

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Indukce odontogenních markerů v prekurzorech buněk neurální lišty

Kateřina Randulová

Brno 2013

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 06 Zdravotnictví

*Indukce odontogenních markerů v prekurzorech buněk neurální
lišty*

Induction of odontogenic markers in neural crest cells precursors

Autor: Kateřina Randulová

**Škola: Gymnázium, Brno-Řečkovice
T. Novákové 2, Brno, 621 00**

**Konzultanti: Mgr. Eva Švandová
RNDr. Kateřina Cibulková**

Brno 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, pod odborným dohledem Mgr. Evy Švandové a za použití podkladů, uvedených v přiloženém seznamu literatury. Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat zejména své externí konzultantce Mgr. Evě Švandové za odborné vedení, vstřícný přístup a technické zabezpečení, bez čehož by má práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat mé interní konzultantce RNDr. Kateřině Cibulkové za důležité podněty a věcné připomínky. V neposlední řadě děkuji Jihomoravskému kraji a Jihomoravskému centru pro mezinárodní mobilitu za finanční podporu.



Jihomoravský kraj



ANOTACE

Zuby jsou z hlediska výživy v životě živočichů prakticky nepostradatelné, jejich absence sice jedince přímo na životě neohrožuje, ale může snížit kvalitu jeho života a přežívání. V případě člověka problematika chrupu nabývá ještě dalších rozměrů; vizuálního vzhledu či artikulace. Z toho důvodu se moderní medicína snaží najít cesty, jak poškozený chrup regenerovat. V tomto ohledu je velká naděje kladena do tkáňového inženýrství, se kterým velice úzce souvisí i má práce.

Pro použití správných metod tkáňového inženýrství, je nutné porozumět celkovému vývoji zubu, tj. od jeho iniciace až po erupci. Vzhledem k tomu, že je v této práci využito indukčního vlivu myšího orálního epitelu, v teoretické části je jako model uveden vývoj zubu myšího moláru.

Experimentální část se zabývá rekombinací myšího orálního epitelu v raném stádiu odontogeneze s buňkami neurální lišty (NCPC), které byly derivovány z lidských embryonálních kmenových buněk (hES), a zkoumáním vzájemných interakcí mezi nimi. Dosavadní experimenty zatím neprokázaly signalizaci mezi epiteliální tkání a NCPC. Příčinou může být způsob kultivace, mnohočetné pasáže, při kterých buňky ztratily svou charakteristiku, či fakt, že je v experimentu použita tkáň myši k indukci lidských buněk.

Klíčová slova

Zub; odontogeneze; odontogenní markery; tkáňové inženýrství; embryonální kmenové buňky; buňky neurální lišty

ANNOTATION

Teeth are essential in the life of animals. The absence of teeth is not directly life threatening, however it can severely decrease quality of life and survival. In the case of human dental issue becomes even more dimensions, e.g. external appearance or articulation. For this reason, modern medicine is actively trying to find ways how to regenerate damaged teeth. In this regard, the great hope placed in tissue engineering, which is very closely related to my job.

To use the correct methods of tissue engineering, it is necessary to understand the overall development of the tooth, ie, from its initiation to eruption. Since it is in this work used the inductive influence of murine oral epithelium, in the theoretical part is like a model given mouse molar tooth development .

Experimental section discusses recombination murine oral epithelium in the early stage of odontogenesis with neural crest cells (NCPC), which were derived from human embryonic stem cells (hESCs), and examining the interactions between them. Previous experiments so far have not shown signaling between epithelial tissue and NCPC . This may be a way of cultivation , multiple passages in which cells lose their characteristics, and the fact that the tissue used in the experiment was mice to induce human cells.

Keywords

Tooth; odontogenesis; odontogenic markers; tissue engineering; embryonic stem cells; neural crest cells

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Fylogenetický vývoj zubu	10
3.2	Myší molár jako model pro studium vývoje zubů.....	11
3.3	Složení a morfologická stavba zubu	12
3.3.1	Zubní alveol.....	12
3.3.2	Periodontium (ligamentum periodontale)	13
3.4	Vývoj prvního myšího moláru.....	14
3.4.1	Iniciace-zubní ztlustění	14
3.4.2	Zubní pupen.....	15
3.4.3	Zubní pohárek (Zubní zárodek).....	15
3.4.4	Zubní zvonek.....	15
3.4.5	Vývoj korunky a kořene	16
3.4.6	Amelogeneze (tvorba skloviny)	16
3.4.7	Dentinogeneze	17
3.4.8	Cementogeneze	17
3.5	Interakce	18
3.6	Moderní zubní lékařství.....	19
3.6.1	Léčebné postupy.....	19
3.7	Využití kmenových buněk pro reparaci dentice	20
4	Experimentální část.....	23
4.1	Detekce odontogeneze <i>in vivo</i>	23

4.1.1	Immunohistochemie-amelogenin, osteokalcin moláry (sagitální a frontální řez)	23
4.2	Detekce odontogeneze <i>in vitro</i>	23
4.2.1	Separace myšího orálního epitelu z ED12	24
4.2.2	Příprava buněk neurální lišty.....	26
4.2.3	Příprava MEF z myších horních končetin ED10	27
4.2.4	Rekombinační systém využívající plovoucí membrány na médiu.....	27
4.2.5	Rekombinační systém využívající tzv. polotuhých médií.....	29
4.2.6	Fixace vzorku a jeho převedení do parafinu	30
4.2.7	Zhotovení histologických parafinových řezů	31
4.3	Imunohistochemie - PCNA	31
4.3.1	Immunohistochemie-cytokeratin.....	32
4.3.2	TUNEL.....	34
4.4	Použité látky	36
4.5	Výsledky	38
4.5.1	Detekce odontogeneze <i>in vivo</i> - IHC amelogenin, osteokalcin moláry	38
4.5.2	Detekce odontogeneze <i>in vitro</i> -rekombinace EP+MEF	42
4.5.3	Detekce odontogeneze <i>in vitro</i> -rekombinace EP+NCPC.....	44
4.5.4	Srovnání vývoje rekombinovaného objektu <i>in vitro</i> (EP+NCPC) a vývoje prvního myšího moláru <i>in vivo</i> v ED12 a v ED17,5	47
5	Diskuse	49
	Závěr	51
6	Seznam citací	52
7	Seznam obrázků	53
8	Seznam použité literatury	54

SEZNAM ZKRATEK

BK	Burkerova komurka
BMP	Bone morphogenetic protein
BS	Blokacni serum
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ED	Embryonální den vývoje
FCS	Fetální sérum
FGF	Fibroblast growth factor
FL	Horní končetina
hESC	Lidské embryonální buňky
IHC	Imunohistochemie
MEF	Mezenchymální embryonální fibroblasty
NCPC	Buňky neurální lišty
P	Postnatální
PAX	Paired-box family
PBS	Fosfátový pufr
PCNA	Poliferating cell nuclear antigen
PSA	Phosphate Saline Buffer
SHH	Sonic hedgehog
TdT enzym	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WNT	Wing-less-type MMTV integration site family

1 Úvod

Onemocnění chrupu postihuje většinu populace. Častým jevem je zubní kaz či parodontitida, méně častým absence jednoho či více zubů. Ageneze permanentních zubů (kromě třetích molárů) dosahuje v některých populacích až 9,6 procent. Jedinec je v takovém případě nucen žít se sníženou schopností artikulace a žvýkání, dochází k narušení estetiky obličeje a často také ke snížení sebevědomí a poškození psychického zdraví.

Moderní medicína nabízí řadu řešení. Často dosavadní možnosti nejsou dostatečně šetrné, komfortní a mohou okolní tkáň značně poškodit.

Tkáňové inženýrství nabízí v tomto ohledu možné východisko, a proto je v současné době v aktivním zkoumání. Pokud by existovala metoda, jak tímto způsobem regenerovat chrup, bylo by možné se vyhnout například odmítnutí implantátu, porušení okolí zubu či snad jen nepříjemnému pocitu v ústech z umělého materiálu.

Zatím nejnadějnější technikou se zdá být napodobení přirozeného vývoje zubu. Aby tato cesta regenerativní medicíny byla možná, je důležité plně porozumět odontogenezi v přirozeném prostředí. Je nutné vycházet z poznání, že v brzkém embryonálním stádiu je indukční odontogenní potenciál v orálním epitelu. Je tedy možné jej využít k indukci mezenchymálních buněk s potenciálem odpovědět na odontogenní signály epitelu.

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo sledování indukce odontogeneze *in vivo* a *in vitro*. V prvním případě byly sledovány markery diferenciacce u myších molárů v různých stádiích vývoje. Druhým krokem bylo testování buněčné linie buněk neurální lišty NCPC (Neural Crest Progenitor Cells), připravené indukcí lidských embryonálních buněk hESC (Embryonal Stem Cells) italským výzkumným týmem Eleny Cattaneo. Jako kontrolní buňky sloužily mezenchymální embryonální fibroblasty MEF izolované z myších horních končetin.

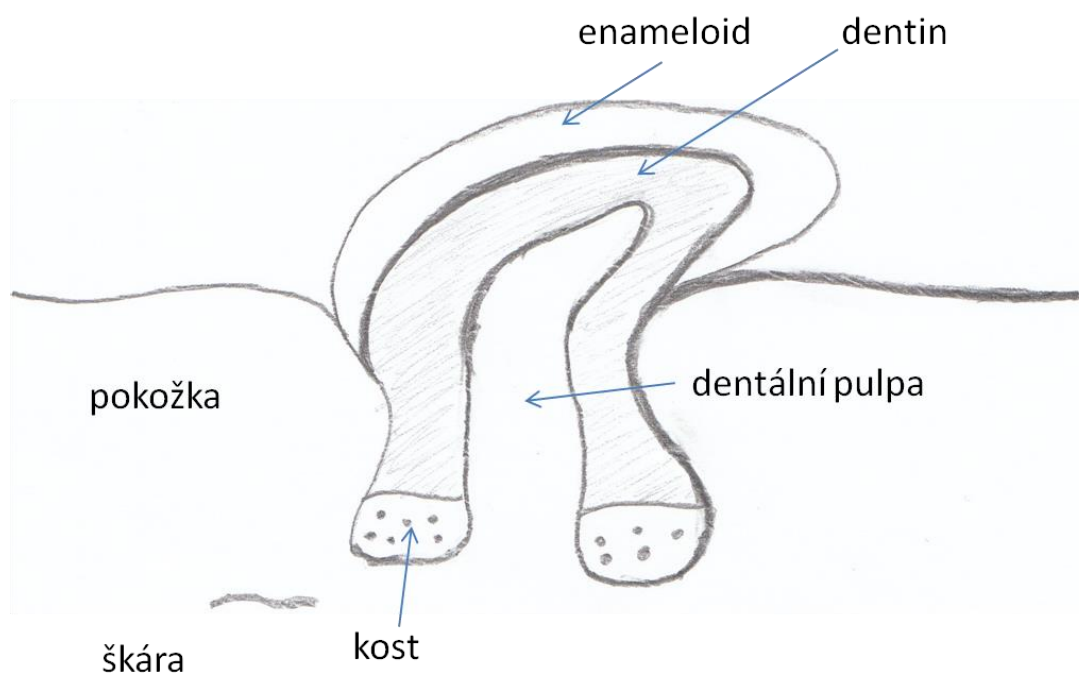
3 Teoretická část

3.1 Fylogenetický vývoj zubu

Poprvé se ektodermální struktury podobné dnešním zubům objevily v podobě kožních útvarů, které se podobaly plakoidním šupinám dnešních žraloků, u bezzubých ryb. Tzv. *odontodes* se nacházely na vnější straně tlamy, byly malé a pravděpodobně sloužily k obraně, smyslovému vnímání a dalším účelům.

Předchůdce současných zubů se skládal z dentinového kužele s dentální pulpou, byl pokryt mineralizovanou tkání podobnou sklovině.

Odontodes se v rámci fylogenetického vývoje přesunuly z vnější strany tlamy do orofaryngeální dutiny. Nejprve pokrývaly celý povrch čelistí, později se vyskytovaly jen na okraji.



Obrázek č. 1: Odontodes

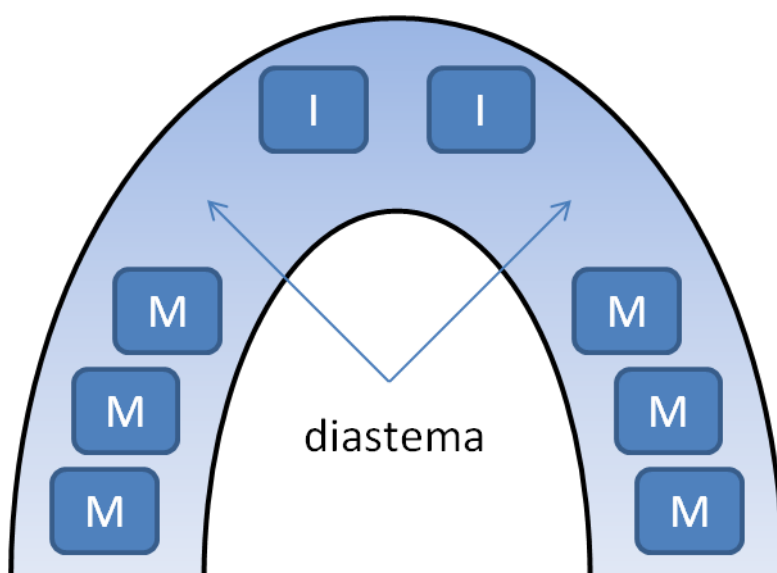
K postupnému vývinu různých typů zubů u obratlovců přispěly stravovací návyky a snaha o přizpůsobení se prostředí. Touto součinností vznikly nynější formy zubů, jež jsou pevně spjaté svou morfologickou stavbou s určitým způsobem zpracování potravy: řezáky (*incisivy*), špičáky (*canini*), třenové zuby (*premolars*) a stoličky (*molars*).

Z hlediska evoluce rozvoj ústní dutiny přisoudil organismům se zuby výhodu v rámci přirozeného výběru a umožnil jim svou potravu zachytit a zpracovat.

3.2 Myší molár jako model pro studium vývoje zubů

Pro studium vývoje zubů se nejčastěji využívá myšího modelu. Obecné morfologické a molekulární charakteristiky vývoje myšího i lidského zubu jsou si podobné. Avšak myší dentice se od lidské v mnohém odlišuje. Tato rozdílnost spočívá v různém počtu generací zubů; u člověka se nachází chrup difyodontní (dvě generace zubů), kdežto u myši monofyodontní (jedna generace zubů) se stále rostoucími řezáky a absencí premolares a canines, což vytváří bezzubou část chrupu, diastemu. Myš má tedy pouze dva typy zubů (řezáky a stoličky), člověk disponuje čtyřmi.

Vzhledem k uvedeným rozdílům se jeví jako vhodnější modelový organismus např. prase domácí, z důvodu laboratorních podmínek je ale myš vhodnější.



Obrázek č. 2: Schéma myšího chrupu

3.3 Složení a morfologická stavba zubu

Korunka a kořen jsou hlavní atributy ve stavbě zubu, viditelný předěl mezi nimi označujeme jako krček, který je z části zakryt gingivou.

Korunka je kryta sklovinou, nejtvrďší tkání lidského těla, která je sekretována ameloblasty (ektodermový původ). Skládá se z několika proteinů: amelogenin, enamelin, ameloblastin a tuftelin. Z anorganických látek obsahuje hydroxyapatit (vápník, fosfor), fluor a vodu. Sklovina na rozdíl od dentinu neobsahuje kolagen. Ameloblasty po skončení vývoje skloviny zanikají, tudíž není možná autoregenerace. Amelogeneze končí erupcí zubu.

Pod sklovinou se nachází dentin. Ten je kryt sklovinou v místě korunky a cementem v oblasti kořene. Dentin je tvořen anorganickými látkami (hydroxyapatit), kolagenními vlákny, dále jsou přítomny organické sloučeniny: dentin sialoprotein a dentin fosfoprotein. Je sekretován odontoblasty. Produkce dentinu časově předchází amelogenezi. Odontoblasty na rozdíl od ameloblastů nezanikají a jsou přítomny po celou existenci zubu. Odontoblasty sekretují dentin ve třech fázích, jako primární dentin, dentin vytvořen do ukončení vývoje kořene, jako sekundární dentin, dentin směřující k pulpální dutině, a jako terciální (= reaktivní; reparativní) dentin, přizpůsoben k odezvě na určitý nepříznivý zevní podnět, jako kupříkladu kaz. Dentin vzniká z dentální papily, která je tvořena ektomezenchymálními buňkami, původem z neurální lišty.

Pod vrstvou dentinu se nachází dentální pulpa, bohatá zejména na buňky podobné fibroblastům, do které pronikají krevní kapiláry a nervy a která se s věkem zužuje. Vzniká z dentální papily.

Kořen a krček zubu jsou pokryty cementem, který je sekretován cementoblasty vznikajícími z folikulárních buněk (zubní vak) v okolí kořene, původem neurální lišty. Jeho složení je podobné kostní tkáni. K alveolární kosti je přichycen Sharpeyovými vlákny. Z opačné strany dentálního vaku se vyvíjí periodontium, vazivo, které upevňuje zub do zubního alveolu.

3.3.1 Zubní alveol

Vzniká dezmogenní osifikací maxily i mandibuly a tvoří kostěné lůžko pro kořen zubu. V případě mandibuly tomuto procesu předchází chrupavčitá kost, označovaná jako cartilago Meckeli.

Díky postupnému kostnatění a vyplňování prostoru pod kořenem zubu, dochází k jeho vytlačování směrem k povrchu, tím se aktivně účastní prořezání zubu.

Svrchní částí prochází krevní cévy, které zásobují periodontium a okrajově mohou vyživovat i zubní pulpu, průchodem přes kořenové kanálky, a nervy.

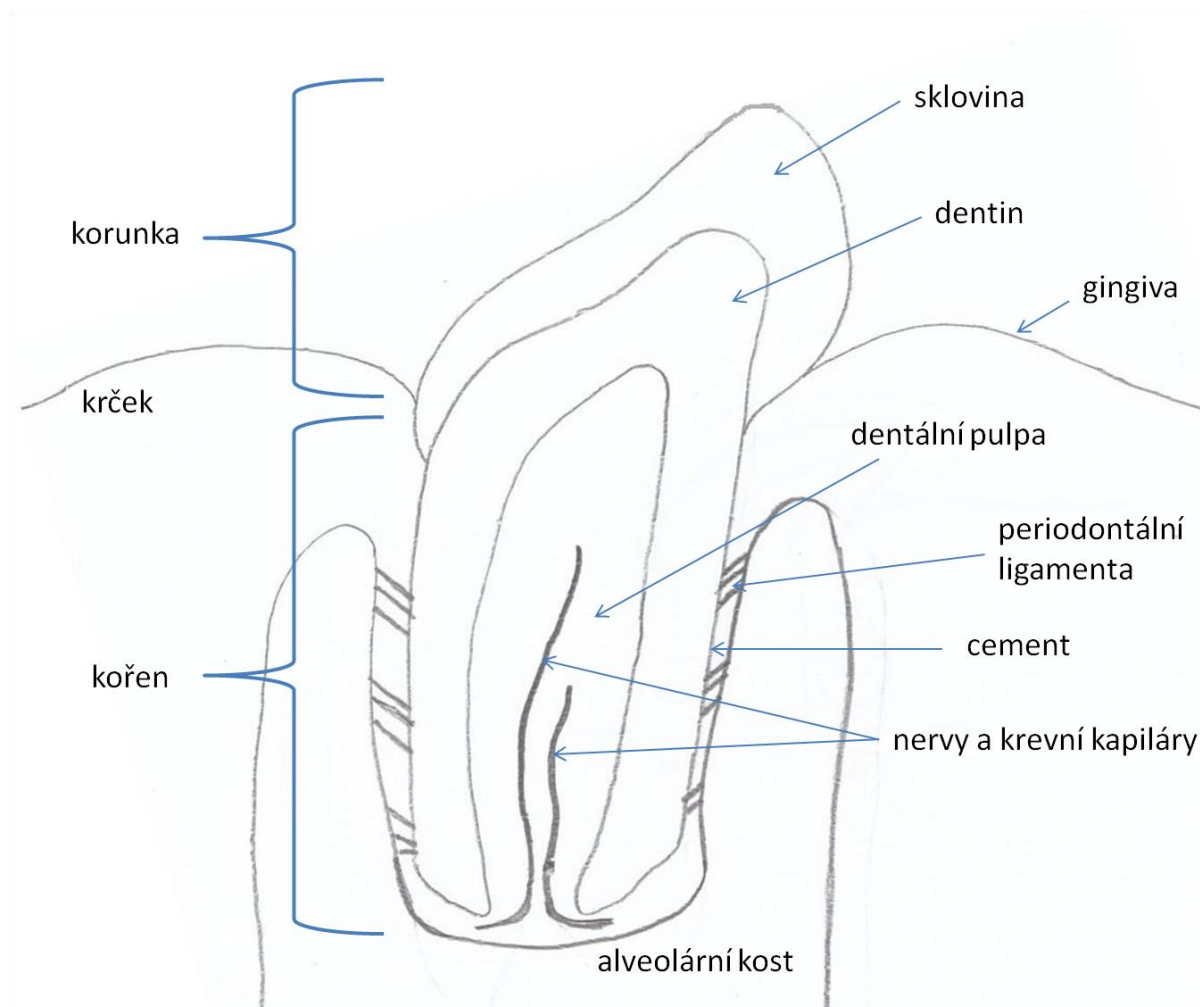
3.3.2 Periodontium (ligamentum periodontale)

Periodontium se tvoří ze zevní části mezenchymu dentálního vaku v období dokončení vývoje orgánu skloviny. Jeho význam spočívá v upevnění zubu v zubním alveolu, krytí kosti zubního alveolu a tlumení nárazu při žvýkání. Vytváří se časově paralelně s cementem, tedy až po vývoji korunky.

Skládá se převážně z kolagenních vláken¹, volných vazivových buněk, nervů a lymfatických a krevních cév.

Vlákna periodontia se z jedné strany upínají na cement a ze strany druhé na zubní alveol. Vlákna ústící do tvrdých tkání se označují jako Sharpeyova.

¹ Kolagenní vlákna vznikají nahromaděním kolagenních fibril, produkovaných fibroblasty mezenchymového původu.



Obrázek č. 3: Schéma zubu

3.4 Vývoj prvního myšího moláru

Vývoj zubů je zahájen reciprokou interakcí mezi orálním epitelem a ektomezenchymálními buňkami, které mají svůj původ v kraniální neurální liště. V případě myšího chrupu jsou tyto signály zahájeny v epitelu kolem desátého dne embryonálního vývoje (ED10). Ektomezenchym je od epitelu přebírá okolo ED12.

3.4.1 Iniciace-zubní ztlustění

Zubní ztlustění epitelu, označované také jako iniciační fáze se u prvního myšího moláru vyskytuje od ED10. V této fázi dochází k vymezení neodontogéního a odontogéního epitelu, také je určena pozice, typ a orientace každého zubu.

3.4.2 Zubní pupen

Kolem ED13,5 vzniká ze zubního ztlustění zubní pupen tvaru váčku. Vlivem signalizace epitelální tkáně dochází ke kondenzaci ektomezenchymových buněk v okolí báze pupene, který se následně integruje do epitelální části a tvoří zubní papilu. V tomto stádiu, kolem ED12,5, se vytrácí z epitelu odontogenní potenciál, který získává ektomezenchym.

3.4.3 Zubní pohárek (Zubní zárodek)

Další stádium v průběhu odontogeneze se nazývá zubní pohárek. Má svůj počátek v ED14,5. Dentální papila se zanořuje stále hlouběji do bazální části orgánu skloviny, tím začíná připomínat pohárek. Během těchto změn dochází k morfologickému členění epitelu na dvě vrstvy, vnitřní sklovinný epitel a vnější sklovinný epitel. Vnitřní část, kterou ohraničují tyto dvě vrstvy, tvoří také epitelové buňky tvořící rozvlákněný retikulární epitel. Tento celek tvořený ektodermem nazýváme orgán skloviny.

3.4.4 Zubní zvonek

V ED16,5 se vytváří ze zubního pohárku zubní zvonek. V rámci tohoto stádia dochází k diferenciaci vnitřního sklovinného epitelu na ameloblasty, které mají schopnost indukovat diferenciaci odontoblastů. Sklovinný epitel, jehož prizmatické buňky nabyly na výšce, nasedají na lamina basalis ameloblastica¹. Hustěji se uspořádají do jedolité vrstvy a vytvoří tzv. stratum intermedium, naopak řidce jsou uspořádány buňky přivrácené k vnějšímu sklovinnému epitelu a tvoří tak pulpu skloviny. Pulpa skloviny je určena k výživě stratum intermedium pomocí difúze a také k ochraně buněk vnitřního sklovinného epitelu.

Během této etapy odontogeneze prochází vývojem také zubní papila, která nejen mění svůj tvar na kuželovitý, ale také se člení na dvě části. První úsek tvoří buňky přiléhající na lamina basalis ameloblastica, právě ty se pod indukčním vlivem ameloblastů diferencují na preodontoblasty a posléze na odontoblasty, které v dalším procesu produkují dentin. Druhý úsek tvoří mezenchymová tkáň, která představuje základ pro budoucí zubní pulpu a na rozdíl od předchozí části si zachovává upořádání řídkého embryonálního vaziva. Zubní pulpou prochází nervová vlákna a krevní kapiláry, zajišťující výživu odontoblastů v procesu dentinogeneze. S přibývajícím věkem se zubní pulpa zužuje.

¹ Tvoří hranici mezi orgánem skloviny a zubní papilou.

3.4.5 Vývoj korunky a kořene

Vývoj korunky je spojen se začátkem tvorby tvrdých tkání (dentinogeneze a amelogeneze). Proces dentinogeneze časově předchází procesu amelogeneze, ale oba tyto pochody mají svůj počátek v růstovém centru, které se nachází v hrotu korunky (tzv. primární sklovinný uzel), a postupuje směrem ke krčku, do oblasti zvané cervikální klička, kde se vnitřní a vnější sklovinný epitel setkávají a ze které v dalším vývoji vyrůstají Hertwigova epitelová pochva a diafragma¹.

3.4.6 Amelogeneze (tvorba skloviny)

Amelogeneze, neboli tvorba skloviny, má svůj počátek při diferenciaci buněk vnitřního sklovinného epitelu na preameloblasty. Tyto protáhlé buňky jsou umístěny mezi stratum intermedium (apikální část) a membrána basalis ameloblastica (bazální část).

V této době začínají odontoblasty, diferencované z preodontoblastů, produkovat organickou matrix, která se ukládá na membrána basalis ameloblastica a brání průchodu živin k preameloblastům. Výživa se k preameloblastům začíná dostávat z druhé strany² a tento obrat vyvolá změnu polaritu preameloblastů, které se následně začínají diferencovat na ameloblasty.

Ameloblasty nejprve sekrenují organickou matrix, která je tvořena především proteiny, menším množstvím lipidů, mukopolysacharidy a tenkými organickými filamenty. Základní hmota je produkována směrem k dentální papile, přesněji k základní hmotě predentinu nebo o něco později dentinu. Tento předěl mezi sklovinou a dentinem se nazývá dentinosklovinná hranice.

Dalším stádiem amelogeneze je kalcifikace, do organické matrix je při postupujícím vývoji vylučována anorganická složka, a to krystaly hydroxylapatitu.

Amelogeneze se ukončuje v období před prořezáním zubu. V jejím průběhu zaniká zevní sklovinný epitel a přilehlá část sklovinné pulpy. Na povrchu se tvoří prizmatická sklovina, která chrání zub při prořezání.

¹ Hertwigova epitelová pochva a diafragma se účastní při vývoji kořene.

² Krevními kapilárami přes dentální vak, zevní ameloblasty a sklovinou pulpu, až ke stratum intermedium.

3.4.7 Dentinogeneze

Dentinogeneze v oblasti korunky je zahájena v růstovém centru induktivním vlivem preameloblastů, díky kterému mezenchymové buňky diferencují na preodontoblasty¹ a posléze na odontoblasty², které už jsou schopny sekretovat predentin, následně dentin.

Dentinogenezi v oblasti kořene, která je zahájena až po vývoji dentinu v korunce, indukuje Hertwigova pochva³, což je spodní okraj orgánu skloviny, který se v koncové části zalamuje a tvoří tzv. diafragmu, která určuje počet kořenů zubu. Aby Hertwigova pochva mohla indukovat buňky dentální papily na preodontoblasty a následně na odontoblasty, musí se sama dostat do stádia preameloblastů. Dentinogeneze v části kořene probíhá od zubního krčku až k apikální části.

Odontoblasty nejprve sekrenují organickou matrix (predentin), obsahující glykoproteiny, proteoglykany a kolagenní fibrily, směrem k membrana basalis ameloblastica, tedy proti ukládající se sklovině. Díky této sekreční aktivitě se odontoblasty posouvají směrem do pulpní dutiny a jsou po celý svůj život pokryty vrstvou nemineralizovaného predentinu.

Mineralizovaný dentin vzniká na povrchu nemineralizovaného predentinu díky ukládání anorganických látek, přesněji krystalů hydroxylapatitu, které mají svůj původ právě v krystalizačních centrech predentinu. Jejich nárůstem a zvětšováním objemu vznikají kalcisférity⁴. Souvislá vrstva mineralizovaného dentinu se tvoří fúzí kalcisféritů a mineralizovaných interglobulárních prostor, při které má velký význam enzym alkalická fosfatáza.

3.4.8 Cementogeneze

Cementogeneze probíhá na vnitřní straně dentálního vaku. Mezenchymové buňky, které tvoří dentální vak, se diferencují induktivní činností orgánu skloviny na cementoblasty, které se přikládají na dentinový povrch kořene díky prostupováním přes Hertwigovu epitelovou pochvu, čímž dochází v souvislé vrstvě epitelu ke vzniku štěrbin a tím i k jejímu rozpadu na tzv. Malassezovy ostrůvky⁵.

¹ Oválné buňky, které dostávají v dalším vývoji prizmatický tvar a diferencují se na odontoblasty.

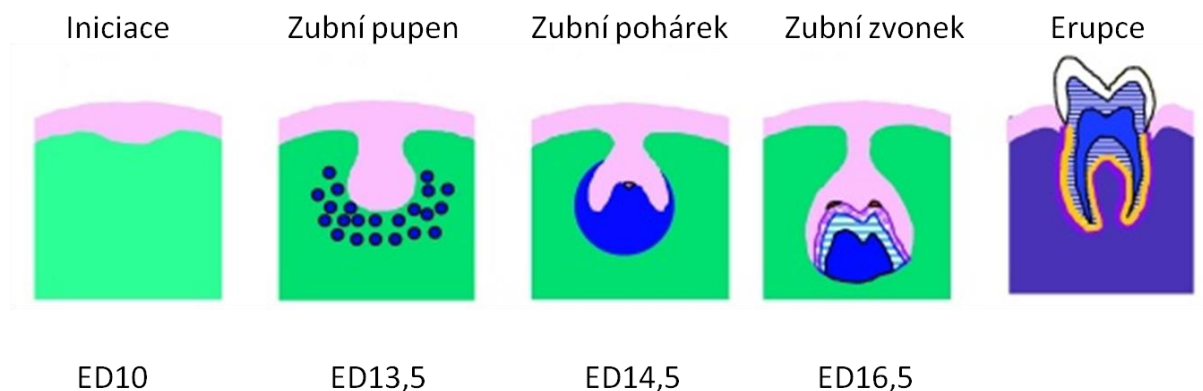
² Polarizované buňky s vysokou sekreční aktivitou.

³ Hertwigova pochva se skládá pouze ze zevního a vnitřního sklovinného epitelu.

⁴ Kalcisférity = dentinové globule

⁵ Malassezovy ostrůvky = epitelové ostrůvky = epitelové perly

Cementoblasty produkují organickou hmotu, která je bohatá na kolagenní fibrily. K následné mineralizaci dochází ukládáním krystalů hydroxyapatitu.



Obrázek č. 4: Schéma vývoje zubu [1]

3.5 Interakce

Odontogeneze je proces, který probíhá prostřednictvím sekvenčních a reciprokých interakcí mezi orálním epitelem a ektomezenchymem. Tyto indukční signály vysílá od ED10 do ED12 orální epitel. Přesné období indukční signalizace epitelu nebylo doposud stanoveno. Informace o časovém rozmezí tohoto jevu se v dostupné literatuře liší. Tento nesoulad může pramenit z odlišných metod použitých k detekci a také z nepřesného časování embryí.

V rámci odontogenních interakcí je identifikováno pět základních rodin transkripčních, růstových a signalizačních faktorů, a to BMP (výskyt v ektodermu i mezenchymu), FGF (výskyt v ektodermu i mezenchymu), SHH (výskyt pouze v ektodermu), TNF a WNT (výskyt pouze v ektodermu). Mezi těmito faktory musí být nastolena velice jemná rovnováha, pokud tomu tak není, jakákoliv změna v regulaci těchto signálních drah vyústí v abnormalitu chrupu. Ta se může projevit buď ve struktuře zubu či v počtu zubů (ageneze nebo zastavení vývoje v raných fázích). Většina abnormalit je způsobena zdvojením nebo absencí určitých genů.

Na prvotním uspořádání ektodermu se podílí molekuly FGF8 a BMP4. BMP4 je inhibitor FGF8 a zajišťuje, aby na určitých místech ektomezenchymu docházelo k produkci PAX9, jenž lokalizuje budoucí uspořádání zubů a ve fázi pupene řídí zhušťování mezenchymu.

Molekuly SSH usměrňují rozšíření ektodermu a jeho vrůstání do ektomezenchymu. Velice důležité jsou v iniciační fázi i ve fázi pupene. Základní zubní vzorec je určen homeoboxovým

kódem, dle BMP4 se umístí budoucí řezáky a dle FGF8/9 moláry. Umístění, velikost a počet zubů určuje spolu s homeoboxovým kódem gen Eda.

Z hlediska produkce prvního důležitého signálu FGF8 by bylo vhodnější používat jako indukční epitel v ED10, z hlediska manipulační techniky je ale vhodnější epitel v ED12.

3.6 Moderní zubní lékařství

Moderní stomatologie se potýká s celou řadou rozličných defektů čelisti, a to jak mechanicky způsobených, tak i vrozených. Poruchy chrupu sice nijak jedince neohrožují přímo na životě, ale mohou mu jeho prožívání značně ztížit.

Tvrdé tkáně zubů se s přibývajícím věkem nevyhnutelně opotřebovávají, nejčastějším vyústěním je zubní kaz, zánět zubní dřeně, parodontóza (bakteriální postižení všech složek závěsného aparátu), gingivitida, v pokročilém věku pak mohou chybět i celé zuby. Dle International Journal of Biological Sciences až 35 % světové populace je ve svých 65 letech bezzubých.

Mezi vrozené poruchy patří anodoncie, kdy pacientovi chybí část či všechny zuby, amelogenesis imperfekta (absence genu Dspp), projevující se nedostatečně kalcifikovanou sklovinou, chrupu je v takovém případě vlastní nažloutlá barva. Defektů s vadným uložením skloviny, dentinu, či cementu je celá řada.

Dalšími abnormalitami mohou být hypodoncie (mírnější forma anodoncie), hyperdoncie (nadpočetné zuby), srostlice, zuby s rozvětveným či zdvojeným kořenem. Malformace ve velikosti zubů se projevují jako makrodoncie (nadměrně velké) a mikrodoncie (nezvykle malé zuby).

3.6.1 Léčebné postupy

Pokud se v čelisti objeví zubní kaz, je vyjmut a kavita je vyplněna plastickým materiálem, z toho nejčastější je například stříbrný amalgám, kompozitní pryskyřice a skloionomerní cementy. Další možností je použití kompozitních inlejí, které pracují na základě otisků.

Pokud však není zubní kaz příliš rozšířený a nachází se pouze ve sklovině, je možné použít neinvazivní metodu ozonoterapii.

Řešením při ztrátě zubů jsou titanové či keramické implantáty. Tvarem připomínají destičku či šroubek. Hlavní část implantátu je ukotvena přímo do kosti, ve vyčnívající části je na něj připevněna korunka nebo můstek.

Již méně komfortním, ale také méně invazivním řešením jsou snímatelné protézy. V současné době nalézají největší využití u starších jedinců.

Výše zmíněné zásahy ale nejsou vždy příjemné, při počáteční manipulaci dochází k poškození okolní tkáně a při následném používání se člověk musí vypořádat se špatným pocitem z nebiologické náhrady v ústech. Nežádoucí jsou i časté vedlejší efekty a selhání, mající svůj původ v nedostatečné biokompatibilitě mezi substitucí a tkání.

Z těchto důvodů je velice žádoucí najít biologicky orientované cesty. V tomto ohledu je regenerativní medicína a s ní spojené tkáňové inženýrství velkou nadějí. Nalezení takové metody, která by byla schopna napodobit přirozené odontogenní procesy při tvoření zubu je v současné době v aktivním zkoumání na mnoha vědeckých pracovištích.

3.7 Využití kmenových buněk pro reparaci dentice

Somatické kmenové buňky pocházející z postnatálního organismu, které jsou v současné době zkoumány z hlediska využitelnosti pro tkáňové inženýrství, se nacházejí v několika lokalitách uvnitř či v okolí zubu. Jedná se zejména o buňky zubní pulpy (izolovaných především ze třetích molárů po jejich extrakci), buňky periodontálních ligamentů, dále buněčné populace z oblasti kořene zubu a z tkáně obklopující ještě neprořezaný zub (zubní folikul) a z pulpy mléčných zubů, které disponují vysokou rychlostí proliferace a také jsou nejvíce plastické, tudíž pro použití nejvhodnější.

Plasticita kmenové buňky značí její schopnost překročit liniové bariéry a přivlastnit si expresi a funkci buněk, které jsou pro odlišné typy tkání unikátní. Somatické kmenové buňky mají tuto diferenciací kapacitu limitovanější než embryonální kmenové buňky, které jsou schopny jak symetrického tak i asymetrického dělení. Avšak pro somatické kmenové buňky se lépe určují kultivační podmínky (souzeno dle přirozeného prostředí buněk), hlídání genetické stability je snadnější, stejně jako jejich získávání z organismu, jelikož se při jejich separaci nemusí vědecké týmy potýkat s etickými problémy, které u embryonálních kmenových buněk

nastávají. Somatické kmenové buňky by v budoucnu mohly sloužit jako autologní zdroj kmenových buněk pro reparaci dentice prostřednictvím regenerativní medicíny.

Embryonální kmenové buňky jsou získávány z vnitřní buněčné masy embrya, ve fázi blastocysty. Je nutné si v tomto případě uvědomit, že se jedná o buňky, které se vyskytují v organismu pouze velmi krátkou dobu, a vzhledem k jejich původu se jedná o buňky obtížně dosažitelné. Tyto buňky, jak již bylo zmíněno, však mají z hlediska plasticity mnohem větší potenciál než somatické kmenové buňky. V rámci své SOČ se zaměřuji na lidské embryonální kmenové buňky.

Buňky lze rozdělovat dle jejich diferenciačních schopností. Jako totipotentní jsou označovány buňky, které jsou schopné vývinu do jakékoliv tělní buňky. Takovou diferenciační schopnost má zygota. Pluripotence je prakticky stejná, s tím rozdílem, že jediné, do čeho se buňka není schopná přeměnit je trofoblast¹. Diferencování se do více typů buněk, ale jen v rámci jednoho typu tkáně dokáží multipotentní kmenové buňky, nazývané také jako oligopotentní kmenové buňky. Posledním typem je unipotence, buňky jsou schopné autoregenerace a produkce jen jednoho typu buněk. Většinou se jedná o somatické kmenové buňky.

Izolované kmenové buňky musí být v odontogenním prostředí, aby se mohly správně naprogramovat ke tvorbě zubu. Toho se dá docílit například rekombinací epitelu, který má v dané době indukční potenciál.

V současné době lze uvést tři odlišné postupy pro rekonstrukci zubního orgánu. Efektivní metodou je tzv. přenesení embryonálního vývoje. Tato technika spočívá v napodobení přirozeného vývoje zubu. Vzhledem k tomu, že indukční potenciál se v brzkém vývoji nachází v epitelu, je možné jej od okolní tkáně enzymaticky a mechanicky separovat a následně epitel použít jako zdroj indukčních signálů pro buněčné linie, které jsou schopny na tyto signály reagovat. Experimentů založených na tomto principu byla provedena celá řada. „Wilde u obojživelníků rekombinoval neurální lištu v oblasti urodele s epitelem stomodea, výsledkem byly zcela diferencované zuby. Na základě Wildeho experimentu rekombinoval Lumsden v roce 1984 myší neurální lištu s mandibulárním ústním epitelem a nechal je kultivovat v přední komoře myšího oka, kde vznikl zárodek. V roce 2006 byl tento postup oficiálně zaveden profesorem Sharpem v Londýně. Zuby vytvořené tímto způsobem odpovídaly velikostí a tvarem normálním myším molárům.“ [1] V laboratorních podmínkách

¹ Zevní obal savčího embrya ve fázi blastocysty.

lze takto vytvořený objekt kultivovat zhruba 7 dní, po této době již není možné uměle systém vyživovat a pro déle trvající kultivaci je třeba jej přenést do imunokompromisního orgánu laboratorní myši; ledvinná kapsula či oční komora. Díky cévnímu zásobení živinami je možné z rekombinovaných tkání vnesených do ledvinných kapsulí dospělé myši, získat plně mineralizované zuby.

Dalším typem tkáňového inženýrství je přímá rekonstrukce zubu v ústech. Tato technika vychází ze sestrojování každé části zubu zvlášť.

Třetím způsobem je vytvoření zubu na tzv. biologickém lešení. Této metodě je zatím věnována menší pozornost. Rozvolněné epiteliální a mezenchymální buňky ještě neprořezaného zubu, nejčastěji ve fázi zubního pupene, se vysejí na biodegradovatelné polymerové lešení. Tato konstrukce by měla plně nahrazovat přirozené prostředí zubu a dávat mu jeho přirozený tvar. Jako lešení se používá bezpočet materiálů, pórovitý hydroxyapatit, kolagen, chitosan a z polymerů například polyglykolová kyselina. Snahy v rámci této metody zatím ztroskotaly na narušení interakce mezi buňkami a okolním prostředím, za což je zodpovědná právě konstrukce.

4 Experimentální část

4.1 Detekce odontogeneze *in vivo*

4.1.1 Immunohistochemie-amelogenin, osteokalcin moláry (sagitální a frontální řez)

Imunohistochemii detekující amelogenin (odkazující na místa budoucí skloviny) a osteokalcin (lokace tvořícího se zubního alveolu) jsem prováděla na histologických řezech myších hlav obsahujících oblast prvního moláru (ED17,5 a P2). Metoda byla totožná s postupem např. pro detekci cytokeratinu, rozdíl byl v použité primární protilátce (viz str. 32).

Imunohistochemie:

Kozí blokační sérum

Primární protilátka: anti-body diluent (ředění 1:300)

→ Detekce amelogeninu: anti-amelogenin

→ Detekce osteokalcinu: anti-osteokalcin

Sekundární protilátka: anti-rabbit antigen

Sledování odontogeneze *in vivo* na myších molárech sloužila k demonstraci diferenciaci buněk při tomto procesu.

4.2 Detekce odontogeneze *in vitro*

V rámci experimentální části jsem se zabývala izolací dolních čelistí myšího embrya v ED12 a následnou separací orálního epitelu mandibuly. Získaný orální epitel jsem rekombinovala s buňkami neurální lišty a poté tyto objekty kultivovala. Jako negativní kontrolu pro správnost rekombinační techniky jsem použila MEF buňky, izolované z horních končetin myších embryí ve stádiu vývoje v ED10.

4.2.1 Separace myšího orálního epitelu z ED12

Gravidní myš je uspána chloroformem, usmrcení je provedeno přerušáním páteře, poté je otevřena břišní dutina, vyjmuta děloha s embryi a ta je vložena do PBS. Z embryonálních obalů jsou vyjmuta embrya. Ta jsou přemístěna do Petriho misky s čistým PBS.

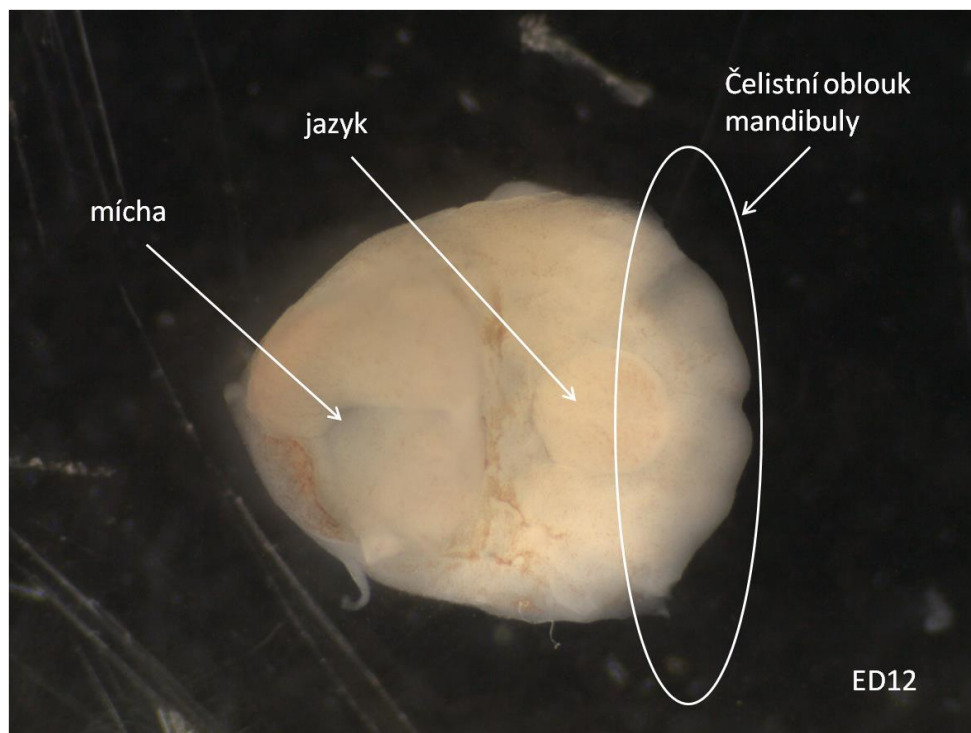
Pomocí skalpelu je izolována dolní čelist embrya. Oddělené čelisti jsou přesunuty do čisté Petriho misky, obsahující dispázu II (koncentrace 1,6 U/ml).

Čelist je inkubována s dispázou (25 minut při teplotě 37 °C). Účelem je oddělení vrstvy epitelu od mezenchymu, čehož plně docílíme následným použitím jehel při mechanické izolaci epitelu.

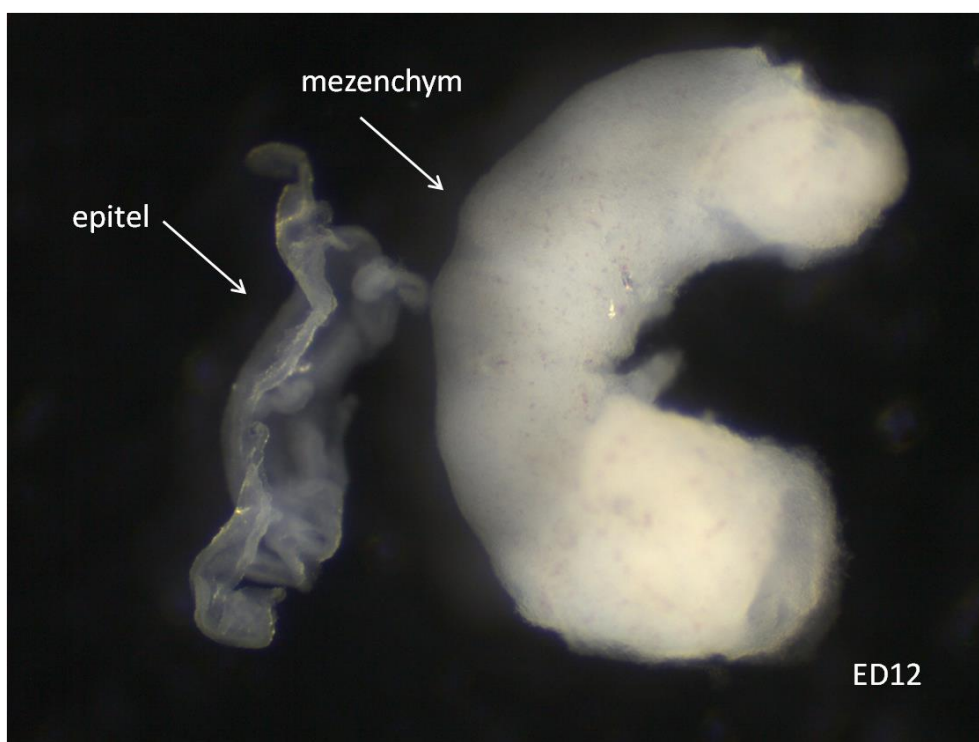
Oddělený epitel je přesunut do Petriho misky s PBS, čímž se zastavuje působení dispázy. Vyseknuty jsou moláry, které jsou přemístěny do Petriho misky s PBS na ledu. Nyní je epitel připraven k rekombinaci s prekurzory buněk neurální lišty.



Obrázek č. 5: Embryo ED12, 8x zvětšeno



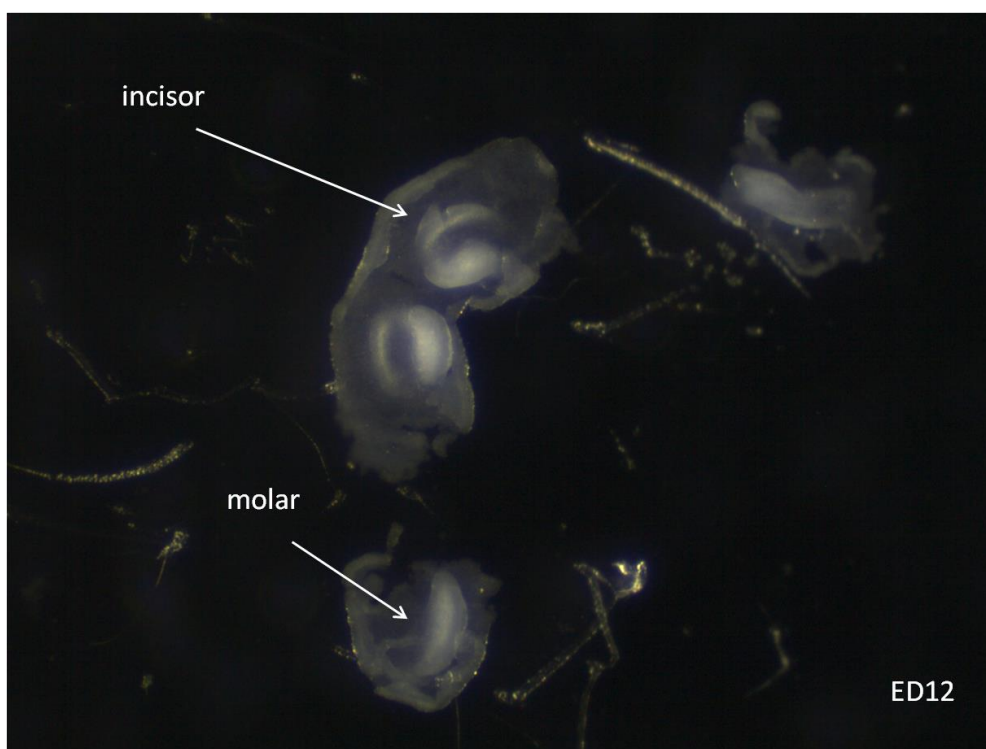
Obrázek č. 6: Separovaná mandibula, 12,5x zvětšeno



Obrázek č. 7: Separace epitelu od mezenchymu, 25x zvětšeno



Obrázek č. 8: Epitel s viditelnými řezáky a stoličkami, 40x zvětšeno



Obrázek č. 9: Vyseknutí dentálního epitelu, dále používaného k rekombinaci; 40x zvětšeno

4.2.2 Příprava buněk neurální lišty

NCPC byly derivovány z lidských embryonálních kmenových buněk (hES) italským výzkumným týmem pod vedením Eleny Cattaneo. Tyto buňky byly kultivovány a množeny

na oddělení doc. Hampla. Kultivace byla prováděna na Petriho miskách s médiem určeným pro tento typ buněk. Buňky byly sklizeny pomocí enzymu akutázy (2 min při 37 °C), následně byla reakce zastavena přidáním media a buňky byly centrifugovány (5 min při 100 g). Supernatant byl odsát a tím byl získán pelet o vysoké koncentraci buněk, která je nezbytná pro rekombinační techniku.

4.2.3 Příprava MEF z myších horních končetin v ED10

Jako kontrolní buňky byly použity MEF izolované z horní končetiny myšího embrya v ED10. U těchto buněk není předpokládán potenciál odpovídat na odontogenní signály orálního epitelu, proto by při rekombinaci s epitelem neměl vzniknout žádný útvar připomínající zub.

Od embrya se pinzetou oddělí přední končetiny (FL), které se opatrně rozřežou jehlami. Celý obsah misky se poté pipetou přenese do 15 ml zkumavky a nechá se stát na ledu 5 až 10 minut, aby se buňky usadily. Přebytké množství PSA, supernatant, se odsaje. K peletu je poté přidáno 2,7 ml PSA se sérem (1:9) a 0,3 ml dispázy. Následně se zkumavka inkubuje při 37 °C po dobu 1,5–2 hodin s občasným vortexováním. Kombinace enzymu dispázy a mechanických vlivů zaručí rozrušení vazeb mezi buňkami.

K zastavení reakce se přidají 3 ml media (pipetou opatrně promíchat nahoru a dolů), následuje centrifugace, odstraní se supernatant a přidají se 3 ml media. Obsah se opatrně resuspenduje pipetou a filtruje přes Cell Strainer („buněčné sítko“) do 50 ml zkumavky, tím se suspenze zbaví větších shluků buněk. Promytí 3 ml media, následuje centrifugace, odsání vzniklého supernatantu, zůstává pouze pelet. Tím vzniká velmi hustá suspenze buněk, která se dále používá k rekombinačním pokusům.

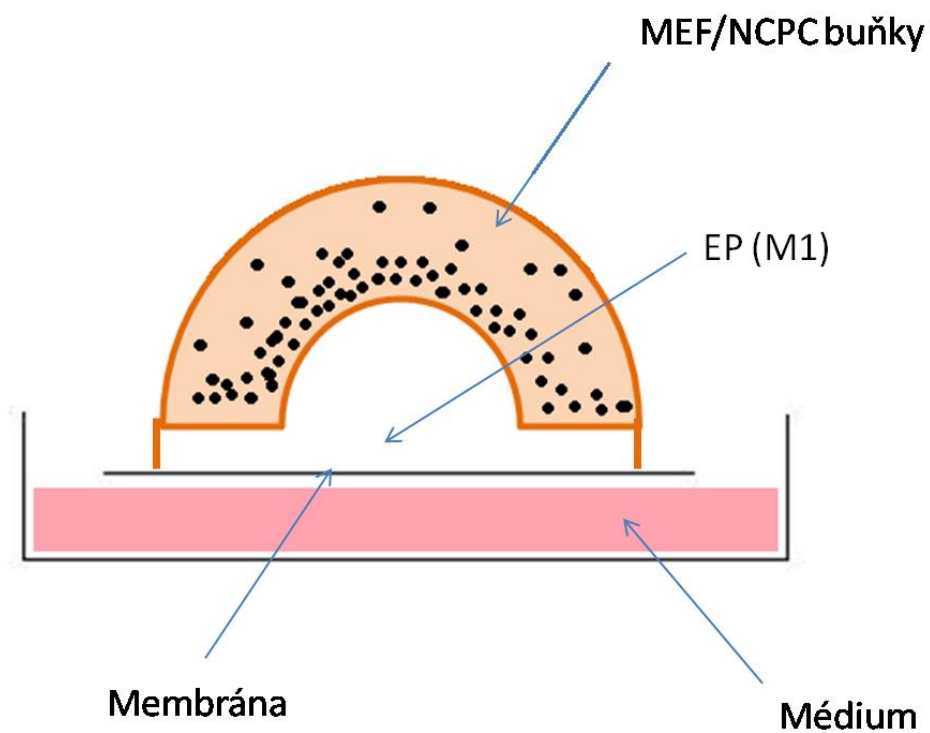


Obrázek č. 10: Schéma přípravy MEF

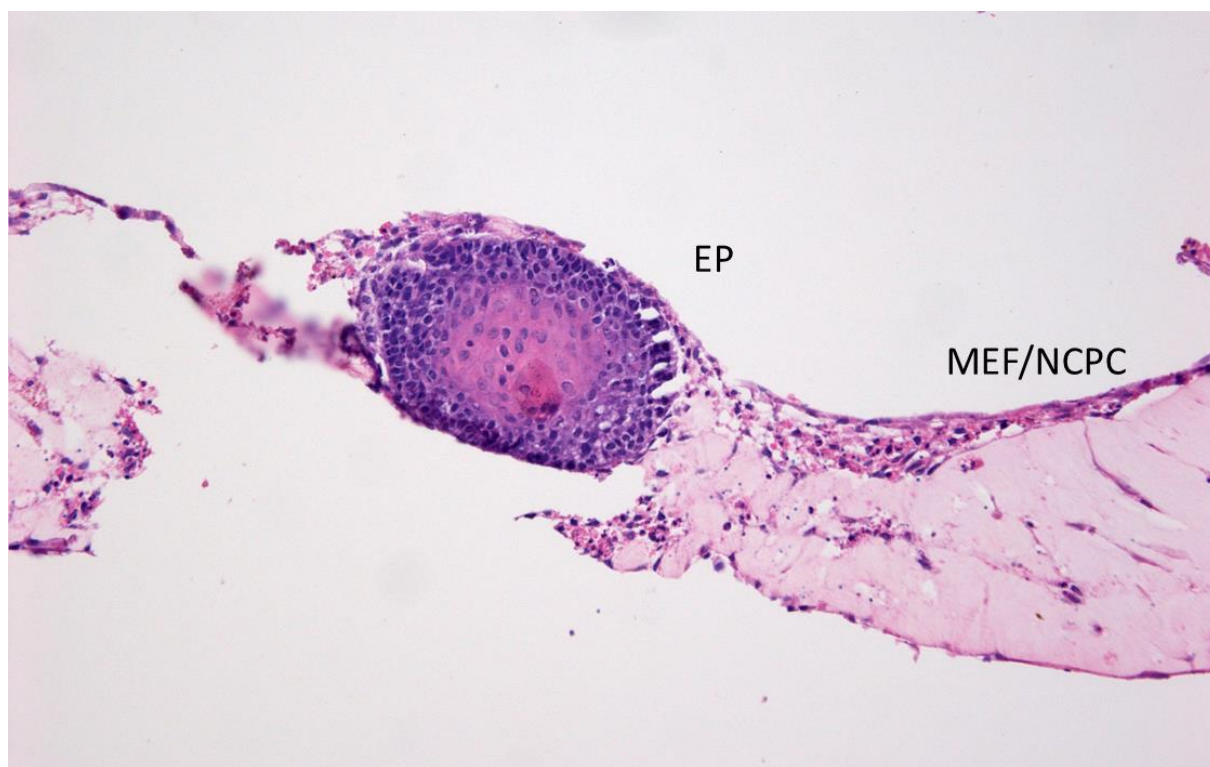
4.2.4 Rekombinační systém využívající plovoucí membrány na médiu

Rekombinace využívající plovoucí membrány je provedena vložením epitelu do středu membrány (vyříznuta z inzertu), následuje vnesení kapky kolagenu (asi 30 µl) smíchaného s médiem a následným vpíchnutím koncentrované suspenze derivovaných NCPC či FL

pomocí tenké špičky. Celý systém se inkubuje po dobu 5 až 10 minut, poté se aplikuje médium pod membránu a nechá se inkubovat 8 dní (při 37,6 °C, 5% CO₂).



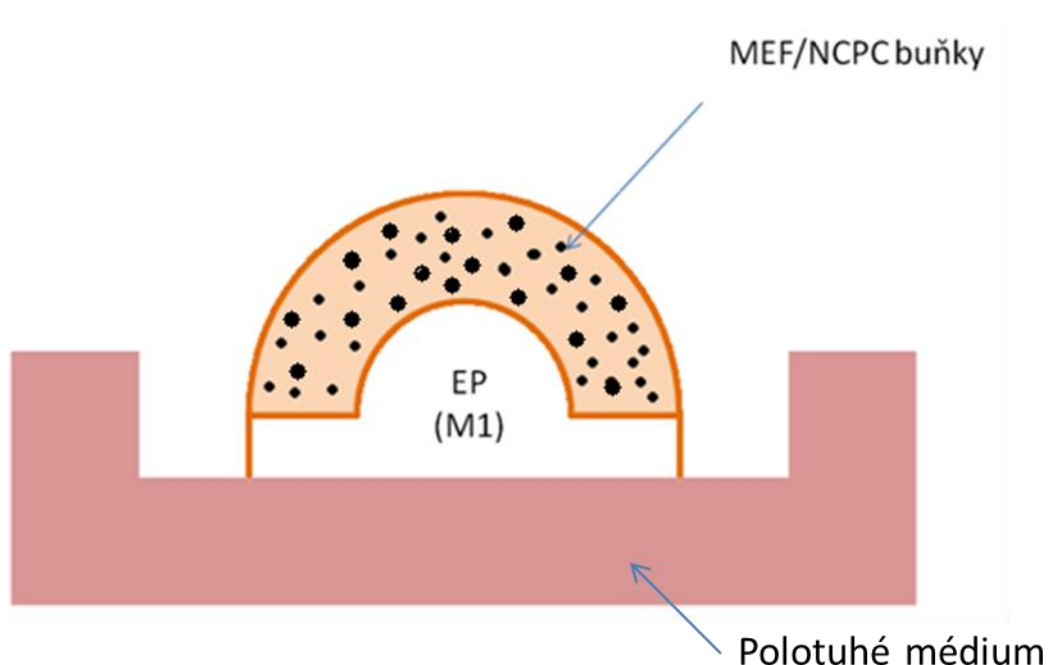
Obrázek č. 11: Schéma rekombinačního systému využívajícího plovoucí membrány na médiu



Obrázek č. 12: Histologický řez rekombinace plovoucí membránou EP s MEF/NCPC, 200x zvětšeno

4.2.5 Rekombinační systém využívající tzv. polotuhých médií

Rekombinace s využitím polotuhého média, které obsahuje podíl agaru, je provedena vložením epitelu na polotuhé médium a jeho následným překrytím NCPC. Takto rekombinované útvary se nechají inkubovat 8 dní.



Obrázek č. 13: Schéma rekombinačního systému využívajícího tzv. polotuhých médií



Obrázek č. 14: Rekombinační systém využívající polotuhého média (EP+NCPC) po osmi dnech kultivace. Epitel se zde vyvíjí pod vrstvou mezenchymálních buněk, tvarem připomíná vyvíjející se molár. 4x zvětšeno.



Obrázek č. 15: Histologický řez vzorku, který byl rekombinován na polotuhém médiu (EP s NCPC)

4.2.6 Fixace vzorku a jeho převedení do parafinu

Po uplynutí požadované doby kultivace se zafixuje v pufrovaném formolu 4% (2 hodiny), promyje se v PBS a následně se dehydratuje ve vzestupné alkoholové řadě, xylenu a zalévá se do parafinu v požadované orientaci.

Vzestupna alkoholova rada

30%	(20 min)
50%	(20 min)
70%	(20 min)
80%	(20 min)
85%	(20 min)
90%	(20 min)
95%	(20 min)
100%	(20 min)

Xylen

Xylen I	(30 min)
Xylen II	(30 min)
Xylen III	(30 min)

Parafín

Parafín I..... (30 min)

Parafín II (30 min)

Parafín III..... (30 min)

4.2.7 Zhotovení histologických parafínových řezů

Histologické parafínové řezy se zhotovují na mikrotomu (optimálně 5 µm). Bloček je nutné nechat zchladit cca 2 min v mrazicím boxu, následně se vloží do držáku, upevní a je připraven ke krájení histologických řezů. Ty se řadí za sebou na podložku, vybrané řezy se vkládají do lázně (cca 1,5 min) o teplotě 38 – 38,5 °C, aby bylo možné je aplikovat na podložní sklo. Řezy, na skle, se suší na vyhřívané podložce při teplotě 41 °C, dále se nechají přes noc v termostatu při teplotě 37 °C. Poté se řezy skladují v lednici.

4.3 Imunohistochemie - PCNA

Metoda imunohistochemie je založena na kompatibilitě antigenu a protilátky. Antigen je v tomto případě PCNA¹ (proliferating cell nuclear antigen), který je lokalizován v jádře a podílí se na dělení buněk (resp. replikaci DNA). Proto je ideálním indikátorem proliferace buněk.

Aby bylo možné rozpoznat, které buňky podstupují proliferaci a které nikoli, využívá se toho, že se protilátka specificky váže na antigen. Na primární protilátku je aplikována protilátka sekundární, která je značená biotinem. Na biotin se váže komplex avidin-POD. Peroxidáza rozkládá DAB. Aplikací DAB² dojde k chromogenní substrátové reakci. (Proliferující buňky jsou zabarveny hnědě.) K protibarvení je využit hematoxylin (modrá/fialová).

Postup:

Histologické řezy se odparafínují v xylenu, zavodní sestupnou ethanolovou řadou, poté se nechají 10 minut v destilované vodě s PBS (10:1) a inhibují endogenní peroxidázu peroxidem vodíku v PBS (5 min). Promyje se třikrát v PBS, na 20 min se aplikuje blokační sérum (blokuje nespecifické vazby protilátky; 1000 µl PBS : 15 µl BS, vortex), poté se setřepe a aplikuje se primární protilátka anti-PCNA (1 µl primární protilátky do 50 µl PBS) ve vlhké komůrce po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se

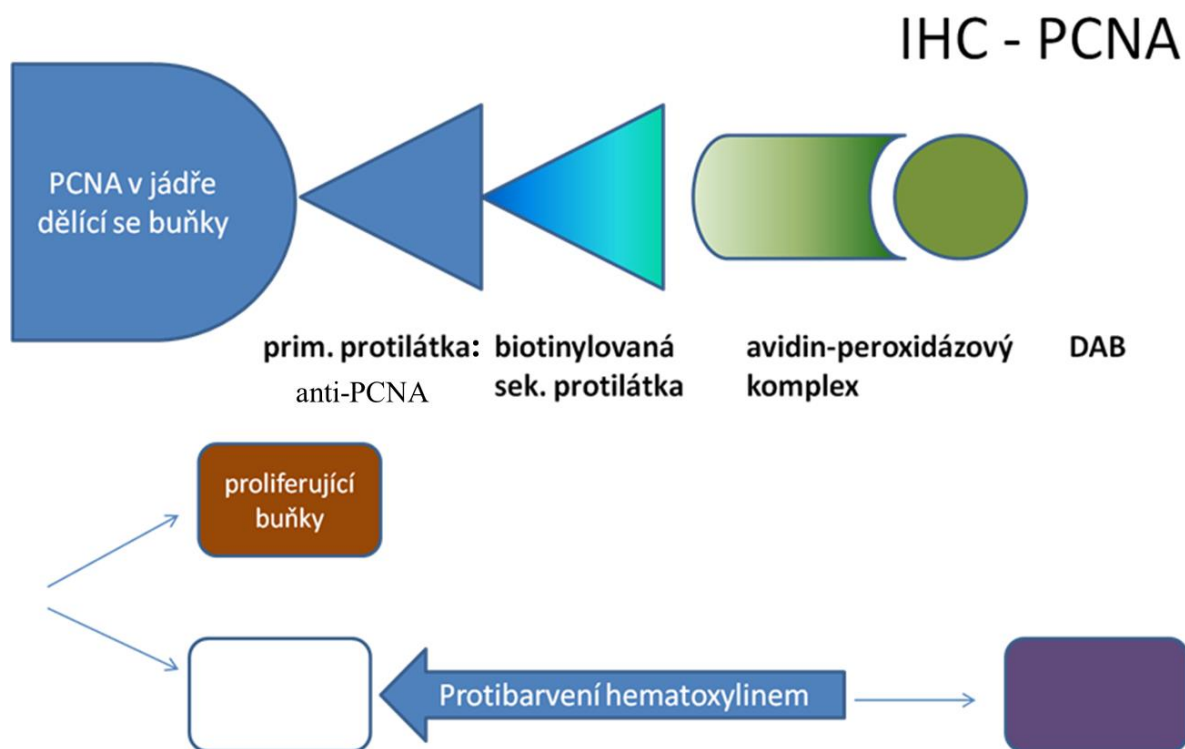
¹ Jedná se o protein.

² Diaminobenzidin (chromogenní substrát)

sekundární protilátka (5 µl sekundární protilátky : 1000 µl PBS) po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se komplex AB po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se chromogenní substrát DAB. Promyje se destilovanou vodou a provede se protibarvení hematoxylinem (5 min), následně se nechá pod tekoucí vodou po dobu 10 minut. Odvodní se vzestupnou ethanolovou řadou a zamontuje Entellanem.

Vzestupná ethanolova řada:

50% 5 min
 70% 5 min
 96% 5 min
 100% 5 min
 Xylen I 10 min
 Xylen II 10 min



Obrázek č. 16: Schéma PCNA

4.3.1 Immunohistochemie-cytokeratin

Imunohistochemie značící cytokeratin, vyskytující se pouze u buněk epitelu, lokalizuje místo ve vzorku, kde se v rekombinovaném histologickém řezu nalézají orální epitel.

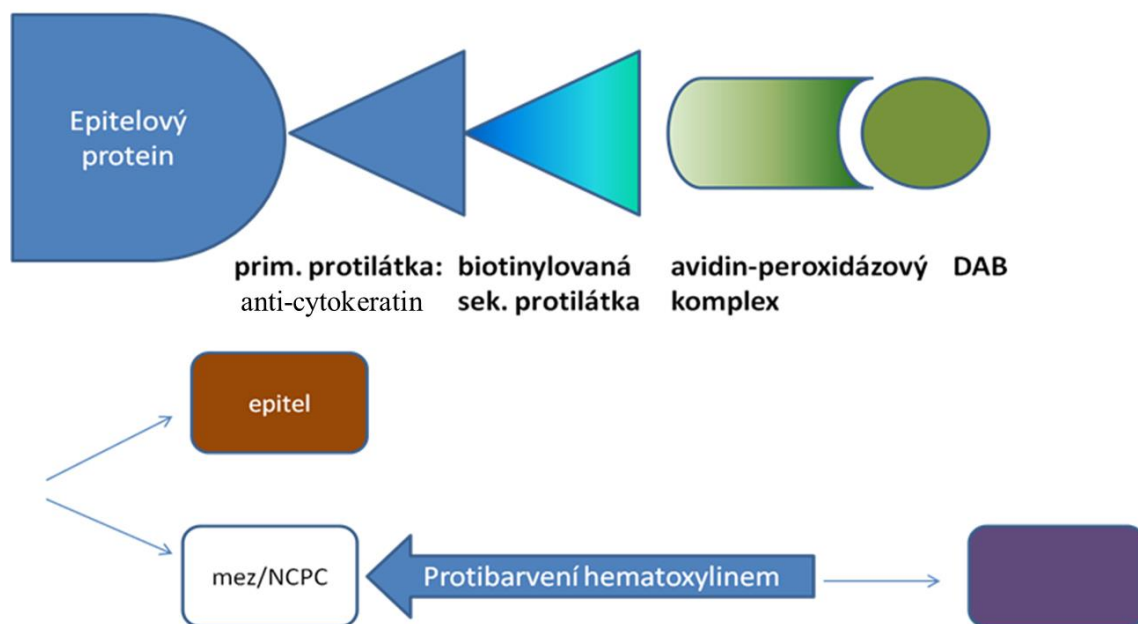
Postup:

Histologické řezy se odparařinují v xylenu, zavodní sestupnou ethanolovou řadou, poté se nechají 10 minut v destilované vodě s PBS (10:1) a aplikuje se predpůsobení (revitalizace antigenů citrátovým pufrem) zahříváním ve vodní lázni po dobu 5 minut, následně se nechá 15 minut chladnout. Promyje se třikrát v PBS a inhibuje se endogenní peroxidáza peroxidem vodíku v PBS (5 min). Promyje se třikrát v PBS, na 20 min se aplikuje koňské blokační sérum (blokuje nespecifické vazby protilátky; 1000 µl PBS : 15 µl BS, vortex), poté se setřepe a aplikuje se primární protilátka anti-cytokeratin (1 µl primární protilátky do 50 µl PBS) ve vlhké komůrce po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se sekundární protilátka (5 µl sekundární protilátky : 1000 µl PBS) po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se komplex AB (10 µl A i B + 1000 µl PBS – zamíchat na vortexu) po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Třikrát se promyje v PBS a aplikuje se chromogenní substrát DAB (30 s). Promyje se třikrát v PBS a destilovanou vodou kvůli zastavení reakce. Následně se provede protibarvení hematoxylinem (5 min), nechá se pod tekoucí vodou po dobu 10 minut, odvodní se vzestupnou ethanolovou řadou a zamontuje Entellanem.

Vzestupná ethanolova řada:

50%	5 min
70%	5 min
96%	5 min
100%	5 min
Xylen I	10 min
Xylen II	10 min

IHC – cytokeratin



Obrázek č. 17: Schéma imunohistochemie-cytokeratin

4.3.2 TUNEL

Díky TUNELu je možné zjistit přítomnost apoptotických buněk ve vzorku, v našem případě tedy v histologickém řezu. Hnědou jsou značené apoptotické buňky a tělíska, modrou buňky přežívající.

Postup:

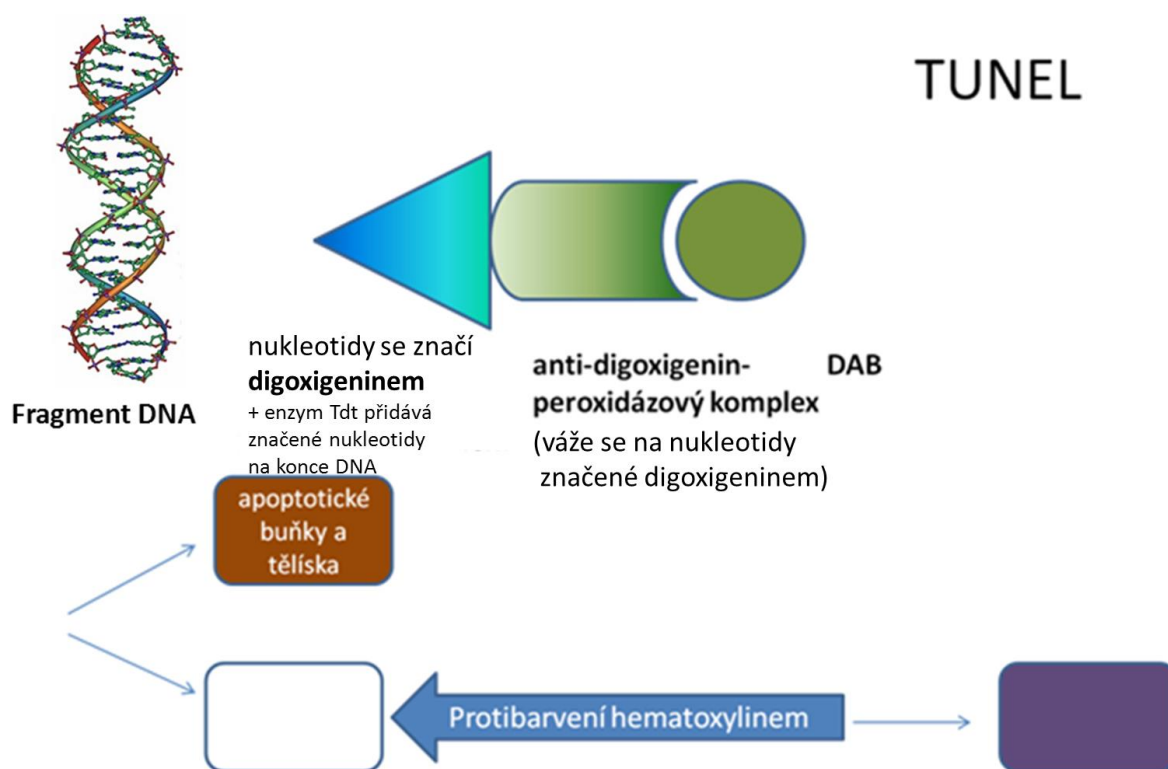
Histologické řezy se odparafínují v xylenu, zavodní sestupnou ethanolovou řadou, poté se nechají 10 minut v destilované vodě s PBS (10:1) a aplikuje se proteináza K (ředění 10x), tak aby překryla celý preparát (15 min). Kvůli zastavení reakce se dvakrát promyje v destilované vodě (2 min) a následně se inhibuje endogenní peroxidáza peroxidem vodíku (ředění 10x, 5 min). Aplikuje se ekvilibrační puft (asi 50 μ l překrýt vzorek) po dobu 15 minut, oklepe se a vysuší. Dále se aplikuje reakční směs (inkubace při 37 °C v termostatu po dobu 1 hodiny; ředění 22 μ l destilované vody : 11 μ l TdT enzymu : 70 μ l reakčního pufru). Na zastavení reakce se vzorek promyje po dobu 10 minut v kyvetě se stop puftrem (ředění 2 ml stop pufru : 68 ml destilované vody). Třikrát se promyje v PBS, osuší se a aplikuje se anti-digoxigenin (30 min). Promytí třikrát v PBS a aplikuje se chromogenní substrát DAB (1–2 min) (1 kapka DAB, 1 ml ředidla). Promyje se v PBS a destilovanou vodou, za účelem zastavení reakce. Následně se provede protibarvení hematoxylinem (5 min), nechá se pod tekoucí vodou po dobu 10 minut. Odvodní se vzestupnou ethanolovou řadou a zamontuje Entellanem.

Sestupná alkoholová řada

Xylen I 5 min
Xylen II 10 min
Etanol 100% 5 min
Etanol 96% 3 min
Etanol 70% 3 min

Vzestupná alkoholová řada

Etanol 50% 5 min
Etanol 70% 5 min
Etanol 96% 5 min
Etanol 100% 5 min
Xylen II 10 min
Xylen I 10 min



Obrázek 18: Schéma TUNEL

4.4 Použité látky

- **PBS SIGMA (D8537) 500 ml (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE)**

- Fyziologicky roztok iontů, které zajišťují fyziologické podmínky pro tkáň
- Komerční
- Sterilní
- *Phosphate Buffered Saline=FOSFÁTOVÝ PUFR*

- **Fetální sérum (FCS)**

- Bovine sera Foetal Calf Serum Eutroph
- Distribuce: Elisabeth Pharmacon

- **Dispáza: Dispase II Roche (neural protease I grade II)**

- Z Bacillus polymyxa; lyophilizate
- (1,6 U/ml je výsledná koncentrace, míchá se s FCS a PBS)

20mg Dispase II Roche

6ml PBS

4ml FCS

- **Polotuhé médium**

- Kyselina askorbová: 18 mg/ml: 0,1 ml
- P/S: P 5 U/ml, S 5 µg/ml: 0,1 ml
- L-Glu: 100x: 0,1 ml
- FBS: 2 ml
- DMEM/F12: 7,7 ml

Smíchat všechny složky dohromady

Pipeta 1,8 ml doisky

Zahřát na 40 °C

- Agar: 0,25 g rozpustit v 10 ml PBS (sterilní, komerční), zahřívát

Pipetou 5–6 kapek agaru doisky

Dobře rozmíchat skleněnou hokejkou

Inkubovat 15 min v RT

Skladovat ve 4 °C

- **Směs kolagenu a média**

- 125 µl kolagenu (BD 354236)

- 31,25 µl DMEM 5x (dodává se v prášku a je možné jej naředit na požadovanou koncentraci)
- 0,4375 µl NaOH 1M
- **Chloroform**
- **Akutáza**
- **PSA**
- **Pufrový formol (4%)**
- **Ethanol** (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 100%)
- **Xyleny** (I, II, III)
- **Parafíny** (I, II, III)

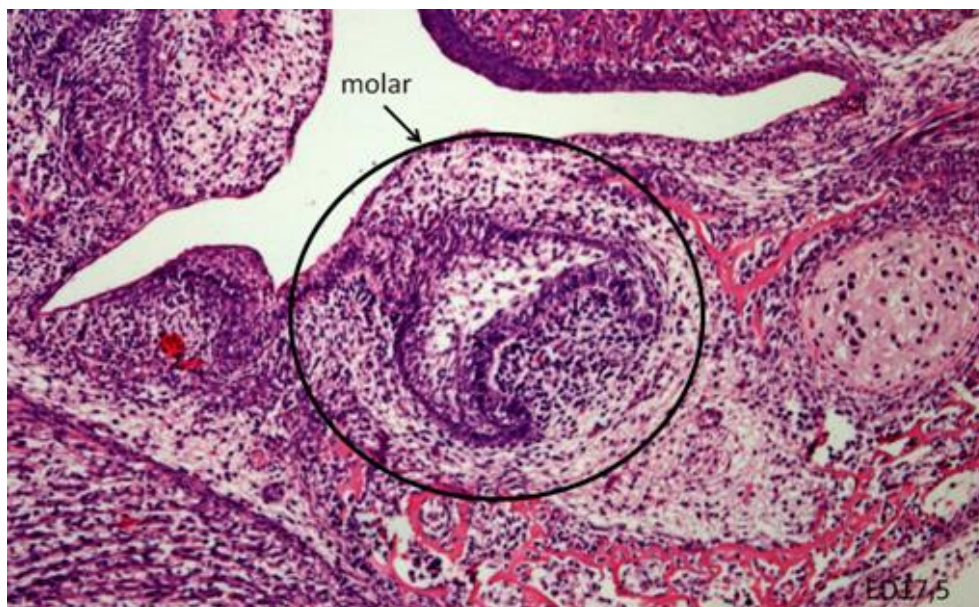
NCPC medium	50 ml	Ředění:
DMEM/F12	24 ml	
Neurobasal	24 ml	
B27 suppl.	500 µl	100x
N2 suppl.	250 µl	200x
2-ME 0,01M v PBS	100 µl	500x (0,02 mM je finální koncentrace)
EGF	100 µl	finální: 20 µg/ml (objem 10 µg/ml)
EGF2	100 µl	finální: 20 µg/ml (objem 10 µg/ml)

Medium TK	50 ml	<u>Ředění:</u>
DMEM	44 ml	
FCS	5 ml	10x
Pen/Strep	500 µl	100x
	Pen – 10 000 U/ml	100 U/ml
	Strep – 10 mg/ml	100 µg/ml
L-Glu	500 µl (200 mM)	100x (2 mM)

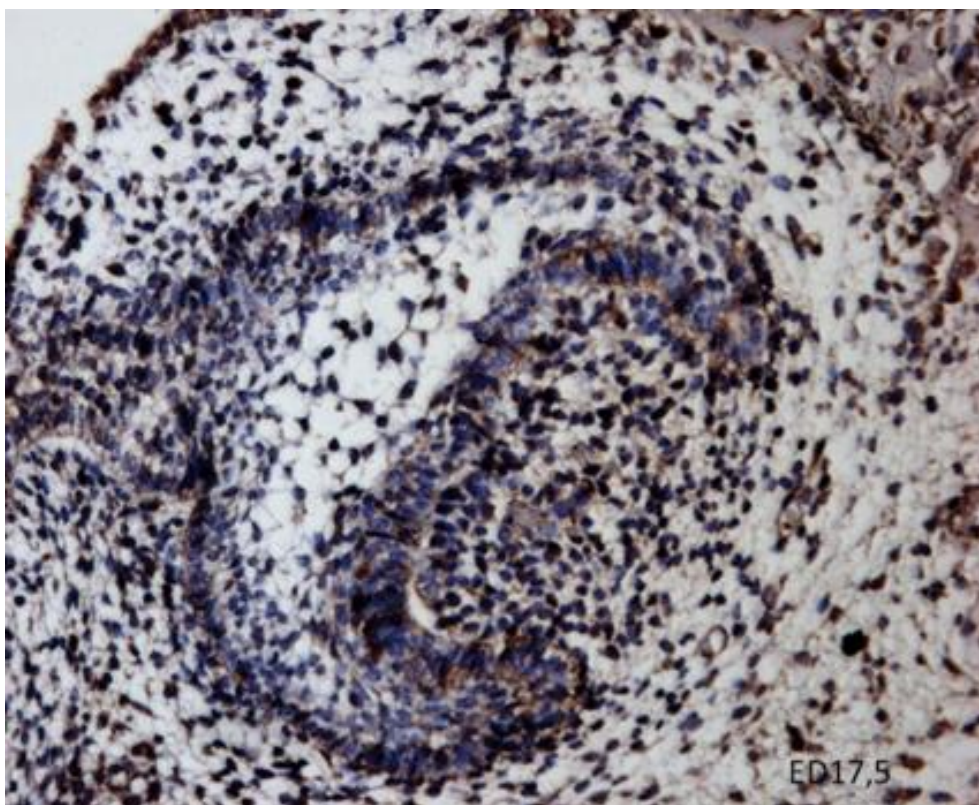
4.5 Výsledky

4.5.1 Detekce odontogeneze *in vivo*- IHC amelogenin, osteokalcin moláry

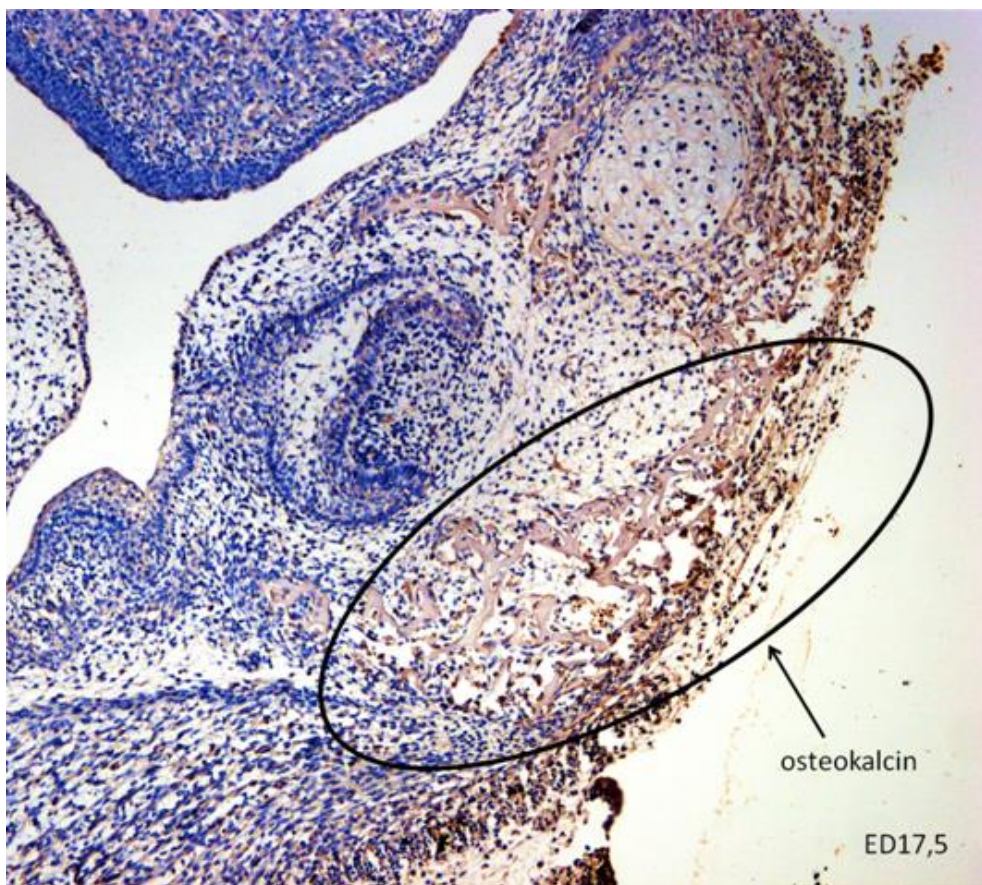
4.5.1.1 ED17,5



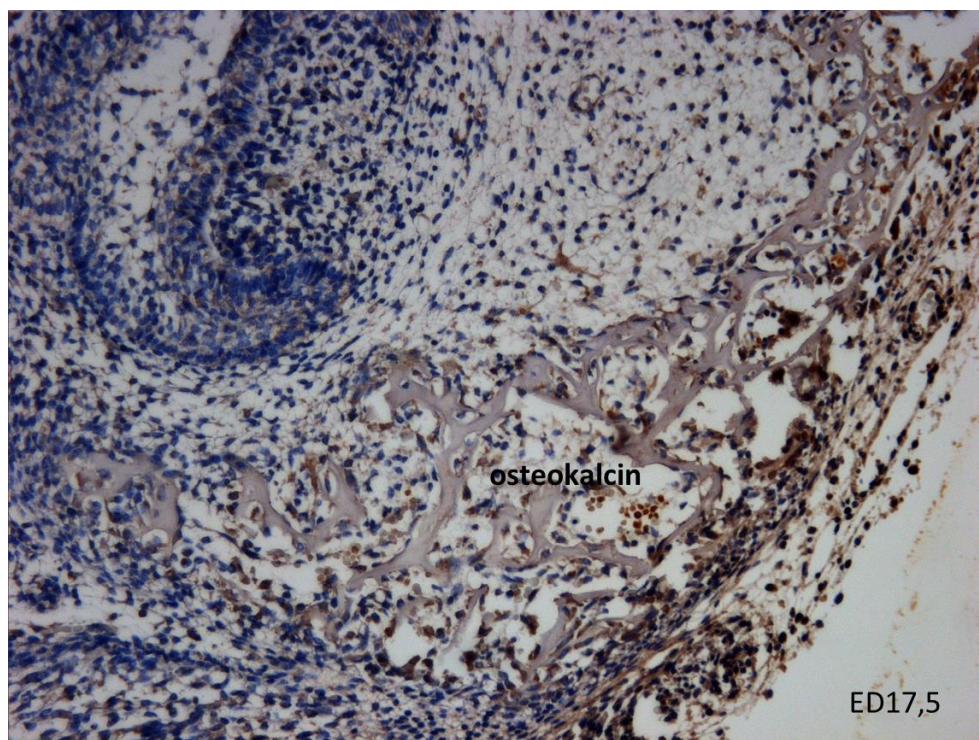
Obrázek č. 19: Hematoxylinem barvený histologický řez, 100x zvětšeno



Obrázek č. 20: IHC–amelogenin, 200x zvětšeno



Obrázek č. 21: IHC–osteokalcin, 100x zvětšeno



Obrázek č. 22: IHC–osteokalcin, 200x zvětšeno

4.5.1.2 P2



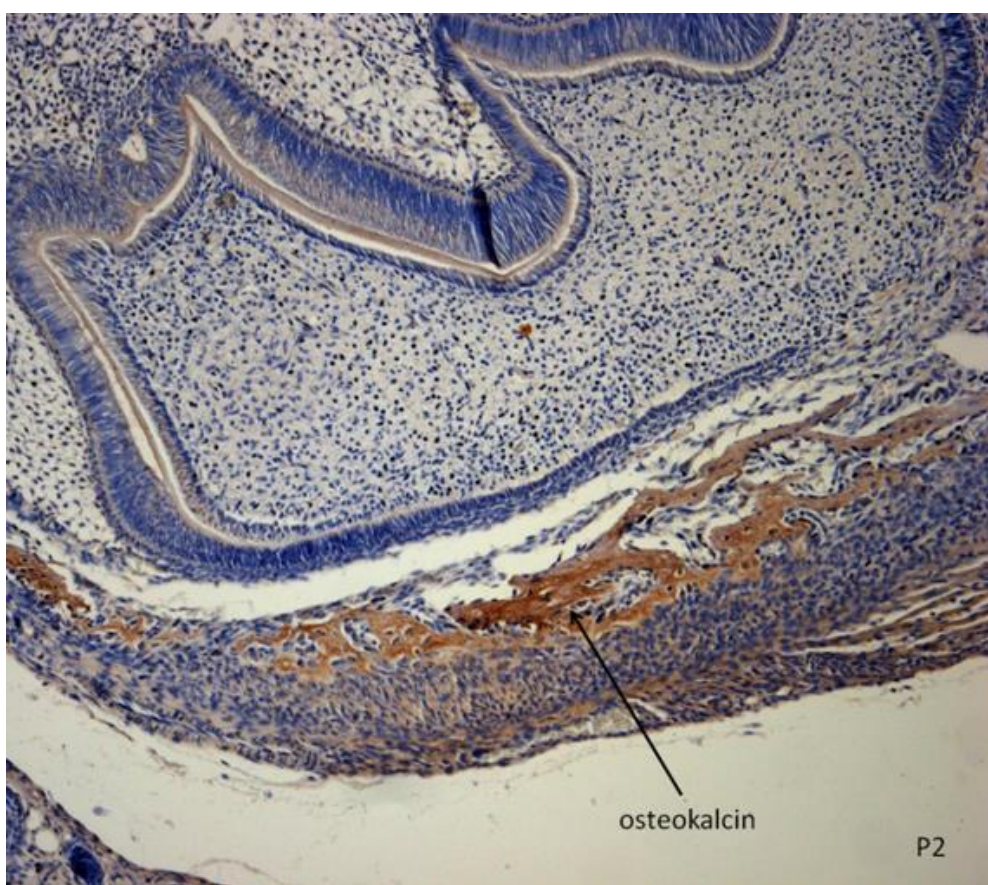
Obrázek č. 23: Hematoxylinem barvený histologický řez, 100x zvětšeno



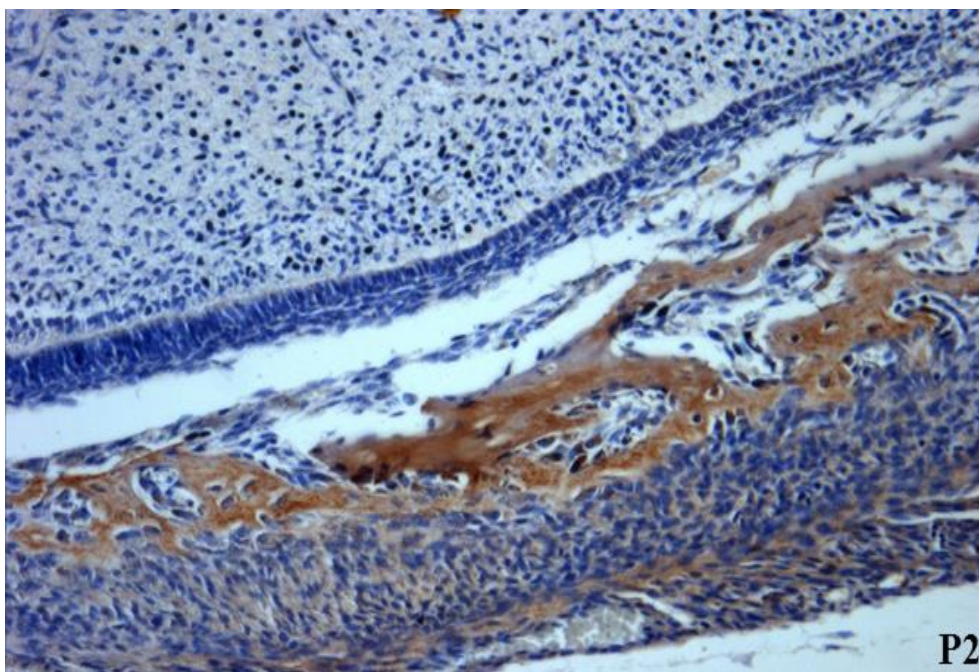
Obrázek č. 24: IHC–amelogenin, 100x zvětšeno



Obrázek č. 25: IHC–amelogenin, 200x zvětšeno

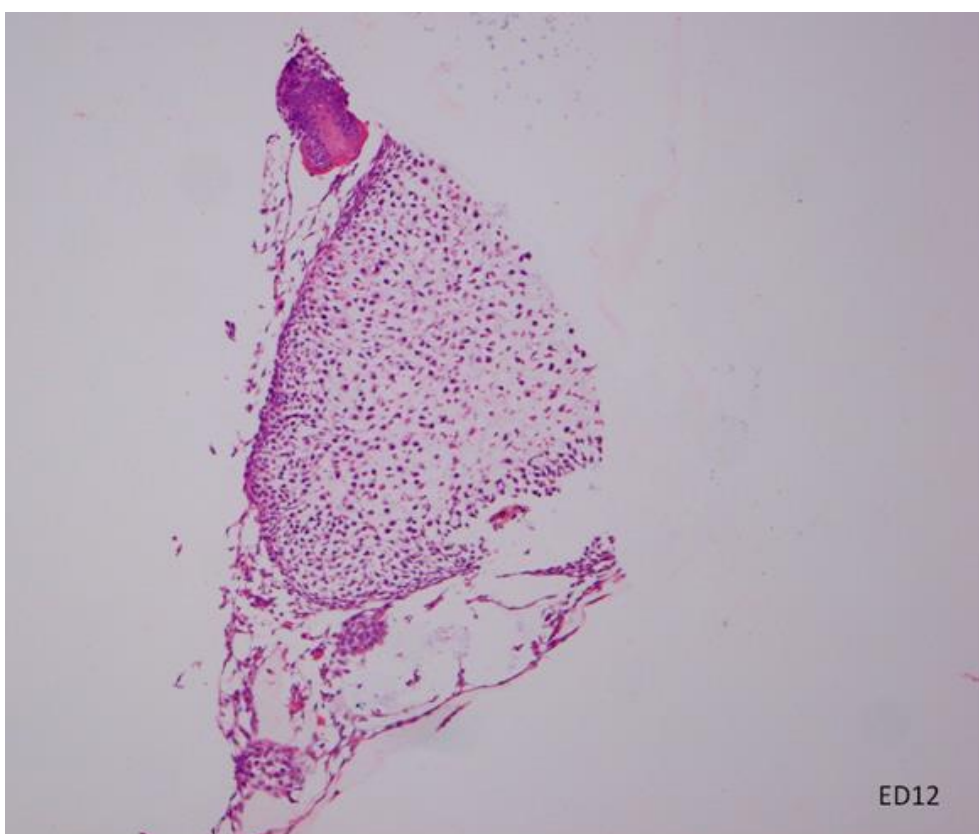


Obrázek č. 26: IHC–osteokalcin, 100x zvětšeno

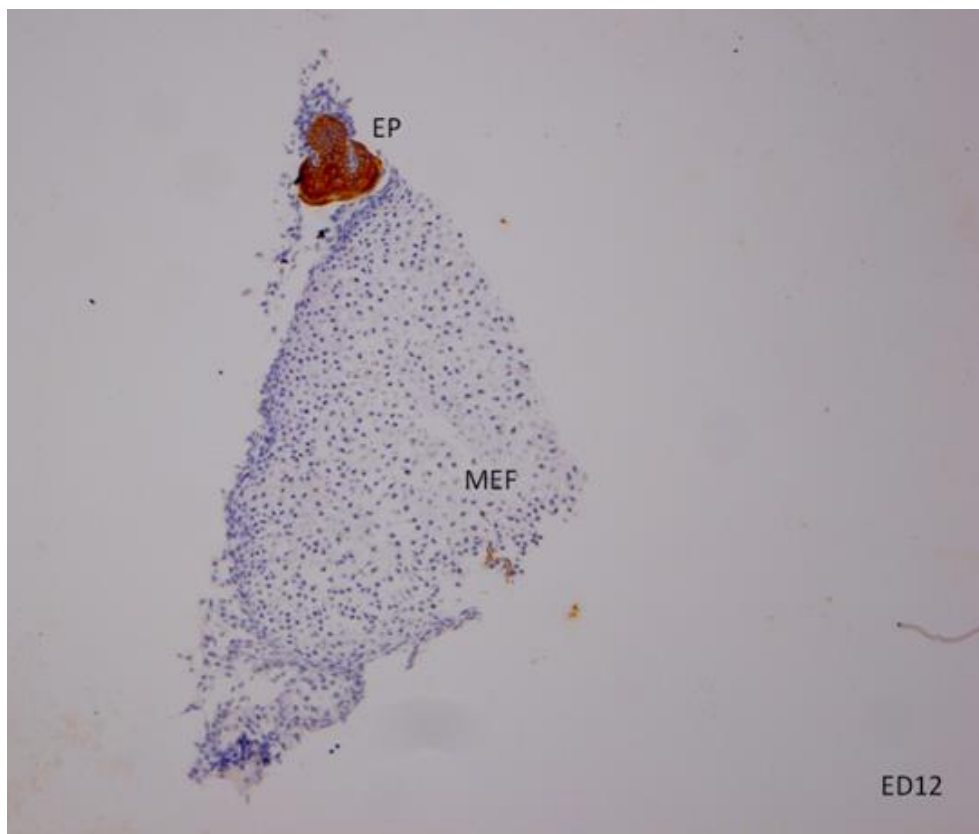


Obrázek č. 27: IHC—osteokalcin, 200x zvětšeno

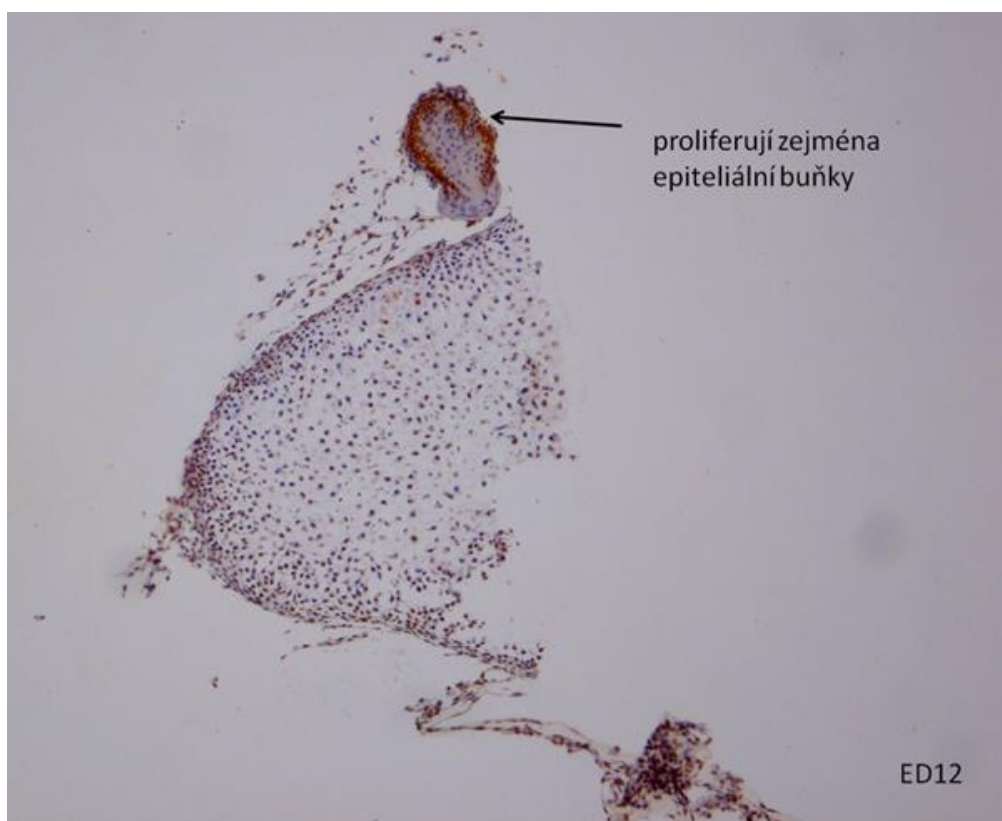
4.5.2 Detekce odontogeneze *in vitro*-rekombinace EP+MEF



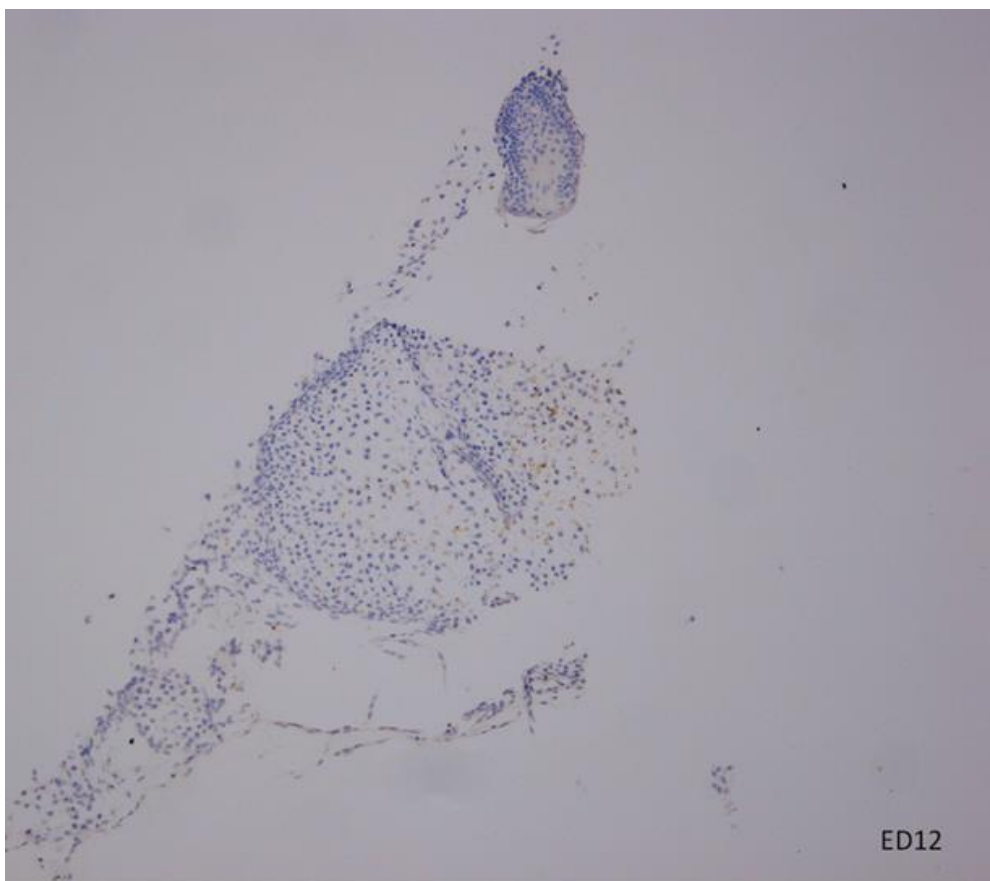
Obrázek č. 28: Barvení tkáně hematoxylinem, 100x zvětšeno



Obrázek č. 29: IHC–cytokeratin, 100x zvětšeno

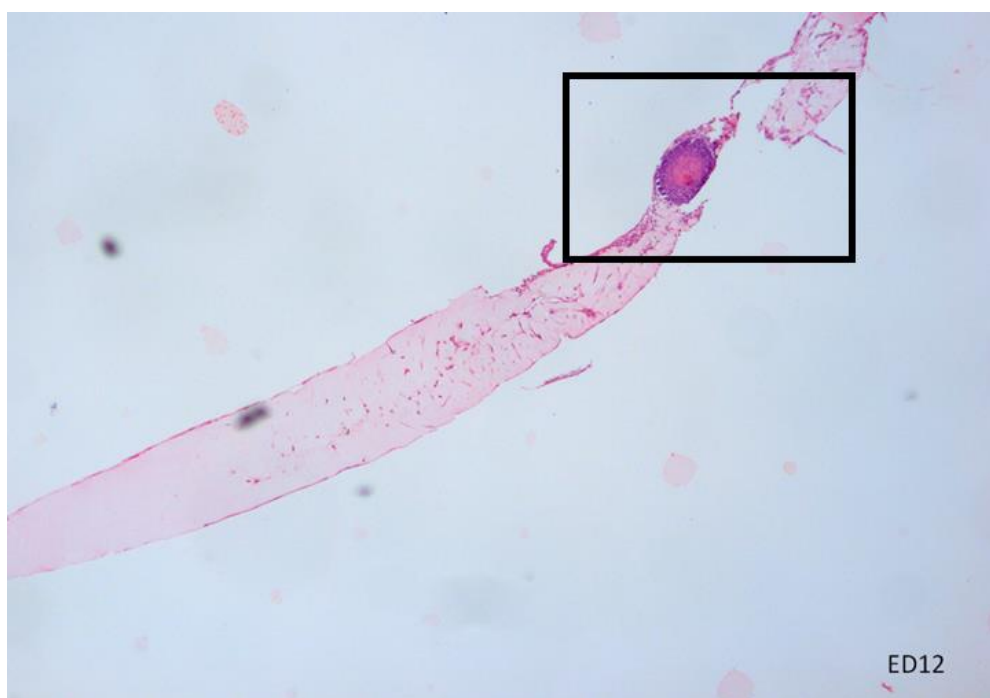


Obrázek č. 30: PCNA, 100x zvětšeno

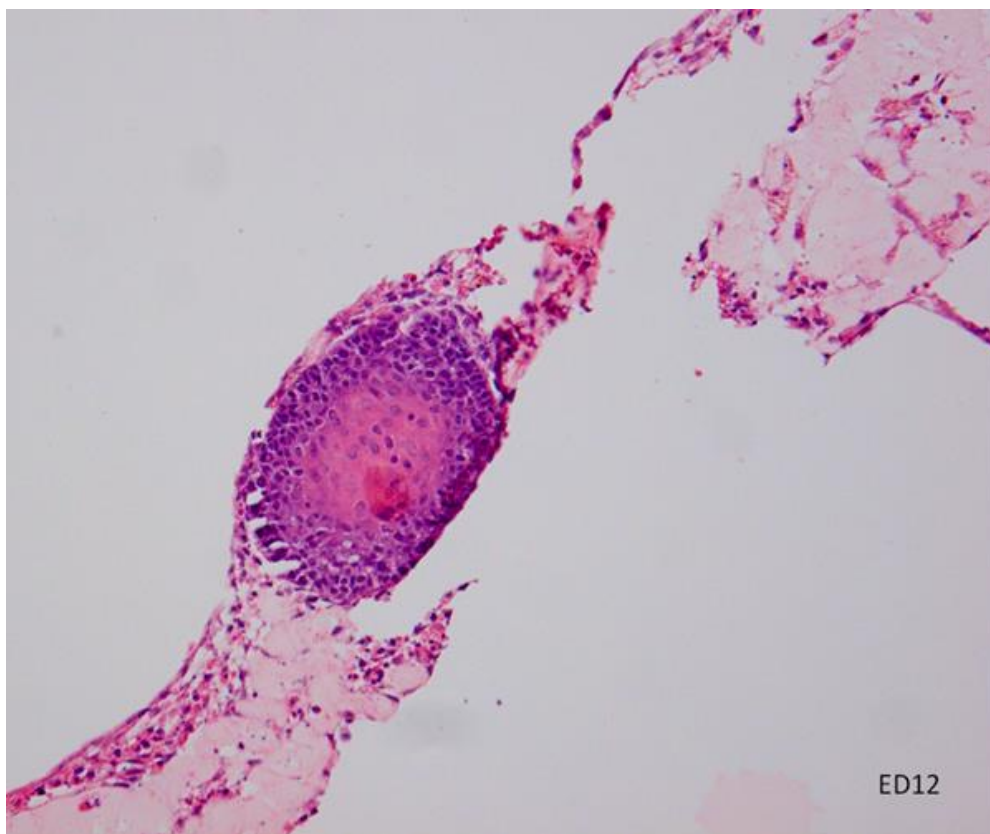


Obrázek č. 31: TUNEL, 100x zvětšeno

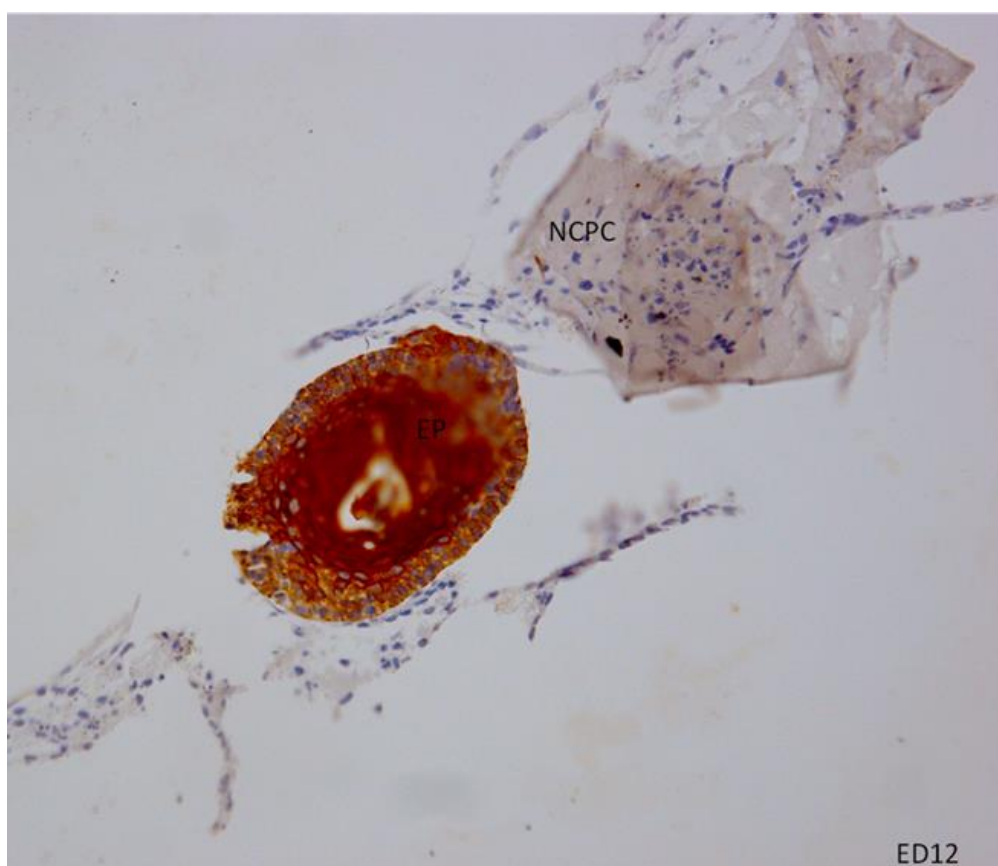
4.5.3 Detekce odontogeneze *in vitro*-rekombinace EP+NCPC



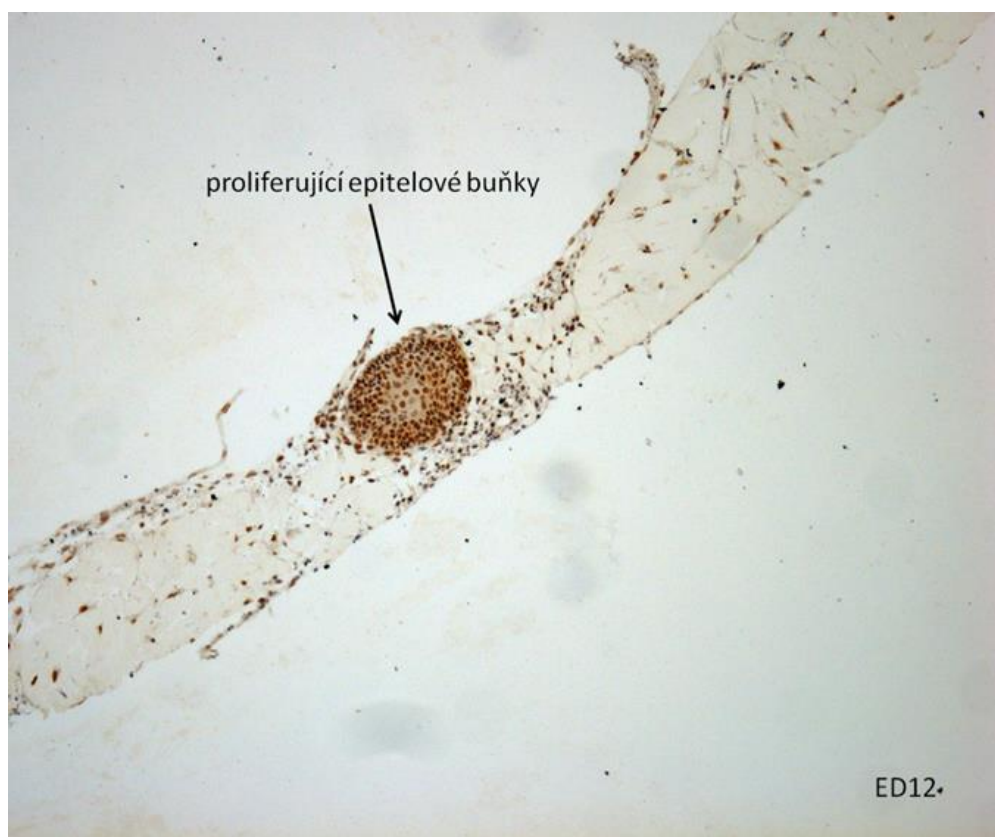
Obrázek č. 32: Hematoxylinem obarvený histologický řez EP s NCPC, 50x zvětšeno



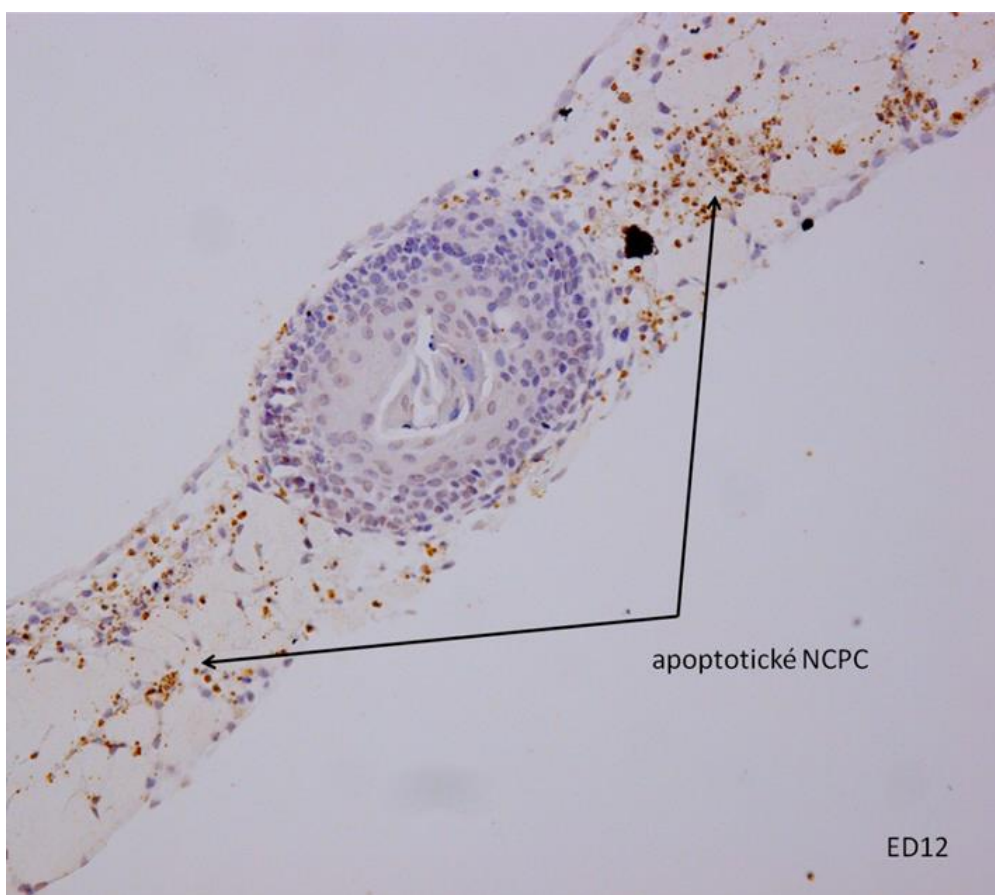
Obrázek č. 33: Hematoxylinem obarvený histologický řez EP s NCPC, 200x zvětšeno



Obrázek č. 34: IHC–cytokeratin, 200x zvětšeno



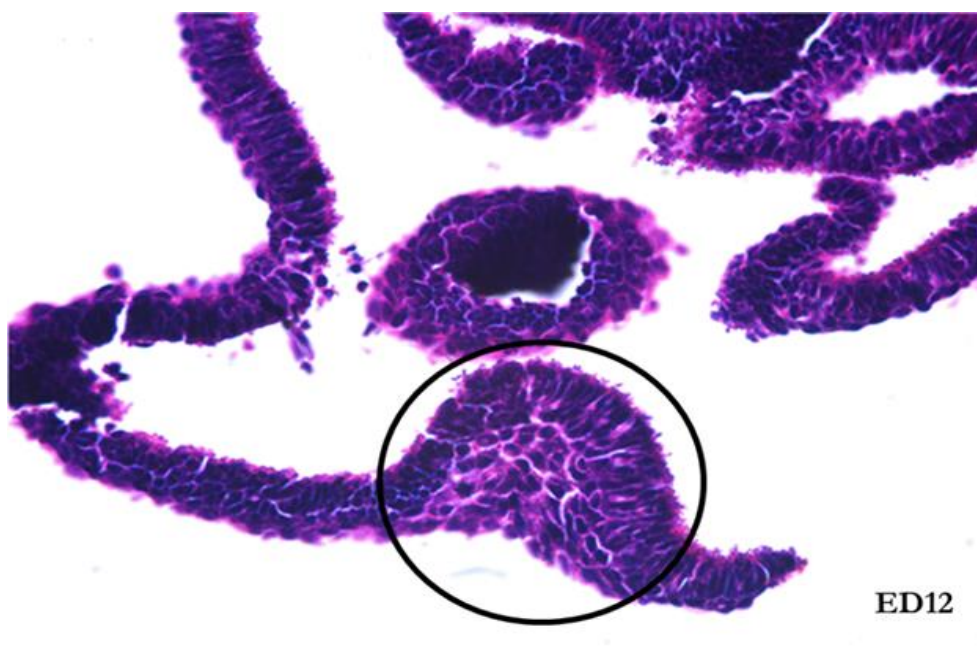
Obrázek č. 35: PCNA, 100x zvětšeno



Obrázek č. 36: TUNEL, 200x zvětšeno

4.5.4 Srovnání vývoje rekombinovaného objektu *in vitro* (EP+NCPC) a vývoje prvního myšního moláru *in vivo* v ED12 a v ED17,5

In vivo řezy (Obrázek č. 40 a 41) jsou vhodné k porovnání, jelikož časově odpovídají 8 dnům kultivace rekombinovaných objektů na polotuhém médiu, jelikož v kultuře vždy dojde ke zpomalení růstu. Je patrné, že struktury, které vznikly (Obrázek č. 39) ani vzdáleně nepřipomínají zub a jediná proliferující část preparátu je epitel.



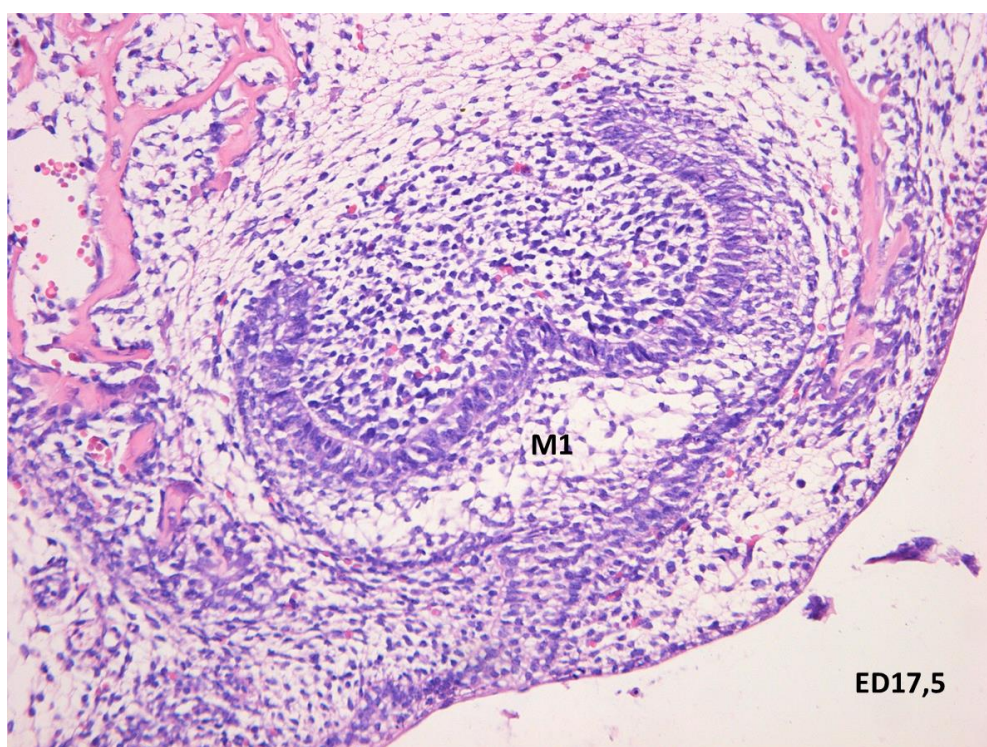
Obrázek č. 37: Epitel ED12 – histologický řez; barveno hematoxylin-eosinem; zvětšeno 400x



Obrázek č. 38: Histologický řez rekombinace polotuhým médiem EP s NCPC



Obrázek č. 39: Hematoxylinem barvený histologický řez tkáně v ED12, 200x zvětšeno



Obrázek č. 40: Hematoxylinem barvený histologický řez, 200x zvětšeno

5 Diskuse

Cíle, které jsem si na počátku své práce stanovila, byly sledování indukce odontogeneze *in vivo* a *in vitro*.

Diferenciaci buněk do odontogenních linií - *in vivo* a vývoj okolní alveolární kosti jsem pozorovala na myších molárech (ED17,5; P2), na nichž byla provedena imunohistochemická detekce amelogeninu, signalizující přítomnost skloviny, a na osteokalcinu, vyskytující se v místech vznikajícího zubního alveolu.

Při detekci odontogeneze pozorujeme, že v embryonálním stádiu (ED17,5) je oblast značená amelogeninem a osteokalcinem nepatrná, u staršího preparátu (P2) je tato oblast rozsáhlejší a lépe viditelná.

Výsledky korespondují s popisovaným vývojem zubu v literatuře, proto mohou sloužit k demonstraci diferenciace buněk při tomto procesu.

Indukci odontogenních linií *in vitro* jsem sledovala na buňkách neurální lišty (NCPC), připravených indukcí lidských embryonálních buněk (hESC), které byly indukovány oblastmi molárů orálního epitelu v ED12.

V literatuře se uvádí, že orální epitel disponuje indukčním potenciálem od ED10 do ED12, v té době ho přebírá ektomezenchym nacházející se pod ním. Je ovšem diskutabilní, zda v této době disponuje orální epitel v ED12 stále daným potenciálem či nikoliv. V tomto se vědecká pracoviště zatím jednohlasně neshodla. V současné době je tato otázka objektem výzkumu.

Jelikož je epitel v ED12 vstřícnější k manipulaci, k rekombinaci s NCPC bylo upřednostněno právě toto stádium (fáze pupene).

Jako kontrolní buněčná linie, pro správně zvolený způsob rekombinace, sloužily mezenchymální embryonální fibroblasty (MEF), izolované z myších horních končetin, u nichž se nepředpokládá potenciál odpovídat na odontogenní signály orálního epitelu.

Rekombinované buněčné linie byly podrobeny IHC na detekci cytokeratinu, PCNA a TUNEL. IHC cytokeratinu detekuje místa, kde se v histologickém řezu nachází epitel. Díky rozlišení epiteliální tkáně a NCPC můžeme následně pomocí PCNA, které detekuje místa proliferace buněk, vidět zda proliferuje epitel či NCPC. TUNEL označuje buňky podstupující apoptózu. Díky těmto metodám jsem zjistila, že proliferací prochází převážně buňky orálního epitelu, okrajově i nepatrná část NCPC, a že buňky NCPC ve velké míře umírají.

Správnost techniky rekombinace a kultivačních podmínek potvrzují kontrolní rekombinace orálního epitelu s MEF. Epitel i MEF v těchto řezech proliferují (zejména opět epitel) a žádná část tkáně nadměrně neumírá. V těchto vzorcích dochází po několika dnech kultivace ke vzniku chrupavky.

Kontrolní rekombinace také dokazují správnou techniku při odebírání epitelu, pokud bychom odebírali zároveň s epitelem i část mezenchymu, vyvinul by se zub. Barvení hematoxylin-eosinem odebraného epitelu v ED12 neprokázalo na morfologické úrovni kontaminaci mezenchymem, což potvrzuje správné provedení zvolené techniky.

V dosavadních experimentech se nepodařilo indukovat odontogenezi v buňkách neurální lišty. Otázkou zůstává, zda buňky neodpovídají na signály epitelu, nebo v rekombinacích umírají ještě předtím, než jsou schopny jakoukoli odpověď vytvořit. Vysvětlením vysokého počtu mrtvých buněk by mohla být neschopnost NCPC přežít v tak vysokých koncentracích, které vyžaduje rekombinační technika.

Možnosti, proč tato buněčná linie není schopná odpovídat na signály epitelu by mohla být také ztráta její charakteristiky díky kultivaci a mnoha provedeným pasážím (46). Pravděpodobnější teorií je však možnost, že lidské buňky mají omezenou schopnost reagovat na signály z myší tkáně. Tato možnost bude předmětem dalšího výzkumu.

Podobné výsledky pozorovali Keller et al., 2011, kteří se naopak snažili využít indukčního potenciálu mezenchymu z pozdějších stadií embryonálního vývoje.

Jejich vědecký tým pracoval s liniemi buněk 17IA4 a 705IC5, jež byly rekombinovány s orálním epitelem v ED14. Výsledky byly porovnávány s přirozeným vývojem v ED14. Rekombinované tkáně nebyly schopné vzájemné indukce. V kultuře byly pozorovány odlišné histologické aspekty, než jaké by měla mít zubní tkáň.

Závěr

V práci byla sledována odontogeneze *in vivo* a *in vitro*. Ukázalo se, že odontogeneze *in vivo* učebnicově odpovídá detekovaným oblastem amelogeninu a osteokalcinu u molárů v daných stádiích. Vývoj zubu *in vitro* byl pozorován na rekombinovaných objektech orálního epitelu ED12 z oblasti molárů a buněčné linie NCPC. Prozatím se nepodařilo potvrdit indukovatelnost těchto buněk do odontogenních linií. Je možné, že tato vada je způsobena kultivací a mnohočetnými pasážemi, při kterých si buňky neudržely své vlastnosti a funkce. Pravděpodobné ale je, že lidské buňky mají omezenou schopnost reagovat na signály z myší tkáně. Detekce vysokého počtu mrtvých buněk by mohla mít za následek neschopnost NCPC přežít v tak vysokých koncentracích, které vyžaduje rekombinační technika. Tato část bude ještě předmětem zkoumání.

6 Seznam citací

- [1] **KARÁSKOVÁ**, Eliška, *Molekulární mechanismy regulující časná stádia vývoje zubu a možnosti realizace těchto procesů in vitro*, Brno 2009

7 Seznam obrázků

- [1] Obrázek č. 4: Schéma vývoje zubu: **VOLPONI**, Ana Angelova, **PANG**, Yvonne and **SHARPE**, Paul T., *Stem cell-based biological tooth repair and regeneration* [online].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000521/figure/fig0015/>

8 Seznam použité literatury

- [1] **BEI**, Marianna, *Molecular Genetics of Tooth Development*, Curr Opin Genet Dev., 2009 October, 19(5), 504-510
- [2] **COBOURNE**, Martyn T., **MITSIADIS**, *Nerural Crest Cell and Patterning of the Mammalian Dentition*, London, Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol.) 306B: 251-260, 2006
- [3] **HAMPL**, Aleš, *Differentiation of human embryonic stem cells into odontogenic lineages*, Czech Science Foundation-Part C
- [4] **KARÁSKOVÁ**, Eliška, *Molekulární mechanismy regulující časná stádia vývoje zubu a možnosti realizace těchto procesů in vitro*, Brno 2009
- [5] **KELLER**, Laetitia, **KUCHLER-BOPP**, Sabine, **MENDOZA**, Soledad Acuna, **POLIARD**, Anne and **LESOT**, Herve, *Tooth engineering: searching for dental mesenchymal cells sources*, Original research article, 04 March 2011, France
- [6] **KOČOVÁ**, Jitka, *Vývoj zubu*, Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni
- [7] **KOUSSOULAKOU**, Despina S., **MARGARITIS**, Lukas H., **KOUSSOULAKOS**, Stauros L., *A curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration*, International Journal of Biological Science, 2009, 5(3):226-243
- [8] **LékařiOnline.CZ**, *Kompozitní inleje, onleje, overleje*[online], Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/stomatologie/zakroky/kompozitni-inleje>
- [9] **MALINSKÝ**, J., *Histologie a embryologie orofaciální oblasti*, Olomouc 1995, Vydavatelství Univerzity Palackého

- [10] **MATALOVA, E., TUCKER A.S. and SHARPE P.T.**, *Death in the Life of a Tooth*, Journal of Dental Research, Published by SAGE[online], Dostupné z: <http://jdr.sagepub.com/content/83/1/11>
- [11] **MILETICH, Isabelle and SHARPE, Paul T.**, *Normal and abnormal dental development*, Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, Review Issue 1 Oxford University Press 2003
- [12] **NAKAO, Kazuhisa, MORITA, Ritsuko, SAJI, Yasumitsu, ISHIDA, Kentaro, TOMITA, Yusuke, OGAWA, Miho, SAITOH, Masahiro, TOMOOKA, Yasuhiro and TSUJI, Takashi**, *The development of a bioengineered organ germ method*, Japan, Nature Methods, Vol.4 No.3, March 2007, 277, Nature Publishing Group
- [13] **SONIE, A.C. Modino, SHARPE, Paul T.**, *Tissue engineering of teeth using adult stem cells*, Archives of Oral Biology, 2005, 50:255-258, London
- [14] **ŠIMŮNEK, Antonín**, *Zubní implantáty: Co jsou zubní implantáty*[online], Dostupné z: <http://www.implantaty.info/index.php?page=implantaty>
- [15] **ŠVANDOVÁ, Eva and MATALOVÁ, Eva**, *Limitations of stem cells in current dentistry*, Brno, Laboratoř živočišné embryologie, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR
- [16] **THESLEFF, Irma**, *Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis*, Journal of Cell Science 116, 1647-1648 2003 The company of Biologists Ltd, University of Helsinki
- [17] **TUMMERS, Mark and THESLEFF, Irma**, *The Importance of Signal Pathway Modulation in all Aspects of Tooth Development*, Developmental Biology Program, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol) 312B, 309-319, 2009
- [18] **VITALION**, *Zubní kaz*[online]. Dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/zubni-kaz/>
- [19] **VOLPONI, A.A., PANG Y and SHARPE, P.T.**, *Stem cell-based biological tooth repair and regeneration*, Trends Cell Biol., 2010 December, 20-206 (12-6): 715-722

[20] **YAN**, Zhengbin, **LIN**, Yunfeng, **JIAO**, Xiaohui, **LI**, Zhiyong, **WU**, Ling, **JING**, Wei, **QIAO**, Ju, **LIU**, Lei, **TANG**, Wei, **ZHENG**, Xiaohui and **TIAN**, Weidong, *Characterization of Ectomesenchymal Cells Isolated from the First Branchial Arch during Multilineage Differentiation*, Čína, Cells Tissues Organs, 2006, 183, 123-132