

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

HUMÁN FOGCSÍRÁK EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX KOMPONENSEINEK  
VIZSGÁLATA

Dr. Felszeghy Szabolcs

Debreceni Egyetem  
Orvos és Egészségtudományi Centrum  
Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet  
2001

Az Értekezés

a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében készült



Témavezető: Dr. Módis László egyetemi tanár

## 1. Bevezetés

A fogat alkotó szövetek az orális ektodermából, valamint a kriszta neurális eredetű mezenchimális sejtekből fejlődnek. A fog morfogenezise az orális epitélium bazális sejtjeinek az ektoderma alatti mezenchimába történő proliferációjával kezdődik, kialakítva ezzel a foglécet. A foglécen, a későbbi fogcsíráknak megfelelő helyen, a kezdetben gömb alakú sejtgyűjteményből, a széli részek fokozott proliferációs aktivitásának, valamint az ektomezenchimának a fogcsíra középső területeire való benyomulásának eredményeképpen kialakul a zománcszerv. Az epiteliális-ektomezenchimális eredetű fogcsíra különböző sejtjei időben, térben eltérő sejt, valamint sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kölcsönhatások indukáló hatására differenciálódnak és létrehozzák a fog különböző szöveteit.

Az ektomezenchimális eredetű odontoblasztok termelik a dentin mátrixát. Az odontoblasztok nyúlványai körül megjelenő dentin szignálként szolgálhat ahhoz, hogy a belső zománchám sejtjei szekretoros ameloblasztokká alakuljanak. A szekretoros ameloblasztok pedig a zománc alapállományának a szintéziséért felelősek. Míg a csontszövetképződés során egy nem mineralizálódott mátrixtemplát kialakulását követően indulnak el a mineralizációs folyamatok, addig a zománc alapállományban gyakorlatilag a szintézist követően azonnal elkezdődik a mineralizáció. Így a szekretoros ameloblasztok által termelt speciális zománcfehérjéknek (amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblasztin/amelin) alapvető szerepe lehet a kristályszerkezet kialakulásának befolyásolásában. Annak ellenére, hogy egyre több kísérletes munka foglalkozik ezen bonyolult szerkezet kialakulásához vezető folyamatokkal, a zománcra jellemző kristályszerkezet kialakulásának pontos mechanizmusa máig nem ismert.

A fejlődő fogcsíra ECM-re vonatkozó irodalmi adatok többsége rágszálakon végzett tanulmányokból származik. A hialuronsavnak, valamint receptorának, a CD44-nek humán fogfejlődésben játszott szerepéről a rendelkezésre álló kevés irodalmi adat miatt nem sokat tudunk. A X-es típusú kollagén fog keményszöveteiben való előfordulásáról irodalmi adatokat nem találtunk.

A hialuronsav (HA) az ECM egyik poliszacharidja. A HA ismétlődő diszacharid egységekből (D-glükuronsav és N-acetilglukózamin) felépülő óriás méretű nem szulfatált glükózaminoglikán, melyben a monoszaharidok egymáshoz béta-1,4- és béta-1,3-glükozidos kötésekkel kapcsolódnak.

Az erősen hidratált hialuronsavnak a viszkoelasztikus sajátságából adódó térkitöltő funkciója mellett jelentős szerepet tulajdonítanak a különböző fejlődésbiológiai folyamatokban: szerepe lehet sejtek proliferációjának, migrációjának és differenciálódásának szabályozásában.

Természetesen ezen folyamatokban nemcsak a HA passzív térkitöltő hatásának lehet szerepe, hanem a hialuronsav különböző sejtfelszíni receptorain keresztül (CD44, RHAMM), hathat az intracelluláris folyamatokra is.

A legtöbbet tanulmányozott és a legtöbb hialuronsav mediált effektus továbbításáért felelős receptor a CD44. A CD44 transzmembrán fehérje, melynek extracelluláris doménjének a disztális része az aggregán molekula link proteinjének szerkezetéhez hasonló, és a hialuronsav molekula kötéséért felelős. Az extracelluláris rész sejtmembránhoz közelebbi, proximális szakasza eltérő lehet a különböző izoformáknál. A sejt belsejébe történő HA-effektus továbbításért a transzmembrán domén mellett a CD44 intracelluláris doménje is felelős, mely a citoszkeleton különböző molekuláival, az ankirinnel és ERM (ezrin/radixin/moezin) család tagjaival kapcsolódhat.

A X-es típusú nem fibrilláris kollagén, melynek jelenlétét először az epifízis porcporong hipertrófiás zónájában, illetve az ízületi porc kalcifikációs zónájában írták le, három különböző szakaszból épül fel: az N terminális végen kis molekulású nonhelikális, a C terminális végen egy 17-20 kD-os globuláris doménből, valamint a 45 kD-os középső helikális szakaszból. A molekula C terminálisán lévő nonhelikális szakasz szerkezete rendkívül konzervatív, s ennek a doménnek tulajdonítanak szerepet a X-es kollagén molekulák homofil aggregációjában. Kísérleti adatok alapján feltételezik, hogy a X-es típusú kollagén szerepet játszik a porc ECM mineralizációjában.

Az értekezésben összegzett kísérletes munkával a fentebb vázolt okok miatt, kvalitatív és kvantitatív hisztokémiai módszerrel vizsgálni kívántuk a hialuronsav, CD44 és X-es típusú kollagén expresszációját fejlődő humán fogcsírákban. Ezen túl, a X-es kollagén expressziójának tanulmányozásakor tapasztalt eredményeink alátámasztása végett ELISA és Western immunoblot kísérleteket is végeztünk.

## 2. Célkitűzések

A fejlődő fogtelep extracelluláris mátrixára vonatkozó ismereteink elsősorban állatokon, főleg rágcsálókon végzett kísérletes tanulmányokból ismeretesek. Ezért döntöttünk úgy, hogy a fejlődés különböző stádiumaiból származó humán fogcsírákon tanulmányozzuk az ECM-komponensek közül a hialuronsav (I) illetve receptorának CD44 (II) időbeli és térbeli expresszáldását kvalitatív és kvantitatív hisztokémiai módszerekkel. Célul tűztük ki, továbbá azt is, hogy adatokat gyűjtsünk annak leírására, hogy az irodalomban eddig nem említett humán fogcsíra zománcának extracelluláris mátrixában általunk detektált X-es típusú kollagén milyen szerepet játszhat a fejlődő zománcmátrix kialakításában (III).

### 3. Anyagok és Módszerek

#### 3.1 Anyaggyűjtés, Mintaelőkészítés

Vizsgálatainkat a DEOEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról kapott abortumokból, valamint a Patológia Intézetben gyűjtött foetusokból, illetve elhalt újszülöttekből származó mintákon végeztük.

3.1.1 Szövetteni metszeteink készítésekor a vizsgálati anyagokból az incizális régióból kivett fogcsírákat tartalmazó 1-1,5 cm-es mandibula részleteket Sainte-Marie oldatban fixáltuk, azután dekalcináltuk EDTA-ban, mostuk majd dehidráltuk és beágyaztuk alacsony olvadáspontú paraffinba. Ezután 7-8 $\mu$ m vastagságú metszeteket készítettünk a fogcsíra hossz tengelyével párhuzamosan. Minden egyes alkalmazott reakció előtt xilolban deparaffinálást, leszálló alkoholsorban és deszt. vízben hidratálást végeztünk.

3.1.2 ELISA és Western immunoblot kísérleteinkhez mintáink az előzőekben ismertetett helyekről származtak. Az eltávolított mandibula darabokból a még át nem tört fogcsírákat szeparáltuk, majd gondos preparálással szétválasztottuk a fogat alkotó szöveteket. Pozitív kontrollként eltávolítottuk a humán mintáink tibijának epifízis porcát is, ugyanis az epifízis porcban megtalálható hipertrófiás porcsejtekről és az őket körülvevő ECM-ről ismert, hogy X-es típusú kollagént tartalmaznak. A fog kemény szöveteit (dentin, zománc) TRIS-t, valamint SDS tartalmú glicin pufferbe tettük és dörzsmozsárban állandó hűtés mellett homogenizáltuk. Az így kapott dentin- és zománc-masszát centrifugáltuk, majd a felülúszót szeparáltuk. Az eltávolított és apróra vágott epifízisporc-darabkákat guanidin HCl-vel homogenizáltuk. Ezt követő ecetsavas mosás után mintáinkat ismét centrifugáltuk, majd az eltávolított felülúszót pepszinnel (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) emésztettük. Az emésztést és ismételt centrifugálást követően a felülúszót ecetsavban dializáltuk, majd lefagyasztottuk és liofileztük.

#### 3.2. HA, CD44 valamint a X-es típusú kollagén detektálása

##### 3.2.1 Hialuronsav kimutatása

A HA reagens (bHABC), a porcmátrixban előforduló nagyméretű PG aggregán molekula N-terminálisán lévő G1 doménből izolált szakasz, mely specifikusan kötődik a hialuronsav dekaszaharidnyi részéhez, hozzá biotint kötnek, ez a komplex lesz a reagens A bHABC-t Dr. Tammi, R. és Dr. Tammi, M. (Department of Anatomy, University of Kuopio, Kuopio, Finland) bocsátották rendelkezésünkre. A reakció első lépése a szövetmintában

jelenlévő HA detektálása a bHABC próbával. A továbbiakban a kötődött reagens biotinját detektáljuk, amire mi avidin-biotin peroxidáz komplexet (ABC) használtunk, a rendszerben lévő enzimet (peroxidáz) pedig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> valamint diaminobenzidin (DAB)-kromogén segítségével tettük láthatóvá. A bHABC reagens specificitását két különböző módon ellenőriztük. A HA reakciót megelőzően (a) *Streptomyces* hialuronidáz enzimemésztést hajtottunk végre, melyről ismert, hogy specifikusan csak a hialuronsavat depolimerizálja tetra és hexaszaharidokra vagy (b) metszeteinken HA-oligoszaharidokkal történő előinkubálást végeztünk. Ezt követően a fentebb ismertetett módon hajtottuk végre bHABC próbával az inkubálást majd a HA-reakció további lépéseit.

### 3.2.2 CD44 Immunohisztokémia

A molekula detektálásához a CD44 összes izoformáját felismerő monoklonális antitestet (Hermes 3, H3) használtunk, melyet Dr. Sirpa Jalkanen (University of Turku, Turku, Finland) bocsátott rendelkezésünkre. A H3-mal inkubált metszeteket biotinizált anti-egér antitesttel kezeltük, majd a 2. antitest biotinját detektáltuk ABC segítségével. A reakciót H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> valamint DAB segítségével tettük láthatóvá. Negatív kontrollként metszeteinket nonimmun IgG2-vel inkubáltuk, majd a fentebb ismertetett módon hajtottuk végre a CD44 immunohisztokémiai reakció további lépéseit.

### 3.2.3 X-es típusú kollagén Immunohisztokémia

A metszeteink deparaffinálását követően tesztikuláris hialuronidáz enzimemésztést végeztünk a X-es típusú kollagén epitópjainak feltárása érdekében. A X-es kollagén detektálására monoklonális ellenanyagot (X53, Dr. von der Mark, K. /University of Erlangen-Nuremberg, Germany/ ajándéka) használtunk. A kötődött antitestet biotinizált anti-egér antitesttel, majd streptavidin-alkalikus foszfatáz komplex-szel konjugáltuk. A reakció vizualizálására naftol AS-MX foszfátot és Fast Red-et alkalmaztunk. A reakció elvégzése után a X-es kollagént tartalmazó struktúrák vörös színben jelennek meg. Az X53-as ellenanyag specificitásának ellenőrzésére a X53 pufferét használtuk.

### 3.2.4 A X-es típusú kollagén kimutatása Western immunoblot technikával

A fogtelegből és a hipertrófiás porcából származó mintáinkat 8 %-os SDS-poliakrilamid minigelekre vittük fel. A gélek zsebeibe egyenként 20-20 µl mintát, valamint molekulaszúly-standardokat helyeztünk. A membrán blokkolását 2 %-os BSA/SDS pufferrel

végeztük, majd a következő lépésben a X53 felvitelére került sor. A gélhez kötődött X53-at a biotinilált anti-egér ellenanyaggal ABC-vel, majd H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DAB-os hívóoldattal detektáltuk.

### 3.2.5 A X-es típusú kollagén kimutatása ELISA technikával

A X-es típusú kollagén ELISA-val történő kimutatásához Nunc-Immuno Plate-et használtunk. A plate-re a szövetmintákat -5µg/lyuk koncentrációban- vittünk fel.

A coatingolás után 1 %-os zselatin PBS-ben blokkolást végeztünk. Ezek után a X53-as antitesttel inkubáltunk majd peroxidázzal konjugált anti-egér ellenanyaggal történő inkubálás követett. A vizualizálásra orto-fenilén-diamint és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot használtunk, mellyel a színreakció megjelenéséig inkubáltunk. A kapott színreakciókat  $\lambda=492$  hullámhosszon fotometráltuk. A fotométert (Titertek Uniskan®Labsystem, Finland) az 1 %-os zselatin PBS-t tartalmazó lyuk abszorpciós értékéhez kalibráltuk. A negatív kontrolloknál a X53 monoklonális ellenanyaggal történő inkubációs lépést hagytuk ki.

### 3.3 Hialuronsav expressziójának kvantitatív Meghatározása Számítógépes Képanalízissel

A bHABC-vel kapott hisztokémiai reakciónk kvantitatív összehasonlítását közönséges fénymikroszkóphoz illesztett CCD kamera (Kodak, Rochester, NY, USA), valamint egy Macintosh PC-n futó IP Lab nevű képanalizáló program (Signal Analytics, Vienna, VA, USA) segítségével végeztük. Méréseinket megelőzően, a képanalizáló rendszer által detektált intenzitás -grey level- értékeket az IPLab program, valamint neutrális filterek segítségével optikai denzitás értékekké alakítottuk és mintáink vizsgálatakor ezen optikai denzitás értékek segítségével, jellemeztük az egyes struktúrák relatív hialuronsav tartalmát. Minden egyes kiválasztott struktúrából 120 mérést végeztünk, méréseinket átlagoltuk és a kapott értékeket terület integrált optikai denzitásként tüntettük fel. A mérések során a rendszer paramétereit nem változtattuk.

### 3.4 Statisztikai módszer

A számítógépes képanalízis során kapott eredményeink elemzésére Mann-Whitney U statisztikai tesztet használtunk. A statisztikai próbát az SPSS szoftver (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) felhasználásával végeztük el.



## 4. Eredmények és Következtetések

### 4.1 A hialuronsav és receptorának (CD44) expressziójának a vizsgálata

A fejlődés korai harang stádiumában lévő mintáinknál az orális epitélium, valamint az ebből kiinduló fogléc sejtjei intenzíven jelölődtek a bHABC-vel. A zománcszerv fogpapillájában mérsékelt bHABC reakciót tapasztaltunk. A preszekretoros ameloblasztok vizsgálatakor a sejtek apikális és bazális része között optikai denzitáskülönbség mutatkozott. A preszekretoros ameloblasztoknak a fogpapilla felé néző apikális része intenzív a sejtek bazális része gyengébb jelölődést mutatott. A preszekretoros ameloblasztokat a fogpapilla legkülső sejtisorától elválasztó membrana bazális (ún. lamina ameloblasztika), intenzíven jelölődött a hialuronsav reagenssel. Hasonlóan más munkacsoportok rágeszélőkon tapasztalt eredményeihez, humán mintáink esetében is megfigyelhető volt a külső zománchámsejtek által határolt zománcpulpa csillag alakú sejtjeinek intenzív HA reakciója. A fogfejlődés korai harang stádiumában lévő fogtelepek esetében a CD44 expresszió nagyjából megfelelt ezen fogcsírák esetében tapasztalt hialuronsav mintázattal: az orális epitélium bazális sejtsora, valamint az ebből kiinduló fogléc sejtjei intenzíven jelölődtek H3 ellenanyaggal, a külső zománchámsejtek valamint a preszekretoros ameloblasztok által határolt zománcpulpa csillag alakú sejtjei moderált CD44-reakciót mutattak. A fogtelep apikális régiójában a preszekretoros ameloblasztok laterális és bazális sejtmembránja intenzív jelölődést mutatott. Érdekes volt az a megfigyelésünk, hogy míg a harang alakú fogtelep homorulatában lévő preszekretoros ameloblasztok pozitivitását tapasztaltuk, addig a gyökérnyúlvány területén ezen sejtek negatívak maradtak, hasonlóan a külső zománchám sejtjeihez.

Számos, sejttenyészetben végzett tanulmány szerint a hialuronsavban gazdag pericelluláris mátrixnak szerepe lehet a különböző típusú sejtek osztódásának és vándorlásának elősegítésében. A pericelluláris HA-hálózat sejt felszínhez való rögzítésében a sejtek membránjában jelenlévő CD44-nek tulajdonítanak alapvető szerepet. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az ektoderma eredetű foglemez burjánzó, az ektomezenchimális szövetbe invaginálódó sejtjein általunk detektált hialuronsavnak és CD44-nek feltehetően fontos szerepe lehet a foglécet alkotó sejtek osztódásának és vándorlásának elősegítésében.

A fogfejlődés korai fázisaiban humán fogcsíránk zománcpulpájában jelenlévő hialuronsav a CD44-hez illetve egyéb hialuronsav-kötő képességgel rendelkező proteoglikán molekulához kötődve fontos strukturális komponense lehet a fogcsíra ezen részének. A zománcpulpában jelenlévő HA, viszkoelasztikus tulajdonságából adódóan, magasan hidratált

extracelluláris mátrix létrehozása által védőburkot biztosíthat a fogtelep egyéb fejlődő, differenciálódó részei felett, biztosítva ezáltal a fogcsíra normális alakfejlődését, mint ahogyan ezt már korábbi tanulmányokban is feltételezték. Egyre több kísérletes adat sugallja azt, hogy a magas hialuronsav tartalmú ECM-el rendelkező fejlődő szövetekben a hialuronsav által kialakított “porózus” extracelluláris mátrixnak szerepe lehet a sejtek és a vér közötti térben a kismolekulatömegű anyagok transzportjában. Úgy gondoljuk, hogy a fogpapilla ektomezenchimális sejtjei között megfigyelhető hialuronsavban gazdag ECM hasonló szereppel bír. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a fogpapilla kapilláris hálózatának kialakulását követően fokozatosan csökken a hialuronsav expresszió mértéke a dentális papillában, illetve a későbbiekben az abból differenciálódó pulpában.

A fogfejlődés későbbi stádiumaiból származó mintáinknál, ahol már megfigyelhető volt a fog kemény szöveteinek szintézise, alacsony volt a HA relatív koncentrációja a pulpában és az odontoblasztokban. A dentin alapállományában csak a dentincsatornácskák falaiban láttunk mérsékelt pozitívítást, egyéb területeken jelölődést nem tapasztaltunk. A zománcképzés megindulásakor, a 21- illetve 31-hetes humán fogcsíráknál eddig az irodalomban nem említett érdekes jelenséget tapasztaltunk, nevezetesen a zománc alapállományának intenzív jelölődését. Ugyanezen stádiumokban a zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális része jelentős, míg ezen sejtek bazális része igen kevés HA-t tartalmazott. Az idősebb, posztnatális mintából származó fogcsíra tanulmányozásakor újabb jelenségre lettünk figyelmesek. Alapvető különbség a fiatalabb korú, a zománcképzés kezdeti stádiumában lévő fogcsírákhoz képest, hogy itt megszűnt a zománc mátrixának intenzív pozitívítása, csak a szekretoros ameloblasztok és a zománc felszín között tapasztaltunk halvány jelölődést, valamint a szekretoros ameloblasztok HA expressziója is jelentősen csökkent. Szignifikánsan gyengébb HA-reakció volt megfigyelhető a fog pulpájában és az odontoblasztokban is. Mindazon humán fogcsírák esetében, ahol már megfigyelhető volt a fog kemény szöveteinek szintézise, a CD44 intenzíven expresszálódott az odontoblasztok rétegében. A dentin alapállományában csak a dentincsatornácskákban lévő Tomes nyúlványok jelölődtek a H3-al. A zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális, laterális valamint bazális sejtmembránján is kifejezett pozitív reakciót tapasztaltunk. A stratum intermedium sejtjeiben valamivel gyengébb reakció mutatkozott.

Az a megfigyelés, hogy az odontoblasztok illetve azok nyúlványai HA valamint CD44 és a körülöttük kialakuló dentintubulusok falai HA-pozitívítást mutatnak, arra utal, hogy a Tomes rostok körül kialakuló HA gazdag extracelluláris térségnek is fontos szerepe lehet ezen struktúrák fejlődésében.

Talán a legérdekesebb, az irodalomban eddig nem említett jelenség az, hogy a zománc alapállomány szintézisének megindulásakor a szekretoros ameloblasztokban, valamint az általuk szintetizált éretlen zománc alapállományban jelentős hialuronsav tartalom detektálható. A zománcmátrix optikai denzitás értéke szignifikánsan emelkedett a korai szekréción fázisban, majd drasztikusan csökkent a posztnatális korban.

Az irodalmi adatokból ismert, hogy a zománc alapállomány szintézisének megindulásakor a jelenlévő zománcproteinek (amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblasztin) fontos szerepet játszhatnak a hidroxipatit kristályok nukleációjának megindításában, növekedésük, térbeli orientálódásuk irányításában. Azt, hogy a zománcmátrixban jelenlévő hialuronsav ezen fehérjékkel kapcsolatba lépve befolyásolja-e a zománc szerkezetének kialakulását, vagy közvetlenül hathat a kristályképződés kezdeti folyamataira, egyértelműen nem lehet megválaszolni. A rendelkezésre álló irodalmi adatokat figyelembe véve úgy gondoljuk, hogy a hialuronsav szerkezeti sajátosságából adódóan feltehetően térkitöltő szerepet játszhat a zománckristályok kialakulásakor, melynek stabilizáló hatása lehet a kristálykötegek szintézisekor. A posztnatális minták zománc alapállományában tapasztalt HA- expresszió csökkenését valószínűleg az a tény magyarázhatja, hogy a mineralizáció előrehaladásával, a zománcproteinekhez hasonlóan, valószínűleg a hialuronsavat is hasítják az ekkor expresszálódó enzimek.

#### 4.2 A X-es kollagén expressziójának vizsgálata

A fogfejlődés korai harang stádiumában lévő humán fogcsírák esetében az anti-humán monoklonális X53-as ellenanyaggal nem tapasztaltunk jelölődést a fogtelep különböző struktúráiban. Azon fogcsíráknál, amelyeknél már megfigyelhető volt a fog kemény szöveteinek szintézise, a X53-as ellenanyaggal intenzív reakciót figyeltünk meg a zománc alapállományában, amihez a zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális részének pozitivitása is társult, míg ezen sejtek bazális részében reakciót nem tapasztaltunk. Idősebb posztnatális mintából származó fogcsíra tanulmányozásakor alapvető különbség mutatkozott a fiatalabb korú, a zománcképzés kezdeti stádiumában lévő fogcsírákhoz képest. A zománc mátrixának és a szekretoros ameloblasztoknak csökkent a pozitivitása.

A reagensünk specifikus kötődését a negatív kontroll mellett, az a - X-es kollagénnel jellemző - festődési mintázat is alátámasztotta, amelyet a 31 hetes foetus Meckel porcában jelenlévő hipertrófiás porcsejtekben, valamint az azok körüli extracelluláris mátrixban észleltünk.

Mivel a zománcképzés megindulásakor tapasztalt érdekes és meglepő jelenségről az irodalom eddig nem tett említést ezért az eredményeink alátámasztása végett ELISA, illetve Western immunoblot-kísérleteket is végeztünk. A zománcképzés kezdeti stádiumában lévő fogcsíra zománc fehérjéinek Western blot analízisét követően a X-es kollagénnre jellemző molekulásúly tartományban (60 kDa) határozott sávot kaptunk, ami alátámasztja reagensünk specificitását. Az ELISA kísérleteinkhez 22, illetve 26 hetes foetus fogcsíra zománcát és dentinét, valamint pozitív kontrollként az előbb említett foetusok tibiáinak hipertrófiás porcsejteket tartalmazó epifízis porc darabjait használtuk.

Az ELISA-val kapott eredményeink is alátámasztották előző megfigyeléseinket, ugyanis pozitív reakciót detektáltunk a zománc, illetve a hipertrófiás porcsejteket tartalmazó extraktumokban, azonban a dentinből készült mintákon ELISA-val nem tapasztaltunk reakciót.

Mint ahogyan azt korábban említettük, a fejlődő zománc mátrixában jelenlévő zománcproteineknek szerepet tulajdonítanak a kristályszerkezet kialakulásának befolyásolásában. Jelenlegi eredményeink alapján nem tartjuk kizártnak, hogy a X-es típusú kollagén közreműködhet a zománc alapállományának mineralizációs folyamataiban. Azt, hogy ez az effektus a zománcproteinnel való kölcsönhatás vagy egyéb mechanizmusok révén valósul-e meg, a jelenlegi ismereteinket figyelembe véve egyértelműen nem lehet megválaszolni. Nem tartjuk kizártnak, hogy a X-es kollagén molekulák –melyek irodalmi adatok szerint szupramolekuláris hexagonális aggregátumokat alkotnak egymással- szerepet játszhatnak a zománc mineralizációs folyamatainak megindulásakor. Ez a kollagénhálózat, hasonlóan más mineralizálódó szövetek eltérő összetételű ECM-jéhez, templátként szolgálhat az aggregátumhoz kötődő kalciumionok számára a nukleációs folyamatok megindulásakor.

## 5. Összefoglalás

Vizsgálatainkat különböző fejlődési stádiumból származó humán fogcsírákon végeztük. A hialuronsavat (HA) biotinilált aggrekán G1-doménnel (bHABC) mutattuk ki, mely specifikusan kötődik a HA dekaszacharidnyi részéhez. A kötődött bHABC-hez avidin-biotin peroxidáz (ABC) komplex-et kötöttünk a rendszerben lévő szubsztrátot pedig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> valamint diaminobenzidin (DAB) kromogén segítségével tettük láthatóvá. A HA-reakció intenzitását számítógépes képanalízissel értékeltük. A CD44-et monoklonális, az összes izoformát felismerő ellenanyaggal (H3) mutattuk ki. A H3-at, második biotinilált anti-egér antitesttel reagáltattuk. A kötődött reagenst, hasonlóan a hialuronsav reakcióhoz, ABC komplex-el, valamint H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel és DAB-al detektáltuk. A X-es típusú kollagént monoklonális ellenanyaggal detektáltuk. A X-es kollagén ellenes reagenssel kapott immunohisztokémiai eredményeink ellenőrzése céljából ELISA és Western immunoblot kísérleteket is végeztünk.

**Eredményeink:** (1) A HA-t expresszálják a fogcsíra sejtjei. Új eredmény az a megfigyelés, hogy a HA tranziens módon megjelenik a zománcmátrixban is, legnagyobb mennyiségben a 31 hetes foetusban, idősebb korú fogcsíra zománcaiban azonban nem detektáltuk. (2) Humán fogcsírák esetében a CD44 expressziója szoros összefüggést mutatott az adott sejtek hialuronsav termelésével. (3) A X. típusú kollagén kimutatható a szekretoros ameloblasztokban és az általuk szintetizált zománc alapállományában. A fogtelep egyéb részeiben nem észleltünk reakciót. Az immunohisztokémiával kapott eredményeinket ELISA valamint Western immunoblot kísérleteink is alátámasztották.

### **Eredményeink alapján feltételezzük:**

**I.** A HA a fogfejlődés során szerepet játszhat több folyamatban:

(a) Szerepe lehet a fogléc sejtjeinek osztódásának és vándorlásának elősegítésében. (b) A dentális papillában jelenlévő, a fejlődés előrehaladásával fokozatosan csökkenő mennyiségben jelenlévő HA nemcsak strukturális komponense lehet a fogpapillának, hanem közreműködhet ezen szövet sejtjei közötti kismolekulatömegű anyagok transzportjában. (c) A HA feltehetően térkitöltő szerepet játszhat a zománckristályok kialakulásakor, stabilizáló hatása lehet a kristálykötegek irányított lerakódásában. (d) A Tomes-rostok körül kialakuló, HA-gazdag extracelluláris térségnek fontos szerepe lehet ezen struktúrák fejlődésében. (e) Mivel a CD44 expresszió hasonló volt a fogcsíráknál tapasztalt hialuronsav mintázattal, feltételezhetjük, hogy a hialuronsav által mediált effektusok közvetítésében a CD44-nek központi szerepe lehet a humán fogfejlődés során.

**II.** A X-es típusú kollagén feltehetően szerepet játszhat a zománc alapállományának mineralizációjában a zománckristálykötegek térbeli orientálódásának elősegítése által.

## 6. Közlemények

Az Értekezés alapjául szolgáló, In Extenso Közlemények

Felszeghy, S., Hyttinen, M., Tammi, R., Tammi, M., Módis, L., Quantitative image analysis of hyaluronan expression in human tooth germs. *Eur J Oral Sci* 2000, (108), 320-326

IF: 1.296

Felszeghy, S., Holló, K., Módis, L., Lammi, M.: The type X collagen in Human enamel development: a possible role in mineralization. *Acta Odontol Scand* 58, 2000, (58), 171-176

IF: 0.798

Az Értekezés alapjául szolgáló, Közlésre benyújtott tudományos közlemény

Felszeghy, S., Módis, L., Tammi, M., Tammi, R.: The distribution pattern of the hyaluronan receptor CD44 during human tooth development. Közlésre benyújtva az *Archs oral Biol.*-hoz

Egyéb tudományos közlemény

Zákány, R., Bakó, É., Felszeghy, S., Holló, K., Balázs, M., Bárdos, H., Gergely, P., Módis, L.: Okadaic acid induced inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures. *Anat Embryol.* Közlésre elfogadva 2000. Június. 26

IF: 1.2

Egyéb benyújtott tudományos közlemény

Schulte-Altdorneburg, G., Droste, D.W., Felszeghy, S., Kellermann, M., Popa, V., Hegedűs, K., Hegedűs, Cs., Módis, L., Ringelstein E.B., Csiba, L.: Accuracy of in vivo carotid B-mode ultrasound compared to pathologic analysis: Intima-media thickening, lumen diameter and cross-sectional area. Közlésre benyújtva a *Circulation*-hoz. 2000. November