

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové



KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY

Jakub Suchánek

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Stomatologie

Hradec Králové
2010

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Stomatologie na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a na Stomatologické klinice Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2005 - 2011.

Autor: MUDr. Jakub Suchánek
Stomatologická klinika
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: MUDr. Romana Ivančaková, CSc.
Stomatologická klinika
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel konzultant: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.
Ústav histologie a embryologie
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové

Oponenti: prof. MUDr. Martina Kukletová, CSc.
Stomatologická klinika
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.
Ústav histologie a embryologie
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Stomatologie dne 15.3.2011 od 13.00 hod.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ 9182-3/07, GAUK 102908-3029/2008, vnitřního grantu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pro studenty 1. ročníku postgraduálního studia s podporou firmy Roche číslo 84124, projektu PurStem – 7. rámcového programu a výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy CR MSM 0021620820.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. MUDr. Antonín Šimůnek, CSc.
Předseda komise pro obhajobu disertačních prací
v doktorském studijním programu stomatologie

Obsah

Souhrn	1
Summary	2
Úvod do problematiky	3
Cíle disertační práce	6
Materiál a metodika	7
Souhrn výsledků	10
Diskuze	13
Závěr	17
Literatura	19
Přehled publikační činnosti autora	23

Kmenové buňky zubní pulpy

Souhrn

Úvod: Tématem této disertační práce je optimalizace izolace kmenových buněk zubní pulpy stálé dentice (KBZP) a standardizace kultivačních podmínek pro 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 a SHED a ověřit schopnost těchto buněk diferencovat se v jiné buněčné linie (osteogenní, chondrogenní a adipogenní).

Metoda: Byly porovnány tři postupy izolace zubní pulpy a izolace KBZP z tkáně zubní pulpy. Porovnávali jsme kultivační média ve snaze snížit množství fetálního telecího séra (FCS) a tím se přiblížit podmínkám vhodným k buněčné terapii. KBZP a SHED jsme charakterizovali pomocí stanovení základních biologických vlastností (morfologie, viabilita, velikost buněk, proliferační aktivita) a jejich porovnání v rozdílných kultivačních médiích (10% FCS, 2% FCS, 2% FCS s 2% ITS). Byl studován vliv média na fenotyp buněk a stabilitu karyotypu s ohledem na genetickou stabilitu buněk v médiu po dosažení Hayflickova limitu.

Výsledky: Jako optimální postup izolace zubní pulpy se ukázala její exstirpace po zpřístupnění *cavum pulpae* pomocí Luerových kleští. Jako standardní metodu izolace KBZP z tkáně zubní pulpy jsme zvolili působení enzymatického koktejlu na rozstříhané tkáni zubní pulpy. Jako optimální kultivační médium se ukázalo médium obsahující 2% FCS obohacené o ITS suplement.

Závěr: KBZP a SHED jsou vysoce proliferačně aktivními liniemi buněk, které jsme byli schopni kultivovat přes Hayflickův limit. Z fenotypu se dá usuzovat, že KBZP nejsou příbuzné s hematopoetickou řadou, jsou mezenchymálního původu a nesou znaky typické pro velmi málo diferencované buňky. SHED jsou v porovnání s KBZP méně diferencované a vykazují zvýšenou pozitivitu znaku CD 105, běžně exprimovaného endoteliálními buňkami.

Klíčová slova: Kmenové buňky, zubní pulpa, stálá dentice, dočasná dentice, Hayflickův limit, izolace, kultivace

Dental pulp stem cells

Summary

Background: 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). Next aims were to characterize DPSC and SHED and prove their ability to proliferate over Hayflick's limit and differentiate into mature cells lines (osteoblasts, chondroblasts and adipocytes).

Methods: In order to find the best protocols for isolation of dental pulp from tooth, we tried three different approaches. During optimization of cultivation protocols 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.

Results: Our study demonstrated that the best protocol for the isolation of dental pulp from tooth was to break the roots and extracted the pulp through this newly created 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 and SHED over Hayflick's limit and differentiate them into osteoblasts and chondroblasts-like cells. Our 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 marker typical for hematopoietic cell line. SHED in comparison with DPSC are more undifferentiated, show high positivity for CD 105, a marker which is commonly expressed by endothelial progenitors.

Key word: Dental pulp, stem cells, exfoliated teeth, adult teeth, Hayflicks limit, isolation, cultivation

Úvod do problematiky

Kmenové buňky (KB) se zakládají ve vznikajícím organismu jako jedny z prvních buněčných populací. 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 (1) obdařeny výjimečnými biologickými vlastnostmi - schopností asymetrického dělení (zamezuje vyčerpání KB v organismu) (2) a schopností diferencovat ve zralé buněčné elementy. Před škodlivými vlivy prostředí chrání KB nejen specifické detoxikační proteiny (3), ale také nižší hladina reaktivních molekul kyslíku než vykazují buňky somatické (4). KB disponují schopností neomezené proliferace při současném zachování původní buněčné linie.

Vlastnosti samotných KB se během vývoje organismu mění vlivem obměny jejich mikroprostředí (5, 6) (embryonální vs. adultní). V lidském organismu jsou pouze embryonální kmenové buňky (7, 8, 9) schopné diferencovat v jakoukoliv buněčnou linii (10). Ovšem tato vlastnost s sebou nese zásadní problém v otázce histokompatibility buněk embrya s buňkami příjemce (11) a v neposlední řadě mnoho etických a právních otázek. Z těchto důvodů se výzkum zaměřil na kmenové buňky izolované z tkání dospělého organismu (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), kdy s výhodou může být pacient sám sobě dárce, což s sebou nese široké spektrum pozitiv, a to od eliminace otázky histokompatibility až po možnost získat KB z organismu kdykoliv v případě potřeby. Mezi adultní KB patří i mezenchymové KB (MKB) (19), které jsou schopny i přes omezený diferenciační potenciál maturovat v širokou škálu buněčných typů (dle embryonálního původu) (20). V Laboratoři tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LFUK HK se věnujeme izolaci a *ex vivo* expanzi MKB z kostní dřeně a zubní pulpy (ZP). Tématem výzkumu, na jehož podkladě vznikla tato práce, se staly kmenové buňky izolované ze zubní pulpy stálých (KBZP) a dočasných zubů (SHED). Lidské KBZP byly poprvé izolovány, kultivovány a obecně charakterizovány vědeckým týmem Gronthos a spol. v roce 2000 (21). Další práce dokládají schopnost sebeobnovy KBZP, diferenciaci ve zralé buněčné typy, regenerace mikroprostředí zubní pulpy a vysoký proliferační potenciál (22, 23, 24, 25, 26, 27). V roce 2003 Miura a spol. izolovali kmenové buňky také z lidských exfoliovaných zubů (SHED); během experimentů byly tyto buňky schopné po transplantaci vytvořit významné množství kosti *in vivo* (28). Díky těmto pracím byla zubní dřev uznána jako alternativní zdroj postnatálních kmenových buněk. Od té doby podléhají KBZP a SHED intenzivnímu vědeckému výzkumu (29).

Co je důvodem tak velkého zájmu právě o tyto buňky? Důležité je si uvědomit, že linie KBZP i SHED jsou izolovány z tkáně, která je získána v rámci jiného léčebného zákroku (extrakce stálých i dočasných zubů probíhá za aseptických podmínek v lokální anestezii nejčastěji z ortodontické indikace). Pacient/dárce tedy nepodstupuje žádný zákrok navíc, spíše jde o využití tkáně, která je za běžných okolností dekontaminována a likvidována jako biologický odpad. Linie SHED s výhodou izolujeme z fyziologicky odloučené tkáně exfoliovaného zubu, tedy bez jakéhokoliv poškození a bolesti.

Zubní pulpa je tedy dostupným a bohatým zdrojem KB, který může být kdykoliv za života pacienta využit (podmínkou je přítomnost nepoškozených vitálních zubů v dutině ústní). Jinou možností, a to především u SHED a KBZP izolovaných z retinovaných třetích molárů, je kryokonzervace, která umožní skladování těchto buněk (30) pro budoucí možné

využití. Sama zubní pulpa představuje ohraničený a od ostatních tkání oddělený kompartment, který si uchoval stavbu typickou pro primitivní tkáň (histologická podobnost s embryonálním mezenchymem pupečníku. Domníváme se proto, že KB v ní obsažené by měly vykazovat spíše vlastnosti podobné embryonálním KB.

Pro izolaci KBZP a SHED mohou být využity retinované, nadpočetné (31) a exfoliované zuby, dále všechny zuby extrahované z ortodontické indikace, pokud nejsou zasažené kazem, nebo mechanicky poškozené. Jako o dalším zdroji se uvažuje o novorozeneckých zubech (32). Nejčastěji využívanými zuby k izolaci se staly třetí moláry (33, 34, 35), které jsou mnohdy jako intaktní extrahovány z mnoha příčin, ať už jako prevence stěsnání ve frontálním úseku po prodělané ortodontické léčbě, usuraci druhého moláru, častým zánětům dásní v okolí korunky, či neuralgiím a mnoha dalším. Ztráta třetích molárů v budoucnosti nečiní pacientovi (dárce) žádné obtíže.

Vývoj zubu a zubní pulpy je z hlediska našeho výzkumu 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 zubní pulpy). U KB zubní pulpy (36, 37, 38, 39) byly objeveny i neurální markery, což v případě, že tyto buňky budeme schopni využít terapeuticky, skýtá i rozsáhlé spektrum klinických aplikací v léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, nebo amyotrofická laterální skleróza (38). KB zubní pulpy mohou být potenciálně využity při léčbě chronických onemocnění srdce jako je chronické srdeční selhání (40), ischemické choroby srdeční (41), mozkové mrtvice (42) a při onemocnění pohybového aparátu (43), parodontopatie a v neposlední řadě k tvorbě zubu *in vitro*.

V současné době terapeutickému využití kmenových buněk brání použití xenogenních suplementů při kultivaci. Klasickým prostředím pro pěstování MKB je Dulbecem modifikované Eaglovo médium, či Eaglovo minimálně esenciální médium v α modifikaci s 10-20 % fetálního telecího séra (FCS) (44). Ani DMEM, ani α -MEM nejsou t. č. schváleny pro klinické použití. Proto jsme se rozhodli soustředit se také na snížení obsahu FCS v kultivačním médiu a jeho nahrazení jinými suplementy.

Struktura zubu, díky unikátní kombinaci vlastností skloviny a dentinu, zajišťuje jeho pevnost a 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 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 kovových implantátů, popřípadě pomocí protetické léčby. Zub vytvořený pomocí KBZP/SHED *in vitro* podmínkách je velmi slibnou metodou na celkovou rekonstrukci pacientovy dentice bez použití materiálů, které nejsou tělu vlastní (45, 46). Již dnes se

v odborné literatuře objevují studie, kdy KBZP byly vpraveny do opracovaného kořenového kanálku (47) a byla prokázána jejich afinita k dentinu. Další studie poukazuje na schopnost KBZP vytvořit dentine-pulp like complex (23).

Cíle práce

Přestože linie KBZP a SHED byly poprvé izolovány již v letech 2000 a 2003, jedná se stále o nedostatečně charakterizované linie kmenových buněk. Srovnání výsledků jednotlivých autorů znemožňuje nejednotný postup izolace a kultivace. Proto jsme se rozhodli vytvořit dlouhodobou studii zaměřenou na tuto problematiku. Cílem práce bylo optimalizovat izolaci zubní pulpy z *cavum pulpae*, následně KBZP ze zubní pulpy a standardizovat podmínky jejich dlouhodobé kultivace. Abychom mohli zhodnotit vlastnosti KBZP v jednotlivých médiích, stala se součástí této práce také charakterizace a diferenciací KBZP ve vybrané buněčné typy. Výsledky optimalizované na liniích KBZP byly užity k izolaci a kultivaci SHED. Pro vyhodnocení vlivu optimalizovaného kultivačního média na SHED byla provedena také charakterizace SHED ve vybraném médiu a diferenciací v několik buněčných typů. Vzhledem k nedostatečnému množství vhodných dárců exfoliovaných zubů nemohly být některé experimenty s KBZP zopakovány pro SHED.

Práce si klade za cíl odpovědět především na tyto otázky.

1. Můžeme rozšířit spektrum dárců KBZP?
2. Jaký postup izolace KBZP/SHED ze zubní pulpy zajistí maximální úspěšnost při izolaci KB?
3. Jaký je nejnižší podíl fetálního telecího séra v kultivačním médiu při zachování optimální proliferační aktivity a cytogenetické stability?
4. Jak ovlivňuje testované médium vlastnosti, proliferační aktivitu a schopnost diferenciací buněk?
5. Je kultivační médium vybrané na liniích KBZP optimální i pro SHED?
6. Jsou KBZP a SHED schopné diferencovat ve vyztřálé buněčné elementy?
7. Jsou KBZP schopné neomezené proliferační?
8. Jaký je vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP?

Materiál a metodika

Studie probíhala na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze a na Stomatologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze od října 2005 do června 2010. Po schválení studie Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové byl u každého pacienta zajištěn informovaný souhlas. Při zařazení do studie byla osobní data pacientů uchována s plnou ochranou důvěrnosti podle platných zákonů ČR.

Izolace zubní dřeně z *cavum pulpae*

Izolaci ZP předchází odběr intaktního vitálního zubu a jeho transport do laboratoře. Odběrem rozumíme extrakci zubu prováděnou v lokální anestezii v aseptických podmínkách. Poté následovalo ošetření extrahovaného zubu sterilní gázou napuštěnou dezinfekčním roztokem (Gutar) pro odstranění zubního mikrobiálního povlaku. Při transportu byl zub uložen v uzavřené nádobě, zcela ponořen do transportního média (HBSS transportní pufr - Hankův balancovaný solný roztok s antibiotiky) při teplotě 4 °C.

Izolaci ZP jsme prováděli vždy za přísně sterilních podmínek v laminárním boxu. U zubů s nedokončeným vývojem kořene jsme pronikly do dřeňové dutiny pomocí pinzety přes *foramen apicale*. V případě, že již nebylo možné extirpovat ZP touto cestou, bylo potřeba zubní kořen od korunky zubu oddělit a zpřístupnit dřeňovou dutinu se zubní pulpou. Pro tyto zuby jsme zvolili tři různé přístupy izolace: pomocí diamantového kotoučového brousku, Battova vrtáku, nebo Luerových kleští, abychom tak získali široce otevřený přístup do *cavum pulpae*; ZP jsme pomocí ostré sondy uvolnili od dentinu a vyjmuli sterilní mikrochirurgickou pinzetou.

Izolace KBZP a SHED ze zubní pulpy

Pro izolaci KBZP ze zubní pulpy byly využity dvě metody – mechanická a enzymatická. Při izolaci KBZP bez využití enzymů byla ZP vložena do homogenizátoru. K enzymatické izolaci 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 (Sevapharma, ČR) a dispázy (Invitrogen, USA) v PBS (Invitrogen, USA) a HBSS (Invitrogen, USA). Tato metoda byla následně použita i pro izolaci SHED.

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 7–10 dnech byly KBZP/SHED přesazeny kultivačních nádob s ošetřeným povrchem (TPP, Švýcarsko nebo NUNC, Dánsko) v denzitě 4500 buněk/1cm². Další pasážování provedeno při dosažení 70% splývavosti buněk. Ve snaze snížit množství FCS a přiblížit se tak podmínkám vhodným pro kultivaci KB pro klinické aplikace, jsme zvolili tři různá kultivační média (viz. Tab. 1). SHED byly kultivovány pouze v médiu s 2 % FCS obohacené o ITS suplement.

REAGENCIE	2 % FCS	10 % FCS	2 % FCS + ITS
ALFA 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

Tab. 1: Složení kultivačního média.

Charakterizace KBZP a SHED

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

Velikost buněk, proliferační aktivita a viabilita byly měřeny pomocí přístrojů Z2-counter (Beckman Coulter, USA) a Vi-Cell analyzer (Beckman Coulter, USA).

Pro fenotypovou analýzu, 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.

Imunocytochemie byla použita k identifikaci cytoskeletálních proteinů a intracelulárních molekul. 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), anti-STRO-1 (STRO-1, 1:4, DSHB, USA) anti- α -aktin, anti- β 3.tubulin a anti-vimentin (V9, 1:40, Sigma, USA).

Dále jsme hodnotili colony forming units (CFU), plating efficiency (Pef), karyotyp a opakovaně prováděli analýzu buněčného cyklu v průběhu dlouhodobé kultivace.

Diferenciace KBZP a SHED

K ověření schopnosti diferenciace KBZP a SHED ve zralé buněčné elementy jsme použili diferenciační protokoly publikované jinými autory. KBZP/SHED byly vystaveny působení osteogenního, chondrogenního a adipogenního 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, tzv. sféroidů, vzniklých spontánní sedimentací (v nádobách s nepřilnavým povrchem).

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.

Vliv ionizujícího záření na proliferační aktivitu KBZP

KBZP kultivované v médiu s 2 % FCS byly vystaveny celkové dávce 3,6 a 20 Gy. Pro sledování apoptózy byl použit průtokový cytometr Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA).

Souhrn výsledků

Do studie bylo zařazeno celkem 70 zubů získaných od zdravých dárců po zajištění informovaném souhlasu (67 stálých a 3 dočasné zuby). Věkový průměr dárců stálých zubů byl 23,2 (12 - 31) let, ve skupině převládaly ženy (63 %). Dočasné zuby jsme získali od dvou dívek a jednoho chlapce ve věku od 8 do 9 let.

Při izolaci zubní pulpy ze zubů s nedokončeným vývojem kořene měl námi zvolený postup 80% úspěšnost. Optimálním způsobem izolace u zubů s dokončeným vývojem kořene se ukázala metoda za použití Luerových kleští a mechanického rozštípnutí kořene s úspěšností 83 %.

Mechanická metoda izolace KBZP ze zubní pulpy se ukázala jako naprosto nevyhovující (0% úspěšnost). Naopak s metodou enzymatického štěpení v kombinaci s předešlým rozstříháním vzorku (které umožnilo zkrátit nutnou dobu vystavení tkáně zubní pulpy enzymatickému koktejlu) bylo izolováno v iniciálním experimentu 10 linií KBZP z 10 vzorků, a proto byla zvolena jako standardní i pro izolaci SHED. Po nasazení do kultivační nádoby pro primokultury 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 %).

Celkem jsme izolovali 16 linií KBZP pro kultivační experimenty v jednotlivých médiích. 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. V průběhu dlouhodobé kultivace ve všech testovaných médiích byly KBZP cytogeneticky stabilní a nevykazovaly žádné známky spontánní diference.

V každém médiu jsme hodnotili počet populační zdvojení (tzv. *population doubling* - PD), průměrný čas potřebný ke zdvojení populace (tzv. *doubling time* – DT), viabilitu v 9. pasáži a distribuci průměrů.

KBZP jsme expandovali přes 42 (2 % FCS), 51 (10 % FCS) a 60 (2 % FCS + ITS) PD. Průměrný čas potřebný ke zdvojení populace byl 55,4 (2 % FCS), 42,6 (10 % FCS), 24,5 (2 % FCS + ITS) hodin. Viabilita KBZP v 9. pasáži byla více než 90 % ve všech sledovaných médiích. Distribuce průměrů byla v průběhu kultivace stabilní. Dominantní populace měla v průměru 12,5 – 17,1 μm (2 % FCS), 12,2 – 16,6 μm (10 % FCS), 14,3 – 16,1 μm (2 % FCS + ITS). Je zřejmé, že KBZP kultivované v médiu obohaceném o ITS měly nejvyšší proliferační aktivitu a nejstabilnější populační DT. To je důvodem, proč bylo zvoleno jako standardní kultivační médium pro SHED.

V porovnání s KBZP byly SHED spíše okrouhlé, bez výběžků. U linií SHED jsme prokázali více jak 45 PD. Průměrný *doubling time* byl 41,2 hodin. Průměrná viabilita SHED v průběhu dlouhodobé kultivace byla 90,6 %. Dominantní populace měly 12,2-16,4 μm .

Proliferační aktivita SHED ve srovnání s KBZP kultivovanými v médiu s 2 % FCS a ITS byla nižší. Tomuto odpovídalo i srovnání DT KBZP s SHED. SHED měly vyšší průměrný DT (60,8 hodin) ve srovnání s KBZP (24,5 hodin). 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. Průměr velikosti obou našich testovaných

linií kmenových buněk byl srovnatelný (SHED 15,0 μ m a KBZP 15,2 μ m). Distribuce velikosti SHED odpovídá delšímu intervalu (12,2 až 16,4 μ m) ve srovnání s KBZP (14,3 - 16,1 μ m).

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. 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. 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. Fenotypová analýza SHED prokázala vysokou pozitivitu pro znaky CD 44 (91,7 %), CD 73 (82,3 %), CD 90 (96,5 %), CD 117 (96,2 %), CD 166 (74,3 %) 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 %).

Imunocytochemie potvrdila vysokou pozitivitu KBZP pro markery mezenchymálních buněk STRO-1 a vimentin. Vimentin byl rovnoměrně rozložen v buněčné cytoplazmě s vyšší denzitou v oblasti jádra. Nestin tvořil síť tenkých filament, která byla rozložena v buněčné cytoplazmě; vyšší signál byl zachycen v oblasti jádra. Dále jsme detekovali tyto markery MKB: Sox-2, nucleostemin, CD 90 a CD 166. 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 jader buněk procházejících interfázi. CD 166 byl pozorován na plazmatické membráně. Prokázali jsme také přítomnost katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) uvnitř jádra. Imunocytochemie potvrdila vysokou pozitivitu SHED pro marker mezenchymálních buněk vimentin. Vimentin byl rovnoměrně rozložen v buněčné cytoplazmě. Signál pro nestin, tvořící síť tenkých filament, byl zachycen perinukleárně. Dále jsme detekovali tyto markery: neurální marker β 3 - tubulin a cytoskeletální marker α - aktin. Barvení pomocí DAPI potvrdilo, že KBZP i SHED jsou monojaderné buňky, jejichž jádro je lokalizováno excentricky - obvykle na druhé straně než největší výběžek cytoplazmy.

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. Předpokládáme, že tyto 3 cytogeneticky abnormální mitózy jsou následkem dlouhodobé kultivace *in vitro*.

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.

KBZP a SHED kultivované v osteogenním médiu měly oproti standardním KBZP rozvinutější cytoskelet a méně cytoplazmatických výběžků, do svého okolí produkovaly extracelulární hmotu, která vytvářela i trojrozměrné útvary. Barvením HE, toluidinovou modří, zeleným Massonovým trichromem a barvením dle Ladewiga jsme prokázali

přítomnost kolagenu typu I, prokolagenu a osteoidu v extracelulární matrix. KBZP a SHED kultivované v chondrogenním spontánně agregovaly do sféroidů o velikosti cca 1 mm³. Po ukončení kultivace byly buňky obarveny pomocí alciánové modři. 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.

Linie KBZP vykazovaly v průběhu kultivace významný pokles relativní délky telomer. Vzhledem k nedostatečnému množství vzorku z jednotlivých věkových skupin jsme nebyli schopni analyzovat vliv věku a pohlaví dárce na délku telomer.

Gama záření (3,6 a 20 Gy) nemělo vážný dopad na viabilitu KBZP, mělo však výrazný vliv na jejich proliferační aktivitu. Celkový počet populačních zdvojení se zmenšil v závislosti na dávce záření.

Diskuze

Moderní stomatologie se neustále snaží najít způsob, jak nahradit, nebo obnovit poškozené 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) poškození zubu kariézním procesem je nevratné. Dalším rozvojem kariézní léze dochází k poškození dentinu, který se v průběhu života tvoří pouze na rozhraní zubní pulpy a tvrdých zubních tkání. Z těchto důvodů je nutné poškozené části tvrdých zubních tkání nahradit pomocí výplňových materiálů nebo, v případě většího poškození, zhotovením protetické práce. Obě možnosti ale mají svoje 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 rekonstrukcí poškozených tvrdých zubních tkání. Využití kmenových buněk a tkáňového inženýrství v klinické stomatologii otevírá zcela nový pohled na léčebné postupy při obnově funkční a estetické dentice. Nejhorší variantou pro pacienta je úplná ztráta zubu. Možností řešení takového defektu v současné době je zavedení dentálního implantátu, nebo zhotovení protetické práce nahrazující chybějící zub. Možnost vytvoření "histokompatibilního" zubu by pak byla ideálním způsobem plně estetické i funkční obnovy (45).

U KBZP i SHED byla opakovaně prokázána schopnost neuro- (33), osteo- i chondrogenní diferenciaci, která společně se snadnou dostupností těchto MKB, umožňuje uvažovat o KBZP a SHED nejen jako o výhodném zdroji MKB pro léčbu degenerativních chorob, náhradu tkání po traumatu, ale i pro možné budoucí aplikaci v bioinženýrství tkání a orgánů *in vitro*.

Zubní dřev představuje pro tyto účely nejlepší zdroj kmenových buněk, který je navíc striktně oddělen od ostatních tkání, jehož izolace není (v porovnání s izolací tkáňově specifických KB např. z kostní dřevě) obtížná.

Vlastnosti KB jsou ovlivněny okolním prostředím. Histologická struktura zubní pulpy připomíná embryonální rosolovité vazivo podobné např. vazivu pupečníku. Dá se proto předpokládat, že vlastnosti KB izolovaných ze zubní pulpy jsou unikátní, a to především s ohledem na podobnost s embryonálními kmenovými buňkami. Po extrakci zubu (v případě zubu exfoliovaného, po jeho odloučení) je ZP s celým zubem zničena jako biologický odpad. Tento materiál by tak mohl být použit při autotransplantacích nebo obnově tkání pacienta/dárce/příjemce.

Pokud se zaměříme na možnost vypěstovat nový zub v laboratoři, 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 xenogenní suplementy; 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 (33), jsme se naučili izolovat zubní dřev 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 došlo k výraznému rozšíření potenciální skupiny dárců zubní dřeně.

Běžný způsob izolace KBZP ze ZP užívaný v literatuře je enzymatická disociace tkáně (6, 17, 18, 21). Tento způsob se zdá být za současných podmínek optimální.

Izolované KBZP jsme kultivovali ve třech různých médiích s různým obsahem FCS s, nebo bez ITS suplementu 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. Ve studii publikované You-Young Jo (48) byl porovnáván vliv složení média na KBZP, periodontální ligamenta a MKB izolované z kostní dřeně. 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 L-askorbové kyseliny. 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, vede k výraznému 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. KBZP v médiu s 2 % FCS + ITS suplementem dosáhly 60 populačních zdvojení a to 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). Negativita nebo nízká pozitivita pro marker CD 45 (antigen typický pro leukocyty, monocyty a T-lymfocyty) a negativita pro CD 34 (marker hematopoetických kmenových buněk) nasvědčuje, že zubní pulpa neobsahuje hematopoetické progenitory. I ostatní markery typické pro hematopoetickou řadu (CD 117, CD 184) byly negativní nebo jen nízce pozitivní (CD 133). Ve studii publikované v *Journal of bone and mineral research* (49) 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 článku nezmiňují přesné složení kultivačního média, avšak se dá předpokládat, že jako ostatní autoři užíli pro kultivaci KBZP médium s vyšším obsahem FCS než v naší studii. Dá se tedy usuzovat, že FCS by mohlo způsobit nárůst positivity CD 34. U KBZP byla také prokázána nízká pozitivita pro CD 117. Tento znak je pozitivní u prekursorů neurální lišty a je považován za receptor pro faktor kmenových buněk I. Dá se tudíž vyvozovat, že část populace KBZP je odvozena z neurální lišty, což by potvrdzovalo naši teorii o dvou liniích KBZP uvnitř ZP samotné. Oproti KBZP kultivovaných v médiu bez ITS, KBZP kultivované v médiu s ITS vykazovaly 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. Expresie Sox-2 (pluripotent embryonic stem cell marker) potvrzuje naši domněnku o blízkosti KBZP a ES. Pozitivita pro nestin a nucleostimin poukazuje na odvození těchto KB z neurální lišty.

V experimentech s SHED kultivovaných v médiu s 2 % FCS a ITS jsme byli schopni dosáhnout 45 PD, počítáno od druhé pasáže. V primokultuře KBZP jsme v průměru získali 50 adherujících buněk 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. Tomuto odpovídalo i srovnání DT KBZP s SHED. SHED měly vyšší průměrný DT (60,8 hodin) ve srovnání s KBZP (24,5 hodin). 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. Průměr velikostí obou našich testovaných linií kmenových buněk byl srovnatelný (SHED 15,0 μ m a KBZP 15,2 μ m).

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. V buněčné linii SHED by měla proto existovat lepší odezva na diferenciaci (CD 105 - složka TGF receptoru). Expresie 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 (28) našel pozitivitu SHED pro CD 146, zatímco naše linie byly CD 146 negativní. Nicméně Miura a spol. neuvádí přesně, kolik procent buněk bylo CD 146 pozitivních. Vzhledem k použití odlišných kultivačních médií není možné tento rozdíl uspokojivě vysvětlit. Negativita CD 45 značí, že SHED nemají příbuznost k hematopoetickým buňkám. 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 vyjádřen 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 3 - 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 byl buněčná linie SHED více exprimován znak 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 tedy vyššímu proliferačnímu potenciálu SHED. Domníváme se, že naše kultivační médium optimalizované pro KBZP není zcela vhodné pro kultivaci SHED. Během dalších experimentů se budeme snažit optimalizovat média 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 nepozorovali žádné známky adipogenní diferenciaci.

Prokázali jsme, že během dlouhodobé *in vitro* kultivace KBZP dochází ke zkrácení telomer, přestože jsme pomocí imunocytochemie prokázali přítomnost katalytické podjednotky telomerázy. Postupné zkrácení telomer v průběhu dlouhodobé kultivace koresponduje s nižší proliferací KBZP v pozdějších pasážích. Otázkou zůstává, zda k tomu 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 ozáření 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 (ZX). 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 p16 a β -galaktosidázy). Tento nálezný se shoduje se studií Serakinci et al. (50), v níž byl studován vliv poškození DNA na MKB izolované z kostní dřeně.

Závěr

V průběhu studie jsme získali celkem 4 premoláry, 63 molárů a 3 dočasné zuby. Ve skupinu dárců bylo i 47 třetích molárů s dokončeným vývojem kořene. Právě toto kritérium by tyto zuby vyučovalo ze studií u 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 dřene. Jako ideální metoda pro odběr zubní pulpy se nám 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 spočívající v rozstříhání tkáně ZP na částičky o objemu cca 1 mm³ před samotnou enzymatickou disociací.

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 citováno. 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 (DT 24,5 h, dosaženo 60 PD), což bylo potvrzeno i analýzou buněčného cyklu (více než 56 % buněk v SG2 fázi buněčného cyklu). Predominantní populace KBZP a SHED měla 15,2 μm resp. 15,0 μm v průměru. Fenotypovou analýzou povrchových znaků KBZP a SHED jsme prokázali jejich příbuznost s tkáněmi mezenchymálního původu a odlišnost v základních hematopoetických znacích exprimovaných na KB z kostní dřene. Pomocí imunocytochemie jsme prokázali přítomnost markerů MKB (STRO-1 a nestinu) u KBZP. Během *in vitro* kultivace nevykazovaly KBZP/SHED žádné známky spontánní diferenciaci. I po dosažení Hayflickova limitu byly KBZP i SHED cytogeneticky stabilní.

Prokázali jsme schopnost KBZP a SHED *in vitro* diferencovat 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. Avšak jsme dokázali 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 potenciálně reprezentují 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 rutinní extrakci zubu likvidován. Zubní dřev tak může být použita jako zdroj kmenových buněk pro budoucí výzkum a případné klinické aplikace bez etických úskalí provázejících kmenové buňky izolované z jiných zdrojů.

Použitá literatura

- 1) MIMEAULT, 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.
- 2) KNOBLICH, J. A.; Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, roč. 9, č. 6, s. 833-841.
- 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) 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.
- 5) DOETSCH, F. A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003, roč. 13, č. 5, s. 543-550.
- 6) 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.
- 7) THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, roč. 282, č. 1145, s. 1145–1147.
- 8) 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. 12, s. 7634–7638.
- 9) 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.
- 10) VAZIN, T.; FREED, W., J. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci.*, 2010, roč. 28, č. 4, s. 589-603.
- 11) LEE, J., E. et al. Evaluation of 28 human embryonic stem cell lines for use as unrelated donors in stem cell therapy: implications of HLA and ABO genotypes. *Cell Transplant.*, 2010 Jun 29 [Epub před vytištěním].
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.

- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) MINGUEL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001, roč. 226, s. 507-520.
- 20) SANCHEZ-RAMOS, J., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 2000, č. 164, s. 247-256.
- 21) 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.
- 22) GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, roč. 81, 2002, č. G, s. 531-535.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) KARBANOVA, 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.
- 27) 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.
28. 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.
- 29) 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.

- 30) 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.
- 31) HUANG, A., H. et al. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.*, 2008, roč. 37, č. 9, s. 571-4.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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)
- 36) RYU, J., S. et al. Gangliosides are involved in neural differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009, roč. 387, č. 2, s. 266-71.
- 37) ARTHUR, A. et al. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.*, 2009, roč. 27, č. 9, s. 2229-37.
- 38) ARTHUR, A. et al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.*, 2008, roč. 26, č. 7, s. 1787-95.
- 39) CHAI, Y. et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.*, 2000, roč. 127, č. 8, s. 1671-9.
- 40) GANDIA, C. et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.*, 2008, roč. 26, č. 3, s. 638-45.
- 41) IOHARA, K. et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells.*, 2008, roč. 26, č. 9, s. 2408-18.
- 42) YALVAC, M., E. et al. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des.*, 2009, roč. 15, č. 33, s. 3908-16.
- 43) KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med.*, 2008, roč. 6, č. 35.

- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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, javascript:AL_get(this, 'jour', 'Exp Cell Res.');

Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce

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.; Mokřý, 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.; Mokřý, 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.

Mokřý 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., Mokřý 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., Mokřý 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.**, Mokřý, J. 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.

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

Soukup, T.; Rückarová, 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.

Mokřý, 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 Medica (Hradec Kralove)*, 2008, roč. 51, č. 3, s. 173-179.

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.; Mokřý 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.; Mokřý, J.; Karbanová, J.; Ivančáková 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.