

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky zubní dřeně**

**Jan Schmidt**

**Autoreferát disertační práce**  
**Doktorský studijní program: Stomatologie**

**Hradec Králové**  
**2021**

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Stomatologie na Stomatologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: MDDr. Jan Schmidt  
Stomatologická klinika Lékařské fakulty v Hradci Králové a  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.  
Stomatologická klinika Lékařské fakulty v Hradci Králové a  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA  
Stomatologická klinika dětí a dospělých 2. lékařské fakulty a  
Fakultní nemocnice v Motole

doc. MUDr. Pavel Poleník, CSc.  
Stomatologická klinika Lékařské fakulty v Plzni a  
Fakultní nemocnice Plzeň

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Stomatologie dne 23. 09. 2021 v Sazamově posluchárně Stomatologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové od..... hod.

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

doc. MUDr. Romana Koberová Ivančaková, CSc.  
Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Stomatologie  
Garantka studijního programu

## **Obsah**

Souhrn .....	1
Summary .....	2
Úvod do problematiky .....	3
Cíl práce .....	7
Materiál a metodika .....	8
Výsledky .....	11
Diskuze .....	16
Závěr .....	22
Seznam citací použité literatury .....	23
Přehled publikační činnosti .....	29

## Souhrn

Kyselina hyaluronová (KH) a kmenové buňky zubní dřeně (KBZD) jsou aktuálními výzkumnými tématy a jejich kombinované použití v rámci tkáňového inženýrství je nadějným směrem regenerativní medicíny. KBZD jsou mezenchymální populací kmenových buněk, které jsou získávány z měkkých tkání dřeňové dutiny zubu. Jejich výhodami jsou snadná dostupnost, vysoká proliferační aktivita a široký diferenciační potenciál. KH je extracelulární biopolymer vyskytující se napříč tkáněmi lidského těla včetně zubní dřeně a díky její biokompatibilitě a biodegradabilitě se jedná o vhodný materiál pro tvorbu buněčných nosičů. Degradací vysokomolekulárních (VM) řetězců KH, které jsou v tkáních enzymaticky štěpeny, dochází ke vzniku nízkomolekulárních (NM) fragmentů KH. V porovnání s VM KH vykazují NM frakce KH výrazně odlišné bioaktivní vlastnosti. Z tohoto důvodu je nutné posuzovat vliv KH na tkáně a buňky separátně pro její jednotlivé frakce.

V této práci jsou prezentovány výsledky dvou *in vitro* experimentů. První z nich byl zaměřen na vliv širokého spektra molekulárních hmotností KH (116 kDa, 540 kDa, 1500 kDa) na dvě linie KBZD. Tento pilotní experiment ověřil základní předpoklad, že buňky v prostředí zvolených molekul adherují, přežívají, prolifерují, zachovávají si svůj typický fenotyp a udržují si schopnost diferencovat osteogenním a chondrogenním směrem. Druhý experiment byl zaměřen na NM KH a její vliv byl testován na 5 liniích KBZD. Použity byly molekuly o velikosti fragmentů vznikajících při *in vivo* degradaci KH (800 Da, 1600 Da, 15 kDa). Po aplikaci KH do kultivačních médií byla u experimentálních skupin zaznamenána akutní redukce proliferační aktivity v porovnání s kontrolní skupinou ( $p = 0,0033$ ,  $p = 0,0033$ ,  $p = 0,1416$ ). Redukce byla omezena pouze na pasáž, při které došlo k iniciálnímu kontaktu buněk s NM KH, a nebyla pozorována v dalších pasážích. Kumulovaný počet populačních zdvojení na konci experimentu se statisticky významně lišil ( $p = 0,015$ ,  $p = 0,0143$ ,  $p = 0,0864$ ). KBZD kultivované v médiích s NM KH byly statisticky významně menší v porovnání s kontrolní skupinou ( $p = 0,0078$ ,  $p = 0,0019$ ,  $p = 0,0098$ ). Relativní délka telomer byla v porovnání s kontrolní skupinou u experimentálních médií kratší u 4 z 5 linií, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u buněk kultivovaných v médiu s přídatkem KH o molekulární hmotnosti 800 Da ( $p = 0,0275$ ,  $p = 0,1416$ ,  $p = 0,0864$ ). Všechny buňky si udržely vysokou expresi povrchových znaků typických pro KBZD (CD29, CD44, CD73, CD90). V porovnání s kontrolou bylo u experimentálních skupin zaznamenáno statisticky významné snížení exprese fenotypových znaků ( $p < 0,05$ ; CD29, CD34, CD90, CD106, CD117, CD146, CD166). Buňky si i po dlouhodobé kultivaci v přítomnosti NM KH udržely znaky mezenchymálních KB a naivní nediferencovaný fenotyp.

Práce dokumentuje vliv NM KH na KBZD *in vitro*. Výsledky ukazují, že NM KH ovlivňuje jejich proliferační aktivitu, velikost, telomerázovou aktivitu a expresi fenotypových znaků. Závěry práce přinášejí významné poznatky o vlivu degradačních produktů KH, které je nutné zohlednit při dalším vývoji buněčných nosičů z KH pro KBZD.

## Summary

Hyaluronic acid (HA) and dental pulp stem cells (DPSCs) are attractive research topics and their combined use in tissue engineering is a promising direction in regenerative medicine. DPSCs are a mesenchymal population of stem cells that are obtained from the soft tissues within the dental pulp cavity. Their advantages are easy availability, high proliferative activity, and wide differentiation potential. HA is a natural extracellular biopolymer occurring across human body tissues, including dental pulp. Due to its biocompatibility and biodegradability, HA is a suitable scaffold material. Degradation of high molecular weight (HMW) HA chains, which are enzymatically cleaved in tissues, results in low molecular weight (LMW) HA fragments. Compared to the HMW HA, LMW HA exhibits markedly different bioactive properties. Thus, it is necessary to assess the effect of HA on tissues and cells separately for its distinct fractions.

The results of two *in vitro* experiments are presented in this work. The first of them was focused on the influence of a wide spectrum of HA (116 kDa, 540 kDa, 1500 kDa) on two DPSC lines. This pilot experiment verified the basic assumption that cells in the environment of selected molecules adhere, survive, proliferate, maintain their typical phenotype and osteogenic and chondrogenic differentiation potential. The second experiment was focused on LMW HA and its effect was tested on 5 DPSC lines. Molecules of the particular sizes corresponding with *in vivo* degradative HA fragments (800 Da, 1600 Da, 15 kDa) were used. After application of HA to the culture media, an acute reduction in proliferative activity was observed in the experimental groups compared to the control group ( $p = 0.0033$ ,  $p = 0.0033$ ,  $p = 0.1416$ ). This reduction was limited to the passage in which the cells were initially seeded in LMW HA enriched media and was not observed in subsequent passages. At the end of the experiment, statistically significant difference in the cumulative number of population doublings was observed between the control group and experimental groups ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.0143$ ,  $p = 0.0864$ ). Additionally, DPSCs cultured in media with LMW HA were statistically significantly smaller compared to the control group ( $p = 0.0078$ ,  $p = 0.0019$ ,  $p = 0.0098$ ). The relative telomere length was shorter in experimental groups of 4 of 5 lines compared to the control group. A statistically significant difference was detected in cells cultured in medium with the addition of 800 Da HA ( $p = 0.0275$ ,  $p = 0.1416$ ,  $p = 0.0864$ ). All cells maintained high expression of surface markers typical of DPSCs (CD29, CD44, CD73, CD90). Compared to the control, a statistically significant reduction in the expression of phenotypic markers was observed in the experimental groups ( $p < 0.05$ ; CD29, CD34, CD90, CD106, CD117, CD146, CD166). The cells retained the features of mesenchymal stem cells and the naive undifferentiated phenotype even after long-term cultivation in the presence of LMW HA.

This work provides data on the effect of HA on DPSCs *in vitro* with emphasis on LMW HA. The results show that LMW HA affects their proliferative activity, size, telomerase activity and expression of phenotypic traits. The work presents important findings about the influence of HA degradation products, which must be taken into account in the further development of HA scaffolds for DPSCs.

## Úvod do problematiky

Kmenové buňky zubní dřeně (KBZD) jsou nejdéle známou linií kmenových buněk z rodiny dental-related stem cells nacházejících se v zubu a jeho okolí. Jedná se o mezenchymálních adultní kmenové buňky, které jsou izolovány ze dřeně stálých zubů a jejichž původ je odvozen z kraniální gangliové lišty [1]. Jsou nadány vysokou mírou proliferace a širokým diferenciačním potenciálem. *In vitro* byla prokázána jejich schopnost diferencovat v odontoblasty, osteoblasty, chondroblasty, adipocyty, myoblasty, epiteliální a neurální buňky či buňky produkující insulin [2-6]. Dalším znakem KBZD je schopnost dosahovat vysokých hodnot populačního zdvojení, kterým je překonán Hayflickův limit. Experimenty našeho pracoviště prokázaly kapacitu překonávající 60 populačních zdvojení, práce Alraies et al. uvádí dokonce 80 populačních zdvojení [7, 8]. Při kontaktu s přílnavým povrchem KBZD na tento přisedají a nabývají tvaru vřetene s mnohočetnými výběžky. Pakliže jsou v prostředí volně, zaujmají tvar koule o průměru 12-17  $\mu\text{m}$  [9]. Na svém povrchu pak vystavují typicky znaky (angl. cluster of differentiation, CD), CD29, CD44, CD73 a CD90. Naopak exprese CD31, CD34 a CD45 je nízká či nulová [9, 10]. Již od první charakterizace v roce 2000 jsou KBZD považovány za heterogenní skupinu s variabilními vlastnostmi [11]. Tato variabilita je pozorována jak mezi jednotlivými liniemi od různých dárců, které vykazují odlišnosti v proliferační aktivitě, velikosti buněk, proliferační aktivitě nebo expresi některých povrchových znaků, tak i v rámci subpopulací v jedné linii [9, 11-17].

Nízká diferenciace těchto buněk a jejich široký diferenciační potenciál může být dán jejich izolací od okolního prostředí a exogenních stimulů. Zubní dřeň je měkkou tkání nacházející se v dřeňové dutině a kořenových kanálcích zubu. Tento vnitřní prostor je od okolí oddělen tvrdými zubními tkáněmi a jedinou komunikaci s vnějším prostředím poskytuje *foramen physiologicum*, jehož šíře je 0,2-0,5 mm [18]. Takto ohraničený kompartment poskytuje i výhodu při získávání KBZD. Vnitřní prostor zubu je i po extrakci nepoškozen a vyjmutý zub, který je považován za biologický odpad, je tak možno využít pro izolaci KBZD. Oproti jiným metodám získávání mezenchymálních kmenových buněk, u kterých je nutný *ad hoc* zásah do integrity těla, je KBZD možno získat jako vedlejší produkt zákroku, který byl primárně indikován ze zcela jiných medicínských důvodů. Zubní dřeň je proto snadno dostupným zdrojem KBZD a jejich získání nepředstavuje pro pacienta zásah nad rámec plánovaného ošetření.

Kyselina hyaluronová (KH) je nesulfátovaný glykosaminoglykan, tedy mukopolysacharid, tvořený opakujícími se disacharidovými jednotkami. Každá jednotka je složena z kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu. Opakováním těchto jednotek vzniká polymer KH o různých molekulárních hmotnostech. Molekulární hmotnost KH produkované v lidském těle se různí podle příslušné tkáně, její obvyklé rozmezí je mezi 1000 a 8000 kDa [19]. V těle dospělého 70 kg člověka je přítomno přibližně 15 g KH, která je soustředěna zejména do pericelulární zóny a extracelulární matrix pojivových tkání [20, 21]. Polovina KH lidského těla je v kůži a dále je zastoupena např. v očních sklivci, synoviální tekutině, pupečnickové šňůře či v zubní

dřeni. Základními funkcemi kyseliny hyaluronové v těle jsou hydratace, lubrikace, vyplňování mezibuněčných prostor, jejich organizace a poskytování prostorové opory pro buňky a ostatní složky mezibuněčné hmoty [22]. Hydratační schopnost KH je dána její hygrokopickými vlastnostmi. Díky funkčním hydrofilním skupinám váže KH vodu, která zvyšuje tkáňový turgor, elasticitu a vypjatost [22]. Vázáním vody a tvorbou solvatačního obalu kolem molekul KH fungují její řetězce jako lubrikant. Tato vlastnost se uplatňuje při separování jednotlivých tkání a jejich vrstev, zejména pak v místech, kde dochází k výraznému otěru. Na dlouhé řetězce KH v se mezibuněčném prostoru váží proteoglykany, které jsou díky KH organizované do štětkovitých útvarů, a spolu s okolní kolagenovou matrix vytváří vysoce organizovanou síťovou strukturu. Tato síť slouží jako opora pro pohyb buněk a usnadňuje tak jejich migraci [23]. Zároveň se jedná o bioaktivní molekulu, která funkčně ovlivňuje své okolí a jejíž působení je závislé na molekulární hmotnosti [24].

V lidském organismu KH syntetizována jako vysokomolekulární (VM) molekula a při její degradaci dochází ke štěpení těchto řetězců na nízkomolekulární (NM) fragmenty. Takto je v tkáních denně degradována přibližně 1/3 veškeré KH [20]. V těle člověka rozlišujeme 7 typů hyaluronidáz (HYALs). Nejlépe popsány jsou HYAL 1 a HYAL 2. HYAL 2 je lokalizována na buněčné membráně a štěpí KH na fragmenty o přibližné velikosti 50 jednotek (~ 20 kDa), HYAL 1 štěpí KH na tetrasacharidové fragmenty (~ 800 Da), které jsou v rámci lyzozomů dále degradovány [25, 26]. Syntéza a degradace je za fyziologických podmínek udržována v rovnováze [19]. Tento stav může být ale změněn při poranění tkáně či při tkáňovém stresu [27]. Takové podmínky vedou k akceleraci degradace KH, a tedy k zvyšování koncentrace jejich NM frakcí s odlišnými bioaktivními vlastnostmi [28].

Při porušení integrity tkáně v ní dochází nejprve k výraznému nárůstu koncentrace VM KH [28]. Dlouhé řetězce KH se váží na fibrinogen a pomáhají zahájit vnější systém koagulace [29]. Se zvyšující se denzitou makromolekul KH se zvyšuje i vázaná tekutina v porušené tkáni, což se klinicky manifestuje jako otok [25]. Hustší síť KH spolu s vyšším zavodněním prostředí vede ke vzniku porézní trojrozměrné sítě, která usnadňuje migraci buněk do místa poškození včetně chemotakticky atrahovaných buněk podílejících se na rozvoji zánětlivé reakce [23, 28, 30]. Během dalších fází hojení rány je KH štěpena a její jednotlivé frakce specificky ovlivňují zánětlivou reakci, vrůstání endotelií, organizování granulační tkáně či reepitelizaci [22, 31-33]. VM frakce KH, které jsou obvyklou formou KH ve většině tkání, mají protizánětlivý a protiangiogenní efekt. NM frakce mají naopak prozánětlivý a proangiogenní efekt [34-39]. Rozdílná regulace zánětlivé odpovědi je dána odlišnou vazebností jednotlivých frakcí KH na receptory imunokompetentních buněk, ve kterých NM KH indukuje expresi prozánětlivých cytokinů [40, 41]. NM KH dále zvyšuje mitogenní aktivitu endotelií a podporuje tak angiogenzi, VM KH ji naopak utlumuje [42-45]. Různý vliv frakcí KH byl pozorován i u adheze, proliferace a diferenciací fibroblastů, mezenchymálních KB kostní dřeně či osteoblastů [35, 46, 47].

KH je pro své vlastnosti intenzivně studována jako materiál vhodný pro tkáňové inženýrství. Díky svému přirozenému výskytu ve tkáních, biokompatibilitě, biodegradabilitě, plné resorbovatelnosti a pokročilé technologii její výroby a úprav je považována za látku s širokou aplikovatelností [22, 48]. Její použití se jeví zvláště výhodné u tkání a buněk, v jejichž nativním prostředí se KH přirozeně vyskytuje, neboť lze předpokládat jejich menší reaktivnost na tento materiál. KH může být produkována ve různých formách a tvarech, např. prášku, variabilně sycených roztocích, gelech o různé viskozitě, pevných porézních či solidních prefabrikátů, a pokročilé technologie umožňují již i produkci KH ve formě nanomateriálů [48-51]. Vlastnosti KH, jako jsou hygroskopie a tvorba oporné sítě podporující migraci buněk, vytváří vhodné prostředí pro kolonizaci nosiče (scaffoldu) implantovanými buňkami a konduktivními vlastnostmi je zároveň usnadňováno vrůstání okolních tkání do nosiče [48, 52]. Využití nosičů z KH je široké a je testováno pro buňky z různých tkání – chrupavky, kosti, rohovky, periodontia či zubní dřeně [53-57].

Obecným požadavkem na nosiče je jejich relativní stálost. Relativní proto, že by měly v místě aplikace vydržet dostatečně dlouho, aby splnily účel aplikace, ale zároveň by měly být následně biodegradovatelné a nahraditelné novotvořenou tkání [58, 59]. Tyto podmínky KH splňuje, ale vzhledem k faktu, že degradační produkty KH, tedy její fragmenty o nižší molekulární hmotnosti, jsou biologicky aktivní molekuly s vlastnostmi odlišnými od VM KH, je nezbytné znát jejich vliv na buňky, které do nich budou implantovány. K tomu, abychom tyto informace získali, je v první fázi testování možné sledovat vliv NM KH na buňky v *in vitro* podmínkách. U KH je však tento krok spojen s technologickým problémem její kvality a čistoty. Mnohé výzkumné práce uvádějí molekulární hmotnost pouze orientačně (nízko/oligo/středně/vysokomolekulární KH) či v širokých rozmezích až stovek kDa (často uváděná hranice pro NM a VM KH je 500 kDa) [37]. Následné výsledky mohou být zavádějící, protože testovaná molekula definovaná v takto širokém rozmezí nemusí vykazovat bioaktivní vlastnosti, které vykazují produkty *in vivo* degradace KH vznikající působením HYALs. Proto by k vědeckým účelům měla být používána KH o přesné molekulární hmotnosti. Zároveň je nutné zajistit, aby používaná KH byla ve farmaceutické čistotě, neboť použití jiné než farmaceuticky čisté KH může vést ke zkreslení či znehodnocení výsledků experimentu [37, 60].

KH byla v několika studiích označena za materiál netoxický pro KBZD, který negativně neovlivňuje jejich viabilitu, proliferační aktivitu nebo diferenciací potenciál [61-63]. Další autoři popsali některé změny v genové expresi KBZD vlivem KH a velmi omezené množství prací se věnuje vlivu KH na expresi fenotypových znaků [64-68]. Interpretace těchto studií stran vlivu KH na KBZD je však limitována některými z následujících faktorů:

- mnohé studie neberou v potaz, že bioaktivita KH je závislá na její molekulární hmotnosti, a proto poskytují jen omezené či žádné informace ohledně molekulární hmotnosti použité KH



- studie se většinou věnují VM KH, pokud se věnují NM HK, pak mimo spektrum fragmentů, které vznikají *in vivo* degradací KH
- deklarace farmaceutické čistoty chybí a není deklarována ani uvedeným dodavatelem
- studie nejsou zaměřeny pouze na vliv KH na KBZD, ale součástí testovaného prostředí jsou i další příměsi ovlivňující KBZD

Z výše uvedeného je patrné, že k relevantnímu zhodnocení vlivu KH na KBZD je třeba provést experimenty, které nebudou zatíženy těmito limitacemi.

## **Cíl práce**

Cílem práce bylo zhodnotit vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky izolované ze zubní dřeně stálých zubů s důrazem na nízkomolekulární kyselinu hyaluronovou. Vliv kyseliny hyaluronové byl analyzován porovnáním viability, velikosti, proliferační aktivity, fenotypu, diferenciačního potenciálu a telomerázové aktivity kmenových buněk zubní dřeně.

## **Materiál a metodika**

Izolační protokol a metodika experimentů včetně zpracování biologického materiálu za vědeckým účelem byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) (souhlasy č. j. 200612 S0IP, 201011 S14P, 201812 S07P). Každý dárce či jeho zákonný zástupce byl před vyjmutím zubu poučen o problematice výzkumu, o využití jím poskytnutých tkání a o obsahu informovaného souhlasu s využitím KBZD pro výzkumné účely.

### **Kyselina hyaluronová**

KH využita pro účely experimentů této práce byla zdarma poskytnuta firmou Contipro, a. s. (Dolní Dobrouč, Česká republika). Molekulární hmotnost použité KH byla 800 Da, 1 600 Da, 15 000 Da, 116 000 Da, 540 000 Da a 1 500 000 Da. Farmaceutická čistota a velikost fragmentů byly ověřeny vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií.

### **Odběr zubu**

Vyjmutí zubu bylo provedeno za lokálního znecitlivění a za aseptických podmínek na Stomatologické klinice Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF HK) a FN HK. Po extrakci byl povrch vyjmutého zubu mechanicky očištěn za použití sterilní gázy a dále byl zub po 30 sekund dekontaminován ponořením do 0,2% vodného roztoku cholorexidin glukonátu. Následně byl zub vyjmut z dekontaminačního roztoku a ponořen do 10% Hankova balancovaného solného roztoku (Invitrogen, MA, USA) s antibiotiky a antimykotiky, ve kterém byl za stálé teploty 4 °C do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LF HK.

### **Izolace, mobilizace, expanze a kryokonzervace**

Izolace zubní dřeně byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu. Dřeň zubů s nedokončeným vývojem byla vyjmuta přes široce otevřené foramen apicale. Dřeň zubů s úzkým formaen apicale byla vyjmuta po rozlomení zubu Luerovými kleštěmi. Mobilizace je roces makromechanického, mikromechanického a enzymatického rozrušení tkáně vedoucí k uvolnění buněk. Měkkotkáňová masa byla rozstříhána sterilními nůžkami na drobné fragmenty o přibližné velikosti 1 mm<sup>3</sup>. Tyto byly přeneseny do tkáňového minihomogenizátoru s obsahem 1 ml izotonického fosfátového pufovačního roztoku (PBS; Invitrogen). V něm byla tkáň rozrušena za vzniku homogenizátu. Homogenizát byl transportován do centrifugační zkumavky, přidán 1 ml 0,05% trypsinu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) a zkumavka ponechána 10 minut při 37 °C. Po inaktivaci trypsinu byla suspenze buněk centrifugována a odsát supernatant. Získaná peleta obsahující směs různých buněk a extracelulární matrix byla kultivována v modifikovaném médiu pro postnatální progenitorové mezenchymální buňky (Eaglovo minimální esenciální médium v Alpha modifikaci) obohaceném o 1 % Insulin-Transferrin-Sodium-Selenium supplement (ITS; Invitrogen), 2 % fetálního bovinního séra (FBS), 2 % glutaminu (Invitrogen), 0,2 mM L-askorbové kyseliny (Bieffe Medital), 50 mM dexametazonu (Bieffe Medital), 10 ng/ml

růstového faktoru izolovaného z trombocytů (PDGF; PeproTech, London, UK), 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF; PeproTech), 10 µl/ml amfotericinu B, 20 µg/ml gentamicinu, 100 U/ml penicilinu a 2,5 µg/ml amphotericinu (Sigma-Aldrich). Kultivační nádoby byly inkubovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Médium bylo měněno každé tři dny. Po dosažení 70% konfluence byly buňky pasážovány v koncentraci 5000 buněk/cm<sup>2</sup> a kultivovány za stejných podmínek. Po dosažení 70% konfluence byly buňky kryokonzervovány v počtu 1,5 x 10<sup>6</sup> KBZD v 1 ml kryokonzervačního média, které se skládalo z 0,5 ml kultivačního média a 0,5 ml 20 % DMSO ve FBS metodou neřízené kryokonzervace a uloženy v -80 °C. Před následným použitím byly buňky rozmrazeny, expandovány do 70% konfluence a v další pasáži použity pro experimenty.

### **Kultivace**

Pro **pilotní experiment** byly zvoleny linie p1 a p2. Buňky byly nasazeny do experimentálních médií v koncentraci 5 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Experimentální média se lišila od standardního kultivačního média pouze přidavkem 0,1 % KH o různých molekulárních hmotnostech, a to: Experimentální pilotní médium 1 (Ep1) 116 kDa, experimentální pilotní médium 2 (Ep2) 540 kDa a experimentální pilotní médium 3 (Ep3) 1 500 kDa. Pro kontrolní data byla zvolena kultivace buněk ve standardním kultivačním médiu bez přidavku KH (kontrola). Všechny buňky byly kultivovány po 5 pasáží, dokud nepřesáhly Hayflickův limit. Pro účely prezentace dat byla pasáž po rozmražení buněk označena jako pasáž 0 a pasáže v rámci experimentu byly označeny jako pasáže 1-5.

Pro **experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou** byly zvoleny linie 1-5. Buňky byly nasazeny do experimentálních médií v Petriho miskách s adherentním povrchem v koncentraci 5 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Experimentální média se lišila od standardního kultivačního média pouze přidavkem 100 µmol/l KH o různých molekulárních hmotnostech, a to: Experimentální médium 1 (E1) 800 Da, experimentální médium 2 (E2) 1 600 Da a experimentální médium 3 (E3) 15 kDa. Pro kontrolní data byla zvolena kultivace buněk ve standardním kultivačním médiu bez přidavku KH (kontrola). Všechny buňky byly kultivovány po 6 pasáží, dokud nepřesáhly Hayflickův limit. Pro účely prezentace dat byla pasáž po rozmražení buněk označena jako pasáž 0 a pasáže v rámci experimentu byly označeny jako pasáže 1-6.

### **Charakteristika buněk**

Počet buněk a jejich velikost byly stanoveny v každé pasáži pomocí přístroje Z2-Counter (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Proliferační aktivita byla vyjádřena populačním zdvojením (angl. population doubling). Viabilita buněk byla stanovena na konci experimentů analyzátozem Vi-Cell (Beckman Coulter). Fenotyp KBZD značených imunofluorescenčními polyvalentními protilátkami konjugovanými s fluorescein izothiokyanátem (FITC) a s fykoerytrinem (PE) proti povrchovým CD znakům byl analyzován metodou průtokové cytometrie pomocí Cell Lab Quanta (Beckman Coulter) na konci experimentů.

## **Analýza relativní délky telomer buněk**

V rámci experimentu s NM KH byla v 5. pasáži izolována DNA pomocí DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Nálož jamky v celkovém objemu 20  $\mu$ l obsahovala 20 ng DNA, 200 nM dopředného primeru telomery tel1b, 200 nM reverzního primeru telomery tel2b (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a SYBR Green master mixu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Jako single copy gen (referenční, housekeeping gen) byl zvolen 36B4 (Generi Biotech) kódující kyselý ribozomální fosfoprotein P0. Termocyklizace byla provedena v přístroji ABI 7500 HT Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## **Diferenciační potenciál**

K ověření schopnosti KBZD diferencovat ve zralé buněčné typy i za přítomnosti KH byly buňky kultivovány v komerčně dodávaných osteogenním a chondrogenním médiu, a to s přípdavkem 0,1% KH o molekulárních hmotnostech 116 kDa, 540 kDa a 1500 kDa a bez přídávku KH. Pro průkaz diference jsme využili histologické barvení.

## **Statistická analýza**

Ke statistické analýze neparametrických dat byl použit Friedmanův test a Dunnův post hoc test. Pro parametrická data byla zvolena jednofaktorová ANOVA a Fisherův LSD post hoc test. Pro určení sféricity dat byl proveden Mauchlyho test. Statistická významnost byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

## **Výsledky**

### ***Pilotní experiment***

#### **Izolace a kultivace KBZD**

Úspěšně jsme izolovali 2 linie KBZD. Linie byly pro potřeby experimentu označeny jako linie p1 a linie p2. Linie p1 a p2 byly kultivovány v médiích kontrola / Ep1 / Ep2 / Ep3. Napříč médii nebyl pozorován rozdíl v adherenci a shlukování buněk.

#### **Proliferační aktivita**

Proliferační linie p1 a p2 byla sledována od 1. do 5. pasáže ve všech kultivačních médiích. Kumulovaný počet populačních zdvojení kontroly byl u obou linií nižší v porovnání s experimentálními skupinami. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení v 5. pasáži pro linii p1 kultivovanou v kontrola / Ep1 / Ep2 / Ep3 byly v tomto pořadí: 14,1 / 15,3 / 15,4 / 14,8. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení v 5. pasáži pro linii p2 kultivovanou v kontrola / Ep1 / Ep2 / Ep3 byly v tomto pořadí: 16,7 / 17,2 / 16,7 / 16,8. Statisticky významné rozdíly nebyly v rámci kumulovaného počtu proliferačních zdvojení zaznamenány

#### **Viabilita**

KBZD si ve všech kultivačních médiích, a to jak kontrolním, tak experimentálních, zachovaly vysokou hodnotu viability přesahující 80 %. U žádného kultivačního média nebyl pozorován negativní vliv na viabilitu KBZD. U linie p1 byla viabilita nejvyšší v experimentálním médiu Ep1, nejnižší pak v experimentálním médiu Ep2. U linie p2 byla viabilita nejvyšší v experimentálním médiu Ep1, nejnižší pak v kontrolním médiu. Statisticky významné rozdíly nebyly zaznamenány. Hodnoty viability v pořadí médií kontrola / Ep1 / Ep2 / Ep3 pro linii p1 byly 92,3 / 93,1 / 91,8 / 92,6 % a pro linii p2 80,1 / 82,5 / 81,8 / 80,9 %.

#### **Analýza povrchových znaků**

Analýza fenotypu KBZD, pro kterou byly vyšetřeny povrchové znaky, proběhla v 5. pasáži obou linií. U KBZD kultivovaných v Ep1 byl zaznamenán oproti KBZD kultivovaných v kontrolním médiu pokles znaků CD 105 a OCT 3/4 u linie p1 a u linie p2 došlo k poklesu znaků CD 105, CD 117 a CD 146. Jako statisticky významně rozdílná ( $p < 0,05$ ) byla vyhodnocena následující data: CD 13 Ep1-Ep3, CD 29 kontrola-Ep2, CD 90 Ep1-Ep3, CD 105 Ep1-Ep3, OCT 3/4 Ep1-Ep2.

#### **Diferenční potenciál**

U obou testovaných linií p1 a p2 kultivovaných v kontrolním a experimentálních médiích byla prokázána schopnost indukovat diferenciaci v osteoblasty a byla prokázána přítomnost vápenatých deposit v extracelulárním prostoru. Chondrogenní diferenciaci byla prokázána u obou testovaných linií v kontrolním médiu, Ep1 a Ep3. V médiu Ep2 došlo během 3. týdne diferenčního procesu ke kontaminaci kultivačních nádob plísní a tyto byly z experimentu vyřazeny.

## Experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou

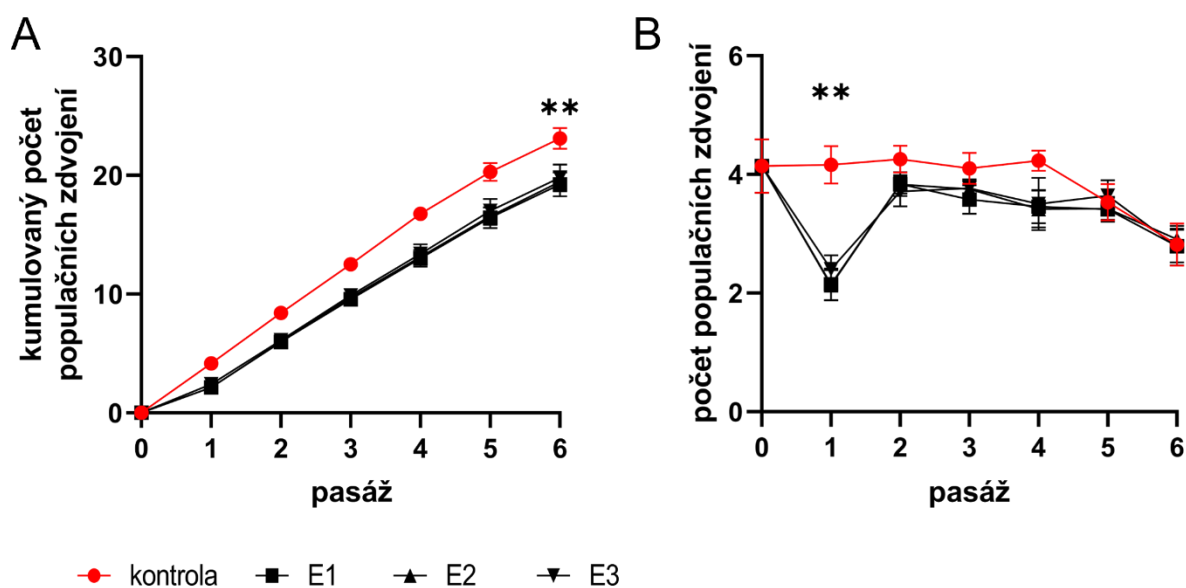
### Izolace a kultivace KBZD

Úspěšně jsme pro experiment s NM KH izolovali 5 linií KBZD. Linie byly pro potřeby experimentu označeny jako linie 1, linie 2, linie 3, linie 4 a linie 5. Napříč médii nebyl pozorován rozdíl v adhezenci a shlukování buněk.

### Proliferační aktivita

Proliferace linií 1-5 byla sledována od 0. do 6. pasáže ve všech kultivačních médiích. Kumulovaný počet populačních zdvojení kontrolní skupiny byl u všech linií vyšší v porovnání s experimentálními skupinami. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení v 6. pasáži pro linie 1-5 kultivované v kontrola / E1 / E2 / E3 byly v tomto pořadí: linie 1 23,2 / 22,1 / 21,2 / 22,8; linie 2 20,3 / 16,8 / 17,2 / 16,3; linie 3 25,6 / 18,0 / 18,8 / 19,2; linie 4 24,0 / 18,1 / 18,9 / 19,1; linie 5 22,4 / 21,0 / 21,3 / 21,6 (Graf 1A). Rozdíl kontrolní a experimentálních skupin byl statisticky významný: Friedmanův test:  $p = 0,023$ ; Dunnův post hoc test: kontrola-E1:  $p = 0,0015$ ; kontrola-E2:  $p = 0,0143$ ; kontrola-E3:  $p = 0,0864$ .

Pokles proliferační aktivity v první pasáži byl mezi kontrolní a experimentálními skupinami statisticky významný: Friedmanův test:  $p = 0,016$ ; Dunnův post hoc test: kontrola-E1:  $p = 0,0033$ ; kontrola-E2:  $p = 0,0033$ ; kontrola-E3:  $p = 0,1416$  (Graf 1B).



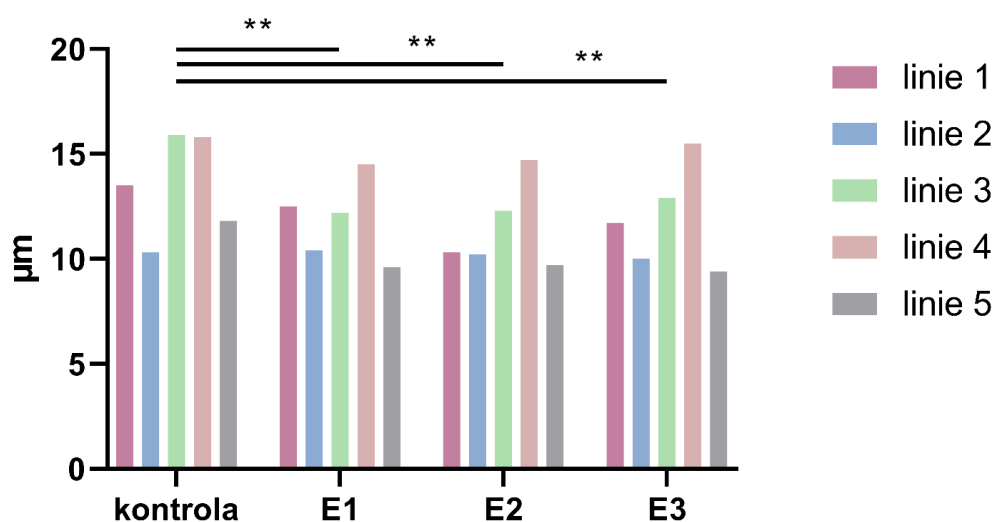
**Graf 1.** Populační zdvojení v pasáži 0-6 experimentu s NM KH. Grafy znázorňují průměr populačních zdvojení linií 1-5 se středními chybami průměru vyneseny jako chybové úsečky. Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3). Statistická analýza byla provedena Friedmanovým testem následovaným Dunnovým post hoc testem, \*\*  $p < 0,005$ .

## Viabilita

Viabilita KBZD byla změřena v poslední pasáži. Viabilita KBZD byla v pořadí kontrola / E1 / E2 / E3 následující: Linie 1: 89,0 / 96,9 / 97,1 / 98,0 %; linie 2: 80,2 / 97,4 / 97,2 / 96,6 %; linie 3: 90,3 / 96,5 / 98,0 / 98,3 %; linie 4: 96,4 / 96,4 / 98,7 / 96,2 %; linie 5: 97,2 / 93,9 / 94,8 / 96,2 %. Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.

## Velikost buněk

Medián průměru buněk v 6. pasáži v pořadí kontrola / E1 / E2 / E3 byl: Linie 1: 13,5 / 12,5 / 10,3 / 11,7  $\mu\text{m}$ ; linie 2: 10,3 / 10,4 / 10,2 / 10,0  $\mu\text{m}$ ; linie 3: 15,9 / 12,2 / 12,3 / 12,9  $\mu\text{m}$ ; linie 4: 15,8 / 14,5 / 14,7 / 15,5  $\mu\text{m}$ ; linie 5: 11,8 / 9,6 / 9,7 / 9,4  $\mu\text{m}$ . Výsledky statistické analýzy: kontrola-E1:  $p = 0,0078$ , kontrola-E2:  $p = 0,0019$ , kontrola-E3:  $p = 0,0098$ . Vyobrazeno v grafu 2.

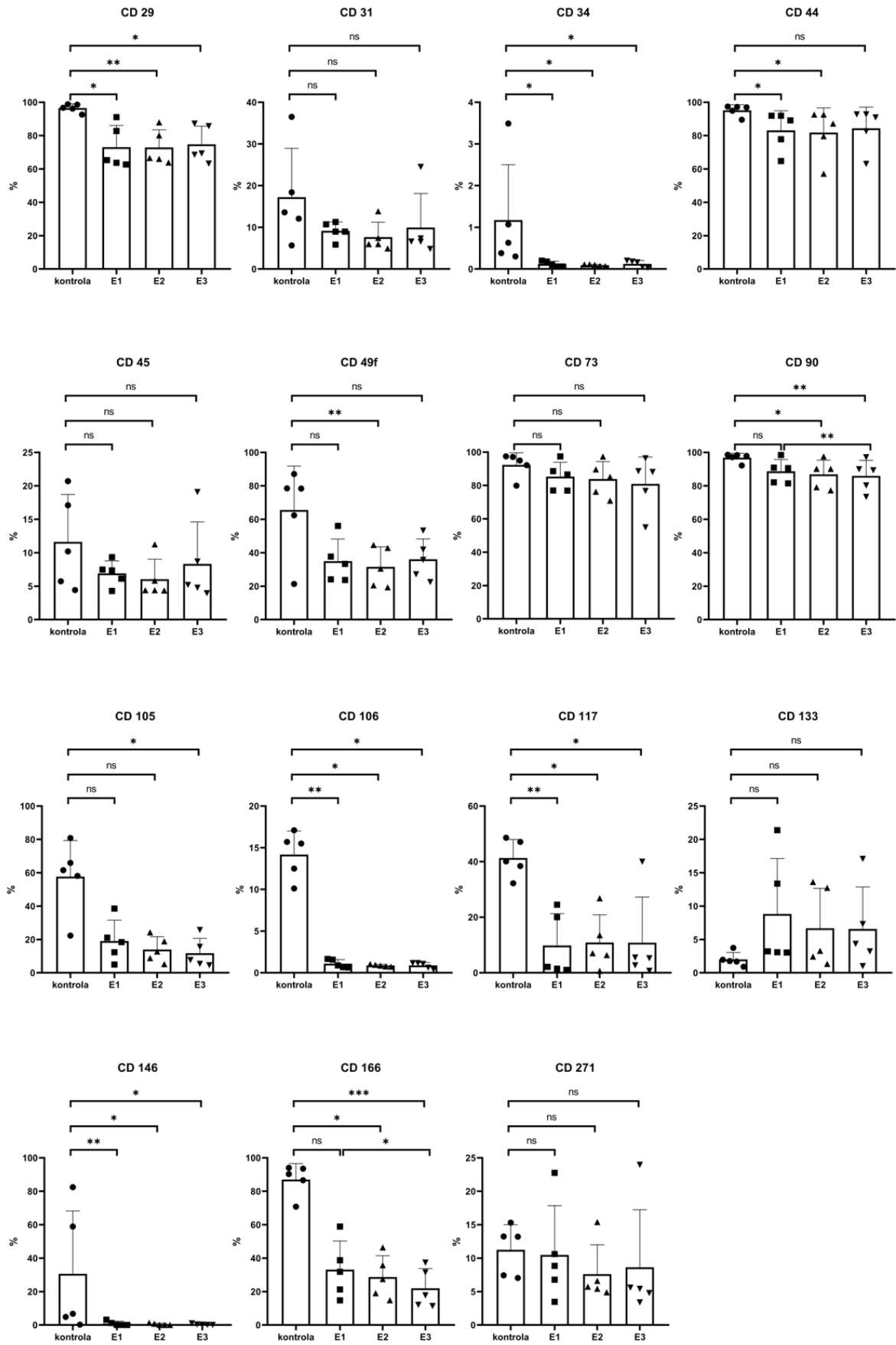


**Graf 2.** Medián průměru kmenových buněk zubní dřene na konci 6. pasáže experimentu NM KH. Graf demonstruje hodnoty linií 1-5 kultivovaných v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3). Pro statistickou analýzu mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami byla použita metoda jednofaktorové analýzy rozptylu a Fisherův LSD post hoc test;  $p < 0,005$ .

## Analýza povrchových znaků

Pro analýzu fenotypu byla vyšetřena pozitivita povrchových znaků KBZD linií 1-5 v 6. pasáži. Statistickou analýzou všech znaků při porovnání kontrolní skupiny a experimentálních skupin bylo zjištěno, že KH má statisticky významný vliv na fenotyp KBZD. Kromě CD133 a CD271 byla v kontrolní skupině zaznamenána vyšší pozitivita všech znaků než v experimentálních skupinách, a to: CD29 (\*), CD31, CD34 (\*), CD44, CD45, CD49f, CD73, CD90 (\*\*\*), CD105, CD106 (\*), CD117 (\*), CD146 (\*), CD166 (\*\*\*) (Friedmanův test). Výsledky statistické analýzy (Friedmanův a Dunnův post hoc test) jsou vyobrazeny v grafu 3.





**Graf 3.** Analýza povrchových znaků kmenových buněk zubní dřevě linie 1-5 v 6. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Grafy demonstrují procenta pozitivních buněk. Průměr skupiny je vyneseno jako sloupec, směrodatná odchylka skupiny je vynesena jako chybová úsečka a individuální hodnoty jsou vyneseny jako symboly (kruh, trojúhelník a čtverec). Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (Ep1-3). Statistická analýza byla provedena Friedmanovým testem následovaným Dunnovým post hoc testem, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Statisticky nevýznamné výsledky vůči kontrolní skupině jsou označeny jako ns, rozdíly mezi experimentálními skupinami navzájem, pakliže není uvedeno jinak, jsou statisticky nevýznamné.

### **Relativní telomerová délka**

Relativní telomerová délka buněk v 6. pasáži v pořadí kontrola / E1 / E2 / E3 byla: Linie 1: 4,13 / 2,90 / 3,27 / 3,70; linie 2: 3,21 / 3,30 / 3,16 / 3,51; linie 3: 3,68 / 2,44 / 2,83 / 2,75; linie 4: 4,51 / 3,42 / 3,50 / 3,28; linie 5: 4,65 / 3,76 / 3,89 / 3,69. Výsledky statistické analýzy: kontrola-E1:  $p = 0,0275$ , kontrola-E2:  $p = 0,1416$ , kontrola-E3:  $p = 0,0864$ .

## Diskuze

KBZD jsou známé již od roku 2000 a díky intenzivnímu studiu jsou jejich vlastnosti detailně popsány. Jednou z limitací klinického využití je však forma jejich aplikace. K tomu, aby mohly být klinicky použity, je nutné buňky do místa aplikace přenést a v místě je udržet. Možnou formou aplikace jsou scaffoldy, tedy nosiče buněk, které zajistí přenos a udržení buněk v tkáni. Vzhledem k tomu, že materiál pro tvorbu nosičů by měl být biokompatibilní, biodegradovatelný a bioresorbovatelný jeví se jako ideální takové látky, které jsou tělu vlastní. Jedním z možných materiálů pro buněčné nosiče je i KH, která se hojně vyskytuje v pojivových a podpurných tkání těla, včetně zubní dřevě. Jedná se tak nejen o biogenní materiál, ale zároveň i o materiál, který je součástí přirozeného prostředí KBZD. Nespornou výhodou je i fakt, že se jedná o látku dlouho známou, kterou lze bez nutnosti dalšího testování používat ve farmaceutickém průmyslu a biomedicíně. Dalším pozitivem je i variabilní forma produktů od prášku přes gely až po tuhé materiály a možnost její chemické modifikace pro úpravu farmakokinetických vlastností.

Důležitou vlastností KH je její bioaktivita závislá na molekulární hmotnosti. Mnoha studii bylo potvrzeno, že vliv KH na buňky a tkáně se pro její jednotlivé frakce liší a je proto nutné KH vnímat jako látku s proměnlivými vlastnostmi. Byť je tento fakt vědeckou literaturou akcentován a velká část výzkumu KH je zaměřena právě na její variabilní funkce, u buněčných nosičů z KH je tento aspekt mnohdy opomíjen. Je to ale právě prostředí uvnitř nosiče a v jeho okolí, tedy nesené buňky a cílová tkáň, kterého se tato problematika týká zcela zásadně. V důsledku biodegradace nosiče dochází k zvyšování přítomnosti nižších molekulárních frakcí KH, a to v širokém spektru molekulárních hmotností.

Preparáty na bázi KH jsou schváleny jako terapeutika pro kožní a slizniční defekty a jsou aplikovány jak na jejich povrch ke krytí, tak i do hloubi ran [69]. Díky tomu, že tato aplikace je již schváleným a studii podloženým postupem, je použití KH k těmto účelům bezpečné. Aplikaci nosiče z KH jsme ověřili i na našem pracovišti v rámci klinického výzkumu [70]. Nosič z kyseliny hyaluronové však nenesl buňky, ale byl vehikulem pro oktenidin-dihydrochlorid a byl vkládán do extrakčních ran postižených alveolární ostitidou (*alveolitis sicca*) s pozitivním účinkem na hojení. Touto studií jsme ověřili nejen účinnost nově zaváděného terapeutika, ale vyzkoušeli jsme si i klinickou práci s nosiči z KH a jejich *in vivo* aplikaci.

Naším dlouhodobým vědeckým záměrem je vývoj nosiče z KH pro KBZD s následnou klinickou aplikací. Nепrostudovaným tématem je však vliv nosiče z KH právě na KBZD. Pokud má být KH považována za vhodný materiál pro nesení těchto buněk, je nutné znát její vliv na KBZD nejen pro molekulární hmotnost, ze které je nosič zhotoven, ale i ve spektru jeho biodegradčních produktů. Z tohoto důvodu je nutné testovat nejen VM KH, která je obvyklou složkou tkání a ze které jsou nosiče nejčastěji konstruovány, ale i NM KH, a to s důrazem na štěpné produkty HYALs.

V prvním experimentu, který byl designován jako pilotní, jsme si kladli za cíl zjistit vliv KH na KBZD v širokém spektru molekulárních hmotností. Jednalo se o probatorní aplikaci nízké, středně a vysokomolekulární KH na buňky. Experimentem jsme se nesnažili získat statisticky významná data, ale záměrem bylo zjistit, zda je vůbec možné KBZD v takovém prostředí kultivovat a využít tyto informace pro statisticky robustnější experimenty. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro 2 linie kultivované v kontrolním médiu a v médiích obohacených o 0,1 % KH o molekulární hmotnosti 116 kDa, 540 kDa a 1500 kDa. Tyto molekulární hmotnosti byly zvoleny na základě review literatury s vědomím, že nepokrývají celé spektrum a detailní zaměření na jednotlivé frakce bude předmětem dalšího výzkumu až v případě, že ověříme kultivovatelnost KBZD v tomto formátu.

Odběr zubů, izolace, mobilizace, expanze a kryokonzervace KBZD byly úspěšné zejména díky dlouhodobé zkušenosti naší laboratoře s těmito postupy. Stejně tak nebylo zaznamenáno významných změn buněčné viability mezi jednotlivými médii. Tímto jsme ověřili, že buňky v experimentálních médiích adherují k povrchu, prolifерují a udržují si viabilitu v rozmezí obvyklém pro kultivaci za standardních podmínek.

V závěru experimentu byly analyzovány povrchové znaky, kterými jsme sledovali, zda buňky vlivem KH nemění svůj fenotyp. Na základě informací z literární rešerše (viz úvod) jsme předpokládali, že NM KH bude mít na KBZD větší vliv než VM KH. Tento předpoklad se potvrdil u některých znaků, a to OCT3/4 a CD105 u linie p1 a CD105, CD117 a CD146 u linie p2. OCT3/4 je typickým znakem KB a je asociován s nízkou diferencovaným fenotypem [71]. Jeho snížení může být ukazatelem indukce diferenciace, ale i přes tento výsledek jsme byli schopni indukovat diferenciaci ve zralé buněčné elementy, a to chondrogenním a osteogenním směrem. CD105 a CD 146 jsou znaky spojené s angiogenezí a jsou diskutovány v rámci druhého experimentu. Exprese CD44 nebyla výrazně změněna, byť se jedná o znak, který obvykle bývá přítomností KH ovlivněn a má vztah k mineralizaci [65, 72]. Takový výsledek může být dán nízkou koncentrací KH v experimentálních médiích, tuto hypotézu by však bylo nutno ověřit opakováním experimentu s médii o vyšší náloži KH.

Pilotní experiment prokázal, že KBZD v přítomnosti KH o molekulárních hmotnostech 116 kDa, 540 kDa a 1500 kDa přežívají, adherují k povrchu, prolifерují a udržují si schopnost diferencovat ve zralé buněčné elementy. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli přistoupit k navazujícímu experimentu, který již na statisticky relevantním souboru analyzoval vliv NM KH na KBZD.

V experimentu s NM KH byly zvoleny fragmenty KH (800 Da, 1600 Da a 15 000 Da) které svou velikostí odpovídají štěpným produktům *in vivo* působícím HYAL 1 a HYAL 2, neboť působení endogenních HYALs budou v tkáních vystaveny i buněčné nosiče. Model prezentovaného experimentu je unikátní a při publikaci výsledků v časopise *Biomolecules* se jednalo o první práci popisující vliv fragmentů KH velikosti degradačních produktů endogenních HYALs na KBZD.

Po nasazení buněk do kultivačních médií byl zvolen stejný postup jako u pilotního experimentu, který neodhalil rozdíly v adherenci buněk kultivovaných v kontrolním a experimentálních médiích. Výsledky analýzy životaschopnosti buněk ukázaly, že NM KH nemá negativní vliv na tento parametr, naopak u 3 z 5 linií byly v experimentálních skupinách pozorovány hodnoty viability vyšší než v kontrolní. Tyto výsledky však nepřekročily hranici statistické významnosti. Nově hodnoceným parametrem byla velikost buněk. Toto měření vykazovalo velmi významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami. KBZD kultivované v kontrolním médiu byly menší než buňky kultivované v experimentálních médiích. Výsledek byl statisticky významný pro všechna experimentální média. Práce Yang et al. popisuje zmenšení velikosti mezenchymálních KB s postupující pasáží a senescencí buněk [73]. Tyto závěry mohou vést k hypotéze, že NM KH deceleruje progresi senescence v KBZD. Taková hypotéza koresponduje i s výsledky práce Alessio et al., která popisuje statisticky významné snížení procenta senescentních mezenchymálních KB kultivovaných za přítomnosti NM a VM KH [74]. Závěry naší analýzy nastolují hypotézu, která otevírá novou oblast vlivu KH na KBZD a k jejímuž potvrzení či vyvrácení je potřeba dalšího výzkumu. Výsledky analýzy velikosti buněk je v tomto kontextu vhodné porovnat s výsledky analýzy relativní telomerové délky. Telomery jsou lokalizované na koncích chromozomů a při dělení buněk dochází k jejich částečné redukci. Postupné zkracování těchto koncových úseků je jednou z příčin stárnutí buněk, které je fyziologicky zakončeno apoptózou. Kompenzační mechanismus, který je přítomný u kmenových a nádorových buněk, je pak schopen toto zkracování vyrovnávat. V naší studii vedla kultivace v experimentálních médiích u 4 z 5 linií ke zkrácení relativní telomerové délky v porovnání kontrolní skupinou. Tento výsledek byl statisticky významný pro buňky kultivované v E1. Tyto výsledky ukazují, že NM KH může vést k redukci délky telomer KBZD, ale projekce tohoto fenoménu do dalších sledovaných ukazatelů, např. viability, nebyla pozorována. Pravděpodobně proto, že telomery jsou na chromozomech přítomny v nadbytku a jejich laboratorně detekovatelné zkrácení tak nemělo na buňky vliv. Je možné, že by postupné zkracování vedlo k vyšší úmrtnosti buněk ve vyšších pasážích. Tato hypotéza, i kdyby se prokázala, by ale neměla mít vliv na použitelnost nosičů z KH, neboť 6 pasáží, pro které byl vliv testován, je dostatečně dlouhým intervalem pro plnou degradaci nosiče aplikovaného do rány.

Analýzou proliferační aktivity byla v porovnání s kontrolní skupinou prokázána redukce kumulovaných populačních zdvojení buněk kultivovaných v médiích obohacených o NM KH. Tato disparita byla statisticky významná u experimentálních skupin E1 a E2. Analýzou proliferační aktivity v každé pasáži byl zjištěn rapidní pokles proliferační aktivity buněk v experimentálních skupinách v první pasáži, kdy byla poprvé přidána KH. Tento fenomén se vyskytoval pouze v první pasáži a nebyl zaznamenán v žádné z dalších pasáží. Možným vysvětlením prudkého poklesu v proliferační aktivitě je tak právě náhlá změna kultivačního prostředí spočívající v přítomnosti KH. Tento náález považujeme za důležitý pro další výzkumy zaměřující se na kultivaci KBZD v přítomnosti NM KH. U krátkodobých experimentů, které nedisponují daty o dlouhodobé kultivaci, může takto významná změna proliferační aktivity vést k závěru,

že útlum proliferační aktivity KBZD je obecně platným vlivem NM KH na tyto buňky. Takové závěry mohou negativně ovlivnit pohled na aplikaci KBZD do buněčných nosičů z KH. Vzhledem k tomu, že u buněčných nosičů je předpoklad dlouhodobého kontaktu s implantovanými buňkami, je důležité konstatovat, že při dlouhodobé kultivaci nebyl pozorován negativní vliv NM KH na proliferační aktivitu KBZD. Zároveň lze předpokládat, že biodegradace nosičů bude probíhat pozvolna a buňky tak nebudou vystaveny náhlé změně okolního prostředí, jak tomu bylo v našem experimentu.

Pro analýzu fenotypu KBZD byl navržen panel sledovaných znaků s důrazem na povrchové znaky týkající se kmenovosti, diferenciace, motility či adheze. Jako markery adultních mezenchymálních KB jsme zvolili CD29, CD44 a CD90. V průměru byla zachována vysoká pozitivita pro tyto znaky ve všech skupinách, ale v kontrolní skupině byla pozitivita vždy vyšší. Statistické porovnání kontrolní skupiny vůči experimentálním skupinám vykázalo významné rozdíly u CD29 a CD90. Dále byly vyšetřeny stromální znaky CD73 a CD166. Buňky všech skupin byly vysoce pozitivní na CD73, nejvyšší pozitivita byla zaznamenána u kontrolní skupiny, rozdíly ale nebyly statisticky významné. Naopak statisticky významných rozdílů bylo dosaženo při analýze exprese CD166, adhezivní molekuly vystavované na mezenchymálních KB a fibroblastech, která byla přítomna v kontrolní skupině výrazně více než ve skupinách experimentálních. Podobný rozdíl jako u CD166 byl pozorován i u CD105 (endoglin), který je membránovým glykoproteinem účastnícím se procesu angiogeneze [75]. Výsledky korespondují se závěry práce Bringhof et al., která popisuje pozitivní korelaci mezi CD105 a CD166 v mezenchymálních KB [76]. Tyto nálezy mohou indikovat negativní vliv NM KH na expresi markerů asociovaných s fibroblasty a angiogenezí. CD31 a CD106, které jsou adhesivními molekulami typickými pro endoteliální buňky, byly ve všech skupinách exprimovány nízkou úrovní. Zatímco rozdíl v expresi mezi kontrolní a experimentální skupinami nebyl u CD31 významný, exprese CD106 byla v experimentálních skupinách statisticky významně nižší než v kontrolní skupině. CD106 (VCAM-1) je buněčný povrchový protein, který mediuje adhezi leukocytů a endoteliálních buněk a byla popsána jeho cytokiny indukovaná exprese [77]. Výsledky naší studie ukazují, že NM KH statisticky významně snižuje subpopulaci KBZD, které tuto adhezivní molekulu nesou. Exprese CD49f (integrin alfa-6, ITGA6) byla u experimentálních skupin zřetelně nižší než v kontrolní skupině. V recentní publikaci Nieto-Nicolau et al. bylo popsáno, že mezenchymální KB, které vykazují vyšší hodnoty CD49f vykazují i vyšší míru klonogenicity, migrace a diferenciačního potenciálu [78]. Autoři také popisují, že tyto změny jsou regulovány cestou proteinkinázy B (PKB, též Akt) a inhibitory buněčného cyklu proteiny p53 a p21. Obdobné statisticky významné snížení exprese v experimentálních skupinách bylo pozorováno i u CD117 (c-KIT), který ovlivňuje signalizační kaskádu proteinkinázy B a má významnou roli v proliferaci, diferenciaci, adhezi, motilitě a angiogenezi u hematopoetických a nádorových stem-like cells [79, 80]. Výsledky našeho výzkumu prokazují snížení exprese obou těchto membránových proteinů, které jsou důležité v regulaci proliferace, mobility a

diferenciace, u KBZD kultivovaných v přítomnosti NM KH. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že NM KH může ovlivnit proliferaci, mobilitu a diferenciaci KBZD.

Při analýze fenotypu byla také zjištěna interindividuální variabilita mezi jednotlivými liniemi. Tento fenomén byl patrný např. u exprese CD133 (prominin-1). Zatímco v kontrolní skupině byla zaznamenána napříč skupinami uniformně nízká hodnota positivity pro tento znak, data v experimentálních skupinách byla velmi variabilní. Tyto rozdíly nebyly náhodné, ale jejich distribuce byla asociována s příslušnými biologickými replikacemi (liniemi) napříč experimentálními médii. Jelikož jsme takové rozdíly nepozorovali v uniformní kontrolní skupině, kde jsou hodnoty obdobné jako hodnoty reportované jinými autory, přisuzujeme tyto změny interindividuální vnímavosti KBZD na NM KH [7, 81]. Tento nálezn je obtížné interpretovat, neboť znak CD133 je ve vztahu ke KBZD obecně považován za nedostatečně definovaný [82]. Inverzní efekt byl pozorován u exprese CD146 (MCAM), který vykazoval konzistentní hodnoty ve všech experimentálních médiích, zatímco hodnoty v kontrolní skupině byly silně inkongruentní. Tento povrchový znak je asociován s diferenciací mezenchymálních KB a pericytů směrem k vaskulární hladké svalovině [83]. U KBZD byly ale CD146+ buňky také identifikovány jako subpopulace promotorů pro regeneraci dentinových a dřevných tkání a byla u nich zjištěna vysoká exprese alkalické fosfatázy (ALP), která je markerem diferenciace KBZD směrem k odontoblastům a osteoblastům podobným buňkám [84, 85]. V tomto kontextu lze CD146 tedy interpretovat i jako znak tendence KBZD diferencovat směrem k odontoblastům a osteoblastům podobným buňkám, jehož exprese je vlivem NM KH snížena na minimum.

V souladu s definicí mezenchymálních KB podle Dominici et al. byla pozorována nízká exprese povrchových znaků CD34 a CD45, a to ve všech skupinách [86]. V práci Alraies et al. byl CD34 identifikován jako možný marker pro stromální subset KBZD s původem v neurální liště. Tento subset je distribuován variabilně mezi donory a i mezi jednotlivými zuby od jednoho dárce a CD34 analýza je jedním z možných nástrojů k identifikaci populací bohatých na tuto subpopulaci s původem v neurální liště a jejich klinickou aplikaci [87]. Přestože byla exprese CD34 hodnocena ve všech skupinách jako nízká, byl zaznamenán její statisticky významný pokles v experimentálních skupinách. Výsledek lze interpretovat tak, že NM KH utlumuje v KBZD CD34+ subpopulaci. Vliv NM KH na právě tento subtyp KBZD by bylo možné analyzovat dalším experimentem s využitím třídění buněk dle CD34.

CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor, NGFR) je markerem, který se vyskytuje na povrchu mezenchymálních KB z různých tkání včetně tkání zubních [88, 89]. Práce Alvarez et al. popisuje CD271 jako marker, který se v populaci KBZD pojí s vysokou proliferační kapacitou a širokým diferenciačním potenciálem [89]. V naší studii se výsledky positivity pro CD271 mezi jednotlivými skupinami nelišily a hodnoty exprese byly v obdobném rozmezí, jaké uváděla i výše zmíněná studie.

Při komplexním hodnocení analýzy fenotypu KBZD v rámci tohoto experimentu je důležité zdůraznit, že v souladu s obvyklými hodnotami povrchových znaků

mezenchymálních KB si buňky napříč skupinami zachovaly vysokou pozitivitu pro CD29, CD73 a CD90 a nízkou pozitivitu pro CD34 a CD45, a to i přes statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a experimentálními skupinami pro CD29, CD 34 a CD90 [90, 91]. Oproti obvyklým hodnotám se lišila exprese znaku CD105, který byl u experimentálních skupin nižší, než jsou hodnoty standardně udávané pro mezenchymální KB. Dále byly u buněk kultivovaných v experimentálních médiích pozorovány celkově nižší exprese znaků asociovaných s buněčnou mobilitou, adhezí, proliferační aktivitou a znaků souvisejících s angiogenezí a s diferenciací směrem k fibroblastům a odontoblastům. Buňky si i v přítomnosti NM KH udržely znaky mezenchymálních KB a naivní nediferencovaný fenotyp.



## Závěr

Cílem práce bylo zhodnotit dlouhodobý *in vitro* vliv KH na KBZD. Byl proveden pilotní experiment testující vliv širokého spektra KH na 2 linie KBZD následovaný experimentem zaměřeným na NM KH, do kterého bylo zařazeno 5 linií KBZD. Pilotní experiment prokázal, že KBZD při dlouhodobé kultivaci v přítomnosti KH o molekulárních hmotnostech 116 kDa, 540 kDa a 1500 kDa a koncentraci 0,1 % přežívají, adherují k povrchu, proliferaují a udržují si schopnost diferencovat ve zralé buněčné elementy ve srovnatelné míře jako buňky kultivované v kontrolním médiu. Byly pozorovány ojedinělé změny exprese povrchových znaků bez statistické významnosti. Pro experiment zaměřený na vliv NM KH na KBZD byly použity fragmenty KH odpovídající molekulární hmotnosti produktů enzymatického štěpení KH *in vivo* působením HYALs. Jednalo se o 800 Da, 1600 Da a 15 kDa o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ . Kultivace probíhala v kontrolním a experimentálních médiích. Po nasazení buněk do médií nebyl pozorován rozdíl v adherenci buněk k povrchu kultivační nádoby, ale byl zaznamenán statisticky významný pokles proliferační aktivity v experimentálních skupinách. V první pasáži byl u KBZD v experimentálních médiích výrazně redukován počet populačních zdvojení. Tento pokles byl omezen pouze na první pasáž a v dalších pasážích již nebyl zaznamenán. Dosažený kumulovaný počet populačních zdvojení na konci experimentu byl v experimentálních skupinách statisticky významně nižší. Velikost buněk kultivovaných v experimentálních skupinách byla statisticky významně menší než velikost buněk v kontrolní skupině. Relativní telomerová délka byla v porovnání s kontrolní skupinou u experimentálních médií kratší u 4 z 5 linií, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u buněk kultivovaných v médiu s přídavkem KH o molekulární hmotnosti 800 Da. Viabilita buněk nebyla přítomností KH negativně ovlivněna, naopak u 3 z 5 linií byla v experimentálních médiích vyšší než u kontroly. Rozdíly ve viabilitě nebyly statisticky významné. Výrazné rozdíly byly pozorovány ve fenotypu buněk – přestože si všechny skupiny udržely vysokou expresi základních markerů KBZD (CCD29, CD44, CD73, CD90), byl u těchto znaků u experimentálních skupin pozorován pokles. Celková analýza fenotypu pak odhalila statisticky významné snížení exprese povrchových znaků v experimentálních skupinách ( $p < 0,05$ ; CD29, CD34, CD90, CD106, CD117, CD146, CD166). Buňky si i po dlouhodobé kultivaci v přítomnosti NM KH udržely znaky mezenchymálních KB a naivní nediferencovaný fenotyp.

Práce dokumentuje vliv NM KH na KBZD *in vitro*. Výsledky ukazují, že NM KH ovlivňuje jejich proliferační aktivitu, velikost, telomerázovou aktivitu a expresi fenotypových znaků. Závěry práce přinášejí významné poznatky o vlivu degradačních produktů KH, které je nutné zohlednit při dalším vývoji buněčných nosičů z KH pro KBZD.

## Seznam citací použité literatury

- [1] Luo L, He Y, Wang X, et al. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *International Journal of Stem Cells*, 2018; 2018:1731289.
- [2] Tsutsui TW. Dental pulp stem cells: advances to applications. *Stem Cells Cloning*, 2020; 13:33.
- [3] Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, et al. Human dental pulp stem cells grown in neurogenic media differentiate into endothelial cells and promote neovasclogenesis in the mouse brain. *Frontiers in Physiology*, 2019; 10:347.
- [4] Goorha S, Reiter LT. Culturing and neuronal differentiation of human dental pulp stem cells. *Current Protocols in Human Genetics*, 2017; 92:21.6. 1-21.6. 10.
- [5] Li D, Deng T, Li H, Li Y. MiR-143 and miR-135 inhibitors treatment induces skeletal myogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 2015; 60:1613-1617.
- [6] Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *Journal of Dental Research*, 2011; 90:646-52.
- [7] Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2007; 50:195-201.
- [8] Alraies A, Waddington RJ, Sloan AJ, Moseley R. Evaluation of Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity and Behaviour in 3D Type I Collagen Gels. *BioMed Research International*, 2020; 2020:3034727.
- [9] Suchanek J, Soukup T, Visek B, et al. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University, Olomouc, Czech Republic*, 2009; 153.
- [10] Suchánek J, Browne KZ, Nasry SA, et al. Characteristics of Human Natal Stem Cells Cultured in Allogeneic Medium. *Brazilian Dental Journal*, 2018; 29:427-434.
- [11] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000; 97:13625-13630.
- [12] Pilbauerova N, Soukup T, Klepova TS, Suchanek J. Enzymatic Isolation, Amplification and Characterization of Dental Pulp Stem Cells. *Folia biologica*, 2019; 65:124-133.
- [13] Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, et al. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs*, 2011; 193:344-365.
- [14] Khanna-Jain R, Vanhatupa S, Vuorinen A, et al. Growth and differentiation of human dental pulp stem cells maintained in fetal bovine serum, human serum and serum-free/xeno-free culture media. *Stem Cell Research & Therapy*, 2012; 2.
- [15] Young FI, Telezhkin V, Youde SJ, et al. Clonal heterogeneity in the neuronal and glial differentiation of dental pulp stem/progenitor cells. *International Journal of Stem Cells*, 2016; 2016.
- [16] Alraies A, Canetta E, Waddington RJ, Moseley R, Sloan AJ. Discrimination of dental pulp stem cell regenerative heterogeneity by single-cell Raman spectroscopy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2019; 25:489-499.

- [17] Schmidt J, Pilbauerova N, Soukup T, Suchankova-Kleplova T, Suchanek J. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Effect on Dental Pulp Stem Cells In Vitro. *Biomolecules*, 2021; 11:22.
- [18] Wolf TG, Paqué F, Sven Patyna M, Willershausen B, Briseño-Marroquín B. Three-dimensional analysis of the physiological foramen geometry of maxillary and mandibular molars by means of micro-CT. *International Journal of Oral Science*, 2017; 9:151-157.
- [19] Cowman MK, Lee H-G, Schwertfeger KL, McCarthy JB, Turley EA. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in Immunology*, 2015; 6:261.
- [20] Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltes L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*, 2009; 16:1718-1745.
- [21] Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992; 6:2397-404.
- [22] Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*, 2016; 28:78-88.
- [23] Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 2004; 4:528-39.
- [24] Cyphert JM, Trempus CS, Garantzotis S. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *International Journal of Cell Biology*, 2015; 2015.
- [25] Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews*, 2006; 106:818-839.
- [26] Kogan G, Šoltés L, Stern R, Schiller J, Mendichi R. Hyaluronic acid: its function and degradation in in vivo systems. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2008; 34:789-882.
- [27] Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: a review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 151:1012-1029.
- [28] Frenkel JS. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*, 2014; 11:159-163.
- [29] Frost SJ, Weigel PH. Binding of hyaluronic acid to mammalian fibrinogens. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1990; 1034:39-45.
- [30] Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 1997; 242:49-55.
- [31] Park D, Kim Y, Kim H, et al. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF $\beta$  receptor interaction via CD44-PKC $\delta$ . *Molecules and Cells*, 2012; 33:563-574.
- [32] Nyman E, Henricson J, Ghafouri B, Anderson CD, Kratz G. Hyaluronic Acid Accelerates Re-epithelialization and Alters Protein Expression in a Human Wound Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2019; 7:e2221.
- [33] Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews*, 2011; 91:221-64.
- [34] Bohaumilitzky L, Huber AK, Stork EM, et al. A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. *Frontiers in Oncology*, 2017; 7:242.
- [35] Yang C, Cao M, Liu H, et al. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287:43094-107.

- [36] Gao F, Yang CX, Mo W, Liu YW, He YQ. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clinical and Investigative Medicine*, 2008; 31:E106-16.
- [37] Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 2006; 85:699-715.
- [38] Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, 1983; 220:1177-9.
- [39] Delmage JM, Powars DR, Jaynes PK, Allerton SE. The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 1986; 16:303-10.
- [40] McKee CM, Penno MB, Cowman M, et al. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *Journal of Clinical Investigation*, 1996; 98:2403-13.
- [41] Noble PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS. Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996; 183:2373-2378.
- [42] West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Experimental Cell Research*, 1989; 183:179-96.
- [43] Deed R, Rooney P, Kumar P, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *International Journal of Cancer*, 1997; 71:251-6.
- [44] Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Laboratory Investigation*, 1998; 78:987-1003.
- [45] Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277:41046-59.
- [46] Zhao N, Wang X, Qin L, Guo Z, Li D. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015; 465:569-574.
- [47] Agarwal S, Duffy B, Curtin J, Jaiswal S. Effect of High- and Low-Molecular-Weight Hyaluronic-Acid-Functionalized-AZ31 Mg and Ti Alloys on Proliferation and Differentiation of Osteoblast Cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018; 4:3874-3884.
- [48] Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 2013; 92:1262-1279.
- [49] Luttrell T, Rosenberry S, Estacado N, Coates J. Novel Use of a Biologically Active-Prefabricated-Random-Three-Dimensional-Polymer Scaffold of Hyaluronic Acid (HYAFF) to Facilitate Complicated Wound Closure. In: Shiffman MA, Low M eds. *Burns, Infections and Wound Management*. Cham: Springer, 2018:213-247.
- [50] Choi KY, Han HS, Lee E, et al. Hyaluronic Acid-Based Activatable Nanomaterials for Stimuli-Responsive Imaging and Therapeutics: Beyond CD44-Mediated Drug Delivery. *Advanced Materials*, 2019; 31:1803549.

- [51] Kim JH, Moon MJ, Kim DY, Heo SH, Jeong YY. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers*, 2018; 10.
- [52] Murashita T, Nakayama Y, Hirano T, Ohashi S. Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin. *British Journal of Plastic Surgery*, 1996; 49:58-63.
- [53] Li H, Qi Z, Zheng S, et al. The Application of Hyaluronic Acid-Based Hydrogels in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019; 2019:3027303.
- [54] Ahearne M, Fernández-Pérez J, Masterton S, Madden P, Bhattacharjee P. Designing Scaffolds for Corneal Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 2020; 30:1908996.
- [55] Takeda K, Sakai N, Shiba H, et al. Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*, 2011; 17:955-67.
- [56] Haugen HJ, Basu P, Sukul M, Mano JF, Reseland JE. Injectable Biomaterials for Dental Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21.
- [57] Ahmadian E, Eftekhari A, Dizaj SM, et al. The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 140:245-254.
- [58] Zhu Z, Wang Y-M, Yang J, Luo X-S. Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plastic and Aesthetic Research*, 2017; 4:219-227.
- [59] Hozumi T, Kageyama T, Ohta S, Fukuda J, Ito T. Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation. *Biomacromolecules*, 2018; 19:288-297.
- [60] Šafránková B, Hermannová M, Nešporová K, Velebný V, Kubala L. Absence of differences among low, middle, and high molecular weight hyaluronan in activating murine immune cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018; 107:1-8.
- [61] Niloy KK, Gulfam M, Compton KB, et al. Methacrylated Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Maintain Stemness in Human Dental Pulp Stem Cells. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 2020; 6:262-272.
- [62] Compton KB. Synthesis and Characterization of Methacrylated Hyaluronan-Based Hydrogels for Tissue Engineering. Thesis and Dissertations. University of Tennessee. Tennessee 2014.
- [63] Jones TD, Kefi A, Sun S, Cho M, Alapati SB. An Optimized Injectable Hydrogel Scaffold Supports Human Dental Pulp Stem Cell Viability and Spreading. *Advances in Medicine*, 2016; 2016:7363579.
- [64] Apel C, Buttler P, Salber J, Dhanasingh A, Neuss S. Differential mineralization of human dental pulp stem cells on diverse polymers. *Biomed Tech (Berl)*, 2018; 63:261-269.
- [65] Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M, et al. Hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via CD44. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016; 7:135.
- [66] Jensen J, Kraft DC, Lysdahl H, et al. Functionalization of polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and  $\beta$ -TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Tissue Engineering Part A*, 2015; 21:729-39.

- [67] Ferroni L, Gardin C, Sivoilella S, et al. A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015; 16:4666-81.
- [68] Chrepa V, Austah O, Diogenes A. Evaluation of a Commercially Available Hyaluronic Acid Hydrogel (Restylane) as Injectable Scaffold for Dental Pulp Regeneration: An In Vitro Evaluation. *Journal of Endodontics*, 2017; 43:257-262.
- [69] Graça MFP, Miguel SP, Cabral CSD, Correia IJ. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2020; 241:116364.
- [70] Suchánek J, Ivančáková RK, Mottl R, et al. Hyaluronic Acid-Based Medical Device for Treatment of Alveolar Osteitis-Clinical Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019; 16:3698.
- [71] Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research*, 2002; 12:321-9.
- [72] Chen KL, Huang YY, Lung J, Yeh YY, Yuan K. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 2013; 39:351-6.
- [73] Yang YK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018; 9:131.
- [74] Alessio N, Stellavato A, Squillaro T, et al. Hybrid complexes of high and low molecular weight hyaluronan delay in vitro replicative senescence of mesenchymal stromal cells: a pilot study for future therapeutic application. *Aging*, 2018; 10:1575-1585.
- [75] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*, 2003; 17:984-992.
- [76] Brinkhof B, Zhang B, Cui Z, Ye H, Wang H. ALCAM (CD166) as a gene expression marker for human mesenchymal stromal cell characterisation. *Gene*: X, 2020; 5:100031.
- [77] Yang ZX, Han Z-B, Ji YR, et al. CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLOS One*, 2013; 8:e59354.
- [78] Nieto-Nicolau N, de la Torre RM, Fariñas O, et al. Extrinsic modulation of integrin  $\alpha 6$  and progenitor cell behavior in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, 2020; 47:101899.
- [79] Foster BM, Zaidi D, Young TR, Mobley ME, Kerr BA. CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance. *Biomedicines*, 2018; 6.
- [80] Edling CE, Hallberg B. c-Kit—A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007; 39:1995-1998.
- [81] Bonnamain V, Thinard R, Sergent-Tanguy S, et al. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Frontiers in Physiology*, 2013; 4:357-357.
- [82] Olatz C, Patricia G-G, Jon L, et al. Is There Such a Thing as a Genuine Cancer Stem Cell Marker? Perspectives from the Gut, the Brain and the Dental Pulp. *Biology*, 2020; 9.
- [83] Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, et al. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014; 18:104-14.

- [84] Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui TW. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Human Cell*, 2018; 31:127-138.
- [85] Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 2007; 33:703-8.
- [86] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8:315-7.
- [87] Alraies A, Alaidaroos NY, Waddington RJ, Moseley R, Sloan AJ. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biology*, 2017; 18:12.
- [88] Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World Journal of Stem Cells*, 2015; 7:470-6.
- [89] Alvarez R, Lee HL, Hong C, Wang CY. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *International Journal of Oral Science*, 2015; 7:205-12.
- [90] Macrin D, Alghadeer A, Zhao YT, et al. Metabolism as an early predictor of DPSCs aging. *Scientific Reports*, 2019; 9:2195.
- [91] Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *The Open Orthopaedics Journal* 2011; 5:253-260.

## Přehled publikační činnosti

### Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

**Schmidt J**, Pilbauerova N, Soukup T, Suchankova-Kleplova T, Suchanek J. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Effect on Dental Pulp Stem Cells In Vitro. *Biomolecules*, 2021, 11, 22. (IF = 4,082 /2019)

Pilbauerova N, **Schmidt J**, Soukup T, Koberova Ivancakova R, Suchanek J. The Effects of Cryogenic Storage on Human Dental Pulp Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 4432. (IF = 4,556 /2019)

Pilbauerova N, Soukup T, Suchankova Kleplova T, **Schmidt J**, Suchanek J. The Effect of Cultivation Passaging on the Relative Telomere Length and Proliferation Capacity of Dental Pulp Stem Cells. *Biomolecules*, 2021, 11, 464. (IF = 4,082 /2019)

Suchánek J, Ivančaková RK, Mottl R, Browne KZ, Pilneyová KC, Pilbauerová N, **Schmidt J**, Suchánková Kleplová T. Hyaluronic Acid-Based Medical Device for Treatment of Alveolar Osteitis-Clinical Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019; 16, 3698. (IF = 2,849)

### Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise:

Mottl R, Kunderová M, Slezák R, **Schmidt J**. Iatrogenic fracture of the lower jaw – a rare complication of lower molar extraction. *Acta Medica (Hradec Kralove)* – přijato k tisku.

**Schmidt J**, Pilbauerová N, Soukup T, Suchánek J. Vliv kyseliny hyaluronové o nízké, střední a vysoké molekulární hmotnosti na lidské kmenové buňky zubní dřeně. *Czech Stomatology & Practical Dentistry/Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství*, 2020,120, 3.

Suchánek J, Browne KZ, Nasry SA, Kleplová TS, Pilbauerová N, **Schmidt J**, Soukup T. Characteristics of Human Natal Stem Cells Cultured in Allogeneic Medium. *Brazilian Dental Journal*, 2018, 29, 5.

### Smluvní projekty:

Smluvní výzkum Contipro – spoluřešitel, Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky zubní dřeně I (2020).



## **Ostatní sdělení – konference, ústní prezentace a postery:**

**Schmidt J**, Pericoronis – etiopatogeneze, diagnostika a terapie. Stomatologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, 2. 3. 2021.

**Schmidt J**, Pilbauerova N, Soukup T, Suchánek J. Low molecular weight hyaluronic acid effects on dental pulp stem cells, 17th International medical postgraduate conference, Hradec Králove, 19.-20. 11. 2020.

**Schmidt J**, Pilbauerova N, Soukup T, Suchánek J. Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky zubní dřeně. XXIV. Sazamův den online, Stomatologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, 4. 11. 2020.

**Schmidt J**. Low molecular weight hyaluronic acid effects on dental pulp stem cells, 16th Postgraduate Medical Students Conference, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Králove 12. 10. 2020.

**Schmidt J**, Suchánek J, Ivančaková RK, Mottl R, Browne KZ, Pilneyová KC, Pilbauerová N, Suchánková Kleplová T. Hyaluronic Acid-Based Medical Device for Treatment of Alveolar Osteitis-Clinical Study (poster), 7th International Conference on Trends in Health and Medicine: Paris 2019, Paris, France, 27.-28. 12. 2019.

**Schmidt J**. CP2 & Muscle Wasting II, The Skeletal Muscle Wasting and Progenitor Cell Biology Laboratory, Mayo Clinic, Rochesten, MN, USA, červen 2019.

**Schmidt J**. CP2 & Muscle Wasting II, The Mitochondrial Neurobiology and Therapeutics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, červen 2019.

Arneson P, Cho DS, Joseph J, **Schmidt J**, Shin A. Skeletal muscle, stem cells, and disease (poster), Mayo Clinic Graduate Schoold of Biomedical Sciences 2019, PhD. Interview Weekend Poster Session, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, leden a únor 2019.

**Schmidt J**. CP2 & Muscle Wasting, The Mitochondrial Neurobiology and Therapeutics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, únor 2019.

**Schmidt J**. CP2 & Muscle Wasting, The Skeletal Muscle Wasting and Progenitor Cell Biology Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, prosinec 2018.

**Schmidt J**. Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky zubní dřeně, Stomatologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, červen 2018.