

Zavod za animalnu fiziologiju  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb  
predstojnik Zavoda prof. dr A. Kaštelan

Zavod za oralnu kirurgiju  
Stomatološkog fakulteta, Zagreb  
predstojnik Zavoda prof. dr I. Miše

## Presadivanje zubnih zametaka štakora

### III Imunološka reaktivnost roditeljskog soja na kalem zubnog zametka hibrida $F_1$

D. ZAKLAN-KAVIĆ, A. KAŠTELAN i I. MIŠE

Mnoga istraživanja koja se bave presađivanjem zuba, opisuju da presađeni strani kalemi mogu preživjeti, usprkos različitim stupnjevima tkivne nepodudarnosti primaoca i davaoca (Cserpfallvi<sup>1</sup>). Međutim, podaci kojima se to potkrepljuje, mahom se temelje na istraživanjima u nevisokosrodnih sojeva životinja, uključujući i čovjeka. Upotrebom životinja kojih je genetička osnova istraživaču nepoznata, teško je procijeniti da li bi neuspjeh u presađivanju trebalo pripisati genetičkim razlikama između primaoca i davaoca, ili nekim drugim faktorima. Budući da je razvoj transplantacijske reakcije na kalem zubnog zametka složeni problem, smatrali smo da je za naša istraživanja neophodna upotreba visokosrodnih sojeva\* životinja s poznatom genetičkom osnovom. U svojim smo dosadašnjim pokusima pokazali da zubni zametak u singenim primaocima\*\* trajno preživi i dalje se razvija (Zaklan-Kavić i sur.<sup>2</sup>). Međutim, zubni zametak, presađen preko »jake« barijere histokompatibilnosti (AgB), soja štakora VM i Y59, pobudio je razvoj snažne imunološke reakcije (Zaklan-Kavić i sur.<sup>3</sup>). Pojavu smo objasnili time, što jaki sustav tkivne snošljivosti (AgB) u štakora nadzire one antigene histokompatibilnosti, koje uzrokuju najsnažniju imunološku reakciju u alogenih primalaca\*\*\*. Zbog toga smo u ovom našem radu odabrali model u kojem upotrebljavamo dva visokosrodna soja štakora VM i Y59, odnosno njihove križance prve filijalne generacije kao davaoce, a roditeljski soj VM kao primaoce. Time smo osigurali »povoljniju« sredinu za transplantirane kaleme. Naime, budući da su geni histokompatibilnosti kodominantni, križanac  $F_1$  homozigotnih roditelja naslijedi po

\* Visokosrodni soj životinja dobiva se uzastopnim srodivanjem, tj. parenjem brat-sestra. Pripadnici takvog soja genetički su gotovo identični.

\*\* Pripadnici visokosrodnog soja, koji su genetički potpuno identični (npr. jednojajčani blizanci).

\*\*\* Pripadnici različitih sojeva iste vrste.

jedan potpun niz gena od svakog roditelja. Zbog toga križanac  $F_1$  generacije podnosi kalem obaju roditelja, ali ako se kalem hibrida presadi na bilo koji od roditeljskih sojeva, on biva odbačen. To se zbiva zbog toga, što se reakcija odbacivanja razvija zbog prisutnosti antigena drugog roditeljskog soja.

U pokusima što ih opisuju Linder<sup>4</sup> (1961). te Guttman i sur.<sup>5</sup> (1969), presađujući bubreg i ovarij štakora, ustanovljeno je da roditeljski soj mnogo bolje tolerira kalem križanaca, nego alogeni kalem, dok je kalem kože u obje kombinacije, alogenoj i semialogenoj, odbacivan istovremeno. Stoga autori pretpostavljaju da kalemi bubrega i ovarija posjeduju slabiju antigeničnost u usporedbi s kožom.

Ako pretpostavimo da su zubi slabo antigenični, što ističe većina autora (Ivanyi i Vacek<sup>6</sup>, Ivanyi<sup>7</sup>, Sharav i sur.<sup>8</sup> Weinreb i sur.<sup>9</sup>), moglo bi se očekivati da će i kalemi zubnih zametaka u ovakvom eksperimentalnom modelu dulje preživjeti, nego oni iz čiste alogene kombinacije.

Ovim pokusima željeli smo dobiti bolji uvid u mehanizam imunološke reaktivnosti na kaleme zubnih zametaka, a posebno nas je zanimalo pronalaženje modela, koji bi mogao poslužiti za studiju kroničnog procesa odbacivanja zubnih kalema.

## MATERIJAL I METODE

### Pokusne životinje

Upotrebljavali smo štakore visokorodnih sojeva Y59 i VM, koji su bili uzgojeni u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Soj Y59 ima alel »c«, a soj VM alel »w« na lokusu histokompatibilnosti Agb (H-1) (Stark i Hauptfeld<sup>10</sup>). Sparivanjem ženki VM i mužjaka 559 dobili smo križance (VMxY59) $F_1$ , koje ćemo u daljnjim razlaganjima obilježavati (VY59) $F_1$ .

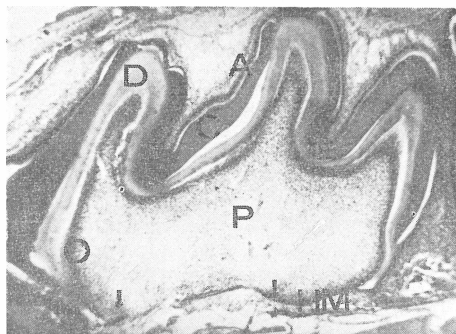
Tablica 1 prikazuje vrijeme preživljavanja kožnih kalema u tih životinja.

Davalac	Primalac	Broj štakora	Prosječno vrijeme odbacivanja (dani)	Razdoblje odbacivanja (dani)
VM	Y59	10	8	7—9
(VY59) $F_1$	Y59	10	8	7—9

Tab. 1. Vrijeme preživljavanja kožnih kalema izmijenjenih između štakora soja VM i Y59 i križanaca (VY59) $F_1$  i Y59.

Primaoci zubnih zametaka bile su ženke soja Y59, u dobi od 4 do 6 mjeseci, teške 180 do 220 grama. Zubne zametke smo uzimali od križanaca (VY59) $F_1$  u dobi od deset dana nakon okota.

Davaoće smo žrtvovali stavljajući ih u eter. Zametke smo vadili tako, da smo prerezali kožu i mišićje lica, uvukavši jedan krak škarica u usnu šupljinu. Nakon toga smo napravili rez po hrptu čeljusnog grebena i odljuštili mukoperiost. Zametke smo oprezno nadigli zubnim ekskavatorom, pazeći da ih ne oštetimo. Držali smo ih do presađivanja u H e n k s o v o j otopini, na sobnoj temperaturi, a ne dulje od 10 minuta. Svaki primalac je dobio po četiri zubna zametka. Prve kutnjake smo presađili pod bubrežnu kapsulu, a druge u potkožno tkivo aksile (sl. 1).



Sl. 1. Zubni zametak prvog kutnjaka deset dana nakon okota. D — dentin, C — caklina, A — ameloblasti, P — pulpa, O — odontoblasti, HM — Hertwigova membrana. Strelice označuju mjesto budućeg stvaranja korijena.

## Priprema histoloških preparata i način procjene ishoda transplantacije

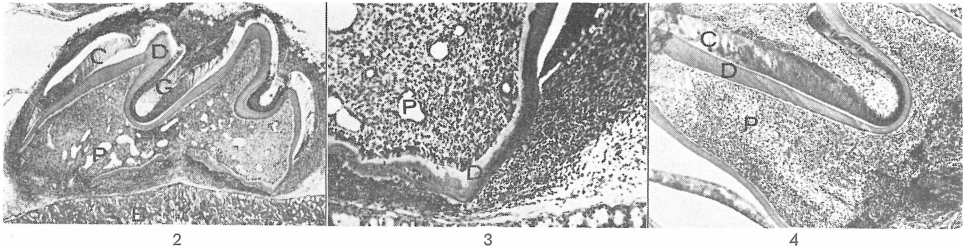
Komadiće potkožnog tkiva i izvadene bubrege s transplantiranim zubima odstranjivali smo u određenim razmacima i stavljali u formalin da se fiksiraju 24 do 36 sati. Nakon dekalcinacije i smrzavanja, preparate smo rezali u rezove debljine 4 mikrona, te bojadisali hemalaun-eozinom.

Nastanak i tijek transplantacijske reakcije pratili smo na histološkim preparatima, a stupanj razvoja imunološke reakcije ocjenjivali smo prema opsegu infiltracije kalema mononuklearnim stanicama te stupnju vitalnosti kalema. Pratili smo morfološki izgled pulpnog tkiva, stanje odontoblasta te novostvoreni predentin i dentin.

## REZULTATI

Kaleme smo uzimali 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 16. i 21. dana nakon presađivanja, a zatim svakih sedam dana do stotog dana. Od 100. do 200. dana, kaleme smo odstranjivali u razmacima od po 25 dana. Sedamdeset kalema, koji su bili presađeni pod bubrežnom kapsulom i sedamdeset tri kalema iz potkožnog tkiva aksile obradili smo histološki. Histološke analize pokazuju, da trećeg i četvrtog dana nakon presađivanja, nije bilo infiltracije okoline kalema, kao ni samog kalema, mononuklearnim stanicama, premda su kalemi pokazivali upalne pro-

mjene. Stanice pulpe promijenile su normalan oblik; tipične trokutaste i vretenaste stanice poprimile su okrugli i ovalni oblik. Odontoblasti su samo mjestimice pravilno u nizu poredani uz periferiju pulpe, dok na nekim mjestima nedostaju, a pokazuju degenerativne promjene s piknotičkim jezgrama.

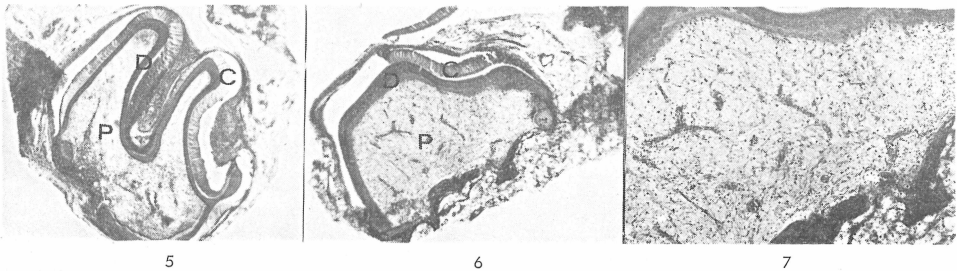


Sl. 2. Zametak prvog kutnjaka 7 dana nakon presađivanja u semialogenog primaoca (x 50). Vide se veće nakupine mononuklearnih stanica u okolnom tkivu kalema. Pulpno tkivo (P) je hiperemično, s proširenim lumenima krvnih žila. D — dentin, C — caklina, G — granulacijsko tkivo, B — bubrežno tkivo. — Sl. 3. Uvećani detalj slike 2 (x 130). U okolnom tkivu zametka izražena jaka infiltracija mononuklearnim stanicama. P — pulpa, D — dentin, C — caklina, O — odontoblasti. — Sl. 4. Pulpa drugog kutnjaka 9 dana nakon presađivanja u semialogenog primaoca (x 100). Imunološka reakcija je u potpunosti razvijena, što se vidi iz guste infiltracije pulpe (P) mononuklearnim stanicama. D — dentin, C — caklina.

Petog dana nakon presađivanja primjećuje se slaba infiltracija mononuklearnim stanicama okoline kalema i korijenskog dijela zametka. Šestog i sedmog dana (sl. 2 i 3) ta je infiltracija izrazitija, da bi devetog dana nakon transplantacije gusto prožela čitavo pulpno tkivo (sl. 4).

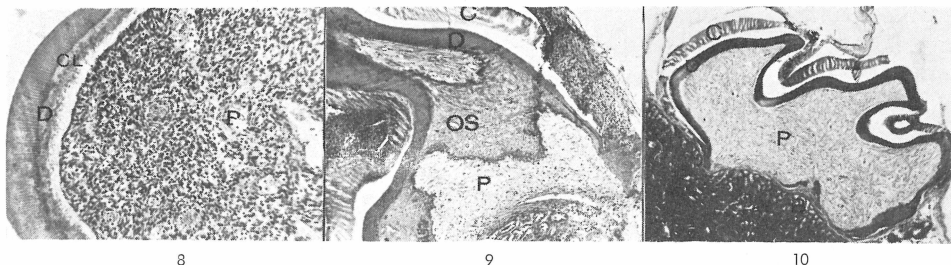
Četrnaestog dana nakon presađivanja (sl. 5) mononukleari su prorijedni, osobito u predjelu prema vrhu pulpne komorice, što je također osobito izraženo u kalema 21. dana nakon transplantacije.

Prateći izgled histoloških preparata do 28. dana nakon presađivanja, vidimo da je nakon početne upale uslijedila djelomična nekroza staničnih elemenata pulpe, s krajnim gubitkom normalne strukture sadržaja pulpne komorice (sl. 6 i 7). Fibroblasta i odontoblasta gotovo da i nema, tako da do izražaja



Sl. 5. Zametak drugog kutnjaka 14 dana nakon presađivanja u semialogenog primaoca (x 40). Transplantacijska reakcija je u opadanju, celularnost pulpe (P) smanjena. D — dentin, C — caklina. — Sl. 6. Kalem drugog kutnjaka 28 dana nakon presađivanja u semialogenog primaoca (x 40). Celularnost pulpe (P) znatno smanjena. Veće nakupine mononuklearnih stanica ističu se u perivaskularnim područjima. D — dentin, C — caklina. — Sl. 7. Uvećani detalj slike 6 (x 100). P — pulpa, D — dentin.

dolaze vezivni snopići, a između njih raspršene mononuklearne stanice. Mononuklearne stanice su gušće poredane oko lumena krvnih žila (sl. 7). Oskudna depozicija dentinskog matriksa započinje devetog dana nakon presađivanja. Najaktivnije područje je predio prema korijenu zuba. Supstancija odložena tijekom drugog postoperativnog tjedna bila je nepravilna, s uključenjima stanica u lakune (osteodentin sl. 8). Linija u dentinu koja se tamnije boji predstavlja granicu između pre- i postoperativno stvorenog dentina (kalciotraumatska linija). U kasnijim razdobljima nakon presađivanja, u pojedinim zuba osteodentin zauzima veća područja pulpne komorice (sl. 9).



Sl. 8. Dio pulpe i dentina drugog kutnjaka 16 dana nakon transplantacije u semialogenog primaoca (x 200). Cl — kalciotraumatska linija dijeli preoperativni od postoperativno stvorenog dentina. D — dentin, P — pulpa. — Sl. 9. Kalem prvog kutnjaka 150 dana nakon presađivanja u semialogenog primaoca (x 70). Pulpna komorica mjestimice prožeta osteoidnim tkivom (OS). P — pulpa, D — dentin, C — caklina. — Sl. 10. Kalem drugog kutnjaka 100 dana nakon transplantacije u semialogenog primaoca (x 40). Morfološka diferencijacija zametka obustavljena, pulpa (P) atrofična, a pulpnu komoricu ispunjavaju snopići vezivnih niti i mononuklearne stanice. D — dentin, C — caklina, B — bubrežno tkivo.

Od 28. do 200. dana nakon presađivanja, kalemi pokazuju podjednaku histološku sliku s neznatnim različitostima (sl. 10). Staničnih elemenata pulpe nema, ili su veoma oskudni, a do izražaja dolaze gušće ili rjeđe poredani vezivni snopići, a između njih nakupine mononuklearnih stanica. Oskudne naslage dentina javljaju se samo u nekih kalema, tako da se o rastu korijena ne može govoriti, kao ni o stvaranju cementa i parodontalnog ligamenta. Tvrdi zubna tkiva, koja su postojala prije presađivanja, održala su se gotovo nepromijenjena do kraja pokusa.

## RASPRAVA

Rezultati ovog rada pokazuju da je kalem zubnog zametka presađen u semialogenoj kombinaciji, tj. između soja (VY59) F<sub>1</sub> i primaoca roditeljskog soja (Y59), pokazivao rane znakove odbacivanja.

Ubrzo nakon presađivanja, razvila se nespecifična upala, a već petog dana uočen je početak razvoja transplantacijske reakcije. Infiltracija mononuklearnim stanicama, koja je petog dana bila vidljiva u okolini kalema, šestog i sedmog dana proteže se i na pulpno tkivo kalema, da bi devetog i desetog dana nakon presađivanja dostigla svoj maksimum. Četrnaestog dana nakon presađi-

vanya, imunološka reakcija je u opadanju, što se vidi iz slabije infiltracije mononuklearima, kako okoline tako i pulpnog tkiva kalema. Gušće nakupine limfocita postoje još oko lumena krvnih žila.

Tijekom prvih triju tjedana nakon transplantacije, kalem je pretrpio veća oštećenja, a do nove organizacije mekih tkiva zametka nije došlo. Dvadeset i prvog dana nakon presađivanja, celularnost pulpe je toliko smanjena, da se vide samo mononuklearne stanice, raspršene po čitavoj pulpnoj komorici, s nešto opsežnijim nakupinama tih stanica oko lumena krvnih žila te snopići vezivno tkivnih niti. Razvojem imunološke reakcije, došlo je do propadanja gotovo svih mekih struktura kalema.

Usporedimo li na histološkim preparatima skupine semialogenih transplantata s odgovarajućim singenim kalemima (Z a k l a n - K a v i ć i sur.<sup>2</sup>) u određenim postoperativnim vremenskim razdobljima, razlike su veoma uočljive. Heterotopički presađeni singeni kalemi, nakon kratkog perioda prilagođivanja, nastavljaju razvojem u primaocu. Ti kalemi pokazuju morfološki normalnu pulpu, s kontinuiranim slojem odontoblasta, stvaraju tubulatni dentin i razvijaju korijen, s cementom i parodontalnim ligamentom. Heterotopički kalemljeni zameci u semialogenoj kombinaciji, međutim, induciraju jaku imunološku reakciju, koja uništava gotovo sve meko tkivo kalema, tako da je daljnja morfološka diferencijacija zametka zaustavljena, ili znatno poremećena.

Rezultati ovog rada pokazuju, nadalje, da je razvoj imunološke reakcije na kaleme zubnih zametaka nešto slabiji, nego u kombinaciji čistih sojeva (alogenoj kombinaciji). Razlika je u vremenu nastupa imunološke reakcije, kao i u daljnjem tijeku morfološke diferencijacije zametka. U semialogenoj kombinaciji, infiltracija mononuklearima počinje kasnije, a opada nešto ranije nego u alogenoj kombinaciji. Ipak, pokus semialogene transplantacije nije ispunio naša očekivanja, jer je odumiranje mekih tkiva kalema bio akutan, a nikako kroničan proces. Vrijeme nastupa imunološke reakcije, kao i njezina jačina, vjerojatno su u prvom redu odraz imunološke razlike između primaoca i davaoca zametaka. Poznato je da je proliferacija mononuklearnih stanica unutar kalema u različitim kombinacijama sojeva kvantitativna (G u t t m a n i sur.<sup>5</sup>). Kožni kalemi, koje smo presađili semialogenim i alogenim primaocima, bili su odbacivani istovremeno. Prema tomu, čini se da bi imunološka reakcija na kaleme zubnih zametaka bila nešto blaža nego na kožne kaleme. Preživljavanje kože ne mora biti mjerilo i za preživljavanje drugih tkiva i organa. Razlika u jačini imunološke reakcije može biti rezultat veće koncentracije antigena kože u odnosu na druga tkiva (G r i t t e s i sur.<sup>11</sup>), razlike u brzini imunizacije kožom i drugim tkivima (H u m e i E g d a h l<sup>12</sup>), razlike u krvnom optoku, limfnoj drenaži te regenerativnoj sposobnosti određenih tkiva (D e v l i n i R a m m<sup>13</sup>).

Ovim smo pokusima pokazali da tvrdnje I v a n y i j a i V a c e k a<sup>6</sup> (1964), I v a n y i j a<sup>7</sup> (1965), W e i n r e b a i sur.<sup>9</sup> (1968), te S h a r a v a i sur.<sup>8</sup> (1969) o slaboj antigeničnosti zubnih tkiva nisu u suglasnosti s našim rezultatima. Za sada nema pouzdanih podataka da su zubi uistinu slabije antigenični od većine ostalog tkiva. Tome u prilog govore i opažanja R e v i e r e i sur.<sup>14</sup> (1971), te K l e i n a<sup>15</sup> (1971), koji izvještavaju da presađeni zubni zameci u miševa pobuđuju snažnu imunološku reakciju. Što više, isti autori iznose da i presađivanje zametaka u životinja, koje su se razlikovale samo u nekoliko

lokusa tkivne snošljivosti, dovode do oštećenja kalema i prestanka njegova daljnog rasta.

U zaključku možemo reći, da zubni zametak, koji se presadi u semialogenog primaoca, pobuđuje relativno snažne imunološke reakcije. Kalemi su pokazivali jaku infiltraciju mononuklearnim stanicama, a njihov daljnji rast bio je ili sasvim zaustavljen ili pak znatno poremećen.\*

#### S a ž e t a k

U radu smo ispitivali razvoj imunološke reakcije na kaleme zubnih zametaka u visokosrodnih sojeva životinja, u kojih se odbacivanje tkiva i organa odvija određenim redoslijedom. U ovim eksperimentima, davaoci kalema su bili hibridi prve filijalne generacije (VMxY59) F<sub>1</sub>, a primaoci kalema roditeljski soj Y59, koji su se razlikovali u jakom histokompatibilnom lokusu AgB (H-1). Zubne zemetke prvih i drugih kutnjaka deset dana starih štakora presađivali smo u potkožno tkivo aksile i pod bubrežnu kapsulu odraslih ženki. Kaleme smo odstranjivali u različitim vremenskim razmacima, počevši od 3. do 200. dana nakon presađivanja i histološki smo ih analizirali. Stupanj razvoja imunološke reakcije ocjenjivali smo prema gustoći infiltracije mononuklearnim stanicama te vitalnosti i daljnjoj diferencijaciji zubnih zametaka.

Rezultati su pokazali, da su kalemi pokazivali različite stupnjeve odbacivanja, ovisno o vremenu koje je prošlo nakon transplantacije. Daljnji je razvoj zubnih zametaka bio ozbiljno poremećen, ili potpuno zaustavljen.

#### S u m m a r y

##### TOOTH GERM TRANSPLANTATION IN RATS III IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF THE PARENTAL STRAIN ON THE TOOTH GERM GRAFT OF F<sub>1</sub> HYBRID

The purpose of this paper is to study allograft immune reaction using the model of tooth germ transplantation between highly inbred strain of rats, where rejection proceeds at a relatively uniform rate. The experiments were carried out in inbred rats of the Y59 and VM strain combinations differing in their major histocompatibility system (AgB). A strong unilateral histocompatibility barrier was made using F<sub>1</sub> hybrid grafts to a parental strain. The donors of the tooth germs were 10-day old rats, and recipients were adult female rats. Germs of the first and second molar tooth dissected from the upper and lower jaw were transplanted into the subcutaneous tissue of the axilla, and beneath the renal capsula. The grafts were removed at different intervals from 3 to 200 days after transplantation and examined histologically. The transplants were evaluated according to infiltration of the grafts with mononuclear cells, and the viability and further development of the tooth germs.

The results revealed that the grafts showed various signs of rejection at each of the experimental period. Further development of the tooth germs was seriously impaired or completely arrested.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g

##### DIE ÜBERPFLANZUNG DER ZAHNKEIME VON RATTEN III. DIE IMMUNOLOGISCHE REAKTIVITÄT DES ELTERNSTAMMES AUF PELZLINGE DER ZAHNKEIME BEI HYBRIDEN F<sub>1</sub>

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der immunologischen Reaktion auf Pelzlinge der Zahnkeime bei engverwandten Tierarten bei denen sich die Ausstossung der Gewebe und Organe in einer bestimmten Folge entwickelt, untersucht. Die Pelzlingspender waren Hybride der ersten Tochtergeneration (VMxY59) F<sub>1</sub>, der Empfänger ein Elternstamm von Y59, welche sich nach starkem histokompatiblen Lokus AgB unterschieden (H-1).

\* Ovaj rad je financirao Republički savjet za naučni rad SR Hrvatske, br. IX/14, kao i Klinički bolnički centar u Zagrebu.

Zahnkeime der ersten und zweiten Mahlzähne von 10 Tage alten Ratten wurden in das subepitheliale Gewebe der Achselhöhle und unter die Nierenkapseln erwachsener Weibchen eingepflanzt. Die Pelzlinge wurden in verschiedenen Zeitabständen vom dritten bis 200-sten Tag nach der Überpflanzung entfernt und histologisch untersucht. Der Grad der immunologischen Reaktion wurde nach der Dichte der Infiltration mit mononukleären Zellen bewertet, ausserdem nach der Vitalität und weiterer Differenzierung der Zahnkeime.

Die Resultate zeigen dass die Pelzlinge verschiedene Grade der Ausstossung aufwiesen, abhängig von der Zeitspanne nach der Transplantation. Die weitere Entwicklung der Zahnkeime war ernstlich gefährdet oder völlig verhindert.

#### LITERATURA

1. CSEREPFALVI, M. P.: J. Amer. Dent. Ass., 67:35, 1963
2. ZAKLAN-KAVIĆ, D., KAŠTELAN, A., BAŠIĆ, I.: Lij. vjes., 96:532, 1974
3. ZAKLAN-KAVIĆ, D., KAŠTELAN, A., BAŠIĆ, I.: Lij. vjes., 96:535, 1974
4. LINDER, O. E.: J. Nath. Inst., 27:351, 1961
5. GUTTMAN, R. D., LINDQUIST, R. R., MERRILLE, J. P.: Transplantation, 8:19, 1969
6. IVANYI, D., VACEK, Z.: Fol. Biol. (Praha), 10:412, 1964
7. IVANYI, D.: Fol. Biol. (Praha), 11:48, 1965
8. SHARAV, Y., WEINREB, M. M., ICKOWITZ, M.: Transplantation, 8:328, 1969
9. WEINREB, M. M., SHARAV, Y., ICKOWITZ, M.: Transplantation, 6:289, 1968
10. STARK, O., HAUPTFELD, M.: Fol. Biol. (Praha), 15:35, 1969
11. GRITTES, R. T., KOSTIN, A. J., GRAFF, D. B., KETCHAM, A. J.: Transplantation, 2:58, 1964
12. HUME, D. M., EGDAHL, R. H.: Surgery, 38:194, 1955
13. DEVLIN, R. G., RAMM, G. M.: Transplantation 12:260, 1971
14. REVIERE, G. R., SABET, T. Y., HOFFMAN, R. L.: Transplantation, 12:271, 1971
15. KLEIN, J.: Transplantation, 12:503, 1971