

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Stomatologie

**Kultivace kmenových buněk zubní pulpy
v kultivačním médiu bez xenogenních látek**

**Human dental pulp stem cells cultured in xenogeneic-free
supplemented media**

MDDr. Tereza Suchánková Kleplová

Školitel: MDDr. Nela Pilbauerová, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autorky

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.

Hradec Králové, 2023

Tereza Suchánková Kleplová

Poděkování autorky

Poděkování:

Děkuji mamince, mému manželovi a mému synovi, jehož fascinující světlo naplnilo můj život smyslem a radostí.

Ráda bych vyjádřila poděkování mé školitelce.

A také mým studentům za vzájemně obohacující čas.

Vám všem v úctě a s láskou

Hradec Králové, 2023

Tereza Suchánková Kleplová

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Cíle práce | 11 |
| 3. Materiál a metodika | 12 |
| 3.1. Izolace hDPSCs | 12 |
| 3.2. Kultivace hDPSCs | 14 |
| 3.3. Biologické vlastnosti, kmenovost a schopnost diferenciaci hDPSCs | 15 |
| 3.4. Kultivace hDPSCs v experimentálních médiích | 19 |
| 3.5. Průkaz povrchových znaků hDPSCs v experimentálních médiích | 20 |
| 4. Výsledky | 22 |
| 4.1. hDPSCs kultivované ve standardním kultivačním médiu (SKM) | 22 |
| 4.2. Trojlineární diferenciaci, znaky hESCs u hDPSCs ve SKM | 28 |
| 4.3. Vliv kultivace hDPSCs v experimentálních kultivačních médiích | 32 |
| 4.3.1. hADPSCs | 32 |
| 4.3.2. hDDPSCs | 44 |
| 4.3.3. hNDPSCs | 56 |
| 4.3.4. Shrnutí výsledků růstových charakteristik hDPSCs | 68 |
| 4.4. Morfologie a viabilita hDPSCs | 77 |
| 4.5. Analýza povrchových znaků hDPSCs v experimentálních médiích | 78 |
| 5. Diskuse | 81 |
| 6. Závěr | 87 |
| 7. Literatura | 88 |

Seznam zkratek

| | |
|-------------|---|
| avDT | aritmetický průměr DT pro jednu buněčnou linii během jedné kultivace |
| avDT_mX | průměrný DT všech linií kultivovaných v médiu X |
| avPD | průměrný počet PD pro jednu buněčnou linii v průběhu jedné kultivace |
| avPD_mX | průměrný počet PD za pasáž všech linií kultivovaných v médiu X |
| CD | povrchový znak, který společně s dalšími určuje fenotyp dané buněčné linie |
| cPDs | celkový součet PD, obvykle pro jednu buněčnou linii během jedné kultivace |
| cPDs/p | kumulativní počet PD dosažených do určité pasáže |
| DT | čas potřebný ke zdvojnásobení buněčné populace počítáno na dobu trvání jedné pasáže, $DT (h) = PD/\text{čas trvání pasáže (h)}$ |
| EKM | experimentální kultivační média |
| FCS | fetální telecí sérum |
| HLAII | antigeny HLA – D a DR |
| HP | lidská krevní plazma |
| hSCs | lidské kmenové buňky |
| hASCs | kmenové buňky vyskytující se v lidském organismu postnatálně |
| hESC | lidské embryonální kmenové buňky |
| hMSCs | lidské mezenchymální kmenové buňky |
| hDPSCs | lidské kmenové buňky zubní dřeně |
| hADPSCs | lidské kmenové buňky zubní dřeně stálých zubů |
| hDDPSCs | lidské kmenové buňky zubní dřeně dočasných zubů |
| hNDPSCs | lidské kmenové buňky zubní dřeně kongenitálních zubů |
| ITS | doplňek inzulinu, transferinu a selenidu sodného pro kultivačního média |
| m_cPDs_mX | medián kumulativního počtu PD ve všech liniích kultivovaných v médiu X |
| m_cPDs/p_mX | medián kumulativního počtu PD ve všech liniích kultivovaných v médiu X v určité pasáži |
| m_X | medián dále uvedené hodnoty |
| MEM | Eaglovo Minimální esenciální kultivační médium |
| PD | počet zdvojení buněčné populace v jedné pasáži, $PD = \log_2 (\text{počet sklizených buněk} / \text{nasazených buněk})$ |
| PRP | lidská krevní plazma bohatá na trombocyty |
| SDav | směrodatná odchylka aritmetického průměru |
| SKM | standardní kultivační médium |

| | |
|------|---------------------------------|
| HBSR | Hankův balancovaný solný roztok |
| DFP | Dulbeccův fosfátový pufr |
| SKN | standardní kultivační nádoba |
| SKP | standardní kultivační podmínky |
| SOP | standardní operační protokol |
| SPC | standardní postup centrifugace |

Kultivace kmenových buněk zubní pulpy v kultivačním médiu bez xenogenních látek

Souhrn

Úvod: Tématem předkládané studie je kultivace kmenových buněk zubní pulpy (hDPSCs) v kultivačním médiu bez xenogenních komponent. Není přípustné, aby byly v klinické praxi používány buňky, které proliferovaly pod vlivem xenogenních (mimodruhových) látek. V případě hDPSCs se jedná především o fetální telecí sérum (FCS). Přestože jsou tyto suplementy považovány za zlatý standard kultivace mezenchymálních kmenových buněk (hMSCs) a vlastnosti s nimi kultivovaných buněk byly postulovány jako charakteristické a určující vlastnosti jednotlivých linií hMSCs. Tím vyvstává základní otázka, pokud a jak ovlivňují xenogenní krevní deriváty vlastnosti buněk a jejich růstové charakteristiky. Existují dvě možnosti náhrady těchto látek jako komplexů růstových faktorů, kdy jsou do média přidány pouze definované růstové faktory tzv. bezsérová média, nebo náhrada zvířecích krevních doplňků lidskými, ideálně autologními. Cílem provedeného výzkumu bylo pomoci ozřejmit odpovědi na tyto otázky, které jsou základní pro buněčnou terapii a zavedení do lékařské praxe.

Metodika: Kultivací 12 linií hDPSCs ze stálých, dočasných a natálních zubů ve 12 různých médiích jsme zjišťovali vliv FCS, derivátů lidské krve krevní plazmy (HP) a na destičky bohaté krevní plazmy (PRP) o různých koncentracích (2%, 10%, 20%) na pěstované buňky pomocí růstových charakteristik a fenotypové analýzy. Nejprve byly všechny linie kultivovány do 15. pasáže za standardních kultivačních podmínek a diferencovány v osteogenní, chondrogenní a adipogenní buněčnou linii k průkazu kmenovosti.

Výsledky: Dle výsledků této studie je krevní derivát s nejvyšší podporou růstu PRP v 10% koncentraci pro kmenové buňky zubní dřevě stálých zubů (hADPSCs) a natálních zubů (hNDPSCs). Kmenové buňky zubní dřevě dočasných zubů (hDDPSCs) nejlépe rostly v médiu s 10% koncentrací HP. Fenotypová analýza prokázala pozoruhodné rozdíly v expresi povrchových markerů, kdy buňky kultivované v médiích s deriváty lidské krve vykazovaly vyšší neurogenní potenciál a fenotyp bližší embryonálním kmenovým buňkám (hESCs), zatímco buňky kultivované s FCS vyšší tendenci k expresi znaků hematopoetické řady bližší progenitorovým buňkám.

Závěr: V naší studii jsme prokázali vliv druhu krevní náhražky na fenotyp hDPSCs s tím, že lidské krevní deriváty o 10% koncentraci jsou ideální náhradou FCS, nejen s ohledem na proliferační aktivitu, ale především na udržení nediferencovaného stavu a neurogenního potenciálu.

Klíčová slova: Mezenchymální kmenové buňky, zubní dřevě, lidské krevní deriváty, kultivace.

Human dental pulp stem cells cultured in xenogeneic-free supplemented media

Summary

Introduction: The topic of the study is the cultivation of dental pulp stem cells (hDPSCs) in a xenogeneic-free culture medium. It is not permissible to use cells upon growing under the influence of xenogeneic (extraneous) substances in human clinical practice. The most frequently used in cultivation of hDPSCs is fetal calf serum (FCS/FBS). Unfortunately, these supplements are widespread in hMSCs cultivation, and all gold standard hMSCs properties were postulated in cells cultivated using these supplements. This raises the basic question if and how xenogeneic blood derivatives affect the properties of cells and their growth characteristics. There are two options for replacing these xenogeneic substances in the culture medium: the so-called serum-free media, or human blood supplements, ideally autologous ones. The conducted research was aimed at identifying the effects of xenogeneic and human blood supplements on basic hDPSCs characteristics that are fundamental to introduce the cell therapy into regular medical practice.

Method: By culturing 12 hDPSC lines obtained from adult, deciduous, and natal teeth in 12 different culture media, we investigated the effect of FCS, human blood derivatives, i.e., blood plasma (HP), and platelet-rich blood plasma (PRP) of different concentrations (2%, 10%, 20%) on cultured cells using growth characteristics and phenotypic analysis. First, all lines were cultured up to the 15th passage under standard culture conditions and differentiated into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lines to demonstrate stemness.

Results: According to the results of this study, the blood derivative with the highest growth support for dental pulp stem cells of permanent teeth (hADPSCs) and natal teeth (hNDPSCs) is PRP at the concentration of 10%. hDDPSCs grew best in cultivation medium with 10% HP. Phenotypic analysis showed remarkable differences in the expression of cluster of differentiation markers. Cells cultured in media with human blood derivatives have the higher neurogenic potential and a phenotype resembling the embryonic stem cells (hESCs), while cells cultured with FCS tended to express features of the hematopoietic lineage resembling the progenitor cells.

Conclusion: In our study, we demonstrated the effect of the various types of blood substitutes on the hDPSCs proliferation rate and phenotype. The human blood derivatives at the concentration of 10% are an ideal substitute for FCS due to their positive effect on hDPSCs proliferative activity, and support hDPSCs the undifferentiated state and neurogenic potential.

Key words: Mesenchymal stem cells, dental pulp, human blood derivatives, cultivation.

1. Úvod

Lidské embryonální kmenové buňky (hESCs) jsou nediferencovanými buněčnými elementy, které vytvářejí první populace ve vznikajícím organismu. Z tohoto důvodu jsou obdařeny výjimečnými vlastnostmi, tj. vysokou proliferační aktivitou, schopností sebeobnovy a diferenciaci ve zralé buněčné elementy¹. Díky těmto vlastnostem mohou hrát klíčovou roli během vývoje organismu². První populace hESCs se nazývá totipotentní, tyto buňky jsou samostatně schopné vytvořit celý organismus³. V začátku organogeneze tuto schopnost ztrácejí a stávají se z nich pluripotentní hESCs, které zakládají zárodečné listy⁴. Během vývoje zárodku hESCs a progenitorové buňky (vzniklé asymetrickým dělením hESCs) aktivně proliferují, aby vytvořily tkáň a orgány^{5,6}. V dospělém organismu existují kmenové buňky také, ovšem jako skryté a nepatrné tkáňově specifické subpopulace tzv. dospělých kmenových buněk⁷, které díky multipotenci, schopnosti diferencovat ve více buněčných typů domovské tkáň nebo orgánu (obvykle i příslušného zárodečného listu), hrají důležitou úlohu v udržení homeostázy⁸. Jejich hlavním úkolem je regenerace a reparace poškozených struktur^{9,10} za současného zachování původní dormativní populace¹¹. Jednou z populací lidských adultních kmenových buněk jsou lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSCs)¹². Tyto buňky jsou schopné diferenciaci (*in vivo/in vitro*) ve zralé buněčné linie odvozené z mezodermy^{13,14,15}. Avšak přesná definice vlastností hMSCs neexistuje^{16,17}. Důvodem je exponenciálně rostoucí počet dat získaných o hMSCs a stále se zvyšující počet tkání, ze kterých byly tyto buňky izolovány¹⁵. Přesto se můžeme rámcově držet poslední uznané definice navržené v roce 2006 *International Society for Cellular Therapy*, která uvádí tato kritéria a doporučení: 1) hMSCs musí disponovat schopností sebeobnovy, vykazovat adhezi k plastovému povrchu kultivačních nádob a diferencovat alespoň ve tři buněčné linie, a to adipogenní, chondrogenní a osteogenní, a 2) musí na svém povrch nést tyto znaky CD105, CD73 a CD90 a zároveň nesmí nést hematopoetické znaky CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 a HLA-DR^{16,17}. hMSCs si tyto znaky udržují až do dospělosti¹⁸, což podporuje a umožňuje vývoj mnohobuněčného organismu. Tyto buňky jsou také charakteristické tím, že si udržují z části nediferencovaný stav (exprimují Oct3/4 a jiné embryonální markery) a jsou tak pod vlivem „vhodného“ prostředí náchylné k nádorovému zvratu cestou dediferenciaci, nebo karcinogenezi prostřednictvím iniciace, propagace a progresu¹⁹. Riziko, že samotné hMSCs nebo kultivační média s jejich působky (tzv. *conditioned media*)²⁰ mohou urychlit růst nádorové populace^{21,22}, je tedy nezanedbatelné a musí na něj být vždy pomýšleno. Podobné chování může být vyvoláno v

přítomnosti xenograftu²³. Dříve byly hMSCs užívány pouze v základním výzkumu molekulární a buněčné biologie²⁴. Rozmach vědeckého bádání v této oblasti zapříčinily čtyři aspekty: Zavedení úspěšných protokolů pro buněčnou expanzi, kontrolované úpravy buněčného genomu transfekcí, využití exozomů lidských adultních kmenových buněk jako nebuněčných látek schválených pro lékařskou klinickou praxi a možnost tvorby organoidů, což je považováno za nejúčinnější přístup k rekonstrukci funkce orgánů po transplantaci²⁵. Organoidy jsou miniaturizovanými a zjednodušenými trojrozměrnými verzemi orgánů vytvořené *in vitro* s realistickou mikroanatomíí. Jedná se o shluky více orgánově specifických buněčných typů, které vznikají z kmenových nebo progenitorových buněk daného orgánu principem samoorganizované kondenzace²⁵. Škála použití hMSCs sahá od výzkumu patofyziologie vybraných chorob^{27,28}, přes regenerativní terapii²⁹⁻³¹, tkáňové inženýrství³²⁻³⁴ a buněčnou terapii³⁵⁻³⁸ až po testy cytotoxicity³⁹. Protizánětlivý potenciál hMSCs se nyní využívá ve výzkumu boje proti infekci COVID-19⁴⁰, stejně jako jejich imunomodulační efekt^{41,42}. hMSCs se také využívají jako prosté nosiče při cíleném podání léčiv. Léčiva jsou potažena alogenními hMSCs, aby působila jako tělu vlastní a nevznikala proti nim nežádoucí imunitní reakce^{43,44}. K léčbě se používají také exozomy izolované z hMSCs⁴⁵⁻⁴⁷ nebo jsou hMSCs jako producenti žádaných exozomů vpraveny v nosiči přímo do místa působení, aby zde zajistily delší terapeutický efekt⁴⁸. hMSCs jsou schopny přecházet přes hematoencefalickou bariéru a dopravit tak chemoterapeutické protinádorové látky do mozku, což je jinak krajně obtížné⁴⁹⁻⁵¹. Sekretom hMSCs je pro svou nízkou imunogenitu ideální nebuněčnou terapií autoimunitních a autoinflamatorních chorob⁵² nebo terapií chronických infikovaných ran⁵³. Jednou z cest cílené léčby onkologických onemocnění je využití chemotaxe, díky níž jsou hMSCs jako nosiče protirakovinných látek atrahovány do místa nádorového bujení⁵⁴⁻⁵⁸. Dokonce i samotné hMSCs jsou schopné regulace lokálně agresivních nádorů jako je např. osteosarkom⁵⁹. V terapii genetických onemocnění se uvažuje o využití hMSCs s vnesenými úseky funkční DNA (tj. genů)^{60,61}. hMSCs byly úspěšně použity pro léčbu neplodnosti u žen z anatomických příčin^{62,63}. Experimentálně jsou užívány ke zpomalení procesu stárnutí⁶⁴ a z vitálních indikací pro léčbu neonatálních poruch⁶⁵. Klíčovými úkoly pro rozšíření těchto terapeutických metod jsou určení ideálního druhu mezenchymálních kmenových buněk pro daný cíl a zavedení standardizovaných postupů kultivace a expanze těchto vybraných buněčných typů⁶⁶. Dle posledních výzkumů se zdá, že hMSCs hrají ústřední roli v aktivaci mezibuněčných, regeneračních, angiogenních, antifibrotických a protizánětlivých signálů a potencují antioxidantní účinky a apoptózu jako součást

protinádorové a antimikrobiální reakce organismu⁶⁷. Bylo popsáno mnoho zdrojových tkání hMSCs^{66,69}, např. kostní dřeň⁷⁰, pupečnicková krev⁷¹, mateřské mléko⁷² a zubní dřeň⁷³. Ačkoliv jsou hMSCs kostní dřeň nejčastěji zkoumaným typem, jejich sběr provází úskalí nízké koncentrace žádaných buněk ve tkáních, výskyt očekávaných reakcí organismu jako jsou bolest a stres a možné pooperační komplikace⁷⁴. Ve studii Huang, Gronthos a Shi⁷⁴ je připomenuto, že existuje mnoho zdrojů hMSCs, z kterých má izolace těchto buněk daleko menší dopad na dárcovský organismus a zároveň vyšší výtěžností, např. dentální tkáň^{75,76}. Oproti získávání hESCs z embryí nevyvolává izolace hMSCs závažné etické otázky^{77,78}. Mnoha studiemi byly shledány zubní tkáň vhodným zdrojem hMSCs⁷⁹. Cenný se tento zdroj jeví z důvodu zachování vysoké diferenciační kapacitou hMSCs z těchto tkání získaných a jejich relativně snadné dosažitelnosti. Dále jsou pozitivně hodnoceny tyto parametry: Multipotence získaných buněk, jejich plasticita, rychlá kinetika buněčného cyklu, endogenní exprese některých faktorů pluripotence a jejich imunomodulační efekt^{80,81}. S rostoucím množstvím znalostí o hMSCs a porozuměním jejich chování a vlastnostem se ukazují jako vysoce potentní zdroj pro regeneraci tkání a buněčnou terapii.

Kmenové buňky zubní dřeň (hDPSCs) mají oproti ostatním hMSCs vysoký neurogenní potenciál, což je dáno jejich embryonálním původem⁸². Během vývoje zubu se na tvorbě zubní dřeň podílí buněčná subpopulace kmenových buněk migrující z neurální lišty⁸³. Tyto buňky dávají v zubní dřeň vzniknout vysoce specializovanému buněčnému typu – odontoblastům⁸⁴, dále se podílí na tvorbě Hertwigovy epiteliální lišty, vzniku periodontální štěrby a inervaci zubní dřeň⁸⁵. Jako všechny adultní kmenové buňky si zachovávají spící populaci tzv. lidských postmigratorních kmenových buněk odvozených z neurální lišty (hNCSCs)^{86,87}. Tyto dospělé multipotentní kmenové buňky ektomezenchymu jsou schopné přispět k regeneraci mezodermálních, neurálních a ektodermálních buněk a tkání^{88,89}. Z výše uvedeného je pochopitelné, že se vlastnosti kmenových buněk zubní dřeň mohou lišit od základních charakteristik postulovaných pro hMSCs⁹⁰. Navíc se předpokládá, že některé specifické charakteristiky hDPSCs odráží prostředí zubní dřeň, ve kterém se tyto buňky formují a částečně vyžívají⁹¹. Zubní dřeň je zcela odlišný a velmi specifický typ tkáň^{92,93}. Je zajímavé, že i u dospělých jedinců stále vykazuje charakteristiky nezralé tkáň s vysokou koncentrací somatických kmenových buněk v porovnání s ostatními zdroji hMSCs⁹⁴⁻⁹⁶. Hypotéza, která se snaží tuto odlišnost vysvětlit, staví na časném a skoro dokonalém ohraničení zubní dřeň od okolních tkání (šířka foramen apicis dentis u třetích molárů je 2 mm)⁹⁷, úplném oddělení od mikrobiálního prostředí dutiny ústní, vysoké denzity sensorické nervové sítě a bohaté

mikrocirkulaci⁹⁸. Neméně důležité je také formování dentální papily na základě migrace a kondenzace buněk neurální lišty (ektomezenchymu) do mezenchymu vznikající ústní dutiny^{99,100}. Tkáň zralé zubní dřene se dá svými vlastnostmi přirovnat k embryonální pojivové tkáni, která je navíc ohraničena vrstvou odontoblastů (postmitotických vysoce specializovaných buněk)¹⁰¹. Kmenové buňky zubní dřene (hDPSCs) jsou tedy směsnou populací hMSCs a hNCSCs¹⁰². hDPSCs získáváme ze tkáně zubní dřene stálých zubů (hADPSCs), nejčastěji retinovaných, s dutinou ústní nekomunikujících, třetích dolních molárů, dále ze zubů dočasných (hDDPSCs) se zachovalou zubní dřeni. Nejnovějším a zároveň nejranějším typem hDPSCs jsou kmenové buňky zubní dřene natálních/neonatálních zubů (hNDPSCs)¹⁰³. Kmenové buňky zubní dřene stálých zubů (hADPSCs) jsou vývojově heterogenní skupinou nesoucí tyto společné vlastnosti – větvenitou morfologii (podobně jako lidské fibroblasty) a vysokou proliferační aktivitu během dlouhodobé kultivace^{104,105}. hADPSCs exprimují na svém povrchu mezenchymální znaky, stejně jako některé povrchové znaky embryonálních kmenových buněk – Nanog, Oct4, specific embryonic antigen-3 a 4¹⁰⁶, což podporuje teorii o jejich pluripotentní kapacitě^{107,108}. Vysokému diferenciačnímu potenciálu odpovídá schopnost hADPSCs vyžrávat v osteogenním, chondrogenním, dentinogenním, adipogenním, neurogenním a myogenním médiu ve zralé buněčné typy odpovídající charakteru daného média¹⁰⁹. Od roku 2000, kdy byly hADPSCs prvně izolovány a popsány⁷³, jsou intenzivně studovány. Zásadní výhodou při získávání hADPSCs je snadná dosažitelnost zubní dřene a eticky akceptovatelný odběr zdroje, tedy zubu. Dokonce byly hADPSCs již izolovány i z neextrahovaného zubu^{110,111}, zaveden byl také protokol imunomagnetické separace, který umožňuje oddělit jednotlivé subpopulace hADPSCs již během izolace^{112,113}. Zdroj hDPSCs, při kterém se chováme nejméně invazivně, nám poskytují právě lidské dočasné zuby blízké stádiu exfoliace (hDDPSCs). hDDPSCs odpovídají svým fenotypem, stejně jako kapacitou sebeobnovy a multilineární diferenciací^{73,114,115} postnatálním hMSCs⁷⁴. Díky ektomezenchymálnímu původu vykazují některé odlišné charakteristiky od obecně postulovaných pro hMSCs⁷⁴. Dle Kerkise a kol.¹⁰⁷ nesou hDDPSCs tyto typické povrchové znaky OCT3/4, CD29, CD31, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 a CD166 a neexprimují CD14, CD34, CD45. Dále byla prokázána jejich klonogenita¹¹⁴ a kapacita diferencovat v adipogenní, neurální⁹⁶ a svalové buňky¹¹⁵. Dle Miury a kol.¹¹⁴ jsou dočasné zuby přístupným zdrojem velmi kvalitních postnatálních kmenových buněk schopných poskytnout dostatek materiálu pro potenciální klinické aplikace¹¹⁶. hDDPSCs jsou v porovnání s hADPSCs ontogeneticky časnější buněčnou populací vykazující

kratší dobu potřebnou pro zdvojení populace^{107,117,118} a vyšší telomerázovou aktivitu¹¹⁹. Z těchto důvodů jsou podle některých autorů hDDPSCs nejslibnějším zdrojem hMSCs pro humánní buněčnou terapii a regenerativní medicínu⁷⁴. Linie kmenových buněk zubní dřeně získaných z natálních/neonatálních zubů (hNDPSCs) jsou ojedinele zkoumanými buněčnými liniemi, neboť se natální a neonatální zuby s ohledem na region a etnikum manifestují s četností 1:800 v Asii až 1:3500 živě narozených dětí v Evropě^{120,121}. Dále pouze malé procento z nich vykazuje morfologii dočasných zubů s přítomnou pulpální tkáně, která obsahuje hNDPSCs. Nález takového druhu je poměrně vzácný¹²². Tyto buňky vykazují charakteristiky blízké embryonálním kmenovým buňkám^{123,124}, což přisuzujeme velmi časně izolaci těchto buněk z nejranějšího postnatálního vývojového stadia lidského organismu a zároveň z vyvíjející se tkáně¹²⁵. Již v roce 2009 Huang, Gronthos a Shi⁷⁴ předpověděli existenci kmenových buněk také v zubní dřeni kongenitálních zubů. hNDPSCs byly izolovány, kultivovány (v kultivačním médiu s 15% FCS) a charakterizovány Karaözem a kol. v roce 2010¹²⁶ a Akpinarem a kol. v roce 2014¹¹⁹. Obě skupiny popsaly hNDPSCs jako metabolicky aktivní kmenové buňky, které exprimují na svém povrchu mezenchymální znaky, znaky embryonálních kmenových buněk a nevykazují hematopoetické markery. hNDPSCs byly diferencovány ve tři standardní buněčné linie (adipogenní, chondrogenní a osteogenní). V porovnání s hADPSCs a hDDPSCs vykazovaly vyšší proliferační a telomerázovou aktivitu¹²⁷. Aby bylo možno získat dostatečné množství validních dat, musí být nejprve hNDPSCs expandovány (koncentrace *in vivo* je pro účely většiny měření nedostatečná). Dle zavedených standardů (2004/23/EC a cGMP) lze předchozí studie na hNDPSCs v důsledku užití xenogenního séra označit pouze jako indikativní¹²⁸.

Terapie kmenovými buňkami je zajímavá a slibná cesta k regeneraci ztracených, či poškozených tkání. Zatímco na vědeckém poli kultivace buněk došlo od roku 1968, kdy byla provedena první úspěšná transplantace kostní dřeně¹²⁹, k velkému pokroku, stále se potýkáme s nepříznivým množstvím neznámých, což neumožňuje bezpečné provedení klinických studií. Jediná možnost, jak se vyhnout selhání terapie a jejím nežádoucím účinkům, je dokonalé porozumění změnám, kterým podléhají vlastnosti hMSCs za měnících se vlivů prostředí¹³⁰. V současnosti rozpoznáváme dva hlavní faktory ovlivňující vlastnosti kultivovaných hMSCs: 1) interindividuální rozdíly dárců¹³¹ a 2) složení kultivačního média¹³². Z tohoto pohledu se jedná především o xenogenní složky kultivačních médií, které s sebou nesou medicínské a etické námitky ohledně jejich použití k expanzi buněčných populací pro humánní použití¹³³⁻¹³⁵. Aby bylo možné výzkumná data mezi

sebou porovnávat, potvrdit jejich věrohodnost a umožnit tak jejich aplikaci v buněčné terapii byly vytvořeny právně závazné předpisy – v Evropské unii platná směrnice *EU Tissues and Cells Directive* (2004/23/EC) a ve Spojených státech amerických *U. S. current good manufacturing practice guidelines* (cGMP), které určují a popisují, za jakých podmínek by měla být původní buněčná linie expandována a dále kultivována. Účelem je minimalizovat rozdíly mezi buněčnými liniemi stejného původu, minimalizovat riziko kontaminace, imunitní reakce a imunizace v důsledku virové infekce nebo internalizace xenogenních proteinů^{136,137}. Aby byly splněny požadavky těchto nařízení, musí být zaveden systém kontroly kvality a čistoty vstupního biologického materiálu, stejně jako platnost a správnost samotného výzkumného protokolu^{138,139}. Z tohoto důvodu se pozornost části vědecké komunity obrací k náhradě xenogenních doplňků arteficiálními, nebo alogenními krevními komponentami¹⁴⁰⁻¹⁴³. Ačkoliv není ani alogenní doplňky možné standardizovat, jejich použitím se vyhneme internalizaci mimodruhových látek – především vyloučíme riziko zoonóz a imunogenicity^{131,132}. Přes všechny uvedené argumenty naprostá většina preklinických a zejména klinických studií využívá média s 10% až 20% koncentrací fetálního telecího séra (FCS), což pravděpodobně odpovídá variabilitě v získaných výsledcích (od proliferační aktivity, přes viabilitu, až po rozdíly v expresi povrchových znaků). Ukazuje se, že hMSCs vystavené vysokých koncentrací FCS spontánně diferencují, a to tím rychleji, čím vyšší je koncentrace FCS¹³⁵⁻¹³⁷. Tento vliv není omezen pouze na hMSCs, byl pozorován také například u prekurzorů adipocytů. Použití FCS v tomto případě vedlo ke zvýšené aktivitě glycerolfosfát-dehydrogenázy a diferenciaci ve zralé buněčné elementy¹³⁸⁻¹⁴¹. Proliferační aktivita neurálních progenitorů je redukována, pokud jsou kultivovány bez přidání cytokinů, v kultivačním médiu s FCS¹⁴²⁻¹⁴⁵.

Fetální telecí sérum (FCS) se díky vysokému obsahu růstových stimulačních faktorů, a naopak nízkému podílu inhibičních růstových faktorů v kombinaci s neschopností vědy vytvořit odpovídající arteficiální náhradu, stalo nejvíce využívaným růstovým doplňkem v kultivačních médiích. Dosud se při izolaci a expanzi hDPSCs (obecně hMSCs) často spoléhá na média obsahující vysoké koncentrace FCS ($\geq 10\%$), což umožňuje lepší adhezi buněk primokultury ke kultivačnímu povrchu^{73,107,108}. FCS představuje zatím jedinou možnost, jak udržet vysokou proliferační aktivitu buněčných linií bez nutnosti přidávat další doplňkové růstové faktory¹⁴⁶. Avšak použití vysokých koncentrací FCS během dlouhodobé kultivace hADPSCs může vést ke spontánní diferenciaci^{147,148}, nebo maligní transformaci¹⁴⁹⁻¹⁵¹. V předchozích studiích jsme

prokázali, že hADPSCs mohou být úspěšně dlouhodobě kultivovány se zachováním stabilního karyotypu i v nízko-sérových médiích (2% FCS), doplněných o epidermal growth factor (EGF) a platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)¹⁵². Použití těchto růstových faktorů bylo popsáno pro buňky kostní dřeně a multipotentní progenitorové buňky^{153,154}. Dále naše skupina prokázala, že i při tomto složení média si hADPSCs uchovávají širokou diferenciací kapacitu vyzrávat v osteogenní, chondrogenní, endoteliální, neurogenní a myogenní buněčnou linii¹⁵⁵. Hlavní složkou standardně užívaného kultivačního média pro somatické mezenchymální kmenové buňky zubní dřeně je alfa varianta Eaglova základního minimálního média (alfa MEM)^{152,155,156}. MEM obsahuje aminokyseliny, soli (chlorid vápenatý, chlorid draselný, síran hořečnatý, chlorid sodný a jednosytný fosforečnan sodný), glukózu a vitamíny (kyselinu listovou, nikotinamid, riboflavin a vitamín B12. Alfa modifikace MEMu navíc obsahuje více neesenciálních mastných kyselin, pyruvát sodný a více vitamínů (kyselina askorbová, biotin a kyanokobalamin) než varianta základní¹⁵⁷. Dle Suchánka a kol.¹⁵² odpovídá základní složení kultivačního média patentu č. US 7,015,097 B1¹⁵⁷, tj. 2% FCS, komplexu růstových faktorů s velmi nízkými hladinami protilátek, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF-BB, 50 nM dexametazonu, který zlepšuje přežití a dlouhověkost buněk^{158,159}. Avšak je dále obohaceno o vyšší koncentraci antioxidantu kyseliny askorbové, konkrétně 0,2 mM L-askorbát-2-fosfátu a 2 mM L-glutaminu, který je důležitý pro růst a funkci buněk^{160,161}. Pro vyloučení přerůstání bakteriální mikroflórou (vzhledem k nesterilnímu prostředí dutiny ústní, ze kterého se materiál získává) k tomuto médiu přidáváme 100 IU/ml penicilinu a 100 μg/ml streptomycinu. V případě nízké koncentrace FCS obohacujeme médium o komplement inzulinu, transferinu a selenu (ITS) v koncentraci 10 μl/ml (inzulin zvyšuje transport glukózy z krve do buněk a syntézu proteinů, transferin a selen se používají jako antioxidanty)^{162,163}. Toto složení nazýváme „Standardním kultivačním médiem“ (SKM). S ohledem na původ séra není možné zaručit stabilitu a neměnné složení jednotlivých šarží pro rozdílné složení endokrinních parametrů a jiných biologicky aktivních látek, odlišné množství proteinů atd.^{119,126,164}. Přesto mnoho současných klinických studií využívá kultivační média obohacená právě o FCS, přehlížejíce nejen nestabilní složení, ale především potenciální nebezpečí, které s sebou nese používání xenogenních komponent (tj. jiného živočišného druhu) a zároveň opomíjejí nutnost verifikovat vliv takových doplňků na kultivované buňky. Zejména hovězí sérové proteiny mohou být snadno internalizovány kmenovými buňkami a stimulovat tak imunogenitu v organismu příjemce následovanou závažnými komplikacemi¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Dokonce však může dojít k virovému nebo

prionovému přenosu zoonóz^{142,143,169-172}. Všechny tyto vedlejší účinky jsou dobře popsány, přesto jsou v odborné literatuře často přehlíženy. Studií, která ilustruje tuto praxi, může být například léčba infarktu myokardu myoblasty kultivovanými v médiu doplněném FCS, která vyústila ve vznik smrtelné maligní ventrikulární arytmie pacienta¹⁷³. Dalším příkladem je léčba nedostatku adenosinové deaminázy autologními T lymfocyty kultivovanými v médiu s FCS, která vedla ke vzniku specifických protilátek proti fetálnímu telecímu séru¹⁷⁴. Nelze také opomenout skutečnost, že FCS se získává z nenarozených, avšak již dobře vyvinutých telat během porážky březích krav^{175,176}. Tato etická otázka je o to palčivější, že dochází k prodlevě mezi usmrcením mateřského organismu a smrtí fétu. Při tomto procesu není užito analgetik, ani anestetik, neboť se jedná o vedlejší produkt produkce masa v potravinářském průmyslu¹⁷⁷. Použití xenogenních suplementů není pouze v rozporu s dobrou laboratorní a výrobní praxí¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Ale bylo také popsáno nezanedbatelné množství klinických případů, kdy se po aplikaci hMSCs kultivovaných v xenogenním médiu u příjemce vyskytly vážné zdravotní problémy. Kocaoemer a kol.¹⁸¹ upozornil na případy popsané v literatuře, kdy aplikace takto připravených buněk vyvolaly vážné imunologické reakce způsobené pravděpodobně internalizací bovinních proteinů¹⁸²⁻¹⁸⁵. Suchánek a kol.¹³² také poukázali na nestabilitu karyotypu, která může způsobit maligní transformaci buněk. Bruinink¹¹⁷ a Dictus¹⁴² pozorovali metabolické a morfologické změny, které vedly k větší variabilitě v chování hMSCs. Halme a Kessler¹⁴⁰ a WHO¹⁴³ upozornili na nebezpečí transferu zoonóz, především virových a prionových infekcí, na lidského příjemce^{165,185}. Z výše uvedených důvodů mezinárodní lékařská komunita usiluje o zákaz používání xenogenních suplementů během klinických testů na lidech a v medicíně obecně^{142,143,178,179}. Přes vše výše uvedené zůstává stále fetální telecí sérum^{136,137} zdaleka nejrozšířenějším suplementem v experimentálních *in vitro* kultivacích hMSCs, především pro vysokou koncentraci růstových faktorů^{187,188}. Z toho důvodu je většina vědeckých poznatků o hMSCs založena na jejich kultivaci v médiích obohacených o FCS¹⁷⁸. Z uvedeného vyvstává potřeba objektivizovat vlastnosti hMSCs. Nejlepším kandidátem je přímo čerstvý buněčný izolát, ale nízká koncentrace buněk primokultury neumožňuje provést nutné testy pro nedostatek substrátu. Nejlepším východiskem, jak vyřešit tuto situaci, se zdá náhrada dosud používaného FCS některou z komponent lidské krve (alogenního, lépe autologního původu), nebo přímo bezsérovým médiem^{106,189,190}.

Avšak ani alogenní a bezsérová média nejsou prosta problémů. Přestože složení bezsérového média může být standardizováno a plně chemicky definováno, čímž bude umožněna plná kontrola nad

kultivačními podmínkami při eliminaci potenciálního zdroje infekce, ukázala se pro některé typy hMSCs méně vhodná^{141,142,165,181,191,192}. Většina studií, které srovnávají bezsérová média mezi sebou nebo obecně se sérovými médii o různém původu, využívají buňky expandované v sérovém médiu s FCS o 10-20% koncentraci, které po dostatečné expanzi přesadí do testovaných médií. Tuto pasáž označují jako nultou. Díky této kontroverzní terminologii se daří dezinterpretovat získané výsledky ve prospěch užití bezsérových médií pro kultivaci hMSCs¹⁹³⁻¹⁹⁷. FCS ovlivňuje vlastnosti buněk, které jsou v něm kultivovány, a to již v raných pasážích^{182-184,198}, proto nelze brát výsledky takto koncipovaných studií jako směrodatné. Obecně buňky v bezsérových médiích vykazují nižší proliferaci aktivitu. Testováním takto expandovaných buněk vznikla doporučení pro kultivaci různých buněčných typů, která nebylo zatím možné ověřit¹⁹⁹. Některá bezsérová média vykazují imunopresivní efekt²⁰⁰, některá naopak zvyšují expresi prozánětlivých působků a podporují angiogenezi²⁰¹. Přestože by chemicky definované bezsérové médium mělo být, v důsledku vyloučení nekontrolovatelných proměnných, ideální pro pionýrskou vědeckou práci, jako je charakterizace nových buněčných linií nebo snazší reprodukovatelnost výsledků¹⁹⁵, nebyl dosud vyvinut arteficiální produkt, který by byl schopen lépe než krevní deriváty pokrýt požadavky somatických kmenových buněk při kultivaci *in vitro*^{202,203}.

Dalším suplementem, kterým lze nahradit xenogenní doplněk, je alogenní sérum, které je levnější variantou než bezsérové doplňky a je univerzálně použitelné pro všechny typy hMSCs (166). Tato séra jsou deriváty lidské krve zahrnující autologní, nebo poolované lidské sérum, sérum z pupečnickové a menstruační krve a deriváty krevních destiček^{187,204,205}, díky čemuž jsou lehce dosažitelná. Ačkoliv, jak poznamenává Zhang a kol.²⁰⁶, může i alogenní suplement vyvolat imunitní reakci, být zdrojem kontaminace organismu a rozdíly mezi dárce a dárce, či dárce a příjemcem, mohou bránit aplikaci kultivovaných hMSCs, většina výzkumníků se shoduje, že alogenní séra jsou jedinou široce přijatelnou náhradou FCS²⁰⁷⁻²¹². Existuje mnoho druhů alogenních sér, lidská krevní plazma (HP) a lidská krevní plazma obohacená o krevní destičky (PRP) jsou dva nejsnadněji izolovatelní zástupci této široké skupiny. Pokud se jedná o alogenní séra bylo prokázáno, že PRP překoná v mnohém FCS a je tedy jeho adekvátní náhradou²¹³⁻²¹⁵. HP a PRP séra obsahují stejné růstové faktory a cytokiny, ovšem s rozdílnou koncentrací, která je dána degranulací krevních destiček v PRP, kdy dojde k uvolnění těchto látek do vnějšího prostředí. Z toho plyne 3,5 až 5krát vyšší množství volných růstových faktorů a cytokinů v PRP, než které se nachází v HP²¹⁶⁻²¹⁸. Konkrétně se jedná o tyto růstové faktory – růstový faktor z krevních destiček

(PDGF), transformační růstové faktory beta1 a beta2 (TGF beta1, beta2), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), endoteliální růstový faktor z krevních destiček (EGF), interleukin 1 (IL-1), základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), krevní destičky aktivující faktor 4 (PAF-4)²¹⁶. Dle Bernarda a kol.²¹⁷ a Kiliana a kol.²¹⁹ vede větší podíl krevních destiček v PRP ke zvýšení prosperity kultivovaných buněk, intenzivnější migraci a pomáhá potlačit možnou imunitní reakci.

2. Cíle

Hlavním cílem naší studie bylo vybrat nejvhodnější derivát lidské krve k náhradě FCS, standardního základního doplňku alfa modikovaného Eaglova minimálního esenciálního média pro kultivaci hMSCs²²⁰⁻²²³. Konkrétně jsme se v naší práci zaměřili na kultivaci hDPSCs v sérových expanzních médiích. Naším cílem bylo posoudit vliv alogeních krevních derivátů (PRP, HP) a xenogenního krevního derivátu (FCS) na hNDPSCs, hDDPSCs a hADPSCs. Ke splnění tohoto cíle byly vybrány 2%, 10% a 20% koncentrace testovaných krevních derivátů. Důvodem byla zjištění týkající se koncentrace FCS, nejdéle používaného krevního suplementu živných médií eukaryotních buněk²²¹⁻²²³. 2% koncentrace obohacená o ITS je dle recentní literatury i našich předchozích studií optimálním kompromisem mezi bezsérovou variantou růstového média a sérovým typem. 10% koncentrace je standardně používána k expanzi hMSCs a považuje se za zlatý standard. A 20% koncentrace vede často ke spontánní diferenciaci, což je možné interpretovat jako důkaz cytotoxicity²²⁴. V první řadě bylo našim úkolem prokázat kmenovost izolovaných buněk. Buňky jsem vystavily dlouhodobé kultivaci překračující počet populačních zdvojení somatických buněk bez známek senescence^{225,226}. Dalším ukazatelem byla jejich schopnost diferencovat v osteoblasty, chondroblasty a adipocyty. Zkoumaná přítomnost STRO-1 v buněčné membráně kultivovaných buněk (*single pass cell membrane protein*) je specifickým znakem hMSCs. K přímému průkazu sebeobnovy jsme použili průkaz telomerázy jako přímého důkazu schopnosti sebeobnovy. Abychom byli schopni provést validní srovnání, zaměřili jsme se na porovnání buněčných charakteristik prostřednictvím proliferační aktivity, viability, morfologie, schopnosti diferenciaci, přítomnosti znaků pluripotence a široké analýzy povrchových znaků charakteristických obecně pro hMSCs, úžeji pro hDPSCs a jejich podtypy hADPSCs, hDDPSCs a hNDPSCs.

3. Materiál a metodika

Izolováno bylo 12 linií hDPSCs (hADPSC1-4, hDDPSCs1-4 a hNDPSCs1-4), které byly kultivovány do 3. pasáže ve SKM (v této pasáži byl získán dostatek buněk pro pokračování v experimentu), většina buněk byla zamrazena. Nezamražené buňky byly podrobeny testům k průkazu kmenovosti. Poté, co byla kmenovost pokázána, byly zamražené buněčné linie rozmrazeny a nasazeny v kvadriplikátu do 12 experimentálních médií (EKM). Každou z těchto buněčných populací jsme kultivovali od 4. do 9. pasáže. V 9. pasáži byla hodnocena viabilita a morfologie buněčných populací. S ohledem na možnosti pracoviště byla provedena fenotypová analýza u hADPSCs1-4 ve všech médiích, u hDDPSCs1-4 v 6 médiích a u hNDPSCs1-4 ve 2 médiích.

Ke statistické analýze rovnoměrně distribuovaných dat byl použit parametrický statistický test analýzy rozptylu (ANOVA), u nerovnoměrně distribuovaných dat neparametrický test porovnání středních hodnot pro více souborů dat (Friedmanův test) na PASS Sample Size Software (NCSS LLC, USA).

3.1 Izolace hDPSCs

Po čtyřech liniích od každého námi porovnávaného typu hDPSCs (hADPSCs, hDDPSCs, hNDPSCs) bylo izolováno ze zubní pulpy natálních, dočasných a stálých zubů. Všichni dárci byli mladší 30 let – průměrný věk dárce natálního zubu byl 3 dny, dárce dočasného zubu 12 let a stálého zubu 18 let, mezi dárci byli 4 muži a 8 žen (tj. v poměru 1:2). Extrahovanými natálními zuby byly zuby v místě dolních středních řezáků, z dočasných zubů se jednalo vždy o první dočasné moláry a mezi stálými zuby se jednalo o dolní třetí stálé moláry (Tab. 1). Indikací k extrakci dolních třetích stálých molárů jsou obtíže spojené s jejich prořezáváním nebo vztahem k okolním strukturám (retence, semiretence, opakující se záněty perikoronárního vaku, těsný kontakt s distálním kořenem dolních druhých molárů), u dětí je nejčastějším důvodem extrakcí dočasných zubů před eliminační fází prevence vzniku ortodontických vad, u natálních zubů komplikace spojené s příjmem mateřského mléka. Extrakce byly provedeny na základě medicínské indikace a na základě písemného souhlasu. Před dáním informovaného souhlasu byli pacient, nebo jeho zákonný zástupce obeznámeni s teorií kmenových buněk a plánovaným experimentem. Izolace kmenových buněk zubní pulpy pro vědecké účely, včetně textu informovaného souhlasu a poučení, byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové ref. č. 200712 S01P. Extrakce zubů byla provedena dle standardního operačního protokolu (SOP) za aseptických kautel v lokální

anestezii na Stomatologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zuby byly poté ošetřeny dezinfekčním roztokem 0,2% chlorhexidinu (Sigma-Aldrich, Německo) a transportovány plně ponořené do transportního média o teplotě 4 °C do Laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LFHK UK. Transportní médium se skládá z 1 ml Hankova balancovaného solného roztoku (Sigma-Aldrich, Německo), 9 ml fyziologického roztoku ve formě aqua pro injectione (B. Braun Medical, Německo), 100 IU/ml penicilinu a 100µg/ml streptomycinu (Gibco TM, USA).

| dárce zubů a identifikace buněčných linií hDPSCs | | | | | |
|--|----------------|-------|----------|---------|-----|
| buněčná linie | | dárce | | | |
| hDPSCs | označení linie | zub | označení | pohlaví | věk |
| hADPSCs | hADPSCs_1 | 38 | A-1 | XX | 18L |
| hADPSCs | hADPSCs_2 | 48 | A-2 | XX | 16L |
| hADPSCs | hADPSCs_3 | 38 | A-3 | XX | 21L |
| hADPSCs | hADPSCs_4 | 38 | A-4 | XY | 18L |
| hDDPSCs | hDDPSCs_1 | 54 | D-1 | XY | 12L |
| hDDPSCs | hDDPSCs_2 | 64 | D-2 | XX | 13L |
| hDDPSCs | hDDPSCs_3 | 74 | D-3 | XY | 10L |
| hDDPSCs | hDDPSCs_4 | 54 | D-4 | XX | 10L |
| hNDPSCs | hNDPSCs_1 | 071 | N-1 | XX | 3D |
| hNDPSCs | hNDPSCs_2 | 081 | N-2 | XX | 1D |
| hNDPSCs | hNDPSCs_3 | 071 | N-3 | XX | 5D |
| hNDPSCs | hNDPSCs_4 | 071 | N-4 | XY | 0D |

Tab. 1: Identifikace buněčných linií hDPSCs dle dárce (XY – muž, XX – žena, L – let, D – den).

Odběr zubní dřeně a izolace kmenových buněk byly provedeny v laminárním boxu II. bezpečnostní třídy biohazard (Alpina, Polsko) s vertikálním prouděním vzduchu jako ochranou před částicovou a bakteriální kontaminací. Laminární box byl těsně před použitím dekontaminován germicidní lampou (ultrafialové záření ve spektru C o vlnové délce 253,7 nm) (Luxera, Slovensko) pro sterilizaci vzduchu a povrchu. Vkládané laboratorní pomůcky byly dezinfikovány 15% roztokem chlornanu sodného (Thermo Fisher Scientific, USA). Laboratorní pracovník používal při práci jednorázových sterilních bariérových ochranných pomůcek – operační oděv (PANEP s.r.o., ČR), operační plášť (SR PLUS Immunity, BATIST Medical Group, ČR) operační čepici (Polly, PANEP s.r.o., ČR), chirurgickou ústenku s úvazky (PANEP s.r.o., ČR), sterilní nepudrované chirurgické

rukavice (Sempermed Supreme latex, Lohmann & Rauscher, s.r.o., Německo), návleky na zdravotnickou obuv přímo určenou ke vstupu do této laboratoře (PANEP, s.r.o., ČR). Samotné vyjmutí zubní dřeně z dřeňové dutiny se lišilo dle vývojového stádia kořenů. Klinická korunka byla (pokud byla již uzavřena) rozlomena Luerovými kleštěmi (Witter GmbH, Německo), anatomickou pinzetou (Witter GmbH, Německo) byla vyjmuta pulpální tkáň, exstirpační jehlou (STERILE Barbed Broaches, VDW Dental, Německo) vedenou kořenovými kanálky byla získána kořenová část pulpy. Izolace kmenových buněk zubní dřeně byla provedena dle SOP (Suchánek J., 2007), tj. metodou přímého nasazení enzymaticky rozvolněné extracelulární matrix pulpy, kdy buňky spontánně přisedly na plastový povrch standardní kultivační nádoby TC Dish 60, Cell+ (Sarstedt, USA) (SKN) (. Tkáň pulpy jsme rozstříhali sterilními chirurgickými nůžkami s rovnou čepelí (IRIS TC, DIMEDA, Německo) na dílky o velikosti cca 1 mm³ pro snazší natrávení enzymy. Následná enzymatická disociace v nemíchané vodní lázni (JB Nova, GRANT, Velká Británie) probíhala po dobu 70 minut při teplotě 37 °C v roztoku sestávajícího z kolagenázy typu I (Gibco TM, USA), dispázy (Gibco TM, USA), Hankova balancovaného solného roztoku (HBSR) (Sigma-Aldrich, Německo) a Dulbeccova fosfátového pufru (DFP) (Sigma-Aldrich, Německo) v poměru 1:1:1:1. Vzniklá směs (zbytky tkáně, buňky, složky disociačního činidla) byla neutralizována inaktivačním médiem (alfa MEM s 20 % FCS/HP/PRP). Po centrifugaci vzniklé buněčné suspenze dle standardních podmínek centrifugace (SPC) (rychlostí 2000 ot. /min, s relativní centrifugační silou 600 g, po dobu 5 min.) v centrifuze (M-240, Boeco Germany, Německo) jsme získali sediment bohatý na buňky, tzv. buněčnou peletu.

3.2. Kultivace hDPSCs

Při zachování pravidel asepse a antisepte a standardních podmínek kultivace za 90% vlhkost, teplotě 37 °C a atmosféra s 5 % CO₂ dle SOP (SKP) bylo buňkám primokultury po 24 hodinách vyměněno Standardní kultivační médium (SKM) s odstraněním zbytků měkkých tkání. Vzniklou buněčnou peletu jsme resuspendovali v 5ml SKM a nasadili v denzitě 5300 buněk/cm² (v celkovém počtu 112 500 buněk/21 cm²) do kultivačních nádob s povrchem pro růst citlivých adherentních buněk primokultury. SKN s buněčnou násadou byly umístěny do inkubátoru (CO2 CB 220, Binder, USA) za dodržení SKP. Pro zajištění optimální výživy bylo dvakrát v týdnu odstraněno vyčerpané SKM i s neadherovanými buňkami a vyměněno za čerstvé. Čtvrtý den po nasazení (primokultura, 0. pasáž), byla zjišťována přítomnost adherovaných buněk pomocí inverzního mikroskopu

(AXIOVERT, Zeiss, Německo). Po 7 dnech byly buňky prvně pasážovány, v následujících pasážích při dosažení 70% splývavosti (při vyšší splývavosti dochází k inhibici růstu). Vyčerpané médium bylo staženo, aniž by byla porušena vrstva přisedlých buněk. Buněčný monolayer byl opláchnut DFP, poté byly buňky na 5 min. vystaveny působení 3 ml 0,025% trypsinu (Sigma-Aldrich, Německo) v inkubátoru za SKP, aby došlo k jejich uvolnění z povrchu kultivační nádoby. Působení trypsinu bylo inaktivováno naředěním 3 ml SKM. Vzniklá suspenze byla několikrát ode dna resuspendována a centrifugována dle SPC v centrifugační zkumavce (KartellLABWARE, Itálie). Takto byly všechny hDPSCs expandovány do 3. pasáže. Ve 3. pasáži byla větší část linií hDPSCs zamrazena v kryokonzervačním médiu, které se skládalo z 10 % dimethylsulfoxidu (Sigma-Aldrich, Německo) a 20% FCS (Sigma-Aldrich, Německo) v poměru 2:8. Buněčná suspenze ve SKM byla resuspendována s kryokonzervačním médiem v poměru 1:1 při teplotě 4 °C, poté byla zkumavka uložena na 2 hod. do - 20 °C a označena datem a finálně uložena při teplotě - 80 °C. Nezamražené hDPSCs byly použity k průkazu kmenovosti a schopnosti jednotlivých subtypů diferencovat ve zralé buněčné linie (osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciaci) (tzv. trojlineární diferenciaci). SKM se skládá z alfa MEM (Sigma-Aldrich, Německo), 2% FCS (Sigma-Aldrich, Německo), 10 ng/ml EGF (PeproTech, USA), 10 ng/ml PDGF-BB (PeproTech, USA), 50 nM dexametazonu (Sigma-Aldrich, Německo), 0,2 mM L-askorbát-2-fosfátu (Sigma-Aldrich, Německo), 2 mM L-glutamine (Gibco TM, USA), 100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Gibco TM, USA) a 10 µl/ml ITS (Sigma-Aldrich, Německo).

3.3. Biologické vlastnosti, kmenovost a schopnost diferenciaci hDPSCs

Viabilita byla hodnocena pomocí zobrazovacího systému automatického cytometru Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter™, USA). Buněčná suspenze (která vzniká během pasážování po centrifugaci, stažení supernatantu a resuspendování v 1 ml kultivačního média) o objemu 250 µl byla zředěna 250 µl fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS) (SAFC, Německo) a smíšena v poměru 1:1 s 0,4% roztokem trypanové modři (Sigma-Aldrich, Německo), pro níž jsou permeabilní pouze buněčné membrány mrtvých buněk. Každý vzorek byl hodnocen pomocí 50 obrázků, což umožnilo stanovit buněčnou koncentraci a viabilitu. Viabilitu jsme hodnotili ve 3. a 10. pasáži. Velikost buněk a proliferační aktivitu jsme měřili přístrojem Z2 Coulter Counter (Beckman Coulter™, USA), kdy je měřena změna elektrické impedance při průchodu jednotlivé buňky (buňka zde působí jako izolant) tunelem mezi dvěma elektrodami. Buněčná

suspenze o objemu 100 μ l byla zředěna 9,9 ml izotonického roztoku fosfátového pufru Isoton II diluent (Beckman Coulter™, USA) v měřicí kyvetě. Izotonický roztok zde sloužil jako elektrolyt. Množství buněk na 1 ml je násobkem počtu buněk na mřížce 25 cm² krát 10⁴. Celkový počet buněk byl získán vynásobením počtu buněk/ml celkovým objemem buněčné suspenze. Dle tohoto výpočtu, po opětovném resuspendování obsahu centrifugační zkumavky, jsme nasadili 112 500 buněk do SKN. Hodnocení morfologie probíhalo před každým pasážováním a třetí den po nasazení. V inverzním mikroskopu BX51 Olympus vybaveném kamerou (DP71, Olympus, Japonsko) jsme hodnotili především tvar buněk a jejich schopnost adherovat k povrchu kultivační nádoby, popř. možné patologické změny.

K trojlineární diferenciaci byly hDPSCs ze 3. pasáže nasazeny do 6 SKN v množství 2,5krát 10⁵ buněk a kultivovány v SKM do dosažení 70% splývavosti. Následně byly rozděleny na experimentální a kontrolní skupinu (v poměru 1:1), po výměně za diferenciací média a SKM dle příslušnosti ke skupině byly uloženy do inkubátoru za SKP. Diferenciační médium u experimentální skupiny a SKM u kontrolní skupiny bylo měněno každý 3. den. Experiment trval v tomto schématu 4 týdny. Kontrolní skupiny pro osteodiferenciaci a chondrodiferenciaci byly kultivovány ve 4 ml SKM, osteodiferenciační testovací skupiny ve směsi 2 ml SKM a 2 ml osteogenního média, chondrodiferenciační testovací skupiny ve 4 ml chondrogenního média; výše uvedené skupiny byly nasazeny do SKN. Osteogenní médium obsahovalo alfa MEM, 50ng/ml TGF-beta1 (Stem Cell Technologies, Kanada), 0,5 mM askorbové kyseliny, 10 mM β -glycerolfosfátu (Sigma-Aldrich, Německo), 0,1 μ M dexametazonu. Chondrogenní médium obsahovalo bylo alfa MEM, 50 ng/ml TGF-beta1. K adipodiferenciaci byly všechny buňky ze SKN resuspendovány s 24 ml SKM a nasazeny do dvou 6jamkových kultivačních destiček (CC Plate 6 well Cell+, 9,07 cm²/jamka, Sarstedt, USA) o výsledném objemu 2ml/jamku. Čtyři dny po dosažení 100% splývavosti byla jedna destička ponechána jako kontrolní, na druhé destičce byla indukována diferenciaci nahrazením SKM adipogenním médiem. Adipogenní médium obsahovalo SMK, 100 nM dexametazonu (Sigma-Aldrich, Německo), 100 ng/ml inzulinu (Sigma-Aldrich, Německo) a 100 ng/ml indometacinu (Sigma-Aldrich, Německo). Po 4 týdnech byly buňky kontrolních i experimentálních skupin histologicky barveny. Buňky byly fixovány při pokojové teplotě 10% formaldehydem (Sigma-Aldrich, Německo). Získaný materiál byl přelit přes filtrační papír, který byl následně vložen do kapsle a zpracován v autotechnikonu (TP 1020 Automatic Tissue Processor, Leica Microsystems, Německo), kde proběhl proces odvodnění stoupající řadou

alkoholů (Ethanol, Sigma-Aldrich, Německo), prosycení methysalicylátem (Sigma-Aldrich, Německo) k projasnění tkáně a parafinem (Sigma-Aldrich, Německo). Po zpracování v autotechnikonu byly buňky uvolněny z povrchu nosiče a v zalévací komůrce (KartellLABWARE, Itálie) zality parafinem (Sigma-Aldrich, Německo) rozehrátým na 56 °C a rychle schlazeny. Sériové řezy (5-6 μm) z rotačního mikrotomu (Leica Biosystems, Německo) byly zamontovány pomocí chromové želatiny (Newcomer, USA) na podložní sklíčka předpřipravená síranem draselno-chromitým (Sigma-Aldrich, Německo) a ponechány při pokojové teplotě uschnout. Druhý den byly řezy vymyty xylolem (Sigma-Aldrich, Německo) a rehydratovány v etanolu (Sigma-Aldrich, Německo). Následně byly řezy histologicky barveny, dehydratovány a montovány DPX (Sigma-Aldrich, Německo). Osteodiferenciaci jsme prokázali barvením dle von Kossy (Sigma-Aldrich, Německo) k průkazu vápníku, v kombinaci s barvením alizarinovou červení (Sigma-Aldrich, Německo) pro kvantifikaci vápníku. K průkazu chondrodiferenciace bylo využito histologické barvení modrým Massonovým trichromem (Sigma-Aldrich, Německo) k detekci kolagenu typu I a alciánovou modří (Sigma-Aldrich, Německo) k detekci kyselých mukopolysacharidů. K průkazu adipogenní diference jsme použili olejovou červeň O (Sigma-Aldrich, Německo) barvicí intracelulární tukové kapénky. Barvení bylo provedeno dle protokolu Kraus a kol.²²⁷. K verifikaci adipodiference byly intracelulární tukové vakuoly bezprostředně pozorovány ve světelném mikroskopu Olympus (BX50 Fluorescence Microscope BX50F-3 Pred BX53 – AV, Olympus Corporation, Japonsko).

Imunocytochemické barvení znaků pluripotence hDPSCs probíhalo dle protokolu Siriboon a kol.²²⁸. Abychom zvýšili nabídku antigenních struktur, deparafinizovali jsme řezy xylolem a rehydratovali snižující se koncentrací etanolu (96, 80 a 70%) a dvakrát opláchlí destilovanou vodou. Pro revitalizaci tkáňových antigenů byly v roztoku citronanu sodného o pH = 6,02 (Sigma-Aldrich, Německo) deparafinizované řezy vystaveny dvakrát 5 minut působení mikrovlnného záření o vlnové délce 12,24 cm při výkonu 700 W. Abychom zabránili falešně pozitivní nespecifické vazbě primární protilátky, bylo třeba saturovat buněčnou peletu bílkovinami. K blokování nespecifických vazeb jsme připravili roztok DFP s 1% hovějším sérovým albuminem (Sigma-Aldrich, Německo) a 1% sérem stejného živočišného druhu, od kterého byla získána primární protilátka (Sigma-Aldrich, Německo). Účinek tohoto média byl po 30 minutách ukončen oplachem řezů roztokem PBS s 0,3 % hověžního sérového albuminu. Pokud jsme používali pro průkaz vazby antigenu s protilátkou značenou peroxidázou, blokovali jsme endogenní aktivitu

enzymu přirozeně se vyskytujícího ve tkáni, abychom tak zabránili falešně pozitivní reakci. Po intenzivním oplachu vodou byla aktivita endogenní peroxidázy zastavena vysycením 3% roztokem peroxidu vodíku (Sigma-Aldrich, Německo) po třikrát 10 minut. K vazbě protilátky a detekčního systému za vzniku chromogenu v místě specifické vazby jsme nejprve přes noc při teplotě 4 °C vystavili vzorek působení primární protilátky (Tab. 2) v roztoku s komponenty redukujícími signál pozadí (Dako, Dánsko). Jako negativní kontroly bylo použito vhodné myší isotypové kontroly, nebo byla primární protilátka vynechána. Při imunoenzymové vizualizaci byly protilátky značeny konjugací s křenovou peroxidázou užitím peroxidázového kitu EnVision + System-HRP (DAB) (Dako, Dánsko) dle návodu výrobce. Chemická reakce křenové peroxidázy a jejího substrátu – peroxidu vodíku byla ozřejmena oxidací chromogenu DAB (2 µg/ml 3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid) (CN/DAB SUBSTRATE KIT, Thermo Fisher Scientific, USA), který se této reakce také účastní. Po omytí destilovanou vodou se viditelnost hnědých precipitátů DAB zintenzivnila působením 3% roztoku síranu měďnatého (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 5 minut. Řezy byly kontrastně zbarveny buď Mayerovým hematoxylinem (Sigma-Aldrich, Německo), nebo barvením *Light green* (BDH Stains, Poole, UK), dehydratovány a montovány do DPX (p-xylen-bis-pyridinium bromid, Invitrogen, USA). V případě imunofluorescenční detekce byly buněčné membrány po důkladném vymytí fixativa permeabilizovány při pokojové teplotě po dobu 10 minut 0,1% roztokem Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich, Německo), buňky byly ponořeny do blokovacího roztoku a inkubovány s primární protilátkou. Po omytí byly inkubovány s odpovídajícím fluorochromem konjugovaným s druhově specifickou sekundární protilátkou při pokojové teplotě 45 minut. Z fluorochromů byly užity Alexa Fluor (488 nm, Invitrogen, USA) a Cy3 (488 nm, Invitrogen, USA). Buněčná jádra byla kontrastně obarvena 4'-6-diamidino-2-phenyl-indolem (DAPI, Sigma-Aldrich, Německo). Jako uzavírací médium jsme pod krycí sklíčko použili polyvinylalkohol/glycerol (Sigma-Aldrich, Německo). Vzorky jsme odečítali pomocí fluorescenčního mikroskopu BX51 Olympus (Olympus, Japonsko) s digitálním fotoaparátem DP71 Olympus. Získané fotografie byly zpracovány programem Adobe Photoshop (Adobe Systems, USA). Pro průkaz vysoké koncentrace alkalické fosfatázy v cytoplazmatických membránách jako typického znaku pro hESCs bylo použito histologické barvení Fast violet B (Sigma-Aldrich, Německo) (viz. výše).

| znak pluripotence | název primární protilátky | klonalita | číslo produktu | výrobce |
|-------------------|---------------------------|-----------|----------------|------------------------|
| STRO-1 | Anti-STRO-1 Antibody | mono | MAB4315 | Sigma-Aldrich, Německo |
| TELOMERÁZA | Anti-Telomerase Antibody | poly | SAB4502944 | Sigma-Aldrich, Německo |
| NANOG | Anti-Nanog Antibody | mono | MABD24 | Sigma-Aldrich, Německo |
| SOX-2 | Anti-SOX-2 Antibody | mono | MAB4343 | Sigma-Aldrich, Německo |
| OCT-4 | Anti-OCT-4 Antibody | poly | AB3209 | Sigma-Aldrich, Německo |

Tab. 2: Protilátky k průkazu pluripotence hDPSCs.

3.4. Kultivace hDPSCs v experimentálních kultivačních médiích

Poté, co byla kmenovost těchto buněčných populací prokázána, byly zamražené buňky rozmrazeny a každý subtyp hDPSCs nasazen v kvadruplikátu do dvanácti různých kultivačních médií, kde byl kultivován od 4. – 9. pasáže. Podstatou všech experimentálních kultivačních médií (EKM) bylo Základní kultivační médium (ZKM). To se skládá z alfa MEM jako základní složky, která byla obohacena o 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF-BB, 1 ng/ml FGF-2 (Sigma-Aldrich, Německo,) 50 nM dexametazonu, 0,2 mM L-askorbát-2-fosfátu, 2 mM L-glutaminu a 100 IU/ml penicilinu s 100 µg/ml streptomycinu. Odběr a příprava derivátů lidské krve (HP, PRP) a jejich použití v kultivačním médiu byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové pod ref. č. 201011 S14P. Každý krevní derivát byl získán smísením vzorků pěti dárců. Krevní deriváty byly připraveny ve spolupráci s Transfúzním oddělením Fakultní nemocnice Hradec Králové. Níže uvedený výčet užitých experimentálních kultivačních médií obsahuje mimo označení média písmenem, především hlavní složky, kterými se mezi sebou liší (Tab. 3).

| | | | |
|-----------------|---------------|-----------------|--------------------|
| médium A | ZKM + 2% FCS | médium B | ZKM + 2% FCS + ITS |
| médium C | ZKM + 2% HP | médium D | ZKM + 2% HP + ITS |
| médium E | ZKM + 2% PRP | médium F | ZKM + 2% PRP + ITS |
| médium G | ZKM + 10% FCS | médium H | ZKM + 20% FCS |
| médium I | ZKM + 10% HP | médium J | ZKM + 20% HP |
| médium K | ZKM + 10% PRP | médium L | ZKM + 20% PRP |

| médium | xenogenní | alogenní | FCS | | | HP | | | PRP | | | ITS |
|--------|-----------|----------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 2% | 10% | 20% | 2% | 10% | 20% | 2% | 10% | 20% | |
| A | x | | x | | | | | | | | | |
| B | x | | x | | | | | | | | | x |
| C | | x | | | | x | | | | | | |
| D | | x | | | | x | | | | | | x |
| E | | x | | | | | | | x | | | |
| F | | x | | | | | | | x | | | x |
| G | x | | | x | | | | | | | | |
| H | x | | | | x | | | | | | | |
| I | | x | | | | | x | | | | | |
| J | | x | | | | | | | x | | | |
| K | | x | | | | | | | | x | | |
| L | | x | | | | | | | | | | x |

Tab. 3: Složení kultivačních médií použitých v experimentu.

3.5. Průkaz povrchových znaků hDPSCs po kultivaci v EKM

Cílem byla detekce specifických antigenních determinant s využitím imunologické vazby na principu antigen-protilátka. V našich experimentech jsme používali pouze monoklonální protilátky – specifické proti jedné antigenní determinantě. K průkazu povrchových antigenů byly použity buňky, které jsme standardně fixovali v jedné vrstvě 10 minut pomocí neutrálního pufrovaného 4% vodného roztoku paraformaldehydu (Sigma-Aldrich, Německo), díky čemuž se podařilo zachovat část enzymatické a imunoglobulinové aktivity. Přítomnost, tj. množství pozitivních buněk pro sledované povrchové znaky (CD, Cluster of Differentiation) bylo měřeno průtokovou cytometrií přístrojem Cell Lab QUANTA (Beckman Coulter™, USA). Nastavení přístroje a strategie jeho propustnosti byly stanoveny pomocí isotypové kontroly, data byla analyzována pomocí FlowJo software (TreeStar, Ashland, USA). hDPSCs byly uvolněny z povrchu kultivační nádoby roztokem trypsinu, po inaktivaci trypsinu a centrifugaci (5 min, 300 g) jsme inkubovali při 4 °C po dobu 30 minut 100 µl buněčné suspenze (10^5 buněk) s imunofluorescenčními protilátkami, tj. monoklonálními protilátkami proti sledovanému povrchovému znaku (CD), na níž byl navázán fluorochrom (FITC, nebo PE) (Tab. 4). Po fixaci 0,5% paraformaldehydem a vymytím přebytečné protilátky pomocí PBS jsme vzorek analyzovali průtokovým cytometrem, který zaznamenává pozitivitu detekovaného znaku znázorněného fluorescenční intenzitou fluorochromu na něj navázaného (Tab. 4). Bylo požadováno 10,000 signálů na každý vzorek zpracovaný v průtokovém

cytometru. Abychom byli schopní detekovat neživé buňky v buněčné suspenzi během průtokové cytometrie, vizualizovali jsme je pomocí nukleárního kontrastního barviva propidium jodidu (Sigma-Aldrich, Německo) v množství 2,5 µg/ml buněčné suspenze, který není schopen prostoupit buněčné membrány živých buněk. Procento pozitivních buněk bylo stanoveno jako procento buněk s vyšší fluorescenční intenzitou než 99,5 % negativní isotopové imunoglobulinové kontroly, která určuje úroveň nespecifického signálu pozadí. Vyjádření povrchových znaků jsme hodnotili dle těchto klasifikačních kritérií: <10 % jako žádná, 11-40 % nízká exprese, 41-70 % mírná exprese, >71 % vysoká exprese povrchového znaku. Fenotypovou analýzu jsme provedli v 9. pasáži.

| protilátka | fluorochrom | klon | protilátka | fluorochrom | klon | protilátka | fluorochrom | klon |
|-------------------|-------------|------------|-------------------|-------------|------------|--------------------|-------------|----------|
| anti-CD9 | FITC | MM2/57 | anti-CD49e | FITC | SAM-1 | anti-CD146 | PE | TEA1/34 |
| anti-CD10 | FITC | CB-CALLA | anti-CD63 | FITC | CLBGran/12 | anti-CD166 | PE | 3A6 |
| anti-CD13 | FITC | WM-15 | anti-CD68 | FITC | K51 | anti-CD197 | FITC | 3D12 |
| anti-CD14 | FITC | RMO52 | anti-CD71 | FITC | YDJ1.2.2 | anti-CD221 | PE | 1H7 |
| anti-CD18 | PE | 2E6 | anti-CD73 | PE | AD2 | anti-CD222 | FITC | MEM-238 |
| anti-CD19 | FITC | J4.119 | anti-CD81 | FITC | JS-81 | anti-CD235a | FITC | JC159 |
| anti-CD29 | FITC | TDM29 | anti-CD90 | FITC | F15-42-1 | anti-CD271 | FITC | ME20.4 |
| anti-CD31 | PE | MBC78.2 | anti-CD105 | PE | 1G11 | anti-CXCR4 | PE | 12G5 |
| anti-CD33 | PE | D3HL60.251 | anti-CD106 | PE | 51-10C9 | anti-HLA I | FITC | Tü149 |
| anti-CD34 | PE | 581 | anti-CD117 | PE | YBS.B8 | anti-INF β | FITC | MMHB-3 |
| anti-CD44 | PE | MEM-85 | anti-CD119 | PE | GIR-208 | anti-HLA-DR | PE | Immu-357 |
| anti-CD45 | FITC | J.33 | anti-CD133 | PE | EMK08 | anti-OCT3/4 | PE | EM92 |
| anti-CD49d | FITC | HP2/1 | anti-CD140 | PE | 16A1 | anti-STRO-1 | FITC | STRO-1 |

Tab. 4: Použité imunofluorescenční protilátky s navázaným cytochromem.

4. Výsledky

Všechny linie hDPSCs byly nejprve kultivovány pro průkaz kmenovosti do 15. pasáže (vč.) ve SKM, podrobeny trojlineární diferenciaci a průkazu přítomnosti STRO-1. Poté byly nasazeny do experimentálních médií, kde byly sledovány růstové charakteristiky a exprese povrchových znaků.

4.1. Kultivace hDPSCs ve SKM

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných linií hADPSCs1-4 za 15 pasáží byl 54,10 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $53,95 \pm 6,12$ cPDs (Tab. 5 A, Graf 1). Medián času zdvojení buněčných linií hADPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68 \pm 18,58$ h (Tab. 5 B).

Tab. 5 A: Kumulativní počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. pasáže

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| cPDs_SKM_hADPSCs1 | 16,22 | 19,20 | 23,17 | 25,15 | 27,14 | 30,22 | 33,36 | 36,82 | 39,13 | 42,71 | 45,10 | 47,97 | 50,25 | 53,00 | 54,94 |
| cPDs_SKM_hADPSCs2 | 15,69 | 21,03 | 24,42 | 28,97 | 31,07 | 33,44 | 37,05 | 40,73 | 44,31 | 46,97 | 50,41 | 52,95 | 56,09 | 58,47 | 61,25 |
| cPDs_SKM_hADPSCs3 | 15,11 | 17,70 | 20,76 | 22,72 | 23,98 | 26,17 | 28,46 | 30,61 | 32,33 | 34,31 | 36,45 | 39,60 | 41,97 | 44,60 | 46,36 |
| cPDs_SKM_hADPSCs4 | 16,15 | 20,68 | 24,68 | 27,25 | 29,03 | 30,96 | 33,14 | 35,38 | 37,97 | 40,09 | 43,56 | 46,01 | 49,01 | 51,25 | 53,25 |
| av cPDs/pasáž | 15,79 | 19,65 | 23,26 | 26,02 | 27,81 | 30,20 | 33,00 | 35,89 | 38,44 | 41,02 | 43,88 | 46,63 | 49,33 | 51,83 | 53,95 |
| SD av cPDs/pasáž | 0,51 | 1,52 | 1,79 | 2,70 | 3,01 | 3,02 | 3,52 | 4,18 | 4,92 | 5,30 | 5,76 | 5,52 | 5,80 | 5,72 | 6,12 |
| m cPDs/pasáž | 15,92 | 19,94 | 23,80 | 26,20 | 28,09 | 30,59 | 33,25 | 36,10 | 38,55 | 41,40 | 44,33 | 46,99 | 49,63 | 52,13 | 54,10 |

ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Tab. 5 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. pasáže kultivace

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_SKM_hADPSCs1 (h) | 20,72 | 32,21 | 18,14 | 48,48 | 48,24 | 31,17 | 23,68 | 27,75 | 40,69 | 40,22 | 80,33 | 50,17 | 73,68 | 52,36 | 86,60 |
| DT_SKM_hADPSCs2 (h) | 21,41 | 17,98 | 21,24 | 21,10 | 45,71 | 40,51 | 19,94 | 26,09 | 26,26 | 54,14 | 55,81 | 56,69 | 53,50 | 60,50 | 60,43 |
| DT_SKM_hADPSCs3 (h) | 22,24 | 37,07 | 23,53 | 48,98 | 76,19 | 46,84 | 31,44 | 44,65 | 54,65 | 72,73 | 89,72 | 45,71 | 70,89 | 54,75 | 95,45 |
| DT_SKM_hADPSCs4 (h) | 20,80 | 21,19 | 18,00 | 37,35 | 53,93 | 49,74 | 33,03 | 42,86 | 36,29 | 67,92 | 55,33 | 58,78 | 56,00 | 64,29 | 84,00 |
| av DT/pasáž | 21,29 | 27,11 | 20,23 | 38,98 | 56,02 | 42,07 | 27,02 | 35,34 | 39,47 | 58,75 | 70,30 | 52,84 | 63,52 | 57,98 | 81,62 |
| SD av DT/pasáž | 0,70 | 9,01 | 2,66 | 13,07 | 13,88 | 8,22 | 6,24 | 9,77 | 11,78 | 14,65 | 17,43 | 6,00 | 10,24 | 5,42 | 14,95 |
| m DT/pasáž | 21,11 | 26,70 | 19,69 | 42,92 | 51,09 | 43,68 | 27,56 | 35,31 | 38,49 | 61,03 | 68,07 | 53,43 | 63,45 | 57,63 | 85,30 |

ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

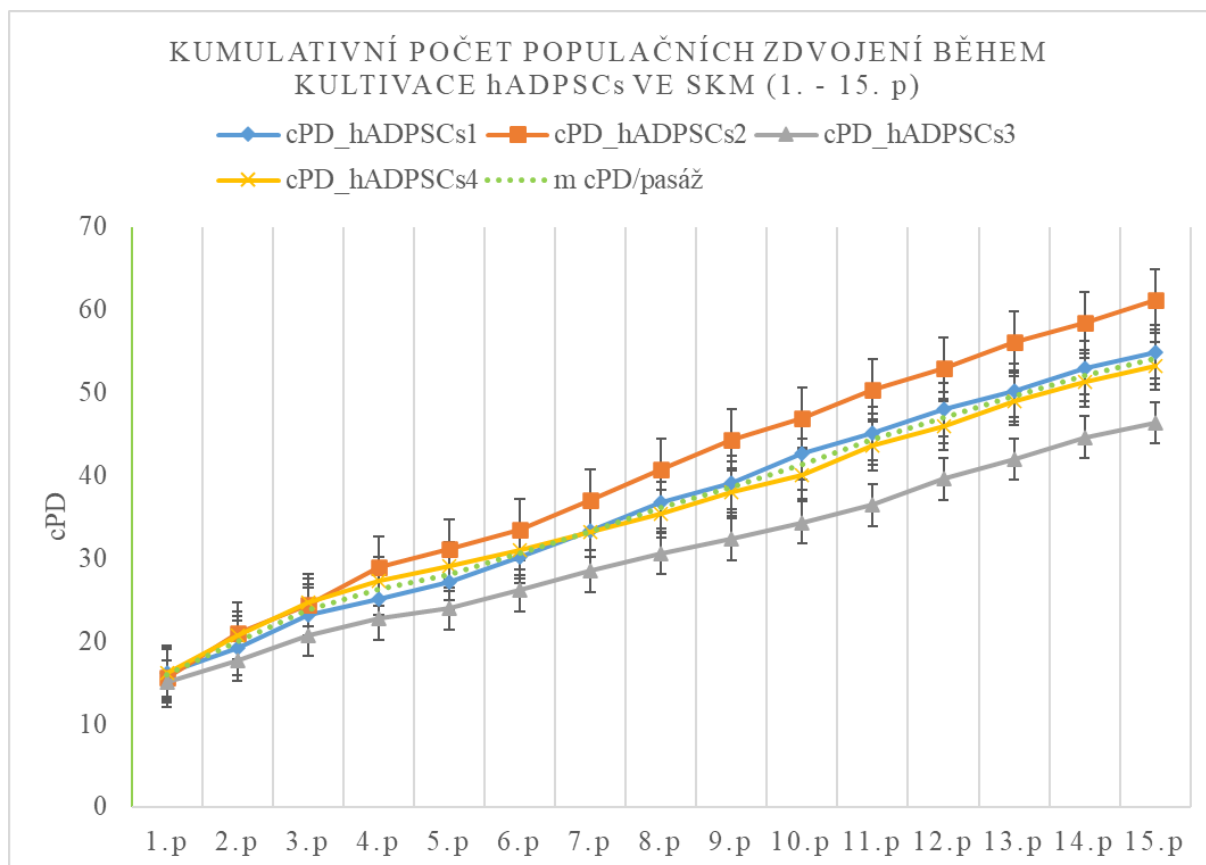
Proliferační aktivitu jednotlivých linií hADPSCs vyjadřují tyto hodnoty:

cPDs/avDT (hADPSCs1) **54,94 PDs/44,96 ± 21,32 hod.**

cPDs/avDT (hADPSCs2) **61,25 PDs/38,75 ± 17,08 hod.**

cPDs/avDT (hADPSCs3) **46,36 PDs/54,32 ± 22,5 hod.**

cPDs/ avDT (hADPSCs4) **53,25 PDs/46,63 ± 19,02 hod.**



Graf 1: Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení SKM_hADPSCs1-4 za 15 pasáží ve vztahu k mediánu kumulativního počtu zdvojení buněčných populací SKM_hADPSCs1-4 za 15 pasáží.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 51,74 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $52,24 \pm 4,68$ cPDs (Tab. 6 A, Graf 2). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68 \text{ h} \pm 18,58 \text{ h}$ (Tab. 6 B).

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| cPDs_SKM_hNDPSCs1 | 15,86 | 19,43 | 23,75 | 27,36 | 32,31 | 36,96 | 39,77 | 43,04 | 46,99 | 50,60 | 53,91 | 57,20 | 59,55 | 62,11 | 65,92 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs2 | 14,00 | 18,50 | 22,00 | 27,90 | 30,01 | 34,96 | 38,90 | 41,00 | 45,60 | 49,30 | 49,99 | 55,02 | 58,36 | 60,00 | 63,22 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs3 | 16,03 | 20,55 | 24,78 | 30,00 | 33,05 | 36,10 | 40,00 | 42,36 | 46,88 | 49,00 | 51,00 | 54,08 | 60,07 | 61,34 | 64,95 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs4 | 14,99 | 18,25 | 24,00 | 29,03 | 32,00 | 36,30 | 39,99 | 43,25 | 47,00 | 51,06 | 54,00 | 57,09 | 60,20 | 62,58 | 66,01 |
| av cPDs/pasáž | 15,22 | 19,18 | 23,63 | 28,57 | 31,84 | 36,08 | 39,67 | 42,41 | 46,62 | 49,99 | 52,23 | 55,85 | 59,55 | 61,51 | 65,03 |
| SD av cPDs/pasáž | 0,93 | 1,04 | 1,17 | 1,18 | 1,30 | 0,83 | 0,52 | 1,02 | 0,68 | 1,00 | 2,04 | 1,55 | 0,84 | 1,13 | 1,30 |
| m cPDs/pasáž | 15,43 | 18,97 | 23,88 | 28,47 | 32,16 | 36,20 | 39,88 | 42,70 | 46,94 | 49,95 | 52,46 | 56,06 | 59,81 | 61,73 | 65,44 |

Tab. 6 A: Kumulativní počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. pasáže během kultivace ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|
| DT_SKM_hDDPSCs1 (h) | 24,07 | 27,59 | 21,30 | 28,92 | 34,04 | 49,23 | 22,93 | 49,48 | 34,94 | 80,00 | 49,61 | 85,71 | 84,00 | 48,48 | 157,01 |
| DT_SKM_hDDPSCs2 (h) | 23,55 | 29,81 | 23,68 | 71,64 | 49,48 | 22,17 | 16,74 | 25,26 | 23,98 | 34,95 | 43,74 | 105,88 | 82,76 | 36,27 | 54,72 |
| DT_SKM_hDDPSCs3 (h) | 24,31 | 31,17 | 33,64 | 27,99 | 39,18 | 32,00 | 25,35 | 50,26 | 36,29 | 60,00 | 90,14 | 94,12 | 123,53 | 60,00 | 130,23 |
| DT_SKM_hDDPSCs4 (h) | 23,80 | 27,20 | 21,11 | 24,55 | 23,82 | 32,88 | 34,62 | 48,48 | 31,02 | 70,24 | 66,44 | 70,24 | 83,17 | 44,17 | 79,25 |
| av DT/pasáž | 23,93 | 28,94 | 24,93 | 38,28 | 36,63 | 34,07 | 24,91 | 43,37 | 31,56 | 61,30 | 62,48 | 88,99 | 93,37 | 47,23 | 105,30 |
| SD av DT/pasáž | 0,29 | 1,63 | 5,13 | 19,33 | 9,25 | 9,71 | 6,43 | 10,47 | 4,78 | 16,78 | 18,01 | 12,98 | 17,42 | 8,57 | 40,41 |
| m DT/pasáž | 23,94 | 28,70 | 22,49 | 28,46 | 36,61 | 32,44 | 24,14 | 48,98 | 32,98 | 65,12 | 58,03 | 89,92 | 83,59 | 46,33 | 104,74 |

Tab. 6 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. pasáže během kultivace ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

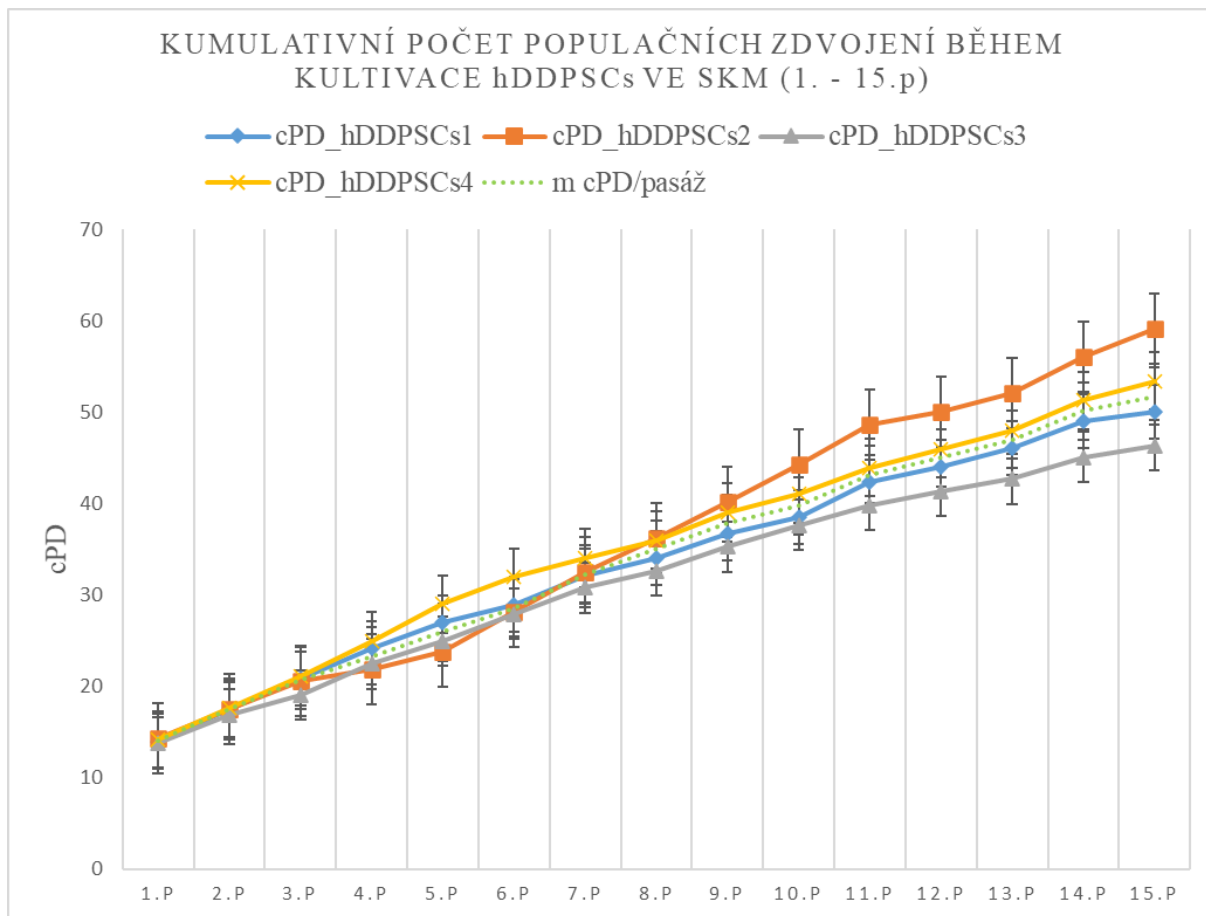
Proliferační aktivitu jednotlivých linií hDDPSCs vyjadřují tyto hodnoty:

cPD/avDT (hDDPSCs1) **50,07 PDs/53,15 \pm 36,15 hod.**

cPD/avDT (hDDPSCs2) **59,10 PDs/42,96 \pm 25,87 hod.**

cPD/avDT (hDDPSCs3) **46,37 PDs/57,21 \pm 35,68 hod.**

cPD/ avDT (hDDPSCs4) **53,40 PDs/45,40 \pm 22,41 hod.**



Graf 2: Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení SKM_hDDPSCs1-4 za 15 pasáží ve vztahu k mediánu kumulativního počtu zdvojení buněčných populací SKM_hDDPSCs1-4 za 15 pasáží.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 65,44 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $65,03 \pm 1,30$ cPDs (Tab. 7 A, Graf 3). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68h \pm 18,58$ h (Tab. 7 B).

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| cPDs_SKM_hNDPSCs1 | 15,86 | 19,43 | 23,75 | 27,36 | 32,31 | 36,96 | 39,77 | 43,04 | 46,99 | 50,60 | 53,91 | 57,20 | 59,55 | 62,11 | 65,92 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs2 | 14,00 | 18,50 | 22,00 | 27,90 | 30,01 | 34,96 | 38,90 | 41,00 | 45,60 | 49,30 | 49,99 | 55,02 | 58,36 | 60,00 | 63,22 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs3 | 16,03 | 20,55 | 24,78 | 30,00 | 33,05 | 36,10 | 40,00 | 42,36 | 46,88 | 49,00 | 51,00 | 54,08 | 60,07 | 61,34 | 64,95 |
| cPDs_SKM_hNDPSCs4 | 14,99 | 18,25 | 24,00 | 29,03 | 32,00 | 36,30 | 39,99 | 43,25 | 47,00 | 51,06 | 54,00 | 57,09 | 60,20 | 62,58 | 66,01 |
| av cPDs/pasáž | 15,22 | 19,18 | 23,63 | 28,57 | 31,84 | 36,08 | 39,67 | 42,41 | 46,62 | 49,99 | 52,23 | 55,85 | 59,55 | 61,51 | 65,03 |
| SD av cPDs/pasáž | 0,93 | 1,04 | 1,17 | 1,18 | 1,30 | 0,83 | 0,52 | 1,02 | 0,68 | 1,00 | 2,04 | 1,55 | 0,84 | 1,13 | 1,30 |
| m cPDs/pasáž | 15,43 | 18,97 | 23,88 | 28,47 | 32,16 | 36,20 | 39,88 | 42,70 | 46,94 | 49,95 | 52,46 | 56,06 | 59,81 | 61,73 | 65,44 |

Tab. 7 A: Kumulativní počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. pasáže během kultivace ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

| | 1.p | 2.p | 3.p | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | 10.p | 11.p | 12.p | 13.p | 14.p | 15.p |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|
| DT_SKM_hNDPSCs1 (h) | 21,19 | 26,89 | 16,67 | 26,59 | 19,39 | 20,65 | 25,62 | 29,36 | 23,80 | 39,89 | 58,01 | 43,77 | 71,49 | 56,25 | 44,09 |
| DT_SKM_hNDPSCs2 (h) | 24,00 | 21,33 | 20,57 | 16,27 | 45,50 | 19,39 | 18,27 | 45,71 | 20,43 | 38,92 | 278,26 | 28,63 | 50,30 | 87,80 | 52,17 |
| DT_SKM_hNDPSCs3 (h) | 20,96 | 21,24 | 17,02 | 18,39 | 31,48 | 31,48 | 48,46 | 40,68 | 20,80 | 67,92 | 96,00 | 46,75 | 28,05 | 113,29 | 46,54 |
| DT_SKM_hNDPSCs4 (h) | 22,41 | 29,45 | 12,52 | 19,09 | 32,32 | 22,33 | 19,51 | 29,45 | 25,07 | 35,47 | 65,31 | 46,60 | 54,02 | 60,50 | 48,98 |
| av DT/pasáž | 22,14 | 24,73 | 16,70 | 20,09 | 32,17 | 23,46 | 27,97 | 36,30 | 22,53 | 45,55 | 124,40 | 41,44 | 50,97 | 79,46 | 47,95 |
| SD av DT/pasáž | 1,39 | 4,11 | 3,29 | 4,50 | 10,67 | 5,48 | 14,04 | 8,22 | 2,27 | 15,03 | 103,89 | 8,65 | 17,85 | 26,53 | 3,45 |
| m DT/pasáž | 21,80 | 24,11 | 16,85 | 18,74 | 31,90 | 21,49 | 22,57 | 35,07 | 22,30 | 39,41 | 80,66 | 45,19 | 52,16 | 74,15 | 47,76 |

Tab. 7 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 1. – 15. ve SKM. Uveden aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

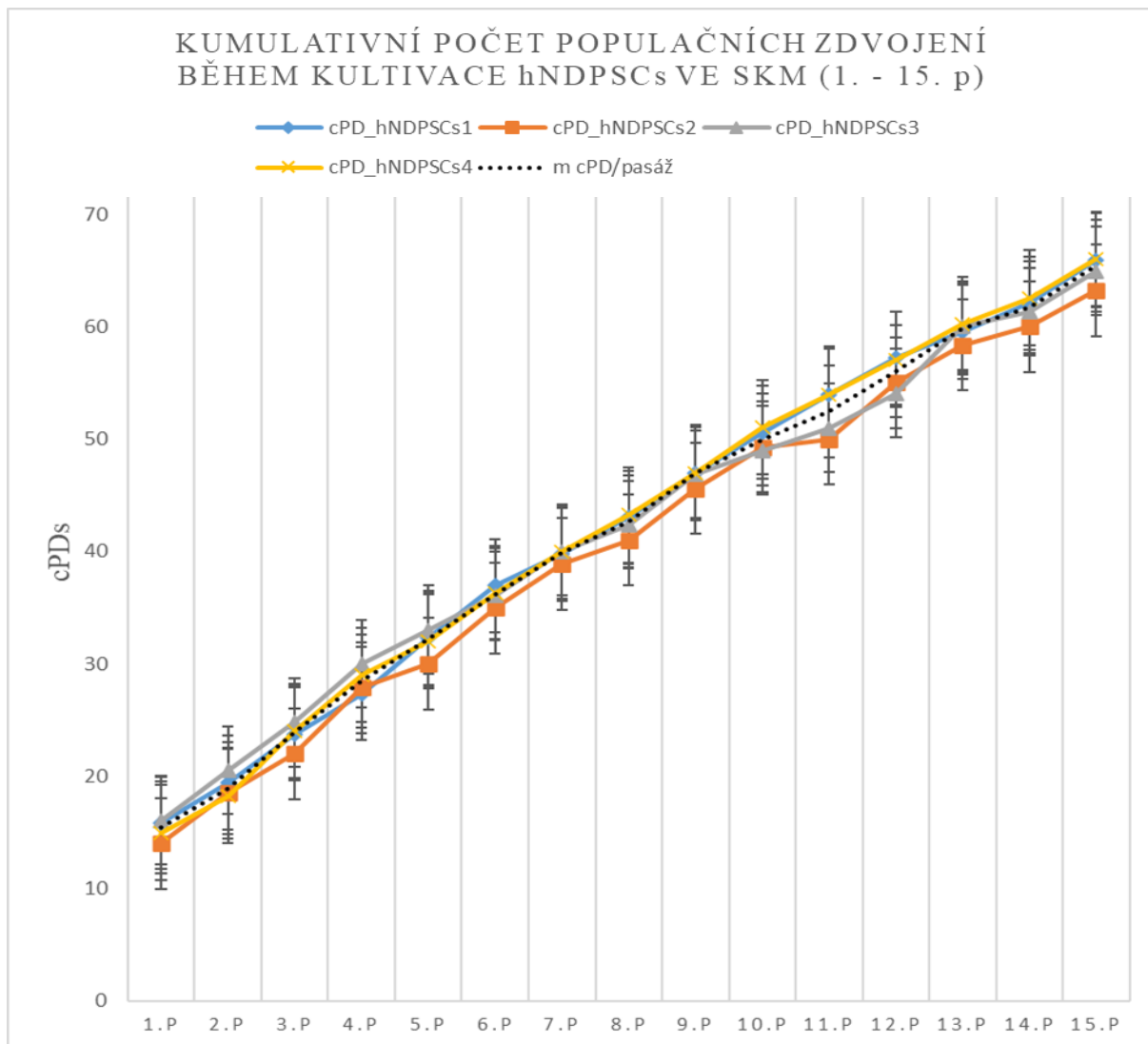
Proliferační aktivitu jednotlivých linií hNDPSCs vyjadřují tyto hodnoty:

cPD/avDT (hNDPSCs1) **65,92 PDs/34,91 \pm 16,59 hod.**

cPD/avDT (hNDPSCs2) **63,22 PDs/51,17 \pm 65,71 hod.**

cPD/avDT (hNDPSCs3) **64,95 PDs/43,27 \pm 28,85 hod.**

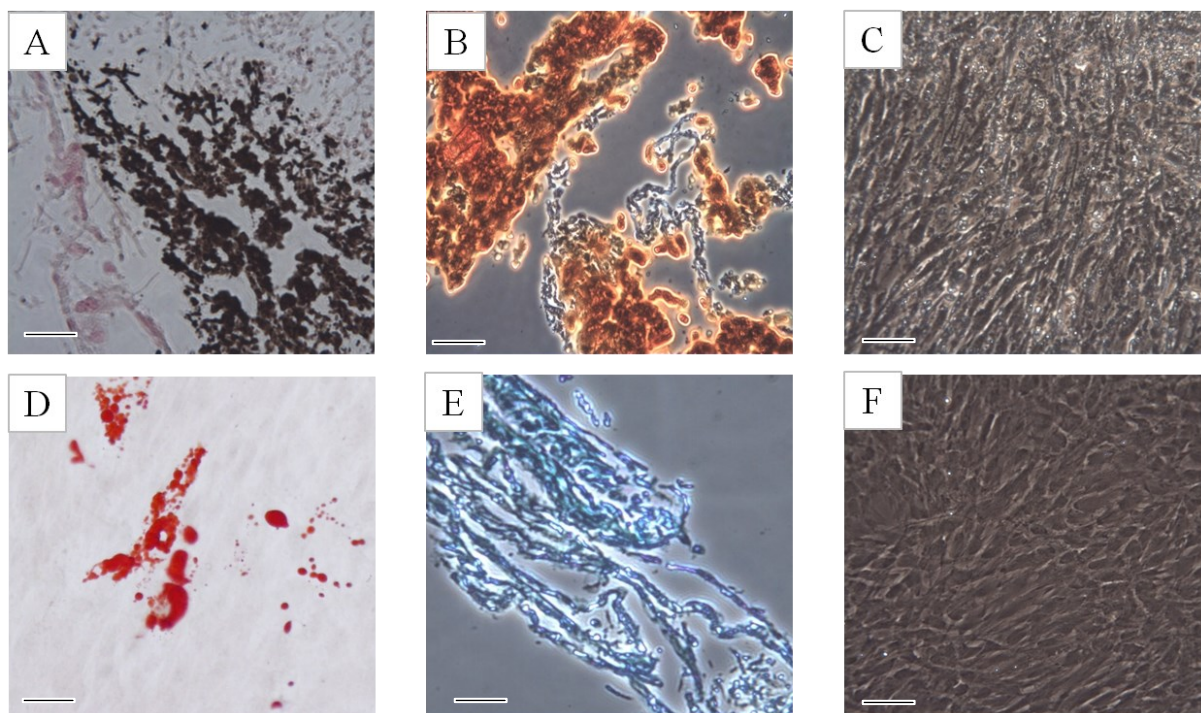
cPD/ avDT (hNDPSCs4) **66,01 PDs/34,87 \pm 16,36 hod.**



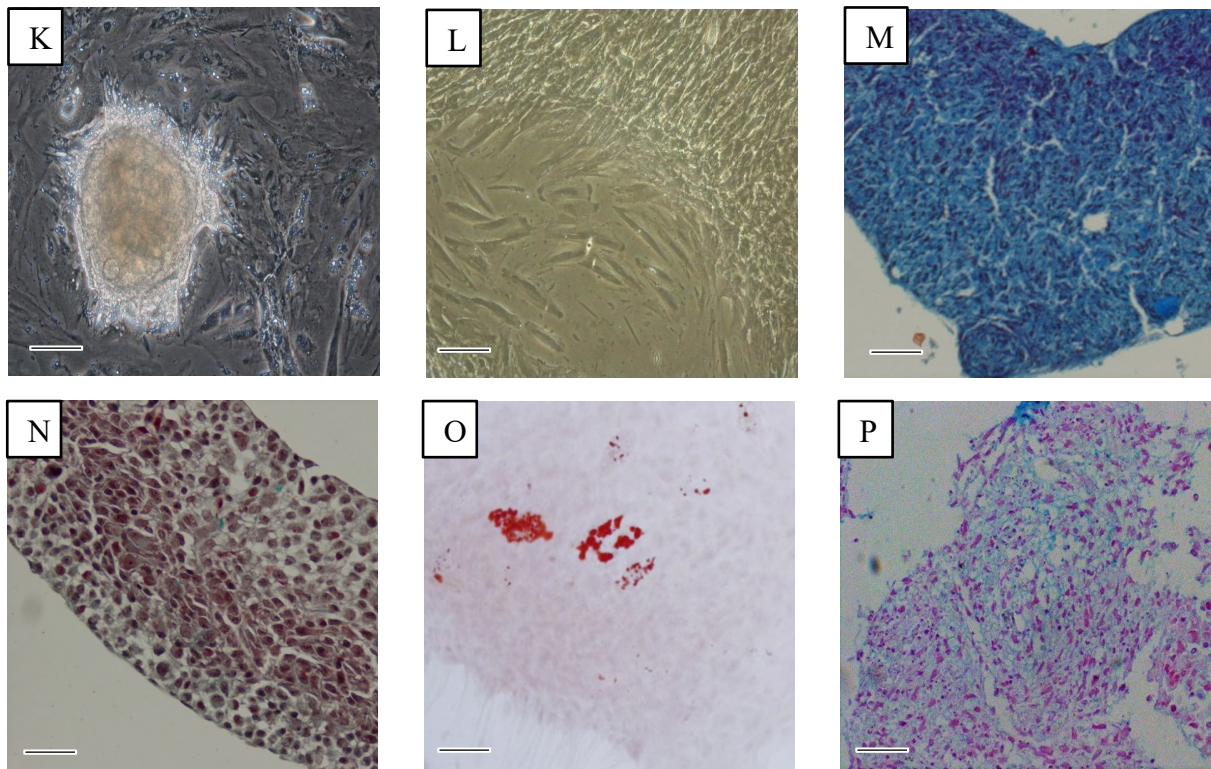
Graf 3: Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení SKM_hNDPSCs1-4 za 15 pasáží ve vztahu k mediánu kumulativního počtu zdvojení buněčných populací SKM_hNDPSCs1-4 za 15 pasáží.

4.2. Trojlineární diferenciace, znaky hESCs u hDPSCs kultivovaných ve SKM

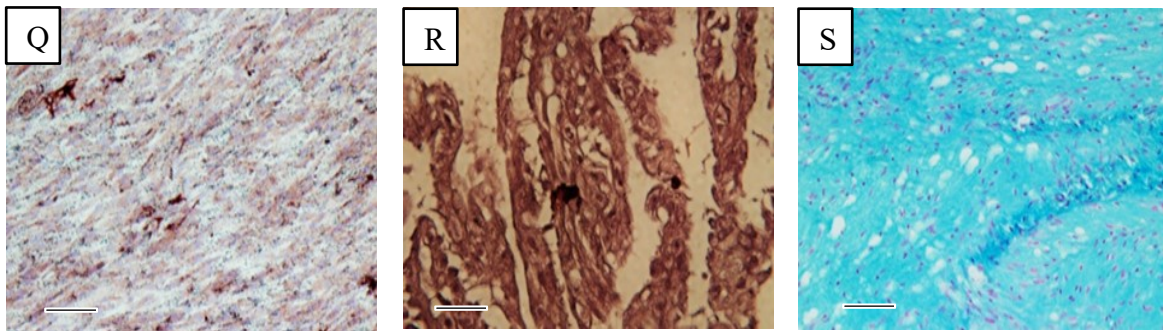
Trojlineární diferenciace byla provedena u všech linií hDPSCs. K tomuto účelu byly použity buňky z 6. pasáže ve SKM. Důkazem úspěšné osteodiferenciace byla přítomnost osteoidu u hADPSCs vizualizovaného barvením dle von Kossy (Obr. 1–A), dále byl osteoid nativně pozorovaného nejen u hADPSCs (Obr. 1-C), ale také u hDDPSCs (Obr. 2-K). Vápníková depozit barvená alizarinovou červení byla zjištěna u hADPSCs (Obr. 1–B), hDDPSCs (Obr. 2-N) a také hNDPSCs (Obr. 3-Q). Chondrogenní diferenciace byla potvrzena přítomností glykosaminoglykanů chrupavčité tkáně – hADPSCs (Obr. 1-E), hDDPSCs (Obr. 2-P) a hNDPSCs (Obr. 3-S). Navíc byl k verifikaci úspěšné chondrodiferenciace u hDDPSCs prokázán také kolagenu typu I, který byl v preparátu zbarven modře (Obr. 2-M). Chondrogenní matrix vzniklá diferenciací hADPSCs je na Obr. 1-F snímkována nativně. Přítomnost intracelulárních tukových kapének vizualizovaných barvením olejovou červení O je důkazem adipodiferenciace u hADPSCs (Obr. 1-D), hDDPSCs (Obr. 2-O) a hNDPSCs (Obr. 3-R). Stejně tak nativní snímek ostrůvku obrovských tukových buněk vzniklých vyžráváním hNDPSCs v adipogenním médiu (Obr. 2-L).



Obr. 1. Průkaz trojlineární diferenciace hADPSCs: A+B+C – osteogenní, D – adipogenní a E+F – chondrogenní (měřítko 1µm).

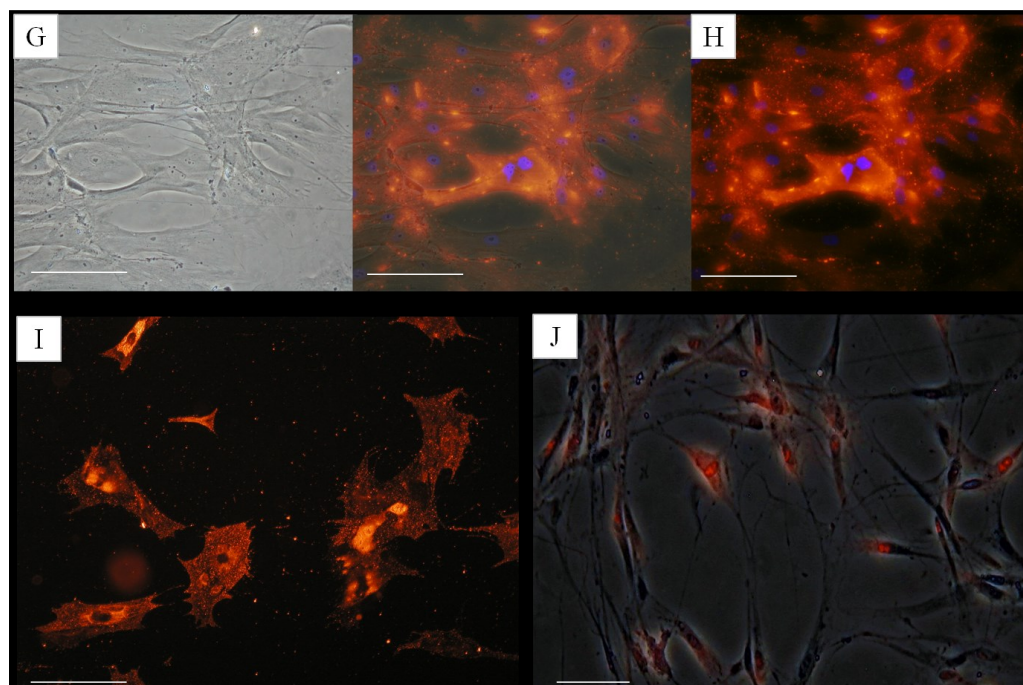


Obr. 2 Průkaz trilineage diferenciace hDDPSCs: K+N – osteogenní, L+O – adipogenní a M+P – chondrogenní (měřítko 1 μ m).

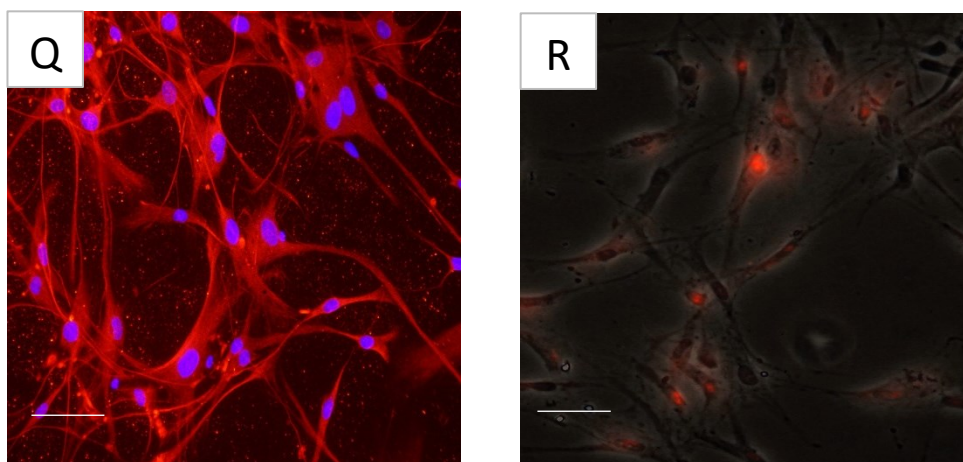


Obr. 3 Průkaz diferenciace hNDPSCs: Q – osteogenní, R – adipogenní a S – chondrogenní (měřítko 1 μ m).

Metodou imunocytochemické detekce jsme prokázali u hADPSCs a hDDPSCs přítomnost proteinového markeru hMSCs STRO-1 (Obr. 4-I) a enzymu telomerázy (Obr. 4-J/5-R). Obr. 4-G jsou buňky zachyceny nazivně a na dvojobrázku 4-H hADPSCs značené nejen na STRO1, ale také DAPI ke zvýraznění buněčných jader před a po zaostření a zvýšení barevného kontrastu. Na Obr. 5-Q je u hDDPSCs průkaz přítomnosti STRO-I s dobarvením buněčných jader DAPI.

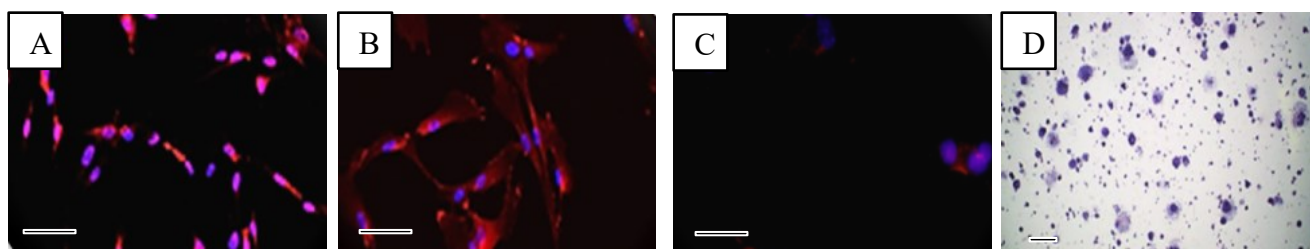


Obr. 4: Znaky hESCs u hADPSCs: I – STRO-1, G – nativní, H – STRO-1+DAPI, J – telomeráza (měřítko 1 μ m).



Obr. 5: Znaky hESCs u hDDPSCs: Q – STRO-1+DAPI, R – telomeráza (měřítko 1 μ m).

Kmenové buňky zubní dřeně natálních zubů nesou některé transkripční faktory a znaky pluripotence shodné s hESCs. Imunofluorescenčním barvením, doplněným o barvení buněčných jader pomocí DAPI, jsme prokázali přítomnost jaderného transkripčního faktoru NANOG (Obr. 6-A), zásadního znaku pluripotence a schopnosti diferenciaci, definujícího embryonální kmenové buňky. Dále byly prokázány transkripční faktory OCT-4 (Obr. 6-B) a SOX2 (Obr. 6-C). Barvením metodou Fast Blue byla prokázána vysoká úroveň alkalické fosfatázy (ALP) (Obr. 6-D), enzymu vysoce aktivního v embryonálních a neurálních kmenových buňkách, který zásadně zvyšuje odolnost a přežívání kmenových buněk v primokultuře.



Obr. 6: Transkripční faktory hECSs u hNDPSCs: A – NANOG, B – OCT-4, C – SOX2 a R – ALP.

4.3. Vliv kultivace hDPSCs v experimentálních kultivačních médiích

Všechny linie hDPSCs po průkazu kmenovosti byly rozmrazeny ve 3. pasáži a nasazeny do 12 EMK, kde byly kultivovány od 4. do 9. pasáže. V 9. pasáži byla provedena fenotypová analýza.

4.3.1. hADPSCs

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu A byl 12,71 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $12,34 \pm 0,1$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu A v jedné pasáži byl 2,25 a jejich aritmetický průměr (av/p_PD_s_mA_hADPSCs1-4_4-9p) byl $2,06 \pm 0,17$. (Tab. 8 A) Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 42,28 h a jejich aritmetický průměr byl $45,41 \pm 5,87$ h. (Tab. 8 B)

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPDs |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mA_hADPSCs1 | 2,47 | 2,56 | 1,69 | 1,59 | 2,21 | 2,29 | 12,81 |
| PD_mA_hADPSCs2 | 1,97 | 2,20 | 1,56 | 1,40 | 1,97 | 2,02 | 11,12 |
| PD_mA_hADPSCs3 | 2,35 | 2,56 | 1,79 | 1,56 | 2,22 | 2,27 | 12,75 |
| PD_mA_hADPSCs4 | 2,33 | 2,10 | 1,73 | 1,75 | 2,35 | 2,40 | 12,66 |
| av_PD_mA_hADPSCs1-4 | 2,28 | 2,36 | 1,69 | 1,58 | 2,19 | 2,25 | |
| SDav_PD_mA_hADPSCs1-4 | 0,22 | 0,24 | 0,10 | 0,14 | 0,16 | 0,16 | |
| m_PD_mA_hADPSCs1-4 | 2,34 | 2,38 | 1,71 | 1,58 | 2,22 | 2,28 | |

Tab. 8 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linií.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mA_hADPSCs1 | 38,87 | 37,50 | 56,80 | 45,28 | 43,44 | 41,05 |
| DT_mA_hADPSCs2 | 48,73 | 43,64 | 61,54 | 51,43 | 48,73 | 46,53 |
| DT_mA_hADPSCs3 | 40,85 | 37,50 | 53,63 | 46,15 | 43,24 | 41,41 |
| DT_mA_hADPSCs4 | 41,20 | 45,71 | 55,49 | 41,14 | 40,85 | 39,17 |
| av DT_mA_hADPSCs1-4 | 42,41 | 41,09 | 56,87 | 46,00 | 44,07 | 42,04 |
| SDav DT_mA_hADPSCs1-4 | 4,33 | 4,23 | 3,38 | 4,23 | 3,33 | 3,15 |
| m_DT_mA_hADPSCs1-4 | 41,03 | 40,57 | 56,15 | 45,72 | 43,34 | 41,23 |

Tab. 8 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu B byl 25,28 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $25,33 \pm 0,88$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu B v jedné pasáži byl 4,23 a jejich aritmetický průměr byl $4,22 \pm 0,61$ (Tab. 9A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 21,07 h a jejich aritmetický průměr byl $21,17 \pm 4,56$ h (Tab. 9 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mB_hADPSCs1 | 4,90 | 3,10 | 4,48 | 4,05 | 4,23 | 4,55 | 25,31 |
| PD_mB_hADPSCs2 | 4,79 | 2,99 | 4,32 | 3,94 | 4,03 | 4,24 | 24,31 |
| PD_mB_hADPSCs3 | 4,82 | 3,15 | 4,47 | 4,10 | 4,16 | 4,54 | 25,24 |
| PD_mB_hADPSCs4 | 5,00 | 3,23 | 4,78 | 4,25 | 4,54 | 4,67 | 26,47 |
| av_PD_mB_hADPSCs1-4 | 4,88 | 3,12 | 4,51 | 4,09 | 4,24 | 4,50 | |
| SDav PD_mB_hADPSCs1-4 | 0,09 | 0,10 | 0,19 | 0,13 | 0,22 | 0,18 | |
| m_PD_mB_hADPSCs1-4 | 4,86 | 3,13 | 4,48 | 4,08 | 4,20 | 4,55 | |

Tab. 9 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. - 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mB_hADPSCs1 | 19,59 | 30,97 | 21,43 | 17,78 | 22,70 | 20,66 |
| DT_mB_hADPSCs2 | 20,04 | 32,11 | 22,22 | 18,27 | 23,82 | 22,17 |
| DT_mB_hADPSCs3 | 19,92 | 30,48 | 21,48 | 17,56 | 23,08 | 20,70 |
| DT_mB_hADPSCs4 | 19,20 | 29,72 | 20,08 | 16,94 | 21,15 | 20,13 |
| av_DT_mB_hADPSCs1-4 | 19,69 | 30,82 | 21,30 | 17,64 | 22,68 | 20,92 |
| SDav DT_mB_hADPSCs1-4 | 0,38 | 1,00 | 0,89 | 0,55 | 1,13 | 0,88 |
| m_DT_mB_hADPSCs1-4 | 19,75 | 30,72 | 21,45 | 17,67 | 22,89 | 20,68 |

Tab. 9 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu C byl 14,80 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $14,80 \pm 0,63$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu C v jedné pasáži byl 2,29 a jejich aritmetický průměr byl $2,47 \pm 0,11$ (Tab. 10 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 41,89 h a jejich aritmetický průměr byl $40,01 \pm 9,59$ h (Tab. 10 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mC_hADPSCs1 | 2,63 | 4,25 | 2,64 | 1,63 | 2,03 | 2,10 | 15,28 |
| PD_mC_hADPSCs2 | 2,43 | 3,97 | 2,44 | 1,50 | 1,95 | 2,03 | 14,32 |
| PD_mC_hADPSCs3 | 2,65 | 4,22 | 2,53 | 1,75 | 2,15 | 2,11 | 15,41 |
| PD_mC_hADPSCs4 | 2,56 | 4,16 | 2,49 | 1,39 | 1,75 | 1,84 | 14,19 |
| av_PD_mC_hADPSCs1-4 | 2,57 | 4,15 | 2,53 | 1,57 | 1,97 | 2,02 | |
| SDav_PD_mC_hADPSCs1-4 | 0,09 | 0,11 | 0,07 | 0,14 | 0,15 | 0,11 | |
| m_PD_mC_hADPSCs1-4 | 2,60 | 4,19 | 2,51 | 1,57 | 1,99 | 2,07 | |

Tab. 10 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mC_hADPSCs1 | 36,50 | 22,59 | 36,36 | 44,17 | 47,29 | 44,76 |
| DT_mC_hADPSCs2 | 39,51 | 24,18 | 39,34 | 48,00 | 49,23 | 46,31 |
| DT_mC_hADPSCs3 | 36,23 | 22,75 | 37,94 | 41,14 | 44,65 | 44,55 |
| DT_mC_hADPSCs4 | 37,50 | 23,08 | 38,55 | 51,80 | 54,86 | 51,09 |
| av_DT_mC_hADPSCs1-4 | 37,43 | 23,15 | 38,05 | 46,28 | 49,01 | 46,68 |
| SDav_DT_mC_hADPSCs1-4 | 1,49 | 0,72 | 1,26 | 4,63 | 4,33 | 3,04 |
| m_DT_mC_hADPSCs1-4 | 37,00 | 22,91 | 38,25 | 46,09 | 48,26 | 45,53 |

Tab. 10 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu D byl 33,91 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $33,95 \pm 0,89$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu D v jedné pasáži byl 5,67 a jejich aritmetický průměr byl $5,66 \pm 0,14$ (Tab. 11 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 16,89 h a jejich aritmetický průměr byl $16,35 \pm 1,38$ h. (Tab. 11 B)

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mD_hADPSCs1 | 5,60 | 5,60 | 7,00 | 4,05 | 5,60 | 5,68 | 33,53 |
| PD_mD_hADPSCs2 | 5,40 | 5,60 | 6,92 | 4,09 | 5,48 | 5,49 | 32,98 |
| PD_mD_hADPSCs3 | 5,57 | 5,65 | 7,03 | 4,41 | 5,82 | 5,80 | 34,28 |
| PD_mD_hADPSCs4 | 5,62 | 5,75 | 7,33 | 4,57 | 5,84 | 5,90 | 35,01 |
| av_PD_mD_hADPSCs1-4 | 5,55 | 5,65 | 7,07 | 4,28 | 5,69 | 5,72 | |
| SDav_PD_mD_hADPSCs1-4 | 0,09 | 0,06 | 0,16 | 0,22 | 0,15 | 0,15 | |
| m_PD_mD_hADPSCs1-4 | 5,59 | 5,63 | 7,02 | 4,25 | 5,71 | 5,74 | |

Tab. 11 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. - 9. v médiu D. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mD_hADPSCs1 | 17,14 | 17,14 | 13,71 | 17,78 | 17,14 | 16,55 |
| DT_mD_hADPSCs2 | 17,78 | 17,14 | 13,87 | 17,60 | 17,52 | 17,12 |
| DT_mD_hADPSCs3 | 17,24 | 16,99 | 13,66 | 16,33 | 16,49 | 16,21 |
| DT_mD_hADPSCs4 | 17,08 | 16,70 | 13,10 | 15,75 | 16,44 | 15,93 |
| av_DT_mD_hADPSCs1-4 | 17,31 | 16,99 | 13,58 | 16,87 | 16,90 | 16,45 |
| SDav_DT_mD_hADPSCs1-4 | 0,32 | 0,21 | 0,34 | 0,98 | 0,52 | 0,51 |
| m_DT_mD_hADPSCs1-4 | 17,19 | 17,07 | 13,69 | 16,97 | 16,82 | 16,38 |

Tab. 11 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu D. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu E byl 13,14 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $13,16 \pm 1,41$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu E v jedné pasáži byl 1,73 a jejich aritmetický průměr byl $2,23 \pm 0,21$ (Tab. 12 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 56,24 h a jejich aritmetický průměr byl $50,24 \pm 19,95$ h (Tab. 12 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mE_hADPSCs1 | 3,26 | 4,25 | 2,11 | 1,10 | 1,45 | 1,54 | 13,71 |
| PD_mE_hADPSCs2 | 3,00 | 3,89 | 1,70 | 0,80 | 1,25 | 1,34 | 11,98 |
| PD_mE_hADPSCs3 | 3,30 | 4,36 | 2,29 | 1,45 | 1,83 | 1,95 | 15,18 |
| PD_mE_hADPSCs4 | 3,10 | 3,99 | 1,89 | 0,97 | 1,24 | 1,39 | 12,58 |
| av_PD_mE_hADPSCs1-4 | 3,17 | 4,12 | 2,00 | 1,08 | 1,44 | 1,55 | |
| SDav_PD_mE_hADPSCs1-4 | 0,12 | 0,19 | 0,22 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | |
| m_PD_mE_hADPSCs1-4 | 3,18 | 4,12 | 2,00 | 1,03 | 1,35 | 1,46 | |

Tab. 12 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mE_hADPSCs1 | 26,52 | 22,59 | 45,50 | 65,45 | 66,21 | 61,04 |
| DT_mE_hADPSCs2 | 32,00 | 24,68 | 56,47 | 90,00 | 76,80 | 70,15 |
| DT_mE_hADPSCs3 | 29,09 | 22,02 | 41,92 | 49,66 | 52,46 | 48,21 |
| DT_mE_hADPSCs4 | 30,97 | 24,06 | 50,79 | 74,23 | 77,42 | 67,63 |
| av_DT_mE_hADPSCs1-4 | 29,64 | 23,34 | 48,67 | 69,83 | 68,22 | 61,75 |
| SDav_DT_mE_hADPSCs1-4 | 2,41 | 1,24 | 6,35 | 16,86 | 11,70 | 9,82 |
| m_DT_mE_hADPSCs1-4 | 30,03 | 23,32 | 48,15 | 69,84 | 71,50 | 64,33 |

Tab. 12 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu F byl 29 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $28,86 \pm 1,46$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu F v jedné pasáži byl 4,85 a jejich aritmetický průměr byl $4,81 \pm 0,21$ (Tab. 13 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 19,94 h a jejich aritmetický průměr byl $20,26 \pm 4,69$ h (Tab. 13 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mF_hADPSCs1 | 7,00 | 5,60 | 5,60 | 2,80 | 4,21 | 4,20 | 29,41 |
| PD_mF_hADPSCs2 | 6,50 | 5,12 | 5,15 | 2,36 | 3,87 | 3,99 | 26,99 |
| PD_mF_hADPSCs3 | 6,78 | 5,42 | 5,39 | 2,65 | 4,15 | 4,19 | 28,58 |
| PD_mF_hADPSCs4 | 7,10 | 5,72 | 5,82 | 2,99 | 4,38 | 4,45 | 30,46 |
| av_PD_mF_hADPSCs1-4 | 6,85 | 5,47 | 5,49 | 2,70 | 4,15 | 4,21 | |
| SDav_PD_mF_hADPSCs1-4 | 0,23 | 0,23 | 0,25 | 0,23 | 0,18 | 0,16 | |
| m_PD_mF_hADPSCs1-4 | 6,89 | 5,51 | 5,50 | 2,73 | 4,18 | 4,20 | |

Tab. 13 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mF_hADPSCs1 | 13,71 | 17,14 | 17,14 | 25,71 | 22,80 | 22,38 |
| DT_mF_hADPSCs2 | 14,77 | 18,75 | 18,64 | 30,51 | 24,81 | 23,56 |
| DT_mF_hADPSCs3 | 14,16 | 17,71 | 17,81 | 27,17 | 23,13 | 22,43 |
| DT_mF_hADPSCs4 | 13,52 | 16,78 | 16,49 | 24,08 | 21,92 | 21,12 |
| av_DT_mF_hADPSCs1-4 | 14,04 | 17,60 | 17,52 | 26,87 | 23,16 | 22,37 |
| SDav_DT_mF_hADPSCs1-4 | 0,56 | 0,86 | 0,92 | 2,74 | 1,21 | 1,00 |
| m_DT_mF_hADPSCs1-4 | 13,93 | 17,43 | 17,48 | 26,44 | 22,97 | 22,41 |

Tab. 13 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu G byl 18,70 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $18,78 \pm 1,03$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu G v jedné pasáži byl 3,19 a jejich aritmetický průměr byl $3,13 \pm 0,16$ (Tab. 14 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 29,85 h a jejich aritmetický průměr byl $29,92 \pm 5,82$ h (Tab. 14 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mG_hADPSCs1 | 3,40 | 3,62 | 2,73 | 3,55 | 2,73 | 3,01 | 19,04 |
| PD_mG_hADPSCs2 | 3,10 | 3,25 | 2,57 | 3,26 | 2,54 | 2,93 | 17,65 |
| PD_mG_hADPSCs3 | 3,37 | 3,55 | 2,43 | 3,42 | 2,60 | 2,99 | 18,36 |
| PD_mG_hADPSCs4 | 3,46 | 3,80 | 2,90 | 3,75 | 2,93 | 3,24 | 20,08 |
| av_PD_mG_hADPSCs1-4 | 3,33 | 3,56 | 2,66 | 3,50 | 2,70 | 3,04 | |
| SDav_PD_mG_hADPSCs1-4 | 0,14 | 0,20 | 0,18 | 0,18 | 0,15 | 0,12 | |
| m_PD_mG_hADPSCs1-4 | 3,39 | 3,59 | 2,65 | 3,49 | 2,67 | 3,00 | |

Tab. 14 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mG_hADPSCs1 | 28,24 | 26,52 | 35,16 | 20,28 | 35,16 | 31,23 |
| DT_mG_hADPSCs2 | 30,97 | 29,54 | 37,35 | 22,09 | 37,80 | 32,08 |
| DT_mG_hADPSCs3 | 28,49 | 27,04 | 39,51 | 21,05 | 36,92 | 31,44 |
| DT_mG_hADPSCs4 | 27,75 | 25,26 | 33,10 | 19,20 | 32,76 | 29,01 |
| av_DT_mG_hADPSCs1-4 | 28,86 | 27,09 | 36,28 | 20,66 | 35,66 | 30,94 |
| SDav_DT_mG_hADPSCs1-4 | 1,44 | 1,79 | 2,76 | 1,22 | 2,22 | 1,34 |
| m_DT_mG_hADPSCs1-4 | 28,36 | 26,78 | 36,26 | 20,67 | 36,04 | 31,33 |

Tab. 14 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu H byl 11,27 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $10,92 \pm 1,09$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu H v jedné pasáži byl 1,67 a jejich aritmetický průměr byl $1,82 \pm 0,17$ (Tab. 15 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 57,50 h a jejich aritmetický průměr byl $56,64 \pm 18,19$ h (Tab. 15 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mH_hADPSCs1 | 3,38 | 1,83 | 1,39 | 1,78 | 1,40 | 1,50 | 11,28 |
| PD_mH_hADPSCs2 | 3,15 | 1,56 | 1,09 | 1,43 | 1,02 | 1,08 | 9,33 |
| PD_mH_hADPSCs3 | 3,24 | 1,71 | 1,31 | 1,85 | 1,51 | 1,63 | 11,25 |
| PD_mH_hADPSCs4 | 3,47 | 1,89 | 1,46 | 1,92 | 1,47 | 1,60 | 11,81 |
| av_PD_mH_hADPSCs1-4 | 3,31 | 1,75 | 1,31 | 1,75 | 1,35 | 1,45 | |
| SDav_PD_mH_hADPSCs1-4 | 0,12 | 0,13 | 0,14 | 0,19 | 0,19 | 0,22 | |
| m_PD_mH_hADPSCs1-4 | 3,31 | 1,77 | 1,35 | 1,82 | 1,44 | 1,55 | |

Tab. 15 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mH_hADPSCs1 | 28,40 | 52,46 | 69,06 | 40,45 | 68,57 | 62,67 |
| DT_mH_hADPSCs2 | 30,48 | 61,54 | 88,07 | 50,35 | 94,12 | 87,04 |
| DT_mH_hADPSCs3 | 29,63 | 56,14 | 73,28 | 38,92 | 63,58 | 58,75 |
| DT_mH_hADPSCs4 | 27,67 | 50,79 | 65,75 | 37,50 | 65,31 | 58,75 |
| av_DT_mH_hADPSCs1-4 | 29,04 | 55,23 | 74,04 | 41,80 | 72,89 | 66,80 |
| SDav_DT_mH_hADPSCs1-4 | 1,25 | 4,76 | 9,85 | 5,82 | 14,30 | 13,62 |
| m_DT_mH_hADPSCs1-4 | 29,01 | 54,30 | 71,17 | 39,68 | 66,94 | 60,71 |

Tab. 15 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu I byl 24,96 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $24,83 \pm 0,90$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu I v jedné pasáži byl 4,07 a jejich aritmetický průměr byl $4,14 \pm 0,13$ (Tab. 16 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 22,22 h a jejich aritmetický průměr byl $22,44 \pm 3,37$ h (Tab. 16 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mI_hADPSCs1 | 4,09 | 5,15 | 3,50 | 3,86 | 4,14 | 4,48 | 25,23 |
| PD_mI_hADPSCs2 | 3,89 | 4,95 | 3,26 | 3,51 | 3,78 | 4,25 | 23,64 |
| PD_mI_hADPSCs3 | 4,00 | 5,01 | 3,46 | 3,71 | 4,06 | 4,46 | 24,70 |
| PD_mI_hADPSCs4 | 4,15 | 5,26 | 3,61 | 3,94 | 4,26 | 4,52 | 25,74 |
| av_PD_mI_hADPSCs1-4 | 4,03 | 5,09 | 3,46 | 3,76 | 4,06 | 4,43 | |
| SDav_PD_mI_hADPSCs1-4 | 0,10 | 0,12 | 0,13 | 0,16 | 0,18 | 0,10 | |
| m_PD_mI_hADPSCs1-4 | 4,04 | 5,08 | 3,48 | 3,79 | 4,10 | 4,47 | |

Tab. 16 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mI_hADPSCs1 | 23,47 | 18,64 | 27,43 | 18,65 | 23,19 | 20,98 |
| DT_mI_hADPSCs2 | 24,68 | 19,39 | 29,45 | 20,51 | 25,40 | 22,12 |
| DT_mI_hADPSCs3 | 24,00 | 19,16 | 27,75 | 19,41 | 23,65 | 21,08 |
| DT_mI_hADPSCs4 | 23,13 | 18,25 | 26,59 | 18,27 | 22,54 | 20,80 |
| av_DT_mI_hADPSCs1-4 | 23,82 | 18,86 | 27,80 | 19,21 | 23,69 | 21,24 |
| SDav_DT_mI_hADPSCs1-4 | 0,67 | 0,51 | 1,20 | 0,99 | 1,22 | 0,59 |
| m_DT_mI_hADPSCs1-4 | 23,74 | 18,90 | 27,59 | 19,03 | 23,42 | 21,03 |

Tab. 16 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu J byl 14,41 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $14,6 \pm 1,01$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu J v jedné pasáži byl 2,15 a jejich aritmetický průměr byl $2,39 \pm 0,15$ (Tab. 17 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 40,68 h a jejich aritmetický průměr byl $41,37 \pm 11,00$ h (Tab. 17 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mJ_hADPSCs1 | 4,00 | 2,56 | 1,78 | 1,93 | 2,18 | 2,24 | 14,69 |
| PD_mJ_hADPSCs2 | 3,95 | 2,32 | 1,45 | 1,64 | 1,85 | 1,90 | 13,11 |
| PD_mJ_hADPSCs3 | 4,02 | 2,44 | 1,65 | 1,85 | 2,03 | 2,14 | 14,13 |
| PD_mJ_hADPSCs4 | 4,19 | 2,73 | 1,91 | 2,06 | 2,27 | 2,36 | 15,52 |
| av PD_mJ_hADPSCs1-4 | 4,04 | 2,51 | 1,70 | 1,87 | 2,08 | 2,16 | |
| SD_av PD_mJ_hADPSCs1-4 | 0,09 | 0,15 | 0,17 | 0,15 | 0,16 | 0,17 | |
| m PDs_mJ_hADPSCs1-4 | 4,01 | 2,50 | 1,72 | 1,89 | 2,11 | 2,19 | |

Tab. 17 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mJ_hADPSCs1 | 24,00 | 37,50 | 53,93 | 37,31 | 44,04 | 41,96 |
| DT_mJ_hADPSCs2 | 24,30 | 41,38 | 66,21 | 43,90 | 51,89 | 49,47 |
| DT_mJ_hADPSCs3 | 23,88 | 39,34 | 58,18 | 38,92 | 47,29 | 43,93 |
| DT_mJ_hADPSCs4 | 22,91 | 35,16 | 50,26 | 34,95 | 42,29 | 39,83 |
| av DT_mJ_hADPSCs1-4 | 23,77 | 38,35 | 57,15 | 38,77 | 46,38 | 43,80 |
| SD_av DT_mJ_hADPSCs1-4 | 0,60 | 2,65 | 6,85 | 3,79 | 4,22 | 4,14 |
| m DT_mJ_hADPSCs1-4 | 23,94 | 38,42 | 56,06 | 38,11 | 45,66 | 42,94 |

Tab. 17 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu K byl 47,42 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $47,48 \pm 1,05$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu K v jedné pasáži byl 7,68 a jejich aritmetický průměr byl $7,91 \pm 0,16$ (Tab. 18 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 11,34 h a jejich aritmetický průměr byl $11,71 \pm 1,65$ h (Tab. 18 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mK_hADPSCs1 | 9,80 | 7,00 | 8,40 | 7,00 | 7,00 | 8,40 | 47,60 |
| PD_mK_hADPSCs2 | 9,29 | 6,91 | 8,34 | 6,79 | 6,73 | 8,21 | 46,27 |
| PD_mK_hADPSCs3 | 9,70 | 6,95 | 8,32 | 6,94 | 6,96 | 8,37 | 47,24 |
| PD_mK_hADPSCs4 | 9,97 | 7,18 | 8,57 | 7,21 | 7,26 | 8,63 | 48,82 |
| av_PD_mK_hADPSCs1-4 | 9,69 | 7,01 | 8,41 | 6,99 | 6,99 | 8,40 | |
| SDav_PD_mK_hADPSCs1-4 | 0,25 | 0,10 | 0,10 | 0,15 | 0,19 | 0,15 | |
| m_PD_mK_hADPSCs1-4 | 9,75 | 6,98 | 8,37 | 6,97 | 6,98 | 8,39 | |

Tab. 18 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mK_hADPSCs1 | 9,80 | 13,71 | 11,43 | 10,29 | 13,71 | 11,19 |
| DT_mK_hADPSCs2 | 10,33 | 13,89 | 11,51 | 10,60 | 14,26 | 11,45 |
| DT_mK_hADPSCs3 | 9,90 | 13,81 | 11,54 | 10,37 | 13,79 | 11,23 |
| DT_mK_hADPSCs4 | 9,63 | 13,37 | 11,20 | 9,99 | 13,22 | 10,89 |
| av_DT_mK_hADPSCs1-4 | 9,91 | 13,70 | 11,42 | 10,31 | 13,75 | 11,19 |
| SDav_DT_mK_hADPSCs1-4 | 0,30 | 0,23 | 0,15 | 0,26 | 0,43 | 0,23 |
| m_DT_mK_hADPSCs1-4 | 9,85 | 13,76 | 11,47 | 10,33 | 13,75 | 11,21 |

Tab. 18 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu L byl 19,27 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $19,26 \pm 0,86$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 v médiu L v jedné pasáži byl 3,32 a jejich aritmetický průměr byl $3,21 \pm 0,13$ (Tab. 19 A). Medián času zdvojení buněčných populací hADPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 28,61 h a jejich aritmetický průměr byl $29,05 \pm 5,33$ h (Tab. 19 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mL_hADPSCs1 | 3,33 | 3,50 | 2,87 | 3,45 | 2,68 | 3,18 | 19,01 |
| PD_mL_hADPSCs2 | 3,13 | 3,42 | 2,75 | 3,31 | 2,56 | 3,05 | 18,22 |
| PD_mL_hADPSCs3 | 3,40 | 3,62 | 2,81 | 3,56 | 2,75 | 3,38 | 19,52 |
| PD_mL_hADPSCs4 | 3,56 | 3,70 | 2,99 | 3,74 | 2,79 | 3,49 | 20,27 |
| av_PD_mL_hADPSCs1-4 | 3,36 | 3,56 | 2,86 | 3,52 | 2,70 | 3,28 | |
| SDav_PD_mL_hADPSCs1-4 | 0,15 | 0,11 | 0,09 | 0,16 | 0,09 | 0,17 | |
| m_PD_mL_hADPSCs1-4 | 3,37 | 3,56 | 2,84 | 3,51 | 2,72 | 3,28 | |

Tab. 19 A: Počet populačních zdvojení hADPSCs1-4 v průběhu 4. - 9. v médiu L. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mL_hADPSCs1 | 28,83 | 27,43 | 33,45 | 20,87 | 35,82 | 29,56 |
| DT_mL_hADPSCs2 | 30,67 | 28,07 | 34,91 | 21,75 | 37,50 | 30,82 |
| DT_mL_hADPSCs3 | 28,24 | 26,52 | 34,16 | 20,22 | 34,91 | 27,81 |
| DT_mL_hADPSCs4 | 26,97 | 25,95 | 32,11 | 19,25 | 34,41 | 26,93 |
| av_DT_mL_hADPSCs1-4 | 28,68 | 26,99 | 33,66 | 20,52 | 35,66 | 28,78 |
| SDav_DT_mL_hADPSCs1-4 | 1,54 | 0,94 | 1,19 | 1,05 | 1,36 | 1,74 |
| m_DT_mL_hADPSCs1-4 | 28,53 | 26,97 | 33,81 | 20,55 | 35,36 | 28,69 |

Tab. 19 B: Čas zdvojení buněčné populace hADPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu L. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

4.3.2. hDDPSCs

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu A byl 6,42 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $6,52 \pm 0,75$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu A v jedné pasáži byl 1,16 a jejich aritmetický průměr byl $1,09 \pm 0,13$ (Tab. 20 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 81,95 h a jejich aritmetický průměr byl $104,47 \pm 67,05$ h (Tab. 20 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| PD_mA_hDDPSCs1 | 0,40 | 1,57 | 1,04 | 0,89 | 1,29 | 1,32 | 6,51 |
| PD_mA_hDDPSCs2 | 0,34 | 1,30 | 0,90 | 0,71 | 1,22 | 1,26 | 5,73 |
| PD_mA_hDDPSCs3 | 0,39 | 1,60 | 1,00 | 0,73 | 1,30 | 1,30 | 6,32 |
| PD_mA_hDDPSCs4 | 0,51 | 1,86 | 1,32 | 0,89 | 1,40 | 1,55 | 7,53 |
| av_PD_mA_hDDPSCs1-4 | 0,41 | 1,58 | 1,06 | 0,81 | 1,30 | 1,36 | |
| SDav_PD_mA_hDDPSCs1-4 | 0,07 | 0,23 | 0,18 | 0,10 | 0,07 | 0,13 | |
| m_PD_mA_hDDPSCs1-4 | 0,40 | 1,59 | 1,02 | 0,81 | 1,29 | 1,31 | |

Tab. 20 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| DT_mA_hDDPSCs1 | 240,00 | 61,15 | 92,31 | 80,90 | 74,42 | 71,21 |
| DT_mA_hDDPSCs2 | 282,35 | 73,85 | 106,67 | 101,41 | 78,69 | 74,60 |
| DT_mA_hDDPSCs3 | 246,15 | 60,00 | 96,00 | 98,63 | 73,85 | 72,31 |
| DT_mA_hDDPSCs4 | 188,24 | 51,61 | 72,73 | 80,90 | 68,57 | 60,65 |
| av_DT_mA_hDDPSCs1-4 | 239,19 | 61,65 | 91,93 | 90,46 | 73,88 | 69,69 |
| SDav_DT_mA_hDDPSCs1-4 | 38,77 | 9,17 | 14,17 | 11,10 | 4,15 | 6,19 |
| m_DT_mA_hDDPSCs1-4 | 243,08 | 60,57 | 94,15 | 89,76 | 74,13 | 71,76 |

Tab. 20 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu B byl 13,12 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $13,38 \pm 0,84$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu B v jedné pasáži byl 2,46 a jejich aritmetický průměr byl $2,23 \pm 0,15$ (Tab. 21 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 35,45 h a jejich aritmetický průměr byl $52,65 \pm 39,70$ h (Tab. 21 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mB_hDDPSCs1 | 0,86 | 2,07 | 2,80 | 2,29 | 2,48 | 2,63 | 13,13 |
| PD_mB_hDDPSCs2 | 0,50 | 2,00 | 2,60 | 2,30 | 2,55 | 2,71 | 12,66 |
| PD_mB_hDDPSCs3 | 0,73 | 1,79 | 2,81 | 2,26 | 2,69 | 2,84 | 13,12 |
| PD_mB_hDDPSCs4 | 1,00 | 2,22 | 3,01 | 2,55 | 2,80 | 3,02 | 14,60 |
| av_PD_mB_hDDPSCs1-4 | 0,77 | 2,02 | 2,81 | 2,35 | 2,63 | 2,80 | |
| SDav_PD_mB_hDDPSCs1-4 | 0,18 | 0,16 | 0,15 | 0,12 | 0,12 | 0,15 | |
| m_PD_mB_hDDPSCs1-4 | 0,80 | 2,04 | 2,81 | 2,30 | 2,62 | 2,78 | |

Tab. 21 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mB_hDDPSCs1 | 111,63 | 46,38 | 34,29 | 31,44 | 38,71 | 35,74 |
| DT_mB_hDDPSCs2 | 192,00 | 48,00 | 36,92 | 31,30 | 37,65 | 34,69 |
| DT_mB_hDDPSCs3 | 131,51 | 53,63 | 34,16 | 31,86 | 35,69 | 33,10 |
| DT_mB_hDDPSCs4 | 96,00 | 43,24 | 31,89 | 28,24 | 34,29 | 31,13 |
| av_DT_mB_hDDPSCs1-4 | 132,78 | 47,81 | 34,32 | 30,71 | 36,58 | 33,66 |
| SDav_DT_mB_hDDPSCs1-4 | 42,07 | 4,35 | 2,06 | 1,67 | 1,98 | 2,01 |
| m_DT_mB_hDDPSCs1-4 | 121,57 | 47,19 | 34,22 | 31,37 | 36,67 | 33,89 |

Tab. 21 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu C byl 4,81 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $4,82 \pm 1,25$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu C v jedné pasáži byl 0,77 a jejich aritmetický průměr byl $0,8 \pm 0,18$ (Tab. 22 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 127,33 h a jejich aritmetický průměr byl $136,37 \pm 40,03$ h (Tab. 22 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| PD_mC_hDDPSCs1 | 0,64 | 1,42 | 0,74 | 0,33 | 0,44 | 0,66 | 4,25 |
| PD_mC_hDDPSCs2 | 0,80 | 1,50 | 0,94 | 0,50 | 0,66 | 0,97 | 5,37 |
| PD_mC_hDDPSCs3 | 0,40 | 1,20 | 0,53 | 0,36 | 0,39 | 0,54 | 3,42 |
| PD_mC_hDDPSCs4 | 0,92 | 1,61 | 1,04 | 0,70 | 0,88 | 1,11 | 6,26 |
| av_PD_mC_hDDPSCs1-4 | 0,69 | 1,43 | 0,81 | 0,47 | 0,59 | 0,82 | |
| SDav_PD_mC_hDDPSCs1-4 | 0,19 | 0,15 | 0,20 | 0,15 | 0,19 | 0,23 | |
| m_PD_mC_hDDPSCs1-4 | 0,72 | 1,46 | 0,84 | 0,43 | 0,55 | 0,82 | |

Tab. 22 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| DT_mC_hDDPSCs1 | 150,00 | 67,61 | 129,73 | 218,18 | 218,18 | 142,42 |
| DT_mC_hDDPSCs2 | 120,00 | 64,00 | 102,13 | 144,00 | 145,45 | 96,91 |
| DT_mC_hDDPSCs3 | 240,00 | 80,00 | 181,13 | 200,00 | 246,15 | 174,07 |
| DT_mC_hDDPSCs4 | 104,35 | 59,63 | 92,31 | 102,86 | 109,09 | 84,68 |
| av_DT_mC_hDDPSCs1-4 | 153,59 | 67,81 | 126,32 | 166,26 | 179,72 | 124,52 |
| SDav_DT_mC_hDDPSCs1-4 | 60,64 | 8,76 | 39,83 | 52,76 | 63,39 | 41,33 |
| m_DT_mC_hDDPSCs1-4 | 135,00 | 65,80 | 115,93 | 172,00 | 181,82 | 119,67 |

Tab. 22 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu D byl 10,99 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $10,84 \pm 0,91$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu D v jedné pasáži byl 1,90 a jejich aritmetický průměr byl $1,81 \pm 0,18$ (Tab. 23 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 50,21 h a jejich aritmetický průměr byl $54,05 \pm 12,89$ h (Tab. 23 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mD_hDDPSCs1 | 1,54 | 1,95 | 2,06 | 0,90 | 1,27 | 1,89 | 9,61 |
| PD_mD_hDDPSCs2 | 1,75 | 2,30 | 2,55 | 1,02 | 1,48 | 2,00 | 11,10 |
| PD_mD_hDDPSCs3 | 1,90 | 2,49 | 2,19 | 1,07 | 1,29 | 1,94 | 10,88 |
| PD_mD_hDDPSCs4 | 2,00 | 2,40 | 2,45 | 1,18 | 1,50 | 2,25 | 11,78 |
| av_PD_mD_hDDPSCs1-4 | 1,80 | 2,29 | 2,31 | 1,04 | 1,39 | 2,02 | |
| SDav_PD_mD_hDDPSCs1-4 | 0,20 | 0,24 | 0,23 | 0,12 | 0,12 | 0,16 | |
| m_PD_mD_hDDPSCs1-4 | 1,83 | 2,35 | 2,32 | 1,05 | 1,39 | 1,97 | |

Tab. 23 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu D. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mD_hDDPSCs1 | 62,34 | 49,23 | 46,60 | 80,00 | 75,59 | 49,74 |
| DT_mD_hDDPSCs2 | 54,86 | 41,74 | 37,65 | 70,59 | 64,86 | 47,00 |
| DT_mD_hDDPSCs3 | 50,53 | 38,55 | 43,84 | 67,29 | 74,42 | 48,45 |
| DT_mD_hDDPSCs4 | 48,00 | 40,00 | 39,18 | 61,02 | 64,00 | 41,78 |
| av_DT_mD_hDDPSCs1-4 | 53,93 | 42,38 | 41,82 | 69,72 | 69,72 | 46,74 |
| SDav_DT_mD_hDDPSCs1-4 | 6,28 | 4,75 | 4,13 | 7,92 | 6,13 | 3,49 |
| m_DT_mD_hDDPSCs1-4 | 52,69 | 40,87 | 41,51 | 68,94 | 69,64 | 47,73 |

Tab. 23 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu D. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu E byl 6,48 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $6,59 \pm 0,94$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu E v jedné pasáži byl 0,94 a jejich aritmetický průměr byl $1,10 \pm 0,14$ (Tab. 24 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 94,97 h a jejich aritmetický průměr byl $95,08 \pm 29,89$ h (Tab. 24 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| PD_mE_hDDPSCs1 | 0,68 | 2,00 | 0,94 | 0,76 | 0,82 | 0,89 | 6,09 |
| PD_mE_hDDPSCs2 | 0,50 | 1,89 | 1,00 | 0,69 | 0,75 | 0,80 | 5,63 |
| PD_mE_hDDPSCs3 | 0,80 | 2,14 | 1,10 | 0,80 | 0,99 | 1,05 | 6,88 |
| PD_mE_hDDPSCs4 | 0,91 | 2,20 | 1,16 | 1,03 | 1,20 | 1,27 | 7,77 |
| av_PD_mE_hDDPSCs1-4 | 0,72 | 2,06 | 1,05 | 0,82 | 0,94 | 1,00 | |
| SDav_PD_mE_hDDPSCs1-4 | 0,15 | 0,12 | 0,09 | 0,13 | 0,17 | 0,18 | |
| m_PD_mE_hDDPSCs1-4 | 0,74 | 2,07 | 1,05 | 0,78 | 0,91 | 0,97 | |

Tab. 24 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| DT_mE_hDDPSCs1 | 141,18 | 48,00 | 102,13 | 94,74 | 117,07 | 105,62 |
| DT_mE_hDDPSCs2 | 192,00 | 50,79 | 96,00 | 104,35 | 128,00 | 117,50 |
| DT_mE_hDDPSCs3 | 120,00 | 44,86 | 87,27 | 90,00 | 96,97 | 89,52 |
| DT_mE_hDDPSCs4 | 105,49 | 43,64 | 82,76 | 69,90 | 80,00 | 74,02 |
| av_DT_mE_hDDPSCs1-4 | 139,67 | 46,82 | 92,04 | 89,75 | 105,51 | 96,66 |
| SDav_DT_mE_hDDPSCs1-4 | 37,84 | 3,22 | 8,69 | 14,51 | 21,32 | 18,96 |
| m_DT_mE_hDDPSCs1-4 | 130,59 | 46,43 | 91,64 | 92,37 | 107,02 | 97,57 |

Tab. 24 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu F byl 13,91 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $13,78 \pm 1,36$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu F v jedné pasáži byl 2,51 a jejich aritmetický průměr byl $2,30 \pm 0,23$ (Tab. 25 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 36,57 h a jejich aritmetický průměr byl $42,15 \pm 12,18$ h (Tab. 25 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mF_hDDPSCs1 | 1,47 | 2,66 | 2,61 | 1,90 | 2,35 | 2,41 | 13,40 |
| PD_mF_hDDPSCs2 | 1,20 | 2,49 | 2,34 | 1,62 | 2,18 | 2,24 | 12,07 |
| PD_mF_hDDPSCs3 | 1,65 | 2,90 | 2,88 | 2,30 | 2,72 | 2,76 | 15,21 |
| PD_mF_hDDPSCs4 | 1,50 | 2,78 | 2,70 | 2,15 | 2,60 | 2,69 | 14,42 |
| av_PD_mF_hDDPSCs1-4 | 1,46 | 2,71 | 2,63 | 1,99 | 2,46 | 2,53 | |
| SDav_PD_mF_hDDPSCs1-4 | 0,19 | 0,18 | 0,23 | 0,30 | 0,24 | 0,24 | |
| m_PD_mF_hDDPSCs1-4 | 1,49 | 2,72 | 2,66 | 2,03 | 2,48 | 2,55 | |

Tab. 25 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mF_hDDPSCs1 | 65,31 | 36,09 | 36,78 | 37,89 | 40,85 | 39,00 |
| DT_mF_hDDPSCs2 | 80,00 | 38,55 | 41,03 | 44,44 | 44,04 | 41,96 |
| DT_mF_hDDPSCs3 | 58,18 | 33,10 | 33,33 | 31,30 | 35,29 | 34,94 |
| DT_mF_hDDPSCs4 | 64,00 | 34,53 | 35,56 | 33,49 | 36,92 | 34,94 |
| av_DT_mF_hDDPSCs1-4 | 66,87 | 35,57 | 36,67 | 36,78 | 39,28 | 37,71 |
| SDav_DT_mF_hDDPSCs1-4 | 9,28 | 2,33 | 3,23 | 5,80 | 3,94 | 3,42 |
| m_DT_mF_hDDPSCs1-4 | 64,66 | 35,31 | 36,17 | 35,69 | 38,89 | 36,97 |

Tab. 25 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu G byl 10,16 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $10,22 \pm 1,22$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu G v jedné pasáži byl 1,71 a jejich aritmetický průměr byl $1,7 \pm 0,21$ (Tab. 26 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 55,56 h a jejich aritmetický průměr byl $77,77 \pm 66,61$ h (Tab. 26 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mG_hDDPSCs1 | 0,58 | 1,80 | 3,19 | 1,97 | 1,59 | 1,79 | 10,92 |
| PD_mG_hDDPSCs2 | 0,30 | 1,42 | 2,94 | 1,68 | 1,20 | 1,45 | 8,99 |
| PD_mG_hDDPSCs3 | 0,43 | 1,71 | 3,00 | 1,59 | 1,10 | 1,56 | 9,39 |
| PD_mG_hDDPSCs4 | 0,72 | 1,99 | 3,34 | 2,03 | 1,58 | 1,90 | 11,56 |
| av_PD_mG_hDDPSCs1-4 | 0,51 | 1,73 | 3,12 | 1,82 | 1,37 | 1,67 | |
| SDav_PD_mG_hDDPSCs1-4 | 0,18 | 0,24 | 0,18 | 0,22 | 0,25 | 0,21 | |
| m_PD_mG_hDDPSCs1-4 | 0,51 | 1,76 | 3,10 | 1,82 | 1,39 | 1,67 | |

Tab. 26 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mG_hDDPSCs1 | 165,52 | 53,33 | 30,09 | 36,55 | 60,38 | 52,51 |
| DT_mG_hDDPSCs2 | 320,00 | 67,61 | 32,65 | 42,86 | 80,00 | 64,83 |
| DT_mG_hDDPSCs3 | 223,26 | 56,14 | 32,00 | 45,28 | 87,27 | 60,26 |
| DT_mG_hDDPSCs4 | 133,33 | 48,24 | 28,74 | 35,47 | 60,76 | 49,47 |
| av_DT_mG_hDDPSCs1-4 | 210,53 | 56,33 | 30,87 | 40,04 | 72,10 | 56,77 |
| SDav_DT_mG_hDDPSCs1-4 | 81,92 | 8,20 | 1,79 | 4,78 | 13,65 | 7,03 |
| m_DT_mG_hDDPSCs1-4 | 194,39 | 54,74 | 31,05 | 39,70 | 70,38 | 56,39 |

Tab. 26 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu H byl 5,55 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $5,38 \pm 0,94$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu H v jedné pasáži byl 0,90 a jejich aritmetický průměr byl $0,90 \pm 0,16$ (Tab. 27 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 105,24 h a jejich aritmetický průměr byl $114,27 \pm 42,23$ h (Tab. 27 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| PD_mH_hDDPSCs1 | 0,59 | 1,22 | 0,87 | 1,01 | 0,82 | 0,87 | 5,38 |
| PD_mH_hDDPSCs2 | 0,31 | 0,99 | 0,70 | 0,89 | 0,59 | 0,62 | 4,10 |
| PD_mH_hDDPSCs3 | 0,70 | 1,42 | 0,95 | 1,20 | 0,94 | 1,13 | 6,34 |
| PD_mH_hDDPSCs4 | 0,64 | 1,19 | 0,90 | 1,10 | 0,91 | 0,98 | 5,72 |
| av_PD_mH_hDDPSCs1-4 | 0,56 | 1,21 | 0,85 | 1,05 | 0,81 | 0,90 | |
| SDav_PD_mH_hDDPSCs1-4 | 0,17 | 0,18 | 0,11 | 0,13 | 0,16 | 0,22 | |
| m_PD_mH_hDDPSCs1-4 | 0,62 | 1,21 | 0,88 | 1,05 | 0,86 | 0,92 | |

Tab. 27 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|
| DT_mH_hDDPSCs1 | 162,71 | 78,69 | 110,34 | 71,29 | 117,07 | 108,05 |
| DT_mH_hDDPSCs2 | 309,68 | 96,97 | 137,14 | 80,90 | 162,71 | 151,61 |
| DT_mH_hDDPSCs3 | 137,14 | 67,61 | 101,05 | 60,00 | 102,13 | 83,19 |
| DT_mH_hDDPSCs4 | 150,00 | 80,67 | 106,67 | 65,45 | 105,49 | 95,92 |
| av_DT_mH_hDDPSCs1-4 | 189,88 | 80,98 | 113,80 | 69,41 | 121,85 | 109,69 |
| SDav_DT_mH_hDDPSCs1-4 | 80,54 | 12,11 | 16,02 | 8,94 | 27,98 | 29,73 |
| m_DT_mH_hDDPSCs1-4 | 156,36 | 79,68 | 108,51 | 68,37 | 111,28 | 101,98 |

Tab. 27 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu I byl 25,30 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $25,38 \pm 0,94$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu I v jedné pasáži byl 4,35 a jejich aritmetický průměr byl $4,23 \pm 0,16$ (Tab. 28 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 20,84 h a jejich aritmetický průměr byl $27,25 \pm 16,07$ h (Tab. 28 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mI_hDDPSCs1 | 1,55 | 2,39 | 3,79 | 4,69 | 5,57 | 6,50 | 24,49 |
| PD_mI_hDDPSCs2 | 2,02 | 2,79 | 4,05 | 5,00 | 5,88 | 6,70 | 26,44 |
| PD_mI_hDDPSCs3 | 1,63 | 2,29 | 3,72 | 4,77 | 5,68 | 6,61 | 24,70 |
| PD_mI_hDDPSCs4 | 1,94 | 2,67 | 3,94 | 4,89 | 5,73 | 6,73 | 25,90 |
| av_PD_mI_hDDPSCs1-4 | 1,79 | 2,54 | 3,88 | 4,84 | 5,72 | 6,64 | |
| SDav_PD_mI_hDDPSCs1-4 | 0,23 | 0,23 | 0,15 | 0,14 | 0,13 | 0,10 | |
| m_PD_mI_hDDPSCs1-4 | 1,79 | 2,53 | 3,87 | 4,83 | 5,71 | 6,66 | |

Tab. 28 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mI_hDDPSCs1 | 61,94 | 40,17 | 25,33 | 15,35 | 17,24 | 14,46 |
| DT_mI_hDDPSCs2 | 47,52 | 34,41 | 23,70 | 14,40 | 16,33 | 14,03 |
| DT_mI_hDDPSCs3 | 58,90 | 41,92 | 25,81 | 15,09 | 16,90 | 14,22 |
| DT_mI_hDDPSCs4 | 49,48 | 35,96 | 24,37 | 15,69 | 16,75 | 13,97 |
| av_DT_mI_hDDPSCs1-4 | 54,46 | 38,11 | 24,80 | 15,13 | 16,80 | 14,17 |
| SDav_DT_mI_hDDPSCs1-4 | 7,04 | 3,52 | 0,95 | 0,55 | 0,38 | 0,22 |
| m_DT_mI_hDDPSCs1-4 | 54,19 | 38,06 | 24,85 | 15,22 | 16,83 | 14,13 |

Tab. 28 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu J byl 13,03 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $12,91 \pm 0,87$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu J v jedné pasáži byl 2,15 a jejich aritmetický průměr byl $2,15 \pm 0,15$ (Tab. 29 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 43,01 h a jejich aritmetický průměr byl $48,66 \pm 20,61$ h (Tab. 29 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mJ_hDDPSCs1 | 1,43 | 1,13 | 1,87 | 2,34 | 2,56 | 3,22 | 12,55 |
| PD_mJ_hDDPSCs2 | 1,21 | 0,99 | 1,62 | 2,25 | 2,60 | 3,19 | 11,86 |
| PD_mJ_hDDPSCs3 | 1,60 | 1,45 | 1,99 | 2,41 | 2,70 | 3,35 | 13,50 |
| PD_mJ_hDDPSCs4 | 1,59 | 1,45 | 2,03 | 2,51 | 2,75 | 3,40 | 13,73 |
| av_PD_mJ_hDDPSCs1-4 | 1,46 | 1,26 | 1,88 | 2,38 | 2,65 | 3,29 | |
| SDav_PD_mJ_hDDPSCs1-4 | 0,18 | 0,23 | 0,18 | 0,11 | 0,09 | 0,10 | |
| m_PD_mJ_hDDPSCs1-4 | 1,51 | 1,29 | 1,93 | 2,38 | 2,65 | 3,29 | |

Tab. 29 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mJ_hDDPSCs1 | 67,13 | 84,96 | 51,34 | 30,77 | 37,50 | 29,19 |
| DT_mJ_hDDPSCs2 | 79,34 | 96,97 | 59,26 | 32,00 | 36,92 | 29,47 |
| DT_mJ_hDDPSCs3 | 60,00 | 66,21 | 48,24 | 29,88 | 35,56 | 28,06 |
| DT_mJ_hDDPSCs4 | 60,38 | 66,21 | 47,29 | 28,69 | 34,91 | 27,65 |
| av_DT_mJ_hDDPSCs1-4 | 66,71 | 78,58 | 51,53 | 30,33 | 36,22 | 28,59 |
| SDav_DT_mJ_hDDPSCs1-4 | 9,03 | 15,11 | 5,43 | 1,40 | 1,20 | 0,88 |
| m_DT_mJ_hDDPSCs1-4 | 63,75 | 75,58 | 49,79 | 30,32 | 36,24 | 28,63 |

Tab. 29 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu K byl 16,19 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $16,30 \pm 0,87$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu K v jedné pasáži byl 2,89 a jejich aritmetický průměr byl $2,72 \pm 0,15$ (Tab. 30 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 33,33 h a jejich aritmetický průměr byl $38,12 \pm 15,95$ h (Tab. 30 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mK_hDDPSCs1 | 2,65 | 3,57 | 2,95 | 0,99 | 2,73 | 3,18 | 16,07 |
| PD_mK_hDDPSCs2 | 2,41 | 3,46 | 2,88 | 0,90 | 2,66 | 3,05 | 15,36 |
| PD_mK_hDDPSCs3 | 2,86 | 3,74 | 3,20 | 1,31 | 2,92 | 3,42 | 17,45 |
| PD_mK_hDDPSCs4 | 2,70 | 3,50 | 3,03 | 1,00 | 2,83 | 3,25 | 16,31 |
| av_PD_mK_hDDPSCs1-4 | 2,66 | 3,57 | 3,02 | 1,05 | 2,79 | 3,23 | |
| SDav_PD_mK_hDDPSCs1-4 | 0,19 | 0,12 | 0,14 | 0,18 | 0,11 | 0,15 | |
| m_PD_mK_hDDPSCs1-4 | 2,68 | 3,54 | 2,99 | 1,00 | 2,78 | 3,22 | |

Tab. 30 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mK_hDDPSCs1 | 36,23 | 26,89 | 32,54 | 72,73 | 35,16 | 29,47 |
| DT_mK_hDDPSCs2 | 39,83 | 27,75 | 33,33 | 80,00 | 36,09 | 30,82 |
| DT_mK_hDDPSCs3 | 33,57 | 25,67 | 30,00 | 54,96 | 32,88 | 27,49 |
| DT_mK_hDDPSCs4 | 35,56 | 27,43 | 31,68 | 72,00 | 33,92 | 28,92 |
| av_DT_mK_hDDPSCs1-4 | 36,30 | 26,93 | 31,89 | 69,92 | 34,51 | 29,17 |
| SDav_DT_mK_hDDPSCs1-4 | 2,62 | 0,91 | 1,43 | 10,61 | 1,41 | 1,38 |
| m_DT_mK_hDDPSCs1-4 | 35,89 | 27,16 | 32,11 | 72,36 | 34,54 | 29,20 |

Tab. 30 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu L byl 6,17 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $6,23 \pm 0,86$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 v médiu L v jedné pasáži byl 0,99 a jejich aritmetický průměr byl $1,04 \pm 0,15$ (Tab. 31 A). Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 97,55 h a jejich aritmetický průměr byl $100,18 \pm 31,61$ h (Tab. 31 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| PD_mL_hDDPSCs1 | 0,93 | 1,82 | 1,00 | 0,50 | 1,06 | 1,24 | 6,55 |
| PD_mL_hDDPSCs2 | 0,99 | 1,90 | 1,20 | 0,65 | 1,20 | 1,33 | 7,27 |
| PD_mL_hDDPSCs3 | 0,67 | 1,61 | 0,90 | 0,51 | 0,99 | 1,11 | 5,79 |
| PD_mL_hDDPSCs4 | 0,59 | 1,56 | 0,85 | 0,40 | 0,83 | 1,09 | 5,32 |
| av PD_mL_hDDPSCs | 0,79 | 1,72 | 0,99 | 0,51 | 1,02 | 1,19 | |
| SD_av PD_mL_hDDPSCs | 0,19 | 0,16 | 0,15 | 0,10 | 0,15 | 0,11 | |
| m PD_mL_hDDPSCs | 0,80 | 1,72 | 0,95 | 0,50 | 1,03 | 1,18 | |

Tab. 31 A: Počet populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu L. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|
| DT_mL_hDDPSCs1 | 103,23 | 52,75 | 96,00 | 144,00 | 90,57 | 75,81 |
| DT_mL_hDDPSCs2 | 96,97 | 50,53 | 80,00 | 110,77 | 80,00 | 70,68 |
| DT_mL_hDDPSCs3 | 143,28 | 59,63 | 106,67 | 141,18 | 96,97 | 86,24 |
| DT_mL_hDDPSCs4 | 162,71 | 61,54 | 112,94 | 180,00 | 115,66 | 86,24 |
| av_DT_mL_hDDPSCs1-4 | 126,55 | 56,11 | 98,90 | 143,99 | 95,80 | 79,74 |
| SDav_DT_mL_hDDPSCs1-4 | 31,66 | 5,30 | 14,41 | 28,33 | 14,98 | 7,79 |
| m_DT_mL_hDDPSCs1-4 | 123,26 | 56,19 | 101,33 | 142,59 | 93,77 | 81,02 |

Tab. 31 B: Čas zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

4.3.3. hNDPSCs

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu A byl 12,27 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $12,22 \pm 0,61$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu A v jedné pasáži byl 1,93 a jejich aritmetický průměr byl $2,04 \pm 0,09$ (Tab. 32 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 44,62 h a jejich aritmetický průměr byl $47,58 \pm 12,19$ h (Tab. 32 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mA_hNDPSCs1 | 2,20 | 3,08 | 1,40 | 1,60 | 1,77 | 2,07 | 12,13 |
| PD_mA_hNDPSCs2 | 2,01 | 3,00 | 1,23 | 1,58 | 1,63 | 2,00 | 11,45 |
| PD_mA_hNDPSCs3 | 2,35 | 3,12 | 1,65 | 1,84 | 1,80 | 2,14 | 12,90 |
| PD_mA_hNDPSCs4 | 2,14 | 3,10 | 1,52 | 1,77 | 1,77 | 2,11 | 12,41 |
| av_PD_mA_hNDPSCs1-4 | 2,18 | 3,08 | 1,45 | 1,70 | 1,74 | 2,08 | |
| SDav_PD_mA_hNDPSCs1-4 | 0,12 | 0,05 | 0,15 | 0,11 | 0,07 | 0,05 | |
| m_PD_mA_hNDPSCs1-4 | 2,17 | 3,09 | 1,46 | 1,68 | 1,77 | 2,09 | |

Tab. 32 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mA_hNDPSCs1 | 43,64 | 31,17 | 68,57 | 45,00 | 54,24 | 45,41 |
| DT_mA_hNDPSCs2 | 47,76 | 32,00 | 78,05 | 45,57 | 58,90 | 47,00 |
| DT_mA_hNDPSCs3 | 40,85 | 30,77 | 58,18 | 39,13 | 53,33 | 43,93 |
| DT_mA_hNDPSCs4 | 44,86 | 30,97 | 63,16 | 40,68 | 54,24 | 44,55 |
| av_DT_mA_hNDPSCs1-4 | 44,28 | 31,23 | 66,99 | 42,59 | 55,18 | 45,22 |
| SDav_DT_mA_hNDPSCs1-4 | 2,86 | 0,54 | 8,51 | 3,18 | 2,52 | 1,33 |
| m_DT_mA_hNDPSCs1-4 | 44,25 | 31,07 | 65,86 | 42,84 | 54,24 | 44,98 |

Tab. 32 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu A. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu B byl 24,14 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $24,18 \pm 1,19$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu B v jedné pasáži byl 4,06 a jejich aritmetický průměr byl $4,03 \pm 0,17$ (Tab. 33 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 23,31 h a jejich aritmetický průměr byl $23,05 \text{ h} \pm 3,73 \text{ h}$ (Tab. 33 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mB_hNDPSCs1 | 4,61 | 3,95 | 3,65 | 3,91 | 3,17 | 4,00 | 23,29 |
| PD_mB_hNDPSCs2 | 4,72 | 4,12 | 3,95 | 4,25 | 3,63 | 4,32 | 24,99 |
| PD_mB_hNDPSCs3 | 4,81 | 4,26 | 4,02 | 4,37 | 3,69 | 4,25 | 25,40 |
| PD_mB_hNDPSCs4 | 4,59 | 3,89 | 3,56 | 3,85 | 3,14 | 3,99 | 23,02 |
| av_PD_mB_hNDPSCs1-4 | 4,68 | 4,06 | 3,80 | 4,10 | 3,41 | 4,14 | |
| SDav_PD_mB_hNDPSCs1-4 | 0,09 | 0,15 | 0,19 | 0,22 | 0,25 | 0,15 | |
| m_PD_mB_hNDPSCs1-4 | 4,67 | 4,04 | 3,80 | 4,08 | 3,40 | 4,13 | |

Tab. 33 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mB_hNDPSCs1 | 20,82 | 24,30 | 26,30 | 18,41 | 30,28 | 23,50 |
| DT_mB_hNDPSCs2 | 20,34 | 23,30 | 24,30 | 16,94 | 26,45 | 21,76 |
| DT_mB_hNDPSCs3 | 19,96 | 22,54 | 23,88 | 16,48 | 26,02 | 22,12 |
| DT_mB_hNDPSCs4 | 20,92 | 24,68 | 26,97 | 18,70 | 30,57 | 23,56 |
| av_DT_mB_hNDPSCs1-4 | 20,51 | 23,70 | 25,36 | 17,63 | 28,33 | 22,73 |
| SDav_DT_mB_hNDPSCs1-4 | 0,44 | 0,97 | 1,50 | 1,09 | 2,43 | 0,93 |
| m_DT_mB_hNDPSCs1-4 | 20,58 | 23,80 | 25,30 | 17,68 | 28,37 | 22,81 |

Tab. 33 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu B. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu C byl 29,56 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $29,46 \pm 1,03$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu C v jedné pasáži byl 4,74 a jejich aritmetický průměr byl $4,19 \pm 0,15$ (Tab. 34 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 17,68 h a jejich aritmetický průměr byl $19,96 \pm 5,94$ h (Tab. 34 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mC_hNPSCs1 | 5,29 | 7,14 | 5,69 | 4,05 | 3,07 | 3,73 | 28,97 |
| PD_mC_hNPSCs2 | 5,40 | 7,33 | 5,94 | 4,27 | 3,56 | 3,97 | 30,47 |
| PD_mC_hNPSCs3 | 5,13 | 7,01 | 5,50 | 3,97 | 3,00 | 3,65 | 28,26 |
| PD_mC_hNDPSCs4 | 5,37 | 7,26 | 5,89 | 4,26 | 3,49 | 3,89 | 30,16 |
| av_PD_mC_hNDPSCs1-4 | 5,30 | 7,18 | 5,76 | 4,14 | 3,28 | 3,81 | |
| SDav_PD_mC_hNDPSCs1-4 | 0,10 | 0,12 | 0,17 | 0,13 | 0,25 | 0,13 | |
| m_PD_mC_hNDPSCs1-4 | 5,33 | 7,20 | 5,79 | 4,16 | 3,28 | 3,81 | |

Tab. 34 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mC_hNDPSCs1 | 18,15 | 13,45 | 16,87 | 17,78 | 31,27 | 25,20 |
| DT_mC_hNDPSCs2 | 17,78 | 13,10 | 16,16 | 16,86 | 26,97 | 23,68 |
| DT_mC_hANPSCs3 | 18,71 | 13,69 | 17,45 | 18,14 | 32,00 | 25,75 |
| DT_mC_hANPSCs4 | 17,88 | 13,22 | 16,30 | 16,90 | 27,51 | 24,16 |
| av_DT_mC_hNDPSCs1-4 | 18,13 | 13,37 | 16,70 | 17,42 | 29,44 | 24,70 |
| SDav_DT_mC_hNPSCs1-4 | 0,42 | 0,26 | 0,59 | 0,64 | 2,57 | 0,95 |
| m_DT_mC_hNDPSCs1-4 | 18,01 | 13,33 | 16,59 | 17,34 | 29,39 | 24,68 |

Tab. 34 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu C. Uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu D byl 68,00 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $68,29 \pm 1,13$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu D v jedné pasáži byl 11,06 a jejich aritmetický průměr byl $11,38 \pm 0,19$ (Tab. 35 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 16,89 h a jejich aritmetický průměr byl $16,35 \pm 1,38$ h (Tab. 35 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| PD_mD_hNDPSCs1 | 11,38 | 9,69 | 15,86 | 11,10 | 8,86 | 10,52 | 67,41 |
| PD_mD_hNDPSCs2 | 11,84 | 10,01 | 16,03 | 11,65 | 9,23 | 11,00 | 69,76 |
| PD_mD_hNDPSCs3 | 11,56 | 10,00 | 15,97 | 11,45 | 8,90 | 10,72 | 68,60 |
| PD_mD_hNDPSCs4 | 11,22 | 9,52 | 15,99 | 11,21 | 8,61 | 10,84 | 67,39 |
| av PD_mD_hNDPSCs1-4 | 11,50 | 9,81 | 15,96 | 11,35 | 8,90 | 10,77 | |
| SD_av PD_mD_hNDPSCs1-4 | 0,23 | 0,21 | 0,06 | 0,21 | 0,22 | 0,18 | |
| m PD_mD_hNDPSCs1-4 | 11,47 | 9,85 | 15,98 | 11,33 | 8,88 | 10,78 | |

Tab. 35 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu D; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|------|-------|------|------|-------|------|
| DT_mD_hNDPSCs1 | 8,44 | 9,91 | 6,05 | 6,49 | 10,84 | 8,94 |
| DT_mD_hNDPSCs2 | 8,11 | 9,59 | 5,99 | 6,18 | 10,40 | 8,55 |
| DT_mD_hNDPSCs3 | 8,30 | 9,60 | 6,01 | 6,29 | 10,79 | 8,77 |
| DT_mD_hNDPSCs4 | 8,56 | 10,08 | 6,00 | 6,42 | 11,15 | 8,67 |
| av_DT_mD_hNDPSCs1-4 | 8,35 | 9,80 | 6,01 | 6,34 | 10,79 | 8,73 |
| SDav_DT_mD_hNDPSCs1-4 | 0,19 | 0,24 | 0,03 | 0,14 | 0,31 | 0,16 |
| m_DT_mD_hNDPSCs1-4 | 8,37 | 9,75 | 6,01 | 6,36 | 10,81 | 8,72 |

Tab. 35 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu D; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu E byl 26,33 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $26,39 \pm 1,31$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu E v jedné pasáži byl 3,70 a jejich aritmetický průměr byl $4,40 \pm 0,19$ (Tab. 36 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 23,13 h a jejich aritmetický průměr byl $24,71 \pm 10,69$ h (Tab. 36 B).

Tab. 36 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E; uveden medián,

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------------|
| PD_mE_hNDPSCs1 | 6,51 | 7,10 | 4,48 | 2,78 | 2,25 | 2,86 | 25,97 |
| PD_mE_hNDPSCs2 | 6,37 | 6,85 | 4,23 | 2,55 | 2,14 | 2,75 | 24,89 |
| PD_mE_hNDPSCs3 | 6,62 | 7,17 | 4,51 | 3,01 | 2,44 | 2,93 | 26,68 |
| PD_mE_hNDPSCs4 | 7,00 | 7,51 | 4,90 | 3,05 | 2,60 | 2,96 | 28,02 |
| av_PD_mE_hNDPSCs1-4 | 6,62 | 7,16 | 4,53 | 2,85 | 2,36 | 2,87 | |
| SDav_PD_mE_hNDPSCs1-4 | 0,23 | 0,24 | 0,24 | 0,20 | 0,18 | 0,08 | |
| m_PD_mE_hNDPSCs1-4 | 6,56 | 7,13 | 4,49 | 2,90 | 2,34 | 2,89 | |

aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

Tab. 36 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu E; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mE_hNDPSCs1 | 14,75 | 13,52 | 21,43 | 25,90 | 42,67 | 32,87 |
| DT_mE_hNDPSCs2 | 15,07 | 14,01 | 22,70 | 28,24 | 44,86 | 34,18 |
| DT_mE_hNDPSCs3 | 14,50 | 13,39 | 21,29 | 23,92 | 39,34 | 32,08 |
| DT_mE_hNDPSCs4 | 13,71 | 12,78 | 19,59 | 23,61 | 36,92 | 31,76 |
| av_DT_mE_hNDPSCs1-4 | 14,51 | 13,43 | 21,25 | 25,42 | 40,95 | 32,72 |
| SDav_DT_mE_hNDPSCs1-4 | 0,58 | 0,51 | 1,27 | 2,14 | 3,51 | 1,08 |
| m_DT_mE_hNDPSCs1-4 | 14,63 | 13,46 | 21,36 | 24,91 | 41,01 | 32,47 |

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu F byl 24,46 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $24,75 \pm 0,95$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu F v jedné pasáži byl 4,10 a jejich aritmetický průměr byl $4,12 \pm 0,16$ (Tab. 37 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 22,77 h a jejich aritmetický průměr byl $22,35 \pm 1,52$ h (Tab. 37 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mF_hNDPSCs1 | 4,55 | 4,15 | 4,71 | 3,09 | 3,72 | 3,81 | 24,03 |
| PD_mF_hNDPSCs2 | 4,42 | 4,10 | 4,77 | 3,08 | 3,77 | 3,89 | 24,03 |
| PD_mF_hNDPSCs3 | 4,34 | 4,08 | 4,75 | 3,34 | 4,12 | 4,26 | 24,89 |
| PD_mF_hNDPSCs4 | 4,69 | 4,28 | 4,99 | 3,45 | 4,24 | 4,39 | 26,04 |
| av_PD_mF_hNDPSCs1-4 | 4,50 | 4,15 | 4,81 | 3,24 | 3,96 | 4,09 | |
| SDav_PD_mF_hNDPSCs1-4 | 0,13 | 0,08 | 0,11 | 0,16 | 0,22 | 0,24 | |
| m_PD_mF_hNDPSCs1-4 | 4,49 | 4,13 | 4,76 | 3,22 | 3,95 | 4,08 | |

Tab. 37 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mF_hNDPSCs1 | 21,10 | 23,13 | 20,38 | 23,30 | 25,81 | 24,67 |
| DT_mF_hNDPSCs2 | 21,72 | 23,41 | 20,13 | 23,38 | 25,46 | 24,16 |
| DT_mF_hNDPSCs3 | 22,12 | 23,53 | 20,21 | 21,56 | 23,30 | 22,07 |
| DT_mF_hNDPSCs4 | 20,47 | 22,43 | 19,24 | 20,87 | 22,64 | 21,41 |
| av_DT_mF_hNDPSCs1-4 | 21,35 | 23,13 | 19,99 | 22,28 | 24,30 | 23,08 |
| SDav_DT_mF_hNDPSCs1-4 | 0,72 | 0,49 | 0,51 | 1,26 | 1,57 | 1,58 |
| m_DT_mF_hNDPSCs1-4 | 21,41 | 23,27 | 20,17 | 22,43 | 24,38 | 23,12 |

Tab. 37 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu F; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu G byl 37,57 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $37,54 \pm 1,03$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu G v jedné pasáži byl 6,05 a jejich aritmetický průměr byl $6,26 \pm 0,16$ (Tab. 38 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 15,86 h a jejich aritmetický průměr byl $15,70 \pm 4,87$ h (Tab. 38 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mG_hNDPSCs1 | 6,84 | 6,12 | 5,96 | 9,09 | 4,19 | 5,59 | 37,79 |
| PD_mG_hNDPSCs2 | 6,50 | 5,86 | 5,76 | 8,91 | 3,99 | 5,26 | 36,28 |
| PD_mG_hNDPSCs3 | 6,78 | 6,14 | 5,99 | 9,00 | 4,03 | 5,41 | 37,35 |
| PD_mG_hNDPSCs4 | 6,97 | 6,24 | 6,01 | 9,26 | 4,50 | 5,78 | 38,76 |
| av_PD_mG_hNDPSCs1-4 | 6,77 | 6,09 | 5,93 | 9,07 | 4,18 | 5,51 | |
| SDav_PD_mG_hNDPSCs1-4 | 0,17 | 0,14 | 0,10 | 0,13 | 0,20 | 0,19 | |
| m_PD_mG_hNDPSCs1-4 | 6,81 | 6,13 | 5,97 | 9,05 | 4,11 | 5,50 | |

Tab. 38 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| DT_mG_hNDPSCs1 | 14,04 | 15,69 | 16,11 | 7,92 | 22,91 | 16,82 |
| DT_mG_hNDPSCs2 | 14,77 | 16,38 | 16,67 | 8,08 | 24,06 | 17,87 |
| DT_mG_hNDPSCs3 | 14,16 | 15,64 | 16,03 | 8,00 | 23,82 | 17,38 |
| DT_mG_hNDPSCs4 | 13,77 | 15,38 | 15,97 | 7,78 | 21,33 | 16,26 |
| av_DT_mG_hNDPSCs1-4 | 14,19 | 15,77 | 16,19 | 7,94 | 23,03 | 17,08 |
| SDav_DT_mG_hNDPSCs1-4 | 0,42 | 0,43 | 0,32 | 0,13 | 1,24 | 0,70 |
| m_DT_mG_hNDPSCs1-4 | 14,10 | 15,66 | 16,07 | 7,96 | 23,37 | 17,10 |

Tab. 38 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu G; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu H byl 22,56 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $22,44 \pm 1,05$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu H v jedné pasáži byl 3,02 a jejich aritmetický průměr byl $3,74 \pm 0,16$ (Tab. 39 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 31,83 h a jejich aritmetický průměr byl $28,47 \pm 11,40$ h (Tab. 39 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mH_hNDPSCs1 | 6,79 | 3,00 | 2,96 | 4,55 | 2,11 | 2,65 | 22,06 |
| PD_mH_hNDPSCs2 | 6,54 | 2,94 | 2,85 | 4,31 | 2,02 | 2,49 | 21,15 |
| PD_mH_hNDPSCs3 | 6,90 | 3,22 | 3,00 | 4,85 | 2,30 | 2,80 | 23,07 |
| PD_mH_hNDPSCs4 | 7,00 | 3,11 | 3,02 | 4,90 | 2,50 | 2,95 | 23,48 |
| av_PD_mH_hNDPSCs1-4 | 6,81 | 3,07 | 2,96 | 4,65 | 2,23 | 2,72 | |
| SDav_PD_mH_hNDPSCs1-4 | 0,17 | 0,11 | 0,07 | 0,24 | 0,18 | 0,17 | |
| m_PD_mH_hNDPSCs1-4 | 6,84 | 3,06 | 2,98 | 4,70 | 2,21 | 2,72 | |

Tab. 39 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mH_hNDPSCs1 | 14,14 | 32,00 | 32,43 | 15,82 | 45,50 | 35,47 |
| DT_mH_hNDPSCs2 | 14,68 | 32,65 | 33,68 | 16,71 | 47,52 | 35,47 |
| DT_mH_hNDPSCs3 | 13,91 | 29,81 | 32,00 | 14,85 | 41,74 | 33,57 |
| DT_mH_hNDPSCs4 | 13,71 | 30,87 | 31,79 | 14,69 | 38,40 | 31,86 |
| av_DT_mH_hNDPSCs1-4 | 14,11 | 31,33 | 32,48 | 15,52 | 43,29 | 34,09 |
| SDav_DT_mH_hNDPSCs1-4 | 0,42 | 1,25 | 0,85 | 0,94 | 4,05 | 1,74 |
| m_DT_mH_hNDPSCs1-4 | 14,03 | 31,43 | 32,22 | 15,33 | 43,62 | 34,52 |

Tab. 39 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu H; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu I byl 48,33 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $48,49 \pm 1,55$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu I v jedné pasáži byl 8,12 a jejich aritmetický průměr byl $8,08 \pm 0,23$ (Tab. 40 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 11,71 h a jejich aritmetický průměr byl $11,65 \pm 2,60$ h (Tab. 40 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mI_hNDPSCs1 | 8,29 | 8,76 | 7,78 | 9,75 | 6,30 | 8,16 | 49,03 |
| PD_mI_hNDPSCs2 | 8,50 | 9,01 | 8,00 | 9,99 | 6,50 | 8,40 | 50,40 |
| PD_mI_hNDPSCs3 | 8,12 | 8,65 | 7,45 | 9,50 | 6,00 | 7,90 | 47,62 |
| PD_mI_hNDPSCs4 | 7,90 | 8,40 | 7,52 | 9,37 | 5,96 | 7,76 | 46,91 |
| av_PD_mI_hNDPSCs1-4 | 8,20 | 8,70 | 7,69 | 9,65 | 6,19 | 8,05 | |
| SD_av PD_mI_hNDPSCs1-4 | 0,22 | 0,22 | 0,22 | 0,24 | 0,22 | 0,25 | |
| m_PD_mI_hNDPSCs1-4 | 8,20 | 8,70 | 7,65 | 9,62 | 6,15 | 8,03 | |

Tab. 40 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| DT_mI_hNDPSCs1 | 11,58 | 10,96 | 12,34 | 7,38 | 15,24 | 11,52 |
| DT_mI_hNDPSCs2 | 11,29 | 10,65 | 12,00 | 7,21 | 14,77 | 11,19 |
| DT_mI_hNDPSCs3 | 11,82 | 11,10 | 12,89 | 7,58 | 16,00 | 11,90 |
| DT_mI_hNDPSCs4 | 12,15 | 11,43 | 12,77 | 7,68 | 16,11 | 12,11 |
| av_DT_mI_hNDPSCs1-4 | 11,71 | 11,04 | 12,50 | 7,46 | 15,53 | 11,68 |
| SDav_DT_mI_hNDPSCs1-4 | 0,36 | 0,32 | 0,41 | 0,21 | 0,64 | 0,41 |
| m_DT_mI_hNDPSCs1-4 | 11,70 | 11,03 | 12,55 | 7,48 | 15,62 | 11,71 |

Tab. 40 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu I; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu J byl 28,09 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $28,40 \pm 1,08$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu J v jedné pasáži byl 4,03 a jejich aritmetický průměr byl $4,73 \pm 0,16$ (Tab. 41 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 23,60 h a jejich aritmetický průměr byl $21,31 \pm 6,77$ h (Tab. 41 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mJ_hNDPSCs1 | 8,29 | 4,30 | 3,83 | 4,83 | 3,24 | 3,97 | 28,46 |
| PD_mJ_hNDPSCs2 | 8,26 | 4,00 | 3,71 | 4,79 | 3,12 | 3,83 | 27,71 |
| PD_mJ_hNDPSCs3 | 8,59 | 4,61 | 4,00 | 5,12 | 3,55 | 4,02 | 29,89 |
| PD_mJ_hNDPSCs4 | 8,10 | 3,99 | 3,77 | 4,70 | 3,11 | 3,85 | 27,52 |
| av_PD_mJ_hNDPSCs1-4 | 8,31 | 4,22 | 3,83 | 4,86 | 3,25 | 3,92 | |
| SDav_PD_mJ_hNDPSCs1-4 | 0,18 | 0,25 | 0,11 | 0,16 | 0,18 | 0,08 | |
| m_PD_mJ_hNDPSCs1-4 | 8,27 | 4,15 | 3,80 | 4,81 | 3,18 | 3,91 | |

Tab. 41 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DT_mJ_hNDPSCs1 | 11,58 | 22,33 | 25,07 | 14,91 | 29,63 | 23,68 |
| DT_mJ_hNDPSCs2 | 11,62 | 24,00 | 25,88 | 15,03 | 30,77 | 24,54 |
| DT_mJ_hNDPSCs3 | 11,18 | 20,82 | 24,00 | 14,06 | 27,04 | 23,38 |
| DT_mJ_hNDPSCs4 | 11,85 | 24,06 | 25,46 | 15,32 | 30,87 | 24,42 |
| av_DT_mJ_hNDPSCs1-4 | 11,56 | 22,80 | 25,10 | 14,83 | 29,58 | 24,00 |
| SDav_DT_mJ_hNDPSCs1-4 | 0,28 | 1,54 | 0,81 | 0,54 | 1,78 | 0,56 |
| m_DT_mJ_hNDPSCs1-4 | 11,60 | 23,16 | 25,26 | 14,97 | 30,20 | 24,05 |

Tab. 41 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu J; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu K byl 96,04 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $95,92 \pm 0,50$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu K v jedné pasáži byl 16,92 a jejich aritmetický průměr byl $15,99 \pm 0,17$ (Tab. 42 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 5,53 h a jejich aritmetický průměr byl $6,07 \pm 1,86$ h (Tab. 42 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PD_mK_hNDPSCs1 | 19,90 | 12,04 | 18,90 | 18,10 | 10,87 | 15,44 | 95,26 |
| PD_mK_hNDPSCs2 | 20,00 | 12,40 | 19,00 | 18,22 | 11,00 | 15,73 | 96,35 |
| PD_mK_hNDPSCs3 | 19,85 | 11,90 | 18,75 | 18,01 | 11,30 | 16,01 | 95,82 |
| PD_mK_hNDPSCs4 | 20,23 | 12,20 | 19,00 | 18,19 | 10,98 | 15,65 | 96,25 |
| av_PD_mK_hNDPSCs1-4 | 20,00 | 12,14 | 18,91 | 18,13 | 11,04 | 15,71 | |
| SDav_PD_mK_hNDPSCs1-4 | 0,17 | 0,21 | 0,12 | 0,09 | 0,18 | 0,24 | |
| m_PD_mK_hNDPSCs1-4 | 19,95 | 12,12 | 18,95 | 18,14 | 10,99 | 15,69 | |

Tab. 42 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| DT_mK_hNDPSCs1 | 4,82 | 7,97 | 5,08 | 3,98 | 8,83 | 6,09 |
| DT_mK_hNDPSCs2 | 4,80 | 7,74 | 5,05 | 3,95 | 8,73 | 5,98 |
| DT_mK_hNDPSCs3 | 4,84 | 8,07 | 5,12 | 4,00 | 8,50 | 5,87 |
| DT_mK_hNDPSCs4 | 4,75 | 7,87 | 5,05 | 3,96 | 8,74 | 6,01 |
| av_DT_mK_hNDPSCs1-4 | 4,80 | 7,91 | 5,08 | 3,97 | 8,70 | 5,99 |
| SDav_DT_mK_hNDPSCs1-4 | 0,04 | 0,14 | 0,03 | 0,02 | 0,14 | 0,09 |
| m_DT_mK_hNDPSCs1-4 | 4,81 | 7,92 | 5,07 | 3,97 | 8,74 | 5,99 |

Tab. 42 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu K; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v médiu L byl 39,42 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $39,14 \pm 1,23$ cPDs. Medián zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 v médiu L v jedné pasáži byl 6,34 a jejich aritmetický průměr byl $6,52 \pm 0,21$ (Tab. 43 A). Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 6 pasáží v 1 pasáži byl 15,03 h a jejich aritmetický průměr byl $15,01 \pm 4,69$ h (Tab. 43 B).

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p | cPD |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| PD_mL_hNDPSCs1 | 6,88 | 6,12 | 6,41 | 9,13 | 4,19 | 6,04 | 38,79 |
| PD_mL_hNDPSCs2 | 6,50 | 5,90 | 6,25 | 9,03 | 3,99 | 5,87 | 37,54 |
| PD_mL_hNDPSCs3 | 6,99 | 6,27 | 6,55 | 9,40 | 4,55 | 6,30 | 40,06 |
| PD_mL_hNDPSCs4 | 7,05 | 6,40 | 6,66 | 9,30 | 4,35 | 6,40 | 40,16 |
| av_PD_mL_hNDPSCs1-4 | 6,86 | 6,17 | 6,47 | 9,22 | 4,27 | 6,15 | |
| SDav_PD_mL_hNDPSCs1-4 | 0,25 | 0,21 | 0,18 | 0,17 | 0,24 | 0,24 | |
| m_PD_mL_hNDPSCs1-4 | 6,94 | 6,20 | 6,48 | 9,22 | 4,27 | 6,17 | |

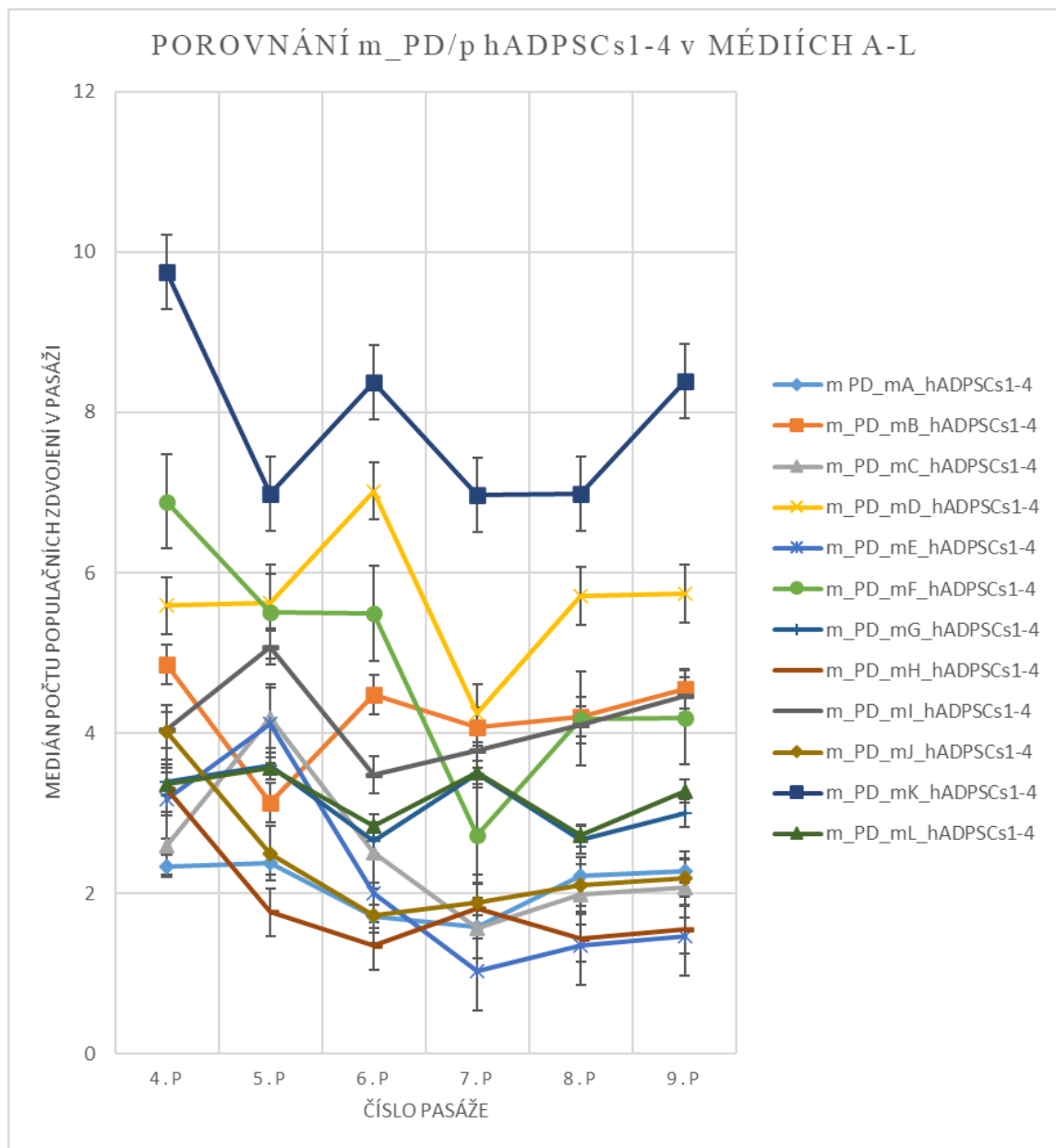
Tab. 43 A: Počet populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu L; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž a kumulativní počet populačních zdvojení/linie.

| | 4.p | 5.p | 6.p | 7.p | 8.p | 9.p |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| DT_mL_hNDPSCs1 | 13,95 | 15,69 | 14,98 | 7,89 | 22,91 | 15,56 |
| DT_mL_hNDPSCs2 | 14,77 | 16,27 | 15,36 | 7,97 | 24,06 | 16,01 |
| DT_mL_hNDPSCs3 | 13,73 | 15,31 | 14,66 | 7,66 | 21,10 | 14,92 |
| DT_mL_hNDPSCs4 | 13,62 | 15,00 | 14,41 | 7,74 | 22,07 | 14,69 |
| av_DT_mL_hNDPSCs1-4 | 14,02 | 15,57 | 14,85 | 7,82 | 22,53 | 15,30 |
| SDav_DT_mL_hNDPSCs1-4 | 0,52 | 0,55 | 0,41 | 0,14 | 1,26 | 0,60 |
| m_DT_mL_hNDPSCs1-4 | 13,84 | 15,50 | 14,82 | 7,81 | 22,49 | 15,24 |

Tab. 43 B: Čas zdvojení buněčné populace hNDPSCs1-4 v průběhu 4. – 9. v médiu L; uveden medián, aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou a medián; počítáno na jednotlivou pasáž.

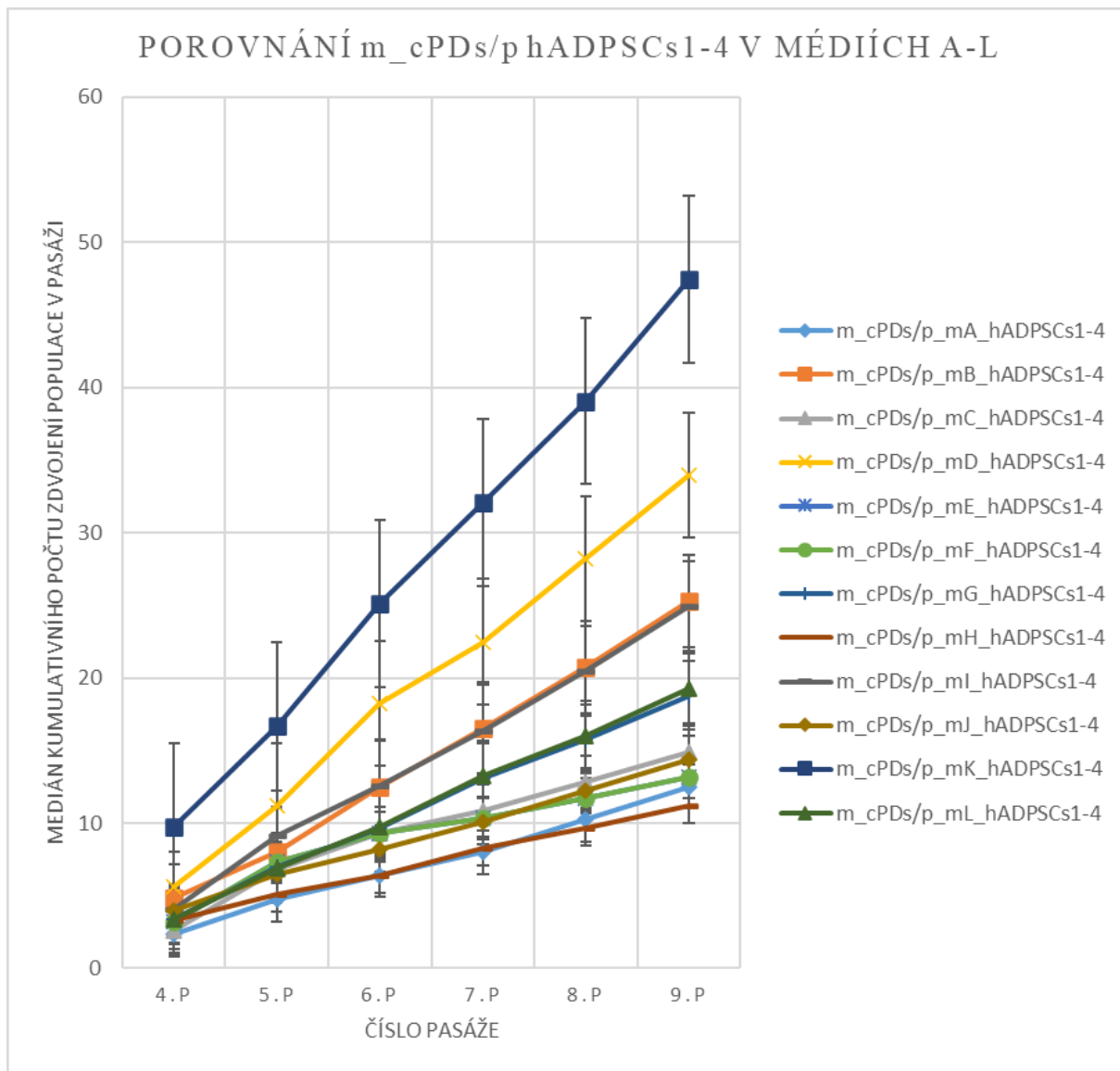
4.3.4. Shrnutí výsledků růstových charakteristik hDPSCs

Nejvyšší proliferační aktivity dosahovaly hADPSCs1-4 v médiu K (10% PRP), medián PD byl 7,68, přibližně o 2 PD více než v médiu D (2% HP + ITS) s 5,67 PD. Sestupně následovala média F (2% PRP+ITS) s 4,85 PD, B (2% FCS+ITS) s 4,34 PD a I (10% HP) s 4,07 PD. Nejméně růst hADPSCs1-4 podporovalo médium H (20% FCS) s 1,66 PD. (Graf 4)



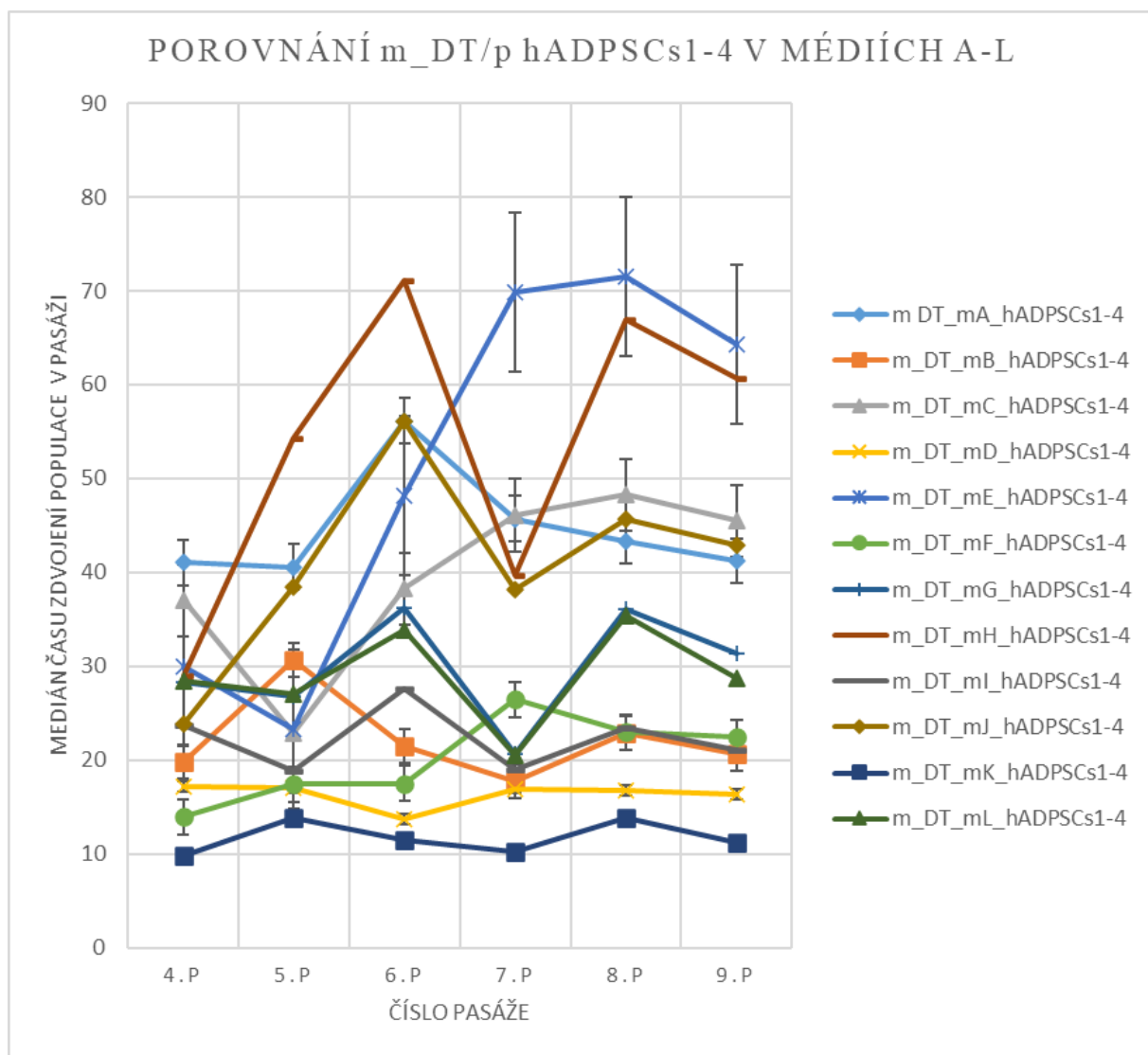
Graf 4: Růstové křivky hADPSCs1-4 v experimentálních médiích.

Nejvyššího počtu populačních zdvojení bylo dosaženo opět v médiu K (47,44 PD) s odstupem následovala média D (33,94 PD), B (25,30 PD) a I (24,96 PD). Dle očekávání bylo dosaženo nejnižšího počtu populačních zdvojení v médiu H (11,24 PD), překvapivě nízké úrovně proliferační aktivity dosahovaly také buňky v médiu A (12,51) a E a F (u obou shodně 13,14 PD). (Graf 5)



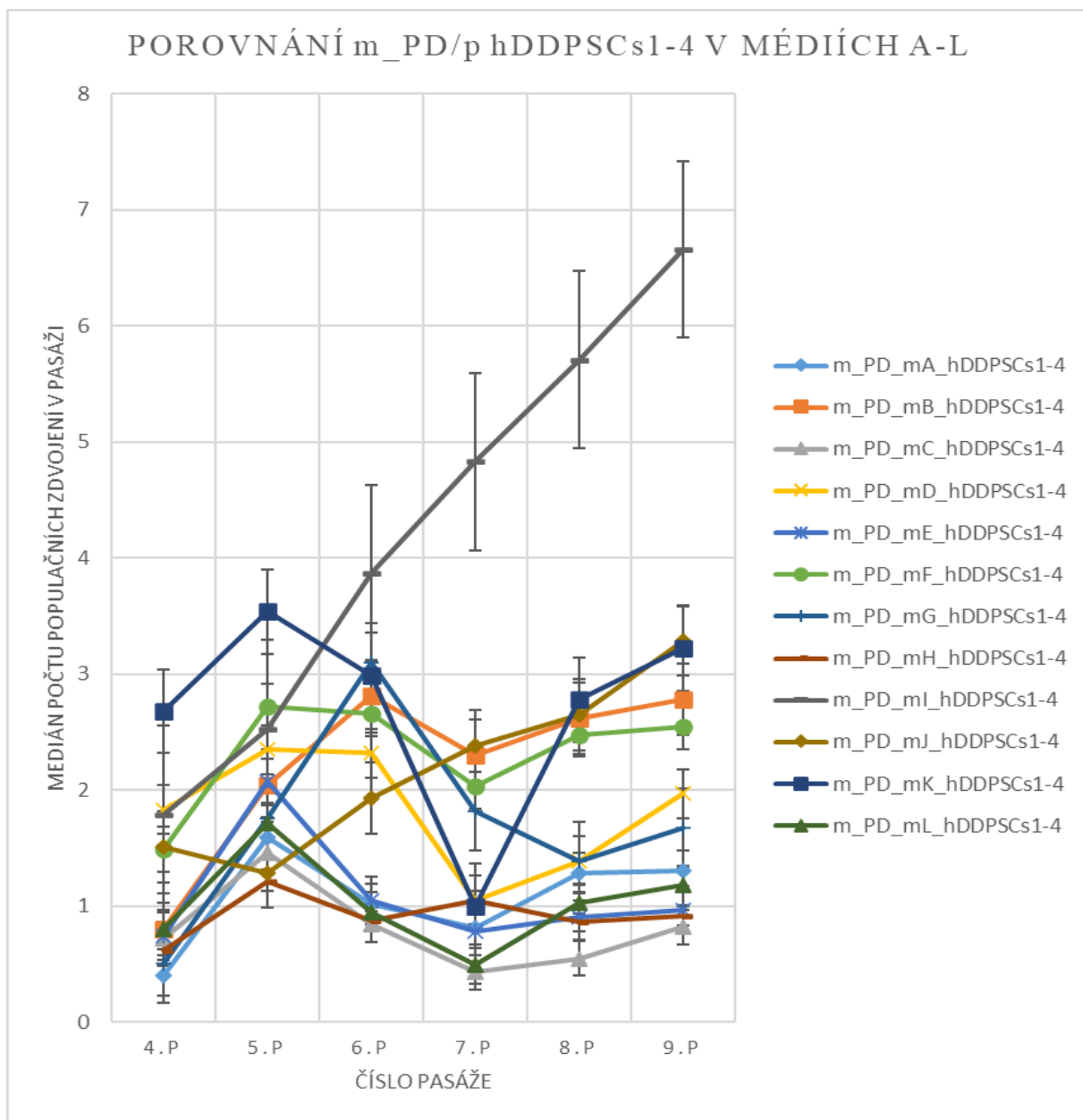
Graf 5: Růstové křivky kumulativního počtu populačních zdvojení v experimentálních médiích.

Nejrychleji proliferovaly hADPSCs1-4 v médiu K, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 11,35 h. S odstupem přibližně 4 hodin následovaly buňky kultivované v médiu D (16,90 h), následované buňkami v médiu F (19,95 h), B (21,10 h) a (22,23 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali u hADPSCs1-4 v živném médiu H (57,51 h) a médiu E (56,24 h). (Graf 6)



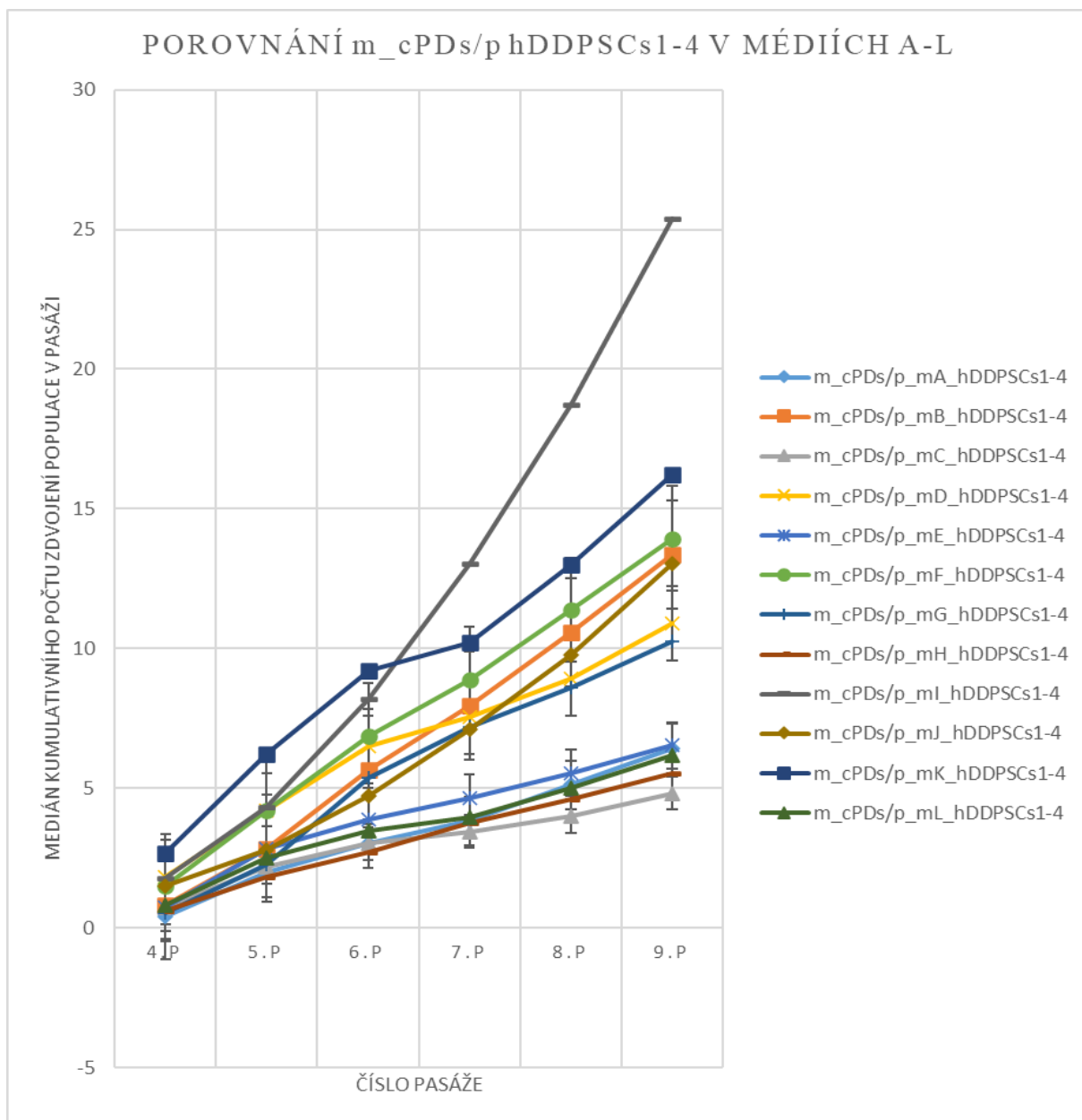
Graf 6: Porovnání času potřebného pro zdvojení buněčné populace hADPSCs v experimentálních médiích.

Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly hDDPSCs1-4 v médiu I (10% HP), medián populačního zdvojení během kultivace v 10% HP byl 4,35, což je přibližně o 1,5 populační zdvojení více v médiu K (10% PRP) s 2,89 PD. Sestupně následovala média F (2% PRP+ITS) s 2,52 PD, B (2% FCS+ITS) s 2,46 PD a J (20% HP) s 2,16 PD. Nejnižší podporu růstu poskytovala média C (2% HP) s 0,77 PD a H (20% FCS). (Graf 7)



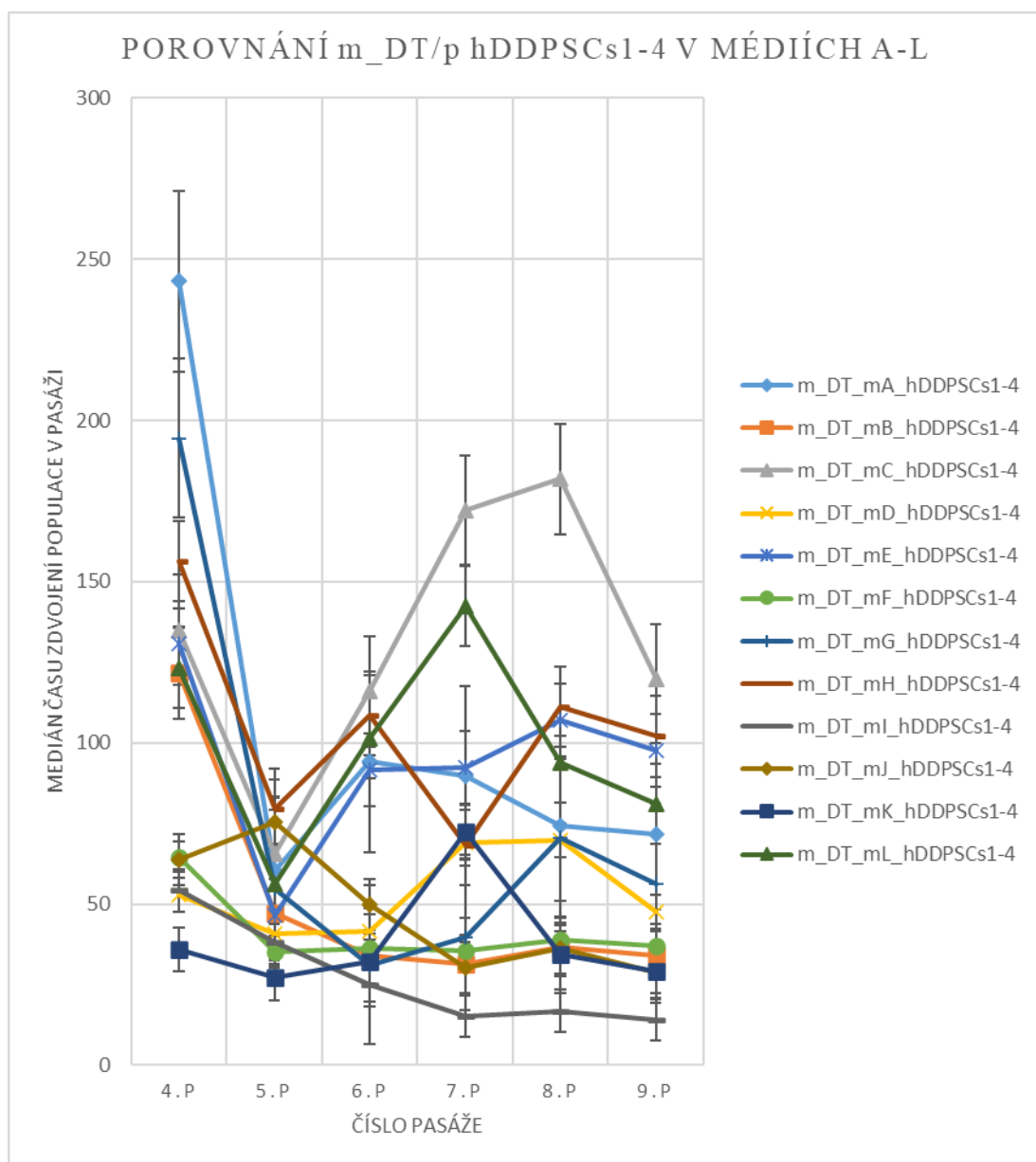
Graf 7: Růstové křivky hDDPSCs1-4 v experimentálních médiích.

Nejvyššího počtu populačních zdvojení hDDPSCs1-4 bylo dosaženo v médiu I (25,30 PD), druhým bylo médium K (16,19 PD); následovala média F (13,91 PD), B (13,12 PD) a J (13,03 PD). Nejnižšího počtu populačních zdvojení bylo dosaženo v médiu C (4,81) a nízkých hodnot v médiu H (5,55), L (6,17 PD), A (6,42 PD) a E (6,48 PD) (Graf 8).



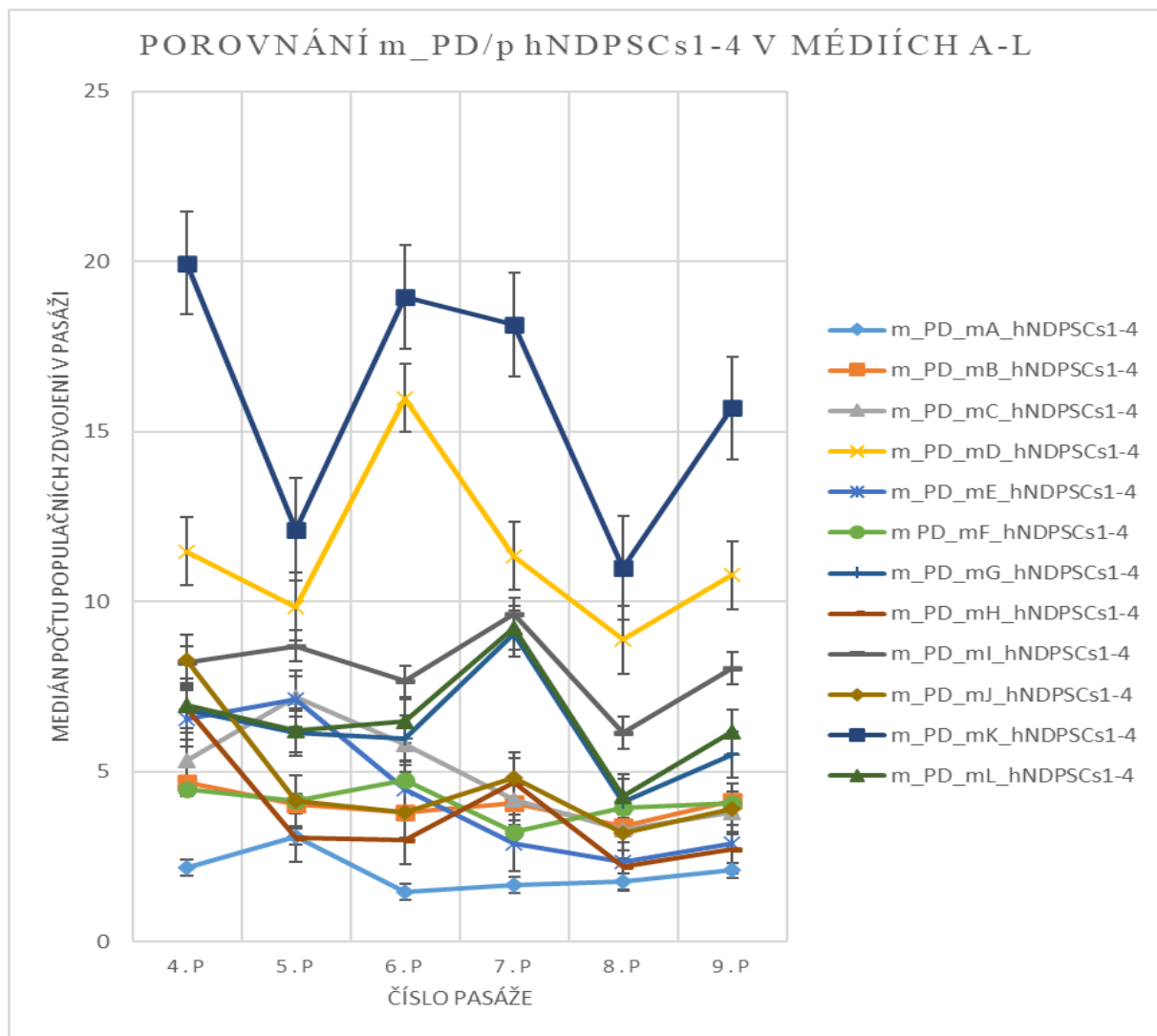
Graf 8: Růstové křivky kumulativního počtu populačních zdvojení hDDPSCs1-4 v médiích A - L.

Nejrychleji proliferovaly hDDPSCs1-4 v médiu I, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 20,84 h s odstupem přibližně 12,5 hodin následovaly buňky kultivované v médiu K (33,33 h), sestupně buňky v médiu B (35,45 h), F (36,57 h) a J (43,02 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali hDDPSCs1-4 v médiu C (127,34 h) a H (105,25 h). (Graf 9)



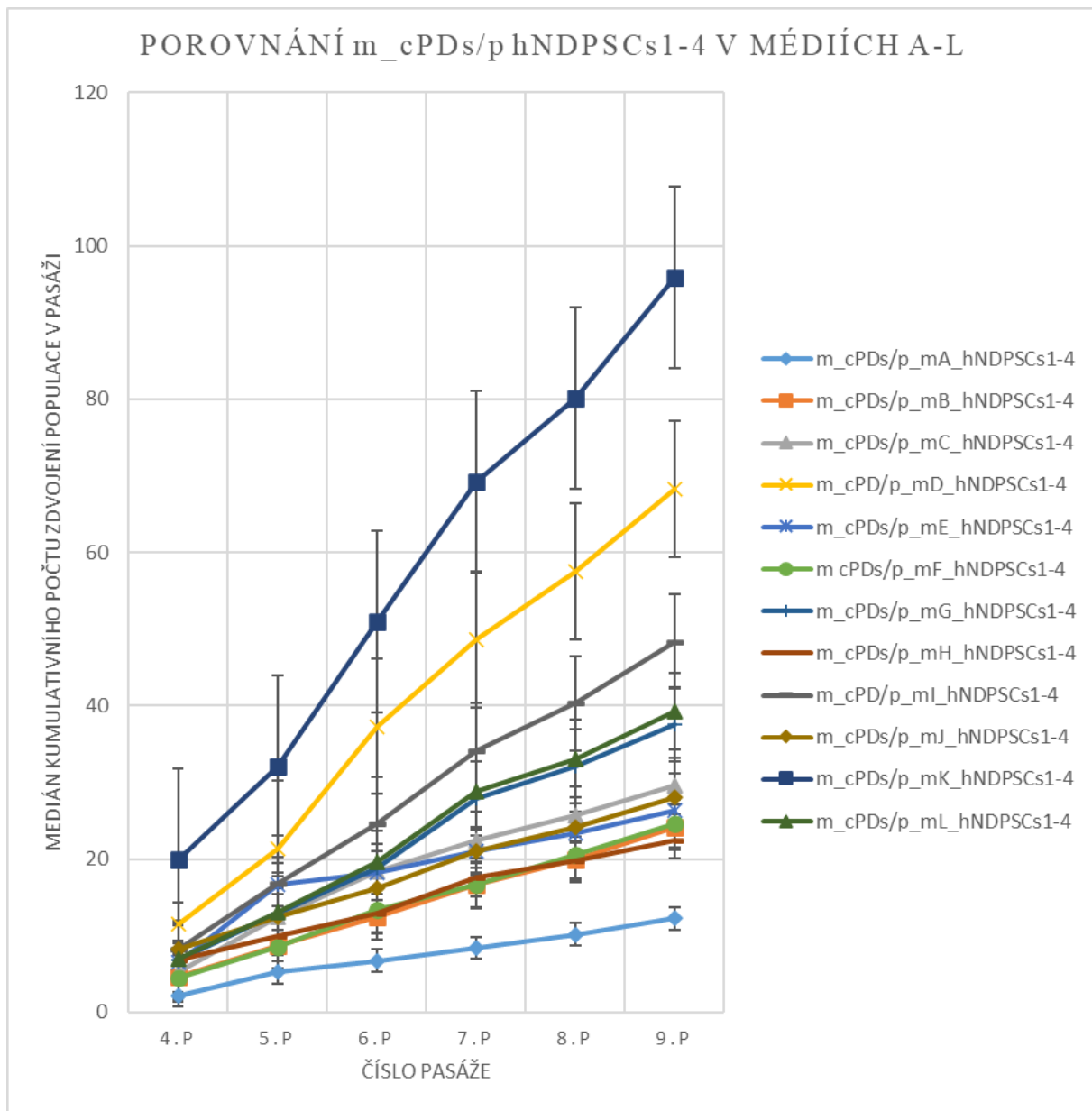
Graf 9: Porovnání času zdvojení buněčné populace hDDPSCs1-4 v médiích A – L.

Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly hNDPSCs1-4 v médiu K (10% PRP), medián populačního zdvojení během kultivace byl 16,92, přibližně o 7 populační zdvojení více než v médiu D (2% HP+ITS), kde tato hodnota dosahovala 11,06 PD. Sestupně následovala média I (10% HP) s 8,12 PD a L (20% PRP) s 6,34 PD. Nejnižší proliferační aktivita se projevila v médiu A (2% PRP) s 1,93 PD. (Grafu 10)



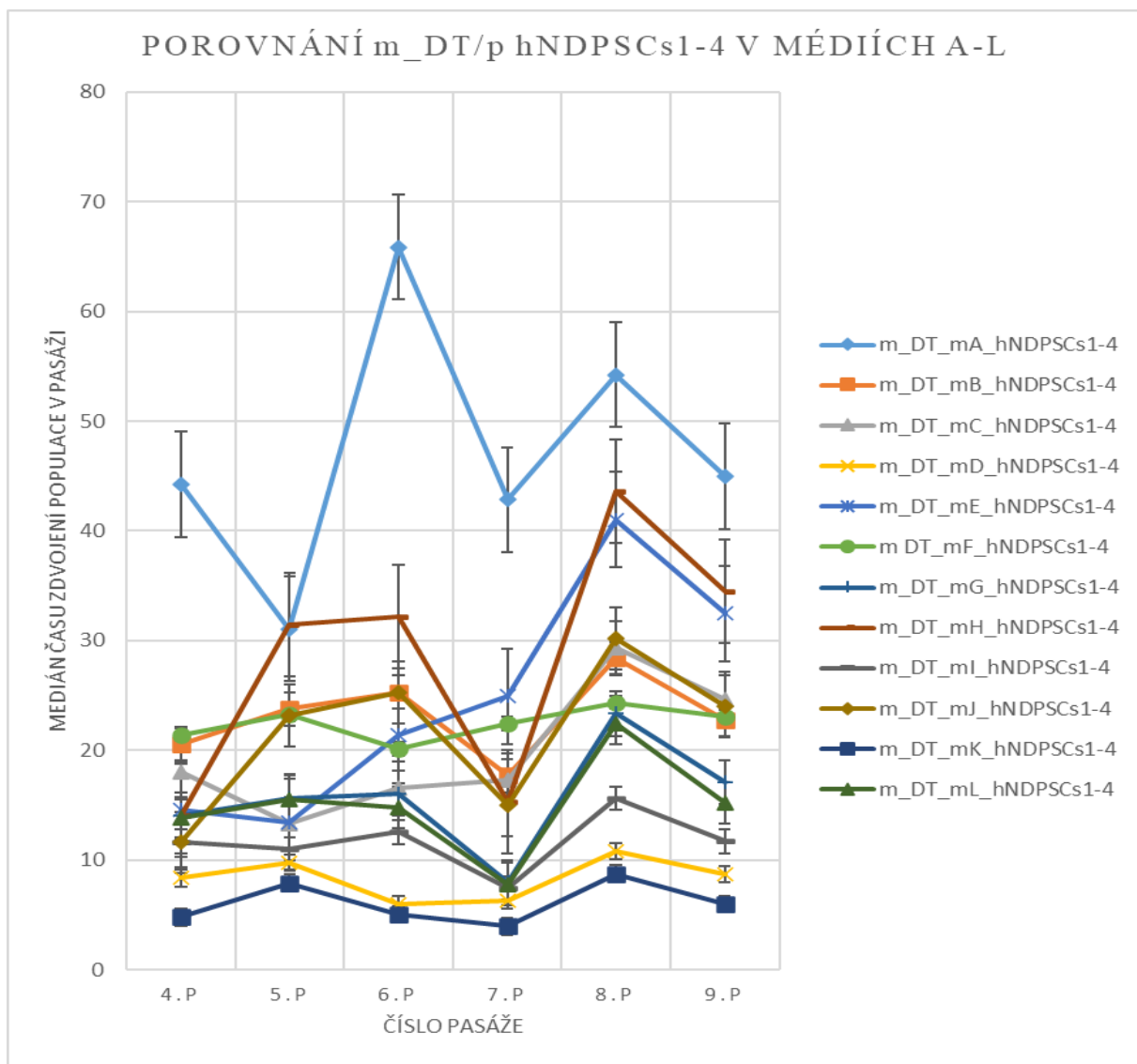
Graf 10: Růstové křivky hNDPSCs1-4 v experimentálních médiích.

Nejvyššího počtu populačních zdvojení hNDPSCs1-4 bylo dosaženo v médiu K (39,42 PD), sestupně pak v médiu D (68,00 PD), I (48,33 PD), L (39,42 PD) a G (37,57 PD). Nejnižší počet populačních zdvojení byl pozorován v médiu A (12,27). (Graf 11)



Graf 11: Růstové křivky kumulativního počtu populačních zdvojení hNDPSCs1-4 v experimentálních médiích.

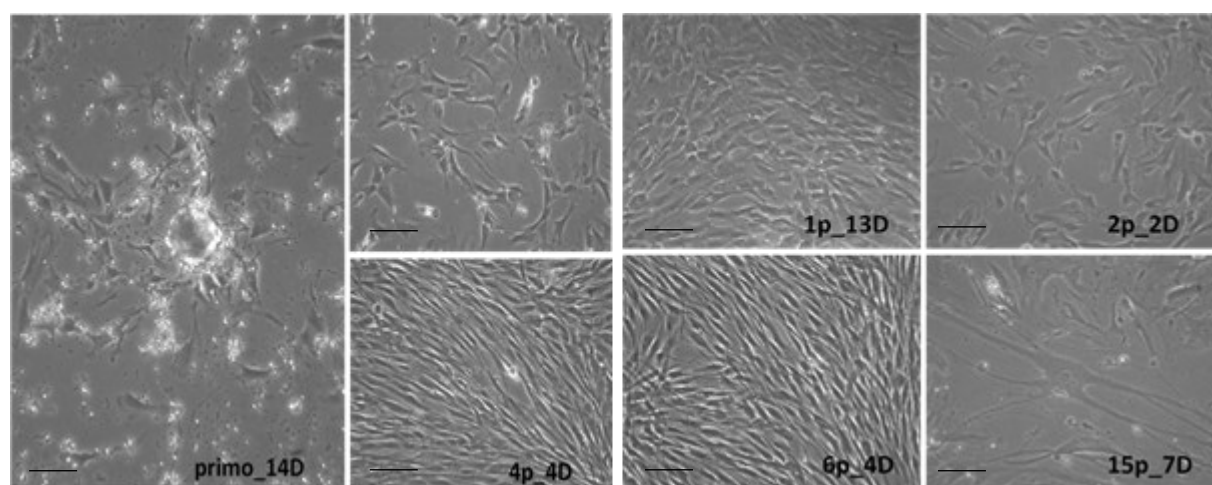
Nejrychleji proliferovaly hNDPSCs1-4 v médiu K, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 5,53 h s odstupem přibližně 3 hodin následovaly buňky kultivované v médiu D (8,55 h), s větším odstupem buňky v médiu I (11,71 h), L (15,03 h) a G (15,87 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali u hNDPSCs1-4 v živném médiu A (44,62 h) a H (31,83 h). (Graf 12)



Graf 12: Porovnání času pro zdvojení populace hNDPSCs1-4 v experimentálních médiích.

4.4. Morfologie a viabilita hDPSCs

Buněčná morfologie hDPSCs kultivovaných v médiu s 2% PRP+ITS odpovídala obecné představě; jednalo se o buňky protáhlého, vřetenitého tvaru podobné fibroblastům. hDPSCs expandované v kultivačním médiu s 2 % FCS byly oválnější. Buňky rostoucí v médiu s 10 % PRP byly oproti všem ostatním protáhlejší a hůře adherovaly k povrchu kultivační nádoby. Naopak silně a velkou plochou lnuly k povrchu buňky s mnohočetnými výběžky cytoplazmy expandované s 10 % HP. Všechny ostatní buňky si zachovaly původní vřetenovitý tvar. (Obr. 7)



Obr. 7: Příklad sledování morfologie hNDPSCs v médiu 2 % PRP+ITS (měřítko 10 μ m).

Viabilita hDPSCs v médiu s 2 % FCS+ITS, 2 % PRP+ITS a 10 % PRP byla vyšší než 90 %, v médiu s 10 % HP byla vyšší než 85 % a v médiu s 2 % HP+ITS byla 75,93 %.

4.5. Analýza povrchových znaků hDPSCs v experimentálních médiích

Fenotypová analýza hADPSCs1-4 byla provedena ve všech experimentálních médiích (Tab. 44). hADPSCs1-4 neměly na svém povrchu vyjádřeny znaky HLAII a CD106. Negativní byly také na přítomnost znaku CD49d a CD49e, mimo média H, kde byla pro tyto znaky zjištěna nízká pozitivita. CD31 byl negativní ve většině médií, mimo médium C a E (nízká pozitivita), K (střední pozitivita) a v médiu L, kde byla zjištěna vysoká pozitivita CD31. CD45 byl negativní také ve většině médií, mimo média A, B, D, H, kde byla zjištěna nízká pozitivita tohoto povrchového znaku. CD34 byl negativní ve většině médií, mimo média I a K (nízká pozitivita) a médium L (střední pozitivita). CD271 byl ve většině médií negativní, mimo média A, B, H, L (nízká pozitivita). Povrchové znaky CD166 a CD29 vykazovaly ve všech buněčných populacích vysokou pozitivitu. CD9 byl vysoce pozitivní ve většině médií, mimo médium G (střední pozitivita) a médium H (kde nebyl tento znak vyjádřen). CD63 byl vysoce vyjádřen ve většině médií, mimo médium H a I (střední pozitivita). HLA I vykazoval vysokou pozitivitu ve většině médií, mimo médium G a H (střední pozitivita). CD13 vykazoval vysokou pozitivitu ve většině médií, mimo médium I, J a K (střední pozitivita) a médium L (nízká pozitivita). CD44 byl vysoce pozitivní ve většině médií, mimo média E, F a K (nízká pozitivita) a L (znak nepřítomen). CD73 a CD 90 shodně vykazovaly ve většině médií vysokou pozitivitu, mimo média E a F (střední pozitivita), médium K (nízká pozitivita) a médium L (znaky nevyjádřeny). Ostatní povrchové znaky nevykazovaly jednoznačný většinový příklon ke stupni vyjádření. CD10 byl v médiích A, E, G, I nepřítomen, v médiích B, C, D, H, J, K nízce pozitivní, v médiu L středně pozitivní a v médiu F vysoce pozitivní, CD18 byl v médiích H a J nepřítomen, v médiích A, E, K, L nízce pozitivní, v médiích G, a I středně pozitivní a v médiích B, D, F vysoce pozitivní. CD71 byl nepřítomen v médiu G, H a L, nízce pozitivní v médiích A a J, středně vyjádřen v médiích B, C, D, E, I a vysoce vyjádřen v médiích F, K a L. CD105 byl nepřítomen v médiu K a L, nízce pozitivní v médiích D, E, F, G, středně pozitivní v médiu D a E a vysoce pozitivní v médiích B, C, H a I. CD117 byl nepřítomen v médiu J, nízce pozitivní v médiích A, B, C a G, středně pozitivní pro média D a E a vysoce pozitivní v médiích F, K a L. CD146 nebyl vyjádřen v médiích G, J, a I, nízce pozitivní v médiích A a E, středně pozitivní v médiích C, H a K a vysoce pozitivní v médiích B, D, F a L. CD184 byl nepřítomen v médiu A, G, H a J, nízce pozitivní v médiích B, C, D, E a I, nízce pozitivní v médiích B, C, D, E, a I, středně pozitivní v médiu F a vysoce pozitivní v médiích K a L. STRO-1 byl pozitivní u všech buněk hADPSCs1-4 nad 5 % (v rozmezí 5,01-28,73 %).

Fenotypová analýza hDDPSCs byla provedena pouze ve vybraných experimentálních médiích, tj. A, B, F, I, K, H (Tab. 44). Zcela negativní byly buněčné populace hDDPSCs1-4 na HLAI, CD106, CD18, CD31, CD49d, CD49e, CD133 a CD197. CD 45 nebyl ve většině médií vyjádřen, mimo médium B a F (nízká pozitivita). CD34 nebyl ve většině médií vyjádřen, mimo médium H (střední pozitivita). Vysokou pozitivitu vykazovaly ve všech médiích povrchové znaky CD73 a HLAI. Znaky CD9, CD13, CD44, CD29, CD90, CD166, CD222 a CD271 byly ve všech médiích vysoce pozitivní, mimo média H (negativní pro CD9 a CD222; nízké pozitivní pro CD271; středně pozitivní pro CD13 a CD166), médium K (středně pozitivní pro CD44, CD90 a Střední pozitivitu vykazovaly znaky CD105, CD146 a CD117 ve většině médií, mimo médium H (nízké pozitivní pro CD105 a negativní pro CD117), médium K (vysoce pozitivní pro CD105, CD146 a CD117), médium I (vysoká pozitivita pro CD105 a CD146), médium F (vysoká CD271), médium F (středně pozitivní pro CD44), médium A (středně pozitivní pro CD29), médium I (středně pozitivní pro CD271). pozitivita pro CD 117). Převážně nízkou pozitivitu mají v námi zkoumaných buněčných populacích hDDPSCs1-4 povrchové znaky CD63, CD71, CD184, CD10, mimo médium H (negativní pro CD63, CD184 a CD10, vysoce pozitivní pro CD71), médium K (vysoce pozitivní pro CD71 a CD184), médium F (středně pozitivní pro CD10 a CD184). STRO-1 byl u všech hDDPSCs1-4 nad 9 % (9,06 – 11,02 %). Fenotypová analýza hNDPSCs byla provedena pouze ve vybraných experimentálních médiích, tj. B a F (Tab. 44). Zcela negativní byly buněčné populace hDDPSCs1-4 pro HLAI. Povrchové znaky CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD71, CD73, CD90, CD166, CD222, INF beta, OCT3/4, HLAI byly v obou médiích vysoce pozitivní. CD 18 byl vysoce pozitivní v médiu F a nepřítomen v médiu B. Znaky CD31, CD34, CD117, CD133, CD146, CD197 byly v médiu F vysoce pozitivní, v médiu B nízké pozitivní. Povrchové znaky CD49d, CD105, CD106, CD184 a CD271 byly v médiu F vysoce pozitivní, v médiu B středně pozitivní. STRO-1 byl u všech hNDPSCs1-4 vysoce pozitivní, nad 90 % (90,95-99,99 %).

| | hADPSCs | | | | | | | | | | hDDPSCs | | | | | nNDPSCs | | | | | | | | |
|--------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|--------|----|----|----|----|
| | mA | mB | mC | mD | mE | mF | mG | mH | mI | mJ | mK | mL | mA | mB | mF | mI | mK | mH | mB | mF | mI | mB | mF | mI |
| STRO1 | 5,60 | 6,00 | 7,45 | 7,51 | 7,00 | 8,65 | 5,01 | 28,73 | 9,05 | 9,98 | 10,03 | 10,20 | 10,00 | 10,12 | 10,99 | 9,59 | 11,02 | 9,06 | 90,95 | 99,99 | | | | |
| CD9 | 97,44 | 99,72 | 96,34 | 95,33 | 95,02 | 95,25 | 61,24 | 0,02 | 76,23 | 95,01 | 88,26 | 80,26 | 98,99 | 99,98 | 94,19 | 80,11 | 90,67 | 0,01 | 98,47 | 99,75 | | | | |
| CD10 | 2,91 | 20,01 | 16,42 | 17,02 | 3,04 | 79,93 | 2,53 | 25,02 | 6,12 | 21,38 | 27,06 | 54,12 | 5,41 | 35,08 | 59,60 | 12,05 | 36,54 | 3,04 | 74,34 | 99,96 | | | | |
| CD13 | 97,44 | 99,72 | 95,12 | 96,47 | 95,00 | 95,45 | 77,42 | 96,80 | 60,07 | 41,77 | 61,47 | 31,37 | 99,89 | 98,87 | 94,57 | 78,52 | 82,30 | 42,03 | 98,59 | 99,97 | | | | |
| CD18 | 34,62 | 88,20 | 56,29 | 85,15 | 33,01 | 82,42 | 57,83 | 0,46 | 47,61 | 1,65 | 26,94 | 19,26 | 0,10 | 0,02 | 0,00 | 0,04 | 0,09 | 0,10 | 8,23 | 99,95 | | | | |
| CD29 | 99,99 | 99,98 | 99,99 | 99,62 | 99,72 | 95,15 | 99,79 | 93,04 | 99,41 | 98,40 | 99,36 | 98,73 | 69,13 | 75,27 | 76,16 | 80,56 | 83,84 | 99,88 | 97,09 | 99,98 | | | | |
| CD31 | 7,49 | 7,10 | 11,42 | 6,32 | 10,03 | 9,18 | 0,18 | 0,10 | 0,89 | 8,02 | 55,18 | 99,98 | 0,03 | 0,00 | 0,01 | 0,07 | 0,04 | 0,01 | 28,44 | 85,96 | | | | |
| CD34 | 1,83 | 6,64 | 2,55 | 3,39 | 0,70 | 2,09 | 0,26 | 0,40 | 11,92 | 1,35 | 35,01 | 68,19 | 0,01 | 0,10 | 0,09 | 0,11 | 0,07 | 48,30 | 23,46 | 85,09 | | | | |
| CD44 | 99,99 | 99,88 | 99,95 | 96,97 | 29,14 | 31,97 | 99,56 | 99,13 | 96,91 | 98,46 | 11,97 | 0,01 | 72,76 | 95,70 | 63,40 | 79,54 | 66,62 | 99,80 | 99,28 | 99,98 | | | | |
| CD45 | 12,77 | 14,32 | 1,46 | 17,94 | 0,04 | 0,12 | 1,79 | 20,85 | 1,82 | 9,48 | 0,08 | 1,00 | 9,45 | 13,20 | 14,09 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,34 | 96,55 | | | | |
| CD49d | 0,10 | 0,12 | 0,21 | 0,22 | 0,31 | 0,11 | 0,20 | 25,01 | 0,29 | 0,14 | 0,20 | 0,01 | 0,40 | 0,50 | 0,21 | 0,20 | 0,15 | 0,00 | 47,09 | 99,84 | | | | |
| CD49e | 2,01 | 4,02 | 4,03 | 0,20 | 0,19 | 0,10 | 0,10 | 32,88 | 0,00 | 0,32 | 0,10 | 0,01 | 1,90 | 3,50 | 3,07 | 0,30 | 0,01 | 0,00 | 85,51 | 95,04 | | | | |
| CD63 | 82,53 | 99,99 | 95,66 | 96,79 | 80,22 | 97,93 | 77,70 | 68,02 | 73,90 | 49,81 | 99,99 | 99,99 | 30,40 | 35,10 | 34,09 | 13,11 | 10,00 | 0,06 | 99,30 | 98,90 | | | | |
| CD71 | 31,38 | 46,55 | 45,25 | 67,60 | 65,32 | 88,42 | 4,34 | 0,00 | 42,00 | 19,25 | 99,50 | 99,99 | 25,44 | 36,60 | 31,03 | 20,70 | 89,60 | 99,98 | 78,06 | 97,70 | | | | |
| CD73 | 99,42 | 99,99 | 99,90 | 98,44 | 48,50 | 49,81 | 99,49 | 95,45 | 96,82 | 98,86 | 15,04 | 0,00 | 83,58 | 82,30 | 75,65 | 95,62 | 77,45 | 99,76 | 98,89 | 99,98 | | | | |
| CD90 | 95,02 | 97,90 | 99,37 | 97,77 | 55,47 | 56,60 | 98,80 | 98,75 | 99,52 | 96,03 | 11,83 | 0,00 | 84,44 | 96,50 | 77,19 | 96,20 | 67,03 | 99,73 | 90,40 | 99,99 | | | | |
| CD105 | 69,01 | 87,68 | 95,61 | 36,65 | 12,11 | 15,39 | 35,33 | 70,20 | 84,26 | 52,92 | 7,12 | 3,78 | 49,10 | 53,41 | 60,47 | 95,71 | 98,06 | 5,07 | 56,41 | 100,00 | | | | |
| CD106 | 0,20 | 0,10 | 0,01 | 0,09 | 1,00 | 2,04 | 2,05 | 0,15 | 2,00 | 2,10 | 1,90 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 47,01 | 98,52 | | | | |
| CD117 | 26,11 | 31,24 | 35,80 | 64,25 | 63,74 | 80,10 | 10,94 | 59,20 | 47,50 | 4,24 | 95,27 | 99,99 | 43,24 | 49,70 | 97,02 | 52,30 | 98,99 | 7,39 | 14,24 | 98,99 | | | | |
| CD146 | 16,26 | 95,48 | 67,94 | 72,60 | 14,38 | 71,92 | 0,84 | 60,21 | 4,13 | 9,16 | 54,68 | 95,04 | 68,90 | 88,94 | 69,99 | 95,88 | 99,89 | 50,36 | 30,53 | 99,97 | | | | |
| CD166 | 99,98 | 99,32 | 99,17 | 99,58 | 99,99 | 99,99 | 99,58 | 93,65 | 95,53 | 95,12 | 99,99 | 100,00 | 72,14 | 74,30 | 73,45 | 69,06 | 71,23 | 63,51 | 94,79 | 99,98 | | | | |
| CD184 | 6,12 | 15,01 | 23,37 | 30,32 | 37,06 | 49,41 | 0,89 | 0,00 | 30,30 | 6,22 | 81,72 | 99,99 | 10,09 | 22,30 | 59,01 | 25,33 | 75,49 | 0,00 | 69,84 | 99,41 | | | | |
| CD271 | 11,84 | 15,44 | 6,64 | 7,40 | 0,51 | 2,99 | 5,14 | 19,85 | 7,97 | 8,88 | 8,62 | 16,51 | 94,21 | 95,87 | 99,62 | 57,60 | 60,35 | 32,74 | 60,36 | 99,95 | | | | |
| HLA I | 99,99 | 95,64 | 97,25 | 98,22 | 88,56 | 84,15 | 41,95 | 66,90 | 99,99 | 84,46 | 99,98 | 99,97 | 88,63 | 98,20 | 98,99 | 99,99 | 99,99 | 86,06 | 81,76 | 99,80 | | | | |
| HLA II | 2,30 | 1,54 | 0,68 | 0,91 | 0,02 | 0,04 | 0,54 | 4,02 | 0,18 | 1,58 | 0,01 | 0,00 | 0,30 | 0,40 | 0,01 | 0,34 | 0,29 | 0,42 | 0,73 | 0,65 | | | | |

Tab. 44: Mediány povrchových znaků hDPSCs vyjádřené v procentech, experiment byl proveden u každé linie čtyřikrát v každém uvedeném experimentálním médiu.

5. Diskuse

Ve výzkumu se od roku 2005 zaměřujeme na snížení obsahu FCS jako xenogenní komponenty v kultivačním médiu pro hDPSCs¹⁵². V předchozích studiích se jeho množství podařilo snížit na 2% koncentraci, ale ne zcela vyloučit²²⁶. V této práci jsme prokázali, že lze nahradit FCS deriváty lidské krve v kultivačních médiích, aniž by došlo ke snížení proliferační aktivity. Abychom získali data, která bude možno porovnat, testovali jsem 12 různých médií na 12 buněčných liniích 3 subpopulací hDPSCs hADPSCs, hDDPSCs a hNDPSCs. Jsme si plně vědomi, že mohla mít kultivace během prvních třech pasáží v médiu s 2 % FCS+ITS vliv na pozorované vlastnosti, na druhou stranu provedené analýzy jasně potvrdily rozdíly ve fenotypu, morfologii i proliferační aktivitě. Přestože již byly provedeny studie porovnávající vliv médií obohacených o FCS nebo krevní deriváty na buněčné vlastnosti²²⁹. Jak poukázala prostřednictvím metaanalýzy dat získaných z publikovaných studií Palombella a kol.²³⁰, není možné z publikovaných údajů vyvodit jasné obecně platné závěry. Stejně jako většina výzkumných skupin jsme u všech linií před započítáním experimentu prokázali kmenovost dlouhodobou kultivací, přítomností telomerázy, STRO-1 a trojlineární diferenciací^{231,232}.

Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly buněčné linie hADPSCs kultivované v médiu s 10 % PRP v souladu se studií Saeed a kol.²³³. Dle růstových křivek se nejúspěšnější média obohacená o krevní suplementy pro kultivaci hADPSCs řadí sestupně – 10 % PRP (1.), 2 % HP+ITS (2.), 2 % PRP+ITS (3.), 2 % FCS+ITS (4.) a 10 % HP (5.). Je pozoruhodné, že pozitivita základních povrchových znaků hMSCs u hDPSCs kultivovaných v jednotlivých médiích velmi kolísá (CD73, CD90, CE102, CD34, CD45 a HLA I-); a to narozdíl od málo úspěšných růstových médií, kde dosahuje vysoké shody (2 % HP, 20 % HP, 10 % FCS). Ani recentní literatura se zcela neshoduje na panelu pro hDPSCs⁸⁹. V médiích s vysokou proliferační aktivitou se vyskytují povrchové znaky základního panelu pro hMSCs v těchto hodnotách: 10 % PRP (CD7+, CD90+, CD105-, CD34+, CD45-, HLAI-), 2 % HP+ITS (CD73+++ , CD90++++, CD105+++ , CD34-, CD45+, HLA II-), v médiu s 2 % PRP+ITS (CD73++ , CD90++ , CD105+ , CD34-, CD45-, HLAI-), 2 % FCS+ITS (CD73+++ , CD90+++ , CD105+++ , CD34-, CD45+) a médiu obohacené o 10 % HP (CD73++++, CD90+++ , CD105+++ , CD34+ , CD45+ , HLA II-). V preferovaném kultivačním médiu, které umožnilo hADPSCs nejrychlejší proliferační aktivitu, tedy médiu s 10% PRP, byly buňky pozitivní na zcela jiné znaky kmenových buněk, a to CD9+++ , CD29+++ , CD63+++ , CD166+++ , CD71+++ , CD117+++ , CD184+++ a postrádaly znaky CD45, CD49, CD105, CD106 a CD271.

Obecně pro buňky kultivované v prvních pěti médiích s vysokou aktivitou růstu (viz. výše) platí tento panel znaků kmenových buněk: CD9⁺⁺⁺, CD29⁺⁺⁺, CD63⁺⁺⁺, HLA I⁺⁺⁺, CD166⁺, CD45⁻, CD49⁻, CD106⁻, CD271⁻, HLAII). CD117, *Receptor pro Stem Cell Factor*, cytokinový receptor pro kmenové buňky a zároveň glykoprotein, který reguluje jejich diferenciaci, a receptor CD71, nezbytný pro erytropoézu a neurologický vývoj, nesly hADPSCs kultivované nejen v médiu s 10 % PRP, ale také s 2 % PRP+ITS. Buňky kultivované v médiu s 2 % HP+ITS a 2 % FCS+ITS vykazovaly stejný profil povrchových znaků jako mezenchymální kmenové buňky pupečníku a amnia (CD13⁺, CD29⁺, CD 44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺), pouze pro buňky amnia je profil rozšířen o CD166⁺ a CD34⁻, CD49⁻²³⁴. S tím rozdílem, že hADPSCs ve většině EKM byly níže pozitivní pro CD45, kdy u buněk amnia tento znak absentuje. Celému profilu buněk amnia pak odpovídaly hADPSCs kultivované v médiu s 2 % PRP+ITS a v médiu s 10 % HP. Není bez zajímavosti, že hADPSCs kultivované v médiích s vysokou podporou růstu (viz. výše) exprimují na svém povrchu znak embryonálních kmenových buněk CD9²³⁵ a jsou pro něj dokonce vysoce pozitivní. Tyto buňky svým fenotypovým profilem odpovídají spíše ranějším buněčným typům, než jsou kmenové buňky zubní dřene stálých zubů, a to především buňkám dentálního folikulu. A zároveň vysokou expresí povrchového znaku CD63 odpovídají fenotypu postulovanému pro kmenové buňky zubní pulpy dočasných zubů²³⁶. Ideálně panel postulovaný pro hMSCs¹⁶ splňují hADPSCs kultivované v médiu s 2% HP (8. médium v podpoře růstu ze 12) (CD73⁺⁺⁺, CD90⁺⁺⁺, CD105⁺⁺⁺, CD34⁻, CD45⁻, HLA II). Následované buňkami v růstovém médiu s 20 % HP (12. médium, tedy nejhorší) (CD73⁺⁺⁺, CD90⁺⁺⁺, CD105⁺⁺, CD34⁻, CD45⁻, HLAII-). Dále s klesající pozitivitou znaků v médiu s 10 % FCS (7. médium) (CD73⁺⁺⁺, CD90⁺⁺⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, HLA II-). A nakonec v médiích s 2 % PRP (10. médium) a 2 % PRP+ITS (3. médium), kde znaky dosahovaly shodné positivity/negativity (CD73⁺⁺, CD90⁺⁺, CD102⁺, CD34⁻, CD45⁻, HLA II-). Obecně uznávaný profil hADPSCs je CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺, CD146⁺, CD271⁺, CD166⁺ a STRO-1⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD106⁻, HLAI I^{-74,237,238,239,240}. Tomuto profilu odpovídají hADPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS a 2 % FCS+ITS. Přestože nejlepších růstových hodnot dosahovaly hADPSCs v médiu s 10 % PRP, jejich fenotypový profil se výrazně lišil od postulovaného základního panelu povrchových znaků pro hMSCs¹⁶. Minimálním kritériím pro hMSCs (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ a CD34⁻, CD45 – a HLA II-)¹⁷ odpovídají hADPSCs kultivované v médiích s 2 % HP, 10 % HP, 20 % HP a hraničně s 10 % HP, 2 % HP+ITS a 20 % FCS. Média s obsahem PRP vykazují zajímavou tendenci ke snižování

pozitivity CD73, CD90, CD105 (nízká pozitivita) a zároveň naprosto postrádají CD34 a CD45. Se zvyšujícím se procentuálním zastoupením PRP (10 %, 20 %) nejprve ztrácí CD105, u 20 % PRP jsou pak CD73, CD90 také negativní, naopak opačný trend má CD34, které je v 10 % PRP nízce pozitivní, ve 20 % PRP již středně pozitivní. Negativní pro znak HLA II jsou hADPSCs ve všech médiích. Všechny buněčné populace hADPSCs byly pozitivní na STRO-1, povrchový znak stromálních prekursorových buněk, dále na CD166, CD63, HLA I, CD9, CD29 a zároveň negativní pro CD106. Nízkou pozitivitu pro nervový růstový receptor CD271 vykazovaly buňky hADPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS, 2 % FCS+ITS, 20 % FCS a 20 % PRP. Znak perivaskulárních buněk CD146 nesly všechny buňky, mimo buněk kultivovaných v 10 % FCS, 10 % HP a 20 % HP, nízce pozitivní pro tento znak byly buňky v růstových médiích 2 % FCS a 2 % PRP. Ueda a kol.²⁴¹ připomíná, že CD146 pozitivní buňky jsou považovány za buňky, které jsou v případě potřeby schopné migrovat do poškozené tkáně a diferencovat v odontoblasty a které mají mnoho shodných vlastností s hMSCs, díky nimž jsou schopné regenerovat zubní dřev *in vivo*. Absence CD34, jakožto znaku hematopoetických buněk nebo buněk endotelia, a znaku CD 45, běžného leukocytárního antigenu, byla u námi kultivovaných buněk hADPSCs téměř absolutní; mimo buňky z 20 % FCS, kde se shodujeme s výsledky studie Laino a kol.²⁴². Buňky hADPSCs kultivované bez PRP vykazovaly také obdobný fenotypový profil jako mezenchymální buňky získané z pupečníku (CD13+, CD29+, CD44+, CD105+, CD166+, HLA I+, CD45-, CD34⁻)²⁴³. Receptor růstového faktoru kmenových buněk CD117 je exprimován na povrchu většiny hADPSCs²²⁴. Tento závěr potvrdila také naše studie s výjimkou buněk v médiu s 20 % HP. Zajímavé je, že čím vyšší podíl PRP byl v médiu obsažen, tím více rostla pozitivita tohoto znaku. Zároveň se na profilu hADPSCs (CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, HLAII-) shoduje většina autorů^{75,244,245}. S absencí znaku CD44 a CD105 se setkáváme u vysoce koncentrovaných médií s obsahem PRP (10 % a 20 %). Buněčné adhezivní molekuly CD44, CD146 a CD166 jsou nesený na povrchu naprosté většiny námi analyzovaných buněčných populací, stejně jako popisuje Rojewski a kol.²⁴⁶. Ovšem narozdíl od tohoto autora jsou buňky námi kultivované zcela negativní na přítomnost adhezivní molekuly CD106, na tzv. VCAM-1. Buněčnými integriny, hlavními mediátory adheze mezi buňkami a extracelulární matrix a zároveň znaky prekursorů kmenových buněk, jejichž přítomnost jsme zjišťovali, byly CD18, CD29 a CD49e, CD49d a CD13. Tyto znaky byly ve všech námi pozorovaných buněčných populacích pozitivní. CD18, integrin beta-2, byl pozitivní u buněk rostoucích ve většině médií, mimo dvou

médií s vysokým obsahem krevního derivátu, tj. 20 % FCS a 20 % HP. Na členy rodiny integrinů alfa byly všechny buňky negativní. I v literatuře hodnoty těchto molekul u hMSCs a i jiných progenitorových buněk, např. hematopoetické řady, výrazně variiují²⁴⁷. Nejvíce se profilu prekurzorů kmenových buněk svými povrchovými znaky blíží hADPSCs kultivované ve 2 % PRP+ITS (CD10+, CD13+, CD71+, CD90+, CD105+, CD117⁺)²⁴⁶. Dle studie Halfona a kol.²⁴⁸ by mohla nízká exprese CD106, kterou jsme pozorovali v 9. pasáži u hADPSCs, znamenat již přechod od hMSCs k diferencovanějším buněčným populacím, např. osteogenním fibroblastům.

Námi kultivované buňky dočasných zubů ve všech médiích postrádaly povrchové znaky CD18 (receptor komplementu), CD31 (adhezivní molekula krevních destiček pro buňky endotelu), CD34 (adhezivní molekula pro hematopoetické buňky), CD45 (*recognize leukocyte common antigen*) receptor typu C proteinové tyrosin fosfatázy vyskytující se v různých izoformách na všech hematopoetických buňkách kromě červených krvinek a plazmatických buněk, rodinu integrinů CD49, CD106 (adhezivní molekula, endoteliální ligand pro integrin alfa4beta1), CD133 (marker klidových kmenových buněk), CD197 (chemokinový receptor na lymfatických tkáních aktivovaných B a T lymfocyty) a HLA II. Ve shodě s hADPSCs byly pozitivní pro znaky CD9, CD44, CD73, CD90, CD105 a CD166 (obecné znaky hMSCs), CD13, CD29, CD146, CD222, CD271. Pouze buňky kultivované v 20 % PRP se lišily a zachovávaly si pozitivitu jen některých uvedených znaků, tj. CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD271 a HLA I. Střední až vysoká exprese CD146 je považována za základní charakteristiku hDDPSCs (64). Stejně tak dříve zmíněná studie Huanga a kol.⁷⁴ uvádí CD13+, CD29+, CD44+, CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD146+, CD34- a CD45- jako typický profil hDDPSCs. Vysoká povrchová exprese CD44, CD105 a negativita znaku CD34 odpovídají recentní literatuře²⁴⁹. Dle Leie a kol.¹⁰⁴ charakterizuje hDDPSCs tento panel fenotypových znaků: CD13+, CD29+, CD31+, CD44+, CD45+, CD63+, CD71+, CD90+, CD105+, CD117+, CD146+, CD166+, STRO-1+. Oproti tomuto panelu se naše zjištění liší v následujících pozorováních – žádná z linií hDDPSCs nenesla znak CD31, ale všechny byly pozitivní na znak CD271, který reguluje růst neuronů, migraci, diferenciaci a buněčnou smrt během života kmenových buněk, a CD222, který je považován za hlavní růstový faktor v těle plodu během těhotenství a je vysoce exprimován v centrálním nervovém systému²⁵⁰. Pouze u buněk kultivovaných v 20 % PRP byl povrchový znak CD222 nízcce pozitivní. Analýza povrchových znaků ukázala pozitivitu CD45 u hDDPSCs kultivovaných v médiu s 2 % FCS a 2 % FCS+ITS, a

naopak absenci znaků CD105, CD117 a CD63 kultivovaných v růstovém médiu obohaceném o 20 % PRP.

hDDPSCs nejlépe rostly v kultivačním médiu s 10 % HP, toto médium v podpoře proliferace následovala sestupně média s 10 % PRP, 2 % PRP+ITS a 2 % FCS+ITS. Společný panel povrchových znaků hDDPSCs kultivovaných v těchto médiích vypadal takto: CD9+++ , CD13+++ , CD29+++ , CD44 , CD73+++ , CD90+++ , CD105+++ , CD117+++ , CD146+++ , CD166+++ , CD222+++ , CD271+++ , HLA I+++ , CD63+ , CD18- , CD31- , CD34- , CD45- , CD49d- , CD49e- , CD106- , CD133- , CD197- , HLA II-. Výše popsaná exprese povrchových znaků se velmi podobá povrchovým znakům hMSCs v pupenech končetin při jejich vývoji^{251,252}. Shrňeme-li vyjádření povrchových znaků hDDPSCs, ukazuje se, že se jednalo o velmi homogenní populaci s vyrovnaným chováním a vysokou expresí znaků raných mezenchymálních kmenových buněk. Nepotvrdili jsme sdělení jiných výzkumných skupin, že se hDDPSCs během kultivace v různých růstových médiích chovají podobně jako hADPSCs^{139, 253, 254}. Buněčný růst nejvíce podporovalo médium obsahující 10 % HP. Závěrem lze říci, že hDDPSCs jsou mnohem homogennější buněčnou populací s vyjádřenějšími neurálními znaky než hADPSCs.

hNDPSCs zdaleka nejlépe proliferovaly v médiu s 10 % PRP. Ke srovnání fenotypu jsme zvolili buňky ze dvou médií se suplementem lidské krve a fetální telecí krve, kde byl buněčný růst nejvyrovnanější během dlouhodobé kultivace, tj. hNDPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS+ITS a 2 % PRP+ITS. Fenotyp těchto dvou buněčných populací se zásadně lišil. Buňky kultivované v médiu s 2 % PRP+ITS toto médium udrželo v nediferencovaném stavu, nebo stavu velmi rané diferenciační fáze, ve které by se pravděpodobně nacházely v makroorganismu při jeho vzniku. Usuzujeme tak na základě kombinace s vysokou pozitivitou znaků pluripotence, stejně jako například Malek a Besinger²⁵⁵ u mezenchymálních kmenových buněk placenty. Tyto buňky vykazují vysokou pozitivitu STRO-1, INF beta a OCT 3/4, tj. znaků pluripotence^{256,257}. Stejně jako embryonální kmenové buňky exprimují na svém povrchu CD9, CD90, CD117, které značí nediferencovaný stav. Pozitivita znaku CD184 se dá vysvětlit přítomností progenitorů v buněčné populaci hESCs²⁵⁸⁻²⁶⁰. Znaky CD106, CD271, které kromě endoteliálních progenitorových buněk exprimují také dendritické buňky, které navíc produkují INF beta, na který byly buňky hNDPSCs také pozitivní. Což by potvrdilo jejich neurogení potenciál^{261,262}. hNDPSCs vykazují vysokou pozitivitu všech povrchových znaků, na které byly testovány, ve shodě s jinými studiemi^{124,126}. A to nejen typických pro hMSCs, ale také hematopoetické markery, markery embryonálních buněk.

hNDPSCs vykazují naprosto unikátní kombinaci vysoké exprese HLA I, HLA II a hMSCs znaků. Toto naše zjištění je v rozporu s popisem exprese povrchových znaků hNDPSCs Akpinarem a kol.¹⁹⁹.

hMSCs kultivovaná v médiích různého složení vykazovala shodné změny morfologie se změnami již dříve popsány^{263,264}. Zajímavé bylo pozorování, že proliferační aktivitu podporuje více 10 % PRP než 2 % PRP+ITS, ač u FCS je tento jev obrácený. Toto zpomalení růstu koreluje i s buněčnou morfologií rozložitých buněk silně lnoucích k povrchu kultivační nádoby. Podobná pozorování provedl Suchánek a kol.²²⁶. Nejrychlejší tvorbu buněčných kolonií a proliferaci jsme pozorovali v médiu s 10 % PRP (10 % HP u hDDPSCs), což koresponduje s teorií, že PRP zlepšuje proliferaci hMSCs^{265,266}. Média s 2 % FCS a 2 % HP obohacená o ITS, EGF a PDGF vykazovala shodnou proliferační aktivitu, ovšem nižší než 10 % PRP (10 % HP u hNDPSCs). Proto usuzujeme, že tyto tři doplňky sice podporují hDPSCs natolik, aby rostly, přesto však předpokládáme, že v lidské krvi existují ještě mnohem silnější růstové a stimulační faktory. Otázkou zůstává, které povrchové znaky jsou skutečně charakteristické pro hDPSCs a které jsou dány suplementy růstových médií.

6. Závěr

Přes veškerý pokrok ve výzkumu kmenových buněk není zatím možné uznat buněčnou terapii jako léčebný postup v humánní medicíně²⁶⁷⁻²⁷⁰. Jedním z hlavních důvodů je používání doplňků kultivačních médií pocházejících z jiného živočišného druhu během expanze lidských kmenových buněk²⁷¹⁻²⁷³. Fetální telecí sérum je nejužívanějším xenogenním krevním derivátem doplňujícím kultivační média o velké množství růstových faktorů, které se dosud nepodařilo uspokojivě chemicky definovat a nahradit. Nevýhodou užívání FCS je jeho schopnost zásadně ovlivňovat vlastnosti kultivovaných buněk, tím silněji, čím déle trvá jejich kultivace. FCS je zároveň velice účinný a levný zdroj růstových a stimulačních faktorů²³⁰. Jelikož se nejedná o uměle vyráběnou komponentu, nýbrž o přírodní produkt získávaný z těl telecích plodů exsanguinací, nelze FCS šarže unifikovat²⁷⁴. Tato skutečnost je problematická stran metodiky experimentů a přijetí získaných výsledků^{125,275}. Avšak tento problém sdílejí všechny deriváty krve, jak lidské, tak zvířecí^{276,277}. Kultivační médium obsahující 10 % PRP (10 % HP u hDDPSCs) je dle našich zjištění ideální alogenní náhradou FCS. Zvyšuje proliferační aktivitu, potlačuje většinu povrchových markerů spojovaných s nádorovými kmenovými buňkami a zásadně neovlivňuje markery pluripotence, pokud jsou u buněčné linie přítomny^{278,279}. Dle recentní literatury udržuje PRP hDPSCs schopné diferencovat v buňky endotelu a perivaskulárního niché, ale především v neurální buněčné linie^{83,280-282}. Díky těmto poznatkům nastává čas na otázku, zdali není třeba přehodnotit parametry, především pozitivitu povrchových znaků, kterými posuzujeme příslušnost adultních kmenových buněk k zárodečnému listu. K posunu od preklinického výzkumu k běžné klinické praxi zbývá urazit ještě velký kus cesty. Největším problémem zůstávají nedostatečná kritéria, podle kterých kmenové buňky zařazujeme, dále též ovlivnění buněk kultivačními podmínkami a délkou kultivace *in vitro*, obtížně při kultivaci monoklonálních buněčných linií, a nakonec i dostatečně kritický přístup ke klinickým studiím a jejich cílům.

7. Literatura

- ¹ Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98.
- ² Weatherbee, B. A., Cui, T., & Zernicka-Goetz, M. (2021). Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. *Developmental biology*, 474, 91-99.
- ³ Ohgushi, M., & Eiraku, M. (2021). Cell-autonomous differentiation of human primed embryonic stem cells into trophoblastic syncytia through the nascent amnion-like cell state. *bioRxiv*.
- ⁴ Saba, J. A., Liakath-Ali, K., Green, R., & Watt, F. M. (2021). Translational control of stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(10), 671-690.
- ⁵ Lackner, A., Sehlke, R., Garmhausen, M., Giuseppe Stirparo, G., Huth, M., Titz-Teixeira, F., ... & Leeb, M. (2021). Cooperative genetic networks drive embryonic stem cell transition from naive to formative pluripotency. *The EMBO journal*, 40(8), e105776.
- ⁶ Nit, K., Tyszka-Czochara, M., & Bobis-Wozowicz, S. (2021). Oxygen as a master regulator of human pluripotent stem cell function and metabolism. *Journal of Personalized Medicine*, 11(9), 905.
- ⁷ Zhang, J. (2021). Origin, evolution and function of pluripotent stem cell niches in the meridian system.
- ⁸ Varghese, B., Ling, Z., & Ren, X. (2022). Reconstructing the pulmonary niche with stem cells: a lung story. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 1-12.
- ⁹ Ding, Z., Pan, X., Wang, X., Xie, H., & Ye, Q. (2021). Interactions between induced pluripotent stem cells and stem cell niche augment osteogenesis and bone regeneration. *Smart Materials in Medicine*, 2, 196-208.
- ¹⁰ Lou, S., Duan, Y., Nie, H., Cui, X., Du, J., & Yao, Y. (2021). Mesenchymal stem cells: Biological characteristics and application in disease therapy. *Biochimie*, 185, 9-21.
- ¹¹ Pshennikova, E. S., & Voronina, A. S. (2022). Dormancy: There and Back Again. *Molecular Biology*, 56(5), 735-755.
- ¹² Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313-319.
- ¹³ Nardi, N. B., & da Silva Meirelles, L. (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. In *Stem cells* (pp. 249-282). Springer Berlin Heidelberg.
- ¹⁴ Knoblich, J.A. (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*,132(4), 583-97.
- ¹⁵ Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell*, 10(6), 709-716.
- ¹⁶ Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S. & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- ¹⁷ Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2), 126-131.
- ¹⁸ Ackema, K. B., & Charité, J. (2008). Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem cells and development*, 17(5), 979-992.
- ¹⁹ Trosko, J. E. (2006). From Adult Stem Cells to Cancer Stem Cells: Oct-4 Gene, Cell-Cell Communication, and Hormones during Tumor Promotion. *Annals of the NEW YORK Academy of Sciences*, 1089(1), 36-58.
- ²⁰ Raj, A. T., Kheur, S., Bhonde, R., Gupta, A. A., & Patil, S. (2021). Assessing the effect of human mesenchymal stem cell-derived conditioned media on human cancer cell lines: A systematic review. *Tissue and Cell*, 71, 101505.
- ²¹ Liu, C., Billet, S., Choudhury, D., Cheng, R., Haldar, S., Fernandez, A., ... & Bhowmick, N. A. (2021). Bone marrow mesenchymal stem cells interact with head and neck squamous cell carcinoma cells to promote cancer progression and drug resistance. *Neoplasia*, 23(1), 118-128.
- ²² Li, C., Zhao, H., & Wang, B. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells: developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics. *Translational Oncology*, 14(1), 100948.
- ²³ Miyazaki, Y., Oda, T., Inagaki, Y., Kushige, H., Saito, Y., Mori, N., ... & Kida, Y. S. (2021). Adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into heterogeneous cancer-associated fibroblasts in a stroma-rich xenograft model. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.
- ²⁴ Drubin, D. G., & Hyman, A. A. (2017). Stem cells: the new “model organism”. *Molecular biology of the cell*, 28(11), 1409-1411.
- ²⁵ Takebe, T., Enomura, M., Yoshizawa, E., Kimura, M., Koike, H., Ueno, Y., ... & Taniguchi, H. (2015). Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell stem cell*, 16(5), 556-565.
- ²⁶ Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194), 1247125.
- ²⁷ Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, K. H., & Lim, S. K. (2013). Exosomes for drug delivery—a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnology advances*, 31(5), 543-551.
- ²⁸ Masuda, K., Han, X., Kato, H., Sato, H., Zhang, Y., Sun, X., ... & Fukumoto, S. (2021). Dental pulp-derived mesenchymal stem cells for modeling genetic disorders. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2269.

- ²⁹ Hassanzadeh, A., Rahman, H. S., Markov, A., Endjun, J. J., Zekiy, A. O., Chartrand, M. S., ... & Jarahian, M. (2021). Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem cell research & therapy*, *12*(1), 1-22.
- ³⁰ Siemionow, M., Szilagy, E., Cwykiel, J., Domaszewska-Szostek, A., Heydemann, A., Garcia-Martinez, J., & Siemionow, K. (2021). Transplantation of dystrophin expressing chimeric human cells of myoblast/mesenchymal stem cell origin improves function in Duchenne muscular dystrophy model. *Stem Cells and Development*, *30*(4), 190-202.
- ³¹ Escobar-Soto, C. H., Mejia-Romero, R., Aguilera, N., Alzate-Granados, J. P., Mendoza-Pinto, C., Munguia-Realpozo, P., ... & Rojas-Villarraga, A. (2021). Human mesenchymal stem cells for the management of systemic sclerosis. Systematic review. *Autoimmunity Reviews*, *20*(6), 102831.
- ³² Dong, X., Askinas, C., Kim, J., Sherman, J. E., Bonassar, L. J., & Spector, J. (2022). Efficient engineering of human auricular cartilage through mesenchymal stem cell chaperoning. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *16*(9), 825-835.
- ³³ Alonso-Goulart, V., Carvalho, L. N., Marinho, A. L. G., de Oliveira Souza, B. L., de Aquino Pinto Palis, G., Lage, H. G. D., ... & de Souza Castro-Filice, L. (2021). Biomaterials and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine: A systematic review. *Materials*, *14*(16), 4641.
- ³⁴ Kim, D., Lee, A. E., Xu, Q., Zhang, Q., & Le, A. D. (2021). Gingiva-derived mesenchymal stem cells: potential application in tissue engineering and regenerative medicine-a comprehensive review. *Frontiers in immunology*, *12*, 667221.
- ³⁵ Hartenstein V. (2013) Stem cells in the context of evolution and development. *Dev genes evol*, *223*(1), 1-3.
- ³⁶ Abdelalim E.M. (2014) "Pluripotent Stem Cells as a Potential Tool for Disease Modelling and Cell Therapy in Diabetes." *Stem Cell Reviews and Reports* *10*.3, 327-337.
- ³⁷ Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, *4*(1), 1-15.
- ³⁸ Dabrowska, S., Andrzejewska, A., Janowski, M., & Lukomska, B. (2021). Immunomodulatory and regenerative effects of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles: therapeutic outlook for inflammatory and degenerative diseases. *Frontiers in immunology*, *11*, 591065.
- ³⁹ Scanu, M., Mancuso, L., & Cao, G. (2011). Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicology in vitro*, *25*(8), 1989-1995.
- ⁴⁰ Dzobo, K. (2021). Recent trends in multipotent human mesenchymal stem/stromal cells: Learning from history and advancing clinical applications. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *25*(6), 342-357.
- ⁴¹ Kou, M., Huang, L., Yang, J., Chiang, Z., Chen, S., Liu, J., ... & Lian, Q. (2022). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?. *Cell death & disease*, *13*(7), 1-16.
- ⁴² Song, N., Wakimoto, H., Rossignoli, F., Bhere, D., Ciccocioppo, R., Chen, K. S., ... & Shah, K. (2021). Mesenchymal stem cell immunomodulation: In pursuit of controlling COVID-19 related cytokine storm. *Stem Cells*, *39*(6), 707-722.
- ⁴³ Kim, K., Bou-Ghannam, S., Kameishi, S., Oka, M., Grainger, D. W., & Okano, T. (2021). Allogeneic mesenchymal stem cell sheet therapy: a new frontier in drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, *330*, 696-704.
- ⁴⁴ Wang, M., Xin, Y., Cao, H., Li, W., Hua, Y., Webster, T. J., ... & Liu, Z. (2021). Recent advances in mesenchymal stem cell membrane-coated nanoparticles for enhanced drug delivery. *Biomaterials science*, *9*(4), 1088-1103
- ⁴⁵ Sun, Y., Liu, G., Zhang, K., Cao, Q., Liu, T., & Li, J. (2021). Mesenchymal stem cells-derived exosomes for drug delivery. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 1-15.
- ⁴⁶ Carballo-Pedraes, N., Kattar, A., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Rey-Rico, A. (2021). Niosomes-based gene delivery systems for effective transfection of human mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C*, *128*, 112307.
- ⁴⁷ Su, Y., Zhang, T., Huang, T., & Gao, J. (2021). Current advances and challenges of mesenchymal stem cells-based drug delivery system and their improvements. *International Journal of Pharmaceutics*, *600*, 120477.
- ⁴⁸ Khayambashi, P., Iyer, J., Pillai, S., Upadhyay, A., Zhang, Y., & Tran, S. D. (2021). Hydrogel encapsulation of mesenchymal stem cells and their derived exosomes for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 684.
- ⁴⁹ Ali, S., Xia, Q., Muhammad, T., Liu, L., Meng, X., Bars-Cortina, D., ... & Dong, L. (2021). Glioblastoma therapy: rationale for a mesenchymal stem cell-based vehicle to carry recombinant viruses. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-21.
- ⁵⁰ Herman, S., Fishel, I., & Offen, D. (2021). Intranasal delivery of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for the treatment of neurological diseases. *Stem Cells*, *39*(12), 1589-1600.
- ⁵¹ Nowak, B., Rogujski, P., Janowski, M., Lukomska, B., & Andrzejewska, A. (2021). Mesenchymal stem cells in glioblastoma therapy and progression: How one cell does it all. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1876*(1), 188582.
- ⁵² Múzes, G., & Sipos, F. (2022). Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells*, *11*(15), 2300.
- ⁵³ Marx, C., Gardner, S., Harman, R. M., & Van de Walle, G. R. (2020). The mesenchymal stromal cell secretome impairs methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms via cysteine protease activity in the equine model. *Stem Cells Translational Medicine*, *9*(7), 746-757.
- ⁵⁴ Sueta, A., Fujiki, Y., Goto-Yamaguchi, L., Tomiguchi, M., Yamamoto-Ibusuki, M., Iwase, H., & Yamamoto, Y. (2021). Exosomal miRNA profiles of triple-negative breast cancer in neoadjuvant treatment. *Oncology Letters*, *22*(6), 1-10.

- ⁵⁵ Sun, Z., Zhang, J., Li, J., Li, M., Ge, J., Wu, P., ... & Qian, H. (2021). Roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer development and targeted therapy. *Stem Cells International*, 2021.
- ⁵⁶ Takayama, Y., Kusamori, K., Tsukimori, C., Shimizu, Y., Hayashi, M., Kiyama, I., ... & Nishikawa, M. (2021). Anticancer drug-loaded mesenchymal stem cells for targeted cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 329, 1090-1101.
- ⁵⁷ Vakhshiteh, F., Rahmani, S., Ostad, S. N., Madjd, Z., Dinarvand, R., & Atyabi, F. (2021). Exosomes derived from miR-34a-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. *Life Sciences*, 266, 118871.
- ⁵⁸ Yassine, S., & Alaaeddine, N. (2022). Mesenchymal stem cell exosomes and cancer: controversies and prospects. *Advanced Biology*, 6(2), 2101050.
- ⁵⁹ Chang, X., Ma, Z., Zhu, G., Lu, Y., & Yang, J. (2021). New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma. *Journal of Bone Oncology*, 29, 100372.
- ⁶⁰ Sun, Y., Xue, C., Wu, H., Li, C., Li, S., Luo, J., ... & Ding, Y. (2023). Genetically Modified Mesenchymal Stromal Cells in Cartilage Regeneration. *Stem Cells and Development*, (ja).
- ⁶¹ Crippa, S., Conti, A., Vavassori, V., Ferrari, S., Beretta, S., Ravis, S., ... & Bernardo, M. E. (2023). Mesenchymal stromal cells improve the transplantation outcome of CRISPR-Cas9 gene-edited human HSPCs. *Molecular Therapy*, 31(1), 230-248.
- ⁶² Ulin, M., Cetin, E., Hobeika, E., Chugh, R. M., Park, H. S., Esfandyari, S., & Al-Hendy, A. (2021). Human mesenchymal stem cell therapy and other novel treatment approaches for premature ovarian insufficiency. *Reproductive Sciences*, 28(6), 1688-1696.
- ⁶³ Strug, M., & Aghajanova, L. (2021). Making more womb: Clinical perspectives supporting the development and utilization of mesenchymal stem cell therapy for endometrial regeneration and infertility. *Journal of Personalized Medicine*, 11(12), 1364.
- ⁶⁴ Zhu, Y., Ge, J., Huang, C., Liu, H., & Jiang, H. (2021). Application of mesenchymal stem cell therapy for aging frailty: from mechanisms to therapeutics. *Theranostics*, 11(12), 5675.
- ⁶⁵ Ahn, S. Y., Park, W. S., Sung, S. I., & Chang, Y. S. (2021). Mesenchymal stem cell therapy for intractable neonatal disorders. *Pediatrics & Neonatology*, 62, S16-S21.
- ⁶⁶ Farkhad, N. K., Mahmoudi, A., & Mahdipour, E. (2021). How similar are human mesenchymal stem cells derived from different origins? A review of comparative studies. *Current stem cell research & therapy*, 16(8), 980-993.
- ⁶⁷ Fernández-Francos, S., Eiro, N., Costa, L. A., Escudero-Cernuda, S., Fernández-Sánchez, M. L., & Vizoso, F. J. (2021). Mesenchymal stem cells as a cornerstone in a galaxy of intercellular signals: basis for a new era of medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3576.
- ⁶⁸ Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., ... & Ueda, M. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 80.
- ⁶⁹ Shih, D. T. B., Lee, D. C., Chen, S. C., Tsai, R. Y., Huang, C. T., Tsai, C. C., ... & Chiu, W. T. (2005). Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem cells*, 23(7), 1012-1020.
- ⁷⁰ Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650.
- ⁷¹ Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., & Davies, J. E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells*, 23(2), 220-229.
- ⁷² Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., & Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human cell*, 23(2), 35-40.
- ⁷³ Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625-13630.
- ⁷⁴ Huang, G. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792-806.
- ⁷⁵ Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., ... & Bagnara, G. P. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80(6), 836-842.
- ⁷⁶ Kim, S. G. (2021). A cell-based approach to dental pulp regeneration using mesenchymal stem cells: a scoping review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4357.
- ⁷⁷ Charitos, I. A., Ballini, A., Cantore, S., Boccellino, M., Di Domenico, M., Borsani, E., ... & Bottalico, L. (2021). Stem cells: a historical review about biological, religious, and ethical issues. *Stem Cells International*, 2021.
- ⁷⁸ Nicolas, P., Etoc, F., & Brivanlou, A. H. (2021). The ethics of human-embryoids model: a call for consistency. *Journal of Molecular Medicine*, 99(4), 569-579.
- ⁷⁹ Wang, F., Jia, Y., Liu, J., Zhai, J., Cao, N., Yue, W., ... & Pei, X. (2017). Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. *Cell Biology International*, 41(6), 639-650.
- ⁸⁰ Moshtagh, P. R., Emami, S. H., & Sharifi, A. M. (2013). Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(3), 451-458.

- ⁸¹ Sawangmake, C., Nowwarote, N., Pavasant, P., Chansiripornchai, P., & Osathanon, T. (2014). A feasibility study of an in vitro differentiation potential toward insulin-producing cells by dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 452(3), 581-587.
- ⁸² Luzuriaga, J., Polo, Y., Pastor-Alonso, O., Pardo-Rodríguez, B., Larrañaga, A., Unda, F., ... & Ibarretxe, G. (2021). Advances and perspectives in dental pulp stem cell based neuroregeneration therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3546.
- ⁸³ Retana-Lobo, C., & Reyes-Carmona, J. (2022). Immunohistochemical characterization of stem cell, vascular, neural, and differentiation markers in the apical papilla and dental pulp of human teeth at various stages of root development. *Journal of Histotechnology*, 1-11.
- ⁸⁴ Arana-Chavez, V. E., & Massa, L. F. (2004). Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(8), 1367-1373.
- ⁸⁵ Goldberg, M. (2016). The dentinoenamel junction. *Understanding Dental Caries: From Pathogenesis to Prevention and Therapy*, 75-83.
- ⁸⁶ Klein, C., Meller, C., & Schäfer, E. (2022). Human Primary Odontoblast-like Cell Cultures—A Focused Review Regarding Cell Characterization. *Journal of Clinical Medicine*, 11(18), 5296.
- ⁸⁷ Korkmaz, Y., Imhof, T., Kaemmerer, P. W., Bloch, W., Rink-Notzon, S., Moest, T., ... & Deschner, J. (2022). The colocalizations of pulp neural stem cells markers with dentin matrix protein-1, dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein in human denticle (pulp stone) lining cells. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 239, 151815.
- ⁸⁸ Tziafas, D., & Kodonas, K. (2010). Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *Journal of endodontics*, 36(5), 781-789.
- ⁸⁹ Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., & Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(5), 511-523.
- ⁹⁰ Kok, Z. Y., Alaidaroos, N. Y., Alraies, A., Colombo, J. S., Davies, L. C., Waddington, R. J., ... & Moseley, R. (2022). Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity: Finding Superior Quality “Needles” in a Dental Pulpal “Haystack” for Regenerative Medicine-Based Applications. *Stem Cells International*, 2022.
- ⁹¹ Mitsiadis, T. A., Feki, A., Papaccio, G., & Catón, J. (2011). Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Advances in dental research*, 23(3), 275-279.
- ⁹² Demarco, F. F., Conde, M. C. M., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Brazilian dental journal*, 22, 3-13.
- ⁹³ Sahara, N., Okafuji, N., Toyoki, A., Ashizawa, Y., Yagasaki, H., Deguchi, T., & Suzuki, K. (1993). A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. *Journal of dental research*, 72(3), 634-640.
- ⁹⁴ Shabbir, J., Farooq, I., Ali, S., Mohammed, F., Bugshan, A., Khurram, S. A., & Khan, E. (2021). Dental Pulp. *An Illustrated Guide to Oral Histology*, 69-79.
- ⁹⁵ Kojoushkova, A., & Krastev, N. (2021, August). Histological characteristics of pulpa dentis. In *Varna Medical Forum* (Vol. 10, No. 2, pp. 60-63).
- ⁹⁶ Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A. & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 81(8), 531-535.
- ⁹⁷ Abarca, J., Zaror, C., Monardes, H., Hermosilla, V., Muñoz, C., & Cantin, M. (2014). Morphology of the physiological apical foramen in maxillary and mandibular first molars. *International journal of morphology= Revista internacional de morfología*, 32(2), 671.
- ⁹⁸ Van Hassel, H. J. (1971). Physiology of the human dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 32(1), 126-134.
- ⁹⁹ Rothová, M., Peterková, R., & Tucker, A. S. (2012). Fate map of the dental mesenchyme: dynamic development of the dental papilla and follicle. *Developmental biology*, 366(2), 244-254.
- ¹⁰⁰ Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., ... & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8), 1671-1679.
- ¹⁰¹ Kerkis, I., & Caplan, A. I. (2012). Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(2), 129-138.
- ¹⁰² Nel, S., Durandt, C., Murdoch, C., & Pepper, M. S. (2022). Determinants of Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity. *Journal of Endodontics*.
- ¹⁰³ Timothy, C. N., Samyuktha, P. S., & Brundha, M. P. (2019). Dental pulp Stem Cells in Regenerative Medicine—A Literature Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(8), 4052-6.
- ¹⁰⁴ Lei, T., Zhang, X., & Du, H. (2021). Characteristics, classification, and application of stem cells derived from human teeth. *Stem Cells International*, 2021.
- ¹⁰⁵ Pilbauerova, N., Soukup, T., Kleplová, T. S., & Suchanek, J. (2019). Enzymatic isolation, amplification and characterization of dental pulp stem cells. *Folia biologica*, 65(3), 124-133.
- ¹⁰⁶ Chen, J., Zheng, X., Rao, N., Huang, Y., Liu, J., Li, Y., & Zhang, J. (2021). Key markers and epigenetic modifications of dental-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells International*, 2021.

- ¹⁰⁷ Kerkis I., Kerkis A., Dozortsev D., Stukart-Parsons G.C., Gomes Massironi S.M., Pereira L.V., Caplan A.I., & Cerruti H.F. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 184 (3-4),105-116, 45-15)
- ¹⁰⁸ Yalvac, M. E., Ramazanoglu, M., Rizvanov, A. A., Sahin, F., Bayrak, O. F., Salli, U., ... & Kose, G. T. (2010). Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The pharmacogenomics journal*, 10(2), 105-113.
- ¹⁰⁹ Zhang, W., & Yelick, P. C. (2021). Tooth repair and regeneration: potential of dental stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, 27(5), 501-511.
- ¹¹⁰ Nakashima, M., & Iohara, K. (2014). Experimental In Vivo Approaches of Pulp Regeneration. In *The Dental Pulp* (pp. 203-218). Springer, Berlin, Heidelberg.
- ¹¹¹ Nakashima, M., Iohara, K., Bottino, M. C., Fouad, A. F., Nör, J. E., & Huang, G. T. J. (2019). Animal models for stem cell-based pulp regeneration: foundation for human clinical applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 25(2), 100-113.
- ¹¹² Yan, Ming, et al. "A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth." *Stem Cell Reviews and Reports* 7.1 (2011): 161-171.
- ¹¹³ Wining, L., El Karim, I. A., & Lundy, F. T. (2019). A comparative analysis of the osteogenic potential of dental mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 28(15), 1050-1058.
- ¹¹⁴ Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (10), 5807-5812.
- ¹¹⁵ Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., & Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue engineering*, 12(10), 2813-2823.
- ¹¹⁶ Yamada Y, Ito K, Nakanuta S, Ueda M, & Nagasaki T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow." *Cell transplant* 2011;20(7): 1003-1013.
- ¹¹⁷ Morsezeck C., Völlner F., Saugspier M., Brandl C., Reichert T.E. Driemel O., & Schmalz G. (2010) Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*, 4(4), 433-440.
- ¹¹⁸ Nourbakhsh N., Soleimani M., Taghipour Z., Karbalaie K., Mousavi S., Talebi A., Nadali F., Tanhaei S., Kiyani G.A., Nematollahi M., Rabiei F., Mardani M., Bahramiyan H., Torabinejad M., Nasr-Esfahani M.H., & Baharvand H. (2011) Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol*, 55(2),189-195.
- ¹¹⁹ Akpınar, G., Kasap, M., Aksoy, A., Duruksu, G., Gacar, G., & Karaöz, E. (2014). Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells International*, 2014.
- ¹²⁰ Holden, E., DeSeta, M., Siddik, D., & Bhujel, N. (2022). Natal and neonatal teeth: A review and management recommendations. *Journal of Neonatal Nursing*.
- ¹²¹ Park, J. S., Patel, J., Seewoo, B. J., King, N. M., & Anthonappa, R. P. (2019). Literature review and micro-computed tomography analysis of natal teeth: A pilot study. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 10(4), e12466.
- ¹²² Gentile, T., Carugo, N., & Galeotti, A. (2020). Neonatal teeth: Importance of histological findings in management update. *European journal of paediatric dentistry*, 21, 323.
- ¹²³ Rezende, K., Imparato, J. C. P., de Oliveira, F. R. A. N. Ç. A., Carvalho, D., Rochs, M. O., & Bönecker, M. (2018). Dental Pulp Stem Cells from Natal Teeth: Isolation and Morphological Study. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 12(3).
- ¹²⁴ Shetty, H., Kakade, A., Shetty, S., Neelakantan, P., Nagar, S., Desai, R. S., & Beri, K. (2018). Immunohistochemical characterization of stem cell and differentiation markers of the dental pulp of human natal teeth. *Future Science OA*, 4(10), FSO342.
- ¹²⁵ Suchánek, J., Browne, K. Z., Nasry, S. A., Kleplová, T. S., Pilbauerová, N., Schmidt, J., & Soukup, T. (2018). Characteristics of human natal stem cells cultured in allogeneic medium. *Brazilian Dental Journal*, 29, 427-434.
- ¹²⁶ Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., ... & Sarıboyacı, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and cell biology*, 133(1), 95-112.
- ¹²⁷ Pisal, R. V., Suchanek, J., Siller, R., Soukup, T., Hrebikova, H., Bezrouk, A., ... & Mokry, J. (2018). Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- ¹²⁸ Yuan, S. M., Yang, X. T., Zhang, S. Y., Tian, W. D., & Yang, B. (2022). Therapeutic potential of dental pulp stem cells and their derivatives: Insights from basic research toward clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, 14(7), 435.
- ¹²⁹ Kumar, R., Sharma, A., Pattnaik, A. K., & Varadwaj, P. K. (2010). Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 1(1), 43.
- ¹³⁰ Tatullo, M., Marrelli, M., Falisi, G., Rastelli, C., Palmieri, F., Gargari, M., ... & Benagiano, V. (2016). Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 29(1), 3-8.
- ¹³¹ Katsara O., Mahaira L.G., Iliopoulou E.G., Moustaki A., Antsaklis A., Loutradis D., Stefanidis K., Baxevanis C.N., & Papamichail M, Perez S.A. (2011) Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 20(9),1549-61.

- ¹³² Suchánek J, Suchánková Kleplová T, Kapitán M, Soukup T. (2103) The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 56, 142-149.
- ¹³³ Mannello F., Tonti G.A. (2007) Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold! *Stem Cells*, 25(7), 1603-1609
- ¹³⁴ Rowland, A. L. (2021). *The Immunogenicity of Mesenchymal Stem Cells* (Doctoral dissertation).
- ¹³⁵ Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., ... & Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Science of Animal Resources*, 42(5), 775-799.
- ¹³⁶ Mochizuki, M., & Nakahara, T. (2018). Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 1-15
- ¹³⁷ Honn, K. V., Singley, J. A., & Chavin, W. (1975). Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 149(2), 344-347.
- ¹³⁸ Kilic, P. (2021). Quality Management Systems (QMSs) of human-based tissue and cell product manufacturing facilities. *Stem Cells and Good Manufacturing Practices*, 263-279.
- ¹³⁹ Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., & Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem cells*, 27(9), 2331-2341.
- ¹⁴⁰ Halme D.G., Kessler D.A. (2006) FDA regulation of stem-cell-based therapies. *New Engl J Med*, 355(16),1730 –1735
- ¹⁴¹ Cowper, M., Frazier, T., Wu, X., Curley, J. L., Ma, M. H., Mohiuddin, O. A., ... & Gimble, J. M. (2019). Human platelet lysate as a functional substitute for fetal bovine serum in the culture of human adipose derived stromal/stem cells. *Cells*, 8(7), 724.
- ¹⁴² Dictus C., Tronnier V., Unterberg A., Herold-Mende C. (2007) Comparative analysis of in vitro conditions for rat adult neural progenitor cells. *J Neurosci Methods*, 161, 250 –258.
- ¹⁴³ WHO (1997) Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: Memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*, 75,505–513.
- ¹⁴⁴ Lehrich, B. M., Liang, Y., Khosravi, P., Federoff, H. J., & Fiandaca, M. S. (2018). Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3538.
- ¹⁴⁵ Shahdadfar A., Fronsdal K., Haug T., Reinholt F.P., Brinchmann J.E. (2005) In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9),1357–1366.
- ¹⁴⁶ Van Der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W., Fu, J., ... & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. *Altex*, 35(1), 1-20
- ¹⁴⁷ Tseng, P. Y., Chen, C. J., Sheu, C. C., Yu, C. W., & Huang, Y. S. (2007). Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(2), 95-102.
- ¹⁴⁸ Gou, S., Wang, C., Liu, T., Wu, H., Xiong, J., Zhou, F., & Zhao, G. (2010). Spontaneous differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes without malignant transformation after long-term culture. *Cells Tissues Organs*, 191(3), 185-192.
- ¹⁴⁹ Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martín, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., & Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research*, 65(8), 3035-3039.
- ¹⁵⁰ Wang, J. C., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in cell biology*, 15(9), 494-501.
- ¹⁵¹ Røsland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., ... & Schichor, C. (2009). Long-term cultures of bone marrow–derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research*, 69(13), 5331-5339.
- ¹⁵² Suchánek, J., Soukup, T., Ivancakova, R., Karbanová, J., Hubková, V., Pytlík, R., & Kucerova, L. (2007). Human dental pulp stem cells-isolation and long term cultivation. *ACTA MEDICA-HRADEC KRALOVE-*, 50(3), 195.
- ¹⁵³ Gronthos, S., & Simmons, P. J. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro.
- ¹⁵⁴ Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., & Verfaillie, C. M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation*, 109(3), 337-346.
- ¹⁵⁵ Karbanová, J., Soukup, T., Suchánek, J., Pytlík, R., Corbeil, D., & Mokřý, J. (2011). Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs*, 193(6), 344-365.
- ¹⁵⁶ Govindasamy, V., Abdullah, A. N., Ronald, V. S., Musa, S., Aziz, Z. A. C. A., Zain, R. B., ... & Kasim, N. H. A. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *Journal of endodontics*, 36(9), 1504-1515.
- ¹⁵⁷ Furcht, L. T., Verfaillie, C. M., & Reyes, M. (2005). U.S. Patent No. US 7,015,097 B1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- ¹⁵⁸ Heitzer, M., Modabber, A., Zhang, X., Winnand, P., Zhao, Q., Bläsius, F. M., ... & Greven, J. (2023). In vitro comparison of the osteogenic capability of human pulp stem cells on alloplastic, allogeneic, and xenogeneic bone scaffolds. *BMC Oral Health*, 23(1), 1-13.
- ¹⁵⁹ Lucarelli, E., Beccheroni, A., Donati, D., Sangiorgi, L., Cenacchi, A., Del Vento, A. M., ... & Picci, P. (2003). Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, 24(18), 3095-3100.
- ¹⁶⁰ Udugma, I. A., Badr, S., Hirono, K., Scholz, B. X., Hayashi, Y., Kino-oka, M., & Sugiyama, H. (2023). The Role of Process Systems Engineering in Applying Quality by Design (QbD) in Mesenchymal Stem Cell Production. *Computers & Chemical Engineering*, 108144.
- ¹⁶¹ Tohyama, S., Fujita, J., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., ... & Fukuda, K. (2016). Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells. *Cell metabolism*, 23(4), 663-674
- ¹⁶² Khamees, N. H. (2022). The impact of media supplement on the viability, proliferation, and differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mustansiriyah Medical Journal*, 21(2), 145.
- ¹⁶³ Liu, X., Zhang, T., Wang, R., Shi, P., Pan, B., & Pang, X. (2019). Insulin-transferrin-selenium as a novel serum-free media supplement for the culture of human amnion mesenchymal stem cells. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 49(1), 63-71.
- ¹⁶⁴ Cheever, M., Master, A., & Versteegen, R. (2017). A method for differentiating fetal bovine serum from newborn calf serum. *BioProcess J*, 16(1).
- ¹⁶⁵ Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., ... & Prockop, D. J. (2004). Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy*. *Molecular Therapy*, 9(5), 747-756.
- ¹⁶⁶ Zheng, X., Baker, H., Hancock, W. S., Fawaz, F., McCaman, M., & Pungor Jr, E. (2006). Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress*, 22(5), 1294-1300.
- ¹⁶⁷ Alvarado, A. S., & Yamanaka, S. (2014). Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell*, 157(1), 110-119.
- ¹⁶⁸ Doucet C., Ernou I., Zhang Y., Llense J.R., Begot L., Holy X., & Lataillade J.J. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205 (2), 228 –236.
- ¹⁶⁹ Paim, W. P., Maggioli, M. F., Falkenberg, S. M., Ramachandran, A., Weber, M. N., Canal, C. W., & Bauermann, F. V. (2021). Virome Characterization in Commercial Bovine Serum Batches—A Potentially Needed Testing Strategy for Biological Products. *Viruses*, 13(12), 2425.
- ¹⁷⁰ Flatschart, R. B., Caldas, L. A., Almeida, D. O., dos Santos, N. C., Boldrini, L. C., Granjeiro, J. M., & Folgueras-Flatschart, A. V. (2016). The Impact of BVDV presence on fetal bovine serum used in the biotechnology industry. *Advances in medicine and biology*, 75-95.
- ¹⁷¹ Bruinink A., Tobler U., Halg M., Grünert J. (2004) Effects of serum and serum heat-inactivation on human bone derived osteoblast progenitor cells. *J Mater Sci Mater Med*, 15 (4), 497–501. Brunner, D.,
- ¹⁷² Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, 27(1), 53.
- ¹⁷³ Fernandes, S., Amirault, J. C., Lande, G., Nguyen, J. M., Forest, V., Bignolais, O., ... & Lemarchand, P. (2006). Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovascular research*, 69(2), 348-358.
- ¹⁷⁴ Tuschong L., Soenen S.L., Blaese R.M., Candotti F., Muul L.M. (2002) Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther*, 13, 1605–1610.
- ¹⁷⁵ Versteegen, R. J., Murray, J., & Doelger, S. (2021). Animal welfare and ethics in the collection of fetal blood for the production of fetal bovine serum. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 38(2), 319-323.
- ¹⁷⁶ Weber, T., Wirths, F., Brakebusch, N., & Van der Valk, J. (2021). Reply to comment “Animal welfare and ethics in the collection of fetal blood for the production of fetal bovine serum”. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 38(2), 324-326.
- ¹⁷⁷ Weber, T., & Wagner, K. (2021). Replacing fetal bovine serum (FBS) in research and testing. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 38(1), 163–164.
- ¹⁷⁸ Dimarakis I., Levicar N. (2006) Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells*, 24 (5), 1407–1408
- ¹⁷⁹ Sekiya I., Larson B.L., Smith J.R., Pochampally R., Cui J.G., Prockop D.J. (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6), 530 –541
- ¹⁸⁰ Bieback K., Ha V.A., Hecker A., Grassl M., Kinzebach S., Solz H., Sticht C., Kluter H., & Bugert P. (2010). Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Eng Part A*, 16(11),3467-84.
- ¹⁸¹ Kocaoemer, A., Kern, S., Klueter, H., & Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem cells*, 25(5), 1270-1278.

- ¹⁸² Mantripragada, V. P., & Muschler, G. F. (2022). Improved biological performance of human cartilage-derived progenitors in platelet lysate xenofree media in comparison to fetal bovine serum media. *Current Research in Translational Medicine*, 70(4), 103353.
- ¹⁸³ Heiskanen, A., Satomaa, T., Tiitinen, S., Laitinen, A., Mannelin, S., Impola, U., ... & Laine, J. (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells*, 25(1), 197-202.
- ¹⁸⁴ Lehrich, B. M., Liang, Y., & Fiandaca, M. S. (2021). Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(3).
- ¹⁸⁵ Chakraborty, E., Chaudhary, S., Saragade, Y., Sharma, S., John, J., Tyagi, N., & Mishra, K. (2022). Optimizing aseptic and serum milieu for the isolation of human whole umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 1-10
- ¹⁸⁶ Chachques J.C., Herreros J., Trainini J., Juffe A., Rendal E., Prosper F., & Genovese J. (2004) Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol*, 95, 29–33
- ¹⁸⁷ Weyand, B., Dominici, M., Hass, R., Jacobs, R., & Kasper, C. (Eds.). (2013). *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. Springer Berlin.
- ¹⁸⁸ Taihi, I., Pilon, C., Cohen, J., Berdal, A., Gogly, B., Nassif, A., & Fournier, B. P. (2022). Efficient isolation of human gingival stem cells in a new serum-free medium supplemented with platelet lysate and growth hormone for osteogenic differentiation enhancement. *Stem cell research & therapy*, 13(1), 1-14.
- ¹⁸⁹ Maharajan, N., Cho, G. W., Choi, J. H., & Jang, C. H. (2021). Regenerative therapy using umbilical cord serum. *in vivo*, 35(2), 699-705.
- ¹⁹⁰ Chelladurai, K. S., Christyraj, J. D. S., Rajagopalan, K., Yesudhasan, B. V., Venkatachalam, S., Mohan, M., ... & Christyraj, J. R. S. S. (2021). Alternative to FBS in animal cell culture-An overview and future perspective. *Heliyon*, 7(8), e07686.
- ¹⁹¹ Froud, s. j. (1999) The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* 99, 157-166.
- ¹⁹² Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A. (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 11(2), 228–232.
- ¹⁹³ Cai, A., Hardt, M., Schneider, P., Schmid, R., Lange, C., Dippold, D., ... & Beier, J. P. (2018). Myogenic differentiation of primary myoblasts and mesenchymal stromal cells under serum-free conditions on PCL-collagen I-nanoscaffolds. *BMC biotechnology*, 18(1), 1-12.
- ¹⁹⁴ Hoang, V. T., Trinh, Q. M., Phuong, D. T. M., Bui, H. T. H., Ngan, N. T. H., Anh, N. T. T., ... & Hoang, D. M. (2021). Standardized xeno-and serum-free culture platform enables large-scale expansion of high-quality mesenchymal stem/stromal cells from perinatal and adult tissue sources. *Cytotherapy*, 23(1), 88-99.
- ¹⁹⁵ Bhat, S., Viswanathan, P., Chandanala, S., Prasanna, S. J., & Seetharam, R. N. (2021). Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Scientific Reports*, 11(1), 1-18.
- ¹⁹⁶ Heathman, T. R., Nienow, A. W., Rafiq, Q. A., Coopman, K., Kara, B., & Hewitt, C. J. (2019). Development of a process control strategy for the serum-free microcarrier expansion of human mesenchymal stem cells towards cost-effective and commercially viable manufacturing. *Biochemical engineering journal*, 141, 200-209.
- ¹⁹⁷ Silva-Carvalho, A. É., Neves, F. A. R., & Saldanha-Araujo, F. (2020). The immunosuppressive mechanisms of mesenchymal stem cells are differentially regulated by platelet poor plasma and fetal bovine serum supplemented media. *International Immunopharmacology*, 79, 106172.
- ¹⁹⁸ Cho, H., Lee, A., & Kim, K. (2018). The effect of serum types on Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Biomaterials Research*, 22(1), 1-10.
- ¹⁹⁹ Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfäller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 27(1), 53-62.
- ²⁰⁰ Yoshida, K., Nakashima, A., Doi, S., Ueno, T., Okubo, T., Kawano, K. I., ... & Masaki, T. (2018). Serum-free medium enhances the immunosuppressive and antifibrotic abilities of mesenchymal stem cells utilized in experimental renal fibrosis. *Stem cells translational medicine*, 7(12), 893-905.
- ²⁰¹ Dong, G., Wang, S., Ge, Y., Deng, Q., Cao, Q., Wang, Q., ... & Gu, Y. (2019). Serum-free culture system for spontaneous human mesenchymal stem cell spheroid formation. *Stem cells international*, 2019.
- ²⁰² Li, Q., Zhao, D., Chen, Q., Luo, M., Huang, J., Yang, C., ... & Liu, T. (2019). Wharton's jelly mesenchymal stem cell-based or umbilical vein endothelial cell-based serum-free coculture with cytokines supports the ex vivo expansion/maintenance of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-9.
- ²⁰³ Dakhore, S., Nayer, B., & Hasegawa, K. (2018). Human pluripotent stem cell culture: current status, challenges, and advancement. *Stem cells international*, 2018.
- ²⁰⁴ Sriramulu, S., Banerjee, A., Di Liddo, R., Jothimani, G., Gopinath, M., Murugesan, R., ... & Pathak, S. (2018). Concise review on clinical applications of conditioned medium derived from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs). *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 12(3), 230.

- ²⁰⁵ Bozorgmehr, M., Gurung, S., Darzi, S., Nikoo, S., Kazemnejad, S., Zarnani, A. H., & Gargett, C. E. (2020). Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: biological properties and clinical application. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 497.
- ²⁰⁶ Zhang, Q., Sun, X., Ding, J., He, P., Liu, Y., Cheng, H., ... & Meng, X. (2015). Autoserum: An Optimal Supplement for Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Liver-Injured Rats. *Stem Cells International*, 2015.
- ²⁰⁷ Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F., Zander A.R. (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*, 32 (12), 1212–1225.
- ²⁰⁸ Kobayashi T., Watanabe H., Yanagawa T., Tsutsumi S., Kayakabe M., Shinozaki T., Higuchi K., & Takagishi K. (2005) Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex-vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br*, 87(10),1426–1433.
- ²⁰⁹ Lin H.T., Tarng Y.W., Chen Y.C., Kao C.L., Hsu C.J., Shyr Y.M., Ku H.H., & Chiou S.H. (2005) Using human plasma supplemented medium to cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplant Proc*, 37 (10), 4504–4505.
- ²¹⁰ Stojkovic, P., Lako, M., Przyborski, S., Stewart, R., Armstrong, L., Evans, J., ... & Stojkovic, M. (2005). Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(7), 895-902.
- ²¹¹ Mizuno, N., Shiba, H., Ozeki, Y., Mouri, Y., Niitani, M., Inui, T., ... & Kurihara, H. (2006). Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell biology international*, 30(6), 521-524.
- ²¹² Müller I., Kordowich S., Holzwarth C., Spano C., Isensee G., Staiber A., Viebahn S., Gieseke F., Langer H., Gawaz M.P., Horwitz E.M., Conte P., Handgretinger R., & Dominici M. (2006) Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 8(5), 437– 444.
- ²¹³ Lang, S., Loibl, M., & Herrmann, M. (2018). Platelet-rich plasma in tissue engineering: hype and hope. *European Surgical Research*, 59(3-4), 265-275.
- ²¹⁴ Kirsch, M., Rach, J., Handke, W., Seltsam, A., Pepelanova, I., Strauß, S., ... & Lavrentieva, A. (2021). Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 598389.
- ²¹⁵ Doucet C., Ernou I., Zhang Y., Llense J.R., Begot L., Holy X., & Lataillade J.J. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205 (2), 228 –236.
- ²¹⁶ Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L. Dohan A.J.J., Mouhyi J., & Gogly B. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e51-5.
- ²¹⁷ Bernardo, M. E., Avanzini, M. A., Perotti, C., Cometa, A. M., Moretta, A., Lenta, E., ... & Locatelli, F. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of cellular physiology*, 211(1), 121-130.
- ²¹⁸ Marx R.E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.*, 10(4), 225-228.
- ²¹⁹ Kilian O., Flesch I., Wenisch S., Taborski B., Jork A., Schnettler R., & Jonuleit T. (2004) Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res*, 9 (7), 337–344.
- ²²⁰ Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19-31.
- ²²¹ Barford, J. P. (Ed.). (1995). *Fundamental and applied aspects of animal cell cultivation*. NUS Press.
- ²²² Mishra, V., & Heath, R. J. (2021). Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8411.
- ²²³ Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.
- ²²⁴ Tancharoen, W., Aungsuchawan, S., Pothacharoen, P., Bumroongkit, K., Puaninta, C., Pangjaidee, N., ... & Thajamngong, C. (2019). Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*, 19(6), 5123-5132.
- ²²⁵ Kameda, M., Mikawa, T., Yokode, M., Inagaki, N., & Kondoh, H. (2021). Senescence research from historical theory to future clinical application. *Geriatrics & Gerontology International*, 21(2), 125-130.
- ²²⁶ Suchanek, J., Soukup, T., Visek, B., Ivancakova, R., Kucerova, L., & Mokry, J. (2009). Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 153(1).
- ²²⁷ Kraus, N. A., Ehebauer, F., Zapp, B., Rudolphi, B., Kraus, B. J., & Kraus, D. (2016). Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*, 5(4), 351-358.
- ²²⁸ Siriboon, C., Lin, Y. H., Kere, M., Chen, C. D., Chen, L. R., Chen, C. H., ... & Ju, J. C. (2015). Putative porcine embryonic stem cell lines derived from aggregated four-celled cloned embryos produced by oocyte bisection cloning. *PLoS one*, 10(2), e0118165.
- ²²⁹ Sukmawati, D., Junaidi, H., & Syaidah, R. (2021). Human platelet-rich plasma as a biological stimulant for proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomedicine*, 41(2), 168-173.

- ²³⁰ Palombella, Silvia, et al. "Systematic review and meta-analysis on the use of human platelet lysate for mesenchymal stem cell cultures: comparison with fetal bovine serum and considerations on the production protocol." *Stem cell research & therapy* 13.1 (2022): 1-31.
- ²³¹ Jin, R., Song, G., Chai, J., Gou, X., Yuan, G., & Chen, Z. (2018). Effects of concentrated growth factor on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418817505.
- ²³² Zhang, M., Jiang, F., Zhang, X., Wang, S., Jin, Y., Zhang, W., & Jiang, X. (2017). The effects of platelet-derived growth factor-BB on human dental pulp stem cells mediated dentin-pulp complex regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2126-2134.
- ²³³ Saeed, M. A., Abd El-Rahman, M., Helal, M. E., Zaher, A. R., & Grawish, M. E. (2017). Efficacy of human platelet rich fibrin exudate vs fetal bovine serum on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *International journal of stem cells*, 10(1), 38.
- ²³⁴ Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*, 83(1), 48-61
- ²³⁵ Cai, J., Olson, J. M., Rao, M. S., Stanley, M., Taylor, E., & Ni, H. T. (2005). Development of antibodies to human embryonic stem cell antigens. *BMC Developmental Biology*, 5(1), 1-7.
- ²³⁶ Sunartvanichkul, T., Arayapisit, T., Sangkhamanee, S. S., Chaweewannakorn, C., Iwasaki, K., Klaihmon, P., & Sritanaudomchai, H. (2023). Stem cell-derived exosomes from human exfoliated deciduous teeth promote angiogenesis in hyperglycemic-induced human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Applied Oral Science*, 31, e20220427.
- ²³⁷ Machado, E., Fernandes, M. H., & de Sousa Gomes, P. (2012). Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113(6), 728-733.208
- ²³⁸ Gandia, C., Arminan, A. N. A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., ... & SEPulveda, P. I. L. A. R. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells*, 26(3), 638-645.
- ²³⁹ Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9), 726-736.
- ²⁴⁰ Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H., ... & Choung, P. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue engineering*, 13(4), 767-773.
- ²⁴¹ Ueda, M., Fujisawa, T., Ono, M., Hara, E. S., Pham, H. T., Nakajima, R., ... & Kuboki, T. (2014). A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem cell research & therapy*, 5(1), 1-10.
- ²⁴² Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., d'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., ... & Papaccio, G. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17(3), 511-515.
- ²⁴³ Sousa, B. R., Parreira, R. C., Fonseca, E. A., Amaya, M. J., Tonelli, F. M., Lacerda, S. M., ... & Resende, R. R. (2014). Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*, 85(1), 43-77.
- ²⁴⁴ Wada, N., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2011). Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells. *Stem cells and development*, 20(4), 647-659.
- ²⁴⁵ Wada, N., Micanin, D., Shi, S., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2009). Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of cellular physiology*, 219(3), 667-676.
- ²⁴⁶ Rojewski, M. T., Weber, B. M., & Schrezenmeier, H. (2008). Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), 168-184.
- ²⁴⁷ De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., ... & Fraser, J. K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*, 89(2-3), 267-270.
- ²⁴⁸ Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., & Ginis, I. (2011). Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem cells and development*, 20(1), 53-66.
- ²⁴⁹ Wen, J., Li, H. T., Li, S. H., Li, X., & Duan, J. M. (2016). Investigation of modified platelet-rich plasma (mPRP) in promoting the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49.)
- ²⁵⁰ Malysheva, O. V., & Ordyan, N. E. (2022). Insulin-Like Growth Factor 2: New Roles for a Known Molecule. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 52(1), 175-182.
- ²⁵¹ Marín-Llera, J. C., & Chimal-Monroy, J. (2018). A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture. *Cell Biology International*, 42(5), 570-579.
- ²⁵² Jiao, F., Wang, J., Dong, Z. L., Wu, M. J., Zhao, T. B., Li, D. D., & Wang, X. (2012). Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 14(4), 324-333.
- ²⁵³ Lee, J. Y., Kang, M. H., Jang, J. E., Lee, J. E., Yang, Y., Choi, J. Y., ... & Park, S. G. (2022). Comparative analysis of mesenchymal stem cells cultivated in serum free media. *Scientific reports*, 12(1), 1-15.

- ²⁵⁴ Tsai, A. I., Hong, H. H., Lin, W. R., Fu, J. F., Chang, C. C., Wang, I., ... & Yen, T. H. (2017). Isolation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp. *BioMed Research International*, 2017.
- ²⁵⁵ Malek, A., & Bersinger, N. A. (2011). Human placental stem cells: biomedical potential and clinical relevance. *Journal of Stem Cells*, 6(2), 75.
- ²⁵⁶ Wu, G., & Schöler, H. R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*, 3(1), 1-10.
- ²⁵⁷ Ng, V. Y., Ang, S. N., Chan, J. X., & Choo, A. B. (2010). Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem cells*, 28(1), 29-35.
- ²⁵⁸ Tey, S. R., Mueller, M., Reilly, M., Switalski, C., Robertson, S., Sakanaka-Yokoyama, M., & Suzuki, M. (2022). Cell Surface Proteins for Enrichment and In Vitro Characterization of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Myogenic Progenitors. *Stem cells international*, 2022.
- ²⁵⁹ Aparicio, J. G., Hopp, H., Choi, A., Comar, J. M., Liao, V. C., Harutyunyan, N., & Lee, T. C. (2017). Temporal expression of CD184 (CXCR4) and CD171 (L1CAM) identifies distinct early developmental stages of human retinal ganglion cells in embryonic stem cell derived retina. *Experimental eye research*, 154, 177-189.
- ²⁶⁰ Sundberg, M., Jansson, L., Ketolainen, J., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Skottman, H., ... & Narkilahti, S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 2(2), 113-124.
- ²⁶¹ Mortada, I., Mortada, R., & Al Bazzal, M. (2017). Dental pulp stem cells and neurogenesis. *Stem Cells: Biology and Engineering*, 63-75.
- ²⁶² Ishizaka, R., Hayashi, Y., Iohara, K., Sugiyama, M., Murakami, M., Yamamoto, T., ... & Nakashima, M. (2013). Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*, 34(8), 1888-1897.
- ²⁶³ Motaln, H., Schichor, C., & Lah, T. T. (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 116(11), 2519-2530.
- ²⁶⁴ Yang, X., Li, L., Xiao, L., & Zhang, D. (2018). Recycle the dental fairy's package: overview of dental pulp stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 1-8.
- ²⁶⁵ Tonti, G. A., & Mannello, F. (2002). From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera?. *International Journal of Developmental Biology*, 52(8), 1023-1032.
- ²⁶⁶ Shafaei, H., Esfandiari, E., & Baghernezhad, H. (2017). Evaluation of morphology and immunophenotype of mesenchymal stem cells after switching of bovine serum of media to human serum. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(151), 105-113.
- ²⁶⁷ Strauer, B. E., & Kornowski, R. (2003). Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 107(7), 929-934.
- ²⁶⁸ Yamanaka, S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell stem cell*, 27(4), 523-531.
- ²⁶⁹ Segers, V. F., & Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, 451(7181), 937-942.
- ²⁷⁰ Mousaei Ghasroldasht, M., Seok, J., Park, H. S., Liakath Ali, F. B., & Al-Hendy, A. (2022). Stem cell therapy: From idea to clinical practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2850.
- ²⁷¹ Golchin, A., Seyedjafari, E., & Ardeshiryajimi, A. (2020). Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: present or future. *Stem cell reviews and reports*, 16, 427-433.
- ²⁷² Herberts, C. A., Kwa, M. S., & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of translational medicine*, 9(1), 1-14.
- ²⁷³ Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747-754.
- ²⁷⁴ Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., Bork, S., Walenda, T., Koch, C., ... & Wagner, W. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(7), 888-898.
- ²⁷⁵ Hemeda, H., Giebel, B., & Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2), 170-180.
- ²⁷⁶ Fernandez-Rebollo, E., Mentrup, B., Ebert, R., Franzen, J., Abagnale, G., Sieben, T., ... & Wagner, W. (2017). Human platelet lysate versus fetal calf serum: these supplements do not select for different mesenchymal stromal cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- ²⁷⁷ Anitua, E., Zalduendo, M., Troya, M., Alkhraisat, M. H., & Blanco-Antona, L. A. (2022). Platelet-rich plasma as an alternative to xenogeneic sera in cell-based therapies: A need for standardization. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6552.
- ²⁷⁸ Sheguti, T. M., & Santos, A. R. (2022). Platelet-rich plasma (PRP) as an alternative to fetal bovine serum (FBS) in the culture of mesenchymal stem cells in cell therapy. *J Stem Cell Res Ther*, 7(1), 26-28.
- ²⁷⁹ Ismail, A., & Praptiningsih, R. S. (2022). Combination of decidual dental stem cell and platelet rich plasma in fibroblast formation in the jawbone regeneration of Wistar rats. *ODONTO: Dental Journal*, 9, 155-161.
- ²⁸⁰ Hu, Z. B., Chen, H. C., Wei, B., Zhang, Z. M., Wu, S. K., Sun, J. C., & Xiang, M. (2022). Platelet rich plasma enhanced neuro-regeneration of human dental pulp stem cells in vitro and in rat spinal cord. *Annals of Translational Medicine*, 10(10).

- ²⁸¹ Madanagopal, T. T., Tai, Y. K., Lim, S. H., Fong, C. H., Cao, T., Rosa, V., & Franco-Obregón, A. (2021). Pulsed electromagnetic fields synergize with graphene to enhance dental pulp stem cell-derived neurogenesis by selectively targeting TRPC1 channels. *Eur Cell Mater*, *41*, 216-32.
- ²⁸² Li, X., Hou, J., Wu, B., Chen, T., & Luo, A. (2014). Effects of platelet-rich plasma and cell coculture on angiogenesis in human dental pulp stem cells and endothelial progenitor cells. *Journal of endodontics*, *40*(11), 1810-1814.