



Středoškolská technika 2008
Setkání a prezentace prací
středoškolských studentů na ČVUT

Buněčná dynamika během vývoje difyodontní dentice

Gymnázium Brno - Řečkovice
T. Novákové 2, 621 00, Brno

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně za odborné pomoci RNDr. Marcely Buchtové, Ph.D. Všechny zdroje, z nichž jsem čerpal jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č.121/2000 Sb., o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v plném znění.

V Brně dne 19.února 2009

.....

Jan Závala

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Laboratoři embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, v.v.i. Akademie věd ČR v Brně. Především pak své konzultantce RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D. za vedení mé práce, odborné konzultace, pomoc při metodických postupech práce a v neposlední řadě za pomoc při sestavování a psaní práce samotné. Dále bych chtěl poděkovat paní Kateřině Marečkové, která mi velice pomohla při seznámení s histologickými metodami a odborně mi radila při zpracování zkoumaných vzorků.

OBSAH

1. Úvod	5
2. Literární přehled	6
2.1. Vývoj zubů	6
2.2. Vývoj difyodontní dentice	9
2.3. Srovnání vývoje dentice u kočky a psa	10
2.4. Zubní vzory u člověka, psa a kočky	11
2.5. Morfologická struktura zubu	11
2.6. Detekce proliferace	15
2.7. Funkce zubů	16
2.8. Barva zubů	17
3. Materiál a metody	18
3.1. Materiál	18
- odběr materiálu	18
- seznam použitého materiálu	18
3.2. Histologické zpracování materiálu	18
- fixace vzorků	18
- převedení tkáně do parafínu	18
- zalití do parafínu	19
- krájení histologických řezů	19
- histologické barvení	20
- zalití do montovacího média	21
3.3. Imunohistochemické metody	22
- detekce PCNA	22
4. Výsledky	24
4.1. Optimalizace imunohistochemické detekce PCNA	24
4.2. Vývoj zubů u kočky: barvení hematoxylin-eosinem	24
4.3. Proliferační aktivita při vývoji zubů u kočky	33
5. Závěr	39
6. Seznam literatury	40

1. Úvod

Jako téma pro svoji středoškolskou odbornou činnost jsem si zvolil jedno z témat nabízených UŽFG, a to výzkum difyodontní dentice. Vybral jsem si tuto práci hlavně z toho důvodu, že bych se chtěl zubním lékařstvím v budoucnu podrobněji zabývat a věřím, že právě práce SOČ je dobrý začátek.

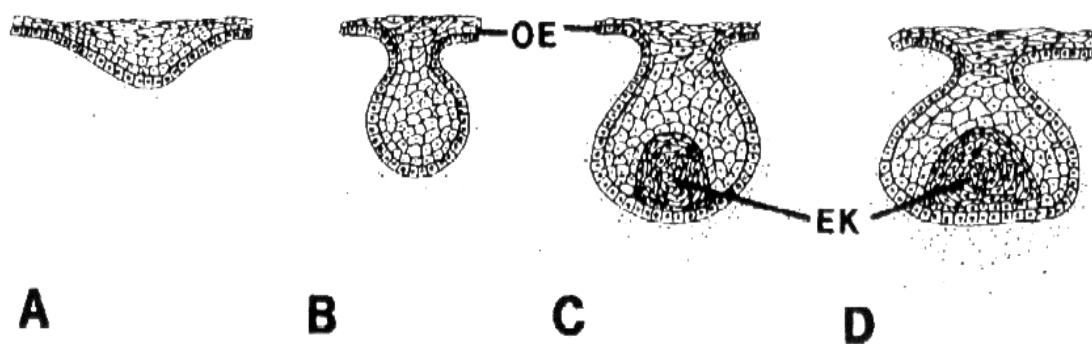
Samotný výzkum byl prováděn zejména na různých vývojových stádiích embryí kočky domácí, částečně také na embryích myši. Hlavním cílem mé práce je blíže prostudovat buněčnou dynamiku během vývoje dentice, což vlastně znamená sledovat četnost proliferujících buněk v různých vývojových stádiích embryí. Výsledky pak budou zpracovány zejména jako srovnání daných vývojových stádií, nebo jako srovnání vývoje u dvou rozdílných živočišných druhů kočky a myši. Tyto dva vývojové modely jsem si zvolil pro srovnání, jelikož kočka má stejně jako člověk dvě generace zubů, kdežto u myši se v průběhu vývoje tvoří pouze jedna generace zubů. Výsledky samotné by měli potvrdit naši hypotézu. Předpokládaná lokalizace největšího výskytu proliferujících buněk je v zubních základech ranných vývojových stádií, dále v zubní liště kočky a v okolí vyvíjející se kosti. Dále se domníváme, že v těch lokalitách, kde buňky proliferují nebude četný výskyt apoptotických buněk.

Celý výzkum provádíme v laboratoři. Nejdříve je třeba připravit si sledované vzorky, což představuje zalití tkáně do parafínu, krájení, barvení řezů a nakonec samotné pozorování mikroskopem, které by mělo přinést kýžené výsledky. Doufejme, že se nám podaří výzkum zdárně dokončit, a že výsledky potvrdí naši teorii.

2. Literární přehled

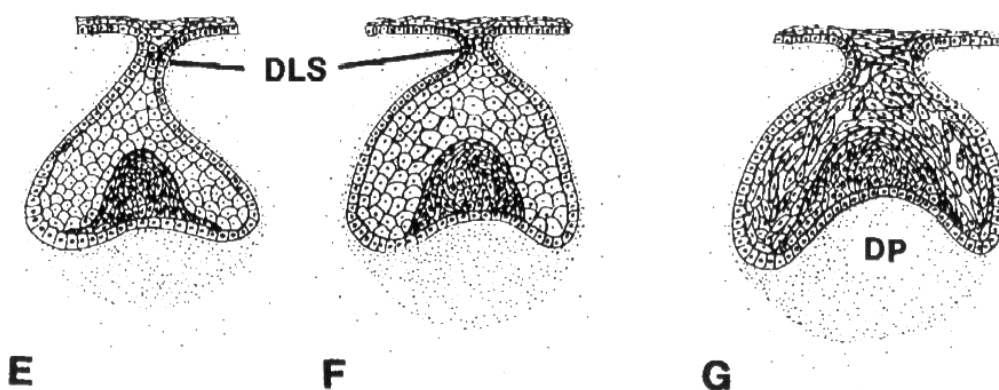
2.1. Vývoj zubů

Bazální vrstva orálního epitelu, neboli ektoderm, proliferuje zhruba v 6. týdnu těhotenství u člověka a vyklenuje se do okolního ektomezenchymu odvozeného z neutrální lišty. V obou čelistech tak vzniká zubní lišta, což je podkovovitý pruh ztlustěného epitelu. Později vzniká v každé čelisti deset ohnisek zvýšené mitotické aktivity, na kterých pak vznikají ektodermální výrůstky. Ty vytvářejí čepičky, které nasedají na ektomezenchymové shluky. Každý z těchto útvarů (zubních pupenů) se stává základem dočasněho zubu. Zubní pupen je složen ze dvou zásadních složek a to ektodermové a ektomezenchymové. Ektodermová složka vytváří sklovinný orgán, který produkuje sklovinu. Ektodermové buňky, které spojují zubní pupeny s povrchovým epitelem později degenerují, až úplně vymizí. Ektomezenchym se skládá z mezenchymových buněk, které vznikají z neutrální lišty ektodermového původu. Ektomezenchymová složka tvoří zubní papilu, v které se vytvářejí odontoblasty, což jsou buňky produkující dentin. Mezenchym se také koncentruje kolem sklovinného orgánu a v závěrečné fázi se diferencuje na cementoblasty (buňky produkující cement) a periodontální vazy.



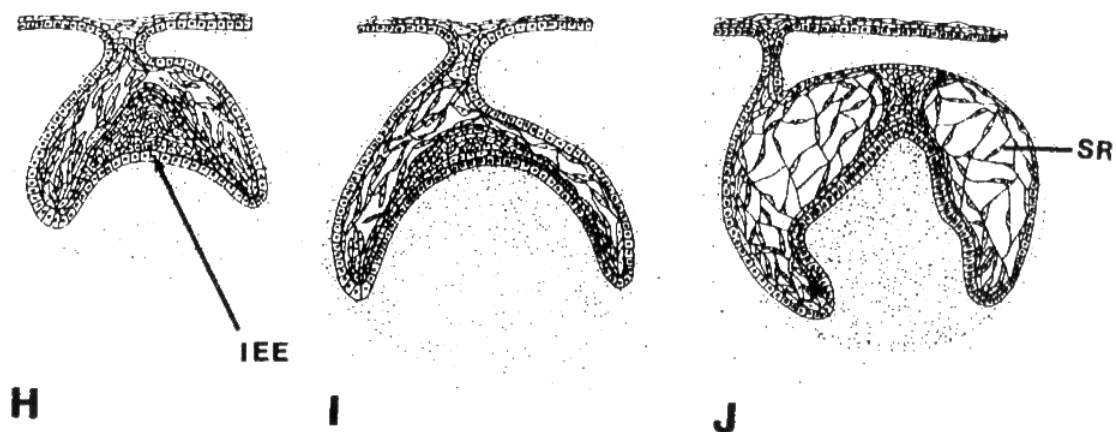
Obr. 1: Epiteliální ztlustění (A) a stádium zubního pupene (B-D)

Sklovinný orgán se během vývoje zvětšuje, postupně nabývá tvaru zubního pohárku a zhruba v 8. týdnu těhotenství tvaru zvonku. Zevní sklovinný epitel, který souvisí se zubní lištou, je narušován četnými kapilárami. Naproti tomu buňky přilehlé k zubní papile proliferují, nabývají cylindrického tvaru a vytvářejí vnitřní sklovinný epitel. Tyto buňky diferencují na ameloblasty, které secernují sklovinu. Zbylé epitelové buňky se vytvářejí z hvězdicovitých elementů mezi zevní a vnitřní epitelovou vrstvou stratum intermedium a retikulárního epitelu. Funkce obou těchto vrstev není doposud ještě příliš jasná.



Obr. 2: Stádium zubního pohárku

Vnitřní sklovinný epitel zůstává po celou dobu oddělen od okolního vaziva souvislou laminou. Tato lamina se pak obtáčí okolo vnitřní epitelové vrstvy a odděluje ji od ektomezenchymových složek zubní papily. Místo, kde vnější sklovinný epitel přechází na epitel vnitřní je označováno jako cervikální smyčka a v trojrozměrném prostoru tvoří kruh.

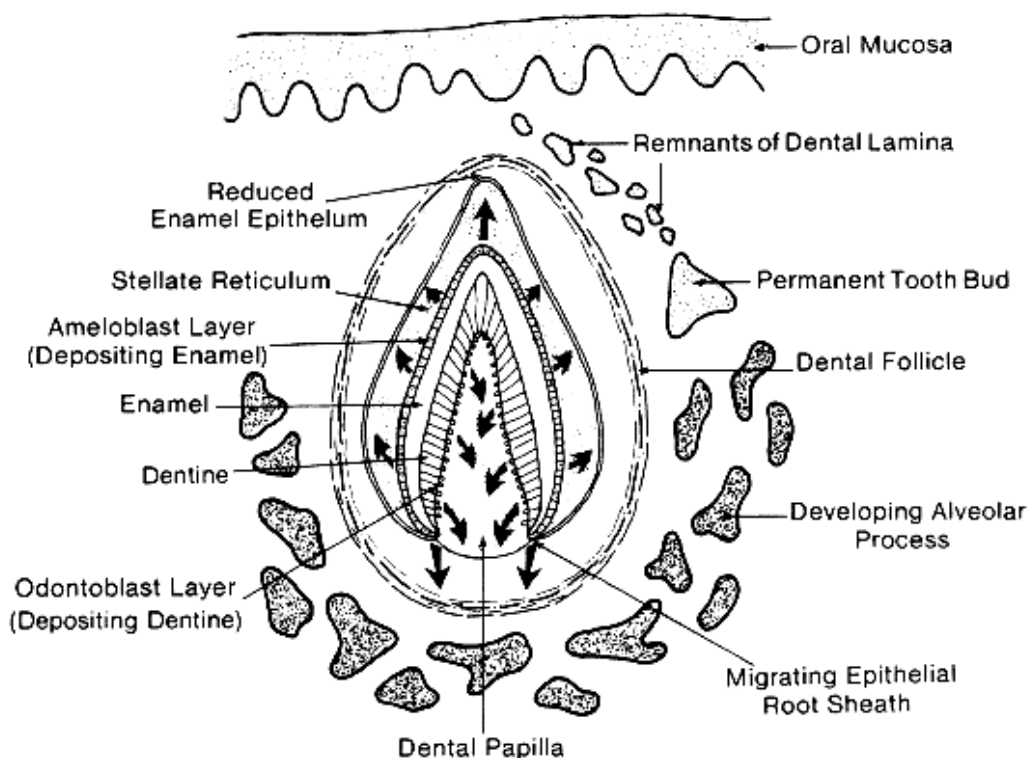


Obr. 3: Stádium zubního zvonku

Diferenciace ameloblastů je určována ektomezenchymovými buňkami zubní papily. Ameloblasty ze začátku ovlivňují povrchovou vrstvu buněk zubní papily, které se prodlouží a přemění v odontoblasty. Poté začnou produkovat zubní sklovinu. Vzniklé odontoblasty začnou produkovat predentin, který pak podněcuje ameloblasty k tvorbě skloviny. Tímto způsobem postupuje vlna recipročních indukcí od budoucí roviny okluze korunek směrem k zubním krčkům.

Tvorba dentinu

Odontoblasty začnou do svého okolí vylučovat prokolagen. Ten se později organizuje v kolagenní fibrily predentinu. Odontoblasty také zprostředkují mineralizaci kolagenních fibril, která vede ke vzniku dentinu. S postupnou akumulací dentinu ustupují odontoblasty od zubní dutiny, při tom za sebou zanechávají výběžky uložené v dentinových kanálcích, které pak prostupují celou šíří dentinové vrstvy.



Obr. 4: Směr produkce tvorby dentinu a skloviny

Tvorba skloviny

Ameloblasty mají oproti ostatním epitelovým buňkám tu výhodu, že se jejich spodní povrch, přivrácený k bazální lamině, mění na povrch sekreční. Kolem jejich apikálních a bazálních částí jsou pak vytvořena těsná spojení. Mezi jádrem a bazální částí je vyvinuto drsné endoplazmatické retikulum a poměrně složitý Golgiho komplex. Tyto buňky odděluje od odontoblastů a dentinu bazální lamina, za jejíž odbourávání jsou zodpovědné právě ameloblasty. Sklovinná matrix se sekretuje na krátkých Tomesových výběžcích. Boční povrch těchto výběžků vytváří organickou matrix interplazmatické skloviny, zatímco koncová část výběžku produkuje matrix sklovinných prizmat. V průběhu mineralizace se na organické matrix vytvářejí hydroxyapatitové krystaly. Ty jsou později téměř úplně odstraněny, pravděpodobně také činností ameloblastů. Po ukončení amelogeneze se sklovinný orgán skládá z vrstevnatého dlaždicového epitelu, který je však rychle rozrušen během prořezávání zubu do dutiny ústní.

Vývoj kořenů

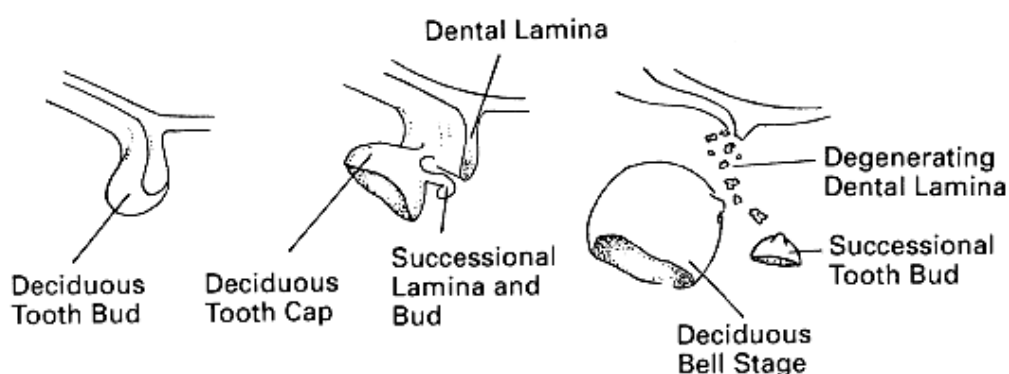
Po ukončení tvarového vývoje korunky a těsně předtím, než se zub prořeže na povrch, vzniká cervikální smyčka apikálním směrem a obaluje zubní papilu. Při tom vytváří takzvanou Hertwigovu kořenovou pochvu, která se skládá ze spojeného zevního a vnitřního sklovinného epitelu. Vnitřní vrstva indikuje tvorbu odontoblastů. Ty poté vystavějí dentinový základ zubního kořene. Po ukončení procesu se kořenová pochva rozpadá a nově vytvořený dentin iniciuje diferenciaci cementoblastů z mezenchymálních buněk okolního zubního vaku. Ty potom produkují cement, který pokrývá kořen zubu.

2.2. Vývoj difyodontní dentice

Na labiální straně zubní lišty se tvoří masa ektodermových buněk, což vytvoří přídatnou sekundární zubní lištu. V této zubní liště, podobně jako v primární, se vytvoří 20 ohnisek zvýšené mitotické aktivity. Z každého tohoto ohniska se později

vytvoří jeden definitivní protějšek dočasného zubu. Současně dochází k propagaci zubní lišty směrem dozadu, což dává vzniknout zárodkům tří permanentních stoliček. Základy pro druhý a třetí molár se objevují až po narození.

Dospělý člověk má 32 stálých zubů (8 v každém kvadrantu), kočka má 30 stálých zubů (7-8 v každém kvadrantu). Jsou uspořádány v maxile a mandibule ve dvou bilaterálně symetrických obloucích. Stálý chrup je předcházen chrupem dočasným, tvořeným u člověka 20 dočasnými (mléčnými) zuby u kočky 26 zuby.



Obr. 5: Vývoj první a druhé generace zubů

2.3. Srovnání vývoje dentice u kočky a psa

Pes	Dočasný chrup (týdny)	Trvalý chrup (měsíce)
Řezáky	3-4	3-5
Špičáky	3	4-6
Třenové zuby	4-12	4-6
Stoličky		5-7
Kočka	Dočasný chrup (týdny)	Trvalý chrup (měsíce)
Řezáky	2-3	3-4
Špičáky	3-4	4-5
Třenové zuby	3-6	4-6
Stoličky		4-5

2.4. Zubní vzory u člověka, psa a kočky

Člověk:

Dočasný chrup: $2 \times (2/2 \text{ i}, 1/1 \text{ c}, 2/2 \text{ m}) = 20$

Trvalý chrup: $2 \times (2/2 \text{ I}, 1/1 \text{ C}, 2/2 \text{ P}, 3/3 \text{ M}) = 32$

Pes:

Dočasný chrup: $2 \times (3/3 \text{ i}, 1/1 \text{ c}, 3/3 \text{ p}) = 28$

Trvalý chrup: $2 \times (3/3 \text{ I}, 1/1 \text{ C}, 4/4 \text{ P}, 2/3 \text{ M}) = 42$

Kočka:

Dočasný chrup: $2 \times (3/3 \text{ i}, 1/1 \text{ c}, 3/2 \text{ p}) = 26$

Trvalý chrup: $2 \times (3/3 \text{ I}, 1/1 \text{ C}, 3/2 \text{ P}, 1/1 \text{ M}) = 30$

Vysvětlení latinských termínů:

Incisors = Řezáky

Canines = Špičáky

Premolars = Třenové zuby

Molars = Stoličky

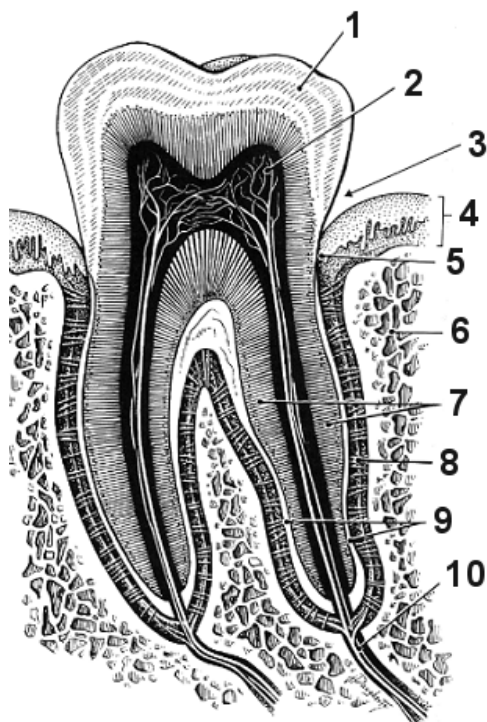
2.5. Morfologická struktura zubu

Zub se skládá z korunky (část zubu vyčnívající z dásně) a jednoho nebo více kořenů, skrytých v dásni. Kořeny zubu jsou zasazeny do kostních lůžek zvaných alveoly. Korunka je krytá mimořádně tvrdou sklovinou, zatímco kořen je potažen cementem. Oba dva tyto pokryvy se setkávají na krčku. Uvnitř zubu je obsažen materiál dentin (zubovina), který obklopuje prostor vyplněný tkání, označovaný jako zubní dřev (pulpa). Zubní dřev začíná od špičky kořene jako kořenový kanál, kde ústí malý otvor (foramen apicis dentis), kterým do pulpy vstupují krevní a lymfatické cévy a nervy. Zvláštní funkci má periodontální ligamentum, což je kolagenní vláknitá struktura zakotvená v cementu, která fixuje zub v alveolu a zároveň ho spojuje s dásní.

Dentin

Dentin je vápnatá tkáň podobná kosti, jenže díky vyššímu obsahu vápenatých solí, tvrdší. Je složena z kolagenních fibril, glykosaminoglykanů a solí vápníku. Organická matrix dentinu je secernována odontoblasty, které lemují vnitřní povrch zubu a oddělují jej od zubní dřevě. Odontoblast je polarizovaná štíhlá buňka, která produkuje organickou hmotu pouze na povrchu přivráceném k dentinu. Jádra jsou umístěna na bazální membráně. Odontoblasty mají charakteristickou strukturu polarizovaných buněk secernujících proteiny se sekrečními granuly obsahujícími protokolagen. Tyto buňky produkují také tzv. Tomesova vlákna, což jsou tenké větvené cytoplazmatické výběžky, které pronikají šířkou dentinu v kolmém směru. Růstem dentinu se vlákna prodlužují a probíhají v malých kanálcích, které se na okraji mezi dentinem a sklovinou bohatě větví. Výběžky odontoblastů mají průměr asi 3-4 mikrometry, na koncích se ještě tenčí.

Organická hmota, vyráběná odontoblasty, není na počátku vývoje ještě mineralizována a nazývá se predentin. K mineralizaci dochází až v dalším stádiu vývoje, když se v predentinu začínají objevovat matrixové vezikuly (váčky ohraničené membránou). Ty obsahují jemné krystaly hydroxyapatitu, které rostou a slouží pak jako krystalizační jádra pro další ukládání minerálu na okolních kolagenních fibrilách.



Obr. 6: Stavba zubu

- 1 – sklovina
- 2 – zubní dřevě
- 3 - záhyb
- 4 – dáseň
- 5 – dentogingivální spojení
- 6 – kost
- 7 – zubovina
- 8 – ozubice
- 9 – cement
- 10 – krevní cévy a nervy

Po zániku odontoblastů dentin přetrvává jako mineralizovaná tkáň (narozdíl od normální kosti). Proto je možné zachovat i zuby, jejichž pulpa nebo odontoblasty byly zničeny infekcí. U dospělých zubů, jejichž sklovina je narušena opotřebením nebo zubním kazem obvykle dochází k opětovné aktivaci tvorby dentinu.

Sklovina

Je to nejtvrďší materiál lidského těla, zároveň také nejbohatší na vápník. Z 95% se skládá ze solí vápníku, zbytek tvoří voda a organická hmota (0,5%). Na rozdíl od většiny ostatních struktur zubu, odvozených z mezodermu nebo neutrální lišty, vzniká činností buněk ektodermového původu. Organická matrix skloviny sestává přinejmenším ze dvou heterogenních tříd proteinů, zvaných amelogeniny a enameliny. Sklovina je složena z protáhlých tyčinek nebo sloupců krystalů hydroxyapatitu, označovaných jako sklovinná prizmata. Ta jsou k sobě vázána interprizmatickým emailem. Sklovinná prizmata i interprizmatický email jsou tvořeny krystaly apatitu a liší se pouze jejich orientací. Každé prizma proniká celou tloušťkou skloviny. Sklovinná hmota je produkována ameloblasty. Ty jsou vysoké, cylindrického tvaru a obsahují v oblasti pod jádrem velké množství mitochondrií. Nad jejich jádrem se naopak vyskytují profily drsného endoplazmatického retikula a dobře vyvinutý Golgiho komplex. Každá ameoblastická buňka obsahuje také jeden apikální výběžek, který obsahuje velké množství sekrečních granul. Součástí těchto granul je protein, vytvářející sklovinou matrix.

Zubní pulpa

Pulpa zubu, neboli zubní dřev, je složena z poměrně řídkého vaziva. Hlavními složkami zubní dřevě jsou odontoblasty, fibroblasty, tenké kolagenní fibrily a základní hmota obsahující glykosaminoglykany. Pulpa je hodně inervována a zásobena cévami. Krevní cévy a nervová vlákna vstupují do zubní dřevě přes zubní kanálek a bohatě se větví. Některá nervová vlákna ztrácejí svoji myelinovou pochvu a vstupují na krátkou vzdálenost do dentinových kanálků. Tato vlákna jsou pak citlivá na bolest, což je jediná sensorická aktivita vnímaná zubem.

Cement

Je to tkáňovitá hmota, která pokrývá dentin v oblasti kořene zubu. Má stavbu podobnou kosti, i když v ní chybějí Haversovy systémy i krevní cévy. V apikálním

úseku je tlustší, nacházejí se tu buňky zvané cementocyty, které jsou velice podobné osteocytům. Podobně jako ony jsou uzavřeny v lakunách, které jsou propojeny systémem kanálků. Cement je stejně labilní jako kterákoliv kostní tkáň a na mechanickou zátěž reaguje resorpcí nebo novotvořením tkáně, podle druhu a povahy zátěže, které je vystaven. Pokud je zničeno periodontální ligamentum, podléhá cement rozpadu a může být vstřebán. Růstové změny zubu kompenzuje neustálá tvorba cementu. Smyslem tohoto procesu je pak udržení kontaktu mezi kořeny zubu a stěnou alveolu.

Periodontální vazy

Periodontální ligamenta jsou složena ze speciálního typu husté vazivové tkáně. Vlákná této tkáně pronikají do cementu a připevňují jej ke kostěným stěnám alveolu, dovolují tak zubu omezený pohyb. Periodontální vazy slouží také jako periost alveolární kosti. Vlákná periodontálního ligamenta jsou uspořádána tak, aby podporovala síly vznikající při žvýkání. Toto uspořádání zamezuje přenosu přímého tlaku na kost. Ten by jinak mohl navodit místní resorpci.

Kolagen periodontálního ligamenta má podobné rysy jako v nezralé tkáni. To jsou zejména rychlá obnova proteinů a velký podíl rozpustného kolagenu. Prostor mezi jednotlivými vlákny je vyplněn glykosaminoglykany.

Alveolární kost

Alveolární kost je v přímém neustálém kontaktu s periodontálními vazami. Je to vláknitá kost nezralého typu, kolagenní vlákna zde nemají lamelární spořádání jak je typické pro zralou kost. Spojovací můstky mezi alveolární kostí a cementem vytvářejí četná kolagení vlákna periodontálního ligamenta, která pronikají oběma strukturami. V okolí zubních kořenů vytváří alveolární kost alveolus. Alveolární kostí pronikají cévy a nervy k foramen apicis dentis, kudy se pak dostávají do pulpy.

Gingiva

Gingiva, neboli dásněň, je sliznice pevně upevněná k periodontálním vazám horní a dolní čelisti. Je složena z vrstevnatého epitelu a četných vazivových papil. K zubní sklovině je připevněna pomocí kutikuly, která připomíná zesílenou bazální lamínu. Epitelové buňky jsou přichycené ke kutikule pomocí hemidezmosomů. Ve formě mělké brázdičky obkružuje korunku gingivální žlábk, který je vytvořen mezi

epitelem a zubní sklovinou.

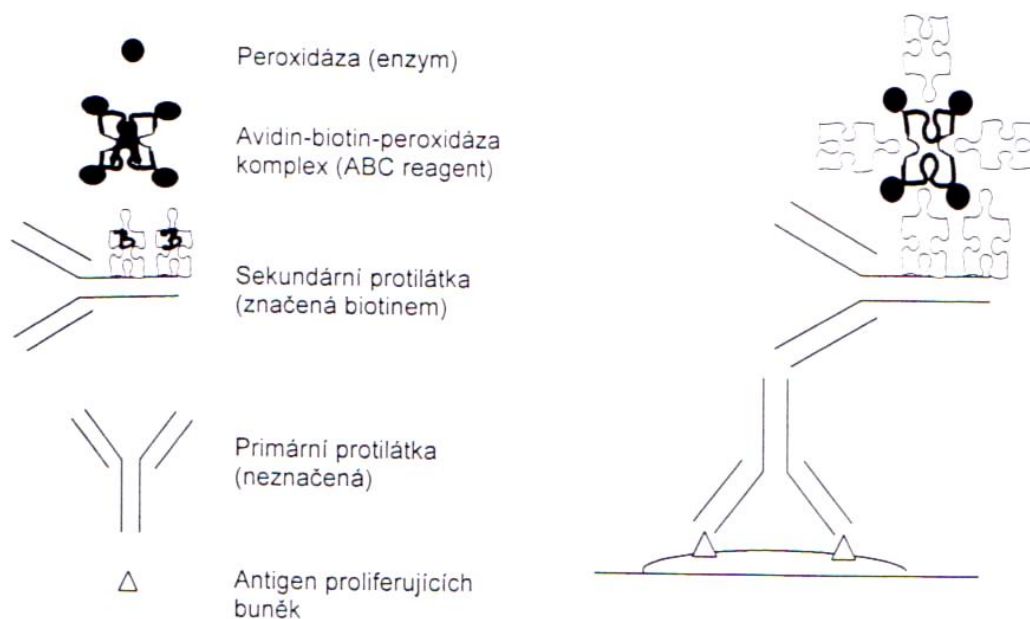
2.6. Detekce proliferace

Pro stanovení proliferativní aktivity v průběhu vývoje zubů jsme využili detekci PCNA (zkratka slov - proliferating cell nuclear antigen) (Takasaki et al. 1981). Jedná se o bílkovinu nepostradatelnou pro replikaci DNA v S-fázi buněčného cyklu eukaryot. Její výhoda, oproti třeba histologickým metodám, je v tom, že je nespecifická a proto ji můžeme použít na většinu živočišných druhů.

Základní nezbytností správné imunohistochemické reakce je blokování nespecifických a neimunitních vazeb. To je zaprvé zabránění endogenní peroxidázové aktivity. V průběhu této aktivity hemoproteiny (jako hemoglobin, myoglobin, cytochromy nebo katalázy) působí rozklad peroxidu a uvolnění molekulárního kyslíku, což by se pak projevilo falešně pozitivní reakcí pozadí. Proto je třeba ji potlačit 3% peroxidem vodíku (H_2O_2). Za druhé jde o zrušení nespecifické vazby reakčních směsí a tkání. Hlavním zdrojem nežádoucí nespecifické vazby bílkovin reakčních směsí na řez může být například hydrofobní vzájemné působení (interakce) proteinů a peptidů. Fixací tkáně formaldehydem se tyto hydrofobní vlastnosti molekul zesilují. To má pak za následek nespecifickou reakci pozadí, nepřehlednost a nečitelnost preparátu. K snížení této hydrofobie se používá tzv. blokační sérum, což je vlastně roztok proteinů v pufru.

Další složka imunohistochemické metody detekce PCNA je ABC komplex, který obsahuje avidin (glykoprotein vaječného bílku) umožňující navázat až čtyři molekuly biotinu a peroxidázy, neboli enzymu. Tím způsobuje zesílení signálu a preparát je poté čitelnější.

Samotný proces detekce probíhá tím způsobem, že se na antigen proliferujících buněk naváže neznačená primární protilátka, která způsobí zvětšení signálu. Na tu se poté navazuje sekundární protilátka (značená biotinem), na kterou se vzápětí navazuje Avidin-biotin-peroxidáza komplex (neboli ABC reagent). Ten na sebe konečně navazuje peroxidázu. Celý tento proces má kromě jiného hlavně vizualizační funkci. Řezy poté můžeme velice přehledně pozorovat pod mikroskopem.



Obr. 7: Schéma postupné vazby primární protilátky na antigen, následované sekundární protilátkou, ABC komplexem a peroxidázou pro zesílení sledovaného signálu

2.7. Funkce zubů

- Ukusování potravy
- Rozmělňování potravy
- Artikulace

Spodní a horní čelist vytvářejí v podstatě zrcadlový obraz, tedy chrup souměrný a stejnočetný. Řezáky slouží k uchopení a utržení potravy. Pomocí stoliček a třenových zubů rozmělnujeme přijatou potravu na hustou kaši.

Skus – jsou-li řezáky správně vyvinuty, dotýkají se při skusu hrany protilehlých zubů. Správný skus je velice důležitý, neboť je na něm závislé ukusování potravy. Pokud horní řezáky přesahují před spodní, vzniká vada, kterou označujeme jako podkus. Druhým případem je, když řezáky spodní čelisti přesahují řezáky v horní čelisti – tzv. předkus.

2.8. Barva zubů

Normální bílá barva zubů kočky bývá různého odstínu a závisí na průsvitnosti a síle skloviny. Změna barvy může být způsobena buď zevním zbarvením povrchu zubní skloviny nebo zubního kamene či změnou barvy vlastní zuboviny. Bakterie, které produkují barviva, můžou změnit barvu zubů do zelena, oranžova nebo černo-hněda. Zubní plak, který reaguje s železem obsaženým ve slinách, může zbarvit krčky zubů. Krmiva s nadbytkem chlorofylu zbarvují zuby do zelena. Živočišné uhlí ulpívá v dolíčkách a prasklinkách skloviny podobně jako hemoglobin. Léčiva obsahující železo působí povrchové ztmavnutí zubů, naopak síra, dusičnany stříbra nebo mangan vytváří šedožlutou až hnědočernou barvu, měď a nikl pak zelenou, kadmium zase žlutozlatou. Pouze povrchové zbarvení zubů je kosmetická vada, která nenarušuje stavbu ani funkci zubů. Zbarvení zuboviny u jednotlivých zubů vzniká po úrazu nebo také následkem zánětu zubní dřeně. Krvácením a rozpadem červeného krevního barviva může dojít k růžovému, šedému nebo i černému zbarvení zubů. Infekční onemocnění (např. horečnatá) prodělané v období vývoje zubů mají vliv na stavbu a vývin zubu i jeho zbarvení. Všechny zuby jsou postiženy při předávkování fluorem v době vývinu skloviny, která pak může být nerovná, bez lesku, neprůsvitně bílá se žlutými a hnědými skvrnami. Do žlutohněda může zuby zbarvit také léčba kořat tetracykliny, která zároveň narušuje růst zubů. Geneticky podmíněné onemocnění provázené změnou obvyklé barvy zubů známé u člověka nebylo u koček zatím objasněno. Změna barvy zuboviny je také často doprovázena sníženou pevností zubu. Prevencí proti zbarvení zubů je samozřejmě adekvátní krmení a včasná a účinná léčba případných onemocnění v době růstu zubů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

Odběr materiálu

Embrya a fěty koček byly odebrány na Klinice malých zvířat na VFU Brno ošetřujícím veterinárním lékařem. Materiál použitý pro řešení této práce je součástí embryologické sbírky Ústavu anatomie, histologie a embryologie.

Seznam použitého materiálu

Pro svou práci jsem vybral 6 následujících vývojových stádií kočičích embryí: DO 25, DO 27, DO 31, DO 36, DO 38 a DO 46.

Jako kontrolní tkáň pro imunohistochemickou reakci jsme použili embrya myši ve stáří 13 dnů prenatalního vývoje.

3.2. Histologické zpracování materiálu

Fixace vzorků

Fixace, neboli rychlé vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a tkání, má zabránit samovolnému rozpadu tkáně (autolýza). Fixaci provádíme ihned po odběru tkáně. Naše vzorky byly fixovány v 4% pufrovaném formalínu.

Převedení tkáně do parafínu

Při dalším postupu nejprve vypereme vzorek v pramenité vodě (po dobu 10-30 minut). Pokračujeme vzestupnou alkoholovou řadou (A 30%, A 50%, A 70%, A 80%, A 90%, A 95%, A 100%) v každém vzorek ponecháme po 30 minut. Poté pokračujeme řadou xylenů (xylen I, xylen II, xylen III) opět v každém 30 minut. Následně necháme vzorek projít ještě parafínovou řadou po 30-40 minutách (parafín I, parafín II, parafín III). Poté následuje zalití do čistého parafínu.

Zalítí do parafínu

Poté co tkáň řádně prosytíme parafínem, můžeme přistoupit k vlastnímu zalití do čistého parafínu. Do zalévacího modulu BioOptica DP500 naplníme parafín. Poté postupujeme tak, že necháme zalévací komůrku naplnit tekutým parafínem asi do poloviny. Tkáň umístíme v požadované orientaci a necháme lehce zatuhnout na chladicí podložce. Poté zalévací komůrku doplníme parafínem až po okraj a necháme

chvíli zatuhnout než přiložíme krycí zalévací kazetu. Tkáňový bloček popíšeme, abychom později věděli s čím pracujeme a necháme pořádně zatuhnout do druhého dne.



Obr. 8: Zalévání vzorku do parafinových bločků

Krájení histologických řezů

Histologické sériové řezy (o tloušťce 5 μ m) jsme zhotovili na rotačním mikrotomu Leica. Ty jsme poté přenesli na horkou ploténku, kde jsme je nechali roztáhnout na vodní hladině o teplotě 37 °C. Řezy nebylo nutno lepit na sklíčka, jelikož jsme používali speciální typ podložních skel (Superfrost), následně byly barveny.



Obr. 9: Sušení řezů na horké ploténce



Obr. 10: Krájení na rotačním mikrotomu

Histologické barvení

Při pozorování preparátů světelným mikroskopem nerozeznáme jednotlivé části tkáně, protože se navzájem mnoho neliší lomivostí světla. Z toho důvodu se používá barvení různých částí tkání různými barvivy (různé buněčné složky na sebe navazují různá barviva). Barvení existuje několik druhů, my jsme zvolili barvení parafinových řezů hematoxylin-eosinem. Nejprve z řezů odstraníme parafin xylenem. Poté sestupnou alkoholovou řadou převedeme histologické řezy do vody. Následně barvíme modře (používáme Mayerův hematoxylin), poté žlutě (používáme eosin). Preparáty odvodníme v alkoholu a necháme projít xylenovou řadou (projasnění vzorků). Po dokončení barvení následuje zamontování do montovacího média. Předpokládané výsledky barvení jsou: jádra – modrá, chrupavka – světle modrá, vazivo – žlutooranžové.



Obr. 11: Barvení histologických řezů

Zalítí do montovacího média

Ihned po vyndání řezů z posledního xylenu bylo nutné zamontovat je mezi podložní a krycí sklíčko pomocí speciálního montovacího média, EUKITu. Na podložní sklíčko nakápneme trochu média a rychle přiložíme krycím sklíčkem. Musíme postupovat precizně, aby v médiu nezůstaly žádné bublinky, které by sťažovaly pozdější pozorování preparátu. Poté necháme řezy zaschnout a očistíme případné nečistoty od montovacího média. Takto upravené řezy jsou již připravené k mikroskopickému pozorování.

3.3. *Imunohistochemické metody*

PCNA – protokol 1 (jaderný chromatin proliferujících buněk)

Celý postup jsme prováděli se soupravou VECTASTEIN MOUSE IgG, která obsahuje blokovací sérum, sekundární protilátku (Anti Mouse IgG) a ABC reagent na vizualizaci produktu.

Nejprve jsme řezy zbavili přebytečného parafínu, tím, že jsme je nechali projít xylenovou a posléze alkoholovou řadou (xylen I, xylen II - po 10ti minutách, alkohol I, alkohol II - po 5ti minutách). Následuje oplach v destilované vodě a 5 minut v pufru PBS, pak 10 minut v 3% H₂O₂ (ředění - 10ml H₂O₂ do 90ml PBS). Opět 5 minut v pufru následované blokovacím sérem (ředí se 3 kapky do 10ml ředícího roztoku – pufru TBS) po 20 minut ve vlhké komůrce. Při aplikaci séra nejprve obtáhneme řezy fixou, aby se nám tekutina neroztekla. Poté řezy zakápneme primární protilátkou (ředí se 5 mikrolitrů s 495 mikrolitry ředící látky – Antibody Diluent) a necháme hodinu ve vlhké komůrce, následuje 5 minut v PBS. Dále následuje 30 minut v sekundární protilátce (10ml pufru TBS + 3 kapky blokovacího séra + 1 kapka sekundární protilátky). Poté opět 5 minut v PBS, následně zakapání ABC reagentem (5ml TBS + 1 kapka A + 1 kapka B) na 30 minut a znovu oplach v pufru PBS. Následně můžeme přistoupit k zakapání DABem (1 kapka do 1,5ml DAB pufru). Sklíčko kontrolujeme pod mikroskopem, až začne tmavnout (hnědě) okamžitě slijeme, aby se nám požadované tkáně nepřebarvili. Postupujeme dále 5 minut v destilované H₂O, 1 minutu v Gillově hematoxylinu, 5 minut v pramenité vodě, 5 minut v destilované H₂O, alkohol I (5 min.), alkohol II (5 min.), alkohol III (5 min.), xylen I (10 min.), xylen II (10 min.). Poté následuje konečné zamontování do Eukittu.

PCNA – protokol 2 (s použitím citrátového pufru)

Narozdíl od výše uvedeného způsobu jsme pracovali se soupravou VECTASTEIN RABBIT IgG. Postup provádíme téměř stejně jako v prvním protokolu, ale vložili jsme jeden mezikrok. Začínáme standardně xylenovou a alkoholovou řadou, následuje destilovaná H₂O a PBS. Poté vložíme sklíčka do

plastové nádoby s citrátovým pufrům (ředí se 50ml citrátu s 450ml destilované H₂O) a v mikrovlnné troubě udržujeme 2 minuty těsně před bodem varu (řezy nesmějí projít varem). Potom necháme 20 minut vychladnout. Postupujeme dále 5 minut v destilované H₂O a 5 minut v PBS, potom už postupujeme stejně jako v prvním případě blokovacím sérem, primární protilátkou, PBS, sekundární protilátkou, PBS, ABC reagentem, PBS, DAB, a poté destilovaná H₂O, hematoxylin, alkoholová a xylenová řada. Nakonec opět následuje zamontování do Entellanu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Optimalizace imunohistochemické detekce PCNA

Při barvení našich prvních vzorků metodou detekce PCNA nebyly výsledky vůbec ideální a rovněž byly špatně pozorovatelné. Důvodem tohoto neúspěchu bylo s největší pravděpodobností stáří a způsob skladování řezů v embryologické sbírce. Řezy byly skladovány po dobu dvou let při pokojové teplotě, což nejspíše vedlo k jejich znehodnocení. Histologické řezy pro imunohistochemickou detekci by měli být skladovány v ledničce. Z tohoto důvodu jsme byli nuceni změnit metodiku PCNA barvení a přidat do procesu jeden krok (viz. Kapitola 3.3. Imunohistochemické metody). Tento krok zahrnoval vložení sklíček do plastové nádoby s citrátovým pufrem a jejich zahřívání v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut. Aplikace citrátu umožnila odkrytí antigenů na povrchu buněk a tím usnadnila vazbu primární protilátky na tyto antigeny. Díky tomuto kroku se nám podařilo získat dobrý signál u většiny vzorků.

4.2. Vývoj zubů u kočky: barvení hematoxylinem – eosinem

Výsledky jsou zpracovány na šesti různých stádiích vývoje kočičího embrya. Tato stádia jsou DO 25, DO 27, DO 31, DO 36, DO 38 a DO 46 (DO – dny ontogeneze). Fotografický materiál je rozdělen do čtyř tabulí, z nichž každá obsahuje jedno nebo dvě vývojová stádia. Všechny histologické řezy jsou transverzální. Obrázky v pravém sloupci představují detaily fotografií nalevo.

Tabule 1: Vývojové stádium DO 25 a DO 31.

A: Stádium DO 25, zvětšení objektivu 5x. Oblast ústní dutiny. V oblasti dolní čelisti jsou dobře vidět Meckelovy chrupavky a mandibulární kosti. Z technických důvodů nebylo možné provést otočení preparátu do vodorovné polohy a tedy fotografie jsou šikmo natočené. Můžeme vidět, že horní patro není ještě zcela srostlé.

B: Stádium DO 25, zvětšení objektivu 20x. Jedná se o pravý horní a dolní základ zubní lišty.

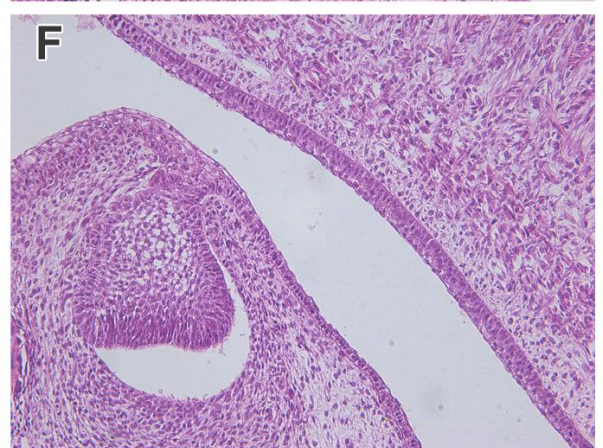
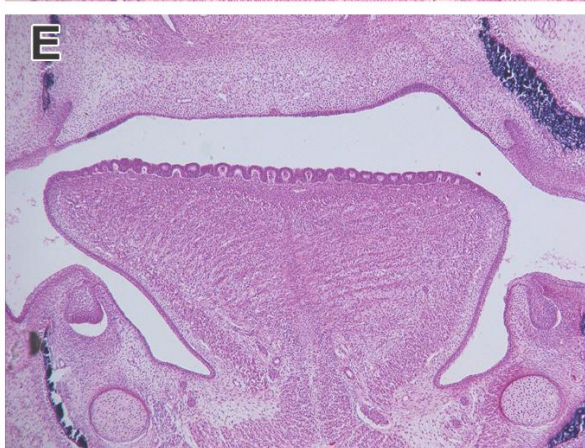
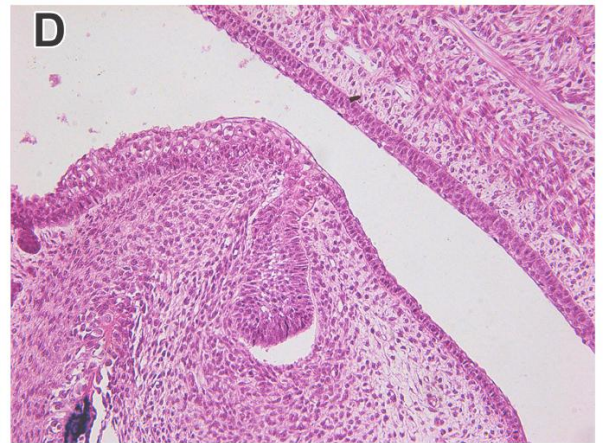
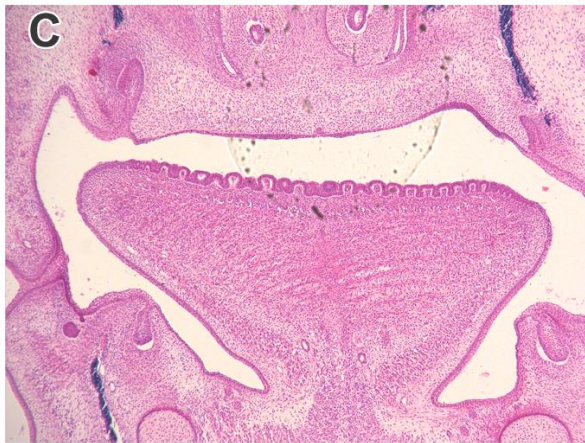
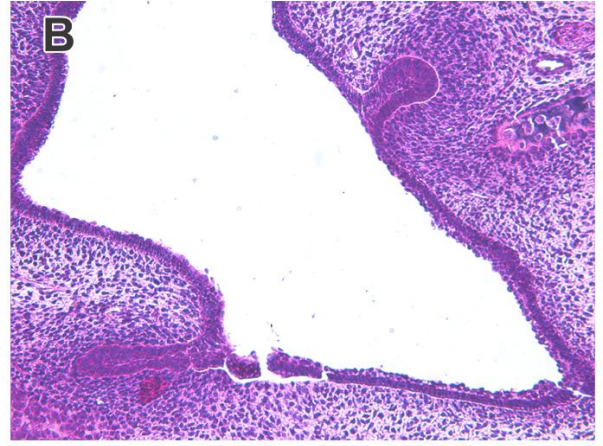
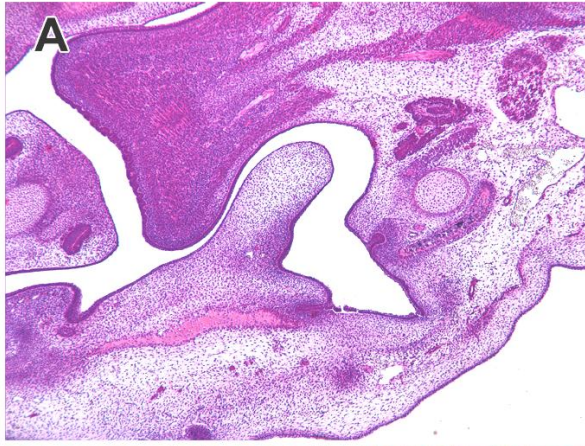
C: Stádium DO 31, zvětšení objektivu 5x. Jedná se o fotografii oblasti vyvýjejší se dutiny ústní. Uprostřed vidíme jazyk, v každém zubním kvadrantu pak jeden zub. Dole na snímku jsou opět částečně vidět Meckelovy chrupavky.

D: Stádium DO 31, zvětšení objektivu 20x. Jedná se o detail pravého dolního zubu. Zub je zde stále ještě ve stádiu zubního pupene, v jeho dolní části se již začíná vytvářet sklovinný uzel.

E: Stádium DO 31, zvětšení objektivu 5x. Opět vidíme trasnverzální řez ústní dutinou. Na okrajích obrázku jsou kosti (maxila a mandibula). Jejich sytě modré přemodření je způsobeno nedokonalým odvápním při zpracování vzorku.

F: Stádium DO 31, zvětšení objektivu 20x. Detail pravého dolního zubního základu z obrázku E, který se nachází již v ranném stádiu zubního pohárku.

Tabule 1



Tabule 2: Vývojové stádium DO 27.

A: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 5x. Na obrázku vidíme část horní i dolní čelisti. V oblasti čelisti dolní vidíme takzvanou Meckelovu chrupavku a vedle ní jazyk. Můžeme zde rozeznat obě zubní lišty v pravé i levé polovině. Vidíme, že dochází k nahloučení buněk v těsném okolí zubní lišty, kde můžeme později očekávat vývoj zubů.

B: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 20x. Je to detail snímku A, z pravé dolní čelisti. Zubní zárodek je ve stádiu zubního pupene s nahloučením buněk v hlouběji umístěné části.

C: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 5x. Opět oblast vyvíjející se dutiny ústní.

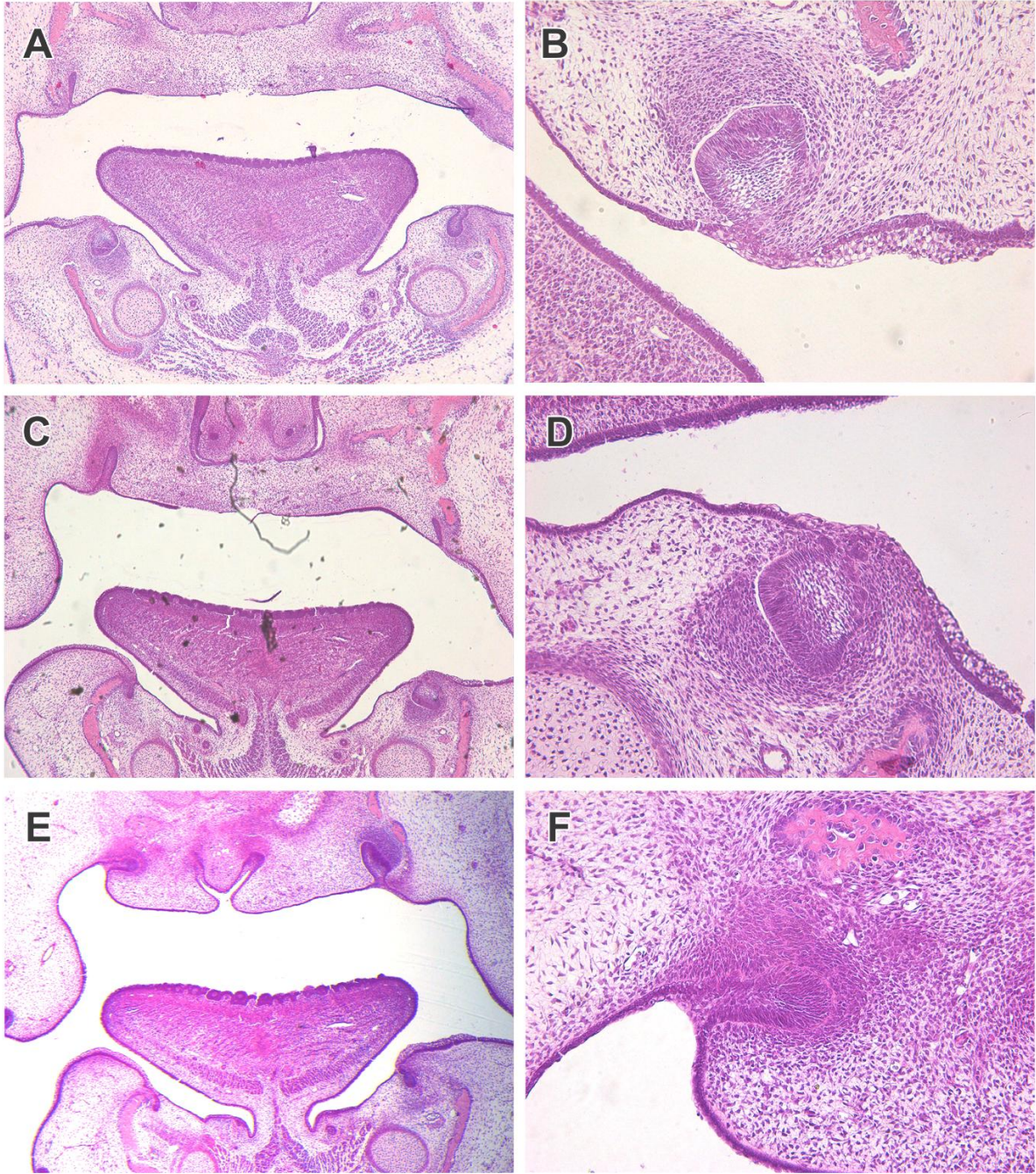
D: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 20x. Detail levého dolního zubu. Pozdní stádium zubního pupene. Vidíme nahloučení buněk okolo bazální membrány.

E: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 5x. Oblast dutiny ústní s otevřeným patrem.

F: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 20x. Nacházíme se v pravém horním kvadrantu.

Na obrázku vidíme samostatnou zubní lištu, bez vyvíjejícího se zubního základu.

Tabule 2



Tabule 3: Vývojová stádia DO 38 a DO 36.

A: Stádium DO 38, zvětšení objektivu 5x. Náhled na pravý horní zubní zárodek. Vidíme již pokročilé stádium vývoje zubu, zubní lišta je již oddělena od orálního epitelu.

B: Stádium DO 38, zvětšení objektivu 20x. Detail obrázku A. Zub se nachází v raném vývojovém stádiu zubního zvonku. Dochází k diferenciaci na jednotlivé vrstvy – vnější a vnitřní sklovinný epitel a retikulum. Velké nahloučení buněk je opět v oblasti bazální membrány a v zubní pulpě.

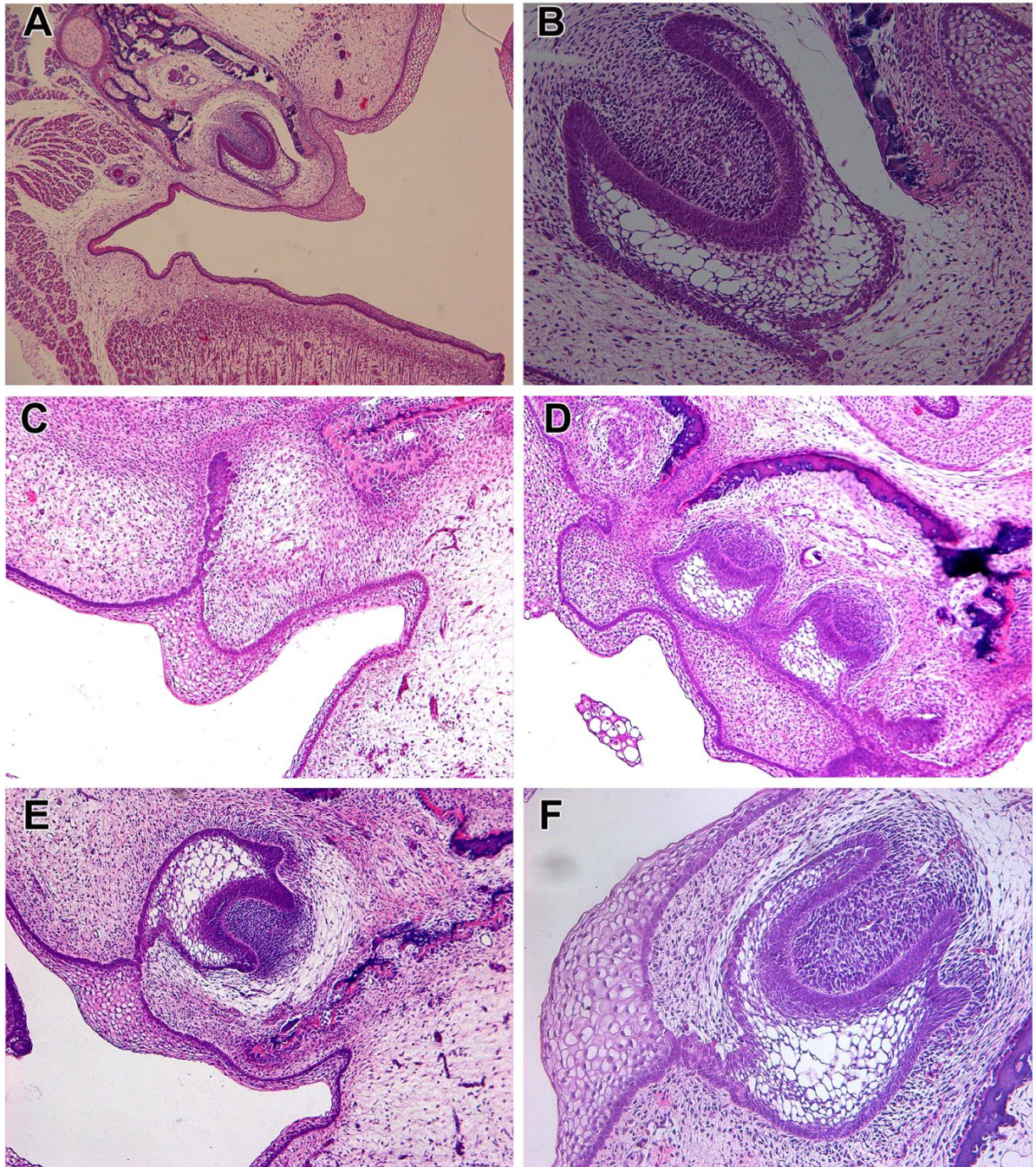
C: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 10x. Na obrázku vidíme vyrůstající dentální lištu. Nacházíme se v interdentalní oblasti, proto tu nejsou patrné žádné zubní zárodky.

D: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 10x. Vidíme dva zubní základy, nacházející se ve stádiu pozdního zubního pohárku.

E: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 10x. Zub ve vývojovém stupni raného zubního zvonku. Zubní lišta, vyrůstající z dentálního výběžku je již téměř oddělena od orálního epitelu.

F: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 20x. Detail obrázku E. Na pravé straně fotografie můžeme vidět vyrůstající nový výběžek. V této oblasti se bude později tvořit druhá generace zubů.

Tabule 3



Tabule 4: Vývojové stádium DO 46. Toto je naše nejstarší vývojové stádium.

A: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 5x. Poměrně pokročilé mineralizační stádium vývoje zubu. Vidíme již silnou vrstvu vytvořeného dentinu. Zubní lišta je již fragmentována a kompletně oddělena od orálního epitelu.

B: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 10x. Detail obrázku A. V dolní části obrázku jsou patrné černé zbytky kostní tkáně, viditelné díky nedokonalému odvápnění při zpracování vzorků. Rovněž jsou zde patrné diferencované ameloblasty (produkují sklovinu) a odontoblasty (produkují dentin).

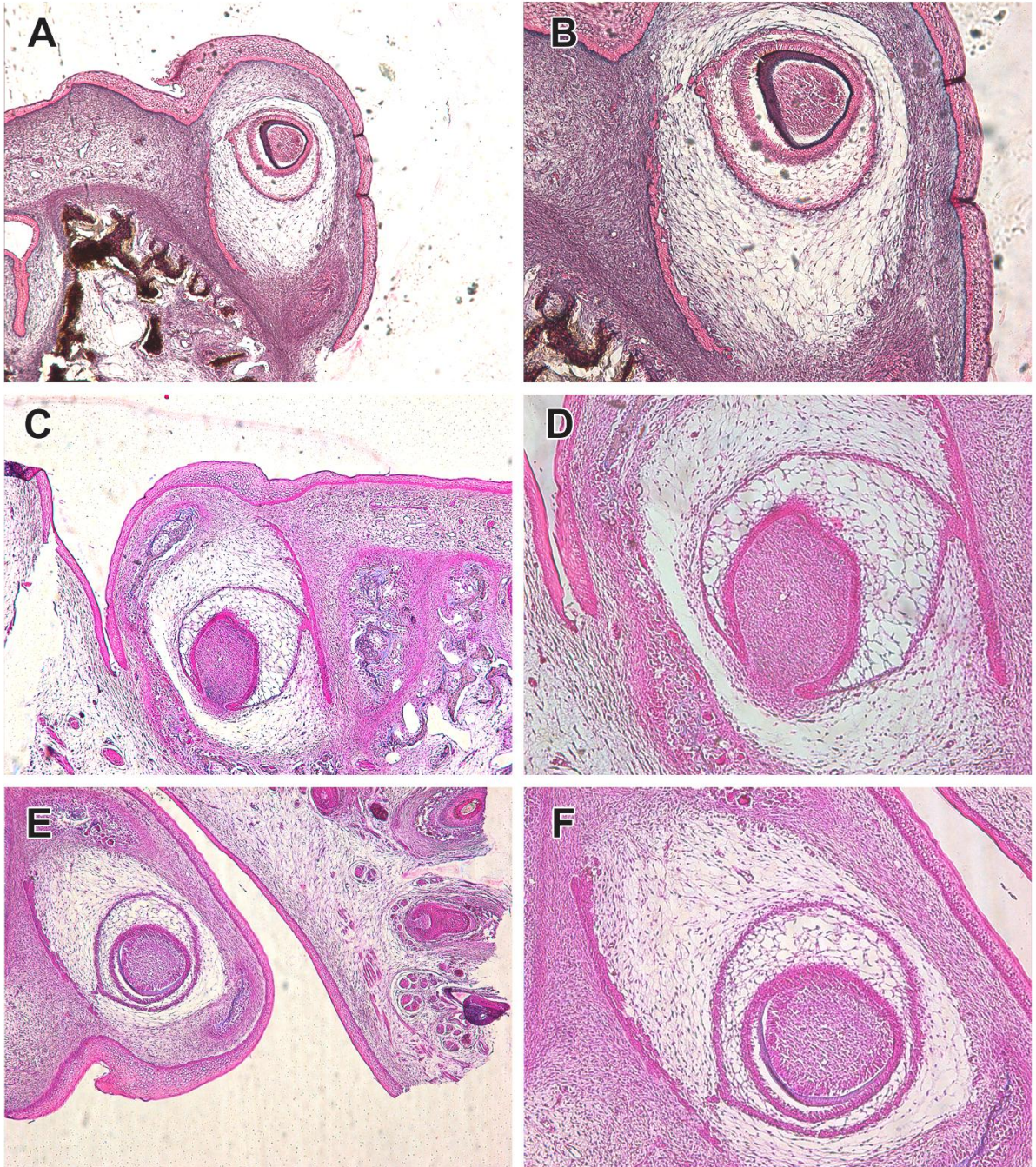
C: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 5x. Dentin zde ještě není vytvořen, ale vidíme velké nahlučení buněk v oblasti jeho budoucí tvorby, i v oblasti zubní dřeně. Zubní lišta je již fragmentována a oddělená od orálního epitelu. Zubní základ je ve stádiu zubního zvonku.

D: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 10x. Detail obrázku C.

E: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 5x. Na obrázku můžeme dobře pozorovat prostor mezi pyskem a dásní, na pravém okraji jsou patrné kořeny chlupů.

F: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 10x. Detail obrázku E. V zubním základu je viditelná tenká vrstvička predentinu, plnohodnotný dentin ještě není vytvořen.

Tabule 4



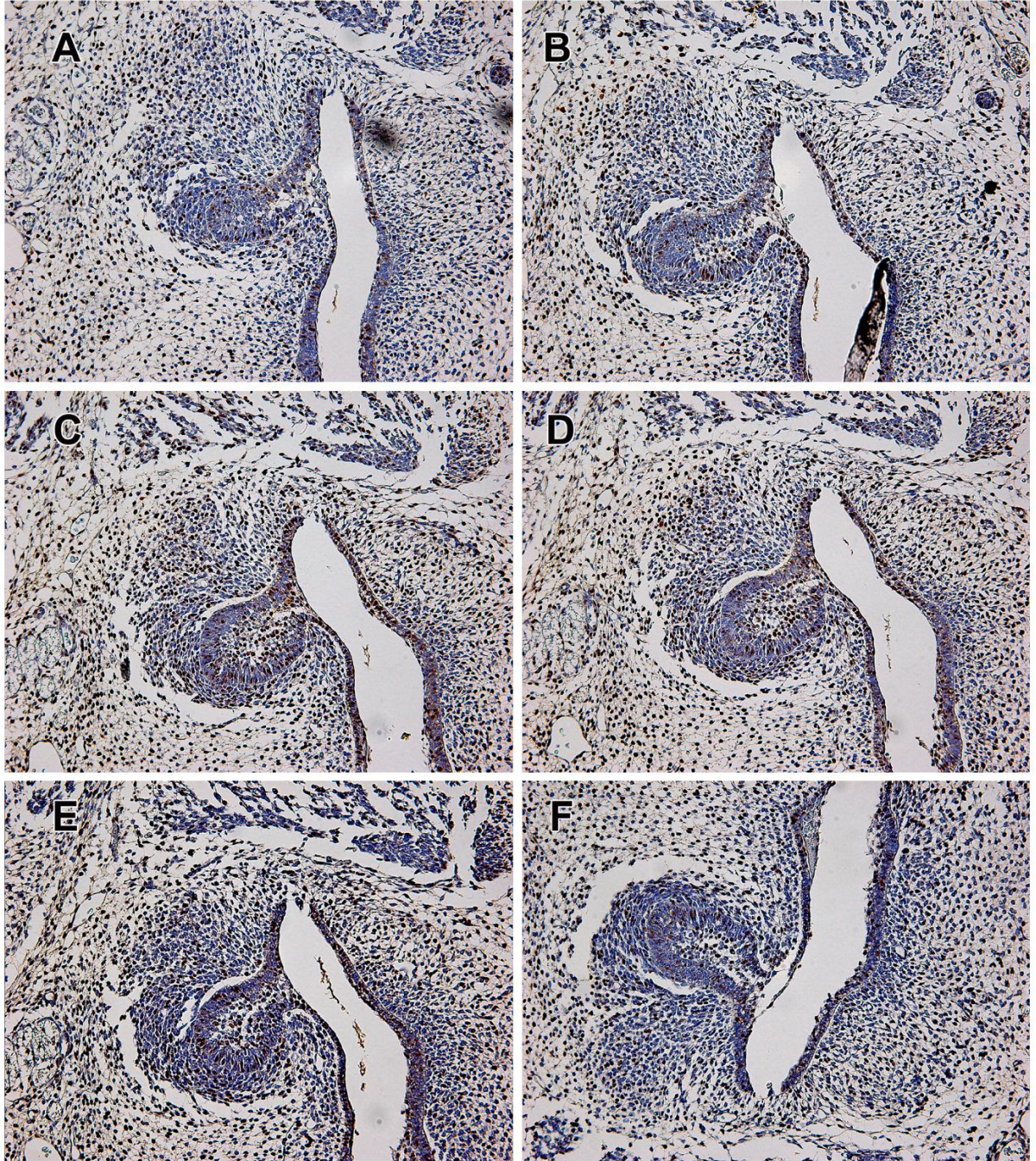
4.3. Proliferační aktivita při vývoji zubů u kočky

Metodou detekce PCNA jsme zpracovali 6 různých stádií embryí kočky domácí (DO 25, DO 27, DO 31, DO 36, DO 38, DO46) a také jedno vývojové stádium myši pro ověření funkčnosti metody. Po správném provedení této metody se nám proliferující buňky obarví hnědě (DAB) a neproliferující namodro (hematoxylin).

Myš

Na tabuli 5 máme pouze jedno vývojové stádium myši, a to DO 13. Na obrázcích A-E vidíme vždy levý horní zubní zárodek, na obrázku F je pravý horní zubní základ. Největší množství proliferujících buněk vidíme vždy v okolí bazální membrány vyvíjejících se zubů. Všechny tyto zuby se nacházejí ještě ve vývojovém stupni zubního pupene. Zvětšení objektivu bylo 20x.

Tabule 5



Kočka

Tabule 6: Tři vývojová stádia zubu, a to DO 25, DO 27, DO 31.

Fotky A a B jsou zde umístěny pouze pro ilustraci, jsou to první vzorky, na kterých jsme metodu PCNA zkoušeli. Po nich jsme metodiku změnili s využitím citrátu a na dalších vzorcích již je proliferace dobře pozorovatelná.

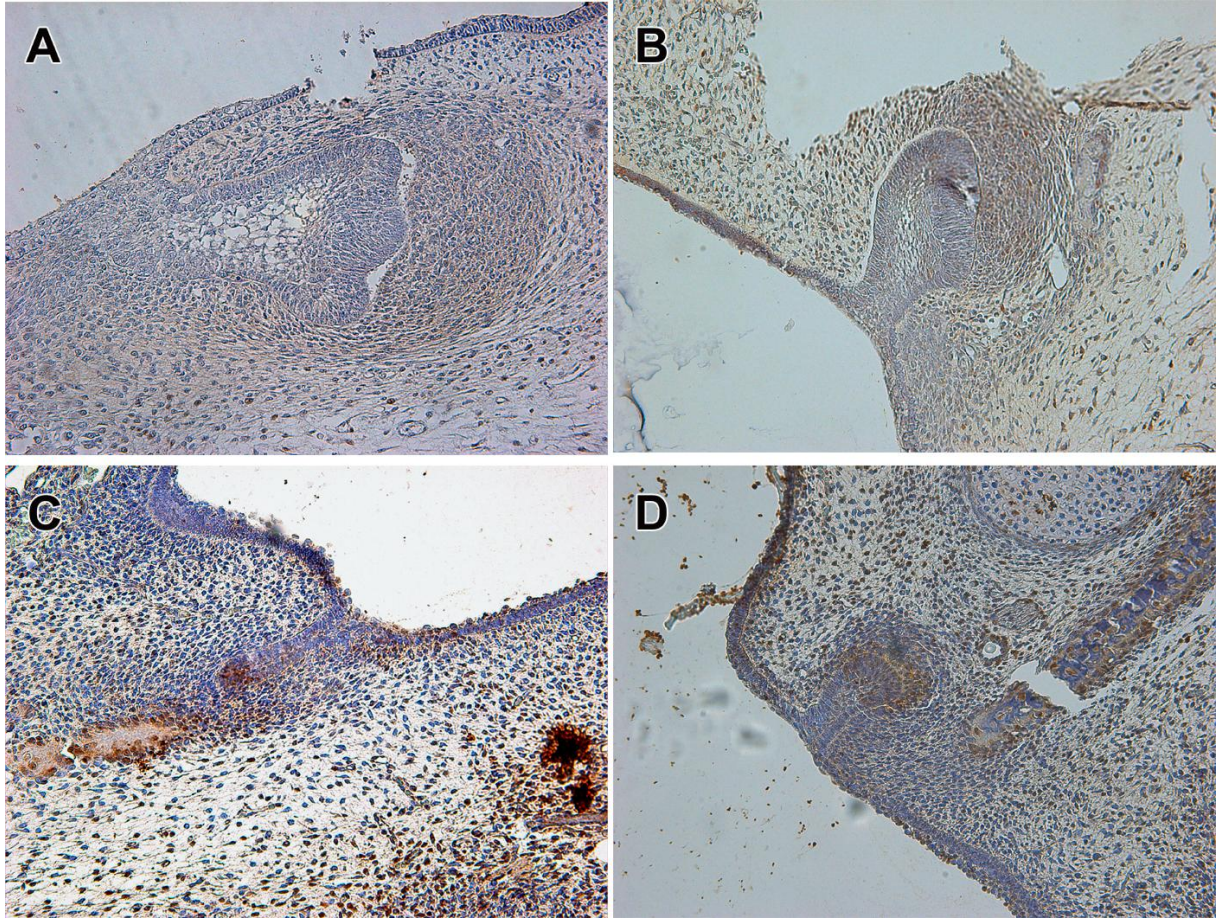
A: Stádium DO 31, zvětšení objektivu 20x. Stádium zubního pohárku. Signál je jen velmi slabý.

B: Stádium DO 27, zvětšení objektivu 20x. Stádium zubního pupene. Signál je jen velmi slabý.

C: Stádium DO 25, zvětšení objektivu 20x. Na obrázku vidíme zubní lištu a na jejím konci četné proliferující buňky.

D: Stádium DO 25, zvětšení objektivu 20x. Zubní lišta a zejména ranné stádium zubního pupene obsahuje četné PCNA-pozitivní buňky. Na obrázku můžeme rovněž rozeznat část Meckelovy chrupavky a pozitivní oblast okolo kostního základu mandibuly.

Tabule 6



Tabule 7: PCNA detekce ve vývojových stádiích DO 36, DO38 a DO 46.

A: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 20x. Na obrázku jsou patrné dva zuby ve stádiu pozdního zubního pohárku. Částečně se již začíná tvořit malá prohlubeň, což je znak začínajícího se vývoje zubní dřeně.

B: Stádium DO 36, zvětšení objektivu 20x. Opět dvojice zubních základů ve stádiu zubního pohárku. Velká proliferace se vyskytuje v oblasti dentální pulpy a ve vnitřním sklovinném epitelu.

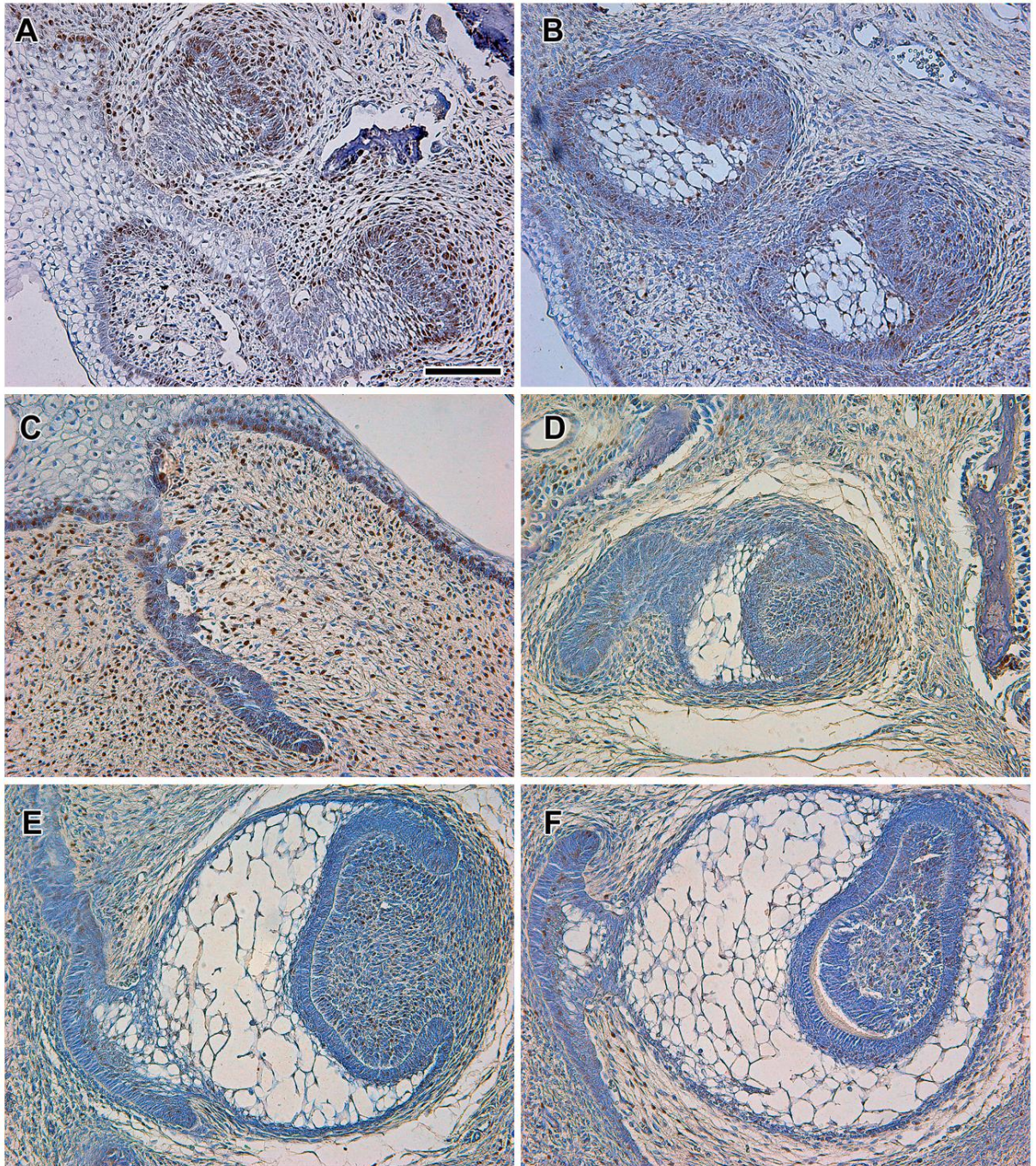
C: Stádium DO 38, zvětšení objektivu 20x. Zubní lišta v interdentalní oblasti neobsahuje velké množství pozitivních buněk jako v předešlých stádiích.

D: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 20x. Zubní lišta kompletně oddělena od orálního epitelu. Malé množství pozitivních buněk je v epitelu zubního základu.

E: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 20x. Dentin ještě není vytvořen. Zubní lišta již částečně fragmentována od zubního epitelu. Proliferující buňky jsou v oblasti zubní dřeně.

F: Stádium DO 46, zvětšení objektivu 20x. Zub v mineralizačním stádiu s patrnou tvorbou dentinu. Proliferující buňky jsou v oblasti rostoucí zubní lišty, která dá základ druhé zubní generaci.

Tabule 7



5. Závěr

Na začátku naší práce jsme si stanovili několik pracovních hypotéz, se kterými jsme dále pracovali. Cílem naší práce bylo blíže se podívat na proliferaci dentice na různých vývojových stádiích kočky domácí. Tento cíl se nám podařilo splnit a zároveň jsme potvrdili i naše hypotézy. Předpokládali jsme, že ve vývojově mladších stádiích vývoje bude větší množství proliferujících buněk. Oblasti s největší četností proliferujících buněk se nacházely v zubních základech raných vývojových stádií a v okolí zubní lišty (jedná se o vícegenerační zuby, tudíž se tu vytváří nové zubní pupeny). Velké množství pozitivních buněk bylo i v okolí vyvíjející se kosti.

Do výsledků práce jsme rovněž zahrnuli několik obrázků jednoho myšního stádia. Tento vzorek byl zpracován metodou detekce PCNA, a to pro ověření správného fungování tohoto postupu.

Mezi výsledky práce jsme začlenili také naše počáteční problémy s metodou PCNA, kdy jsme byli nuceni změnit postup v metodice. Tento původně neplánovaný a v podstatě vedlejší výsledek mé práce se stane přínosným i pro další studenty pracující s tímto materiálem v případě výskytu podobného problému.

Práce měla samozřejmě pozitivní efekt i pro můj osobní rozvoj. Naučil jsem se principům práce v laboratoři, zpracování materiálu s využitím základních histologických metod a rovněž jsem se seznámil s některými imunohistochemickými metodami a možnostmi řešení problémů, které mohou nastat.

6. Seznam literatury

- Horký, D., Mikyska, E. (1990): Veterinární histologie. SPN, Praha.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1992): Základy histology. H&H, Praha.
- Luckett, W.P. (1993): Ontogenetic staging of the mammalian dentition, and its value for assessment of homology and heterochrony. J. Mamm. Evol., 1: 269-282
- Malínský, J., Lichnovský, V., Kamarád, V. (1992): Přehled embryologie člověka. Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Matulová, P. (2001): Exprese PCNA, Bcl-2 a p53 v průběhu odontogeneze u savců. Dizertační práce. Brno
- Vacek, Z. (1995): Histologie a histologická technika. Institut pro další vzdělávání v Brně.
- Wiggs, R.B., Lobprise, H.B. (1997): Veterinary dentistry – Oral anatomy and physiology. Lippincott – Raven. New York.

Zdroje z internetu

http://www.ifauna.cz/rubriky/clan_show.php?id=1976&r=8

http://www.gymspgs.cz:5050/bio/Sources/Textbook_Textbook.php?intSectionId=50800

http://www.ksoft.cz/kone/a_zuby.htm