

Zavod za oralnu kirurgiju  
Stomatološkog fakulteta, Zagreb

Zavod za animalnu fiziologiju  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb

## **Osjetljivost zubnih zametaka na stanice slezene štakora imuniziranih zubnim tkivom**

D. ZAKLAN-KAVIĆ i I. BAŠIĆ

Dosadašnja istraživanja imunogeničnosti zuba pokazuju da alogeničan zubni transplantat pobuđuje razvoj imunološke reakcije u primaocu (Klein i Secosky<sup>1</sup>, Reviere i Hildemann<sup>2</sup>, Zaklan-Kavić i sur.<sup>3</sup>). Čini se da presudnu ulogu u procesu odbacivanja transplantata zuba imaju stanice, jer su transplantati infiltrirani limfocitima, plazma stanicama i makrofazima (Ivany i Klein<sup>4</sup>). U životinja imuniziranih zubnim tkivima pojavljuju se limfoblasti u limfnim čvorovima (Haley i Costich<sup>5</sup>), a transplantat alogenične kože ove odbacuje sekundarnom reakcijom (Bartlett i Reade<sup>7</sup>, Zaklan-Kavić i sur.<sup>8</sup>). Ovo pokazuje da odbacivanju zubnih transplantata posreduje reakcija staničnog tipa. Kardos i Heslop<sup>9</sup>, Mincer i Jennings<sup>10</sup>, međutim, izvješćuju o stvaranju humoralnih protutijela, nakon transplantacije alogeničnog transplantata zuba. U ovom smo radu ispitivali citotoksički učinak limfatičkih stanica štakora imuniziranih zubnim tkivima na zubne zametke *in vitro*, da bismo po bliže utvrdili ulogu stanične imunosti u procesu odbacivanja zubnih transplantata.

### **MATERIJAL I METODE**

**Životinje.** Upotrijebili smo štakore visokosrodnih sojeva Y59 i VM, koji se međusobno razlikuju u jakom sustavu tkivne snošljivosti AgB (Stark i Hauptfeld<sup>11</sup>). Davaoci zubnih zametaka su bili štakori u dobi od 10 dana, a primaoci štakori stari oko 3 mjeseca. Transplantirali smo zametke kutnjaka uzetih iz gornje i donje čeljusti.

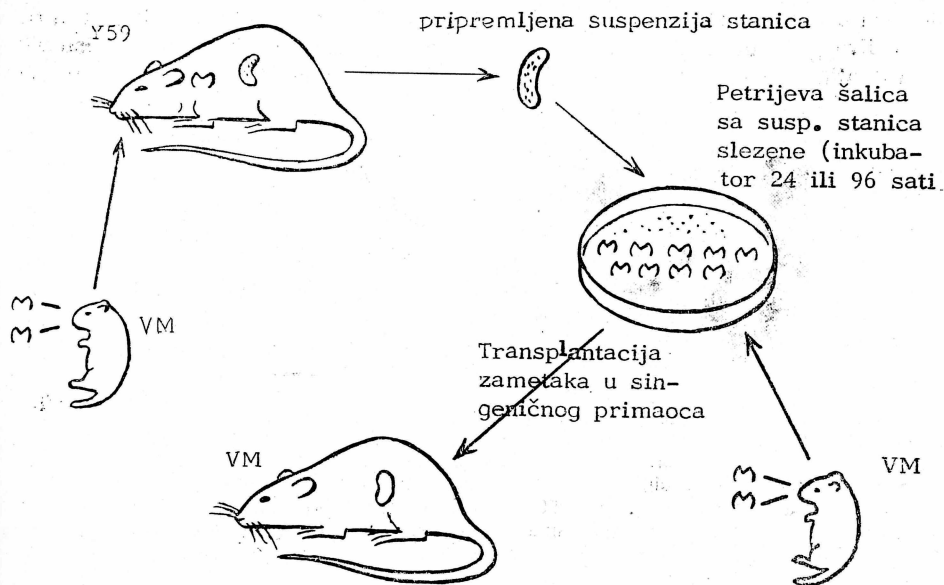
**Imunizacija.** Štakore soja YU59 smo imunizirali zubnim zamecima štakora soja VM na slijedeći način: četiri zubna zametka presadili smo pod bubrežnu kapsulu, a šestog i četrnaestog dana nakon prvog presađivanja, istim smo životinjama presadili po četiri zametka u potkožje pazuha, da bismo deset dana nakon posljednje imunizacije, životinje usmrtili i od njihovih slezena pripravili suspenziju stanica.

Drugu smo skupinu štakora imunizirali alogeničnom kožom i stanicama slezene. Štakorima soja Y59 smo presadili kožu soja VM, a sedmog dana nakon što je koža odbačena, istim smo životinjama u trbušnu šupljinu uštrcali 2 puta po  $5 \times 10^7$  stanica slezene soja VM, u razmaku od 7 dana. Životinje smo usmrtili desetog dana nakon posljednje imunizacije, i od njihovih slezena pripravili suspenziju stanica.

Priprema suspenzije stanica slezene. Slezene smo isjekali, protisnuli kroz najlonsku mrežicu i raspršili u mediju 199 (Imunološki institut, Zagreb). Dobivene suspenzije smo isprali u mediju trokratnim centrifugiranjem po 10 minuta. Broj stanica u suspenziji odredili smo u hemacitometru. Testom isključenja tripanskog modrila odredili smo varijabilnost stanica, koja je bila 90%.

## PLAN POKUSA

U Petrijeve posudice promjera 100 mm, koje su sadržavale 20 ml medija 199 s dodatkom standardne antibiotske mješavine i 10% svježeg singeničnog serumu, stavili smo 18 svježe izvađenih zubnih zametaka štakora soja VM (sl. 1).



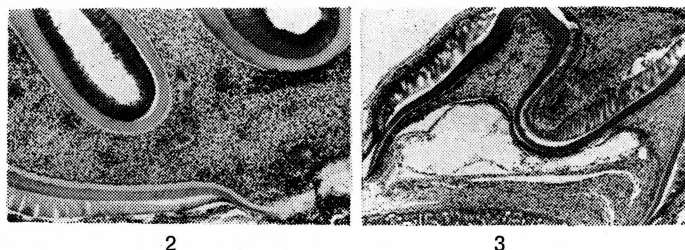
Sl. 1. Shematski prikaz plana pokusa.

Nakon toga, Petrijeve posudice podijelili u tri skupine. Prvoj smo skupini dodali  $12\% 10^8/ml$  stanica slezene štakora imuniziranih zubnim zametcima, drugoj skupini stanice slezena štakora imuniziranih kožom i stanicama slezene, a u trećoj skupini smo imali Petrijeve posudice bez dodatka limfatičnih stanica, ili s dodatkom singeničnih, odnosno alogeničnih stanica slezene neimuniziranih životi-

nja. Petrijeve posudice smo zatim inkubirali 24 ili 96 sati, na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi s 10% protočnog CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije, zametke smo isprali medijem 199 i presađili ih pod bubrežnu kapsulu singeničnih primalaca. Primaocze zametaka smo usmrtili 7, 14, 21, 28. ili 35. dana nakon presađivanja i odstranili im transplantate, koje smo standardnom metodom (Zaklan-Kavić i sur.<sup>12</sup>) pripravili za histološku analizu. Histološki smo analizirali morfološki izgled pulpnog tkiva, stanje odontoblasta, stupanj i svojstva novonastalog dentina i razvika korijena pa ih uspoređivali s istim parametrima u transplantata zubnih zametaka presađenih u singenične primaocze neposredno nakon vađenja (Zaklan-Kavić i sur.<sup>12</sup>). Dobiveni podaci su rezultat analize četiriju uzoraka po svakom vremenskom intervalu.

## REZULTATI

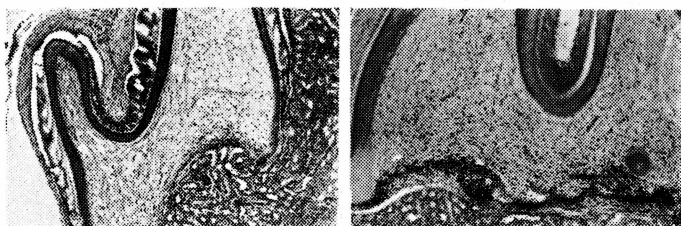
Transplantati inkubirani 24 sata stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima, a odstranjeni 7. dana nakon presađivanja, pokazivali su različite stupnjeve degeneracije. Stanice zubne pulpe su većim dijelom bile razorene, a preostalo tkivo pulpne komorice je bilo prožeto nakupinama mononuklearnih stanica. Vidio se samo poneki odontoblast, koji je, iako degeneriran, stvorio nešto nepravilnog dentina u korijenskom dijelu zuba (sl. 2). Pulpe zubnih zametaka, koji su bili prije presađivanja inkubirani 96 sati, mahom su nekrotizirale. Odontoblasti se nisu vidjeli, a dentin se nije odlagao (sl. 3). Transplantati izvađeni 14. dana nakon presađi-



Sl. 2. Dio transplantata zubnog zametka 7. dana nakon presađivanja u singeničnog primaoca (x 100). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 24 sata stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima. — Sl. 3. Transplantat zubnog zametka 7. dana nakon presađivanja (x 50). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 96 sati stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima.

vanja pokazivali su jednaku histološku sliku u skupini inkubiranih zametaka od 24 i 96 sati. Tkivo pulpne komorice je bilo atrofično, a od stanica se vidio samo poneki limfocit. Dentin se nije odlagao, kako u koronarnom, tako ni u korijenskom dijelu zuba (sl. 4). Zameci odstranjeni 21, 28. i 35. dana nakon presađivanja, imali su slična histološka obilježja, pulpa im je bila atrofična (sl. 5 i 6), odontoblasti nisu regenerirali, postoperativnog dentina nije bilo, a preoperativni je na nekim mjestima pokazivao lakunarnu resorpciju (sl. 6).

Histološki nalazi transplantata inkubiranih prije presađivanja stanicama slezene štakora imuniziranih kožom i stanicama slezene, pokazivali su sličnosti s nalazima transplantata inkubiranih stanicama slezene životinja imuniziranih zubnim

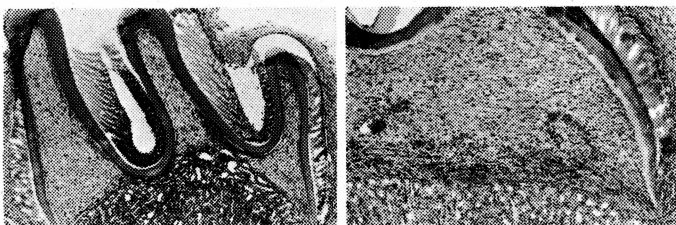


4

5

Sl. 4. Transplantat zubnog zametka 14. dana nakon presađivanja (x 50). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 24 sata stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima. — Sl. 5. Transplantat zubnog zametka 21. dana nakon presađivanja (x 100). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 96 sati stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima.

zamecima. Sedmog dana nakon presađivanja, pulpe svih transplantiranih zubnih zametaka su bile razorene, bez obzira na vrijeme inkubacije. Pulpne komorice su bile ispunjene jedino rijetkim vezivnim tkivom i po kojoj mononuklearnom stanicom (sl. 7). Transplantati, odstranjeni 14, 21, 28. i 35. dana nakon presađivanja, pokazivali su sličnu histološku sliku, s tom razlikom da je bubrežno tkivo infiltriralo u pulpnu komoricu (sl. 8).



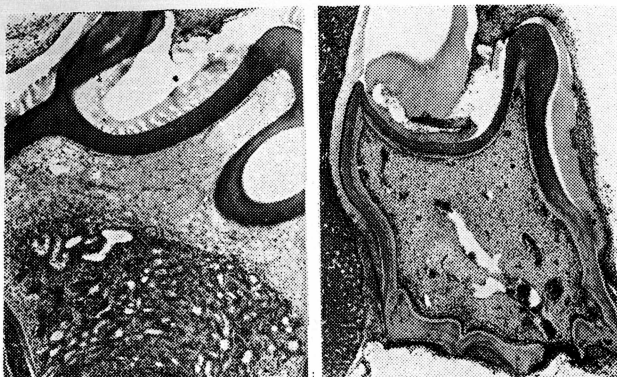
6

7

Sl. 6. Transplantat zubnog zametka 28. dana nakon presađivanja (x 50). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 24 sata stanicama slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima. — Sl. 7. Dio transplantata zubnog zametka 7. dana nakon presađivanja (x 100). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 24 sata stanicama slezene štakora imuniziranih kožom i stanicama slezene.

Transplantati inkubirani stanicama slezene neimuniziranih alogeničnih ili singeničnih štakora, ili bez stanica, prihvaćali su se i dalje diferencirali nakon presađivanja u singenične primaocce, bez obzira na vrijeme inkubacije. Sedmog dana nakon presađivanja, u pulpi transplantata se vidjela nespecifična upala, s edematoznim i piknotičnim fibroblastima (sl. 9). Odontoblasti nisu bili svuda u pravilnom nizu na periferiji pulpe i pokazivali su izvjesne degenerativne promjene. Stanice pulpe su bile prorijeđene u gornjim i središnjim predjelima pulpne komorice, a prema korijenskom dijelu su bile gušće. Dentin se odlagao u korijenskom dijelu zametaka, mahom je bio nepravilna oblika, s uključenim odontoblastima (sl. 9). Četr-

naestog dana nakon transplantacije, pulpno tkivo, premda još lagano hiperemično, postajalo je bogato stanicama. Odontoblasti su bili pravilno poredani, a oblik im je ponovno bio štapićast. Novi dentin se obilno odlagao, kako u koronarnom tako i u

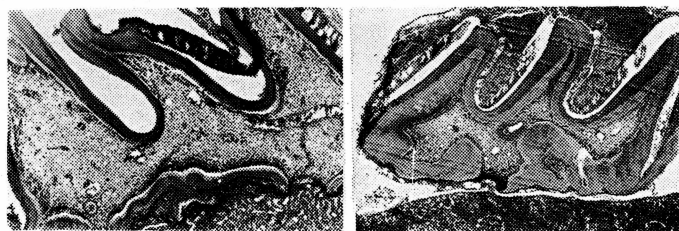


8

9

Sl. 8. Transplantat zubnog zametka 28. dana nakon presađivanja (x 80). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 96 sati stanicama slezene štakora imuniziranih kožom i stanicama slezene. — Sl. 9. Transplantat zubnog zametka 7. dana nakon presađivanja (x 60). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 24 sata singeničnim stanicama slezene.

korijenskom dijelu zuba (sl. 10). Rast i diferencijacija svih presađenih zametaka su se dalje nastavljali, što se osobito dobro vidjelo u zametaka uzetih u obradu 28. i 35. dana nakon presađivanja (sl. 11).



10

11

Sl. 10. Transplantat zubnog zametka 14. dana nakon presađivanja (x 50). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 96 sati neimunim alogeničnim stanicama slezene. — Sl. 11. Transplantat zubnog zametka 35. dana nakon presađivanja (x 50). Zametak smo prije presađivanja inkubirali 96 sati u mediju 199.

## RASPRAVA

Prikazani rezultati pokazuju da su stanice slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima, kao i stanice slezene životinja imuniziranih kožom i stanicama slezene, citotoksične za zubne zametke in vitro.

Ranije smo pokazali da se svježe izvađeni zubni zameci prihvaćaju i rastu u singeničnim primaocima (Zaklan-Kavić i sur.<sup>12</sup>), dok u alogeničnim primaocima pobuđuju razvoj imunološke reakcije, zbog čega se odbacuju (Reviere i Hildeman<sup>3</sup>). Reakcija odbacivanja je snažna, a posljedica je razvoja stanične imunosti na zubna tkiva (Zaklan-Kavić i sur.<sup>3</sup>, Reviere i sur.<sup>13</sup>). Da su zaista imune stanice nosioci reakcije primaoca protiv zubnih tkiva pokazuju ova istraživanja, jer su meka tkiva zubnih zametaka razorena in vitro jedino u prisutnosti stanica slezene imuniziranih životinja. Zubni se zameci, nakon inkubacije imunim stanicama te presađivanja u singenične primaoce, nisu prihvaćali niti razvijali u zrele zube. Histološka analiza odstranjenih transplantata pokazuje da su pulpe svih zametaka nekrotizirale, a regeneracija stanica nije nastupila ni do 35. dana nakon presađivanja. Ukoliko bi poneka stanica preživjela u kulturi s imunim stanicama in vitro, postojala bi mogućnost da se nakon presađivanja inkubiranih zametaka u singenične primaoce oporavi, a morfološka diferencijacija bar djelomično nastavi. Stoga ovi podaci pokazuju da je razaranje pulpe zubnih zametaka posljedica citotoksičkog učinka stanica slezene životinja imuniziranih zubnim tkivom, tijekom izravnog doticaja u kulturi.

Stanice slezene životinja imuniziranih zubnim tkivom podjednako su citotoksične za zubne zametke in vitro, kao i stanice slezene štakora imuniziranih kožnim transplantatom i limfatičkim stanicama. To pokazuje da bi imunogeničnost tkiva zubnih zametaka mogla biti slična imunogeničnosti transplantata kože ili limfatičkih stanica.

S druge pak strane, rezultati pokusa, u kojima smo zubne zametke preoperativno inkubirali alogeničnim stanicama slezene neimuniziranih životinja i singeničnim stanicama slezene bez limfocita in vitro pokazuju da se svi zameci nakon presađivanja u singenične primaoce prihvaćaju i dalje razvijaju, bez obzira na trajanje inkubacije. Transplantati su u prvih sedam dana nakon presađivanja pokazivali znakove nespecifične upale, ali je već 14. dana nakon presađivanja pulpno tkivo regeneriralo, a razvitak zametaka se nastavio odlaganjem postoperativnog dentina i osteodentina. Morfološka diferencijacija zametaka nakon transplantacije ovisila je o dužini inkubacije in vitro; zameci inkubirani 96 sati imali su više nepravilnog dentina u koronarnom dijelu zuba nego zameci inkubirani 24 sata.

Zaključno možemo reći, da stanice slezene štakora imuniziranih zubnim tkivom imaju citotoksički učinak na pulpno tkivo zametaka in vitro, a to pokazuje da transplantati zubnih zametaka pobuđuju razvoj stanične imunološke reakcije u primaoce.

#### Sažetak

Pratili smo citotoksični učinak limfatičkih stanica slezene štakora imuniziranih zubnim tkivima na zubne zametke in vitro. Štakore soja Y59 smo imunizirali zubnim zamecima ili kožom i stanicama slezene štakora soja VM. Zubne zametke 10 dana starih štakora soja VM smo inkubirali in vitro stanicama slezene imuniziranih ili neimuniziranih životinja 24 ili 96 sati, a zatim ih presadili u odrasle singenične primaoce. Presađene smo zametke odstranjivali od 7. do 35. dana nakon presađivanja i histološki analizirali. Stanice slezene štakora imuniziranih zubnim zamecima ili kožom i stanicama slezene imale su podjednak učinak na zubne zametke — tijekom inkubacije one su uništile pulpne stanice odgovorne za rast zuba pa se zubni zameci presađeni u singenične primaoce nisu prihvaćali niti dalje

razvijali. Nasuprot tomu, zubni zameci inkubirani alogeničnim ili singeničnim stanicama slezene neimuniziranih životinja, kao i bez limfatičkih stanica, nakon presađivanja normalno su rasle i razvijale se u singeničnom primaocu. Rezultati pokazuju da transplantati zubnih zametaka izazivaju razvoj stanične imunološke reakcije u primaocu.

## Summary

### IN VITRO SENSITIVITY OF TOOTH GERMS TO IMMUNE SPLEEN CELLS IN RATS

In vitro cytotoxicity of immune spleen cells to tooth germs is described in this study. Three-month-old inbred Y59 rats were immunized either with tooth germs or with skin graft and spleen cells originated from VM rats. Tooth germs from 10-days-old VM rats were incubated at 37°C in 10% CO<sub>2</sub> atmosphere with spleen cells from immunized or nonimmunized animals. Following 24 or 96 hours' incubation the tooth germs were transplanted under the kidney capsula of the syngeneic recipients. The recipients were killed from 7 to 35 days after transplantation, grafts removed and histologically analysed. The results showed that the soft tissue of the grafted tooth germs incubated with immunized spleen cells undergo necrosis. All grafts become acellular within 14 days after transplantation in syngeneic recipients and they did not recover until 35 days after transplantation. On the other hand, the tooth germs incubated with allogeneic or syngeneic spleen cells as well as those incubated with no presence of the lymphoid cells maintained their ability to recover, develop and differentiate in syngeneic recipient. This indicates that tooth germs induce cellular immune response in allogeneic host and that the spleen cells of these animals are capable of destroying soft tissue of the tooth germs when incubated in vitro.

## Zusammenfassung

### DIE EMPFINDLICHKEIT DER ZAHNKEIME AUF MILZZELLEN VON RATTEN DIE MIT ZAHNGEWEBE IMMUNISIERT WURDEN

Die zytotoxische Auswirkung von lymphatischen Zellen der Rattenmilz, welche mit Zahngewebe auf Zahnkeime immunisiert waren, wurde in vitro beobachtet. Ratten vom Stamm Y59 wurden mit Zahnkeimen immunisiert oder mit Haut und Milzzellen vom Rattenstamm VM. Zahnkeime von 10 Tage alten Ratten vom Stamm VM wurden in vitro durch 24 oder 96 Stunden mit Milzzellen immunisierter oder nicht immunisierter Tiere inkubiert und nachher in erwachsene syngeneische Empfänger überpflanzt. Die überpflanzten Keime wurden in 7 bis 35 Tagen nach der Überpflanzung entfernt und histologisch untersucht. Die Zellen von Rattenmilz, welche mit Zahnkeimen oder mit Haut und Milzzellen immunisiert waren, hatten die gleiche Auswirkung auf Zahnkeime. Im Verlaufe der Inkubation wurden die Pulpazellen, verantwortlich für das Zahnwachstum, vernichtet, so dass die in syngeneische Empfänger überpflanzten Zahnkeime weder angenommen noch sich weiter entwickelt haben.

Dagegen haben sich Zahnkeime, inkubiert mit alogenen oder syngenen Milzzellen von nicht immunisierten Tieren, auch ohne die Anwesenheit von lymphatischen Zellen, nach der Überpflanzung im syngenen Empfänger normal weiter entwickelt.

Die Resultate zeigen dass Transplantate von Zahnkeimen die Entwicklung von Zellimmunologischen Prozessen im Empfänger hervorrufen.

## LITERATURA

1. KLEIN, J., SECOSKY, W. R.: Oral. Surg., 32:513, 1971
2. REVIERE, G. R., HILDEMANN, W. H.: Transplantation, 16:655, 1973
3. ZAKLAN-KAVIĆ, D., BAŠIĆ, I., KAŠTELAN, A.: Lij. vjes., 96:535, 1974
4. IVANYI, D.: Transplantation, 4:639, 1966
5. KLEIN, J.: Transplantation, 12:503, 1971
6. HALEY, E. W., COSTICH, R. E., J. Dent. Res., 46:628, 1967
7. BARTLETT, P. F., READE, P. C.: Transplantation, 16:479, 1973
8. ZAKLAN-KAVIĆ, D., BAŠIĆ, I., KAŠTELAN, A.: Iug. Physiol. Pharmacol. Acta, 14:276, 1978
9. KARDOS, T. B., HESLOP, B. F.: Transplantation, 20:381, 1975
10. MINCER, H. H., JENNINGS, B. R.: J. Dent. Res., 49:381, 1970
11. STARK, O., HAUPTFELD, M.: Fol. Biol. (Praha), 15:35, 1969
12. ZAKLAN-KAVIĆ, D., BAŠIĆ, I., KAŠTELAN, A.: Lij. vjes., 96:531, 1974
13. REVIERE, G. R., SABET, T. Y., HOFFMAN, R. L., Transplantation, 12:271, 1971
14. TURK, J. L.: Organ grafts, Alden Press, Oxford, 1975