

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Vliv kryokonzervace na kmenové buňky

Nela Pilbauerová

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Stomatologie

Hradec Králové

2020

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Stomatologie na Stomatologické klinice Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Autor: MDDr. Nela Pilbauerová,
Stomatologická klinika
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradce Králové

Školitel: doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.
Stomatologická klinika
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradce Králové

Oponenti: prof. MUDr. Jana Dušková, DrSc., MBA
Stomatologická klinika
1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
Katedra biologických a chemických věd
Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Stomatologie dne 16. 9. 2020 v Sažamově posluchárně, na Stomatologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové od 13:15 hod.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Antonín Šimůnek, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Stomatologie

Obsah

Souhrn	1
Summary	2
Úvod do problematiky	3
Cíl	6
Materiál a metodika	7
Výsledky	10
Diskuze	14
Závěr	17
Použitá literatura	18
Přehled publikační aktivity	20

Souhrn

Úvod: Tématem této práce je kryokonzervace kmenových buněk 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 plné využití kryokonzervace 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).

Metodika: Vliv neřízené kryokonzervace jsme zjišťovali 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.

Výsledky a závěr: Dle výsledků této práce mohou být KBZD efektivně kryokonzervovány technicky nenáročnou metodou neřízené kryokonzervace minimálně po dobu 12 měsíců. Nepozorovali jsme vliv kryokonzervace na jejich morfologii, fenotyp a diferenciační potenciál. U kryokonzervovaných KBZD došlo k jejich zmenšení a poklesu viability. Kryokonzervované buňky zůstaly po rozmrazení proliferačně aktivní, ale potřebovaly delší čas na obnovení jejich „funkčního zdraví“.

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.

Effect of cryopreservation on stem cells

Summary

Background: The topic of this study is the cryopreservation of 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 determine the effect of cryopreservation on DPSCs stored for 6 and 12 months using an uncontrolled-rate freezing technique.

Methods: We successfully isolated ten dental pulp stem cell lineages from donors aged 13 – 18 years to be able to observe the effect of an uncontrolled rate freezing technique on cell size, viability, proliferation activity, relative telomere length, and differentiation potential. We used 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotective agent (CPA).

Results and conclusion: 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. However, we observed size reduction and decreased viability after cryopreservation. Cryopreserved groups of cells remained proliferatively active, but the population rate was slower immediately after thawing in comparison with fresh stem 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.

Úvod do problematiky

Kmenové buňky (KB) představují velmi pravděpodobně budoucnost regenerativní a reparativní medicíny díky svým vlastnostem, jako jsou schopnost sebeobnovy a diferenciací ve zralé buněčné typy *in vitro*. Dle zdroje a doby izolace KB rozeznáváme kmenové buňky embryonální (EKB) a postnatální nebo také adultní (AKB). 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.

Adultní kmenové buňky byly izolovány z řady tkání lidského těla, mimo jiné také z tkání souvisejících se zubem, tj. ze zubní dřevě natální, dočasné i stálého zubu, zubního folikulu, apikální papily, tzn. z tkáně při apexu kořene vyvíjejícího se zubu, z periodontia a gingivy. V současnosti bylo identifikováno a charakterizováno již osm skupin kmenových buněk izolovaných z tkání souvisejících s natální, dočasnou nebo stálou denticí. Kmenové buňky zubní dřevě (KBZD) byly poprvé izolovány v roce 2000 (1) a charakterizovány v roce 2002 (2).

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. Nejčastěji jsou za účelem izolace KB využívány třetí moláry, první premoláry a nadpočetné zuby, zejména meziodenty (3). 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) (4). Jelikož svým složením niche zubní dřevě velmi připomíná niche primitivní (embryonální) tkáně, dá se předpokládat, že i některé vlastnosti KBZD mohou být podobné vlastnostem embryonálních kmenových buněk.

Výhodou KBZD je jejich ektomezenchymální embryonální původ, díky kterému jsou schopné diferenciací v široké spektrum buněk *in vitro*, např. v osteogenní, neurogenní, adipogenní, myogenní, chondrogenní buněčnou řadu a v buňky produkující inzulín (5). V současné době existují dvě metody izolace KBZD, metoda enzymatického štěpení (anglický termín – „*enzymatic digestion method*“, ED) (6) a metoda spontánního vycestování z izolované tkáně (anglický termín – „*outgrow isolation method*“, OG) (7). Při enzymatické izolaci se suspenze KBZD získává štěpením tkáně zubní dřevě působením enzymů. Při druhé technice se

rozmělněné části zubní dřevě vloží do kultivační nádoby s vhodným médiem a KBZD spontánně vycestovávají z tkáně a adherují k povrchu kultivační nádoby.

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 (8). 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. Pro soubor mechanismů s negativním dopadem na KB se používá obecně termín kryopoškození. Problematická pro KB je zejména rychlost ochlazování, vystavení kritickým teplotám či při rozmrazování přechod zpět k teplotám okolo 37 °C (8). Jedním z mechanismů poškození buněk během procesu kryokonzervace je tvorba intracelulárních a extracelulárních krystalů ledu. Místo vzniku ledového krystalu silně souvisí s rychlostí snižování teploty. Při příliš rychlém poklesu teploty voda z buněk nestačí uniknout, nedojde k obnovení rovnováhy a ledové krystaly se při dalším snižování teploty začnou tvořit intracelulárně (9). Naopak, při příliš pomalém poklesu teploty buňky ztrácejí nitrobuněčnou vodu, čímž dochází k jejich dehydrataci a smrštění (10). Buňky jsou navíc poškozeny extracelulárně vzniklými krystaly ledu.

Mezi další mechanismy, které se uplatňují během kryokonzervace a poškozují kryokonzervované buňky, patří oxidativní stres a tvorba volných kyslíkových radikálů (11).

Kryoprotektiva (KPA) jsou látky přidávané k buněčné suspenzi před kryokonzervací, jejichž smyslem je snížit negativní dopad procesu kryokonzervace. Princip ochrany je založen zejména na optimalizaci teploty tání a tuhnutí. Dále jsou tyto látky schopné zamezit či omezit tvorbu krystalů ledu tím, že zamezují či omezují vazbu tuhnoucí vody na zárodečná centra krystalů (12). KPA se dají rozdělit dle molekulární hmotnosti na nízkomolekulární a vysokomolekulární. Mezi KPA o nízké molekulární hmotnosti patří glycerol, ethylen (propylen) glykol, dimethylsulfoxid (DMSO), methanol a jiné. Díky nízké molekulární váze jsou schopné proniknout intracelulárně a ovlivnit tak vnitřní prostředí buňky. Jejich efektivita stoupá s koncentrací, ale s vyšší koncentrací zároveň stoupá i jejich toxicita (10). Druhá skupina látek

jsou látky o vysoké molekulární hmotnosti, mezi které patří například dextrans, hydroxyethyl škrob, polyvinylalkohol a jiné (13).

Nejčastěji využívané KPA v kryokonzervaci KB je DMSO. Užití DMSO je diskutováno už od roku 1964, kdy byly poprvé provedeny klinické studie na zvířatech. 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 (14). 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 bylo DMSO použito pro méně závažná postižení (15). Letální dávka DMSO při intravenózním podání je 2,5 – 8,9 mg/kg tělesné hmotnosti (studováno na zvířatech - psech, opicích, krysách a myších) (15). Poměrně vysoká letální dávka změnila pohled na toxicitu DMSO, a americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv klasifikoval DMSO do kategorie rozpouštědel 3. třídy (16).

Existuje několik metod kryokonzervace. Woods a kol. ve své studii uvedli, že optimální množství buněk pro kryokonzervaci je $1,0 - 1,5 \times 10^6$ buněk při použití 10% DMSO jako kryoprotektiva (17). Metoda neřízené kryokonzervace je technicky i finančně nenáročná. Primárně je kryokonzervační médium zchlazeno na teplotu 4 °C, kdy po přidání buněk je kryokonzervační nádoba přímo zmrazena na teplotu – 20 °C a při této teplotě ponechána po 1 - 2 hodiny. Po této době jsou kryozkumavky dlouhodobě uchovány při teplotě – 80 °C či při teplotě kapalného dusíku (94). Řada studií potvrdila efektivnost této metody. Jen málo studií popisuje neřízenou kryokonzervaci při následném skladování kmenových buněk při teplotě – 80 °C. Ve všech dostupných studiích se prozatím pozoroval vliv neřízené kryokonzervace na KBZD pouze při použití DMSO.

Nejen samotná kryokonzervace, ale i proces rozmrazování může mít kritický vliv na viabilitu KBZD. 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 (18).

Cíl

Cílem této práce bylo ověření vlivu metody neřízené kryokonzervace na kmenové buňky izolované ze zubní dřevě 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.

Materiál a metodika

Každý pacient/dárce či jeho zákonný zástupce byl před odběrem, respektive extrakcí zubu, seznámen s obsahem informovaného souhlasu. Informovaný souhlas byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (ref. č. 201812 SO7P).

Odběr zubu

Extrakce zubu probíhala v lokálním znecitlivění za aseptických podmínek na Stomatologické klinice UK LF a FN v Hradci Králové. Po extrakci 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 (Hankův balancovaný solný roztok (Invitrogen, MA) s antibiotiky a antimykotiky) o teplotě 4 °C.

Izolace zubní dřene

Izolace zubní dřene byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu v laboratoři tkáňových kultur. V případě zubů s nedokončeným vývojem kořenového systému jsme pro vyjmutí zubní dřene z kořene a korunky využili široce otevřené *foramen apicale*. U zubů s úzkým *foramen apicale* bylo nutné pro izolaci zubní dřene nejdříve separovat korunku zubu od kořene v místě cementosklovinové hranice pomocí Luerových kleští. Zubní dřeň jsme následně oddělili od vnitřní stěny korunky a kořene pomocí sterilní sondy a vyjmuli mikrochirurgickou pinzetou.

Enzymatická izolace kmenových buněk zubní dřene

Pomocí sterilních nůžek jsme zubní dřeň rozstříhali na malé fragmenty o objemu cca 1 mm³. Následně jsme takto upravenou zubní dřeň vložili do tkáňového minihomogenizátoru k získání homogenní suspenze zbytků tkáně zubní dřene. Pro enzymatické štěpení homogenních fragmentů zubní dřene jsme využili 0,05% trypsin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, CA) po dobu 10 minut při teplotě 37 °C. Po inaktivaci trypsinu, centrifugaci a odsátí supernatantu, byla směs různorodých buněk, extracelulární matrix a cév kultivována v modifikovaném médiu pro postnatální progenitorové mezenchymální buňky (Eaglovo

minimální esenciální médium v Alpha modifikaci) obohacené o 2 % FBS, růstové faktory - 10 ng/ml epidermální růstový faktor (PeproTech, London, UK), 10 ng/ml růstový faktor izolovaný z trombocytů (PeproTech); dále o 0,2 mM L-askorbové kyseliny (Bieffe Medital, Itálie), o esenciální aminokyselinu glutamin (Invitrogen) s finální koncentrací 2 %, o 50 mM dexametazonu (Bieffe Medital), o antibiotika a antimykotika - 100 U/ml penicilinu (Invitrogen), 100 µg/ml streptomycinu (Invitrogen), 20 µg/ml gentamicinu (Invitrogen), 10 µl/ml amfotericinu B (Sigma-Aldrich, MO). Dále bylo kulturační médium obohacené o 10 µl/ml Insulin-Transferrin-Sodium-Selenium supplement (ITS; Sigma-Aldrich). Kulturační 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.

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). Viabilitu buněk jsme detekovali pomocí analyzátoru Vi-Cell (Beckman Coulter) v 2. a 8. pasáži. 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. 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 (19).

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 (20). Kvantitativní analýzu qPCR pro měření délky telomer, resp. relativní aktivity telomerázy jsme

prováděli v 2. a 7. pasáži. Pro samotnou analýzu jsme počítali s rovnicí $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (kde $\Delta Ct = Ct_{telomery} - Ct_{\text{“single copy“ gen}}$).

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.

Pro průkaz diferenciace jsme využili imunohistochemické a histologické barvení.

Neřízená kryokonzervace KBZD

Z první pasáže byly uchovány dvě 2 ml kryozkumavky obsahující $1,5 \times 10^6$ KBZD v 1 ml kryokonzervačního média, které se skládalo z 0,5 ml kultivačního média a 0,5 ml 20 % DMSO v FBS. Výsledná koncentrace DMSO tak byla 10 %. Kryozkumavky byly zamrazeny metodou neřízené kryokonzervace. Kryokonzervované KBZD byly při teplotě - 80 °C skladovány po dobu 6 a 12 měsíců. Po uplynutí 6 nebo 12 měsíců, byly kryozkumavky rozmrazeny v 37 °C teplé termální lázni. Následně jsme pokračovali ve stanoveném protokolu jako u nezamrazených KBZD (kontrolní skupina).

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, respektive s PD, byla hodnocena pomocí Pearsonova korelačního testu. Hladina významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Při použití Bonferroniho modifikace byla hladina významnosti upravena na 0,025.

Výsledky

Izolace KBZD

Pro tuto práci jsme extrahovali celkem deset stálých zubů s různým stupněm vývoje kořene a úspěšně izolovali 10 linií KBZD od dárců ve věku od 13 do 18 let.

Charakterizace KBZD

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. U kryokonzervovaných KBZD po dobu šesti a dvanácti měsíců jsme nezpozorovali změnu tvaru buněk po celou dobu kultivace. 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 . Při statistickém zpracování nebyl rozdíl mezi hodnotami velikosti nezmrazených KBZD a kryokonzervovaných KBZD po dobu 6 a 12 měsíců významný.

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. 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. U KBZD zamrazených po dobu 12 měsíců byl medián hodnot viability v 2. pasáži 91,5 %, ale ke konci kultivace v 8. pasáži hodnota mediánu viabilních buněk klesla na 88,9 %. Ani jedna z hodnot se statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny.

Medián dosažených PD u 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 do 8. pasáže. Také KBZD kryokonzervované po dobu 12 měsíců zůstaly proliferačně aktivní a dosáhly mediánu 44,6 populačních zdvojení od 0. pasáže do 8. pasáže. 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. Rychlost proliferace jsme hodnotili dle dosaženého DT. Kryokonzervované buňky byly vždy rozmrazeny v 1. pasáži, kdy jsme u obou skupin zmrazených KB pozorovali prodloužení DT mezi 1. a 2. pasáží oproti kontrolní skupině. Medián DT v 2. pasáži u nezmrazených KB byl 36,3 hodin, u KBZD zmrazených po dobu 6 měsíců činil

38,1 hodin a KB zmrazených po dobu dvanácti měsíců 38,9 hodiny. 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. Medián DT u nezamrazených buněk činil 45,6 hodin v 8. pasáži, u buněk zamrazených po dobu šesti měsíců 54,9 hodin a u buněk zamrazených po dobu dvanácti měsíců 58,8 hodin. I přes navýšení DT nebyl rozdíl od kontrolní skupiny statisticky významný.

Celkem jsme analyzovali 20 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, CD73 a CD166. Naopak s negativní expresí byl znak CD34 a s nízkou pozitivitou znak CD45. Ke statisticky významné změně exprese došlo u znaků CD31, CD106, CD117, CD146, HLA I. Přehled mediánů procent pozitivních KBZD vyjadřující testované CD znaky zobrazuje tab. 1.

	Nezamrazené 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. 1 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 $p < 0,025$).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

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. Pozorovali jsme signifikantní zkrácení délky telomer jak u kontrolní skupiny, tak u zmrazených KBZD po dobu 6 měsíců 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. Rozdíl ve zkrácení relativní délky telomer mezi kontrolní skupinou a kryokonzervovanými skupinami buněk nebyl staticky významný. Po kryokonzervaci jsme však pozorovali prodloužení relativní délky telomer v 2. pasáži oproti kontrolní skupině. 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. Při korelaci prodlouženého DT v 2. pasáži s relativním prodloužením délky telomer v 2. pasáži u kryokonzervovaných KBZD oproti kontrolní skupině byla tato korelace statisticky významná. Pozorovali jsme také statisticky významnou korelaci mezi vyšší hodnotou T/S vypočítanou u kryokonzervovaných skupin buněk v 7. pasáži a vyšším počtem dosažených PD, respektive kratším DT v 7. pasáži. 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 a snížením počtu dosažených PD.

Diferenciační potenciál KBZD

Diferenciační potenciál KBZD jsme ověřovali ve 4. pasáži, kdy byly KBZD vystaveny působení diferenciačního média. I po roční kryokonzervaci KBZD diferenciovaly v osteoblastům a chondroblastům podobné buňky a produkovaly extracelulární matrix dané tkáně.

Charakteristiku vyprodukované extracelulární matrix jsme ověřovali pomocí histologického barvení i imunohistochemie. I přes využití protokolu ověřeného jinými autory a použití proadipogenně silně působícího média nebylo nahromadění tukových vakuol v diferencovaných nezmrazených KBZD průkazné, proto jsem adipogenní diferenciaci u kryokonzervovaných skupin buněk neověřovali.

Diskuze

Cílem této dizertační 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 dlouhodobé uskladnění kmenových buněk pro potenciální budoucí klinické využití, či případně udržení pro další klinické testování, bez ovlivnění fenotypu a ostatních základních biologických vlastností. Podmínkou výše uvedených uplatnění je důkladné porozumění procesu kryokonzervace a optimalizace jednotlivých kroků, popř. objasnění nežádoucích efektů na kryokonzervované buňky.

V této práci jsme KBZD izolovali od mladých dárců ve věkovém rozmezí 13 – 18 let. V současnosti je upřednostňována kryokonzervace již izolovaných, charakterizovaných KBZD než tkáně zubní dřeně nebo celých zubů. Ze dvou technik izolace je pro KBZD obecně více přijímána metoda enzymatického štěpení zubní dřeně. Pro enzymatické štěpení zubní tkáně je zapotřebí přítomnost enzymů. Nejčastěji se jedná o směs kolagenázy typu I a dispázy v poměru koncentrací 1:1 (21), doba působení této směsi se pohybuje v rozmezí 30 - 60 minut dle množství izolované tkáně zubní dřeně. Doba působení enzymů je v izolačním protokolu stěžejní a může negativně ovlivnit viabilitu izolovaných kmenových buněk (22). Vždy je proto snaha zkrátit dobu působení enzymu na minimum. V naší studii jsme využili k izolaci KBZD trypsin v koncentraci 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 zkrátili na 10 minut oproti popisovaným 30 až 60 minutám při využití směsi kolagenázy typu I a dispázy.

V této práci jsme izolovali celkem deset linií KBZD z deseti extrahovaných stálých zubů. Pro uchování buněk a tkání po dobu šesti a dvanácti měsíců jsme využili metodu neřízené kryokonzervace a využitím 10% DMSO jako kryoprotektiva.

Při kultivaci rozmrazených KBZD jsme nepozorovali změnu v jejich morfologii, a to ani u KBZD zmrazených po dobu šesti ani dvanácti měsíců. 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 (10).

Při pozorování vlivu neřízené kryokonzervace na viabilitu KBZD jsme u buněk zmrazených po dobu 6 měsíců pozorovali statisticky významný pokles viability naměřené po rozmrazení ve 2. pasáži. Viabilita měřená v 8. pasáži se již od kontroly statisticky významně nelišila. Snížení viability měřená v 2. pasáži může být spojeno s poškozením buněk vlivem jednotlivých kroků při kryokonzervaci nebo při rozmrazování. Po eliminaci nevitálních buněk postupnou kultivací a pasážováním došlo k obnovení viability buněk. U KBZD kryokonzervovaných po dobu 12 měsíců jsme naopak pokles viability pozorovali ke konci kultivace, ale tento pokles nebyl statisticky významný. Ovlivnění viability v tomto případě může být způsobeno pozdními vlivy kryokonzervace, kdy nedošlo k obnovení „funkčního“ zdraví kryokonzervovaných buněk.

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 KBZD zůstaly proliferačně aktivní. U kryokonzervovaných KBZD po dobu šesti i dvanácti měsíců byla hodnota PD nižší a došlo i k prodloužení DT, ale tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Kryokonzervované KBZD potřebovaly delší dobu na obnovení „funkčního“ zdraví po kryokonzervaci a rozmrazení.

S proliferační aktivitou KB souvisí i délka telomer v sekvenci DNA buněk. 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 zamrazených KBZD po dobu 6 měsíců s rostoucí dobou kultivace. 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 *in vitro* podmínkách a 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, v porovnání s délkou telomer negativní kontroly v 2. pasáži. U kryokonzervovaných buněk došlo k prodloužení DT mezi 1. a 2. pasáží, pravděpodobně z důvodu vyrovnání se se stresem plynoucím z procesu kryokonzervace. Během této doby mohlo dojít ke kompenzaci ztrát telomer aktivitou telomerázy.

Fenotyp čerstvě izolovaných i kryokonzervovaných buněk jsme měřili pomocí průtokové cytometrie v 3. a 7. pasáži. Čerstvě izolované i kryokonzervované buňky vysoce exprimovaly znaky mezenchymálních kmenových buněk CD29, CD44, CD90. Dále byly vysoce vyjádřeny tzv. „stromal-associated“ antigeny CD13, CD73, CD166. Naopak negativní exprese znaku CD34 a nízká pozitivita znaku CD45 potvrzuje, že hematopoetické prekurzory nejsou v zubní dřeni přítomny. Lehce zvýšená exprese CD45 může být vysvětlena přítomností ITS v kultivačním médiu. Takto obohacené médium ponechává KBZD méně diferenciované (23). Obecně však lze říci, že si KBZD kryokonzervované po dobu šesti i dvanácti měsíců, až na některé výjimky, zachovaly stabilní fenotyp, shodný s fenotypem čerstvě izolovaných KBZD.

Diferenciace ve zralé buněčné typy je dalším kritériem „kmenovosti“ buněk. 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. U všech skupin buněk 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. Na rozdíl od mezenchymálních buněk z kostní dřeni, které fyziologicky inklinují k adipogenní buněčné řadě. KBZD tuto vlastnost nemají a v tukové buňky přirozeně nediferencují.

Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv neřízené kryokonzervace s použitím 10 % DMSO na kmenové buňky izolované ze zubní dřene. Dle získaných výsledků jsou KBZD 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. Pozorovali jsme však, že kryokonzervace měla vliv na velikost buněk. Hodnota mediánu velikosti buněk byla po kryokonzervaci nižší než jeho hodnota v kontrolní skupině. 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, 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 si buňky zachovaly schopnost diferenciaci ve zralé buněčné typy, osteoblastům podobné buňky a chondroblastům podobné buňky. I přes proadipogenně silně působící diferenciací médium se nám nepodařilo čerstvě izolované buňky diferenciovat v adipocyty, proto jsme u kryokonzervovaných buněk tuto schopnost dále neověřovali.

V tomto výzkumu 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. Efektivita kryokonzervačního média je dána zejména stanovením rovnováhy mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím během kryokonzervace. Poté jsou kryokonzervované buňky nejlépe chráněny.

Použitá literatura

- (1) Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.
- (2) Gronthos S, Brahim J, Li W et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(G): 531-535.
- (3) 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.
- (4) Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008;132(4):598–611.
- (5) 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.
- (6) Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.
- (7) 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.
- (8) Mullen F, Critser JK. The science of cryobiology. *Cancer Treat Res.* 2007;138:83–109.
- (9) Mazur P. Equilibrium quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 1990;17:53-92.
- (10) Gao D, Critser JK. Mechanismus of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR J.* 2000;41:187-196
- (11) 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.
- (12) Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems - review. *Transfusion and Apheresis Science.* 2012;46:137–47.
- (13) 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.* 2012;14: 3170–3175.

- (14) Brown JH. Dimethyl sulfoxide (DMSO)-- a unique therapeutic entity. *Aviat Space Environ Med.* 1982;53(1): 82–8.
- (15) Rubin LF. Toxicity of dimethyl sulfoxide alone, and in combination. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;243:98-103.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) Suchánek 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
- (20) 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.
- (21) Fogarty WM, Griffin PJ. Production and purification of the metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Applied Microbiology.* 1973; 26(2):185–190.
- (22) 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.
- (23) 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.

Přehled publikační činnosti

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

Pilbauerová N., Soukup T., Suchánková Kleplová T., Suchánek J. Enzymatic Isolation, Amplification and Characterization of Dental Pulp Stem Cells. *Folia Biol (Praha)*. 2019; 65(3):124-133. **(IF = 1.073/2018)**

Suchánek J., Ivančaková R. K., Mottl R., Browne K. Z., Pilneyová K. C., **Pilbauerová N.**, Schmidt J., Suchánková Kleplová T. Hyaluronic Acid-Based Medical Device for Treatment of Alveolar Osteitis—Clinical Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(19). **(IF = 2.468 /2018)**

Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise:

Pilbauerová N., Suchánek J. Inovovaný izolační protokol pro kmenové buňky zubní dřeně – pilotní studie. *LKS – přijato do tisku*

Kapitán M., **Pilbauerová N.**, Vavříčková L., Šustová Z., Machač S. Prevalence of Musculoskeletal Disorders Symptoms Among Czech Dental Students. Part 2: The Predictive Value of Digital Assessment. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2019;62(1):6-11.

Kapitán M., **Pilbauerová N.**, Vavříčková L., Šustová Z., Machač S. Prevalence of Musculoskeletal Disorders Symptoms among Czech Dental Students. Part 1: a Questionnaire Survey. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2018;61(4):131-136

Suchánek J., Browne K. Z., Nasry S. A., Kleplová S. T., **Pilbauerová N.**, Schmidt J., Soukup T. Characteristics of Human Natal Stem Cells Cultured in Allogeneic Medium. *Braz Dent J*. 2018;29(5):427-434.

Pilbauerová N., Kapitán M., Šustová Z., Machač S (2017) Hodnocení výskytu muskuloskeletálních obtíží u zubních lékařů Stomatologické kliniky LF UK a FN v Hradci Králové. *LKS*. 2017;27(1):8-12.

Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise:

Pilbauerová N. Malé ilustrované repertorium - Jak úspěšně napravit neúspěch: Kožní pístěL LKS. 2018;28(6):148-151.

Pilbauerová N., Suchánek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. Acta Medica (Hradec Kralove). 2018;61(1):1-7.

Smluvní projekty

Smluvní výzkum Contipro č. 99-111 – hlavní řešitel, Kyselina hyaluronová jako kryoprotektivum II (2020).

Smluvní výzkum Contipro – spoluřešitel, Kyselina hyaluronová jako kryoprotektivum (2019).

Ostatní sdělení – konference, ústní prezentace a postery:

Pilbauerová N., Suchánek J. Cryopreservation of dental pulp stem cells, 16th International medical postgraduate conference, Hradec Kralove, Czech Republic, 21. - 22. 11. 2019.

Pilbauerová N., Suchánek J. Cryopreservation of dental pulp stem cells , 15th Postgraduate Medical Students Conference, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, 21. 10. 2019.

Pilbauerová N., Soukup T., Suchánková Kleplová T., Suchánek J. Enzymatic isolation, amplification and characterization of dental pulp stem cells (poster), 19th Biennial ESE Congress, Vienna, Austria, 12. –14. 9. 2019.

Pilbauerová N., Suchánek J. Vliv kryokonzervace na kmenové buňky zubní dřeně, Den výzkumných prací 2019 - Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze, červen 2019

Pilbauerová N., Suchánek J. Faster and equally effective isolation protocol for dental pulp stem cells, 14th Postgraduate Medical Students Conference, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, 22. 10. 2018.

Pilbauerová N., Suchánek J. Kryokonzervace kmenových buněk zubní dřeně, Den výzkumných prací 2017, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze, červen 2017.