

Заједничке имунофенотипске одлике подвличне пљувачне жлезде и грудне жлезде пацова

Иван Дожић¹, Татјана Тодоровић¹, Миодраг Чолић²

¹Одељење опште и оралне биохемије, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Институт за медицинска истраживања, Војномедицинска академија, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Субмандибуларна пљувачна жлезда је део неуроимуноендокриног система која посредством биолошких фактора регулише многе функције у организму, укључујући и модулацију функције тимуса.

Циљ рада Циљ рада био је да се испитају имунофенотипске одлике субмандибуларне пљувачне жлезде пацова током онтогенезе помоћу панела моноклонских антитела и упореде с фенотипским својствима епителних компоненти тимуса.

Методе рада Истраживања су рађена на пацовима соја *АО (Albino Oxford)*, мушког пола, старости од једног, 30 и 60 дана. За фенотипску анализу коришћена је стрептавидин-биотин-пероксидазна метода бојења.

Резултати Ова имунохистолошка студија указује на хетерогеност фенотипских одлика појединих компоненти субмандибуларне пљувачне жлезде током постнаталног развоја. Такође је установљено да субмандибуларна пљувачна жлезда и тимус имају заједничке антигене, али је много значајнија фенотипска сличност између појединих региона у оба испитивана органа. Епителне ћелије изводних канала субмандибуларне пљувачне жлезде су фенотипски сличне епителним ћелијама субкапсуларне и већини ћелија у медули тимуса. Епителне ћелије ацинуса су фенотипски сличне епителним ћелијама кортекса тимуса.

Закључак Фенотипска комплексност субмандибуларне пљувачне жлезде и сличност с тимусом отвара нове могућности за анализу фенотипске сличности између ове жлезде и лимфатичних органа.

Кључне речи: субмандибуларна пљувачна жлезда; тимус; пацов; моноклонска антитела

УВОД

Субмандибуларна пљувачна жлезда (СПЖ) је важан орган неуроимуноендокриног система због њене функционалне повезаности с осталим жлездама, као што су надбубрежна жлезда, полне жлезде и хипофиза [1-5]. Документовани су и подаци који указују на функционалну повезаност грудне жлезде (тимуса) и СПЖ [6-11]. Основна функција тимуса је регулисање диференцијације и матурације Т-лимфоцита [12], док је примарна функција СПЖ формирање и лучење пљувачке, као и синтеза специфичних протеина [13]. Заједничко обележје тимуса и СПЖ је ендокрина активност због постојања специфичних ћелија које испољавају хормонску активност. Хормонски активне ћелије установљене су у епителним зонама гранулираних вијугавих каналића СПЖ [14-18], док су ћелије задужене за стварање тимусних хормона локализоване у епителним зонама субкапсуле и медуле [19, 20, 21]. Повезаност СПЖ и тимуса и њихове интеракције не могу се испитивати одвојено од комплексног неуроендокриног система, у чијем је саставу функционална равнотежа свих ендокриних и егзокриних жлезда. Међузависност ове две жлезде углавном је заснована на функционалним одликама епи-

телних ћелија. У литератури нису пронађени радови о заједничким антигеним обележјима СПЖ и тимуса.

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања био је да се дефинишу фенотипска својства СПЖ и упореде фенотипска сличност између епителних и мезенхимних компоненти СПЖ и тимуса.

МЕТОДЕ РАДА

Испитивања су рађена на СПЖ и тимусу пацова соја *АО (Albino Oxford)* мушког рода. Животиње су одгајане и размножаване у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. За испитивање сваког стадијума постнаталног развоја (старости од једног, 30 и 60 дана) коришћено је по пет пацова. Пацови су жртвовани етарском инхалационом анестезијом. Пресеци ткива СПЖ и тимуса, дебљине 5-6 μm , прављени су на криотому (*LEICA*, Немачка) при температури од -20°C . Плочице с ткивним пресецима сушене су на собној температури два-три сата или су остављане у фрижидеру преко ноћи. Након тога

Correspondence to:

Ivan DOŽIĆ
Stomatološki fakultet
Dr Subotića 8, 11000 Beograd
idozic@eunet.rs

фиксиране су у ацетону десет минута. Имунохистолошке одлике жлезда проучаване су на животињама првог, 30. и 60. дана постнаталног развоја. Последњи термин истовремено означава и полну зрелост животиње.

Стрептавидин-биотин пероксидазно бојење: криостатски пресеци ткива СПЖ и тимуса, фиксирани у ацетону, инкубирани су са по 20 μ l примарног моноклонског антитела (мАт) одговарајућег разблажења (Табела 1) у *TBS* (енгл. *tris-buffered saline*), у влажној комори 60 минута. Затим су ткивни пресеци испрани у *TBS* 10 минута, након чега је блокирана ендогена пероксидаза са троцентним водоник-пероксидом у метанолу 20 минута. На пресеке ткива је нането 20-30 μ l секундарног антитела конјугованог биотином у разблажењу 1:50. Пресеци су инкубирани у влажној комори 30 минута на собној температури. Након испирања у *TBS* нането је по 20 μ l стрептавидина конјугованог пероксидазом у разблажењу 1:50, и инкубирано 30 минута на собној температури. Визуелизација бојења је урађена наношењем супстрата *DAB* (3'3 диаминобензедин-тетрахлорид) током 5-15 минута. Препарати су контрастирани раствором хематоксилина и монтирани Кајзеровим гелом. Анализа обојених препарата је вршена светлосним микроскопом. Негативна контрола је добијена заменом примарног антитела раствором *TBS*.

У истраживању су коришћена примарна мАт, чије су основне одлике приказане у табели 1. Антитела препознају цитокератине (*CK7*, *CK8*, *CK18*, *K8.12*, *K8.13*, *CK* бубрега), епител пацова (*PT13D11*), адхезиони молекули сијалоадхезин (*ED3*) и компоненту ванћелијског матрикса колаген (*RMC-23*).

Секундарна антитела су имуноглобулини (*Ig*) козе или овце против мишјег *Ig*. Антитела су конјугована биотином (*Dakopats*). Стрептавидин конјугован пероксидазом произведен је у фирми *Dakopats*.

РЕЗУЛТАТИ

Реактивност субмандибуларне пљувачне жлезде пацова са антицитокератинским антителима

Испитивања показују да су ацинусне ћелије различито обојене са анти-*CK* мАт (Табеле 2 и 3). Међутим, није уочена битнија разлика у експресији *CK* у ацинусима током постнаталног развоја. Слабију обојеност ацинуса показују мАт *CK18*, *K8.13* и *CK* бубрега. Такође је уочено да мАт *CK7* и *CK8* показују већу реактивност са серозним него са мукозним ацинусима. *K8.12*, мАт специфично за полипептиде *CK13* и *CK16*, није дало позитивну реакцију с овим ћелијама.

Реактивност епителних ћелија изводних канала са анти-*CK* антителима била је израженија од реактивности ацинусних ћелија. *K8.13* мАт је панепителни маркер јер боји епителне ћелије свих компоненти СПЖ пацова (Слика 1). За разлику од *K8.13*, мАт *K8.12* има најјачу реактивност у базалним ћелијама екскреторних канала, чији се број повећавао током сазревања

жлезде (Слика 2). Експресија мАт *CK8* у епителним ћелијама канала била је слабија од мАт *K8.13* и углавном локализована у базалним деловима ћелија. Сличну реактивност показивало је и мАт *CK7*. За разлику од њих, мАт *CK18* дифузно боји епителне ћелије канала (Слика 3) са смањењем експресије у ћелијама пругастих канала током онтогенезе. *CK* бубрега мАт се најснажније везује за епителне ћелије уметнутих канала, као и за апексни део епителних ћелија екскреторних канала, што је посебно изражено код одраслих животиња, пацова старих 60 дана (Слика 4).

Значајна компонента хистофизиолошке структуре СПЖ су и миоепителне ћелије. Оне показују реактивност са мАт *K8.12* и *K8.13*, док су мАт *CK7*, *CK8*, *CK18* и *CK* бубрега показала негативну реакцију с овим ћелијама.

Реактивност субмандибуларне пљувачне жлезде пацова са моноклонским антителима *ED3*, *PT13D11* и *RMC-23*

ED3 мАт специфично је за пацовски сијалоадхезин [22]. Ово антитело је преобладајући маркер миоепителних ћелија (Табела 4, слика 5). Међутим, код новорођених животиња овај молекул је снажно испољен у епителним ћелијама уметнутих, пругастих и екскреторних канала. У каснијем постнаталном периоду (30. и 60. дана) повећава се позитивност миоепителних ћелија око ацинуса и екскреторних канала, а смањује експресија у пругастих каналима. Типично је да код одраслих животиња (60. дана) постоји снажна реактивност само у појединим епителним ћелијама екскреторних канала.

PT13D11 је новопродуковано мАт у Институту за медицинска истраживања ВМА [23]. Показује сличну реактивност као мАт *ED3*, с тим што је позитивност пругастих и екскреторних канала слабија код тек рођених животиња (Табела 4). Такође се уочава разлика у локализацији антигена кога препознаје мАт *PT13D11*. Антиген је у епителним ћелијама локализован претежно на луминалном делу епителних ћелија канала. Интензивно боји и миоепителне ћелије око ацинуса (Слика 6).

RMC-23 мАт открива неке од компоненти пацовског колагена [24]. Изражено снажно се везује за интерстицијум СПЖ и за базалне мембране епителних ћелија свих компоненти ове жлезде, како код новорођених, тако и код одраслих животиња (Табела 4). Није уочена реактивност с епителним ћелијама, нити разлика у експресији овог маркера током онтогенетског развоја.

Реактивност тимуса пацова са антицитокератинским антителима

Цитокератинска антитела су показивала реактивност само с епителним ћелијама тимуса. Као што је приказано у табели 5, уочава се изразита хетерогеност епи-

Табела 1. Специфичне одлике примарних моноклонских антитела**Table 1.** Characteristics and specificities of monoclonal antibodies

Моноклонска антитела Monoclonal antibodies	Специфичности Specificity	Изотип Isotype	Разблажење Attenuation	Произвођач Manufacturer
CK7	CK7	IgG1	1:100	Sigma
CK8	CK8	IgG1	1:100	Sigma
CK18	CK18	IgG1	1:100	Sigma
K8.12	CK13, 16	IgG1	1:50	ICN
K8.13	CK1, 5-8, 10, 11, 18	IgG2a	1:50	ICN
PT13D11	Епител пацова Epithelium of rats	IgM	1:150	*
RMC-23	Колаген пацова Collagen in rats	IgG1	1:150	*
CK бубрега CK kidney	CK бубрега (CK7) CK kidney	IgG2a	1:10	Amersham
ED3	Сијалоадхезин Sialoadhesin	IgG1	1:25	Serotek

* антитела произведена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду

* antibodies produced at the Institute of Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade

Табела 2. Имунореактивност субмандибуларне пљувачне жлезде са моноклонским антителима CK7, CK8 и CK18 током онтогенезе**Table 2.** Immunoreactivity of CK7, CK8 and CK18 monoclonal antibodies with submandibular salivary gland during ontogenesis

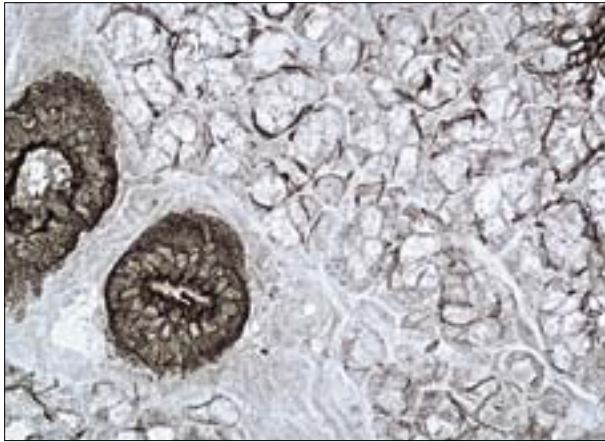
Моноклонска антитела Monoclonal antibody	CK7			CK8			CK18		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60
Дани Days									
Мукозни ацинуси Mucous acini	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)
Серозни ацинуси Serosus acini	2+(c);3+(c)J	2+(c);3+(c)J	2+(c)	3+(c)	3+(c)	3+(c)	1+(c)	1+(c)	1+(c)
Миоепителне ћелије Myoepithelial cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Уметнути канали (епителне ћелије) Intercalated ducts (epithelial cells)	2+(c);3+(c)J	2+(c);3+(c)J	2+(c)	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	4+(c)	4+(c)	4+(c)
Пругасти канали (епителне ћелије) Striated ducts (epithelial cells)	4+(c)	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	4+(c)	4+(c); 3+(b)J	3+(b)
Миоепителне ћелије Myoepithelial cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Екскреторни канали (епителне ћелије) Excretory duct (epithelial cells)	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	3+(c)*	4+(c)	4+(c)	4+(c)
Миоепителне ћелије Myoepithelial cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Базалне ћелије Basal cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = негативно бојење; 1+ – слабо бојење; 2+ – умерено бојење; 3+ – снажно бојење; 4+ – изразито снажно бојење; a – 10-20% позитивних ћелија; b – 30-50% позитивних ћелија; c – већина позитивних ћелија; * – бојење базалних делова ћелија; J – различита обојеност унутар испитиваног одељка свих испитиваних структура
- = negative staining; 1+ – weak staining; 2+ – moderate staining; 3+ – strong staining; 4+ – very strong staining; a – 10-20% cells positive; b – 30-50% cells positive; c – majority cells positive; * – staining basal parths cells; J – different staining single cells inside investigated field of all investigated structures

Табела 3. Имунореактивност субмандибуларне пљувачне жлезде са моноклонским антителима K8.13, K8.12 и CK бубрега током онтогенезе**Table 3.** Immunoreactivity of K8.13, K8.12 i CK kidney monoclonal antibodies with submandibular salivary gland during ontogenesis

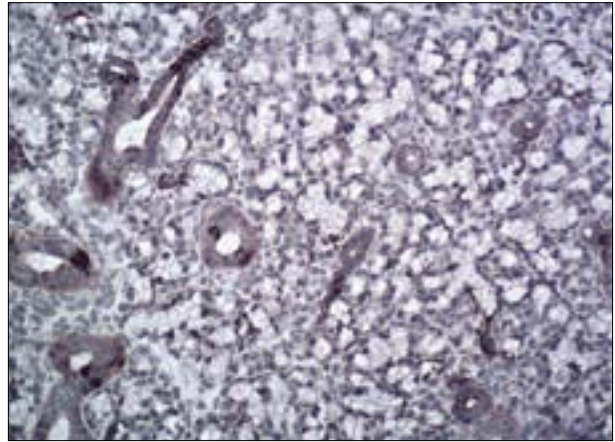
Моноклонска антитела Monoclonal antibody	K8.13			K8.12			CK бубрега CK-kidney		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60
Дани Days									
Мукозни ацинуси Mucous acini	-	1+(c)	1+(c)	-	-	-	1+(c)	1+(c)	1+(c)
Серозни ацинуси Serosus acini	1+(c)	1+(c)	1+(c)	-	-	-	1+(c)	1+(c)	1+(c)
Миоепителне ћелије (мукозни ацинуси) Myoepithelial cells (mucous acini)	4+(b)	4+(c)	4+(c)	-	-	-	-	-	-
Миоепителне ћелије (серозни ацинуси) Myoepithelial cells (serous acini)	4+(a)	4+(b)	4+(c)	-	-	-	-	-	-
Уметнути канали (епителне ћелије) Intercalated ducts (epithelial cells)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	1+(c)	2+(c)	2+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)
Пругасти канали (епителне ћелије) Striated ducts (epithelial cells)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	1+(c)	2+(c)	2+(c)	4+(c)	2+(b)	2+(b);4+(b)J
Миоепителне ћелије Myoepithelial cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Екскреторни канали (епителне ћелије) Excretory duct (epithelial cells)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	2+(c)	2+(c)	2+(c)	4+(c)•	4+(c)•	4+(c)•
Миоепителне ћелије Myoepithelial cells	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
Базалне ћелије Basal cells	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(a)	4+(b)	4+(b)	-	-	-

- = негативно бојење; 1+ – слабо бојење; 2+ – умерено бојење; 3+ – снажно бојење; 4+ – изразито снажно бојење; a – 10-20% позитивних ћелија; b – 30-50% позитивних ћелија; c – већина позитивних ћелија; J – различита обојеност унутар испитиваног одељка свих испитиваних структура; • – бојење апексних делова ћелија
- = negative staining; 1+ – weak staining; 2+ – moderate staining; 3+ – strong staining; 4+ – very strong staining; a – 10-20% cells positive; b – 30-50% cells positive; c – majority cells positive; J – different staining single cells inside investigated field of all investigated structures; • – staining apical cell parts



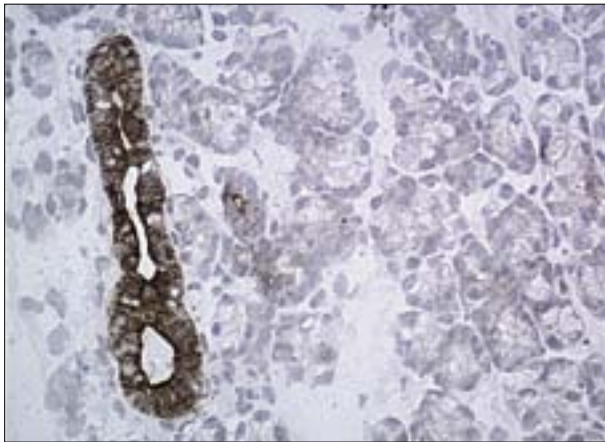
Слика 1. Изразито K8.13 позитивне епителне ћелије изводних канала и миоепителне ћелије око ацинуса пацова старих један дан (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 20$)

Figure 1. K8.13 very positive ductal epithelial cells and myoepithelial cell around acini in one day old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 20$)



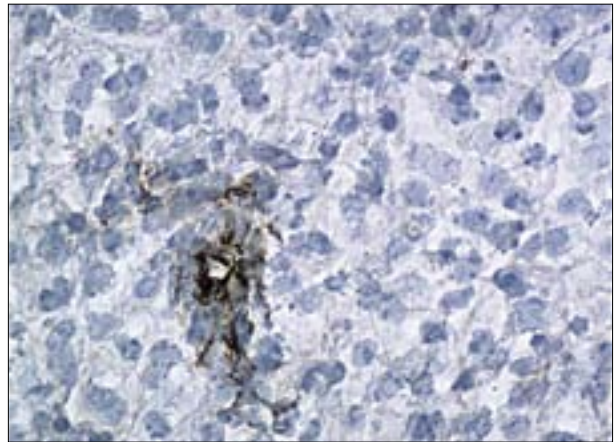
Слика 2. Изразито K8.12 позитивне поједине епителне ћелије изводних канала пацова старих тридесет дана (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 10$)

Figure 2. K8.12 very positive in some cells of ductal epithelium in thirty days old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 10$)



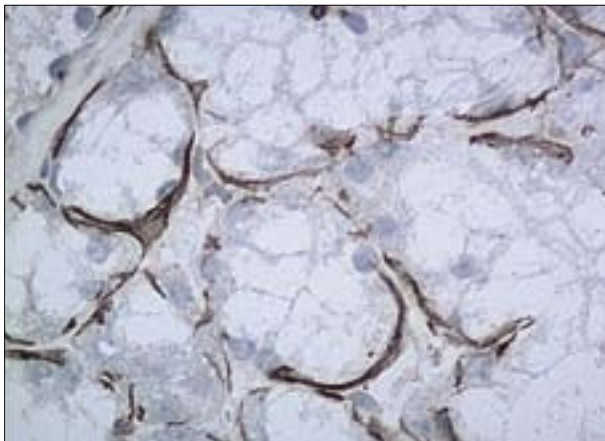
Слика 3. Интензивно CK18 позитивне епителне ћелије изводног канала пацова старих тридесет дана (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 20$)

Figure 3. Intensive CK18 positive cells of ductal epithelium in thirty days old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 20$)



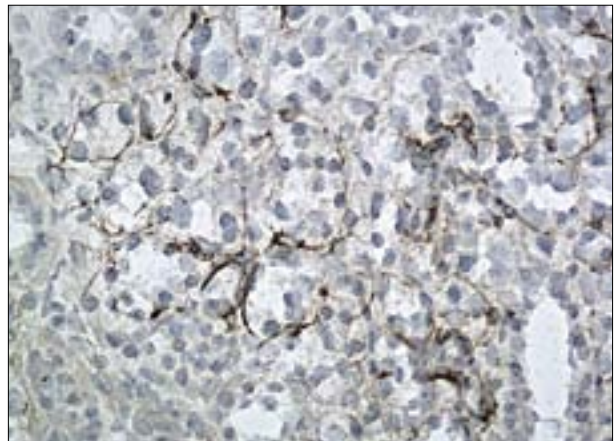
Слика 4. Епителне ћелије уметнутих канала интензивно везују моноклонско антитело које специфично препознаје СК бубрега пацова старих шездесет дана (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 40$)

Figure 4. Intercalated duct epithelial cells that bind intensive monoclonal antibody which specifically recognizes CK-kidney of sixty days old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 40$)



Слика 5. Најснажније ED3 позитивне су миоепителне ћелије око ацинуса пацова старих један дан (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 40$)

Figure 5. The strongest ED3 positive are myoepithelial cells around the acinar in one day old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 40$)



Слика 6. PT13D11 моноклонско антитело се везује за миоепителне ћелије око ацинуса пацова старих шездесет дана (стрептавидин-биотин пероксидазно бојење, $\times 20$)

Figure 6. PT13D11 mAb binds to myoepithelial cells around the acini in sixty days old rats (streptavidin-biotin immunoperoxidase staining, $\times 20$)

Табела 4. Имунореактивност субмандибуларне пљувачне жлезде са моноклонским антителима *PT13D11*, *ED3* и *RMC-23* током онтогенезе
Table 4. Immunoreactivity of *PT13D11*, *ED3* and *RMC-23* monoclonal antibodies with submandibular salivary gland during ontogenesis

Моноклонска антитела Monoclonal antibody	<i>PT13D11</i>			<i>ED3</i>			<i>RMC-23</i>		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60
Дани Days									
Миоепителне ћелије (мукозни ацинуси) Mucoepithelial cells (mucous acini)	4+(b)	4+(c)	4+(c)	4+(b)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
Миоепителне ћелије (серозни ацинуси) Mucoepithelial cells (serous acini)	4+(a)	4+(b)	4+(b)	-	4+(b)	4+(c)	-	-	-
Уметнути канали (епителне ћелије) Intercalated ducts (epithelial cells)	4+(b)	4+(b)	4+(b)	4+(c)	4+(c)	4+(b);2+(c)J	-	-	-
Пругасти канали (епителне ћелије) Striated ducts (epithelial cells)	2+(b)•	2+(b)•	1+(a)•	3+(a);4+(b)J	1+(b)	-	-	-	-
Миоепителне ћелије Mucoepithelial cells	-	-	-	3+(a)	2+(a)	2+(a)	-	-	-
Екскреторни канали (епителне ћелије) Excretory duct (epithelial cells)	3+(c)•	4+(c);3+(c)•	3+(c)•	4+(c);3+(b)J	4+(b);3+(a)J	4+♦	-	-	-
Миоепителне ћелије Mucoepithelial cells	-	-	-	4+(b)	4+(b)	4+(c)	-	-	-
Базалне ћелије Basal cells	-	-	-	4+(a)	4+(b)	4+(b)	-	-	-
Базална мембрана ацинуса Basal membranes of acini	-	-	-	-	-	-	4+(a)	4+(b)	4+(c)
Базална мембрана изводних канала Basal membranes of ducts	-	-	-	-	-	-	4+(c)	4+(c)	4+(c)
Интерстицијум Interstitium	-	-	-	-	-	-	4+(c)	4+(c)	4+(c)
Крвни судови Blood vessels	-	-	-	-	-	-	4+(c)	4+(c)	4+(c)

- = негативно бојење; 1+ – слабо бојење; 2+ – умерено бојење; 3+ – снажно бојење; 4+ – изразито снажно бојење; a – 10-20% позитивних ћелија; b – 30-50% позитивних ћелија; c – већина позитивних ћелија; J – различита обојеност унутар испитиваног одељка свих испитиваних структура; • – бојење апиалних делова ћелија; ♦ – бојење појединачних ћелија
 - = negative staining; 1+ – weak staining; 2+ – moderate staining; 3+ – strong staining; 4+ – very strong staining; a – 10-20% cells positive; b – 30-50% cells positive; c – majority cells positive; J – different staining single cells inside investigated field of all investigated structures; • – staining apical cell parts; ♦ – staining single cells

Табела 5. Имунореактивност анти-*CK* моноклонских антитела са тимусом током онтогенезе
Table 5. Immunoreactivity of anti-*CK* monoclonal antibodies with thymus during ontogenesis

Моноклонска антитела Monoclonal antibody	<i>CK7</i>			<i>CK8</i>			<i>CK18</i>			<i>CK бубрега CK kidney</i>			<i>K8.13</i>			<i>K8.12</i>		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60	1	30	60	1	30	60	1	30	60
Дани Days																		
Субкапсула Subcapsular	3+♦	3+(a)	4+(b)	3+(a)	4+(b)	4+(c)	-	-	-	3+♦	3+(a)	4+(b)	3+(a)	4+(b)	4+(c)	3+(a)	3+(b)	4+(c)
Кортекс Cortex	3+(a)	3+♦	-	3+(c)	4+(c)	4+(c)	3+(b)	3+(c)	4+(c)	3+(a)	3+♦	-	3+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
Медула Among	3+(a)	3+(a)	3+(a)	3+(c)	4+(c)	4+(c)	3+♦	3+(a)	3+(a)	3+♦	3+(a)	4+(a)	3+(c)	4+(c)	4+(c)	3+(a)	4+(a)	4+(b)
Хасалова тела Hassall's bodies	-	-	-	-	3+(c)	4+(c)	-	-	-	-	-	-	-	3+(c)	4+(c)	-	4+♦	4+♦

- = негативно бојење; 1+ – слабо бојење; 2+ – умерено бојење; 3+ – снажно бојење; 4+ – изразито снажно бојење; a – 10-20% позитивних ћелија; b – 30-50% позитивних ћелија; c – већина позитивних ћелија; ♦ – бојење појединачних ћелија
 - = negative staining; 1+ – weak staining; 2+ – moderate staining; 3+ – strong staining; 4+ – very strong staining; a – 10-20% cells positive; b – 30-50% cells positive; c – majority cells positive; ♦ – staining single cells

Табела 6. Имунореактивност моноклонских антитела *PT13D11*, *ED3*, *RMC-23* са тимусом током онтогенезе
Table 6. Immunoreactivity of *PT13D11*, *ED3*, *RMC-23* monoclonal antibodies with thymus during ontogenesis

Моноклонска антитела Monoclonal antibody	<i>PT13D11</i>			<i>ED3</i>			<i>RMC-23</i>		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60
Дани Days									
Субкапсула Subcapsular	3+(a)	4+(b)	4+(c)	-	2+(b)	3+(b)	-	-	-
Кортекс Cortex	3+(a)	-	-	-	-	1+(a)	-	-	-
Медула Among	3+(b)	4+(b)	4+(b)	1+(b)	2+(b)	3+(c)	-	-	-
Хасалова тела Hassall's bodies	-	3+♦	3+♦	-	-	-	-	-	-
Капсула, везивне преграде, базалне мембране Capsula, connective septum, basal membranes	-	-	-	-	-	-	4+	4+	4+
Крвни судови Blood vessels	-	-	-	-	-	-	4+	4+	4+
Макрофаге Macrophages	-	-	-	-	2+♦	3+♦	-	-	-

- = негативно бојење; 1+ – слабо бојење; 2+ – умерено бојење; 3+ – снажно бојење; 4+ – изразито снажно бојење; a – 10-20% позитивних ћелија; b – 30-50% позитивних ћелија; c – већина позитивних ћелија; ♦ – бојење појединачних ћелија
 - = negative staining; 1+ – weak staining; 2+ – moderate staining; 3+ – strong staining; 4+ – very strong staining; a – 10-20% cells positive; b – 30-50% cells positive; c – majority cells positive; ♦ – staining single cells

телних ћелија појединих структура тимуса (субкапсуларна, кортекс, медула, Хасалова тела) у свим испитиваним онтогенетским терминима. Моноклонска анти тела *K8.13* и *СК8* су углавном панепителни маркери. Нешто слабија реактивност је запажена на пресецима неонаталних тимуса. На овом степену развоја само једна субпопулација субкапсуларних епителних ћелија била је позитивна. *K8.12*, *СК7* и *СК* бубрега мАт специфично реагују с епителним ћелијама субкапсуларне зоне и субпопулацијом епителних ћелија медуле тимуса одраслих животиња. Слична расподела се уочава и у остала два онтогенетска термина, с тим што је реактивност најслабија била на рођењу. Занимљиво је да се мАт *СК7* и *СК* бубрега на степену неонаталног развоја (првог дана) везују и за једну субпопулацију епителних ћелија кортекса тимуса. Током постнаталног периода реактивност се постепено смањује (30. дана), а затим губи (60. дана). Антитело специфично за *СК18* препознаје кортикалне епителне ћелије и једну субпопулацију епителних ћелија медуле. Већина епителних ћелија медуле, укључујући и Хасалова тела и субкапсуларне епителне ћелије, јесу негативне на *СК18*.

Реактивност тимуса пацова са моноклонским антителима *PT13D11*, *ED3* и *RMC-23*

PT13D11 мАт се у тимусу одраслих животиња везује за субкапсуларне епителне ћелије, већину медуларних епителних ћелија, укључујући и појединачне ћелије, обично на периферији Хасаловог тела (Табела 6). На неонаталном степену развоја (1. дана) поједине кортикалне епителне ћелије су позитивне, да би касније (30. и 60. дана) постале негативне.

ED3 мАт препознаје субкапсуларне епителне ћелије и већину медуларних епителних ћелија тимуса одраслих пацова (Табела 6). На неким пресецима уочава се и слаба позитивност епителних ћелија кортекса. На неонаталном степену развоја уочава се само слаба позитивност субпопулације медуларних епителних ћелија. Осим епителних ћелија, мАт *ED3* се везује и за поједине макрофаге који су углавном распоређени у капсули, везивним преградама и око крвних судова медуле.

RMC-23 мАт се не везује за епителне ћелије. Ово антитело препознаје структуре капсуле, везивних преграда и базалне мембране око крвних судова, посебно у региону медуле тимуса (Табела 6).

ДИСКУСИЈА

На основу упоредне имунохистолошке онтогенетске студије СПЖ и тимуса пацова помоћу панела мАт утврђене су заједничке антигенске одлике ова два органа. Резултати указују на врло типична фенотипска својства епителних ћелија СПЖ пацова. *K8.13* мАт је панепителни маркер, јер боји епителне ћелије свих компоненти СПЖ пацова, као и миоепителне ћелије, што је у сагласности с резултатима истраживања на хума-

ној СПЖ [25]. За разлику од *K8.13*, мАт *K8.12* има најјачу имунореактивност са базалним ћелијама екскреторних канала, али су ацинуси *K8.12* негативни. Слични резултати су добијени на хуманом и ткиву пацова и кунића [26, 27, 28]. Наша истраживања показују да епителне ћелије канала имају израженије *СК* обичног епитела (*СК 7, 8, 18*) у односу на њихово присуство у ацинусима. У епителним ћелијама канала најјачу позитивност показује мАт *СК18*, осим у ћелијама пругастих канала, где је уочено смањење његове експресије у одраслом периоду (60 дана). Постојање овог *СК* доказано је и у епителним ћелијама канала СПЖ кунића [28] и човека [29, 30]. Доказали смо да мАт специфично за *СК* бубрега најснажније везује епителне ћелије уметнутих канала и апексни део ћелија екскреторних канала током онтогенезе. Такође су епителне ћелије уметнутих канала позитивне на *PT13D11*, као и миоепителне ћелије око ацинуса. Сличну реактивност има мАт *ED3*. Када је реч о експресији *RMC-23*, антигена који открива неке од компоненти пацовског колагена, може се закључити да реактивност овог антитела одговара локализацији колагена типа *IV* у СПЖ. Добијени резултати на СПЖ су у сагласности с налазима ранијих истраживања на мишевима и пацовима [31, 32, 33]. Може се закључити да се мАт специфична за *СК* простог епитела (*СК 7, 8, 18*) везују за ацинусе, за разлику од мАт *K8.12*, *ED3* и *PT13D11*, чије везивање није уочено. Такође, мАт *K8.13*, које препознаје већи број *СК* (1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 18), могло би у ацинусима СПЖ пацова бити реактивно са *СК* паром *8/18* и *СК7*. Епителне ћелије канала СПЖ показују реактивност са *СК18* и *K8.13*, док мАт *K8.12* показује реактивност са базалним ћелијама. У миоепителним ћелијама не постоје *СК* простог епитела, већ се налазе највероватније *СК13/16*, као и *СК4*, *СК5*, *СК6*, који су маркери стратификованог епитела. И ове ћелије су позитивне са мАт *ED3* и *PT13D11*.

Резултати овог рада у вези с расподелом *СК* у тимусу пацова углавном су слични досад објављеним подацима [34-39]. Као што је приказано у резултатима, мАт *K8.13* и *СК8* су панепителни маркери у адултном тимусу. Они показују сличну расподелу и код тек рођених животиња. Основна разлика је у томе што су субкапсуларне епителне ћелије и Хасалова телашца слабо развијена на рођењу. Осим мАт *СК18*, који је маркер кортикалних епителних ћелија и субпопулације медуларних епителних ћелија, сва остала коришћена анти-*СК* антитела (*K8.12*, *СК7*, *СК* бубрега) везују се за субкапсуларне и субпопулацију медуларних епителних ћелија. Овакву реактивност имају мАт *PT13D11* и *ED3*. Ранија испитивања Чолића и сарадника [34] коришћењем додатних анти-*СК* антитела (за *СК10* и *СК19*) омогућила су поделу епитела тимуса пацова у шест фенотипски различитих зона: субкапсуларно-периваскуларне епителне ћелије и субпопулација медуларних ћелија имају изражене *СК7*, *СК8* и *СК18* (тип 1); кортикалне епителне ћелије имају изражене *СК8* и *СК18* (тип 2); медуларне епителне ћелије имају изражене *СК8*, *СК18* и *СК19* (тип 3), *СК8*, *СК10*, *СК18* и *СК19* (тип 4), *СК8* и

СК10 (тип 5) и СК8 (тип 6). Оваква фенотипска хетерогеност указује на постојање различитих микросредина тимуса. Претпоставка је да сваки од ових региона има и неке функционалне специфичности. Фенотипска различитост кортекса у односу на субкапсулу и већину медуларних епителних ћелија може се тумачити и различитим пореклом епителних ћелија ових зона. Верује се да је кортекс тимуса који садржи СК престога епитела (СК8 и СК18) ендодермног порекла, док је субкапсуларна зона и медула ектодермног порекла.

На основу компаративних испитивања антигенских својстава СПЖ и тимуса пацова урађених у овом раду могу се донети врло значајни закључци. Први се односи на постојање заједничких антигена у оба органа. На први поглед оно не изненађује с обзиром на то да би вероватно таква фенотипска сличност постојала и када би се поредили други органи. Међутим, много је значајнија фенотипска повезаност појединих региона у оба испитивана органа. Наша истраживања показују да су епителне ћелије ацинуса СПЖ фенотипски сличне епителним ћелијама кортекса тимуса. За разлику од њих, епителне ћелије канала фенотипски су сличне епителним ћелијама субкапсуларне зоне и већини ћелија у медули. Ове сличности могу се тумачити у светлу неких општих заједничких функција СПЖ и тимуса, као што је, на пример, стварање хормона. Хормонски активне ћелије су откривене у каналима СПЖ [16, 17, 18], док су ћелије које стварају тимусне хормоне локализоване у епителним зонама субкапсуларног региона и медуле тимуса [19, 20, 21]. Једна од претпо-

ставки би могла бити да је ова фенотипска сличност последица и различитог ембрионалног порекла ацинуса и канала СПЖ, као што је већ потврђено истраживањем на тимусу [35, 36]. Међутим, имајући у виду топографску блискост СПЖ и тимуса, могуће је да и ектодерм и ендодерм фаринксног система учествују у диференцијацији епитела СПЖ. На основу наших испитивања може се претпоставити да су епителне ћелије ацинуса ендодермног порекла, а да епителне ћелије, пре свега, екскреторних канала потичу од ектодерма. Ово је врло значајна хипотеза која отвара нове правце истраживања.

Наше истраживање указује на врло типична фенотипска својства миоепителних ћелија. Коришћењем мултимаркерске фенотипске анализе, као и пажљивог поређења експресије ових маркера с епителом СПЖ и тимуса, може се закључити да миоепителне ћелије поседују бројне заједничке антигенске особине с епителним ћелијама канала СПЖ и субкапсуларним, односно медуларним епителом тимуса.

ЗАКЉУЧАК

Компаративним испитивањем антигенских својстава СПЖ и тимуса пацова утврђени су заједнички антигени у оба органа. Међутим, фенотипска сличност између појединих региона у оба испитивана органа отвара нове правце истраживања биохемијских и функционалних одлика појединих компоненти СПЖ.

ЛИТЕРАТУРА

- Bartova J, Zajicek O. Antibody response and blood plasma corticosterone level after total and partial extirpation of the large salivary glands. XX International Symposium on Biological Models; 1981. p.58-60.
- Rothschild R, Levine L, Hattingh J. Oestrogens in saliva. J Dent Ass. 1981; 36:27-30.
- Menendez-Petterson A, Suarez J, Cornejo S, Marin B. Sex differences in the effect of extirpation of the submandibular salivary glands in rats. Arch Oral Biol. 1985; 30:243-8.
- Hosoi K, Maruyama S, Ueha T, Sato S, Gresik E. Additive and/or synergistic effects of 5 α -dihydrotestosterone dexamethasone and triiodo-L-thyronin on induction of proteinases and epidermal growth factor in the submandibular gland of hypophysectomized mice. Endocrinology. 1992; 130:1044-55.
- Maruyama S, Hosoi K, Ueha T, Tajima M, Sato S, Gresik E. Effect of female hormones and triiodo-L-thyronine or dexamet and hasone on induction of EGF proteinases F, D, A and P in the submandibular gland of hypophysectomized male mice. Endocrinology. 1993; 133:1051-69.
- Martinez-Hernandez A, Nakane PK. Realationships between the submaxillary gland and the thymus. Lab Invest. 1973; 29:266-71.
- Hoffman H, Burnett M. Hypertrophy of thymic epithelium following removal of submaxillary glands. In: Eight International Conference on Electron Microscopy. Vol II. Sanders, Cambera, Australia: Academy of Science; 1974. p.508-9.
- Kumegawa M, Takuma T, Takagi Y. Precocious induction of secretory granules by hormones in convoluted tubules of mouse submandibular glands. Am J Anat. 1977; 149:111-4.
- Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ. The effects of neonatal thymectomy on the level of salivary and serum immunoglobulins in rats. Immunology. 1979; 36:649-57.
- Letić-Gavrilović A, Janković BD. Effects of submandibular salivary gland on lymphoid tissue in rats. Period Biol. 1983; (Suppl 3):85-103.
- Horie K, Kagami H, Hiramatsu Y, Hata K, Shigetomi T, Ueda M. Selected salivary gland cell culture and the effects of isoproterenol vasoactive polypeptide and substance P. Arch Oral Biol. 1996; 41(3):243-52.
- Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. Prog Histochem Cytochem. 2008; 43:73-120.
- Todorović T, Dožić I. Pljuvačka i oralno zdravlje. Beograd: Zavod za udžbenike; 2009.
- Barka T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. J Histochem Cytochem. 1980; 28:836-59.
- Pinkstaff CA. The cytology of salivary glands. Int Rev Cytol. 1980; 63:140-261.
- Gresik E. Postnatal development changes in submandibular glands of rats and mice. J Histochem Cytochem. 1980; 28(8):860-70.
- Gresik E. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. Microscopy Res Tech. 1994; 27:1-24.
- Kurabuchi S. Repeated androgen and thyroid hormone injection modulates the morphology of hormone-responsive duct cells in the mouse parotid gland. Odontology. 2006; 94:29-37.
- Dardene M, Bach JF. Functional biology of thymic hormones. Thymus Update 1. The Microenvironment of the Human Thymic. London: Harwood Academic Press; 1988. p.101-15.
- Savino W, Dardenne M. Thymic hormone-containing cells VI. Immunohistologic evidence for the simultaneous presence of thymulin, thymopoetin, and thymosin alpha 1 in normal and pathological human thymuses. Eur J Immunol. 1984; 14:987-91.
- Savino W, Dardenne M. Thymic hormone-containing cells VIII. Effects of colchicine, cytochalasin B and monensin, on secretion of thymulin by cultured human thymic epithelial cells. J Histochem Cytochem. 1986; 34:1719-23.
- Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophages subpopulation in the rat recognized by monoclonal

- antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 1985; 54:589-99.
23. Pavlović DM, Čolić M, Vučević D, Dujčić A. Two novel monoclonal antibodies reactive with different components of the rat thymic epithelium. *Thymus*. 1993; 21:235-46.
 24. Čolić M, Matanović D, Hegediš L, Dujčić A. Immunohistochemical characterization of rat thymic non-lymphoid cells. *Immunology*. 1988; 65:277-84.
 25. Geiger S, Geiger B, Leitner O, Marshak G. Cytokeratin polypeptides expression in different elements of human salivary glands. *Virchows Arch*. 1987; 410:403-14.
 26. Burns BF, Dardick I, Parks WR. Intermediate filament expression in normal parotid glands and pleomorphic adenomas. *Virchow Archiv A Pathol Anat*. 1988; 413:103-12.
 27. Sumitomo S, Hashimura K, Mori M. Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands-an immunohistochemical evaluation. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996; 32(2):97-105.
 28. Farina V, Zedda M. On the expression of cytokeratins and their distribution in some rabbit gland tissues. *Eur J Histochem*. 1992; 36:479-88.
 29. Ogawa Y, Kishino M, Atsumi Y, Kimoto M, Fukuda Y, Ishida T, et al. Plasmacytoid cells in salivary-gland pleomorphic adenomas: evidence of luminal cell differentiation. *Virchows Arch*. 2003; 443:625-34.
 30. Kusama K, Jiang Y, Ohno J, Shikata H, Ishikawa F, Taguchi K, et al. Immunohistochemical detection of cytokeratin 18 and its neo-epitope in human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Anticancer Res*. 2000; 20:2485-8.
 31. Hardman P, Spooner BS. Localization of extracellular matrix components in developing mouse salivary glands by confocal microscopy. *Anat Rec*. 1992; 234:452-9.
 32. Macauley SP, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Chagini N, Oxford GE, Humphreys-Beher MG. Extracellular-matrix gene expression during mouse submandibular gland development. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(6):443-54.
 33. Lazowski KW, Mertz PM, Redman RS, Kousvelari E. Temporal and spatial expression of laminin, collagen types IV and I and $\alpha\beta 1$ integrin receptor in the developing rat parotid gland. *Differentiation*. 1994; 56:75-82.
 34. Čolić M, Matanović D, Hegediš L, Dujčić A. Heterogeneity of rat thymic epithelium defined by monoclonal antikeratin antibodies. *Thymus*. 1988; 12:123-30.
 35. Čolić M, Jovanović S, Mitrović S, Dujčić A. Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus*. 1989; 13:175-85.
 36. Čolić M, Jovanović S, Vasiljevski M, Dujčić A. Ontogeny of rat thymic epithelium defined by monoclonal anticytokeratin antibodies. *Dev Immunol*. 1990; 69:416-22.
 37. Vicente A, Varas A, Sacedon R, Zapata AG. Histogenesis of the epithelial components of rat thymus: an ultrastructural and immunohistological analysis. *Anat Rec*. 1996; 244:506-19.
 38. Brelisnka R, Malendowicz LK, Malinska A, Kowalska K. Characteristic of age-related changes in rat thymus: morphometric analysis and epithelial cell network in various thymic compartments. *Biogerontology*. 2008; 9:93-108.
 39. Lee EN, Park KJ, Lee J, Oh S, Beak S, Kim B, et al. Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8, and 14 in mouse thymus regeneration following acute thymic involution. *Anat Cell Biol*. 2011; 44:14-24.

Common Immunophenotypic Features of Submandibular Salivary Glands and Thymus in Rats

Ivan Dožić¹, Tatjana Todorović¹, Miodrag Čolić²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Submandibular salivary gland is a part of the neuro-immune-endocrine system. It contains biological factors which regulate a number of functions in the body including the modulation of thymus function.

Objective The aim of the study was to investigate immunophenotypic characteristics of submandibular salivary glands of rats during ontogenesis, using the panels of monoclonal antibodies and to compare with the phenotypic characteristics of epithelial components of the thymus.

Methods Submandibular salivary glands and thymus were obtained from 1, 30 and 60 days old male AO (Albino, Oxford) rats. Streptavidin-biotin peroxidase method was used for staining.

Results Immunohistochemical analysis of rat submandibular salivary glands showed phenotypic heterogeneity of particu-

lar components of this gland during the postnatal development. We demonstrated that rat submandibular salivary glands share common antigens with rat thymic epithelial cells, but the observed phenotypic similarity between the individual regions was considered much more significant. Our data showed that the phenotypic similarity between duct epithelial cells and subcapsular epithelial cells and most medullary cells, whereas cortical epithelial cells are phenotypically similar to acinar cells.

Conclusion This immunohistological study showed phenotypic complexity of the submandibular salivary gland and similarity to the thymus that opens new perspectives in studying phenotypic similarities between this gland and lymphatic organs.

Keywords: submandibular salivary glands; thymus; rat; monoclonal antibodies

Примљен • Received: 09/03/2011

Прихваћен • Accepted: 12/07/2011