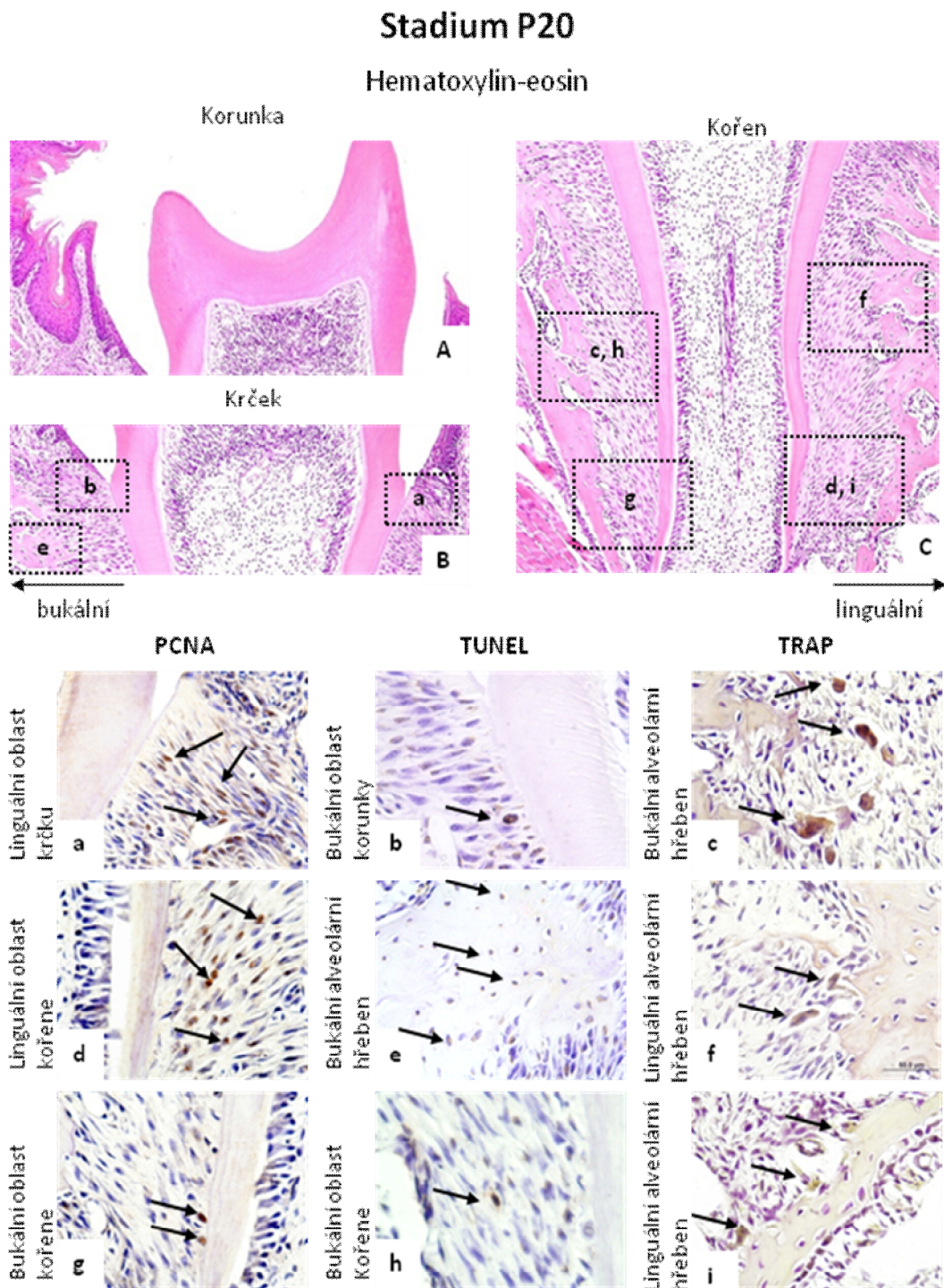
Ve stadiu P20 srůstá redukovaný sklovinný orgán s epitelem dásně při vytvoření epitelové manžety, která chrání zub před vstupem cizorodých látek. Redukovaný sklovinný epitel již není v tomto stádiu patrný, jak je vidět na řezech barvených HE ve stadiu P20 (obr. 8). Alveolus je široce otevřen a umožňuje tak správné ukotvení periodontálních vazů. Na detailním výřezu periodontálních vláken (obr. 8, b, c) jsou pozorovatelná okrajová vlákna cementu, která se začínají napojovat na periodontální vazy, tato vlákna ještě nejsou kolmo orientovaná.



**Obr. 8** Myší mandibulární molár M1 stádium P20. Hematoxilin-eosinové barven (a) morfologie moláru M1 s vyznačením jednotlivých sledovaných oblastí: A – korunka, B – krček, C – kořen (am – ameloblasty, e – sklovina, cd – dentin korunky, rd – dentin kořene, od – odontoblasty, g – gingiva, je – epitelová manžeta, cem – cement, ff – okrajová vlákna cementu, pdl – periodontální vazy, ab – alveolární kost). Zvětšeno 40x. Detail periodontálních vláken b – bukalní, c – lingvální část kořene. Zvětšeno 400x.

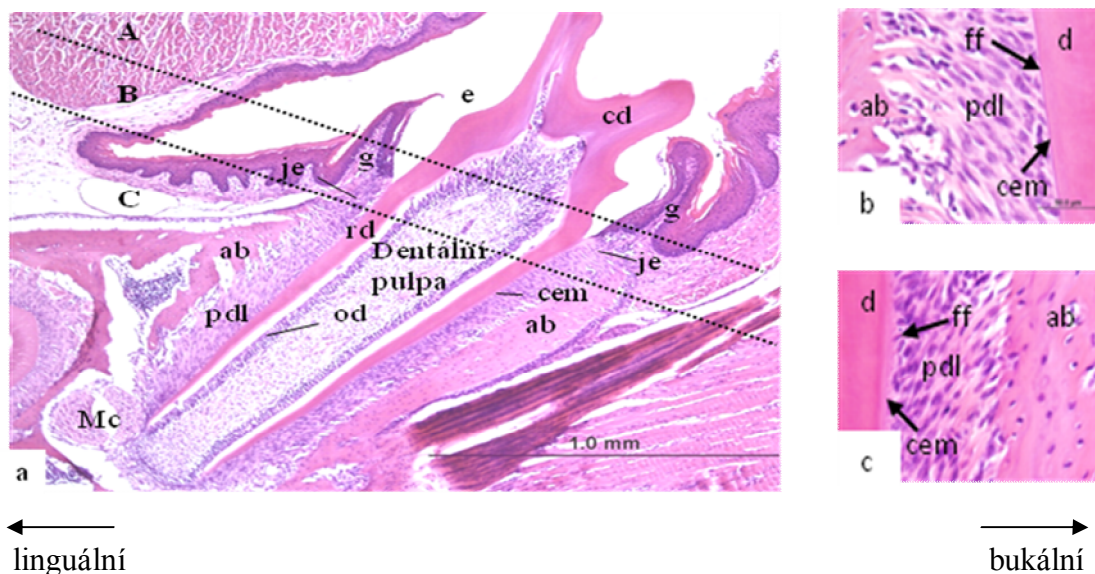
Ve stadiu P20 se zvyšuje proliferace epitelové manžety a periodontálních vazů v oblasti krčku (obr. 9, a). Několik pozitivních buněk bylo pozorováno v měkkých tkáních korunky. Apikálně na linguální straně kořene byly lokalizovány PCNA pozitivní buňky v okolním periodontiu (obr. 9, d). Dále byly nalezeny proliferující cementoblasty v dolní části bukalní strany kořene (obr. 9, g). Na druhou stranu byl nalezen v oblasti krčku taktéž na bukalní straně zubu cementoblast podstupující apoptózu (obr. 9, b). Apoptické buňky byly pozorovány rovněž na vrcholu bukalního hřebene alveolární kosti (obr. 9, e) dále v apikální části dentální pulpy a výjimečně v oblasti periodontálních vazů (obr. 9, h). Aktivní osteoklasty se nacházely podél

vnitřního okraje bukálního (obr. 9, c) i linguálního alveolárního hřebene (obr. 9, f) a na bázi zubního lůžka (obr. 9, i).



**Obr. 9** Myší mandibulární molár M1 v postnatálním stadiu P20. Hematoxylin-eosin barvení zubu jednotlivých sledovaných oblastí: A – korunka, B – krček, C – kořeny s vymezením jednotlivých detailů (a-i). Zvětšeno 40x. PCNA imunohistochemie (a, d, g), šipky ukazují pozitivně zbarvené buňky do hněda. TUNEL test (b, e, h), šipky označují apoptické buňky zbarvené hnědě. TRAP pozitivní osteoklasty (c, f, i) zbarvené do růžova jsou naznačeny šipkami. Zvětšeno 400x.

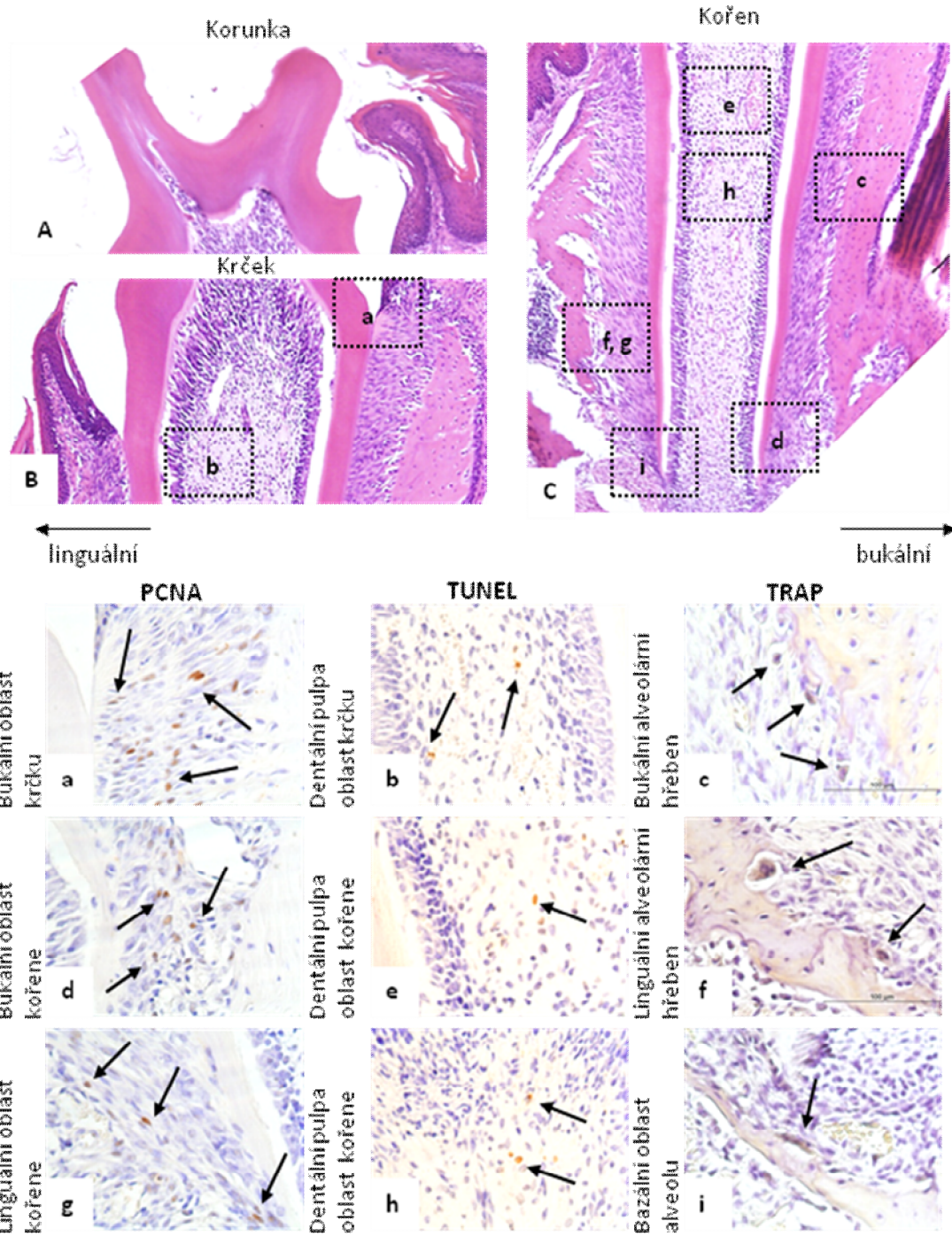
Ve stadiu P22 se na linguální straně zuby začíná vytvářet finální ukotvení zuby, což je patrné z propojení cementu a alveolární kosti pomocí periodontálních vazů (obr. 10, b, c). Zatímco periodontální vazy na linguální straně zuby (obr. 10, b) již probíhají paralelně, a tedy dosahují funkční orientace, periodontální vazy na bukální straně (obr. 10, c) jsou stále orientovány šikmo k povrchu kořene.



**Obr. 10** Myší mandibulární molár M1 stadium P22. Hematoxylin-eosinové barvení (a) morfologie moláru M1 s vyznačením jednotlivých sledovaných oblastí: A – korunka, B – krček, C – kořen (am – ameloblasty, e – sklovina, cd – dentin korunky, rd – dentin kořene, od – odontoblasty, g – gingiva, je – epitelová manžeta, cem – cement, ff – okrajová vlákna cementu, pdl – periodontální vazy, ab – alveolární kost, Mc - Meckelova chrupavka). Zvětšeno 40x. Detail periodontálních vláken b – bukální, c – linguální část kořene. Zvětšeno 400x.

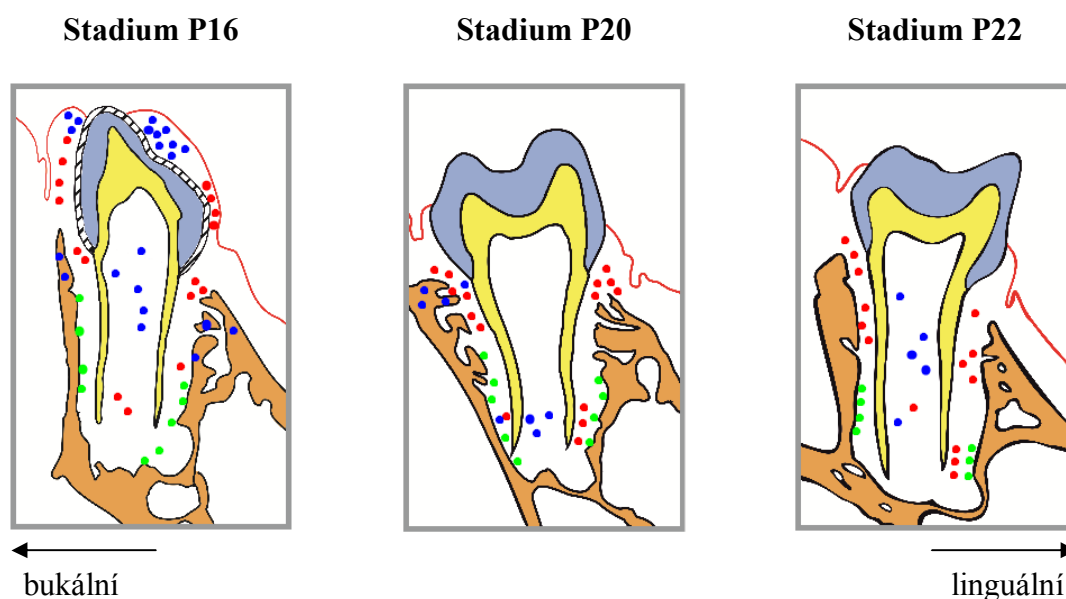
Ve stadiu P22 pokračuje proliferace epitelové manžety (obr. 11, a). Ojedinele byly detekovány proliferující buňky v periodontiu jak na bukální (obr. 11, d), tak na linguální straně kořenu (obr. 11, g). Výjimečně byly nalezeny proliferující buňky v dentální pulpě. TUNEL pozitivní buňky se nacházely pouze v dentální pulpě (obr. 11, b, e, h). TRAP pozitivní osteoklasty byly stále pozorovány podél vnitřního okraje bukálního (obr. 11, c) i linguálního alveolárního hřebene (obr. 11, f, i). Jejich počet se, ale snižuje. Alveolus se činností osteoklastů stále mírně rozšiřuje.

## Stadium P22 Hematoxylin-eosin



**Obr. 11** Myší mandibulární molár M1 v postnatálním stadiu P22. Hematoxylin-eosin barvení zubu jednotlivých sledovaných oblastí: A – korunka, B – krček, C – kořeny s vymezením jednotlivých detailů (a-i). Zvětšeno 40x. PCNA imunohistochemie (a, d, g), šipky ukazují pozitivně zbarvené buňky do hněda. TUNEL test (b, e, h), šipky označují apoptické buňky zbarvené hnědě. TRAP pozitivní osteoklasty (c, f, i) zbarvené do růžova jsou naznačeny šipkami. Zvětšeno 400x.

Na schematickém nákresu (obr. 12) byly naznačeny pozitivní proliferující, apoptické buňky a aktivní osteoklasty ve vybraných stádiích. Na schématech je patrný pokles proliferační aktivity, který se přesouvá do oblasti periodontálních vazů, což souvisí s aktivitou osteoklastů a tedy s resorpcí vnitřního povrchu alveolárních hřebenů. Ubývá i apoptických buněk. Po apoptické eliminaci měkkých tkání korunky, slouží apoptóza výhradně k udržování homeostázy především v oblasti dentální pulpy i okolního peridontia.



**Obr. 12** Schematické znázornění rozmístění proliferace, apoptózy a TRAP-pozitivních osteoklastů v myším mandibulárním moláru M1 v postnatálních stádiích P16, P20 a P22 (buněčná proliferace - červené body, apoptóza – modré body a TRAP pozitivní osteoklasty - zelené body, alveolární kost - okrová, sklovina - modrá, dentin - žlutá).

## 5.2 Diskuze

Tato práce navazuje na souhrnnou studii Lungové *et al.* (2011), která se zabývá postnatálním vývojem myšího mandibulárního moláru M1 od stadia P0 do P16, tedy od dokončení formování zubní korunky, přes vývoj kořene až po zahájení prořezávání zubu do ústní dutiny. Vývoj zubu a přestavba okolní kosti u myšího mandibulárního moláru M1 v pokročilejších stádiích odontogeneze během erupce zubu v literatuře zatím chybí. Do dnešní doby byly publikovány pouze souhrnné studie zabývající se postnatálním vývojem molárů během erupce u potkanů, krys, psů a primátů (Stern, 1964; Formicola *et al.*, 1971; Owens, 1979; Cho & Garant 1989; Marks & Schroeder, 1996) a komparční

studie srovnávající postnatální vývoj zubů a přilehlých tkání u potkanů či psů a lidí (Owens 1978; Sequeira *et al.*, 1992; Bosshardt, 1994; Bosshard & Schroeder, 1996). Jedná se tedy o první práci zabývající se postnatálním vývoje myších mandibulárních moláru M1 ve stadií P20 a P22.

V této práci byla sledována časoprostorová korelace proliferace, apoptózy a aktivity osteoklastů na myších mandibulárních molárech M1 v postnatálních stadiu P16, kdy dochází k zahájení prořezávání zubu do ústní dutiny a ve stadiích P20 a P22, kdy se zub dostává do funkční pozice. Během této studie byla pozorována nejen morfogeneze zubu, ale i morfogeneze přilehlých tkání, jako jsou tvorba a ukotvení periodontálních vazů, utváření epitelové manžety a remodelace alveolární kosti během erupce mandibulárního moláru M1.

Co se týče proliferace, publikovaná data v literatuře potvrzují, že intenzivní dělení buněk v postnatálních stadiích odontogeneze se zejména podílí na růstu a prodlužování zubního kořene. Je však zřejmé, že před prořezáním zubu se proliferační aktivita HERS ve stadiu P14 rychle snižuje, takže se aktivní růst kořene postupně zpomaluje, až se v P16 zcela zastaví. Jeho další růst je tedy zapříčiněn pasivním ukládáním kořenového dentinu nikoliv proliferační aktivitou (Chlástková *et al.*, 2011, Lungová *et al.*, 2011). Výsledky této práce ukazují, že ve stadiu P16 se objevují prolifерující buňky v cervikální oblasti zubu, což ukazuje na počátek tvorby epitelové manžety po obou stranách krčku. K proliferaci buněk epitelové manžety dochází i ve stadiích P20 a P22. Tyto buňky se navíc zároveň prodlužují a napojují na povrch zubu.

Epitelová manžeta zabezpečuje přímé spojení s povrchem zubu. Během prořezávání zubu do ústní dutiny dochází ke spojení redukovaného orgánu skloviny s orálním epitelem gingivy, čímž dochází k transformaci na epitelovou manžetu. Při kontaktu buněk epitelové manžety s povrchem zubů, dochází k vytvoření vnitřní bazální membrány a k ukotvení buněk v této membráně pomocí četných hemidesmosomů (Schroeder & Scherle, 1988). U zdravých zubů jsou vlákna napojena v místě cementosklovinné hranice. Ačkoliv epitelová manžeta nevykazuje fenotypové rozvrstvení, nejvzdálenější buňky epitelu mají tendenci k prodlužování. Epitelová manžeta má endocytickou kapacitu, zahrnující makrofágy a neutrofilly, jejichž činnost může mít ochranný charakter (Cho & Garant, 2000).

Výsledky této práce rovněž naznačují, že ve stádiích P20 a P22 dochází i k ojedninělé proliferaci buněk okolního periodontia. Tato proliferace koreluje s resorpcí kosti. Díky pokračujícímu rozšiřování alveolárního lůžka, dochází i ve stádiích během erupce zubu k další tvorbě periodontálních vazů. Vedle proliferace však probíhá v okolním periodontiu u diferencovaných fibroblastů intenzivní tvorba kolagenních vláken. Tato vlákna mění postupně svoji orientaci, napojují se na povrch cementu a povrch okolní kosti a vytváří tak funkčnímu ukotvení zubu v čelisti. Ve stadiu P16 byla na histologických řezech barvených HE patrná, kolmo orientovaná, vyvíjející se okrajová vlákna na povrchu cementu, která prorůstají do prostoru periodontálních vazů a šikmo orientovaná periodontální vlákna, která ještě nebyla napojena na okrajová vlákna cementu. Z výsledků této práce tedy vyplývá, že postupné napojení vláken na okolní struktury se vytváří ve stadiu P20. Ve stadiu P22 pak dochází k definitivnímu propojení cementu a alveolární kosti pomocí vláken PDL na linguální straně zubu. Bukálně se toto propojení vytváří pravděpodobně o dva dny později. Stadium P24 však nebylo díky potíží s odvápněním do této studie zahrnuto.

Podle Cho & Garant (1988) má vývoj okrajových vláken cementu na povrchu dentinu vztah k prodlouženým polarizovaným fibroblastům. Při vývoji těchto vláken vykazují fibroblasty cytoplazmatickou polaritu směrem ke kořeni zubu resp. ultrastrukturální vzhled těchto buněk je v souladu se směrem migrace buněk k povrchu kořene. Díky činnosti cementoblastů během počátečního vývoje cementu jsou okrajová vlákna pevně zabalena. Během erupce zubu dochází ke zrání periodontálních vláken a k jejich spojování s vláknými okrajovými za vzniku hlavních vláken periodontálních vazů. Většinou platí, že se hlavní periodontální vlákna vytváří od cementu k alveolární kosti. Pro správný vývoj, ukotvení periodontálních vazů a zakotvení zubu v alveolu dochází současně i k resorpci alveolární kosti.

K přestavbě alveolu dochází jednak díky apoptické eliminaci osteoblastů a osteocytů a jednak aktivitou osteoklastů. Programovaná buněčná smrt osteoblastů byla pozorována na vrcholech alveolárních hřebenů již před prořezáním zubu do ústní dutiny ve stadiu P16. Ve stadiu P20 byla apoptóza sledována pouze na bukalním hřebenu, což ukazuje na její postupný útlum. Osteoklasty byly prokázány na vnitřním okraji obou alveolárních hřebenů a na bázi alveolárního lůžka u stadií P16, P20 i P22. Počty aktivních osteoklastů však ve stádiích P20 a P22 postupně klesají, dochází tedy k útlumu resorpční aktivity. Vzhledem k mechanickému zatížení zubu při žvýkání a interakcím

mezi zubem a alveolární kostí trvá remodelační aktivita až do doby, dokud je zub zakotven v alveolu (Wise & King, 2008; Fleischmannová *et al.*, 2010).

Jak bylo už dříve prokázáno ve studiích Shibata *et al.* (1995); Lungová *et al.* (2011) a Moriguchi *et al.* (2011) při zahájení prořezávání zubu byly pozorovány TUNEL pozitivní buňky v tkáních kolem korunky a tedy v orálním a redukovaném sklovinném epitelu. Dochází tak k uvolnění erupční dráhy a korunka prořezávajícího se zubu se dostává do ústní dutiny. Ve stadiích P20 a P22 byla apoptóza detekována pouze v oblasti dentální pulpy a výjimečně v periodontiu. V těchto stadiích slouží apoptóza pouze k udržení stálého počtu buněk a tedy k udržení homeostázy. Na rozdíl od zjištění Lungové *et al.* (2011) nebyly ve stadiu pozorovány TUNEL pozitivní odontoblasty.

Výsledky této práce tedy potvrzují, že úspěch erupce a ukotvení zubu ve funkční pozici závisí na mnoha faktorech. Zprvé musí dojít k vytvoření erupční dráhy. Což vyžaduje resorpci alveolární kosti aktivitou osteoklastů a eliminací osteoblastů ve směru dráhy erupce za současného rozšíření alveolu podél vnitřního okraje stěn zubního lůžka (Lungová *et al.*, 2011, Marks & Schroeder, 1996). Pro prořezání zubů je rovněž důležitá eliminace měkkých tkání kolem prořezávající se korunky (Shibata *et al.*, 1995) a eliminace ameloblastů po skončení amelogeneze. Dále musí dojít k vytvoření a změně funkční orientace periodontálních vazů a jejich napojení mezi cementem kořene a alveolární kostí (Cho & Garant, 2000). Nedílnou součástí erupce je i vytvoření epitelové manžety, která zabraňuje proniknutí cizorodých látek (Schroeder & Scherle, 1988). Vývoj zubu během erupce je tedy složitý proces vyžadující neustálou komunikaci mezi zubem i přilehlými tkáněmi.



## 6 ZÁVĚR

Erupce je jedena z nedílných součástí vývoje zubu. Díky erupci se zub dostává do své funkční polohy. Během prořezávání zubů dochází k mnoha nezbytným procesům, tak aby se zub mohl zařadit do okluzní roviny: 1) k vývoji zubního kořene a periodontálních vazů a 2) k remodelaci alveolární kosti doprovázené růstem čelisti a tlakem žvýkacích svalů. Prořezávání zubu umožňuje především aktivní kostní metabolismus vlivem činnosti osteoblastů a osteoklastů.

V této práci bylo sledováno časoprostorové rozložení proliferace, apoptózy a aktivity osteoklastů v postnatálních stadiích P16, P20 a P22 u myšího mandibulárního moláru M1. Výsledky této práce potvrdily dynamický soulad mezi prořezáním M1 moláru a jeho ukotvením do alveolární kosti pomocí periodontálních vazů. Bylo prokázáno, že proliferace probíhá především v oblasti tvořící se epitelové manžety a periodontia. Toto zjištění korelovalo s resorpcí alveolární kosti na vnitřních okrajích alveolárních hřebenů, což prokazuje aktivita osteoklastů. Apoptóza hrála především roli v eliminaci osteoblast a v udržování stálého množství buněk především v oblasti dentální pulpy. Pokračující diferenciaci fibroblastů okolního periodontia vedla k funkční přestavbě periodontálních vazů zabezpečujících spojení zubu s okolní alveolární kostí. Výsledky této práce nově ukázaly, že se funkční periodontium vytváří postupně - nejprve na lingvální a poté i na bukální straně zubu. Koordinace a řízení těchto procesů by mohly stát hlavním tématem funkčních experimentů navazujících studiích postnatální odontogeneze.

## 7 REFERENCE

- Alatalo, S. L., Ivaska, K. K., Waguespack, S. G., et al.** (2004). Osteoclast derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis (ADO2)). *Clin. Chem.*, 50: 883–90.
- Bosshardt, D. D.** (1994). Formation and attachment of new cementum matrix following root resorption in human teeth: a light- and electron microscopic study. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants* (ed. by Davidovitch, Z.) 617-630.
- Bosshardt, D. D., Zalzal, S., McKee, M. D. & Nanci, A.** (1995). Immunocytochemical and lead-gold characterization of human and porcine cementum. *J. Dent. Res.*, 74 (special issue): 24.
- Bosshardt, D. D. & Schroeder, H. E.** (1996). Cementogenesis Reviewed: A Comparison Between Human Premolars and Rodent Molars. *Anat Rec.*, 245: 267-292.
- Brockers, A. L., Goei, S. W., Dumont, E. et al.** (2000). *In situ* detection of apoptosis in dental and periodontal tissues of the adult mouse using alexin-V-biotin. *Histochem Cell Biol.*, 113: 293-301.
- Cerri, P. S., Freymuller, E., Katchburian, E.** (2000). Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec.*, 258: 136–144.
- Coin, R., Lesot, H., Vonesch, J. L., et al.** (1999). Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int. J. Dev. Biol.*, 43(3): 261-267.
- Diamond, M. & Applebaum, E.** (1942). The epithelial sheath: histogenesis and function. *J Dent Res.*, 21: 403–411.
- Diekwisch, T. G. H.** (2001). The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol.*, 45: 695–706.
- Diep, L., Matalová, E., Mitsiadis, T. A., et al.** (2009). Contribution of the tooth bud mesenchyme to alveolar bone. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.*, 312B: 510–517.

- Dostálová, T., Seydlová, M., et al.** (2008). *Stomatologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-2700-4.
- Ekert, P. G. & Vaux, D. L.** (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.*, 17: 626–630.
- Fialová, S. & Nováková, K.** (2004). *Vybrané kapitoly z pedostomatologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN:8024408945.
- Fleischmannová, J., Matalová, E., Tucker, A. S., et al.** (2008). Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Oral Sci.*, 116: 1–10.
- Fleischmannová, J., Matalova, E., Sharpe, P. T., et al.** (2010). Formation of the Tooth-Bone Interface. *J Dent Res.*, 89(2):108-115.
- Formicola, A. J., Krampf, J. I., Witte, E. T.** (1971). Cementogenesis in developing rat molars. *J Periodontol.*, 42: 766–773.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119: 493-501.
- Gregory, S. G., Sekhon, M., Schein, J. et al.** (2002). A physical map of the mouse genome. *Nature*, 418: 743-750.
- Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I.** (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092: 385–396.
- Chlastáková, I., Lungová, V., Wells, K., et al.** (2011). Morphogenesis and bone integration of the mouse mandibular third molar. *Eur. J. Oral. Sci.*, 119: 265–274.
- Cho, M-I. & Garant, P. R.** (1988). Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J. Periodont. Res.*, 23:268-276.
- Cho, M-I. & Garant, P. R.** (1989). Radioautographic study of (3H) manose utilization during cementoblast differentiation, formativ of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers. *Anat Rec.*, 223: 209–222.

**Cho, M-I. & Garant P. R.** (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontol*, 24: 9–27.

**Jebavý, L. et al.** (2011). Chov laboratorních zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. 1. vydání. 50-58.

**Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., et al.** (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 463-469.

**Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., et al.** (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development*, 125: 161–169.

**Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O.** (1997). *Základy histologie*. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H&H.

**Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer.*, 26: 239–257.

**Khosla, S.** (2001). Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*, 142(12): 5050–5055.

**Kitahara, Y., Suda, N., Kuroda, T., et al.** (2002). Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone*, 30(1): 48-56.

**Klepáček, I. & Mazánek, J. et al.** (2001). *Klinická anatomie ve stomatologii*. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o. ISBN 80-7169-770-2.

**Klika, E., et al.** (1988). *Histologie pro stomatology*. Praha: Avicenum – zdravotnické nakladatelství.

**Lesot, H. & Brook, A. H.** (2009). Epithelial histogenesis during tooth development. *Archives of Oral Biology*, 54: S25-S33.

**Luan, X., Yoshihiro, I., Diekwisch, T. G. H.** (2006). Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn.*, 235: 1167–1180.

- Luckett, W. P.** (1993). Ontogenetic staging of the mammalian dentition, and its value for assessment of homology and heterochrony. *J. Mammal. Evol.*, 1: 269–282.
- Lungová, V., Radlanski, R. J., Tucker, A. S., et al.** (2011). Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *Journal of Anatomy.*, 1111: 1469-7580.
- Luukko, K., Løes, S., Furmanek, T., et al.** (2003). Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mech. Develop.*, 120: 270–276.
- MacNeil, R. L., Sheng, N., Strayhorn, C., et al.** (1994). Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J. Bone Miner. Res.*, 9:1597-1606.
- Macholán, M.** (1997). Myš domácí. *Vesmír*, 76(4): 208–21.
- Malinský, J., Lichnovský, V., Michalíková, Z.** (2002). Přehled histologie člověka v obrazech 1. díl. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.
- Malinský, J., Malinská, J., Michalíková, Z.** (2005). Morfologie orofaciálního systému pro studenty zubního lékařství. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 80-244-1062-1.
- Marks, S. C. Jr. & Schroeder H. E.** (1996). Tooth Eruption: Theories and Facts. *Anat Rec.*, 245:374-393.
- Matalová E., Tucker A.S., Sharpe P.** (2004). Death in the Life of s Tooth. *J Dent Res.*, 83: 11-16.
- Merglová, V., et al.** (2000). Stomatologie pro studující bakalářských oborů lékařské fakulty. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 80-246-0094-3.
- Moriguchi, M., Yamada, M., Miake, Y. & Yanagisawa, T.** (2011). Immunolocalization of TAK1, TAB1, and p38 in the developing rat molar. *Anat Sci Int.*, 86:69–77.
- Owens, P.** (1978). Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol.*, 23: 91–104.

- Owens, P.** (1979). A light and electron microscopic study of the early stage of root surface formation in molar teeth in the rat. *Arch Oral Biol.*, 24: 901–907.
- Peterková, R., Lesot, H., Vonesch, J., et al.** (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int. J. Dev Biol.*, 40: 1009–1016.
- Purevsuren, D., Reiko, T., Shinji, I., et al.** (2010). Possible involvement of maspin in tooth development. *Histochem Cell Biol.*, 134:603–614.
- Sequeira, P., Bosshardt, D. D., Schroeder, H. E.** (1992). Growth of acellular extrinsic fiber cementum (AEFC) and density of inserting fibers in human premolars of adolescents. *J Periodontal Res.*, 27: 134–142.
- Shi, Y., Szalay, M. G., Paskar, L., et al.** (1990). Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. *J. Immunol.*, 144:3326-3333.
- Shibata, S., Suzuki, S., Tengan, T. & Yamashita, Y.** (1995). A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Arch Oral Biol.*, 40:677–680.
- Shimazu, Y., Sato, K., Aoyagi, K., et al.** (2009) Hertwig's epithelial cells and multi-root development of molars in mice. *J Oral Biosci.*, 51: 210–217.
- Schroeder, H. E. & Scherle, W. F.** (1988). Cemento-enamel junction – revisited. *J Periodontal Res.*, 23: 53–59.
- Stejskalová, J. et al.** (2008). *Konzervační zubní lékařství*. (2nd ed.) Praha: Galén.
- Stern, I. B.** (1964). An electron microscopic study of the cementum, Sharpey's fibers and periodontal ligament in the rat incisor. *Am J Anat.*, 115: 377–410.
- Streelman, J. T., Webb, J. F., Albertson, R. C., et al.** (2003). The cusp of evolution and development: a model of cichlid tooth shape diversity. *Evol Dev.*, 5: 600–608.
- Suda, N., Kitahara, Y., Hammond, V. E. & Ohyamaa, K.** (2003). Development of a novel mouse osteoclast culture system including cells of mandibular body and erupting teeth. *Bone*, 33: 38–45.

**Šedý, J. & Foltán, R.** (2009). *Klinická anatomie zubů a čelistí*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-312-7.

**Thomas, H. F.** (1995). Root formation. *int. J. Dev. Biol.*, 39: 231-237.

**Tian, Q., Streuti, M., Saito, H., et al.** (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell*, 67:629-639.

**Tsurimoto, T.** (1999). PCNA binding proteins. *Front Biosci.*, 4:D849-58.

**Tucker A. & Sharpe P.** (2004). The cutting-edge of mammalian development: how embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics*, 5: 499-508.

**Vacek, Z.** (2006) *Embryologie*. Praha: Grada publishing. ISBN 80-247-1267-9.

**Viriot, L., Peterková, R., Vonesch, J., et al.** (1997). Mouse molars morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. III. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-staged first lower molar teeth. *Int. J. Dev. Biol.*, 41: 679–690.

**Wise, G. E. & King, G. J.** (2008). Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J. Dent. Res.*, 87(5): 414-434.

**Yamamoto, T.** (1986). The innermost layer of cementum in rat molars: Its ultrastructure, development, and calcification. *Arch. Histol. Jpn.*, 49: 459-481.

**Yamamoto, T. & Wakita, M.** (1990). Initial attachment of principal fibers to the root dentin surface in rat molars. *J. Periodont. Res.*, 25: 113-119.

**Zeichner-David, M., Oishi, K., Zhengyan, S., et al.** (2003). Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn.*, 228: 651–663.

#### **Internetové zdroje:**

URL1: **Thompson, E. G.** (2011). Normal Tooth Anatomy. Super text v síti WebMD. Retrieved 11. 11. 2012 from the World Wide Web: <http://www.webmd.com/oral-health/tooth-anatomy>.

URL2: **Nedorost, L., Tomanová, V., Eberlová, L., et al.** (2009). Atlas histologie tvrdých tkání. Super text v síti MEFANET LF v Plzni UK v Praze. Retrieved 30. 10. 2012 from the World Wide Web: <http://mefanet.lfp.cuni.cz> ISSN: 1804-4409.

URL3: Retrieved 15. 12. 2012 from the World Wide Web: Gene expression in tooth: <http://bite-it.helsinki.fi>

URL4: **Jelínek, R., Dostál M., Likovský, Z., et al.** Skripta histogie. Supertext v síti 3. LF UK. Retrieved 15. 11. 2012 from the World Wide Web <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>.

URL5: **Beranová, M. & Tonar, Z.** (2002). Principy a příklady imunohistochemie. Ústav histologie a embryologie LF UK v Praze. Retrieved 28. 10. 2012 from the World Wide Web: [http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc\\_hi\\_res.pdf](http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf)

URL6: **Zádvorská, R.** Imunocytochemická motoda – její principy a využití v laboratoři. Super text v síti PedF JU v Českých Budějovicích. Retrieved 28. 10. 2012 from the World Wide Web: [http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/MMCB\\_Imunocytochemie\\_Zavodska.pdf](http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/MMCB_Imunocytochemie_Zavodska.pdf)

URL7: Retrieved 11. 11. 2012 from the World Wide Web: [http://www.rndsystems.com/product\\_detail\\_objectname\\_tunel\\_assay\\_principle.aspx](http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_tunel_assay_principle.aspx).

URL8: **Palička, V., Živný, P., Friedecký, B.** (2003). Patobiochemie kostního metabolismu a možnosti sledování metabolického obratu kostní tkáně pomocí laboratorních metod. Praktická gynekologie 2/03. Retrieved 15. 12. 2012 from the World Wide Web: [http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg\\_03\\_02\\_10.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_03_02_10.pdf)



# PŘÍLOHY

## Příloha č. 1 Protokol imunohistochemie

**Téma:** Imunohistochemie PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

**Potřeby:** mikroskop, kádinky, kyveta, stopky, eppendorfka, pipety, krycí sklíčka

**Chemikálie:** xylén, etanol 50-100%, destilovaná voda, fosfátový pufr PBS, 0.3% roztok peroxidu vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, blokační sérum (VECTASTAIN), primární protilátka anti-PCNA (SC-7907, Santa Cruz), ředidlo Antibody diluent, sekundární biotinylová protilátka (VECTASTAIN) ABC reagent (VECTASTAIN), DAB+ředidlo (DAB, K3466, Dako, Dánsko), hematoxylin, eukit

Všechny chemikálie jsou uchovávány při 4°C (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PrimAb+ředidlo, SekAb (biotin), ABC kit, DAB+ředidlo)

### **Provedení:**

#### **Odstranění parafinu**

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| 1. Xylen I (špinavý) | 5 min  |
| 2. Xylen II (čistý)  | 10 min |

**Poznámky:** Použít samostatný košíček na xylén a etanol, aby 100% etanol zůstal čistý. Nejlépe opláchnout vzorky 100% etanolem před vložením do nádoby s čistým 100% etanolem.

#### **Zavodnění vzorku:**

- |                |        |
|----------------|--------|
| 3. Etanol 100% | 10 min |
| 4. Etanol 96%  | 5 min  |
| 5. Etanol 70%  | 5 min  |
| 6. Etanol 50%  | 5 min  |

**Poznámka:** 100% etanol v kyvetě dobře zavírat, váže vodu ze vzduchu. Častěji měnit.

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| 7. Destilovaná voda | 5 min |
|---------------------|-------|

**Blok endogenní peroxidázy** - odstranění peroxidázy v samotné tkáni z důvodu interference s vázanou POD – falešně pozitivní výsledky po přidání DABu):

8. Peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) 5 min

**Poznámky:** Peroxid vodíku je nutno zředit, původní koncentrace je obvykle 30%.

(Na 100ml = 99ml destilované vody a 1ml peroxidu vodíku)

9. PBS 3x 5min

**Poznámky:** PBS používáme zředěný 1:9, naředíme několik litrů, lze uchovávat při RT zředěný (na 1000ml=900ml destilovaná voda + 100ml PBS)

10. Osušíme oblast kolem řezů a hydrofobní tužkou vymežíme oblast kolem řezů.

11. Blokační sérum – ředění 15 μl/1ml PBS 30 min

### **Reakce s primární protilátkou (naváže se na detekovaný protein)**

12. Primární protilátka PCNA, 50x ředěná ředidlem na protilátku. Pipetou nakápneme na vzorky a jemně špičkou rozprostřeme tak, aby všechny řezy byly překryty (nedotknout se tkáně)

**Poznámky:** Finální objem protilátky na jedno/dvě sklíčka = 50 μl, max. objem 100 μl (100 μl = 98 μl ředidla + 2 μl protilátky). Roztok se připraví do ependorfky a promíchá špičkou pipety.

13. Vložíme do vlhké komůrky/ 4°C přes noc

14. PBS 3x 5min

15. Osušit oblast kolem řezů.

### **Sekundární protilátka s biotinem, váže se specificky k Ig primární protilátky**

16. Sekundární protilátka s biotinem = ředění 5 μl / 1ml PBS

-součást ABC kitu

17. Vložíme do vlhké komůrky/RT 30 min

18. PBS 3x 5 min

19. Osušit oblast kolem řezů

### **Reagent ABC - obsahuje streptavidin a peroxidázu vytvoření komplex**

20. Reagent ABC – ředění reagent A 10 μl + reagent B 10 μl / 1 ml PBS

**Poznámka:** Půl hodiny před použitím musí stát – chystá se současně se sekundární protilátkou

21. Vložíme do vlhké komůrky 30 min

22. PBS 3x 5 min

### **Substrátová reakce POD/DAB:**

Osušit oblast kolem řezů. Při práci s DAB používat rukavice a odpad odhazovat do speciální nádoby (DAB-karcinogenní účinky).

23. DAB chromogenní barvivo – ředění 1 kapka / 1ml ředidla DABu.

**Poznámky:** Od 1 min až do 5 min. Při mírném hnědnutí vložíme do PBS a v mikroskopu zkontrolujeme intenzitu barvení jader. Pokud je barvení nedostatečné osušíme sklíčka a opět překryjeme DABem, počkáme další minutu, popř. 2 min, opět vložíme do PBS a zkontrolujeme pod mikroskopem, až jsme s výsledkem spokojeni.

24. Zastavení DABu – destilovaná voda vyprat

#### **Protibarvení hematoxilinem:**

25. Hematoxylin v kyvetě 5 min

26. Probarvení 10 min pod tekoucí vodou

#### **Opětné odvodnění vzorku**

27. 70% etanol 3 min

28. 96% etanol 3 min

29. 100% etanol 5 min

30. Xylén I opláchnout

31. Xylén II (čistý) 10 min

#### **Montování**

32. Eukit, zakápnout a překrýt krycím sklíčkem. Pozor na bubliny.

33. Necháme zaschnout.

34. Vzorky zkontrolujeme pod mikroskopem a nafotíme.

## Příloha č. 2: Protokol TUNEL test

**Téma: TUNEL test (TdT mediated Nick End labeling) – detekce apoptózy**

**Potřeby:** mikroskop, kádinky, kyveta, stopky, eppendorfka, pipety, krycí sklíčka

**Chemikálie:** xylen, etanol 70-100%, destilovaná voda, fosfátový pufr PBS, 0.3% roztok peroxidu vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proteináza K, equilibrační pufr, Tdt enzym, reaktivní pufr, Stop pufr, anti-digoxigeninový konjugát, DAB+ředidlo, hematoxylin, eukit

Chemikálie jsou uchovávané v ledničce při 4°C (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proteináza K, DAB+ředidlo), v mrazáku -20°C (equilibr.pufr, Tdt enzym, stopo wash pufr, AbM digoxigen)

**Provedení:**

### **Odstranění parafínu**

1. Xylen I (špinavý) 5 min
2. Xylen II (čistý) 10 min

**Poznámky:** Použít samostatný košíček na xylen a etanol, aby 100% etanol zůstal čistý. Nejlépe opláchnout vzorky 100% etanolem před vložením do nádoby s čistým 100% etanolem.

### **Zavodnění vzorku**

3. Etanol 100% 10 min
4. Etanol 96% 5 min
5. Etanol 70% 5 min

**Poznámka:** 100% etanol v kyvetě dobře zavírat, váže vodu ze vzduchu. Častěji měnit.

6. PBS 5 min

**Natravení jaderné membrány** – reaktivní enzym se tak dostane do jádra

7. Proteináza K - naapilkovat na sklíčko, vlhká komůrka) 15 min/RT

Ředění: finální objem=100μl, 10μl proteináza + 90μl PBS

8. Destilovaná voda 2x2 min

**Blok endogenní peroxidázy** - odstranění peroxidázy v samotné tkáni z důvodu interference s vázanou POD – falešně pozitivní výsledky po přidání DABu

9. Peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) 5 min

**Poznámky:** Peroxid je nutno zředit, původní koncentrace je obvykle 30%.

(Na 100ml = 99ml destilované vody a 1ml peroxidu)

10. PBS 3x5 min

**Poznámky:** PBS používáme zředěný 1:9, naředíme několik litrů, lze uchovávat při RT ředěný (na 1000ml=900ml destilovaná voda + 100ml PBS)

11. Osušíme oblast kolem řezů a hydrofobní tužkou vymežíme vzorek

12. Aplikace equilibračního pufru 15 min/RT

(vyndat 1hod předem z důvodu rozmražení, neředí se, aplikace přímo na sklíčko, 40 μl)

13. Osušíme oblast kolem řezů

14. Aplikace TdT enzymu 45/50 min / 37°C

(vytáhnutí těsně předem)

Ředění: finální objem= 110μl

33μl enzymu (3μl enzymu, 30μl dest.voda)

77μl reakční pufr (dopředu rozmrazit)

Vložit do vlhké komůrky a termostatu.

15. Aplikace stop pufru v kyvetě

Ředění: finální objem=70ml, 2ml pufr + 68ml dest.voda 10 min

16. PBS 3x5 min

17. Osušíme oblast kolem řezů

18. Aplikace Anti-digoxigenin konjugátu 30 min/ RT

**Poznámka:** nakapeme a rozetřeme na sklíčko,  $65\mu\text{l}/5\text{cm}^2$  a vložíme do vlhké komůrky

19. PBS 4x2 min

**Substrátová reakce POD/DAB:**

Osušit oblast kolem řezů. Při práci s DAB používat rukavice a odpad odhazovat do speciální nádoby (DAB-karcinogenní účinky).

20. DAB chromogenní barvivo – ředění 1 kapka / 1ml ředidla DABu.

**Poznámky:** Od 10 s až do 2 min. Při mírném hnědnutí vložíme do PBS a v mikroskopu zkontrolujeme intenzitu barvení jader. Pokud je barvení nedostatečné osušíme sklíčka a opět překryjeme DABem, počkáme další minutu, popř. 2 min, opět vložíme do PBS a zkontrolujeme pod mikroskopem, až jsme s výsledkem spokojení.

21. Zastavení DABu – destilovaná voda 5 min

**Protibarvení hematoxilin:**

22. Hematoxylin v kyvetě 5 min

23. Probarvení 10 min pod tekoucí vodou

**Opětovné odvodnění vzorku**

24. 70% etanol 3 min

25. 96% etanol 3 min

26. 100% etanol 5 min

27. Xylén I opláchnout

28. Xylén II (čistý) 10 min

**Montování**

29. Eukit, zakápnout a překrýt krycím sklíčkem. Pozor na bubliny. Necháme zaschnout.

30. Vzorky zkontrolujeme pod mikroskopem a nafotíme.

### Příloha č.3: Protokol TRAP test

**Téma: TRAP test (tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza) – detekce aktivity osteoklastů**

**Potřeby:** mikroskop, termostat, teploměr, stopky, kádinky, kyveta, pipety, krycí sklíčka

**Chemikálie:** xylen, etanol 30-100%, destilovaná voda, fosfátový pufr PBS, naftol, Fast garnet base, roztok dusičnanu sodného, roztok octanu, roztok tartrátu, hematoxylin, eukit

Chemikálie jsou uchovávány v lednici při 4°C (naftol, Fast garnet base, roztok dusičnanu sodného, roztok octanu, roztok tartrátu, hematoxylin)

#### **Provedení:**

##### **Odstranění parafínu**

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| 1. Xylen I (špinavý) | 5 min  |
| 2. Xylen II (čistý)  | 15 min |

**Poznámky:** Použít samostatný košíček na xylen a etanol, aby 100% etanol zůstal čistý. Nejlépe opláchnout vzorky 100% etanolem před vložením do nádoby s čistým 100% etanolem.

##### **Zavodnění vzorku**

- |                |        |
|----------------|--------|
| 3. Etanol 100% | 10 min |
| 4. Etanol 96%  | 5 min  |
| 5. Etanol 70%  | 5 min  |
| 6. Etanol 70%  | 5 min  |
| 7. Etanol 50%  | 5 min  |

**Poznámka:** 100% etanol v kyvetě dobře zavírat, váže vodu ze vzduchu. Častěji měnit.

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| 8. Destilovaná voda | 5 min |
|---------------------|-------|

## 9. **Beaker B (TRAP)**

A.) Destilovaná voda 45ml - předeřrát na 37° C - vložit do špinavé kyvety a tu vložit do kádinky s vodou, 2 teploměry, 1x 100° C, 1x 50° C, udržet 41° C

B.) Naftol 0,5 ml

C.) Fast garnet (0,5ml fast garnet base + 0,5 ml roztok dusičnanu sodného 2 min nechat odstát - tvorba solí

D.) Roztok octanu 2,0 ml

E.) Roztok tartrátu 1,0 ml - teplota při přidání nad 37° C

10. Přelít do kyvety obalené alobalem, inkubovat při 37° C / 2hod v termostatu

11. Destilovaná voda 5min

12. Hematoxylin - zakápnout 15-30 s

13. Opláchnout v destilované vodě

14. Nechat přes noc oschnout do druhého dne

### **Montování**

15. Eukit, zakápnout a překrýt krycím sklíčkem. Pozor na bubliny. Nechat zaschnout.

16. Vzorky zkontrolujeme pod mikroskopem a nafotíme.