

**WYBRANE ASPEKTY POWSTAWANIA ORGANICZNEJ
MACIERZY MINERALIZOWANYCH TKANEK ZĘBA
ORAZ ZMIANY JEJ FIZJOLOGII SPOWODOWANE
WPŁYWEM ENDOGENNEJ PROFILAKTYKI
FLUORKOWEJ. CZĘŚĆ I. SZKLIWO**

THE ASPECTS OF THE FORMATION OF EXTRACELLULAR MATRIX
IN MINERALIZED TISSUES INCLUDING THE DISTURBANCES CAUSED
BY FLUORIDE. PART I. ENAMEL

Izabela MACIEJEWSKA, Zdzisław BEREZNOWSKI

Zakład Implantoprotetyki Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Rozwój szkliwa rozpoczyna się od sekrecji organicznej macierzy, na którą składają się białka głównie z grupy amelogenin i enamelin. W trakcie dojrzewania szkliwa organiczna macierz podlega procesom proteolitycznej degradacji, a produkty jej rozpadu są sukcesywnie usuwane i zastępowane kryształami hydroksyapatytów tworzącymi pryzmaty szkliwne. Proces sekrecji oraz mineralizacji szkliwa może ulec modyfikacjom na skutek wprowadzenia jonów fluorkowych w postaci endogennej profilaktyki fluorkowej. Bardzo trudno jest określić optymalną dawkę dobową fluoru, której przekroczenie skutkuje zaburzeniami mineralizacji oraz powstawaniem fluorozy zębów. Mechanizm powstawania fluorozy jak dotąd nie został w pełni wyjaśniony, jakkolwiek istnieje coraz więcej potwierdzonych dowodów, iż jest ona efektem zaburzeń w proteolitycznej degradacji białek tworzących organiczną macierz szkliwa. W pracy omówiono najbardziej istotne białka biorące udział w procesie powstawania organicznej macierzy szkliwa oraz wpływ fluoru na metabolizm omawianych białek ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w powstawaniu zaburzeń mineralizacji szkliwa.

Słowa kluczowe: macierz organiczna, szkliwo, fluorek.

Summary: Dental enamel is the most mineralized tissue all over the body. The enamel development begins with the organic matrix secretion. The enamel extracellular matrix mainly consists of amelogenins and enamelin. As the enamel maturation progress the organic matrix undergoes proteolytic degradation. The remnants, which remain after the degradation are subsequently withdrawn and replaced with hydroxyapatites crystals which form the enamel prisms. The enamel secretion and maturation can be modified by fluoride ions supplemented per os. It is extremely difficult to establish the daily optimal dose of fluoride which if exceeded leads to disturbances in the enamel mineralization and the fluorosis origin. The mechanism of the dental fluorosis origin has not been completely explained yet. Nevertheless the available data confirm that dental fluorosis is a side effect of disturbances in the proteolytic degradation of

the proteins that form the enamel extracellular matrix. In the paper we depicted the proteins which are the main components of the enamel extracellular matrix as well as the influence that fluoride exerts on their metabolism, which can result in the fluorosis.

Keywords: extracellular matrix, fluoride, enamel.

WSTĘP

Narząd szkliwotwórczy zęba rozwija się z pochodzącej z ektodermy listewki zębowej. Jego rozwój rozpoczyna się w bardzo wczesnym okresie życia płodowego i przechodzi kolejne fazy morfologiczno-histologicznego różnicowania komórek aż do wykształcenia w pełni dojrzałych ameloblastów odpowiedzialnych za tworzenie szkliwa. W pierwszym okresie rozwoju szkliwa – fazie sekrecyjnej następuje odkładanie organicznej macierzy, która w kolejnych fazach (przejściowej i dojrzewania) ulega mineralizacji.

POWSTAWANIE MATRYCY BIAŁKOWEJ W SZKLIWIE (APOZYCYJNE ODKŁADANIE SZKLIWA)

Dojrzałe szkliwo zęba jest najbardziej zmineralizowaną, bezkomórkową tkanką organizmu. Stopień mineralizacji wynosi 92–96%, pozostałe składniki to woda i substancje organiczne. Zbudowane jest z kryształów hydroksyapatytów – $\text{HP Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ tworzących zorganizowane struktury pryzmatów szkliwnych [55]. Rozwój szkliwa przebiega w trzech fazach: sekrecyjnej, przejściowej oraz dojrzewania [49]. Powstawanie szkliwa rozpoczyna się od wydzielania przez wypustkę ameloblastów, zwaną wyrostkiem Tomesa, białek (niektóre występują jedynie w szkliwie) tworzących swoiste rusztowanie dla wzrastających kryształów hydroksyapatytów [37,62,68]. Białkiem prawdopodobnie odpowiedzialnym za inicjację powstawania kryształów hydroksyapatytów jest tuftelina (55 kDa), jedyne białko pojawiające się we wczesnej fazie sekrecyjnej na granicy szkliwno-zębinowej. Nie wiadomo, czy pełni ona funkcję cząsteczki sygnalizacyjnej, czy też bierze bezpośredni udział w inicjacji tworzenia kryształów hydroksyapatytów szkliwa [23,24]. Istnieje hipoteza, iż za krystalizację kryształów HA w szkliwie odpowiedzialne są białka charakterystyczne dla zębiny, fosfoproteiny i sialoproteiny zębiny [8]. Mineralizacja szkliwa następuje natychmiast po tym, jak ameloblasty rozpoczną wydzielanie organicznej macierzy, jednak stopień mineralizacji we wczesnej fazie sekrecyjnej wynosi jedynie 30% [49]. Dokładnie nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do wzrostu pryzmatów szkliwnych w długiej osi (oś – c) poza faktem, iż jest to wzrost preferowany energetycznie [56]. Nie stwierdzono, czy wzrost pryzmatów odbywa się poprzez dokładanie kolejnych jonów do pierwotnego miejsca krystalizacji, czy powstają niezależne, liniowo zorientowane, sferyczne miejsca krystalizacji, które w późniejszym etapie rozwoju ulegają fuzji [50].

Jednocześnie z inicjacją powstania pierwszych centrów krystalizacji ameloblasty rozpoczynają wydzielanie białek amelogenin i enamelin, stanowiących organiczne rusztowanie dla tworzących się zmineralizowanych struktur szkliwa – pryzmatów

szkliwnych [15,61]. Stwierdzono, że obydwie grupy białek mają silne powinowactwo do wiązania składników mineralnych, wapnia, fosforanów i węglanów. Bogate w prolinę, histydynę i glutaminian amelogeniny w fazie sekrecyjnej stanowią 90% organicznej macierzy szkliwa i umiejscawiają się w rdzeniu tworzących się pryzmatów. Macierzyste amelogeniny o masie cząsteczkowej 25 kDa zlokalizowane są głównie w powierzchniowej warstwie nowo utworzonego szkliwa, szybko jednak podlegają degradacji, prawdopodobnie poprzez odłączenie C-końcowego telopeptydu, co nadaje im silne właściwości hydrofobowe, podnosi zdolność agregacji oraz redukuje masę cząsteczkową do 20 kDa [54]. Tak zredukowane cząsteczki tworzą główną strukturę organicznej macierzy szkliwa modulującą wzrost kryształów hydroksyapatytów. Kolejne, chronologiczne procesy proteolitycznej degradacji prowadzą do ich rozkładu na rozpuszczalne fragmenty o masie cząsteczkowej 11–13 kDa oraz silnie nierozpuszczalne, bogate w tyrozynę reszty 5 kDa (TRAP) [16, 28, 29]. Pod koniec fazy sekrecyjnej prawie wszystkie amelogeniny powinny ulec proteolitycznej degradacji i zostać usunięte z tworzącej się tkanki szkliwnej. Jedynie silnie agregujące cząstki TRAP pozostają w szczątkowej ilości w zewnętrznej warstwie pryzmatów szkliwnych. W trakcie fazy sekrecyjnej amelogenezy, amelogeniny (20 kDa) warunkują orientację przestrzenną i prawidłowy wzrost pryzmatów szkliwnych na długość, stanowiąc swoiste wsporniki dla nowo powstających pryzmatów szkliwnych, zapewniając im jednocześnie homogenny kształt [29]. Jednak całkowita degradacja amelogenin oraz usunięcie produktów ich rozkładu pod koniec fazy sekrecyjnej jest bezwzględnie warunkiem dalszego wzrostu pryzmatów w pozostałych wymiarach, czyli na grubość i szerokość (osie a,b) [53]. W rdzeniu pryzmatów, w bezpośrednim sąsiedztwie amelogenin występuje grupa białek o silnie kwaśnym charakterze zwana enamelinami [31,64]. Enameliny, czyli wszystkie białka niebędące amelogeninami, w swym składzie zawierają duże ilości kwasu glutaminowego, asparaginowego, seryny oraz glicyny. Podobnie jak amelogeniny macierzyste cząsteczki enamelin o m.c. 150 kDa, ulegają degradacji (89 kDa > 65 kDa > 32 kDa) w trakcie fazy sekrecyjnej, a także podlegają postranslacyjnym modyfikacjom, tj. fosforylacji i glikozylacji [32, 70]. Przeciwnie do amelogenin nie są one całkowicie usuwane w trakcie dojrzewania szkliwa i dlatego można je również wykryć w szkliwie dojrzałym jako cząstki o masie cząsteczkowej 32 kDa, silnie związane z pryzmatami szkliwa [59]. Fakt sekrecji enamelin w bardzo wczesnej fazie tworzenia szkliwa, ich niezmiennosc ewolucyjna (podobny skład u innych gatunków np. u rekinów) świadczy o ich niezwykle istotnej roli w procesie krystalizacji oraz regulacji wzrostu kryształów apatytów szkliwa [23]. Ponadto systematyczna degradacja zarówno amelogenin, jak i enamelin w trakcie całej fazy sekrecyjnej rozwoju szkliwa wskazuje na istotność funkcji tych białek w regulacji wzrostu i dojrzewania tkanki, a ich wzajemna zależność może odpowiadać za wzrost, orientację przestrzenną pryzmatów oraz odkładanie substancji międzypryzmatycznej [53].

Kolejne białko biorące udział w tworzeniu organicznej macierzy szkliwa to ameloblastyna (m.c. 62 kDa) zlokalizowana głównie na obrzeżach pryzmatów szkliwnych. Funkcja ameloblastyny w amelogenezie pozostaje niejasna. Istnieją przypuszczenia, iż pełni ona rolę cząstki sygnalizacyjnej w pochewce Hertwiga oraz ze względu na jej umiejscowienie bierze udział w tworzeniu połączeń pryzmat-pryzmat [65]. W amelogenezie niezwykle istotną rolę odgrywa degradacja białek poprzez specyficzne dla szkliwa enzymy należące do dwóch grup. Są to metaloproteazy i proteazy seryny [19,41,46,60]. Występujące

w wysokim stężeniu w fazie sekrecyjnej amelogenezy metaloproteazy, których głównym przedstawicielem jest enamelizyna, prawdopodobnie regulują przebieg apozycyjnego odkładania szkliwa wybiórczo, właśnie w fazie sekrecyjnej, na co wskazuje gwałtowny spadek ich stężenia w kolejnych fazach amelogenezy, czyli przejściowej oraz dojrzewania szkliwa [9]. Odmienne przebiega krzywa aktywności proteazy serynowej macierzy szkliwa – 1, której stężenie w fazie sekrecyjnej utrzymuje się na niskim poziomie, gwałtownie wzrasta natomiast w fazie przejściowej i utrzymuje plato na wysokim poziomie w fazie dojrzewania [10]. Na podstawie powyższych obserwacji przyjęto założenie, iż proteaza serynowa odpowiada za degradację białek, głównie z grupy amelogenin w fazie sekrecyjnej amelogenezy, a tym samym pośrednio moduluje wzrost i dojrzewanie pryzmatów szkliniwych [19,52,60]. Podstawowym składnikiem zmineralizowanego szkliwa są kryształy hydroksyapatytów zawierające w swoim składzie fosforany wapnia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dokładnie nie wiadomo, co jest donorem i jaka jest droga transportu wapnia do ameloblastów, a następnie w okolicę frontu mineralizacji. Badania wykazały pozytywną immunoreaktywność ameloblastów dla dwóch białek wiążących wapń: parwalbuminy PV (m. cz. 12 kDa) oraz witamino D_3 -zależnej kalbindyny CB D28k (m.c. 28 kDa). Pierwsze ślady obecności obydwu białek w części podstawnej ameloblastów zanotowano we wczesnej fazie sekrecyjnej amelogenezy. W trakcie postępu procesu mineralizacji parwalbumina i kalbindyna D28k „przemieszczane” były w kierunku wypustki Tomesa, aż do „wysycenia” całej objętości aktywnego ameloblasta [11, 12, 13, 14]. Fakt ekspresji obydwu białek u szczura jedynie w ameloblastach oraz prawdopodobnie w komórkach warstwy pośredniej, odpowiedzialnych za dostarczenie składników odżywczych dla ameloblastów narzuca przypuszczenie, iż parwalbumina i/lub kalbindyna D28k mogą być bezpośrednio związane z procesem mineralizacji szkliwa. Istnieją przypuszczenia, iż zarówno kalbindyna D28k, jak i parwalbumina pełnią istotną funkcję w utrzymaniu określonego, wysokiego, ale niecytotoksycznego stężenia jonów wapniowych w komórkach macierzystych szkliwa [17, 18, 27, 34, 45]. Obserwacje dotyczące gwałtownego spadku ilości CB D28k w dojrzałych ameloblastach fazy dojrzewania szkliwa sugeruje, że teoria „transportu” jonów wapniowych przez kalbindynę D28k nie jest tak pewna, jak pierwotnie przypuszczano [35, 36], oraz zważywszy, iż obecnie przeważa teoria roli buforującej dla białek wiążących wapń, być może główna rola zarówno CB D28k, jak i PV polega właśnie na buforującej ochronie ameloblasta przed wzrastającym, potencjalnie cytotoksycznym stężeniem jonów wapniowych.

Pod koniec fazy sekrecyjnej i w fazie przejściowej amelogenezy następuje całkowity rozkład i usunięcie produktów degradacji większości amelogenin oraz częściowo enamelin, w miejscu których powstają porowate przestrzenie [49], szybko wypełniane się płynem zewnątrzkomórkowym zawierającym węglany, fosforany oraz jony fluorkowe i magnezowe [51]. W fazie dojrzewania dochodzi do zapelniania powstałych przestrzeni kryształami hydroksyapatytów szkliwa odkładających się w pozostałych dwóch osiach (a, b) pryzmatów, co skutkuje wzrostem pryzmatów na szerokość i grubość oraz pełną mineralizacją szkliwa.

ZAGROŻENIA WYNIKAJĄCE Z WBUDOWANIA JONÓW FLUORKOWYCH DO SIATKI KRYSZTAŁICZNEJ PRYZMATÓW SZKLIWNYCH

Jon fluorkowy wprowadzony do organizmu endogennie np. w postaci tabletek fluorkowych (suplementacja endogenna) w czasie trwania odontogenezy, wbudowywany jest bezpośrednio do siatki krystalicznej apatytów szkliwa zmieniając dwuhydroksyapatyty $[Ca_5(PO_4)_3(OH)_2]$, w hydroksyfluoroapatyty $[Ca_5(PO_4)_3(OH)_1F]$, a następnie fluoroapatyty $[Ca_5(PO_4)_3F_2]$ [5]. Ta część fluoru stanowi względnie stabilną komponentę szkliwa i może być z niego usunięta jedynie na skutek demineralizującego działania kwasów bądź abrazyj [48]. Jon fluorkowy zastępując dipol OH^- w siatce krystalicznej zmienia konfigurację przestrzenną kryształu (wynika to z mniejszej o $0,3 \text{ \AA}$ średnicy F^- od dipola OH^-), silniej wiąże sąsiadujące z nim bezpośrednio 3 jony Ca^{2+} , co skutkuje wzmożeniem krystalizacji oraz stabilności wiązań elektrostatycznych, a w konsekwencji zwiększeniem odporności kryształów apatytów na demineralizujące działanie kwasów [26, 30, 39, 43, 63]. Labilną frakcją fluoru w szkliwie stanowi uwodniona otoczka pryzmatów oraz płyny ustrojowe. Fluor w fazie uwodnionej znajdujący się w bezpośrednim sąsiedztwie pryzmatów odgrywa znaczącą rolę w profilaktyce próchnicy zębów, gdyż może natychmiast wbudowywać się w powierzchniowe warstwy zdemineralizowanej działaniem kwasów struktury szkliwa, powodując jego wtórną remineralizację [7, 33, 57]. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt gromadzenia się CaF w bezpośrednim otoczeniu pryzmatów szkliwnych, a tym samym przesunięcie stałej dysocjacji na korzyść pryzmatów [44]. Badania wskazują na gromadzenie się zjonizowanej formy fluoru w szkliwie, w fazie sekrecyjnej, przejściowej oraz fazie dojrzewania. W stadium przejściowym amelogenezy, zjonizowany fluor zawarty w fazie uwodnionej wraz z jonami wapniowymi, fosforanowymi, magnezowymi, prawdopodobnie konkurencyjnie do fosforanów oraz węglanów wapnia, zajmuje przestrzenie powstające w tkance po usuwanych komponentach organicznej macierzy, głównie amelogeninach [1], co może zaburzać mineralizację i powodować powstawanie porowatego szkliwa. Proporcjonalnie do wzrostu stężenia jonów fluorkowych w płynie zewnątrzkomórkowym, wzrasta stężenie jonów magnezu, przy jednoczesnym spadku stężenia węglanów. Taka tendencja może skutkować powstawaniem hipoplazji bądź fluorozy szkliwa [40, 42, 66, 67]. Jednak za główną przyczynę niepełnej bądź nieprawidłowej mineralizacji szkliwa uważa się zaburzenia w enzymatycznej degradacji białek tworzących organiczną macierz szkliwa, głównie amelogenin. DenBesten wykazał [22] opóźnienie degradacji amelogenin u szczurów intoksykowanych wysokimi stężeniami fluorku sodowego w wodzie pitnej, co skutkowało opóźnieniem i słabszą mineralizacją szkliwa (zawartość komponent białkowych była proporcjonalna do wysokości stężenia fluorku sodowego w wodzie pitnej). Opóźnienie rozkładu białek obserwowano do późnej fazy dojrzewania szkliwa. Spowolnienie dojrzewania szkliwa przez fluor może wiązać się z jego zdolnością zmniejszenia ilości cykli odwracalnej modyfikacji ameloblastów z formy „*smooth ended*” do „*ruffle ended*” oraz wydłużenia tych cykli, co bezpośrednio rzutuje na szybkość wycofywania ze szkliwa komponent białkowych i zastępowania ich substancją mineralną [21]. Dinkard i wsp.

w przeciwieństwie do DenBesten i wsp. oraz Aoba i wsp. obserwował zmiany w składzie aminokwasowym oraz w ilości białek macierzy szkliwa poddanego wpływowi fluoru już we wczesnej fazie sekrecyjnej [5, 20, 25]. Autorzy pozostają jednak zgodni, co do faktu znaczącego opóźnienia procesu degradacji amelogenin pod wpływem jonu fluorkowego [47, 69]. Teorię tę potwierdzają również Aoba i wsp. wykazując absorpcję macierzystych amelogenin do powierzchni apatytów szkliwa z zaznaczeniem ich silnie hamującego wpływu na wzrost kryształów apatytów szkliwa [2, 3]. 25–30% fluoru zgromadzonego w tworzącym się szkliwie może zostać usunięta w postaci nierozpuszczalnych aglomeratów z amelogeninami, jednak znacząco większa część fluoru na stałe wbudowana w siatkę krystaliczną fluoroapatytów stanowi stabilną część rezerwuaru i może hamować degradację białek macierzy [6]. Fluor wbudowany do wnętrza siatki krystalicznej apatytów zmienia jej strukturę, zwiększając siłę wiązania kryształów z białkami (amelogeninami) [6]. Cząsteczki amelogenin ulegają wówczas konformacji, co obniża „dostępność” do nich metaloproteaz i w konsekwencji uniemożliwia bądź znacząco opóźnia ich proteolityczną degradację [4, 5]. Lyaruu i wsp. zaobserwowali jedynie przejściowe zaburzenia w mineralizacji szkliwa w okresie fazy sekrecyjnej oraz brak negatywnego wpływu fluoru na białka organicznej macierzy szkliwa, natomiast Suckling i wsp. notowali bardziej nasilone objawy fluorozji szkliwa u zwierząt narażonych na intoksykację związkami fluoru od wczesnej fazy sekrecyjnej w przeciwieństwie do intoksykowanych jedynie w fazie dojrzewania szkliwa [38, 58]. Obniżenie poziomu Ca^{2+} w płynie zewnątrzkomórkowym jako następstwo obecności reaktywnych jonów fluorkowych, może powodować spadek aktywności wapniozależnych proteaz (np. metaloproteazy), biorących udział w degradacji amelogenin i zaburzać prawidłowy przebieg mineralizacji szkliwa w drodze pośredniej. Reasumując, wciąż niejasny pozostaje sposób oddziaływania fluoru na organiczną macierz szkliwa. Nie wiadomo, czy dzieje się to w wyniku swoistej reakcji z amelogeninami, czy na skutek blokowania centrów katalitycznych proteaz odpowiedzialnych za ich rozkład. Ponieważ zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne organicznej macierzy szkliwa pozostają bezsprzecznie potwierdzoną przyczyną powstawania fluorozji szkliwa, dalsze badania mają na celu precyzyjne określenie punktu „uchwyty” fluoru oraz zdefiniowanie mechanizmu powstawania fluorozji zębów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AOBA T, FEJERSKOV O. Dental fluorosis: Chemistry and Biology. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**: 155–170.
- [2] AOBA T, TANABE T, MORENO EC. Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. *Adv Dent Res* 1987; **1**: 252–260.
- [3] AOBA T, TANABE T, MORENO EC. Proteins in the enamel fluid of immature porcine teeth. *J Dent Res* 1987; **66**: 1721–1726.
- [4] AOBA T, MORENO EC, KRESAK M, TANABE T. Possible roles of partial sequences at N- and C-termini of amelogenin in protein-enamel mineral interaction. *J Dent Res* 1989; **68**: 1331–1336.
- [5] AOBA T, TANABE T, MORENO EC, FUKAE M. Effects of fluoride on matrix proteins and their properties in rat secretory enamel. *J Dent Res* 1990; **69**: 1248–1255.

- [6] AOBA T. Strategies for improving the assessment of dental fluorosis: focus on chemical and biochemical aspects. *Adv Dent Res* 1994; **8**: 66–74.
- [7] ARENDS J, CHRISTOFFERSEN J, CHRISTOFFERSEN MR, SCHUTOF J. Influence of fluoride concentration on the progress of demineralization in bovine enamel at pH 4.5. *Caries Res* 1983; **17**: 455–457.
- [8] ARSENAULT L, ROBINSON BW. The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. *Calcif Tissue Int* 1989; 45111–45121.
- [9] BARTLETT JD, SIMMER JP, XUE J, MARGOLIS HC, MORENO EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel Matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 1996; **183**:123–128.
- [10] BARTLETT JD, XUE J, MARGOLIS HC. A novel serine protease mRNA isolated from porcine enamel organ. *J Dent Res* 1997; 7627.
- [11] BARCHOLD MW, CELIO MR, HEIZMANN CW. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. *J Biol Biochem* 1984; **250**: 5189–5196.
- [12] BERDAL A, HOTTON D, BALMAIN N, BREHIER A, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Immunological characterization, developmental pattern and Vitamin-D-dependency of calbindin D-28 K in rat teeth ameloblasts. *Differentiation* 1989; **40**: 27–35.
- [13] BERDAL A, HOTTON D, KAMYAB S, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Subcellular co-localization and co-variations of the two vitamin D-dependent proteins in rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 1991; **36**:715–725.
- [14] BERDAL A, NANJI A, SMITH CE, AHLUWALIA JP, THOMASSET M, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Differential expression of calbindin-D 28 kDa in rat incisor ameloblasts throughout enamel development. *Anat Rec* 1991; **230**: 149–163.
- [15] BOUROPOULOS N, MORADIAN-OLDAK J. Induction of apatite by the cooperative effect of amelogenins and the 32-kDa enamelin. *J Dent Res* 2004; **83**: 278–282.
- [16] BROOKES SJ, ROBINSON C, KIRKHAM J, BONASS WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing enamel. *Arch Oral Biol* 1995; **40**: 1–14.
- [17] CELIO MR, NORMAN AW, HEIZMANN CW. Vitamin-D-dependent calcium-binding-protein and parvalbumin occur in bones and teeth. *Calcif Tissue Int* 1984; **36**:129–130.
- [18] CHEN WY, NANJI A, SMITH CE. Immunoblotting studies on artificial contamination of enamel homogenates by albumin and other proteins. *Calcif Tissue Int* 1995; **57**: 145–151.
- [19] DENBESTEN PK, HEFFERNAN LM. Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1989; **34**: 399–404.
- [20] DEN BESTEN PK, CRENSHAW MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol* 1984; **29**: 675–679.
- [21] DENBESTEN PK, CRENSHAW MA, WILSON MH. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res* 1985; **64**: 1365–1370.
- [22] DENBESTEN PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986; **65**: 1272–1277.
- [23] DEUTSCH D, PALMON A, FISHER LW, KOLODNY N, TERMINE JD, YOUNG MF. Sequencing of bovine enamelin („tuftelin”) a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 1991; **226**: 16021–16028.
- [24] DEUTSCH D, DAFNI L, PALMON A, HEKMATI M, YOUNG MF, FISHER LW. Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. W: Chichester: John Wiley&Sons 1997: 135–155.
- [25] DRINKARD CR, CRENSHAW MA, BAWDEN JW. The effect of fluoride on the electrophoretic patterns of developing rat molar enamel. *Arch Oral Biol* 1983; **12**: 1131–1134.
- [26] ELLIOTT JC. Recent progress in the chemistry, crystal chemistry and structure of apatites. *Calcif Tissue Res* 1969; **3**: 293–307.
- [27] ELMS TN, TAYLOR AN. Calbindin-D28 kappa localization in rat molar during odontogenesis. *J Dent Res* 1987; **66**: 1431–1434.
- [28] FINCHAM AG, MORADIAN-OLDAK J. Recent advances in amelogenin biochemistry. *Connect Tissue Res* 1995; **32**: 119–124.
- [29] FINCHAM AG, SIMMER JP. Amelogenin proteins of developing dental enamel. W: Chadwick DJ, Cardew G, Eds. Dental enamel. Chichester John Wiley & Sons, 1997: 118–134.
- [30] FRAZIER PD. X-ray diffraction analysis of human enamel containing different amounts of fluoride. *Arch Oral Biol* 1967; **12**: 35–42.
- [31] FUKAE M, TANABE T, UCHIDA T, YAMAKOSHI Y, SHIMIZU M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int* 1993; **53**: 257–261.

- [32] FUKAE M, TANABE T, MURAKAMI C, DOHI N, UCHIDA T, SHIMIZU M. Primary structure of the porcine 89 kDa enamel. *Adv Dent Res* 1996; **10**: 111–118.
- [33] HELLWIG E, LUSSI A. What is the optimum fluoride concentration needed for the remineralization process? *Caries Res* 2001; **35**: 57–59.
- [34] HOTTON D, DAVIDEAU JL, BERNAUDIN JF, BERDAL A. *In situ* hybridization of calbindin-D 28k transcripts in undecalcified section of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 1995; **32**: 137–143.
- [35] HUBBARD MJ, KON JC. Proteomic analysis of dental tissues. *J Chromatography B* 2002; **771**: 211–220.
- [36] HUBBARD MJ. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; **11**: 437–466.
- [37] JESSEN H. Elliptical tubules as unit structure of forming enamel Matrix in the rat. *Arch Oral Biol* 1968; **13**: 351–352.
- [38] LYARUU DM, DE JONG M, BROCKERS AL, WOLTGENS JH. Ultrastructure of *in vitro* recovery of mineralization capacity of fluorotic enamel Matrix in hamster tooth germs pre-exposed to fluoride in organ culture during the secretory phase of amelogenesis. *Arch Oral Biol* 1987; **32**: 107–115.
- [39] MACIEJEWSKA I, ADAMOWICZ-KLEPALSKA B. Influence of low and high doses of fluoride on tooth germ development in rats. *Folia Morphol* 2000; **59**: 307–310.
- [40] MASCARENHAS AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; **22**: 269–277.
- [41] MORADIAN-OLDAK J, SIMMER JP, SARTE PE, ZEICHNER DM, FINCHAM AG. Specific cleavage of a recombinant murine amelogenin by a proteinase isolated from bovine tooth enamel. *Arch Oral Biol* 1994; **39**: 647–656.
- [42] MURRAY JJ, RUGG-GUNN AJ, JENKINS GN. Epidemiology and measurement of dental fluorosis. W: Fluoride in caries prevention. Oxford: Wright 1991: 222–261.
- [43] OBERSZTYN A, TRYKOWSKI J. Wybrane zagadnienia dotyczące reakcji jonu fluorkowego ze szkliwem. *Czas Stomat* 1983; **36**: 485–491.
- [44] OGAARD B. CaF₂ formation: Cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001; **35**: 40–44.
- [45] ONISHI T, OOSHIMA T, SOBUE S, TABATA MJ, KURISU K, WAKISAKA S. Calbindin D28k-like immunoreactivity during the formation the enamel-free area in the rat molar teeth. *Anat Res* 2000; **258-4**: 384–390.
- [46] OVERALL CM, LIMEBACK H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem J* 1988; **256**: 965–972.
- [47] RICHARDS A, KRAGSTRUP J, JOSEPHSEN K, FEJERSKOV O. Dental fluorosis development in post-secretory enamel. *J Dent Res* 1986; **65**: 1406–1409.
- [48] ROBINSON C, CONNELL S, KIRKHAM J, BROOKES SJ, SHORE RC, SMITH AM. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res* 2004; **38**: 268–276.
- [49] ROBINSON C, FUCHS P, DEUTSCH D, WEATHERELL JA. Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res* 1978; **12**: 1–11.
- [50] ROBINSON C, FUCHS P, WEATHERELL JA. The appearance of developing rat incisor enamel using freeze-fracturing technique. *J Cryst Growth* 1981; **53**: 160–165.
- [51] ROBINSON C, KIRKHAM J, BRIGGES HD, ATKINSON PJ. Enamel proteins: from secretion to maturation. *J Dent Res* 1982; **61**: 1490–1495.
- [52] ROBINSON C, KIRKHAM J. The effect of fluoride on the developing mineralised tissues. *J Dent Res* 1990; **69**: 685–691.
- [53] ROBINSON C, KIRKHAM J, BROOKES SJ, BONASS WA, SHORE RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995; **39**: 145–152.
- [54] ROBINSON C, BROOKES SJ, KIRKHAM J, BONASS WA, SHORE RC. Crystal growth in dental enamel: The role of amelogenins and albumin. *Adv Dent Res* 1996; **10**: 64–71.
- [55] ROBINSON C, BROOKES SJ, BONASS WA, SHORE RC, KIRKHAM J. Enamel maturation. W: Wiley, Chichester 1997: 156–174.
- [56] ROBINSON C, BROOKES SJ, SHORE RC, KIRKHAM J. The developing enamel Matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998; **106**: 282–291.
- [57] SJOGREN K. How to improve oral fluoride retention? *Caries Res* 2001; **35**: 14–17.

- [58] SUCKLING GW, THURLEY DC, NELSON DGA. The macroscopic and scanning electron-microscoping appearance and microhardness of the enamel, and the related histological changes in the enamel organ of erupting sheep incisors resulting from prolonged low daily dose of fluoride. *Arch Oral Biol* 1988; **33**: 361–373.
- [59] TANABE T, AOBA T, MORENO EC, FUKAE M, SHIMIZU M. Properties of phosphorylated 32 kDa nonamelogenin proteins isolated from porcine secretory enamel. *Calcif Tissue Int* 1990; **46**: 205–215.
- [60] TANABE T, FUKAE M, UCHIDA T, SHIMIZU M. The localisation and characterisation of proteinases for the initial cleavage of porcine amelogenin. *Calcif Tissue Int* 1992; **51**: 213–217.
- [61] TERMINE JD, BELCOURT AB, CHRISTNER PJ, CONN KM, NYLEN MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980; **255**: 9760–9768.
- [62] TRAVIS DF, GLIMCHER MJ. The structure and organization of and the relationship between the organic matrix and the inorganic crystals of embryonic bovine enamel. *J Cell Biol* 1964; **23**: 447–497.
- [63] TRYKOWSKI J, OBERSZTYN A. Rola fluoru w utrzymaniu kariostazy. *Czas Stomat* 1983; **36**: 817–823.
- [64] UCHIDA T, TANABE T, FUKAE M, SHIMIZU M, YAMADA M, MIAKE K, KOBAYASHI S. Immunohistochemical and immunohistochemical studies using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and 13–17 kDa nonamelogenins on immature enamel of the pig and rat. *Histochemistry* 1991; **96**: 129–138.
- [65] UCHIDA T, FUKAE M, TANABE T, YAMAKOSHI Y, SATODA T, MURAKAMI C, TAKAHASHI O, SHIMIZU M. Immunohistochemical and immunocytochemical study of the 15 kDa non-amelogenin and related proteins in the porcine immature enamel: proposal of a new group of enamel proteins „sheath proteins”. *Biomed Res* 1995; **16**: 131–140.
- [66] VIEIRA AP, HANCOCK R, LIMEBACK H, MAIA R, GRYNPAS MD. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? *J Dent Res* 2004; **83**: 76–80.
- [67] VIEIRA AP, HANCOCK R, LIMEBACK H, SCHWARTH M, GRYNPAS MD. How does fluoride concentration in the tooth affect apatite crystal size? *J Dent Res* 2003; **82**: 909–913.
- [68] WARSHAWSKY H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. *Anat Rec* 1971; **169**: 559–584.
- [69] WRIGHT JT. Hereditary defects of enamel. W: Robinson C, Kirkham J, Shore RC. (ed) Dental enamel formation to destruction. CRC Press, Boca Raton, FL: 193–222.
- [70] YAMAKOSHI Y. Carbohydrate moieties of porcine 32 kDa enamel. *Calcif Tissue Int* 1995; **56**: 323–330.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.03. 2005 r.

Przyjęto: 21.09. 2005 r.

80-208 Gdańsk, ul. Orzeszkowej 18

e-mail: lzabelam@amg.gda.pl