

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie

Mechanismy a dynamika přirozeného hojení zubu

Tereza Hollá

Jihomoravský kraj

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie

Mechanismy a dynamika přirozeného hojení zubu

Mechanisms and Dynamics of Natural Tooth Regeneration

Autor: Tereza Hollá
Škola: Gymnázium Brno, Křenová 304/36, p. o.
Kraj: Jihomoravský kraj
Vedoucí práce: doc. Mgr. Jan Křivánek, Ph.D.
Konzultanti: MDDr. Haneen Riadh Ali Tuaima
Marcos González López, MSc.
Bc. Margarita Gorbulina

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

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

V Brně dne 25.2.2025

Tereza Hollá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce doc. Mgr. Janu Křivánkovi Ph.D. za možnost vypracovat odbornou práci ve výzkumné skupině Dental Development and Regeneration na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Děkuji za vstřícnost, odborné vedení i podporu.

Velké díky patří všem členům výzkumné skupiny Jana Křivánka za přátelskou atmosféru a pomoc při praktických experimentech. Jmenovitě děkuji MDDr. Haneen Riadh Ali Tuaima za veškerý čas, jenž mi věnovala nejen při asistenci na praktických experimentech, ale i orientaci se studijním materiálem. Nápomocní mi byli také Marina Štruncová Ph.D., Marcos González López, MSc. a Bc. Margarita Gorbulina. Děkuji Štěpánce Keprtové za cenné rady ohledně psaní práce.

Dále chci poděkovat své škole, Gymnáziu Brno, Křenová p.o., za individuální přístup a ochotu během práce na praktických experimentech.

V neposlední řadě děkuji rodině a kamarádům za neustálou podporu.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JCMM a Jihomoravského kraje.

jihomoravský kraj



M U N I
M E D



Anotace

Hojení je vysoce dynamický proces, jenž je nezbytný pro správnou funkci tkání. Je to proces, který je řízený na několika úrovních. Zahrnuje mobilizaci imunitních buněk v místě poranění, buněčnou proliferaci, tvorbu extracelulární matrix i remodelaci poraněné tkáně. Uvnitř zubu hlodavců zahrnuje proces hojení mimo jiné diferenciaci mezenchymových kmenových buněk v odontoblasty a tvorbu terciárního dentinu, který překrývá vzniklou lézi. Mechanismy přenosu informací z poraněného místa k mikroprostředí kmenových buněk a jejich aktivace však dosud nejsou zcela známy.

K poodhalení tohoto zajímavého procesu byl využit unikátní modelový systém – kontinuálně dorůstající myší zub. Myší řezáky jsou schopny nepřetržité regenerace po celý život těchto zvířat. Je toho docíleno díky aktivním kmenovým buňkám, které se nacházejí v apikální (růstové) části zubu. Přetrvávání tohoto mikroprostředí kmenových buněk až do dospělosti poskytuje ideální systém pro studium dynamiky obnovy tkáně. Zajímavostí je, že na poranění nereaguje pouze apikální část zubu, ale i jeho distální část, která tvoří zásadní komunikující rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím.

Metodologicky tato práce zahrnuje práci s experimentálními laboratorními zvířaty, zkoumání aktivity jednotlivých buněčných typů pomocí imunohistochemie a pokročilých zobrazovacích technik, a to jak u zdravých, tak i u poškozených myších zubů. Rovněž byl sledován průběh hojení ran na úrovni tvrdých tkání. Tato práce pomáhá pochopit mechanismy, které jsou zodpovědné za přirozené hojící a regenerativní procesy zubu. Zaměřuje se na dosud neprozkoumanou distální část zubu a přináší tak nové hypotézy ke zkoumání interakce zubu s jeho vnějším prostředím a možnou souvislost s obranyschopností v tomto pozoruhodném modelovém systému.

Klíčová slova

Regenerace; kmenové buňky; kontinuálně rostoucí zuby; diferenciaci; proliferace; vývoj

Annotation

Healing is a highly dynamic process that is essential for proper tissue function. It is a process that is controlled on several levels. It involves the mobilisation of immune cells at the site of injury, cell proliferation and the formation of an extracellular matrix as well as the remodelling of injured tissue. Inside the rodent tooth, the healing process among other things involves differentiation of mesenchymal stem cells in the odontoblasts and formation of a tertiary dentin that overlays the resulting lesion. However, the mechanisms for transmitting information from the injured site to the stem cell niche and activating it are not yet fully understood.

A unique model system – a continuously growing mouse tooth – was used to uncover this interesting process. Mouse incisors are capable of continuous regeneration throughout the lives of these animals. This is due to the active stem cells found in the apical (growth) part of the tooth. The persistence of this stem cell microenvironment into adulthood provides an ideal system for studying the dynamics of tissue recovery. Interestingly, it is not only the apical part of the tooth that reacts to the injury, but also its distal part, which forms a crucial communicating interface between the internal and external environment.

Methodologically, this work involves working with experimental laboratory animals, examining the activity of individual cell types using immunohistochemistry and advanced imaging techniques, both in healthy and damaged mouse teeth. The course of wound healing at the level of hard tissues was also monitored. This work helps to understand the mechanisms responsible for the natural healing and regenerative processes of the tooth, focuses on the previously unexplored distal part of the tooth and thus provides new hypotheses to investigate the interaction of the tooth with its external environment and the possible link to defences in this remarkable model system.

Keywords

Regeneration; stem cells; continuously growing teeth; differentiation; proliferation; development

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Anatomie, morfologie a funkce myšího řezáku	10
2.2 Vývoj a evoluce kontinuálně dorůstajícího chrupu	13
2.2.1 Odontogeneze myšího řezáku	13
2.2.2 Evoluční vývoj	14
2.3 Buněčný systém pulpy myšího řezáku	15
2.3.1 Imunitní buňky	15
2.3.2 Lymfatický systém	17
2.3.3 Cévní systém	17
2.3.4 Nervový systém	17
2.4 Interakce mikroprostředí zubu po poranění	18
3 Materiály a metody	20
3.1 Imunohistochemie	20
3.1.1 Odběr, fixace, dekalcefikace a zmrazení vzorků	21
3.1.2 Barvení pomocí protilátek	22
3.1.2.1 Detekované antigeny	23
3.1.3 Analýza pomocí konfokálního mikroskopu	24
3.2 Histologické zpracování	24
3.2.1 Odběr, fixace, dekalcefikace vzorků a jejich zalití do parafínu	24
3.2.2 Barvení	25
3.2.2.1 Hematoxylin eosin	25
3.2.2.2 Massonův modrý trichrom	26
3.2.3 Pozorování pomocí optického mikroskopu	27
3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie	28
3.3.1 Odběr, fixace a oplach vzorků	28
3.3.2 Dehydratace vzorků, leptání kyselinou a pozlacení	28
3.3.3 Analýza pomocí elektronového mikroskopu	29

4 Výsledky	30
4.1 Detekce buněčných typů ve špičce řezáku	30
4.1.1 Porovnání zdravých a poraněných řezáků	30
4.1.2 Specifikace dalších antigenů ve zdravém řezáku	33
4.1.3 Detekce DMP1 a DSPP proteinů	37
4.2 Morfologická struktura řezáku	42
4.2.1 Mandibula	42
4.2.2 Maxila	44
4.3 Hojení na úrovni tvrdých tkání	45
5 Diskuse	49
6 Závěr	51
7 Seznam obrázků	52
8 Seznam tabulek	55
9 Použitá literatura	56

Seznam zkratek

AIF1 – *allograft inflammatory factor 1*; protein

BMP – kostní morfogenetický protein (*bone morphogenetic protein*)

BSA – hovězí sérový albumin (*bovine serum albumine*)

CD90/THY1 – *thymus cell antigen 1*; protein

COL4 – *collagen IV*; protein

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol

DMP1 – *dentin matrix acidic phosphoprotein 1*; protein

DSPP – *dentin sialophosphoprotein*; protein

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EMCN – *endomucin*; protein

FGF – fibroblastový růstový faktor (*fibroblast growth factor*)

HERS – Hertwigova epitelová kořenová pochva (*Hertwig's epithelial root sheath*)

IHC – imunohistochemie

laCL – labiální cervikální klička (*labial cervical loop*)

liCL – lingvální cervikální klička (*lingual cervical loop*)

OCT – optimální směs pro řeznou teplotu (*optimal cutting temperature compound*)

PBS – fosfátový pufovaný fyziologický roztok (*phosphate-buffered saline*)

PBS-T – fosfátový pufovaný fyziologický roztok s Tween-20

PDL – periodontální ligament

PFA – paraformaldehyd

SEM – rastrovací elektronový mikroskop (*scanning electron microscope*)

Shh – *Sonic hedgehog*; protein

TUJ1 – *class III beta-tubulin*; protein

Wnt – signální dráha

1 ÚVOD

Kontinuálně dorůstající chrup neboli hypselodontní chrup, je unikátní adaptací hlodavců a zajícovců či zvířat s kly, jako jsou sloni, divoká prasata, mroži nebo narvalové. Tato vlastnost je umožněna přítomností kmenových buněk v apikální části zubu, jež se mohou neustále diferencovat a proliferovat. Díky tomu se při abrazi či poškození prostřednictvím různých signálních drah kmenové buňky aktivují a zubní tkáň se obnoví (Renvoisé and Michon, 2014). Pokud dojde k mechanickému poškození řezáku, zub svůj růst rapidně akceleruje do délky (An et al., 2018).

Pro studium tohoto pozoruhodného mechanismu je často jako modelový organismus využívána myš domácí (*mus musculus*), jejíž řezáky představují unikátní systém pro studium kmenových buněk, procesů regenerace či signálních drah regulujících tyto procesy.

Uvnitř pulpy řezáku se nenachází pouze kmenové buňky. Jedná se o velmi heterogenní prostředí zahrnující cévní, nervové a lymfatické zásobení či imunitní buňky. Tyto složky výrazně přispívají jak k imunitní obraně řezáku, tak i k mechanismům při regeneraci. Při hojení tak dochází ke komplexním mechanismům, které se navzájem ovlivňují (Yu and Klein, 2020).

Mechanismy přenosu signálů z místa poranění (distální část) směrem ke kmenovým buňkám však zatím nejsou známy. Ačkoliv se špička řezáku neustále mechanicky obrušuje, nachází se zde opět mnoho buněčných složek podílejících se na homeostáze řezáku, jmenovitě například makrofágy či buňky asociované s krevními cévami (Krivanek et al., 2017). Ve špičce řezáku je pulpa chráněna pouze tenkou mineralizovanou vrstvou, je tedy v blízkém kontaktu s vnějším prostředím (Pang et al., 2016).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anatomie, morfologie a funkce myšího řezáku

Myší lebka (*calva*) se skládá z horní čelisti (maxily) a dolní čelisti (mandibuly), mezi nimi se nachází diastema. Chrup myši je charakterizován jako heterodontní, je tvořen čtyřmi řezáky (incisivy) a dvanácti stoličkami (moláry), které vykazují rozdílnou morfologii a funkci (Renvoisé and Michon, 2014; Treuting and Morton, 2012). Myší moláry řadíme mezi brachyodontní chrup, neboť se vyznačuje nízkou korunkou nad úrovní dásně (gingivy) a dobře vyvinutými kořeny zasazenými do alveolární kosti čelisti. Unikátním modelovým systémem pro další studium jsou řezáky, které jsou označovány jako hypselodontní, jež lze charakterizovat jako kontinuálně dorůstající chrup bez utvořených kořenů. U herbivorů jsme navíc schopni rozlišit chrup hypsodontní, mající korunku výše nad úroveň gingivy, kde samotná korunka převažuje délku celého zubu. Tato modifikace je uzpůsobena pro zpracovávání abrazivní potravy (Renvoisé and Michon, 2014; Yu and Klein, 2020).

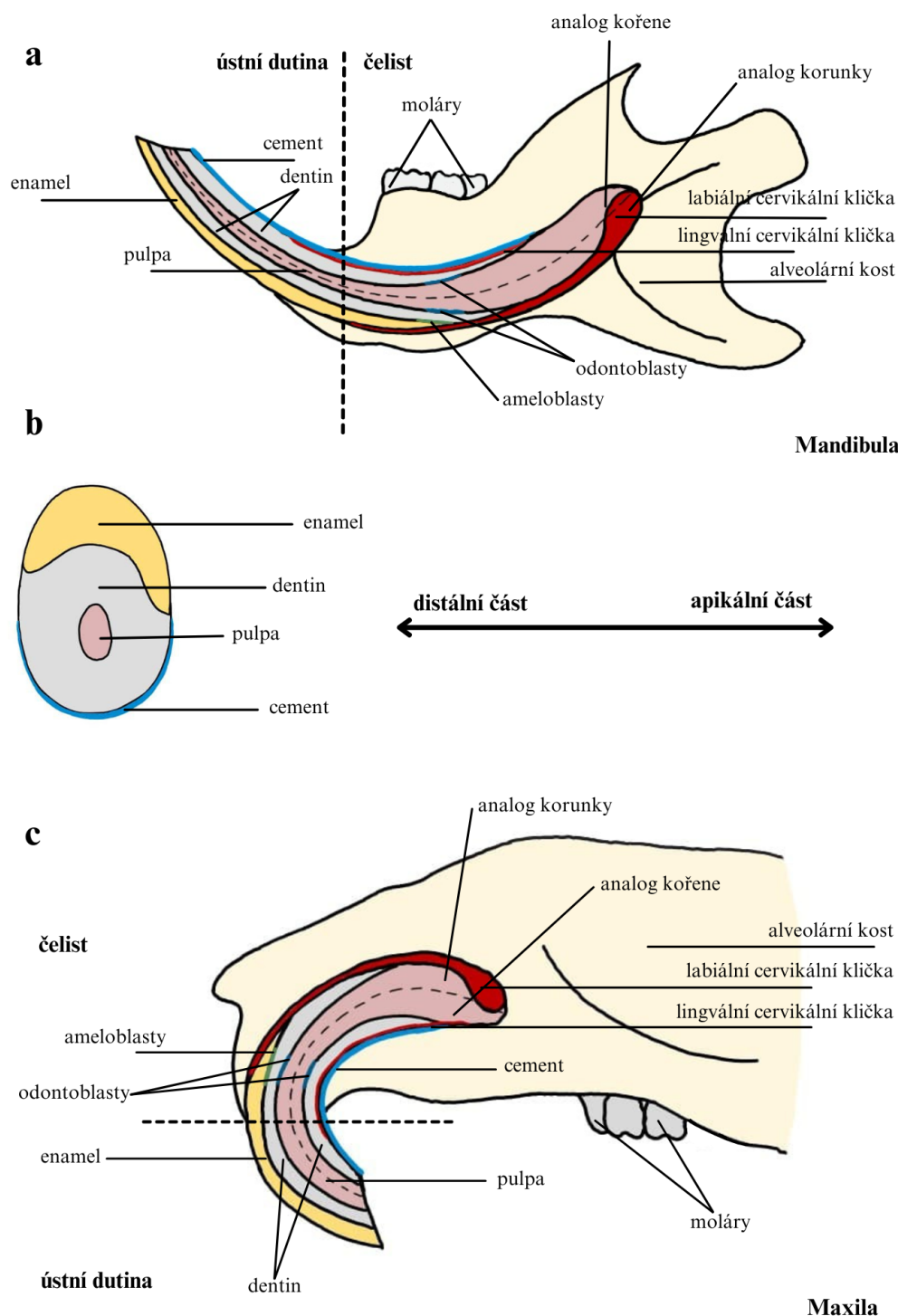
Myší řezák nemá přímo rozlišitelnou korunku a kořen. Narozdíl od molárů, jež mají korunku v dutině ústní a kořen v čelisti, rozlišujeme řezák na analog kořene (lingvální strana) a analog korunky (labiální strana). Takovéto rozlišení je z důvodu uspořádání buněčných typů, jež jsou typická pro korunku či kořen. Oba dva tyto analogy tak zasahují jak do ústní dutiny, tak do čelistní kosti (Krivánek et al., 2017; Yu and Klein, 2020).

Řezáky se vyznačují širokým apikálním otvorem (foramenem), ve kterém přímo prochází pulpa obsažená uvnitř zubní dutiny řezáku. Pulpa obsahuje například stromální buňky pulpy (fibroblasty), krevní zásobení, odontoblasty a nervové buňky, které vyživují zub (Treuting and Morton, 2012). Může být obnovena díky mezenchymovým kmenovým buňkám (Krivánek et al., 2017).

Součástí pulpy jsou odontoblasty, které jsou zodpovědné za tvorbu zuboviny (dentin). Odontoblasty jsou tvořeny z mezenchymových kmenových buněk. Kmenové buňky sestávají z lingvální cervikální kličky (analog kořene), labiální cervikální kličky (analog korunky) a mezi nimi se nachází právě mezenchymové kmenové buňky. Nejprve je vytvořen predentin, jenž je následně zmineralizován do nebuněčného avaskulárního dentinu, což zasouvá odontoblasty hlouběji do pulpy. (Krivánek et al., 2017; Treuting and Morton, 2012; Yu and Klein, 2020) Každý tento proces má svůj vlastní kanál nazývaný dentinový tubul, který se podílí na dentinových opravách a tvoří mechanosenzorický systém (Shuhaibar et al., 2021). Spolu s pulpou utváří dentino-pulpální komplex reagující na vnější prostředí a udržující homeostázu (Lavický et al., 2022).

Výhradně v analogu korunky se nachází jedna řada ameloblastů tvořící enamel pouze pomocí labiální cervikální kličky. Ameloblasty jsou tvořeny z epitelových kmenových buněk. Produkce skloviny (enamel) začíná vytvořením enamelové matrix. Enamelová matrix se skládá z proteinů ameloblastinu, enamelinu a amelogeninu, jež následně díky hydroxyapatitu řídí mineralizaci do podoby enamelu, nejtvrďší tkáň v těle. Enamel je zbarven do žluta z důvodu výskytu železa mezi enamelem a dentinem, jež mezi sebou vzájemně interagují a tvoří tzv. dentino-enamelovou spojnici (Krivanek et al., 2017; Treuting and Morton, 2012; Yu and Klein, 2020).

Na kořenové straně dentinu se nachází cementoblasty, jež produkují cement díky mezenchymovým kmenovým buňkám, v tomto případě v oblasti lingvální cervikální kličky. Cement rozlišujeme na buněčný, který se nachází blíže dorzálního kořene u něžž je tlustší, a nebuněčný, ležící blíže frontální části kořene. Pomáhá řezáku k lepšímu uchycení do čelisti (Krivanek et al., 2020; Treuting and Morton, 2012; Yu and Klein, 2020). Řezák je vnořen do alveolární kosti pomocí pojivové tkáň periodontálních ligamentů (Lavicky et al., 2022).



Obr. 1: Anatomie myší mandibuly, maxily a okluzní části řezáku (vlastní nákres, 2025).

a – Schematický nákres mandibuly na sagitálním řezu. Vertikální přerušovaná čára rozděluje řezák na čelist a ústní dutinu. Přerušovaná čára uvnitř pulpy značí analog kořene, kde se nachází cement a lingvální cervikální klička. Pod vrstvou cementu je dentin tvořený odontoblasty. Z opačné strany se nachází analog korunky, kde najdeme enamel, tvořen ameloblasty a labiální cervikální kličku. Mezi enamelem a pulpou se taktéž nachází odontoblasty. Řezák je vnořen do alveolární kosti. V oblasti čelisti se navíc nachází 3 moláry. **b** – Schematický nákres okluzní plochy řezáku, dle transverzálního řezu. Značí enamel, dentin, pulpu a cement. **c** – Schematický nákres maxily dle sagitálního řezu. Horizontální přerušovaná čára rozděluje řezák na čelist a ústní dutinu. Přerušovaná čára uvnitř pulpy

rovněž značí analog kořene a korunky. Tyto analogy vykazují stejnou morfologii jako u mandibulárního řezáku.

Pro myši (a hlodavce obecně) je typická jejich schopnost regenerace díky kmenovým buňkám v apikální části řezáku. Důvodem je převážně jejich způsob života. Při zpracování potravy a zkoumání okolního prostředí jsou jejich zuby neustále obušovány. U přerostlých řezáků tak často dochází k podvýživě (Treuting and Morton, 2012). Labiální strana řezáku je více rezistentní vůči abrazi, než ta lingvální, neboť se na ní nachází enamel, který je tvrdší než dentin. Dochází tak k asymetrické abrazi a řezák má ostrou špičku (Boran et al., 2009). Jak se řezák obušuje a dorůstá, v každé jeho části jsou buňky v jiné fázi vývoje. V apikální části s kmenovými buňkami se nachází buňky nejmladší, v distální části naopak nejstarší (Krivánek et al., 2017).

2.2 Vývoj a evoluce kontinuálně dorůstajícího chrupu

2.2.1 Odontogeneze myšího řezáku

Savčí chrup je vyvíjen ze dvou zárodečných listů, konkrétně z epitelového ektodermu a mezenchymové neurální lišty, jež mezi sebou vzájemně interagují (Jheon et al., 2013). Na počátku se postupně zvětšuje orální epitel, až se utvoří primární dentální lišta udávající linii pro budoucí zubní řadu. Vytvoří se dentální plakody, první signální centrum pro vznik chrupu (Thesleff and Tummers, 2008). Tyto plakody se akumulují do podoby iniciačního uzlíku, jenž proliferuje do následných vývojových stádií, při nichž začínají být zuby rozlišitelné: stádium pupenu, stádium čepičky a zvoncové stádium (Jernvall and Thesleff, 2012; Yu and Klein, 2020).

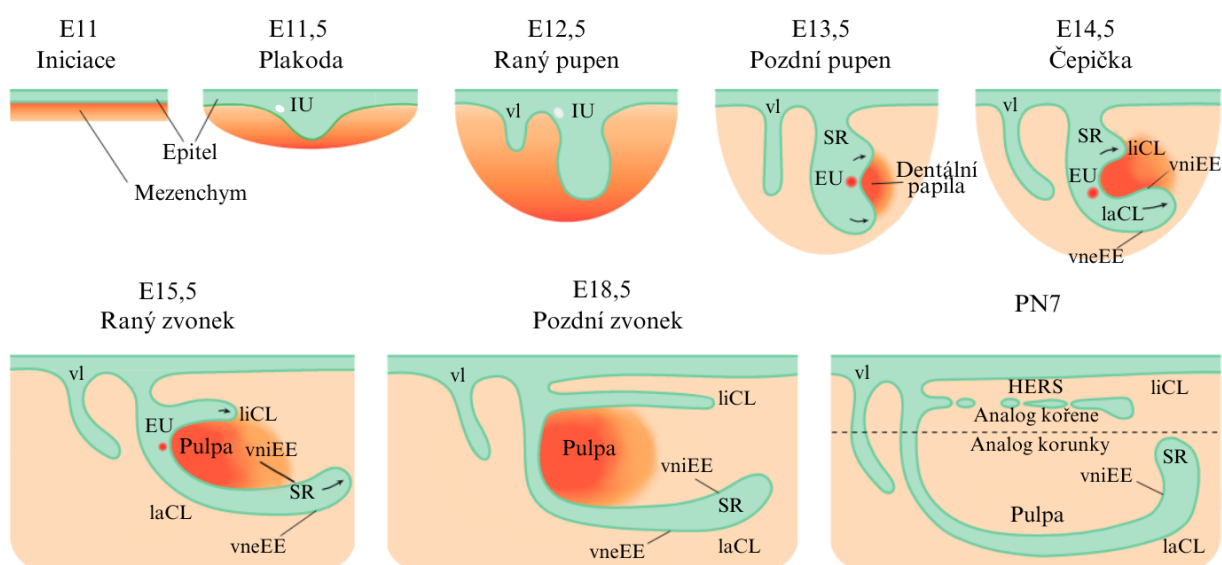
Při stádiu pupenu se dentální epitel vchlípí do dentálního mezenchymu. Ten se okolo něj kondenzuje, formuje jeho tvar a interaguje s epitelem prostřednictvím signálních molekul (Jernvall and Thesleff, 2012). Exprimují je primární enamelové uzly, jež nahradí iniciační uzel, konkrétně jsou to například signální molekuly BMP (kostní morfogenetický protein), FGF (fibroblastový růstový faktor), Wnt signalizace a Shh (sonic hedgehog) (Jernvall and Thesleff, 2012; Yu and Klein, 2020). Tvoří se další epitelová struktura – vestibulární lišta, rozlišující budoucí rozhraní mezi rty a chrupem (Yu and Klein, 2020). Pupen se dělí na dvě histologicky rozdílné linie: periferní bazální buňky a stellátové (hvězdčovitě) retikulum, jenž bude následně tvořit epitelové složky mikroprostředí kmenových buněk (Thesleff and Tummers, 2008). Z mezenchymu mezi epitelem vzniká dentální papila, okolo níž se proliferují základy pro cervikální kličky (Yu and Klein, 2020). Papila bude utvářet pulpu a odontoblasty (Thesleff and Tummers, 2008). Dále pupen z mezenchymu formuje periferní dentální folikuly, utvářející cementoblasty a periodontální tkanivo (Krivánek et al., 2017; Thesleff and Tummers, 2008).

Při stádiu čepičky se epitel více rozšiřuje do mezenchymu a obaluje jej (Jernvall and Thesleff, 2012). Na labiální a lingvální ose okolo dentální papily začínají z enamelového uzlíku vznikat labiální a lingvální cervikální kličky a prodlužují se do dentálního mezenchymu (Yu and Klein, 2020). U kontinuálně rostoucích zubů zůstává struktura

cervikální kličky zachována i po dokončené ontogenezi (Thesleff and Tummers, 2008). Buňky epitelu se diferencují na vnější enamelový epitel a vnitřní enamelový epitel, jenž bude tvořit ameloblasty (Krivanek et al., 2017).

Ve stádiu zvonku se okolo hvězdovitého retikula tvoří labiální cervikální klička. Lingvální cervikální klička se vyvíjí také, ovšem pomaleji. Dentální papila je nakonec přeměněna na pulpu (Yu and Klein, 2020).

V postnatálním vývoji se na lingvální straně vyvine Hertwigova epitelová kořenová pochva (HERS) (Yu and Klein, 2020). Ta určuje tvar kořene a stimuluje diferenciaci odontoblastů či cementoblastů v kořenové oblasti (Huang et al., 2009). Myší řezák však nikdy nevyvine samostatný kořen, ale dojde pouze k asymetrii mezi analogem kořene a analogem korunky (Renvoisé and Michon, 2014). HERS tak zůstává v malých fragmentech v periodontálním tkanivu (Krivanek et al., 2017).



Obr. 2: Odontogeneze myšního řezáku (převzato a přeloženo z Yu a Klein, 2020). Schematický náčrt odontogeneze. E značí embryonální den vývoje. PN potom den postnatální. Zkratky: IU – iniciační uzlík, vl – vestibulární lišta, SR – stellátové retikulum, EU – enamelový uzlík, liCL – lingvální cervikální klička (lingual cervical loop), laCL – labiální cervikální klička (labial cervical loop), vniEE – vnitřní enamelový epitel, vneEE – vnější enamelový epitel, HERS – Hertwigova epitelová kořenová pochva (Hertwig's epithelial root sheath).

2.2.2 Evoluční vývoj

Evoluční modifikace zubů probíhají během ontogeneze, neboť po prořezání již nemůže chrup změnit tvar (Jernvall and Thesleff, 2012). Hypselodontní chrup vznikne, když se u hypsodontního chrupu nevyvinou zcela kořeny, důležité je tak načasování přechodu mezi korunou a kořenem (Jernvall and Thesleff, 2012; Renvoisé and Michon, 2014). Nachází se u hlodavců a zajíců, či u zvířat s kly, jako jsou sloni, divoká prasata, mroži nebo narvalové (Krivanek et al., 2017). Nicméně, ne veškerý kontinuálně dorůstající chrup se vyznačuje

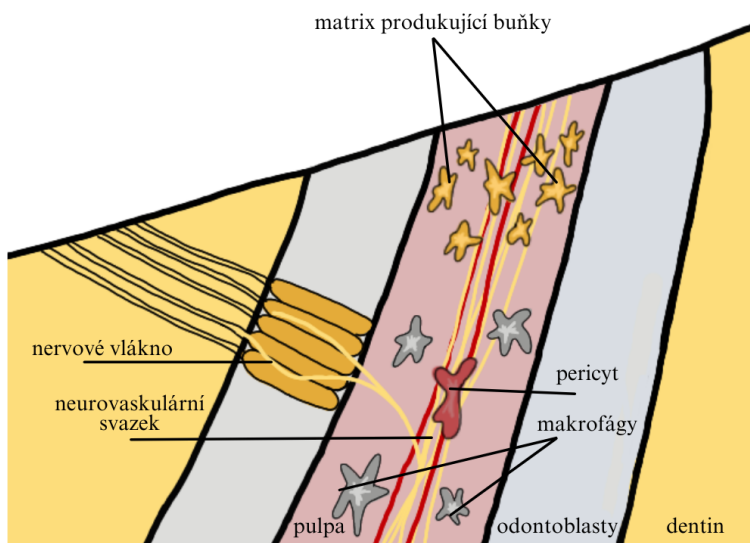
stejným tkáňovým uspořádáním. Například hlodavci mají asymetrické řezáky, kde je enamel pouze na labiální straně řezáku (Renvoisé and Michon, 2014).

Hlodavci jsou si evolučně nejbližší se zajícovci, u nichž jsou důkazy o hypselodontii již v době paleocénu (asi před 60 miliony lety). Naopak u chobotnatců, sudokopytníků či hrabáčovitých se tento dentální aspekt vyskytuje nejdříve v období miocénu (asi před 15 miliony lety) (Renvoisé and Michon, 2014).

2.3 Buněčný systém pulpy myšího řezáku

Ačkoliv se dentální pulpa skládá z mezenchymových částí, je také velmi hojná pro imunitní systém, což zajišťuje její buněčnou různorodost. Zároveň je pulpa jednou z nejvíce inervovaných tkání v celém těle a taktéž je hojně prokrvena z důvodu výživy zubu. Různorodost pulpy tak značně přispívá k regeneraci zubu (Křivanek et al., 2017).

Lze si všimnout blízkých vztahů mezi různými imunitními buňkami a odontoblasty. Odontoblasty jsou schopny detekovat patogeny a utváří si vlastní obranné mechanismy jako oxid dusnatý či defensiny – antimikrobiální peptidy, jež narušují integritu membrán u patogenů, čímž je usmrtí. Interagují s pulpou a varují tak imunitní buňky k reakci na patogeny (Farges et al., 2015).



Obr. 3: Detail na buněčné prostředí špičky řezáku (vlastní nákres podle Křivánek et al., 2017). Schematický nákres distální části řezáku. Uvnitř pulpy se nachází tzv. neurovaskulární svazek, jenž vyživuje prostředí zubu. Nervová vlákna přecházejí skrze odontoblasty až do dentinových tubulů. Dále se v pulpě mimo jiné vyskytují makrofágy, pericyty a matrix produkující buňky.

2.3.1 Imunitní buňky

Prostředí zubu musí být připraveno reagovat na infekci. Potenciálně taktéž imunitní buňky přispívají k opravám tvrdých tkání. Zatím nejsou přesně známy mechanismy vývoje

imunitních buněk v zubu. Většina mechanismů se však odehrává v pozdně embryonálním až raně postnatálním období (Krivanek et al., 2017).

V zubu působí jak vrozená, tak adaptivní imunita. Při invazi nejprve reagují fagocytující buňky vrozené imunity, které nejsou antigenně specifické. K rozpoznání škodlivých buněk jim slouží receptory. Pokud vrozená imunita nedokáže patogen sama odstranit, jsou vyvolány buňky adaptivní imunity, které jsou antigenně specifické a podporují tak funkci vrozené imunity (Hahn and Liewehr, 2007).

Makrofágy jsou fagocytující buňky, jež se diferencují z monocytů cirkulující krví při migraci do tkání (Charles A Janeway et al., 2001). Chrání zub před infekcí a podílejí se na odstraňování stárnoucích buněk. Mohou se šířit celou pulpou, a dokonce se mohou dostat i do dentinových tubulů. Většina makrofágů v pulpě se množí lokálně bez nabírání nových z krevního řečiště. Pravděpodobně také regulují diferenciaci odontoblastů (Krivanek et al., 2017).

Dendritické buňky jsou podobné makrofágům, mají však slabší schopnost fagocytózy a spíše využívají endocytózy zprostředkované receptorem (Jontell et al., 1998). Často jsou rovněž brány jako hranice mezi pulpou a vrstvou odontoblastů (Krivanek et al., 2017). Při detekci bakteriálních antigenů putují do lymfatických uzlin pomocí lymfatických cév a informují T-lymfocyty (Charles A Janeway et al., 2001).

Třetím typem fagocytujících imunitních buněk jsou neutrofilové. U myši se však vyskytují v menším procentuálním zastoupení než u člověka. Myši mají naopak větší počet T-lymfocytů (Mestas and Hughes, 2004).

Mastocyty se obvykle nacházejí v blízkosti malých cév. Při jejich aktivaci vylučují látky ovlivňující cévní permeabilitu. Předpokládá se, že jejich rolí je ochrana slizničních povrchů před patogeny (Charles A Janeway et al., 2001).

Pokud se v zubu vyskytne chronická infekce, do zubu infiltrují T-lymfocyty (Krivanek et al., 2017). Dokud nenarazí na antigen, jsou obvykle malé a neaktivní (Charles A Janeway et al., 2001). V zubní pulpě se nejvíce vyskytují CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty, schopné samy eliminovat nakažené buňky. Dále jsme schopni rozlišit CD4⁺ lymfocyty, jež po specifickém rozpoznání pomocí antigenu aktivují cytokiny jako makrofágy či B-lymfocyty. Obecně T-lymfocyty chrání zub před virovými infekcemi a jsou schopny zvýšit míru fagocytózy. Jsou vysoce migratorní a dokážou se pohybovat (Jontell et al., 1998; Krivanek et al., 2017).

B-lymfocyty se při aktivaci diferencují na plazmocyt, které začnou produkovat protilátky (Charles A Janeway et al., 2001). Byly detekovány i ve zdravé pulpě, při zánětu se jejich počet zvyšuje (Farges et al., 2015).

Posledním typem lymfocytů jsou přirození zabíječi, NK buňky, které nemají specifické antigenní receptory, přesto jsou však schopny detekovat a usmrtit abnormální buňky (Charles A Janeway et al., 2001). Byly také detekovány ve zdravé pulpě (Farges et al., 2015).

2.3.2 Lymfatický systém

Lymfatické cévy, nacházející se v pulpě, slouží jako imunitní ochrana a odvádějí přebytečné tekutiny pro udržování homeostázy. Jsou slepě zakončené a při zánětu vznikají nové, aby zvýšily svou obranyschopnost. Tento proces se nazývá lymfangiogeneze. (Berggreen et al., 2009). Hojně koexistují s krevními cévami, jež se také podílejí na homeostáze (Matsumoto et al., 2002).

Lymfatické uzliny v oblasti čelisti můžeme rozlišit na mandibulární lymfatickou uzlinu (*ln. mandibularis*) a přídatnou mandibulární lymfatickou uzlinu (*ln. mandibularis accessorius*) (Linden et al., 2012). Větví se od nich lymfatické cévy (Berggreen et al., 2009).

Lymfatické cévy jsou vedeny periodontálním ligamentem, jenž nejvíce propojuje alveolární kost, ale také ostatní zuby. Infekce se tudíž může šířit z jednoho zubu na druhý. Z periodontálního ligamenta vstupují cévy do zubu přes apikální foramen. Samotné cévy se hojně nacházejí v apikální části zubu a směrem k distální části jich ubývá. V distální části se ale hojně vyskytují lymfatické buňky. Než se přebytečné tekutiny dostanou do slepě zakončených lymfatických cév v apikální části řezáku, je jejich odvod zajištěn tlakovým gradientem uvnitř pulpy. Tento systém je typický pro kontinuálně rostoucí řezák, neboť moláry jsou vedeny lymfatickými cévami přes celou pulpu (Berggreen et al., 2009). Obecně se lymfatické cévy vyskytují více ve středu pulpy, blíže odontoblastům jich je méně (Matsumoto et al., 2002).

2.3.3 Cévní systém

Krevní cévy se v zubu nachází již v raném stádiu embryonálního vývoje (Krivanek et al., 2017). Drobné cévy vstupují do zubní pulpy přes apikální foramen, odkud se od kořenové části větví přes celou pulpu, která je silně prokrvena. Při reakci na bolest se zvýší prokrvení uvnitř pulpy. Důvodem je pravděpodobně reakce nervových buněk, které komunikují s cévním zásobením (Orchardson and Cadden, 2001; Saghiri et al., 2018). Cévy lemují endotelové buňky, jež cévám utváří permeabilní bariéru, také regulují homeostázu či imunitu. Taktéž hrají roli při angiogenezi – tvorba nových krevních cév z již existujících kapilár (Saghiri et al., 2018).

Blízko špičky zubu se u krevních cév nachází pericyty, jež produkují buňky podobné odontoblastům a tenkou mineralizovanou vrstvou uzavírají otevření pulpy na špičce řezáku. Díky tomu zabraňují infekci či reagují na poranění (Pang et al., 2016; Yianni and Sharpe, 2020). Pericyty se tak podílejí na udržování homeostázy tkáně a také slouží jako rezervoár pro regenerativní buňky (Krivanek et al., 2017).

2.3.4 Nervový systém

Nervové glie trojklanného nervu (*nervus trigeminus*) přispívají k obnově kontinuálně rostoucího řezáku (Krivanek et al., 2017). Trojklanný nerv, jeden z hlavových nervů, inervuje

obličejovou část a také maxilu i mandibulu, kde se dále větví na několik dalších vláken. Před vstupem do řezáku se dolní alveolární nerv (*nervus alveolaris inferior*) větví na nerv bradový (*nervus mentalis*) a nerv řezákový (*nervus incisivus*), jenž postupuje dále. Nejvíce myelinizované nervy se nacházejí právě v nervu řezákovém. Je silně inervováno periodontium, v pulpě se nachází pouze řídká síť těchto nervů. Nervy vcházejí do pulpy v těsné blízkosti s krevními cévami přes apikální foramen v apikální části zubu. Odtud se větví do drobných nervových fascikulů (Hagan et al., 2012; Naftel et al., 1999). Společně s krevními cévami jsou stále v blízkém kontaktu a tvoří tzv. neurovaskulární svazek (Zhao et al., 2014).

V oblasti krevních cév nejsou nervy myelinizované, ale hojně se u nich vyskytují gliové buňky (Zhao et al., 2014). Gliové buňky jsou zodpovědné za ochranu a výživu neuronů. V periferní nervové soustavě je tvoří Schwannovy buňky (Bazira, 2021). Ty se rovněž podílejí na tvorbě regenerativního dentinu po poranění a s pomocí dalších složek v pulpě také na regeneraci periferních nervů (Couve and Schmachtenberg, 2018; Kaukua et al., 2014).

Existuje několik teorií o senzorickém rozpoznávání podnětů v pulpě. Neuronální teorie tvrdí, že jsou stimuly přenášeny nervovými zakončeními uvnitř tubulů v dentinu. Hydrodynamická teorie naopak popisuje vnímání změn tlaku tekutiny uvnitř dentinových tubulů, které následně snímají buď odontoblasty nebo nervová zakončení. Další teorie zmiňuje, že odontoblasty fungují jako přímý přenos těchto podnětů do nervových zakončení (Couve and Schmachtenberg, 2018).

Nervové buňky interagují s imunitním systémem. Pokud zub ztratí nervové zásobení, sníží se počet imunitních buněk. Naopak při zubním kazu se jejich počet zvyšuje (Krivanek et al., 2017).

2.4 Interakce mikroprostředí zubu po poranění

Při poranění dojde v zubu k několika reparativním procesům, které tak tvoří velmi komplexní reparativní systém.

V místě poranění reagují nervová zakončení, gliové buňky, krevní cévy a imunitní buňky, jak již bylo popsáno blíže v kapitole *Buněčný systém pulpy myšího řezáku*. Specificky na poranění nervových vláken reagují Schwannovy buňky (Couve and Schmachtenberg, 2018). Regenerace zahrnuje tvorbu extracelulární matrix, jež poskytuje podporu okolním buňkám a také aktivuje signální molekuly. Signální molekuly aktivují několik signálních drah, které zrychlí proliferaci kmenových buněk v oblasti cervikálních kliček. Jedná se o již zmíněné FGF, BMP, Wnt, Shh a další. Tyto signální dráhy se podílí na udržování homeostázy řezáku během jeho sebeobnovy (Goldberg et al., 2008; Yu and Klein, 2020).

Pokud je řezák zastřižen, zub rapidně urychlí svůj růst do délky. V takovém případě dochází k aktivaci klidových buněk, jež se začnou mitoticky dělit a obnoví populaci mezenchymálních kmenových buněk CD90/THY1. Tyto buňky se při akcelерованém hojení podílejí na proliferaci a diferenciaci odontoblastů a buněk pulpy, které napomáhají regeneraci. Jakmile jsou oba řezáky ve vzájemném kontaktu (okluze), dochází k abrazi řezáku a následné

ztrátě tkání v oblasti špičky. Růst řezáku se stabilizuje tak, aby odpovídal abrazi, čímž dochází k homeostáze (An et al., 2018). Rovnoměrně s dorůstáním řezáku dochází také ke ztlušťování stěny dentinu (Gonzalez Lopez et al., 2023).

Na pomezí vývoje epitelových kmenových buněk a ameloblastů jsou epitelové progenitory, které nejsou zcela diferencované a v reakci na poranění se mohou přizpůsobit a produkovat jiné typy buněk (Yu and Klein, 2020). Při poranění taktéž epitelové kmenové buňky pomocí signálních drah urychlí produkci ameloblastů a následnou tvorbu enamelu (Yu et al., 2015).

Dentino-pulpální komplex začne při reakci na poranění tvořit tzv. terciární dentin. Podle závažnosti poranění se tvoří během procesu reaktivní nebo reparativní dentinogeneze (Yu et al., 2015). Při mírném poškození dojde k tzv. reaktivní dentinogenezi z již diferencovaných odontoblastů. Při závažném poškození jsou díky mezenchymálním kmenovým buňkám aktivovány signální dráhy a dochází k reparativní dentinogenezi, kdy jsou aktivovány progenitorové buňky, které se diferencují v buňky podobné odontoblastům produkující dentin. Na místo poranění jsou taktéž dopraveny zánětlivé buňky produkující růstové faktory, což podporuje produkci dentinu (Pang et al., 2016; Yu and Klein, 2020).

Podél délky řezáku se začleňuje nově syntetizovaný dentin. Ještě rapidněji se mineralizuje otvor ve špičce řezáku, ale se značně nižším podílem mineralizace. Tuto mineralizaci způsobují již zmíněné pericyty bránící pulpu před vnějším prostředím a možnou infekcí. V oblasti špičky řezáku se při kontinuální regeneraci mineralizovaná tkáň formuje pomocí pericytů, jež se diferencují do odontoblastů s expresí proteinu DSPP (*dentin sialophosphoprotein*), který produkuje materiál podobný dentinu, nazývaný reparativní dentin. Reparativní dentin nemá stejnou strukturu jako tubulární dentin, a proto je často nazýván jako osteodentin, protože může obsahovat buňky vypadající podobně jako kostní osteocyty a není příliš mineralizovaný. Z důvodu tvorby reparativního dentinu při neustálé abrazi a expozici pulpy do vnějšího prostředí nedochází k infekcím. Tento proces není stimulován poškozením, ale dochází k němu i v případě omezené abraze a probíhá kontinuálně (Pang et al., 2016).

3 MATERIÁLY A METODY

Výzkumný projekt se skládal ze 3 samostatných experimentů a to z:

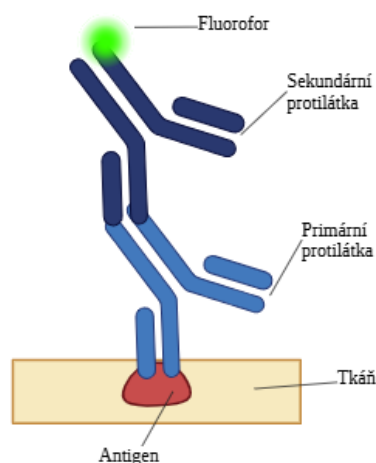
- detekce jednotlivých markerů pomocí imunohistochemie
- prozkoumání zubní struktury díky histologickým metodám barvení
- rastrovací elektronové mikroskopie pro lepší pochopení tvrdé tkáně po poškození zubu

3.1 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je laboratorní metoda používaná pro vyhledání specifického antigenu v tkáních za pomoci fluorescenčního barvení. Metoda je založena na principu funkce imunitního systému (protilátky, které specificky vyhledají škodlivý antigen a zničí jej). Zde jsme pracovali s nepřímou dvoustupňovou metodou: primárními a sekundárními protilátkami (Creager et al., 2017).

Primární protilátka se specificky váže na námi zvolený antigen. Sekundární protilátka obsahuje fluorofor, který způsobuje fluorescenční záření a naváže se na primární protilátku, což způsobí samotnou fluorescenci v tkáni a díky tomu ji můžeme vizualizovat (Creager et al., 2017).

Vlastní příspěví: V rámci výzkumu jsem se aktivně podílela na všech fázích experimentu. Byla jsem poučena o manipulaci s laboratorními zvířaty a mnohokrát navštívila sterilní prostředí zvířecího výzkumného chovu. Po proškolení jsem samostatně provedla disekci čelistí a připravila vzorky k zamrazení. Samostatně jsem nakrájela vzorky na kryotomu a s drobnou asistencí jsem provedla imunohistochemické barvení pomocí stanoveného protokolu. Byla jsem přítomna u snímání vzorků konfokálním mikroskopem a část snímků jsem v programu Imaris zanalyzovala samostatně.



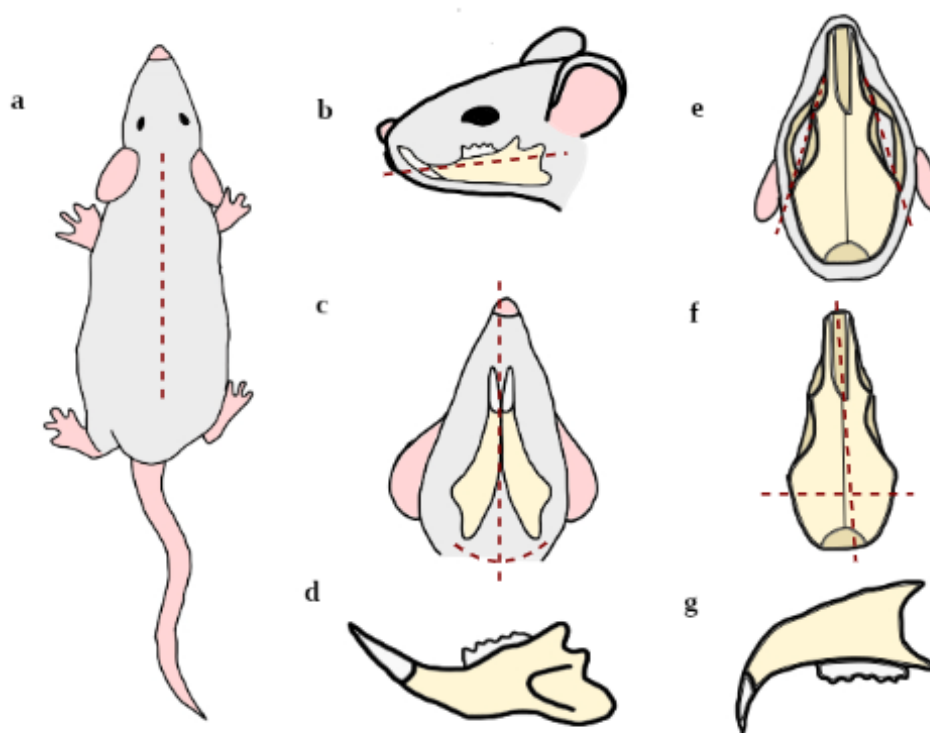
Obr. 4: Princip imunohistochemie (vlastní náčrt vytvořený pomocí BioRender, 2024)

3.1.1 Odběr, fixace, dekalcifikace a zmrazení vzorků

V rámci experimentu byly získány vzorky z myších samic ve věku 6-8 týdnů. Pracovali jsme se 3 konkrétními kmeny:

- C57BL/6 (zkráceně Bl6), jež nebyl nijak geneticky modifikován.
- F/D2, charakterizován jako *wildtype*, tudíž bez cílených změn v genomu.
- *DMP1-Cherry/DSPP-Cerulean* – zkráceně DD myši – jsou geneticky upravené myši, které vykazují červený fluorescenční signál u odontoblastů, osteoblastů, osteocytů, cementoblastů a cementocytů. Zároveň modrý fluorescenční signál u odontoblastů (Vijaykumar et al., 2019).

Myším byla zastřižnuta část řezáku v distální části maxily nebo mandibuly, následně byly rozděleny do určených časových skupin pro regeneraci po 6 hodinách a do kontrolní skupiny bez poškození řezáku. Po daném čase byly usmrceny. Usmrcení bylo provedeno inhalací anestetika izofluoranu a následnou cervikální dislokací. Následně se provedla disekce maxily a mandibuly.



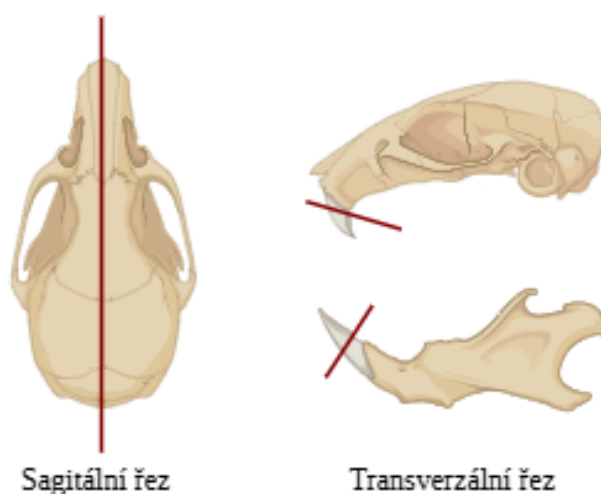
Obr. 5: Náčrt disekce maxily a mandibuly (vlastní náčrt, 2024). a – Myš byla usmrcena kombinací izofluoranu a cervikální dislokace. b – Pomocí chirurgických nůžek byly rozstříhány *musculi masticatores* a spojení mezi horní a dolní čelistí. c – Následně došlo k odstříhnutí *lingua* a samotnému vypreparování mandibuly. d – Nakonec byla mandibula rozdělena na 2 části v místě *incisivů*. e – Horní část lebky byla oddělena od těla a zbavena měkkých tkání včetně *integumentu*, *oculi* a *cerebra*, načež došlo k odstřížení *arcus zygomatici*. f – Lebka byla zastřižnuta v místě počátku molárů. g – Výsledná maxila byla opět rozdělena na 2 části – na pomezí parietální a frontální kosti lebeční a zároveň v oblasti *palatum durum*.

Z důvodu zabránění rozkladu vzorků a nejvýše možného zachování původního uspořádání tkáně je nutné vzorky zafixovat. Vzorky byly fixovány po dobu 24 hodin v 4% paraformaldehydu (PFA) při teplotě +4 °C a za promíchávání v rotátoru.

Po uplynutí 24 hodin se vzorky dekalcifikovaly v 10% roztoku EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) pod dobu 2 týdnů. EDTA bylo měněno každé 2-3 dny, po celou dobu byly vzorky uchovávány při teplotě +4 °C a promíchávány v rotátoru. Dekalcifikace se provádí z důvodu změkčení tvrdé kostní tkáně, abychom ji byli schopni v následujících krocích nakrájet na tenké řezy.

Posledním krokem přípravy vzorků před zmrazením je jejich 24hodinová konzervace v 30% sacharóze (sacharóza ředěna s 10x PBS (fosfátový pufovaný fyziologický roztok)) při teplotě +4 °C a za promíchávání v rotátoru. Důvodem je ochrana vzorků pro zachování stejné morfologie po jejich zmrazení. V opačném případě by mohlo dojít ke vzniku ledových krystalků, a tudíž nenávratného poškození vzorku.

Po proběhlých krocích byly vzorky zmrazeny do OCT (optimální směs pro řeznou teplotu) a následně nakrájeny pomocí kryotomu (Leica CM1850) na řezy o tloušťce 14 μm. Řezy byly provedeny transverzálním i sagitálním způsobem a následně přeneseny na sklíčko, to bylo uchováno při teplotě -20 °C. Výhodou OCT je jeho schopnost fixovat fluorescenční tkáň, nevýhodou je naopak horší schopnost udržet ji pohromadě, což může vést ke špatnému pozorování morfologické struktury vzorku.



Obr. 6: Sagitální vs. transverzální řez (vlastní náčrt vytvořený pomocí BioRender, 2024)

3.1.2 Barvení pomocí protilátek

Nakrájené vzorky byly třikrát po dobu pěti minut promyty v pufru 1x PBS + 0,1 Tween-20 (dále jen PBS-T), aby došlo k odstranění OCT. Díky Tween-20 dojde k rozrušení nescifických vazeb a antigeny tak mají vyšší senzitivitu pro lepší návaznost protilátek. Následně byl připraven roztok primární protilátky v 1% BSA (boviní sérový albumin) v daném poměru podle druhu markeru (viz. Tabulka 1), který byl zvortexován. Na sklíčko okolo vzorku byla nakreslena hydrofobní bariéra pomocí ochranného pera a na každý vzorek

bylo napipetováno 50 µl roztoku primární protilátky. Vzorky byly ponechány v tmavém zvlhčeném boxu při teplotě +4 °C přes noc.

Následující den byly vzorky opět třikrát promyty v pufru PBS-T po dobu pěti minut. Poté byl připraven roztok sekundární protilátky tak, aby její druh byl kompatibilní s primární protilátkou (používáme stejný zvířecí druh), zároveň musí mít každá protilátka jiné zbarvení, abychom je od sebe mohli rozpoznat. Roztok v 1% BSA v poměru 1:800, byl zvortexován a zcentrifugován. Na každý vzorek bylo napipetováno 50 µl roztoku sekundární protilátky. Vzorky byly ponechány na 1 hodinu v tmavém zvlhčeném boxu při pokojové teplotě. Sekundární protilátky obsahují fluorofor. Aby nedošlo k jeho vyzáření a zobrazovaná tkáň byla fluorescenční, musíme protilátky chránit před světlem.

Po uplynutí 1 hodiny byly vzorky třikrát promyty v pufru PBS-T po dobu pěti minut. Připravili jsme roztok DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) v poměru 1:500 (ředěno 1x PBS-T). Na každý vzorek bylo napipetováno 50 µl roztoku. Vzorek byl ponechán 10 minut v tmavém zvlhčeném boxu při pokojové teplotě. DAPI slouží k nabarvení buněčného jádra. V případě kmene DD, které již díky genetické modifikaci fluorescenci vykazují, došlo pouze k barvení pomocí DAPI.

Vzorky byly naposledy třikrát promyty v pufru PBS-T po dobu pěti minut. Následně došlo k jejich zamontování pomocí média fluoromount.

Antigen	Koncentrace primární protilátky	Původ	Koncentrace sekundární protilátky	Použitý druh sekundární protilátky
AIF1	1:300	Koza	1:800	anti-goat Alexa 488
COL4	1:500	Králík	1:800	anti-rabbit Alexa 568
EMCN	1:200	Potkan	1:800	anti-rat Alexa 488
THY1	1:100	Myš	1:800	anti-mouse Alexa 488
TUJ1	1:200	Myš	1:800	anti-mouse Alexa 647/568

Tabulka 1: Koncentrace primárních a sekundárních protilátek, jejich původ a druh

3.1.2.1 Detekované antigeny

AIF1 (*allograft inflammatory factor 1*) je protein spojený s aktivací makrofágů a tudíž reakcí na zánětlivá onemocnění. Používá se k detekci makrofágů nebo mikroglií, což je typ makrofágů přítomen v centrální nervové soustavě (De Leon-Oliva et al., 2023).

COL4 (*collagen IV*) je součástí bazální membrány krevních cév. Bazální membrána je vrstva mezi endotelovými buňkami tvořící extracelulární matrix. Col4 se podílí na tvorbě a homeostáze cév (Gan et al., n.d.).

EMCN (*endomucin*) se nachází na povrchu endotelových buněk. Byl detekován jak v krevních, tak lymfatických cévách (Samulowitz et al., 2002).

THY1 (*Thymus cell antigen 1*) je proteinový marker na povrchu buněk. Lze s ním detekovat neurony, mezenchymové kmenové buňky či fibroblasty (Hu et al., 2022).

TUJ1 (*class III beta-tubulin*) je neuronově specifický protein, který byl detekován v tělech neuronů, ale také v jejich axonech a dendritech (Nadal-Nicolás et al., 2023).

DMP1 (*dentin matrix acidic phosphoprotein 1*) a DSPP (*dentin sialophosphoprotein*) jsou proteiny podílející se na mineralizaci a jsou exprimovány v odontoblastech. Zatímco DMP1 je exprimován i v osteoblastech, osteocytech, cementoblastech a cementocytech, DSPP je exprimován pouze v odontoblastech (Lavicky et al., 2022).

3.1.3 Analýza pomocí konfokálního mikroskopu

Vzorky byly zanalyzovány laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 880). Zdrojem konfokálního mikroskopu je laser, který se postupně posouvá přes celý vzorek, což emituje fluorescenční signál, jenž je poté zobrazován. Mikroskop dokáže snímat více množství rovin, proto je vhodný i pro 3D struktury (Elliott, 2020). Snímky byly zpracovány v programu Imaris Viewer (verze 10.2.0).

3.2 Histologické zpracování

Z důvodu detailního prozkoumání mikroskopického prostředí myšího řezáku a jeho morfologie jsme využili histologického zpracování vzorků do parafínu a jejich následné barvení hematoxylinem eosinem a modrým trichromem.

Vlastní příspěví: Opět jsem samostatně provedla disekci čelistí a připravila vzorky k zalití do parafínu. Následně jsem zpracované vzorky nakrájela na mikrotomu a pod dohledem jsem provedla oba druhy barvení dle poskytnutého protokolu. Vzorky jsem nasnímala a zanalyzovala samostatně.

3.2.1 Odběr, fixace, dekalcifikace vzorků a jejich zalití do parafínu

U tohoto experimentu jsme pracovali s kmeny C57BL/6 a FT89 (kontrolní, beze změn v genomu) myších samic ve věku 6-8 týdnů. Cílem bylo prozkoumání samotné struktury zubu, tudíž myším nebyly zastřiženy řezáky a byla tak usmrcena pouze kontrolní skupina. Usmrcení myší a disekce čelistí byly již podrobně popsány v kapitole *Imunohistochemie*.

Vzorky byly následně zpracovány stejným způsobem jako při imunohistochemii: 24hodinová fixace v 4% PFA a dekalcifikace v 10% EDTA po dobu 2 týdnů (měněno každé 2-3 dny).

Po uplynutí těchto kroků byly vzorky dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou, projasněny xylenem a prosyceny parafínem (viz Tabulka 2). Následně došlo k samotnému zalití vzorků do parafínu při teplotě +60 °C.

Látka	Čas
70% ethanol	45 min
80% ethanol	60 min
96% ethanol	60 min
96% ethanol	60 min
96% ethanol	90 min
Xylen	30 min
Xylen	30 min
Xylen	45 min
Xylen	75 min
Parafin	60 min
Parafin	90 min
Parafin	120 min

Tabulka 2: Proces před zalitím vzorků do parafínu

Po ztuhnutí parafínu byly vzorky nakrájeny na mikrotomu (Leica RM2245) na řezy o tloušťce 6 μm pouze sagitálním způsobem. Pomocí vodní lázně o teplotě +45 °C byly přeneseny na sklíčko a po dobu 24 hodin vysoušeny v termostatu při teplotě +37 °C. Takto zpracované vzorky jsou následně uchovávány při teplotě +4 °C.

Výhodou parafínu je jeho schopnost lepšího udržování morfologie tkáně a možnost krájení tenčích řezů než u OCT. Z důvodu vysokých teplot při fixaci jej však nemůžeme použít pro fluorescenční vzorky.

3.2.2 Barvení

Nakrájené vzorky byly rozděleny do dvou skupin podle určených histologických metod barvení – hematoxylin eosinu a Massonova modrého trichromu.

3.2.2.1 Hematoxylin eosin

Při barvení musel být nejprve xylenem odstraněn parafin, přešlo se k rehydrataci ethanolom a praní ve vodě. Poté byly vzorky 10 minut barveny v hematoxylinu. Pomocí vody byly vzorky promyty, aby došlo k odstranění přebytečného barviva. Následovalo barvení v eosinu po dobu 5 minut a vzorky byly opět promyty ve vodě. Následně byly vzorky dehydratovány ethanolom, byly ponořeny do změkčovacího roztoku (xylen+fenol) a nakonec byly projasněny v xylenu. (viz Tabulka 3) Po zhotoveném barvení byly vzorky zamontovány pomocí média pertex.

Krok	Látka	Čas
1.	Xylen	5 min
2.	Xylen	5 min
3.	Xylen	5 min
4.	Ethanol (100%)	5 min
5.	Ethanol (96%)	5 min
6.	Voda	oplach
7.	Hematoxylin	10 min
8.	Voda	oplach
9.	Teplá voda	10 min
10.	Eosin	5 min
11.	Voda	oplach
12.	Studená voda	5 min
13.	Ethanol (96%)	5 min
14.	Ethanol (100%)	5 min
15.	Xylen+fenol (1:1)	několik ponoření
16.	Xylen	5 min
17.	Xylen	5 min
18.	Zamontování (pertex)	

Tabulka 3: Postup při hematoxylin eosinovém barvení

Hematoxylin eosinové barvení je nejčastějším druhem barvení používaným v histologii. Výsledkem barvení jsou modro-fialová buněčná jádra (způsobuje zásaditý hematoxylin) a růžové zbarvení cytoplazmy, vaziva a svalů (způsobuje kyselý eosin).

3.2.2.2 Massonův modrý trichrom

Při barvení byl opět xylenem odstraněn parafin a byla provedena rehydratace ethanolem. Poté byly vzorky 10 minut barveny ve Weigertově hematoxylinu. Pomocí destilované vody byly vzorky promyty, aby došlo k odstranění přebytečného barviva. Následovala diferenciací v 3% kyselém alkoholu, modráním v pramenité vodě a oplach v destilované vodě. Pokračovalo se barvením v ponceau kyselém fuchsinu (5 minut), oranž G (15 minut) a anilinové modři 2,5% (3 minuty). Po každém barvení došlo k oplachu destilovanou vodou, dokud nebyla voda čirá. Následně byly vzorky dehydratovány ethanolem a nakonec byly projasněny v xylenu. (viz. Tabulka 4) Po zhotoveném barvení byly vzorky zamontovány pomocí média pertex.

Krok	Látka	Čas
1.	Xylen	5 min
2.	Xylen	5 min
3.	Xylen	5 min
4.	Ethanol (100%)	5 min
5.	Ethanol (96%)	5 min
6.	Weigertův hematoxylin	10 min
7.	Destilovaná voda	oplach
8.	Diferenciace v 3% kyselém alkoholu	
9.	Modrání v pramenité vodě	5 min
10.	Destilovaná voda	oplach
11.	Ponceau kyselý fuchsin	5 min
12.	Destilovaná voda	oplach
13.	Oranž G	15 min
14.	Destilovaná voda	oplach
15.	Anilinová modř 2,5%	3 min
16.	Destilovaná voda	oplach
17.	Ethanol (96%)	5 min
18.	Ethanol (100%)	5 min
19.	Xylen	5 min
20.	Xylen	5 min
21.	Zamontování (pertex)	

Tabulka 4: Postup při barvení Massonova modrého trichromu

Barvení Massonovým trichromem se obvykle užívá k zobrazení kolagenu. Existují tři druhy trichromů, podle obarvení vaziva: žlutý, zelený a modrý. Výsledkem barvení jsou modročerná jádra (způsobuje zásaditý Weigertův hematoxylin), červená svalovina (způsobuje ponceau kyselý fuchsin), oranžové erytrocyty (způsobuje kyselá oranž G) a modrý kolagen (způsobuje kyselá anilinová modř).

3.2.3 Pozorování pomocí optického mikroskopu

Vzorky byly zanalyzovány a vyfoceny optickým mikroskopem (Leica DM5000 B).

3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie

Pro detailní prozkoumání okluzní plochy, respektive struktury tvrdé zubní tkáně po jejím poranění, byla využita metoda rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

Vlastní příspěví: Podílela jsem se na disekci mandibuly a následně jsem samostatně připravovala vzorky před samotným mikroskopováním dle poskytnutých protokolů. Pod dozorem jsem na mikroskopu pořídila část snímků, které jsem následně analyzovala.

3.3.1 Odběr, fixace a oplach vzorků

V experimentu jsme pracovali s myším kmenem DD, který je geneticky upravený a vykazuje fluorescenční signál, jak bylo specifikováno v kapitole *Imunohistochemie*.

Myši byly rozděleny do skupin, kde jim byla zastřižena část pravého řezáku v distální části mandibuly, a to buď 1krát, 4krát a 4krát, kdy byla myš usmrcena až po 14 dnech od posledního zastřihnutí. Zároveň byla utvořena kontrolní skupina bez zastřihnutí mandibuly. Mezi každým zastřihnutím byl časový bod 3 dny, kdy 4. den probíhajícího hojení došlo k případnému dalšímu zastřižení nebo usmrcení.

Usmrcení bylo provedeno inhalací anestetika izofluoranu a následnou cervikální dislokací. Následně se provedla disekce mandibuly (podrobněji popsáno v kapitole *Imunohistochemie*).

Vzorky byly nejprve fixovány v 3% glutaraldehydu (6% glutar + kakodylátový pufr zásaditý, v poměru 1:1) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté došlo k oplachu kakodylátovým pufrem 100mM (kakodylátový pufr zásaditý + milli-Q voda, v poměru 1:1) třikrát po deseti minutách.

3.3.2 Dehydratace vzorků, leptání kyselinou a pozlacení

Dalším krokem přípravy vzorků byly jejich dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou, kdy vzorky byly třikrát po dobu deseti minut odvodňovány v 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% ethanolu.

Posléze byly vzorky po dobu dvou dnů vysoušeny v sušicí troubě při teplotě + 65°C. Následovalo leptání kyselinou: vzorky byly po dobu 15 sekund ponořeny v 0,2% kyselině sírové a po stejný čas promyty v destilované vodě. Tento proces byl zopakován třikrát. Leptání kyselinou se provádí z důvodu odhalení mikroskopické struktury dentinu, což umožní jeho detailní pozorování při mikroskopii.

Posledním krokem přípravy vzorků před mikroskopováním je jejich pozlacení. Pozlacení bylo provedeno pomocí naprašovačky kovů (Balzers SCD 040) při tlaku 0,15 mbar a proudu 30 mA po dobu 3 minut. Vykonává se kvůli nevodivému povrchu vzorku, což při mikroskopii zhoršuje kvalitu obrazu. Pozlacení zajistí elektrickou vodivost vzorku a odvede přebytečný náboj.

3.3.3 Analýza pomocí elektronového mikroskopu

Vzorky byly zanalyzovány a vyfoceny pomocí elektronového mikroskopu (Tescan Vega TS 5136 XM).

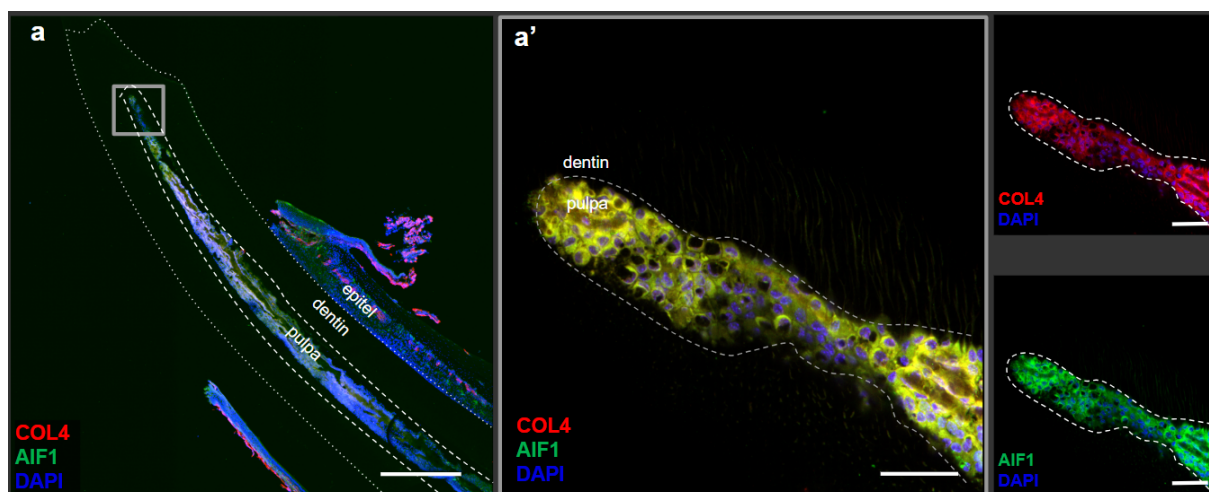
Existují dva základní druhy elektronové mikroskopie: transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a rastrovací elektronová mikroskopie (SEM), se kterou jsme pracovali v experimentu. Jejím zdrojem jsou elektrony primárního svazku, jež jsou vypuzeny, narazí na elektrony atomů vzorku a vypudí je z atomů. Tyto elektrony se nazývají sekundární elektrony a jsou zobrazeny pomocí detektoru, který vytvoří výsledný obraz (Mohammed and Abdullah, n.d.).

4 VÝSLEDKY

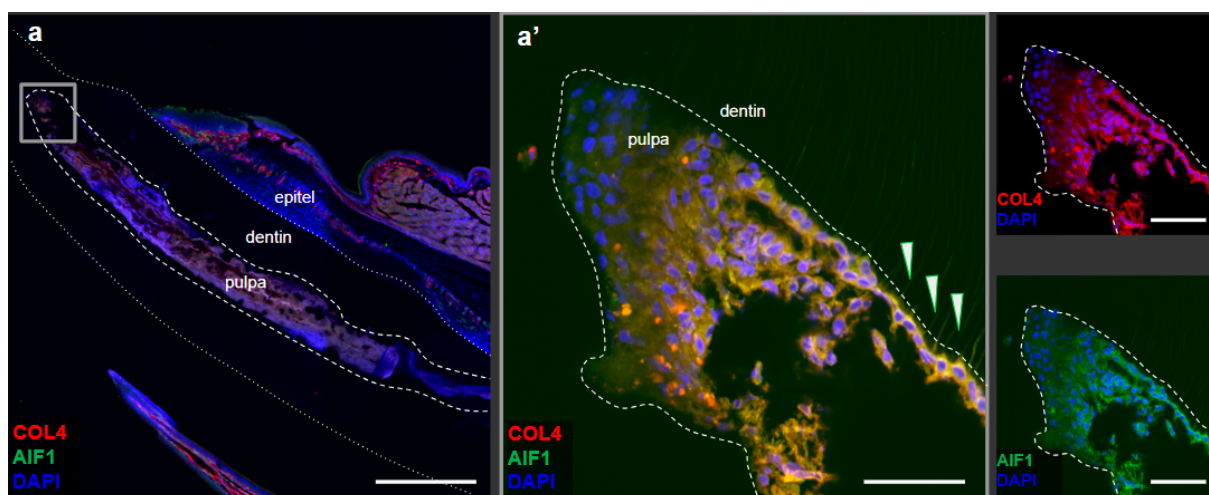
4.1 Detekce buněčných typů ve špičce řezáku

4.1.1 Porovnání zdravých a poraněných řezáků

Rozdílná míra fluorescenčního signálu mezi poškozenými a zdravými řezáky je znatelná primárně v oblasti špičky řezáku.



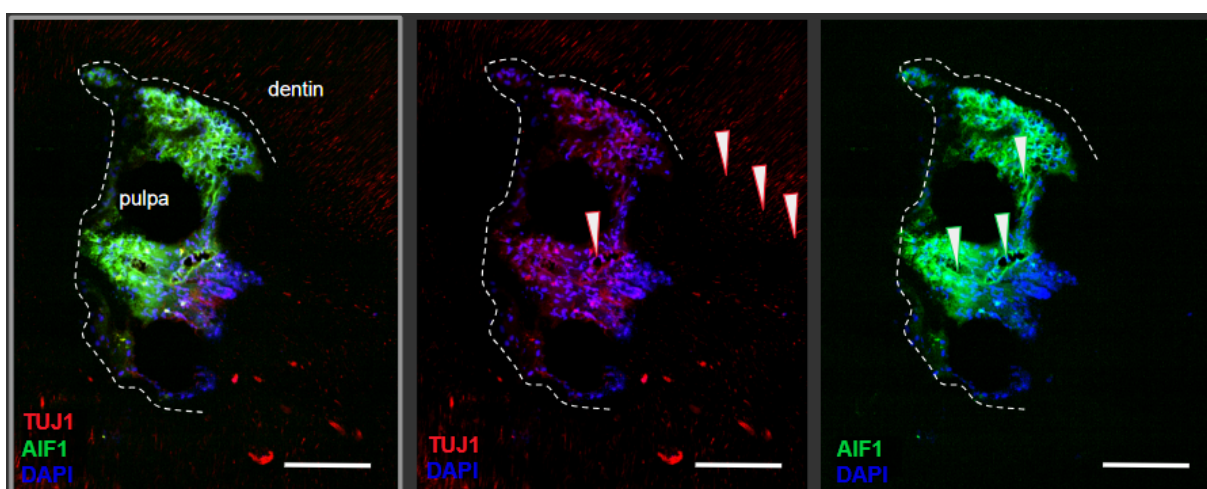
Obr. 7: Mandibulární řezák bez zastřihnutí, s detailem na špičku řezáku (vlastní snímky). Sagitální řez. BL6 myš, protilátky COL4, AIF1 + DAPI. **a** – Mandibulární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu a zubního epitelu. Zvětšení 10x, tilescan, měřítko: 500 μm . **a'** – Detail na distální konec řezáku, konkrétně buňky pulpy, krevní cévy a makrofágy. Zvětšení 40x, z-stack, měřítko: 50 μm .



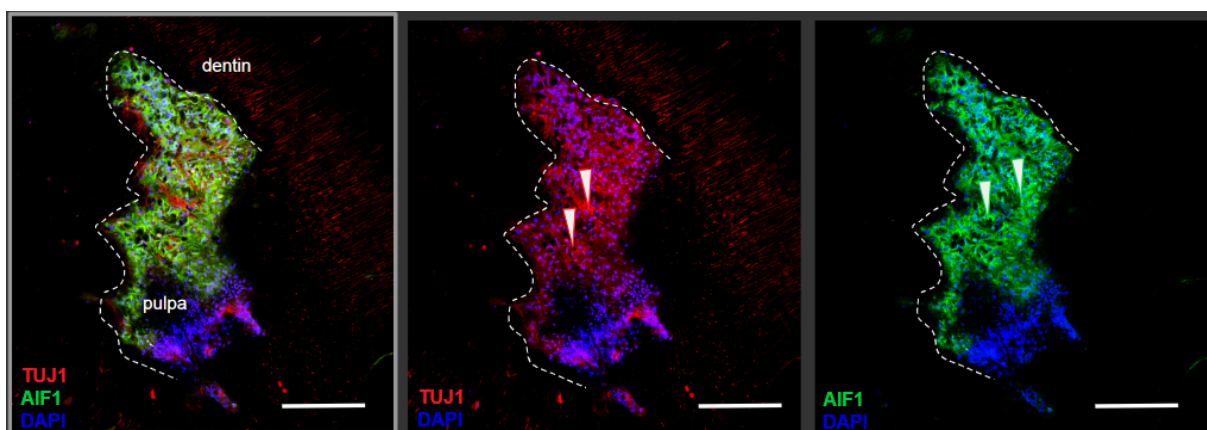
Obr. 8: Mandibulární řezák 6 hodin po zastřihnutí, s detailem na špičku řezáku (vlastní snímky). Sagitální řez. BL6 myš, protilátky COL4, AIF1 + DAPI. **a** – Mandibulární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu a zubního epitelu. Zvětšení 10x, tilescan, měřítko: 500 μm . **a'** – Detail na distální konec řezáku, konkrétně buňky pulpy, krevní cévy, makrofágy a dentin. Šipky zdůrazňují výskyt dentinových tubulů. Zvětšení 40x, z-stack, měřítko: 50 μm .

Jak lze vidět na obrázcích 7 a 8, koncentrace makrofágů (AIF1) se po poranění v místě špičky zvýšila. V poraněném řezáku byly makrofágy koncentrovány i v oblasti dentinu, kde dříve nebyly detekovány. To by mohlo potvrzovat naši tezi o spojitosti s aktivní imunitní odpovědí v oblasti špičky řezáku, která zatím není detailně prozkoumána.

V případě míry fluorescence COL4 (obr. 7 a 8) je rozdíl mezi poraněným a nepoškozeným řezákem, kde se jeho koncentrace zvyšuje po poranění. Pravděpodobně se bude jednat o přirozenou reakci na poranění, kdy cévy rozšíří své zásobení díky angiogenezi a aktivně se podílejí na hojení. Zároveň by se mohlo jednat o pericyty, které byly v oblasti špičky již dříve popsány, neboť se hojně podílejí na regeneraci



Obr. 9: Špička maxilárního řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Detail na distální konec řezáku, konkrétně buňky pulpy a dentin. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk a makrofágů. Sagitální řez. BL6 myš, protilátky AIF1, TUJ1 + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 120 μ m.

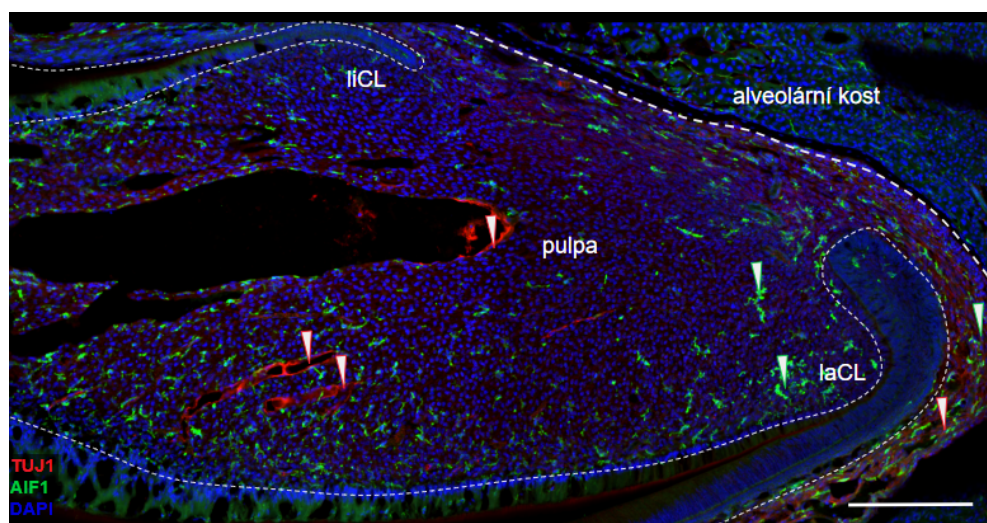


Obr. 10: Špička maxilárního řezáku 6 hodin po zastřihnutí (vlastní snímek). Detail na distální konec řezáku, konkrétně buňky pulpy a dentin. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk a makrofágů. Sagitální řez. BL6 myš, protilátky AIF1, TUJ1 + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 150 μ m.

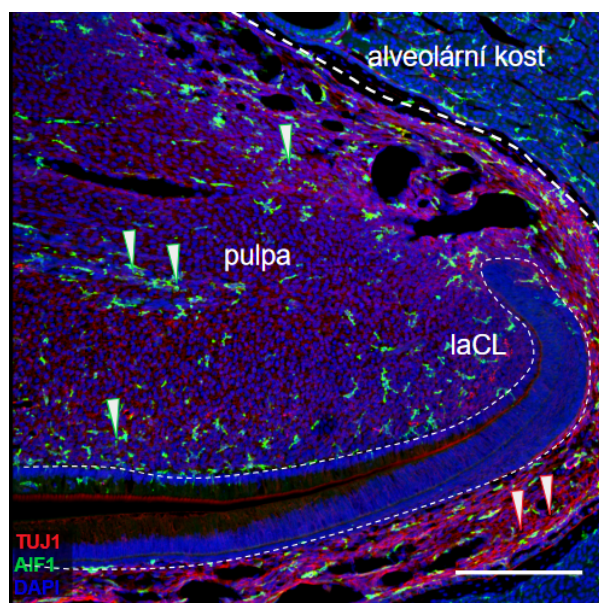
Při detekci antigenu AIF1, avšak v maxilární špičce řezáku (obr. 9 a 10) byla míra výskytu makrofágů hojná již u nepoškozeného řezáku a po poranění se příliš nezvýšila.

Důvodem by mohla být samotná funkce makrofágů, které se podílejí i na odstraňování stárnoucích buněk, což by odpovídalo specifikaci kontinuálního dorůstání myšího řezáku a jeho neustálé abrazi.

V maxilárním řezáku byl místo COL4 detekován antigen TUJ1 (obr. 9 a 10). Obecně lze říci, že rozdíl fluorescenčního signálu mezi zdravým a poraněným řezákem zde byl nejvíce patrný. U nezastřižené špičky se nervové buňky vyskytovaly převážně v dentinu okolo pulpy. Po zastřižení se jejich intenzita v pulpě viditelně zvýšila. To potvrzuje, že nervové buňky reagují na buňky imunitní a při poranění spolu navzájem komunikují. Zároveň se Schwannovy buňky podílejí na tvorbě regenerativního dentinu a mohly by tak komunikovat s odontoblasty.



Obr. 11: Maxilární labiální a lingvální cervikální klička bez zastřižení (vlastní snímek). Zobrazení apikální části řezáku, prostředí pulpy, labiální cervikální kličky (laCL), lingvální cervikální kličky (liCL) a část prostředí alveolární kosti. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk a makrofágů. Sagitální řez. Bl6 myš, protilátky AIF1, TUJ1 + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μ m.



Obr. 12: Maxilární labiální cervikální klička 6 hodin po zastřihnutí (vlastní snímek). Zobrazení apikální části řezáku, prostředí pulpy, labiální cervikální kličky (laCL) a část prostředí alveolární kosti. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk a makrofágů. Sagitální řez. Bl6 myš, protilátky AIF1, TUJ1 + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μ m.

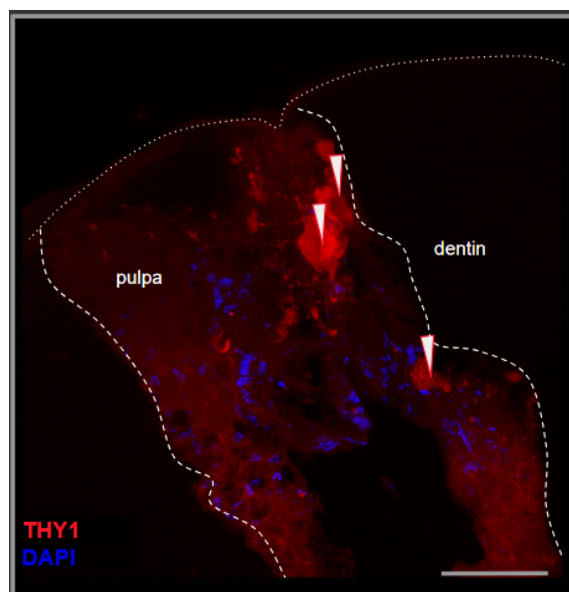
V oblasti lingvální cervikální kličky maxilárního řezáku (obr. 11 a 12) se naopak množství makrofágů po poranění zvýšilo. Aktivace a šíření makrofágů pulpou by mohly mít delší časový horizont, než dorazí k samotné špičce, tudíž by bylo dobré detekovat tuto oblast i v pozdějším čase po poranění.

U lingvální cervikální kličky (obr. 11 a 12) se nervové buňky hojně vyskytují, ale po poranění nedošlo k zásadní změně jejich míry výskytu. Mohly by přispívat k regeneraci primárně v distální části řezáku.

Zajímavě se jeví rozmístění těchto buněčných typů. Ve zdravé špičce mandibulárního řezáku buněčné typy působí více souvisle, ale při pohledu na poškození si lze všimnout slabší míry fluorescence v nejdistanější části. Blíže apikální oblasti je míra signálu naopak silnější. V maxilární špičce řezáku nebyly tyto změny patrné ani u jiných výsledků. Mohlo by se tak jednat o rozdíl mezi maxilou a mandibulou. V případě imunohistochemických metod však často může docházet k nespecifické fluorescenci a pro úplné závěry by bylo nutné experimenty replikovat.

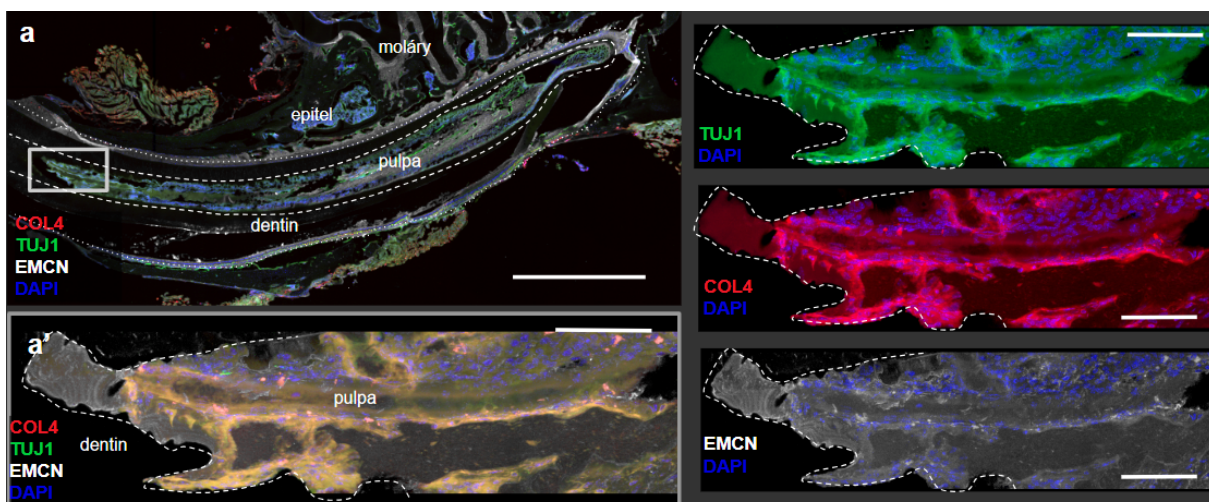
4.1.2 Specifikace dalších antigenů ve zdravém řezáku

Další vzorky, na nichž byly antigeny detekovány, již zastřihnuty nebyly, a tudíž se jedná pouze o popis výskytu jednotlivých buněčných typů ve zdravém myším řezáku.

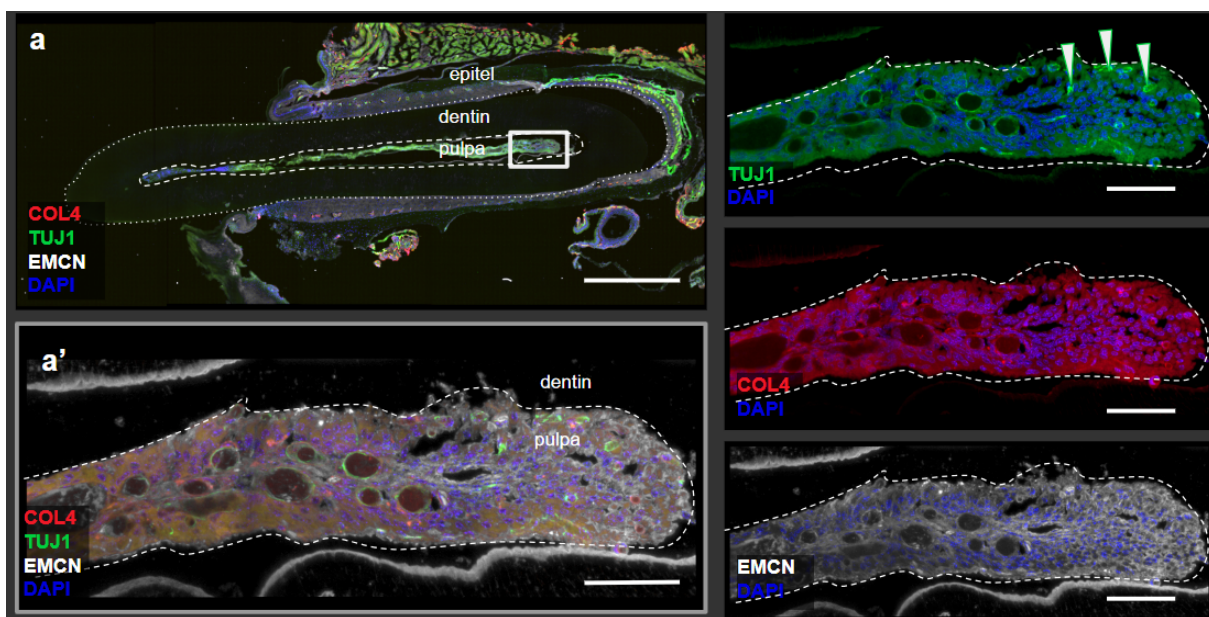


Obr. 13: Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Detail na distální konec řezáku, přímý přechod pulpy mezi vnějším a vnitřním prostředím a prostředí dentinu. Šipky značí pravděpodobný výskyt nervových buněk či fibroblastů. Sagitální řez. BL6 myš, protilátka THY1 + DAPI. Zvětšení 63x, měřítko: 40 μm .

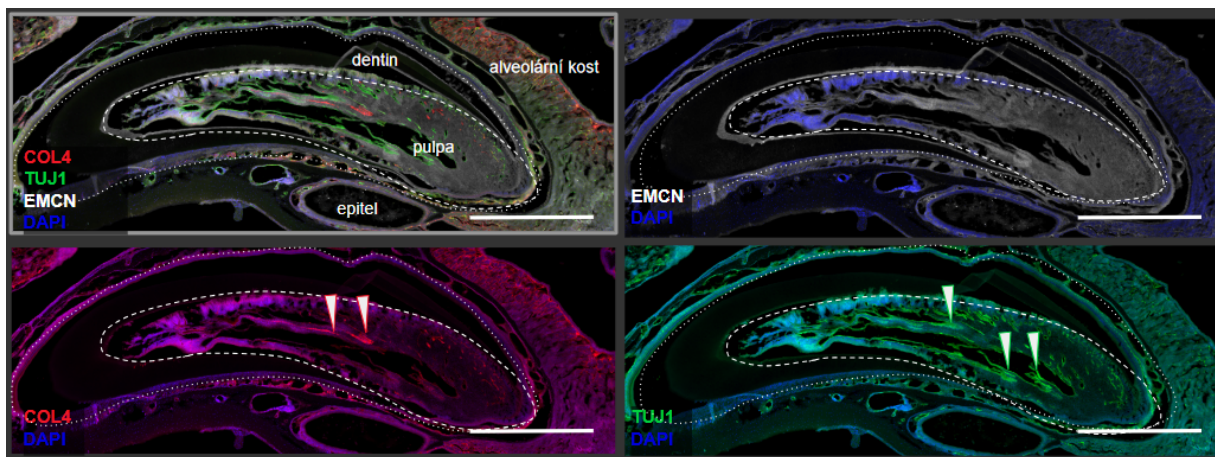
Při detekci antigenu THY1 v mandibulární špičce řezáku (obr. 13) bylo obtížné detekovat skutečný signál od nespecifické fluorescence. Za skutečné bychom mohli považovat pouze viditelný nejsilnější signál, ale k potvrzení by bylo potřeba experiment několikrát opakovat. Nervové buňky v oblasti pulpy zde přesto již byly detekovány, zajímavá by byla detekce fibroblastů. Ty se však pravděpodobně budou více vyskytovat v apikální části, kde se podílejí na signalizaci kmenových buněk.



Obr. 14: Mandibulární řezák bez zastřihnutí s detailem na distální část pulpy řezáku (vlastní snímky). Sagitální řez. BL6 myš, protilátky COL4, TUJ1, EMCN + DAPI. **a** – Mandibulární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu, zubního epitelu a molárů. Zvětšení 10x, měřítko: 1500 μm . **a'** – Detail na distální konec řezáku, konkrétně buňky pulpy, krevní cévy a nervové buňky. Zvětšení 64x, měřítko: 80 μm .



Obr. 15: Maxilární řezák bez zastříhnutí, s detailem na pulpu řezáku (vlastní snímky). Transverzální řez. F/D2 myš, protilátky COL4, TUJ1, EMCN + DAPI. **a** – Maxilární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu a zubního epitelu. Zvětšení 10x, měřítko: 600 μm . **a'** – Detail na pulpu řezáku, konkrétně krevní cévy a nervové buňky. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk. Zvětšení 63x, měřítko: 60 μm .



Obr. 16: Maxilární řezák bez zastříhnutí (vlastní snímek). Maxilární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu a zubního epitelu, jež je vnořený do alveolární kosti. Šipky zdůrazňují výskyt nervových buněk a krevních cév. Sagitální řez. F/D2 myš, protilátky COL4, TUJ1, EMCN + DAPI. Zvětšení 10x, měřítko: 1000 μm .

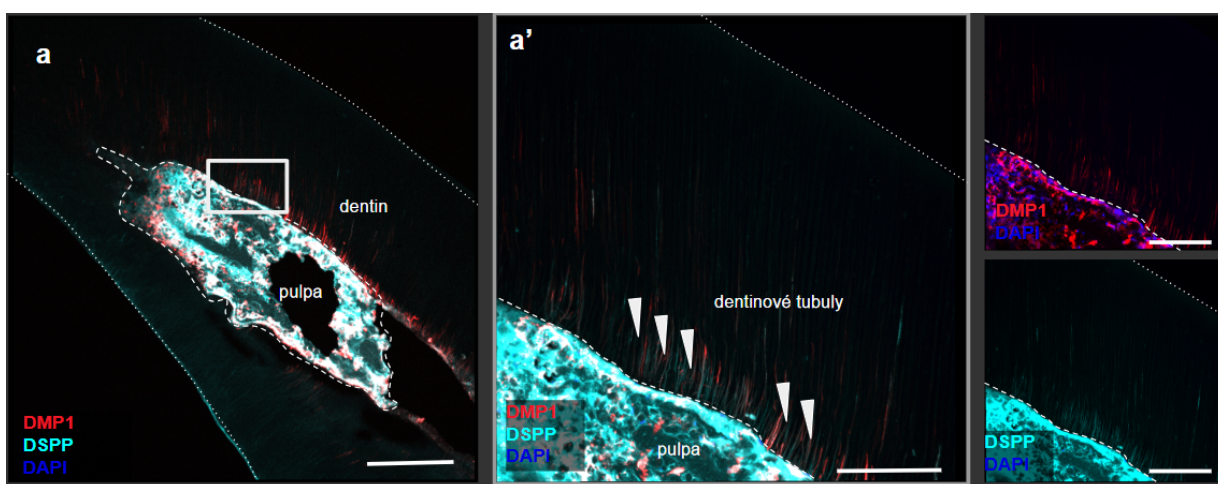
COL4 byl ve zdravém řezáku detekován jak ve špičce řezáku (obr. 14), tak i v maxilární pulpě (obr. 15) či celém maxilárním řezáku (obr. 16). Tyto snímky tak poskytují přehled o prokrvení zubu a zároveň rozvíjejí myšlenku o komplexitě imunitního systému myšího chrupu.

TUJ1 se také hojně vyskytuje v řezáku a převážně na přehledových snímcích si lze všimnout silné inervace řezáku. Tímto můžeme přispět k tezi o komunikaci mezi distální a apikální částí zubu nejen při hojení, ale také při sebeobnově a přirozené abrazi.

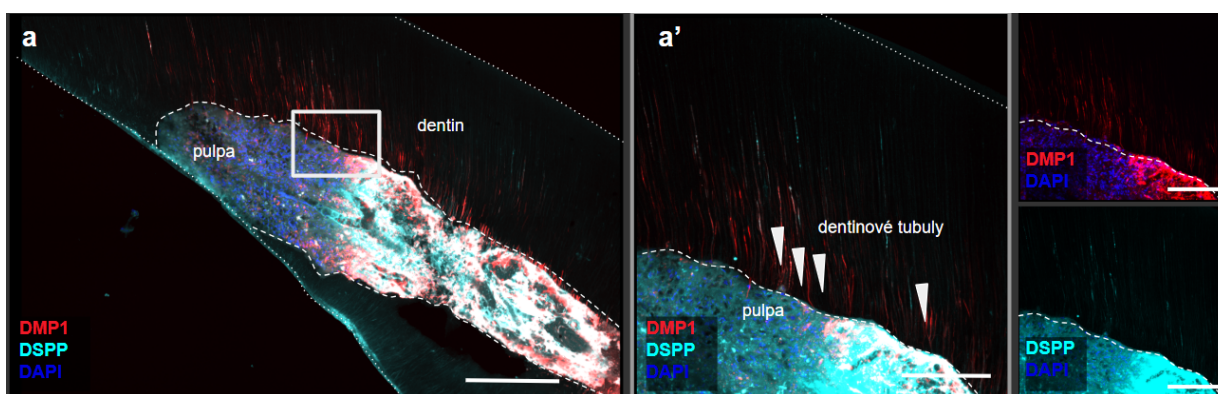
Endomucin (EMCN) nebyl v poškozených řezácích detekován a v budoucích experimentech by se dalo na tento antigen podrobněji zaměřit. Nynější (bílé) zbarvení však příliš nepřispívá ke snadnému rozlišení specifického signálu od nespecifického.

4.1.3 Detekce DMP1 a DSPP proteinů

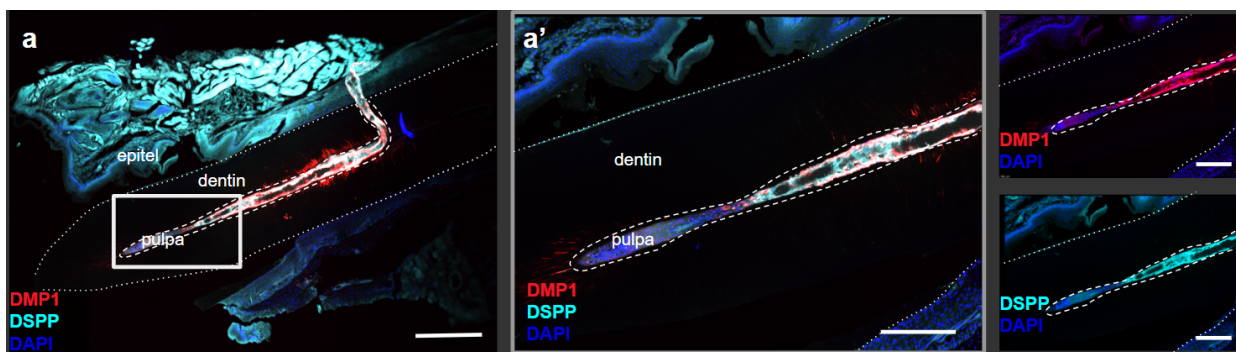
K přesné detekci proteinů, jež se podílejí na mineralizaci v oblasti špičky řezáku byl využit DMP1-Cherry/DSPP-Cerulean myší kmen, který exprimuje červený fluorescenční signál u odontoblastů, osteoblastů, osteocytů, cementoblastů a cementocytů (DMP1), zároveň modrý fluorescenční signál u odontoblastů (DSPP) (Vijaykumar et al., 2019). Tyto proteiny je tak možné ve vysokém rozlišení detekovat i bez dalšího IHC barvení.



Obr. 17: Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí, s detailem na rozhraní mezi pulpou a dentinem (vlastní snímky). Sagitální řez, sklo 2.2. DD myš + DAPI. a – Mandibulární špička řezáku, rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, dle mineralizačních proteinů. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 200 μ m. a' – Detail na rozhraní mezi pulpou a dentinem. Šipky zdůrazňují výskyt dentinových tubulů. Zvětšení 25x, z-stack, měřítko: 100 μ m.

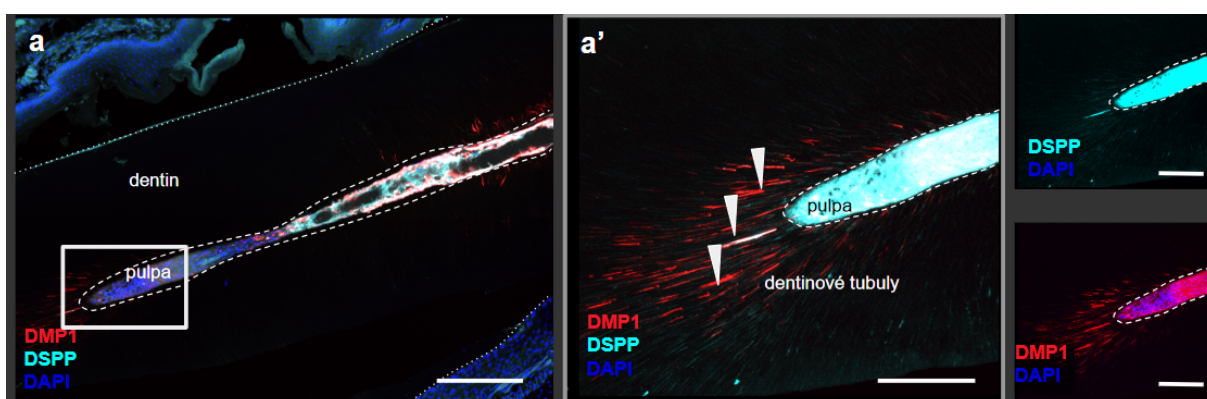


Obr. 18: Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí, s detailem na rozhraní mezi pulpou a dentinem (vlastní snímky). Sagitální řez, sklo 2.5. DD myš + DAPI. a – Mandibulární špička řezáku, rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, dle mineralizačních proteinů. Zvětšení 25x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μ m. a' – Detail na rozhraní mezi pulpou a dentinem. Šipky zdůrazňují výskyt dentinových tubulů. Zvětšení 25x, z-stack, měřítko: 100 μ m.

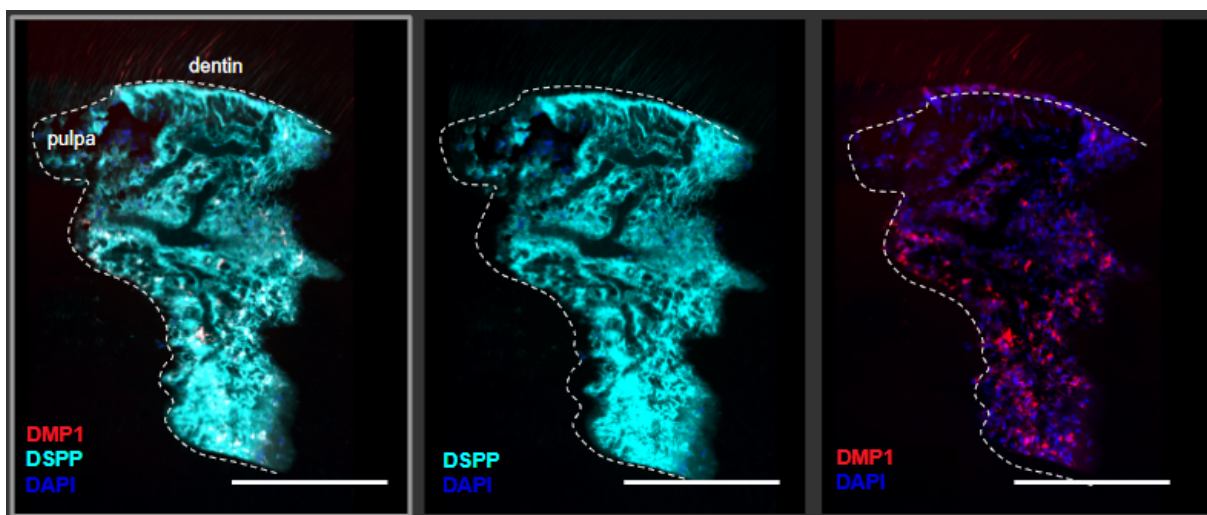


Obr. 19: Mandibulární řezák bez zastřihnutí, s detailem na pulpu řezáku (vlastní snímky). Transverzální řez. DD myš + DAPI. **a** – Mandibulární řezák rozlišitelný na buňky pulpy, dentinu a zubního epitelu, dle mineralizačních proteinů. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 400 μm . **a'**– Detail na prostředí mezi pulpou a dentinem. Zvětšení 25x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μm .

Na obrázcích (primárně 17, 18, 20 a 21) si lze všimnout DMP1 a DSPP značící dentinové tubuly. Dentinové tubuly však byly již dříve pozorovány, na rozdíl od pulpy v distální části řezáku. Prozkoumání oblasti pulpy je důležité z důvodu pochopení mechanismů mezi dentinem a pulpou při regeneraci, ale také homeostáze.

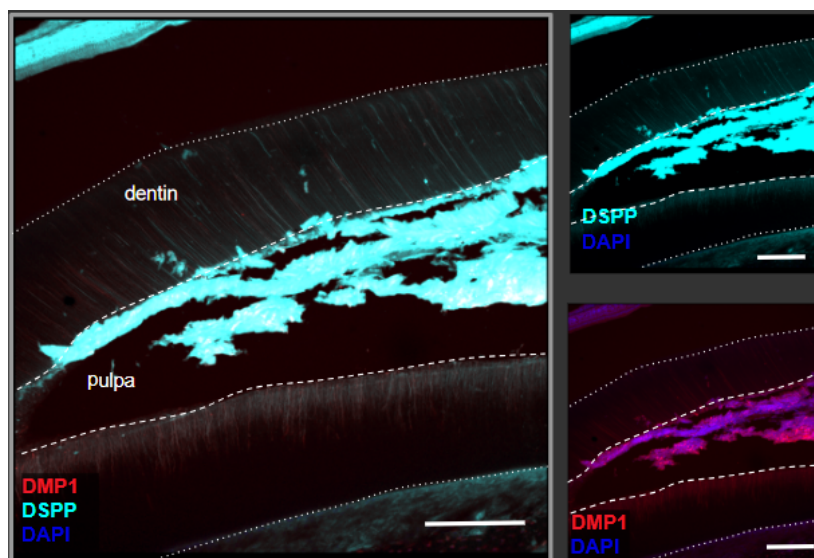


Obr. 20: Mandibulární pulpa řezáku bez zastřihnutí, s bližším detailem na rozhraní pulpy a dentinu (vlastní snímky). Transverzální řez. DD myš + DAPI. **a** – Prostředí mezi pulpou a dentinem, dle mineralizačních proteinů. Zvětšení 25x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μm . **a'**– Detailní zobrazení dentinových tubulů, jež jsou zdůrazněny šipkami. Zvětšení 25x, z-stack, měřítko: 100 μm .

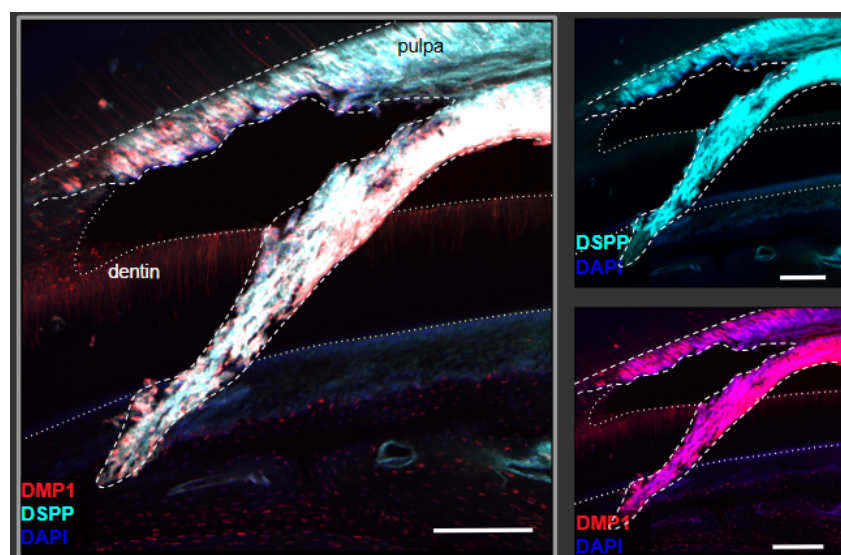


Obr. 21: Maxilární špička řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Maxilární špička řezáku, rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, respektive dentinových tubulů dle mineralizačních proteinů. Sagitální řez. DD myš + DAPI. Zvětšení 25x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μ m.

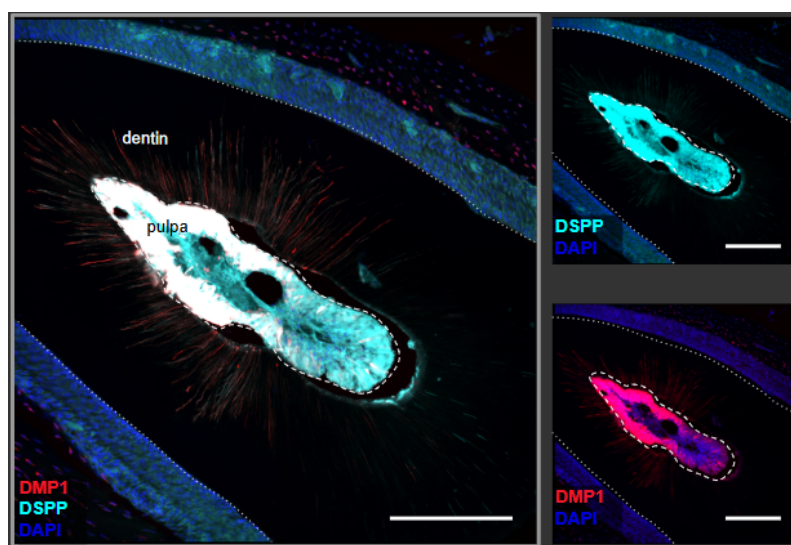
Opět je v nejdistančnější části mandibulární špičky řezáku slabší fluorescence (obr. 18), kde se vyskytuje hlavně buněčné barvivo DAPI, v další části je již intenzita signálu silnější. V případě maxilární špičky řezáku (obr. 21) je intenzita všude poměrně rovnoměrná. Příčinou by opět mohl být rozdíl na buněčné úrovni mezi maxilou a mandibulou, která by mohla být při mechanickém zpracování potravy více zatěžována. Nebo ve špičce zubu nemusí docházet k tak intenzivní tvorbě zubní matrix, když je distální část neustále obrušována. Znovu je však nutné provést další experimenty.



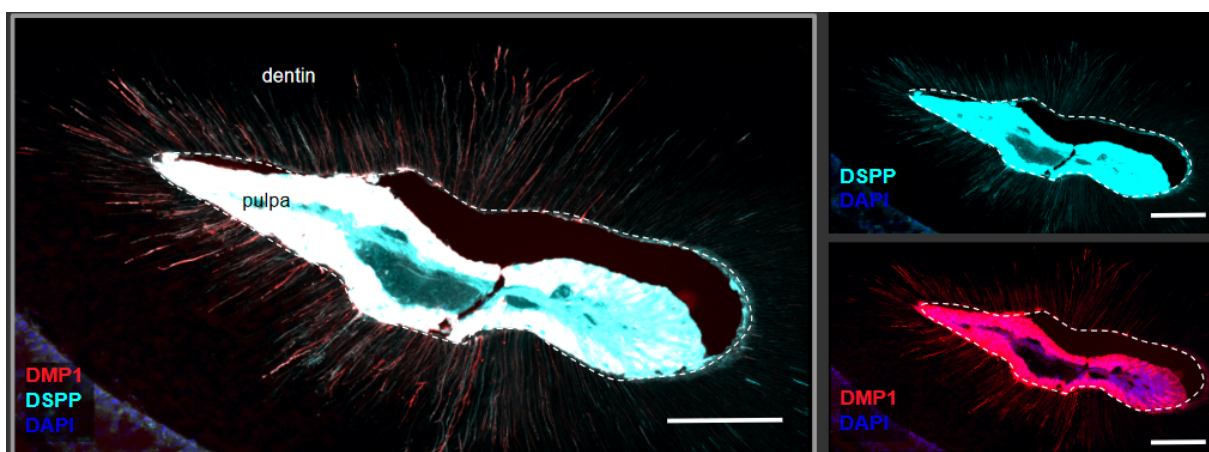
Obr. 22: Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Mandibulární špička řezáku rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, respektive dentinových tubulů dle mineralizačních proteinů. Sagitální řez. DD myš + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 200 μ m.



Obr. 23: Mandibulární pulpa řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Mandibulární špička řezáku, rozlišitelná na strukturu pulpy (při krájení na tenké řezy došlo k jejímu roztržení) a dentinu, respektive dentinových tubulů dle mineralizačních proteinů. Sagitální řez. DD myš + DAPI. Zvětšení 10x, z-stack, měřítko: 200 μ m.



Obr. 24: Maxilární pulpa řezáku bez zastřihnutí (vlastní snímek). Maxilární pulpa řezáku, rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, respektive dentinových tubulů dle mineralizačních proteinů. Transverzální řez. DD myš + DAPI. Zvětšení 25x, z-stack, tilescan, měřítko: 200 μ m.



Obr. 25: Detail na maxilární pulpu řezáku bez zastříhnutí (vlastní snímek). Maxilární pulpa řezáku (detail), rozlišitelná na strukturu pulpy a dentinu, respektive dentinových tubulů dle mineralizačních proteinů. Transverzální řez. DD myš + DAPI. Zvětšení 25x, z-stack, měřítko: 120 μ m.

U transverzálních řezů maxily a mandibuly nejsou přílišné rozdíly mezi intenzitou i rozmístěním fluorescence a jednotlivých typů proteinů.

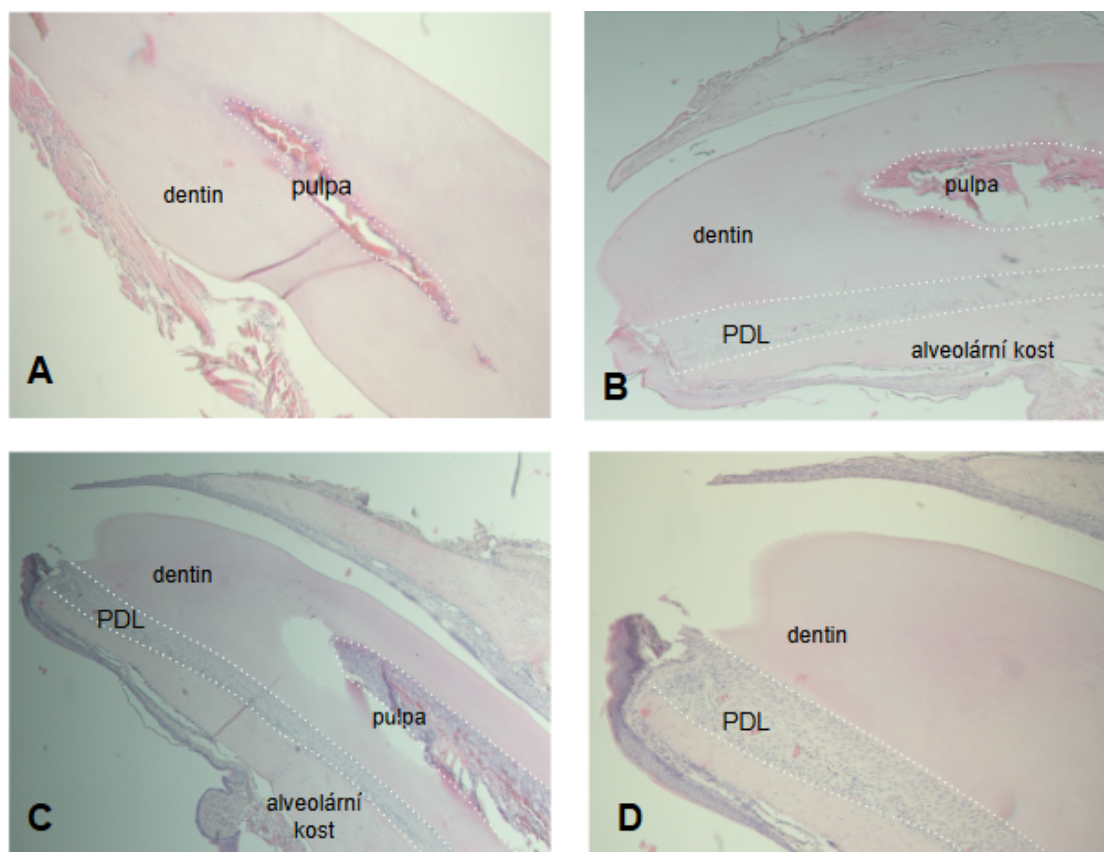
Z výsledků můžeme vyvodit hojný výskyt matrix produkujících proteinů v pulpě. Zatímco DSPP je specifický pro odontoblasty a jeho fluorescence je v pulpě rozsáhlejší, DMP1 se podílí i na mineralizování jiných tvrdých tkání. Zvýšená intenzita DSPP může být také způsobena autofluorescencí, což negativně ovlivňuje správné rozlišení specifického signálu. Narozdíl od DMP1, jehož intenzita se jeví více specificky.

4.2 Morfologická struktura řezáku

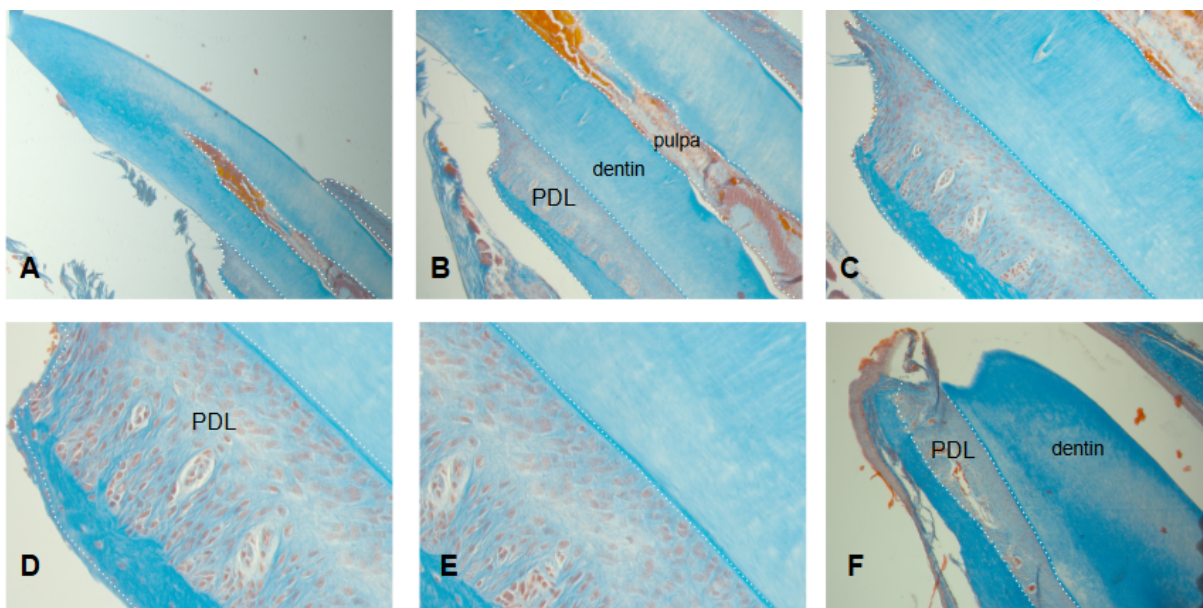
4.2.1 Mandibula



Obr. 26: Mandibulární řezák bez zastřihnutí (vlastní snímky). Sagitální řez. Bl6 myš, sklo 2.5, řez 1. Hematoxylin eosinové barvení. **A** – Oblast labiální cervikální kličky (laCL) a pulpy, zvětšení 5x. **B** – Oblast špičky řezáku s dentinem, zvětšení 20x. **C** – Oblast špičky řezáku s periodontálním ligamentem (PDL) a dentinem, zvětšení 10x.



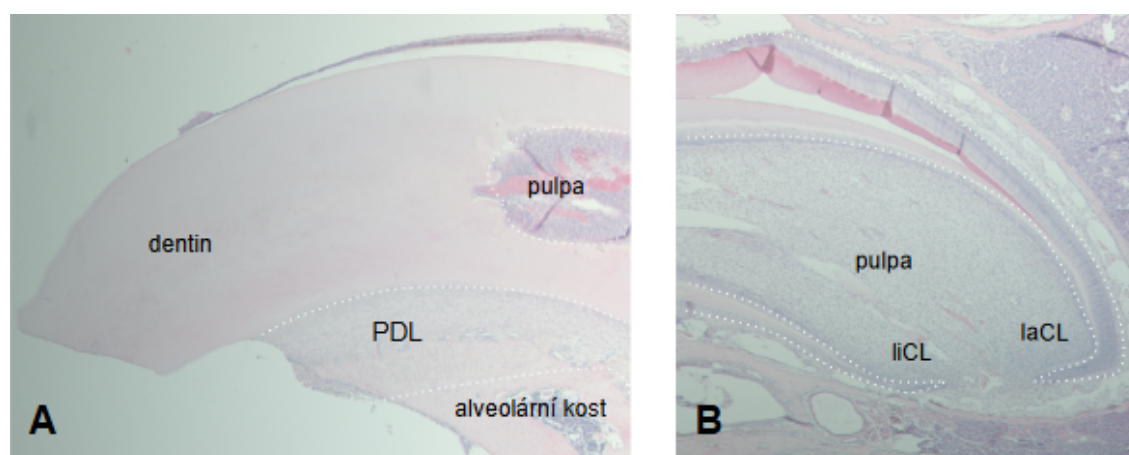
Obr. 27: Mandibulární špičky řezáků bez zastřihnutí (vlastní snímky). Sagitální řezy. Bl6 myš. **A:** sklo 2.5, **B-D:** sklo 2.1. Hematoxylin eosinové barvení. **A** – Detail na dentin a pulpu, zvětšení 10x, řez 4. **B** – Detail na dentin, pulpu, periodontální ligament (PDL) a alveolární kost, zvětšení 5x, řez 1. **C** – Detail na dentin, pulpu, periodontální ligament (PDL) a alveolární kost, zvětšení 5x, řez 2. **D** – Zobrazení dentinu a periodontálního ligamentu (PDL), zvětšení 10x, řez 2.



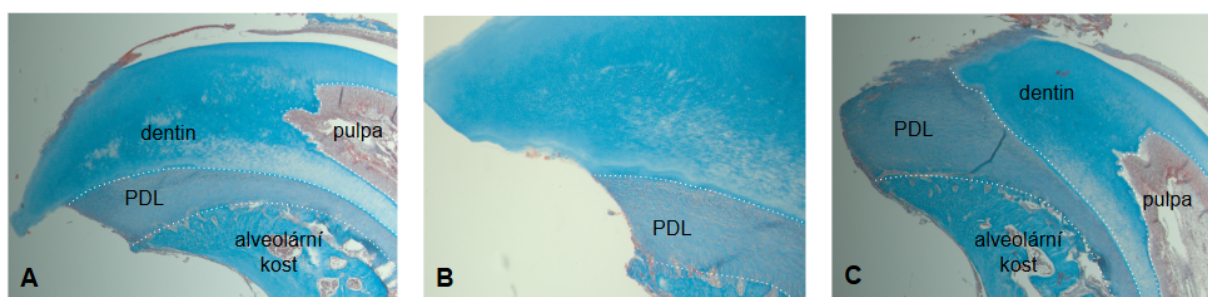
Obr. 28: Mandibulární špičky řezáků bez zastříhnutí (vlastní snímky). Sagitální řezy. Barvení Massonovým modrým trichromem. **A-E:** Bl6 myš, sklo 2.2, řez 4. **F:** FT89 myš, sklo 1.5, řez 3. **A** – Přehledový snímek špičky řezáku, zvětšení 5x. **B** – Zobrazení pulpy, dentinu a periodontálního ligamentu (PDL), zvětšení 10x. **C** – Rozhraní mezi pulpou, dentinem a periodontálním ligamentem (PDL), zvětšení 20x. **D** – Detail na periodontální ligament (PDL), zvětšení 40x. **E** – Detail na periodontální ligament (PDL), zvětšení 40x. **F** – Zobrazení dentinu a periodontálního ligamentu (PDL), zvětšení 10x.

Tyto snímky zaznamenávají samotnou strukturu dosud hojně neprozkoumané distální části mandibulárního řezáku i s ukázkou labiální cervikální kličky (obr. 26A). Na některých snímcích lze pozorovat strukturu pulpy (obr. 27A/B/C, 28A/B) nebo periodontálního ligamentu (PDL) (obr. 26C, 27B/C/D, 28B-F). PDL zasahuje přímo na konec špičky zubu. Detaily na špičku řezáku zobrazují její specifický zalomený tvar vyskytující se z důvodu přirozené abraze.

4.2.2 Maxila



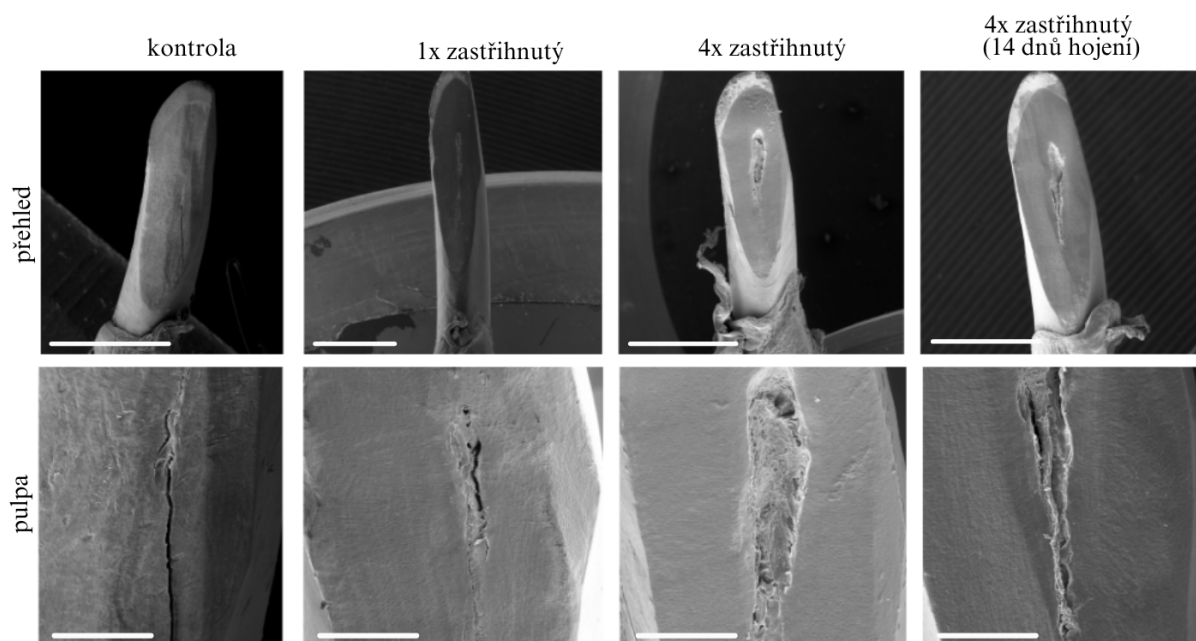
Obr. 29: Maxilární řezák bez zastřihnutí (vlastní snímky). Sagitální řez. BL6 myš, sklo 2.1. Hematoxylin eosinové barvení. **A** – Oblast špičky řezáku s dentinem, pulpou, periodontálním ligamentem (PDL) a alveolární kostí, zvětšení 5x, řez 3. **B** – Oblast labiální (laCL) a lingvální (liCL) cervikální kličky řezáku s pulpou, zvětšení 5x, řez 4.



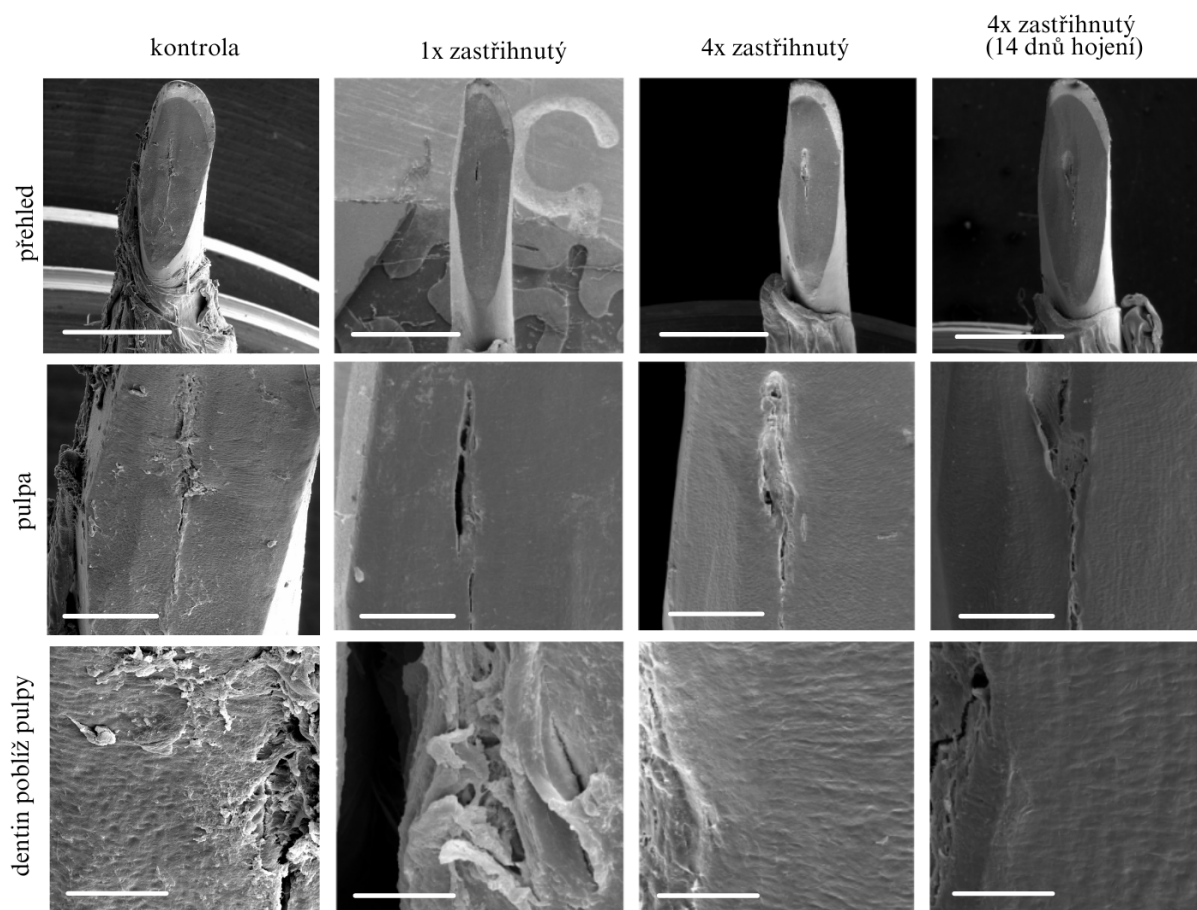
Obr. 30: Maxilární špičky řezáků bez zastřihnutí (vlastní snímky). Sagitální řezy. BL6 myš, sklo 2.2. Barvení Massonovým modrým trichromem. **A** – Zobrazení pulpy, dentinu, periodontálního ligamentu (PDL) a alveolární kosti, zvětšení 5x, řez 1. **B** – Detail na periodontální ligament (PDL) a dentin, zvětšení 10x, řez 1. **C** – Zobrazení pulpy, dentinu, periodontálního ligamentu (PDL) a alveolární kosti, zvětšení 5x, řez 2.

Na snímcích je detailně zachycena hranice mezi pulpou, PDL a dentinem v distální části maxilárního řezáku. Dále byly zaznamenány snímky lingválních a labiálních cervikálních kliček v apikální části řezáku (obr. 29B). Barvení modrým trichromem dobře rozlišuje PDL (obr. 30) a stejně jako v případě mandibulárního řezáku, i zde jde specificky vidět morfologická struktura špičky řezáku s jejím otevřením přímo u PDL.

4.3 Hojení na úrovni tvrdých tkání



Obr. 31: Přehledové snímky okluzní části levého řezáku – kontrolní, nepoškozená strana (vlastní snímky). DD myši. SE detektor. Zvětšení: přehled 50-75x, pulpa 300x, dentin poblíž pulpy 3300x (1x zastříhnutý) a 1500x. Měřítka: přehled 1 mm, pulpa 200 µm, dentin poblíž pulpy 20µm (1x zastříhnutý), 50 µm (ostatní).

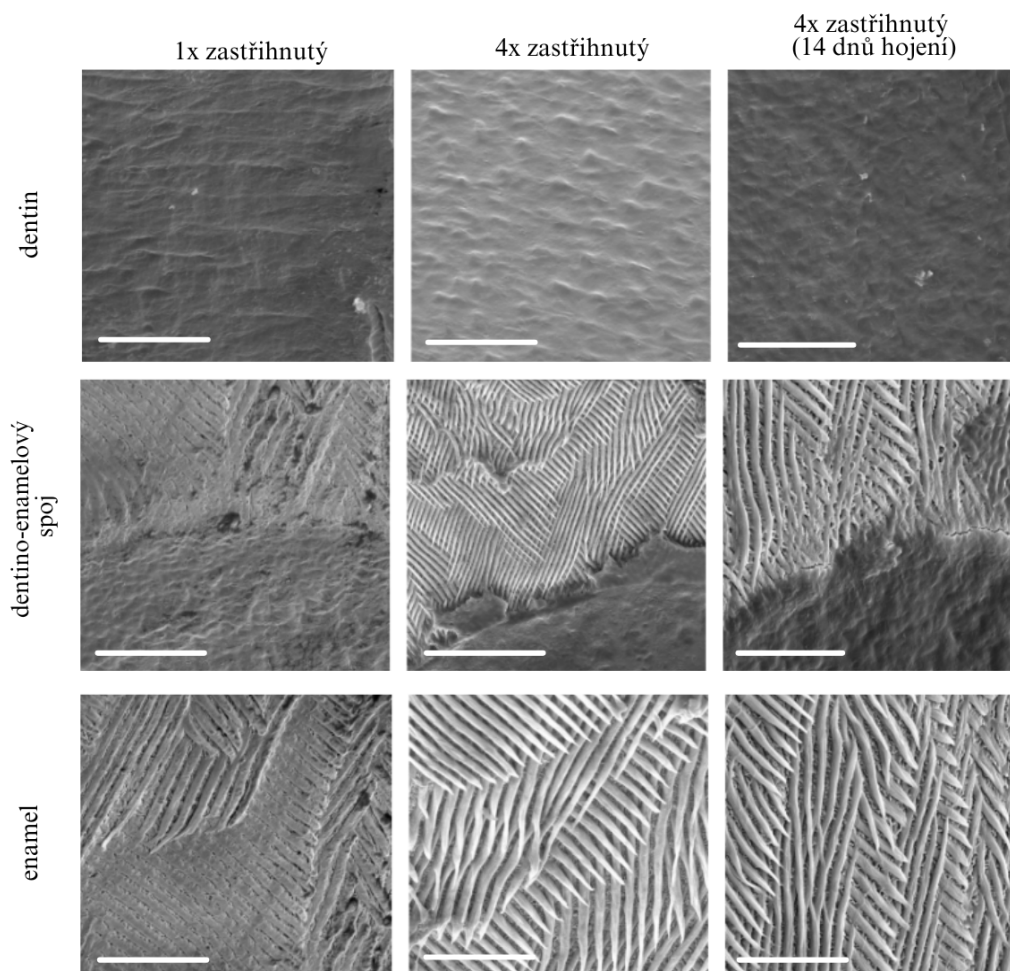


Obr. 32: Přehledové snímky okluzní části pravého řezáku (vlastní snímky). DD myši. SE detektor. Zvětšení: přehled 60-90x, pulpa 300x, dentin poblíž pulpy 3300x (1x zastříhnutý) a 1500x. Měřítka: přehled 500 μ m (kontrola), 1 mm (ostatní), pulpa 200 μ m, dentin poblíž pulpy 50 μ m.

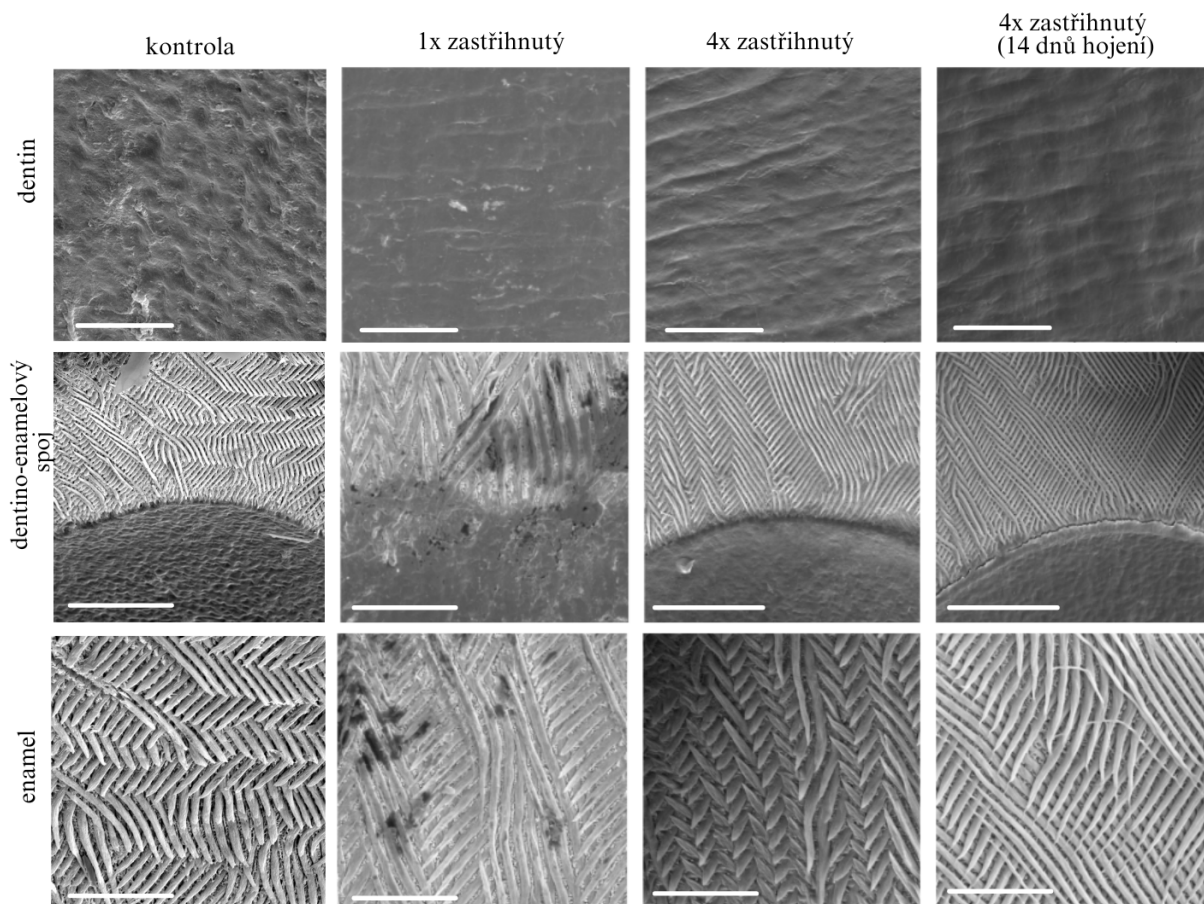
Zastříhnutí okluzní plochy řezáku už od pohledu mění její vzhled, neboť plocha obvykle není úplně zarovnaná, ale některé části jsou více vystouplé a zaoblené. Řezák celou okluzi během hojení navrácí do původní podoby a po 14 dnech si už můžeme všimnout rozdílů (obr. 32).

Po zastřížení zubu dojde k rozšíření otvoru pulpy (obr. 32). Zub totiž zrychlí svůj růst do délky, ale po dalších zastříženích už nestíhá zesílit svoji stěnu. Po 14 dnech hojení se otevření začíná viditelně zmenšovat a navrácet do původního stavu. Při rozšíření otvoru pulpy by mohly být myši náchylnější k infekcím.

Na rozhraní mezi dentinem a pulpou si můžeme lépe všimnout samotné struktury pulpy, která je narozdíl od dentinu a enamelu měkkou tkání. Jedná se o přechod zubu mezi vnějším a vnitřním prostředím, jenž se v průběhu hojení postupně stahuje.



Obr. 33: Detailní snímky okluzní části levého řezáku – kontrolní, nepoškozená strana (vlastní snímky). DD myši. SE detektor. Zvětšení: dentin 3300x a 1500x (4x zastřihnutý), dentino-enamelový spoj 3300x a 1500x (4x zastřihnutý), enamel 3300x. Měřítka: dentin 20 µm (ostatní), 50 µm (4x zastřihnutý, 14 dnů hojení), dentino-enamelový spoj 20 µm (ostatní), 50 µm (4x zastřihnutý), enamel 20 µm.



Obr. 34: Detailní snímky okluzní části pravého řezáku (vlastní snímky). DD myši. SE detektor. Zvětšení: dentin 3300x, dentino-enamelový spoj 3350x (1x zastřihnutý) a 1500x, enamel 3300x. Měřítka: dentin 20 μm , dentino-enamelový spoj 50 μm , enamel 20 μm .

Na obrázcích 33 a 34 už pozorujeme detailní struktury tvrdých tkání a tedy vnější oblast zubu bez i po poškození. Struktura dentinu se po 4 zastřihnutích změnila, ale po 14 dnech hojení nejsou vidět znatelné změny, pouze hrubší textura dentinu (obr. 34). Hojení vnější oblasti zubu bude tedy pravděpodobně trvat déle. Změny u dentino-enamelového spoje během hojení ukazují hladší přechod mezi těmito strukturami. Krystalický vzhled enamelu je v každé oblasti řezáku trochu jiný, ale obecně můžeme říci, že daná vlákna jsou v běžném stavu prodloužená a při poranění jsou kratší. Během hojení se postupně prodlužují.

5 DISKUSE

Distální část myšího řezáku se v literatuře příliš neobjevuje a před jejím detailním prozkoumáním se dává přednost části apikální, ve které se nacházejí kmenové buňky. Studium kmenových buněk je nepochybně důležité pro správné pochopení regenerace a možnému budoucímu využití v regenerativní medicíně. Pro správné pochopení aktivace a buněčné proliferace v apikální části řezáku je však neméně důležité studovat část distální, jež s mikroprostředím kmenových buněk interaguje prostřednictvím signálních drah, nervových buněk, krevního řečiště či imunitního systému (Krivanek et al., 2017).

Tato práce se zabývá studiem buněčných typů v distální části řezáku, jeho morfologií a také změnami na úrovni tvrdých tkání po poranění. O této problematice se odborná literatura sice zmiňuje (Yu and Klein, 2020), ale nevěnuje se myšlence komunikace mezi apikálním a distálním prostředím, kterou tato práce pomáhá otevřít díky jednotlivým experimentálním metodám.

Konkrétně imunohistochemické metody potvrdily výskyt krevních cév (COL4, EMCN) a nervových buněk (TUI1) v distální oblasti řezáku, především v pulpě. Výsledky detailněji popisují inervaci a prokrvení celého řezáku. Zvýšená koncentrace těchto antigenů při poranění hypoteticky souvisí se zvýšením počtu pericytů, angiogenezí a komunikací nervů s mikroprostředím pulpy pro zrychlení diferenciaci a následné obnovení zubní tkáně. Hojný výskyt makrofágů (AIF1) v neporaněné špičce řezáku naznačuje, že by se mohly podílet nejen na hojení a imunitní ochraně, ale i na přirozené obnově u kontinuálního dorůstání z důvodu abraze. Dále v této oblasti řezáku došlo k detekci proteinů, které se podílejí na mineralizaci (DMP1, DSPP). Identifikace mineralizačních proteinů v pulpě úzce souvisí s obnovou okluzní roviny řezáku, která byla snímána na elektronovém mikroskopu. Při poranění je pulpa v bližším kontaktu s vnějším prostředím, neboť má rozšířený otvor. Jak dochází k hojení, otvor se postupně stahuje, na což by mohly mít vliv i již zmíněné DMP1 a DSPP proteiny v distální oblasti. Při rozšíření otvoru může být zub náchylnější k infekcím a pravděpodobně se zde tak vyskytuje i větší množství imunitních buněk. Anatomie špičky řezáku díky histologickým metodám zase zobrazuje zatím hojně nezkoumanou morfologii zubu klíčovou pro další studium.

Myš pomocí řezáku objevuje okolní prostředí, přičemž při poranění se zrychlí exprese kmenových buněk, což umožňuje jeho opětovný růst (An et al., 2018). Pomocí komunikace s vnějším a vnitřním prostředím by mohla existovat spojitost s regulací exprese signálních drah. Dalšími postupy by mohla být rozsáhlejší detekce buněčných typů ve špičce řezáku nebo zmapování hlodavců a zajíců, u kterých se toto otevření vyskytuje.

Po přečtení odborné literatury (Renvoisé and Michon, 2014) se nabízí několik možných teorií otevření špičky řezáku. Jeho výskyt by mohl být dán evolučním uspořádáním Hertwigovy epitelové kořenové pochvy, neboť se podílí na formaci kořenových kanálků a brání úplnému vytvarování kořene. Mohlo by se také jednat o evoluční mechanismus, jenž budou mít spojený hlodavci a zajícovci, u kterých se kontinuálně dorůstající chrup vyvíjí v podobnou dobu a jsou si evolučně nejbližší. Možná se jednalo o vývojový aspekt, který se právě vyvinul z důvodu imunitní obrany či mechanosenzitivního vnímání.

Pokud odhalíme, jak evolučně došlo k přeměně z brachyodontního chrupu do hypselodontního na molekulární úrovni, mohli bychom se přiblížit budoucnosti regenerativní medicíny. Jednotlivé genové exprese a tkáňová uspořádání by mohly být zkoumány s cílem budoucí implementace na lidský chrup, který by byl po modifikaci schopen sebeobnovy.

Z práce se však nedají vyvozovat finální závěry a bude zapotřebí experimenty rozšířit na více vzorků. Nicméně nynější experimenty již tuto tezi potvrzují a špička řezáku rozhodně představuje klíčovou oblast pro další výzkum v oblasti regenerace či imunitního systému hlodavců.

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá studiem špičky v distální části myšího řezáku a její reakcí na poranění, což je doposud nepříliš prozkoumaná oblast tohoto komplexního systému. Projekt se skládal z více experimentálních částí, jež měly za cíl toto prostředí zmapovat v jeho fyziologické podobě i v reakci na mechanické poškození. Konkrétně byly pomocí imunohistochemie detekovány antigeny AIF1, COL4, TUJ1, THY1, EMCN, proteiny DMP1 a DSPP, jež byly již dříve popsány hlavně v apikální části řezáku. Díky pokročilým zobrazovacím metodám byly řezáky pozorovány na morfologické úrovni a také na úrovni tvrdých tkání.

Výzkum potvrdil přítomnost jednotlivých antigenů a zároveň byla popsána jejich případná změna výskytu po poškození řezáku. V distální části zubní pulpy byly detekovány buňky COL4, EMCN a TUJ1, což detailněji zobrazuje prokrvenost a inervaci prostředí. Po poškození byla jejich koncentrace zvýšená, což je způsobeno přirozenou reakcí zubu na poranění, kdy dochází k vyššímu prokrvení, což ovlivňují i nervové buňky. Výskyt AIF1 byl hojně zaznamenán i ve zdravém řezáku. To podporuje tezi o vysoké imunitní ochraně vůči vnějšímu prostředí. THY1 měl vysokou míru nespecifického signálu a z těchto dat zatím nelze vyvodit závěr. Poslední detekované byly proteiny DMP1 a DSPP, které se hojně podílejí na mineralizaci, pravděpodobně i na zmenšování otvoru pulpy do vnějšího prostředí v případě, že dojde k poškození řezáku.

Histologické snímky zobrazují špičku řezáku z jiného pohledu a mohou být nápomocné do studia vývojové biologie, histologie a anatomie či v budoucí aplikaci do výzkumu.

V případě hojení na úrovni tvrdých tkání se otvor pulpy postupně rozšiřoval, neboť zub akceleroval svůj růst do délky a nestíhal ztlušťovat svou stěnu. Patrná změna byla i na celé okluzní ploše řezáku či na mikroskopické struktuře krystalického enamelu.

Dalšími možnostmi studia této problematiky je rozšiřující detekce jiných typů buněčných antigenů a hojnější porovnání s poškozenými řezáky a různými časovými relacemi. Nabízí se podrobné studium pericytů a jejich funkce v distální části, jež působí jako jedny z klíčových složek hojení. Pomocí *in situ* hybridizačních technik by mohly být zkoumány nové signální dráhy komunikující mezi distální a apikální částí. Poslední možností je detailní studium evolučních mechanismů, které vedly k charakteristickému otevření špičky.

Práce otevírá novou oblast studia na poli regenerativní medicíny a vývojové biologie. Bližší poznatky by mohly přinést informace o hojení tkání, podobnosti s lidským chrupem a možnou aplikací mechanismů do tkáňového inženýrství. Biologická stránka nabízí potenciální spojitosti v komunikaci hlodavčího komplexního imunitního systému a jejich specificky uspořádaného chrupu zvyklého interagovat s vnějším prostředím.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:

Anatomie myší mandibuly, maxily a okluzní části řezáku 12

Obrázek 2:

Odontogeneze myšího řezáku 14

Obrázek 3:

Detail na buněčné prostředí špičky řezáku 15

Obrázek 4:

Princip imunohistochemie 20

Obrázek 5:

Nákres disekce maxily a mandibuly 21

Obrázek 6:

Sagitální vs. transverzální řez 22

Obrázek 7:

Mandibulární řezák bez zastříhnutí, s detailem na špičku řezáku 30

Obrázek 8:

Mandibulární řezák 6 hodin po zastříhnutí, s detailem na špičku řezáku 30

Obrázek 9:

Špička maxilárního řezáku bez zastříhnutí 31

Obrázek 10:

Špička maxilárního řezáku 6 hodin po zastříhnutí 31

Obrázek 11:

Maxilární labiální a lingvální cervikální klička bez zastříhnutí 32

Obrázek 12:

Maxilární labiální cervikální klička 6 hodin po zastříhnutí 33

Obrázek 13:

Mandibulární špička řezáku bez zastříhnutí 34

Obrázek 14:

Mandibulární řezák bez zastříhnutí, s detailem na apikální část pulpy řezáku 34

Obrázek 15:

Maxilární řezák bez zastříhnutí, s detailem na pulpu řezáku 35

Obrázek 16:	
Maxilární řezák bez zastřihnutí	35
Obrázek 17:	
Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí, s detailem na rozhraní mezi pulpou a dentinem	37
Obrázek 18:	
Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí, s detailem na rozhraní mezi pulpou a dentinem	37
Obrázek 19:	
Mandibulární řezák bez zastřihnutí, s detailem na pulpu řezáku	38
Obrázek 20:	
Mandibulární pulpa řezáku bez zastřihnutí, s bližším detailem na rozhraní pulpy a dentinu	38
Obrázek 21:	
Maxilární špička řezáku bez zastřihnutí	39
Obrázek 22:	
Mandibulární špička řezáku bez zastřihnutí	39
Obrázek 23:	
Mandibulární pulpa řezáku bez zastřihnutí	40
Obrázek 24:	
Maxilární pulpa řezáku bez zastřihnutí	40
Obrázek 25:	
Detail na maxilární pulpu řezáku bez zastřihnutí	41
Obrázek 26:	
Mandibulární řezák bez zastřihnutí	42
Obrázek 27:	
Mandibulární špičky řezáků bez zastřihnutí	42
Obrázek 28:	
Mandibulární špičky řezáků bez zastřihnutí	43
Obrázek 29:	
Maxilární řezák bez zastřihnutí	44

Obrázek 30:

Maxilární špičky řezáků bez zastřihnutí 44

Obrázek 31:

Přehledové snímky okluzní části levého řezáku – kontrolní, nepoškozená strana 45

Obrázek 32:

Přehledové snímky okluzní části pravého řezáku 46

Obrázek 33:

Detailní snímky okluzní části levého řezáku – kontrolní, nepoškozená strana 47

Obrázek 34:

Detailní snímky okluzní části pravého řezáku 48

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1:

Koncentrace primárních a sekundárních protilátek, jejich původ a druh	23
---	----

Tabulka 2:

Proces před zalitím vzorků do parafínu	25
--	----

Tabulka 3:

Postup při hematoxylin eosinovém barvení	26
--	----

Tabulka 4:

Postup při barvení Massonova modrého trichromu	27
--	----

9 POUŽITÁ LITERATURA

- An, Z., Sabalic, M., Bloomquist, R.F., Fowler, T.E., Streelman, T., Sharpe, P.T., 2018. A quiescent cell population replenishes mesenchymal stem cells to drive accelerated growth in mouse incisors. *Nat. Commun.* 9, 378. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02785-6>
- Bazira, P.J., 2021. An overview of the nervous system. *Surg. Oxf.* 39, 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.06.012>
- Berggreen, E., Haug, S.R., Mkonyi, L.E., Bletsa, A., 2009. Characterization of the dental lymphatic system and identification of cells immunopositive to specific lymphatic markers. *Eur. J. Oral Sci.* 117, 34–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00592.x>
- Boran, T., Peterkova, R., Lesot, H., Lyons, D.B., Peterka, M., Klein, O.D., 2009. Temporal analysis of ectopic enamel production in incisors from sprouty mutant mice. *J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.* 312B, 473–485. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21254>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2001. The components of the immune system, in: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition. Garland Science.
- Couve, E., Schmachtenberg, O., 2018. Schwann Cell Responses and Plasticity in Different Dental Pulp Scenarios. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 299. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00299>
- Creager, M.D., Choi, J., Hutcheson, J.D., Aikawa, E., 2017. 3.18 Immunohistochemistry, in: *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier, pp. 387–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09828-3>
- De Leon-Oliva, D., Garcia-Montero, C., Fraile-Martinez, O., Boaru, D.L., García-Puente, L., Rios-Parra, A., Garrido-Gil, M.J., Casanova-Martín, C., García-Honduvilla, N., Bujan, J., Guijarro, L.G., Alvarez-Mon, M., Ortega, M.A., 2023. AIF1: Function and Connection with Inflammatory Diseases. *Biology* 12, 694. <https://doi.org/10.3390/biology12050694>
- Elliott, A.D., 2020. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr. Protoc. Cytom.* 92, e68. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
- Farges, J.-C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A.J., Cooper, P.R., 2015. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015, 230251. <https://doi.org/10.1155/2015/230251>
- Gan, C., Yaqoob, U., Lu, J., Xie, M., Anwar, A., Jalan-Sakrikar, N., Jerez, S., Sehrawat, T.S., Navarro-Corcuera, A., Kostallari, E., Habash, N.W., Cao, S., Shah, V.H., n.d. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to portal hypertension through collagen type IV–driven sinusoidal remodeling. *JCI Insight* 9, e174775. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.174775>

- Goldberg, M., Lacerda-Pinheiro, S., Priam, F., Jegat, N., Six, N., Bonnefoix, M., Septier, D., Chaussain-Miller, C., Veis, A., Denbesten, P., Poliard, A., 2008. Matricellular molecules and odontoblast progenitors as tools for dentin repair and regeneration. *Clin. Oral Investig.* 12, 109–112. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0172-6>
- Gonzalez Lopez, M., Huteckova, B., Lavicky, J., Zezula, N., Rakultsev, V., Fridrichova, V., Tuaima, H., Nottmeier, C., Petersen, J., Kavkova, M., Zikmund, T., Kaiser, J., Lav, R., Star, H., Bryja, V., Henyš, P., Vořechovský, M., Tucker, A.S., Harnos, J., Buchtova, M., Krivanek, J., 2023. Spatiotemporal monitoring of hard tissue development reveals unknown features of tooth and bone development. *Sci. Adv.* 9, eadi0482. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi0482>
- Hagan, C.E., Bolon, B., Keene, C.D., 2012. Nervous System, in: *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, pp. 339–394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00020-2>
- Hahn, C.-L., Liewehr, F.R., 2007. Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries. *J. Endod.* 33, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.001>
- Hu, P., Leyton, L., Hagood, J.S., Barker, T.H., 2022. Thy-1-Integrin Interactions in cis and Trans Mediate Distinctive Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 928510. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.928510>
- Huang, X., Bringas, P., Slavkin, H.C., Chai, Y., 2009. Fate of HERS during tooth root development. *Dev. Biol.* 334, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.034>
- Jernvall, J., Thesleff, I., 2012. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development* 139, 3487–3497. <https://doi.org/10.1242/dev.085084>
- Jheon, A.H., Seidel, K., Biehs, B., Klein, O.D., 2013. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *WIREs Dev. Biol.* 2, 165–182. <https://doi.org/10.1002/wdev.63>
- Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., Bergenholtz, G., 1998. Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9, 179–200. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020301>
- Kaukua, N., Shahidi, M.K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Ährlund-Richter, L., Blom, H., Brismar, H., Lopes, N.A., Pachnis, V., Suter, U., Clevers, H., Thesleff, I., Sharpe, P., Ernfors, P., Fried, K., Adameyko, I., 2014. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 513, 551–554. <https://doi.org/10.1038/nature13536>
- Krivanek, J., Adameyko, I., Fried, K., 2017. Heterogeneity and Developmental Connections between Cell Types Inhabiting Teeth. *Front. Physiol.* 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00376>

- Krivanek, J., Soldatov, R.A., Kastriti, M.E., Chontorotzea, T., Herdina, A.N., Petersen, J., Szarowska, B., Landova, M., Matejova, V.K., Holla, L.I., Kuchler, U., Zdrilic, I.V., Vijaykumar, A., Balic, A., Marangoni, P., Klein, O.D., Neves, V.C.M., Yianni, V., Sharpe, P.T., Harkany, T., Metscher, B.D., Bajénoff, M., Mina, M., Fried, K., Kharchenko, P.V., Adameyko, I., 2020. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat. Commun.* 11, 4816. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18512-7>
- Lavicky, J., Kolouskova, M., Prochazka, D., Rakultsev, V., Gonzalez-Lopez, M., Steklikova, K., Bartos, M., Vijaykumar, A., Kaiser, J., Pořízka, P., Hovorakova, M., Mina, M., Krivanek, J., 2022. The Development of Dentin Microstructure Is Controlled by the Type of Adjacent Epithelium. *J. Bone Miner. Res.* 37, 323–339. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4471>
- Linden, M., Ward, J.M., Cherian, S., 2012. Hematopoietic and Lymphoid Tissues, in: *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, pp. 309–338. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00019-6>
- Matsumoto, Y., Zhang, B., Kato, S., 2002. Lymphatic networks in the periodontal tissue and dental pulp as revealed by histochemical study. *Microsc. Res. Tech.* 56, 50–59. <https://doi.org/10.1002/jemt.10006>
- Mestas, J., Hughes, C.C.W., 2004. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Mohammed, A., Abdullah, A., n.d. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM): A REVIEW.
- Nadal-Nicolás, F.M., Galindo-Romero, C., Lucas-Ruiz, F., Marsh-Amstrong, N., Li, W., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2023. Pan-retinal ganglion cell markers in mice, rats, and rhesus macaques. *Zool. Res.* 44, 226–248. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.308>
- Naftel, J.P., Richards, L.P., Pan, M., Bernanke, J.M., 1999. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat. Rec.* 256, 433–447. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(19991201\)256:4<433::AID-AR10>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(19991201)256:4<433::AID-AR10>3.0.CO;2-R)
- Orchardson, R., Cadden, S.W., 2001. An Update on the Physiology of the Dentine–Pulp Complex. *Dent. Update* 28, 200–209. <https://doi.org/10.12968/denu.2001.28.4.200>
- Pang, Y.W.Y., Feng, J., Daltoe, F., Fatscher, R., Gentleman, E., Gentleman, M.M., Sharpe, P.T., 2016. A perivascular stem cell niche at the tip of mouse incisors regulates tissue regeneration. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31, 514–523. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2717>

- Renvoisé, E., Michon, F., 2014. An Evo-Devo perspective on ever-growing teeth in mammals and dental stem cell maintenance. *Front. Physiol.* 5, 324. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00324>
- Saghiri, M.A., Asatourian, A., Sorenson, C.M., Sheibani, N., 2018. Mice Dental Pulp and Periodontal Ligament Endothelial Cells Present Different Angiogenic Phenotypes. *Tissue Cell* 50, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.11.004>
- Samulowitz, U., Kuhn, A., Brachtendorf, G., Nawroth, R., Braun, A., Bankfalvi, A., Böcker, W., Vestweber, D., 2002. Human Endomucin. *Am. J. Pathol.* 160, 1669–1681.
- Shuhaibar, N., Hand, A.R., Terasaki, M., 2021. Odontoblast processes of the mouse incisor are plates oriented in the direction of growth. *Anat. Rec.* 304, 1820–1827. <https://doi.org/10.1002/ar.24570>
- Thesleff, I., Tummers, M., 2008. Tooth organogenesis and regeneration, in: *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA).
- Treuting, P.M., Morton, T.H., 2012. Oral Cavity and Teeth, in: *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, pp. 95–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00007-X>
- Vijaykumar, A., Ghassem-Zadeh, S., Vidovic-Zdrilic, I., Komitas, K., Adameyko, I., Krivanek, J., Fu, Y., Maye, P., Mina, M., 2019. Generation and characterization of DSPP-Cerulean/DMP1-Cherry reporter mice. *genesis* 57, e23324. <https://doi.org/10.1002/dvg.23324>
- Yianni, V., Sharpe, P.T., 2020. Transcriptomic Profiling of Dental Pulp Pericytes: An RNAseq Approach. *Front. Dent. Med.* 1. <https://doi.org/10.3389/fdmed.2020.00006>
- Yu, T., Klein, O.D., 2020. Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Development* 147, dev184754. <https://doi.org/10.1242/dev.184754>
- Yu, T., Volponi, A.A., Babb, R., An, Z., Sharpe, P.T., 2015. Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 187–212. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.010>
- Zhao, H., Feng, J., Seidel, K., Shi, S., Klein, O., Sharpe, P., Chai, Y., 2014. Secretion of Shh by a Neurovascular Bundle Niche Supports Mesenchymal Stem Cell Homeostasis in the Adult Mouse Incisor. *Cell Stem Cell* 14, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.013>