

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Jakub SUCHÁNEK

2011



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Stomatologie

KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY
DENTAL PULP STEM CELLS

MUDr. Jakub SUCHÁNEK

Školitel: MUDr. Romana Ivančaková, CSc.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

Je mou milou povinností poděkovat všem, kteří přispěli ke vzniku této práce.

Můj upřímný vděk patří doc. Věře Hubkové, CSc., za podporu v začátcích mého postgraduálního studia a doc. Radovanu Slezákovi, CSc., za pomoc s publikací dosažených výsledků.

Děkuji své školitelce MUDr. Romaně Ivančakové, CSc., a školiteli konzultantovi prof. MUDr. Jaroslavu Mokrému, Ph.D.

Jsem vděčný MUDr. Tomáši Soukupovi, vedoucímu Laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, za spolupráci, metodické vedení, trpělivé rady a v neposlední řadě za drahé přátelství.

Tato práce by nikdy nevznikla bez spolupráce a přátelství Heleny Rückerové, Benjamína Víška a Mgr. Lenky Brůčkové, za což jim velmi děkuji.

Tereze Kleplové, za lásku, péči a pomoc s grafickou úpravou této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK 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 v Praze.

V Hradci Králové, 10.12.2010

Abstrakt

Tématem této disertační práce je optimalizace vybavení zubní pulpy z *cavum pulpae*, izolace kmenových buněk zubní pulpy stálé dentice (KBZP) a standardizace kultivačních podmínek pro jejich dlouhodobou kultivaci. Postupy vyhodnocené jako optimální na liniích KBZP byly dále použity pro izolaci a kultivaci kmenových buněk zubní pulpy dočasné dentice (SHED). Dalším cílem bylo charakterizovat KBZP/SHED a ověřit schopnost těchto buněk diferencovat se v jiné buněčné linie (osteogenní, chondrogenní, adipogenní).

Porovnávali jsme postupy extrakce zubní pulpy a metody izolace KBZP. Ke kultivačním experimentům byla použita tři média s rozdílným množstvím fetálního telecího séra (FCS) ve snaze optimalizovat nejnižší hladinu tohoto xenogenního suplementu v médiu při zachování běžné proliferační aktivity a cytogenetické stability KBZP. Standardizované postupy a vybrané kultivační média byly použity také při izolaci a kultivaci kmenových buněk zubní pulpy z dočasných zubů (SHED). KBZP a SHED jsme charakterizovali pomocí základních biologických vlastností (morfologie, viabilita, velikost buněk, proliferační aktivita). Byl studován vliv jednotlivých médií na biologické vlastnosti (viz výše), fenotyp a stabilitu karyotypu KBZP po dosažení Hayflickova limitu.

Optimálním postupem extrakce zubní pulpy se ukázala být extrakce pomocí Luerových kleští, standardní metodou izolace KBZP z tkáně zubní pulpy jsme zvolili působení enzymatického koktejlu na rozstříhanou tkáň zubní pulpy. Kultivační médium s 2 % FCS obohacené o ITS suplement bylo vybráno jako standardní, proto bylo užito i při kultivaci SHED. KBZP/SHED jsou vysoce proliferačně aktivními buněčnými liniemi, které jsme byli schopni kultivovat přes Hayflickův limit při zachování cytogenetické stability. Z fenotypu se dá usuzovat, že KBZP jsou mezenchymálního původu, nesou znaky typické pro velmi málo diferencované buňky a nejsou příbuzné s hematopoetickou řadou. SHED jsou v porovnání s KBZP méně diferencované, vykazují zvýšenou pozitivitu CD 105, znaku běžně exprimovaného endoteliálními buňkami.

Klíčová slova

Kmenové buňky zubní pulpy, exfoliovaný dočasný zub, Hayflickův limit, izolace, kultivace, analýza fenotypu

Abstract

The aim of this dissertation study was to optimize the isolation and long term cultivation protocols for human dental pulp stem cells. The protocols which showed best results were used for cultivation of dental pulp stem cell isolated from exfoliated teeth (SHED). Additional aims were to characterize DPSC and SHED and prove their ability to proliferate over Hayflick's limit and differentiate into mature cell lines (osteoblasts, chondroblasts and adipocytes).

In order to find optimal protocols for isolation of dental pulp from tooth, we tried three different approaches. During optimization of cultivation protocol we focused on decreasing amount of fetal calf serum (FCS) from 10 % FCS in cultivation media (most often used in literature) into 2 % and thus get closer to cultivation conditions suitable for clinical usage. We compared DPSC cultivated in three different media (medium with 10 % FCS, 2 % FCS supplemented with growth factors and media with 2 % FCS supplemented with ITS and growth factors). For characterization of DPSC and SHED we used basic biological properties (proliferation activity, viability, morphology), their phenotype and karyotype.

The study demonstrated that the best protocol for isolation of dental pulp from tooth was to break the roots and extract the pulp through this aperture. We found that enzymatic dissociation was the most successful for isolation of DPSC from dental pulp. We were able to cultivate DPSC in all three tested media, but DPSC in medium containing 2 % FCS and supplemented with ITS showed the highest proliferation rate and kept other biological properties on the same levels as DPSC cultivated in other tested media. We were able to proliferate DPSC over Hayflick's limit and differentiate them into osteoblasts and chondroblasts-like cells. The phenotypical analysis showed that DPSC express surface markers typical for mesenchymal cells and some markers of stem cells, on the other hand they did not express any markers typical for hematopoietic cell line.

Key word

Dental pulp stem cells, exfoliated teeth, Hayflick's limit, isolation, cultivation, phenotypical analysis

Obsah

1. Úvod a současný stav sledované problematiky	1
1.1 Kmenové buňky	1
1.1.1 Embryonální kmenové buňky (ES)	1
1.1.2 Mezenchymové kmenové buňky (MKB)	2
1.2 Srovnání ES, MKB a somatických buněk	3
1.3 Kmenové buňky zubní pulpy dočasného a stálého zubu	3
1.4 Budoucnost užití KBZP/SHED v buněčné terapii	5
1.5 Centrum pro odběr, izolaci, kultivaci a dlouhodobé uchování KBZP/SHED	7
2. Histologická stavba zubní pulpy a tvrdých zubních tkání, odontogeneze	8
2.1 Tvrdé zubní tkáně	8
2.1.1 Sklovina	8
2.1.2 Dentin	10
2.1.3 Cement	12
2.1.4 Regenerace tvrdých zubních tkání	12
2.2 Zubní pulpa	13
2.3 Vývoj zubu a zubní pulpy	15
3. Cíle práce	18
3.1 Dárci zubní dřevě	18
3.2 Izolace zubní dřevě z <i>cavum pulpae</i>	18
3.3 Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy	18
3.4 Kultivační podmínky KBZP a SHED	19
3.5 Charakterizace KBZP a SHED	19
3.6 Diferenciace KBZP a SHED	19
3.7 Měření délky telomer	20
3.8 Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP	20

4. Materiál a metodika	21
4.1 Dárci zubní dřevě	21
4.1.1 Rozdělení dárců podle extrahovaných zubů	21
4.2 Izolace zubní dřevě z <i>cavum pulpae</i>	21
4.2.1 Odběr zubu a transport do laboratoře tkáňových kultur	21
4.2.2 Izolace zubní dřevě z <i>cavum pulpae</i>	22
4.2.2.1 Stálé zuby s nedokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v pokročilé fázi resorpce kořene	22
4.2.2.2 Stálé zuby s dokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v počáteční fázi resorpce kořene	24
4.2.2.2.1 Izolace ZP pomocí diamantového kotouče, nebo Battova vrtáku	24
4.2.2.2.2 Izolace ZP pomocí Luerových kleští	25
4.3 Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy	26
4.3.1 Izolace KBZP z SO a PV kompartmentu ZP	26
4.3.2 Izolace směsné linie KBZP a SHED	26
4.4 Kultivační podmínky pro KBZP a SHED	27
4.5 Charakterizace KBZP a SHED	29
4.5.1 Stanovení základních biologických vlastností	29
4.5.2 Analýza fenotypu	30
4.5.3 Imunocytochemie	31
4.5.4 Karyotyp	31
4.5.5 Analýza buněčného cyklu	31
4.6 Diferenciace KBZP a SHED	32
4.6.1 Osteogenní diferenciace	32
4.6.2 Chondrogenní diferenciace	33
4.6.3 Adipogenní diferenciace	33

4.6.4	Histologické zpracování vzorku	33
4.7	Měření délky telomer KBZP	34
4.8	Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP	34
5.	Výsledky	35
5.1	Dárci zubní dřeně	36
5.1.1	Spektrum dárců	36
5.2	Izolace zubní dřeně z <i>cavum pulpae</i>	37
5.2.1	Stálé zuby s nedokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v pokročilé fázi resorpce kořene	37
5.2.2	Stálé zuby s dokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v počáteční fázi resorpce kořene	38
5.2.2.1	Izolace ZP pomocí diamantového kotouče, nebo Battova vrtáku	38
5.2.2.2	Izolace ZP pomocí Luerových kleští	38
5.3	Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy	38
5.3.1	Izolace KBZP z SO a PV kompartmentu ZP	38
5.3.2	Izolace směsné linie KBZP a SHED	39
5.4	Kultivační podmínky pro KBZP a SHED	39
5.4.1	Kultivace KBZP	39
5.4.1.1	Kultivace KBZP v médiu s 2 % FCS	42
5.4.1.2	Kultivace KBZP v médiu s 10 % FCS	43
5.4.1.3	Kultivace KBZP v médiu s 2 % FCS + ITS	44
5.4.1.4	Kultivace KBZP z SO a PV kompartmentu	45
5.4.1.5	Porovnání kultivačních médií pro KBZP s 2 % FCS, 10 % FCS a 2 % FCS + ITS	46
5.4.2	Kultivace SHED	47
5.4.3	Porovnání KBZP a SHED v kultivačním médiu s 2 % FCS + ITS	49
5.5	Charakterizace KBZP a SHED	51

5.5.1	Analýza fenotypu KBZP a SHED	51
5.5.1.1	Analýza fenotypu KBZP z SO a PV kompartmentu ZP	51
5.5.1.2	Analýza fenotypu směsné linie KBZP v testovaných médiích	52
5.5.1.3	Analýza fenotypu SHED	53
5.5.2	Imunocytochemie	53
5.5.2.1	Imunocytochemie KBZP	53
5.5.2.2	Imunocytochemie SHED	55
5.5.3	Karyotyp KBZP a SHED	57
5.5.4	Analýza buněčného cyklu KBZP a SHED	57
5.6	Diferenciace KBZP a SHED	59
5.6.1	Osteogenní diferenciace	59
5.6.2	Chondrogenní diferenciace	60
5.6.3	Adipogenní diferenciace	61
5.7	Měření délky telomer KBZP	61
5.8	Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP	62
6.	Diskuze	65
7.	Závěr	72
8.	Použitá literatura	74
9.	Přílohy	80
9.1	Řešené granty věnované problematice KBZP a SHED	80
9.1.1	Hlavní řešitel	80
9.1.2	Spoluřešitel	80
9.2	Publikační aktivita	80
9.2.1	Hlavní autor	80
9.2.2	Spoluautor	80
9.3	Ústní sdělení	81

9.4 Postery	82
9.5 Souhlas etické komise s výzkumem	84
9.6 Informovaný souhlas pro pacienty	85
9.6.1 Informace pro pacienty (varianta pro pacientky)	85
9.6.2 Informovaný souhlas (varianta pro pacientky)	86
9.7 SOP – izolace, kultivace KBZP/SHED	87
9.7.1 SOP 1 – izolace zubní pulpy	87
9.7.2 SOP 2 – izolace kmenových buněk zubní pulpy (KBZP, SHED)	89
9.7.3 SOP 3 – kultivace KBZP a SHED.	91
9.8 SOP – diferenciací	94
9.8.1 SOP 4.1 – osteogenní diferenciací KBZP/SHED <i>in vitro</i>	94
9.8.2 SOP 4.2 – chondrogenní diferenciací KBZP/SHED <i>in vitro</i>	96
9.8.3 SOP 4.3 – adipogenní diferenciací KBZP/SHED <i>in vitro</i>	98
9.9 Porovnání CD znaků KBZP a SHED v jednotlivých médiích	99

Seznam zkratek

α -MEM	Eaglovo minimální esenciální médium v α modifikaci
AMFO	amfotericin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo médium
DPSC	<i>dental pulp stem cells</i>
DT	<i>doubling time</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	endoteliální růstový faktor
ES	embryonální kmenové buňky
FCS	fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GEN	gentamycin
HBSS	Hankův balancovaný solný roztok
HE	hematoxylin-eosin
ITS	<i>insulin transferin sodium selenite supplement</i>
KB	kmenové buňky
KBZP	kmenové buňky zubní pulpy
KBZP/ SHED	kmenové buňky izolované ze zubní pulpy dočasných, nebo stálých zubů
LFUK HK	Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
MKB	mezenchymové kmenové buňky
MKB-like	kmenové buňky mezenchymovým podobné
MPB	mezenchymová progenitorová buňka
PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosfáty
PD	populační zdvojení
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PEf	<i>plating efficiency</i>
PNC/STM	penicilin/streptomycin
PV	perivaskulární
SHED	KB z lidských exfoliovaných zubů
SO	subodontoblastický
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β1</i>
TZT	tvrdé zubní tkáň
ZP	zubní pulpa
2 % FCS + ITS	kultivační médium obsahující 2 % FCS obohacené o ITS suplement

1. Úvod a současný stav sledované problematiky

1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (KB) se zakládají ve vznikajícím organismu jako jedny z prvních buněčných populací. Jejich hlavní úlohou je produkce specializovaných buněčných typů při současném zachování nezměněné populace KB v průběhu celého života. Zatímco během vývoje organismu vytvářejí základ jednotlivých orgánů, v dospělosti slouží k udržení homeostázy tkání a jejich reparaci v případě poškození. Z tohoto důvodu jsou KB obdařeny výjimečnými biologickými vlastnostmi - schopností asymetrického dělení (1), které zamezuje vyčerpání KB v organismu, a schopností se diferencovat ve zralé buněčné elementy. KB mají nižší hladinu reaktivních molekul kyslíku než buňky somatické (2) a navíc obsahují specifické detoxikační proteiny (3), které je chrání před škodlivými vlivy prostředí. V neposlední řadě disponují schopností neomezené proliferace při současném zachování původní buněčné linie. Tyto vlastnosti KB odlišují od všech ostatních buněk organismu. Mikroprostředí (tzv. niche), v němž jsou KB uchovávány, se s vyžíváním organismu mění, a proto se obměňují i vlastnosti samotných KB (adultní vs. embryonální KB). Nové poznatky o chování embryonálních kmenových buněk (ES), primordiálních zárodečných (prvopohlavních) buněk, fetálních a adultních tkáňově specifických KB, jakož i možnosti jejich izolace, separace, aktivace, *ex vivo* expanze, reprogramování, včetně možností regulace vyžívání potomstva těchto buněk v přesně vymezené buněčné typy, činí z KB velice perspektivní nástroj pro terapii afekcí postihujících nejrůznější tkáně či orgány, ať již stimulací endogenní reparační, nebo transplantací KB.

1.1.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky jsou totipotentní kmenové buňky získané z buněk blastocysty (4). Tyto buňky disponují neomezeným proliferačním potenciálem a schopností diferencovat v jakýkoliv buněčný typ nacházející se v dospělém organismu (endodermálního, ektodermálního a mezodermálního původu) (5). První linie ES byly izolovány z myších embryí v roce 1981 (6). Stejný tým prokázal schopnost ES proliferovat v *in vitro* podmínkách. Lidské ES byly poprvé izolovány v roce 1998 (7). Izolace lidských ES a jejich užití jako prostředku buněčné terapie naráží na etické a právní problémy, které vedou k omezení výzkumu těchto buněk.

1.1.2 Mezenchymové kmenové buňky

Mezenchymové kmenové buňky (MKB) jsou vzácné buněčné elementy vyskytující se ve většině tkání, např. v kostní dřeni, v níž jsou zodpovědné za vytvoření a udržení struktury stromatu, s frekvencí zhruba 2-5 na 1 milion jaderných buněk (8, 9, 10). Obecně lze výskyt MKB předpokládat ve většině tkání a orgánů. Mezenchymové kmenové buňky či kmenové buňky mezenchymovým podobné (MKB-like) byly v lidském organismu identifikovány např. v tukové tkáni (11), amniové tekutině (12), fetálních tkáních a orgánech (13), periostu (14), periodontálních ligamentech (15) a také v zubní pulpě (ZP) stálých i dočasných zubů (16, 17, 18, 19).

MKB jsou v současné době intenzivně studovány pro svou schopnost podpory krvetvorby, modulace imunitních funkcí a diferenciaci směrem ke specializovaným tkáním (kost, chrupavka, šlacha, srdeční sval aj.). Disponují značným proliferačním (20) a diferenciacním potenciálem (21, 22). Tyto buňky jsou schopné diferenciaci jak *in vitro* (po poskytnutí diferenciacních podnětů), tak *in vivo* při přenesení do permisivního prostředí (19). Nedávno publikovaná studie Yasuaki a spol. rozšiřuje možnosti využití MKB. Retrovirovou transdukcí byly do MKB zavedeny OCT3/4, Sox-2 a KLF4, což vedlo k indukci pluripotentních buněk, které v mnoha směrech, včetně jejich morfologie, připomínají ES (23). MKB se nabízejí pro potenciální široké klinické využití (buněčná terapie), laboratorní modelování a laboratorní testování.

MKB a MKB-like buňky ze solidních tkání, či orgánů jsou nejčastěji izolovány procesem enzymatické disociace - běžně směsí kolagenázy typu I a dispázy (15, 16, 17, 18). V některých vědeckých publikacích se můžeme setkat též s metodou mechanické disociace (24), nebo spontánní migrace buněk ze vzorku tkáně na dno kultivační nádoby (25). Vzniklá suspenze buněk je následně filtrací zbavena nedisociovaných částí tkáně (např. cév), buňky jsou propláchnuty fyziologickým roztokem pufrovaným fosfáty (PBS), následně centrifugovány a resuspendovány v kultivačním médiu různého složení (většina protokolů používá zavedené médium s 10 % FCS) (15, 16, 17, 18).

1.2 Srovnání ES, MKB a somatických buněk

Lidské tělo obsahuje více než 220 buněčných typů. Jedná se většinou o plně diferencované somatické buňky, které mají výrazně omezenou schopnost proliferace. Díky své specializaci jsou tyto buňky pro fungování organismu nepostradatelné. Kvůli jejich omezené proliferační aktivitě jsou ve většině tkání uchovávány multipotentní kmenové buňky. Tyto kmenové buňky nejsou schopné diferenciaci v jakýkoliv buněčný typ, ale pouze v buňky tkání pocházejících ze stejných embryonálních listů. V lidském organismu jsou pouze ES buňky tzv. totipotentní, tedy schopné diferencovat v jakoukoliv buněčnou linii. Na druhou stranu využití ES buněk s sebou nese zásadní problémy v otázce histokompatibility (buněk dárce s buňkami příjemce), etických a právních norem. Hlavně z těchto důvodů se výzkum zaměřuje právě na kmenové buňky izolované z tkání dospělého organismu. Mezi ně patří i mezenchymové kmenové buňky. MKB jsou, i přes omezený diferenciací potenciál, schopny maturovat v širokou škálu buněčných typů. Což, v případě, že tyto buňky budeme schopni využít terapeuticky, skýtá i rozsáhlé spektrum potenciálních klinických aplikací v léčbě degenerativních onemocnění, posttraumatických stavů a autoimunitních nemocí. Průkazem, že testovaná linie je linií ES, nebo KB je, mimo schopnosti diferencovat ve více buněčných typů, schopnost neomezené proliferace. Tato esenciální vlastnost je dána přítomností telomerázy – enzymu reverzní transkriptázy, který je schopen prodlužovat telomery (opakující se sekvenci DNA bazí, konkrétně v případě lidských telomer TTAGGG, na konci eukaryotních chromozomů), čímž brání degeneraci chromozomů (26). Degenerace chromozomů je základem procesu stárnutí somatických eukaryotních buněk, které má za následek neschopnost buňky dále syntetizovat DNA a postupnou senescenci (27).

1.3 Kmenové buňky zubní pulpy dočasného a stálého zubu

Lidské MKB, jejichž izolaci a *ex vivo* expanzi se věnujeme v Laboratoři tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, byly izolovány i ze ZP. Tyto buňky byly popisně označeny jako kmenové buňky zubní pulpy (KBZP). Poprvé byly izolovány, kultivovány a obecně charakterizovány vědeckým týmem Gronthos a spol. (16). Další práce (17, 28, 29, 30, 31) dokládají schopnost sebeobnovy KBZP, diferenciaci ve zralé buněčné typy, regenerace mikroprostředí zubní pulpy a vysoký

proliferační potenciál. Stejní autoři také diskutují distribuci KBZP uvnitř zubní pulpy a zaměřují se především na srovnání perivaskulárního niché KB z kostní dřevě a ZP. Kromě toho v roce 2003 Miura a spol. izolovali kmenové buňky z lidských exfoliovaných zubů (SHED) (19). Během jejich experimentů byly tyto buňky schopné po transplantaci vytvořit významné množství kosti *in vivo*. Zubní dřevě z exfoliovaných zubů byla díky této práci shledána jako alternativní zdroj postnatálních kmenových buněk (19, 32).

Důležité je si uvědomit, že linie KBZP i SHED jsou izolovány z tkáně, která je získána v rámci jiného léčebného zákroku. Pro izolaci KBZP ze ZP jsou nejčastěji využívány třetí moláry. Třetí moláry jsou posledními zuby prořezávajícími do dutiny ústní. Jsou to také zuby s nejvariabilnější erupcí, tvarem i postavením v okluzi, vztahu k okolním zubům a anatomickým strukturám. Prořezávání obvykle začíná okolo 14. roku, do svého individuálního anatomického postavení však dorůstají až do 30. roku. Tento časový interval je abnormálně dlouhý v porovnání s ostatními zuby. Děje se tomu tak proto, že umístění zárodků těchto zubů na konci dentální lišty často neumožňuje třetím molárům prořezat do správného postavení.

Evolučním vývojem splanchnokrania (především vlivem změny složení stravy - začleněním masa a tepelnou úpravou pokrmů), dochází k postupnému zmenšování čelistí a redukci zubních oblouků. Mezi zuby nejčastěji postižené anodoncií patří třetí moláry. Pokud vezmeme v úvahu zmenšení čelistí a skutečnost, že tzv. „zuby moudrosti“ erupují jako poslední, nutně dojdeme k závěru, že se prostor jim vymezený změnil. Takto modifikované anatomické poměry v dutině ústní třetím molárům málokdy umožní plné prořezání. To je důvodem častého výskytu tzv. retencí, či semiretencí třetích molárů v kosti, či pod sliznicí, kdy během erupce prořeže pouze část zubu.

S výhodou extrahujeme třetí moláry v adolescentním věku, kdy často pozorujeme rychlé a nekomplikované zhojení. Velkou výhodou je rovněž nízká morbidita pacientů v tomto věku. O ideálním čase k extrakci retinovaných zubů moudrosti se vedou spory, všichni odborníci se ale shodují, že se tak má stát před dokončením vývoje kořene, tedy mezi 14. – 18. rokem života.

Indikace extrakce třetích molárů jsou tyto: 1. ohrožují-li při svém růstu, prořezávání a ektopickým postavením sousední zuby (resorpce kořene, zubní kaz, poškození závěsného aparátu druhého moláru), 2. opakovaný výskyt perikoronitidy (záněty měkkých tkání v okolí obtížně prořezávající korunky zubu), odkud se infekce šíří do okolních prostor za vzniku kolemčelistních zánětů. Extrakce se z této indikace provádí až po odeznění zánětu. 3. dojde-li k cystické degeneraci, či nádorovému zvratu tkáně folikulárního vaku, 4. retence zubu pod zubní náhradou, kdy díky útlaku a resorpci okolní kosti v „bezzubém úseku“ čelisti dochází ke zdánlivému pozdnímu prořezávání retinovaného zubu, zhmoždění sliznice nad „prořezávajícím“ zubem, ulceracím a možnému vzniku infekcí (extrakce těchto zubů provází obtížné a dlouhé hojení), 5. bolest v retromolárním prostoru po vyloučení jiných možných příčin, tlak na n. mandibularis, onemocnění dřeně, nebo parodontu semiretinovaných třetích molárů, 6. extrakce retinovaného zubu z lomné linie při fraktuře dolní čelisti, 7. ortodontická indikace (extrakce zubního zárodku u některých typů mesiookluzí, po ukončení ortodontické léčby jako prevence stěsnání ve frontálním úseku), 8. vyloučení metastatického rozsevu odontogenní infekce před náhradou srdečních chlopní, transplantacemi orgánů a kostní dřeně a radioterapií v oblasti hlavy a krku (33), 9. pokročilá parodontitida a za 10. zubní kaz a jeho komplikace. Ztráta třetích molárů nečiní pacientovi (dárci) žádné obtíže.

Linie SHED s výhodou izolujeme z fyziologicky odloučené tkáně exfoliovaného zubu, tedy bez jakéhokoliv poškození a bolesti.

Obměna dočasného chrupu ve stálou dentici je velmi unikátním a dynamickým procesem. Vývoj a erupce stálých zubů jsou pečlivě koordinovány s resorpcí kořenů dočasných zubů. Tento proces začíná v 6 letech dítěte a pomalu ustává po 12. roce věku. Během tohoto období by mělo být všech 20 dočasných zubů nahrazeno zuby stálými.

1.4. Budoucnost užití KBZP/SHED v buněčné terapii

Zvýšený zájem o problematiku KB, a to zejména v posledních deseti letech, si vyžádal uspořádání mnoha monotematicky zaměřených mezinárodních konferencí a postgraduálních kurzů. Informace o výzkumu KB se stále častěji objevují nejen v nejrůznějších odborných periodících, ale také v populárně naučných pořadech, stejně jako plní titulní strany novin po celém světě.

Ve světové literatuře přibývá zpráv o tom, že nejperspektivnějším typem buněk pro regenerativní medicínu jsou právě MKB, které jsou schopné generovat celé spektrum buněk mezenchymového původu (34, 35, 36). Navíc jsou některé MKB, mezi něž patří KBZP a SHED, schopné konverze i v elementy odlišných zárodečných listů (v rámci tzv. plasticity KB) – nervové buňky (37, 38) atd. Takový terapeutický potenciál lze očekávat pouze od lidských embryonálních kmenových buněk, které však nesplňují podmínku histokompatibility s tkáněmi příjemce.

Výzkum ZP ukázal unikátní histologickou podobnost s embryonální tkání pupečníku. Zubní dřeň je díky tvrdým zubním tkáním (TZT) uchována v dobře ohraničeném prostoru *cavum pulpa* a zachovává si tak výjimečnou stavbu. Vzhledem ke specifickému niché (18), které zubní pulpa představuje a k výše uvedené podobnosti s embryonálním mezenchymem, předpokládáme, že tyto kmenové buňky izolované ze zubní pulpy stálých, nebo dočasných zubů (KBZP/SHED) sdílejí mnohé vlastnosti s primitivními kmenovými buňkami. Proto by izolace populace multipotentních kmenových buněk z pulpy exfoliovaných dočasných zubů, stálých zubů (především retinovaných 3. molárů a zubů extrahovaných z ortodontické indikace) mohla nabídnout jedinečný zdroj (autogenních) kmenových buněk pro potenciální klinické aplikace.

V současné době terapeutickému využití kmenových buněk brání použití xenogenních suplementů při kultivaci. Klasickým prostředím pro pěstování MKB je Dulbecem modifikované Eaglovo médium (DMEM), či Eaglovo minimálně esenciální médium v alfa modifikaci (α -MEM) s 10-20 % fetálním telecím sérem (FCS) (39). Ani DMEM, ani α -MEM nejsou t. č. schváleny pro klinické použití a též použití zvířecího séra je v současné době považováno za velmi problematické vzhledem k možnosti přenosu zoonóz (např. bovinní spongiformní encefalopatie) a vzniku prudkých alergických (anafylaktických) reakcí na zvířecí bílkovinu, zejména pokud by byly buňky u téhož pacienta transplantovány opakovaně (40). Proto jsme se rozhodli soustředit se na snížení obsahu FCS v kultivačním médiu a na jeho nahrazení jinými suplementy.

1.5 Centrum pro odběr, izolaci, kultivaci a dlouhodobé uchování KBZP/SHED

Laboratoř tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové se věnuje izolaci KBZP od roku 2004, na konci roku 2009 byly do experimentů zařazeny i SHED. Současně s touto buněčnou linií kultivujeme kmenové buňky izolované z kostní dřeně. V současné době spolupracujeme s několika zahraničními laboratořemi na projektu PurStem (FP7, www.purstem.eu), jehož cílem je vytvoření kultivačního média splňující podmínky pro klinické aplikace kmenových buněk. V případě, že bude toto médium vytvořeno, mohlo by dojít ve spolupráci Ústavu histologie a embryologie Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Stomatologické kliniky Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové a Tkáňovou ústřednou Fakultní nemocnice Hradec Králové k vytvoření Centra pro odběr, izolaci, kultivaci a dlouhodobé uchování KBZP/SHED (41).

2. Histologická stavba zubní pulpy a tvrdých zubních tkání, odontogeneze

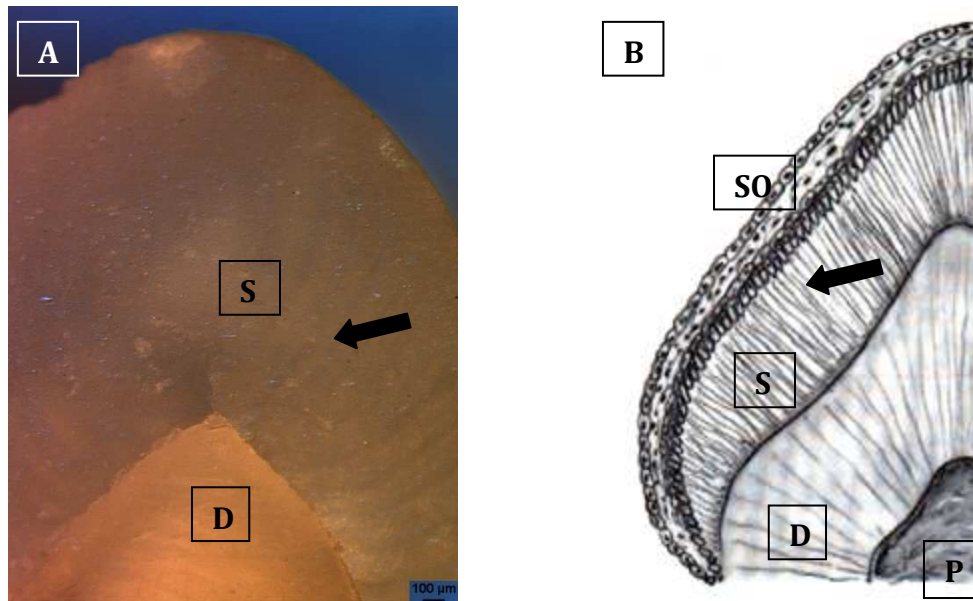
2.1 Tvrdé zubní tkáně

Zub se skládá ze skloviny, dentinu a cementu. Tyto tkáně se od sebe liší strukturou, vlastnostmi i embryonálním původem.

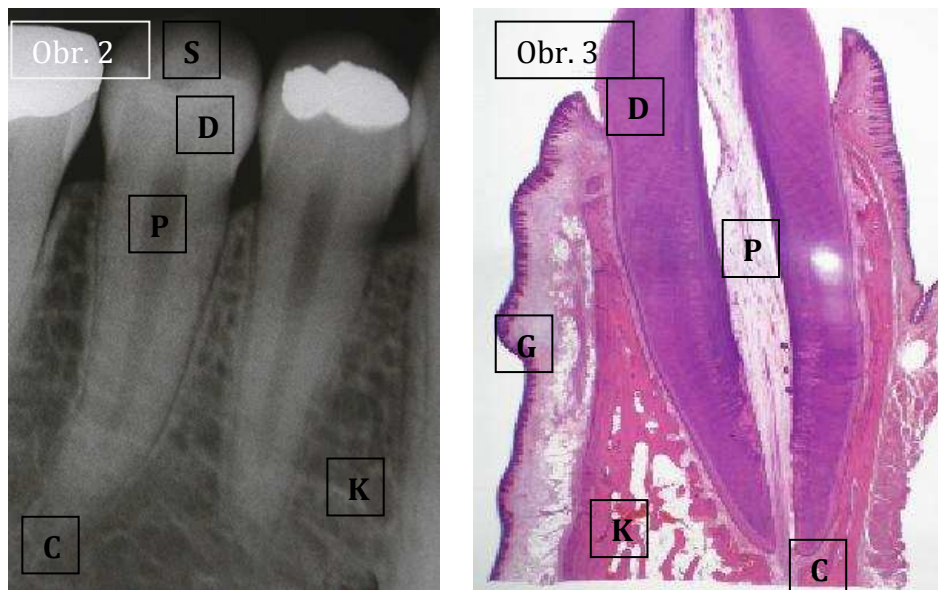
2.1.1. Sklovina

Sklovina je nejtvrdší tkáň v lidském těle, která zub chrání a zároveň mu umožňuje odolávat žvýkacím silám. Není inervována, a proto při poškození nebolí. Z 96 % je tvořena anorganickými krystaly (převážně fluorohydroxyapatitu), 1-2 % připadají na organické látky (hlavně bílkoviny enamelin, amelogenin a keratin), zbývající 2-3 % představuje voda. Sklovina se vzhledem ke své struktuře dělí na prizmatickou, aprizmatickou a interprizmatickou.

Prizmatická sklovina je nebuněčná substance tvořená krystaly hydroxyapatitu, které jsou produkovány ameloblasty, buňkami ektodermálního původu. Tyto krystaly tvoří tzv. prizmata. Prizmata jsou struktury tvaru hranolu, které odstupují kolmo k povrchu dentinu, ve střední třetině se spirálně stáčíjí a končí opět kolmo k povrchu zubu. Toto zakřivení významně ovlivňuje pevnost skloviny. Každé sklovinné prizma je tvořeno jedním ameloblastem, který po ukončení produkce skloviny degeneruje; obnova ztracené skloviny proto není možná. Vždy čtyři sousední ameloblasty se podílejí na produkci interprizmatické skloviny (vyšší podíl organické složky), která vyplňuje prostor mezi jednotlivými prizmaty (Obr. 1) a vytváří tak mezi nimi tmel. Jako poslední produkt ameloblastů vzniká sklovina aprizmatická, v níž jsou k sobě vzájemně paralelní krystaly hydroxyapatitu přikládány kolmo na sklovinu prizmatickou. Díky tomuto ději je na konci období produkce skloviny uzavřen vchod do interprizmatických prostor velmi tvrdou hmotou, která je více mineralizovaná než sama sklovina prizmatická.



Obr. 1: Výbrus korunky zubu v polarizovaném světle (A) a náčrt vyvíjejícího se zubu (v poslední fázi amelogeneze) (B), jehož korunka je ještě kryta redukováným sklovinným epitelem (residuum orgánu skloviny) (SO). S – sklovina, D – dentin, P – pulpa, šipky – Retziusovy linie (mineralizační růstové linie) ve sklovině. (A – Mazurová Y., Úst. histologie a embryologie, UK v Praze, LF v Hradci Králové; B – Bath-Balogh M., Fehrenbach M. J., 1997)



Obr. 2: Periapikální rentgenový snímek zubů 44 a 45. P - dřevná dutina, D - dentin, C - cement, K - alveolární kost, S – sklovina. Archiv Stomatologické kliniky FNHK.

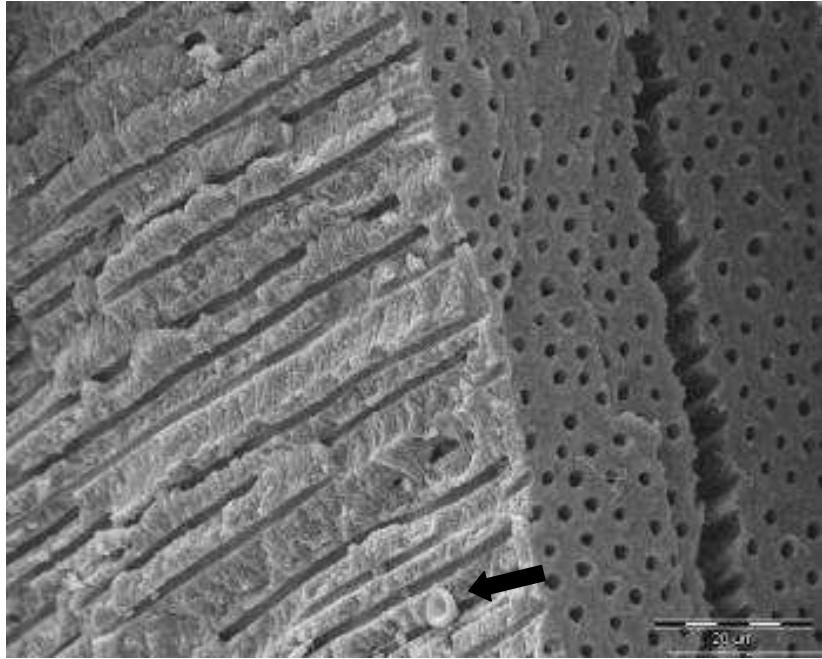
Obr. 3: Preparát kořene zubu a závěsného aparátu. P - zubní pulpa, D - dentin, C - cement, K - alveolární kost, G - gingiva. Barvení Hematoxylin-eosin (HE). Převzato z http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_1/maatlas.html.

2.1.2. Dentin

Dentin tvoří pružné jádro korunky i kořene zubu. Oproti sklovině je méně mineralizován; obsahuje 75 % anorganické substance, 20 % organické substance (především kolagen typu I a III) a 5 % vody. Tato tkáň mezenchymového původu je tvořena odontoblasty, buňkami odvozenými z crista neuralis, které během odontogeneze migrují do zárodku zubní pulpy, kde před sebe produkují predentin, který následně mineralizuje. Odontoblasty jsou uloženy v odontogenní zóně, tj. na hranici dentinu a pulpy. Odontoblasty jsou zásobovány pulpární subodontoblastickou kapilární pletení a inervovány subodontoblastickou nervovou pletení.

Dentin je v celé tloušťce prostoupen dentinovými tubuly. Jedná se o systém kanálků vyplněných ultrafiltrátem krevní plazmy (Obr. 4). Na dentino-pulpálním rozmezí a v dentinových tubulech nalézáme tzv. Tomesova vlákna, dlouhé výběžky odontoblastů provázené nemyelinizovanými nervovými zakončeními (Obr. 5).

Rozlišujeme tři základní druhy dentinu. Dentin primární vzniká v průběhu vývoje zubu rychlým přirůstáním (přibližně 4 μm za den), dentinové tubuly mají plynulý průběh od dentinosklovinné hranice až k pulpě. Sekundární dentin se tvoří po ukončení vývoje kořene, během období funkce, kdy se dřevná dutina pomalu zmenšuje. Ukládání transparentního dentinu je fyziologický jev, při kterém dochází k uzavírání dentinových tubulů přirůstajícím intertubulárním dentinem. Odontoblastům podobné buňky mezenchymového původu produkují terciární dentin jako odpověď na lokální dráždění, tím mění geometrii dřevné dutiny. Dentin, který má vlivem přirůstání intertubulární matrix obliterované tubuly jako následek věkových změn, nazýváme dentin transparentní, jako následek chronického dráždění dentin sklerotický.



Obr. 4: Struktura dentinu s dentinovými tubuly a jejich vyústěním na povrch dentinu. Šipka označuje erytrocyt. Elektronový mikroskop, původní zvětšení 150x. Převzato z www.bleaching-dental.com/img/news/5.jpg.



Obr. 5: Dentino-pulpální hranice. D - dentin, P - predentin, O - vrstva odontoblastů. Do dentinových tubulů pronikají Tomesova vlákna. Barvení HE, původní zvětšení 150x.

2.1.3 Cement

Tato tvrdá zubní tkáň pokrývající kořen zubu se svojí strukturou podobá primární kosti. Cement tvoří z 65 % anorganické látky, 23 % představuje organická komponenta a zbylých 12 % celkové hmotnosti připadá na vodu. Anorganická část se skládá z vápníku a fosforečných iontů ve formě apatitových krystalů, organická komponenta je převážně kolagenního původu. Stejně jako sklovina není tato tvrdá zubní tkáň inervována a je tedy nebolestivá.

Zubní cement je důležitou součástí závěsného aparátu, protože se do něj upínají Sharpeyova vlákna, která takto uchycují zub k alveolární kosti a umožňují pružné dentoalveolární spojení (Obr. 2, 3). Nejsilnější vrstva cementu pokrývá apex kořene (200 μm), naopak nejtenčí nalézáme v oblasti krčku (15 μm). Rozeznáváme dva typy cementu, acelulární (primární) a celulární (sekundární) cement. Acelulární cement vznikající během vývoje zubu vytváří kalcifikovanou homogenní nebuněčnou strukturu na povrchu koronárních dvě třetiny kořene; cementoblasty tak zůstávají na zevním povrchu cementové vrstvy, kolagenní vlákna probíhající kolmo k povrchu kořene a fixují zub v alveolu. Celulární cement, přirůstající během období funkce zubu, pokrývá hrot kořene silnou vrstvou; zde se také cementoblasty vyskytují na zevním povrchu. Vzhledem k rychlé apozici celulárního cementu jsou cementoblasty zality do matrix. Tímto dochází k maturaci cementoblastů v cementocyty a ukončení produkce cementu. Cementocyty jsou uloženy v lakunách a jejich výběžky ve vzájemně propojených kanálcích, které směřují k povrchu zubu a tím umožňují transport látek z periodontia a výživu této avaskulární struktury. Kolagenní vlákna probíhají rovnoběžně s povrchem zubu a na fixaci zubu v alveolu se nepodílejí.

Cement je nepravidelně produkován po celý život. Vlivem tlaku a tahu dochází k přestavbě cementové vrstvy, k její fyziologické resorpci a apozici. Toto nestejněměrné ukládání cementu dokládá průběh inkrementálních Salterových linií.

2.1.4 Regenerace tvrdých zubních tkání

Struktura zubu, díky jedinečné kombinaci vlastností skloviny a dentinu, zajišťuje pevnost a zároveň jistou míru pružnosti. I přes tyto vlastnosti je zubní tkáň často poškozena, ať už působením síly (trauma), nebo chronickým působením zplodin bakteriálního

metabolismu. Zubní tkáň nemá možnost se v případě poškození sama reparovat. Jednou z příčin je přítomnost ameloblastů pouze v době před erupcí zubu do dutiny ústní. Druhým důvodem je schopnost odontoblastů vytvářet dentin pouze na hranici mezi ZP a dentinem. Poškození struktury zubu, ať už traumatem, parodontálním onemocněním, kariézním procesem, nebo genetickou poruchou, vedoucí k jeho ztrátě nejen negativně ovlivňuje základní funkci žvýkacího ústrojí, ale i estetiku a kvalitu pacientova života sdruženou s orálním zdravím.

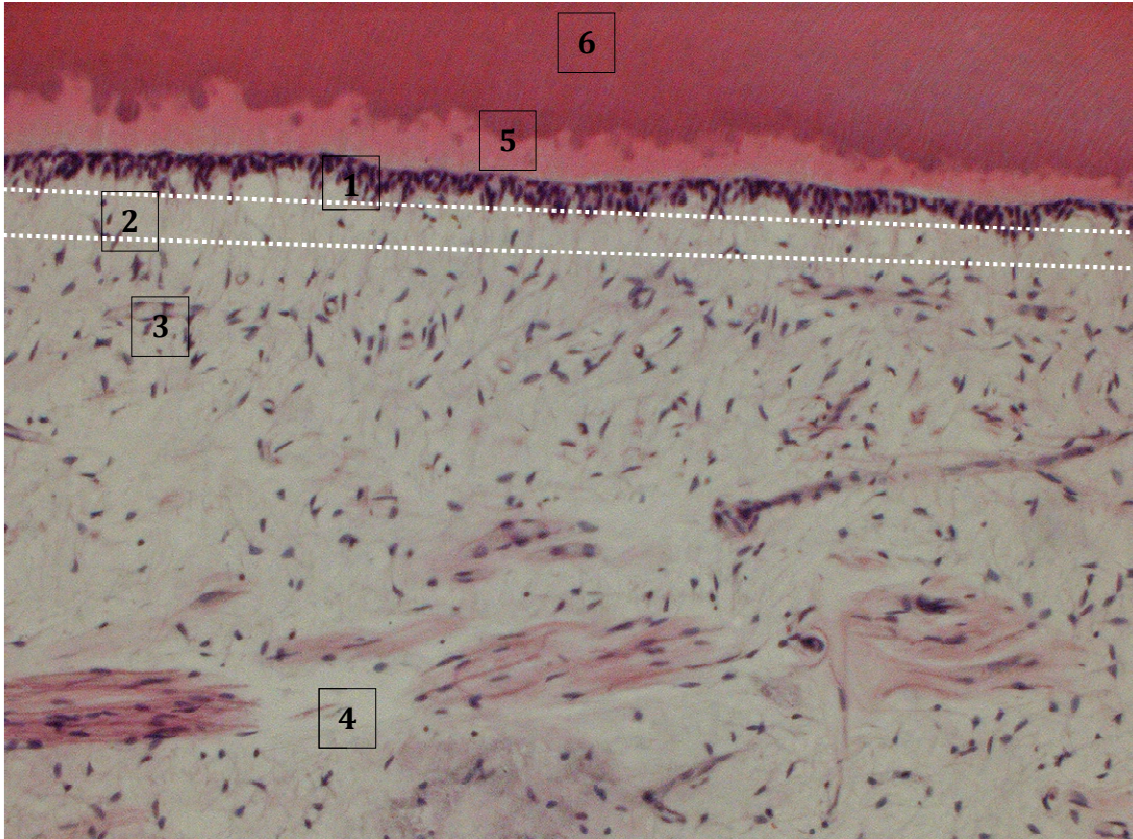
Zubní lékařství v současné době řeší tyto problémy pomocí autologní transplantace, použitím dentálních aloplastických implantátů, popřípadě pomocí protetické léčby. Tato léčba s sebou nese určitá rizika (např. poškození sousedních zubů) a omezení (např. resorpce alveolární kosti). Zub vytvořený pomocí KBZP/SHED *in vitro* podmínkách by byl velmi slibnou metodou pro celkovou rekonstrukci pacientovy dentice bez použití materiálů, které nejsou tělu vlastní. Již dnes se v odborné literatuře objevují studie, kdy KBZP byly vpraveny do opracovaného kořenového kanálku, kde byla prokázána jejich afinita k dentinu (42). Další studie poukazuje na schopnost KBZP vytvořit tzv. dentine-pulp like complex (28).

2.2 Zubní pulpa

Zubní pulpa je pro většinu zubních lékařů tkání, se kterou se ve své praxi neradi setkávají. Je to právě zubní pulpa (resp. nervová zakončení v ní obsažená), která způsobuje bolest pacientovi při zákroku nebo při probíhajícím zánětu. Další nepříjemnou vlastností pro klinického stomatologa je nízký regenerační potenciál ZP *in situ*. V případě toxického nebo mechanického poškození dochází často k nekróze ZP a z toho plynoucí nutnosti endodontického ošetření. ZP však nemusí být jen zdrojem obtíží. Právě díky ZP si pacient uvědomuje, že některý z jeho zubů je poškozen a často navštíví stomatologa ještě v době, kdy je náprava škod možná.

Jelikož je ZP ohraničena tvrdými zubními tkáněmi od okolních struktur již v období embryonálního vývoje, zachovává si stavbu unikátního, tzv. rosolovitého vaziva. Jedná se o vazivo s velkým množstvím mezibuněčné hmoty (glykosaminoglykany, glykoproteiny) a jen s malým množstvím kolagenních vláken (zejména typ I a III).

ZP z mikroskopického pohledu rozdělujeme do 4 částí: 1) vrstva odontoblastů, 2) nebuněčná Weilova zóna, 3) vrstva bohatá na buňky (fibroblasty, imunokompetentní buňky a buňky nediferencované) a 4) centrum ZP (Obr. 6).



Obr. 6: Zubní pulpa s částí dentinu. 1) vrstva odontoblastů, 2) nebuněčná Weilova zóna, 3) vrstva bohatá na buňky (fibroblasty, imunokompetentní buňky a buňky nediferencované), 4) centrum ZP, 5) predentin a 6) dentin. HE, původní zvětšení 100x.

Odontoblasty jsou palisádovitě (epiteloidně) uspořádané buňky těsně pod vrstvou dentinu. Jsou zodpovědné za tvorbu primárního, sekundárního a peritubulárního dentinu. Pod pásem odontoblastů je vrstvička dřeně s minimálním množstvím buněk - bazální Weilova zóna. Pod Weilovou zónou je tzv. silně buněčná vrstva s fibroblasty, které jsou štíhlými výběžky v kontaktu s odontoblasty i mezi sebou navzájem. Weilova zóna i silně buněčná vrstva tvoří subodontoblastický okrsek dřeně. Subodontoblastický kompartment je velmi bohatý na nervová vlákna, která zde tvoří plexus Raschkowi, z něhož odbočují terminální vlákna probíhající spolu s výběžky odontoblastů v dentinových tubulech. ZP

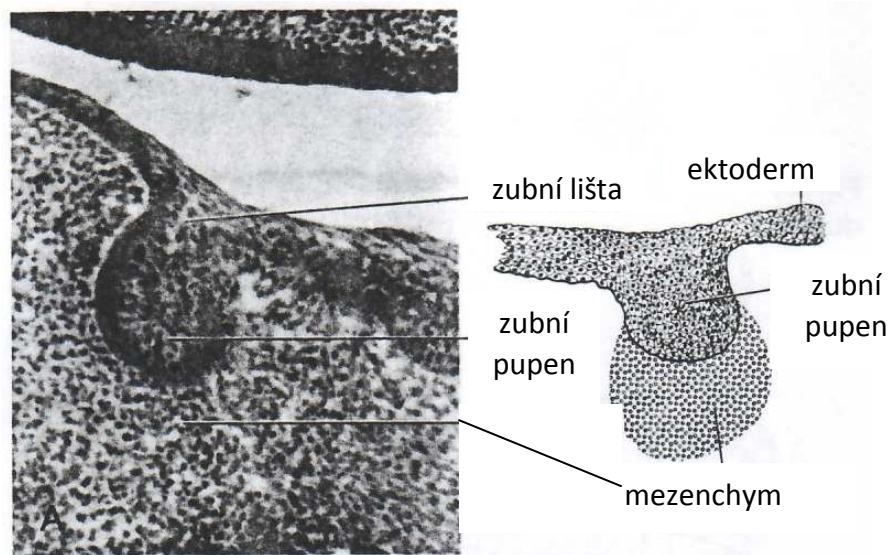
je velmi bohatě vaskularizována. V centru subodontoblastické zóny nacházíme větší cévní i nervové kmeny.

Na základě výše uvedených faktů a vzhledem ke skutečnosti, že zubní pulpa představuje ohraničený a od ostatních tkání oddělený kompartment, který si uchoval stavbu typickou pro primitivní (embryonální) tkáň, se domníváme, že KB v ní obsažené by měly vykazovat spíše vlastnosti podobné ES. Zubní pulpa je polarizovaná tkáň, proto v ní předpokládáme existenci dvou kompartmentů, subodontoblastického - SO a perivaskulárního - PV, o jejichž KB se domníváme, že mají různý embryonální původ (31).

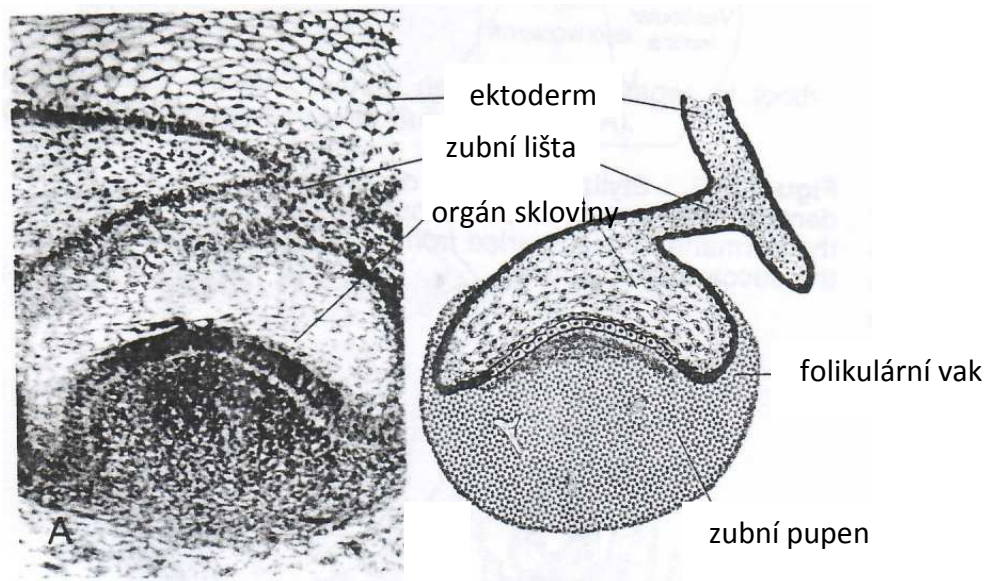
2.3 Vývoj zubu a zubní pulpy

Vývoj zubu a ZP je z hlediska embryogeneze velmi zajímavý proces. Zub se zakládá z jednoho ektodermálního a dvou mezenchymálních zdrojů. Ektoderm je list kryjící povrch embrya, z něhož vzniká orgán skloviny. Na vývoji zubu se dále podílejí buňky mezenchymové, derivované jednak z mezenchymu primitivní dutiny ústní, jednak z neurální lišty (tyto buňky během embryogeneze migrují z předního mozku pod ektoderm primitivní dutiny ústní a tvoří zde tzv. ektomezenchym, ze kterého vzniká část ZP - odontoblasty).

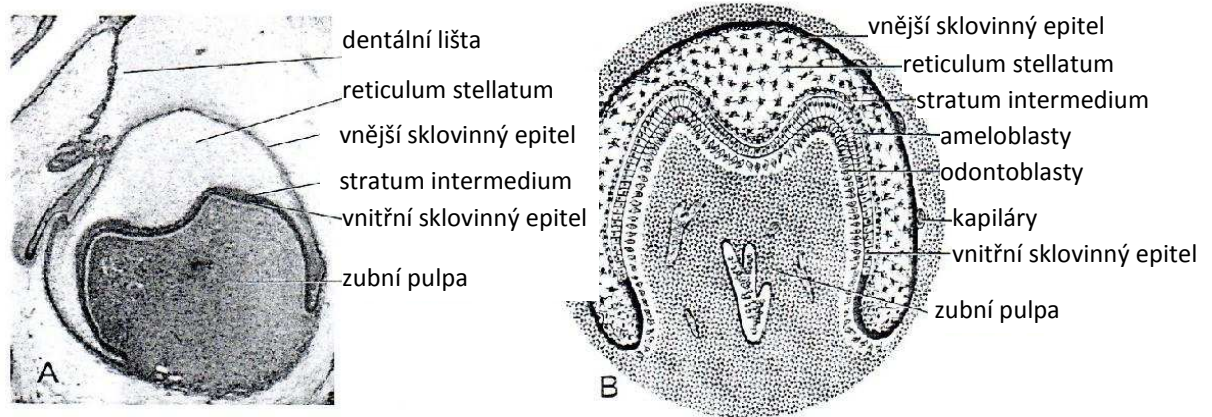
V první fázi vývoje zubu (6. týden embryonálního vývoje) dochází k zanoření buněk ektodermu do mezenchymu. Vzniká tzv. dentální lišta, ze které se vyvíjí zuby dočasné i stálé dentice. Od dentální lišty se postupně oddělují zárodky pro jednotlivé zuby (stálá dentice se vyvíjí lingválně od dentice dočasné); tímto vzniká stadium pupenu (Obr. 7). Později dochází ke zmnožení buněk ektodermu a formuje se tzv. stadium pohárku (Obr. 8). V této fázi je patrné zmnožení buněk ektomezenchymu. Po kontaktu buněk ektodermu s buňkami mezenchymu se vytváří orgán skloviny (Obr. 1). Buňky odvozené z ektodermu diferencují v preameloblasty a indukují tak migraci buněk z *crista neuralis* do povrchových částí budoucí zubní pulpy. Tyto buňky po kontaktu s preameloblasty diferencují v odontoblasty a začínají tvořit predentin. Preameloblasty, poté co přijdou do styku s predentinem, dokončují diferenciaci a začínají tvořit sklovinu. Posledním vývojovým stupněm korunky zubu je stadium zvonku (Obr. 9). V této fázi je již dotvořen orgán skloviny, buňky ektodermu téměř obklopily budoucí ZP.



Obr. 7: Zárodek zubu ve fázi pupenu. Patrné zanoření buněk vycházejících z dentální lišty (ektoderm) do mezenchymu primitivní dutiny ústní. Převzato z Avery James K.: Oral development and histology, ISBN 0-86577-553-2, str. 74.



Obr. 8: Zárodek zubu ve fázi pohárku. Začíná se tvořit orgán skloviny, dochází ke zmnožení buněk mezenchymu a migraci buněk odvozených z crista neuralis do oblasti sousedící s orgánem skloviny. Převzato z Avery James K.: Oral development and histology, ISBN 0-86577-553-2, str. 74.



Obr. 9: Zubní zárodek ve stadiu zvonku. Orgán skloviny je již vytvořen, postupně začíná tvorba skloviny a dentinu. Převzato z Avery James K.: Oral development and histology, ISBN 0-86577-553-2, str. 75.

3. Cíle práce

Přestože linie KBZP a SHED byly poprvé izolovány již v roce 2000 a 2003, jedná se stále o nedostatečně charakterizované linie kmenových buněk. Charakterizaci obou linií a případné porovnání výsledků výzkumu s nálezy ostatních autorů značně znesnadňuje i nejednotný postup během izolace KBZP/SHED a rozdíly v kultivačních podmínkách během experimentů. Proto jsme se v naší studii zaměřili hlavně na optimalizaci izolace KBZP a standardizaci podmínek pro dlouhodobou kultivaci. Dalším cílem bylo charakterizovat KBZP/SHED a ověřit schopnost těchto buněk diferencovat v jiné buněčné linie. Vzhledem k nedostatečnému množství vhodných dárců exfoliovaných zubů nemohly být některé experimenty provedené s KBZP uskutečněny i se SHED.

3.1 Dárci zubní dřeně

Naším cílem bylo rozšířit spektrum dárců. Recentní literatura odkazuje na izolaci ZP z exfoliovaných zubů, či třetích molárů s nedokončeným vývojem kořene, tedy na zuby s široce otevřenou *cavum pulpae* (či *foramen apicale*). Tento fakt omezuje skupinu dárců na jedince do 16 let (včetně). Pro budoucí možná klinická využití bude nutné vytvořit postup, při kterém je možné odebírat ZP ze zubů dárců různého věku, ideálně od dárců všech věkových skupin (podmínkou je přítomnost alespoň jednoho nekariézního vitálního zubu v dutině ústní dárce).

3.2 Izolace zubní dřeně z *cavum pulpae*

Při izolaci zubní dřeně jsme hledali optimální metodu extrakce ZP z *cavum pulpae*.

Pro vytvoření optimálního postupu samotné izolace zubní pulpy z *cavum pulpae* jsme sledovali tyto cíle - izolace musí probíhat ve sterilních podmínkách pro prevenci kontaminace, za vyloučení termického i mechanického poškození a zbytečné ztráty tkáně (polarizace ZP, existence dvou kompartmentů uvnitř ZP).

3.3 Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy

Při optimalizaci a standardizaci metody izolace KBZP jsme dbali na to, aby KB byly uvolněny z tkáně ZP v přijatelném čase (který bude modifikován postupem a náročností metody) a nedocházelo tak ke zbytečnému poškození a destrukci buněk. Naším cílem bylo

porovnání postupů izolace (s ohledem na traumaticčnost, tepelný stres, ztrátu tkáně a úspěšnost) jako podklad pro standardizaci metody, která byla ve výše popsanych kritériích hodnocena jako nejlepší. V literatuře se uvádějí dvě základní metody izolace KBZP/SHED ze ZP – mechanická a enzymatická disociace. V dalších experimentech jsme se zaměřili na izolaci KBZP z PV a SO kompartmentu.

Izolací SHED jsme se začali zabývat později (2009), po ukončení optimalizačních experimentů s KBZP, jejichž výsledek byl vzhledem ke shodné histologické stavbě ZP stálých a dočasných zubů použit i pro izolaci SHED z ZP exfoliovaných zubů.

3.4 Kultivační podmínky KBZP a SHED

Naším cílem bylo vytvořit kultivační médium s nejnižším možným podílem FCS při zachování viability a dostatečné proliferační aktivity kultivovaných linií KBZP.

Vzhledem k nízkému počtu vhodných dárců exfoliovaných zubů, shodné histologické stavbě tkáně ZP dočasných a stálých zubů a existenci námi optimalizovaného kultivačního protokolu KBZP (první experimenty s SHED byly provedeny až počátkem roku 2009) nebyly na SHED obdobné kultivační experimenty provedeny; při kultivaci SHED bylo použito kultivační médium optimalizované pro KBZP.

3.5 Charakterizace KBZP a SHED

KBZP/SHED jsme charakterizovali pomocí základních biologických vlastností (morfologie, viabilita, distribuce průměrů buněk a proliferační aktivita). Dále pak pomocí analýzy fenotypu vybraných povrchových znaků, analýzy buněčného cyklu, imunocytochemie, sledováním karyotypu, zhodnocením tzv. colony forming units (CFU) a plating efficiency (PEf).

3.6 Diferenciace KBZP a SHED

Naším záměrem bylo ověřit schopnost KBZP/SHED diferencovat ve vyzrálé buněčné elementy. Z tohoto důvodu jsme použili diferenciační protokoly uvedené jinými autory (30, 43, 44).

3.7 Měření délky telomer KBZP

Jedním z možných důkazů, že námi izolované a kultivované linie KBZP jsou KB, je průkaz aktivity telomerázy, která odráží esenciální vlastnost KB, kterou je, mimo schopnost diferenciaci ve více buněčných typů (viz výše), neomezená schopnost proliferace. Tento experiment byl proveden metodou měření délky telomer v průběhu dlouhodobé kultivace a převedení linií KBZP přes Hayflickův limit.

Pokusy s kmenovými buňkami z dočasných zubů byly prováděny později, proto u nich nebylo měření délky telomer provedeno.

3.8 Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP

Cílem tohoto experimentu bylo zhodnotit účinky ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP, detekci hladiny p53 a schopnost reparovat poškozenou DNA. Při tomto experimentu jsme spolupracovali s Ústavem biochemie LFUK HK.

4. Materiál a metodika

4.1 Dárci zubní dřeně

Do studie byly zařazeny zuby extrahované zdravým jedincům obou pohlaví do 30 let věku. Každý pacient byl před odběrem zubu pro výzkumné účely krátce seznámen s teorií kmenových buněk a obsahem informovaného souhlasu. V případě souhlasu pacient/dárce, za plného porozumění textu tento informovaný souhlas podepsal. Pokud se jednalo o odběr zubu u dítěte, s informovaným souhlasem byl seznámen zákonný zástupce, který ho také v případě souhlasu signoval. Informace pro dárce a text informovaného souhlasu (viz příloha č. 9.6.1 a 9.6.1) schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové (viz příloha č. 9.5). Při zařazení do studie byla osobní data pacientů uchována s plnou ochranou důvěrnosti podle platných zákonů ČR.

4.1.1 Rozdělení dárců podle extrahovaných zubů

Dárci zubní pulpy byli rozděleni do dvou hlavních skupin: 1) dárce dočasných zubů a 2) dárce stálých zubů. Obě skupiny se rozdělily do následujících podskupin: 1a) dárce spontánně exfoliovaných zubů, 1b) dárce extrahovaných dočasných zubů, u kterých resorpce kořene nepřekročila $\frac{1}{2}$ původní délky, 2a) dárce neprořezaných třetích molárů, 2b) dárce prořezaných třetích molárů a 2c) dárce prořezaných premolárů.

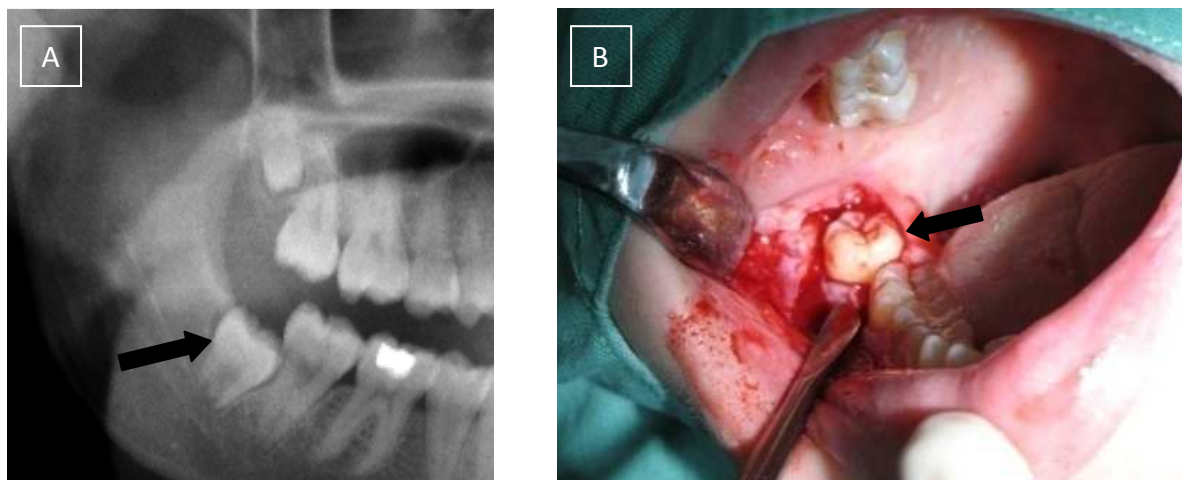
4.2 Izolace zubní dřeně z *cavum pulpae*

4.2.1 Odběr zubu a transport do laboratoře tkáňových kultur

Izolaci ZP předchází odběr zubu a transport do Laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LFUK HK.

Odběrem rozumíme extrakci zubu prováděnou v lokální anestezii v aseptických podmínkách. Zuby byly indikovány k extrakci ošetřujícím lékařem nejčastěji z ortodontických důvodů (Obr. 10). Extrakce jsou plánovaným zákrokem a odběrem zubu pro výzkumné účely tedy pacientovi nevzniká žádná újma (nedochází k žádnému vyšetření, ani zákroku navíc). Z důvodu zamezení přenosu infekce do Laboratoře tkáňových kultur byly vyloučeny zuby s kariézním procesem. Ve všech skupinách byl zub extrahován dle standardů Stomatologické kliniky FNHK v lokální anestezii. Po extrakci následovalo ošetření zubu sterilní gázou

napuštěnou dezinfekčním roztokem (Gutar) pro odstranění zubního mikrobiálního povlaku, event. kontaminace slinou.



Obr. 10: A) Rentgenogram retinovaného třetího moláru (48), šipkou označen neprořezaný zub indikovaný k extrakci. B) Vybavení retinovaného třetího moláru (48) (označen šipkou) po odklopení mukoperiostálního laloku.

Při transportu byl zub uložen v uzavřené nádobě, zcela ponořen do transportního média (HBSS transportní pufr - Hankův balancovaný solný roztok s antibiotiky) ve složení 1 ml HBSS (Invitrogen, USA), 9 ml Aqua pro inj. (Bieffe Medital, Itálie), 200 µl/10 ml gentamycin (Invitrogen, USA), 200 µl/10 ml streptomycin (Invitrogen, USA), 200 µl/10 ml amfotericin (Sigma, USA) a 200 µl/10 ml penicilin (Invitrogen, USA) při teplotě 4 °C.

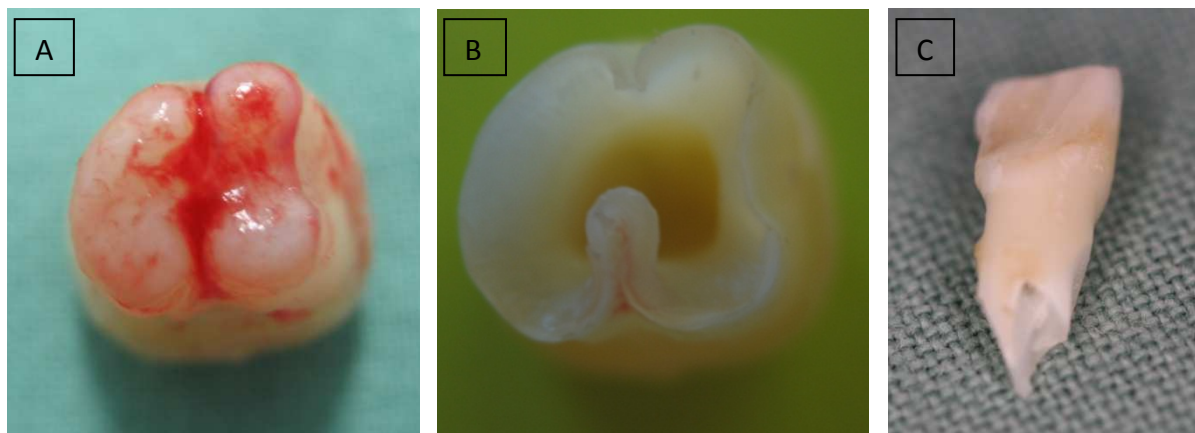
4.2.2 Izolace zubní dřeně z *cavum pulpae*

K izolaci ZP jsme použili různé přístupy ve snaze snížit riziko poškození KBZP/SHED vnějšími vlivy (termické nebo mechanické poškození). Pro zajištění sterilních podmínek jsme extrakce ZP prováděli vždy v laminárním boxu, ve sterilním oblečení (sterilní čepice, ústenka, plášť a rukavice).

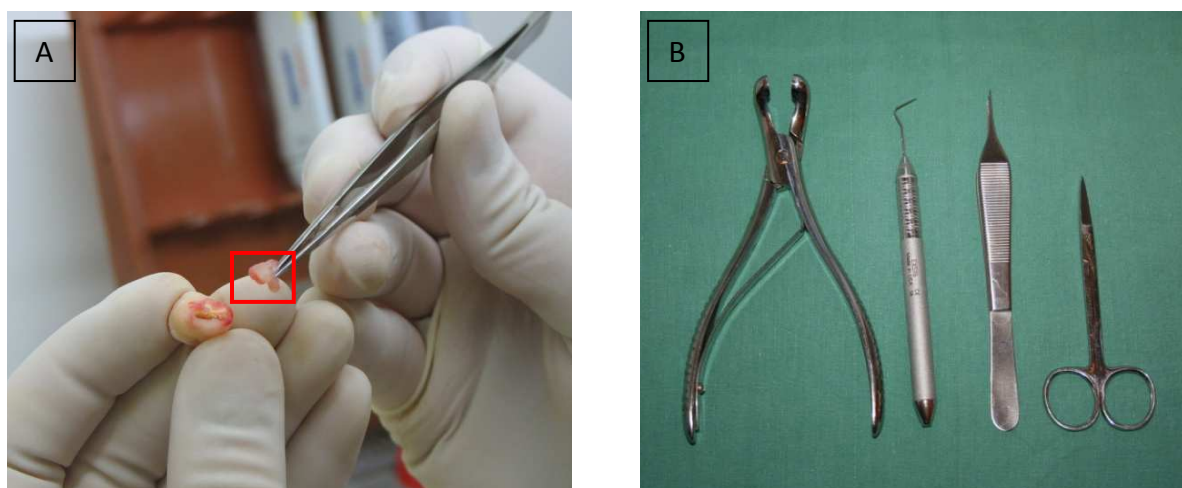
4.2.2.1 Stálé zuby s nedokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v pokročilé fázi resorpce

Extrakce ZP ze zubů s nedokončeným vývojem zubního kořene, nebo ze zubů, které již byly v pokročilé fázi resorpce kořene, probíhala již v laminárním boxu za sterilních

podmínek pomocí pinzety, eventuálně exkavátoru (Henry Schein, UK) skrze *foramen apicale* zubního kořene (Obr. 11, 12).



Obr. 11: A) Extrahovaný zub 38 s nedokončeným vývojem kořenového systému společně se ZP. B) Zub z Obr. A po izolaci ZP. C) Dočasný horní střední řezák s pokročilou resorpcí kořene.



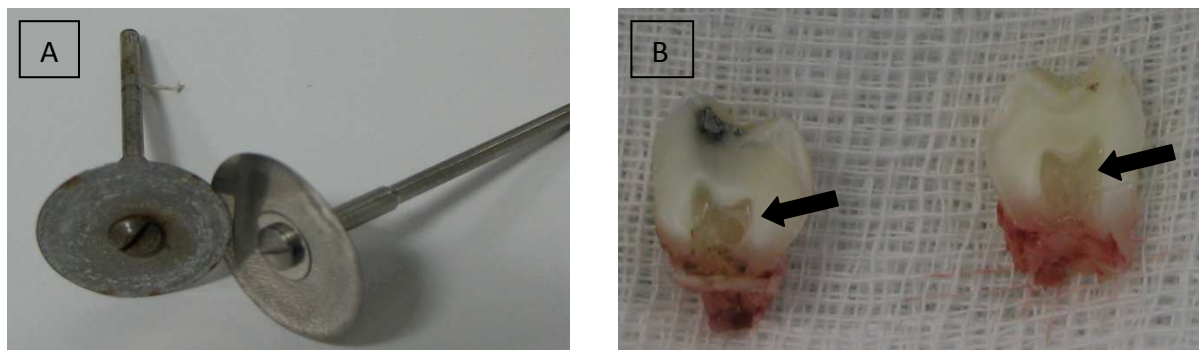
Obr. 12: A) Exstirpace ZP ze zubu s nedokončeným vývojem kořenového systému. Exstirpace probíhá v laminárním boxu. B) Sterilní instrumentarium k izolaci zubní pulpy (Luerovy kleště, ostrá sonda, mikrochirurgická pinzeta, nůžky na suturu rovné kleště).

4.2.2.2 Stálé zuby s dokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v počáteční fázi resorpce

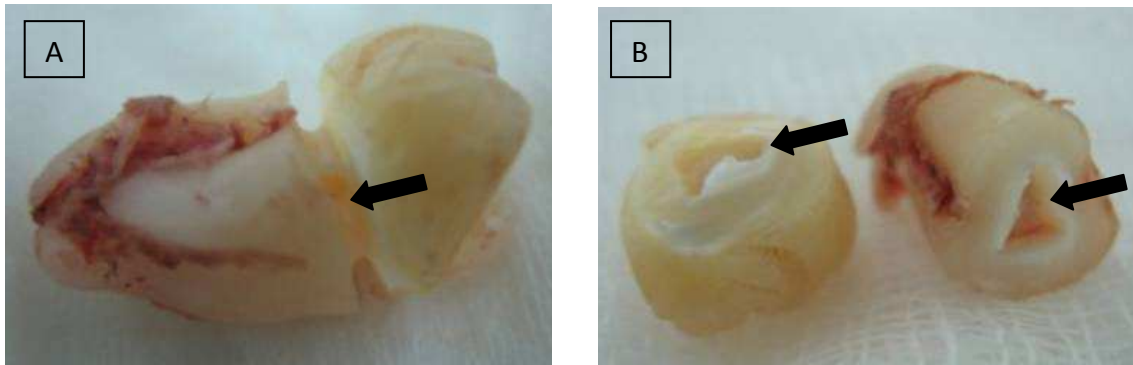
V případě, že již nebylo možné extrahovat ZP cestou *foramen apicale*, bylo třeba zubní kořen od korunky zubu oddělit a zpřístupnit dřeňovou dutinu se zubní pulpou. Pro tyto zuby jsme zvolili tři různé přístupy.

4.2.2.2.1 Izolace ZP pomocí diamantového kotouče, nebo Battova vrtáku

U první metody jsme extrahované zuby fixovali sterilním mulovým čtvercem na pevné podložce. Zuby včetně zubní pulpy jsme rozřízli ve směru dlouhé osy zubu sterilním diamantovým kotoučovým brouskem (Obr. 13). U druhé metody jsme extrahovaný zub také fixovali k pevné podložce sterilním mulovým čtvercem a pomocí diamantového Battova vrtáku jsme oslabili TZT v úrovni cementosklovinné hranice a zubní korunku od zubního kořene oddělili rozlomením (Obr. 14). Během řezu byl zub chlazen fyziologickým roztokem. Tím jsme získali dvě poloviny zubu a snadno přístupné *cavum pulpae*. Zubní dřeň byla izolována pomocí sterilního exkavátoru (Henry Schein Inc., UK) a poté transportována v HBSS (Invitrogen, USA) při teplotě 4 °C do Laboratoře tkáňových kultur.



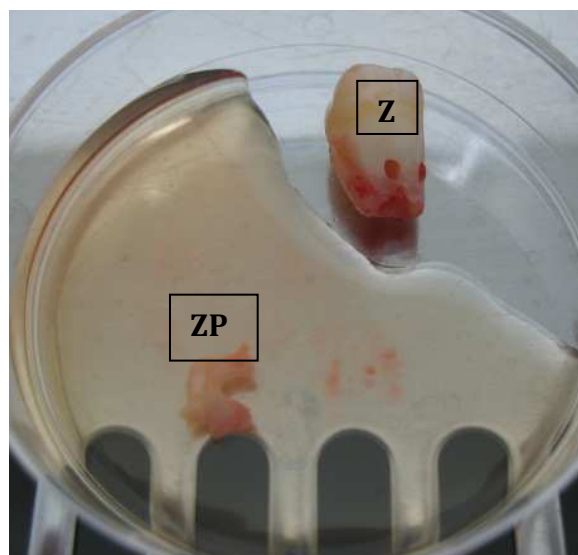
Obr. 13: A) Diamantový kotoučový brousek. B) Dočasný molár podélně rozříznutý pomocí diamantového brousku. *Cavum pulpae* (označeno šipkou) je dobře přístupné pro izolaci ZP.



Obr. 14: A) Extrahovaný zub 48 horizontálně rozříznutý Battovým vrtákem. Šipky označují perforaci do *cavum pulpae*. B) Rozlomený zub 48 s přístupnou dřeňovou dutinou (označeno šipkou).

4.2.2.2 Izolace ZP pomocí Luerových kleští

Při tomto postupu jsme transportovali zuby do Laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LFUK HK v HBSS při teplotě 4 °C. Poté jsme v laminárním boxu za sterilních podmínek pomocí Luerových kleští odlomili kořeny, abychom tak získali široce otevřený přístup do *cavum pulpae*. ZP jsme pomocí ostré sondy uvolnili od dentinu a vyjmuli sterilní mikrochirurgickou pinzetou (Obr. 15).



Obr. 15: Zub 48 (Z) po odlomení apikální části kořenového systému, zpřístupněné *cavum pulpae* a izolovaná zubní pulpa (ZP).

4.3 Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy

KBZP/SHED jsou obsaženy uvnitř zubní pulpy. Jejich přesná lokalizace není dodnes dořešena. Protože buňky podílející se na vzniku zubní pulpy pocházejí z ektomezenchymu odvozeného z crista neuralis a mezenchymu primitivní dutiny ústní, předpokládáme, že uvnitř ZP se vyskytují dvě populace KB. Jedna populace v povrchové, tzv. subodontoblastické zóně (SO), pocházející z ektomezenchymu. Druhá populace se nachází v centru zubní pulpy v tzv. perivaskulární zóně (PV), pocházející z mezenchymu. Zdá se, že ZP je takto polarizována vlivem odontogeneze, při níž dochází k indukci migrace buněk ektomezenchymu do blízkosti orgánu skloviny. Proto jsme pro izolaci KBZP použili dva různé přístupy. První možností bylo získat dvě linie KBZP viz výše (KBZP ze SO a PV kompartmentu), druhou izolovat směšnou linii KBZP.

4.3.1 Izolace KBZP ze SO a PV kompartmentu ZP

Během izolace KBZP ze SO a PV zóny byla ZP po dobu 35 minut při teplotě 37 °C vystavena působení roztoku enzymů kolagenázy typu I (Sevapharma, ČR) a dispázy (Invitrogen, USA) ve fyziologickém roztoku pufovaného fosfáty (PBS) (Invitrogen, USA) a HBSS (Invitrogen, USA) v poměru 1:1:1:1. Poté byla odsáta buněčná suspenze bez zbytku měkkých tkání a inaktivována inaktivačním médiem (α -MEM (Invitrogen, USA), 20 % FCS (PAA, USA)), tímto jsme získali předpokládanou linii KBZP z SO zóny. Zbylé měkké tkáně byly opět vystaveny enzymatickému koktejlu stejného složení po dobu dalších 35 minut při teplotě 37 °C. Takto získaná buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 2000 ot/min (600 g). Buněčná peleta byla dále resuspendována a nasazena do kultivačních nádob s ošetřeným povrchem Cell⁺ (Sarstedt, USA).

4.3.2 Izolace směšné linie KBZP a SHED

Pro izolaci směšné linie KBZP ze ZP byly využity dvě metody – mechanická a enzymatická. Během izolace KBZP bez využití enzymů byla ZP vložena do homogemizátoru, v němž byla její struktura mechanicky rozrušena. Po přidání 1 ml kultivačního média byla buněčná suspenze nasazena do kultivačních nádob s ošetřeným povrchem Cell⁺ (Sarstedt, USA). Tento postup nebyl využit pro izolaci KB ze ZP dočasných zubů.

Pro izolaci KBZP za využití enzymů byl použit tento postup: rozstříhání ZP na části cca 1mm³, enzymatické štěpení ZP po dobu 40 - 60 minut (dle velikosti ZP) při teplotě 37,0 °C působením roztoku enzymů kolagenázy typ I (Sevapharma, ČR) a dispázy (Invitrogen, USA), PBS (Invitrogen, USA) a HBSS (Invitrogen, USA) v poměru 1:1:1:1. Vzniklá buněčná suspenze byla se zbytky měkkých tkání inaktivována inaktivačním médiem. Získaná buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 2000 ot/min (600 g), centrifugací vzniklá buněčná peleta byla resuspendována a nasazena do kultivačních nádob s ošetřeným povrchem Cell⁺ (Sarstedt, USA). Tato metoda byla použita i pro izolaci SHED.

4.4 Kultivační podmínky pro KBZP a SHED

KBZP a SHED byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

Primokultura KBZP/SHED byla standardně nasazena do kultivačních nádob Cell⁺ (Sarstedt, USA). Po 24 hodinách byly pomocí PBS (Invitrogen, USA) odmyty nepřisedlé buňky a zbytky měkkých tkání ZP. V primokultuře byly KBZP/SHED kultivovány po dobu 7-10 dnů, dokud nebyly pozorovány malé kolonie čítající cca 20 buněk.

Abychom uvolnili buňky z povrchu kultivační nádoby, během přesazení z primokultury do první pasáže byly vystaveny působení enzymu trypsin-EDTA (Invitrogen, USA) při 37 °C po dobu 10 min. Buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 2000 ot/min (600 g) a takto vzniklá peleta resuspendována v 1 ml kultivačního média. KBZP/SHED byly nasazeny do nových kultivačních nádob s ošetřeným povrchem (TPP, Švýcarsko, nebo NUNC, Dánsko) v denzitě 4500 buněk/1cm². Každé další pasážování bylo provedeno při dosažení 70% splývavosti buněk.

Ve snaze snížit množství FCS a přiblížit se tak podmínkám vhodným ke kultivaci KB pro klinické aplikace, jsme zvolili tři různá kultivační média. Základem prvního média je α -MEM (Invitrogen, USA) s 2 % FCS (PAA, USA) obohacené o 10 ng/ml EGF (PeproTech, USA), 10 ng/ml PDGF (PeproTech, USA), L-askorbovou kyselinu (Sigma, USA), 2 % glutamin (Invitrogen, USA), penicilin/streptomycin (Invitrogen, USA), gentamycin (Invitrogen, USA) a dexametazon (Sigma, USA) (Tab. 1). Složení druhého média je α -MEM (Invitrogen, USA), 2 % FCS (PAA, USA), 10 ng/ml EGF (PeproTech, USA), 10 ng/ml PDGF (PeproTech, USA), L-askorbová kyselina (Sigma, USA), 2 % glutamin (Invitrogen, USA), penicilin/streptomycin

(Invitrogen, USA), gentamycin (Invitrogen, USA), dexametazon (Sigma, USA) a obohaceno o inzulin transferin sodium selenite suplement v koncentraci 10 $\mu\text{l/ml}$ (ITS) (Sigma, USA) (Tab. 1). Třetí médium, nejčastěji citované v literatuře (45, 46), se skládá z α -MEM (Invitrogen, USA), 10 % FCS (PAA, USA), L-askorbové kyseliny (Sigma, USA), 2 % glutaminu (Invitrogen, USA), penicilinu/streptomycinu (Invitrogen, USA) a gentamycinu (Invitrogen, USA) (Tab. 1).

Tato média jsme dále označili jako médium se 2 % FCS, médium se 2 % FCS + ITS a médium se 10 % FCS. SHED byly kultivovány pouze v médiu s 2 % FCS obohaceném o ITS suplement.

SLOŽKA	2 % FCS	10 % FCS	2 % FCS + ITS
α MEM (Invitrogen, USA)	94,96 ml	86 ml	94,96 ml
FCS (PAA, USA)	1,94 ml -2%	9,7 ml -10%	1,94 ml -2%
Kyselina L- askorbová (Sigma, USA)	1 ml (10 mg)	1 ml (10 mg)	1 ml (10 mg)
Glutamin (Invitrogen, USA)	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
PEN/STM (Invitrogen, USA)	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
GEN (Invitrogen, USA)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Dexametazon (Sigma, USA)	8 μl	-	8 μl
PDGF-BB (Peprotech, USA)	10 ng/ml	-	10 ng/ml
EGF (Peprotech, USA)	10 ng/ml	-	10 ng/ml
ITS (Sigma, USA)	-	-	10 $\mu\text{l/ml}$

Tab. 1: Složení kultivačního média.

4.5 Charakterizace KBZP a SHED

4.5.1 Stanovení základních biologických vlastností

U KBZP kultivovaných v jednotlivých mediích a SHED jsme charakterizovali základní biologické vlastnosti (morfologie, viabilita, velikost buněk, proliferační aktivita), provedli analýzu buněčného cyklu a fenotypu, zhodnotili CFU a PEF.

Velikost buněk a proliferační aktivita byly měřeny pomocí přístroje Z2-counter (Beckman Coulter, USA). Buněčná peleta získaná po centrifugaci byla resuspendována v 1 ml kultivačního média. Poté bylo 100 ml buněčné suspenze zředěno 9,9 ml izotonického roztoku v měřící kyvetě. Pro zamezení chyby byl každý vzorek měřen dvakrát a výsledek byl počítán jako průměrná hodnota. Toto měření bylo provedeno při každé pasáži.

Viabilita KB byla měřena pomocí přístroje Vi-Cell analyzer (Beckman Coulter, USA). Buněčná peleta získaná centrifugací byla resuspendována v 1 ml kultivačního média. Z buněčné suspenze bylo odebráno 250 μ l vzorku a zředěno 250 μ l PBS (Invitrogen, USA). Vzhledem k větší ztrátě buněk bylo toto měření prováděno v každé páté pasáži.

Pro analýzu buněčného cyklu byly KB značeny propidium jodidem. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA). Data byla analyzována pomocí Multicycle software (Phoenix Flow Systems, USA). KBZP byly analyzovány v páté a desáté pasáži.

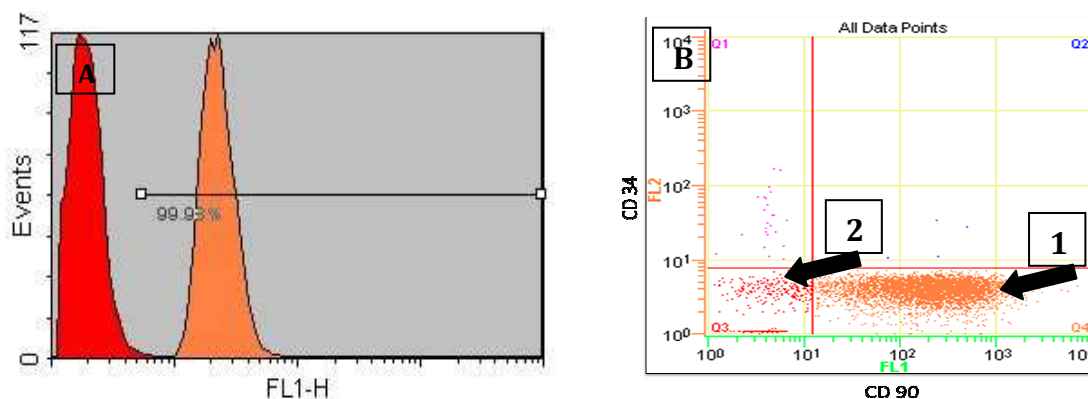
Pro analýzu CFU byla jedna linie KBZP nasazena do dvou primokultur v poměru 1:1. Po dvou týdnech kultivace byla jedna nádoba s primokulturou obarvena (May-Grunwald-Giemsa-Romanowski) a množství jednotlivých kolonií v ní narostlých sečteno. V druhé nádobě s primokulturou bylo pomocí přístroje Z2-counter (Beckman Coulter, USA) změřeno množství buněk. Tímto jsme získali přibližný počet KBZP (tzv. colony forming units) v zubní pulpě, který byl vyjádřen množstvím kolonií v první nádobě a množstvím populačních zdvojení v období mezi primokulturou a 1. pasáží. Vzhledem ke ztrátě celé buněčné linie po ukončení tohoto experimentu nebyl tento experiment opakován v liniích SHED (malý počet dárců).

Pro analýzu PEF bylo do kultivační nádoby nasazeno 122 500 buněk. Tyto buňky byly ponechány 6 hodin při standardních kultivačních podmínkách. Poté bylo odsáto kultivační

médium a kultivační nádoba opláchnuta pomocí PBS (Invitrogen, USA). Adherující buňky byly pomocí enzymu trypsin-EDTA (Invitrogen, USA) uvolněny z povrchu kultivační nádoby a spočítány pomocí přístroje Z2-counter (Beckman Coulter, USA). Celková PEF je podílem počtu přisedlých buněk ku počtu nasazených buněk (47).

4.5.2 Analýza fenotypu

Pro analýzu fenotypu provedenou na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA) byly KBZP/SHED inkubovány po dobu 30 minut s primárními protilátkami konjugovanými s FITC nebo PE. Procento pozitivních buněk bylo stanoveno jako procento s fluorescenční intenzitou vyšší než 99,5 % negativní isotopové imunoglobulinové kontroly (Obr. 16). Klasifikační kritéria: < 10 % negativní, 11 – 40 % nízká exprese, 41 – 70 % střední exprese a >71 % vysoká exprese CD znaku. U KBZP a SHED jsme testovali vybrané panely CD znaků (viz příloha 9.10 – Analýza fenotypu).



Obr. 16: A) Graf znázorňující rozložení fluorescenční aktivity u testovaného CD znaku a isotopové imunoglobulinové negativní kontroly. Procento pozitivních buněk (oranžově) stanovujeme jako procento buněk s intenzitou fluorescence vyšší než 99,5 % isotopové kontroly (červeně). B) Tzv. dotplot pro znaky CD 34 a CD 90 zobrazuje vysoké procento buněk pozitivních pouze pro znak CD 90 (šipka 1) a část buněk negativních pro oba znaky (šipka 2).

4.5.3 Imunocytochemie

Imunocytochemie byla použita k identifikaci cytoskeletálních proteinů a intracelulárních molekul. Pro detekci cytoskeletálních proteinů byly KBZP/SHED fixovány pomocí ledového metanolu (-20 °C) po dobu 6 minut, následně byly po dobu 10 minut oplachovány 0,1% Triton X-100. Pro detekci ostatních intracelulárních molekul byly KBZP/SHED fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 20 minut a poté po dobu 10 minut oplachovány 0,1% Triton X-100. Pro imunocytochemické detekce jsme použili následující primární protilátky: anti-nucleostemin (goat polyclonal, 1:10, R&D Systems, USA), anti-nestin (10C2, 1:200, Chemicon, USA), anti-Sox-2 (rabbit polyclonal, 1:100, Chemicon, USA), anti-STRO-1 (STRO-1, 1:4, DSHB, USA) a anti-vimentin (V9, 1:40, Sigma, USA), anti- α akti (Abcam, UK), anti- β 3 tubulin (Exbio, CZ) Po oplachu PBS (Invitrogen, USA) byla vazebná místa antigenů označena pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s fluorochromy Alexa (488 - 1:300, Invitrogen, USA) a Cy3 (1:300, Jackson Immunoresearch, USA) dle návodu výrobce.

4.5.4 Karyotyp

Po 24hodinové kultivaci za standardních podmínek byly KBZP/SHED vystaveny působení Demecolcemidu (Sigma, USA) po dobu 4 hodin a následně uvolněny z kultivační nádoby pomocí trypsin-EDTA (Invitrogen, USA), lyzovány pomocí hypotonického roztoku KCl, po nakapání lyzátu na sklo byla provedena fixace kyselým alkoholem. Metafáze jsme hodnotili v G a R pruhování pomocí programu Ikaros v. 5.0 (MetaSystems, USA). Poslední vzorek jednotlivé linie KBZP/SHED byl vyšetřen po dosažení Hayflickova limitu. Karyotyp KBZP jsme v průběhu dlouhodobé kultivace vyšetřovali opakovaně u 20 posledních linií, karyotyp SHED byl vyšetřen u všech třech získaných linií.

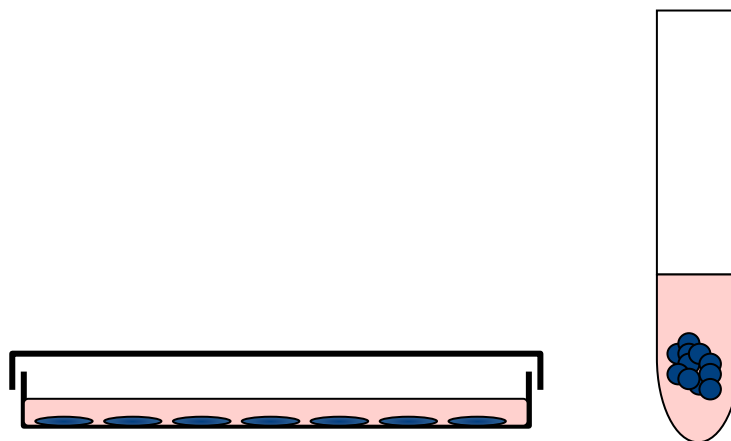
4.5.5 Analýza buněčného cyklu

Detekce fází buněčného cyklu byla provedena pomocí COULTER® DNA PREP™ Reagents Kitu (Beckman Coulter, USA) dle návodu výrobce. KBZP/SHED byly fixovány etanolem, poté při pokojové teplotě po dobu 5 minut inkubovány v roztoku (192 ml 0,2 mol/l Na_2HPO_4 + 8 ml 0,1 mol/l kyseliny citrónové, pH 7,8) a vystaveny působení

propidium jodidu po dobu 60 minut při 37 °C. DNA byla značena pomocí cyclinA2/7AAD a p-H3/PI (Beckman Coulter) dle pokynů výrobce.

4.6 Diferenciace KBZP a SHED

K ověření schopnosti diferenciace KBZP a SHED ve zralé buněčné elementy jsme použili diferenciační protokoly publikované jinými autory (30, 48, 49). KBZP/SHED byly vystaveny působení diferenciačního média po dosažení 70% splývavosti. Buňky jsme diferencovali jak ve formě monolayeru (přisedlé na dno standardní kultivační nádoby), tak i ve formě trojrozměrných útvarů (sféroidů) vzniklých spontánní sedimentací (v nádobách s nepřilnavým povrchem) (Obr. 17).



Obr. 17: Schéma diferenciace MKB ve formě monolayeru a trojrozměrných sféroidů.

4.6.1 Osteogenní diferenciace (viz příloha 9.8.1 - SOP 4.1)

Pro osteogenní diferenciaci jsme použili standardní osteodiferenciační médium složeného z α -MEM (Invitrogen, USA) s 10 % FCS (PAA, USA), 0,2 mM kyseliny L-askorbové (Sigma, USA), 10 mM β -glycerolfosfátu (Sigma, USA), 0,1 μ M dexametazonu (Invitrogen, USA). Diferenciace probíhala jak ve formě monolayeru, tak ve formě sféroidů. KBZP/SHED byly vystaveny působení osteodiferenciačního média po dobu 4 týdnů (30).

4.6.2 Chondrogenní diferenciaci (viz příloha 9.8.2 - SOP 4.2)

Pro chondrogenní diferenciaci jsme použili základní kultivační médium bez růstových faktorů (PDGF, EGF a FCS) obohacené o 50 ng/ml Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (Invitrogen, USA). Buňky byly diferencovány ve formě sféroidů. Kultivační médium bylo měněno každý třetí den. KBZP/SHED byly v chondrodiferenciačním médiu kultivovány 2-4 týdny (43).

4.6.3 Adipogenní diferenciaci (viz příloha 9.8.3 - SOP 4.3)

Pro diferenciaci v adipocyty jsme použili základní médium s 10 % FCS s přidavkem 0,1 μ M/l dexametazonu (Sigma, USA), 100 ng/ml inzulinu (Sigma, USA) a 100 ng/ml indometacinu (Sigma, USA). Diferenciační médium jsme aplikovali po dosažení 70% splývavosti v buněčné kultuře. Následně docházelo k výměně média každý třetí den. KBZP a SHED byly v tomto diferenciačním médiu kultivovány po dobu 4 týdnů (44).

4.6.4 Histologické zpracování vzorku

Po 4 týdnech byly buňky pomocí cell-scraperu uvolněny od povrchu kultivační nádoby. Takto získaný materiál byl fixován 10% formaldehydem a zalit do parafinu. Parafinový bloček byl nakrájen na 5-6 μ m silné řezy. Parafin z preparátů byl odstraněn pomocí xylolu a vzorky byly opět hydratovány v roztoku etanolu (96 %, 80 % a 70 %).

Buňky kultivované na nepřilnavém povrchu byly fixovány 4% roztokem paraformaldehydu v PBS (Invitrogen, USA) po dobu 30 minut. Fixovaný preparát byl poté vystaven působení 20% roztoku sacharózy v PBS (Invitrogen, USA) po dobu 2 hodin a zalit do TissueTekR OCT™ compound (Sakura Finetek, Nizozemí). Kryo řezy byly nanесeny na podložní sklíčko ošetřené pomocí 3-aminopropyltriethoxysilanu (APES) (Sigma, USA) a ponořeny do 0,1% roztoku Triton X-100 na 10 minut.

Pro průkaz osteogenní diferenciaci KBZP a SHED jsme použili barvení pomocí zeleného a modrého Massonova trichromu, toluidinové modři a dle Ladewiga pro průkaz kolagenu typu I, prokolagenu a osteomu.

Chodrogenní diferenciaci KBZP jsme prokazovali pomocí histologických metod barvení alcianovou modří (modré barvení mukopolysacharidů) a pomocí imunocytochemie použité k detekci kolagenu typu II.

Pro průkaz adipogenní diferenciaci jsme použili barvení pomocí olejové červeně.

4.7 Měření délky telomer KBZP

DNA byla z KBZP izolována pomocí silica-gel-membrane-based DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Austrálie). Délka telomer byla stanovena pomocí qPCR sondy. Poměr T/S (poměr opakování počtu kopií telomer na jednu kopii genu) byl stanoven pomocí rovnice $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ (kde $\Delta Ct = Ct_{\text{telomer}} - Ct_{\text{jedné kopie genu}}$). 36B4, gen kódující kyselý fosfoprotein P0, byl použit jako $Ct_{\text{jedné kopie genu}}$. PCR genu 36B4 a telomer bylo provedeno v 96jamkových destičkách na ABI 7500 HT Detection System (Applied Biosystems, USA). Na 20 μ l reakčního roztoku připadalo 20 g DNA, 1 \times SYBR Green master mix (Applied Biosystems, USA), 200 nM *telomer forward primer* (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), 200 nM *telomer reverse primer* (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT). Pro PCR genu 36B4 byly použity primery: 36B4u, CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; 36B4d, CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA. Cykly PCR telomer a 36B4 genu byly 1 \times 10 min při 95 °C a 40 \times 15 s při 60 °C a 1 min při 60 °C. T/S každého vzorku byl poté porovnán s T/S referenčního vzorku DNA (Du145 nádorové buňky CA prostaty). Pomocí vzorce $\Delta \Delta Ct$ jsme získali průměrnou délku telomer v jednotlivých vzorcích (50).

4.8 Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP

V tomto experimentu byly použity KBZP z 4.-7. pasáže. KBZP byly kultivovány v médiu s 2 % FCS (ITS suplement byl z média vyřazen pro svoje radioprotektivní účinky). Po dosažení 50% splývavosti byly KBZP ozářeny pomocí zdroje gama záření ^{60}Co o dávce 3Gy/min. KBZP byly vystaveny celkové dávce 3, 6 a 20 Gy. Poté byly opět kultivovány za standardních kultivačních podmínek. Expanzní médium bylo doplňováno každé 4 dny a buňky kontroly v případě dosažení 70% splývavosti pasážovány. Viabilita a proliferační aktivita byly měřeny pomocí přístroje Z2-Counter (Beckman Coulter, USA) a Vi-Cell analyzer (Beckman Coulter, USA).

Pro sledování apoptózy jsme použili průtokový cytometr Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA), buňky byly značeny pomocí Apoptest-FITC kit (DakoCytomation, Dánsko)

dle pokynů výrobce. Aktivace kaspázy-3 byla detekována pomocí anti-cleaved Caspase-3 (Asp175) (Beckman Coulter, USA) dle pokynů výrobce.

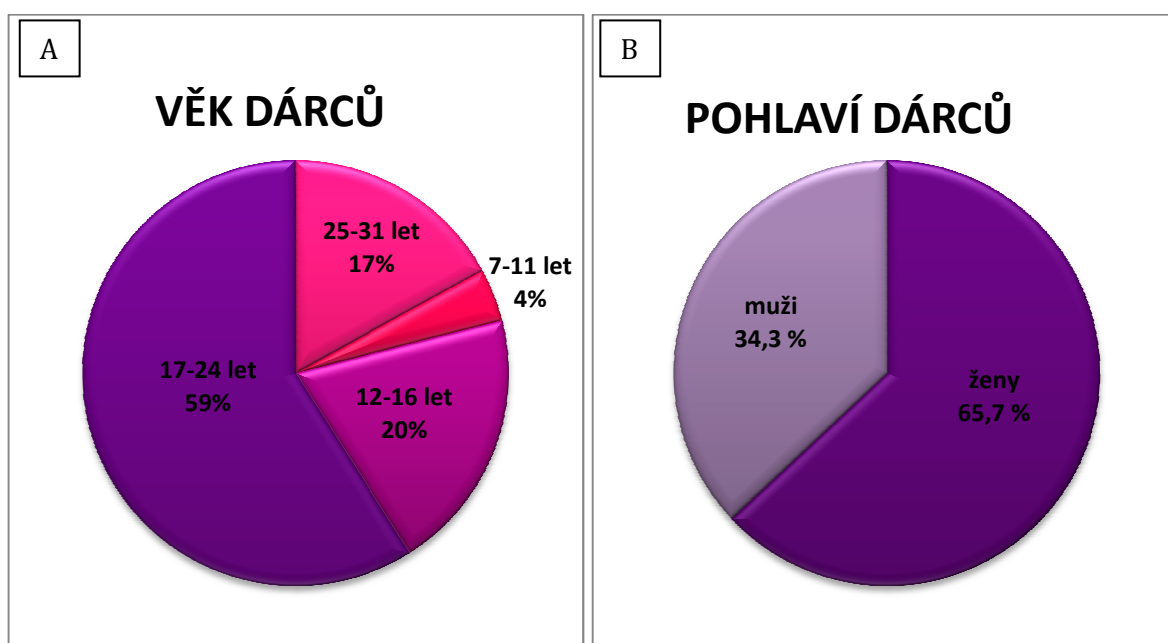
V průběhu experimentu byly KBZP opakovaně analyzovány pomocí metody western blot a elektroforézy. KBZP byly lyzovány pomocí Cell Lysis buffer (Cell Signaling Technology, USA). Po separaci proteinů pomocí elektroforézy byly vzorky přeneseny na PVDF membránu (Bio-Rad, USA) a přes noc inkubovány s primární protilátkou p53_serine392 (Exbio, ČR), β -aktinem (Sigma, USA) a p53_serinem (Calbiochem-Merck, USA) při 4 °C. Po oplachu byla membrána jednu hodinu inkubována se sekundární protilátkou (DakoCytomation, Dánsko) při pokojové teplotě. Signál byl vyvolán pomocí chemiluminiscence Detection Kit (Roche, Švýcarsko) (51).

5. Výsledky

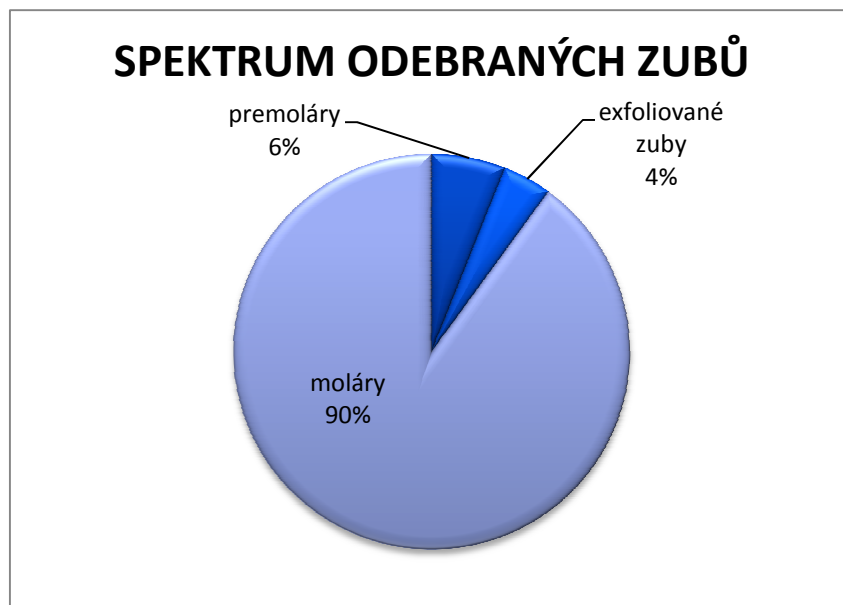
5.1 Dárci zubní dřevě

5.1.1 Spektrum dárců

Celkem jsme ZP izolovali ze 67 stálých zubů a 3 zubů dočasných (Graf 1 A). Věkový průměr dárců stálých zubů byl 20,2 roku (12-31) (Graf 1 B), ve skupině převládaly ženy (65,7 %) (Graf 2). Dočasné zuby byly získány od dvou dívek a jednoho chlapce ve věku od 7 do 9 let; jednalo se o jeden dočasný řezák a dva dočasné moláry.



Graf 1: A) Rozložení věkových skupin dárců. Věk 7 -11 let dočasné zuby, 12-16 let zuby s nedokončeným vývojem kořene. Ve věkových skupinách 17-24 let a 25-31 let byly všemi izolovanými zuby třetí moláry s dokončeným vývojem kořene. B) Procentuální zastoupení mužů (34,3 % = 24 jedinců) a žen (65,7 % = 46 jedinců) mezi dárci.



Graf 2: Procentuální zastoupení zubů přijatých do studie.

5.2 Izolace zubní dřeně z *cavum pulpae*

5.2.1 Stálé zuby s nedokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v pokročilé fázi resorpce

Izolace ZP ze zubů se široce otevřeným *foramen apicale*, nebo u zubů, kde vývoj zubního kořene ještě nezapočal, event. kořen byl již částečně resorbován, byly úspěšné. Celkem jsme tímto postupem izolovali ZP z 5 zubů a ve 4 případech byla izolace úspěšná. Nevýhodou této metody je nutnost velmi široce otevřeného *foramen apicale*. Tímto dochází k výraznému snížení počtu dárců. Nejčastěji (ve 4 případech) se jednalo o první premoláry extrahované z ortodontických důvodů u dětí mezi 11. a 13. rokem. Jedna linie byla izolována z dolního třetího moláru, který byl extrahován též z ortodontických důvodů, od dárce ve věku 12 let.

5.2.2 Stálé zuby s dokončeným vývojem kořene, dočasné zuby v počáteční fázi resorpce

5.2.2.1 Izolace ZP pomocí diamantového kotouče, nebo Battova vrtáku

Přístupy využívající rotační nástroje, ať už diamantový kotouč a vertikální řez, nebo diamantový brousek a horizontální řez, se ukázaly jako nevhodné. Během izolace ZP došlo pravděpodobně k jejímu mechanickému a termickému poškození, což se výrazně projevilo na úspěšnosti izolace KBZP. Dalším negativním dopadem tohoto postupu byla častá kontaminace plísní. Je pravděpodobné, že se tak stalo během manipulace se ZP mimo laminární box, kde došlo k přenosu infekce na tkáň ZP. Z tohoto důvodu musely být kultury dekontaminovány a ukončeny. Celkem jsme tímto postupem izolovali ZP z 10 zubů; pouze tři izolace byly úspěšné. Z těchto tří linií KBZP musely být dvě ukončeny pro mikrobiální kontaminaci. Vzhledem k výše uvedenému nebyla metoda dále používána a rozvíjena.

5.2.2.2 Izolace ZP pomocí Luerových kleští

Izolace ZP rozštípáním kořene zubu pomocí Luerových kleští byla úspěšná celkem v 10 ze 12 případů. Tento přístup chrání ZP před termickým poškozením. K mechanickému poškození dochází pouze u malé části ZP lokalizované uvnitř kořenových kanálků, ale i té je možno se vyvarovat, pokud pomocí tenké sondy ZP z kořenových kanálků zatlačíme do *cavum pulpaе*. Na rozdíl od předchozích metod celý proces izolace ZP probíhá za sterilních podmínek v laminárním boxu, což výrazně snižuje riziko kontaminace vzorku. Zásadním přínosem této metody je rozšíření potenciální skupiny dárců i na jedince s již dokončeným vývojem kořenového systému.

Izolace KBZP ze zubů s téměř, nebo úplně dokončeným vývojem zubního kořene pomocí Luerových kleští byla zvolena jako standardní metoda pro izolaci ZP. Tento postup byl využit i pro linie SHED v dalších experimentech (viz příloha 9.7.1).

5.3 Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy

5.3.1 Izolace KBZP z SO a PV kompartmentu ZP

Izolace KBZP ze dvou kompartmentů (SO a PV) pomocí enzymatického štěpení byla úspěšná celkem v 7 z 10 případů. KBZP izolované z SO a PV zóny vykazovali velmi podobné

vlastnosti, proto jsme tuto metodu opustili. Jako standardní metodu pro další experimenty jsme zvolili izolaci směsné linie KBZP (viz příloha 9.7.2).

5.3.2 Izolace směsné linie KBZP a SHED

Mechanická izolace KBZP pomocí homogenizátoru se ukázala jako nevyhovující. Celkem jsme se takto pokusili izolovat KBZP ve čtyřech případech a nezachytili jsme ani jednu linii KBZP. Úspěšnost izolace KBZP výrazně stoupla při užití metody enzymatického štěpení. Pro získání směsné linie KBZP jsme ZP rozstříhali na malé části (cca 1 mm v průměru), což umožnilo vystavit buňky působení enzymů po kratší dobu (do 50 minut). Při tomto postupu jsme úspěšně izolovali 10 linií KBZP z 10 vzorků zubní pulpy.

Jako standardní metodu pro další experimenty jsme tedy zvolili izolaci směsné linie KBZP, kdy byla ZP rozstříhána na menší části a vystavena působení enzymů po dobu cca 50 minut (viz příloha 9.7.2). Po nasazení do kultivační nádoby pro primokulturu jsme získali 46 ± 6 (10 – 108) CFU. Efektivita nasazení KBZP (PEf) byla $73,5 \pm 2,3$ % (68,1 % – 79,7 %). Viabilita kultivovaných buněk byla dlouhodobě 96 ± 3 % (89 % - 100 %).

Vzhledem k menšímu počtu vhodných dárců dočasných zubů jsme pro izolaci SHED použili pouze standardní metodu pro izolaci KBZP (viz příloha 9.7.2). Celkem jsme získali tři linie SHED od třech dárců ve věku 7 - 9 let.

5.4 Kultivační podmínky pro KBZP a SHED

5.4.1 Kultivace KBZP

Pro kultivační experimenty jsme celkem izolovali 16 linií KBZP. Čtyři linie KBZP byly kultivovány v médiu s 2 % FCS a čtyři linie v médiu s 10 % FCS, v médiu s 2 % FCS + ITS jsme kultivovali osm linií KBZP.

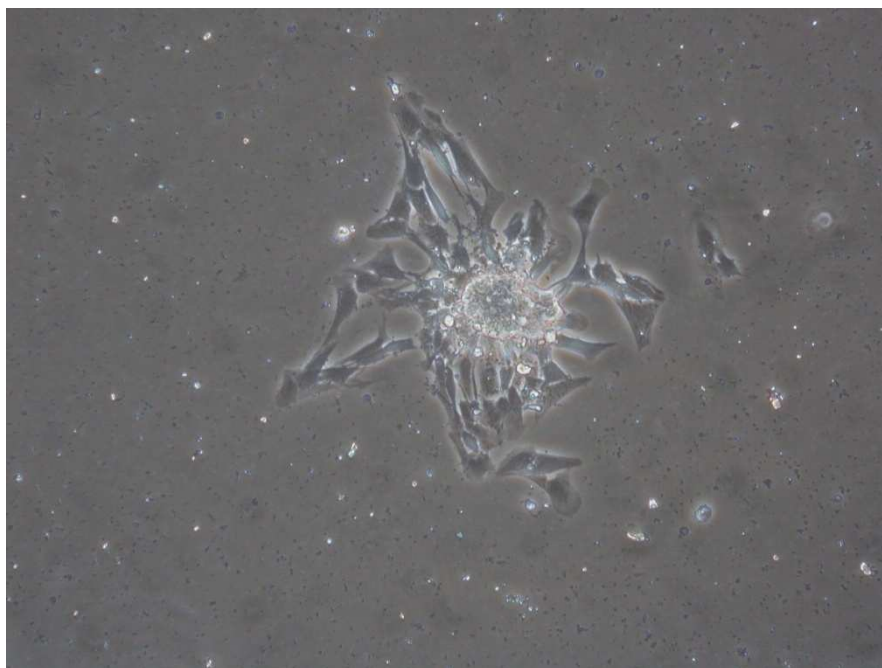
Kultivace KBZP ve všech třech kultivačních médiích probíhala za stejných podmínek (viz příloha 9.7.3). 24 hodin po nasazení do primokultury proběhla výměna kultivačního média, čímž jsme odstranili zbytky měkkých tkání ZP (Obr. 18). V této době bylo již možné pozorovat jednotlivé přisedlé buňky, popř. malé kolonie čítající 2 - 5 buněk (Obr. 19). Po sedmi dnech, když kolonie čítaly okolo 20 až 50 buněk (Obr. 20), byla primokultura pasážována. Následné pasáže probíhaly po dosažení 70% splývavosti (Obr. 21).



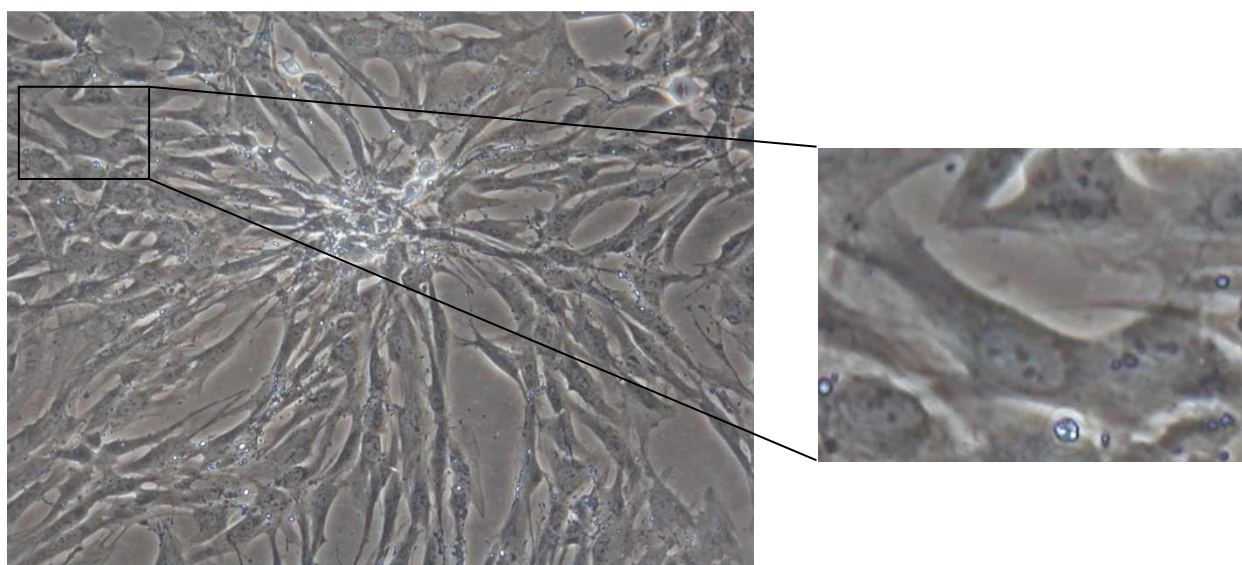
Obr. 18: Zbytky měkkých tkání ZP 24 hodin po nasazení. Šipky označují erytrocyt a zbytek cévy. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



Obr. 19: KBZP 24 hodin po nasazení a výměně média. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



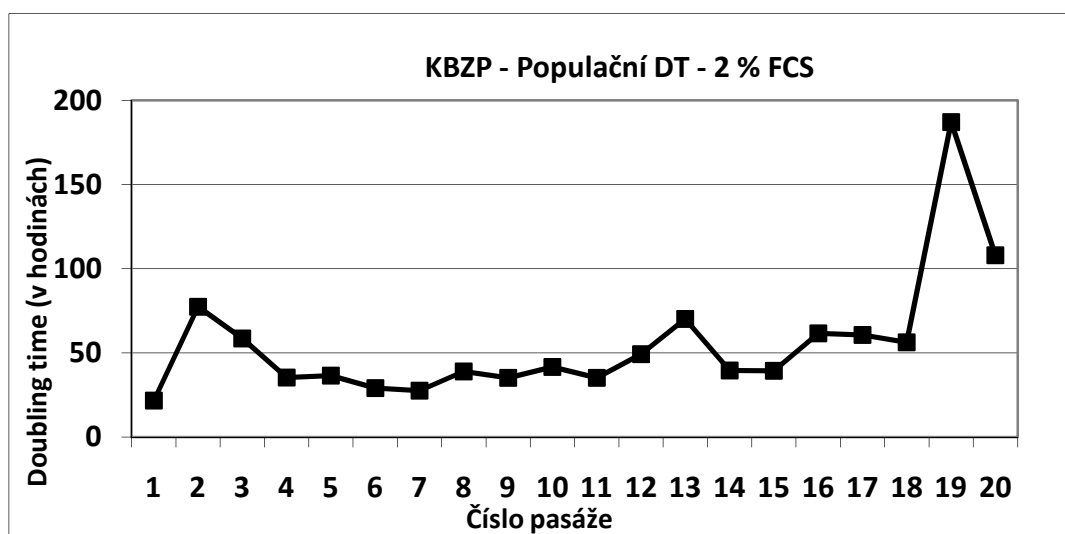
Obr. 20: Kolonie KBZP čítající cca 50 buněk 7 dní po nasazení. Primokultura je připravena na 1. pasáž. Buňky se koncentrují okolo krystalu TZT odlomeného během izolace ZP. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



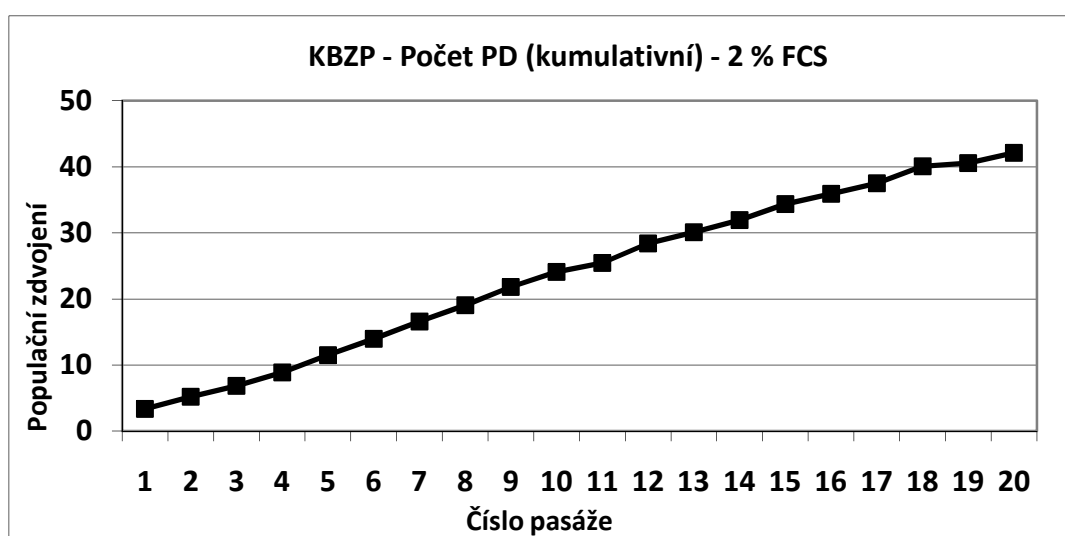
Obr 21: KBZP v 1. pasáži po dosažení 70% splývavosti. Linie připravena na další pasáž. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.

5.4.1.1 Kultivace KBZP v médiu s 2 % FCS

KBZP kultivované v médiu s 2 % FCS jsme expandovali přes 42 populačních zdvojení (tzv. population doubling - PD). Průměrný čas potřebný pro zdvojení populace (tzv. doubling time - DT) byl 55,4 hodin. DT pro prvních 21 PD byl 40 (21,6 – 77,3) hodin a poté stoupl na 68 hodin (35,1 – 187) (Graf 3, 4). Viabilita KBZP v 9. pasáži (21,8 PD) byla více než 90 %. Distribuce průměrů byla v průběhu kultivace stabilní. Dominantní populace měla 12,5 – 17,1 μm v průměru.



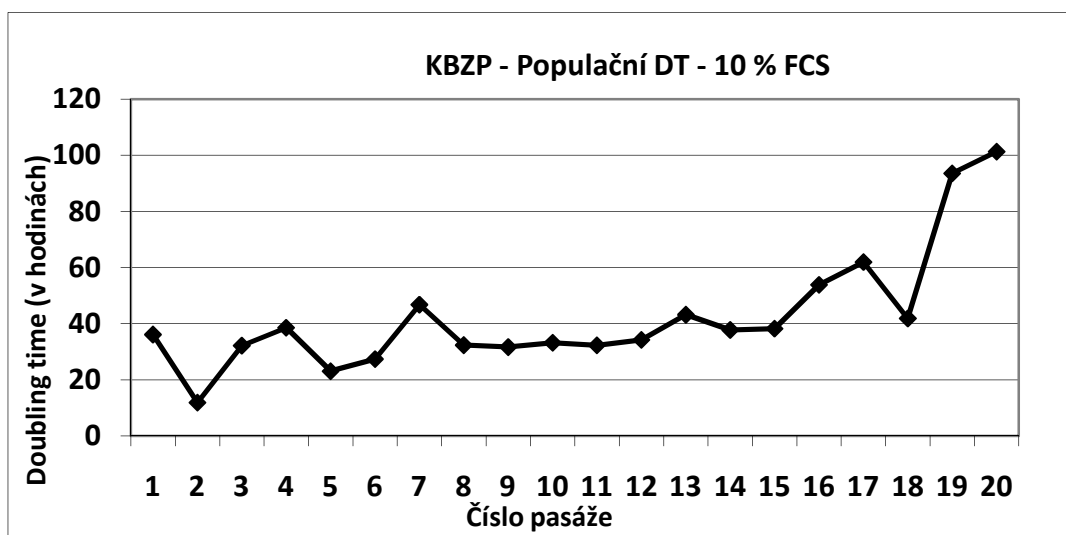
Graf 3: Proliferační aktivita KBZP kultivovaných v médiu s 2 % FCS. Doubling time v průběhu dlouhodobé kultivace značně kolísal (21 – 187 hodin).



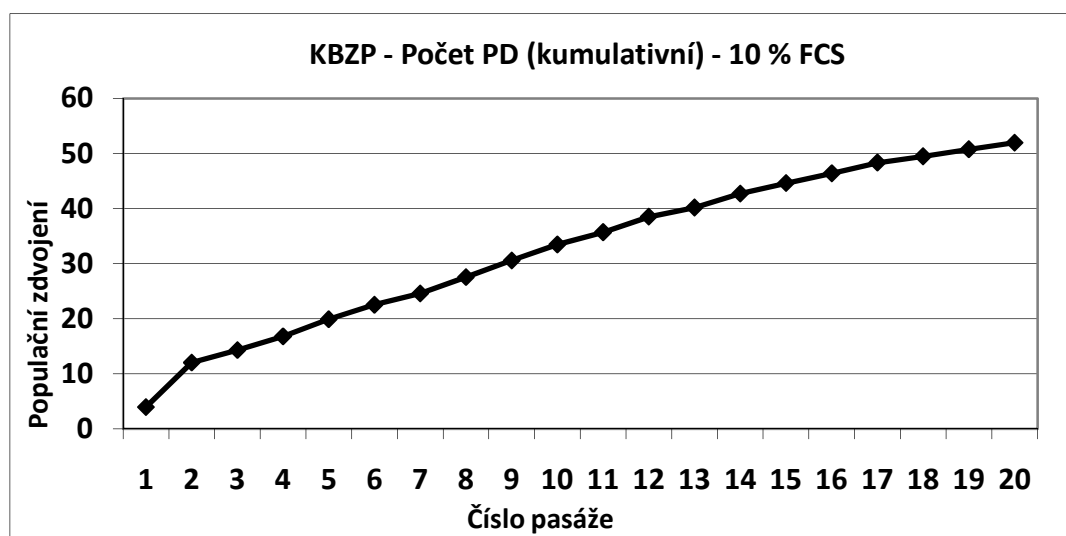
Graf 4: Kumulativní počet populačních zdvojení dosažený v médiu s 2 % FCS. Celkem jsme dosáhli 42 populačních zdvojení.

5.4.1.2 Kultivace KBZP v médiu s 10 % FCS

V médiu s 10 % FCS jsme byli schopni expandovat KBZP přes 51 PD a průměrný DT byl 42,6 hodin. Pro prvních 28 PD byl 31 (11,9 – 46,7) hodin, po překročení 28 PD stoupl na 50,2 (31,6 – 101) hodin (Graf 5, 6). Viabilita KBZP v 9. pasáži (31 PD) byla přes 90 %. Dominantní populace KBZP kultivovaných v médiu s 10 % FCS měla 12,2 – 16,6 μm v průměru.



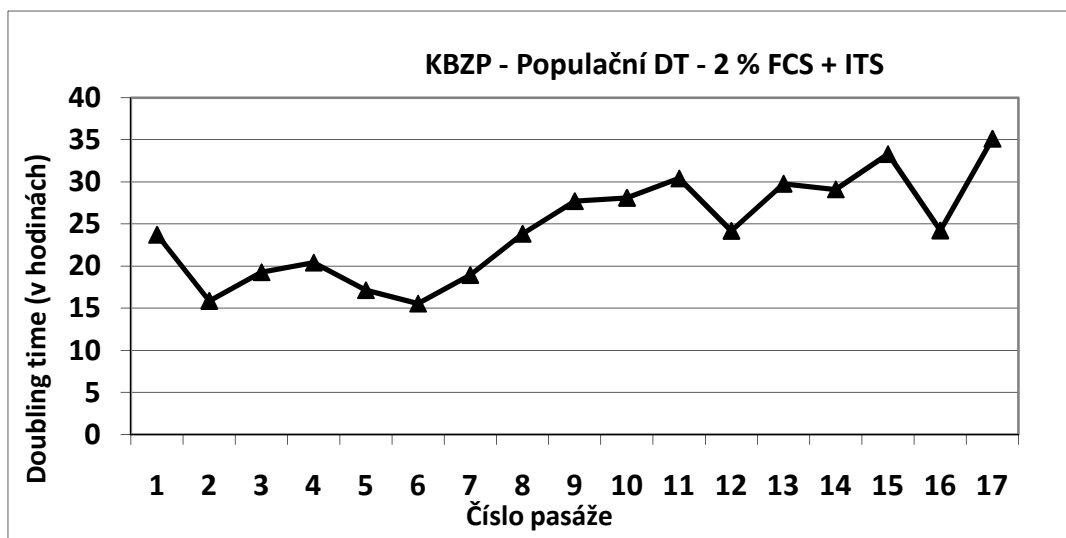
Graf 5: Proliferační aktivita KBZP kultivovaných v médiu s 10 % FCS. Doubling time v průběhu dlouhodobé kultivace kolísala (12 – 101 hodin).



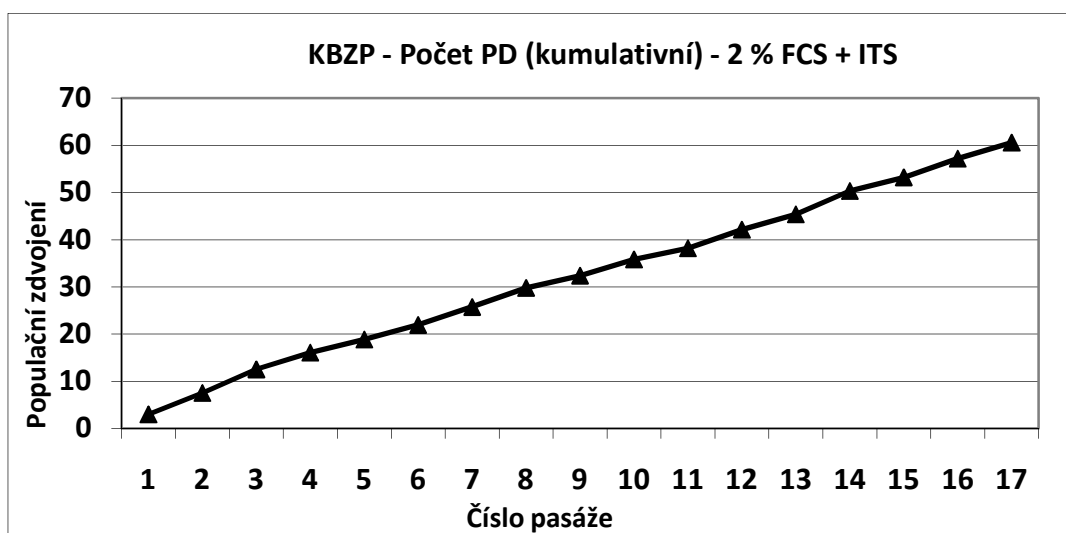
Graf 6: Kumulativní počet populačních zdvojení dosažený v médiu s 10 % FCS. Celkem jsme dosáhli více než 51 populačních zdvojení.

5.4.1.3 Kultivace KBZP v médiu s 2 % FCS + ITS

KBZP kultivované v médiu s 2 % FCS + ITS dosáhly více jak 60 PD. Průměrný DT byl 24,5 hodiny. Pro prvních 29 PD byl DT 19,3 (15,5 – 23,8) hodin, po překročení 29 PD stoupl na 29,1 (24,2 – 35,1) hodin (Graf 7, 8). Viabilita KBZP v 9. pasáži byla přes 90 %. Dominantní populace KBZP kultivovaných v médiu s 2 % FCS + ITS měla 14,3 – 16,1 μm v průměru.



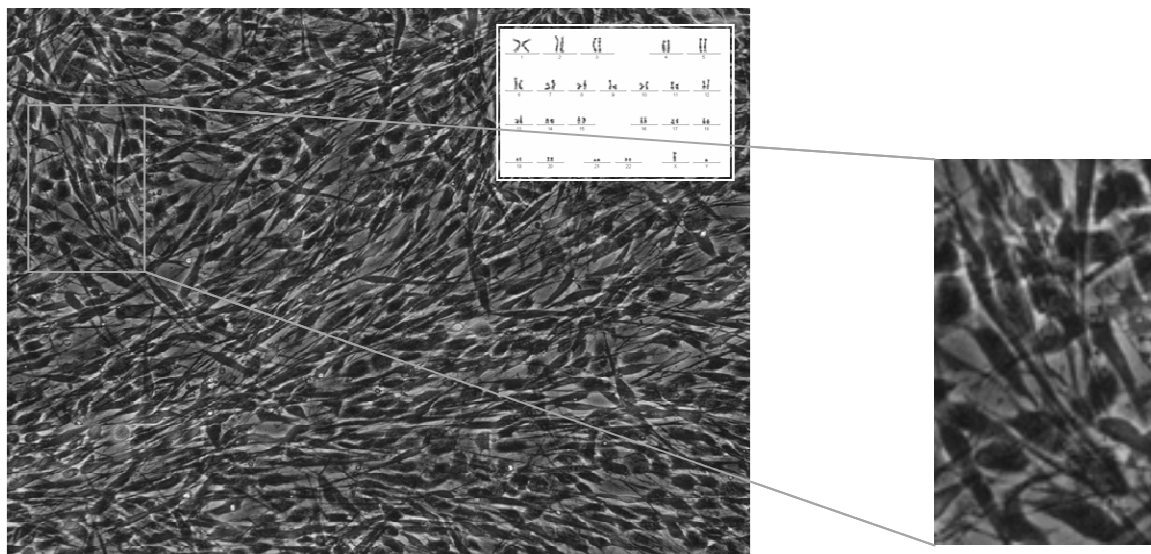
Graf 7: Proliferační aktivita KBZP kultivovaných v médiu s 2 % FCS + ITS. Doubling time byl v průběhu dlouhodobé kultivace stabilní (16 – 35 hodin).



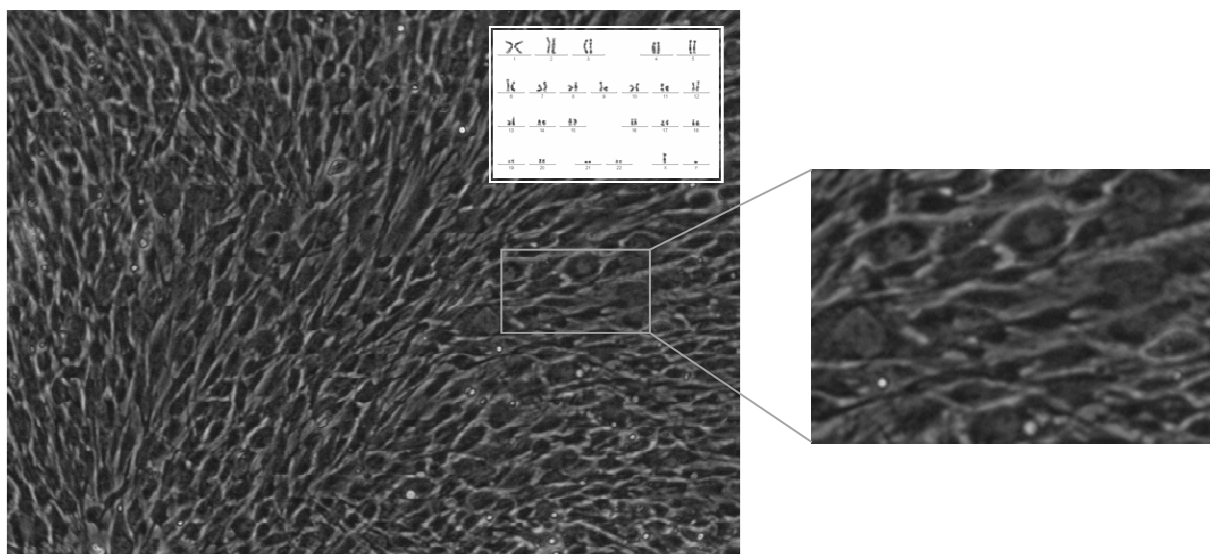
Graf 8: Kumulativní počet populačních zdvojení dosažený v médiu s 2 % FCS + ITS. Celkem jsme dosáhli více než 60 populačních zdvojení.

5.4.1.4 Kultivace KBZP z SO a PV zóny v médiu s 10 % FCS

V průběhu kultivace KBZP z SO a PV zóny jsme pozorovali morfologické rozdíly těchto dvou populací. Kmenové buňky izolované z PV zóny byly vřetenovité s mnoha výběžky (Obr. 22) oproti KBZP izolovaných z SO zóny, které byly zakulacené (Obr. 23). Tento morfologický rozdíl nebyl spojen s jinou biologickou vlastností. Obě linie vykazovaly stejnou distribuci průměrů a proliferační aktivitu.



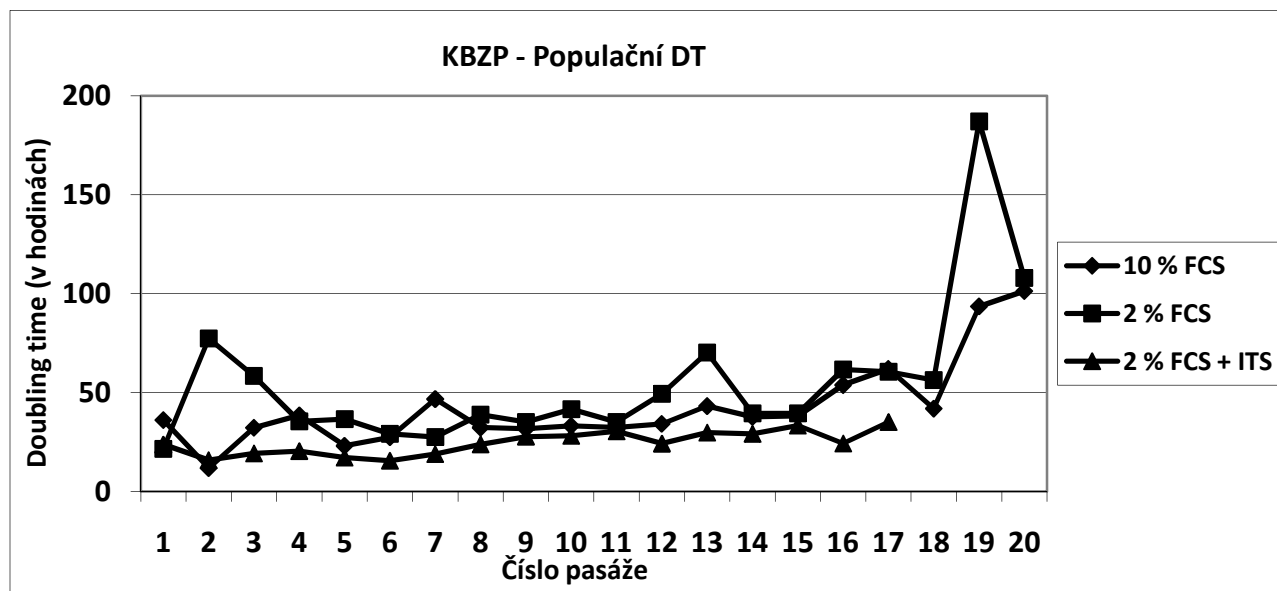
Obr. 22: KBZP izolované z PV kompartmentu. Buňky v 9. pasáži vykazovaly normální karyotyp. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



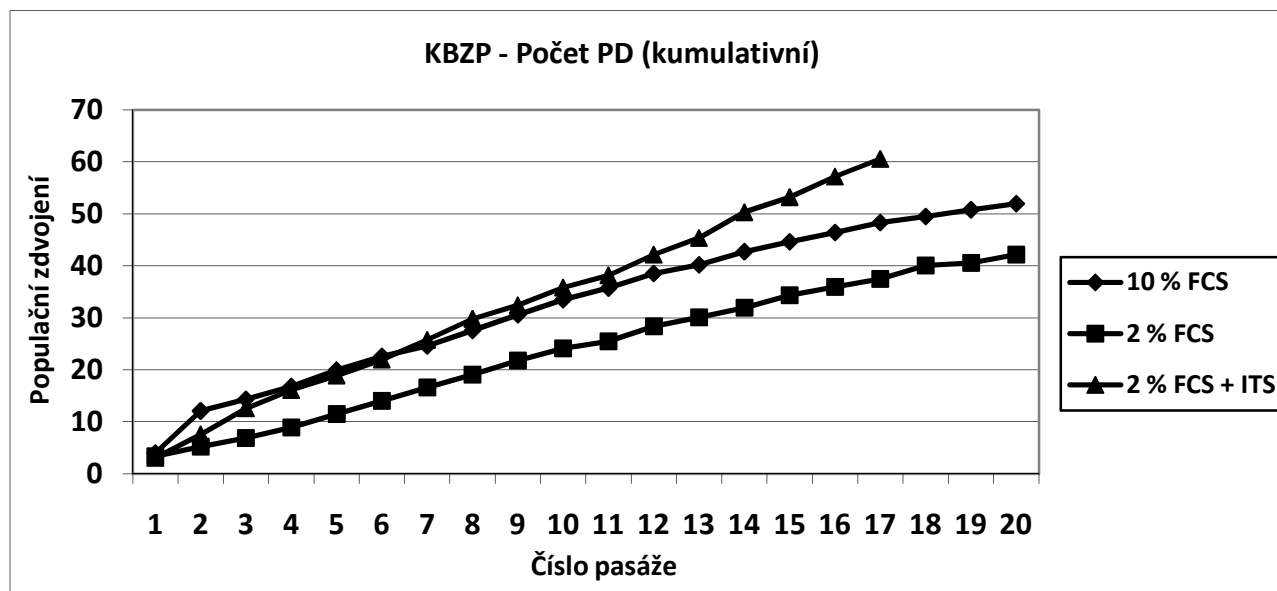
Obr. 23: KBZP izolované z SO kompartmentu. Buňky jsou v 9. pasáži vykazovaly normální karyotyp. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.

5.4.1.5 Porovnání kultivačních médií pro KBZP s 2 % FCS, 10 % FCS, 2 % FCS + ITS

Z porovnání grafů 9 a 10 je zřejmé, že KBZP kultivované v médiu obohaceném o ITS měly nejvyšší proliferační aktivitu a nejstabilnější populační DT.



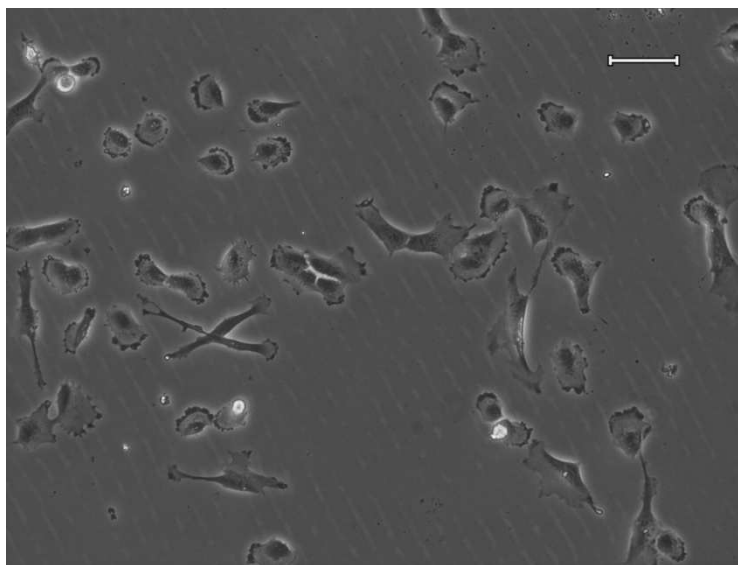
Graf 9: Proliferační aktivita KBZP kultivovaných ve třech rozdílných médiích. KBZP kultivované v médiu s ITS suplementem měly kratší doubling time, který v průběhu kultivace pouze mírně stoupal.



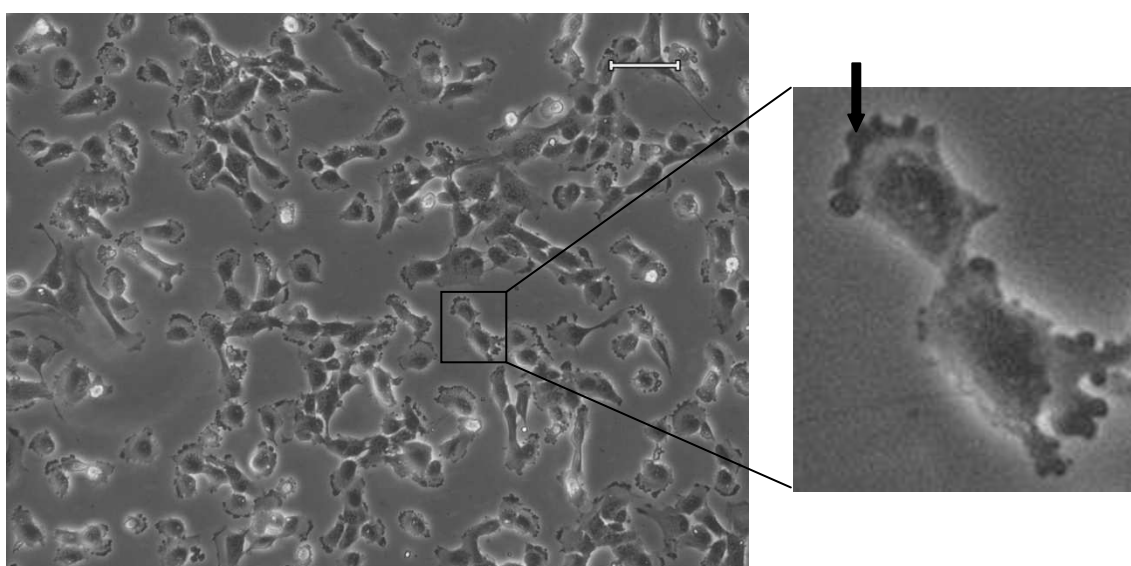
Graf 10: Celkový počet populačních zdvojení dosažený v jednotlivých kultivačních médiích. KBZP kultivované v médiu s ITS suplementem dosáhly 60 populačních zdvojení již v 17. pasáži.

5.4.2 Kultivace SHED

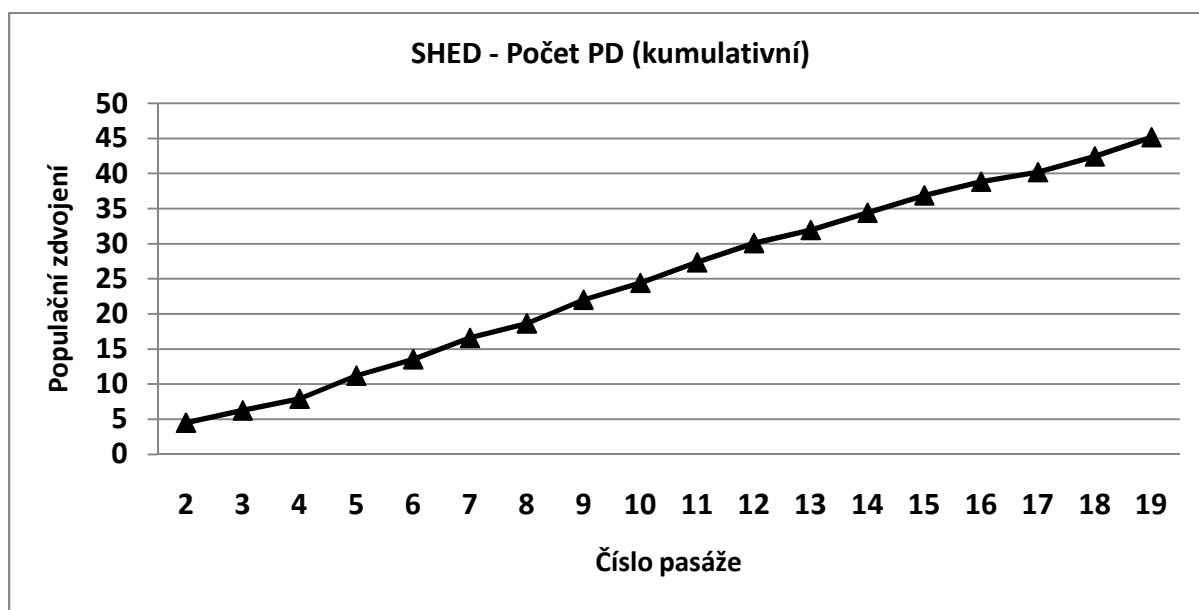
Izolované linie SHED byly kultivovány v médiu s 2 % FCS obohaceném o ITS suplement. V porovnání s KBZP byly SHED spíše okrouhlé, bez výběžků (Obr. 24, 25). U linií SHED jsme prokázali více než 45 PD (Graf 11). Průměrný doubling time byl 41,2 hodin. Pro prvních 24 PD byl DT 28,4 (21,3 – 34,6) hodiny. Po dosažení 24 PD se DT prodloužil na 54,12 (32,7 - 97,3) hodin (Graf 12). Průměrná viabilita SHED v průběhu dlouhodobé kultivace byla 90,6 % (86,0 - 94,0 %). Dominantní populace měla 12,2-16,4 μm v průměru.



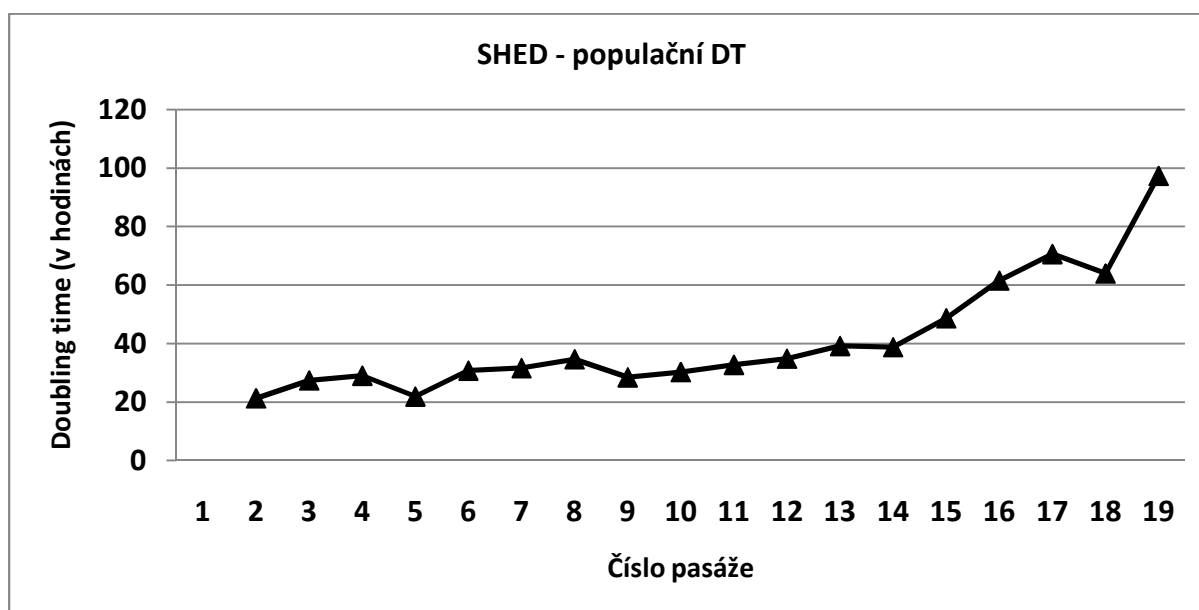
Obr. 24: Kolonie SHED v primokultuře 5 dní po izolaci. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



Obr. 25: SHED v 1. pasáži, 70% splývavost. Mikroskop s fázovým kontrastem, zvětšení 200x. Šipka označuje pseudopodium.



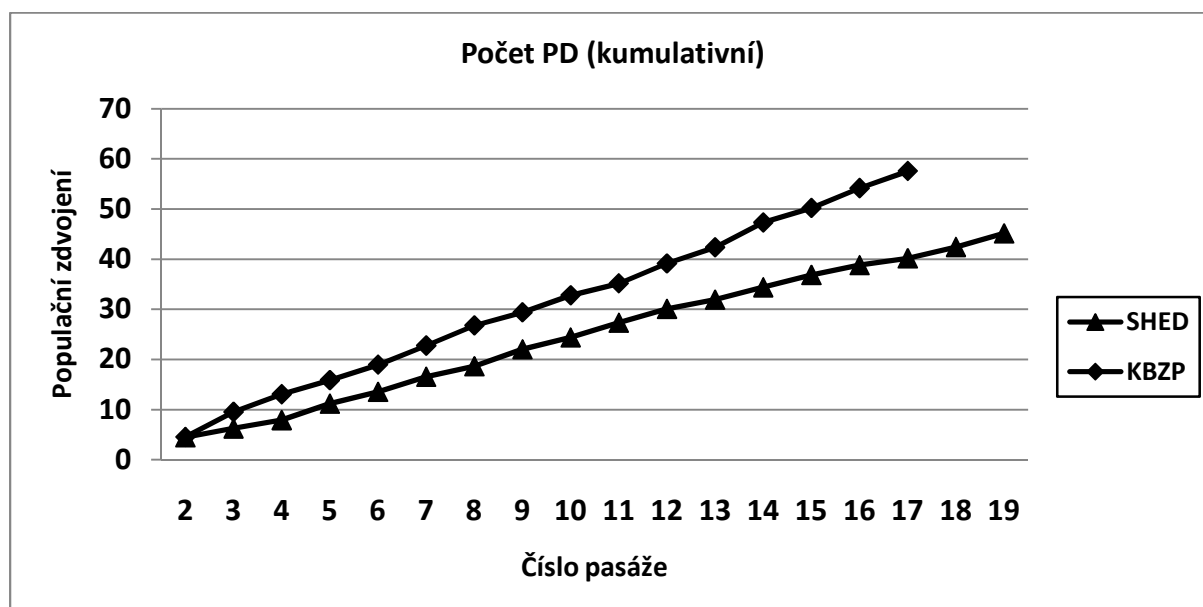
Graf 11: Od 2. do 19. pasáže jsme s SHED dosáhli celkem 45 PD.



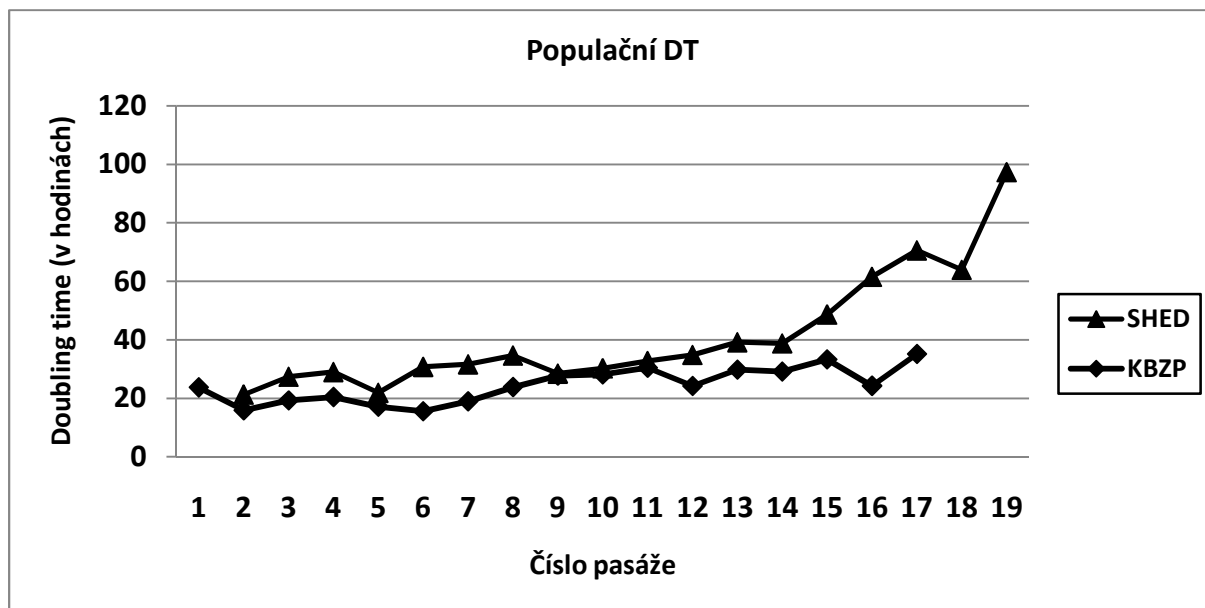
Graf 12: Proliferační aktivita SHED v průběhu kultivace klesala, což se projevilo prodloužením doubling time.

5.4.3 Porovnání SHED a KBZP v kulturačním médiu s 2 % FCS + ITS

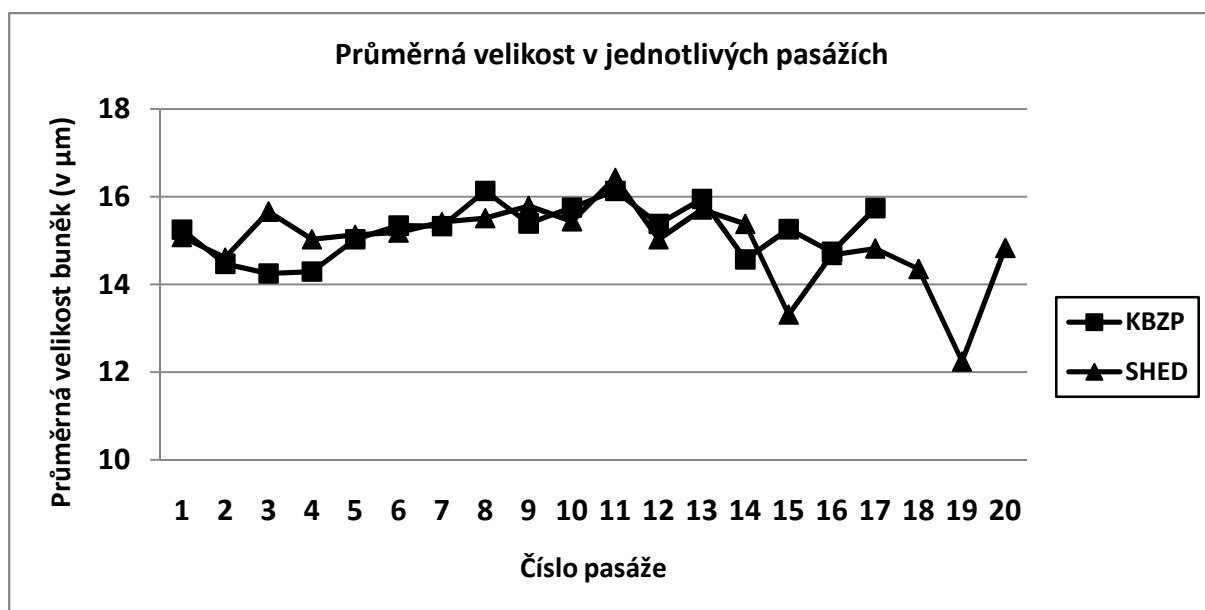
Proliferační aktivita SHED ve srovnání s KBZP kultivovanými v médiu s 2 % FCS a ITS byla nižší (Graf 13). Tomuto odpovídá i srovnání DT KBZP s DT SHED. SHED měly vyšší průměrný DT - 60,8 hodin (21,3 - 97,3) - ve srovnání s KBZP – jejichž průměrný DT byl 24,5 hodiny (15,6 - 35,1). Pro prvních 24 PD SHED byl DT (28,4 hodin) o 33 % vyšší než DT KBZP (19,3 hodin). Po dosažení 24 PD se DT SHED zvýšil na 54,2 hodiny, zatímco se DT KBZP zvýšil pouze na 29,1 hodiny (Graf 14). Průměr velikosti obou našich testovaných linií kmenových buněk byl srovnatelný (SHED 15,0 μm a KBZP 15,2 μm). Distribuce velikosti SHED odpovídá delšímu intervalu (12,2 - 16,4 μm) ve srovnání s KBZP (14,3 - 16,1 μm) (Graf 15).



Graf 13: Porovnání kumulativního počtu populačních zdvojení SHED a KBZP. Obě linie kultivované v médiu s 2 % FCS + ITS supplement.



Graf 14: Porovnání proliferační aktivity SHED a KBZP. Obě linie kultivované v médiu s 2 % FCS + ITS suplement.



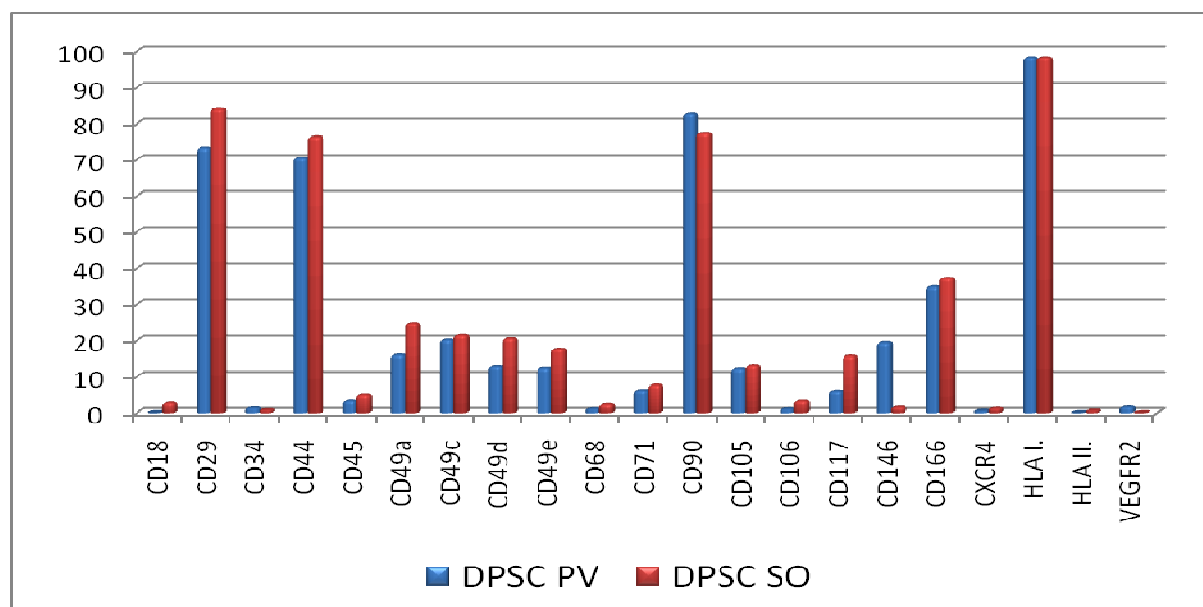
Graf 15: Porovnání velikosti SHED a KBZP. Obě linie kultivované v médiu s 2 % FCS + ITS suplement.

5.5. Charakterizace KBZP a SHED

5.5.1 Analýza fenotypu KBZP a SHED

5.5.1.1 Analýza fenotypu KBZP z SO a PV kompartmentu

KBZP izolované z SO a PV kompartmentu ZP byly kultivovány v médiu s 10 % FCS. Porovnáním fenotypu KBZP z PV a SO kompartmentu jsme našli pouze malé rozdíly mezi těmito liniemi. KBZP z SO zóny vykazovaly vysokou pozitivitu pro znaky CD 29 (84,1 %), CD 44 (76,4 %), CD 90 (77,4 %), HLA I (98,5%). Žádné znaky z námi testovaného panelu nebyly středně pozitivní. Nízkou pozitivitu vykazovaly pro CD 49a (24,9 %), CD 49c (21,6 %), CD 49d (20,7 %), CD 49e (17,8 %), CD 105 (13,2 %), CD 117 (15,8 %), CD 166 (37,4 %) a negativitu pro znaky CD 18 (2,9 %), CD 34 (0,8 %), CD 45 (5,1 %), CD 68 (2,5 %), CD 71 (7,8 %), CD 106 (3,4 %), CD 146 (1,7 %), CD 184 (1,3 %), HLA II (0,7 %). KBZP izolované z PV kompartmentu byly vysoce pozitivní pro CD 29 (73,4 %), CD 90 (82,4 %), HLA I (98,5 %), středně pozitivní pro CD 44 (70,5 %), nízké pozitivní pro znaky CD 49a (16,1 %), CD 49c (20,3 %), CD 49d (12,9 %), CD 49e (12,5 %), CD 105 (12,3 %), CD 146 (19,6 %), CD 166 (34,9 %) a negativní pro CD 18 (0,1 %), CD 34 (1,4 %), CD 45 (3,4 %), CD 68 (1,2 %), CD 71 (6,3 %), CD 106 (1,1 %), CD 117 (6,1 %), CD 184 (0,6 %), HLA II (0,1 %) (Graf 16, Příloha 9.9).



Graf 16: Porovnání fenotypu KBZP izolovaných z SO a PV kompartmentu.

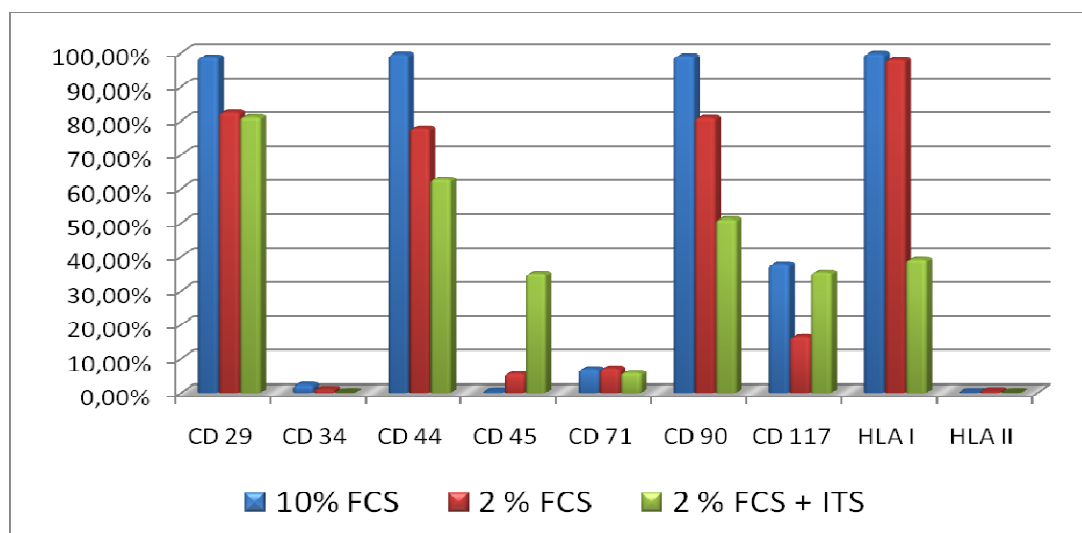
5.5.1.2 Analýza fenotypu směsné linie KBZP v testovaných médiích

Fenotypová analýza KBZP kultivovaných v médiu 2 % FCS ukázala vysokou pozitivitu těchto buněk pro CD 29 (82,4 %), CD 44 (77,9 %), CD 90 (80,9 %) a HLA I (98,0 %). Žádný z testovaných znaků nebyl v rozmezí pro střední pozitivitu. Znak CD 117 (16,4 %) byl níže pozitivní a znaky CD 34 (1,0 %), CD 45 (5,5 %), CD 71 (7,1 %), a HLA II (0,44 %) byly negativní (Graf 17).

Podobné výsledky jsme získali i u KBZP kultivovaných v médiu 10 % FCS. Vysoce pozitivní byly znaky CD 29 (98,8 %), CD 44 (99,6 %), CD 90 (99,1 %) a HLA I (99,8 %). Střední pozitivita byla pouze pro znak CD 117 (37,8 %) a znaky CD 34 (2,3 %), CD 45 (0,3 %), CD 71 (6,9 %) a HLA II (0,1 %) byly negativní (Graf 17).

Fenotypová analýza KBZP kultivovaných v médiu s ITS suplementem prokázala vysokou pozitivitu pro znak CD 29 (81,1 %), střední pozitivitu pro znaky CD 44 (62,7 %) a CD 90 (51,1 %). Znaky CD 45 (35,0 %), CD 117 (35,4 %) a HLA I (39,2 %) byly níže pozitivní a znaky CD 34 (0,0 %), CD 71 (5,8 %) a HLA II (0,0 %) byly negativní (Graf 17, Příloha 9.9).

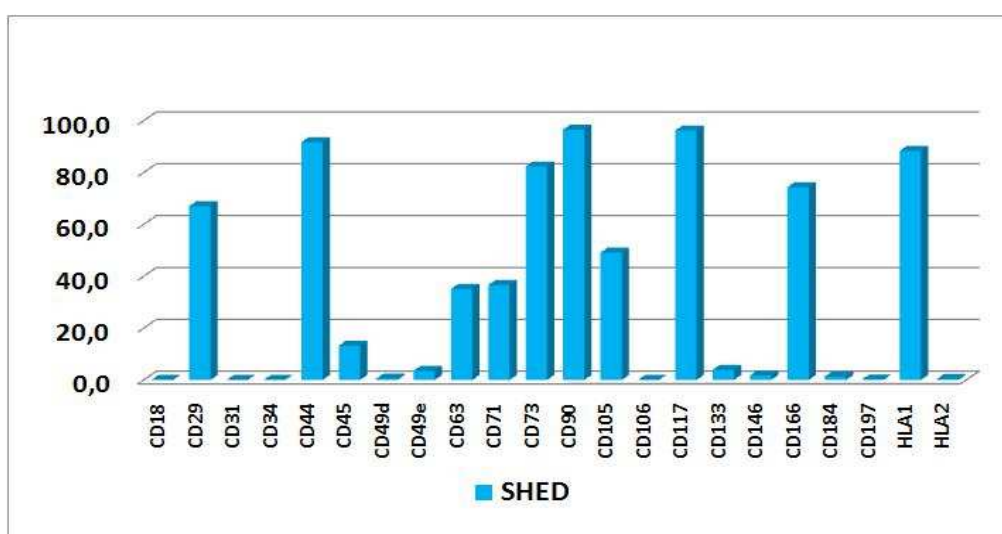
V průběhu dlouhodobé kultivace ve všech testovaných médiích byly KBZP cytogeneticky stabilní a nevykazovaly žádné známky spontánní diferenciace.



Graf 17: Porovnání fenotypu KBZP kultivovaných v rozdílných médiích.

5.5.1.3 Analýza fenotypu SHED

Fenotypová analýza SHED prokázala vysokou pozitivitu pro znaky CD 44 (91,7 %), CD 73 (82,3 %), CD 90 (96,5 %), CD 117 (96,2 %) a HLA I (88,3 %). Střední pozitivita byla pozorována u znaků CD 29 (67,0 %), CD 105 (49,1 %) a nízká pozitivita pro znaky CD 45 (13,2 %), CD 63 (35,1 %) a CD 71 (36,6 %). SHED byly negativní pro znaky CD 18 (0,1 %), CD 31 (0,0 %), CD 34 (0,1 %), CD 49d (0,5 %), CD 49e (3,5 %), CD 106 (0,0 %), CD 133 (3,9 %), CD 146 (1,7 %), CD 184 (1,3 %), CD 197 (0,2 %) a HLA II (0,4 %) (Graf 18, Příloha 9.9).



Graf 18: Analýza fenotypu SHED.

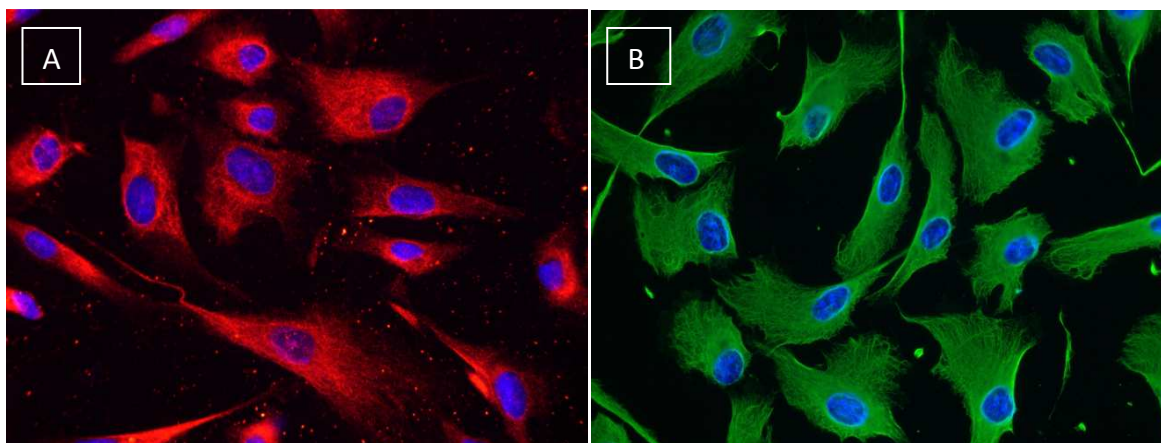
5.5.2 Imunocytochemie

5.5.2.1 Imunocytochemie KBZP

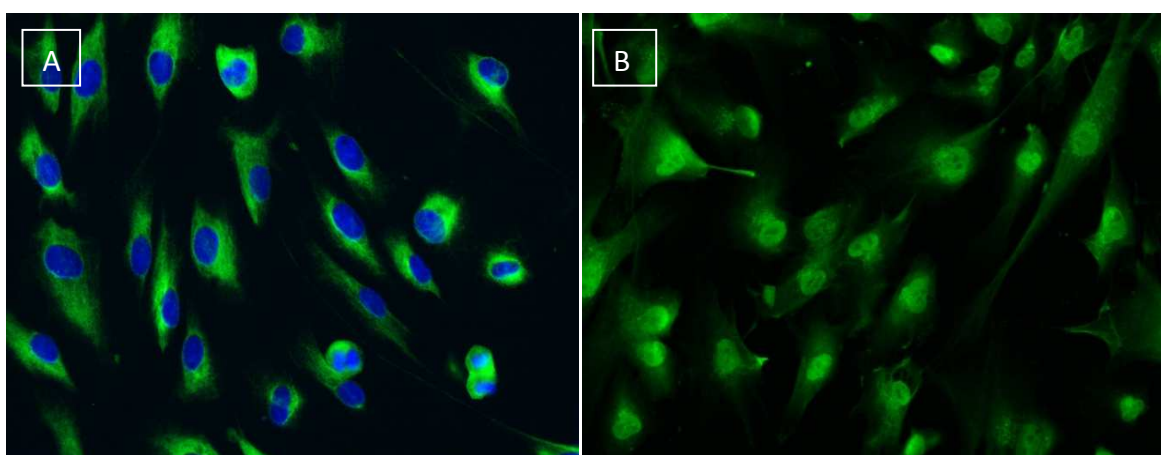
Imunocytochemie potvrdila vysokou pozitivitu KBZP pro markery mezenchymálních buněk STRO-1 (Obr. 26 A) a vimentin (Obr. 26 B). Vimentin byl rozložen v buněčné cytoplazmě s vyšší denzitou v oblasti jádra. Nestin (Obr. 27 A) tvořil síť tenkých filament v cytoplazmě; vyšší signál byl zachycen v oblasti jádra. Dále jsme detekovali tyto markery MKB: Sox-2 (Obr. 27 B), nucleostemin (Obr. 28 B), CD 90 (Obr. 29 A) a CD 166 (Obr. 29 B). Silnější jaderný a slabší cytoplazmatický signál byl pozorován pro Sox-2. Sox-2 je v buňce pravděpodobně spojen s drsným endoplazmatickým retikulem lokalizovaným v oblasti jádra.

Pozitivní signál pro nucleostemin byl zachycen uvnitř jádra buněk procházejících interfází. CD 166 byl pozorován na plazmatické membráně. Prokázali jsme také přítomnost katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) (Obr. 28 A).

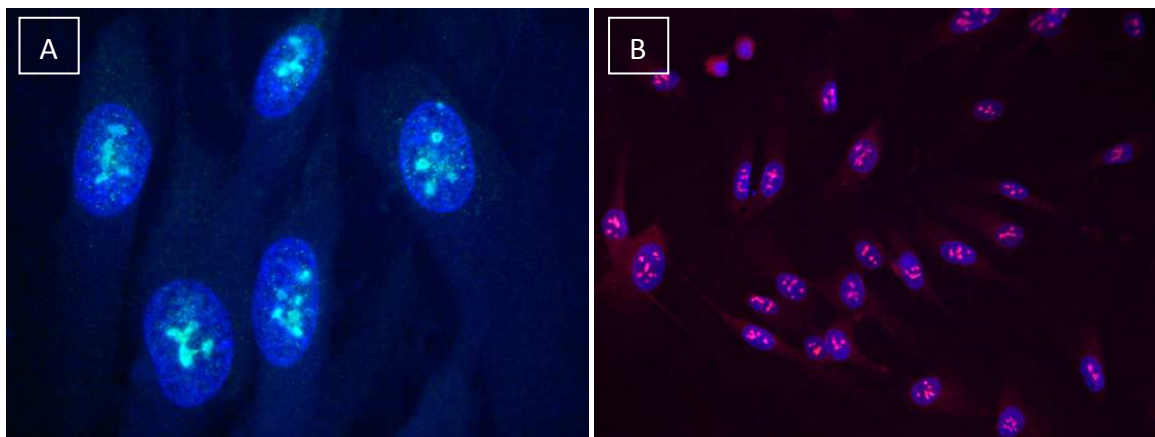
Barvení pomocí DAPI (Obr. 26, 27, 28, 29) potvrdilo, že KBZP jsou monojadernými buňkami, jejichž jádro je lokalizováno excentricky, obvykle na druhé straně než je největší výběžek cytoplazmy.



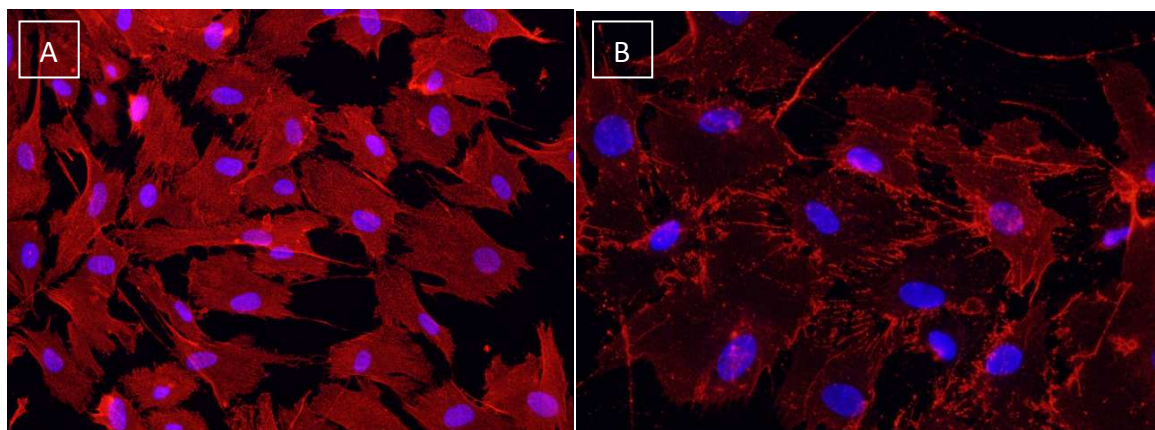
Obr. 26: Imunocytochemický průkaz vysoké positivity KBZP pro markery mezenchymálních buněk STRO-1 (A) a vimentin (B). Buněčné jádro barveno DAPI. Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.



Obr. 27: Nestin (A) tvoří síť tenkých filament rozložených v buněčné cytoplazmě; vyšší signál zachycen v oblasti jádra. Buněčné jádro barveno DAPI. Silnější jaderný a slabší cytoplazmatický signál pozorován pro Sox-2 (B). Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.



Obr. 28: Průkaz hTERT (A), světle modrá barva uvnitř buněčného jádra, a nucleosteminu (B), červené okrsky uvnitř buněčného jádra. Buněčné jádro barveno DAPI. Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.

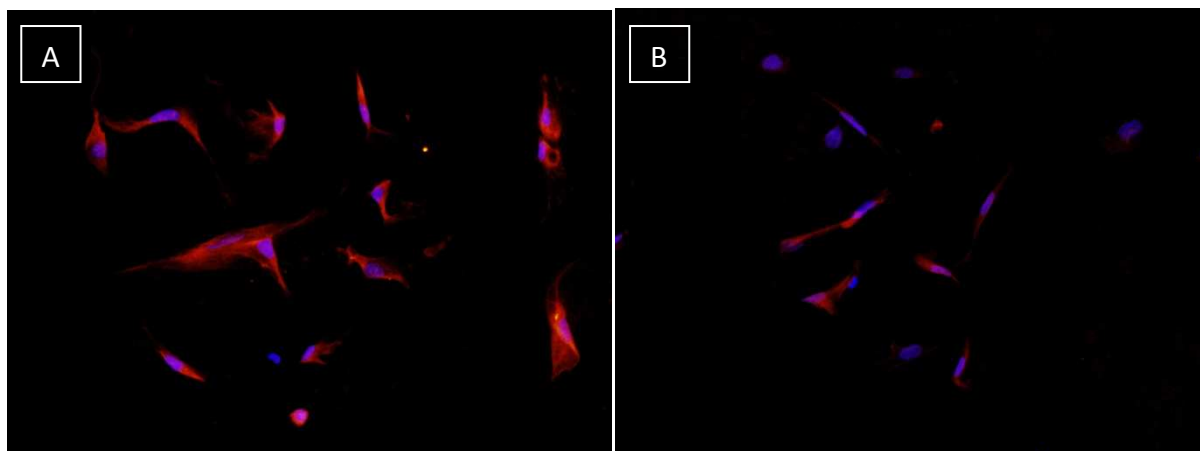


Obr. 29: CD 90 (A), znak mezenchymálních kmenových buněk a neurální diferenciacie. CD 166 (B) byl přítomen na plazmatické membráně. Buněčné jádro barveno DAPI. Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.

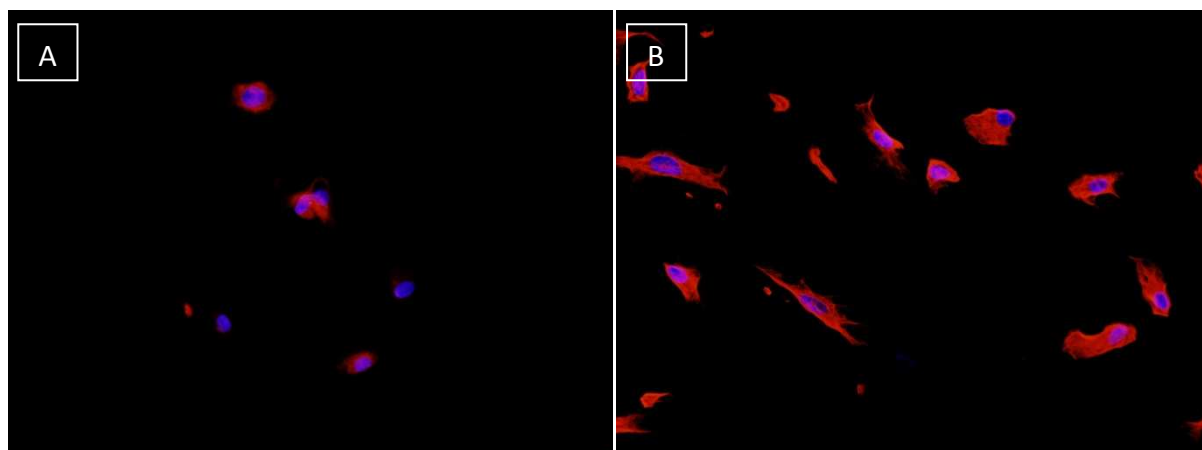
5.5.2.2 Imunocytochemie SHED

Imunocytochemie potvrdila vysokou pozitivitu SHED pro marker mezenchymálních buněk vimentin (Obr. 31 B). Vimentin byl rovnoměrně rozložen v buněčné cytoplazmě. Signál pro nestin (Obr. 31 A), tvořící síť tenkých filament, byl zachycen perinukleárně. Dále jsme detekovali tyto markery: neurální marker $\beta 3$ - tubulin (Obr. 30 B) a cytoskeletální marker α – aktin (Obr. 30 A).

Barvení pomocí DAPI (Obr. 33, 34) potvrdilo, že SHED jsou monojaderné buňky, jejichž jádro je lokalizováno excentricky - obvykle na druhé straně než největší výběžek cytoplazmy.



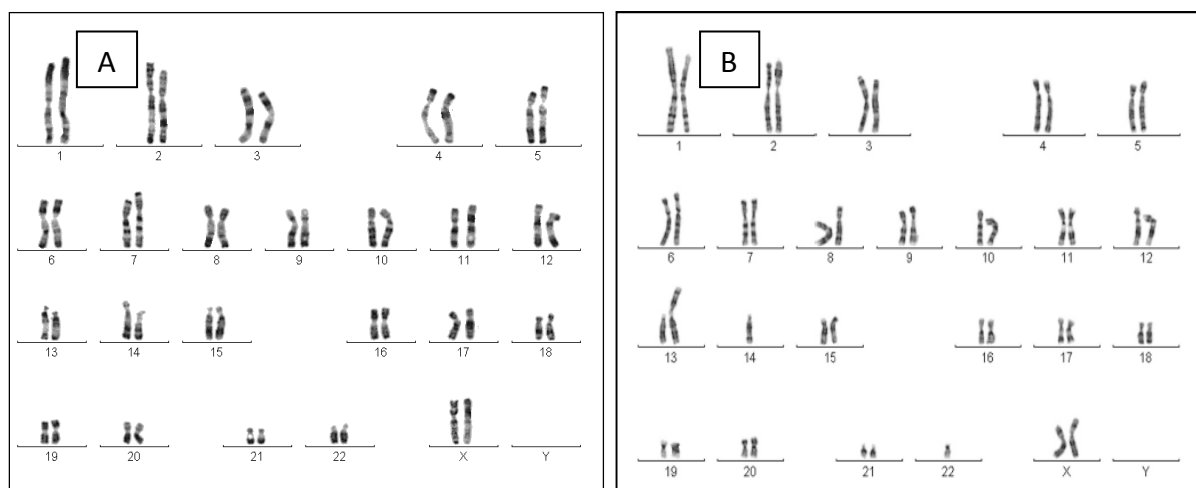
Obr. 30: Cytoskeletální marker α – aktin (A), $\beta 3$ – tubulin (B) neurálních filament. Buněčné jádro barveno DAPI. Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.



Obr. 31: Nestin (A) tvoří síť tenkých filament, signál zachycen v oblasti jádra. Imunocytochemický průkaz vysoké pozitivivity SHED pro marker mezenchymálních buněk vimentin (B). Buněčné jádro barveno DAPI. Fluorescenční mikroskop, původní zvětšení 400x.

5.5.3 Karyotyp KBZP a SHED

V průběhu dlouhodobé kultivace byly námi sledované linie KBZP a SHED cytogeneticky stabilní i po dosažení Hayflickova limitu. U dvou linií KBZP po dosažení 65 PD bylo 97 ze 100 hodnocených mitóz bez známek cytogenetické nestability (Obr. 32 A). Předpokládáme, že tyto 3 cytogeneticky abnormální mitózy byly následkem dlouhodobé kultivace *in vitro* (Obr. 32 B).

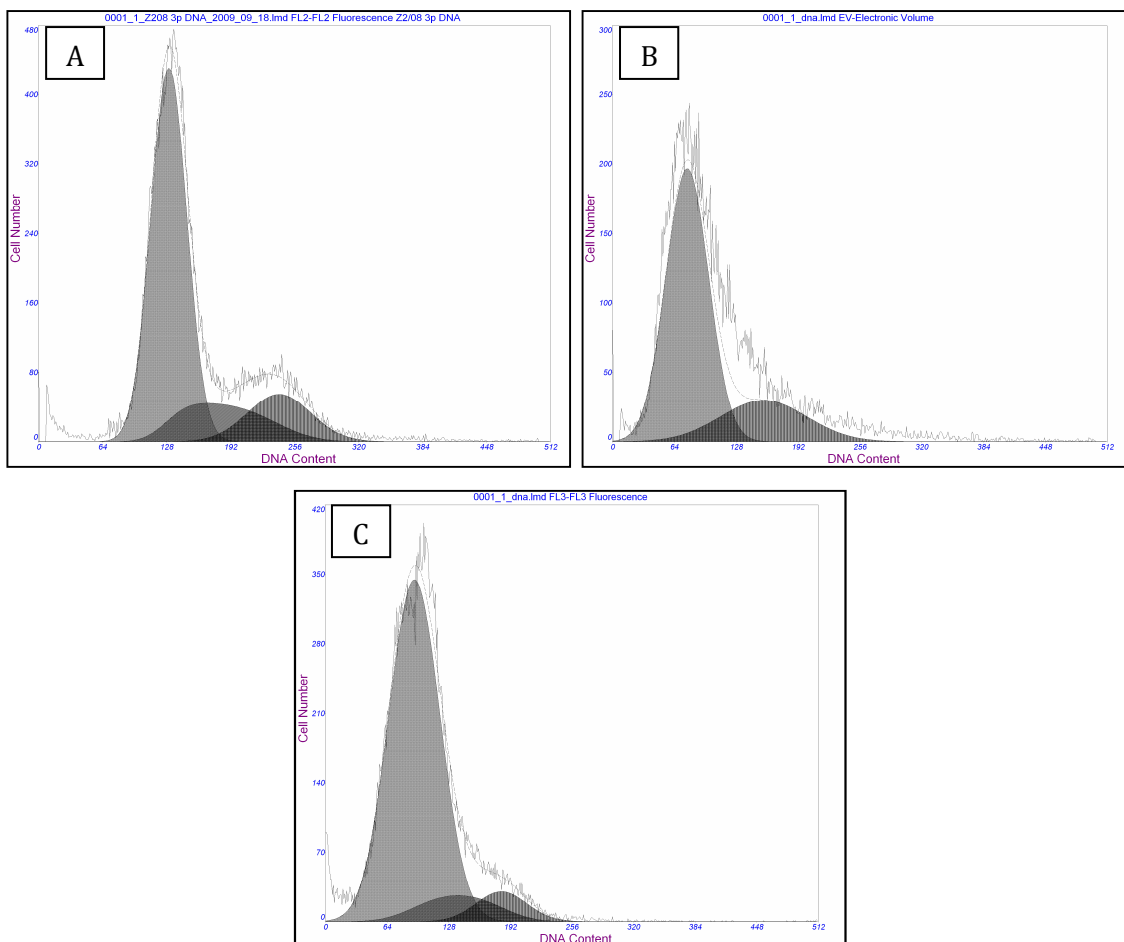


Obr. 32: A) Karyogram linie Z001, 4.p. (22 PD), 46, XX – normální karyotyp. B) Abnormální karyogram linie Z001, 20.p. (65 PD), 44, XX, t(13,14), -22.

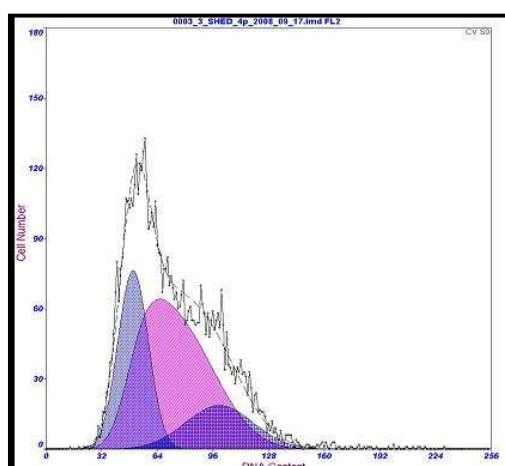
5.5.4 Analýza buněčného cyklu KBZP a SHED

Analýza buněčného cyklu opakovaně prokázala vysoké procento buněk v SG₂ fázi u KBZP i SHED ve všech testovaných médiích. U KBZP v médiu s 10 % FCS 47,3 % (Graf. 19 C), v médiu s 2 % FCS 36,4 % (Graf. 19 A) a v médiu s 2 % FCS obohaceném o ITS 57,6 % (Graf 19 B) buněk v SG₂ fázi. U SHED v médiu s 2 % FCS obohaceném o ITS více než 68 % buněk v SG₂ fázi (Graf. 20).

Analýza buněčného cyklu ukázala, že v průměru bylo 69,8 % SHED se nachází v SG₂ fázi buněčného cyklu, naproti tomu v liniích KBZP bylo v průměru pouze 56 % buněk v SG₂ fázi.



Graf 19: Analýza buněčného cyklu KBZP A) médium s 2 % FCS 36,4 % buněk v SG₂ fázi, B) médium s 2 % FCS obohacené o ITS 57,6 % buněk v SG₂ fázi, C) médium s 10 % FCS 47,3 % buněk v SG₂ fázi.

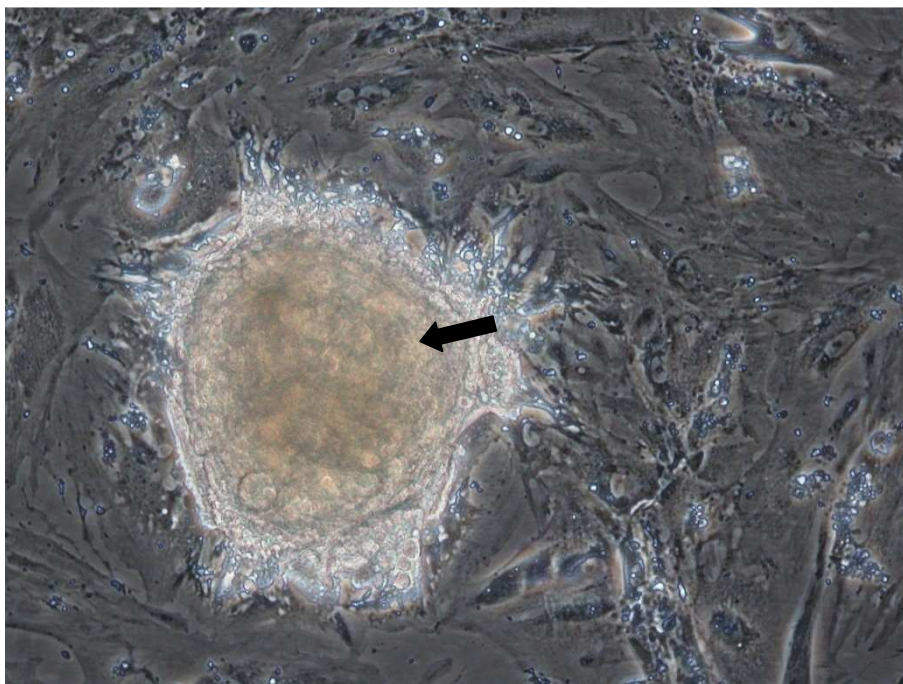


Graf 20: Analýza buněčného cyklu SHED Ze07, 4.p, v médiu s 2 % FCS obohaceném o ITS, 71,8 % buněk v SG₂ fázi.

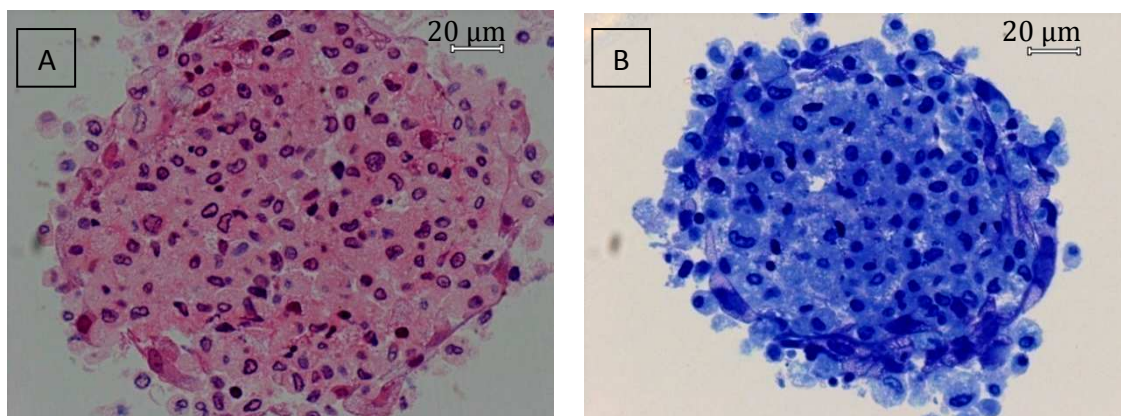
5.6 Diferenciace KBZP a SHED

5.6.1 Osteogenní diferenciace

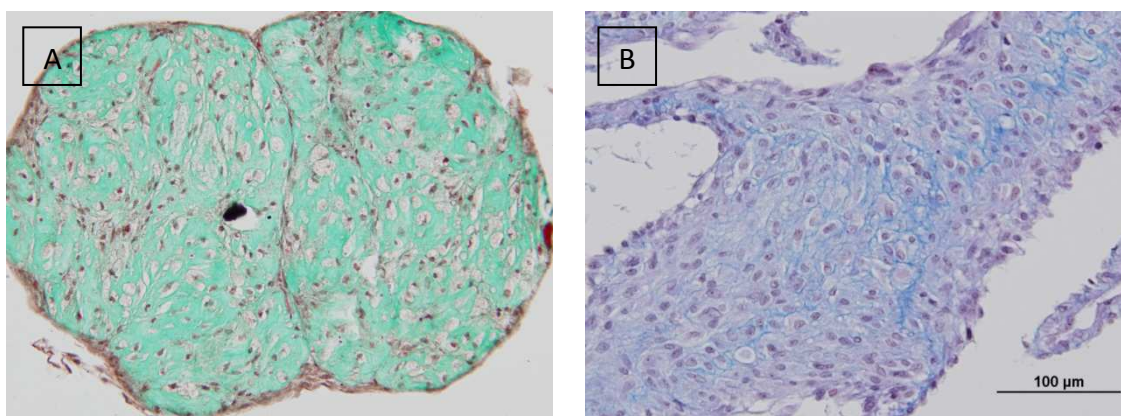
KBZP/SHED kultivované v osteogenním médiu v nádobách s nepřilnavým povrchem spontánně agregovaly a vytvořily sféroid o velikosti do 1 mm³. U KBZP/SHED kultivovaných v kultivační nádobě s přilnavým povrchem jsme pozorovali změnu morfologie. Tyto buňky měly oproti standardním KBZP rozvinutější cytoskelet a méně cytoplazmatických výběžků, do svého okolí produkovaly extracelulární hmotu, která vytvářela i trojrozměrné útvary (Obr. 33). Po ukončení kultivace byly uvolněny z kultivační nádoby pomocí cell-scraperu. Tímto získaná buněčná peleta a sféroid byly fixovány, zality do parafinových bločků. Histologické řezy byly obarveny HE (Obr. 34 A), toluidinovou modří (Obr. 34 B), zeleným Massonovým trichromem (Obr. 35 A) a barvením dle Ladewiga (Obr. 35 B). Tímto jsme prokázali přítomnost kolagenu typu I, prokolagenu a osteoidu v extracelulární matrix.



Obr. 33: Trojrozměrná částice extracelulární matrix (označena šipkou) vytvořená KBZP kultivovanými v osteogenním médiu po dobu 4 týdnů. Mikroskop s fázovým kontrastem, původní zvětšení 200x.



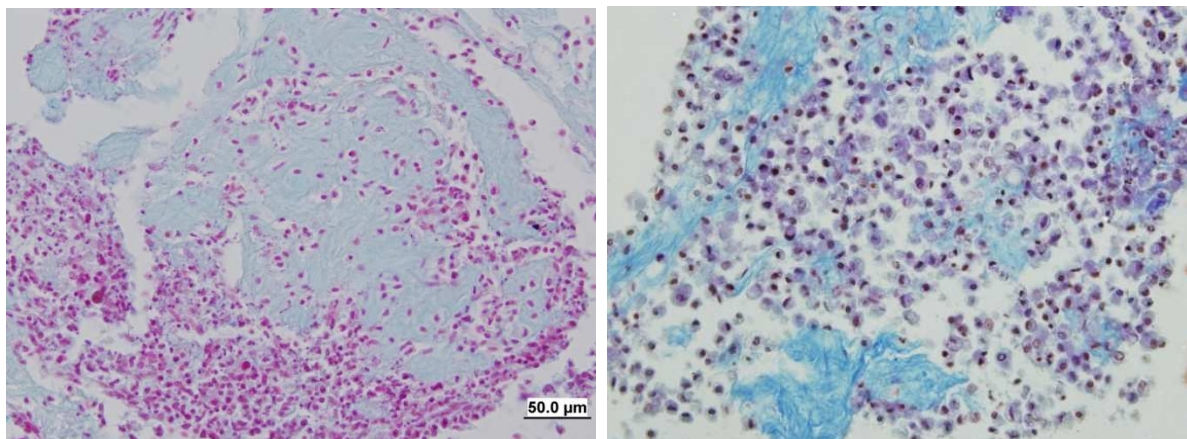
Obr. 34: Buněčná peleta společně s extracelulární matrix získaná z KBZP kultivovaných po dobu 4 týdnů v osteogenním médiu obarvená HE (A), obarvená toluidinovou modří (B) pro průkaz proteoglykanů a glykosaminoglykanů, původní zvětšení 150x.



Obr. 35: Buněčná peleta společně s extracelulární matrix získaná z KBZP kultivovaných po dobu 4 týdnů v osteogenním médiu. Barvení pomocí Massonova zeleného trichromu (A) a barvení dle Ladewiga (B), osteoid zbarven modře, původní zvětšení 150x.

5.6.2 Chondrogenní diferenciaci

KBZP/SHED byly kultivovány v chondrogenním médiu po dobu 4 týdnů v kulturační nádobě s nepřilnavým povrchem. Během kultivace spontánně agregovaly do sféroidů o velikosti cca 1 mm³. Po ukončení kultivace byly SHED (Obr. 36 A) a KBZP (Obr. 36 B) obarveny alciánovou modří.



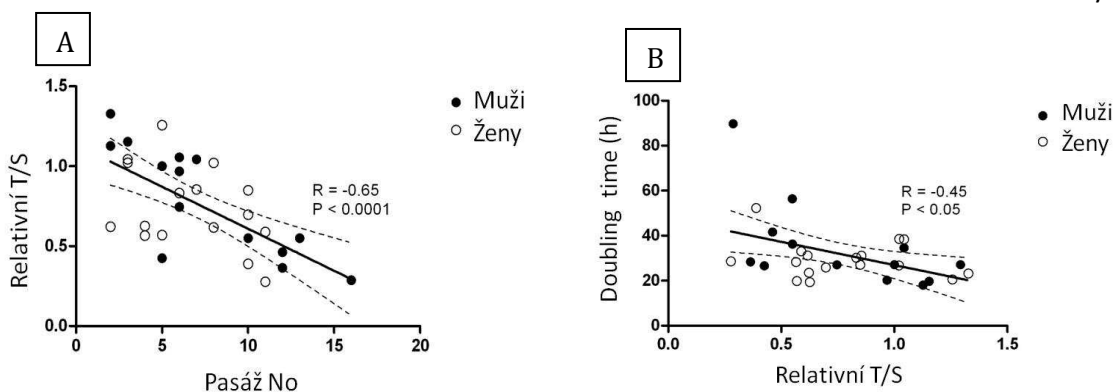
Obr. 36: Sféroidy SHED kultivované v chondrogenním médiu po dobu 4 týdnů, obarveny alciánovou modří (A), průkaz kyselých mukopolysacharidů; původní zvětšení 100x. Sféroidy KBZP kultivované v chondrogenním médiu po dobu 4 týdnů, obarveny alciánovou modří (B), průkaz mukopolysacharidů a glykosaminoglykanů; původní zvětšení 150x.

5.6.3 Adipogenní diferenciaci

I přes využití silného adipogenního média jsme nebyli schopni prokázat hromadění vakuol uvnitř buněk. KBZP i SHED byly i nadále proliferačně aktivní, v adipocyty nediferencovaly.

5.7 Měření délky telomer

Aby bylo možné posoudit vliv buněčného dělení na relativní délku telomer, izolovali jsme DNA z KBZP ve 2. a 6. pasáži. Relativní hodnota T/S u KBZP byla v intervalu 0,3 – 1,3. Navzdory tomuto významnému rozdílu mezi jednotlivými vzorky byl trend ve změně relativního T/S poměr v průběhu pasáže v čase zřejmý. Linie KBZP vykazovaly v průběhu kultivace významný pokles relativní délky telomer (Graf 21 A). Signifikantní byly také změny relativního T/S ve vztahu ke zvýšenému PD, které prokazovaly prodloužení DT v buňkách se zkrácenou délkou telomer (Graf 21 B). Vzhledem k nedostatečnému množství vzorku z jednotlivých věkových skupin jsme nebyli schopni analyzovat vliv věku a pohlaví dárce na délku telomer.



Graf 21: A) Délka telomer (relativní T/S) oproti pasáži KBZP. Relativní T/S se s přibývajícím pasáží zkracuje. B) Délka telomer (relativní T/S) oproti DT. Je patrné postupné zkracování telomer s narůstající délkou trvání DT.

5.8 Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP

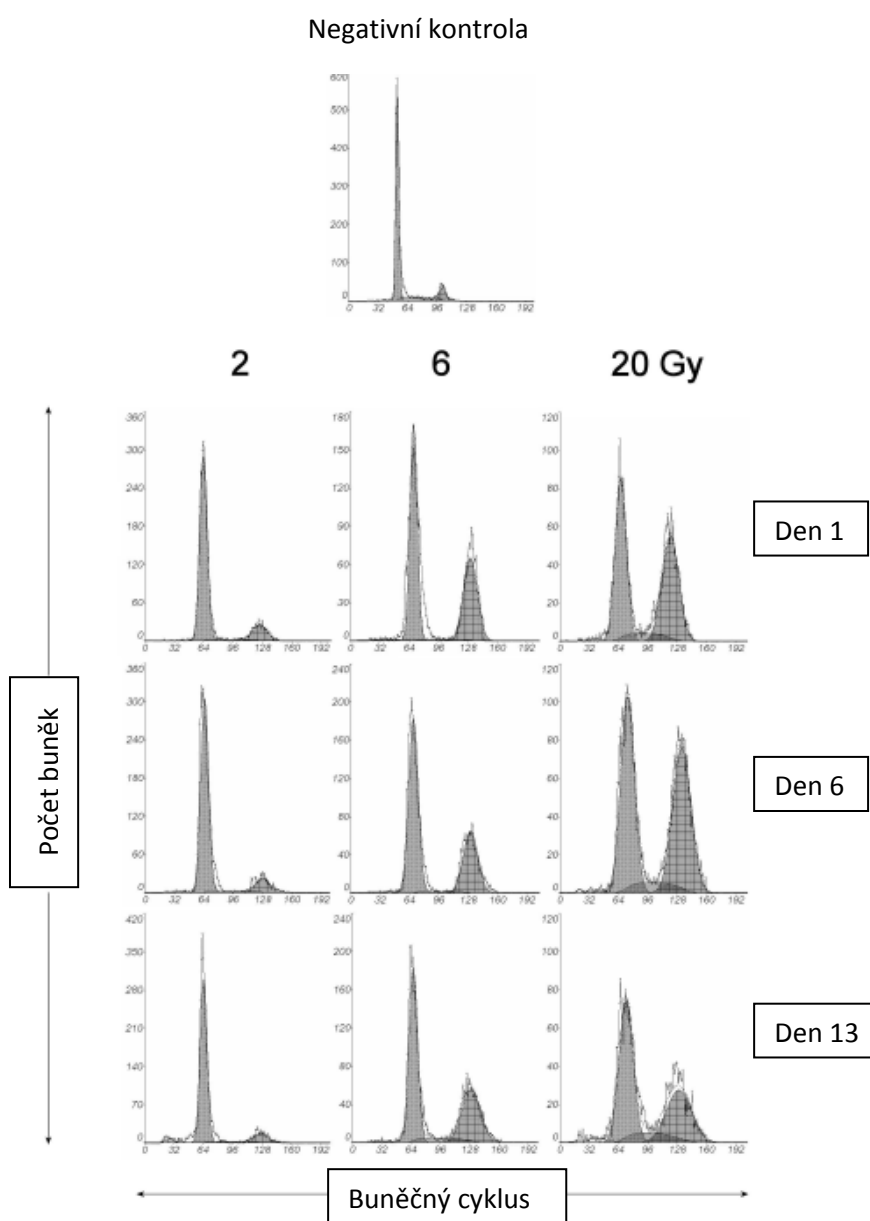
Gama záření ve všech testovaných dávkách (3, 6 a 20 Gy) nemělo vážný dopad na viabilitu KBZP. V průběhu celého experimentu bylo 80 - 90 % buněk viabilních a to jak v negativní kontrole tak i ve všech ozářených liniích. Gama záření však mělo výrazný dopad na proliferační aktivitu KBZP. Celkový počet populačních zdvojení se zmenšil v závislosti na dávce záření. KBZP ozářené dávkou 2 Gy se během 14 dnů regenerovaly a jejich proliferační aktivita se opět zvýšila. Se snížením proliferační aktivity se pojí i zvýšení populačního DT, který během 13 dnů vzrostl z 27 hodin (negativní kontrola) na 128 hodin (20 Gy).

Pouze malé množství KBZP prošlo apoptózou, a to až v pozdějších fázích testu. Třináctý den po ozáření bylo v linii vystavené celkové dávce 2 Gy 5 % apoptických buněk, v linii vystavené 6 Gy bylo 17 % apoptických buněk a v linii ozářené 20 Gy bylo až 20 % apoptických buněk. V negativní kontrole jsme nacházeli okolo 3 % apoptických buněk. Aktivace kaspázy-3 nebyla pozorována v průběhu celého experimentu.

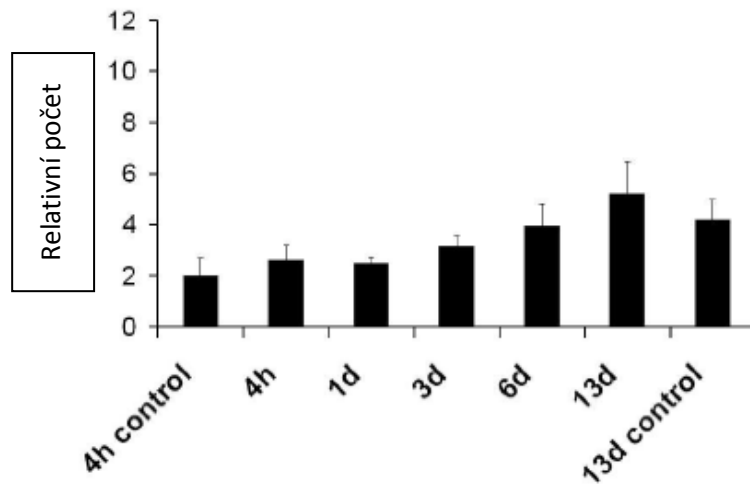
U linie ozářené dávkou 2 Gy došlo k výraznému snížení počtu buněk v S fázi buněčného cyklu (3 %) oproti negativní kontrole (12 %). Toto snížení bylo patrné již první den po ozáření a přetrvávalo v průběhu celého experimentu (13 dní). U linií vystavených dávkou 6 a 20 Gy došlo ke značnému nárůstu množství buněk v G2/M fázi buněčného cyklu. Již první den po ozáření bylo 41 % (6 Gy) a 45 % (20 Gy) KBZP v G2/M fázi, oproti negativní kontrole, kde se v této fázi DNA cyklu nacházelo pouze 10 % KBZP. Tento poměr se nezměnil ani po

13 dnech experimentu. Pomocí značení buněk propidium jodidem jsme prokázali, že ozářené KBZP zůstávají v G₂ fázi buněčného cyklu a nepostupují do M fáze (Graf 22).

K detekci změny v expresi proteinů u KBZP vystavených celkové dávce 20 Gy jsme použili metodu western blot a elektroforézu. U této linie došlo k výrazné upregulaci proteinů p53 hned první den po ozáření. Hladina p53 postupně stoupala ke svému maximu a třetí den po ozáření opět začala klesat (Graf 23). Třináctý den po ozáření byla hladina p53 na stejné úrovni jako u negativní kontroly.



Graf 22: Efekt gama záření na buněčný cyklus KBZP a indukci apoptózy. Signifikantní nárůst počtu buněk v G₂/M fázi u linií vystavených záření 6 Gy a 20 Gy.



Graf 23: Indukce a aktivace p53 u KBZP vystavených záření o dávce 20 Gy.

6. Diskuze

Moderní stomatologie se neustále snaží najít způsob jak nahradit, nebo obnovit poškozené či ztracené zubní tkáň. V případě kariézního procesu dochází nejprve k destrukci skloviny. Sklovina však není po zániku orgánu skloviny schopná regenerace, a tudíž již v počáteční fázi (pokud převáží demineralizace nad remineralizačním procesem) je poškození zubu kariézním procesem nevratné. Dalším rozvojem kariézní léze dochází k poškození dentinu, který se v průběhu života tvoří pouze na rozhraní zubní pulpy a TZT. Z těchto důvodů je nutné poškozené části tvrdých zubních tkání nahradit pomocí výplňových materiálů, nebo, v případě většího poškození, zhotovením protetické náhrady. Obě možnosti ale mají své indikační hranice a omezenou životnost. I zubní pulpa, přestože se jedná o živou tkáň, má pouze velmi malou regenerační schopnost, a její poškození vede velmi často k nutnosti zhotovení kořenové výplně s následnou restaurací poškozených TZT. Využití kmenových buněk a tkáňového inženýrství v klinické stomatologii otevírá zcela nový pohled na postupy při obnově funkční a estetické dentice.

Nejhorší variantou pro pacienta je úplná ztráta zubu. Možností řešení takového defektu v současné době je implantace, nebo zhotovení protetické náhrady. Možnost vytvoření histokompatibilního zubu by byla ideálním způsobem plné estetické i funkční rehabilitace (52).

U KBZP i SHED byla opakovaně prokázána schopnost neurogení (53), osteogení i chondrogení diferenciací, které společně se snadnou dostupností těchto MKB, umožňují uvažovat o KBZP a SHED nejen jako o výhodném zdroji MKB pro léčbu degenerativních chorob, náhradu tkání po traumatu *in vivo*, ale i bioinženýrství tkání a orgánů *in vitro*.

Zubní dřevina představuje pro tyto účely nejlepší dosud známý zdroj kmenových buněk, který je navíc striktně oddělen od ostatních tkání a jeho izolace není v porovnání s izolací tkáňově specifických KB, např. z kostní dřeviny, nebo neurálních KB, obtížná. Vlastnosti KB jsou ovlivněny okolním prostředím (tzv. niché). Histologická struktura zubní pulpy připomíná embryonální rosolovité vazivo (podobné vazivu pupečníku). Dá se proto předpokládat, že vlastnosti KB izolovaných ze zubní pulpy jsou unikátní, především s ohledem na podobnost s ES.

Po extrakci zubu (v případě zubu exfoliovaného, po jeho odloučení) je ZP s celým zubem zničena jako biologický odpad. Tento materiál by mohl být použit při autotransplantacích a obnově tkání pacienta/dárce/příjemce.

Pokud se zaměříme na možnost vypěstovat v laboratoři nový zub, musíme počítat s mnoha úskalími. Proces odontogeneze je velmi komplikovaný děj, který nebude možno simulovat bez znalosti všech vlastností KBZP. V současné době je navíc potřeba při kultivaci KB užívat xenogenních suplementů; tato nutnost znemožňuje transplantovat kmenové buňky zpět do lidského organismu. Z těchto důvodů jsme se v této práci zaměřili na izolaci a charakterizaci KB izolovaných ze zubní pulpy dočasných i stálých zubů a dále na snížení obsahu xenogenních suplementů při kultivaci KB.

Na rozdíl od ostatních autorů, kteří izolovali KBZP z germektomií (53), jsme se naučili izolovat zubní dřeň i ze zubů s dokončeným vývojem zubního kořene. Během zpřístupnění dřeňové dutiny pomocí diamantového brousku pravděpodobně došlo k termickému nebo mechanickému poškození KBZP, což vedlo k neúspěšné izolaci KBZP. K tomuto účelu se tedy jako nejvhodnější jeví odstranění kořene pomocí Luerových kleští a následná izolace ZP. Užitím tohoto postupu také došlo k výraznému rozšíření potenciální skupiny dárců zubní dřene.

Běžný způsob izolace KBZP ze ZP užívaný v literatuře je enzymatická disociace tkáně (14, 15, 16, 18). Tento způsob se zdá být za současných podmínek optimální. První autoři, kteří publikovali práce o izolaci a kultivaci KBZP předpokládali, že tyto elementy pocházejí z oblastí kolem cév, tj. z oblasti perivaskulárního niché (16). Sami jsme řízenou disociací zubní pulpy ve dvou krocích oddělili dvě frakce a tedy i dvě subpopulace KBZP z odlišných kompartmentů. Tyto dvě frakce měly rozdílnou morfologii. KB izolované z PV zóny byly vřetenovité, s mnoha výběžky, oproti KBZP izolovaných z SO zóny, které byly zakulacené. Tyto dvě subpopulace nicméně vykazovaly velmi podobné biologické vlastnosti. KBZP z SO kompartmentu vykazovaly vysokou pozitivitu pro znak CD 29, oproti KBZP z PV kompartmentu, kde byla pozitivita střední. KB z obou kompartmentů vykazovaly střední pozitivitu pro CD 44. CD 90 byl vysoce pozitivní u KBZP izolovaných z PV zóny, zatímco u KBZP z SO zóny byl pouze středně pozitivní. CD 146 byl exprimován pouze KBZP izolovanými z PV kompartmentu. Charakterizací těchto subpopulací a pomocí spektra znaků jejich

diferencovaného potomstva bychom v budoucnosti měli být schopni usuzovat na původ KBZP. Chceme tak přispět do diskuse o niché KBZP a jejich distribuci ve vlastní pulpě.

Izolované KBZP jsme kultivovali ve třech různých médiích a porovnávali jsme jejich jednotlivé biologické vlastnosti. Na rozdíl od ostatních autorů jsme izolované KB kultivovali alespoň přes 40 PD, čímž jsme u většiny linií přesáhli Hayflickův limit. I po dosažení tohoto limitu byly námi kultivované kmenové buňky cytogeneticky stabilní a nevykazovaly žádné znaky spontánní diferenciaci nebo degenerace. Doubling time KBZP a regresní analýza nekumulovaných populačních zdvojení ukázala těsný vztah mezi počtem populačních zdvojení a postupně se snižující proliferací aktivitou (Graf 10). Ve studii publikované You-Young Jo (54) byl porovnáván vliv složení média na KBZP, periodontální ligamenta a MKB izolované z kostní dřevě. V tomto experimentu byla použita média s 10 % FCS a s 20 % FCS obohacená o kyselinu L-askorbovou v různé koncentraci. Dle této studie se jako ideální kultivační médium jeví médium s 10 % FCS a 100 μ M kyseliny L-askorbové. Toto médium jsme použili jako referenční i pro náš experiment. Prokázali jsme, že další snížení obsahu FCS z 10 % na 2 % má negativní vliv na biologické vlastnosti, výrazné snížení proliferací aktivity a prodloužení doubling time. Průměrný doubling time dosahoval v médiu s 10 % FCS na 42,6 hodin, KBZP dosáhly 52 populačních zdvojení. Oproti tomu KBZP kultivované v médiu s 2 % FCS dosáhly doubling time 55,4 hodiny a pouze 42 populačních zdvojení. Na druhou stranu, pokud jsme médium s 2 % FCS obohatili o ITS suplement, došlo k výraznému zvýšení proliferací aktivity a stabilizaci doubling time v průběhu dlouhodobé kultivace (Graf 10 a 11). KBZP v médiu s 2 % FCS + ITS suplementem dosáhly 60 populačních zdvojení již v 17. pasáži. KBZP kultivované v médiu s 10 % FCS v 17. pasáži dosáhly pouze 48 populačních zdvojení. Průměrná velikost a morfologie buněk nebyla ovlivněna.

Fenotypová a imunocytochemická analýza KBZP prokázala střední nebo vysokou pozitivitu pro markery mezenchymálních kmenových buněk (vimentin, STRO-1, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90 a CD 166). Byla pozorována nízká pozitivita pro znaky CD 45 (antigen typický pro leukocyty, monocyty a T-lymfocyty) a negativita pro CD 34 (marker hematopoetických kmenových buněk), což nasvědčuje tomu, že zubní pulpa neobsahuje hematopoetické progenitory. I ostatní markery typické pro hematopoetickou řadu (CD 117, CD 184) byly negativní, nebo jen nízké pozitivní (CD 133). Ve studii publikované v *Journal of bone and mineral research* (55) autoři uvádějí více než 10 % KBZP pozitivních pro CD 34. KBZP

kultivované v našich podmínkách byly pro CD 34 negativní (0 - 2,3 %). Autoři však ve svém sdělení článku nezmiňují přesné složení kultivačního média. Dá se předpokládat, že podobně jako ostatní užili pro kultivaci KBZP médium s vyšším obsahem FCS než bylo použito v naší studii. Lze tedy usuzovat, že FCS by mohlo způsobit nárůst positivity pro CD 34. Analýza fenotypu námi kultivovaných KBZP v médiu s 10 % FCS prokázala vysokou pozitivitu pro znaky CD 29 (98,8 %), CD 44 (99,6 %) a CD 90 (99,1 %) a negativitu pro CD 45 (0,3 %), tedy shodnou expresi ve všech společně testovaných znacích uvedených ve studii *Characterisation of human dental pulp stem cells and buccal mucosa fibroblasts* Lindroose a spol. (CD 29 – 99 %, CD 44 95,7 %, CD 90 99,6 % a CD 45 0,5 %); KBZP byly kultivovány ve shodném médiu (56). U KBZP byla také prokázána nízká pozitivita pro CD 117. Tento znak je pozitivní u prekurzorů neurální lišty a je považován za receptor pro faktor kmenových buněk I. Z toho lze usuzovat, že část populace KBZP je odvozena z neurální lišty, což by potvrzovalo naši teorii o dvou liniích KBZP uvnitř ZP samotné. Oproti KBZP kultivovaných v médiu bez ITS vykazovali KBZP kultivované v médiu s ITS nižší pozitivitu pro CD 44, CD 90 a HLA I. Možným vysvětlením je vliv ITS suplementu, který udržuje KBZP méně diferencované a potlačuje expresi mezenchymálních markerů a HLA I. Pro ověření této teorie ale musíme výrazně rozšířit testovaný panel CD znaků. Expresí Sox-2 (*pluripotent embryonic stem cell marker*) potvrzuje naši domněnku o blízkosti KBZP a ES. Pozitivita pro nestin a nucleostemin poukazuje na odvození těchto KB z neurální lišty.

V experimentech s SHED kultivovanými v médiu s 2 % FCS a ITS jsme byli schopni dosáhnout 45 PD, počítáno od druhé pasáže. V primárních kulturách bylo množství buněk velmi nízké, proto jsme se rozhodli, že nebudeme počítat SHED v prvních pasážích. Tímto jsme omezili ztráty buněk v primokultuře a první pasáži. V primokultuře KBZP jsme v průměru získali 50 adherujících buněk (10 - 110) po enzymatické disociaci. Odhadujeme, že od primokultury do prvního pasážování SHED proliferovaly okolo 10 PD. Proliferační aktivita SHED ve srovnání s KBZP kultivovanými v médiu s 2 % FCS a ITS byla nižší (Graf 13). Tomuto odpovídalo i srovnání DT KBZP s SHED. SHED měly vyšší průměrný DT - 60,8 (21,3 - 97,3) hodin - ve srovnání s KBZP - 24,5 (15,6 - 35,1) hodin (Graf 14). Pro prvních 24 PD SHED byl DT (28,4 hodin) o 33% vyšší než DT KBZP (19,3 hodin). Po dosažení 24 PD se DT SHED zvýšil na 54,2 hodiny, zatímco se DT KBZP zvýšil pouze na 29,1 hodiny (Graf 12). Průměr velikosti obou našich testovaných linií kmenových buněk byl srovnatelný

(SHED 15,0 μm a KBZP 15,2 μm). Distribuce velikosti SHED odpovídala delšímu rozmezí (12,2 - 16,4 μm) ve srovnání s KBZP (14,3 - 16,1 μm) (Graf 15).

Analýza fenotypu SHED ukázala, že ve srovnání s KBZP (CD 71 - 7,1 %, CD 105 - 12,6 %, CD 117 - 16,4 % a CD 166 - 41,7 %) měly SHED výrazně vyšší pozitivitu (více než o 20 % pozitivních buněk) ve znacích CD 71, CD 105, CD 117 a CD 166. U ostatních sledovaných markerů nebyla nalezena výrazná změna positivity. Z těchto rozdílů můžeme usuzovat, že SHED jsou méně diferencované (vysoká pozitivita na CD 117 - receptor pro faktor kmenových buněk I, typický pro pluripotentní buňky) než KBZP. Buněčné linie SHED by měly proto vykazovat lepší odezvu na diferenciaci (CD 105 - složka TGF receptoru). Exprese znaku CD 146 je i v dnešní době málo popsána a přesný význam tohoto znaku zatím není odhalen, nicméně je spojován s aktinem v cytoskeletu. Miura (19) našel pozitivitu SHED pro CD 146, zatímco naše linie byly CD 146 negativní. Neuvádí však přesně, kolik procent buněk bylo CD 146 pozitivních a vzhledem k použití odlišných kultivačních médií není možné tento rozdíl uspokojivě vysvětlit. Negativita CD 45 značí, že SHED nemají příbuznost s hematopoetickými buňkami. Tato domněnka je potvrzována negativitou pro CD 34 a CD 18, což jsou další typické markery pro buňky hematopoetické řady. Naopak SHED vykazují zvýšenou pozitivitu pro CD 105, marker běžně exprimovaný endoteliálními buňkami. CD 105 bývá často v koexpresi s CD 133. SHED byly pro CD 133 negativní, což nemůžeme jednoznačně vysvětlit. Mimo jiné i tento fakt potvrzuje, že SHED jsou unikátní nediferencovanou linií buněk. Ostatní námi uvedené CD znaky pro SHED nebyly dosud v odborné literatuře publikovány.

Imunocytochemická analýza SHED prokázala vysokou pozitivitu pro marker mezenchymálních kmenových buněk vimentin, neurální specifické proteiny nestin a β - tubulin a cytoskeletální marker α - aktin.

Nejprekvapivějším zjištěním byla pomalá proliferace SHED ve srovnání s KBZP. Analýza buněčného cyklu ukázala, že 69,8 % SHED se nachází v SG2 fázi buněčného cyklu, naproti tomu v liniích KBZP bylo pouze 56 % buněk v SG2 fázi. Kromě toho, byly buněčné linie SHED více pozitivní pro CD 71 (který lze nalézt na proliferujících buňkách) a CD 105. Tato zjištění odpovídají představě, která přibližuje SHED více primitivním kmenovým buňkám, než je tomu u KBZP, a odpovídá tedy vyššímu proliferačnímu potenciálu. Domníváme se, že naše kultivační médium optimalizované pro KBZP není zcela vhodné

pro kultivaci SHED. Během dalších experimentů se budeme snažit optimalizovat kultivační médium pro pěstování SHED a připravit širší analýzu jejich fenotypu.

KBZP/SHED v osteogenním médiu během 4 týdnů vytvořily drobné uzlíky. Histologické vyšetření prokázalo, že tyto uzlíky byly formovány buňkami podobnými osteoblastům a extracelulární matrix. Histochemická analýza prokázala přítomnost kolagenních vláken a osteonektinu, což jsou dvě základní složky extracelulární kostěné matrix.

KBZP/SHED kultivované v chondrogenním médiu vytvořily trojrozměrné agregáty. Buňky uvnitř agregátů byly oválné a obklopené extracelulární matrix. Pomocí histologických technik (barvení alciánovou modří) jsme prokázali přítomnost kyselých sulfátových glykosaminoglykanů, hlavní složky extracelulární chrupavčité tkáně.

KBZP/SHED kultivované v adipogenním médiu pokračovaly v proliferaci. I přes opakování tohoto experimentu jsme nezpozorovali žádné známky adipogenní diferenciace.

Vystavením KBZP/SHED podmínkám indukujícím diferenciaci v jiné buněčné typy jsme prokázali jejich schopnost diferencovat v buňky podobné osteoblastům a chondroblastům. I přes využití silného adipogenního diferenciačního média jsme nebyli schopni tyto buňky diferencovat v adipocyty. Neschopnost KBZP diferencovat v adipocyty se shoduje i se studií publikovanou v roce 2002 Gronthosem (16).

Pro porovnání hodnoty T/S jsme využili nádorové buňky z adenokarcinomu prostaty Du145. Průměrná délka telomer u těchto buněk je krátká (2,8 kb) (4), nicméně během dlouhodobé kultivace zůstala stále stejná (57). Prokázali jsme, že během dlouhodobé *in vitro* kultivace KBZP dochází ke zkrácení telomer, přestože jsme u nich pomocí imunocytochemie přítomnost katalytické podjednotky telomerázy prokázali. Postupné zkrácení telomer v průběhu dlouhodobé kultivace koresponduje s nižší proliferační aktivitou KBZP v pozdějších pasážích. Otázkou zůstává, zda k tomuto dochází i *in vivo*, nebo je to důsledek *in vitro* kultivace. Během *in vitro* kultivace jsou buňky vystaveny kyslíkovým radikálům v mnohem větší míře než *in vivo*. Řešením tohoto problému by mohlo být přidání protektivních látek do kultivačního média.

Během ozařování somatických buněk byla pozorována tato kaskáda reakcí: aktivace p53 u somatických buněk vede k regulaci CDKN1 (gen kódující p21) a k inhibici cyklin dependentní kinázy CDK2 a CDK4, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi DNA cyklu (58). Oproti tomu KBZP vystavené ionizujícímu záření zastavují proliferaci v S/G2 fázi i přesto, že dochází k aktivaci p53-p21 systému stejně jako u somatických buněk. Typickou odezvou somatických buněk na velké poškození DNA způsobené ionizujícím zářením je apoptóza. U KBZP i přes ozáření 20 Gy nedošlo k výraznému poklesu viability, ale k zastavení proliferace, která nebyla obnovena ani po 13 dnech po ozáření. Místo apoptózy KBZP jeví spíše známky senescence (zvýšená hladina p 16 a β -galaktosidázy). Tento nálezn se shoduje se studií Serakinci et al. (59), v níž byl studován vliv poškození DNA na MKB izolované z kostní dřeně.

7. Závěr

V průběhu studie jsme získali celkem 4 premoláry, 63 molárů a 3 dočasné zuby. V našem souboru bylo i 47 třetích molárů s dokončeným vývojem kořene, tj. zubů, které nevyhovovaly kritériím ostatních autorů. Z těchto sedmdesáti zubů jsme úspěšně izolovali 51 linií KBZP a 3 linie SHED.

Během studie jsme optimalizovali a standardizovali techniku odběru zubní dřeně z *cavum pulpaе*. Jako ideální metoda pro odběr zubní pulpy se jeví odstranění zubních kořenů pomocí Luerových kleští, uvolnění zubní pulpy od dentinu pomocí ostré sondy a její vyjmutí mikrochirurgickou pinzetou. Hlavní výhody této metody spatřujeme v možnosti provádět celou izolaci zubní pulpy v laminárním boxu za sterilních podmínek, eliminaci termického poškození tkáně ZP a v rozšíření skupiny dárců.

Pro izolaci SHED a KBZP ze zubní pulpy samotné se nejvíce osvědčila modifikace enzymatické disociace tkáně zubní pulpy po předešlém rozstříhání na částičky o objemu cca 1mm³.

Testovali jsme celkem 3 kultivační média s různým obsahem fetálního telecího séra. Ve snaze snížit množství FCS a nahradit ho jiným supplemtem jsme testovali vliv ITS na KBZP. Ukázalo se, že KBZP kultivované v médiu s 2 % FCS a ITS supplemtem vykazovaly vyšší proliferační aktivitu v porovnání s KBZP kultivovanými v médiu s 10 % FCS, které je nejčastěji publikováno. KBZP kultivované v médiu s ITS supplemtem vykazovaly v porovnání s KBZP kultivovanými v médiu s 10 %, nebo se 2 % FCS nižší pozitivitu mezenchymálních znaků (CD 29, CD 44, CD 90) a HLA I, vyšší proliferační aktivitu, ale obtížnější diferenciaci.

Vzhledem k analýze CFU se dá předpokládat, že uvnitř ZP se nalézá okolo 50 KB. KBZP a SHED si v průběhu dlouhodobé kultivace zachovávaly vysokou viabilitu (přes 90 %), byly vysoce proliferačně aktivní (KBZP - DT 24,5 hodiny, dosaženo 60 PD; SHED – DT 41,2 hodiny, dosaženo 52 PD), což bylo potvrzeno i analýzou buněčného cyklu (více než 56 % KBZP a 69,8 % SHED v SG2 fázi buněčného cyklu). Predominantní populace KBZP a SHED měly 15,2 a 15 μm v průměru. Fenotypovou analýzou povrchových znaků KBZP a SHED jsme prokázali jejich příbuznost s tkáněmi mezenchymálního původu, avšak odlišnost v expresi základních hematopoetických znaků od MKB kostní dřeně. Pomocí imunocytochemie jsme

dokázali přítomnost markerů MKB u KBZP (STRO-1 a vimentin) i SHED (vimentin). Během *in vitro* kultivace nevykazovaly KBZP/SHED žádné známky spontánní diferenciaci. I po dosažení Hayflickova limitu byly KBZP i SHED cytogeneticky stabilní.

Také jsme ověřili schopnost KBZP a SHED diferencovat *in vitro* v osteoblasty a chondroblasty. I přes využití silného adipogenního média se nám nepodařilo diferencovat KBZP v adipocyty.

Pomocí imunocytochemické analýzy jsme prokázali přítomnost katalytické podjednotky telomerázy v jádře KBZP, přestože v průběhu dlouhodobé kultivace docházelo ke zkracování telomer. Dokázali jsme nicméně schopnost KBZP (60 PD) a SHED (52 PD) proliferovat přes Hayflickův limit (50 PD).

Prokázali jsme schopnost KBZP reparovat DNA v případě poškození malými dávkami ionizujícího záření (2 Gy). Při vyšší dávce došlo k zastavení DNA cyklu v SG2 fázi. Takto poškozené buňky vstoupily do senescence.

Z již uvedených důvodů představuje zubní dřev z exfoliovaných a stálých zubů alternativní a snadno dostupný zdroj pro získání tkáňově specifických kmenových buněk. Díky histokompatibilitě těchto buněk s tkáněmi pacienta/příjemce reprezentují dle našeho mínění budoucnost regenerativní medicíny.

SHED i KBZP jsou stabilní po opakované kryokonzervaci a mohou být dlouhodobě skladovány. Zubní dřev ze stálých a z exfoliovaných dočasných zubů představuje snadno dostupný zdroj tkáně, který je navíc po extrakci zubu likvidován. Zubní dřev tak může být použita jako zdroj kmenových buněk pro budoucí výzkum a klinické aplikace bez etických úskalí provázející kmenové buňky izolované z jiných zdrojů. V průběhu studie jsme získali celkem 4 premoláry, 63 molárů a 3 dočasné zuby. Skupinu dárců jsme rozšířili o 47 třetích molárů s dokončeným vývojem kořene, tudíž zubů, které nevyhovovaly kritériím ostatních autorů a nebyly by do studie zařazeny. Z těchto 70 zubů jsme úspěšně izolovali 51 linií KBZP a 3 linie SHED.

8. Použitá literatura

- 1) KNOBLICH, J. A.; Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, roč. 9, č. 6, s. 833-841.
- 2) JANG, Y. Y.; SHARKIS, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 2007, roč. 110, č. 8, s. 3056-3063.
- 3) RAMALHO-SANTOS, M., et al. "Stemness": Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*, 2002, roč. 298, č. 5593, s. 597-600.
- 4) ASAI, A., et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res*, 2003, roč. 63, č. 14, s. 3931-3939.
- 5) Ying, Q. L., et al. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, roč. 115, č. 3, s. 281-292.
- 6) Martin, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, roč. 78, č. 7, s. 3213-3218.
- 7) Thomson, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, roč. 282, č. 1145, s. 1145-1147. 12, s. 7634-7638.
- 8) MINGUEL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001, roč. 226, s. 507-520.
- 9) REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T., et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, roč. 9, č. 98, s. 2615-2625.
- 10) WERNTZ, J. R.; LANE, J. M.; BURSTEIN, A. H., et al. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J. Orthop. Res.*, 1996, roč. 14, č. 1, s. 85-93.
- 11) ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.*, 2002, roč. 13, č. 12, s. 4279-4295.
- 12) ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C., et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003, roč. 102, č. 4, s. 1548-1549.
- 13) CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A.; KUMAR, S., et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 2001, roč. 98, č. 8, s. 2396-2402.

- 14) NAKAHARA, H.; DENNIS, J. E.; BRUDER, S. P., et al. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp. Cell. Res.*, 1991, roč. 195, č. 2, s. 492-503.
- 15) SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S., et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004, roč. 364, č. 9429, s. 149-155.
- 16) GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J., et al. Postnatal human dental pulp stem cells (KBZPs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, č. 97, s. 13625-13630.
- 17) GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, roč. 81, 2002, č. 6, s. 531-535.
- 18) SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, roč. 18, 2003, č. 4, s. 696.
- 19) MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M., et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, roč. 100, č. 10, s. 5807-5812.
- 20) COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, č. 97, s. 3213-18.
- 21) PITTENGEL, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, č. 284, s. 143-7.
- 22) PEREIRA, R. F.; HALFORD, K. W.; O'HARA, M. D., et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, č. 92, s. 4857-61.
- 23) ODA, Y., et al. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *JBC Papers in Press.*, 2010, [online] 1.7.2010, poslední aktualizace 1.7.2010. Dostupný z www: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.055889>, M109.055889.
- 24) CONBOY, M. J., et al. Immuno-analysis and FACS sorting of adult muscle fiber-associated stem/precursor cells. *Methods Mol Biol.*, 2010, roč. 621, s. 165-73.
- 25) SIEBER-BLUM, M., et al. Pluripotent Neural Crest Stem Cells in the Adult Hair Follicle. *Dev. Dynamics*, 2004, roč. 231, č. 2, s. 258-269.
- 26) GREIDER, C. W. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, 1996, roč. 65, s. 337-365.
- 27) WONG, J. M.; COLLINS, K. Telomere maintenance and disease. *Lancet*, 2003, roč. 362, č. 9388, s. 983-988.

- 28) YU, J.; DENG, Z.; SHI, J.; ZHAI, H., et al. Differentiation of dental pulp cells into regular-shaped dentin pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue eng.*, 2006, roč. 12, č. 11, s. 3097-3105.
- 29) TURKSEN, K., *Adult stem cells*. 1. vyd. [Kap.] 5. Human dental pulp stem cells: characterization. GRONTHOS, S., et al. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004., s. 67-82. eISBN 11-59259-732-7.
- 30) KARBANOVÁ, J., et al. Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2010, roč. 53, č. 2, s. 79–84.
- 31) Rachel, J., et al. Isolation of Distinct Progenitor Stem Cell Populations from Dental Pulp. *Cells Tissues Organs*, 2009; roč. 189, č. 1-4, s. 268–274.
- 32) PENG, L.; YE, L.; ZHOU, X. Mesenchymal Stem Cells and Tooth Engineering. *International Journal of Oral Science*, 2009, roč. 1, č. 1, s. 6–12.
- 33) LIBERDA O., et al. Multimediální atlas pro výuku stomatologické chirurgie - retence zubů a vývojové odontogenní cysty. MULTIMEDIÁLNÍ PODPORA VÝUKY KLINICKÝCH A ZDRAVOTNICKÝCH OBORŮ: PORTÁL LÉKAŘSKÉ FAKULTY MASARYKOVY UNIVERZITY [online] 19.2.2009, poslední aktualizace 19.2.2009. Dostupný z www: <<http://portal.med.muni.cz/clanek-487-multimedialni-atlas-pro-vyuku-stomatologicke-chirurgie-retence-zubu-a-vyvojove-odontogenni-cysty.html>>. ISSN 1801-6103.
- 34) LIAO, Y. H.; VERCHERE, C. B.; WARNOCK, G. L. Adult stem or progenitor cells in treatment for type 1 diabetes: current progress, *Can J Surg*, 2007, roč. 50, č. 2, s. 137-142.
- 35) MIMÉAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics—Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies, *Clin Pharmacol Ther.*, 2007, roč. 82, č. 3, s. 252–264.
- 36) CHRISTOFOROU, N.; GEARHART, J. D. Stem Cells and Their Potential in Cell-Based Cardiac Therapies, *Prog Cardiovasc Dis.*, 2007, roč. 49, č. 6, s. 396-413.
- 37) SANCHEZ-RAMOS, J., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 2000, č. 164, s. 247-256.
- 38) DOETSCH, F. A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003, roč. 13, č. 5, s. 543-550.

- 39) COELHO, M. J.; FERNANDES, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 2000, roč. 21, č. 11, s. 1095-1102.
- 40) MACKENSEN, A.; DRÄGER, R.; SCHLESIER, M., et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2000, roč. 49, č. 3, s. 152-156.
- 41) ARORA, V.; ARORA, P.; MUNSHI, A. Banking Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED): Saving for the Future. *J Clin Pediatr Dent*, 2009, roč. 33, č. 4, s. 289–294.
- 42) GOTLIEB, E. L.; MURRAY, P. E.; NAMEROW, K. N., et al. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *J Am Dent Assoc*, 2008, roč. 4, č. 139, s. 457-465.
- 43) YAMAZA, T., et al. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PLoS ON*, 2008, roč. 3, č. 7, s. e2615.
- 44) KARAÖZ, E., et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*, 2010, roč. 133, č. 1, s. 95–112.
- 45) TURKSEN, K., *Adult stem cells*. 1. vyd. [Kap.] 3. Stem cells in skeletal muscle. POLESSKAYA, A.; RUDNICKY, M. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004., s. 37-51. eISBN 11-59259-732-7.
- 46) TURKSEN, K., *Adult stem cells*. 1. vyd. [Kap.] 7. Adult liver stem cells. COLEMAN, W. B.; GRISHAM, J. W.; MALOUF, N. N. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004., s. 101-148. eISBN 11-59259-732-7.
- 47) KARBANOVÁ, J., et al. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low-serum containing medium. *Cells Tissues Organs* (IF=3,322) (přijato k publikaci)
- 48) GRONTHOS, S.; GRAVES, S.; OHTA, S., et al. The STRO-1 + fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 1994, roč. 84, č. 12, s. 4164-4173.
- 49) HAYNESWORTH, S. E.; BARBER, M. A.; CAPLAN, I. A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 1992, roč. 13, č. 1, s. 69–80.
- 50) MOKRÝ, J., et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol.*, (IF=1,75). (accepted for publication)

- 51) MUTHNA, D., et al. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest and Senescence but not Apoptosis. *Stem Cells Dev.*, (IF=4,146) (přijato k publikaci)
- 52) IKEDA, E.; TSUJI, T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.*, 2008, roč. 8, č. 6, s. 735-44.
- 53) YALVAC, M. E., et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.*, 2010, roč. 10, č. 2, s. 105-13.
- 54) JO, Y., et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental pulp tissues. *Tissue eng.*, 2007, roč. 13, č. 4, s. 767-773.
- 55) LAINO, G., et al. A new source of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue. *J Bone Miner Res.*, 2005, roč. 20, č. 8, s. 1394-402.
- 56) LINDROOS, B. et al. Characterisation of human dental pulp stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2008, roč. 368, č.2, s. 329-35.
- 57) KAGEYAMA, Y. et al. Telomere length and telomerase activity in bladder and prostate cancer cell lines. *Int J Urol*, 1997, roč. 4, č.4, s. 407-410.
- 58) SCHWARTZ, G. K. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle*, 2002, roč. 1, č. 2, s. 122-3.
- 59) SERAKINCI, N., R., et al. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. *Exp. Cell Res*, 2007, roč. 313, č. 5, s. 1056-67.

9. Přílohy

9.1 Řešené granty věnované problematice KBZP a SHE

9.1.1 Hlavní řešitel

2006 - Grant s podporou fi. ROCHE, a.s. - Kmenové buňku zubní pulpy

2007 – Grantová agentura Univerzity Karlovy - 102908-3029/2008

9.1.2 Spoluřešitel

2007-2009 - Grant IGA MZ NR/9182

2008-2011 – projekt PurStem

9.2 Publikační aktivita

9.2.1 Hlavní autor

Suchánek, J.; Soukup, T.; Ivančaková, R.; Karbanová, J.; Hubková, V.; Pytlík, R.; Kučerová, L. Human dental pulp stem cells - isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2007, roč. 50, č. 3, s. 195-201. (citováno 2x)

Suchánek, J.; Soukup, T.; Víšek, B.; Kučerová, L.; Mokrý, J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2009, roč. 153, č. 1, s. 31-36. (citováno 3x)

Suchánek, J.; Soukup, T.; Ivančaková, R.; Víšek, B. Zubní pulpa – zdroj mezenchymových kmenových buněk. *Čes. Stomat.*, 2008, roč. 108, č. 5, s. 122-128.

Suchánek, J.; Víšek, B.; Soukup, T.; Kamal El-Din Mohamed, S.; Ivančaková, R.; Mokrý, J. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2010, roč. 53, č. 2, s. 93–99.

9.2.2 Spoluautor

Mokry J., Soukup T., Micuda S., Karbanova J., Visek B., Brcakova E., **Suchanek J.**, Bouchal J., Vokurkova D., Ivancakova R. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:673513. Epub 2010 Oct 4 (**IF=1,75**)

Karbanová J., Soukup T., **Suchánek J.**, Pytlík R., Corbeil D., Mokrý J. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low-serum containing medium. *Cells Tissues Organs*, Published online: November 11, 2010 (**IF=3,322**)

Muthna D., Soukup T., Vavrova J., Mokry J., Cmielova J., Visek B., Jiroutová A., Havelek R., **Suchánek J.**, Filip S., English D and Rezacova M. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest and Senescence but not Apoptosis. *Stem Cells and Development* 2010 Dec; 19(12):1855-62. Epub 2010 Sep 13. (**IF=4,146**)

Karbanová J., Soukup T., **Suchánek J.**, Mokrý J. Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. *Acta Med (Hradec Kralove)* 2010;53(2):79-84.

Soukup T.; Víšek B.; **Suchánek J.**; Ivančaková R. Analýza proliferačního potenciálu kmenových buněk periodontia. *In vitro diagnostika*, 2008, č. 9, s. 11-13.

Soukup T.; Růckerová H.; Karbanová J.; **Suchánek J.**; Kudrnáčová J.; Vlček R.; Moos J. Stanovení základních biologických charakteristik v laboratoři tkáňových kultur. *In vitro diagnostika*, 2007, č. 5, s. 18-21.

Ivančaková R.; Soukup T.; **Suchánek J.**; Karbanová J. Metodiky odběru zubní pulpy pro izolaci a kultivaci kmenových buněk. *Čes. Stomat.*, 2006, roč. 106, č. 5, s. 131-135.

Mokrý, J.; Ehrmann, J.; Karbanová, J.; Čížková, D.; Soukup, T.; Suchánek, J.; Filip, S.; Kolář, Z. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Med (Hradec Kralove)*, 2008, roč. 51, č. 3, s. 173-179.

9.3 Ústní sdělení

Suchánek, J. Dental pulp stem cells and their characterization, 5th International conference of postgraduate Medical Students Conference, Hradec Kralove, 27-29.11.2008.

Suchánek, J. Dental pulp stem cells and their characterization, 4th Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Kralove, 21.10.2008 – (druhé místo).

Suchánek J.; Soukup, T. Izolace a kultivace kmenových buněk zubní pulpy. Den výzkumných prací – Výzkumný ústav stomatologický, 1. LF UK v Praze, ČR 6.6.2008.

Suchánek, J.; Soukup, T.; Karbanová, J.; Víšek, B.; Mokry J. Fenotypická analýza kmenových buněk zubní pulpy. 3. morfologický kurz PGS, LF UK, Hradec Králové, ČR 13.12.2007.

Suchánek, J.; Soukup, T.; Hubková, V.; Mokry, J.; Karbanová, J.; Ivančaková R. Zubní pulpa jako zdroj kmenových buněk. Seminář Stomatologické kliniky a Ústavu histologie a embryologie LF v Hradci Králové, Czech Republic 18.1.2006.

Suchanek, J. Methods of Dental Pulp Stem Cells (KBZPs) isolation and their phenotypic changes according to culture conditions. II. Fakultní konference studentů doktorského studia, Hradec Králové, Česká republika 24.10. 2006.

Suchánek, J. Dentální amalgamy. Odborné sdělení na sjezdu oblastní stomatologické komory Hradec Králové, Hradec Králové, Česká republika 21.11.2007.

9.4 Postery

Soukup, T.; **Suchanek, J.;** Visek, B.; Ivancakova, R.; Bruckova, L.; Mokry, J. Influence of ITS supplemented media on human dental pulp stem cells in vitro. World Stem Cell Summit 2009, Baltimore, USA 21-23.9.2009.

Ivančaková R.; Soukup, T.; **Suchánek, J.;** Víšek, B.; Mokry, J. Isolation, cultivation differentiation, phenotypic characterization of dental pulp stem cells. PEF IADR 2008, London 10.-12.9.2008.

Suchánek, J.; Soukup, T. Zubní pulpa – Fakta a záhady. Prague Dental Days, Prague, Czech Rep. 10.-12.10.2007.

Suchanek, J.; Soukup, T.; Ivancakova, R.; Karbanova, J.; Hubkova, V. Dental pulp stem cells – the subject of postgraduate scientific research. The 11th Annual Conference of the EADPH, Prague, Czech Republic 7.-9.9.2006

Karbanová, J.; Soukup, T.; Mokry, J.; Pytlík, R.; Mičuda, S.; **Suchánek, J.;** Ivančaková, R.; Kučerová, L. Growth and phenotypic characteristics of human dental pulp stem cells.

Proceedings of 5th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Cairns, Queensland, Australia, 17.-20. 6. 2007, s. 95.

Karbanová, J.; Soukup, T.; Vališ, M.; Mokrý, J.; **Suchánek, J.**; Pytlík, R.; Kučerová, L.; Čížková, D. Characterization of human dental pulp stem cells. Proc of Stem Cells, Cancun, Mexican Riviera 14.-17.12.2006, 86.

Ivančaková, R.; Soukup, T.; **Suchánek, J.**; Karbanová, J. Metodiky odběru zubní pulpy pro izolaci a kultivaci kmenových buněk. X. Sazamovy dny, Výukové centrum LF UK, Hradec Králové, Czech Rep. 10.-11.11.2006.

Ivancakova, R.; Soukup, T.; **Suchanek, J.**; Karbanova, J. Methods of dental pulp extraction for isolation and cultivation of the stem cells. ZÄK Krems 2006, Krems, Austria 27.-30.9.2006.

Karbanová, J.; Soukup, T.; Mokrý, J.; Pytlík, R.; Kučerová, L.; Mičuda, S.; Ivančaková, R.; **Suchánek, J.** Human dental pulp stem cells and their biological and antigenic properties. Proc of the 3rd International Meeting of Stem Cell Network North Rhine Westphalia, Münster, Germany, 2006, 84.

9.5 Souhlasné stanovisko etické komise k výzkumu

Etická komise, Fakultní nemocnice Hradec Králové,
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Vážený pan
MUDr. Jakub Suchánek
Stomatologická klinika
FN Hradec Králové

STANOVISKO - čj. 200712 S01P

Název klinického hodnocení: Fenotypizace kmenových buněk zubní pulpy
a periodoncia

Datum doručení: 6. 11. 2007
Datum vydání stanoviska: 8. 11. 2007

Místo hodnocení: MUDr. Jakub Suchánek, Stomatologická klinika
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Seznam dokumentace:

- a) Kopie stanoviska EK ke grantu s podporou GAUK
- b) Žádost o vyjádření EK
- c) Informace pro pacienta
- d) Text informovaného souhlasu

Výrok (odůvodnění):

- souhlasné stanovisko
 nesouhlasné stanovisko
 bere na vědomí

Fakultní nemocnice Hradec Králové
Etická komise
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: etikom@fnhk.cz



V Hradci Králové dne 8. listopadu 2007

MUDr. Jiří Vortel
předseda EK

vyřizuje: Ing. Petra Doležalová, tel.: 49 583 3795; E-mail: etikom@fnhk.cz

9.6 Informovaný souhlas pro pacienty

9.6.1 Informace pro pacienty (varianta pro pacientky)



ODBĚR DŘEŇOVÝCH BUNĚK PRO VÝZKUMNÉ ÚČELY INFORMACE PRO PACIENTA

Název studie: Izolace, kultivace, diferenciacce a fenotypizace kmenových buněk zubní pulpy

Vážená slečno/paní, dnes podstupujete lékařský zákrok, při kterém bude v místním znecitlivění extrahován dočasný/ stálý zub. Chtěli bychom Vás proto požádat, abyste v rámci tohoto výkonu věnovala extrahovaný zub, resp. zubní dřeň, na výzkum mezenchymových kmenových buněk, které se v zubní dřeni nacházejí.

Co to vlastně jsou kmenové buňky?

Jde o vývojově nejstarší, relativně nezralé a nediferencované buněčné elementy. V lidském těle jsou přítomné po celý život (od početí do smrti). Kmenové buňky nacházíme ve všech tkáních, jsou zodpovědné za udržení jejich struktury i za regenerační procesy – udržují tzv. tkáňovou homeostázu (rovnováhu). Mají schopnost neomezeně se dělit, jejich zásoba ve tkáních je nevyčerpitelná.

Mezenchymové kmenové buňky jsou v současné době intenzivně studovány pro své schopnosti podpory krvetvorby, modulace imunitních funkcí a vyzrávání směrem ke specializovaným tkáním (kost, chrupavka, šlacha, srdeční sval, nervová tkáň aj.).

Izolace, diferenciacce, laboratorní modelování a klinické aplikace kmenových buněk v ČR rozhodně nepatří mezi rutinní běžně používané postupy. Proto jsem se na podkladě zkušeností získaných v zahraničí, motivován školitelem, prací v oboru histologie a základní znalostí problematiky mezenchymových kmenových buněk rozhodl formulovat cíle mé doktorské práce „Mezenchymové kmenové buňky: Jejich izolace, charakteristika a potenciální klinické aplikace“. Jedná se o výzkum toho, jak lze zdravé kmenové buňky, a to nejen ze zubní dřene, izolovat, stimulovat k dělení, růstu a diferenciaci směrem ke specializovaným tkáním (kost, chrupavka, šlacha, srdeční sval, nervové buňky). Poznatky získané tímto výzkumem nebudou bezprostředně využity k Vaší léčbě, ale mohou být důležité pro zlepšení léčby či vývoj nových léčebných možností pro další pacienty.

Dárcovství zubu k výzkumným účelům je zcela dobrovolné a odmítnutí nebude mít žádný vliv na další léčbu a nebude jím ovlivněn ani vztah Vašeho ošetřujícího lékaře k Vám. Vzhledem k tomu, že se jedná o darování zubu v rámci běžného zákroku, nevzniká Vám tím ani nárok na finanční náhradu. Projevíte-li zájem o přesnější informace o prováděném výzkumu, obraťte se prosím na svého ošetřujícího lékaře nebo na lékaře, podílejícího se na řešení projektu.

Za kolektiv lékařů,

MUDr. Tomáš Soukup
Laboratoř kmenových buněk
Ústav histologie a embryologie
LF v Hradci Králové
Šimkova 870
500 01 Hradec Králové

9.6.2 Informovaný souhlas (varianta pro pacientky)



ODBER KMENOVÝCH BUNEK ZUBNÍ PULPY PRO VÝZKUMNÉ UCELY INFORMOVANÝ SOUHLAS

Název studie: Izolace, kultivace, diferenciacce a fenotypizace kmenových buněk zubní pulpy

Jméno a příjmení pacienta:

Datum narození:

Pacient byl do studie zařazen pod číslem:

Odpovědný lékař:

Vážená slečno/paní dnes podstupujete léčebný zákrok, při kterém bude v místním znečistivění extrahován dočasný / stálý zub. Tento zákrok je pro zlepšení zdravotního stavu (stavu chrupu) nezbytný, jak Vám vysvětlil lékař, který Vás ošetřuje. Chtěli bychom Vás požádat, zda byste mohla v rámci tohoto výkonu věnovat Váš dočasný / stálý zub, především jeho zubní dřeň na výzkum neurálních a mezenchymových kmenových buněk, jež se v zubní dřeni nacházejí. Jedná se o výzkum toho, jak lze zdravé kmenové buňky ze zubní dřene izolovat, stimulovat k dělení, růstu a diferenciaci směrem ke specializovaným tkáním (kost, nervové buňky,...). Poznatky získané tímto výzkumem nebudou bezprostředně využity k Vaší léčbě, ale mohou být důležité pro zlepšení léčby či vývoj nových léčebných možností pro další pacienty.

Váš souhlas s dárcovstvím bude znamenat, že Vám bude standardním způsobem extrahován dočasný / stálý zub z něž již mimo dutinu ústní odebereme vlastní zubní dřeň. Nebude se jednat o žádný vpich navíc. Zubní dřeň Vám nebude nyní, ani kdykoliv v budoucnu chybět.

Dárcovství Vaší zubní dřene k výzkumným účelům je zcela dobrovolné a odmítnutí nebude mít žádný vliv na Vaší další léčbu a nebude jím ovlivněn ani vztah Vašeho ošetřujícího lékaře k Vám. Vzhledem k tomu, že se jedná o odběr v rámci běžného zákroku, nevzniká Vám nárok na finanční náhradu. Projevíte-li zájem o přesnější informace o prováděném výzkumu, obraťte se prosím na svého ošetřujícího lékaře nebo na lékaře, podílejícího se na řešení projektu.

Za kolektiv lékařů,

MUDr. Tomáš Soukup
Laboratoř kmenových buněk
Ústav histologie a embryologie, LF v Hradci Králové

INFORMOVANÝ SOUHLAS

Já níže podepsaná souhlasím s účastí ve studii. Potvrzuji tímto svůj souhlas s odběrem zubní dřene z dočasného / stálého zubu, který dnes bude standardním způsobem extrahován v rámci léčebné péče, kterou na oddělení podstupuji.

Potvrzuji, že tento souhlas dávám zcela dobrovolně a jsem si vědoma možnosti odběr odmítnout. Jsem srozuměna s tím, že mi za poskytnutou zubní dřeň nevzniká nárok na žádnou finanční náhradu. Při zařazení do studie budou osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti podle platných zákonů ČR.

V Hradci Králové, dne

Podpis pacienta (zákonného zástupce)

Podpis lékaře

9.7 SOP – izolace, kultivace KBZP/SHED

9.7.1 SOP 1 – izolace zubní pulpy

SOP 1 - IZOLACE ZUBNÍ PULPY

Izolace zubní pulpy je postup extrakce zubní tkáně z *cavum pulpae* za účelem získání kmenových buněk zubní pulpy dočasného (SHED), či stálého (KBZP) zubu.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ

Luerovy kleště – kleště užívané ve stomatologii k egalizaci ostrých okrajů kosti po extrakci

HBSS transportní pufr – v 10ml sterilní zkumavce

SLOŽKA	10 ml
HBSS (Invitrogen, USA)	1 ml
Aqua pro inj. (Biedde Medital, Itálie)	9 ml
PNC/STM (Invitrogen, USA)	200 µl
GEN (Invitrogen, USA)	200 µl
AMFO (Invitrogen, USA)	200 µl

STERILNÍ INSTRUMENTARIUM: Luerovy kleště, ostrá sonda, mikrochirurgická pinzeta, nůžky na suturu rovné

PRACOVNÍ POSTUP

1. Příprava

1.1 INFORMOVANÝ SOUHLAS

1.1.1 Dospělý pacient je před odběrem zubu pro výzkumné účely krátce seznámen s teorií kmenových buněk. Pokud souhlasí, ztvrdí tento souhlas podpisem **Informovaného souhlasu** (schválen Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové).

1.1.2 Pokud je pacientem dítě, je s problematikou viz výše seznámen zákonný zástupce, pokud souhlasí, podepíše **Informovaný souhlas**. Při zařazení do studie jsou osobní data pacientů uchovávána s plnou ochranou důvěrnosti podle platných zákonů ČR.

1.2 ODBĚR ZUBU

Odběrem zubu rozumíme extrakci zubu v lokální anestezii za sterilních podmínek. Extrakce je provedena zubním lékařem na stomatologické klinice v aseptickém prostředí.

1.3 OŠETŘENÍ ZUBU PO EXTRAKCI

Zub prořezaný do dutiny ústní hrozí přenosem infekce, proto po extrakci následuje ošetření sterilní gázou napuštěnou dezinfekčním roztokem (Gutar) pro odstranění zubního mikrobiálního povlaku.

1.4 TRANSPORT ZUBU DO LABORATOŘE TKÁŇOVÝCH KULTUR

Zub je transportován v HBSS transportním pufru s antibiotiky (200 µl/10 ml gentamycinu, 200 µl/10 ml amfotericinu a 200 µl/10 ml penicilinu/streptomycinu) při teplotě 4 °C.

2. Vlastní izolace zubní pulpy

Veškerá práce během izolace ZP probíhá v LAMINÁRNÍM BOXU za přísně sterilních podmínek (sterilní čepice, ústenka, rukavice a plášť jsou podmínkou!).

2.1. Odlomíme sterilními **Luerovými kleštěmi** kořen (γ).

2.2 Po odlomení části kořene pomocí ostré sondy vtlačíme zubní pulpu lokalizovanou v kořenovém kanálku do *cavum pulpae* (čímž zabráníme ztrátě této části ZP během dalšího procesu odlamování zubního kořene).

2.3 Po získání dostatečného přístupu do *cavum pulpae*, uvolníme zubní pulpu od tvrdých zubních tkání pomocí ostré sondy a opatrně vyjmeme mikrochirurgickou pinzetou.

2.4 Takto získanou tkáň pomocí nůžek rozstříháme na části 1mm³ a vložíme do čistého HBSS, aby byly všechny částice zcela ponořeny.

9.7.2 SOP 2 – izolace kmenových buněk zubní pulpy (KBZP, SHED)

SOP 2 - IZOLACE KMENOVÝCH BUNĚK ZUBNÍ PULPY (KBZP, SHED)

Izolace kmenových buněk zubní pulpy je postup, při kterém ze solidní tkáně zubní pulpy extrahujeme pouze buňky kmenové.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ

Enzymatický koktejl

SLOŽKA	2 ml	4 ml
HBSS (Invitrogen, USA)	0,5 ml	1 ml
PBS (Invitrogen, USA)	0,5 ml	1 ml
Kolagenáza typ I (Sevapharma, ČR)	0,5 ml	1 ml
Dispáza (Invitrogen, USA)	0,5 ml	1 ml

HBSS – Hankův balancovaný solný roztok

Inaktivační médium

SLOŽKA	100 ml	50 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	80 ml	40 ml
20 % FCS (PAA, USA)	20 ml	10 ml

STERILNÍ INSTRUMENTÁRIUM: nůžky na suturu rovné, pipeta

POSTUP

1. Příprava

1.1 IZOLACE zubní pulpy (viz SOP 1)

2. Vlastní izolace kmenových buněk ze zubní pulpy

2.1 Izolace směsné linie KBZP

2.1.1 Rozstříháme zubní pulpu na části cca 1mm³ sterilními nůžkami.

2.1.2 Smícháme kolagenázu typ I, dispázu, HBSS a PBS v poměru 1:1:1:1. Podle množství tkáně ZP 1ml:1ml:1ml:1ml, nebo 0,5ml:0,5ml:0,5ml:0,5ml. Do tohoto roztoku v centrifugační zkumavce ponoříme pulpu, aby byly části zubní pulpy po hladinou enzymatického roztoku.

2.1.3 Zkumavku s tímto obsahem umístíme do vodní lázně předehřáté na 37°C, abychom aktivovali enzymy. Ponecháme zkumavku v lázni po dobu 40 až 60 minut, dokud nedojde k plné disociaci tkáně („obláček“). Každých 10 minut pomocí Pasterovy pipety promícháme.

2.1.4 Buněčnou suspenzi inaktivujeme inaktivačním médiem, přidáme stejný objem inaktivačního média jako je objem enzymatického koktejlu (4, nebo 2 ml).

2.1.5 Centrifugujeme 600g (2000ot./min. po dobu 5 minut).

2.1.6 Pipetou odsajeme ze zkumavky supernatant.

2.1.7 Vzniklou peletu resuspendujeme v 1 ml kultivačního média.

2.1.8 Nasadíme do připravené kultivační nádoby.

2.1.9 Vložíme do inkubátoru. Inkubujeme při teplotě 37°C v atmosféře s 5 % CO₂.

2.1.10 Po 24 až 72 hodinách odstraníme pomocí oplachu PBS zbytky zubní pulpy a nepřisedlé buňky. Dále kultivujeme po dobu 6 dnů ve standardním kultivačním médiu.

2.2 Izolace subpopulace KBZP ze subodontoblastického kompartmentu

2.2.1 Pulpu ponoříme do roztoku enzymů a ponecháme ji v lázni 35 minut.

2.2.2 Odsajeme buněčnou suspenzi (zbude pouze nedisociovaná tkáň pulpy).

2.2.3 Inaktivujeme buněčnou suspenzi inaktivačním médiem.

2.2.4 Buněčnou suspenzi centrifugujeme a postupujeme dle bodů 2.1.5 – 2.1.10

2.3 Izolace subpopulace KBZP z perivaskulárního kompartmentu

2.3.1 Zubní pulpu zbylou z izolace SO kompartmentu umístíme na 35 minut do nového roztoku enzymů.

2.3.2 Dále postupujeme dle bodů 2.1.3 - 2.1.10.

9.7.3 SOP 3 – kultivace KBZP a SHED

SOP 3 – KULTIVACE KBZP a SHED

Kultivace kmenových buněk zubní pulpy je postup expanze linií KBZP/SHED za účelem namnožení kmenových buněk zubní pulpy dočasného (SHED), či stálého (KBZP) zubu.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ

Inaktivační médium

SLOŽKA	100 ml	50 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	80 ml	40 ml
20 % FCS (PAA, USA)	20 ml	10 ml

Složení kultivačních médií (standardně užitá 2 % FCS + 2 % ITS)

SLOŽKA	2 % FCS	10 % FCS	2 % FCS + ITS
α MEM (Invitrogen, USA)	94,96 ml	86 ml	94,96 ml
FCS (PAA, USA)	1,94 ml -2%	9,7 ml -10%	1,94 ml -2%
Kyselina L-askorbová (Sigma, USA)	1 ml (10 mg)	1 ml (10 mg)	1 ml (10 mg)
Glutamin (Invitrogen, USA)	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
PEN/STM (Invitrogen, USA)	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
GEN (Invitrogen, USA)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Dexametazon (Sigma, USA)	8 µl	-	8 µl
PDGF-BB (Peprotech, USA)	10 ng/ml	-	10 ng/ml
EGF (Peprotech, USA)	10 ng/ml	-	10 ng/ml
ITS (Sigma, USA)	-	-	10 µl/ml

STERILNÍ INSTRUMENTARIUM: pipeta**Látky potřebné k pasážování:**

Trypsin EDTA (Invitrogen, USA)
PBS (Invitrogen, USA)

PRACOVNÍ POSTUP

1. Po resuspendaci buněčné pelety pipetou v 1 ml kultivačního média jsou buňky nasazeny do kultivační nádoby Cell⁺ (Sarstedt, USA) a kultivovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.
2. 24 - 72 hodin po nasazení je médium odsáto, nepřisedlé buňky a zbytky měkkých tkání jsou opláchnuty PBS. Doplněno nové médium.
3. Po 7 dnech, když jsou patrné kolonie čítající cca 20-50 buněk, pasážujeme primokulturu do standardní kultivační nádoby.
 - 3.1 Odsajeme kultivační médium a opláchneme kulturu PBS.
 - 3.2 Buňky vystavíme působení enzymu trypsin-EDTA (tolik trypsin-EDTA, aby pokryl celé dno kultivační nádoby) po dobu 10 minut při 37 °C.
 - 3.3 Trypsin-EDTA společně s uvolněnými kmenovými buňkami odsajeme a vložíme do centrifugační zkumavky.
 - 3.4 Kultivační nádobu opláchneme 2ml PBS a použité PBS odsajeme a smícháme s obsahem v centrifugační zkumavce (viz 3.3).
 - 3.5 Buněčnou suspenzi vzniklou smícháním trypsinu a PBS inaktivujeme pomocí inaktivačního média v poměru 1:1.
 - 3.6 Centrifugujeme – 2000 ot./ 1 min po dobu 5 min (600g).
 - 3.7 Odsajeme pipetou supernatant a vzniklou buněčnou peletu resuspendujeme v 1 ml kultivačního média.

3.6 Buněčnou suspenzi nasadíme do standardní kultivační nádoby.

4. Kmenové buňky kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ do dosažení 70% splývavosti, výměna kultivačního média probíhá každé 3 dny.
5. Po dosažení 70% splývavosti pasážujeme linii do nové kultivační nádoby dle postupu v bodě 3.1 - 3.7, linii KB nasazujeme do nových kultivačních nádob v denzitě 4500 buněk/1cm².

9.8 SOP – diferenciacie

9.8.1 SOP 4.1 – osteogenní diferenciacie KBZP/SHED *in vitro*

SOP 4.1 – OSTEOGENNÍ DIFERENCIACE KBZP/SHED *IN VITRO*

Osteogenní diferenciacie kmenových buněk zubní pulpy je postup, při kterém se snažíme stimulovat KB k diferenciaci v osteoblasty.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ

Osteogenní médiu

SLOŽKA	100 ml	180 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	77,5 ml	139,5 ml
20 % FCS (PAA, USA)	19,4 ml	27,9 ml
PNC/STM (Invitrogen, USA)	1,2 ml	2,16 ml
Dexametazon (Sigma, USA)	15 µl	7,5 µl
Vitamin C fosfát (Sigma, USA)	10 mg	180 mg
Glutamin (Invitrogen, USA)	1,9 ml	3,42 ml
β-glycerofosfát (Sigma, USA)	216 mg	388,8 mg

Inaktivační médiu

SLOŽKA	100 ml	50 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	80 ml	40 ml
20 % FCS (PAA, USA)	20 ml	10 ml

STERILNÍ INSTRUMENTARIUM: pipeta

Látky potřebné k pasážování:

Trypsin EDTA (Invitrogen, USA)
PBS (Invitrogen, USA)

PRACOVNÍ POSTUP

Osteogenní diferenciaci ve sférách

1. Po dosažení 70 % splývavosti ve standardní kultivační nádobě, odsajeme kultivační médium a opláchneme kulturu PBS.
2. Buňky vystavíme působení enzymu trypsin-EDTA (tolik trypsin-EDTA, aby pokryl celé dno kultivační nádoby) po dobu 10 minut při 37 °C.
3. Trypsin-EDTA společně s uvolněnými kmenovými buňkami odsajeme a vložíme do centrifugační zkumavky. Kultivační nádobu opláchneme 2ml PBS, PBS odsajeme a smícháme s obsahem centrifugační zkumavky. Buněčnou suspenzi vzniklou smícháním trypsin-EDTA a PBS inaktivujeme pomocí inaktivačního média v poměru 1:1.
4. Centrifugujeme - 2000 ot./ 1 min po dobu 5 min (600g).
5. Vzniklou peletu resuspendujeme ve 3 ml osteogenního média a přeneseme do kultivační nádoby s nepřilnavým povrhem (např. centrifugační zkumavka).
6. Kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 4 týdnů. Médium každý 3 den opatrně vyměníme, popř. pouze doplníme nové kultivační médium. Zkumavku nezavíráme!

Osteogenní diferenciaci v monolayeru

1. Po dosažení 70% splývavosti ve standardní kultivační nádobě odsajeme kultivační médium, opláchneme kulturu PBS a přelijeme osteogenním médiem
2. Kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 4 týdnů. Médium každý 3 den vyměníme.

9.8.2 SOP 4.2 – chondrogenní diference KBZP/SHED *in vitro*SOP 4.2 – CHONDROGENNÍ DIFERENCIACE KBZP/SHED *IN VITRO*

Chondrogenní diference kmenových buněk zubní pulpy je postup, při kterém se snažíme stimulovat KB k diferenciaci v chondrocyty.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ

Chondrogenní médium

SLOŽKA	100 ml	50 ml	30 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	94,96 ml	47,48 ml	28,48 ml
2 % FCS (PAA, USA)	2 ml	1 ml	0,6 ml
Kyselina L-askorbová (Sigma, USA)	10 mg	5 mg	3 mg
Dexametazon (Sigma, USA)	15 µl	7,5 µl	4,5 µl
PEN/STM (Invitrogen, USA)	1,2 ml	0,6 ml	0,3 ml
Glutamin (Invitrogen, USA)	1,9 ml	0,95 ml	0,57 ml
PDGF (5µl/ml) (Peprotech, USA)	500 µl	250 µl	150 µl
EGF (1µl/1ml) (Peprotech, USA)	100 µl	50 µl	30 µl
TGF beta 1 (10 ng/ml) (Peprotech, USA)	1 µg	0,5 µg	0,3 µg
BMP-6 (500 ng/ml) (Peprotech, USA)	50 µg	25 µg	15 µg

Inaktivační médiu

SLOŽKA	100 ml	50 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	80 ml	40 ml
20 % FCS (PAA, USA)	20 ml	10 ml

STERILNÍ INSTRUMENTARIUM: pipeta

Látky potřebné k pasážování:

Trypsin EDTA (Invitrogen, USA)
PBS (Invitrogen, USA)

PRACOVNÍ POSTUP**Chondrogenní diferenciacie ve sférách**

1. Po dosažení 70% splývavosti ve standardní kultivační nádobě, odsajeme kultivační médium a opláchneme kulturu PBS.
2. Buňky vystavíme působení enzymu trypsin-EDTA (tolik trypsin-EDTA, aby pokryl celé dno kultivační nádoby) po dobu 10 minut při 37 °C.
3. Trypsin-EDTA společně s uvolněnými kmenovými buňkami odsajeme a vložíme do centrifugační zkumavky. Kultivační nádobu opláchneme 2ml PBS, PBS odsajeme a smícháme s obsahem centrifugační zkumavky. Buněčnou suspenzi vzniklou smícháním trypsin-EDTA a PBS inaktivujeme pomocí inaktivačního média v poměru 1:1.
4. Centrifugujeme - 2000 ot./ 1 min po dobu 5 min (600g).
5. Vzniklou peletu resuspendujeme ve 3 ml chondrogenního média a přeneseme do kultivační nádoby s nepřilnavým povrhem (např. centrifugační zkumavka).
6. Kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 2 - 4 týdnů. Médium každý 3. den opatrně vyměníme, popř. pouze doplníme nové kultivační médium. Zkumavku nezavíráme!

Chondrogenní diferenciacie v monolayeru

1. Po dosažení 70% splývavosti ve standardní kultivační nádobě, odsajeme kultivační médium, opláchneme kulturu PBS a přelijeme chondrogenním médiem
2. Kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 2 - 4 týdnů. Médium každý 3 den vyměníme.

9.8.3 SOP 4.3 – adipogenní diferenciacie KBZP/SHED *in vitro***SOP 4.3 – ADIPOGENNÍ DIFERENCIACE KBZP/SHED *IN VITRO***

Adipogenní diferenciacie kmenových buněk zubní pulpy je postup, při kterém se snažíme stimulovat kmenové buňky k diferenciaci v adipocyty.

DEFINICE ZÁKLADNÍCH POJMŮ**Adipogenní médiu**

SLOŽKA	100 ml	50 ml	30 ml
α MEM (Invitrogen, USA)	94,96 ml	47,48 ml	28,48 ml
2 % FCS (PAA, USA)	2 ml	1 ml	0,6 ml
Isobutyl-methylxanthin (0,5 mM/ml) (Sigma, USA)	50 mM	25 mM	15 mM
Dexametazon (1μM/ml) (Sigma, USA)	100 μM	50 μM	30 μM
Inzulin (10 μg/ml) (Sigma, USA)	1 mg	0,5 mg	0,3 mg

STERILNÍ INSTRUMENTARIUM: pipeta**Látky potřebné k pasážování:**

Trypsin EDTA (Invitrogen, USA)
PBS (Invitrogen, USA)

PRACOVNÍ POSTUP

- Po dosažení 70% splývavosti KBZP/SHED v kultivační nádobě odsajeme kultivační médium, 2x opláchneme PBS.
- Doplníme nové adipogenní médium, tak aby pokrývalo celé dno kultivační nádoby.
- KB kultivujeme v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 14 dnů. Médium měníme každé 3 dny.

9.9 Porovnání CD znaků KBZP a SHED v jednotlivých médiích

CD	PANEL CD ZNAKŮ HODNOCENÝ PŘI ANALÝZE FENOTYPU	KBZP					SHED
		2 % FCS	10 % FCS	2 % FCS + ITS	KBZP z SO	KBZP z PV	2 % FCS
CD18	Integrin beta-2: adhezivní a signální molekula leukocyty.	x	x	x	2,9%	0,1%	0,1%
CD29	Integrin beta-1: adhezivní molekula, receptor pro VCAM-1.	82,4%	98,8%	81,1%	84,1%	73,4%	67,0%
CD31	PECAM-1: adhezivní molekula destiček a bb endotelu, receptor pro CD38.	x	x	x	x	x	0,0%
CD34	Sialomucin-like adhesion molecule: KB, prekursorů hematopoet. bb, endotelu kap.	1,0%	2,3%	0,0%	0,8%	1,4%	0,1%
CD44	Hyaluronate: adhezivní molekula, adheze ke kolagenu, lamininu a fibronectinu.	77,9%	99,6%	62,7%	76,4%	70,5%	91,7%
CD45	Leucocyte common antigen: transmembránový protein hematopoetických bb.	5,5%	0,3%	35,0%	5,1%	3,4%	13,2%
CD49a	Very late antigen (VLA)-1: receptor pro kolagen a laminin, buněčná adheze.	x	x	x	24,9%	16,1%	x
CD49c	VLA-3: receptor pro kolagen, laminin, fibronectin.	x	x	x	21,6%	20,3%	x
CD49d	VLA-4: Tly, Bly, NK, thymocyty, monocyty, eosinofily.	x	x	x	20,7%	12,9%	0,5%
CD49e	VLA-5: receptor pro fibronectin, adheze a přenos signálu dovnitř buňky.	x	x	x	17,8%	12,5%	3,5%
CD63	Tetraspanin family: expřimován na aktivovaných destičkách, monocyty a makrof.	x	x	x	x	x	35,1%
CD68	Glykosylovaný transmembránový protein: imunocytoch. marker monocyt. a makrof.	x	x	x	2,5%	1,2%	x
CD71	Receptor pro transferin: regulace příjmu železa, proliferující bb, prekursor ery.	7,1%	6,9%	5,8%	7,8%	6,3%	x
CD73	5'-nucleotidasa: adheze lymfocytů.	x	x	x	x	x	82,3%
CD90	Thy-1: marker hematopoetických KB a neuronální diferenciace.	80,9%	99,1%	51,1%	77,4%	82,4%	96,5%
CD105	Endoglin: buněčná odpověď TGF-beta1, endotel.bb., buňky kostní dřevě, aktiv.mak.	x	x	x	13,2%	12,3%	49,1%
CD106	VCAM-1: adhezivní molekula, migrace buněk bílé krevní řady.	x	x	x	3,4%	1,1%	0,0%
CD117	C-kit: receptor pro Stem Cell Factor, hematopoet. KB, diferenciace.	16,4%	37,8%	35,4%	15,8%	6,1%	96,2%
CD133	Prominin-like1: hematopoet. KB, epitel a endotel.bb.	x	x	x	x	x	3,9%
CD146	MUC18: adheze, endotel.bb.	x	x	x	1,7%	19,6%	1,7%
CD166	Activated leukocyte cell adhesion molecule, STRO-1, Fibroblast surface marker	x	x	x	37,4%	34,9%	74,3%
CD184	CXCR4: homing a migraci KB a chemotaxi ly.	x	x	x	x	x	1,3%
CD197	C-C chemokine receptor: expřimován na lymfatických tkáních, aktivovaných B a T	x	x	x	x	x	0,2%
HLA I		98,0%	99,8%	39,2%	98,5%	98,5%	88,3%
HLA II		0,4%	0,1%	0,0%	0,7%	0,6%	0,4%

x nehodnoceno