

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Stomatologie

Vliv kryokonzervace na kmenové buňky

Effect of cryopreservation on stem cells

MDDr. Nela Pilbauerová

Školitel: doc. MUDr. Jakub Suchánek Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Poděkování autora

Poděkování:

Je mou milou povinností touto cestou poděkovat všem, kdo se podíleli na vzniku této disertační práce.

V první řadě děkuji svému školiteli doc. MUDr. Jakobovi Suchánkovi, Ph.D., který mě k výzkumu kmenových buněk přivedl a bez něho by tato práce nevznikla. Děkuji mu za cenné rady, metodické vedení, za trpělivost a v neposlední řadě za cenné přátelství.

Dále pak chci vyjádřit vděk celému Ústavu histologie a embryologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové za poskytnutí zázemí pro uskutečnění této studie. Jmenovitě děkuji MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D., vedoucímu Laboratoře tkáňových kultur; paní Heleně Rückerové a paní Simoně Vrchotové.

Dále si cením spolupráce s Ústavem farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, jmenovitě s prof. MUDr. Stanislavem Mičudou, Ph.D. a s Ing. Hanou Laštůvkovou. Děkuji jim za metodické vedení a poskytnutí prostředků při měření relativní délky telomer kmenových buněk zubní dřeně.

Nakonec můj upřímný vděk patří RNDr. Evě Čermákové, z Ústavu lékařské biofyziky, oddělení výpočetní techniky, Lékařské fakulty v Hradci Králové, za trpělivost a pomoc při statistickém zpracování dat.

Obsah

1 Úvod do problematiky	1
1.1 Kmenové buňky	1
1.2 Kmenové buňky zubní dřeně	2
1.3 Principy kryokonzervace	3
1.4 Kryoprotektivum	5
1.4.1 Dimethylsulfoxid	6
1.5 Kryokonzervace celých zubů	8
1.6 Kryokonzervace kmenových buněk zubní dřeně	10
1.6.1 Extrahované zuby	10
1.6.2 Izolace kmenových buněk zubní dřeně	10
1.6.3 Kryokonzervační protokol	11
1.6.3.1 Řízená kryokonzervace	11
1.6.3.2 Neřízená kryokonzervace	12
1.6.3.3 Vitřifikace	13
1.6.3.4 Kryokonzervace s použitím magnetického pole	13
1.6.4 Rozmrazování buněk	14
2 Cíl	15
3 Materiál a metodika	16
3.1 Odběr zubu	16
3.2 Izolace zubní dřeně	16
3.3 Enzymatická izolace kmenových buněk zubní dřeně	17
3.4 Charakterizace KBZD	21
3.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	22
3.6 Diferenciační potenciál KBZD	23
3.7 Neřízená kryokonzervace	26
3.8 Statistické zpracování	26
4 Výsledky	28
4.1 Izolace KBZD	28
4.2 Charakterizace KBZD	29
4.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	42

4.4 Diferenciační potenciál KBZD	46
5 Diskuze	55
6 Závěr	65

Seznam použitých zkratek

AKB	Adultní kmenové buňky
α - MEM	Eaglovo minimální esenciální médium v Alpha modifikaci
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cy3	Cyanin
CIRBP	Chladem indukovaný RNA vázající protein
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DT	Čas potřebný pro zdvojení populace („ <i>population doubling time</i> “)
ECM	Extracelulární matrix
ED	Metoda enzymatického štěpení („ <i>enzymatic digestion method</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	Epidermální růstový faktor
EKB	Embryonální kmenové buňky
FBS	Fetální bovinní sérum
FITC	Fluorescein izothiokyanát
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
HBSS	Hankův balancovaný solný roztok
ITS	<i>Insulin-transferrin-sodium-selenite supplement</i>
KB	Kmenové buňky
KBZD	Kmenové buňky zubní dřeně
KPA	Kryoprotektivum
mRNA	„ <i>Messenger</i> “ ribonukleová kyselina
Nd	Neodym
OG	Metoda spontánního vycestování z izolované tkáně („ <i>outgrow isolation method</i> “)

p	pasáž
PBS	Fosfátový pufrční roztok
PD	Populační zdvojení („ <i>population doubling</i> “)
PDGF	Růstový faktor izolovaný z trombocytů
PE	Fykoerytrin
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RBM3	RNA vázající motiv protein 3
SFR	Pomalá řízená kryokonzervace („ <i>slow freezing rate</i> “)
SHED	Kmenové buňky izolované ze zubní dřene dočasných exfoliovaných zubů
TGF-β1	Transformující růstový faktor β1
TZT	Tvrde zubní tkáň
USFR	Ultra pomalá řízená kryokonzervace („ <i>ultra slow freezing rate</i> “)
YAG	Yttrito-hlinitý granát

Souhrn

Tématem této práce je vliv kryokonzervace na kmenové buňky, jmenovitě na kmenové buňky izolované ze zubní dřeně (KBZD). Kryokonzervace je metoda uchovávání buněk a tkání při teplotách hluboko pod bodem mrazu, při níž jsou biologické pochody zastaveny. Odstraňuje nutnost udržovat kmenové buňky (KB) v dlouhodobé kultivaci, umožňuje skladování KB pro potenciální budoucí klinické využití, případně pro klinické testování. Pro její plné využití v preklinické a klinické praxi je nezbytné objasnění nežádoucích efektů na kryokonzervované buňky.

Cílem tohoto výzkumu bylo ověření vlivu metody neřízené kryokonzervace na KBZD s použitím dimethylsulfoxidu (DMSO) v koncentraci 10 % jako kryoprotektiva (KPA). Stanovit vliv porovnáním velikosti, viability, proliferační aktivity, fenotypu, relativní délky telomer a diferenciačního potenciálu nezmrazených a zamrazených KBZD po dobu šesti a dvanácti měsíců. KBZD byly izolovány ze stálých zubů od dárců ve věku 13 – 18 let.

Dle výsledků této práce mohou být KBZD efektivně kryokonzervovány technicky nenáročnou metodou neřízené kryokonzervace minimálně po dobu 12 měsíců. Nepozorovali jsme vliv na jejich morfologii, fenotyp, ale po kryokonzervaci došlo k jejich zmenšení a poklesu viability. Kryokonzervované buňky zůstaly po rozmrazení proliferačně aktivní, ale potřebovaly delší čas na obnovení jejich „funkčního zdraví“. I po roční kultivaci byly KBZD schopné diferenciace ve zralé buněčné typy.

DMSO je považován za zlatý standard pro jeho všestranné využití při kryokonzervaci různých typů buněk. Využití DMSO však sebou nese i rizika plynoucí z jeho cytotoxického efektu. V naší budoucí práci bychom se rádi zaměřili na eliminaci DMSO z kryokonzervačního média, případně alespoň na snížení jeho koncentrace kombinací s vysokomolekulárními látkami.

Summary

The topic of this study is the effect of cryopreservation on stem cells, namely dental pulp stem cells (DPSCs). Cryopreservation is a process of sustaining the viability of cells and tissues by freezing and storing them at sub-zero temperatures where biochemical reactions do not occur. It eliminates the need to preserve stem cells through long-term cultures, allows the storage of stem cells for potential future clinical use, or clinical studies. However, it is necessary to fully understand any adverse effects on cryopreserved cells for full applicability in preclinical and clinical practice.

The purpose of this study was to cryopreserve DPSCs for 6 and 12 months using an uncontrolled-rate freezing technique and observe its effect on the biological properties of stored stem cells. We used 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotective agent (CPA). We successfully isolated ten dental pulp stem cell lineages from donors aged 13 – 18 years to be able to observe the effect of cryopreservation on cell size, viability, proliferation activity, relative telomere length and differentiation potential.

According to the data obtained, the uncontrolled-rate freezing technique is not technically demanding, and it is sufficient for the successful cryopreservation of DPSCs for at least 12 months. Cryopreserved cells kept the same morphology, phenotype and differentiation potential. We observed size reduction and decreased viability after cryopreservation. Cryopreserved cell groups remained proliferatively active after the thawing process. However, the population doubling time for the cryopreserved group was longer immediately after thawing in comparison to the fresh cells.

DMSO is a frequently used CPA for its versatile effectiveness in cryopreservation of various cell types. On the other hand, there are broadly published concerns about its cytotoxic effect. In our future study, we would like to reduce its concentration or eliminate it from the cryopreservation protocol.

1 Úvod do problematiky

1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (KB) představují velmi pravděpodobně budoucnost regenerativní a reparativní medicíny díky svým vlastnostem, jako jsou schopnost sebeobnovy a diferenciace ve zralé buněčné typy *in vitro*. Dle zdroje a doby izolace KB rozeznáváme kmenové buňky embryonální (EKB) a postnatální nebo také adultní (AKB). EKB se mohou diferencovat v kteroukoli buňku lidského těla, jsou tzv. pluripotentní (1). AKB mají užší spektrum diferenciace a jsou označovány jako multipotentní (1). Při odběru adultních kmenových buněk může dárce nebo jeho zákonný zástupce dát informovaný souhlas s jejich využitím a nevznikají tak silné etické rozpory, jako při využití embryonálních kmenových buněk, u kterých je odběr spojen se zánikem embrya. Navíc AKB mají nižší imunogenní a tumorózní potenciál (2), a proto představují bezpečnější buněčnou linii pro potenciální využití v regenerativní či reparativní medicíně.

Adultní kmenové buňky byly izolovány z řady tkání lidského těla, jmenovitě z kůže (3), kostní dřeně (4), tukové tkáně (5), periferní krve (6), chrupavky (7), periostu (8) a řady dalších. Adultní kmenové buňky byly také izolovány z tkání souvisejících se zubem, tj. ze zubní dřeně natálního, dočasného i stálého zubu, zubního folikulu, apikální papily, tzn. z tkáně při apexu kořene vyvíjejícího se zubu, z periodontia a gingivy. V angličtině označovaných jako „Dental related stem cells“. Vývoj zubu je založen na sérii vzájemných induktivních interakcí mezi ektodermem a mezenchymem či ektomezenchymem. Deriváty dentálního mezenchymu jsou dentální papila a dentální vak. Zevní vrstva buněk dentální papily jsou buňky ektomezenchymální, dávající vznik odontoblastům a extracelulární matrix (ECM) dentinu. Vnitřní masa buněk dentální papily je mezenchymálního původu a dává vznik fibroblastům zubní dřeně, cévám a řídkému kolagennímu vazivu zubní dřeně. Vnitřní vrstva buněk dentálního vaku jsou buňky ektomezenchymálního původu a dávají vznik cementoblastům, respektive ECM cementu. Zevní a střední masu buněk dentálního vaku poté tvoří buňky mezenchymálního původu a dávají vznik fibroblastům (střední vrstva), kolagennímu vazivu periodontia, a osteoblastům (zevní vrstva), ECM kosti alveolárního výběžku horní a dolní čelisti. Podkladem pro dentální mezenchym a ektomezenchym jsou buňky, které během embryonálního vývoje vycestovaly z okrajů *crista neuralis*. Díky rozdílnému embryonálnímu

vývoji jednotlivých zubních tkání se dá předpokládat, že ze zubní dřevě a z okolních měkkých tkání je možné získat KB rozdílného původu umožňující výběr vhodných linií pro různé aplikace (9).

V současnosti bylo identifikováno a charakterizováno již osm skupin kmenových buněk izolovaných z tkání souvisejících s natální, dočasnou nebo stálou denticí. Kmenové buňky izolované ze zubní dřevě (KBZD), které byly poprvé izolovány v roce 2000 (10) a následně charakterizovány v roce 2002 (11). Ostatní typy kmenových buněk byly objeveny poději: Kmenové buňky izolované ze zubní dřevě dočasných exfoliovaných zubů (SHED – „*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*“) (12) poprvé izolovány v roce 2003; kmenové buňky izolované z periodontálních ligament (13) objeveny v roce 2004; kmenové buňky izolované z dentálního folikulu poprvé izolovány v roce 2005; kmenové buňky izolované z apikální papily objeveny v roce 2006 (15); kmenové buňky izolované ze zubního zárodku ve vývojovém stádiu zvonku poprvé izolovány v roce 2007 (16); gingivální mezenchymální kmenové buňky poprvé izolovány v roce 2009 (17); kmenové buňky izolované ze zubní dřevě natálních zubů objeveny v roce 2010 (18).

1.2 Kmenové buňky zubní dřevě

Kmenové buňky zubní dřevě byly poprvé identifikovány v roce 2000 prof. Gronthosem a jeho kolegy (10). Vitální zubní dřevě představuje relativně snadno dostupný zdroj postnatálních kmenových buněk. Extrakce zubu se provádí většinou jako plánovaný výkon, a tak se jedná o využití biologického materiálu, který by se jinak cíleně likvidoval jako biologický odpad. Pacient, respektive dárce, tak nepodstupuje žádný operační výkon navíc. Nejčastěji jsou za účelem izolace KB využívány třetí moláry v 77,6 % (19), které jsou často extrahovány z důvodů retence či semiretence. Druhou nejčastější skupinou jsou první premoláry v 10,7 % (19), které jsou extrahovány z ortodontických důvodů okolo 12. roku věku, tedy záhy po prořezání do dutiny ústní. Jedná se tak často o intaktní zuby s nedokončeným vývojem kořene. Třetí nejčastěji využívané zuby jako zdroj KBZD jsou nadpočetné zuby, zejména meziodenty, a to v 2,6 % (19).

Zubní dřevě je izolována od okolních struktur tvrdými zubními tkáněmi a zachovává si specifické mikroprostředí, nazývané „*niche*“, které ovlivňuje vlastnosti uložených kmenových buněk izolovaných ze zubní dřevě (KBZD) (20), (21). Jelikož svým složením niché zubní dřevě velmi připomíná niché primitivní (embryonální) tkáně, dá se předpokládat, že i

některé vlastnosti KBZD mohou být podobné vlastnostem embryonálních kmenových buněk. Suchánek a kol. dokázali, že buňky jsou schopné dosáhnout přes 60 populačních zdvojení (22) a Laino s kolegy dosáhl i 80 populačních zdvojení (23). KBZD mají vřetenovitý tvar s množstvím cytoplazmatických výběžků. Jsou schopné adherovat k pevným povrchům a exprimují povrchové CD („*cluster of differentiation*“) znaky mezenchymálních kmenových buněk. Jejich velikou výhodou je ektomezenchymální embryonální původ, díky kterému jsou schopné diferenciaci v široké spektrum buněk *in vitro*. KBZD jsou schopné diferenciovat *in vitro* v osteogenní, neurogenní, adipogenní, myogenní, chondrogenní buněčnou řadu a buňky produkující inzulin (24), (25), (26).

1.3 Principy kryokonzervace

Jeden z hlavních cílů tkáňového inženýrství je regenerace a reparace tkání ztracených úrazem nebo patologickým procesem. K dosažení tohoto cíle je potřeba mít k dispozici dostatečný počet KB, ideálně takových, které jsou již charakterizované a uskladněné pro případné využití. Kryokonzervace je metoda uchovávání buněk a tkání při teplotách hluboko pod bodem mrazu, kdy jsou biologické pochody zastaveny (27). Po odebrání by tak buňky a tkáně mohly být skladovány až do doby, kdy by je dárce potřeboval. Pro využití zmrazených buněk a tkání v klinické praxi je však nutné, aby použitý kryokonzervační protokol byl standardizován a respektoval pravidla „*good manufacturing practice*“ (GMP). Buňky a tkáně jsou během procesu kryokonzervace vystaveny riziku ireverzibilního poškození. Přesné mechanismy poškození nejsou zcela objasněny. Kryobiologie je multidisciplinární obor zabývající se biologickými principy probíhajícími v buňkách a tkáních (zahrnující i jejich interakci se zevním prostředím) při teplotách bod bodem mrazu. Během kryokonzervace je problematická zejména rychlost ochlazování, vystavení kritickým teplotám či při rozmrazování přechod zpět k teplotám okolo 37 °C (27). Primárním úkolem tohoto oboru je objasnění principů a mechanismů poškození buněk a tkání během kryokonzervace a upravit protokoly tak, aby k těmto ireverzibilním změnám nedocházelo, nebo byl jejich dopad minimální.

Během kryokonzervace se pro soubor mechanismů s negativním dopadem na KB používá obecně termín kryopoškození, jelikož je těžké jednotlivé mechanismy od sebe oddělit. Nejdůležitější jsou procesy, které se souborně označují jako chladový šok a chladové poškození (28). Chladový šok je zodpovědný za snížení viability vlivem prudké či velké změny

teplot a chladové poškození nastává při vystavení buněk kritickým teplotám, což jsou teploty okolo 0-20 °C.

Při chladovém šoku jsou první poškozeny lipidy vázané v membráně, struktura proteinů a nukleových kyselin DNA dále je poškozený proces translace mRNA a inhibována enzymová aktivita vázaná na buněčné membrány (28). Vlivem těchto pochodů je zahájena syntéza tzv. chladem indukovaných proteinů. Prozatím byly důkladně prostudovány zejména dva chladové proteiny: CIRBP (chladem indukovaný RNA vázající protein) a RBM3 (RNA vázající motif protein 3). Tyto proteiny byly identifikovány jak u bakterií, tak i u mnohobuněčných organismů včetně člověka. Syntéza těchto chladových proteinů je klíčovým kontrolním mechanismem v savcích buňkách, který spouští kaskádu dalších pochodů během kryokonzervace (29), například zvýšenou syntézu nenasycených mastných kyselin, čímž dochází ke zvýšené propustnosti membrán (30).

Jedním z možných mechanismů chladového poškození je neefektivní fázová přeměna lipidů v lipidové dvojvrstvě buněčných membrán. Při teplotě 0 – 20 °C by měly lipidy přecházet z tekuté krystalické struktury na gelu podobnou rigidní strukturu (31). Teplota 0 – 20 °C je proto označována za kritickou a doba strávená při těchto teplotách by měla být obecně co nejkratší. Kryokonzervace využívající rychlý pokles teploty tak snižuje riziko chladového poškození, ale zvyšuje riziko chladového šoku (32). Geneticky se senzitivita pro chladové poškození u rostlin upravuje vyšším podílem nenasycených mastných kyselin (podíl dvojných vazeb) v buněčných membránách (33), na druhou stranu se membrány poté stávají více propustnými. Membrány spermíí mají také vyšší podíl polynenasycených MK. V těchto případech se poté uplatňuje poškození vlivem volných radikálů (34), (35).

Při studiu vlivu kryopoškození na buňky kůry králíčích nadledvin ponořených do vitrifikačního média byla zjištěna lineární závislost mezi snižováním viability buněk a klesající teplotou od 0 °C až k – 85 °C (28). Ve studii Guan a kol. při genové analýze zjistili expresi stresových a prozánětlivých genů při pomalé kryokonzervaci až k teplotě – 80 °C (36).

Buňky a tkáně jsou také poškozeny během procesu kryokonzervace a rozmrazování tvorbou extracelulárních a intracelulárních krystalů ledu. Při teplotě mezi – 15 °C až – 5 °C dochází k formování krystalů ledu v extracelulárním médium, ale intracelulárně stále chrání buňky jejich membrána. Nastává tzv. přechodné období, kdy obsah buněk zůstává nezmrazený a zvyšuje se jeho osmolalita. Pro obnovení rovnováhy uniká intracelulární voda vně buněk (37). Následující pochody poté závisí na rychlosti poklesu teploty během kryokonzervace. Při

příliš rychlém poklesu teploty voda z buněk nestačí uniknout, nedojde k obnově rovnováhy a ledové krystaly se při dalším snižování teploty začnou tvořit intracelulárně (38). Naopak při příliš pomalém poklesu teploty buňky ztrácejí nitrobuněčnou vodu. Ztráta vody způsobuje dehydrataci a smrštění buněk, čímž dochází ke zvýšení koncentrace intracelulárních elektrolytů před dosažením eutektické teploty (při této teplotě jsou všechny komponenty roztoku v pevném stavu) (37). Objemové smrštění buněk a dlouhodobé vystavení vyšší koncentraci elektrolytů vede k poškození lipidové dvojvrstvy, čímž buněčné membrány ztrácejí svou selektivní propustnost a při rozmrazování praskají (39). Tento mechanismus je označován jako hyperosmotický stres (40). Navíc je objemové smrštění buněk limitované jejich obsahem, který je označován jako tzv. kritický objem. I když buňky mají nadále tendenci se zmenšovat, není to možné, a tak se na povrchu buněk vytváří vysoký hydrostatický tlak, který opět vede k jejich lýze (41). Při ztrátě vody dále dochází k formování nových vazeb mezi proteiny, které by při fyziologické konfiguraci buněk nemohly vznikat. Při opětovném zahřátí, respektive rehydrataci buněk, jsou tyto vazby nestálé, proteiny denaturují a buňky jsou ireverzibilně poškozeny (42). Při smrštění buněk se také ztrácejí mezibuněčné kontakty (37).

Reakce na kryokonzervaci jsou odlišné odvíjející se od typu a velikosti buněk, rozdílné permeability buněčných membrán a osmotické tolerance (37), (43), (44).

Mezi další mechanismy, které se uplatňují během kryokonzervace a poškozují kryokonzervované buňky, patří oxidativní stres a tvorba volných kyslíkových radikálů. Nejčastěji se jedná o peroxid vodíku, superoxidové ionty a hydroxylové radikály (45).

1.4 Kryoprotektivum

Kryoprotektiva (KPA) jsou látky přidávané k buněčné suspenzi před kryokonzervací, jejichž smyslem je snížit negativní dopad kryokonzervace ve všech výše popsaných mechanismech. Díky vysokému obsahu vody uvnitř buněk a tkání je voda jeden z hlavních determinantů fyzikálních změn uvnitř buněk během kryokonzervace i při procesu rozmrazování.

Tvoření intracelulárních a extracelulárních krystalů ledu vede k fatálnímu poškození buněčných struktur. Tvorba krystalů ledu může nastat kdykoliv pokud klesne teplota pod 0 °C (46), přičemž extracelulární krystaly se tvoří snadněji než intracelulární (47). Krystaly ledu jsou většinou solidní a mají pravidelnou krystalickou strukturu. Pro krystalizaci ledu je nutné krystalizační centrum, jádro, od kterého se krystal rozrůstá. Toto jádro může být iont nebo

jiný krystal ledu. KPA pracují jednak na principu optimalizace teploty tání a tuhnutí, ale také jsou to látky schopné zamezit či omezit tvorbu krystalů ledu tím, že zamezují či omezují vazbu tuhnoucí vody na zárodečná centra krystalů (48). KPA se dají rozdělit dle jejich molekulární hmotnosti na nízkomolekulární a vysokomolekulární. Mezi KPA o nízké molekulární hmotnosti patří ethylen (propylen) glykol, dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, methanol a jiné (28), (48). Díky nízké molekulární váze jsou schopné proniknout intracelulárně a ovlivnit tak vnitřní prostředí buňky. Snižují koncentraci elektrolytů nitrobuněčně a brání dehydrataci buněk při poklesu teploty. Zabraňují formování ledových krystalů vazbou na hydroxylovou skupinu v molekulách vody (49). Jejich efektivita stoupá s koncentrací, ale s vyšší koncentrací zároveň stoupá i jejich toxicita (37). Druhá skupina látek jsou látky o vysoké molekulární hmotnosti, mezi které patří například dextran, hydroxyethyl škrob, polyvinylalkohol a jiné (50). Cukry a jejich deriváty, jako glukóza, sacharóza nebo trehalóza, byly nalezeny jako přírodní KPA u některých druhů rostlin (51), žab (52) a žábřonožek (53), které jsou tímto chráněny před nízkými teplotami. Obecně vysokomolekulární látky chrání buňky převážně extracelulárně. Podílí se částečně na dehydrataci buněk, zábráně tvorby intracelulárních krystalů ledu a dále také stabilizují buněčné membrány (48). V malém množství se tato KPA dostávají intracelulárně i do nefagocytující buněk pravděpodobně díky procesu pinocytózy (54).

Obecně platí, zejména u většiny nízkomolekulárních kryoprotektiv, že s rostoucí koncentrací stoupá jejich toxicita. Rozlišuje se jednak specifická toxicita v rámci daného KPA a nesespecifická toxicita. Toxický vliv KPA se velmi obtížně dokazuje, jelikož se během kryokonzervace uplatňují i mechanismy kryopoškození, osmotického poškození, oxidativního stresu a jiné. Stejně i samotný vliv KPA se liší dle použité koncentrace, teploty, typu buněk, metodiky studie a média s KPA (28).

1.4.1 Dimethylsulfoxid

Užití DMSO je s obavami diskutováno už od roku 1964, kdy byly poprvé schváleny klinické studie. Již v roce 1965 byly klinické studie s DMSO v humánní medicíně zakázány, protože byl pozorován nežádoucí účinek DMSO na oční čočku u pokusných zvířat (55). Následující rok byly schváleny některé klinické studie, ve kterých byl DMSO použit pro kožní aplikaci u pacientů s vážným onemocněním, a u nichž neexistovala jiná účinná léčba. V roce 1968, po dokončení zvláštních studií toxicity, které nepotvrdily toxicitu DMSO na proteiny oční čočky

člověka, byly povoleny další klinické studie. Při těchto studiích byl DMSO použit pro méně závažná postižení (56). Letální dávka DMSO při intravenózním podání je 2,5 – 8,9 mg/kg tělesné hmotnosti (studováno na zvířatech - psech, opicích, krysách a myších) (56). Poměrně vysoká letální dávka změnila pohled na toxicitu DMSO, a americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv klasifikoval DMSO do stejné kategorie jako ethanol, jmenovitě do rozpouštědla 3. třídy. Rozpouštědla 3. třídy jsou látky s nízkým toxickým potenciálem při nízkých koncentracích přijatelných v léčivech (57). Tento závěr umožnil rozšíření užívání DMSO. Využití DMSO se zakládá na vlastnostech, které je možné medicínsky využít. DMSO má analgetické, vazodilatační, diuretické účinky a relaxační účinky na svalstvo, kdy tyto vlastnosti se ověřovaly laboratorně (58). Navíc DMSO napomáhá vstřebávání ostatních léčiv přes kožní bariéru (59). Mimo kryokonzervace KBZD se DMSO používá například v dermatologii. Při kožní aplikaci zabezpečuje okamžitou, dočasnou úlevu od bolesti, tedy spíše paliativní léčbu (60). Používá se při řešení vředů, dekubitů, nekrotizace kůže při extravazaci po podání cytostatik (59). Dále při léčbě muskuloskeletálních onemocnění, respektive při řešení bolestí spojených s muskuloskeletálními onemocněními (60), (61), (62). Jedná se o bezbarvou tekutinu, která se pro svou liposolubilitu rychle vstřebává. Je metabolizován zejména v ledvinách, ale jeden z metabolitů je vylučovaný plícemi a má česneku podobný zápach (63). Obecně platí, že podporuje vylučování histaminu, a proto i vedlejší reakce jsou spojené s reakcemi vázanými na histamin (64). Nejčastěji je nežádoucím účinkem postižení gastrointestinálního traktu a projevy jsou zejména nauzea a zvracení. Výrazněji se nežádoucí účinky projevují při intravenózním podání, kdy se však jedná o přechodné a mírné účinky, trvající přibližně 48 hod. Další vedlejší účinky se projevují v kardiovaskulárním a respiračním systému. Po intravenózním podání již kryokonzervovaných kmenových buněk byla popisována u pacientů přechodná bradykardie, hypertenze, hypotenze, extrasystoly, dyspnoe až cyanóza. Jednalo se vždy o přechodné na dávce závislé účinky, nevyžadující další intervenci. Při léčbě dermatologických onemocnění byly u pacientů popsány po transdermálním podání lokální reakce, například zarudnutí, edém, svědění. Dále byly popsány neurologické vedlejší účinky, zejména bolest hlavy, ale i epileptické záchvaty. Vliv na proteiny oční čočky nebyl u člověka prokázán (65). Toxicita DMSO stoupá s rostoucí koncentrací, teplotou a dobou působení DMSO na buňky (66).

Vazba DMSO na hydroxylové skupiny v molekule vody je několikrát silnější (30 KJ/mol) a déle trvající než vazba mezi molekulami vody samotné (20 KJ/mol) (67). Síla této vazby se snižuje se stoupající teplotou (68).

Nejčastější využívána koncentrace DMSO pro kryokonzervaci je 10 %. Pro snížení koncentrace DMSO se využívá jeho kombinace s vysokomolekulárními KPA, které ve většině případů nejsou samostatně dostačujícími pro ochranu během procesu kryokonzervace či rozmrazování. Stabilizují buněčné membrány, urychlují proces vitrifikace a snižují tvorbu ledových krystalů (37). Dle studie Thirumbala a kol. poškození kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně bylo srovnatelné při využití DMSO v koncentracích 2 %, 4 %, 6 %, 8 % a 10 %. Naopak při koncentraci DMSO pod 2 % došlo k výraznému snížení viability kmenových buněk po rozmrazení (69).

Díky riziku výše popsaných vedlejších účinků, při podání již kryokonzervovaných KB s použitím DMSO pacientovi, je nutné po procesu rozmrazování DMSO odstranit. Nejjednodušší metoda je okamžitá centrifugace rozmrazených buněk. Po centrifugaci je supernatant odstraněn a buňky jsou resuspendovány v novém čistém roztoku. Proces se může opakovat (70). Nevýhodou této metody jsou ztráty buněk, které jsou nutné pro následnou léčbu, časová náročnost metody a riziko kontaminace (71). Metoda je ale úspěšná, Akkök a kol. pozorovali výrazně nižší výskyt vedlejších reakcí u pacientů po podání již zmrazené destičkové náplavy, kde DMSO před podáním byl odstraněn právě tímto způsobem (72).

Mezi nové metody pro odstranění DMSO patří filtrace buněčné suspenze přes rotační membránu. Nevýhodou jsou opět velké ztráty objemu buněk díky jejich shlukování a vyšší ekonomické náklady této metody. Na druhou stranu se při této metodě snižuje riziko kontaminace (73). Další novou metodou je difúze buněčné suspenze přes mikrotubuly (74). Nevýhodou je, že se můžou zpracovat jen malé objemy vzorků a pro větší objemy při klinickém využití není tato metoda vhodná (71). Třetí nová metoda je diluce přes duté tubuly obsahující velké množství tenkých dutých vláken. Při odstraňování DMSO proudí buněčná suspenze přes úzká vlákna jedním směrem a vymývací roztok opačně (75).

1.5 Kryokonzervace celých zubů

Přestože se větší pozornost přikládá studiu kryokonzervace kmenových buněk zubní dřeně, tedy po úspěšné izolaci a amplifikaci, bylo i několik studií zabývajících se kryokonzervací celých

intaktních zubů. Izolace a kultivace KBZD v tkáňových laboratořích je technicky náročný a nákladný proces, během kterého hrozí kontaminace izolovaných linií KBZD (76). Při zamrazení celých zubů by se toto riziko eliminovalo. Kryokonzervace celých intaktních zubů má však svá úskalí, které téměř brání užití tohoto protokolu v preklinické i klinické praxi.

Díky nízkým teplotám během kryokonzervace dochází k mechanickému poškození zubů. Oh a kol. (77) ve své studii uvádějí, že u 4 z 16 premolárů zmrazených při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jednoho týdne pozorovali podélnou frakturu klinické korunky a kořene. Tvrdost tvrdých zubních tkání byla shodná s kontrolní skupinou nezamrazených zubů. Další problémem byl nízký počet získaných viabilních kmenových buněk po izolaci ze zubní dřene rozmrazených dočasných i stálých zubů. Liedemann a kol. (78) ve své studii uvedli, že úspěšnost izolace kmenových buněk z rozmrazených dočasných zubů byla pouze 30 % v porovnání s nezamrazenými zuby, kde úspěšnost byla přes 60 %. Navíc, tyto buňky z rozmrazených zubů, neměly typickou morfologii SHED. Místo klasického vřetenovitého tvaru vykazovaly kulatý tvar a měly nižší proliferační aktivitu v porovnání s SHED izolovaných z nezamrazených zubů. Doba do první pasáže u SHED z rozmrazených zubů byla 31 dní u nezamrazených 27 dní. V jiné studii Woods a kol. (79) zamrazili 10 stálých zubů s nedokončeným vývojem kořene po dobu jednoho měsíce při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení se ze tří zubů nepodařilo izolovat KBZD, u sedmi izolované KBZD nebyly proliferačně aktivní, pouze u dvou zubů KBZD vykazovaly znaky typické pro KBZD a byly proliferačně aktivní. Předpokládá se, že nízká výtěžnost izolace KB z kryokonzervovaných zubů je způsobena nedostatečnou penetrací kryoprotektiva do nitra zubní dřene. Z tohoto důvodu není možné tento protokol využít pro stálé zuby s dokončeným vývojem kořene či dočasné zuby bez viditelné resorpce kořene. I přes využití stálých zubů s nedokončeným vývojem kořene či dočasných zubů s resorbovanými kořeny, je však výtěžnost nízká a izolované buňky vykazují nízkou proliferační aktivitu. Gioventiu a kol. (80) využili Nd:YAG laser k vytvoření otvorů o průměru 0,07 – 0,3 mm ve sklovině a dentinu dočasných zubů ve snaze usnadnit penetraci kryoprotektiva přes tvrdé zubní tkáně (TZT) do nitra zubu, a tím zvýšit protektivní účinek KPA. Izolované buňky byly pozitivní pro znaky mezenchymálních kmenových buněk a zachovaly si shodnou morfologii i proliferační aktivitu jako kontrolní skupina. Na druhou stranu technická i finanční náročnost metody s využitím Nd:YAG laseru se výrazně zvýšila.

Obečně platí, že i přes riziko kontaminace v průběhu izolace kmenových buněk je upřednostňován postup izolace a krátkodobé kultivace linií KB s následnou kryokonzervací před kryokonzervací celého zubu.

1.6 Kryokonzervace kmenových buněk zubní dřevě

1.6.1 Extrahované zuby

Pro izolaci kmenových buněk je limitující fakt, že vlivem ztráty krevní perfuze dochází po vyčerpání zásob kyslíku a zvýšení pH k degradaci zubní dřevě, respektive kmenových buněk, po extrakci zubu. Několik studií prokázalo, že je možné kmenové buňky izolovat i po uplynutí 120 hodin od přerušení cévního zásobení zubní dřevě zubu. Čím je tato doba však delší, tím procento úspěchu izolace klesá (47). Pro zpomalení procesu degradace tkání během transportu do tkáňové laboratoře jsou zuby uchovávány při 4 °C a nejčastěji ponořeny do Hankova balancovaného solného roztoku. Pro snížení rizika kontaminace během izolace se jednak ošetřuje povrch zubů komerčně dostupnými baktericidními prostředky, např. chlorhexidinem, ale také jsou do transportního roztoku přidávána antibiotika a antimykotika. Pro účely izolace kmenových buněk lze využít jakýkoliv vitální zub v průběhu celého života jedince, ale úspěšnost izolace s rostoucím věkem klesá.

1.6.2 Izolace kmenových buněk zubní dřevě

Pro izolaci zubní dřevě je nejdříve nutné zpřístupnit dřevěnou dutinu tak, aby nedošlo k poškození zubní dřevě. V současné době existují dvě metody izolace KBZD, metoda enzymatického štěpení (anglický termín – „*enzymatic digestion method*“, ED) (10) a metoda spontánního vycestování z izolované tkáně (anglický termín – „*outgrow isolation method*“, OG) (82). Při enzymatické izolaci se suspenze KBZD získává štěpením tkáně působením enzymů. Nejčastěji se jedná o směs kolagenázy typu I a dispázy v poměru 1:1. Doba působení enzymů je okolo 30 - 60 minut, různí se dle velikosti izolované solidní tkáně. Výsledkem štěpení je suspenze jednotlivých buněk různého původu, zbytky cév a extracelulární matrix. KBZD poté adherují ke dnu kultivační nádoby a při výměně média se ostatní neadherující buňky a zbytky tkání odstraní. Doba působení enzymů je pro izolaci KBZD stěžejní, jelikož delší doba může negativně ovlivňovat viabilitu izolovaných kmenových buněk (83). Druhá technika je autory popisována jako metoda, kdy se rozmělněné části zubní dřevě velikosti

okolo 1 - 2 mm³ vloží do kultivační nádoby s vhodným médiem a KBZD spontánně vycestovávají z tkáně a adherují k povrchu kultivační nádoby během 3 – 5 dní. Ačkoliv je metoda spontánního vycestování technicky méně náročná, všeobecně se k izolaci mezenchymálních kmenových buněk více využívá postup enzymatického štěpení. Bylo popsáno, že KBZD získané touto metodou vykazují vyšší proliferační aktivitu, širší diferenciační potenciál (84) a vyšší schopnost produkovat mineralizovanou extracelulární matrix (85). Hilkens s kol. (86) ve své pozdější práci demonstroval, že pokud jsou KBZD izolovány od stejného dárce, kultivovány za stejných podmínek, nezáleží na použité metodě, jelikož nezpozorovali signifikantní rozdíl v morfologii, proliferační aktivitě či diferenciačním potenciálu mezi izolovanými KBZD.

1.6.3 Kryokonzervační protokol

Existuje několik metod kryokonzervace. Woods a kol. (79) ve své studii uvedli, že optimální množství buněk pro kryokonzervaci je 1,0 - 1,5 x 10⁶ buněk při použití 10% DMSO jako kryoprotektiva. Studovali také optimální teplotu pro uchování buněk. Nepozorovali rozdíl ve viabilitě po rozmrazení (>90 %) u buněk skladovaných po dobu jednoho týdne, měsíce a roku při teplotě – 80 °C či teplotě kapalného dusíku – 196 °C.

1.6.3.1 Řízená kryokonzervace

Chladový šok je zodpovědný za snížení viability buněk a tkání po rozmrazení vlivem prudkého či velkého poklesu teploty při ochlazování. Řízená kryokonzervace kontroluje pokles nízkých teplot ve snaze minimalizovat riziko poškození zamrazených buněk a tkání. Díky regulaci poklesu teplot se minimalizuje dehydratace buněk a tkání a tím i riziko osmotického šoku. Snižuje se i riziko vzniku intracelulárních krystalů ledu. Při pomalé regulované kryokonzervaci („*slow freezing rate*“, SRF) dochází k poklesu teploty o – 1 až – 2 °C za minutu (87), (88). Tato metoda byla poprvé využita při kryokonzervaci psích hematopoetických kmenových buněk (89). Při další metodě, ultra pomalé regulované kryokonzervaci („*ultra-slow freezing rate*“, USFR), je pokles teplot ještě pomalejší, o – 0,3 až – 0,6 °C za minutu. Tato metoda je však jak technicky, tak finančně náročnější (90). Huynh a kol. (91) ve své studii uvedli, že při použití kontrolované kryokonzervace dosáhli výrazněji vyšší viability buněk po rozmrazení, 79,7 % při použití 5% DMSO jako KPA a 79,0 % při použití 10% DMSO jako KPA než v případě vitrifikace, kde viabilita byla 10,8 % při 5% DMSO a 32,1

% při 10% DMSO jako KPA. Na druhou stranu Naaldijk a kol. (92) ve své studii ověřovali efektivitu kontrolované kryokonzervace a vitrifikace při využití různých kombinací koncentrací hydroxyethyl škrobu a DMSO jako KPA. Ve své práci nepozorovali výrazné rozdíly ve viabilitě krysích kmenových mezenchymálních buněk po rozmrazení (85 % v průměru) v žádném z použitých protokolů. Nevýhodou této metody zůstává fakt, že nelze využít pro kryokonzervaci většího objemu, jelikož by nebylo možné kontrolovat rovnoměrný pokles teploty.

1.6.3.2 *Neřízená kryokonzervace*

Alternativou kontrolované kryokonzervace je neřízená kryokonzervace, technicky i finančně nenáročná metoda. Primárně je kryokonzervační médium zchlazeno na teplotu 4 °C, kdy po přidání buněk a tkání je kryokonzervační nádoba přímo zmrazena na teplotu – 20 °C. Při této teplotě je uchována přibližně 1-2 hodiny. Po této době jsou kryozkumavky dlouhodobě uchovány při teplotě – 80 °C či teplotě kapalného dusíku (93). Řada studií potvrdila efektivnost této metody na kryokonzervaci KBZD při použití kapalného dusíku. Zhang a kol. (94) ve své studii potvrdili schopnost KBZD diferencovat v neurogenní, osteogenní/odontogenní, adipogenní, myogenní a chondrogenní buněčnou řadu po jednoměsíční kryokonzervaci v tekutém dusíku. Další studie potvrdila schopnost buněk vytvářet kostní matrix po dvouroční kryokonzervaci a skladování při teplotě kapalného dusíku (95). Dentry a kol. (96) potvrdili ve své studii, že je tato metoda vhodná i pro kmenové buňky periferní krve. Jen málo studií popisuje neřízenou kryokonzervaci při následném skladování při teplotě – 80 °C. Kumar a kol. (97) ve své studii analyzovali efekt několika modifikovaných protokolů neřízené kryokonzervace při použití DMSO jako KPA. Uvedli, že v žádném z protokolů neviděli změnu v morfologii či fenotypu KBZD po jednorroční kryokonzervaci. Po rozmrazení byly nejvíce proliferačně aktivní buňky, které byly zamrazené přímo na teplotu – 80 °C. Naopak nejmenší proliferační aktivitu pozorovali u buněk, které nejdříve ponechali 15 minut v 10% DMSO, a poté až zamrazili na teplotu - 80 °C. Všechny zmrazené buňky si zachovaly schopnost diferencovat ve zralé buněčné linie. Ve všech dostupných studiích se prozatím pozoroval vliv neřízené kryokonzervace na KBZD pouze při použití DMSO.

1.6.3.3 *Vitrifikace*

Vitrifikace je metoda rapidní kryokonzervace. Tato metoda je využívána zejména při kryokonzervaci embryí, oocytů a spermatických buněk, tedy buněk velmi senzitivních na kryopoškození. Při této metodě se využívá vysokých koncentracích vhodného KPA (často DMSO) a velmi rychlého ochlazení buněk na teplotu kapalného dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kryokonzervační médium s buňkami se mění na vysoce viskózní až sklovitou hmotu. Buňky jsou dále uchovávány při teplotě kapalného dusíku. Vysoké koncentrace KPA a tím možný cytotoxický efekt se díky velmi rychlému ochlazení buněk neprojevuje. Jadoon a kol. (98) ve své studii srovnávali metodu řízené kryokonzervace a vitrifikace při uchovávání oocytárních buněk a pozorovali větší množství viabilních buněk po rozmrazení v případě použití vitrifikace (70,3 % vs. 12,5 %). Při pomalé řízené kryokonzervaci je problematické zajistit rovnoměrné ochlazení periferie i centra oocytů, a tím dochází k jejich poškození. Na druhou stranu, pro zajištění vitrifikace je nutné, aby byl uchováván jen malý objem buněk či tkání (99). Je jen málo studií zabývajících se využitím vitrifikace pro uchování KBZD. Huynh a kol. (91) ve své studii pozorovali výrazně nižší viabilitu po rozmrazení u buněk uchovávaných po dobu 6 měsíců metodou vitrifikace než u buněk kryokonzervovaných metodou pomalé řízené kryokonzervace. Vitrifikaci není možné využít při kryokonzervaci tkání, pro velký objem není možné zajistit dostatečné zesklivatění celého objemu tkáně. Stejně neúspěšná je i vitrifikace celých intaktních zubů, kdy dochází výraznému poškození kořene, respektive poškození uchovaných KBZD (100).

1.6.3.4 *Kryokonzervace s použitím magnetického pole*

Tato metoda je modifikací řízené kryokonzervace, kde se využívá navíc efekt magnetického pole. Programovatelné mrazící boxy jsou schopné vytvářet magnetické pole o velikosti 0,01 mT a regulovat rychlost chlazení o $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu až po teplotu $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně jsou buňky a tkáně uchovávány přímo při teplotě $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při použití tohoto protokolu byla zachována viabilita KBZD po rozmrazení přes 73 % i při snížení koncentrace použitého DMSO na 3 % a využití kryokonzervačního média bez přidání fetálního bovinního séra (101). Oba tyto výsledky jsou velmi důležité pro pozdější klinické využití. Magnetické pole omezuje pronikání slabého proudu, který se tvoří při krystalizaci vody. Tento proud tak nemůže poškodit buněčné membrány kryokonzervovaných buněk a buňky jsou lépe chráněny.

Efektivnost této metody byla ověřena nejen při kryokonzervaci izolovaných KBZD, ale i celých intaktních zubů (101).

1.6.4 Rozmrazování buněk

Nejen samotná kryokonzervace, ale i rozmrazování může mít kritický vliv na viabilitu KBZD. Během rozmrazování je hned několik bodů, které je nutné brát v úvahu, pokud chceme zajistit co nejvyšší výtěžnost viabilních buněk po rozmrazení. Mezi tyto body patří teplota a rychlost zahřívání, výsledná teplota vzorku, promíchání obsahu během rozmrazování, a nakonec naředění KPA, tak aby se neprojevil cytotoxický efekt KPA (102). V současné době je za zlatý standard považována metoda rozmrazování v termální vodní lázni při teplotě 37 °C. Při této metodě dochází k rozpuštění ledových krystalů, a tak poškození buněk je jen minimální (79), (81). Na druhou stranu vodní lázeň představuje prostředí s vysokým rizikem kontaminace mykotickou či bakteriální infekcí. Méně rozšířená metoda je rozmrazování suchým teplem. Suché teplo představuje nižší riziko kontaminace a větší univerzálnost při rozmrazování. Současné poznatky ukazují, že je tato metoda stejně efektivní jako vodní lázeň (103), (104). Nejvíce se suché teplo v klinické praxi využívá při zpracování zamrazených vzorků krve a krevních derivátů (102). Rozmrazování ale nekončí pouze zahřátím vzorků. Dalším důležitým krokem je inaktivace KPA a jeho rozředění, tak aby se minimalizoval jeho cytotoxický efekt. Obecně by koncentrace KPA neměla být vyšší než 0,5 % předtím, než jsou buňky nasazeny do kultivačního média.

2. Cíl

Cílem tohoto výzkumu bylo ověření vlivu metody neřízené kryokonzervace na kmenové buňky izolované ze zubní dřeně stálých zubů s použitím kryoprotektivní látky DMSO v koncentraci 10 %. Vliv kryokonzervace a DMSO jsme stanovili porovnáním morfologie, proliferační aktivity, viability, fenotypu, relativní délky telomer a diferenciačního potenciálu linií nezmrazených a zamrazených KBZD po dobu šesti a dvanácti měsíců.

3. Materiál a metodika

Každý pacient/dárce byl před odběrem, respektive extrakcí zubu seznámen s problematikou výzkumu KBZD a obsahem informovaného souhlasu. V případě nezletilých pacientů byli seznámeni s danou problematikou také jejich zákonní zástupci. Informovaný souhlas i obsah doprovodného textu byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zpracování biologického materiálu za vědeckým účelem bylo schváleno stejnou komisí (ref. 201812 SO7P). Po zařazení do studie v případě kladného souhlasu byla osobní data uchovávána dle platných zákonů ČR.

3.1 Odběr zubu

Extrakce zubu probíhala v lokálním znecitlivění za aseptických podmínek na oddělení dentoalveolární chirurgie Stomatologické kliniky UK LF a FN v Hradci Králové. Po extrakci zubu, pro co největší minimalizaci rizika kontaminace, následovalo ošetření povrchu zubu pomocí sterilní gázy a jeho dekontaminace ponořením do 0,2% vodného roztoku chlorhexidin glukonátu po dobu 30 sekund. Po dobu transportu do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové byl zub uložen v uzavřené nádobě a zcela ponořen do transportního média, složeného z 1 ml Hankova balancovaného solného roztoku (HBSS; Invitrogen, Waltham, MA), 9 ml aqua pro injectione (Bieffe Medital, Grosotto, Itálie) a antibiotik, antimykotik - 200 µl/10 ml streptomycinu (Invitrogen), 200 µl/10 ml gentamicinu (Invitrogen), 200 µl/10 ml penicilinu (Invitrogen), 50 µl/10 ml amfotericinu B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Teplota roztoku během transportu byla udržována při 4 °C.

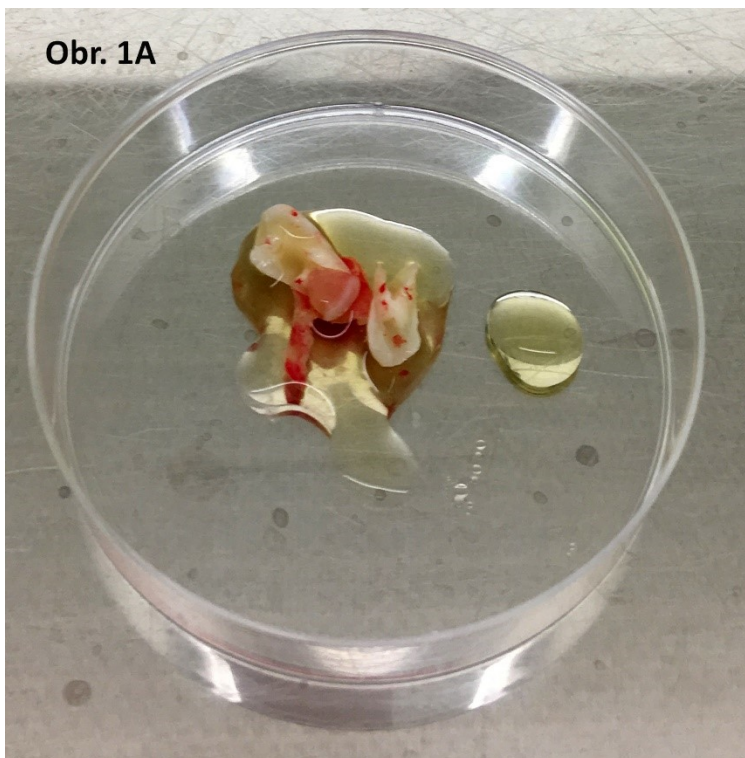
3.2 Izolace zubní dřeně

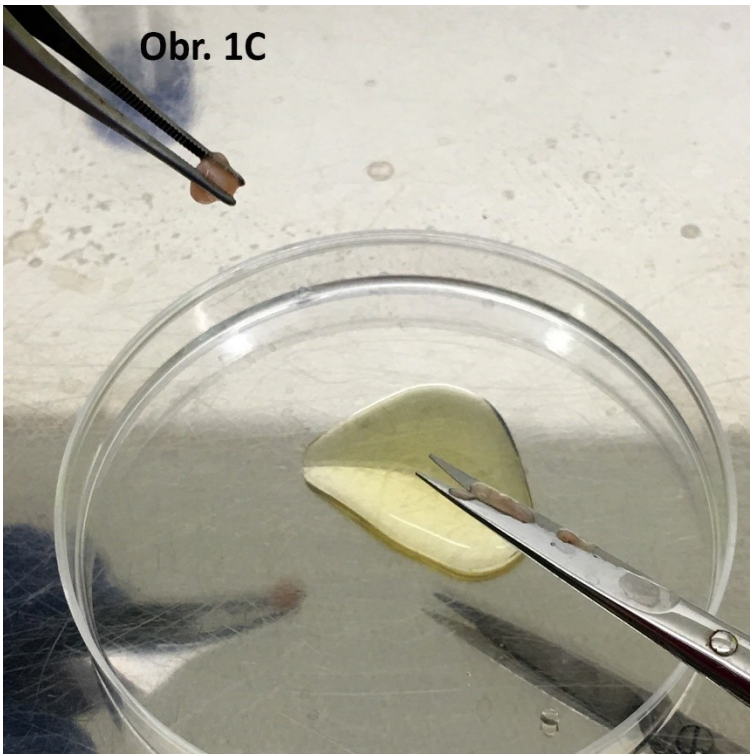
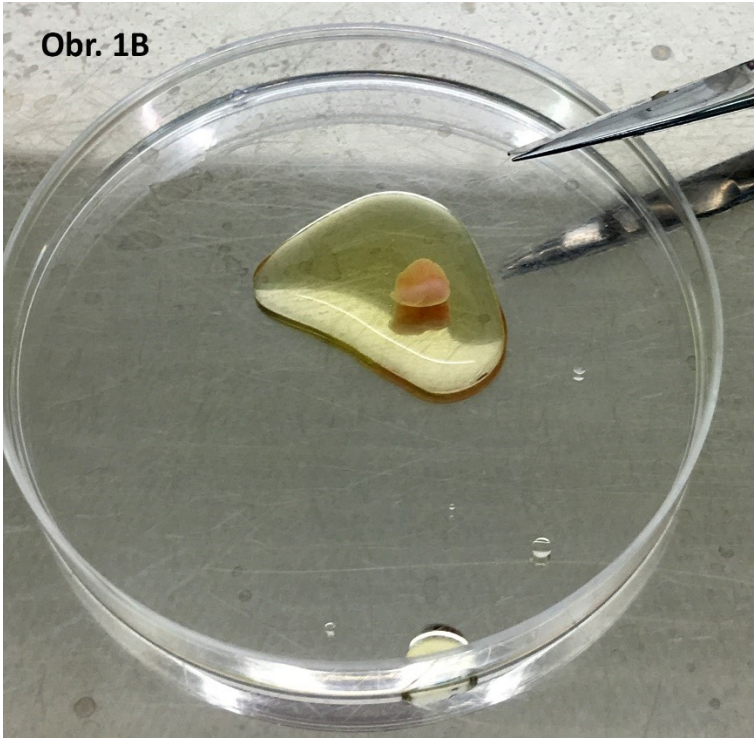
Izolace zubní dřeně byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu v laboratoři tkáňových kultur. V případě zubů s nedokončeným vývojem kořenového systému jsme pro vyjmutí zubní dřeně z kořene a korunky využili široce otevřené *foramen apicale*. Po šetrném oddělení zubní dřeně od vnitřní stěny kořene použitím sterilní ostré sondy jsme zubní dřeň separovali od zubu sterilní mikrochirurgickou pinzetou. Podmínkou byla minimální šířka *foramen apicale* dva milimetry, jinak tento způsob odběru nebyl možný. U zubů s kořeny, kde rozměry *foramen apicale* byly menší než dva milimetry, bylo nutné separovat korunku zubu od kořene v místě cementosklovinné hranice pomocí Luerových kleští. Tím jsme široce

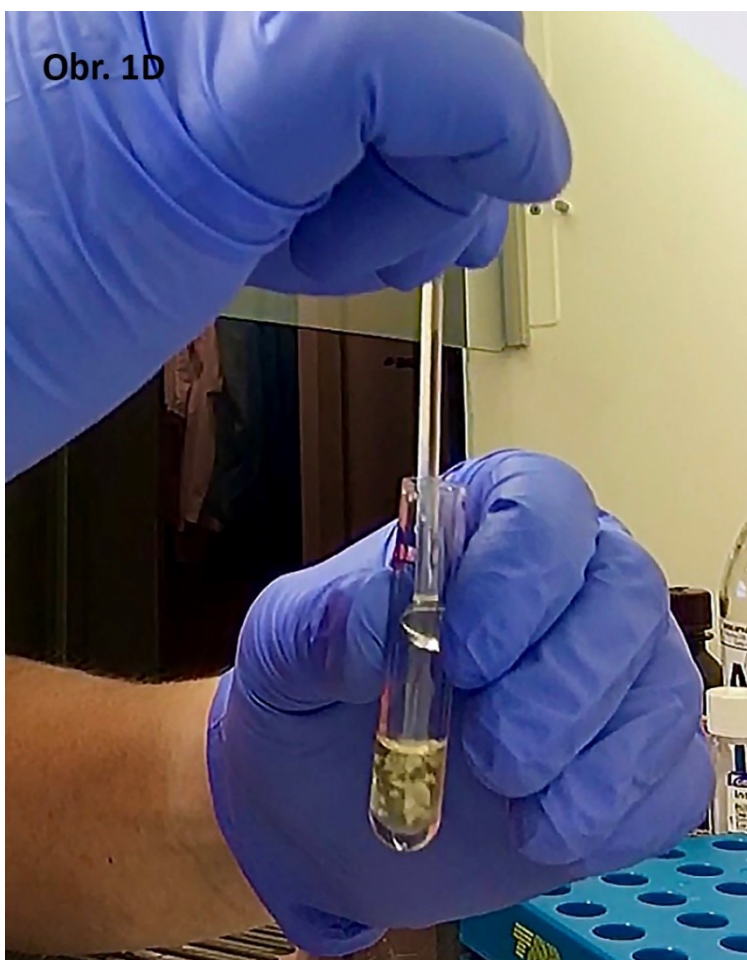
otevřeli jak dřeňovou dutinu, tak kořenové kanálky, a opět oddělili zubní dřeň od vnitřní stěny korunky a kořene zubu sterilní sondou a vyjmuli mikrochirurgickou pinzetou (obr. 1A, 1B).

3.3 Enzymatická izolace kmenových buněk zubní dřeň

Pomocí sterilních nůžek jsme zubní dřeň rozstříhali na malé fragmenty o objemu cca 1 mm³ (obr. 1C). Následně jsme takto upravenou zubní dřeň vložili do tkáňového minihomogenizátoru (Radnoti, Covina, CA) s 1 ml izotonického fosfátového pufovačního roztoku (PBS; Invitrogen) k získání homogenních fragmentů metodou homogenizace (obr. 1D).







Obr. 1D

Obr. 1 Izolace KBZD. A Separace korunky od kořene zuby. B Izolovaná zubní dřeň. C Nastříhání tkáně zubní dřeně. D Použití minihomogenizátoru.

Pro zahájení enzymatického štěpení homogenních fragmentů zubní dřeně jsme směs přelili do zkumavky a přidali 1 ml 0,05% trypsinu (0,02 mM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA). Komerčně dodávaný roztok dále obsahuje 0,48 mM ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), 0,35 mM fenolové červeně pro identifikaci acidobazické rovnováhy, 5,33 mM chloridu draselného, 37,93 mM chloridu sodného, 0,44 mM fosforečnanu draselného, 0,34 mM fosforečnanu sodného, 4,17 mM bikarbonátu sodného a 0,03 mM dextrózy (D-glukózu). Zkumavku jsme následně uložili do termální vodní lázně o teplotě 37 °C. Po uplynutí 10 minut jsme působení enzymu inhibovali přidáním 3 ml inaktivačního média, složeného z minimálního esenciálního média v α modifikaci (α -MEM), (Gibco) a fetálního bovinního séra (FBS, PAA Laboratories, Dartmouth, MA) v koncentraci 20 % (obr. 2A). Následnou centrifugací suspenze buněk při 2000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut (600 g) jsme získali buněčnou peletu složenou z uvolněných buněk různého původu, zbytky cév a extracelulární matrix (obr. 2B).



Obr. 2A Enzymatická izolace KBZD. 2B Peleta buněk, extracelulárních tkání, cév po centrifugaci (označena šipkou).

Po odsátí supernatantu jsme peletu resuspendovali do kultivační nádoby o ploše 22,5 cm² (Sarstedt, Newton, NC). Izolovanou směs různorodých buněk, extracelulární matrix a cév jsme kultivovali v modifikovaném médiu pro postnatální progenitorové mezenchymální buňky (Eaglovo minimální esenciální médium v Alpha modifikaci; α -MEM) obohacené o 2 % FBS, růstové faktory - 10 ng/ml epidermální růstový faktor (EGF, „*epidermal growth factor*“; PeproTech, London, UK), 10 ng/ml růstový faktor izolovaný z trombocytů (PDGF, „*platelet-derived growth factor*“; PeproTech); dále o 0,2 mM L-askorbové kyseliny (Bieffe Medital) pro ochranu proti kyslíkových radikálům, o esenciální aminokyselinu glutamin (Invitrogen) s finální koncentrací 2 %, o 50 mM dexametazonu (Bieffe Medital), o antibiotika a antimykotika - 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 20 μ g/ml gentamicinu, 10 μ l/ml amfotericinu B. Dle výsledků naší předchozí studie bylo dále kultivační médium obohacené o 10 μ l/ml Insulin-Transferrin-Sodium-Selenium supplement (ITS; Sigma-Aldrich) pro usnadnění utilizace nutrientů (105). Kultivační nádoby s izolovanými KB byly inkubovány

při teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO₂. Médium bylo měněno každé tři dny a po dosažení 70% konfluence byly buňky pasážovány v koncentraci 5000 buněk/cm². Kultivace byla vždy ukončena při dosažení 8. pasáže.

3.4 Charakterizace KBZD

Celkový počet buněk a medián jejich velikosti byly změřeny v každé pasáži pomocí přístroje Z2-Counter (firma Beckman Coulter, Miami, FL). Proliferační aktivitu jsme analyzovali pomocí počtu populačních dvojení (anglický termín „*population doubling*“, PD) a času potřebného pro zdvojení populace (anglický termín „*population doubling time*“, DT). Pro výpočet kumulativních populačních zdvojení v každé pasáži jsme použili vzorec $PD = \log_2(N_x/N_1)$, kde N_x je celkový počet získaných buněk při pasážování vypočítaný pomocí Z2-Counter a N_1 je iniciační počet buněk při nasazení do kultivační misky (5000 buněk/cm²). Pro výpočet času potřebného pro zdvojení počtu populace jsme použili vzorec $DT = t/n$, kde t je počet hodin kultivace v rámci jedné pasáže a n je počet PD v dané pasáži, vypočítaný podle popisu výše. Viabilitu buněk jsme detekovali na základě obarvení nevitálních buněk trypanovou modří pomocí analyzátoru Vi-Cell (Beckman Coulter) v 2. a 8. pasáži. Porovnává se vždy 50 obrázků zachycujících jak neviabilní, tak viabilní buňky v zorném poli. Procento viabilních buněk bylo následně spočítáno poměrem neviabilních (označené trypanovou modří) ku viabilním buňkám. Fenotyp izolovaných buněk jsme analyzovali pomocí průtokové cytometrie pomocí Cell Lab Quanta (Beckman Coulter) v 3. a 7. pasáži. Buňky byly obarveny imunofluorescenčními polyvalentními protilátkami konjugovanými s fluorescein izothiokyanátem (FITC) a konjugovanými s fykoerytrinem (PE) proti povrchovým CD znakům. Při fenotypové analýze jsme použili metodu dvojího značení, tzn. že do jedné z 96 jamek jsme pipetovali 10⁵ buněk v celkovém objemu 200 ml PBS a dvě protilátky konjugované s odlišnými fluorochromy. Celý 96-jamkový panel byl inkubován ve tmě po dobu 30 minut při teplotě 24 °C. Analyzovali jsme tyto znaky (viz. příloha – Analýza fenotypu): **CD10** (CB-CALLA, eBioscience, Waltham, MA), **CD13** (WM-15, eBioscience), **CD18** (7E4, Beckman Coulter), **CD29** (TS2/16, BioLegend, San Diego, CA), **CD31** (MBC 78.2, Invitrogen), **CD34** (581 (Class III), Invitrogen), **CD44** (MEM 85, Invitrogen), **CD45** (HI30, Invitrogen), **CD49f** (GoH3, Invitrogen), **CD63** (CLBGran/12, Beckman Coulter), **CD73** (AD2, BD Biosciences Pharmingen, Erembodegen, Belgie), **CD90** (F15-42-1-5, Beckman Coulter), **CD105** (SN6, Invitrogen), **CD106** (STA, BioLegend, USA), **CD117** (2B8, Chemicon, Tokio, Japonsko), **CD146** (TEA1/34,

Beckman Coulter), **CD166** (3A6, Beckman Coulter), **CD271** (ME20.4, BioLegend), **HLA I** (Tu149, Invitrogen), **HLA II** (Tü36, Invitrogen), **antiCXCR4** (12G5, Invitrogen) a **STRO1** (STRO-1, BioLegend). Všechny vzorky byly měřeny spolu s negativními kontrolami konjugovanými s FITC a PE (izotyp IgG1, IgG2a, IgG2b) a autofluorescencí. Procento pozitivních buněk bylo stanoveno jako procento s fluorescenční intenzitou vyšší než 99,5 % negativní izotypové imunoglobulinové kontroly. Vyjádření CD znaků jsme hodnotili podle klasifikačních kritérií: <10 % - nevyjádřeno, 11 – 40 % - nízká exprese, 41 – 70 % - střední exprese, >71 % - vysoká exprese znaku (106).

3.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Pro kvantitativní PCR analýzu (qPCR) jsme využili DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Protokol pro analýzu byl shodný s protokolem použitým v předchozí studii (107). Kvantitativní analýzu qPCR pro měření délky telomer, resp. relativní aktivity telomerázy jsme prováděli v 2. a 7. pasáži. Každé měření jsme prováděli ze zamrazených suchých pelet. Nejdříve byly vzorky rozmrazeny na pokojovou teplotu. Po zahřátí jsme suchou peletu resuspendovali v 200 μ l PBS a přidali 20 μ l proteinázy K. Dále jsme přidali 200 μ l AL pufru („lysis“ pufr; Qiagen, Hilden, Německo). AL pufr obsahuje pufrovací soli (např. Tris-HCl) a iontové soli (např. NaCl) pro regulaci pH a osmolarity lyzátu. Směs jsme důkladně promíchali na třepačce. Následně jsme přidali 200 μ l ethanolu (96–100 %) a opět promíchali na třepačce. Poté jsme směs přenesli do DNeasy mini spin zkumavek a ty i s obsahem vložili do 2 ml sběrných zkumavek. Zkumavky jsme centrifugovali při 8000 otáčkách za minutu (\geq 6000 g) po dobu 1 minuty. Po odsátí supernatantu a přidání 500 μ l AW1 pufru (s nízkou koncentrací guanidinu; Qiagen) jsme směs centrifugovali při 8000 otáčkách za minutu (\geq 6000 g) po dobu 1 minuty. Nakonec jsme ještě jeden krok centrifugace zopakovali, ale s použitím 500 μ l AW2 pufru (na bázi tres(hydroxymethyl)aminomethanu; Qiagen) při 20 000 otáčkách za minutu (\geq 14 000 g) po dobu 3 minut. Pro vyluhování DNA jsme do centra membrány spin zkumavky přidaly 200 μ l AE pufru (Qiagen). AE pufr se skládá z 10 mM Tris-HCl a 0.5 mM EDTA a má pH 9,0. Přidáním tohoto pufru došlo k vyluhování DNA skrz křemičito-gelovou membránu do sběrné zkumavky. Vyluhování probíhá při teplotě 15 – 25 °C po dobu 1 minuty. Nakonec se zkumavka opět centrifuguje po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu. Krok je možné zopakovat pro vyšší výtěžnost DNA. Koncentrace DNA v každém vzorku byla analyzována pomocí přístroje Nanodrop 1000 (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Pro analýzu relativní délky telomer jsme počítali s rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (kde $\Delta Ct = Ct_{telomery} - Ct_{\text{„single copy“ gen}}$). 36B4, je kódující acidický ribozomální fosfoprotein, který je často používán jako interní standard pro analýzu. V naší studii byl použit jako „single copy“ gen („housekeeping“ gen). qPCR měření relativní délky telomer a 36B4 bylo vždy prováděno na samostatných 96jamkových destičkách, přičemž každý vzorek byl měřen v triplikaci ve stejné pozici jamek na detekčním systému ABI 7500 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Každá 20 μ l reakce se sestávala z 20 ng DNA, 1 \times SYBR Green master mixu (Applied Biosystems) a 200 nM dopředného primeru telomery (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), 200 nM reverzní primeru telomery (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT). Pro 36B4 genovou qPCR byly použity následující páry primerů: 36B4u, CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC; 36B4d, CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A. Pro standardizaci kvanta DNA byl jeden referenční vzorek zředěn do výsledné koncentrace (0,02, 0,2, and 2,0 ng/ μ l) v každé 96-jamkové desce. Cyklování pro qPCR jak telomer, tak 36B4 produktů bylo nejdříve po dobu 10 minut při 95 °C, následovalo 45 cyklů při 95 °C po dobu 15 sekund a 60 °C po dobu 1 minuty. Po amplifikaci byla zhotovena disociační křivka pro potvrzení specifity měření. Jak standardní, tak disociační křivka, byla vygenerována za použití ABI Prism 7500 SDS softwaru. Výsledky analýzy jsme statisticky zpracovali Wilcoxonovým párovým testem s pomocí softwaru GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA), kdy jako statisticky významné jsme stanovili $p < 0,05$.

3.6 Diferenční potenciál KBZD

K ověření skutečnosti, zda jsou KBZD schopné diferencovat ve zralé buněčné typy (osteoblasty chondroblasty, adipocyty), jsme použili komerčně dodávaná média a standardní diferenční protokoly. Diferenciace probíhala ve formě monolayeru (buňky zachycené na dně kultivační nádoby) i ve formě trojrozměrné pelety.

Jako chondrodiferenční médium bylo využito Differentiation Basal Medium-Chondrogenic (Lonza, Basilej, Švýcarsko) obohacené o 50 ng/ml TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), přidané do kultivační nádoby po dosažení 70 – 100% konfluency v buněčné kultuře, vyměňované každé 3 dny po dobu 3 týdnů. Po uplynutí této doby byly buňky v kultivační nádobě fixovány pomocí 10% formalínu. Následně byly buňky odděleny ode dna kultivační nádoby pomocí cell-scraperu a přefiltrovány přes filtrační papír. Stejný

krok byl zopakován ještě po přidání 5 ml PBS do kultivační nádoby tak, aby byla dosažena co největší výtěžnost. Materiál s filtračním papírem jsme vložili do kapsle a zpracovali v autotechnikonu (Leica, Wetzlar, Německo), kde došlo k odvodnění za pomoci ethanolu, acetonu a xylolu. Po vyjmutí z autotechnikonu byl materiál uvolněn od filtračního papíru a zalit do parafínového bloku. Ten byl nakrájen na 7 μ m silné řezy. Pro průkaz chondrogenní extracelulární matrix jsme využili imunohistochemické i histologické barvení. Pro imunohistochemii byl ze vzorků odstraněn parafín pomocí zahřátí v citrátovém pufru (Penta, Praha, Česká republika). Poté byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou. Pro permeabilizaci buněčných membrán, která pomáhá navázání imunoprotilátek na již fixované buňky, jsme použili 0,5 % roztok Tritonu (Sigma-Aldrich) (250 ml Triton a 500 ml PBS) po dobu 10 minut. Po trojnásobném oplachu pomocí PBS po dobu 5 minut byly vzorky blokovány fosfátový pufráním roztokem s kozím sérem v koncentraci 1:20 (Jackson ImmunoResearch Labs, Cambridgeshire, UK) a inkubovány při 4 °C po dobu 60 minut s myší IgM primární protilátkou (1:500, Sigma-Aldrich) proti kolagenu typu II. Po opětovném trojnásobném oplachu pomocí PBS po dobu 5 minut se vzorky s navázanou primární protilátkou inkubovaly s kozí IgM anti-myší sekundární protilátkou konjugovanou s Cy3TM (1 : 600, Jackson ImmunoResearch Labs) při pokojové teplotě po dobu 45 minut. Následně byly vzorky opět třikrát opláchnuty pomocí PBS. Pro vizualizaci jader buněk byly vzorky dobarveny fluorescenčním barvivem 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI, Sigma-Aldrich) po dobu 5 minut a opláchnuty destilovanou vodou. Buňky s vyprodukovanou extracelulární hmotou byly poté pozorovány fluorescenčním mikroskopem BX51 Olympu (Tokyo) s digitální kamerou. Získané fotografie bylo nutné navzájem překrýt použitím Adobe® Photoshopu CC 2019, aby byla patrná ložiska jak s kolagenem typu II v extracelulární matrix, fluoreskující červeně, tak lokalizace jader buněk, fluoreskující modře. Negativní kontroly byly provedeny s každým vzorkem spolu se vzorkem bez primární protilátky. Dále jsme také pro průkaz přítomnosti kolagenu a prokolagenu ve vyprodukované matrix využili standardní histologické barvení modrým Massonovým trichromem.

Pro indukci osteodiferenciace jsme buněčné kultury po dosažení 70 – 100 % konfluency přelili médiem Differentiation Basal Medium-Osteogenic (Lonza). Médium jsme pravidelně měnili dvakrát týdně po dobu 21 dní. Po 3 týdnech byly buněčné kultury opět fixovány 10% formalínem, zality do parafínového bloku a nařezány na 7 μ m řezy. Pro ověření, zda buňky diferenciovaly a začaly produkovat osteogenní extracelulární matrix jsme vzorky barvily

využitím imunohistochemického a histologického barvení. Přítomnost kolagenu a prokolagenu v extracelulární matrix jsme potvrdili standardním histologickým barvením modrým Massonovým trichromem (kolagen a prokolagen zobrazen modře). Dále jsme ověřovali přítomnost kalcium fosfátových depozit s použitím von Kossova barvení. Kalcium fosfátová ložiska jsou patrná jako tmavě hnědá až černá, jádra buněk se poté barví červeně. Imunohistochemicky jsme prokazovali přítomnost osteokalcinu, primárního proteinu osteogenní matrix. Parafínové řezy musely být znovu deparafínovány pro zahájení imunohistochemické reakce. Deparafínované řezy byly permeabilizovány využitím 0,5% roztoku Tritonu (Triton (250 ml Triton (Sigma-Aldrich) and 500 ml PBS)) po dobu 10 minut. Opláchnuty destilovanou vodou. Vzorky jsme následně opět třikrát opláchli PBS po dobu 5 minut. Posléze byly buňky blokovány fosfátový pufráčným roztokem s oslím sérem v koncentraci 1:20 (Jackson ImmunoResearch Labs) po dobu 20 minut. Nato jsme vzorky inkubovali při 4 °C po dobu 60 minut s IgG myší primární protilátkou (1:50, Millipore, Kankakee, IL, USA) namířenou proti osteokalcinu. Po oplachu, byly vzorky s primární protilátkou inkubovány při pokojové teplotě po dobu 45 minut se sekundární oslí IgG anti-myší protilátkou (1:500, Jackson ImmunoResearch Labs). Po opětovném oplachu, byly vzorky inkubovány s avidin-peroxidázou (1:300, Dako, Glostrup, Německo). Po těchto reakcích byly řezy opět třikrát opláchnuty použitím PBS a obarveny 3,3'-diaminobenzidinem (DAB, Sigma-Aldrich). Oxidovaný DAB ve vzorku formuje hnědé precipitáty v místě peroxidázy. Na konci tohoto protokolu byly vzorky omyty destilovanou vodou a dobarveny modrou skalicí (Penta) po dobu 5 minut a hematoxylinem (Sigma-Aldrich) po dobu 5 sekund. Nakonec byly řezy opět pozorovány s použitím mikroskopu BX51 Olympus s digitální kamerou. Negativní kontroly byly provedeny s každým vzorkem spolu se vzorkem bez primární protilátky.

Pro diferenciaci v adipocyty jsme KBZD nechali dorůst do 100% konfluency, poté nádobu s buňkami přelili médiem hMSC Adipogenic Induction SingleQuots (Lonza) a ponechali takto 3 dny. Po této době jsme médium vyměnili za hMSC Adipogenic Maintenance SingleQuots (Lonza, USA) na další 3 dny. Tento postup jsme opakovali celkem třikrát. Na poslední týden diferenciaci jsme kulturační nádobu přelivali pouze druhým uvedeným médiem, které jsme dle návodu výrobce jedenkrát vyměnili. Po uplynutí stanované doby jsme odsáli médium z kulturační nádoby a přichycené buňky na dně nádoby jsme opláchnuli pomocí PBS. Diferencované KBZD jsme následně fixovali 10% formalínem přímo v kulturační nádobě po

dobu 15 minut. Fixované buněčné kultury jsme opláchli pomocí pufru a do nádoby přidali 3,3 ml olejové červeně pro průkaz tukových vakuol v diferencovaných buňkách. Tukové vakuoly se po tomto kroku barví červeně. Po 30 - 60 minutách a oplachu destilovanou vodou jsme barevné změny ihned pozorovali pod mikroskopem.

3.7 Neřízená kryokonzervace KBZD

Z první pasáže byly uchovány vždy dvě kryozkumavky o celkovém objemu 2 ml obsahující $1,5 \times 10^6$ KBZD v 0,5 ml kultivačního média. Pro dosažení stanoveného počtu byly buňky vždy nejdříve spočítány pomocí Z2-Counteru (firma Beckman Coulter). Kryozkumavky byly zamrazeny metodou neřízené kryokonzervace. To znamená, že nejdříve byly KBZD ponořeny do 0,5 ml již zchlazeného kryokonzervačního media na teplotu 4 °C, obsahující fetální bovinní sérum a dimethylsulfoxid jako kryoprotektivum. Po smíchání s médiem s buňkami byla výsledná koncentrace DMSO 10 % a koncentrace FBS byla 40 %. Následně byly kryozkumavky zchlazeny nejdříve na teplotu – 20 °C. Při této teplotě byly skladovány po dobu 1 - 2 hodin a poté byly vloženy do mrazících boxů, kde byly uchovávány při konečné teplotě - 80 °C. Při této teplotě byly buňky dlouhodobě skladovány po dobu 6 a 12 měsíců. Po uplynutí 6 měsíců byla jedna kryozkumavka z každé linie KBZD rozmrazena v 37 °C teplé termální lázni. Pro inaktivaci kryokonzervačního média, a tím použitého kryoprotektiva, byly buňky po rozmrazení smíchány s 2 ml inaktivačního média, složeného z α -MEM a FBS v koncentraci 20 %. Zkumavku jsme cetrifugovali při 2000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut (600 g). Získaná peleta byla nejdříve resuspendována a poté nasazena do nové kultivační nádoby. Následně jsme pokračovali ve stanoveném protokolu jako u nezamrazených KBZD (kontrolní skupina). Stejně jsme postupovali i po uplynutí 12 měsíců s druhou kryozkumavkou.

3.8 Statistické zpracování

Výsledky byly statisticky zpracovány s použitím párového t-testu a v případě zamítnuté normality neparametrickým Wilcoxonovým testem. Korelace relativní délky telomer s DT a s PD byla hodnocena pomocí Pearsonova korelačního testu. Hladina významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Díky faktu, že se porovnávala vždy kontrolní skupina nezamrazených KBZD se zmrazenými skupinami KBZD po dobu 6 a 12 měsíců, bylo statisticky správné využít Bonferroniho modifikaci hladiny významnosti. Tím bylo sníženo riziko chyby 1. druhu, a to i za cenu navýšení rizika chyby 2. druhu díky malé velikosti souboru. Bonferroniho modifikace

spočívá v tom, že při porovnávání na hladině 0,05 nastavíme hladinu významnosti ve výpočtech na $p=0,05/k$, kde k je počet srovnání (v této dizertační práci je tedy k rovno 2). Vypočtené hladiny významnosti jsme porovnávali s modifikovanými hladinami. Pro hladinu $p<0,05$ je modifikovaná hladina 0,025.

4. Výsledky

4.1 Izolace KBZD

Pro tuto práci jsme extrahovali celkem deset stálých zubů s různým stupněm vývoje kořene od pacientů, resp. dárců ve věku od 13 do 18 let. Získali jsme celkem čtyři retinované či semiretinované třetí moláry (od žen ve věku 15, 16 a 18 let), jeden semiretinovaný druhý molár (od ženy ve věku 16 let), tři první premoláry (od ženy ve věku 14 let a dva premoláry od muže ve věku 13 let), jeden přespočetný premolár (od ženy ve věku 16 let) a také jeden nadpočetný zub ve střední čáře, tzv. meziodent (od ženy ve věku 14 let). Z větší části se jednalo o celkově zdravé jedince, pouze ve dvou případech se jednalo o zdravotně kompromitované pacienty. Jedním byl 13letý pacient s Aspergerovým syndromem a druhým 16letá pacientka s mitrální chlopenní vadou.

Linie	Dárce/pacient	Věk	Zub	Vývoj kořene	Poloha prořezání
KBZD01	žena	14	meziodent	do 1/2	retinovaný
KBZD02	žena	16	M2	více 1/2	retinovaný
KBZD03	žena	16	M3	do 1/2	retinovaný
KBZD04	žena	14	P1	plně vyvinutý	prořezaný
KBZD05	žena	15	M3	do 1/2	retinovaný
KBZD06	žena	15	M3	do 1/2	retinovaný
KBZD07	žena	18	M3	více než 1/2	semiretinovaný
KBZD08	muž	13	P1	více než 1/2	retinovaný
KBZD09	muž	13	P1	více než 1/2	retinovaný
KBZD10	žena	16	nadpočetný P	více než 1/2	retinovaný

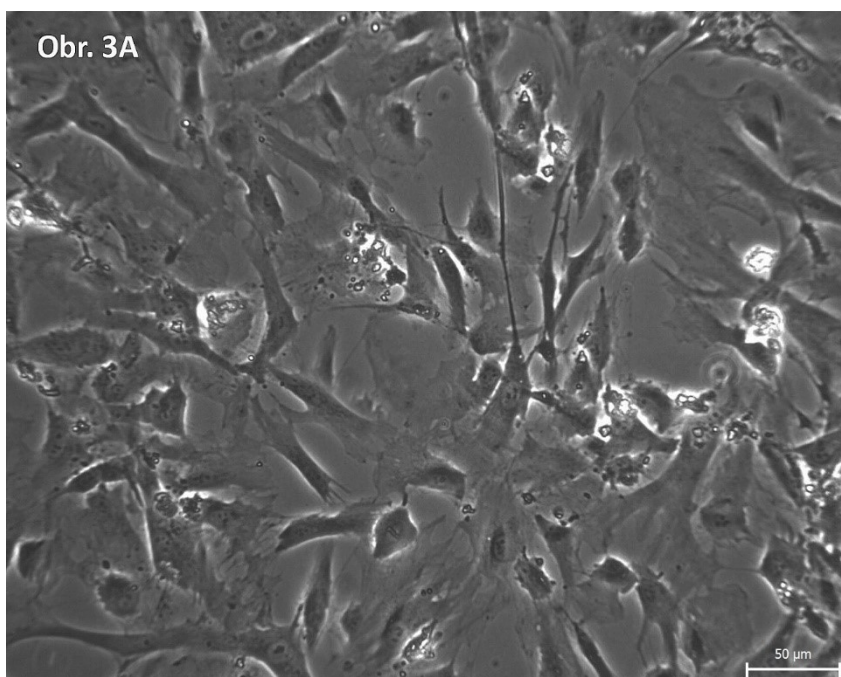
Tab. 1 Přehled pacientů/dárců a extrahovaných zubů (M – molár, P – premolár).

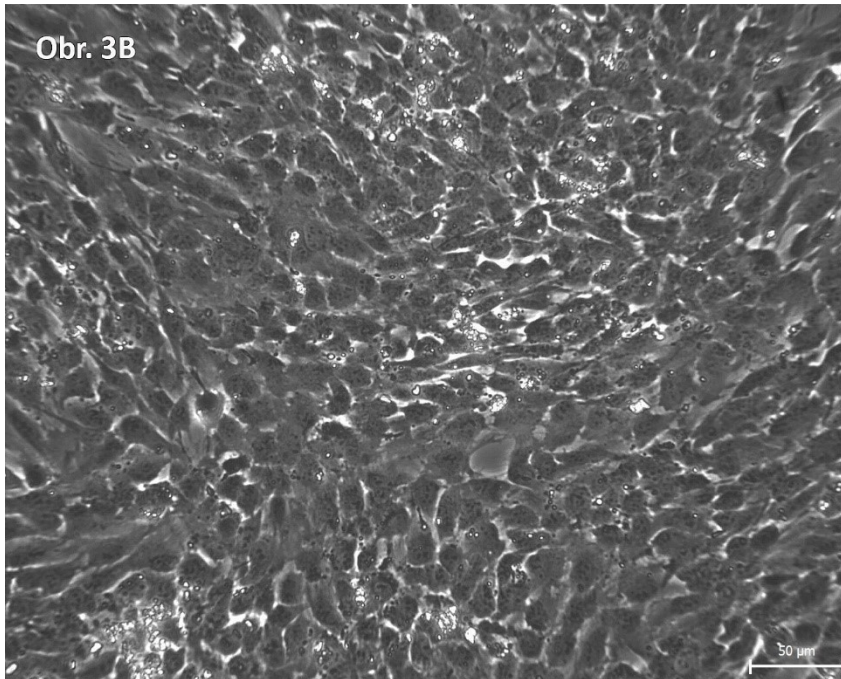
Pacienti/dárci byli zařazeni do studie po podepsání informovaného písemného souhlasu. V případě nezletilých pacientů informovaný souhlas podepisoval jejich zákonný zástupce. Pro názornost buňky rozmrazené po 6 měsících jsme označili písmenem A a buňky rozmrazené po 12 měsících jsme označili písmenem B v názvu.

4.2 Charakterizace KBZD

Úspěšně jsme izolovali celkem deset stabilních linií KBZD. Za 48 - 72 hodin po nasazení suspenze buněk získaných z enzymatického štěpení jsme v primokultuře pozorovali pod mikroskopem s fázovým kontrastem první KBZD, popřípadě malé kolonie po 2 - 5 buňkách. V této době jsme kultivační médium pouze přidali. Jeho výměna následovala po 7 dnech kultivace, čímž jsme odstranili i zbytky tkání, případně zbytky ostatních buněk, které na rozdíl od KBZD neadherují ke dnu kultivační nádoby. Primokulturu jsme nechali narůst až do 70% konfluence, poté byla pasážována.

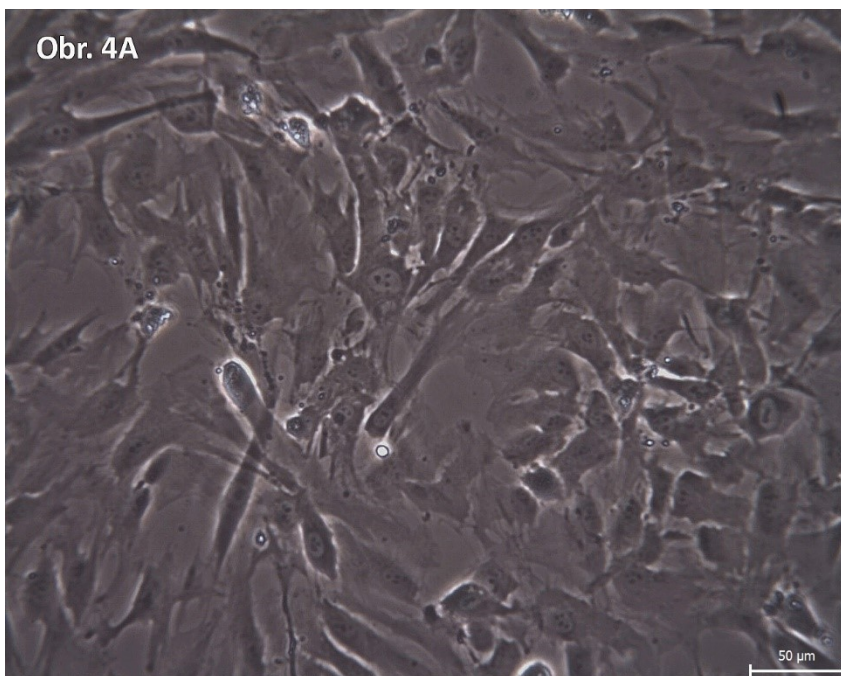
Tvar KBZD byl jednak vřetenovitý s dlouhými výběžky a rozvinutým cytoskeletem, ale pozorovali jsme také linii KBZD, v níž převládal tvar více okrouhlý, s menším počtem výběžků (obr. 3A, B).

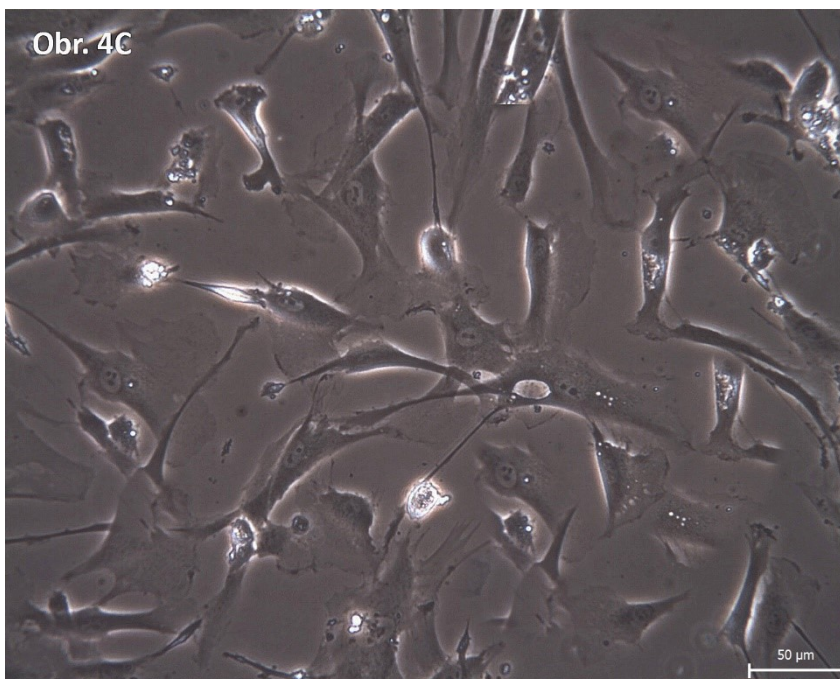
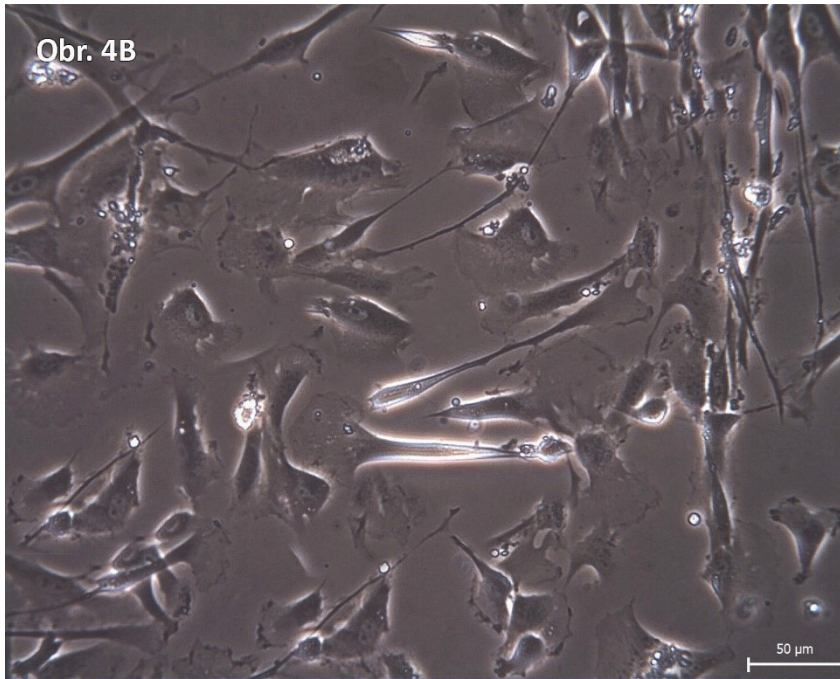




Obr. 3 Tvar KBZD v 1. pasáži, mikroskop s fázovým kontrastem. A Vřetenovitý tvar KBZD s četnými výběžky (linie KBZD02). B Okrouhlý tvar KBZD (linie KBZD04).

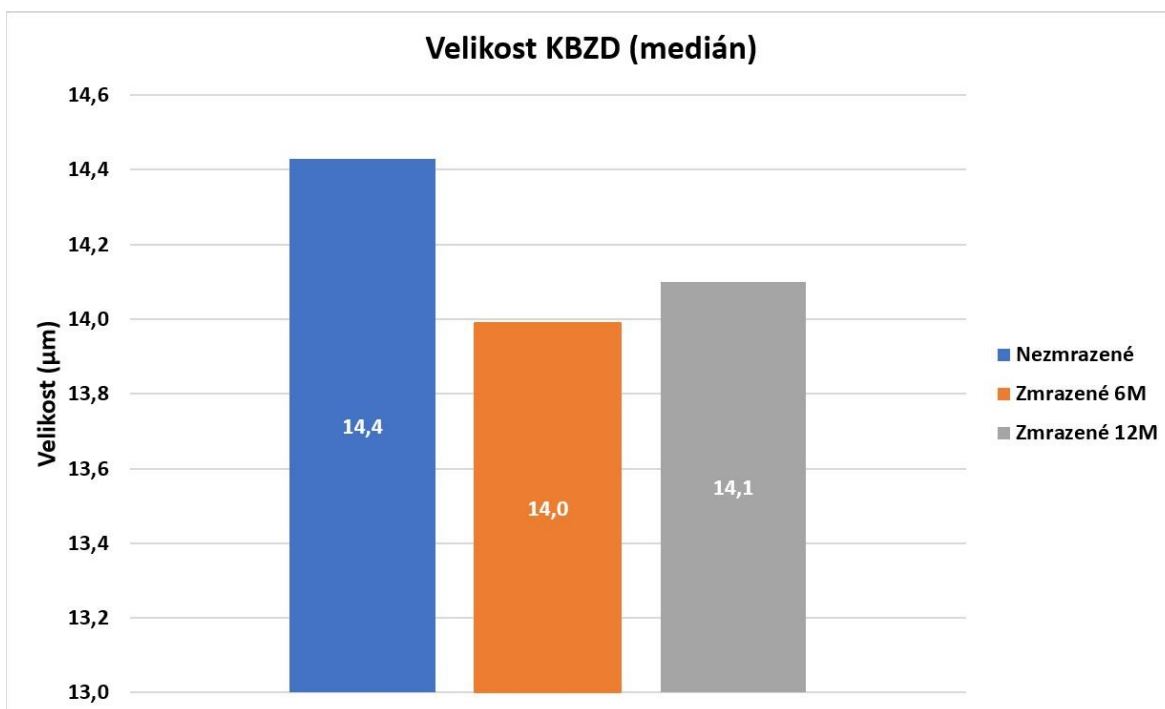
U kryokonzervovaných KBZD po dobu šesti a dvanácti měsíců jsme nepozorovali změnu tvaru buněk po celou dobu kultivace. Dominantním tvarem byl vřetenovitý tvar s četnými cytoplazmatickými výběžky a rozvinutým cytoskeletem (obr. 4A - C).





Obr. 4 Tvar KBZD v 3. pasáži, mikroskop s fázovým kontrastem. A Linie nezmrazených KBZD (linie KBZD02). B Linie zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců (linie KBZD02A). C Linie zmrazených KBZD po dobu 12 měsíců (linie KBZD02B).

Medián velikosti ze všech osmi pasáží nezmrazených kmenových buněk činil 14,4 μm . U KBZD zmrazených po dobu 6 měsíců byl 14,0 μm a u KBZD zmrazených po dobu 12 měsíců 14,1 μm (graf 1). Podrobný přehled mediánů velikostí jednotlivých linií znázorňuje tabulka 2.



Graf 1 Přehled mediánů velikostí KBZD v μm

Podrobný přehled mediánů velikostí jednotlivých linií znázorňuje tabulka 2.

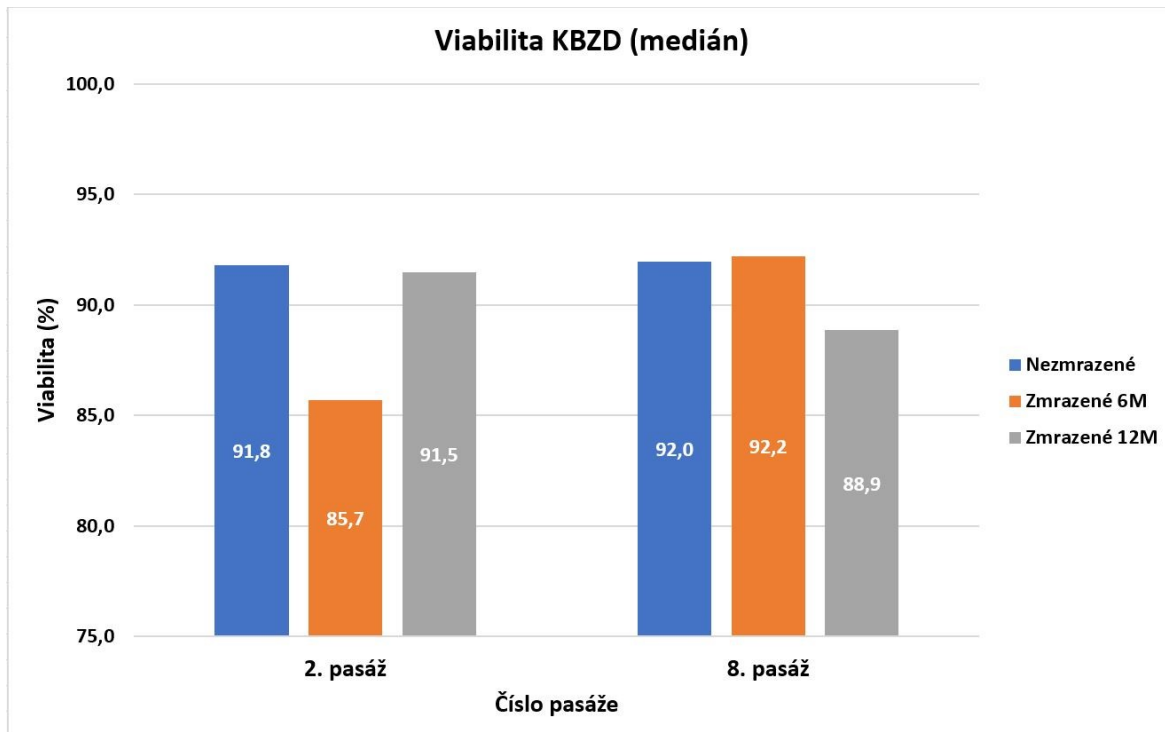
Linie	Velikost	Linie	Velikost	Linie	Velikost
KBZD01	14,5	KBZD01A	13,1	KBZD01B	13,9
KBZD02	12,7	KBZD02A	11,1	KBZD02B	10,8
KBZD03	13,1	KBZD03A	13,4	KBZD03B	10,1
KBZD04	14,4	KBZD04A	13,6	KBZD04B	14,9
KBZD05	13,9	KBZD05A	12,5	KBZD05B	11,0
KBZD06	15,1	KBZD06A	14,6	KBZD06B	14,9
KBZD07	15,2	KBZD07A	14,3	KBZD07B	14,3
KBZD08	15,8	KBZD08A	14,9	KBZD08B	12,0
KBZD09	15,7	KBZD09A	15,3	KBZD09B	15,2
KBZD10	14,3	KBZD10A	15,0	KBZD10B	15,3

Tab. 2 Přehled mediánů velikostí KBZD v μm. A – KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců; B – KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců

Při statistickém zpracování s použitím párového t-testu nebyl rozdíl mezi hodnotami velikosti nezmrazených KBZD a kryokonzervovaných KBZD po dobu 6 a 12 měsíců významný (pro KBZD kryokonzervovaných po dobu 6 měsíců $p=0,221$; pro KBZD

kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců $p=0,120$). Pozorovali jsme však zmenšení KBZD po kryokonzervaci.

Viabilita buněk byla zjišťována na základě obarvení neživých buněk trypanovou modří v 2. a 8. pasáži pomocí přístroje Vi-cell. U nezmrazené skupiny buněk byl medián naměřené viability 91,8 % v 2. pasáži a 92,0 % v 8. pasáži. U buněk zmrazených neřízenou kryokonzervací a rozmrazených po 6 měsících byl medián viability ihned po rozmrazení v 2. pasáži nižší 85,7 %. Toto snížení počtu viabilních KBZD ihned po rozmrazení bylo statisticky významné ($p=0,005$) i podle Bonferroniho modifikace hladiny významnosti. Procento viabilních buněk v 8. pasáži bylo opět přes 90 %, kdy medián činil 92,2 %. Tato hodnota se již významně nelišila od hodnoty kontrolní skupiny v 8. pasáži ($p=0,708$). U KBZD zamrazených po dobu 12 měsíců byla situace odlišná. Medián hodnot viability v 2. pasáži byl vyšší, a to 91,5 %, ale ke konci kultivace v 8. pasáži vypočítaná hodnota mediánu viabilních buněk klesla na 88,9 %. Ani jedna z hodnot se statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny ($p=0,469$ v případě 2. pasáže a $p=0,073$ v případě 8. pasáže) (Graf 2). Přehled změřených hodnot viabilních KBZD jednotlivých linií z 2. a 8. pasáže popisuje tabulka č. 3.



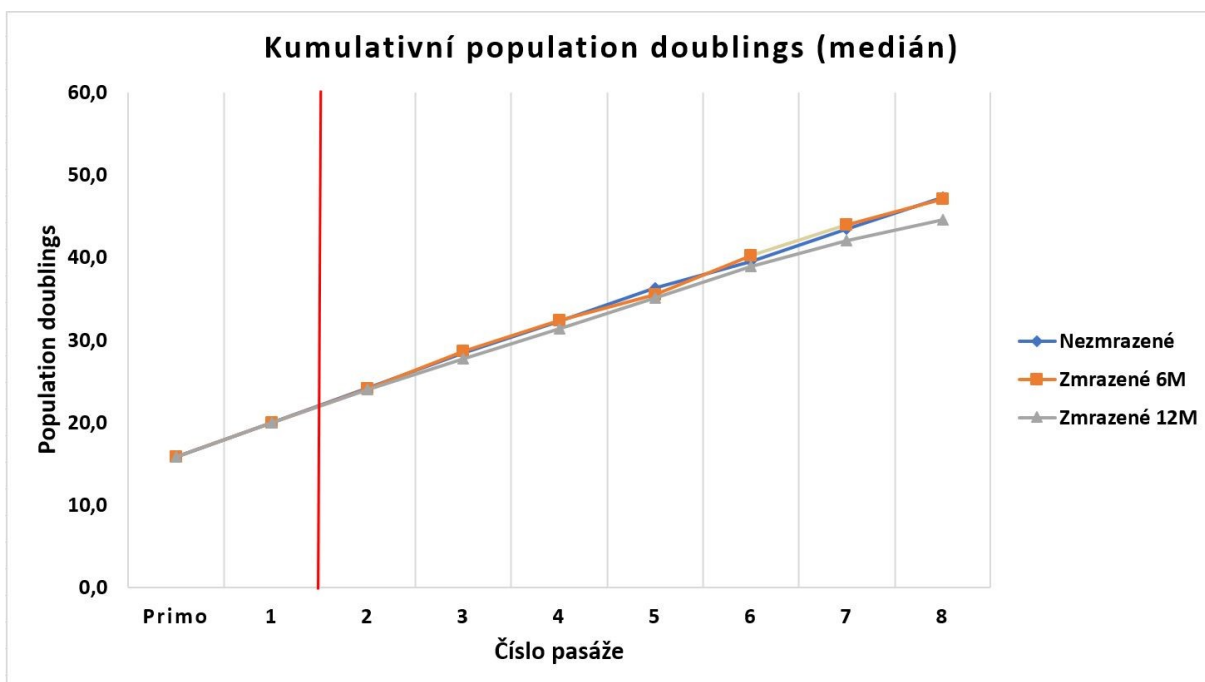
Graf 2 Medián viability KBZD v %

Přehled hodnot viabilních KBZD jednotlivých linií z 2. a 8 pasáže popisuje tabulka č. 3.

Linie	2p	8p	Linie	2p	8p	Linie	2p	8p
KBZD01	91,3	94,7	KBZD01A	84,2	91,8	KBZD01B	95,3	89,0
KBZD02	94,8	93,3	KBZD02A	82,1	92,6	KBZD02B	91,6	88,7
KBZD03	90,7	91,8	KBZD03A	85,4	90,8	KBZD03B	86,6	77,5
KBZD04	90,2	93,5	KBZD04A	83,7	91,4	KBZD04B	90,0	85,0
KBZD05	90,2	91,5	KBZD05A	86,0	88,4	KBZD05B	93,6	80,2
KBZD06	95,6	97,7	KBZD06A	88,2	91,5	KBZD06B	96,7	97,2
KBZD07	92,8	90,7	KBZD07A	90,9	94,1	KBZD07B	95,1	96,4
KBZD08	92,5	91,4	KBZD08A	87,4	96,7	KBZD08B	82,5	87,3
KBZD09	90,5	92,1	KBZD09A	83,7	96,7	KBZD09B	88,1	90,3
KBZD10	92,3	90,2	KBZD10A	97,2	98,5	KBZD10B	91,4	94,5

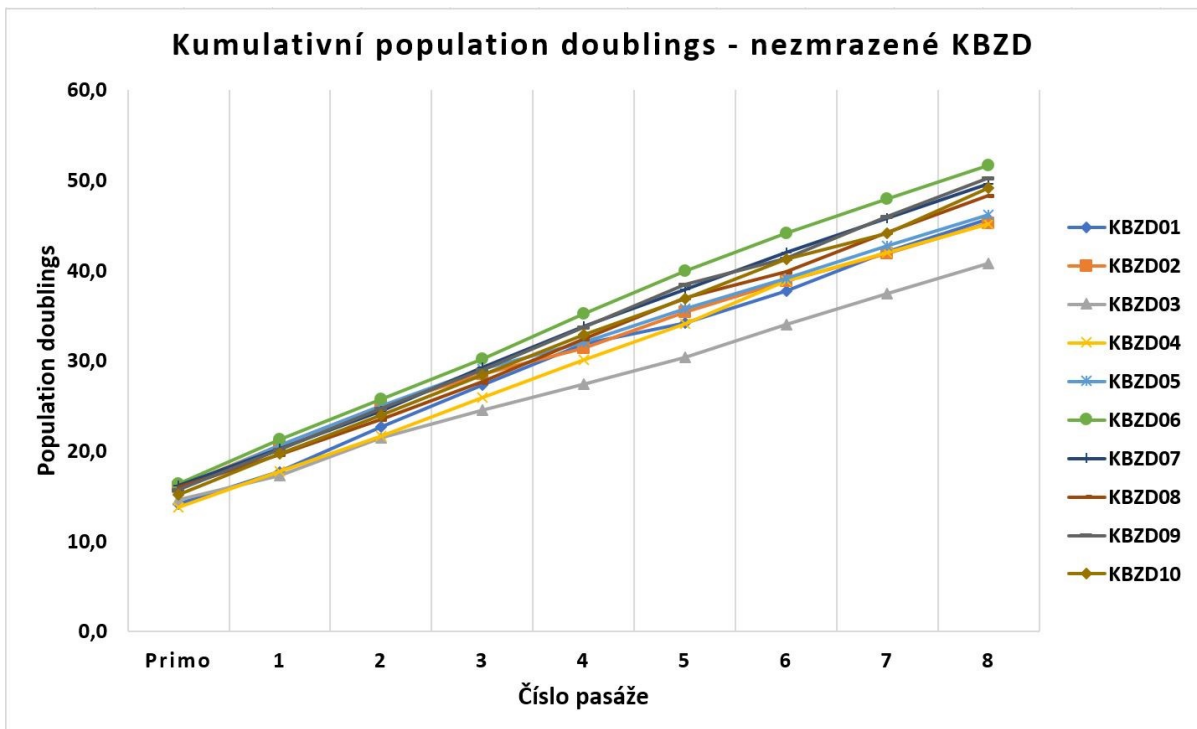
Tab. 3 Přehled viability KBZD v % v 2. (2p) a 8. (8p) pasáži (A – KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců; B – KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců)

Medián dosažených populačních zdvojení u jednotlivých linií nezmrazených KBZD činil 47,3 populačních zdvojení od 0. pasáže (primokultura) do 8. pasáže. KBZD zmrazené po dobu 6 měsíců dosáhly mediánu 47,1 populačních zdvojení od 0. pasáže (primokultura) do 8. pasáže. Také KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců zůstaly proliferačně aktivní a dosáhli mediánu 44,6 populačních zdvojení od 0. pasáže (primokultura) do 8. pasáže. Trend nárůstu kumulativních populačních zdvojení s dobou kultivace zobrazuje graf 3.



Graf 3 Medián populačních zdvojení v průběhu kultivace vypočítaný z jednotlivých populací nezmrazených a zmrazených KBZD. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace KBZD v 1. pasáži.

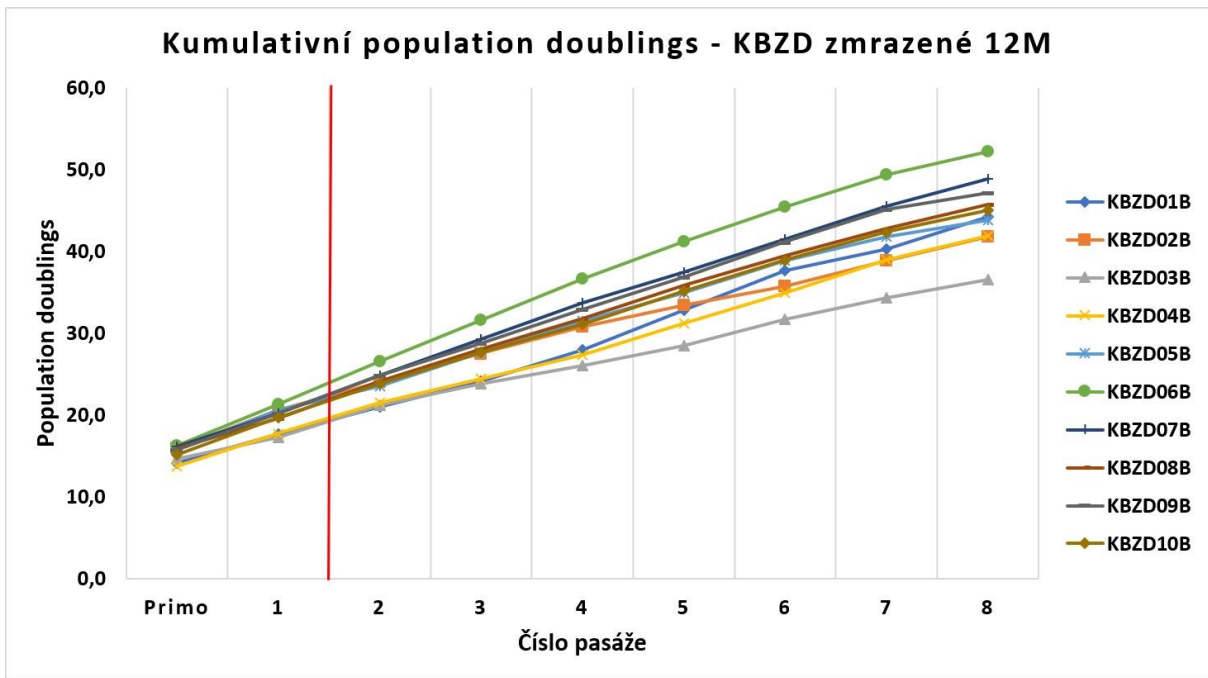
Při statistickém zpracování jsme neporovnávali výsledky z primokultury a 1. pasáže, jelikož jsme vycházeli z hodnot, získaných z linií nezmrazených KBZD. Porovnávali jsme data až od 2. pasáže, kdy jsme pokračovali ve standardním protokolu i u zmrazených linií. Při porovnávání PD v rámci každé linie KBZD kryokonzervovaných po dobu 6, respektive 12 měsíců, s hodnotami, které dosáhly před kryokonzervací, nebyl rozdíl statisticky významný v žádné pasáži ($p > 0,05$). Dosažená populační zdvojení u jednotlivých linií zobrazují grafy 4-6.



Graf 4 Dosažená populační zdvojení u jednotlivých linií nezmrazených KBZD.

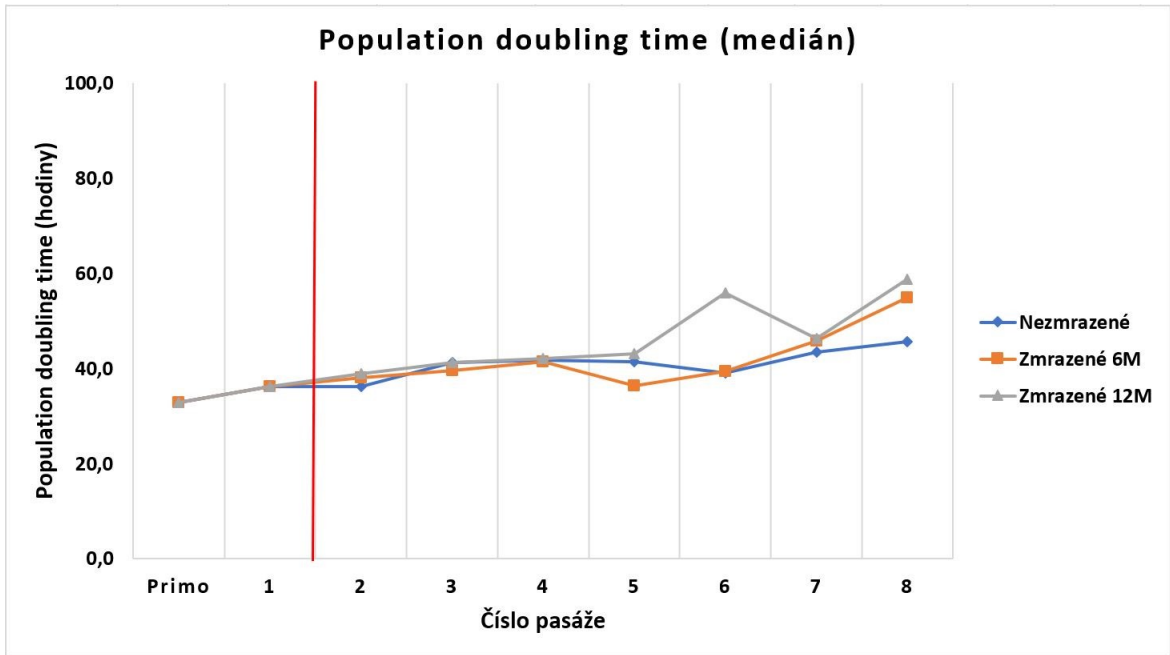


Graf 5 Dosažená populační zdvojení u jednotlivých linií zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace v 1. pasáži.



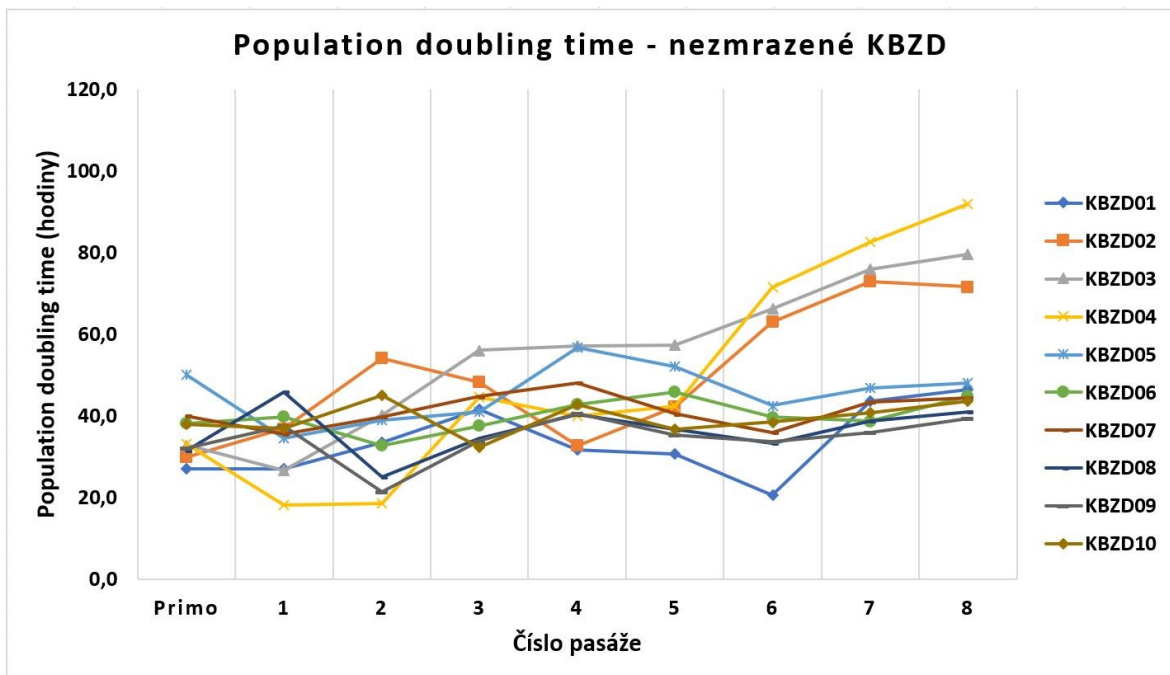
Graf 6 Dosažená populační zdvojení u jednotlivých linií zmrazených KBZD po dobu 12 měsíců. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace v 1. pasáži

Rychlost proliferace jsme hodnotili dle času potřebného pro zdvojení počtu populace. Opět jsme porovnávali hodnoty od 2. pasáže, jelikož hodnoty z primokultury a 1. pasáže byly shodné u nezmrazených i zmrazených KBZD. U zmrazených KB po dobu šesti i dvanácti měsíců jsme však pozorovali stejný trend, a to prodloužení DT při pasážování buněk po dosažení 70% konfluency po rozmrazení, tedy mezi 1. a 2. pasáží. Medián DT v 2. pasáži u kontrolní skupiny nezmrazených KB byl 36,3 hodin, u KBZD zmrazených po dobu 6 měsíců byl tento čas 38,1 hodin a KB zmrazených po dobu dvanácti měsíců činil 38,9 hodiny. Tento rozdíl nebyl statisticky významný. Od 3. pasáže se rychlost proliferací aktivity přiblížila rychlosti kontrolní skupiny. Větší rozdíl jsme opět pozorovali až ke konci kultivace, zejména u buněk zmrazených po dobu 12 měsíců. Medián *population doubling time* z jednotlivých linií nezamrazené buněk činil 45,6 hodin v 8. pasáži, u buněk zamrazených po dobu šesti měsíců byla tato hodnota 54,9 hodiny a u buněk zamrazených po dobu dvanácti měsíců 58,8 hodin. I přes navýšení DT nebyl rozdíl od kontrolní skupiny statisticky významný. Obecně však platilo, že s rostoucí dobou kultivace se prodlužovala i doba potřebná pro zdvojení počtu populace (graf 7.)

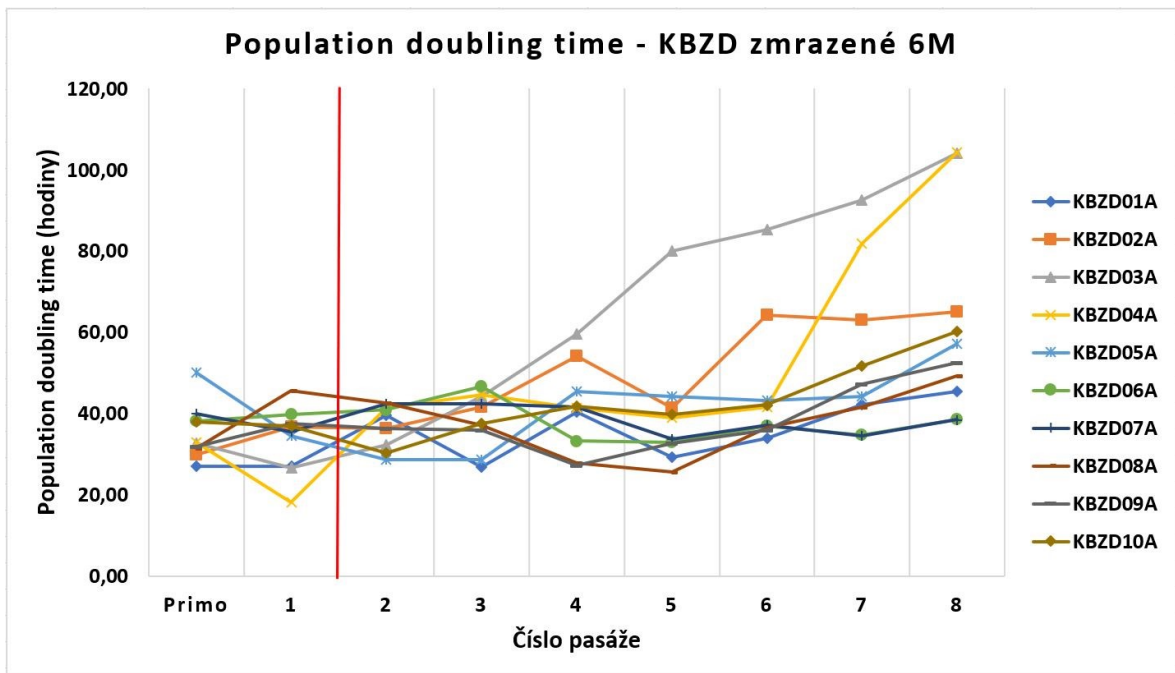


Graf 7 Medián doubling time v průběhu kultivace vypočítaný z jednotlivých populací nezmrazených a zmrazených KBZD. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace KBZD v 1. pasáži.

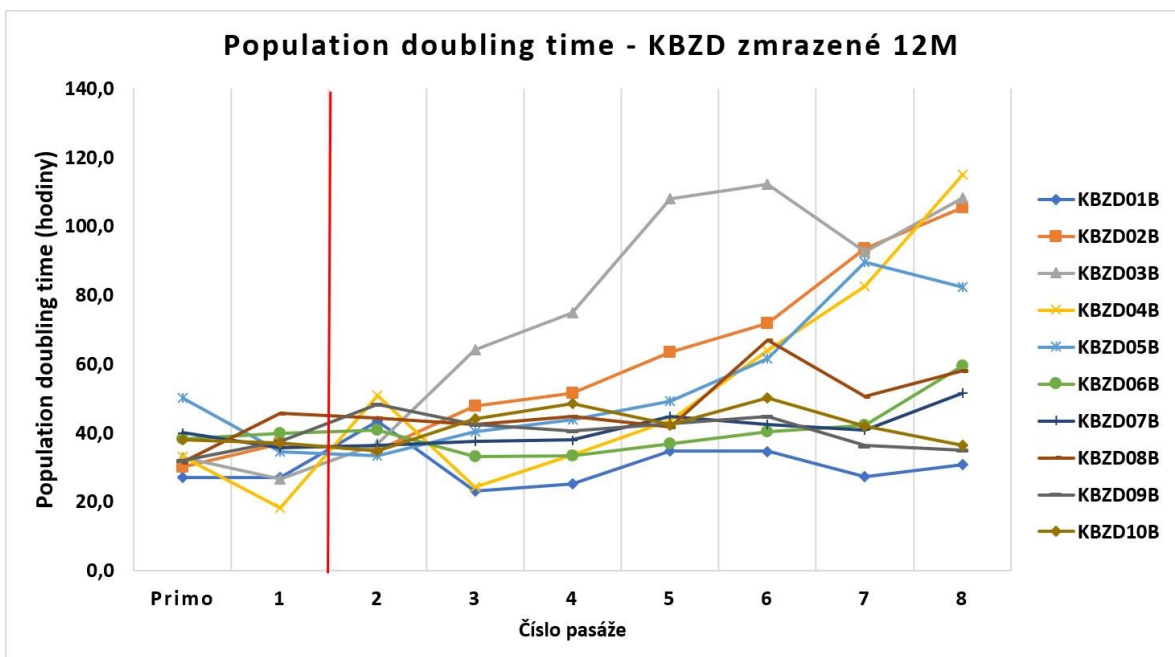
Rozdíl v proliferační aktivitě, při porovnávání potřebného času pro zdvojení populace, u KBZD kryokonzervovaných po dobu 6 měsíců, respektive 12 měsíců, s kontrolní skupinou, nebyl v žádné z pasáží statisticky významný. DT u jednotlivých linií v průběhu kultivace zobrazují grafy 8-10.



Graf 8 Doubling time v průběhu kultivace nezmrazených KBZD.



Graf 9 Doubling time v průběhu kultivace KBZD zamrazených po dobu 6 měsíců. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace KBZD v 1. pasáži.



Graf 10 Doubling time v průběhu kultivace KBZD zamrazených po dobu 12 měsíců. Červená vertikála označuje okamžik kryokonzervace KBZD v 1. pasáži.

Fenotyp jsme analyzovali pomocí průtokové cytometrie v 3. a 7. pasáži u zmrazených i nezmrazených KBZD. Během kultivace kontrolní skupina nezmrazených kmenových buněk dle vypočítaných mediánů ze všech linií vykazovala vysokou pozitivitu povrchových znaků

CD13 (96,8 % v 3 pasáži (3p), 95,0 % v 7. pasáži (7p)), **CD29** (92,0 % v 3p a 91,8 % v 7p), **CD44** (96,7 % v 3p a 94,9 % v 7p), **CD63** (81,7 % v 3p), **CD73** (92,3 % v 3p a 95,7 % v 7p), **CD90** (97,9 % v 3p a 98,0 % v 7p), **CD166** (89,7 % v 3p a 92,4 % v 7p). Naopak negativní expresi pro znaky **CD10** (6,8 % v 7p), **CD18** (0,4 % v 3p a 0,5 % v 7p), **CD31** (0,1 % v 3p a 0,1 % v 7p), **CD34** (0,4 % v 3p a 0,6 % v 7p), **CD106** (0,2 % v 3p a 0,1 % v 7p), **HLA II** (5,5 % v 3p a 3,0 % v 7p). Nízce pozitivní byly buňky pro znaky **CD10** (26,0 % v 3p), **CD45** (16,8 % v 3p a 20,7 % v 7p), **CD49f** (34,0 % v 3p a 26,8 % v 7p), **CD271** (14,8 % v 3p a 19,5 % v 7p), **STRO1** (25,2 % v 3p a 28,2 % v 7p). Středně pozitivní byly nezmrazené buňky pro znaky **CD63** (67,4 % v 7p), **CD105** (61,8 % v 3p a 69,7 % v 7p), **CD117** (59,1 % v 3p, 53,2 % v 7p), **CD146** (59,4 % v 3p a 59,6 % v 7p), **HLA I** (66,9 % v 3p a 52,2 % v 7p).

KBZD zmrazené po dobu 6 měsíců exprimovaly s vysokou pozitivitou znaky **CD13** (93,3 % v 3p a 93,8 % v 7p), **CD29** (92,2 % v 3p a 93,0 % v 7p), **CD44** (94,0 % v 3p a 96,6 % v 7p), **CD63** (74,0 % v 3p), **CD73** (96,7 % v 3p a 97,4 % v 7p), **CD90** (96,1 % v 3p a 97,5 % v 7p), **CD146** (84,6 % v 3p a 77,6 % v 7p), **CD166** (87,7 % v 3p a 83,8 % v 7p). Nevyjádřeny byly povrchové znaky **CD18** (0,4 % v 3p a 1,2 % v 7p), **CD31** (0,0 % v 3p a 0,5 % v 7p), **CD34** (0,0 % v 3p a 0,4 % v 7p), **CD106** (7,3 % v 3p a 8,2 % v 7p), **CD271** (8,6 % v 3p), **HLA II** (0,8 % v 3p a 2,4 % v 7p). Nízkou expresi vykazovaly znaky **CD10** (14,0 % v 3p a 10,3 % v 7p), **CD45** (12,7 % v 3p a 11,2 % v 7p), **CD49f** (19,1 % v 3p a 25,7 % v 7p), **CD 117** (32,6 % v 7p), **CD271** (10,6 % v 7p), **HLA I** (37,6 % v 3p), **STRO1** (25,3 % v 3p a 29,3 % v 7p). Středně vysokou expresi jsme pozorovali u znaků **CD63** (64,1 % v 7p), **CD105** (58,3 % v 3p a 61,6 % v 7p), **CD117** (40,6 % v 3p), **HLA I** (44,7 % v 7p).

Buňky zmrazené po dobu 12 měsíců měly vysoce vyjádřené znaky **CD13** (85,2 % v 3p a 88,4 % v 7p), **CD29** (95,5 % v 3p a 96,7 % v 7p), **CD44** (94,5 % v 3p a 94,4 % v 7p), **CD63** (76,7 % v 3p), **CD73** (94,8 % v 3p a 95,0 % v 7p), **CD90** (96,1 % v 3p a 97,6 % v 7p), **CD146** (80,0 % v 3p), **CD166** (81,6 % v 3p a 84,5 % v 7p). Nevyjádřeny byly znaky **CD10** (5,2 % v 7p), **CD18** (5,0 % v 3p a 5,2 % v 7p), **CD34** (0,6 % v 3p a 0,6 % v 7p), **CD106** (9,7 % v 3p), **CD271** (9,3 % v 3p), **HLA II** (3,6 % v 3p a 2,0 % v 7p). Mezi znaky, které byly mírně pozitivní, patřily **CD10** (32,5 % v 3p), **CD31** (23,4 % v 3p a 16,5 % v 7p), **CD45** (13,7 % v 3p a 11,1 % v 7p), **CD49f** (19,1 % v 3p), **CD63** (37,6 % v 7p), **CD106** (11,1 % v 7p), **CD117** (37,4 % v 7p), **CD271** (11,3 % v 7p), **HLA I** (28,3 % v 7p), **STRO1** (28,4 % v 3p a 18,5 % v 7p). Středně vysoce vyjádřené byly znaky **CD49f** (41,8 % v 7p), **CD105** (58,3 % v 3p a 58,2 % v 7p), **CD117** (40,6 % v 3p), **CD146** (68,7 % v 7p), **HLA I** (61,5 % v 3p).

Pro statistické zpracování jsme použili párový t-test a v případě zamítnuté normality neparametrický Wilcoxonův test. U znaků **CD13, CD49f, CD73, CD90, CD106, CD117, CD146, CD271, HLA I, HLA II** v 3. pasáži a znaků **CD45, CD117, CD146, CD271** v 7. pasáži u KBZD zmrazených po dobu 6 měsíců byla hladina $p < 0,05$ při porovnání s expresí znaků u nezmrazených buněk. Při použití hladiny významnosti dle Bonferroniho modifikace byl rozdíl statisticky významný pouze u znaků **CD13, CD73, CD106, CD117, CD146, HLA I, HLA II** v 3. pasáži. U KBZD zmrazených po dobu 12 měsíců se jednalo o znaky **CD13, CD31, CD44, CD90, CD106, CD146** v 3. pasáži a **CD13, CD18, CD28, CD31, CD45, CD105, CD106, CD166, HLA I a STRO1** v 7. pasáži, kdy byla hladina $p < 0,05$. Pouze u znaků **CD13, CD31, CD44, CD106, CD146** v 3. pasáži a **CD13, CD18, CD29, CD31, CD45, CD105, CD166, HLA I** v 7. pasáži byla hladina $p < 0,025$. Expresi jednotlivých povrchových znaků u KBZD nezmrazených, zmrazených po dobu šesti a dvanácti měsíců v mediánech a přesné hladiny p dle statistického zpracování zobrazuje tabulka č. 4.

	Nezmrazené KBZD		KBZD zamrazené 6M				KBZD zamrazené 12M			
	3p	7p	3p	p - hladina	7p	p - hladina	3p	p-hladina	7p	p-hladina
CD10	26,0	6,8	14,0	0,822	10,3	0,389	32,5	0,919	5,2	0,262
CD 13	96,8	95,0	93,3	0,007	93,8	0,136	85,2	0,006	88,4	0,003
CD18	0,4	0,5	0,4	0,719	1,2	0,610	5,0	0,058	5,2	0,012
CD29	92,0	91,8	92,2	1,000	93,0	0,646	95,5	0,086	96,7	0,014
CD31	0,1	0,1	0,0	0,533	0,5	0,102	23,4	0,006	16,5	0,006
CD34	0,4	0,6	0,0	0,182	0,4	0,435	0,6	0,893	0,6	0,203
CD44	96,7	94,9	94,0	0,090	96,6	1,000	94,5	0,011	94,4	0,154
CD45	16,8	20,7	12,7	0,124	11,2	0,033	13,7	0,307	11,1	0,013
CD49f	34,0	26,8	19,1	0,041	25,7	0,609	19,1	0,378	41,8	0,189
CD63	81,7	67,4	74,0	0,799	64,1	0,719	76,7	0,799	37,6	0,375
CD73	92,3	95,7	96,7	0,009	97,4	0,822	94,8	0,358	95,0	0,175
CD90	97,9	98,0	96,1	0,028	97,5	0,560	96,1	0,043	97,6	0,241
CD105	61,8	69,7	58,3	0,984	61,6	0,384	54,2	0,444	58,2	0,029
CD106	0,2	0,1	7,3	0,001	8,2	0,312	9,7	0,013	11,1	0,277
CD117	59,1	53,2	40,6	0,009	32,6	0,050	47,4	0,075	37,4	0,153
CD146	59,4	59,9	84,6	0,002	77,6	0,026	80,0	0,017	68,7	0,209
CD166	89,7	92,4	87,7	0,289	83,8	0,105	81,6	0,181	84,5	0,032
CD 271	14,8	19,5	8,6	0,032	10,6	0,047	9,3	0,610	11,3	0,155
HLA I	66,9	52,2	37,6	0,014	44,7	0,746	61,5	0,223	28,3	0,004
HLA II	5,5	3,0	0,8	0,007	2,4	0,721	3,6	0,933	2,0	0,169
STRO1	25,2	28,2	25,3	0,236	29,3	0,266	28,4	0,591	18,5	0,038

Tab. 4 Medián procent pozitivních KBZD vyjadřující testované povrchové CD znaky. Procento pozitivních buněk bylo stanoveno jako procento s fluorescenční intenzitou vyšší než 99,5 % negativní izotypové imunoglobulinové kontroly. Hladiny p dle statistického zpracování s použitím t-testu, respektive neparametrického Wilcoxonova testu (žlutě označené $p < 0,05$; zeleně $p < 0,025$).

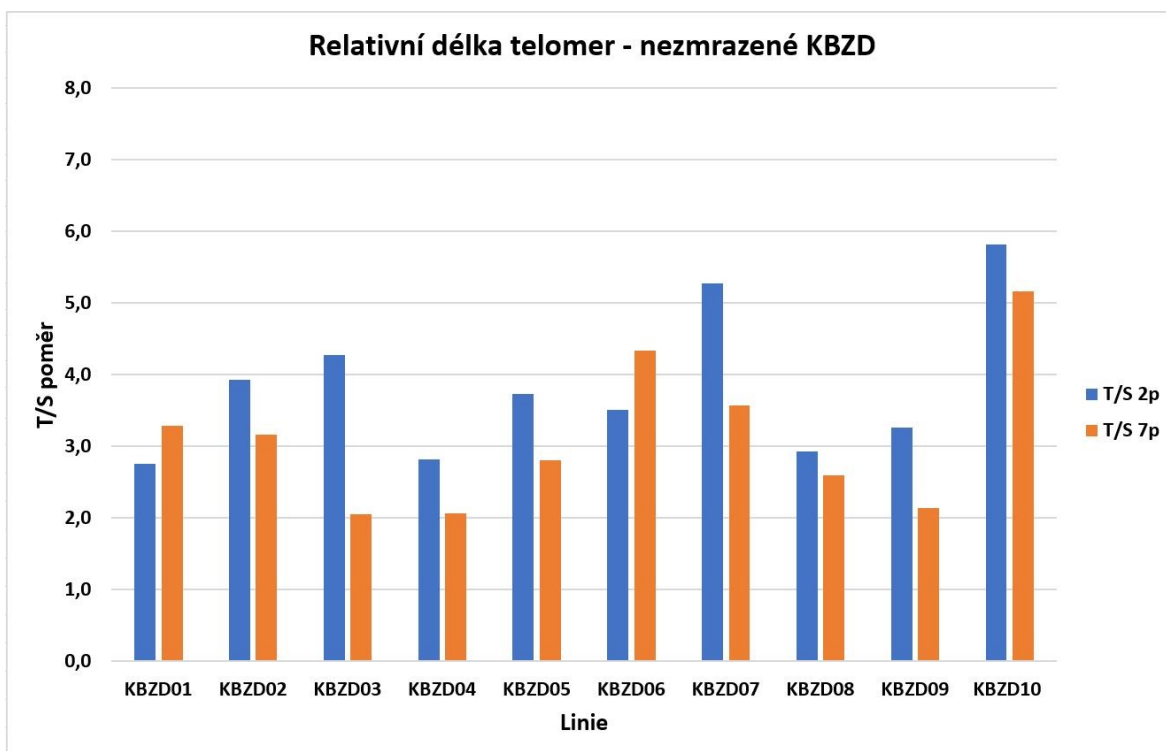
4.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Měření relativní délky telomer, respektive telomerázové aktivity s použitím kvantitativní PCR metody jsme prováděli v 2. a 7. pasáži u nezmrazených i zmrazených KBZD. Pro samotnou analýzu jsme počítali s rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (kde $\Delta Ct = Ct_{telomery} - Ct_{\text{“single copy“ gen}}$). Jednotlivé hodnoty ΔCt u nezmrazených a zmrazených linií KBZD zobrazuje tabulka č. 5.

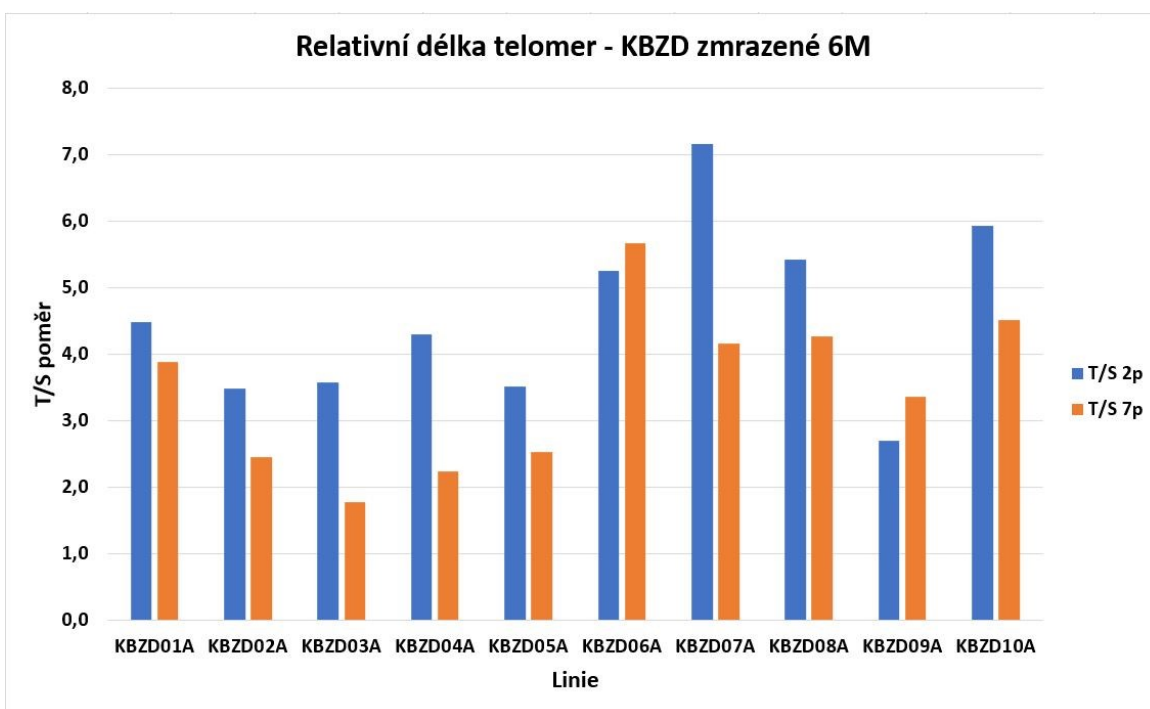
Linie	ΔCt		Linie	ΔCt		Linie	ΔCt	
	2p	7p		2p	7p		2p	7p
KBZD01	1,5	1,7	KBZD01A	2,2	2,0	KBZD01B	1,9	2,1
KBZD02	2,0	1,7	KBZD02A	1,8	1,3	KBZD02B	1,9	1,6
KBZD03	2,1	1,0	KBZD03A	1,8	0,8	KBZD03B	2,5	1,3
KBZD04	1,5	1,0	KBZD04A	2,1	1,2	KBZD04B	2,5	1,3
KBZD05	1,9	1,5	KBZD05A	1,8	1,3	KBZD05B	1,9	1,2
KBZD06	1,8	2,1	KBZD06A	2,4	2,5	KBZD06B	2,5	2,6
KBZD07	2,4	1,8	KBZD07A	2,8	2,1	KBZD07B	2,4	2,5
KBZD08	1,5	1,4	KBZD08A	2,4	2,1	KBZD08B	1,8	1,5
KBZD09	1,4	1,1	KBZD09A	1,4	1,7	KBZD09B	2,2	1,7
KBZD10	2,5	2,4	KBZD10A	2,6	2,2	KBZD10B	2,3	2,0

Tab. 5 Vypočítané ΔCt jednotlivých linií nezmrazených a zmrazených KBZD.

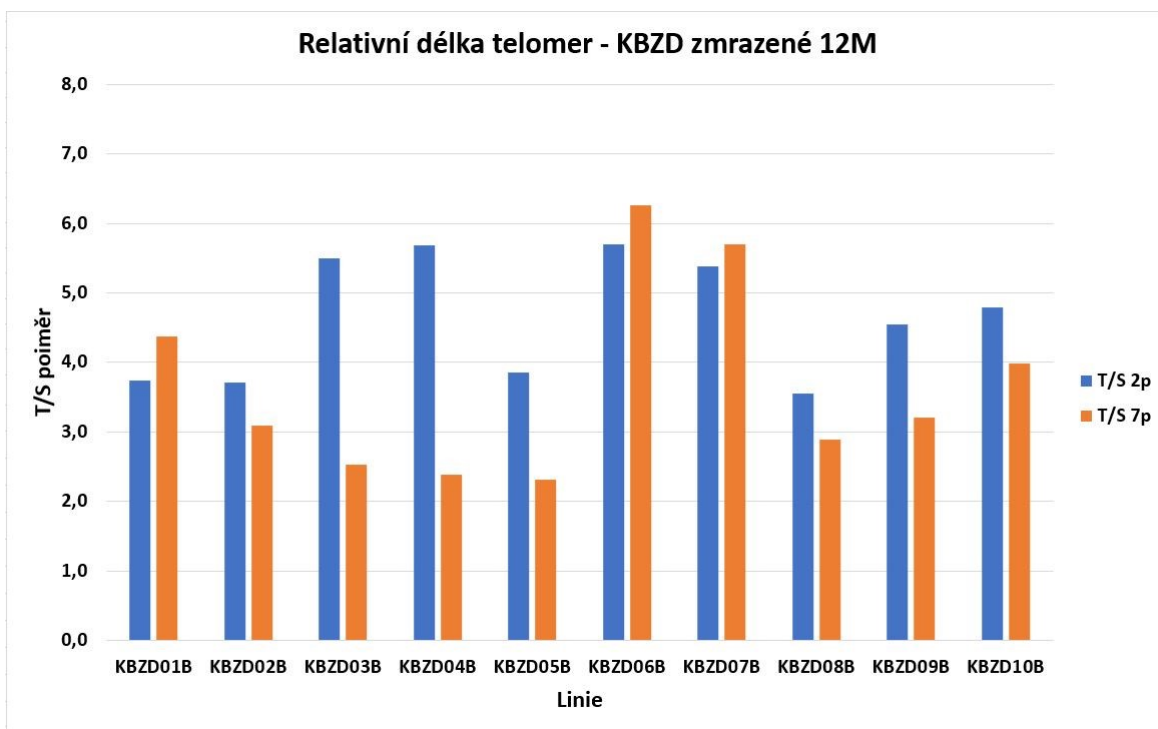
Vypočítané ΔCt u kontrolní skupiny KBZD se nacházelo v rozmezí 1,5 – 2,5 v 2. pasáži a 1,0 – 2,4 v 7. pasáži. U buněk kryokonzervovaných po dobu 6 měsíců bylo toto rozmezí 1,4 - 2,8 v 2. pasáži a 0,8 – 2,5 v 7. pasáži a u buněk kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců 1,8 – 2,5 v 2. pasáži a 1,2 – 2,6 v 7. pasáži. V 7. pasážích dosáhly linie dle vypočítaného mediánu ze všech linií okolo 43,4 populačních zdvojení u kontrolní skupiny, 43,9 u buněk zmrazených na 6 měsíců a 42,1 populačních zdvojení u buněk zmrazených na 12 měsíců. Navzdory možné interindividuální variabilitě jsme pozorovali signifikantní zkrácení délky telomer ($p < 0,05$) jak u kontrolní skupiny ($p = 0,036$), tak u zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců ($p = 0,011$) mezi buňkami izolovanými z 2. a 7. pasáže. I když jsme pozorovali zkrácení relativní délky telomer i u KBZD kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců, u této skupiny byl rozdíl mezi 2. a 7. pasáží na hranici statistické významnosti ($p = 0,0502$). Pouze u linie KBZD06 nedošlo ke zkrácení relativní délky telomer ani po kryokonzervaci. Rozdíl ve zkrácení relativní délky telomer mezi kontrolní nezmrazenou skupinou a kryokonzervovanými skupinami buněk nebyl staticky významný. Pro KBZD zmrazené po dobu šesti měsíců i dvanácti měsíců byla hodnota $p = 0,160$. Dynamiku relativní délky telomer v 2. a 7. pasáži nezmrazených a zmrazených KBZD ilustrují grafy č. 11 – 14.



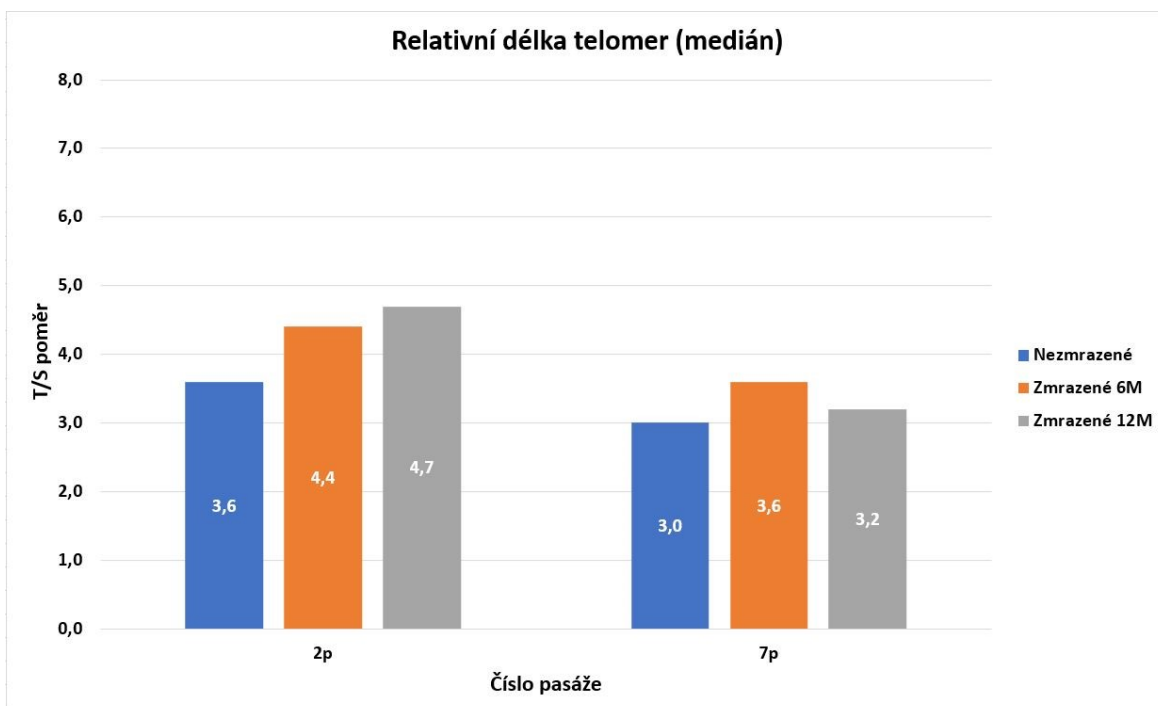
Graf 11 Relativní délka telomer měřena rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (qPCR) u nezmrazených KBZD.



Graf 12 Relativní délka telomer měřena rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (qPCR) u zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců.



Graf 13 Relativní délka telomer měřena rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (qPCR) u zmrazených KBZD po dobu 12 měsíců.



Graf 14 Medián relativní délky telomer měřena rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (qPCR) ze všech linií KBZD.

Při porovnání relativní délky telomer měřené v 2. pasáži mezi zmrazenými a nezmrazenými KBZD jsme zjistili zajímavý jev. Po kryokonzervaci se relativní délka telomer měřená v 2. pasáži oproti kontrolní skupině prodloužila. Medián T/S pro KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců byl 4,4, pro KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců 4,7 a u kontrolní

skupiny byla hodnota 3,6. DT kryokonzervovaných buněk strávený ve 2. pasáži byl delší než u kontrolní skupiny. Medián DT v 2. pasáži u kontrolní skupiny nezmrazených KB byl 36,3 hodin, u KBZD zmrazených po dobu 6 měsíců byl tento čas 38,1 hodin a KB zmrazených po dobu dvanácti měsíců 38,9 hodiny. Při korelaci prodlouženého DT u jednotlivých linií s relativním prodloužením délky telomer v 2. pasáži u kryokonzervovaných KBZD oproti kontrolní skupině vyšel korelační koeficient $R=0,818$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců a $R=0,754$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců. Při porovnání s hladinou významnosti testu nulovosti korelačního koeficientu byla korelace v obou případech kryokonzervovaných KBZD statisticky významná ($p=0,003$, respektive $0,012$), a to i podle Bonferroniho modifikace.

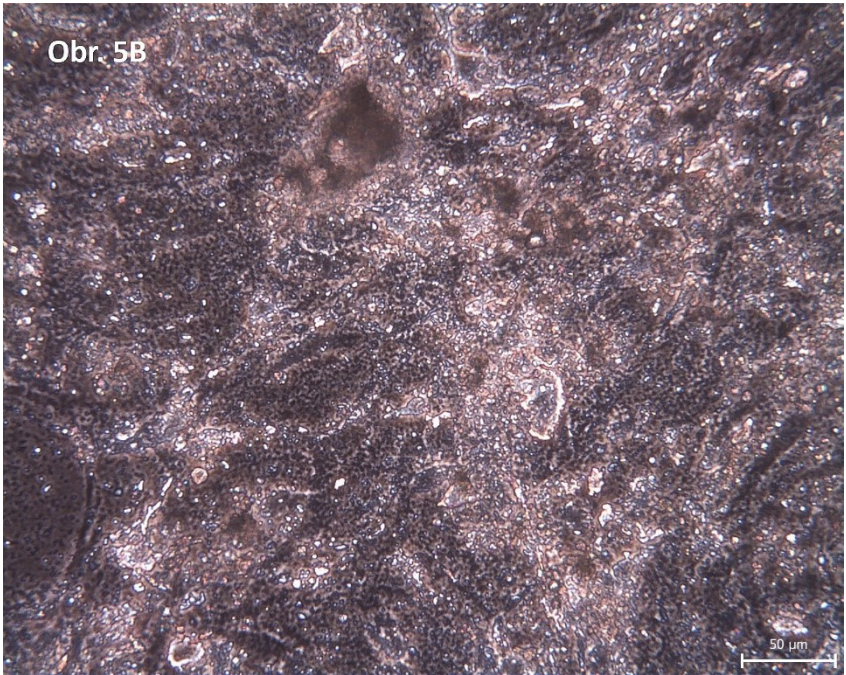
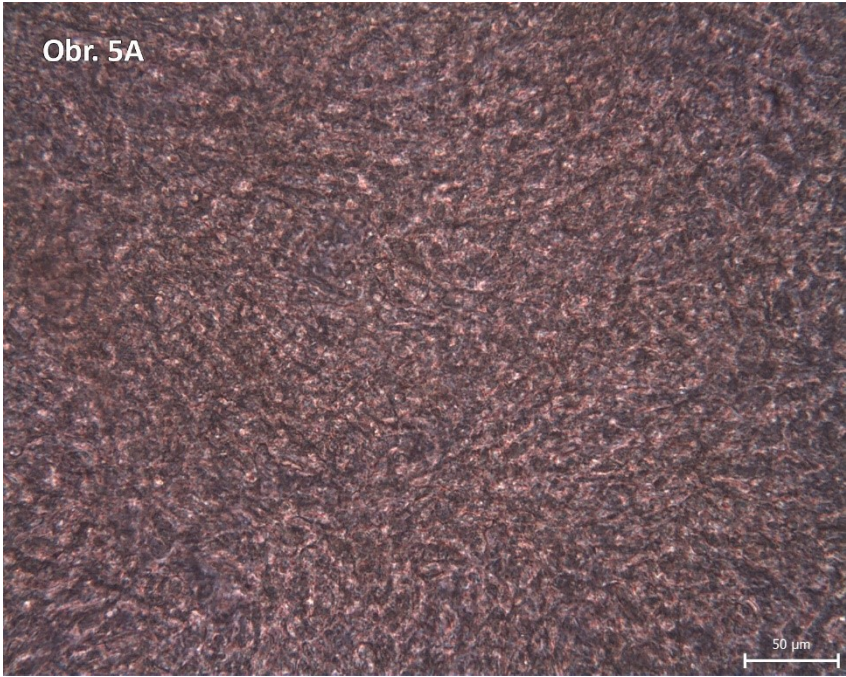
Obecně jsme pozorovali statisticky významnou korelaci mezi vyšší hodnotou T/S vypočítanou u kryokonzervovaných skupin buněk v 7. pasáži a vyšším počtem dosažených PD ($R=0,810$, $p=0,005$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců a $R=0,722$, $p=0,018$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců), respektive kratším DT v 7. pasáži ($R=-0,786$, $p=0,007$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců a $R=-0,667$, $p=0,035$ pro KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců).

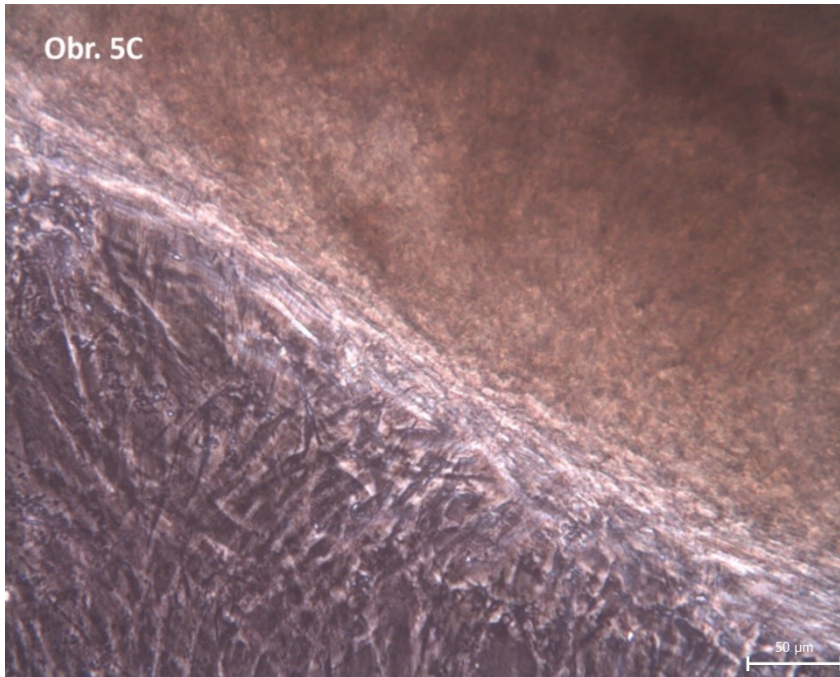
Navíc u buněk kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců signifikantně korelovalo zkrácení relativní délky telomery mezi 2. a 7. pasáží u jednotlivých linií s prodloužením DT do 7. pasáže ($R=0,692$, $p=0,027$) a snížením počtu PD ($R=-0,655$, $p=0,018$) do 7 pasáže.

4.4 Diferenciační potenciál KBZD

K ověření faktu, zda jsou KBZD schopné diferencovat ve zralé buněčné typy, osteoblasty chondroblasty, adipocyty, jsme použili komerčně dodávaná média a využili standardně využívané diferenciační protokoly. Diferenciační potenciál KBZD jsme ověřovali ve 4. pasáži, kdy po dosažení 70 - 100% konfluency byly KBZD vystaveny působení diferenciačního média.

KBZD ze všech skupin, nezmrazené i zmrazené, kultivované v chondrogenním, resp. osteogenním médiu měly rozvinutější cytoskelet a do svého okolí produkovaly extracelulární matrix (obr. 5A, 5B). Diferenciace probíhala jak ve formě monolayeru (na dnu kultivační misky) i ve formě trojrozměrné pelety (obr. 5C).

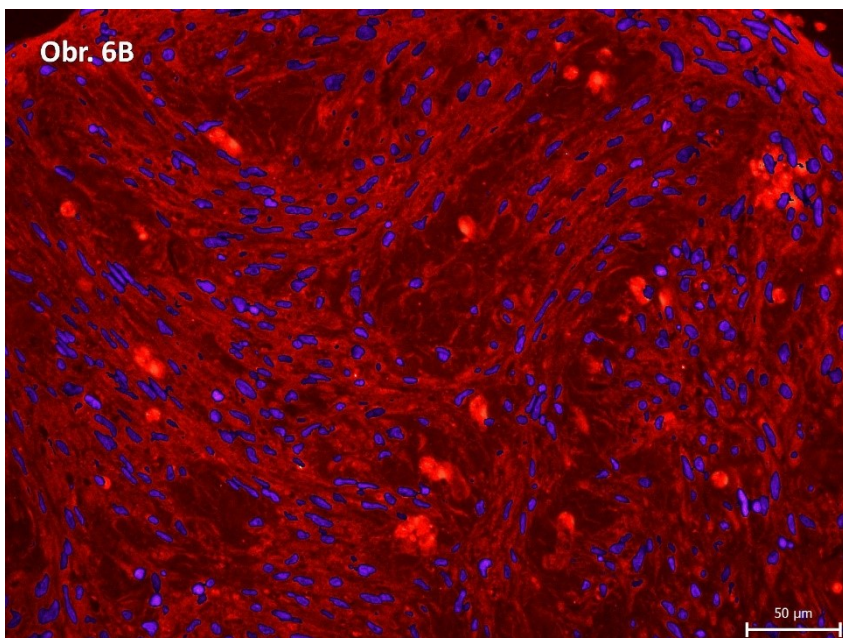
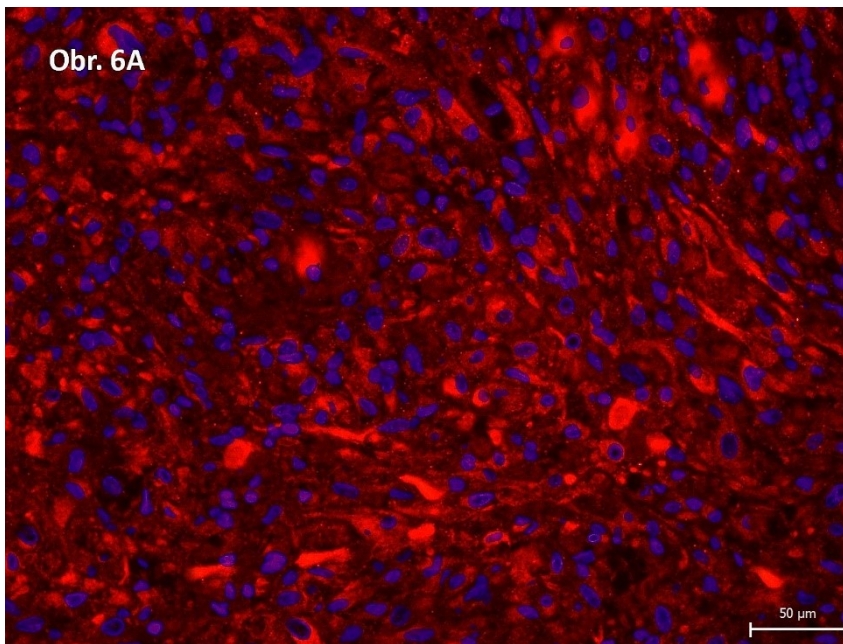




Obr. 5 Diferenciace KBZD, mikroskop s fázovým kontrastem. A Chondrogenní extracelulární matrix ve formě monolayeru (linie KBZD01). B Osteogenní extracelulární matrix ve formě monolayeru (linie KBZD05). C Chondrogenní extracelulární matrix ve formě trojrozměrné pelety (linie KBZD05).

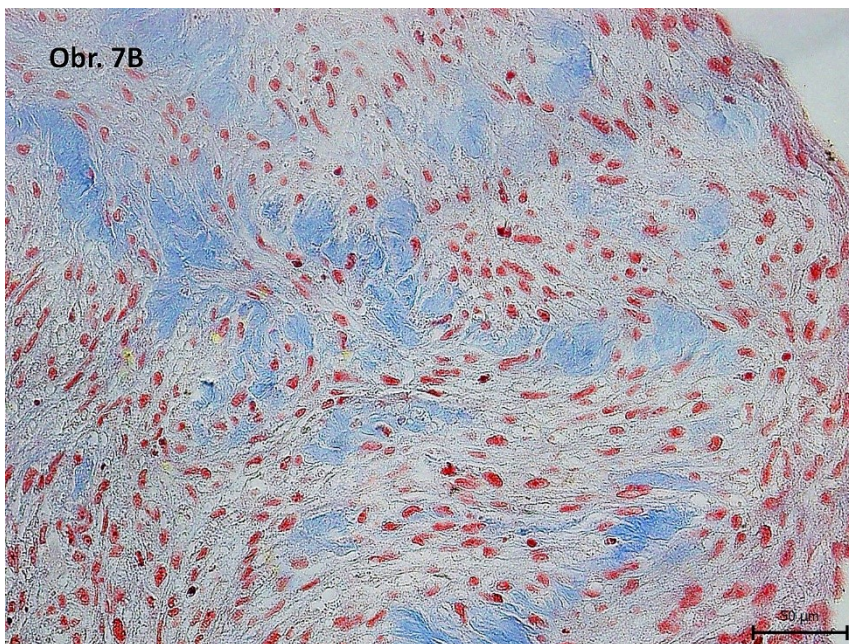
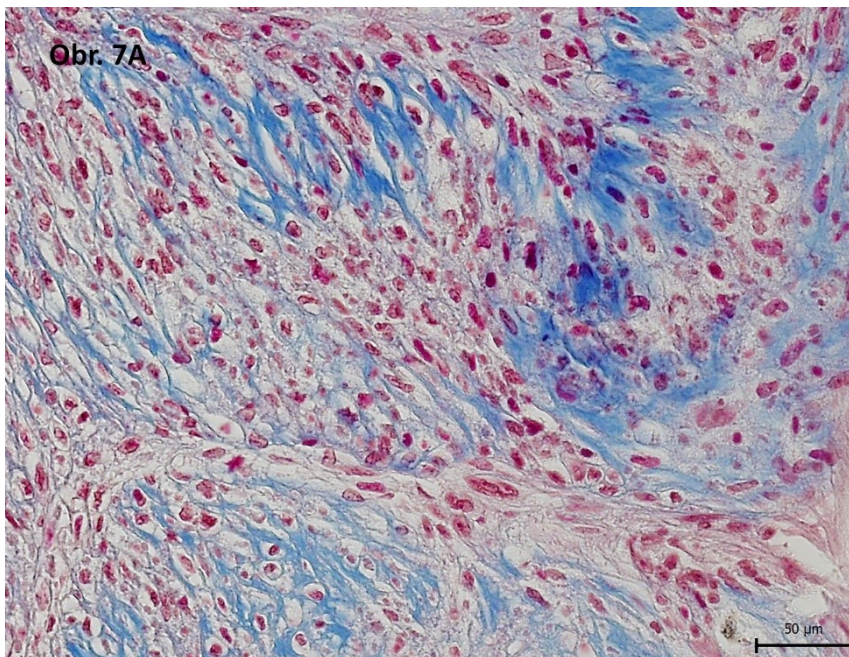
Po ukončení osteogenní a chondrogení diferenciace dle stanoveného protokolu jsme vzorky nezamrazených i rozmrazených kryokonzervovaných KBZD zalili do parafínových bločků a diferenciaci prokazovali pomocí imunohistochemie a histologického barvení.

Kontrolní skupiny buněk i rozmrazené kryokonzervované KBZD produkovaly do extracelulárního prostoru chondrogení matrix. Kolagen typu II v produkované matrix jsme verifikovali pomocí imunohistochemické reakce, kdy po navázání protilátek kolagen typu II fluoreskoval červeně, zatímco jádra buněk se zbarvila modře (obr. 6A, B).



Obr. 6 Histologický řez KBZD kultivovaných v chondrogenním médiu, imunohistochemie, fluorescenční mikroskop (jádra buněk fluoreskující modře, okrsky kolagenu typu II červeně). A Nezmrazené KBZD (linie KBZD01); jádra buněk představují 15,5 % plochy a okrsky kolagenu typu II 32,7 % plochy obrázku. B KBZD zmrazené po 12 měsíců (linie KBZD01B); jádra buněk představují 12,3 % plochy a okrsky kolagenu typu II 30,1 % plochy obrázku)

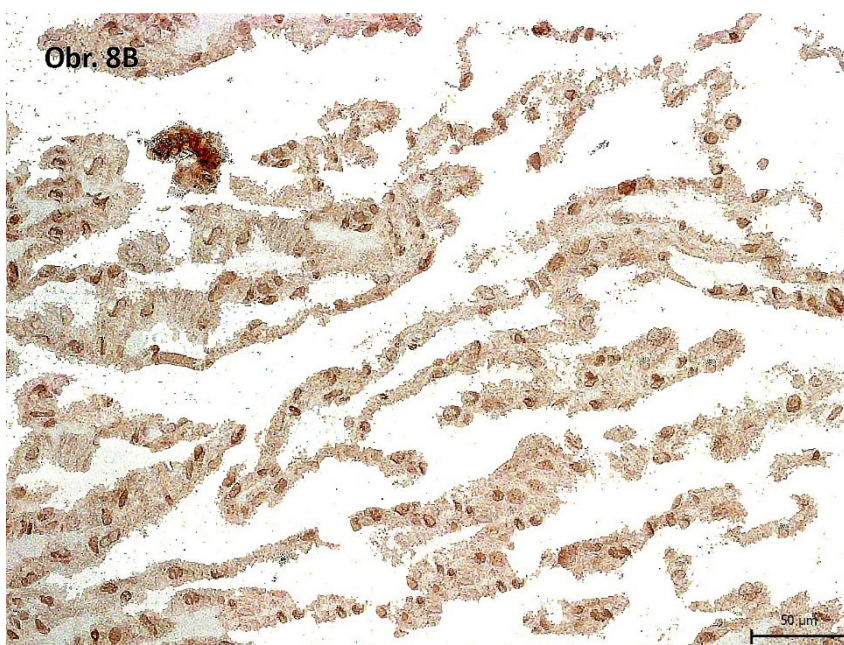
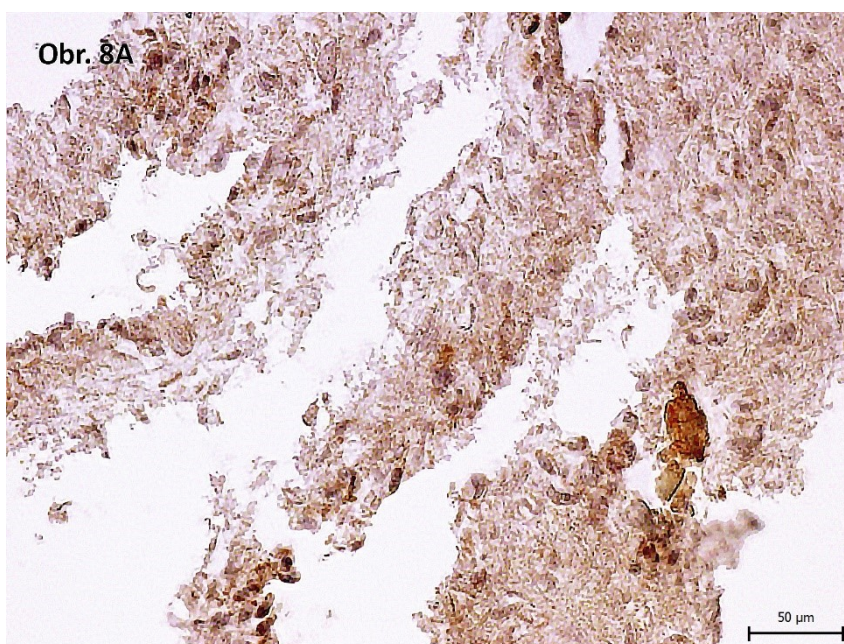
Při histologickém barvení byl kolagen a prokolagen v chondrogenní hmotě prokázány modrým Massonovým trichromem a byl znázorněn modře (obr 7A,B).



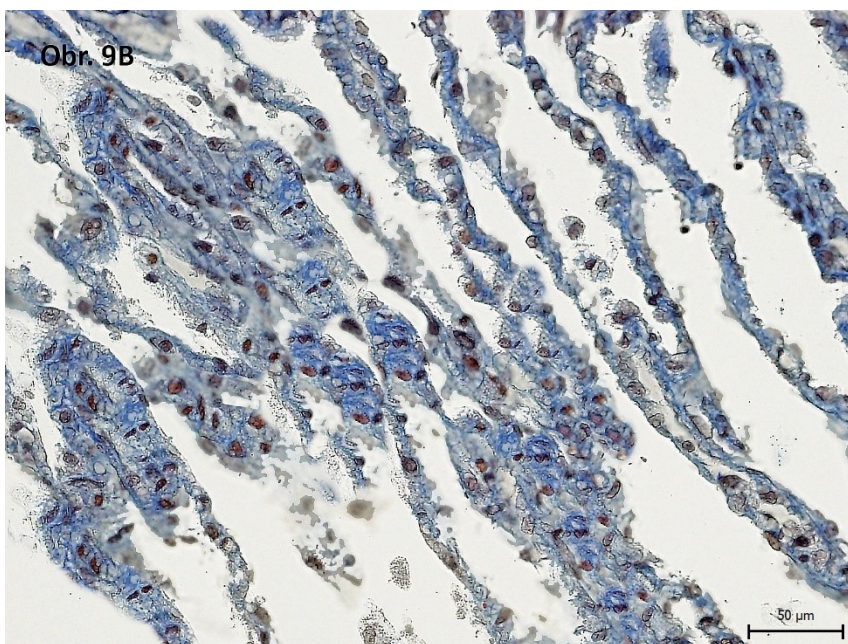
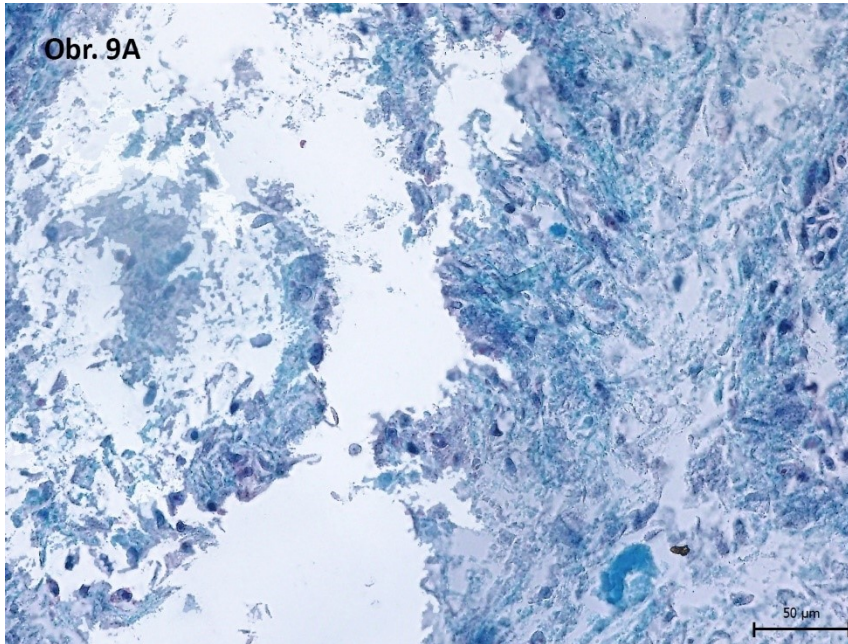
Obr. 7 Histologický řez KBZD kultivovaných v chondrogenním médiu, barvení modrým Massonovým trichromem (kolagen a prokolagen obarveny modře). A Nezmrazené KBZD (linie KBZD01); jádra buněk představují 12,0 % plochy a okrsky kolagenu 29,0 % plochy obrázku. B KBZD zmrazené po 12 měsících (linie KBZD01B); jádra buněk představují 12,1 % plochy a okrsky kolagenu 18,5 % plochy obrázku.

U nezmrazených i rozmrazených kryokonzervovaných KBZD jsme také úspěšně indukovali osteogenezi. Imunohistochemicky jsme prokázali přítomnost osteokalcinu (hnědé okrsky)

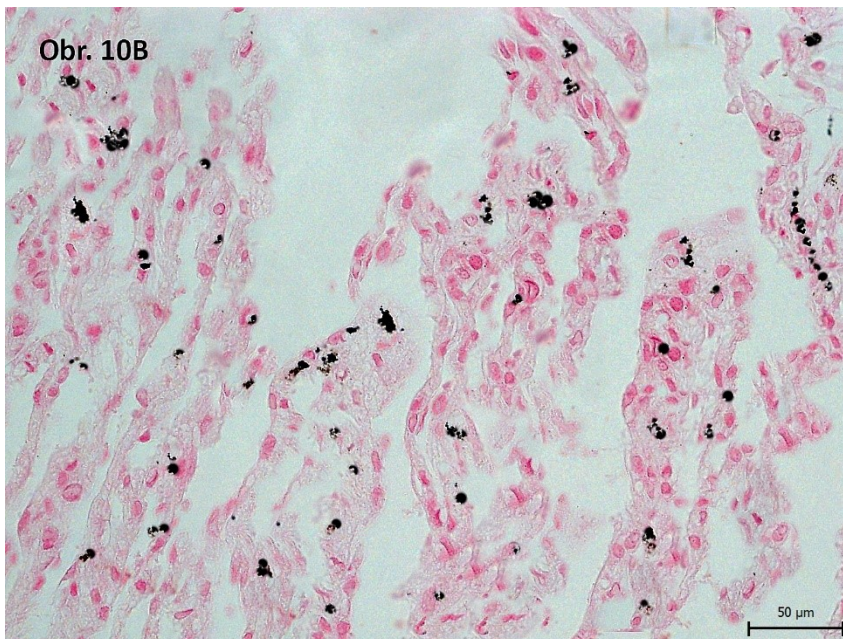
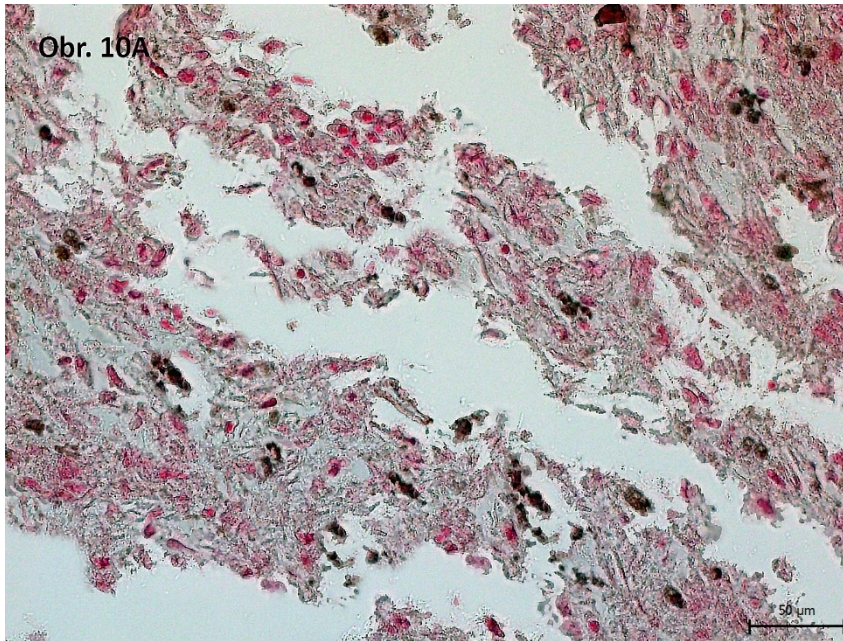
(obr. 8A,B), za pomoci histologického barvení modrým Massonovým trichromem jsme ověřili přítomnost kolagenu a prokolagenu (modré okrsky) (obr. 9A,B) a barvením dle Kossy přítomnost vápenatých partikulí (černé okrsky) ve vyprodukované osteogenní extracelulární hmotě (obr. 10A, B) u kontrolní i sledované skupiny rozmrazených kryokonzervovaných buněk.



Obr. 8 Histologický řez KBZD kultivovaných v osteogenním médiu, imunohistochemie (osteokalcin obarven hnědě). A Nezmrázené KBZD (linie KBZD05); okrsky extracelulární matrix představují 61,2 % plochy obrázku. B KBZD zmrazené po 12 měsících (linie ZKBZD05B); okrsky extracelulární matrix představují 45,0 % plochy obrázku.



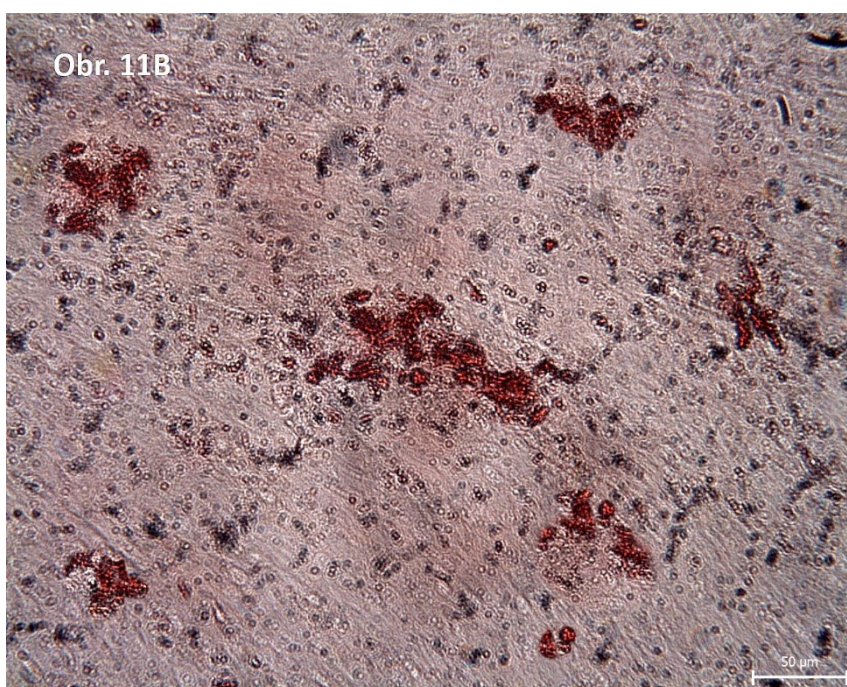
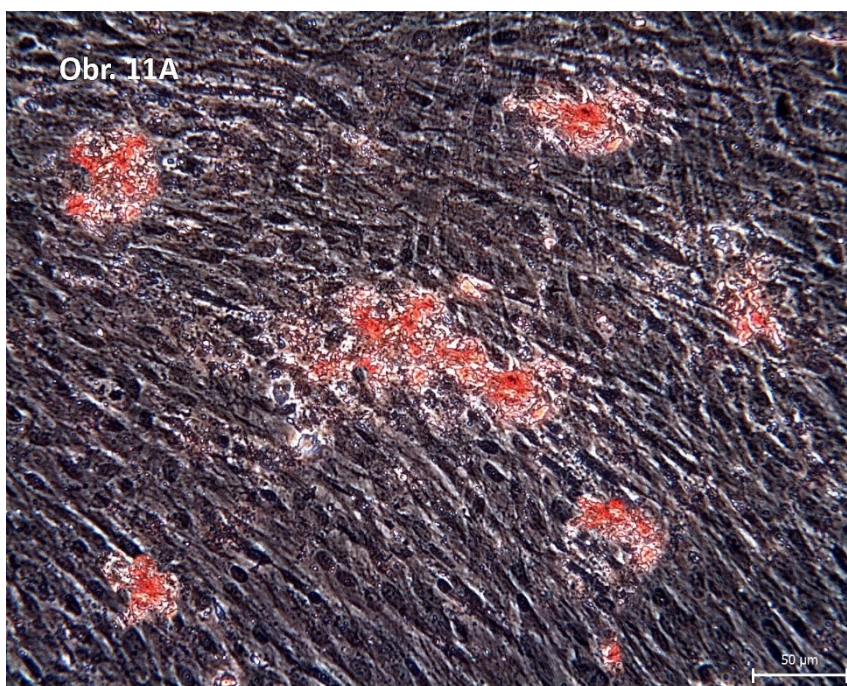
Obr. 9 Histologický řez KBZD kultivovaných v osteogenním médiu, barvení modrý Massonův trichrom (kolagen a prokolagen obarveny modře). A Nezmrazené KBZD (linie KBZD05); okrsky extracelulární matrix představují 67,8 % plochy obrázku. B KBZD zmrazené po 12 měsících (linie KBZD05B); okrsky extracelulární matrix představují 65,1 % plochy obrázku.



Obr. 10 Histologický řez KBZD kultivovaných v osteogenním médiu, barvení dle Kossy (jádra buněk obarvena červeně, vápenaté partikule černě). A Nezmrazené KBZD (linie KBZD05); vápenaté partikule představují 2,1 % plochy obrázku. B KBZD zmrazené po 12 měsících (linie KBZD05B); vápenaté partikule představují 1,4 % plochy obrázku.

Adipogenní diferenciaci jsme prokazovali po ukončení stanované doby diferenciaci pomocí olejové červeně přímo na fixovaných diferenciovaných buňkách v kultivačních nádobách. I přes využití protokolu ověřeného jinými autory a použití proadipogenně silně působícího média nebylo nahromadění tukových vakuol v diferencovaných nezmrazených

KBZD průkazné (Obr. 11A,B). Adipogenní diferenciaci jsme poté u kryokonzervovaných buněk dále neověřovali.



Obr. 11 Barvení olejovou červení buněk nezmrazených KBZD kultivovaných v adipogenním médiu (tukové vakuoly barevny červeně), linie KBZD01; obarvené tukové vakuoly představují 3,9 % plochy obrázku. A Mikroskop s fázovým kontrastem. B Optický invertovaný mikroskop.

5. Diskuze

Od roku 2000, kdy KBZD byly poprvé izolovány, zájem o ně neustále stoupá. Relativně snadná izolace a pozoruhodné vlastnosti, schopnost sebeobnovy a diferenciaci, tyto buňky předurčují k využití v regenerativní a reparativní medicíně.

Cílem této práce bylo objasnění vlivu neřízené kryokonzervace s využitím 10% DMSO jako KPA na KBZD. Kryokonzervace přináší značné množství výhod. Odstraňuje nutnost udržovat buňky v dlouhodobé kultivaci, a s tím související problémy jako riziko kontaminace, genetických driftů či epigenetických změn. Umožňuje udržování požadovaných fenotypů buněk uložených v buněčných bankách, skladování kmenových buněk pro potenciální klinické využití, či případně udržení pro další klinické testování. Z komerčního i klinického hlediska umožňuje skladování produktů, respektive buněk, a zjednodušuje jejich přepravu mezi jednotlivými pracovišti. Podmínkou výše uvedených uplatnění je důkladné porozumění procesu kryokonzervace a optimalizace jednotlivých kroků, popř. objasnění nežádoucích efektů na kryokonzervované buňky. Je pravdou, že díky rozmanitosti kmenových buněk, zdrojů kmenových buněk a možností využití v buněčné terapii, je málo pravděpodobné, že je možné dosáhnout univerzálního kryokonzervačního protokolu. Bez ohledu na typ buněk, který je kryokonzervován, klíčovou roli na zajištění optimálního skladování procesem kryokonzervace má výběr kryokonzervačního média, použitého kryoprotektiva, způsob nastolení nízkých teplot a přechod zpět k teplotám okolo 37 °C. Při kryokonzervaci je hlavním cílem zachování strukturní a funkční integrity buněk. K dosažení tohoto cíle je nutná přítomnost kryoprotektiva v kryokonzervačním médiu. Problémovým faktem je, že různé typy buněk reagují na přítomné kryoprotektivum rozdílně. Nejvíce v současnosti rozšířené a „univerzální“ kryoprotektivum je dimethylsulfoxid. Bez ohledu na jeho účinnost při zachování velké škály buněk, hematopoetických i mezenchymálních, během procesu kryokonzervace, byly vzneseny obavy v souvislosti s jeho použitím v buněčné terapii. Obecně platí, že je snaha snížit jeho koncentraci vhodnou kombinací zejména s vysokomolekulárními kryoprotektivy, případně začlenit do kryokonzervačního protokolu jinou stejně účinnou alternativu. Na druhou stranu je pravdou, že cytotoxické účinky DMSO se vytvářejí zejména po delší době expozice, s vyšší koncentrací a v kultuře při teplotách zejména těsně nad bodem mrazu (66). Stále však platí, že u pacientů po infuzi rozmrazených hematopoetických kmenových buněk, kde byl použit DMSO jako KPA, byly popsány nežádoucí reakce.

V této práci jsme KBZD izolovali od mladých dárců ve věkovém rozmezí 13 – 18 let. Obecně platí, že s rostoucím věkem dárce se negativně ovlivňují vlastnosti izolovaných KB (108). Jedním z důvodů při izolaci může být fakt, že s rostoucím věkem pacienta se snižuje dostupné množství tkáně zubní dřeně díky apozici sekundárního i terciálního dentinu, a tím i množství potencionálně izolovaných KBZD (109). Guerrero-Jiménez a kol. ve své studii studovali histologické, morfologické i váhové rozdíly v zubní dřeni izolované od dárců ve věku od 5 – 25 let, respektive z dočasných řezáků, stálých premolárů a molárů a přespočetných zubů. Obecně platilo, že nejvíce solidní tkáně izolovali z molárů, zatímco nejméně z dočasných řezáků. Na druhou stranu i přes menší množství se jednalo o více buněčnou tkáň, a to i v případě přespočetných zubů. Přespočetné zuby jsou navíc často extrahovány v časném věku pacienta (111), kdy jejich klinické využití ještě většinou nebývá zapotřebí. Právě z těchto důvodů je nutné izolované KBZD charakterizovat a uskladnit v dostatečném množství pro budoucí případné využití. Je prokázáno, že kmenové buňky zubní dřeně s rostoucím věkem pacienta ztrácejí proliferační schopnost, diferenciační potenciál, a navíc dochází i k redukci jejich množství (110).

V současnosti je upřednostňována kryokonzervace již izolovaných, charakterizovaných KBZD než tkáně zubní dřeně nebo celých zubů. Ze dvou technik izolace KBZD, je metoda enzymatického štěpení zubní dřeně více přijímána. I přes to, že se jedná o vícekrokový postup, který je technicky náročnější než metoda spontánního vycestování. V současné literatuře nebyl doposud publikován jednoznačný důkaz, že by metoda enzymatického štěpení byla výrazněji účinnější než metoda spontánního vycestování z izolované tkáně.

Pro enzymatické štěpení solidní zubní tkáně je zapotřebí přítomnost enzymů. Ferrúa a kol. (19), ve své přehledové studii vycházející z 202 článků zjistili 19 různých protokolů, které byly úspěšně využity k izolaci KBZD. Nejčastěji se jednalo o směs kolagenázy typu I, štěpící kolagen typu I a dispázy, štěpící fibronektin a kolagen typu IV (112), (113). Doba enzymatického štěpení zubní dřeně touto kombinací v poměru 1:1 je 30 - 60 minut. Rozmezí se liší dle velikosti fragmentů. Dalšími popisovanými enzymy byly například trypsin nebo DNáza. Doba působení enzymů je v izolačním protokolu stěžejní a může ovlivnit viabilitu izolovaných kmenových buněk. Při dlouhém působení se může enzym stát pro buňky až toxickým (114). Vždy je proto snaha zkrátit dobu působení enzymu na minimum. Prvním předpokladem, jak zkrátit dobu enzymatické izolace, je důkladné rozmělnění solidní tkáně na fragmenty. K tomuto účelu jsme využili efektivní metodu homogenizace.

Při tomto způsobu zpracování dochází ke vzniku homogenní suspenze rozmělněním tkáně třením o stěny nádoby za přítomnosti vhodného roztoku. Nejčastěji se využívá izotonický roztok, tak aby se zabránilo osmotickému poškození. Principem enzymatické izolace KBZD je proteolýza s cílem získat suspenzi buněk ze solidní tkáně, respektive zubní dřevě. Trypsin je proteolytický enzym využívaný v laboratoři tkáňových kultur zejména pro pasážování buněk, kdy štěpí proteiny odpovědné za adhezi buněk ke dnu kultivační nádoby. V naší studii jsme se proto zaměřili na využití trypsinu i k samotné izolaci KBZD, a to v koncentraci trypsinu 0,05 %. Dle dostupných údajů v současné literatuře se jednalo o první protokol využívající trypsin pro izolaci KBZD, kdy izolované buňky byly proliferačně aktivní až do 8. pasáže a měly viabilitu přes 90 %. Navíc jsme dobu enzymatické izolace zkrátily na 10 minut oproti popisovaným 30 až 60 minutám při využití směsi kolagenázy typu I a dispázy. Časová úspora je benefitní, zejména při izolaci většího počtu vzorků, a zároveň minimalizujeme dobu působení proteolytického enzymu, který při prolongovaném působení může negativně ovlivňovat vlastnosti izolovaných buněk. Salehinejad a kol. (115) izolovali mezenchymální kmenové buňky z pupečníku pomocí směsi kolagenázy/hyaluronidázy/trypsinu, kolagenázy/trypsinu a pouze trypsinu. Kmenové buňky izolované použitím trypsinu po 30 dnech kultivace dále neproliferovaly.

V této práci jsme izolovali celkem deset linií KBZD z deseti extrahovaných stálých zubů s různým stupněm vývoje kořene. Jednalo se o čtyři retinované či semiretinované třetí moláry, jeden semiretinovaný druhý molár, tři první premoláry a jeden nadpočetný zub, meziodent. Spektrum získaných zubů v naší práci odpovídalo i obecnému trendu, kdy nejvíce jsou pro experimentální účely využívány právě třetí moláry, následovány premoláry, které jsou extrahovány z ortodontických důvodů, a třetími nejčastěji využívanými jsou přespočetnými zuby (19).

Pro uchování buněk a tkání po dobu šesti a dvanácti měsíců jsme využili metodu neřízené kryokonzervace a využitím 10% DMSO jako kryoprotektiva. Sledovali jsme vliv této metody i použitého kryoprotektiva na morfologii, proliferační aktivitu, viabilitu, fenotyp, relativní délku telomer a diferenciační potenciál zamrazených kmenových buněk zubní dřevě.

Pro zachování standardů GMP jsou důležité dva aspekty, a to stanovení kryokonzervačního média, a tím použitého kryoprotektiva, a stanovené kryokonzervační techniky (116).

Při kultivaci rozmrazených KBZD jsme nepozorovali změnu v jejich morfologii, a to ani u KBZD zmrazených po dobu šesti ani dvanácti měsíců. Dominantní tvar, který jsme

pozorovali u všech skupin buněk, byl vřetenovitý s dlouhými výběžky a rozvinutým cytoskeletem. Tento tvar je popisován zejména u KBZD, které byly izolovány z perivaskulární zóny zubní dřene (22). U linie KBZD04 jsme po izolaci pozorovali také více okrouhlý tvar s menším počtem výběžků, tento tvar je naopak pozorován u KBZD získaných ze subodontoblastické zóny (22). Zubní dřeň zejména stálých zubů je rozdělena do charakteristických vrstev, vnější vrstva odontoblastů s disperzně uloženými buňkami a Weilovou nebuněčnou zónou (subodontoblastická zóna) a vnitřní perivaskulární zóna. Centrálně poté procházejí arterioly, vénuly a nervy. U dočasných zubů není toto rozdělení tak patrné. Větší denzita nediferenciováných mezenchymálních buněk, fibroblastů se nachází v perivaskulární a centrální zóně (111). Z těchto důvodů je i vřetenovitý tvar pozorován u izolovaných KBZD častěji.

U kryokonzervovaných KBZD byl medián velikosti buněk menší než u nekryokonzervovaných KBZD, a však změna velikosti nebyla statisticky významná. Tento jev si vysvětlujeme tím, že došlo k určité selekci a eliminaci různorodých subpopulací KBZD vlivem stresu způsobeného při kryokonzervaci, resp. rozmrazení KBZD. Obecně platí, že větší KBZD se obtížněji vyrovnávají se vzniklým osmotickým stresem při tvoření ledových krystalů, a tím dochází snadněji k jejich lýze (37).

Při pozorování vlivu neřízené kryokonzervace s použitím 10% DMSO jako kryoprotektiva na viabilitu KBZD jsme u buněk zmrazených po dobu 6 měsíců pozorovali pokles viability naměřené po rozmrazení ve 2. pasáži v mediánu na 85,7 %, tedy nižší než u kontrolní skupiny buněk (91,8 %). Viabilita měřená v 8. pasáži se již od kontroly statisticky významně nelišila a medián byl 92 %. Při neřízené kryokonzervaci dochází k rychlému nekontrolovanému poklesu teploty při zmrazení KBZD nejdříve na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, při které jsou buňky nadále uchovávány. Při rychlém nastolení nízkých teplot, hrozí riziko tvorby intracelulárních krystalů ledu, naopak se snižuje potencionálně toxický vliv DMSO, který je vyšší při vyšších teplotách (66). Snižování viability měřená v 2. pasáži, může být proto spojeno s poškozením buněk vlivem samotné techniky a jednotlivých kroků při kryokonzervaci, resp. rozmrazování. Pravděpodobně více buněk podlehló lýze či jinému druhu poškození buněčné membrány, které po rozmrazení bylo pro buňky fatální. Po eliminaci těchto buněk postupnou kultivací a pasážováním došlo na konci kultivace k obnovení viability buněk opět přes 92 %. Tento jev jsme naopak nepozorovali u buněk kryokonzervovaných po dobu dvanácti měsíců. U nich byl efekt zcela opačný. Medián

viability po rozmrazení byl přes 91,0 %, zatímco po kultivaci těchto buněk došlo k poklesu na 88,9 % v 8. pasáži. Ovlivnění viability v tomto případě může být způsobeno pozdními vlivy kryokonzervace, kdy nedošlo k obnovení „funkčního“ zdraví kryokonzervovaných buněk, což se projevilo během kultivace, že zbylé viabilní buňky po roční kryokonzervaci nebyly schopné kompenzovat stresovou situaci jako v případě půlroční kryokonzervace. Obecně platí, že v průběhu kryokonzervace je mnoho kroků, které spolu souvisí a které mohou negativně ovlivňovat množství viabilních buněk po kryokonzervaci. Mezi ně patří výběr KPA a způsob jeho přidání k buňkám, které mají být kryokonzervovány, výběr kryokonzervačního protokolu, rychlost poklesu teplot, způsob skladování, teplota při skladování, způsob a rychlost rozmrazování, a s tím související odstranění použitého KPA, nakonec také aplikace a načasování spolehlivé metody měření viability. Načasování doby měření viability je považováno za zásadní, má-li být dosaženo spolehlivého vyhodnocení procesu kryokonzervace. Vyhodnocení viability ihned po rozmrazení se nepovažuje za vhodné. Pravděpodobně nadhodnocuje výsledek, jelikož buňky podléhají buněčné smrti vlivem kryokonzervace zejména během 48 hodin po jejich rozmrazení. Pokud je viability měřena okamžitě po rozmrazení tyto zpožděné ztráty buněk nejsou započítány. Navíc nevýhodou námi zvolené techniky měření viability je ta, že neodráží „funkční zdraví“ buněk. Využití trypanové modře je nenáročná technika měření viability, která však identifikuje pouze buňky s porušenou integritou buněčné membrány. Neodráží se tak jejich funkčnost. Z těchto důvodů nelze výsledek měřené viability brát samostatně, ale je nutné jej brát v souvislosti s například proliferační aktivitou buněk. Na druhou stranu, je třeba zdůraznit, že i viability okolo 89 % po jednorroční kryokonzervaci KB je považován za úspěšný výsledek.

Vysoká proliferační aktivita je velmi důležitou vlastností KBZD potřebnou pro jejich možné terapeutické uplatnění. Je tedy nutné zachovat ji po kryokonzervaci v co nejméně alterované podobě. Jak kontrolní skupina KBZD, tak kryokonzervované skupiny KBZD zůstaly proliferačně aktivní. Nezmrazené KBZD do 8. pasáže dosáhly v mediánu 47,3 populačních zdvojení. U kryokonzervovaných KBZD po dobu dvanácti měsíců byla hodnota nižší, 44,6 populačních zdvojení. Rozdíl však nebyl statisticky významný. Došlo i k prodloužení population doubling time u buněk kryokonzervovaných po dobu šesti a dvanácti měsíců, ale opět tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Kryokonzervované KBZD potřebovaly delší dobu na obnovení „funkčního“ zdraví po kryokonzervaci,

respektive rozmrazení. Stejný trend pozorovali i ostatní autoři. Například Al-Sagi a kol. (117) ve své studii došli k závěru, že mezenchymální kmenové buňky (hematopoetické a KB izolované z tukové tkáně) kryokonzervované v kryokonzervačním médiu bez přidaného fetálního bovinního séra a 10% DMSO jako kryoprotektivum v porovnání s nezmrazenými KB vykazovaly prodloužení DT po kryokonzervaci.

Linie KBZD02, KBZD03, KBZD04 proliferovaly jak před kryokonzervací, tak po kryokonzervaci, pomaleji než ostatní linie KBZD. V případě linií KBZD02, KBZD03 se jednalo o linie získané od jedné 16-ti leté celkově zdravé pacientky. Linie KBZD02 byla izolována z retinovaného druhého moláru, linie KBZD03 z retinovaného třetího molárů. Linie KBZD04 byla izolována od 14-ti leté pacientky z plně prořezaného prvního premoláru extrahovaného z ortodontických důvodů. Neobjevili jsme tedy žádné souvislosti s věkem, typem zubu. Tento rozdíl přisuzujeme tedy interindividuální variabilitě pacientů. Tutu charakteristiku si linie zachovaly i po kryokonzervaci, kdy proliferovaly pomaleji než ostatní kryokonzervované linie KBZD.

S proliferační aktivitou KB souvisí i délka telomer v sekvenci DNA buněk. Telomery jsou umístěné na koncové části chromosomu, kdy u obratlovců jsou tyto koncové úseky tvořeny TTAGGG opakující se nukleotidovými sekvencemi. Jsou to úseky zejména bohaté na guanin. Při každém dělení buněk, a tím replikaci DNA, dochází ke ztrátě těchto koncových úseků. Postupné zkracování telomer je považováno za hlavní příčinu stárnutí buněk a nastartování jejich buněčné smrti apoptózou, čímž je zabráněno nekontrolovatelnému dělení. Ke ztrátě této kontroly dochází při nádorovém bujení (118). Na rozdíl od somatických buněk, kmenové buňky, ale také nádorové buňky, mají kompenzační mechanismus vyrovnávající ztrátu délky telomer. Telomeráza je enzym pracující jako reverzní transkriptáza, který má prodlužovat ztracené konce chromozomů. Obsahuje RNA molekulu (tzv. telomerázová RNA komponenta, TERC) o délce několika desítek až stovek nukleotidů, která slouží jako předloha (templát) pro syntézu DNA (119). Právě zajištění homeostázy mezi délkou telomer a aktivitou telomerázy je důležité během embryonálního vývoje (120). Obecně platí, že homeostáza délky telomer, respektive aktivity telomerázy, je determinující faktor v proliferační aktivitě buněk, a tím i v zajištění homeostázy tkání. Ke snížení aktivity telomerázy naopak dochází k rostoucím věkem (121). V této dizertační práci jsme pro měření relativní délky telomer v 2. a 7. pasáži u nezmrazených a zmrazených KBZD použili qPCR analýzu. Pro analýzu jsme počítali s rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (kde $\Delta Ct = Ct_{telomery}$

– Ct^{“single copy” gen}). Pro interní standard jsme použili housekeeping gen 36B4, kódující acidický ribozomální fosfoprotein. Přestože se jednalo o kmenové buňky, u nichž by ztráta telomer měla být kompenzována aktivitou telomerázy, pozorovali jsme signifikantní zkrácení relativní délky telomer u nezmrazených i zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců s rostoucí dobou kultivace, respektive s navyšováním počtu pasáží. U KBZD kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců bylo zkrácení délky úseku telomer oproti negativní kontrole na hranici statistické významnosti. Procesem neřízené kryokonzervace nedošlo k signifikantní změně tohoto trendu. Zkrácení relativní délky telomer vysvětlujeme tím, že izolované buňky vysoce proliferovaly v *in vitro* podmínkách při kultivaci do 8. pasáže. V těchto uměle navozených stresových podmínkách nebyla kompenzace k udržení délky telomer dostačující, což vedlo k poklesu jejich replikační kapacity, nebo proliferační aktivita byla rychlejší než schopnost telomerázy syntetizovat zkrácené úseky telomer. Tomuto závěru nasvědčuje i fakt, že u kryokonzervovaných buněk jsme pozorovali delší relativní délku telomer měřenou po rozmrazení v 2. pasáži. Kryokonzervované buňky byly standardně kryokonzervovány v 1. pasáži a po rozmrazení byl nutný delší čas kultivace než byly KBZD pasážovány do 2. pasáže, pravděpodobně z důvodu vyrovnání se se stresem plynoucím z procesu kryokonzervace. Po tuto dobu, mohlo dojít ke kompenzaci ztrát telomer aktivitou telomerázy. Lineární korelace mezi prodloužením DT v 2. pasáži kryokonzervovaných KBZD a relativní délkou telomer měřenou v 2. pasáži byla signifikantní, jak pro skupinu kryokonzervovanou po dobu 6 měsíců, tak pro skupinu kryokonzervovanou po dobu 12 měsíců. U buněk kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců jsme navíc zjistili statisticky významný lineární vztah mezi zkrácením relativní délky telomer měřené mezi 2. a 7. pasáží a prodloužením DT a snížením počtu dosažených PD do 7. pasáže.

Vzhledem k heterogenitě populace mezenchymálních kmenových buněk a rozdílným technikám izolace používaných v laboratoři jsou charakteristické znaky nekonstantní. Obecně platí, že KB mají schopnost adherovat k přilnavému povrchu, vyjadřovat specifické povrchové antigeny a schopnost diferenciovat minimálně v chondrogenní, osteogenní a adipogenní buněčnou řadu (114).

Fenotyp čerstvě izolovaných i kryokonzervovaných buněk jsme měřili pomocí průtokové cytometrie v 3. a 7. pasáži. Buňky byly obarveny imunofluorescenčními polyvalentními protilátkami konjugovanými s fluorescein izothiokyanátem (FITC) a konjugovanými

s fykoerytrinem (PE) proti povrchovým CD znakům. Vyjádření těchto znaků jsme hodnotili podle klasifikačních kritérií: <10 % - nevyjádřeno, 11 – 40 % - nízká exprese, 41 – 70 % - střední exprese, >71 % - vysoká exprese znaku (106).

Analyzovali jsme velké spektrum povrchových CD znaků. Čerstvě izolované i kryokonzervované buňky vysoce exprimovaly znaky typické pro mezenchymální kmenové buňky, tj. **CD29**, **CD44**, **CD90**. Dále byly vysoce vyjádřeny tzv. „stromal-associated“ antigeny **CD13** (aminopeptidáza N, molekula spojována s angiogenezí, buněčnou adhezí), **CD73** (5'-nukleotidáza) a **CD166** („*activated leukocyte cell adhesion molecule*“, ALCAM), tj. adhezivní molekula zodpovědná za regulaci denzity a za migraci buněk. Naopak negativní exprese znaku **CD34** („*hematopoietic stem cell marker*“, prekursor hematopoetických buněk) a nízká pozitivita znaku **CD45** („*recognize leukocyte common antigen*“, receptor typu C proteinové tyrosin fosfatázy, vyskytující se v různých isoformách na všech hematopoetických buňkách mimo červených krvinek a plazmatických buněk) potvrzuje, že hematopoetické prekurzory nejsou v zubní dřeni přítomny. Lehce zvýšenou expresi znaku **CD45** vysvětlujeme přítomností ITS v kultivačním médiu. Takto obohacené médium ponechává KBZD méně diferenciované a tyto KB mají poté variabilnější diferenciační potenciál (122). Při porovnání výsledků fenotypové analýzy měřené u čerstvě izolovaných a kryokonzervovaných buněk byly některé změny statisticky významné. U některých znaků byla tato změna stále ve stejném rozmezí stanovených klasifikačních kritérií. Jmenovitě se jednalo o znaky **CD13**, **CD18**, **CD29**, **CD44**, **CD45**, **CD49f**, **CD73**, **CD90**, **CD 105**, **CD166**, **CD271**, **HLA II** a **STRO 1**. K statisticky významné změně exprese i dle klasifikačních kritérií jsme pozorovali u znaků **CD31**, kdy došlo k navýšení exprese v 3. i 7. pasáži KBZD kryokonzervovaných po dobu dvanácti měsíců; **CD106**, kdy došlo k navýšení exprese zejména u buněk kryokonzervovaných po dobu dvanácti měsíců; **CD117**, kdy došlo k poklesu exprese u KBZD kryokonzervovaných po dobu šesti měsíců; **CD146**, kdy došlo k navýšení exprese u obou skupin kryokonzervovaných kmenových buněk; **HLA I** kdy došlo k poklesu v 3. pasáži KBZD zmrazených po dobu šesti měsíců a v 7. pasáži u KBZD zmrazených po dobu dvanácti měsíců. **CD106** je označována za VCAM-1 molekulu, z anglického termínu „*vascular cell adhesion molecule-1*“. Její zvýšená exprese je zejména v zánětlivých procesech, kdy jedním z induktorů mohou být volné kyslíkové radikály (123). Je dokázáno, že se během procesu kryokonzervace také tvoří volné kyslíkové radikály, což může vysvětlovat i zvýšenou expresi této povrchové molekuly u kryokonzervovaných

buněk po dobu šesti nebo dvanácti měsíců. S tímto souvisí i molekula **CD31**, která je označována jako PECAM-1, z anglického termínu „*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*“. Její zvýšená exprese může nastat opět vlivem volných kyslíkových radikálů (124). Další možností může být i fakt, že zvýšená exprese CD31 byla popsána i u nezralých kmenových buněk zubní dřeně (125). Zvýšená nutnost kompenzovat buněčné ztráty během kryokonzervace může vést ke zvýšené přítomnosti nezralých kmenových buněk. **CD146** je označována jako MCAM molekula, z anglického termínu „*melanoma cell adhesion molecule*“. Její zvýšená exprese byla pozorována u vysoce proliferativních buněk (126), kdy kryokonzervací mohlo dojít k určitému nárůstu CD146 pozitivních buněk (CD146+) při nutnosti kompenzovat zaniklé buňky. Dále je zvýšená exprese CD146 popisována u buněk reagující na přítomnost volných kyslíkových radikálů zejména při zánětech či jiných stresových situacích, kdy je nutná angiogeneze (127). Takovou stresovou situací může být samozřejmě i samotný proces kryokonzervace. **CD117** je molekula označována KIT, z anglického termínu „*tyrosine-protein kinase*“. Je to signální molekula uplatňující se například v migraci a diferenciaci buněk (128). Při naší analýze i přes pokles se molekula exprimovala ve více než 32 % v mediánu ze všech linií KBZD kryokonzervovaných po dobu 6 měsíců. Navíc dle Bonferroniho modifikace hladina významnosti $p=0,05$ nebyla statisticky významná. Při ověřování schopnosti diferenciaci i buňky kryokonzervované po dobu 6 měsíců úspěšně diferenciovaly ve zralé buněčné typy. Nárůst buněk po kryokonzervaci s nižším vyjádřením **HLA I** na svém povrchu může být pozitivním jevem, jelikož bylo popsáno, že takovéto mezenchymální kmenové buňky mají nižší imunogenní potenciál (129). Stejně snížení exprese **HLA I** po kryokonzervaci a následném rozmrazení popisují i ve své studii Catral a kol. (130). Obecně však lze říci, že si KBZD kryokonzervované po dobu šesti a 12 měsíců, až na některé výjimky, zachovaly stabilní fenotyp shodný s fenotypem čerstvě izolovaných KBZD.

Diferenciaci ve zralé buněčné typy je dalším kritériem „kmenovosti“ buněk. Diferenciaci *in vitro* spočívá ve vystavení buněk specifickým modulátorům signálních drah a v manipulaci s podmínkami buněčné kultury k napodobení přirozených drah za účelem produkce daného buněčného typu. Během embryonálního vývoje se zub vyvíjí z orálního ektodermu a ektomezenchymu, pocházejícího z neurální křivky. Díky tomu KB izolované z tkání souvisejících se zubem mají schopnost diferenciaci ve velké spektrum zralých buněčných typů, v odontoblastům podobné buňky, osteoblastům podobné buňky,

adipocyty, neurální buňky, chondroblastům podobné buňky, myoblasty, fibroblasty, endoteliální buňky, buňky produkující insulin. Velká variabilita diferenciačního potenciálu tyto buňky upřednostňuje k výzkumu možného terapeutického uplatnění. Počáteční výsledky výzkumů *in vitro* ukazují na možnost budoucího využití KBZD v léčbě endokrinních poruch (diabetu), akutního infarktu myokardu, v regenerativní léčbě onemocnění kostí (osteoporózy), chrupavek (osteoartritidy), neurodegenerativních onemocnění (léčby Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby, cévní mozkové příhody, poškození míchy, periferního nervu po úrazu) (131).

V této práci jsme hodnotili schopnost diferenciace izolovaných KBZD před a po kryokonzervaci ve tři zralé buněčné typy, v osteoblastům podobné buňky, chondroblastům podobné buňky a v adipocyty. Využívali jsme komerčně dostupná diferenciační média a následovali standardizované protokoly. Výsledky diferenciace po stanovené době tři až čtyř týdnů jsme ověřovali histologickým barvením a imunohistochemicky. U všech skupin buněk, kontrolní nezamrazené skupiny i zamrazených skupin po dobu šesti a dvanácti měsíců, jsme úspěšně prokázali diferenciaci v osteoblastům podobné a chondroblastům podobné buňky současně s průkazem tvorby kostní a chrupavčité extracelulární matrix. Avšak i přes proadipogenně silně působící médium buňky diferencovaly v adipocyty jen velmi omezeně. Schopnost diferenciace v adipocyty zvoleným protokolem jsme ověřovali u linií KBZD01, KBZD02, KBZD03 a KBZD04, kdy výsledky byly shodné. Z těchto důvodů jsme dále schopnost diferenciace v adipocyty po kryokonzervaci již neprováděli. Je pravdou, že kritéria pro potvrzení, že se jedná o kmenové buňky, se tvořila zejména pro kmenové buňky izolované z kostní dřeně. Na rozdíl od mezenchymálních buněk z kostní dřeně, které fyziologicky inklinují k adipogenní buněčné řadě, jelikož i v průběhu života je kostní dřeň nahrazována tukovou tkání, KBZD tuto vlastnost nemají a v tukové buňky přirozeně nediferencují. Stejných výsledků dosáhli i Gronthos a kol. ve své studii, v níž popsali, že KBZD v adipocyty diferencují pouze velmi omezeně (11).

6. Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv neřízené kryokonzervace s použitím 10 % DMSO na kmenové buňky zubní dřene. Dle získaných výsledků jsou kmenové buňky zubní dřene schopné odolat stresovým podmínkám a mohou být efektivně kryokonzervovány metodou neřízené kryokonzervace minimálně po dobu 12 měsíců. Kryokonzervované buňky si po rozmrazení a při následující kultivaci zachovaly charakteristický vřetenovitý tvar jako čerstvě izolované buňky. Pozorovali jsme však, že kryokonzervace měla vliv na velikost buněk. Hodnota mediánu velikosti buněk byla po kryokonzervaci nižší než jeho hodnota u kontrolní skupiny. Čerstvě izolované KBZD si zachovaly viabilitu přes 90 % po celou dobu kultivace. KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců těchto hodnot dosáhly až na konci kultivace. U buněk kryokonzervovaných po dobu dvanácti měsíců jsme v průběhu kultivace pozorovali pokles viability pod 89 %, avšak i tento výsledek se dá hodnotit jako úspěšný v porovnání s ostatními studiemi. Kryokonzervované buňky byly stále proliferačně aktivní. U kryokonzervovaných buněk jsme pozorovali prodloužení DT okamžitě po rozmrazení v 2. pasáži, kdy buňky potřebovaly delší čas na kompenzaci ztrát nevitálních buněk vlivem kryokonzervace, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Od 3. pasáže se rychlost proliferační aktivity přiblížila rychlosti kontrolní skupiny. Větší rozdíl jsme opět pozorovali až ke konci kultivace, zejména u buněk zmrazených po dobu 12 měsíců. Jak u čerstvě izolovaných, tak kryokonzervovaných buněk jsme pozorovali zkrácení relativní délky telomer s rostoucím počtem pasáží. U kryokonzervovaných buněk došlo k prodloužení relativní délky telomer v 2. pasáži, což korelovalo s prodloužením DT u jednotlivých linií v 2. pasáži. Po roční kryokonzervaci KBZD diferenciovaly v osteoblastům a chondroblastům podobné buňky a produkovaly extracelulární matrix dané tkáně. I přes proadipogenně silně působící diferenciační médium se nám nepodařilo čerstvě izolované buňky diferenciovat v adipocyty, proto jsme u kryokonzervovaných buněk tuto schopnost dále neověřovali.

V této studii jsme jako kryoprotektivum využili 10% DMSO. DMSO je považován za standardní kryoprotektivum pro jeho efektivnost při kryokonzervaci velkého spektra buněk. Využití DMSO však sebou nese i rizika plynoucí z jeho cytotoxického efektu. V naší budoucí práci bychom se proto rádi zaměřili ideálně na jeho eliminaci z kryokonzervačního média, případně alespoň na snížení jeho koncentrace kombinací s vysokomolekulárními kryoprotektivy. Efektivita kryokonzervačního média, respektive použitého kryoprotektiva,

je dána zejména stanovením rovnováhy mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím během kryokonzervace, tak aby byly buňky co nejlépe chráněny.

Použitá literatura

- (1) Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, presents and future. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):68.
- (2) Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2015;7(5):839–851.
- (3) Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778–784.
- (4) Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393–403.
- (5) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–4295.
- (6) Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477–488.
- (7) Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004;50(5):1522–1532.
- (8) De Bari C, Dell’Accio F, Luyten FP. Human periosteum derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*. 2001;44(1):85–95.
- (9) Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792–806.
- (10) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):136.
- (11) Gronthos S, Brahimi J, Li W et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(G): 531-535.
- (12) Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-5812.
- (13) Seo BM, Miura M, Gronthos S et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149–155.

- (14) Morsczeck C, Götz W, Schierholz J et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155–165.
- (15) Sonoyama W, Liu Y, Fang D et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1, e79.
- (16) Ikeda E, Yagi K, Kojima M et al. Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation.* 2008;76:495-505.
- (17) Zhang Q, Shi S, Liu Y et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol.* 2009;183(12):7787–7798.
- (18) Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(1):95–112.
- (19) Ferrúa CP, Centeno EGZ, Rosa LC et al. How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Braz. Oral Res.* 2017;31:e87.
- (20) Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008;132(4):598–611.
- (21) Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1–2):7–25.
- (22) Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R et al. Human dental pulp stem cells–isolation and long-term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2007;50(3):195–201.
- (23) Laino G, D’Aquino R, Graziano A et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005;20(8):1394–1402.
- (24) Gronthos S, Brahimi J, Li W et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531–535.
- (25) Arthur A, Rychkov G, Shi S et al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008;26(7):1787–1795.
- (26) Zhang W, Walboomers XF, Shi S et al. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813–2823.
- (27) Mullen F, Critser JK. The science of cryobiology. *Cancer Treat Res.* 2007;138:83–109.

- (28) Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res.* 2015;18(5):422-36.
- (29) Neutelings T, Lambert CA, Nusgens BV, Colige AC. Effects of Mild Cold Shock (25°C) Followed by Warming Up at 37°C on the Cellular Stress Response. *PLoS One.* 2013;23;8(7):e69687.
- (30) Weber MH, Mrahiel MA. Coping with the cold: The cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357:895–907.
- (31) Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, Rudenko S. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology.* 2001;42(2):88-102.
- (32) Mazur P, Schneider U, Mahowald AP. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology.* 1992;29(1):39-68.
- (33) Wada H, Gombos Z, Murata N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature.* 1990;347:200-203.
- (34) Sala JM, Lafuente MT. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *J Agric Food Chem.* 1999;47:2410–2414.
- (35) Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 2005;72:230–238.
- (36) Guan N, Blomsma SA, Fahy GM, Groothuis GM, de Graaf IA. Analysis of gene expression changes to elucidate the mechanism of chilling injury in precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro.* 2013;27:890–899.
- (37) Gao D, Critser JK. Mechanismus of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR J.* 2000;41:187-196.
- (38) Mazur P. Equilibrium quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 1990;17:53-92.
- (39) Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc Lond B.* 1957;147:427-434.
- (40) Mazur P, Leibo SP, Chu E. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res.* 1972;71(2):345-55.

- (41) Meryman HT. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1974;3(0):341-63.
- (42) Levitt J. A sulfhydryl disulphide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J Theor Biol.* 1962;3:355.
- (43) Li Y, Ma T. Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *BioResearch Open Access.* 2012;1(5), 205–214.
- (44) Hoon T, Choel S, Hyun J et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research.* 2017;6(1):12–18.
- (45) Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil.* 1995;26(4):145–8.
- (46) Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:119–35.
- (47) Meryman HT. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. *Transfusion.* 2007;47:935–945.
- (48) Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems - review. *Transfusion and Apheresis Science.* 2012;46:137–47.
- (49) Towey JJ, Dougan L. Structural examination of the impact of glycerol on water structure. *J Phys Chem B.* 2012;116:1633–164.
- (50) Jadzyn J, Świergiel J. On similarity of hydrogen-bonded networks in liquid formamide and water as revealed in the static dielectric studies. *Phys Chem Chem Phys.* 20012;14: 3170–3175.
- (51) Fernandez O, Bethencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clement C. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.* 2010;15(7):409–17.
- (52) Storey KB. Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. *Am J Physiol.* 1990;258(3 Pt 2):R559–68.
- (53) Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science.* 1984;223(4637):701–3.
- (54) Nohe B, Burchard M, Zanke C et al. Endothelial accumulation of hydroxyethyl starch and functional consequences on leukocyte-endothelial interactions. *Eur Surg Res.* 2002;34(5):364–72.

- (55) Brown JH. Dimethyl sulfoxide (DMSO)-- a unique therapeutic entity. *Aviat Space Environ Med.* 1982;53(1): 82–8.
- (56) Rubin LF. Toxicity of dimethyl sulfoxide alone, and in combination. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;243:98-103.
- (57) Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape *in vitro*. *Sci Rep.* 2019;9(1):4641.
- (58) Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology.* 1986;23(1):14-27.
- (59) Capriotti K, Capriotti J. Dimethyl sulfoxide: History, chemistry, and clinical utility in dermatology. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology.* 2012;5(9):24-6.
- (60) Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm.* 1985;5(1–2):1–33.
- (61) Paul MM. Interval therapy with dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1967;141(1): 586–98.
- (62) Rosenbaum EE, Herschler RJ, Jacob SW. Dimethyl Sulfoxide in Musculoskeletal Disorders. *JAMA.* 1965;192:309–13.
- (63) Hucker HB, Miller JK, Hochberg A, et al. Studies on the absorption, excretion and metabolism of dimethylsulfoxide (DMSO) in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1967;155(2):309–17.
- (64) Kligman AM. Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide. *JAMA.* 1965;193:796–804.
- (65) Kollerup Madsen B, Hilscher M, Zetner D, Rosenberg J. Adverse reactions of dimethyl sulfoxide in humans: a systematic review. Version 2. *F1000Res.* 2018;7:1746.
- (66) Wang X, Hua TC, Sun DW, Liu B, Yang G, Cao Y. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me₂SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology.* 2007;55:60–65.
- (67) Kirchner B, Reiher M. The secret of dimethyl sulfoxidewater mixtures. A quantum chemical study of 1DMSOnwater clusters. *J Am Chem Soc.* 2002;124:6206–6215.
- (68) Anchooguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, Crowe LM. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1104:117–122.

- (69) Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(4):513–522.
- (70) Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(22):10119–22.
- (71) Fleming Glass K, Longmire E, Hubel A. Optimization of a microfluidic device for diffusion-based extraction of DMSO from a cell suspension. *Int J Heat Mass Transfer.* 2009;6:247–53.
- (72) Akkök ÇA, Holte MR, Tangen JM, Østenstad B, Bruserud O. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. *Transfusion.* 2009;49(2):354–61.
- (73) Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(4):469–76.
- (74) Hubel A. Advancing the preservation of cellular therapy products. *Transfusion.* 2011;51(Suppl 4):82S–6S.
- (75) Ding W, Zhou X, Heimfeld S, Reems JA, Gao D. A steady-state mass transfer model of removing CPAs from cryopreserved blood with hollow fiber modules. *J Biomech Eng.* 2010;132(1):011002.
- (76) Lindemann D, Werle SB, Steffens D. Effects of Cryopreservation on the characteristics of Dental Pulp Stem Cells of Intact Deciduous teeth. *Archives of oral biology.* 2014;59:970-7.
- (77) Oh YH, Che ZM, Hong JC et al. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank—a preliminary study. *Cryobiology.* 2005; 51(3):322–329.
- (78) Lindemann D, Werle SB, Steffens D. Effects of Cryopreservation on the characteristics of Dental Pulp Stem Cells of Intact Deciduous teeth. *Archives of oral biology.* 2014;59:970-76.
- (79) Woods J, Perry BC, Hockema JJ et al. Optimized Cryopreservation Method for Human Dental Pulp-Derived Stem Cells and Their Tissues of Origin for Banking and Clinical Use. *Cryobiology.* 2009;59(2):150-7.

- (80) Gioventiu S, Andiollo G, Bonino F et al. A Novel Method for Banking Dental Pulp Stem Cells. *Transfusion and Apheresis Science*. 2012;47:199-206.
- (81) Perry BC, Zhou D, Wu X et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng C Methods*. 2008;14(2):149–56.
- (82) Spath L, Rotilio V, Alessandrini M et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med* 14. 2010;(6B):1635–1644.
- (83) Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother*. 2010; 37: 75–83.
- (84) Huang GT, Sonoyama W, Chen J et al. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(2):225–236.
- (85) Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Vis Exp*. 2012;69:4372.
- (86) Hilkens P, Gervois P, Fanton Y et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*. 2012;353(1):65–78.
- (87) Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T et al. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol*. 2004;49(1):59–69.
- (88) Thirumala S, Zvonic S, Floyd E et al. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog*. 2005;21(5):1511–24.
- (89) English D, Paterson AH, Bone G, McPherson TA. Cryopreservation of canine hematopoietic cells. *Clin. Invest. Med*. 1979;2:67-74.
- (90) Ha SY, Jee BC, Suh CS et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1779–85.
- (91) Huynh NC-N, Le SH, Doan VN, Ngo LTQ, Tran HLB. Simplified conditions for storing and cryopreservation of dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*. 2013;84:74–81.

- (92) Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol.* 2012;12:4.
- (93) Davies OG, Smith AJ, Cooper PR et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology.* 2014;69(2):342–7.
- (94) Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813–2823.
- (95) Papaccio G, Graziano A, d’Aquino R et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):319–325.
- (96) Detry G, Calvet L, Straetmans N et al. Impact of uncontrolled freezing and longterm storage of peripheral blood stem cells at -80 degrees C on haematopoietic recovery after autologous transplantation. Report from two centres. *Bone Marrow Transpl.* 2014;49:780–785.
- (97) Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(4):513-22.
- (98) Jadoon S, Adeel M. Cryopreservation of oocytes. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2015;27(1):22-8.
- (99) Arav A, Patrizio P. Technique of cryopreservation for ovarian tissue and whole ovary. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health.* 2019;13:1–5.
- (100) Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T et al. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol.* 2004;49(1):59–69.
- (101) Lee SY, Huang GW, Shiung JN et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2002;196:23-33.
- (102) Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *Cytotherapy.* 2001;3(5):377–386.
- (103) Röllig C, Babatz J, Wagner I et al. Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood—comparison between waterbath and dry warming device. *Cytotherapy.* 2002;4(6):551–5.

- (104) Triana E, Ortega S, Azgueta C et al. Thawing of cryopreserved hematopoietic progenitor cells from apheresis with a new dry-warming device. *Transfusion*. 2013;53(1):85–90.
- (105) Suchánek J, Nasry SA, Soukup T. The differentiation potential of human natal dental pulp stem cells into insulin-producing cells. *Folia Biol. (Praha)*. 2017;63:132-138.
- (106) Suchanek J, Visek B, Soukup T et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth - isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010;53(2): 93-99
- (107) Mokry J, Soukup T, Micuda S et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010;11 pages.
- (108) Raik S, Kumar A, Rattan V, Seth S, Kaur A, Bhatta Charyya S. (2019) Assessment of Post-thaw Quality of Dental Mesenchymal Stromal Cells After Long-Term Cryopreservation by Uncontrolled Freezing. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019; doi: 10.1007/s12010-019-03216-6
- (109) Raoof M, Yaghoobi MM, Derakhshani A et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dental Research Journal*. 2014;11:244–25.
- (110) Iezzi I, Pagella P, Mattioli-Belmonte M, Mitsiadis TA. The effects of ageing on dental pulp stem cells, the tooth longevity elixir. *Eur Cell Mater*. 2019;26(37):175-185.
- (111) Marytere Guerrero-Jiménez, Geovanny I, Nic-Can et al. In vitro histomorphometric comparison of dental pulp tissue in different teeth. *PeerJ*. 2019;7: e8212.
- (112) Fogarty WM, Griffin PJ. Production and purification of the metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Applied Microbiology*. 1973; 26(2):185–190.
- (113) Kühn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biology*. 1995; 14(6):439–44.
- (114) Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother*. 2010;37:75–83.
- (115) Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. 2012;48(2):75–83.

- (116) Abbasalizadeh S, Baharvand H. Technological progress and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies. *Biotechnol. Adv.* 2013; 31(8):1600–1623.
- (117) Al-Saqi SH, Saliem M, Quezada HC et al. Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(2):181-93
- (118) Rivera T, Haggblom C, Cosconati S, Karlseder J. A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(1):30-39.
- (119) Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 2011;27(8):295-306.
- (120) Aubert, G. Telomere dynamics and aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014;125:89–111.
- (121) Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:703–713.
- (122) Suchánek J, Suchánková Kleplová T, Kapitán M, Soukup T. The effect of fetal calf serum of human dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Králové).* 2013; 56(4):142-149.
- (123) Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1607-38.
- (124) Venkataramani V, Küffer S, Cheung KCP et al. CD31 Expression Determines Redox Status and Chemoresistance in Human Angiosarcomas. *Clin Cancer Res.* 2018;24(2):460-473.
- (125) Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS. Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: *An in vitro* study. *Journal of conservative dentistry.* 2013;16(5):423-428.
- (126) Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol.* 2008;36:1035–1046.
- (127) Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui TW. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Hum Cell.* 2018;31(2):127–138.

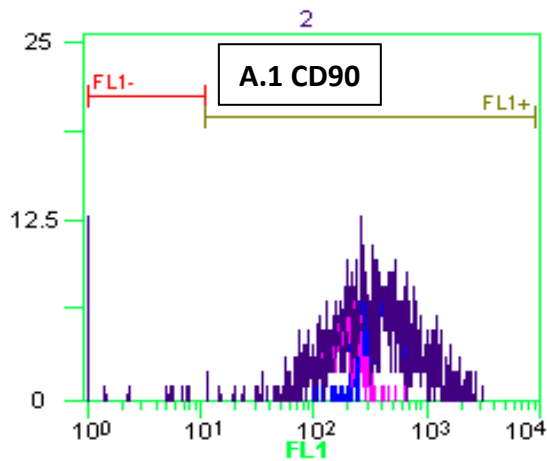
- (128) Foster BM, Zaidi D, Young TR, Mobley ME, Kerr BA. CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance, *Biomedicines*. 2018;6(1): 31.
- (129) Wang Y, Huang J, Gong L. The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. *iScience*. 2019;15:66–78.
- (130) Cattral MS, Warnock GL, Kneteman NM, Halloran PF, Rajotte RV. The effect of cryopreservation on the survival and MHC antigen expression of murine islet allografts. *Transplantation*. 1993;55(1):159-63.
- (131) Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2016;12:511–523.

Přílohy

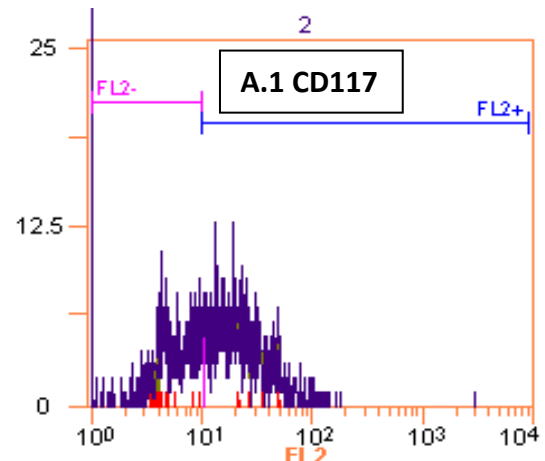
1. Přehled panelu CD znaků hodnoceného při fenotypové analýze

CD znak	Popis	Buněčná exprese	KBZD
CD10	Nepriřazená membránová metalloendoproteáza (MME): Regulace růstu B-lymfocytů, regulace zánětlivých a chemotaktických procesů zahrnující neutrofil	B a T lymfocyty, stromální buňky kostní dřevě, na buňkách u pacientů při chronické myeloidní leukémii, Burkittova lymfomu, myoepiteliální buňky vývodů prsní žlázy, žlučníku, fibroblasty, epiteliální buňky mikroklků proximálních tubulů ledvin a tenkého střeva	Nespecifikováno
CD13	Aminopeptidáza N: zinek vážící metalloproteáza	Progenitorní buňky granulocytů, monocytů, endoteliální buňky, epiteliální buňky mikroklků proximálních tubulů ledvin a tenkého střeva, stromální buňky kostní dřevě, fibroblasty, osteoklasty	Pozitivní
CD18	Integrin beta-2: adhezivní a signalizační molekula pro hematopoetickou řadu	B a T lymfocyty, makrofágy, neutrofil, "natural killer" buňky	Negativní
CD29	Integrin beta-1: adhezivní molekula, interakce buněk s ECM, uplatňující se v embryogenezi, reparaci tkání, hemostáze, imunitní reakci, atd.	Mesenchymální buňky, kmenové buňky, epiteliální buňky	Pozitivní
CD31	"Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)": adhezivní molekula krevních destiček a buněk endotelu	Krevní destičky, monocyt, neutrofil, některé T lymfocyty, endoteliální buňky	Negativní
CD34	Transmembránový fosfolykoprotein: poprvé izolovaný na hematopoetických KB	Časné hematopoetické buňky, buňky asociované s cévami	Negativní
CD44	Hyaluronát: adhezivní molekula, adheze ke kolagenu, lamininu a fibronektinu	Leukocyty, erytrocyty, hematopoetické i nehematopoetické buňky (nikoliv krevní destičky)	Pozitivní
CD45	Receptor typu C proteinové tyrosin fosfatázy: transmembránový protein	Hematopoetické buňky kromě erytrocytů a krevních destiček	Negativní
CD49f	Integrin alpha-6: povrchový marker uplatňující se v buněčné adhezi a signalizaci	Paměťové buňky T a B lymfocytů, monocyt, krevní destičky, megakaryocyt, epiteliální buňky, endoteliální buňky, cytotrofoblasty	Pozitivní
CD63	Patří do skupiny tetraspaninů: hrají roli v regulaci vývoje, aktivaci, růstu a motilitě buněk	Zejména v cytoplazmě buněk několika tkání, zahrnující i melanocyty	Pozitivní
CD73	5'-nucleotidáza (5'-NT)	Marker lymfocytární diferenciaci, marker progenitorových nebo mezenchymálních kmenových buněk	Pozitivní
CD90	Glycofosfatidylinositol (GPI)	Marker různých kmenových buněk a axonů zralých neuronů	Pozitivní
CD105	Endoglin: část receptoru pro TGF-beta	Endoteliální buňky, mezenchymální kmenové buňky, erytroidní prekurzory, aktivované monocyt a makrofágy	Pozitivní
CD106	"Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1): adhezivní molekula, migrace buněk bílé krevní řady	Aktivované endoteliální buňky, buňky myeloidní řady, stromální buňky kostní dřevě, folikulární dendritické buňky, Kufferovy buňky	Negativní
CD117	"Proto-oncogene c-KIT" or mast/stem cell growth factor receptor (SCF)": receptor typu III protein tyrosin kinázy vážící "stem cell factor" uplatňující se v proliferaci, diferenciaci buněk	Různé buňky - uplatňuje se při apoptóze, buněčné diferenciaci, proliferaci, chemotaxi, buněčné adhezi	Pozitivní
CD146	"Melanoma cell adhesion molecule" (MCAM): adhezivní glykoprotein	Podskupina T a B lymfocytů v periferní krvi, marker mezenchymálních kmenových buněk (s vyšší expresí se zvyšuje diferenciací potenciál)	Pozitivní
CD166	"Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	T lymfocyty, "natural killer" buňky, krevní destičky, aktivované B a T lymfocyty, eozinofily, fibroblasty, endoteliální buňky, neurony, mezenchymové kmenové buňky	Pozitivní
CD 271	Receptor pro nervový růstový faktor s nízkou afinitou; p75 receptor pro neutrofin	Neurony, Scheannovy buňky, mezenchymální kmenové a stromální buňky, folikulární dendritické buňky, melanocyty a další buněčné typy	Nespecifikováno
HLA I	Hlavní histokompatibilní komplex; molekuly 1. třídy vyjádřeny na všech jaderných somatických buňkách	Antigenní prezentace	Pozitivní
HLA II	Hlavní histokompatibilní komplex; molekuly 2. třídy vyjádřeny na antigen prezentujících buňkách	Antigenní prezentace	Negativní
STRO1	Gen pro proteinový znak mezenchymálních kmenových buněk	Mezenchymové kmenové buňky	Pozitivní

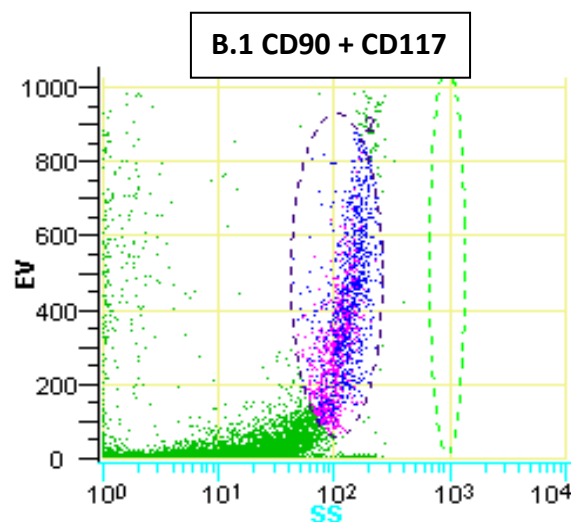
2. Přehled výsledků průtokové cytometrie při fenotypové analýze. A Histogram a tabulka hodnot znázorňující rozložení fluorescenční aktivity u testovaných povrchových znaků CD90 a CD117 v 3. pasáži u linie KBZD01. B Tzv. dotplot znázorňující spektrum pozorovaných buněk z hlediska jejich velikosti (EV) a vnitřní komplexity (SS). 1. Čerstvě izolované KBZD. 2. KBZD kryokonzervované po dobu 6 měsíců. 3. KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců.

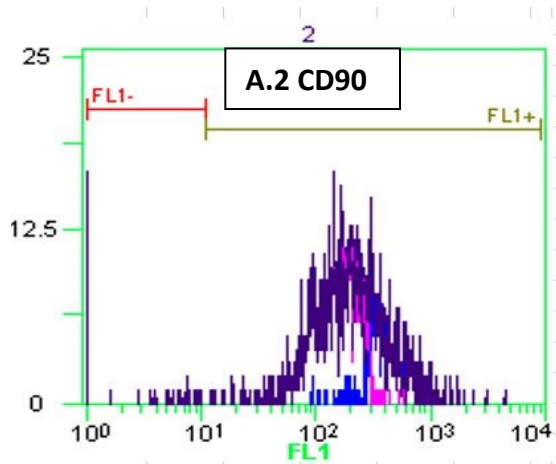


Region	Gated
FL1-	1,45 %
FL1+	98,55 %

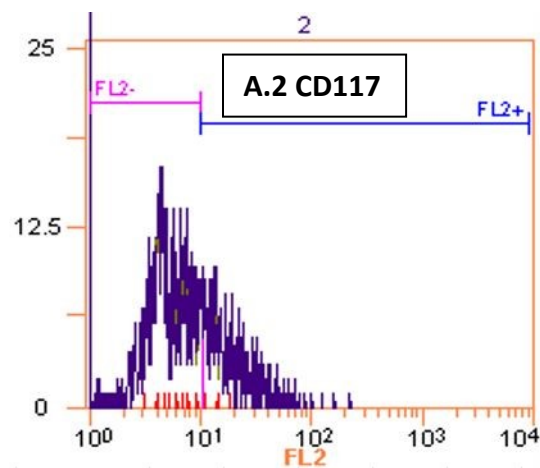


Region	Gated
FL2-	40,05 %
FL2+	59,95 %

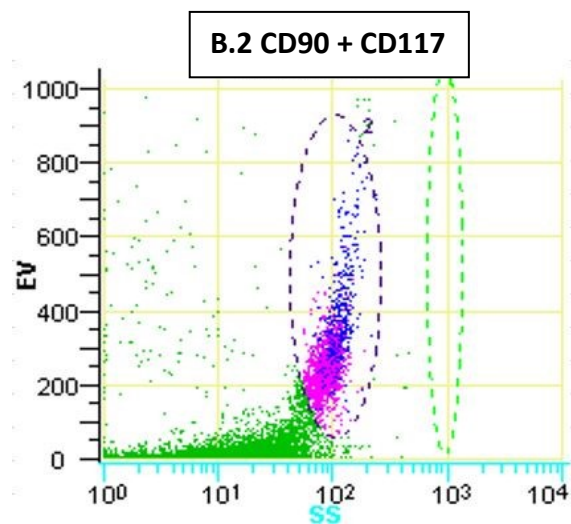


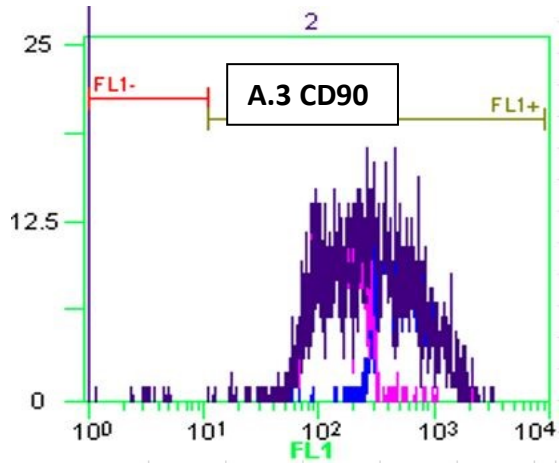


Region	Gated
FL1-	1,97 %
FL1+	98,03 %

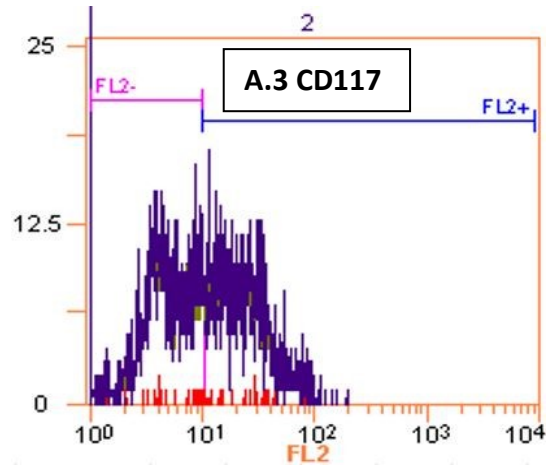


Region	Gated
FL2-	69,76 %
FL2+	30,24 %





Region	Gated
FL1-	1,69 %
FL1+	98,31 %



Region	Gated
FL2-	52,74 %
FL2+	47,26 %

