

# Imunohistološke karaktersitike kolagena, laminina i sijaloadhezina u podviličnoj pljuvačnoj žlezdi pacova tokom ontogeneze

SGS YU ISSN 0039-1743-  
COBISS.SR-ID 8417026

## Immunohistological Characteristics of Collagen, Laminin and Sialoadhesin in The Rat Submandibular Salivary Gland During Ontogenesis

### KRATAK SADRŽAJ

*Cilj ovog rada je bio da se ispita ekspresija kolagena, laminina i sijaloadhezina u podviličnoj pljuvačnoj žlezdi (PPŽ) pacova tokom postnatalnog razvoja (1, 30, 60 dana). Imunohistohemijski, streptavidin-biotin peroksidaznom bojenjem, upotrebom različitih monoklonskih antitela RMC-23 (specifično za kolagen),  $\alpha_6\beta_1$  (specifično za laminin) i ED3 (specifično za sijaloadhezine) detektovane su ove komponente ekstraćelijskog matriksa. RMC-23 mAt se snažno vezuje za bazalne membrane izvodnih kanala (umetnuti, prugasti i ekskretorni kanali) i intersticijum. Ekspresija u bazalnim membranama acinusa se povećava u toku razvoja žlezde. Sličnu imunoreaktivnost ima  $\alpha_6\beta_1$  mAt, ali je intersticijum pokazivao negativnu reakciju. Epitelne ćelije izvodnih kanala posebno neonatalnih životinja bile su  $\alpha_6\beta_1$  +. ED3 mAt je za razliku od  $\alpha_6\beta_1$  i RMC-23 mAt detektovano i u mioepitelnim ćelijama čija se reaktivnost povećava tokom ontogeneze. Veoma je interesantan nalaz sijaloadhezina u mioepitelnim ćelijama PPŽ pacova koji nije opisan u literaturi, što zahteva dalja ispitivanja. Ovi rezultati pokazuju da adhezioni molekuli i proteini ekstraćelijskog matriksa imaju značajnu biohemijsku ulogu u toku postnatalnog razvoja podvilične pljuvačne žlezde.*

**Gljučne reči :** podvilična pljuvačna žlezda, ontogeneza, ekstraćelijski matriks

Ivan Dožić<sup>1</sup>, Miodrag Čolić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za Biohemiju, Stomatološki fakultet, Beograd

<sup>2</sup>Institut za medicinska istraživanja, VMA, Beograd

ORIGINALNI RAD (OR)

Stom Glas S, 2003; 50:179-183

Podvilična pljuvačna žlezda (PPŽ) se često koristi kao model za proučavanje procesa morfogeneze i citodiferencijacije. Značajnu ulogu u razvoju ove žlezde imaju ekstraćelijski molekuli: kolagen, laminin, fibronektin, proteoglikani<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>. Povezivanje ćelija sa molekulima ekstraćelijskog matriksa se ostvaruje preko adhezivnih molekula- integrina na membrani ćelija. Tokom postnatalnog razvoja parotidne žlezde, Lazowski i sar.,<sup>2</sup> su pokazali da postoji koekspresija laminina i kolagena (tip IV i I) sa integrinskim receptorima ( $\alpha_6\beta_1$ ). Integrini su heterodimeri koji imaju glavnu ulogu u očuvanju integriteta tkiva kao i u regulaciji proliferacije, diferencijacije i migracije ćelija. Sastoje se od dva transmembranska glikoproteina označeni kao  $\alpha$  i  $\beta$  čijim kombinacijama se formira familija od 24 različita integrina<sup>8,9,10</sup>.

U literaturi postoje različiti podaci o ulozi ekstraćelijskih molekula u razvoju PPŽ i njihovom prisustvu tokom postnatalnog razvoja.

Naime, u normalnom i patološki izmenjenom tkivu pljuvačnih žlezda pokazana je različita promena u ekspresiji integrinskih subjediničica<sup>11,12</sup>. Poznavanje biološke uloge i pris-

ustva adhezivnih molekula u normalnom žlezdanom tkivu je značajno zbog njihove funkcije u tumorski izmenjenom tkivu i time otvorile nove mogućnost za razvoj novih dijagnostičkih metoda.

Cilj ovog rada je bio da se ispita ekspresija kolagena, laminina i sijaloadhezina u PPŽ pacova tokom ontogeneze.

## Materijal i metode

Ko materijal u ovom ispitivanju korišćena je podvilična pljuvačna žlezda, uzimana od pacova soja AO (Albino Oxford), muškog pola, starosti 1, 30, 60 dana gajenih u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Pacovi su žrtvovani etarskom inhalacionom anestezijom. Pre pravljenja kriostatskih preseka žlezda je potopljena u fiziološki rastvor. Preseci tkiva, debljine 5-6  $\mu$ m, sušeni su na sobnoj temperaturi 2-3 sata ili su ostavljeni u frižideru preko noći. Nakon toga fiksirani su u acetonu 10 min.

U ovom istraživanju su korišćena primarna monoklonska antitela:

- RMC-23 (proizvedeno u Institutu za medicinska istraživanja VMA) specifično za kolagen pacova, po izotipu je IgG<sub>1</sub><sup>15</sup>.
- $\alpha_6\beta_1$ ; VLA-6-integrin (Biosource) receptor za laminin, po izotipu je IgG<sub>1</sub>.
- ED3 (Serotek) prepoznaje sijaloadhezin pacova, po izotipu je IgG<sub>1</sub>.

Sekundarna antitela su Ig koze ili ovce protiv mišjeg Ig. Antitela su konjugovana biotinom ( Dakopats ). Streptavidin-konjugovan peroksidazom je takođe kupljen od Dakopats-a.

Za imunohistohemijsku metodu korišćen je :

- rastvor TBS ( tris-buffered saline ) je korišćen za ispiranje kriostatskih preseka u svim fazama imunocitohemijskog bojenja. Napravljen je mešanjem 50 ml 0,5 mol TRIS i 50 ml 1,5 mol NaCl - odmeriti 87,66 (1,5 mol) NaCl a zatim dodavanjem destilovane vode do 500 ml H<sub>2</sub>O.
- rastvor DAB ( 3'3 diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma) je korišćen kao substrat za peroksidazu u imunocitohemijskim reakcijama. Peroksidaza u prisustvu DAB reaguje sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i nastaje tamno braon nerastvorljivi precipitat na mestu reakcije. Korišćen je 0,06 DAB i 0,01 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rastvoreni u TBS.
- rastvor, metanol-peroksid je upotrebljavan za blokadu endogene peroksidaze. U 100 ml metanola dodavan je 1 ml 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- Kajzer gel ( Kaiser's glycerol gel) je korišćen za trajno pravljenje preparata, a sadrži: -10g želatina, 70ml glicerola, 0,25g fenola i 60ml destilovane vode

Imunohistohemijska ispitivanja su obuhvatila **Streptavidin-biotin peroksidazno bojenje**. Kriostatski preseki tkiva PPŽ koji su bili fiksirani u acetonu, inkubirani su sa po 20 $\mu$ l primarnog mAt odgovarajućeg razblaženja ( RMC-23 1:150;  $\alpha_6\beta_1$  1:50 ; ED3 1:25) u TBS, u vlažnoj komori 60 min. Zatim su tkivni preseki isprani u TBS 10min., posle čega je blokirana endogena peroksidaza sa 3 vodonik peroksidom u metanolu, 20 min. Na preseke tkiva je naneto 20-30 $\mu$ l sekundarnog antitela konjugovan biotinom u razblaženju 1:50. Preseci su inkubirani u vlažnoj komori 30 min na sobnoj temperaturi. Pošto su pločice isprane u TBS naneto je po 20 l streptavidina konjugovan peroksidazom u razblaženju 1:50, i ostavljene su 30 min. na sobnoj temperaturi. Ispiranjem u TBS nanošen je supstrat DAB na pločice u trajanju 5-15 min, kada je došlo do razvoja citohemijske reakcije. Preparati su kontrastirani rastvorom hematoksilina i montirani Kajzerovim gelom. Analiza obojenih preparata je vršena svetlosnim mikroskopom.

U ovom radu su korišćena monoklonska antitela koja prepoznaju adhezione molekule i neke od komponenti vanćelijskog matriksa na PPŽ pacova. Imunohistološke karakteristike ove žlezde su proučavane na životinjama 1, 30, i 60. dana postnatalnog razvoja. Zadnji termin istovremeno označava i polnu zrelost životinje. Analiza je urađena na svetlosnom mikroskopu firme Olympus. Intezitet citohemijske reakcije je rangiran od 1 do 4.

Tabela 1: Imunoreaktivnost monoklonskih antitela RMC-23,  $\alpha_6\beta_1$ , ED3 na podviličnoj pljuvačnoj žlezdi pacova u toku ontogeneze.

Table 1: Immunoreactivity of RMC-23,  $\alpha_6\beta_1$ , ED3 mAbs with rat submandibular salivary glands during ontogenesis

Strukturni Elementi	RMC-23 ontogeneza (dani)			$\alpha_6\beta_1$ ontogeneza (dani)			ED3 ontogeneza (dani)		
	1	30	60	1	30	60	1	30	60
<b>ACINUSI</b>									
Epitelne ćelije	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazalna membrana	4+(a)	4+(b)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
Mioepitelne ćelije	-	-	-	-	-	-	-	4+(b)	4+(c)
<b>UMETNUTI KANALI</b>									
Epitelne ćelije	-	-	-	-	-	-	4+(c)	4+(c)	4+(b);2+(c) f
Bazalna membrana	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
<b>PRUGASTI KANALI</b>									
Epitelne ćelije	-	-	-	3+(c)	2+(c)	2+(c)	3+(a);4+(b) f	1+(b)	-
Bazalna membrana	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
Mioepitelne ćelije	-	-	-	-	-	-	3+(a)	2+(a)	2+(a)
<b>EKSKRETORNI KAN.</b>									
Epitelne ćelije	-	-	-	3+(c)	2+(c)	2+(c)	4+(c)	4+(b)	4+,
Bazalne ćelije	-	-	-	-	-	-	4+(b)	4+(b)	4+(c)
Bazalna membrana	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-
<b>INTERSTICIJUM</b>									
	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-	-	-	-
<b>KRVNI SUDOVI</b>									
	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	4+(c)	-	-	-

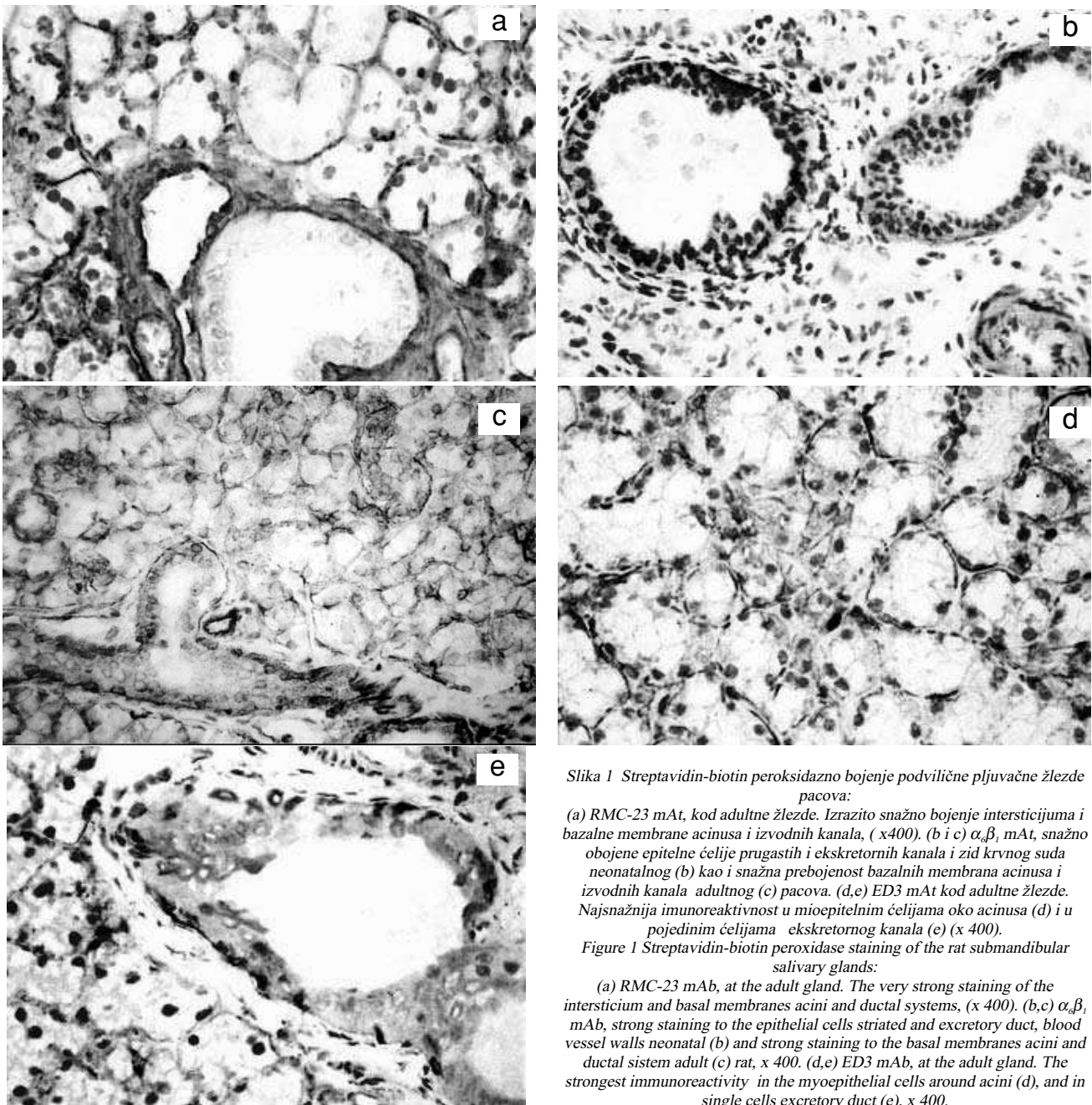
LEGENDA: - = negativno bojenje, 1+= slabo bojenje, 2+= umereno bojenje, 3+= snažno bojenje, 4+= izrazito snažno bojenje, a= 10-20% pozitivnih ćelija, b= 30-50% pozitivnih ćelija, c= većina pozitivnih ćelija, = bojenje pojedinačnih ćelija, f = različita obojenost pojedinih ćelija unutar ispitivanog odeljka svih ispitivanih struktura.

LEGEND OF FIGURE: - = negative staining, 1+= weak staining, 2+= moderate staining, 3+= strong staining, 4+= very strong staining, a= 10-20 positive cells, b= 30-50 positive cells, c= majority positive cells, =staining single cells, f = different staining single cells inside investigated field all investigated structures

## Rezultati

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 1 i na slici 1(a,b,c,d,e). Rezultati bojenja PPŽ sa ovim mAt su prikazani u tabeli 1. RMC-23 mAt se izrazito snažno vezuje za intersticijum i bazalne membrane epitelnih struktura PPŽ (slika 1a). Bazalne membrane izvodnih kanala (umetnuti, prugasti, ekskretorni) pokazuju veoma snažnu imunoreaktivnost sa ovim mAt kako kod neonatalnih tako i kod adultnih životinja (60 dana). Reaktivnost sa bazalnom membranom acinusa se blago povećava tokom razvoja žlezde. Rezultati pokazuju da ovo antitelo nije detektovano u epitelnim ćelijama acinusa i izvodnih kanala dok su krvni sudovi RMC-23+.

Rezultati bojenja PPŽ sa  $\alpha_6\beta_1$  mAt su prikazani na tabeli 1. Monoklonsko antitelo  $\alpha_6\beta_1$  se vezuje veoma snažno za bazalne membrane acinusa i izvodnih kanala (umetnuti, prugasti, ekskretorni) bez promena u ekspresiji tokom ontogeneze (slika 1c). Za razliku od RMC-23 mAt, ovo mAt pokazuje negativnu reaktivnost sa intersticijumom. Takođe su i krvni sudovi  $\alpha_6\beta_1$  +. Ovi rezultati pokazuju da ovo antitelo prepoznaje epitelne ćelije prugastih i ekskretornih kanala (slika 1b). Epitelne ćelije ovih kanala pokazuju promenljivu imunoreaktivnost sa ovim antitelom. Na rođenju, epitelne ćelije izvodnih kanala su snažno pozitivne dok se tokom ontogeneze uočava blago smanjenje ekspresije. Ćelije acinusa su  $\alpha_6\beta_1$ -.



Slika 1 Streptavidin-biotin peroksidazno bojenje podvilične pljuvačne žlezde pacova:

(a) RMC-23 mAb, kod adultne žlezde. Izrazito snažno bojenje intersticijuma i bazalne membrane acinusa i izvodnih kanala, (x400). (b i c)  $\alpha_6\beta_1$  mAb, snažno obojene epitelne ćelije prugastih i ekskretornih kanala i zid krvnog suda neonatalnog (b) kao i snažna prebojenost bazalnih membrana acinusa i izvodnih kanala adultnog (c) pacova. (d,e) ED3 mAb kod adultne žlezde. Najznačajnija imunoreaktivnost u mioepitelnim ćelijama oko acinusa (d) i u pojedinim ćelijama ekskretornog kanala (e) (x 400).

Figure 1 Streptavidin-biotin peroxidase staining of the rat submandibular salivary glands:

(a) RMC-23 mAb, at the adult gland. The very strong staining of the interstitium and basal membranes acini and ductal systems, (x 400). (b,c)  $\alpha_6\beta_1$  mAb, strong staining to the epithelial cells striated and excretory duct, blood vessel walls neonatal (b) and strong staining to the basal membranes acini and ductal sistem adult (c) rat, x 400. (d,e) ED3 mAb, at the adult gland. The strongest immunoreactivity in the myoepithelial cells around acini (d), and in single cells excretory duct (e), x 400.

Rezultati bojenja PPŽ sa ED3 mAt su prikazani na tabeli 1. Kod neonatalnih životinja ovo antitelo je snažno ispoljeno u epitelnim ćelijama umetnutih, prugastih i ekskretornih kanala, dok je kod adultnih životinja (60 dana) prisutna snažna reaktivnost samo u pojedinim ćelijama ekskretornih kanala koje su bliže bazalnoj membrani (slika 1e). Acinusi nisu ispoljili reaktivnost sa ED3. Za razliku od RMC-23 i  $\alpha_6\beta_1$  mAt, ovo antitelo je predominantni marker mioepitelnih ćelija (slika 1d). U kasnijem postnatalnom periodu, povećava se pozitivnost mioepitelnih ćelija oko acinusa, a smanjuje ekspresija u prugastim kanalima.

## Diskusija

Slabija diferencijacija epitelnih ćelija PPŽ na rođenju u odnosu na adultni period je prikazana u brojnim ispitivanjima.<sup>1,13,14</sup> U citodiferencijaciji PPŽ važnu ulogu imaju molekuli ekstraćelijskog matriksa, koji se preko adhezionih molekula povezuju sa proteinima citoskeleta<sup>2,5</sup>.

U ovoj imunohistološkoj studiji pošli smo od, u literaturi prikazane, fenotipske heterogenosti epitelnih ćelija, kao i drugih struktura PPŽ pacova u toku ontogeneze. Koristili smo monoklonska antitela koja prepoznaju različite molekule na ćelijama ili komponentama vanćelijskog matriksa. Naši rezultati pokazuju da se RMC-23 mAt snažno vezuje za intersticijum PPŽ i bazalne membrane epitelnih struktura, što je u saglasnosti sa ranijim zaključkom da ovo antitelo detektuje neke od komponenti pacovskog kolagena<sup>15</sup>. Može se zaključiti da reaktivnost ovog mAt odgovara lokalizaciji kolagena tipa IV na osnovu rezultata i istraživanja na mišu<sup>4,5</sup> i pacovu<sup>3,6</sup>. Sličnu distribuciju kao RMC-23 mAt pokazuje i antitelo koje detektuje VLA-6 ( $\alpha_6\beta_1$  integrin). Dobijeni rezultati pokazuju da je ekspresija ovog adhezionog molekula predominantno vezano za bazalne membrane svih epitelnih struktura PPŽ kao i krvnih sudova. Izraženost  $\alpha_6\beta_1$  mAt se delimično poklapa sa ekspresijom laminina koji je osnovni konstituent bazalne membrane epitelnih struktura PPŽ. To je u saglasnosti sa poznatom činjenicom da je VLA-6 receptor za laminin. Slično ovim rezultatima, dokazano je prisustvo laminina u bazalnim membranama strukturnih komponenti parotidne žlezde pacova<sup>3</sup> i PPŽ miša<sup>4,5</sup>. Za razliku od RMC-23 mAt, koje ne detektuje epitelne ćelije, potvrđeno je da antitelo  $\alpha_6\beta_1$  prepoznaje i epitelne ćelije prugastih i ekskretornih kanala. Ekspresija na ovim ćelijama se smanjuje tokom ontogeneze. Obzirom da ovo antitelo detektuje VLA-6 može se pretpostaviti da ovaj adhezioni molekul možda ima

neke druge funkcije u epitelnim ćelijama PPŽ pacova. Veruje se da tokom razvoja embriona, laminin-1 koji se vezuje za  $\alpha_6\beta_1$  integrinske receptore podstiče diferencijaciju epitelnih ćelija<sup>7</sup>. Redman (1987) je uočio da se laminin i kolagen (tip IV i I) mnogo više proizvode 1. nego 21. dana kada dolazi do smanjenja ovih molekula ekstraćelijskog matriksa. To se slaže sa rezultatima Lazowskog i sar., (1994). Takođe se smanjenje ovih molekula poklapa sa početkom citodiferencijacije acinusa i duktusa.

Monoklonsko antitelo ED3 prepoznaje pacovski sijaloadhezin. Ovaj molekul je predominantno ispoljen na populaciji makrofaga i u subkapsularnoj zoni limfnog čvora<sup>16</sup>. Iako funkcije ovog molekula nisu dovoljno proučene smatra se da je sijaloadhezin uključen u vezivanje makrofaga i limfocita što bi moglo biti od značaja u daljoj aktivaciji limfocita. Dosadašnji dobijeni podaci urađeni u Laboratoriji za ćelijsku biologiju Slobodnog Univerziteta u Amsterdamu pokazuju da se ED3 mAt vezuje u većim koncentracijama i za neke epitelne ćelijske linije timusa pacova<sup>15</sup>. Rezultati istraživanja ove studije su prvi ukazuju na reaktivnost ED3 mAt sa epitelnim ćelijama pljuvačnih žlezda. Kao što se iz ovih rezultata može videti sijaloadhezin je ispoljen na mioepitelnim ćelijama i epitelnim ćelijama izvodnih kanala. Zbog toga su ovi rezultati dobra osnova za dalja proučavanja ekspresije i funkcije ED3 molekula u pljuvačnoj žlezdi. Obzirom da je sijaloadhezin adhezivni molekul može se pretpostaviti da je on verovatno uključen i u adhezivne reakcije između epitelnih ćelija pljuvačne žlezde i drugih komponenti (ćelijski i vanćelijski molekuli).

## Zaključak

Monoklonsko antitelo RMC-23 (specifično za kolagen) snažno se vezuje za intersticijum i bazalne membrane epitelnih struktura PPŽ pacova, što odgovara lokalizaciji kolagena tipa IV. Imunoreaktivnost antitela  $\alpha_6\beta_1$  nije detektovana u intersticijumu, ali je pokazala snažnu reaktivnost u bazalnim membranama svih epitelnih struktura, što se poklapa sa ekspresijom laminina koji je osnovni konstituent ove membrane. Takođe je  $\alpha_6\beta_1$  mAt pokazala reaktivnost sa epitelnim ćelijama ove žlezde koja se smanjuje tokom ontogeneze. Posebno je interesanta ekspresija sijaloadhezina (ED3 mAt) u epitelnim i mioepitelnim ćelijama PPŽ pacova, što otvara mogućnost proučavanja funkcije ovo adhezionog molekula u pljuvačnim žlezdama.

Ova zapažanja zahtevaju dalja istraživanja biohemijskih i funkcionalnih karakteristika pojedinih komponenti PPŽ sa obzirom na značajnu i kompleksnu funkciju ove žlezde.

## Literatura

1. Denny P.C., Ball W.D., Redman R.S. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1997; 8(1):51-75.
2. Cutler L. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. *Adv Dent Res*, 1990; 4: 27-33.
3. Lazowski K.W., Mertz P.M., Redman R.S., Kousvelari E. Temporal and spatial expression of laminin, collagen types IV and I  $\alpha_6\beta_1$  integrin receptor in the developing rat parotid gland. *Differentiation*, 1994; 56:75-82.
4. Hardman P., Spooner B.S. Localization of extracellular matrix components in developing mouse salivary glands by confocal microscopy. *Anat Rec*, 1992;234:452-459.

5. Macauley S.P., Trauzzer R.W., Schultz G.S., Chegini N., Oxford G.E., Humphreys-Beher M.G. Extracellular-matrix gene expression during mouse submandibular gland development. *Archs Oral Biol*, 1997;42(6):443-454.
6. Redman R.S. Development of the salivary glands. In *The Salivary System*, pp. 2-20, 1987; CRC Press, Boca Raton, FL.
7. Kadoya Y., Kadoya K., Durbeej M., Holmvail K., Sorokin L., Ekblom P. Antibodies against domain E3 of laminin 1 and integrin alpha 6 subunit perturbing epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *J Cell Biol*, 1995;129(2):521-34.
8. Hynes R.O. Integrins: Versatility, Modulation and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*, 1992;69:11-25.
9. Van der Flier A., Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 2001;Sept, 305(3):285-98.
10. Stupack D.G., Cheresh D.A. get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science*, 2002; 115, 3729-3738.
11. Franchi A., Santoro R., Paglierani M., Bondi R. Immunolocalization of alpha 2, alpha 5 and alpha 6 integrin subunits in salivary tissue and adenomas of the parotid glands. *J Oral Pathol Med*, 1994; Nov, 23 (10):457-60.
12. Thomas G.J., Jones J., Speight P.M. Integrins and oral cancer. *Oral Oncol*, 1997; Nov, 33(6):381-8.
13. Jacoby F., Leeson C. The postnatal development of the rat submaxillary gland. *J Anat*, 1959;93:201.
14. Gresik E. Postnatal Development Changes in Submandibular Glands of Rats and Mice. *J Histochem Cytochem*, 1980;28(8):860-870.
15. Čolić M., Matanović D., Hegediš L. and Đujić A. Immunohistochemical characterization of rat thymic non-lymphoid cells. Epithelial and mesenchymal components defined by monoclonal antibodies. *Immunology*, 1988; 65:277-284.
16. Dijakstra C.D., Dopp E.A., 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.

**IMMUNOHISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COLLAGEN, LAMININ AND SIALOADHESIN IN THE RAT SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND DURING ONTOGENESIS**

**SUMMARY**

The aim of this study was to investigate the expression of collagen, laminin and sialoadhesin in the rat submandibular salivary gland during postnatal development (1st, 30th, and 60th day) by using various monoclonal antibodies (mAbs) RMC-23 (specific for collagen),  $\alpha_6\beta_1$  (specific for laminin) and ED3 (specific for sialoadhesin). These components of extracellular matrix were detected. RMC-23 mAb showed strong positivity to the basal membranes of the ductal system (intercalated, striated and excretory ducts) and of interstium. Increased expression in the basal membrane of acini during development of glands was noted. Similar immunoreactivity was shown by  $\alpha_6\beta_1$  mAb, but the interstium showed a negative reaction to this antibody. Positive reactivity of  $\alpha_6\beta_1$  mAb of epithelial ductal cells, particularly of the neonatal animals, was found. In contrast to  $\alpha_6\beta_1$  and RMC-23 mAbs, ED3 mAb was increasingly expressed in the myoepithelial cells during ontogenesis. Our findings regarding the immunoreactivity of collagens and laminins are in accordance with the findings of other authors. The very interesting finding of sialoadhesin in myoepithelial cells of the rat submandibular salivary gland, which is not described in literature and needs further investigation. Our results suggest that adhesion molecules and extracellular matrix proteins have an important biochemical role during postnatal development of the submandibular salivary gland.

**Key words:** submandibular salivary gland, ontogenesis, extracellular matrix

**Ivan Dožić, Miodrag Čolić**

**Address for correspondence**

Ivan Dožić  
Dept. of Oral Biochemistry  
Faculty of Stomatology  
Dr Subotića 1/IV  
11000 Belgrade  
Serbia