

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Stomatologie

**Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky
zubní dřeně
Effect of hyaluronic acid on dental pulp
stem cells**

MDDr. Jan Schmidt

Školitel: doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2021

Jan Schmidt

Poděkování autora

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Jakubu Suchánkovi, Ph.D. za to, že mi je již od dob mého pregraduálního studia trpělivým učitelem a blízkým přítelem. Jeho schopnost motivovat osobními příklady, pochopení a vždy přítomná ochota pomoci mi pomáhaly a pomáhají nejen v rozvoji profesním, ale i osobním. *Ductus exemplo*.

Děkuji přednostovi Stomatologické kliniky doc. MUDr. Radovanu Slezákovi, CSc. za podporu našeho výzkumného týmu a celkovou podporu vědecko-výzkumné činnosti na našem pracovišti.

Děkuji Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za poskytnutí laboratorního zázemí, zejm. pak MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D. za jeho cenné rady a rozmanitou akademickou spolupráci.

My special thanks are dedicated to my mentors and friends, Professor Jeffrey L. Salisbury, Professor Eugenia Trushina, and Dr. Jason D. Doles, from Mayo Clinic, Rochester, MN, USA. The year of research guidance followed by years of friendship have enriched my life to this day.

I thank my colleague and friend, Dr. Pádraig J. Flannery, from University College London Hospitals, London, GB, for his patience in teaching me laboratory techniques over and over again.

Děkuji prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Ph.D. a Ing. Haně Laštůvkové z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za poskytnutí laboratorního zázemí při analýze relativní délky telomer kmenových buněk zubní dřene.

Obsah

1	Úvod do problematiky	1
1.1	Kmenové buňky	1
1.1.1	Kmenové buňky zubní dřeně	4
1.2	Zubní dřeň	5
1.3	Kyselina hyaluronová	7
1.3.1	Historie kyseliny hyaluronové.....	7
1.3.2	Chemická struktura kyseliny hyaluronové	9
1.3.3	Syntéza a degradace kyseliny hyaluronové	12
1.3.4	Produkce kyseliny hyaluronové.....	13
1.3.5	Funkce kyseliny hyaluronové	16
1.3.6	Kyselina hyaluronová a tkáňové inženýrství	22
1.3.7	Kyselina hyaluronová a kmenové buňky zubní dřeně	24
2	Cíl.....	28
3	Materiál a metodika.....	29
3.1	Kyselina hyaluronová	29
3.2	Kritéria výběru dárců kmenových buněk.....	29
3.3	Kritéria výběru zubů pro získání kmenových buněk	30
3.4	Odběr zubů.....	30
3.5	Izolace zubní dřeně	31
3.6	Mobilizace a expanze buněk	31
3.7	Kryokonzervace buněk.....	35
3.8	Rozmrazení buněk	36
3.9	Kultivace buněk	36
3.9.1	Pilotní experiment	36
3.9.2	Experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou.....	37
3.10	Charakterizace buněk	38
3.11	Analýza relativní délky telomer buněk.....	39
3.11.1	Izolace DNA.....	40
3.11.2	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	40
3.12	Diferenciace buněk.....	41
3.13	Statistická analýza dat.....	42
4	Výsledky.....	44
4.1	Pilotní experiment.....	44
4.1.1	Izolace KBZD	44

4.1.2	Kultivace KBZD	44
4.1.3	Proliferační aktivita.....	47
4.1.4	Viabilita	51
4.1.5	Analýza povrchových znaků.....	51
4.1.6	Diferenční potenciál.....	55
4.2	Experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou	58
4.2.1	Izolace KBZD	58
4.2.2	Kultivace KBZD	58
4.2.3	Proliferační aktivita.....	61
4.2.4	Viabilita	65
4.2.5	Velikost buněk.....	67
4.2.6	Analýza povrchových znaků.....	68
4.2.7	Relativní telomerová délka	72
5	Diskuse	74
6	Závěr	85
7	Seznam citací použité literatury	87

Seznam použitých zkratk

KH	Kyselina hyaluronová
KBZD	Kmenové buňky zubní dřene
DPSCs	Dental pulp stem cells,
HA	Hyaluronic acid
NM	Nízkomolekulární
VM	Vysokomolekulární
LMW	Low molecular weight
HMW	High molecular weight
KB	Kmenové buňky
EKB	Embryonální kmenové buňky
AKB	Adultní kmenové buňky
TGPCs	Tooth germ progenitor cells
nDPSCs	Natal dental pulp stem cells
SHEDs	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth
DFSCs	Dental follicle stem cells
SCAP	Stem cells from apical papilla
PDLSCs	Peridontal ligament stem cells
GMSCs	Gingival mesenchymal stem cells
CD	Cluster of differentiation
HAS	Hyaluronan syntáza
HYAL	Hyaluronidáza
NOS2	Nitric oxid synthase 2
TNF	Tumor necrosis factor
IL12B	Interleukin-12 subunit beta
IGF1	Insulin-like growth factor 1
ARG1	Arginase 1
IL10	Interleukin 10
MRC1	Mannose receptor C-type 1
RHAMM	Receptor for HA-mediated motility
ROS	Reactive oxygen species
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution

EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
α -MEM	Eaglovo minimální esenciální médium v α modifikaci
FBS	Fetální bovinní sérum
ITS	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenium supplement
PDGF	Platelet derived growth factor
EGF	Epidermal growth factor
PBS	Phosphate-buffered saline
Ep1	Experimentální pilotní médium 1
Ep2	Experimentální pilotní médium 2
Ep3	Experimentální pilotní médium 3
E1	Experimentální médium 1
E2	Experimentální médium 2
E3	Experimentální médium 3
PE	Fykoerytrin
FITC	Fluorescein izothiokyanát
HLA	Human leukocyte antigen
LSD	Least significant difference
ANOVA	Analysis of variance
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
ITGA6	Integrin alfa-6
c-KIT	Tyrosine-protein kinase Kit
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
ALP	Alkalická fosfatáza
NGFR	Low-affinity nerve growth factor receptor

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 řetězců (VM) 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 kulturačních 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.

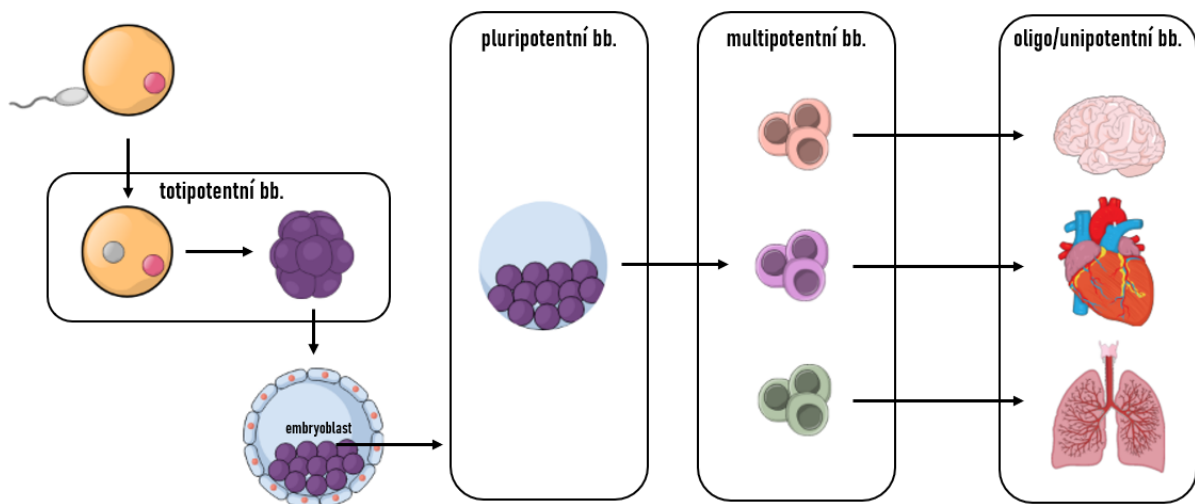
This work provides data on the effect of HA on DPSCs *in vitro* with emphasis on LMW HA. The results show that LMW HA affects their proliferative activity, size, telomerase activity and expression of phenotypic traits. The work presents important findings about the influence of HA degradation products,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

1 Úvod do problematiky

1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (KB) jsou nediferencované eukaryotní buněčné elementy se specifickými vlastnostmi. Jsou schopny vysoké míry proliferace, kterou překonávají Hayflickův limit, a diferenciaci ve zralé buněčné typy. Dělení KB může být symetrické či asymetrické. Při symetrickém dělení vznikají z buňky mateřské dvě buňky dceřiné, které jsou identické. Tato forma se uplatňuje při expanzi počtu KB či při diferenciaci KB do dvou buněk diferencovaných. Při asymetrickém dělení dochází naopak ke vzniku dceřiných buněk, které jsou rozdílné. Jedna dceřiná buňka je kopií buňky mateřské, druhá pak odlišná. Díky tomuto mechanismu je udržován stálý počet KB [1]. Podle šíře diferenciačního potenciálu jsou KB děleny na totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní (obr. 1) [2]. Prvně jmenované jsou nadány schopností dát vzniku všem buněčným typům, a to jak buňkám embryonálním, tak i extraembryonálním. Jedná se o zygotu vznikající po splynutí vajíčka a spermie a buňky moruly. Z těchto buněk vzniká blastocysta jejíž vnitřní buněčná masa, embryoblast, je nadána potenciálem diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů – ektodermu, mezodermu a entodermu. Buňky embryoblastu jsou proto označovány jako pluripotentní. Multipotentní KB jsou definovány jako buněčné elementy, jejichž diferenciaci je omezena jen na jeden zárodečný list. Příkladem mohou být hematopoetické kmenové buňky, které dávají v procesu krvetvorby vzniku myeloidním a lymfoidním progenitorům. Jako oligopotentní jsou pak označovány ty KB, jejichž vývoj je limitován pouze na několik buněčných typů, unipotentní KB pak pouze na jeden buněčný typ. Dále rozlišujeme kmenové buňky embryonální (EKB) a kmenové buňky adultní (AKB). EKB jsou pluripotentními KB, které jsou izolovány z vnitřní buněčné masy embrya ve stádiu blastocysty [2]. Diferenciační potenciál těchto buněk je široký, neboť jako pluripotentní KB mohou diferencovat v buňky všech zárodečných listů. Nicméně jejich odběr, při kterém dochází k zániku embrya, a práce s nimi jsou spojeny s řadou etických, náboženských a politických problémů [3]. AKB jsou nediferencované buňky sídlící v tkáních a orgánech, kde zajišťují buněčnou obnovu, a jako multipotentní jsou ve svém diferenciačním potenciálu omezeny na jeden ze tří zárodečných listů [4]. Zdrojem pak mohou být např. periferní krev, pupečnicková krev,

kostní dřeň, tuková tkáň, chrupavka, játra, tkáň paradontu, zubní dřeň aj. [5-8]. Jelikož jsou AKB izolovány postnatálně, jsou snadněji dostupné a jejich využití není doprovázeno tolika etickými kontroverzemi [3]. Další výhodou AKB oproti EKB je jejich nižší tumorogenní a imunogenní potenciál a jejich použití je tak považováno za bezpečnější [9]. Speciální skupinou jsou indukované pluripotentní KB. Tyto buňky jsou biotechnologicky změněné somatické buňky, které díky úpravám nabývají vlastností pluripotentních KB. Mohou tak diferencovat do všech buněk těla, ale postrádají schopnost diferencovat v buňky extraembryonální, tedy např. buňky placenty.



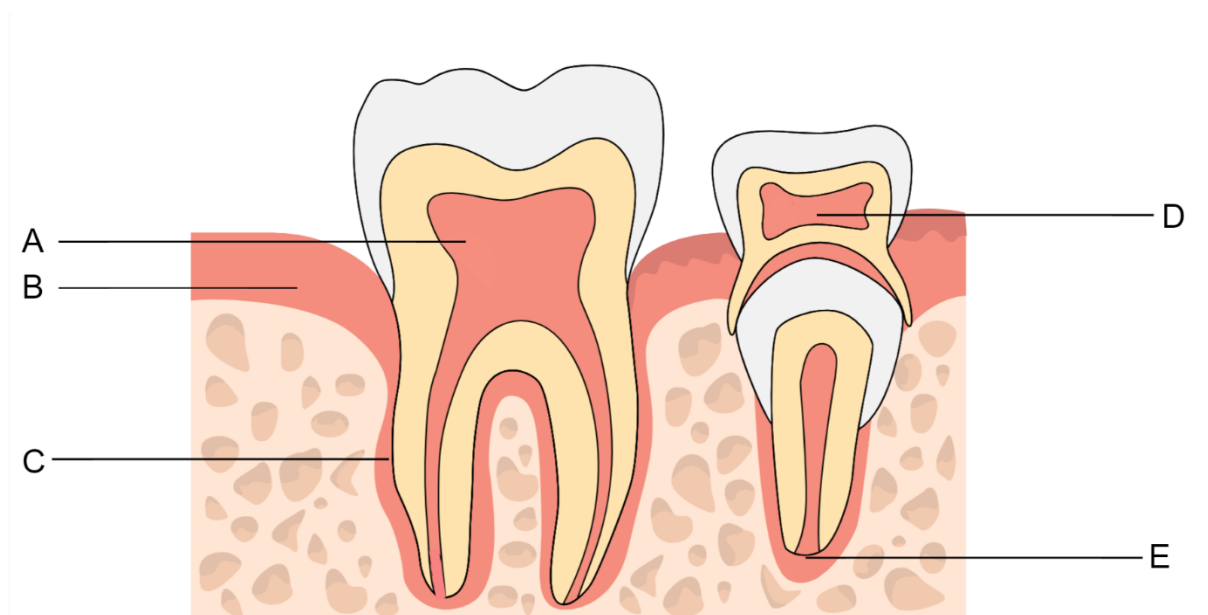
Obrázek 1. Potence buněk. Splynutím spermie a vajíčka vznikají totipotentní zygota a morula. Vnitřní buněčná masa blastocysty, embryoblast, obsahuje pluripotentní buňky, které dávají vznik zárodečným listům. Ty obsahují multipotentní buňky, jež diferencují v buňky oligo/unipotentní omezené ve své potenci na buňky příslušné tkáni.

Mezi AKB patří také KB, se vztahem k zubům. V anglické literatuře je pak pro buňky v této lokalizaci užíván souhrnný termín „dental-related stem cells“ [10]. Toto označení zahrnuje KB získané z tkání zubu či tkání kolem zubu, tj. dásně, paradontálních vazů, zubního vaku či papily. V průběhu vývoje těchto tkání dochází k formování horní a dolní zubní lišty vznikající z ektodermového epitelu primitivní ústní dutiny. Zubní lišta se dělí do zubních pupenů, které se zahlubují do mezenchymu vyvíjejících se čelistí, a dochází k tvarování tzv. zubních pohárků přecházejících do tvaru zvonku a v orgán skloviny. Kondenzovaný mezenchym a ektomezenchym dává vzniku zubní papile a zubnímu vaku. Ektomezenchym zevní vrstvy zubní papily je podkladem pro vznik odontoblastů, jejichž činností vzniká dentin, naopak vnitřní část papily je základem

zubní dřeně. Vnitřní část dentálního vaku obsahující zejm. ektomezenchymální buňky diferencující v cementoblasty, které produkují zubní cement. Mezenchymální buňky zevní vrstvy dentálního vaku se vyvíjí ve fibroblasty periodoncia a v osteoblasty kosti alveolárního výběžku horní a dolní čelisti. Vývoj zubu a jeho okolí je tak výsledkem součinnosti ektomezenchymu a mezechymu, jejichž buňky mají původ v gangliové liště, a ektodermu. Díky tomuto specifickému prostředí nacházíme v tkáních zubu a jeho okolí hned několik specifických populací kmenových buněk, jejichž názvy jsou odvozeny od místa jejich výskytu (obr. 2). Jedná se o KB:

- zubního zárodku (anglicky tooth germ progenitor cells, TGPCs) [11]
- zubní dřeně natálního zubu (anglicky natal dental pulp stem cells, nDPSCs) [12]
- zubní dřeně dočasného zubu (anglicky stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs) [13]
- zubní dřeně stálého zubu (KBZD, anglicky dental pulp stem cells, DPSCs) [14]
- zubního vaku (anglicky dental follicle stem cells, DFSCs) [15]
- apikální papily (anglicky stem cells from apical papilla, SCAP) [16]
- periodontálních vazů (anglicky peridontal ligament stem cells, PDLSCs) [17]
- dásně (anglicky gingival mesenchymal stem cells, GMSCs) [18]

Tyto relativně nově definované skupiny KB, byly objeveny postupně během první dekády tohoto století. Jako první z nich byly popsány KBZD - Gronthos et al. v roce 2000, následovány byly charakterizací KB zubní dřeně dočasného zubu - Miura et al. v roce 2003, periodontálních vazů - Seo et al. v roce 2004, zubního vaku - Morsczeck et al. v roce 2005, apikální papily - Sonoyama et al. v roce 2006, zubního zárodku - Ikeda et al. v roce 2008, gingivy - Zhang et al. v roce 2009 a zubní dřeně natálních zubů - Karaöz et al. v roce 2010 [11, 19-25]. Dnes se jedná o standardně využívaný zdroj kmenových buněk pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu [26-30].



Obrázek 2. Lokalizace kmenových buněk tkání zubu a jeho okolí. Kmenové buňky zubní dřeně stálého zubu (A), kmenové buňky dásně (B), kmenové buňky periodontálních vazů (C), kmenové buňky zubní dřeně dočasného zubu (D), kmenové buňky apikální papily (E).

1.1.1 Kmenové buňky zubní dřeně

KBZD jsou nejdéle známou linií KB z rodiny dental-related stem cells nacházejících se v zubu a jeho okolí. Jedná se o mezenchymálních AKB, které jsou izolovány ze dřeně stálých zubů a jejichž původ je odvozen z kraniální gangliové lišty [31]. 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 [32-36]. 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 [37, 38]. Při kontaktu s přilnavým povrchem KBZD na tento přisedají a nabývají tvaru vřetene s mnohočetnými výběžky. Pakliže jsou v prostředí volně, zaujmají tvar koule o průměru 12-17 μm [14] (obr. 3). 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 [12, 14]. Již od první

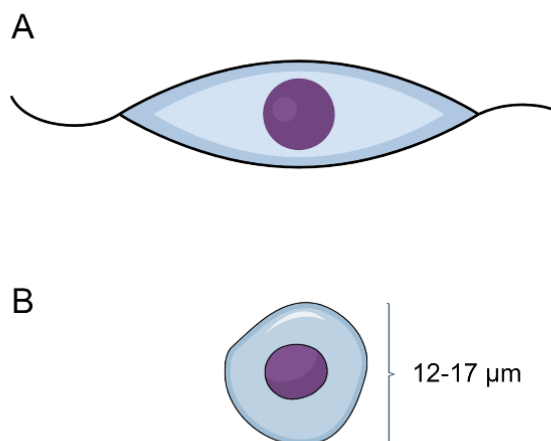
charakterizace v roce 2000 jsou KBZD považovány za heterogenní skupinu s variabilními vlastnostmi [19]. Tato variabilita je pozorována jak mezi jednotlivými liniemi od různých dárců, které vykazují odlišnosti v proliferační aktivitě, velikosti buněk, proliferační aktivitě nebo expresi některých povrchových znaků, tak i v rámci subpopulací v jedné linii [14, 19, 39-44].

Nízká diferenciací těchto buněk a jejich široký diferenciací 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 (obr. 4) [45]. 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 KB, 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 krok nad rámec plánovaného ošetření.

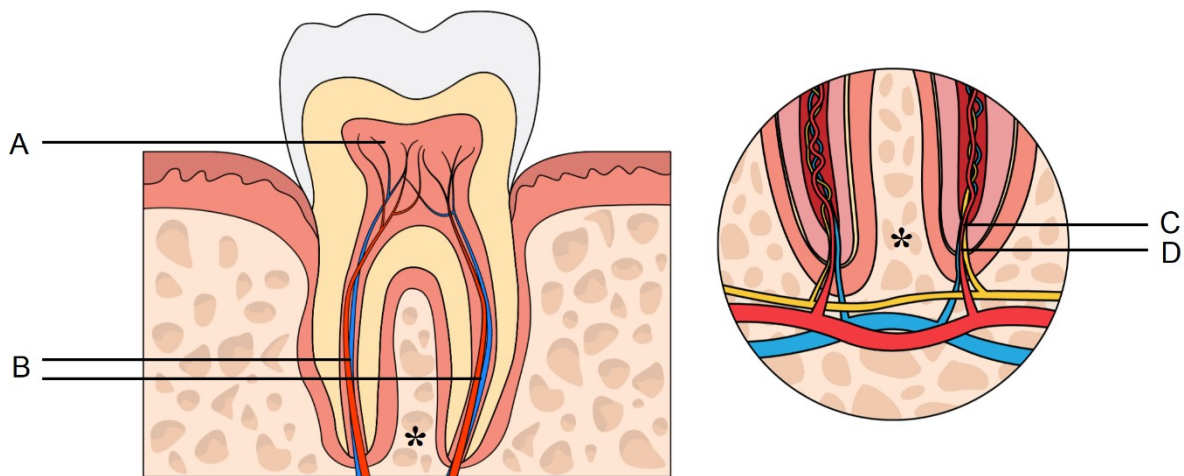
1.2 Zubní dřeň

Zubní dřeň (*pulpa dentis*) je měkká tkáň, která se nachází v nitru zubu v prostoru ohraničeném tvrdými zubními tkáněmi. Rozlišována je dřeň koronární a radikulární. Koronární zubní dřeň je uložena v korunkové části zubu v dřeňové dutině (*cavum pulpae*) a směrem k okluzi či incizi zubu vybíhá v rohy dřeňové dutiny obsahující rohy zubní dřeně (*cornua pulpae*). Radikulární zubní dřeň je uložena v kořenových



Obrázek 3. Kmenové buňky zubní dřeně – tvar. Vřetenovitý tvar přisedlé kmenové buňky (A), kulovitý tvar volné kmenové buňky a její obvyklá velikost (B).

kanálcích (*canales radicis dentis*), jimiž je do dřeňové dutiny vedeno nervové a cévní zásobení, a to přes *foramen anatomicum* a *foramen physiologicum* (obr. 4).



Obrázek 4. Zubní dřeň a její lokalizace. Zubní dřeň v prostoru dřeňové dutiny (A), zubní dřeň v kořenových kanálcích (B), do kterých měkké tkáně vstupují přes *foramen physiologicum* (C), *foramen anatomicum* (D).

Histologicky se jedná o rosolovité řídké vazivo obsahující buňky a mezibuněčnou hmotu. Z buněk zde nacházíme fibroblasty, bloudivé buňky (zejm. histocyty, makrofágy, lymfocyty, dendritické buňky) či KBZD, v zevní části se pak po obvodu dřeňové dutiny nacházejí odontoblasty. Mezibuněčná hmota obsahuje retikulární a kolagenní vlákna a také nekolagenní proteiny – fibronektin, osteokalcin či glykosaminoglykany jako jsou např. chondroitin sulfát, heparan sulfát nebo kyselina hyaluronová [46].

Funkce zubní dřeně vychází z jejího obsahu. Odontoblasty jsou odpovědné za tvorbu dentinu, senzitivní nervová zakončení za čítí, cévy zajišťují hydrataci dentinu a výživu tkání zubu, KBZD představují zásobu nediferencovaných KB a mohou diferencovat např. do odontoblastům podobných buněk. Mezibuněčná hmota pak zajišťuje buňkám strukturální podporu, napomáhá látkové výměně a funkčně je ovlivňuje.

Díky izolovanosti od okolních tkání je zubní dřeň stabilním níché, ve kterém si KBZD udržují svou nízkou diferencovanost. Komponenty zubní dřeně jsou přirozenou

součástí prostředí KBZD a lze tak předpokládat, že jejich kontakt s KBZD tyto buňky výrazně neovlivňuje.

1.3 Kyselina hyaluronová

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. V organismech, kde se vyskytuje jak součást pojivových, epiteliálních a nervových tkání, se pak většinou nachází ve formě soli, obvykle soli sodné, neboť se KH v těchto prostředích vyskytuje jako anion. V takovém případě je přesné užívat označení hyaluronát, např. hyaluronát sodný, či obecně hyaluronan, avšak v praxi jsou tyto pojmy často zaměňovány. 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 [47]. Zároveň se jedná o bioaktivní molekulu, která funkčně ovlivňuje své okolí a jejíž působení je závislé na molekulární hmotnosti [48].

1.3.1 Historie kyseliny hyaluronové

KH byla poprvé izolována a popsána německým biochemikem Karlem Mayerem a jeho asistentem Johnem Palmerem v roce 1934 na půdě Kolumbijské Univerzity v New Yorku, NY, USA (obr. 5) [49]. V textu s názvem „The polysaccharide of the vitreous humor“ publikovaném v Journal of Biological Chemistry pojmenovávají tuto látku hyaluronová kyselina. Označení má původ v řeckém hyaloeidés, které v překladu znamená skleněné či transparentní, a koncovka -uronic odkazuje na kyselinu uronovou. Byť o prvenství v izolaci a popisu KH Mayerem et al. není sporu, je vhodné zmínit, že první článek zmiňující „nový polysacharid izolovaný z corpus vitreum“ je text „Mucins and mucinoids“ Phoebuse Aarona Levenena z roku 1918 publikovaný v také v Journal of Biological Chemistry [50]. Levenen v laboratořích Rockefellerova institutu pro lékařský výzkum v New Yorku, NY, USA objevil v očním sklivci a pupečnickové krvi „mucoitin-sulfurovou kyselinu“ složenou z glukosaminu, glukuronové kyseliny a sulfonových iontů. Z dnešního pohledu je zřejmé, že se jednalo o KH, která byla extrahována spolu se sulfátovanými glykosaminoglykany.

Některé práce uvádí informaci, že nejstarší záznam o KH je publikován v roce 1880 francouzským chemikem Portesem. Pro tuto kusou informaci jsem však ve stávající literatuře nenalezl žádné řádné zdroje, neboť autoři recentních publikací se při tomto tvrzení odkazují na jiné recentní autory. Po důkladné rešerši literárních análů jsem našel článek publikovaný časopisem *Journal de l'anatomie et de la physiologie* v Paříži v roce 1880. Text s názvem „Étude du corps vitré“ je psán ve francouzském jazyce a autorem je H. Beauregard [51]. Ten v textu své práce věnujícímu se složení očního sklivce zmiňuje spolupráci s M. Portesem, vedoucím lékárníkem nemocnice Lourcine v Paříži (dnes nemocnice Broca, Paříž). Z textu vyplývá, že M. Portes analyzoval hovězí sklivce, izoloval z něj mucinu podobnou látku, která ale vykazovala odlišné vlastnosti než mucin jiných tkání, a jako pracovní název navrhl proto „hyalomucin“. Výsledky svého bádání poskytl H. Beauregardovi. V textu je také uvedeno, že práce na analýze této látky stále pokračují. Další informace o následné práci M. Portese s hyalomucinem jsem již v historické literatuře nenalezl.

KH byla po svém představení K.

Mayerem v roce 1934 následně detekována ve většině tkání obratlovců a v roce 1937 byla uveřejněna práce pod vedení Forresta Kendalla představující izolaci KH z kapsuly bakterií rodu *Streptococcus* [52]. Tento objev byl základem k industriální produkci KH z mikroorganismů. První zdokumentované lékařské využití proběhlo během 2. světové války v roce 1943. Sovětský lékař a vědec ukrajinského původu Nikolay Fyodorovich Gamaleya využíval extrakt z pupečnickové krve, jehož hlavní složkou byla KH,

THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR

BY KARL MEYER AND JOHN W. PALMER

(From the Biochemical Laboratory of the Department of Ophthalmology of the College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York)

(Received for publication, September 4, 1934)

Since the work of Mörner (1) the existence of a mucoid in the vitreous humor has seemed well established. All subsequent workers used his method of preparation: the precipitation of the diluted native vitreous humor with dilute acetic acid. In his recent book on the nature of the vitreous body (2), Duke-Elder gives its concentration as 0.021 per cent, or about 30 per cent of the total protein present. The only analysis we were able to find on this mucoid is that of Mörner: N, 12.27 per cent; S, 1.19 per cent.

The stability of a typical mucoid, as, for example, egg mucoid, toward splitting into its polysaccharide and protein components is very remarkable. Thus Levene and Mori (3) state that the egg white must be hydrolyzed on the steam bath with 10 times its volume of 10 per cent barium hydroxide for 7 hours.

In an effort to prepare the supposed vitreous mucoid for other studies, we obtained, by very gentle methods, a free polysaccharide acid of high molecular weight, which is apparently in the vitreous humor in a salt-like combination. It appears to be a substance unique in higher animals, and may be best compared with some of the specific polysaccharides of bacteria.

EXPERIMENTAL

Our starting material was the acetone precipitate of fresh cattle vitreous humor. Lots of 100 eyes were brought from the abattoir packed in ice; the vitreous humor was immediately removed, strained through loose cotton gauze, and poured into 10 times its volume of cold acetone with vigorous stirring. After standing overnight in the ice box, it was filtered by suction, washed abundantly with acetone, and dried in a vacuum desiccator.

629

Obrázek 5. *The polysaccharide of the vitreous humor – titulní strana první publikace o kyselině hyaluronové v časopise Journal of Biological Chemistry.*

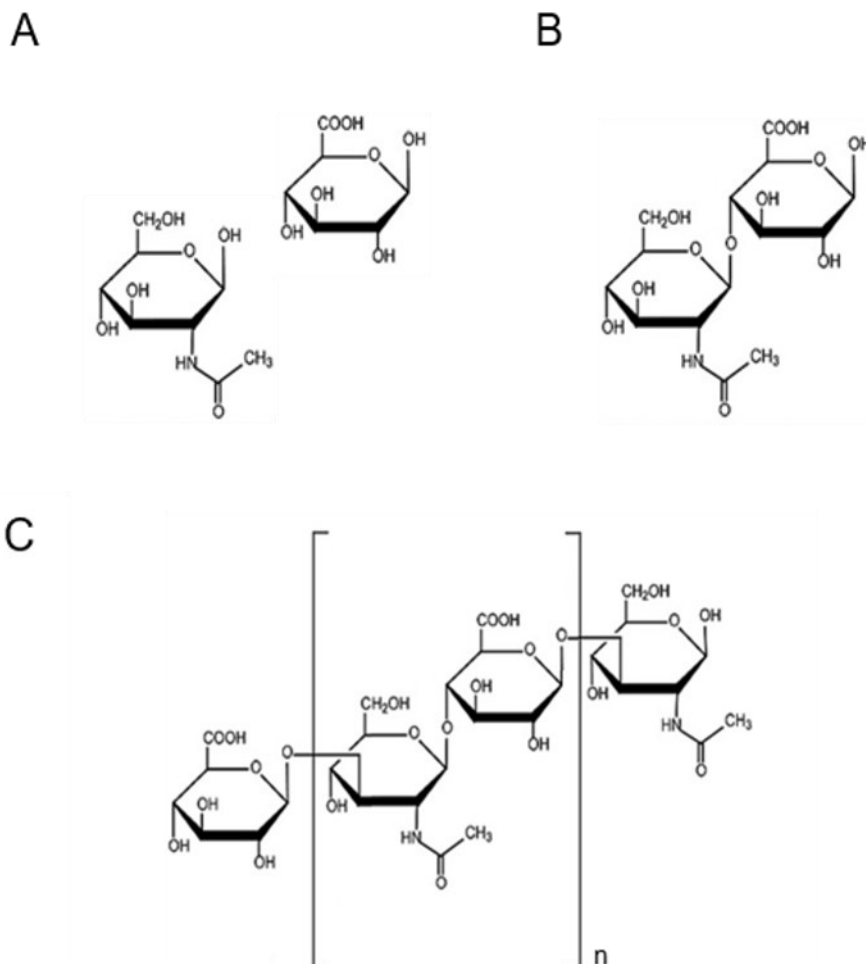
k impregnaci obvazů ran. Gamaleya extrakt pojmenoval „regenerační faktor“ a ten byl následně oficiálně schválen k užívání sovětským ministerstvem zdravotnictví [53]. V 50. letech 20. století byly provedeny první experimenty s KH k léčbě odchlípení sítnice a koncem 60. let byla injekčně podaná KH použita k experimentální léčbě artritidy [53]. V roce 1964 byla publikována J. C. Thonardem působícím na Fakultě zubního lékařství Pittsburghské univerzity, PA, USA práce představující izolaci KH při fermentaci kultur *Streptococci spp.* [54]. Na přelomu 70. a 80. let 20. století byly představeny a patentovány metody izolace čisté KH z tkání, nejčastěji z kohoutích hřebenů, vyvinuty týmem kolem Endreho Balazse, lékaře maďarského původu působícího na New York City's Columbia-Presbyterian Hospital, NY, USA a tento proces otevřel cestu industriální produkci KH pro medicínální a kosmetické užití [55, 56]. Koncem 70. let 20. století byla vyvinuta a patentována metoda výroby čisté KH mikrobiální fermentací za použití *Streptococcus zooepidemicus* [57].

1.3.2 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

KH je lineární polymerní molekulou složenou z repetitivních disacharidových jednotek se souhrnným vzorcem $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$. Chemický název (2-acetamido-2-deoxy-D-gluko)-D-glukuronoglykan pak odhaluje, že se jedná o kyselinu D-glukuronovou a N-acetylglukosamin spojené β -(1→4) a β -(1→3) glykosidovými vazbami (obr. 6). Tato disacharidová struktura je energeticky stabilní, neboť oba sacharidy v β -glukózové konfiguraci staví velké skupiny do prostorově výhodných ekvatoriálních poloh, kdežto malé vodíky jsou vztyčeny osově [58]. Přibližná molekulární hmotnost každé repetyce je 400 Da a počet jejich opakování může dosahovat až 25 000 [59]. Molekulární hmotnost v těle se v závislosti na lokalizaci pohybuje v rozmezí 5 000-20 000 000 Da.

KH je dělena dle délky svého řetězce na nízkomolekulární (NM) a vysokomolekulární (VM), avšak hranice těchto skupin nejsou oficiálně definovány. V literatuře lze proto nalézt různé mezní hodnoty pro toto dělení a někteří autoři uvádějí i KH o středně vysoké molekulární hmotnosti. Toto rozdělení je teoretické a spíše, než aby bylo definováno exaktními hodnotami, je na místě vnímat KH jako polymer vyskytující se v širokém rozmezí molekulárních hmotností, kdy mnohé její funkce souvisí s délkou jejího řetězce. Rozdělení má proto smysl, pokud odráží rozdílné vlastnosti a funkce jednotlivých frakcí KH. Nejednotnost klasifikace KH v rámci literatury je tak pravděpodobně dána tím, na jaký fenomén se která práce zaměřuje. Každou klasifikaci

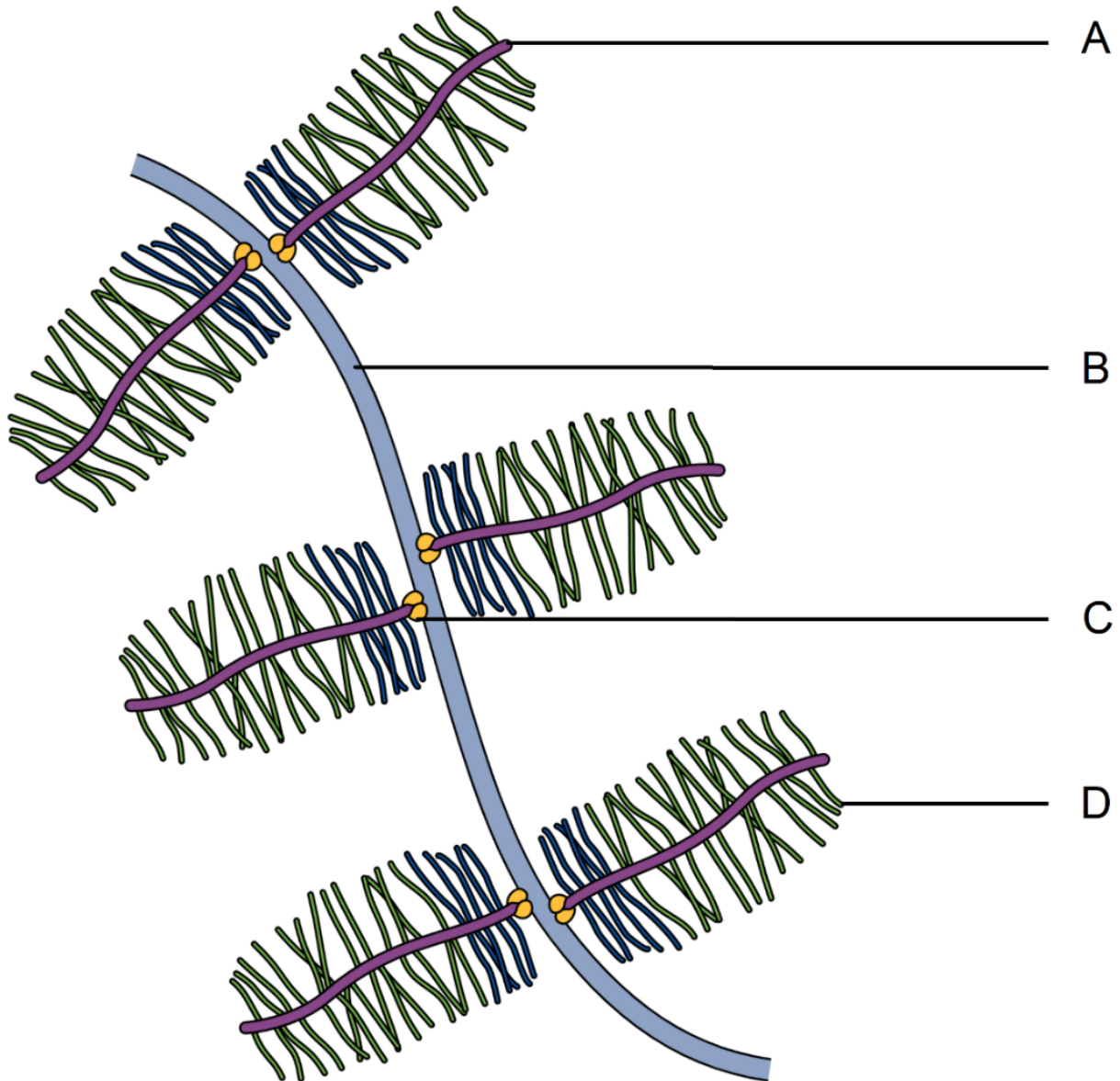
je tak nutné vnímat v kontextu sledovaného fenoménu a s vědomím, že ke změnám vlastností a funkcí KH nedochází skokově po dosažení určitých hodnot molekulární hmotnosti, ale jedná se většinou o změnu pozvolnou. V literatuře bývá hranice, od které je KH považována za vysokomolekulární, obvykle v rozmezí 500-1000 kDa [48, 58, 60-62].



Obrázek 6. Chemická struktura kyseliny hyaluronové. (A) kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin, (B) monomer kyseliny hyaluronové, (C) polymer kyseliny hyaluronové o $(n+1)$ monomerech.

Při fyziologickém pH se z karboxylové skupiny kyseliny glukuronové odštěpuje vodík a každá jednotka KH pak nese negativní náboj. Na tento hyaluronanový polyanion se váží kationty z okolí (např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) a vznikají soli kyseliny hyaluronové. V těle je tak KH přítomna právě v solné formě. KH je v některých tkáních, např. v chrupavce, součástí agregátů s ostatními molekulami extracelulárního prostoru. Pomocí

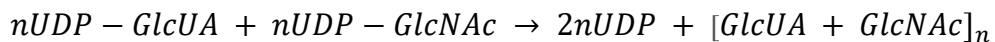
spojovacích proteinů jsou na KH vázány osové proteiny nesoucí glykosaminoglykany, např. chondroitinsulfát či keratansulfát, které společně s proteinem tvoří proteoglykanovou jednotku. Takto organizované makromolekuly pak vyplňují extracelulární prostor (obr. 7).



Obrázek 7. Kyselina hyaluronová a proteoglykany. Osový protein (A), kyselina hyaluronová (B), spojovací protein (C) a glykosaminoglykan (D).

1.3.3 Syntéza a degradace kyseliny hyaluronové

KH je syntetizována jako lineární polymer enzymem hyaluronan syntáza (HAS). HAS je glykosyltransferáza, která zajišťuje polymeraci dvou UDP-cukerných prekurzorů jednotky KH a její funkcí vzniká řetězec střídajících se molekul kyseliny glukuronové a N-acetyl-glukosaminu. Chemický zápis reakce katalyzované HAS je znázorněn v rovnici 1 [63].



Rovnice 1. Zápis reakce katalyzované hyaluronan syntázou.

HAS je membránový enzym. Na rozdíl od syntézy většiny glykosaminoglykanů, které jsou tvořeny v Golgiho aparátu v intracelulárním prostoru, je proces geneze KH lokalizován na buněčné membráně. Výsledný produkt tak vzniká vně od buněčné membrány a je vydáván do extracelulárního prostoru.

Podle struktury HAS jsou rozeznávány dvě HAS skupiny. Skupina HAS I byla popsána v některých virech (např. chloroviry), bakteriích (streptokoky skupiny A a C) a v obratlovcích. Jedná se o vícedoménový integrální transmembránový enzym a syntéza UDP-prekurzorů probíhá na redukujícím či neredukujícím konci vznikajícího řetězce [64]. V lidském těle jsou HAS skupiny I dále členěny do izoform HAS1, HAS2 a HAS3, které se liší v regulaci své funkce a molekulární hmotnosti produkované KH [64]. Skupina HAS II byla identifikována pouze v *Pasteurella multocida*, nepohyblivé, gramnegativní a fakultativně anaerobní bakterii známé jako původce pasteurelóz. Tento periferní (neintegrální) enzym sestává ze 2 domén a syntéza UDP-prekurzorů zde probíhá pouze na neredukujícím konci [65]. Na rozdíl od skupiny HAS I nepotřebuje být skupina HAS II asociována s fosfolipidy membrány, čehož je využíváno v nebakteriální *in vitro* produkci KH (viz kapitola Produkce kyseliny hyaluronové). Molekulární hmotnost KH produkované v lidském těle se různí podle příslušné tkáně, její obvyklé rozmezí je mezi 1000 a 8000 kDa [66].

Degradace KH probíhá dvěma odlišnými mechanismy: specifická degradace za účasti enzymů či nespecifická degradace působením stresu, např. vlivem reaktivních forem kyslíku (anglicky reactive oxygen species, ROS). Enzymy podílející se na degradaci KH jsou souhrnně nazývány hyaluronidázy (HYALs) a patří sem různé enzymy specifické pro bakterie, hmyz, pijavice, korýše nebo obratlovce [67, 68]. Společným

působením specifických a nespecifických procesů je v lidském organismu degradováno denně asi 5 g KH, což představuje 1/3 její celkové váhy v těle 70 kg jedince [67]. V těle člověka rozlišujeme 7 typů HYALs. Jedná se o endoglykosidázy, které štěpí glykosidové vazby a optimální aktivity dosahují v kyselém pH [69]. 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 lysozomů dále degradovány [70, 71].

Syntéza a degradace je za fyziologických podmínek udržována v rovnováze [66]. Tento stav může být ale změněn při porušení integrity tkáně či při tkáňovém stresu vyvolaném volnými radikály, teplotními, mechanickými nebo enzymatickými ataky [72]. Takové podmínky vedou k akceleraci degradace KH, a tedy k zvyšování koncentrace jejích NM frakcí [73].

1.3.4 Produkce kyseliny hyaluronové

K industriální produkci KH jsou využívány 3 procesy: extrakce z tkání, mikrobiální fermentace a *in vitro* nebakteriální produkce využívající izolovaný enzym HAS. Každá metoda má své výhody a limity, které jsou podmíněny množstvím produktu, molekulární hmotností produktu, rozsahem molekulárních hmotností produktu a jeho čistotou.

1.3.4.1 Extrakce z tkání

Izolace z tkání je nejstarší metodou výroby KH. Metoda izolace a purifikace KH ve farmaceutické kvalitě byla poprvé popsána v roce 1979 týmem Endreho Balazse [56]. Zdrojem mohou být téměř všechny tkáně obratlovců, např. hřeben kurů, pupečnicková šňůra, chrupavka, synoviální tekutina, oční sklivec, perikardiální tekutina či rybí oči [74, 75]. V praxi se kvůli dostupnosti, výtěžnosti a vysoké molekulární hmotnosti produktu využívají nejčastěji kuří hřebeny (1,2 MDa), lidské pupečnickové šňůry (3,4 MDa), hovězí oční sklivec (1,7 MDa) a hovězí synoviální tekutina (14 MDa) [76].

Výhodami této metody produkce je dostupnost vstupního materiálu, který bývá jinak považován za odpadní, a velmi vysoká molekulární hmotnost produktu. Nevýhodami jsou pak nízká výtěžnost, riziko kontaminace, složitá purifikace a variabilita molekulární hmotnosti produktu [76]. KH se ve tkáních vyskytuje v nízkých koncentracích, je

většinou vázána v proteoglykanových komplexech a její molekulární hmotnost je variabilní [77]. Chemické postupy využívané k uvolnění a čištění KH, jež jsou nezbytné pro eliminaci rizika kontaminace proteiny, nukleovými kyselinami či viry, dále zvyšují polydisperzitu molekulární hmotnosti produktu [78]. K té pak navíc přispívá i přítomnost v tkáních přirozeně vyskytujících se HYALs. Sumarizováno v tabulce 1. Tento postup výroby je i dnes důležitým zdrojem KH, avšak je stále více nahrazován bakteriální produkcí [65].

1.3.4.2 Bakteriální produkce

Produkce KH bakteriemi byla popsána již v roce 1937, izolace čisté KH na základě fermentace bakteriálních kultur byla popsána v roce 1964 a industriální produkce touto metodou začala být aplikována koncem 70. let 20. století [52, 54, 56]. K dalšímu zvýšení produkce došlo díky genetickým úpravám bakterií, které vedly např. k eliminaci produkce HYALs [79]. Vůbec první využívané bakterie byly rodu *Streptococcus* skupiny A, u kterých dosahovala výtěžnost 60-140 mg KH na litr buněčné suspenze [52]. Díky fermentační metodě a použití mutantního kmene *Streptococcus equi* je dnes možné dosáhnout koncentrace 6-7 g na litr buněčné suspenze [79]. Dalšími užívanými mikroorganismy jsou např. *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus thermophilus*, *Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium sp.* či *Lactococcus lactis*.

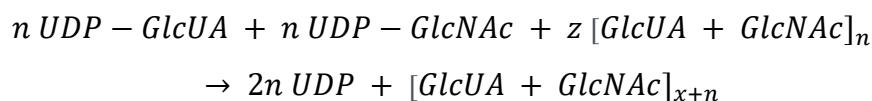
Výhodami této metody je vysoká výtěžnost, vysoká molekulární hmotnost, méně úprav a užší rozhraní polydisperzity molekulové hmotnosti produktu v porovnání s metodou tkáňové extrakce [80]. Molekulární hmotnost bakteriálně produkované KH je možno ovlivnit výrobními podmínkami – obsahem kultivačního média, jeho aerací, mícháním, způsobem fermentace či kontrolou pH a teploty [81-85]. Nevýhodou je riziko kontaminace bakteriálními proteiny či nukleovými kyselinami a u mutantních kmenů je takto vzniklou KH nutno považovat za produkt geneticky modifikovaných organismů [76]. Sumarizace v tabulce 1.

Alternativou k bakteriální kultivaci může být pěstování sladkovodních jednobuněčných řas rodu *Chlorella* infikovaných chlorovirem, výtěžnost je však nižší (0,5-1 g/l) [86, 87].

1.3.4.3 *In vitro* nebakteriální produkce

Tato metoda využívá *in vitro* enzymatickou syntézu KH katalyzovanou HAS. Do reakce se zapojují UDP-cukerné monomery KH, které dávají *de novo* vzniku monomerům KH

nebo se váží na různě dlouhé řetězce KH, jež figurují jako akceptory. Chemický zápis reakce *in vitro* produkce KH katalyzované HAS je znázorněn v rovnici 2.



Rovnice 2. Chemický zápis reakce *in vitro* produkce KH katalyzované HAS.

Integrální enzymy buněčné stěny skupiny HAS I jsou lipid-dependentní a pro *in vitro* produkci méně vhodné [65]. Skupina HAS II izolovaná z *P. multocida* je naopak jako periferní protein k tomuto použití vhodná. Rekombinantní HAS z *P. multocida* (PmHAS) produkovaná *E. coli* je solubilní enzym, který katalyzuje genezi KH o molekulární hmotnosti ~ 1-2 MDa a nízké polydisperzité [63, 88]. Molekulární hmotnost produktu lze kontrolovat přidáním akceptorních polymerů KH, na jejichž koncích dochází k připojování monomerů KH. Stechiometricky kontrolovanou reakcí je pak možno získávat NM KH o molekulární hmotnosti ~ 8 kDa.

Výhodami této metody jsou čistota produktu, který není ohrožen kontaminací bakteriálních nebo živočišných proteinů a nukleových kyselin, konstantní kvalita produktu a možnost kontrolovat jeho molekulární velikost či polydisperzitu. Nevýhodami jsou technická a ekonomická náročnost a potřeba dalšího rozvoje této technologie [76]. Sumarizováno v tabulce 1.

Metoda výroby	Výhody	Nevýhody
Extrakce z tkání	Jednoduchá technologie	Variabilita kvality produktu
	Dostupný a levný substrát	Polydisperzita produktu
	Přírodní produkt	Riziko kontaminace proteiny, NK a viry
	Produkt o velmi vysoké MH (až do 20 MDa)	Nutnost výrazné purifikace Nízký výtěžek
Bakteriální produkce	Vysoký výtěžek	Použití GMO
	Produkt o vysoké MH (1-4 MDa)	Riziko kontaminace bakteriálními endotoxiny, proteiny, NK a těžkými kovy
In vitro nebakteriální produkce	Kontrola MH produktu	Technologie ve vývoji
	Produkt o MH 0,55-2,5 MDa	
	Bez rizika kontaminace	
	Konstantní kvalita produktu	

Tabulka 1. Výhody a nevýhody metod produkce kyseliny hyaluronové. Převzato a upraveno podle Boeriu et al. 2013 [76].

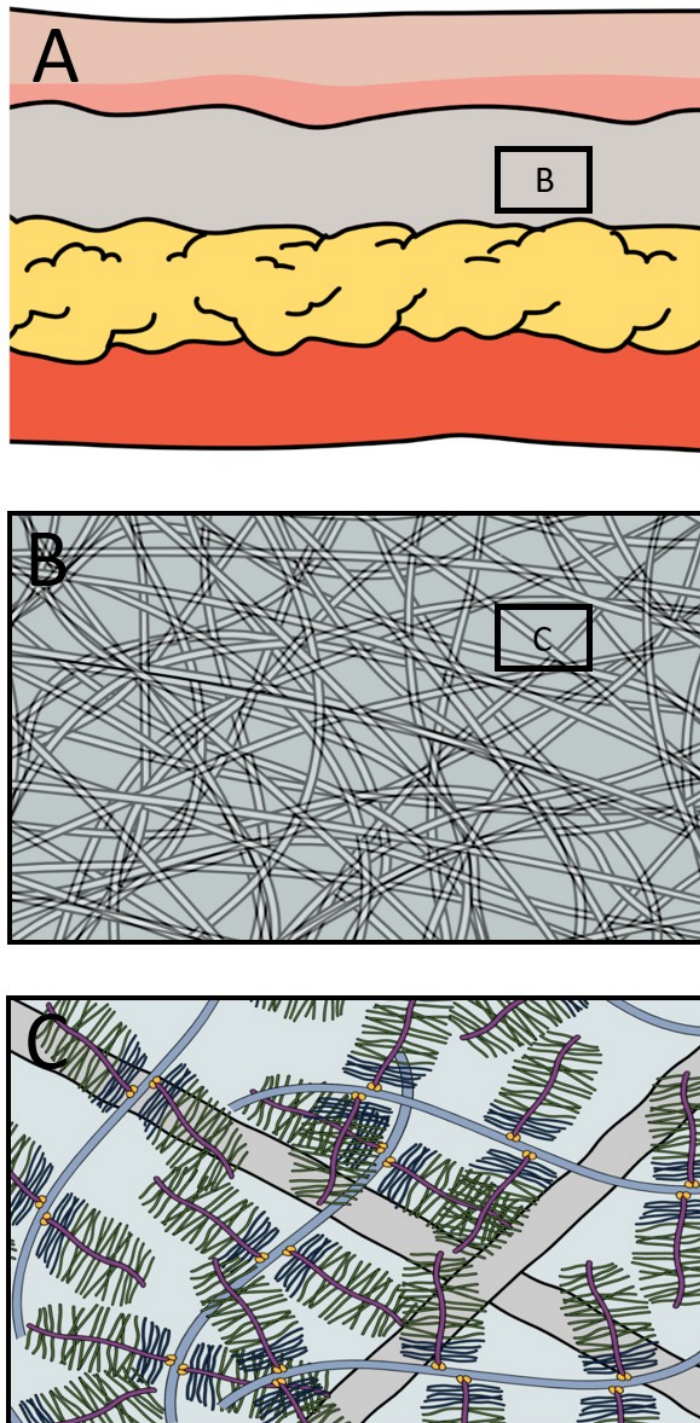
1.3.5 Funkce kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je zastoupena téměř ve všech tkáních obratlovců a dále v pouzdech některých bakterií [89]. Nevyskytuje se naopak v houbách, rostlinách a v hmyzu [89]. V těle dospělého 70 kg člověka je přítomno přibližně 15 g KH, která je soustředěna zejména do pericelulární zóny a extracelulární matrix pojivových tkání [67, 90]. Polovina KH lidského těla je v kůži a dále je hojně zastoupena i v očním sklivci, synoviální tekutině a pupečnickové šňůře. Nejčastěji se KH v těle vyskytuje ve své vysokomolekulární formě a jejími základními funkcemi jsou hydratace, vyplňování mezibuněčného prostoru, lubrikace a vytváření oporné struktury pro buňky a jejich migraci [91].

Hydratační schopnost KH je dána její hygrokopickými vlastnostmi. Díky funkčním hydrofilním skupinám váže KH vodu, která zvyšuje tkáňový turgor, elasticitu a vypjatost [47]. 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. Reologicky se KH chová odlišně v závislosti na její koncentraci v prostředí a na délce jejího řetězce. Od koncentrace 0,1-1 mg/ml dochází k vzájemnému zaplétání molekul KH (angl. entanglement), jehož výsledkem je trojrozměrná flexibilní síť [92]. K zaplétání dochází nejen mezi řetězci, ale i v rámci jednotlivých částí jednoho řetězce. Koncentrace nutná pro zaplétání molekul je udávána jako rozmezí, jelikož se liší v závislosti na molekulární hmotnosti KH. Obecně platí, že čím vyšší je molekulární hmotnost, tím nižší koncentrace je třeba k dosažení vzájemného zaplétání řetězců. Viskozita stoupá spolu s koncentrací a délkou řetězce exponenciálně. Pro příklad: KH s molekulární hmotností 4,3 MDa obsahuje ~ 10 750 repetitivních disacharidových jednotek, její celková délka je ~ 10,75 μm a viskozita přesahuje 100 000 mPas [62, 93]. KH s molekulární hmotností 1,1 MDa obsahuje ~ 2 750 repetitivních disacharidových jednotek, její celková délka je ~ 2,75 μm a viskozita nedosahuje ani 1000 mPas [93]. Jednotlivé části molekuly KH se v tkáních zaplétají samy se sebou a zároveň i s jinými molekulami v okolí. Tyto „propletence“ zvyšují viskozitu prostředí a při koncentracích nad 1 mg/ml mohou vést až k jeho zgelování [92].

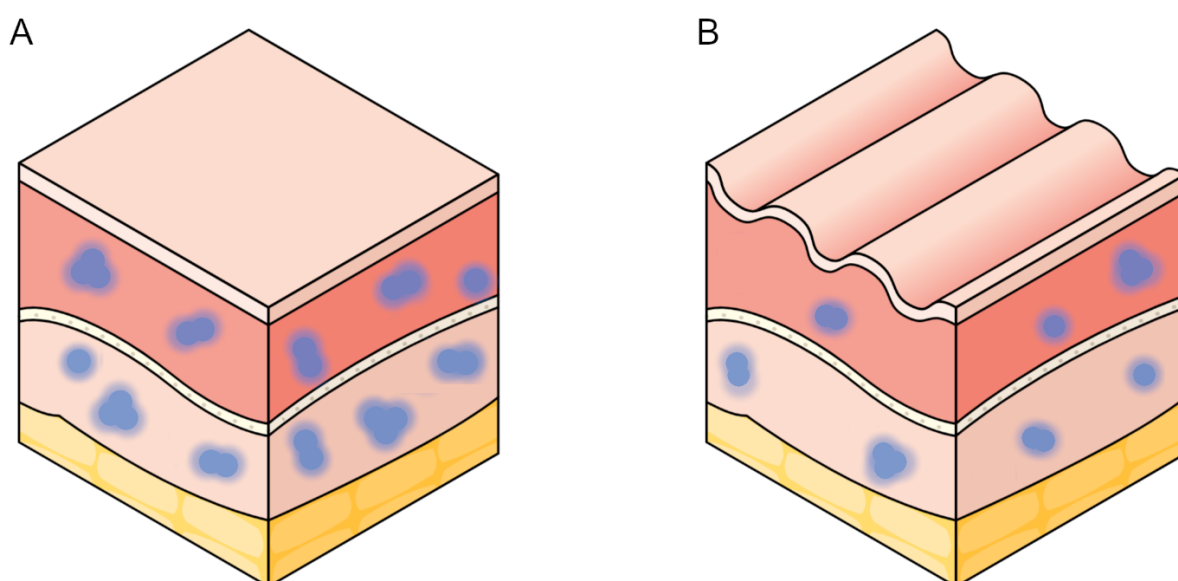
Dlouhé řetězce KH v se mezibuněčném prostoru váží s proteoglykany, které jsou díky KH organizované do štětkovitých útvarů, a spolu s okolní kolagenovou matrix vytváří

vysoce organizovanou síťovou strukturu (obr. 8). Tato síť slouží jako opora pro pohyb buněk a usnadňuje tak jejich migraci [91].



Obrázek 8. Schéma síťové struktury kolagenu, kyseliny hyaluronové a proteoglykanů v extracelulárním prostoru kůže. Průřez kůže a podkoží (A), kolagenová síť v dermis (B), řetězce kyseliny hyaluronové (modře) s proteoglykany v prostředí kolagenové sítě (šedě) (C).

Dále KH společně s vázanou vodou podporuje elasticitu tkání. Při tlaku na tkáň dochází díky polymerním řetězcům a jimi vázané vodě k přenosu tlaků do okolí. Voda je vytlačena do přilehlých tkání a řetězce, které slouží jako výztuha extracelulární matrix, jsou stlačeny blíže k sobě. Poté, co tlak ustane, vnitřní turgor a odpor mezi stlačenými molekulami napomáhá návratu tkáně do původního tvaru [91]. S věkem dochází v tkáních k poklesu obsahu KH, což spolu s dalšími faktory vede k snížení obsahu vody [94]. V kůži tyto procesy vedou ke snížení elasticity a přispívají k jejímu vrásknění (obr. 9) [95].



Obrázek 9. Ilustrativní schéma změny zastoupení kyseliny hyaluronové (modře) v kůži. Kůže bez vrásek s vyšším obsahem kyseliny hyaluronové (A) a kůže s vráskami s nižším obsahem kyseliny hyaluronové (B).

Na podobném principu funguje proudění tekutiny při stlačování chrupavky. Voda, která je v chrupavce vázána, tvoří většinu váhy hydratované chrupavky, a to 65-80 % [96]. Ta je vázána na kolagen, KH a proteoglykany a při tlaku dochází k jejímu vytlačení do okolí. Když tlak přestane působit, je tekutina opět chrupavkou nasávána. Tento mechanismus připodobňovaný k houbě nasávající a vydávající tekutinu dodává chrupavce pružnost a zajišťuje transport živin a metabolitů [97]. V synoviální tekutině KH plní navíc i ochrannou funkci kloubních hlavic před tlakem. Při tlaku na kloubní

aparát dochází k vytlačování a filtrování synoviální tekutiny spolu s drobnými molekulami mimo prostor kloubní dutiny. Velké molekuly, jako je např. VM KH, ale zůstávají a v důsledku snížení obsahu tekutiny dochází k nárůstu jejich koncentrace v tomto prostoru [98]. Výsledkem je zvýšení viskozity synoviální tekutiny a tvorba gelové substance, jež tlumí a rozprostírá tlak mezi k sobě se přibližujícími hlavicemi kloubu [98].

KH hraje také důležitou roli v procesu hojení ran. Při porušení integrity tkáně v ní dochází k výraznému nárůstu koncentrace VM KH, a to jak zvýšením syntézy, tak i přívodem z krevního řečiště [73]. Dlouhé řetězce KH se váží na fibrinogen a pomáhají zahájit vnější systém koagulace [99]. Se zvyšující se denzitou makromolekul KH se zvyšuje i vázaná tekutina v porušené tkáni, což se klinicky manifestuje jako otok [70]. 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 [73, 91, 100]. Během dalších fází hojení rány je KH štěpena a její jednotlivé frakce specificky ovlivňují zánětlivou reakci, vrůstání endotelií, organizování granulační tkáně či reepitelizaci [47, 101-103]. Tkáně s vyšším zastoupením KH, např. u mladších organismů, vykazují rychlejší hojení a nižší produkci jizevnaté tkáně a tento fenomén bývá označován jako fetální bezjizevnaté hojení [104]. Výsledky studií již od 90. let naznačují, že v tomto multifaktoriálně podmíněném fenoménu hraje důležitou roli právě KH [105-107].

VM frakce KH, které jsou obvyklou formou KH ve většině tkání, mají protizánětlivý a protiangiogenní efekt. NM frakce mají naopak prozánětlivý a proangiogenní efekt [108-113]. Rozdílná regulace zánětlivé odpovědi je dána odlišnou vazebností jednotlivých frakcí KH na receptory imunokompetentních buněk, ve kterých NM KH indukuje expresi prozánětlivých cytokinů. Například vazbou NM KH na CD44 makrofágů dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů, tento proces ale není aktivován VM KH [114]. Obdobně bylo prokázáno, že NM KH v monocytech indukuje kaskádu nukleárního faktoru kappa B, ale VM KH tento efekt nemá [115]. Další výzkumy naznačují, že působením NM KH na makrofágy dochází k jejich aktivaci a fenotypovému posunu spojeného s aktivací celé škály prozánětlivých genů, např. NOS2, TNF, IL12B, IGF1 či CD80, zvýšením sekrece oxidu dusnatého a transformujícího růstového faktoru α (TGF- α). VM KH má na makrofágy zcela odlišný

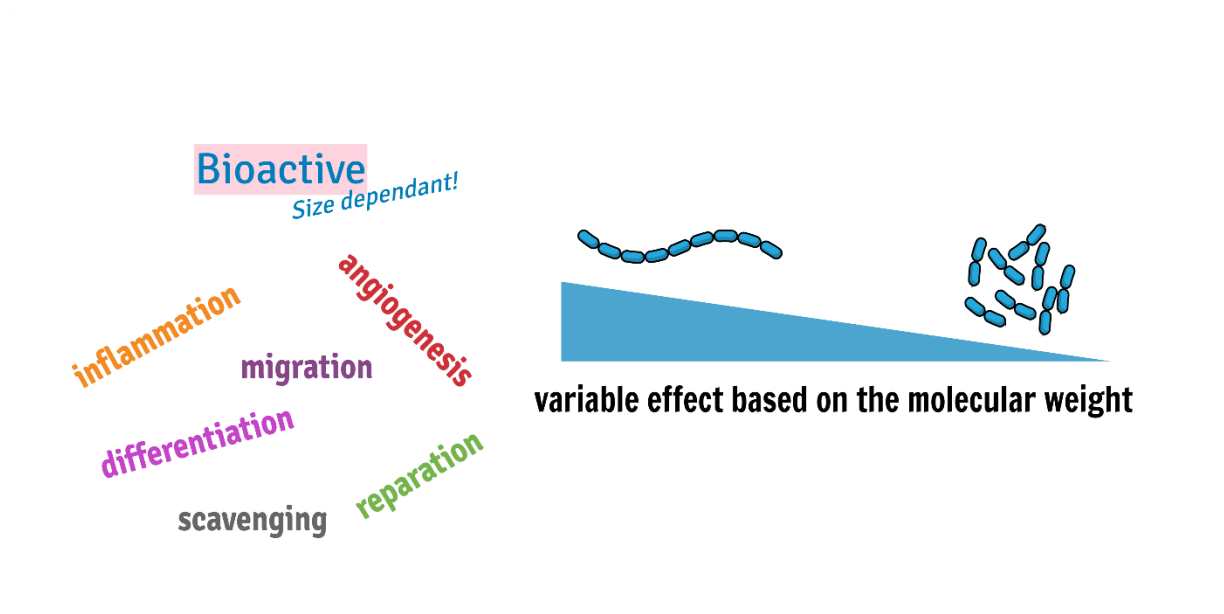
vliv, jelikož vede k aktivaci „pro-resolving“ genů, např. ARG1, IL10, či MRC1, a zvýšené sekreci argininu [116]. Rozdílný vliv má KH v závislosti na molekulární hmotnosti i na fagocytózu. VM KH fagocytózu inhibuje, u NM KH tento efekt pozorován nebyl [117, 118]. V eozinofilech pak NM KH zvyšuje syntézu a sekreci transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), kdežto u VM KH je tento efekt zanedbatelný [119].

Odlišný vliv jednotlivých frakcí KH na angiogenezi byl popsán již v roce 1985, kdy byl prokázán proangiogenní efekt NM fragmentů KH o velikosti 4-25 disacharidových jednotek [120]. Další výzkumy prokázaly, že tento efekt je vyvolán pouze NM HK a VM KH má naopak antiangiogenní efekt [121, 122]. NM fragmenty KH podporují mitogenní aktivitu buněk a zvyšují tak jejich proliferaci [123, 124]. Tento efekt je pravděpodobně výsledkem aktivace CD44 a RHAMM (Receptor for HA-Mediated Motility) receptorů [101, 125].

Odlišný vliv frakcí KH byl pozorován i u adheze, proliferace a diferenciaci různých typů buněk. Někdy je VM KH označována jako antiproliferativní a antiadhezivní a NM KH přisuzují opačné vlastnosti. Vzhledem k tomu, že k těmto fenoménům existuje pouze omezený okruh literatury, je potřeba k jasné kategorizaci vlivu různých molekulárních hmotností KH dalších výzkumů. Zároveň je pravděpodobné, že tyto efekty jsou omezeny pouze na některé typy buněk. U fibroblastům podobných buněk bylo *in vitro* prokázáno, že oligomery KH (NM KH) významně zvyšují jejich adhezi, a naopak VM KH nemá na adhezi těchto buněk vliv [109]. U mezenchymálních KB kostní dřene bylo prokázáno, že NM KH při *in vitro* kultivaci výrazně zvyšuje jejich adhezi a proliferaci v porovnání s VM KH. Ta, oproti NM HK, vedla v těchto buňkách ke zvýšené indukci markerů osteogenní diferenciaci [126]. Osteoblasty v *in vitro* studiích vykazují také rozdílné výsledky – NM frakce KH způsobuje v porovnání s VM frakcí KH snížení adheze a proliferace. VM frakce vede ke zvýšení osteogenní diferenciaci [127].

Vztah KH a reaktivních forem kyslíku (angl. reactive oxygen species, ROS) je také jedním z intenzivně studovaných témat s předpokladem odlišného vlivu různých frakcí KH. VM KH se podílí na regulaci ROS, kdy se přednostně oxiduje a chrání tak okolní tkáň [128]. KH chrání okolní tkáň, neboť vychytává část ROS, ale dochází tak k její degradaci na menší fragmenty s odlišnou funkcí [128]. Tento proces probíhá i za fyziologických podmínek, ale výrazně se akcentuje během zánětu, a dochází tedy i tímto způsobem k akceleraci štěpení KH [129, 130]. V kloubních tkáních tak zánětem indukované ROS mění např. složení synoviální tekutiny a její viskozitu, což může

přispívat k progresi primárního onemocnění. V *in vitro* podmínkách bylo prokázáno, že ochranná funkce před vlivem ROS na epitelální buňky horních cest dýchacích je dominantní u VM KH. Tato funkce klesá spolu s klesající molekulární hmotností a u NM KH je mizivá [131].



Obrázek 10. Grafika ilustrující variabilitu bioaktivních vlastností kyseliny hyaluronové v závislosti na její molekulární hmotnosti. Obrázek převzat z Schmidt et al. 2021 [44].

Při studiu KH je důležité nevnímat její funkce jako obecně platné pro všechny molekulární frakce. V závislosti na délce řetězce se mění jak její fyzikálně chemické vlastnosti, tak zejména ty biologické. Každá frakce KH má v lidském těle svou roli při udržování homeostázy tkání a jejich poměr je fyziologicky regulován. Je proto nevhodné označovat některé fragmenty *a priori* za nežádoucí či škodlivé. Takovými se ale mohou stát ve chvíli, kdy dojde k poruše regulačních mechanismů. Tento pohled na KH potvrzuje i zvyšující se počet vědeckých prací, které naznačují, že narušení regulace syntézy, štěpení a degradace KH úzce souvisí či přispívá k patologickým procesům jako jsou např. rozvoj nádorových onemocnění, jejich progres, metastazování a rezistence k terapii, zánětlivá onemocnění kloubů, plic, jater, cév, ledvin nebo idiopatická zánětlivá onemocnění střev [132-140]. Tento rozsah není s podivem, neboť KH je přítomna ve většině tkání lidského těla. Dřívější pohled na KH jako na pouhý inertní „výplňový materiál“ mezibuněčné hmoty již dnes není platný a KH je vnímána jako biologicky aktivní molekula s širokým spektrem působení [141].

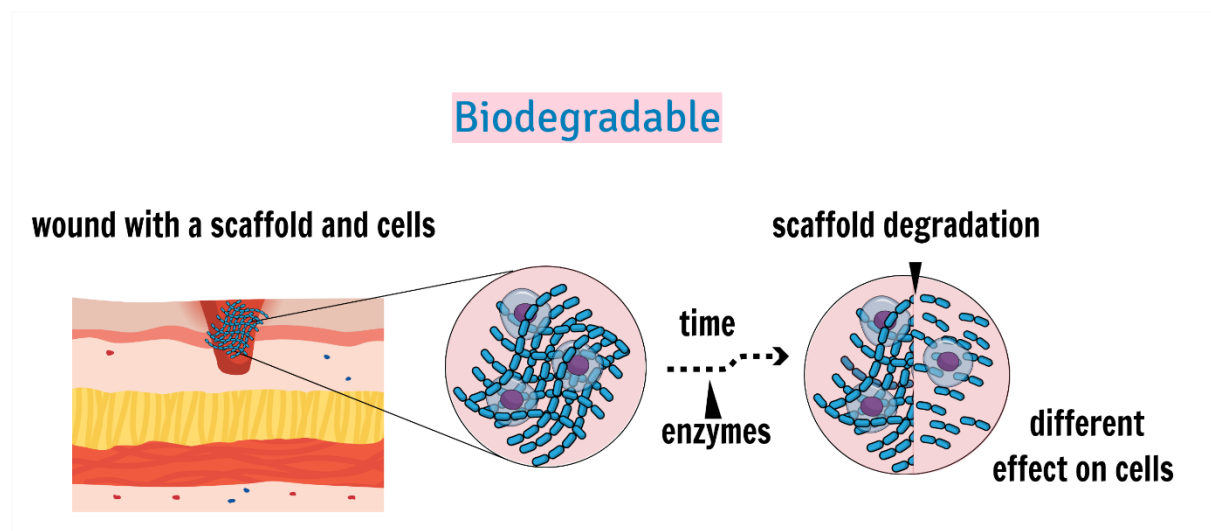
Přesný popis patologických procesů spojených s KH v jednotlivých tkáních však stále není plně objasněn a je předmětem obsáhlého výzkumu napříč obory.

1.3.6 Kyselina hyaluronová a tkáňové inženýrství

KH je pro své vlastnosti intenzivně studována i 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 [47, 142]. 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 [142-145]. 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 [142, 146]. Využití nosičů z KH je široké a je testováno pro buňky z různých tkání – chrupavky, kosti, rohovky, periodontia či zubní dřeně [147-151].

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 [152, 153]. Degradací proces je závislý na proměnných podmínkách místa aplikace a podle toho je nutné nosič upravit [154]. Nosiče z KH mohou být za tímto účelem modifikovány chemickými úpravami jako jsou esterifikace, síťování (crosslinking) či oxidace. Prakticky je však velmi obtížné dosáhnout „kontrolované degradace“, tedy takových kvalit nosičů, aby jejich degradační kinetika byla v rovnováze s resorpcí residuí a růstem novotvořené tkáně [155]. Nadměrná degradace, která není doprovázena adekvátní tvorbou nové tkáně, vede ke ztrátě podpůrných funkcí nosiče a v případě, že tvorba degradačních produktů překonává kapacitu tkáně je odstraňovat, dochází k jejich akumulaci. To může mít zásadní vliv na implantované buňky a na okolní tkáň, zejména pak, pokud jsou degradační produkty biologicky aktivní [156, 157]. 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, a na tkáň, do kterých budou nosiče aplikovány.



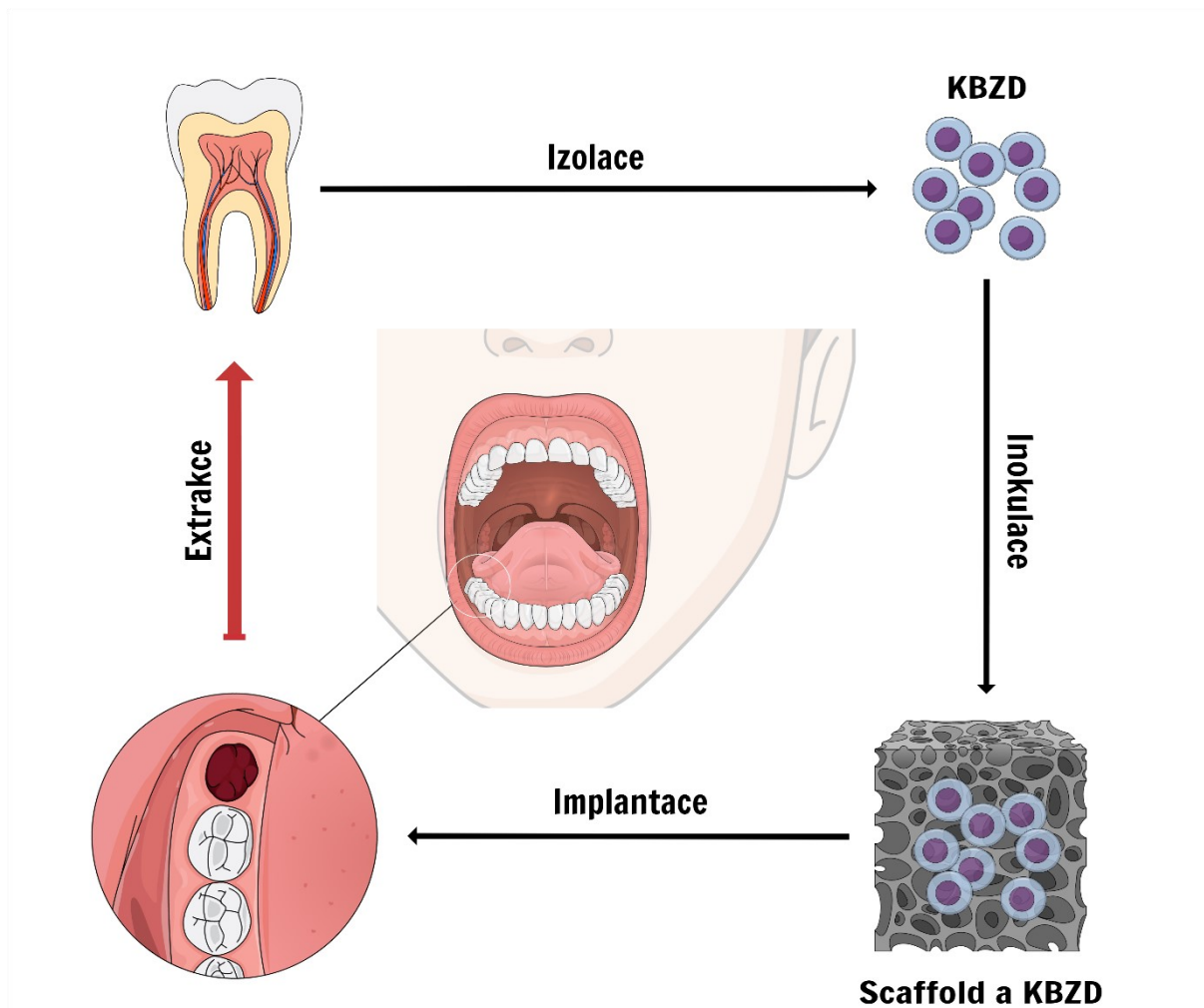
Obrázek 11. Grafika ilustrující biodegradaci nosiče kyseliny hyaluronové v ráně. V čase dochází k enzymatické degradaci kyseliny hyaluronové, která je během tohoto procesu štěpena za vzniku fragmentů s nižší molekulární hmotností o jiných bioaktivních vlastnostech. Obrázek převzat z Schmidt et al. 2021 [44].

K tomu, abychom tyto informace získali, je v první fázi testování možné sledovat vliv degradačních produktů na cílené buňky v *in vitro* podmínkách. U KH je však tento krok spojen s technologickým problémem její kvality a čistoty. K výrobě KH o velmi nízké či žádné polydisperzitě molekulární hmotnosti, tak aby byl produkt o přesně definované molekulární hmotnosti, je technologicky náročný proces. Mnohé výzkumné práce uvádějí molekulární hmotnost pouze orientačně (nízko/oligo/středně/vysokomolekulární KH) či v rozmezí [111]. Následné výsledky mohou být zavadějící, neboť KH s molekulární hmotností < 500 kDa může být formálně označena za NM, ale 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 jinak hrozí riziko kontaminace – u bakteriálně produkované KH např. kontaminace endotoxiny, u KH získávané extrakcí z tkání pak kolagenem, DNA či peptidy [111, 141,

158]. Použití jiné než farmaceuticky čisté KH může vést ke zkreslení či znehodnocení výsledků experimentu [111, 159].

1.3.7 Kyselina hyaluronová a kmenové buňky zubní dřevě

KH je jako součást mezibuněčné hmoty možným materiálem pro tvorbu buněčných nosičů. VM KH se vyskytuje i v zubní dřevě, kde je součástí přirozeného prostředí KBZD, které jsou s ní *in vivo* v kontaktu. Prostor dřevěné dutiny a kanálků zubu, ve kterých je zubní dřevě uložena, je od okolí izolován tvrdými zubními tkáněmi a představuje stabilní nische pro KB. Ty jsou chráněny před diferenciačními stimuly z okolí zubu a udržují si svůj nezralý fenotyp. Zubní dřevě je tak atraktivním alternativním zdrojem mezenchymálních KB. Důležitou výhodou je jejich způsob odběru a snadná izolace. Získání těchto buněk pro potřeby tkáňového inženýrství může navazovat na extrakce zubů, které byly indikovány k vyjmutí z medicínských důvodů, např. nepříznivé uložení zubu, ortodontické důvody aj. Zuby jsou následně likvidovány jako biologický odpad a odběr buněk tak nepředstavuje pro pacienta žádnou další zátěž nad rámec prováděného zákroku [160]. Tyto mezenchymální KB jsou pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu vhodné, neboť mají široký diferenciační potenciál, vysokou proliferační aktivitu a vysokou schopnost sebeobnovy [161]. Jejich schopnost diferencovat v různé buněčné typy, jako jsou např. odontoblasty, osteoblasty, chondroblasty, myoblasty, adipocyty, buňky produkující insulin či endoteliální a neurální buňky, je předurčuje pro aplikaci napříč obory [32, 33, 36]. Grafická demonstrace hypotetického využití nosiče pro KBZD v zubním lékařství vyobrazena v obrázku 12.



Obrázek 12. Schéma hypotetického využití kmenových buněk zubní dřevě a tkáňového inženýrství v klinické aplikaci. Před nebo po extrakci zubu dojde k izolaci kmenových buněk zubní dřevě a inokulaci do nosiče (scaffoldu) z kyseliny hyaluronové. Nosič kolonizovaný buňkami bude následně implantován do rány po extrakci zubu za účelem podpory hojení rány.

Použití KH jako nosiče pro KBZD však vyžaduje znalost vlivu KH na tyto buňky. Vzhledem k bioaktivním vlastnostem KH, které se mění v závislosti na molekulární hmotnosti, je potřeba posoudit, zda dochází jejich působením k ovlivnění KBZD. Tuto analýzu je třeba provést v celém spektru molekulární hmotnosti KH, tedy pro její nativní formy a fragmenty s důrazem na degradační produkty vznikající působením HYALS. Analyzovat lze velké množství ukazatelů, které jsou vybírány podle sledovaného

záměru. Pro základní analýzu vlivu látky na buňky lze použít např. následující parametry:

- viabilita (životaschopnost buněk)
- proliferační aktivita
- exprese fenotypových znaků
- diferenciační potenciál
- telomerázová aktivita

Viabilita, neboli životaschopnost buněk, je důležitým faktorem reflektujícím cytotoxický účinek prostředí a schopnost buněk v takovém prostředí přežít. Požadavkem na materiály nosiče je, aby negativně neovlivňovaly viabilitu buněk. U vlivu materiálu nosiče na proliferaci není nezbytným imperativem tuto vlastnost neovlivňovat, neboť takový vliv může být s výhodou využit k jejímu řízení. Je ale nutné dopad materiálu na proliferaci buněk znát. Dále je důležité sledovat, zda si buňky zachovávají jejich typické povrchové znaky. U KBZD jde zejména o pozitivitu CD29, CD44, CD73 a CD90 a naopak nízkou či žádnou expresi CD31, CD34 a CD45 [12, 14]. Změna v tomto spektru odráží změnu ve fenotypu buněk. Analýza fenotypových znaků může odhalit např. tendenci KBZD diferencovat ve zralejší formy. Vliv nosiče na diferenciaci nesených buněk je nutno vnímat v kontextu použití. V případě urychlení diferenciace kýženým směrem může být diferenciační tlak pozitivní, ale tento efekt může naopak limitovat použití nosiče v případech, kdy je záměrem diferenciace buněk do jiných buněčných typů. Obecně je vhodné, aby byl efekt nosiče na diferenciaci buněk co nejmenší, neměnil diferenciační tlak endogenních vlivů a zejména aby diferenciaci nezamezoval. Schopnost buněk diferencovat ve zralejší buněčné typy je nezbytný předpoklad pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. Proto je důležité ověřit, zda vlivem materiálu nosiče dochází k omezení či změnám této vlastnosti. Telomerázová aktivita reflektuje replikační věk buněk a pokud dochází v prostředí materiálu k jejímu krácení, lze předpokládat vliv prostředí na senescenci a nižší životnost buněk, což bylo potvrzeno i u KBZD [162].

Vzhledem k přirozenému výskytu nativní KH v zubní dřeni lze předpokládat, že samotná přítomnost KH o vysoké molekulární hmotnosti nebude mít na buňky zásadní vliv [46]. K ovlivnění může ale dojít v závislosti na její koncentraci. Takovou hypotézu je nutné ověřit, neboť dostupná literatura neposkytuje na toto téma dostatečné

množství dat. S NM KH se KBZD dostávají fyziologicky do styku velmi omezeně v rámci metabolismu KH. Biodegradace nosičů z KH povede ale ke zvýšení přítomnosti NM KH nad hodnoty obvyklé a je proto nutné zjistit, jaký dopad bude mít tento stav na KBZD.

KH byla v několika studiích označena za materiál netoxický pro KBZD, který negativně neovlivňuje jejich viabilitu, proliferační aktivitu nebo diferenciační potenciál [163-165]. Další autoři popsali některé změny v genové expresi KBZD vlivem KH a velmi omezené množství prací se věnuje vlivu KH na expresi fenotypových znaků [166-170]. 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 KH, 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; tento stav není důsledkem chybné metodiky studií, ale jejich cílené zaměření na testování zvolených materiálů, jichž je KH součástí

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

2 Cíl

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.

3 Materiál a metodika

Izolační protokol a metodika experimentů včetně zpracování biologického materiálu za vědeckým účelem byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (souhlasy č. j. 200612 S01P, 201011 S14P, 201812 S07P). Každý dárce byl před vyjmutím zubu poučen o problematice výzkumu, o využití jím poskytnutých tkání a o obsahu informovaného souhlasu s využitím KBZD pro výzkumné účely. V případě nezletilých dárců byli s tímto seznámeni jak dárce, tak jeho zákonný zástupce. Informovaný souhlas s využitím KBZD pro vědecké účely byl podepsán dárce nebo jeho zákonným zástupcem, pakliže dárce byla nezletilá osoba. V případě kladného souhlasu byla osobní data uschována dle platných zákonů ČR.

3.1 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. KH byla získána z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* a je certifikována jako materiál nezvířecího a geneticky nemodifikovaného původu. Výroba fragmentů KH proběhla formou částečné enzymatické digesce VM KH. Po odstranění enzymů byly získány uniformní fragmenty KH použitím chromatografické izolace a frakcionace (metoda iontově výměnné chromatografie). Farmaceutická čistota a velikost fragmentů byly ověřeny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. KH použita v této práci byla výrobcem deklarována jako rozpustná ve vodných roztocích.

Rozpuštění KH bylo prováděno 2 metodami – aplikací KH do média zahřátého na 37 °C a následné třepání a míchaní do plného rozpuštění, nebo aplikací KH do média o 4 °C a ponecháním při této teplotě po dobu 24 hodin k samovolnému rozpuštění.

3.2 Kritéria výběru dárců kmenových buněk

K experimentům byly použity pouze KBZD získané ze zubů dárců, jejichž věk byl v den izolace < 26 let.

3.3 Kritéria výběru zubů pro zisk kmenových buněk

K experimentům byly použity pouze KBZD získané z vitálních zubů bez postižení zubním kazem a bez přítomnosti předoperační či peroperační komplikované zlomeniny tvrdých zubních tkání.

3.4 Odběr zubů

Vyjmutí zubu bylo provedeno vždy za lokálního znecitlivění injekční aplikací lokálního anestetika a za aseptických podmínek na oddělení dentoalveolární chirurgie Stomatologické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Pro experiment byly použity pouze zuby, u kterých během vyjmutí nedošlo k narušení integrity stěn dřeňové dutiny a kořenových kanálků, neboť u takových stavů je vysoké riziko kontaminace zubní dřeně orální mikroflórou. Pro minimalizaci rizika kontaminace byl povrch vyjmutého zubu mechanicky očištěn za použití sterilní gázy a dále byl zub po 30 sekund dekontaminován ponořením do 0,2% vodného roztoku chlorhexidin glukonátu. Následně byl zub vyjmut z roztoku a ponořen do transportního média, které bylo složeno z aqua pro injectione (Bieffe Medital, Grosotto, Itálie) s 10 % Hankova balancovaného solného roztoku (HBSS; Invitrogen, Waltham, MA, USA), 200 µg/ml gentamicinu (Invitrogen), 200 U/ml penicillinu (Invitrogen), 200 µg/ml streptomycinu (Invitrogen) a 1,25 µg/ml amfotericinu B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). V tomto roztoku a v uzavřené přepravní nádobě byl zub transportován za stálé teploty 4 °C do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (dále jen tkáňová laboratoř). Perioda mezi vyjmutím zubu a izolací zubní dřeně byla < 4 hodiny. Věk a pohlaví dárců a popis zubů, jsou zaznamenány v tabulce 2.

Označení	Pohlaví	Věk	Specifikace zubu
linie p1	muž	25	dolní třetí molár
linie p2	muž	9	horní první premolár
linie 1	žena	14	dolní třetí molár
linie 2	žena	15	dolní třetí molár
linie 3	muž	13	horní druhý premolár
linie 4	žena	18	dolní třetí molár
linie 5	žena	15	dolní třetí molár

Tabulka 2. Linie kmenových buněk zubní dřeně a popis dárců a zubů, ze kterých byly získány.

3.5 Izolace zubní dřeně

Po transportu zubu v transportním médiu do laboratoře tkáňových kultur byl zevní povrch transportní nádoby dezinfikován a všechny následující kroky proběhly za sterilních podmínek v laminárním boxu. Zub byl vyjmut z transportního média a vložen do sterilní Petriho misky, do které byl přidán 1 ml čerstvého transportního média. Izolace zubní dřeně spočívala v jejím vyjmutí z dřevné dutiny a kořenových kanálků. Kvůli morfologickým rozdílům byla tato metoda odlišná v závislosti na stupni vývoje kořene zubu. U zubů s nedokončeným vývojem kořenů bylo možné provést izolaci dřeně přes široce otevřené *foramen apicale*. Za použití sterilní ostré sondy, kterou bylo vstupováno do kořenových kanálků a dřevné dutiny, byla oddělena zubní dřev od tvrdých zubních tkání a následně vyjmuta sterilní mikrochirurgickou pinzetou. Výhodou tohoto postupu byla větší šetrnost a menší riziko mechanického poničení zubní dřeně. Kritériem pro volbu tohoto postupu bylo dostatečně otevřené *foamen apicale*, a to v průměru alespoň 2 mm. Menší průměr tento postup znemožňoval. U zubů, jejichž průměr *foramen apicale* byl < 2 mm, muselo být přistoupeno k izolaci dřeně pomocí separace korunky od kořenů v místě cementosklovinné hranice. K oddělení byly použity Luerovy kleště a místo lomu zpřístupnilo nitro kořenových kanálků a dřevnou dutinu. Následně byla dřev vyjmuta z nitra zubu sterilní ostrou sondou a sterilní mikropinzetou (obr. 13). Nevýhodou tohoto postupu byla omezená kontrola procesu separace korunky od kořenů zubu, protože bylo zapotřebí vyvinout velké síly s rizikem mechanického poničení části zubní dřeně. Získaná tkáň byla ponořena do transportního média v Petriho misce, aby nedocházelo k jejímu vysychání. Bez prodlení bylo přistoupeno k mobilizaci buněk.

3.6 Mobilizace a expanze buněk

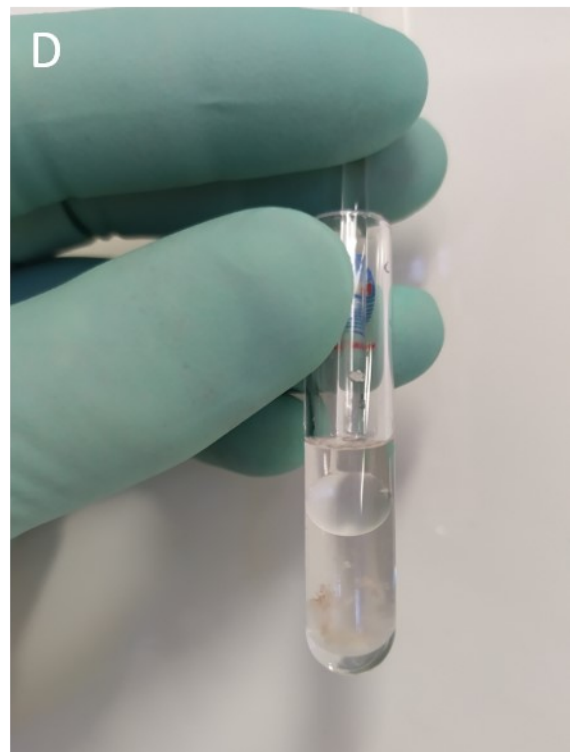
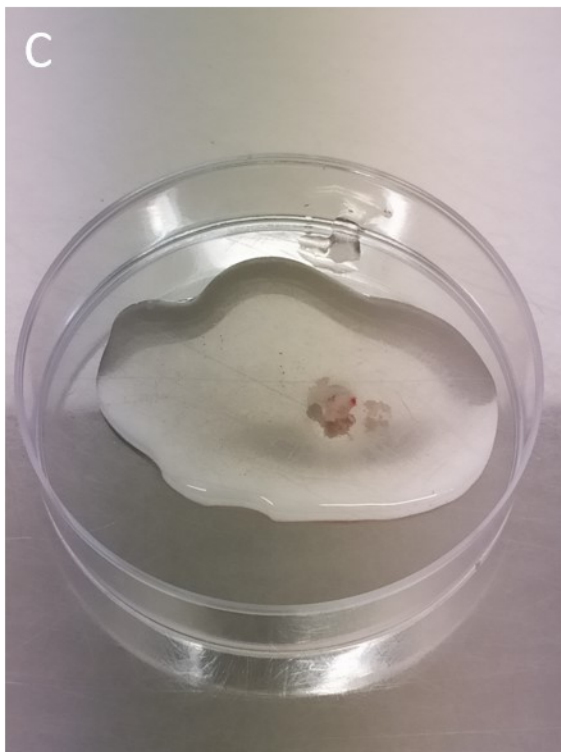
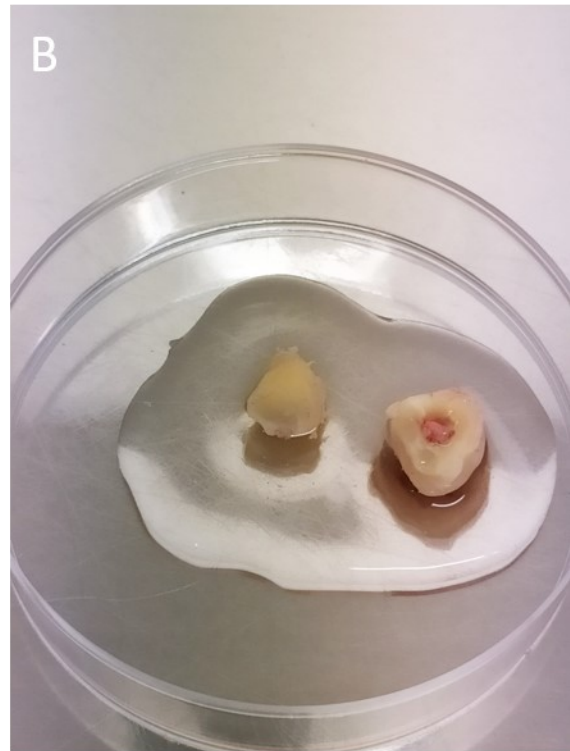
Tkáň zubní dřeně, které byly získány izolací z dřevné dutiny a kořenů zubů, bylo potřeba rozrušit, aby došlo k uvolnění KB z tkáně. Proces je označován jako mobilizace KB. Za tímto účelem bylo provedeno makromechanické, mikromechanické a enzymatické rozrušení tkáně. V prvním kroku byla měkkotkáňová masa rozstříhána sterilními nůžkami na drobné fragmenty o přibližné velikosti 1 mm³. Tyto byly přeneseny do tkáňového minihomogenizátoru (Radnoti, Covina, CA, USA) s obsahem 1 ml izotonického fosfátového pufovačního roztoku (PBS; Invitrogen) (obr. 13).

V něm byla tkáň za mechanického mělnění na principu hmoždíře rozrušena za vzniku homogenizátu. Posledním krokem mobilizace je enzymatické štěpení homogenizátu zubní dřeně, jehož účelem je chemické rozrušení pojivových a podpurných tkání. Homogenizát byl transportován do centrifugační zkumavky a přidán 1 ml 0,05% trypsinu (0,02 mM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), který dále obsahuje i následující aditiva: 0,03 mM dextrózy, 0,34 mM fosforečnanu sodného, 0,35 mM fenolové červeně, 0,44 mM fosforečnanu draselného, 0,48 mM ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), 4,17 mM bikarbonátu sodného, 5,33 mM chloridu draselného, 37,93 mM chloridu sodného. Pro dosažení teplotního optima enzymu byla zkumavka ponořena do termální vodní lázně o teplotě 37 °C, kde byla bez další manipulace ponechána po 10 minut. Ponor zkumavky nedosahoval jejího uzávěru, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Enzymatická fáze mobilizace byla ukončena přidáním 3 ml inaktivačního média, složeného z Eaglova minimálního esenciálního média v α modifikaci (α -MEM, Gibco) a fetálního bovinního séra (FBS, PAA Laboratories, Dartmouth, MA, USA) o koncentraci 20 %. Tímto krokem došlo k inaktivaci trypsinu a získali jsme suspenzi mobilizovaných buněk. Celá centrifugační zkumavka přenesena do centrifugy, kde byly pevné částice odstředěny při 2 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Odsátím tekuté fáze obsahu zkumavky byla získána samotná buněčná peleta. Vzhledem k tomu, že mobilizace probíhala rozrušením celé tkáně zubní dřeně, výsledná peleta neobsahovala pouze KB, ale i jiné buněčné typy a zbytky mezibuněčné hmoty.

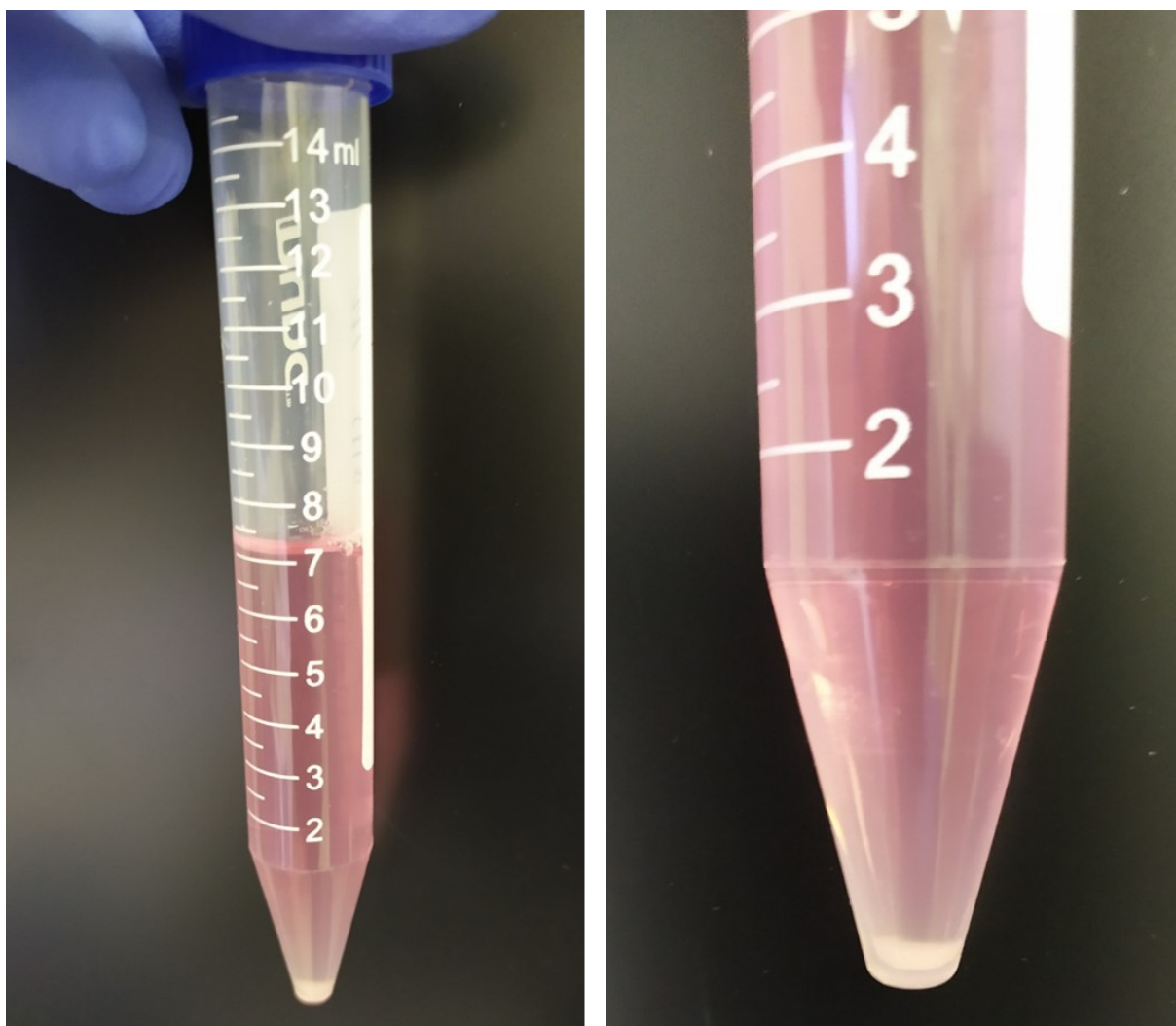
Následně byla peleta obsahující buněčnou směs s extracelulárními hmotami rozsuspendována v 5 ml kultivačního média a toto bylo přepipetováno do sterilní Petriho misky s adherentním povrchem o ploše 22,5 cm² (TPP, Sigma-Aldrich). Kultivačním médiem v rámci celé této práce je označeno médium s následujícím složením: modifikované médium pro postnatální progenitorové mezenchymální buňky (α -MEM) s 1 % Insulin-Transferrin-Sodium-Selenium supplement (ITS; Invitrogen), 2 % 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, „platelet derived growth factor“; PeproTech, London, UK), 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF, „epidermal growth factor“; PeproTech), 10 μ l/ml amfotericinu B, 20 μ g/ml gentamicinu, 100 U/ml penicilinu a 2,5 μ g/ml amphotericinu (Sigma-Aldrich). Kultivační nádoba s rozsuspendovanou buněčnou

peletou v 5 ml kultivačního média byla inkubována za 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Každé 3 dny bylo kultivační médium odsáto, kultivační plocha omyta 2 ml PBS pro odstranění neadherujícího obsahu, tj. zbytky mezibuněčných hmot a jiné buněčné typy než KB, a opět aplikováno 5 ml čerstvého kultivačního média. Tento postup byl opakován do dosažení 70% konfluence. Po jejím dosažení bylo kultivační médium odsáto, kultivační plocha omyta 2 ml PBS a buňky byly enzymaticky mobilizovány 0,05% trypsinem při 37 °C po dobu 7 minut. Výsledkem mobilizace byla buněčná suspenze, tentokrát již pouze těch elementů, které v průběhu expanzivní fáze adherovaly k povrchu nádoby a nebyly odstraněny při průběžném vymývání PBS, tedy buněčná suspenze obsahovala pouze KBZD. Buněčná suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugací při 2 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut byla získána buněčná peleta (obr. 14). Po odsátí supernatantu zbyla v centrifugační zkumavce peleta, ze které byly do nové Petriho misky s adherentním povrchem přeneseny buňky v koncentraci 5 000 buněk/cm² kultivačního povrchu. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako v předchozím kroku a po expanzi KBZD do 70% konfluence byly buňky kryokonzervovány.

Appendix: Výše popsané je platné pro linie 1-5. U linií p1 a p2 byly v protokolu mobilizace použity k chemickému uvolnění buněk z tkáně zubní dřeně místo trypsinu enzymy kolagenáza typ I (3 mg/ml, Sevapharma, ČR) a dispáza (4 mg/ml, Invitrogen, USA) po dobu 50 minut při 37 °C. Při kultivaci těchto linií byly dále použity stejné suplementy ve stejných koncentracích, ale od jiných dodavatelů, a to L-askorbová kyselina (Sigma, USA), glutamin (Gibco, UK), gentamicin (Ginco, UK), penicilin (Gibco, UK), streptomycin (Gibco, UK), dexametazon (Sigma, USA). Rozdíly byly dány úpravou metodiky a změnou dodavatelů materiálu.



Obrázek 13. Izolace a mechanická mobilizace kmenových buněk zubní dřeně ze zubní dřeně extrahovaného zubu. Extrahovaný zub byl vyjmut z transportního média a přenesen do Petriho misky (A). Dřeňová dutina byla zpřístupněna rozlomením zubu pomocí Luerových kleští (B). Zubní dřeň byla z dřeňové dutiny přenesena do Petriho misky, kde byla rozstříhána nůžkami (C) a následně rozmělněna v tkáňovém homogenizátoru (D).



Obrázek 14. Centrifugační zkumavka s buněčnou peletou po centrifugaci. Kmenové buňky zubní dřeně jsou usazeny jako bledě žlutý sediment v hrotu zkumavky.

3.7 Kryokonzervace buněk

Vzhledem k nemožnosti získat linie KBZD od všech dárců ve stejný časový okamžik, bylo nutné buňky uchovat metodou kryokonzervace. Po expanzi byly buňky mobilizovány, centrifugovány a peleta resuspendována v 1 ml kultivačního média. Následně byl spočítán buněčný počet za použití Z2-Counter (Beckman Coulter, Miami, FL) podle postupu určeným výrobcem. Z média s resuspendovanou peletou KBZD bylo odměřeno do kryokonzervační zkumavky takového objemu, který obsahoval $1,5 \times 10^6$ buněk, k němu připipetováno kultivační médium do celkového objemu 1 ml a přidán 1 ml kryokonzervačního média o teplotě 4 °C. Kryokonzervační médium obsahovalo 20 % dimethylsulfoxidu (DMSO) a 80 % FBS. Kryokonzervační zkumavka

s celkovým objemem 2 ml buněčné suspenze byla uzavřena a neprodleně zchlazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 90 minutách uložení v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla zkumavka přesunuta do mrazícího boxu s teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a transportována do kryokonzervačního centra Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (dále jen kryokonzervační centrum), kde byla uskladněna v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V těchto podmínkách byly uchovány všechny buněčné linie až do začátku kultivace v rámci jednotlivých experimentů.

3.8 Rozmrazení buněk

Kryokonzervační zkumavky byly vyjmuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přeneseny v mrazícím boxu o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ z kryokonzervačního centra do tkáňové laboratoře. Zde byly buňky rozmrazeny v termální lázni o $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálé kontroly skupenství obsahu zkumavky. Jakmile došlo k rozmrazení média, byl obsah zkumavky bez prodlení přenesen do centrifugační zkumavky s obsahem 2 ml inaktivačního média. Kryokonzervační zkumavka byla dále vymyta 1 ml PBS a ten přenesen také do centrifugační zkumavky. Centrifugační zkumavka byla následně centrifugována při 2 000 otáčkách za minutu po 5 minut. Po odsání supernatantu zbyla peleta KBZD připravená k nasazení do kultivační nádoby.

3.9 Kultivace buněk

Peleta KBZD získaná po rozmražení buněk byla rozsuspendována v 5 ml kultivačního média a buňky byly kultivovány podle protokolu popsáném výše do dosažení 70% konfluence. Poté byly buňky dle protokolu popsáném výše trypsinizovány, centrifugovány, peleta rozsuspendována v 1 ml kultivačního média a byl určen buněčný počet za použití přístroje Z2-Counter podle postupu určeným výrobcem. Tímto krokem jsme získali suspenzi buněk o známém počtu, která byla připravena k nasazení do kultivačních nádob. Vzhledem k tomu, že prezentovaná data jsou výsledkem dvou experimentů, budou následující kroky popsány pro každý experiment zvlášť.

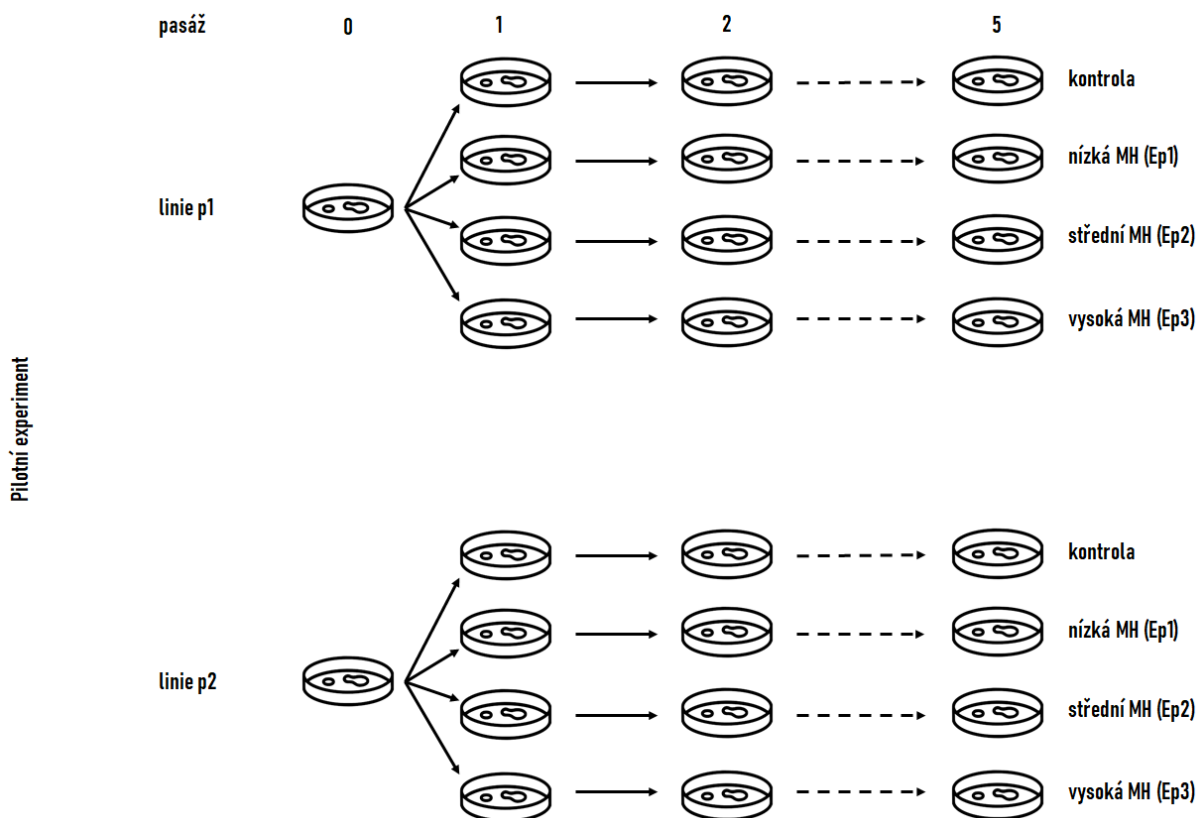
3.9.1 Pilotní experiment

Cílem pilotního experimentu bylo analyzovat vliv KH na KBZD v širokém spektru molekulárních hmotností – od NM po VM. Pro pilotní experiment byly zvoleny linie p1

a p2. Buňky byly nasazeny do experimentálních médií v Petriho miskách s adherentním povrchem v koncentraci 5 000 buněk/cm². 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. KH byla v kultivačním médiu plně rozpuštěna. Pro kontrolní data byla zvolena kultivace buněk ve standardním kultivačním médiu bez přidavku KH (kontrola). Všechny buňky byly kultivovány za stejných kontrolovaných podmínek popsanych výše 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. Grafický záznam kultivačního schématu je pro ilustraci vyobrazen v obr. 10.

3.9.2 Experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou

Cílem tohoto experimentu bylo analyzovat vliv NM KH na KBZD v přesně definovaných molekulárních hmotnostech, které odpovídají fragmentům vznikajícím působením HYALs. Pro tento experiment byly zvoleny linie 1-5. Buňky byly nasazeny do experimentálních médií v Petriho miskách s adherentním povrchem v koncentraci 5 000 buněk/cm². 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. KH byla v kultivačním médiu plně rozpuštěna. Pro kontrolní data byla zvolena kultivace buněk ve standardním kultivačním médiu bez přidavku KH (kontrola). Všechny buňky byly kultivovány za stejných kontrolovaných podmínek popsanych výše 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.



Obrázek 15. Schéma kultivace linií p1 a p2 v rámci pilotního experimentu. MH je zkratkou pro molekulární hmotnost

3.10 Charakterizace buněk

Buněčný počet a průměr mobilizovaných buněk byly spočítány přístrojem Z2-Counter v každé pasáži. Proliferační aktivita byla v každé pasáži vyjádřena jako populační zdvojení. K výpočtu populačního zdvojení byla použita rovnice 3.

$$PZ = \log_2(Nx/N1)$$

Rovnice 3. Výpočet populačního zdvojení (PZ). Nx reprezentuje celkový počet buněk na konci pasáže, N1 reprezentuje iniciální počet buněk, které byly nasazeny v pasáži do kultivační nádoby

Na konci kultivace byla stanovena viabilita buněk použitím přístroje Vi-Cell analyzer (Beckman Coulter) využívajícím kolorimetrickou metodou průniku trypanové modře skrz buněčnou membránu nevitálních buněk. Postup probíhal podle protokolu dodavatele. Proliferační aktivita byla měřena v každé pasáži pro všechny linie ve všech

kultivačních médiích. Pro fenotypovou analýzu povrchových znaků buněk metodou průtokové cytometrie byl použit přístroj Cell Lab Quanta (Beckman Coulter). Za účelem analýzy povrchových znaků byly buňky uvolněny od adherentního povrchu kultivační nádoby 0,05 % trypsinem a označeny imunofluorescenčními polyvalentními protilátkami proti povrchovým CD znakům. Tyto protilátky byly konjugovány s fykoerytrinem (PE) a fluorescein izothiokyanátem (FITC). Pro pilotní experiment byly použity tyto protilátky: CD29 (BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgie), CD34 (Dako, Glostrup, Dánsko), CD44 (BD Biosciences Pharmingen), CD45 (Dako), CD71 (Dako), CD90 (BD Biosciences Pharmingen), HLA I (Dako), HLA II (Dako). Pro experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou byly použity tyto protilátky: CD29 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD31 (Invitrogen), CD34 (Invitrogen), CD44 (Invitrogen), CD45 (Invitrogen), CD49f (Invitrogen), CD73 (BD Biosciences), CD90 (Beckman Coulter), CD105 (Invitrogen), CD106 (BioLegend), CD117 (Chemicon, Tokyo, Japan), CD133 (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD146 (Beckman Coulter), CD166 (Beckman Coulter), CD271 (BioLegend). Všechny analýzy byly provedeny podle protokolu dodavatele.

3.11 Analýza relativní délky telomer buněk

Analýza relativní délky telomer byla provedena v 5. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Buněčná masa, tj. suchá peleta, pro analýzu byla získána následujícím způsobem. Buňky v kultivační nádobě byly po dosažení 90% konfluency omyty 2 ml PBS, které bylo následně odsáto. Dále bylo aplikováno 5 ml PBS, buňky odděleny od adherentního povrchu kultivační nádoby buněčnou škrabkou a přeneseny v PBS do centrifugační zkumavky. V té byly centrifugovány při 2 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Po odsání supernatantu byla peleta přesunuta v 1 ml PBS do zmrazovací zkumavky a ta centrifugována při 2 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Po odsání supernatantu byla zkumavka se suchou buněčnou peletou neprodyšně uzavřena a plně ponořena do tekutého dusíku po dobu 5 minut. Následně byla vyjmuta, přesunuta do mrazícího boxu s teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a transportována do kryokonzervačního centra, kde byla uskladněna v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.11.1 Izolace DNA

Před izolací DNA byly zkumavky se suchými peletami vyjmuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechány při pokojové teplotě k pozvolnému rozmrazení. Suchá peleta byla následně resuspendována v 200 μl PBS, do kterého bylo přidáno 20 μl proteinázy K (Qiagen, Hilden, SRN) a 200 μl AL pufru (Qiagen), který obsahoval iontové a pufrovací soli k udržování optimální osmolarity a pH. Obsah zkumavky byl promíchán třepačkou a poté bylo přidáno 200 μl absolutního ethanolu. Po opětovném promíchání byl obsah zkumavky přenesen do DNeasy mini spin zkumavek (Qiagen), které byly zasazeny do sběrných zkumavek (Qiagen). Celá aparatura byla centrifugována při 8 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty. Po odsání tekutiny bylo přidáno 500 μl AW1 pufru (Qiagen) a směs centrifugována při 8 000 otáčkách po dobu 1 minuty. Po odsání tekutiny bylo přidáno 500 μl AW2 pufru (Qiagen) a směs centrifugována při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut. Po odsání tekutiny bylo na sběrnou membránu aplikováno 200 μl AE pufru (Qiagen). Tímto krokem došlo k uvolnění DNA skrz membránu, proces probíhal za laboratorních podmínek po dobu 1,5 minuty. Výtěžek byl získán centrifugací při 8 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty. Koncentrace a kvalita výtěžku byla spektrofotometricky analyzována přístrojem Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.11.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Pro provedení Kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) byla zvolena 96 jamková deska. Nálož jamky v celkovém objemu 20 μl obsahovala 20 ng DNA, 200 nM dopředného primeru telomery tel1b, 200 nM reverzního primeru telomery tel2b (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a 1x SYBR Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Jako single copy gen (referenční, housekeeping gen) byl zvolen 36B4 (Generi Biotech) kódující kyselý ribozomální fosfoprotein P0. Sekvence primerů je uvedena v tabulce 3. Každý vzorek byl naložen v technické triplikaci pro eliminaci vlivu chybné nálože. Kvantitativní standardy DNA byly odvozeny ze sériových ředění referenčního vzorku DNA při konečných koncentracích 0,02, 0,2 a 2,0 ng/l. Termocyklizace byla provedena v přístroji ABI 7500 HT Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Zvoleno bylo následující cyklizační schéma: 10 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 cyklů při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 sekund a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty. Kontrola amplifikace byla provedena na disociační

křivce. Grafický výstup byl zpracován programem ABI Prism 7500 SDS. Analýza relativní délky telomer byla počítána modifikací Cawthonovy metody dle rovnice 4 [171].

$$\frac{T}{S} = 2^{-\Delta Ct}$$

Rovnice 4. Výpočet relativní telomerové délky. *T* reprezentuje množství telomerové DNA, *S* reprezentuje množství DNA single copy genu (v našem případě 36B4), ΔCt je vypočítáno jako $Ct_{telomera} - Ct_{single\ copy\ gen}$.

Označení primeru	sekvence
tel1b(For)	5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3'
tel2b(Rev)	5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3'
36B4u(For)	5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3'
36B4d(Rev)	5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'

Tabulka 3. Označení a sekvence primerů.

3.12 Diferenciace buněk

Schopnost KBZD diferencovat ve zralé buněčné typy i po kultivaci v prostředí KH byla verifikována na osteogenním a chondrogenním směru (diferenciace v buňky produkující kostní a chrupavčitou matrix). Diferenciace byla provedena za použití komerčních diferenciačních sad a postupováno bylo dle instrukcí dodavatele.

Pro průkaz chondrogenní diferenciace KBZD linie p1 a p2 v rámci pilotního experimentu byly buňky kontrolní i experimentálních skupin v závěru experimentu nechány narůst do 100% konfluence a kultivovány v médiu o tomto složení: alfa-MEM (Gibco, UK), dexametazon 0,02 % (Sigma, USA), kyselina askorbová 1 % (Sigma, USA), penicilin/streptomycin 1,2 % (Gibco, UK), glutamin 1,9 % (Gibco, UK), 50 ng/ml TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Experimentální média byla obohacena o KH ve stejném poměru jako bylo popsáno výše. Takto byly buňky kultivovány po 21 dní, médium bylo měněno každé 3 dny. Následně byly buňky a jimi vyprodukovaná extracelulární matrix fixovány 4% formaldehydem, odděleny od adherentního povrchu kultivační nádoby buněčnou škrabkou a filtrovány přes filtrační

papír. Pro maximální výtěžnost byl tento krok byl opakován po přidání 5 ml PBS do kultivační nádoby. Vytěžený materiál byl vložen do kapsle a zpracován v odvodňovacím tkáňovém automatu (autotechnikon; Leica, Wetzlar, SRN). V tomto přístroji byl materiál odvodněn ethanolem, acetonem a xylolem. Po dokončení odvodňovacího procesu byl materiál oddělen od filtračního papíru a zalit do bloku parafínu. Po osazení do mikrotomu byl blok krájen na řezy o tloušťce 7 μm . K demonstraci kyselých mukopolysacharidů, které se vyskytují v chondrogenní matrix, bylo použito barvení alcianovou modří pro histologické vyšetření.

Pro průkaz osteogenní diferenciací KBZD linie p1 a p2 v rámci pilotního experimentu byly buňky kontrolní i experimentálních skupin v závěru experimentu nechány narůst do 100% konfluencí a kultivovány v médiu o tomto složení: alfa-MEM (Gibco, UK), FBS 19 % (PAA, USA), kyselina askorbová 1 % (Sigma, USA), beta glycerolfosfát 2 % (Sigma, USA), glutamin 1,9 % (Gibco, UK), penicilin/ streptomycin 1,2 % (Gibco, UK), dexametazon 37 $\mu\text{l/l}$ (Sigma, USA). Experimentální média byla obohacena o KH ve stejném poměru jako bylo popsáno výše. Takto byly buňky kultivovány po 21 dní, médium bylo měněno každí 3 dny. Následně byly buňky a jimi vyprodukovaná extracelulární matrix fixovány 4% formaldehydem, odděleny od adherentního povrchu kultivační nádoby buněčnou škrabkou a filtrovány přes filtrační papír. Pro maximální výtěžnost byl tento krok byl opakován po přidání 5 ml PBS do kultivační nádoby. Vytěžený materiál byl vložen do kapsle a zpracován v odvodňovacím tkáňovém automatu (autotechnikon; Leica, Wetzlar, SRN). V tomto přístroji byl materiál odvodněn ethanolem, acetonem a xylolem. Po dokončení odvodňovacího procesu byl materiál oddělen od filtračního papíru a zalit do bloku parafínu. Po osazení do mikrotomu byl blok krájen na řezy o tloušťce 7 μm . K demonstraci přítomnosti osteogenní matrix a kalciových depozit bylo použito barvení alizarinovou červení pro histologické vyšetření.

3.13 Statistická analýza dat

Pro statistickou analýzu neparametricky distribuovaných dat byl zvolen Friedmanův test a Dunnův post hoc test. Pro parametricky distribuovaná data byla zvolena jednofaktorová ANOVA a Fisherův LSD post hoc test. Pro určení sféricity dat byl proveden Mauchlyho test. Statistická významnost byla stanovena jako $p < 0,05$ a označena následovně: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$. Pro statistické výpočty

byly použity programy GraphPad Prism (verze 8.0.0 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a IBM SPSS Statistics (IBM Corp, Released 2017. verze 25.0 pro Windows, Armonk, NY, USA).

4 Výsledky

Projekt studující vliv KH na KBZD byl rozdělen do několika etap a experimentů, z nichž každý je zaměřen na jiné molekulární hmotnosti KH. Jedná se o dlouhodobý projekt, jehož další etapy při psaní této práce stále probíhají. Jako první byl proveden pilotní experiment, kterým byl sledován vliv KH v širokém rozmezí molekulárních hmotností. Další experimenty byly zaměřeny cíleně na specifické rozmezí KH - nízká, střední a vysoká molekulární hmotnost. V této práci budou představeny a diskutovány výsledky pilotního experimentu a experimentu s NM KH. Data experimentů ve zbytku spektra molekulárních hmotností není možno nyní publikovat buď ze smluvních důvodů nebo z důvodu stále probíhajícího výzkumu.

4.1 Pilotní experiment

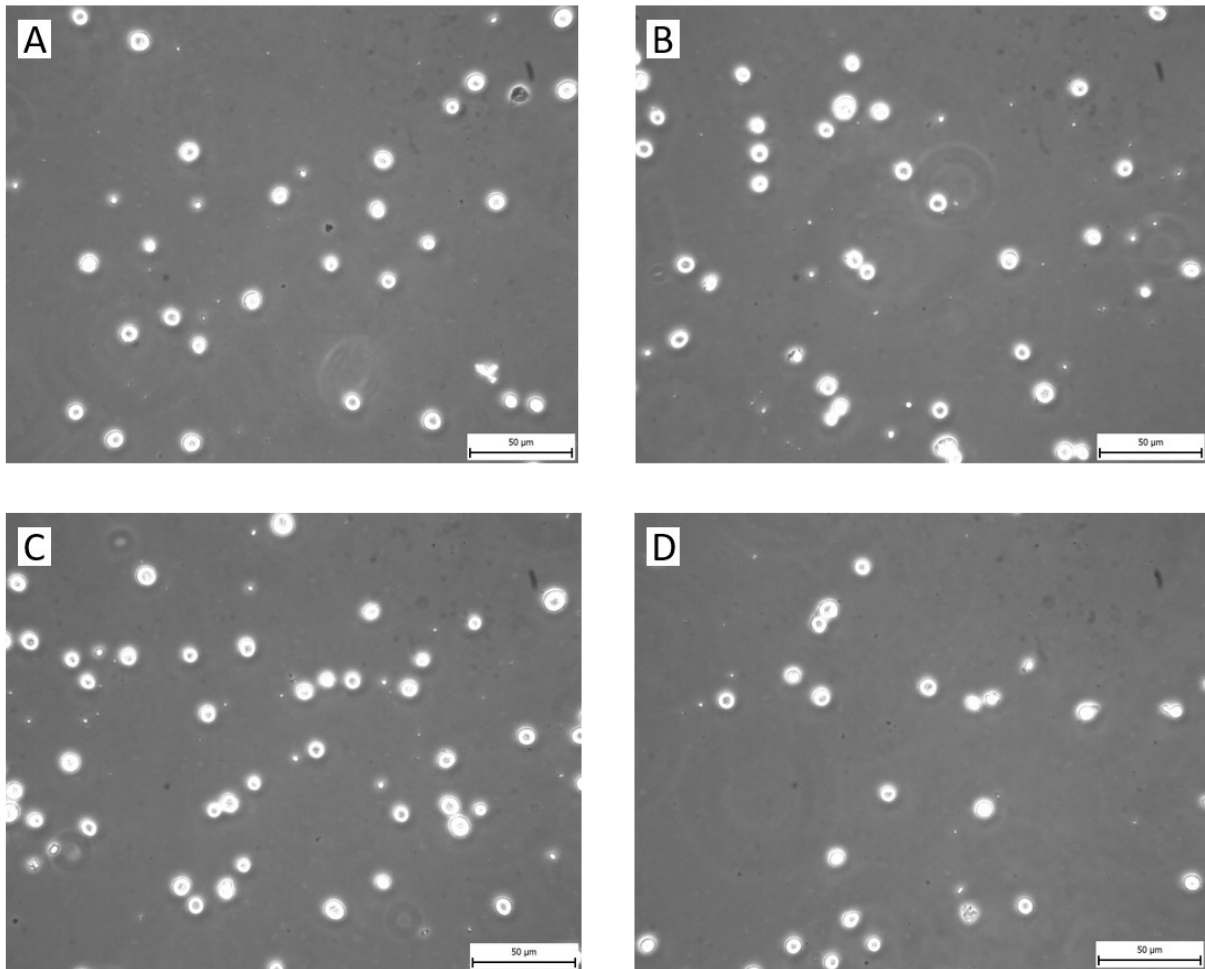
4.1.1 Izolace KBZD

Úspěšně jsme pro pilotní experiment izolovali 2 linie KBZD. Linie byly pro potřeby experimentu označeny jako linie p1 a linie p2. Linie p1 byla získána ze semiretinovaného dolního třetího moláru s dokončeným vývojem kořenů, dárce byl muž ve věku 25 let, který byl celkově zdravý a neužíval žádné léky. Linie p2 byla získána z retinovaného horního prvního premoláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byl muž ve věku 9 let, který byl celkově zdravý a neužíval žádné léky.

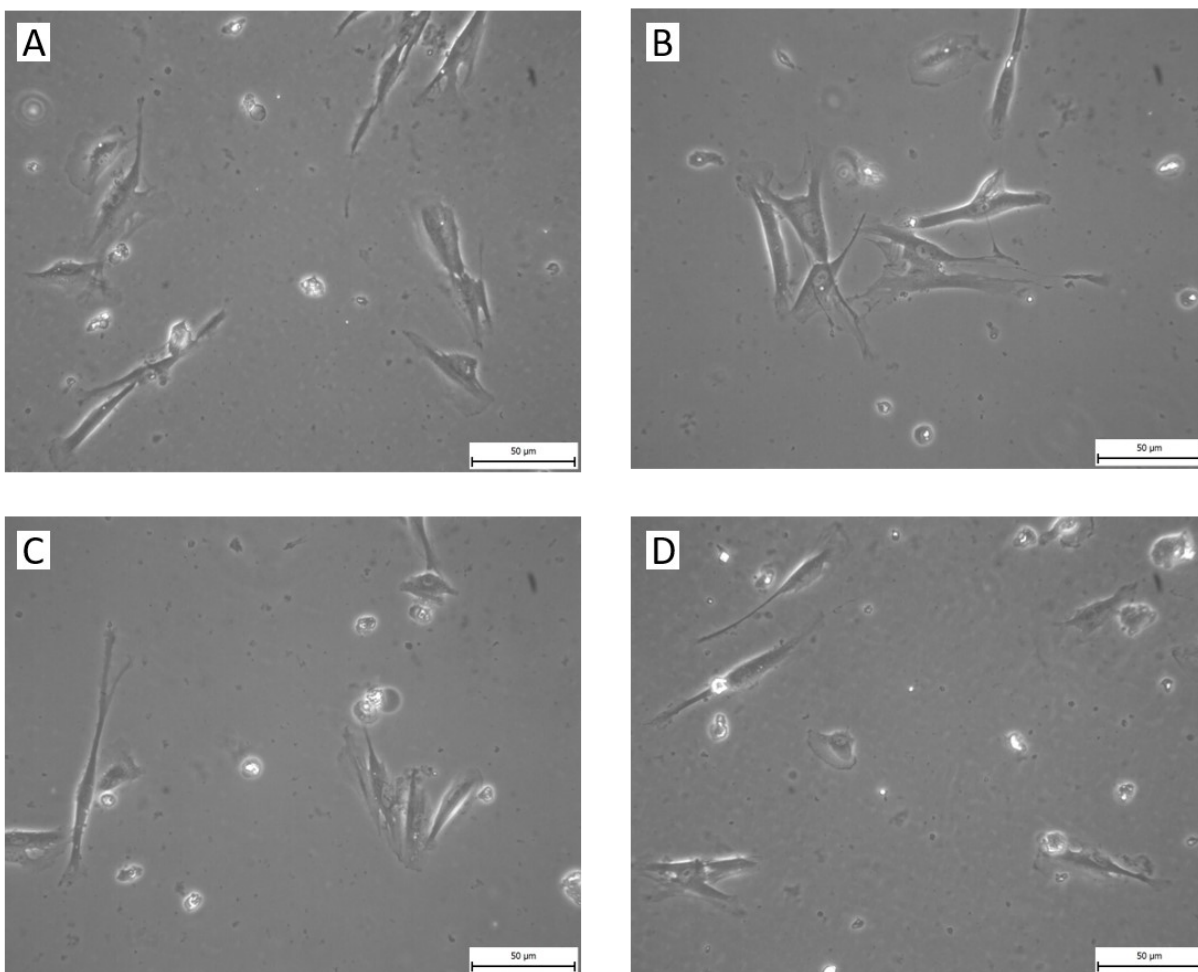
4.1.2 Kultivace KBZD

Linie p1 a p2 byly po rozmrazení nasazeny v rámci pasáže 0 do kontrolního kultivačního média, expandovány a následně po dosažení 70% konfluence pasážovány do médií kontrola / Ep1 / Ep2 / Ep3 v rámci pasáže 1. Pod mikroskopem s fázovým kontrastem byly po nasazení pozorovány buňky, které plavaly v médiu a měly kulovitý tvar (obr. 16). Tyto buňky začaly v následujících hodinách přisedat k adherentnímu povrchu kultivační nádoby a nabývaly vřetenovitého tvaru (obr. 17). Nebyly pozorovány rozdíly v adhezenci mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích. Za 48 hodin byly pozorovatelné kolonie o 3-10 buňkách, které se vzájemně dotýkaly svými výběžky (obr. 18). Nebyly pozorovány rozdíly ve shlukování mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích.

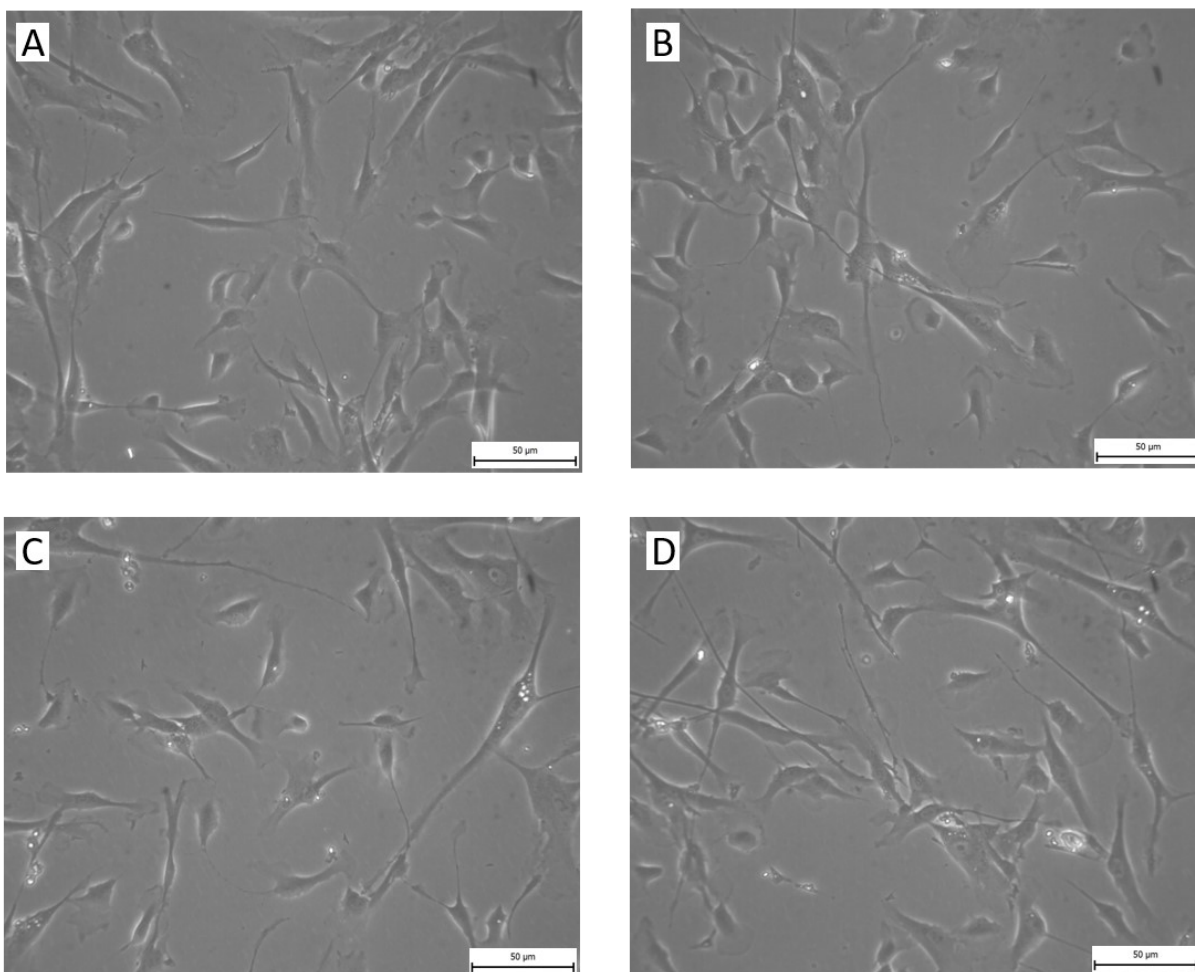
Kultivační média byla měněna každé 3 dny a v rámci tohoto procesu byla adherentní plocha kultivační nádoby oplachována PBS. Po oplachu nebyla mikroskopicky pozorována změna adheze mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích. Buňky byly takto kultivovány po 5 pasáží, během kterých pozorování pod mikroskopem neodhalilo rozdíly v adhezenci či shlukování buněk.



Obrázek 16. Kmenové buňky zubní dřeně mobilizované a volně plovoucí v kultivačním médiu okamžitě po pasáži - linie p1 ve 4. pasáži pilotního experimentu. Fotografie zobrazují v reprezentativním poli buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích Ep1 (B), Ep2 (C) a Ep3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem



Obrázek 17. Kmenové buňky zubní dřeně v kultivačním médiu přisedající k adherentnímu povrchu kultivační nádoby 12 hodin po pasáži - linie p1 v 4. pasáži pilotního experimentu. Fotografie zobrazují v reprezentativním poli buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích Ep1 (B), Ep2 (C) a Ep3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem.



Obrázek 18. Kmenové buňky zubní dřeně v kultivačním médiu přisedlé k adherentnímu povrchu kultivační nádoby 72 hodin po pasáži - linie p1 v 4. pasáži pilotního experimentu. Fotografie zobrazují v reprezentativním poli buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích Ep1 (B), Ep2 (C) a Ep3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

4.1.3 Proliferační aktivita

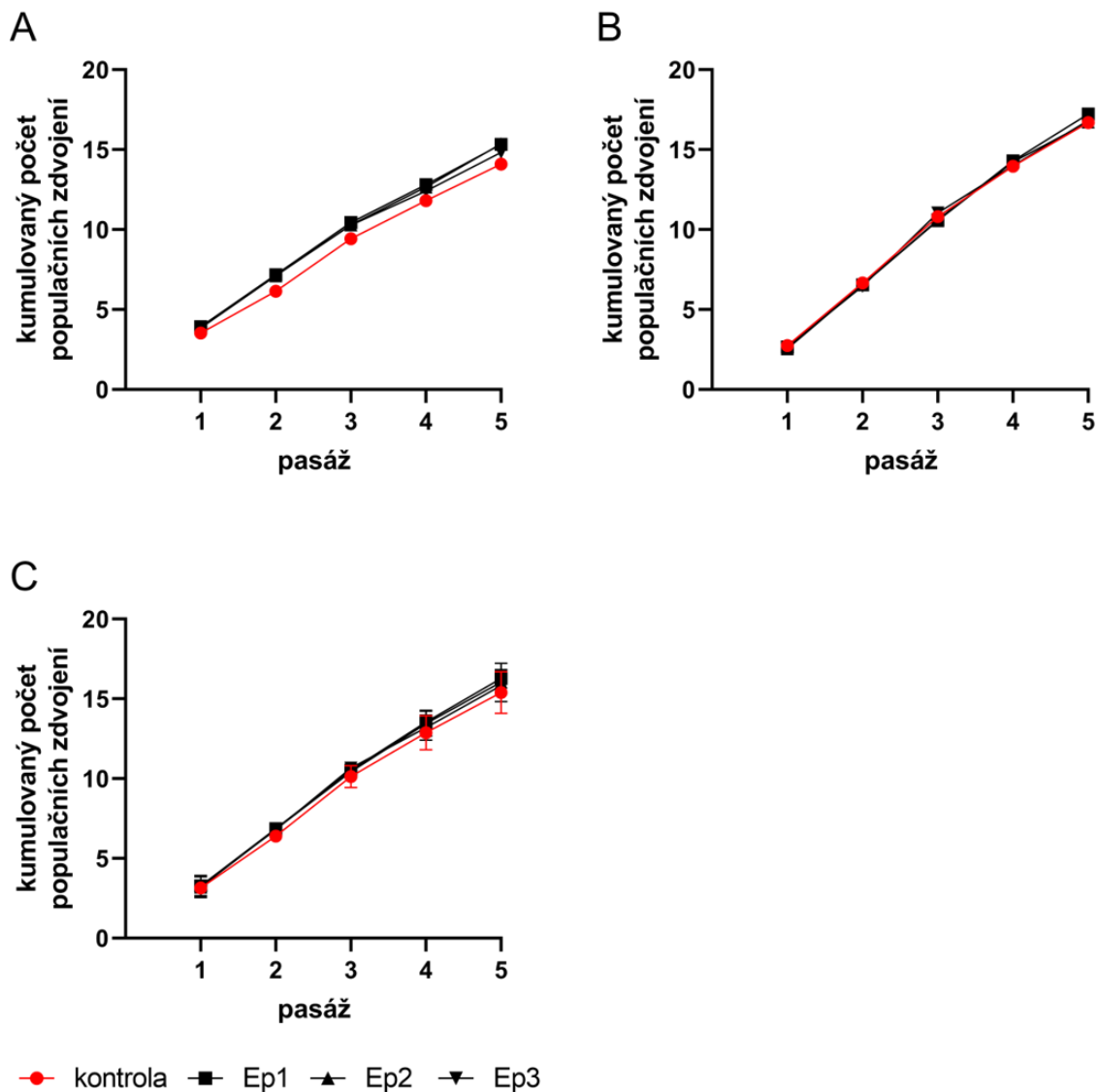
Proliferační linie p1 a p2 byla sledována od 1. do 5. pasáže ve všech kultivačních médiích. Kumulovaný počet populačních zdvojení kontroly byl u obou linií nižší v porovnání s experimentálními skupinami. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení v 5. pasáži pro linii p1 kultivovanou v kontrola / 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, ale mezi kontrolní skupinou a skupinou Ep1 bylo dosaženo velmi hraničního výsledku ($p = 0,0528$, Friedmanův test, Dunnův post hoc test). Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení každé pasáže linií p1 a p2 jsou vyobrazeny v grafu 1.

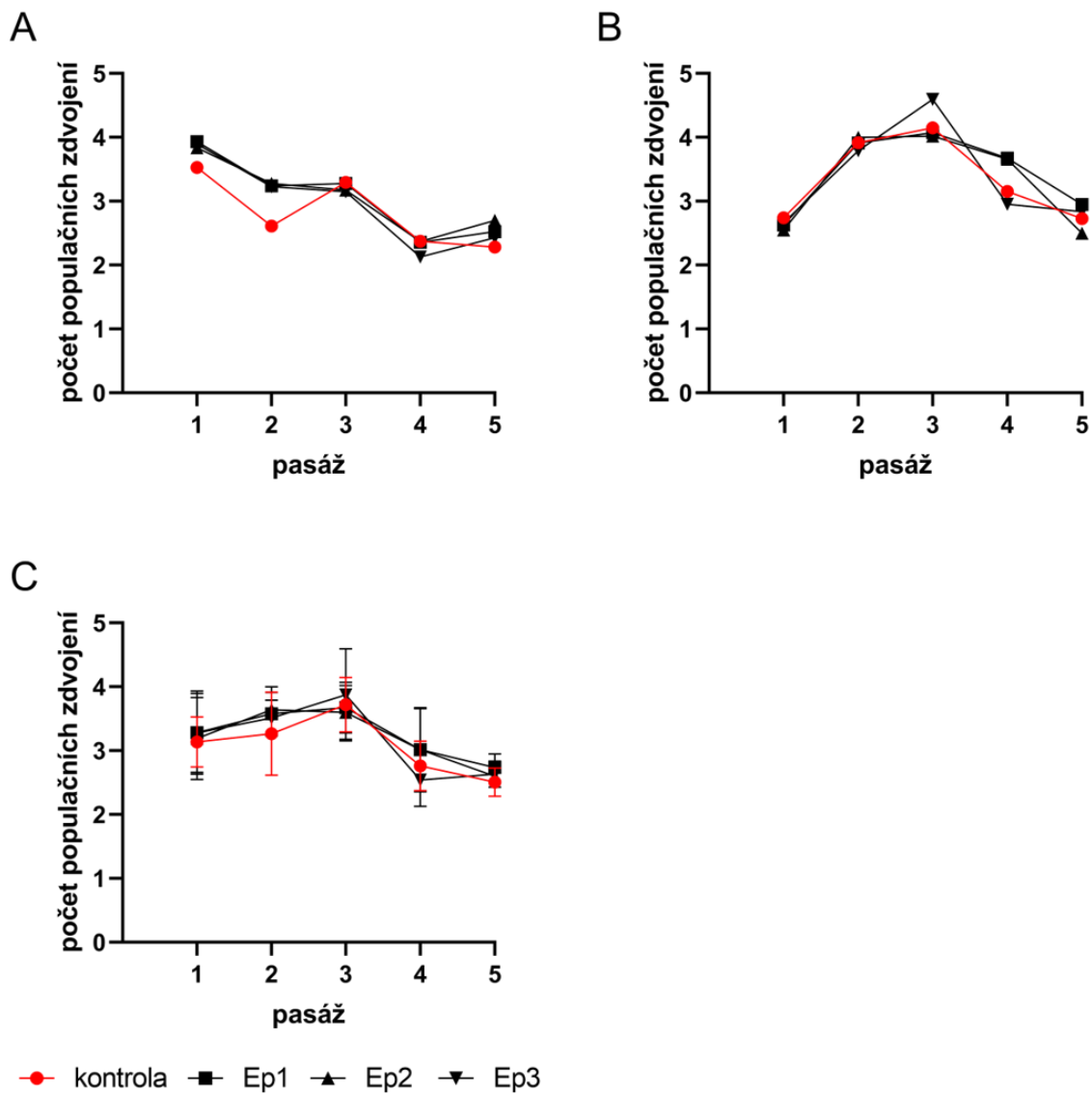
Detailní analýza nekumulovaných hodnot proliferační aktivity v rámci jednotlivých pasáží odhalila mírný pokles počtu populačních zdvojení v 2. pasáži u linie p1, ale tento efekt nebyl pozorován u linie p2. Hodnoty počtu populačních zdvojení v každé pasáži jsou uvedeny v tabulce 4 a graficky znázorněny v grafu 2.

pasáž	kontrola		Ep1		Ep2		Ep3	
	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2
1	2,74	3,53	2,63	3,93	2,55	3,83	2,66	3,89
2	3,91	2,61	3,91	3,24	4,00	3,28	3,79	3,23
3	4,15	3,29	4,07	3,28	4,02	3,17	4,59	3,15
4	3,15	2,37	3,67	2,36	3,66	2,37	2,95	2,13
5	2,73	2,28	2,95	2,52	2,50	2,70	2,83	2,43

Tabulka 4. Populační zdvojení během kultivace kmenových buněk zubní dřene v pilotním experimentu. Tabulka zobrazuje populační zdvojení linií p1 a linie p2 kultivovaných v kontrolním médiu (kontrola) a v experimentálních médiích (Ep1-3) v pasážích 1-5.



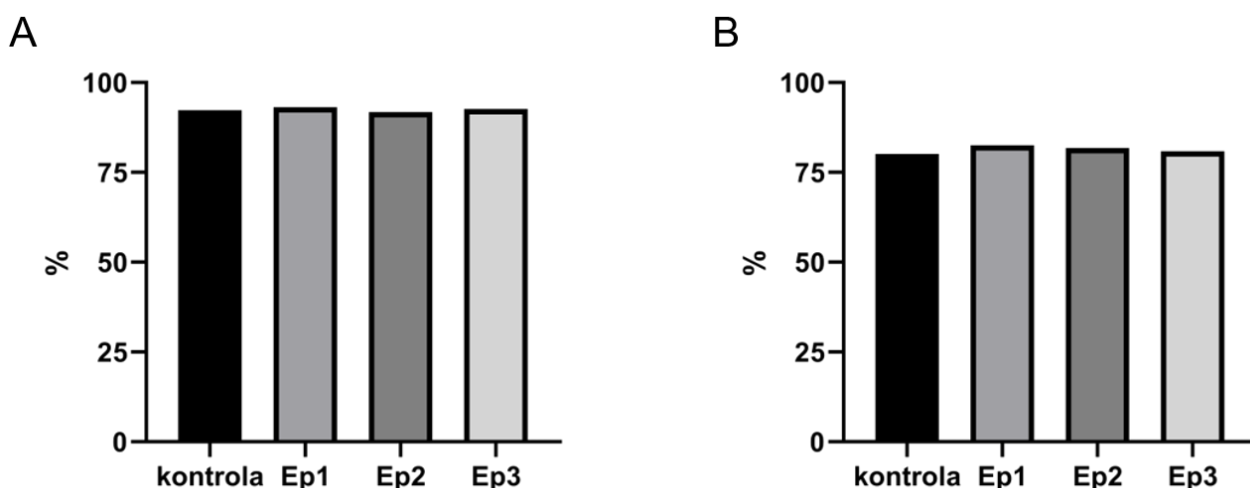
Graf 1. Kumulovaný počet populačních zdvojení v pasáži 1-5 pilotního experimentu. Grafy znázorňují kumulativní populační zdvojení linie p1 (A), linie p2 (B) a průměr obou linií se středními chybami průměru vyneseny jako chybové úsečky (C). Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (Ep1-3).



Graf 2. Počet populačních zdvojení v pasáži 1-5 pilotního experimentu. Grafy znázorňují počet populační zdvojení linie p1 (A), linie p2 (B) a průměr obou linií se středními chybami průměru vyneseny jako chybové úsečky (C). Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (Ep1-3).

4.1.4 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, ale mezi kontrolní skupinou a skupinou Ep1 bylo dosaženo hraničního výsledku ($p = 0,0528$, Friedmanův test, Dunnův post hoc test). 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 %. Graficky znázorněno v grafu 3.



Graf 3. Viabilita buněk na konci 5. pasáže pilotního experimentu. Grafy znázorňují procenta živých buněk v populaci linie 1 (A) a linie 2 (B). Buňky byly kultivovány ve standardním kultivačním médiu (kontrola) a v experimentálních médiích (Ep1-3).

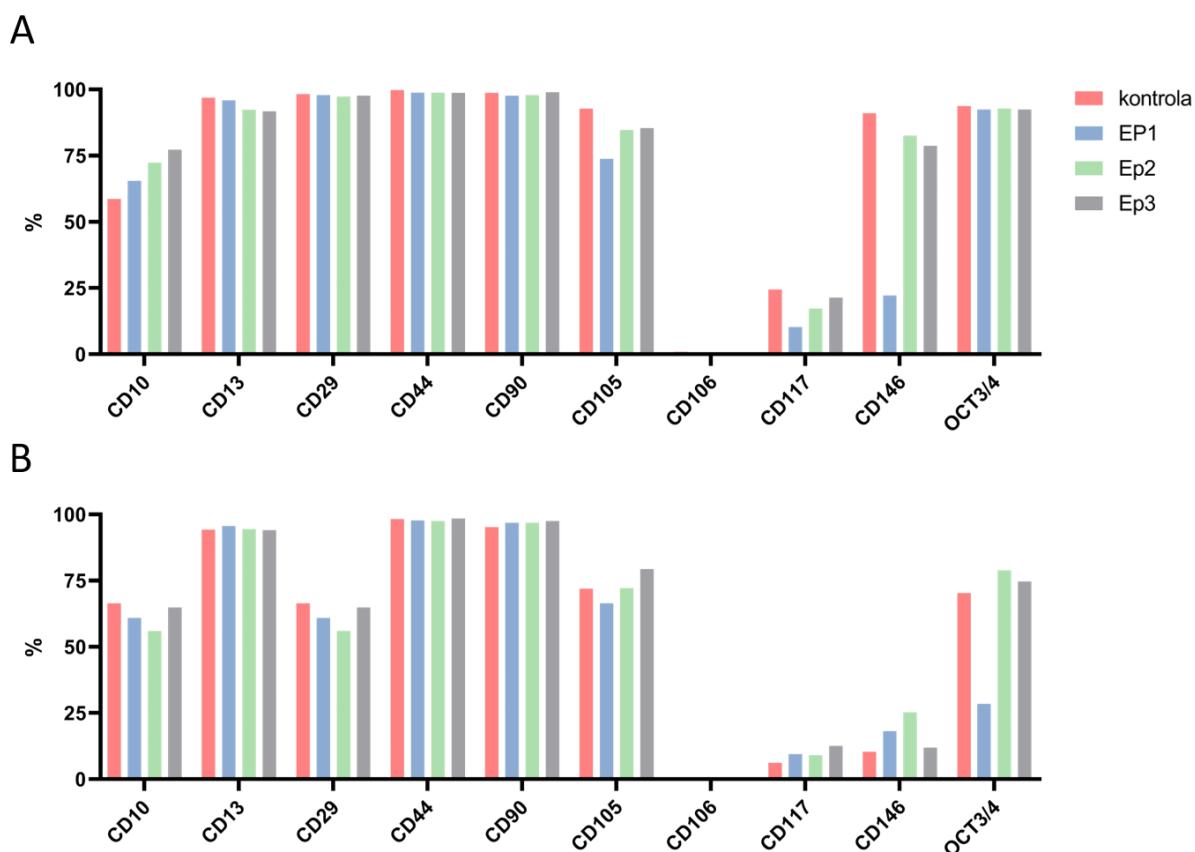
4.1.5 Analýza povrchových znaků

Analýza fenotypu KBZD, pro kterou byly vyšetřeny povrchové znaky, proběhla v 5. pasáži u 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. Souhrnné hodnoty positivity

jednotlivých povrchových znaků jsou uvedeny v tabulce 5 a vyneseny v grafické podobě v grafu 4.

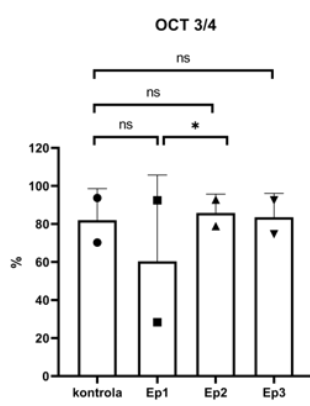
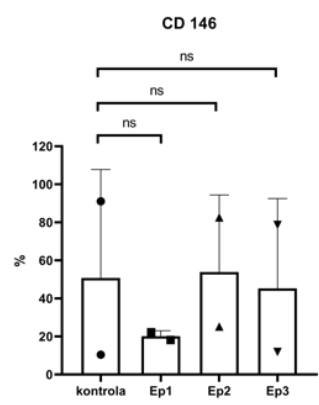
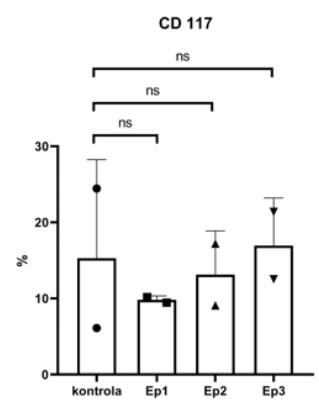
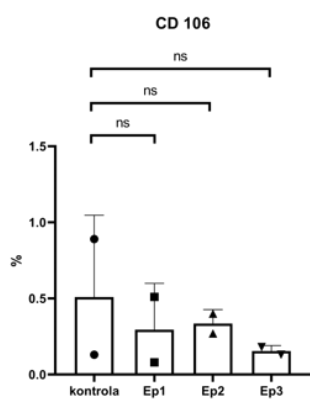
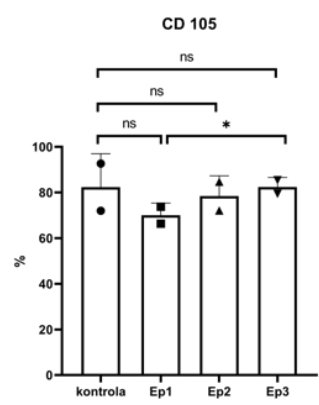
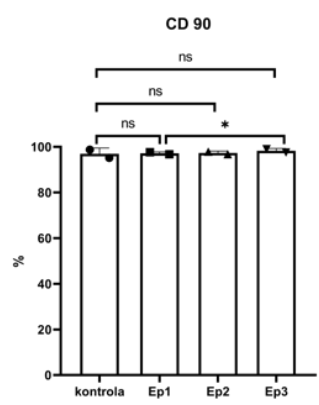
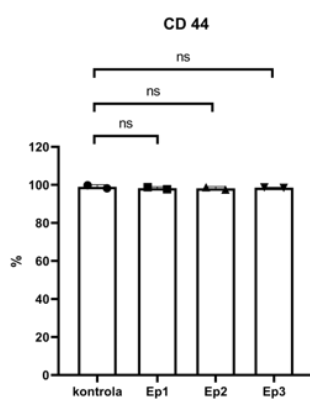
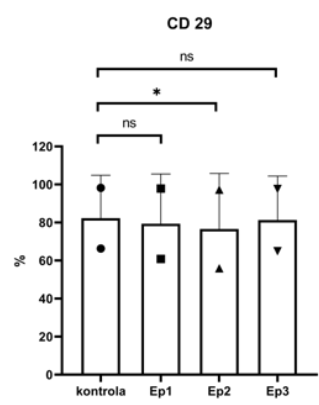
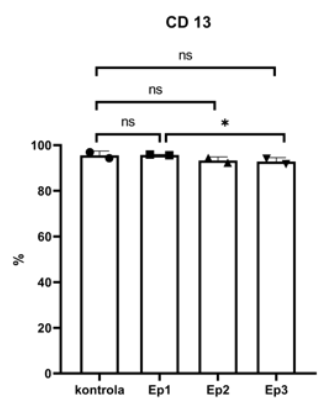
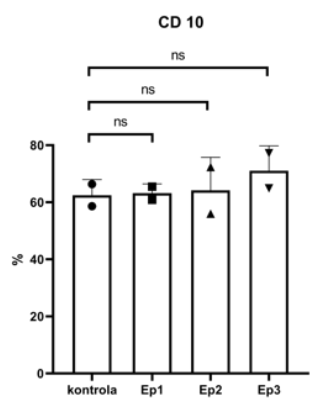
	kontrola		Ep1		Ep2		Ep3	
	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2	linie p1	linie p2
CD10	66,35	58,59	60,85	65,48	55,97	72,33	64,91	77,22
CD13	94,31	96,9	95,59	95,88	94,43	92,29	94,04	91,68
CD29	66,35	98,24	60,85	97,86	55,97	97,25	64,91	97,64
CD44	98,22	99,80	97,73	98,77	97,55	98,82	98,46	98,67
CD90	95,19	98,74	96,77	97,63	96,80	97,91	97,53	98,98
CD105	71,96	92,67	66,35	73,77	72,13	84,70	79,40	85,36
CD106	0,13	0,89	0,51	0,08	0,27	0,40	0,13	0,18
CD117	6,11	24,44	9,44	10,18	9,07	17,20	12,53	21,37
CD146	10,40	91,06	18,15	22,22	25,22	82,57	11,88	78,67
OCT3/4	70,27	93,72	28,38	92,43	78,85	92,81	74,67	92,44

Tabulka 5. Procentuální pozitivita kmenových buněk zubní dřeně linií p1 a p2 na sledované povrchové znaky v 5. pasáži pilotního experimentu. Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (Ep1-3).



Graf 4. Procentuální pozitivita sledovaných povrchových znaků kmenových buněk zubní dřeně linií p1 (A) a p2 (B) v 5. pasáži pilotního experimentu. Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (Ep1-3).

Následně byla provedena analýza jednotlivých znaků. Statistická analýza byla provedena mezi kontrolní a všemi experimentálními skupinami a i mezi všemi experimentálními skupinami navzájem použitím Friedmanova testu následovaného Dunnovým post hoc testem. 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. Data obou linií jednotlivě pro každý sledovaný znak a výsledky statistické analýzy jsou vyobrazeny v grafu 5.

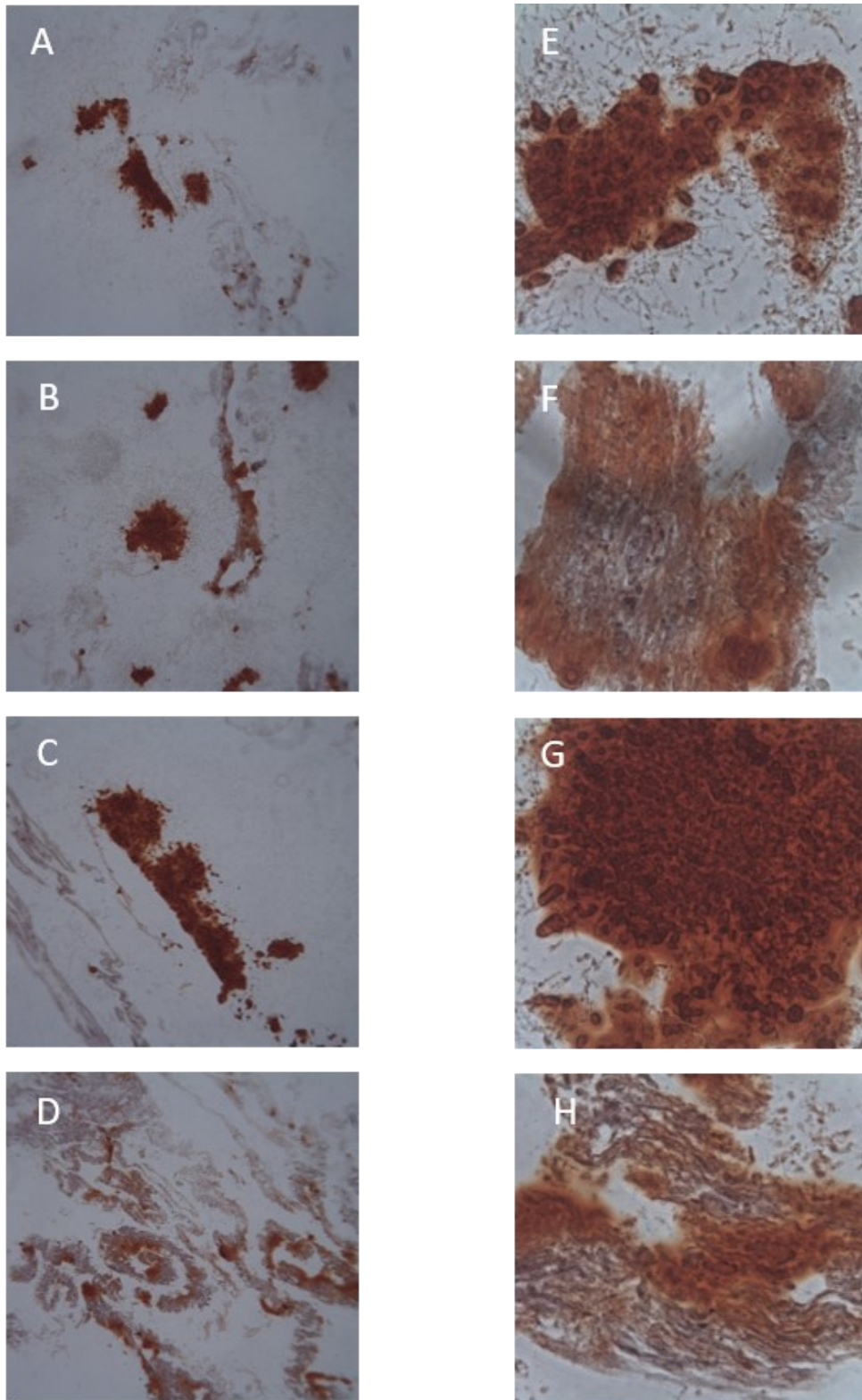


Graf 5. Analýza povrchových znaků buněk linie p1 a p2 v 5. pasáži pilotního experimentu. Grafy demonstrují procenta buněk v populaci barvených fluorochromaticky značenými protilátkami proti jednotlivým povrchovým znakům. Průměr skupiny je vynesena jako sloupec, směrodatná odchylka skupiny je vynesena 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, * $p < 0,05$. Statisticky nevýznamné výsledky vůči kontrolní skupině jsou označeny jako ns, rozdíly mezi experimentálními skupinami navzájem, pakliže není uvedeno jinak, jsou statisticky nevýznamné.

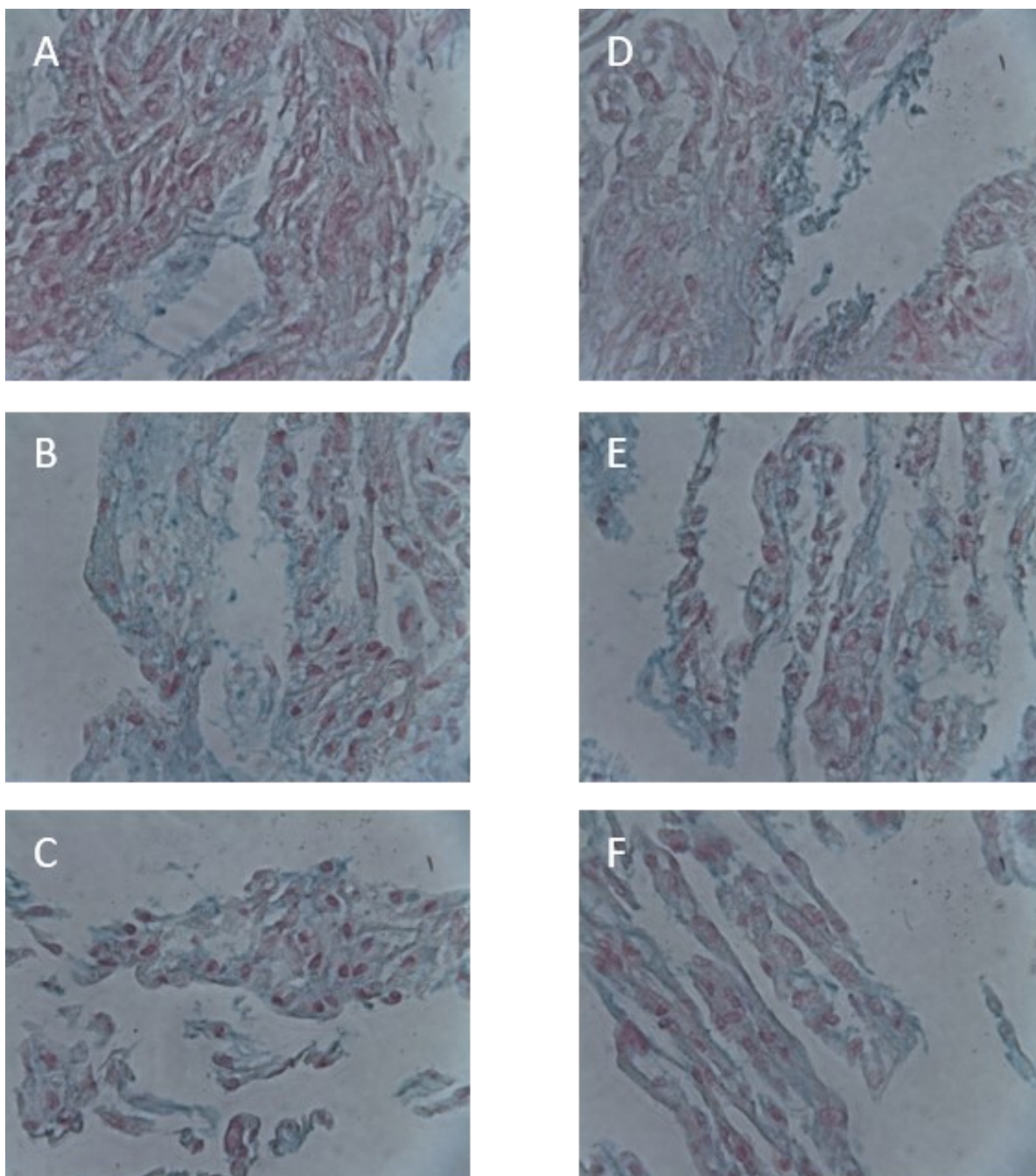
4.1.6 Diferenciační potenciál

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 (obr. 19).

Chondrogenní diferenciaci byla prokázána u obou testovaných linií v kontrolním médiu, Ep1 a Ep3 (obr. 20). V médiu Ep2 došlo během 3. týdne diferenciačního procesu ke kontaminaci kultivačních nádob plísní a tyto byly z experimentu vyřazeny.



Obrázek 19. Osteogenní diferenciace kmenových buněk zubní dřeně v 5. pasáži pilotního experimentu. Barvení extracelulárních depozit vápníku alizarinovou červení. Obrázky znázorňují výsledky osteogenní diferenciaci linie p1 kultivované v kontrolním médiu (A), Ep1 (B), Ep2 (C) a Ep3 (D) a linie p2 kultivované v kontrolním médiu (E), Ep1 (F), Ep2 (G) a Ep3 (H).



Obrázek 20. Chondrogenní diferenciaci kmenových buněk zubní dřevě v 5. pasáži pilotního experimentu. Barvení extracelulárních kyselých mukopolysacharidů alciánovou modří. Obrázky znázorňují výsledky chondrogenní diferenciaci linie p1 kultivované v kontrolním médiu (A), Ep1 (B) a Ep3 (C) a linie p2 kultivované v kontrolním médiu (D), Ep1 (E) a Ep3 (F).

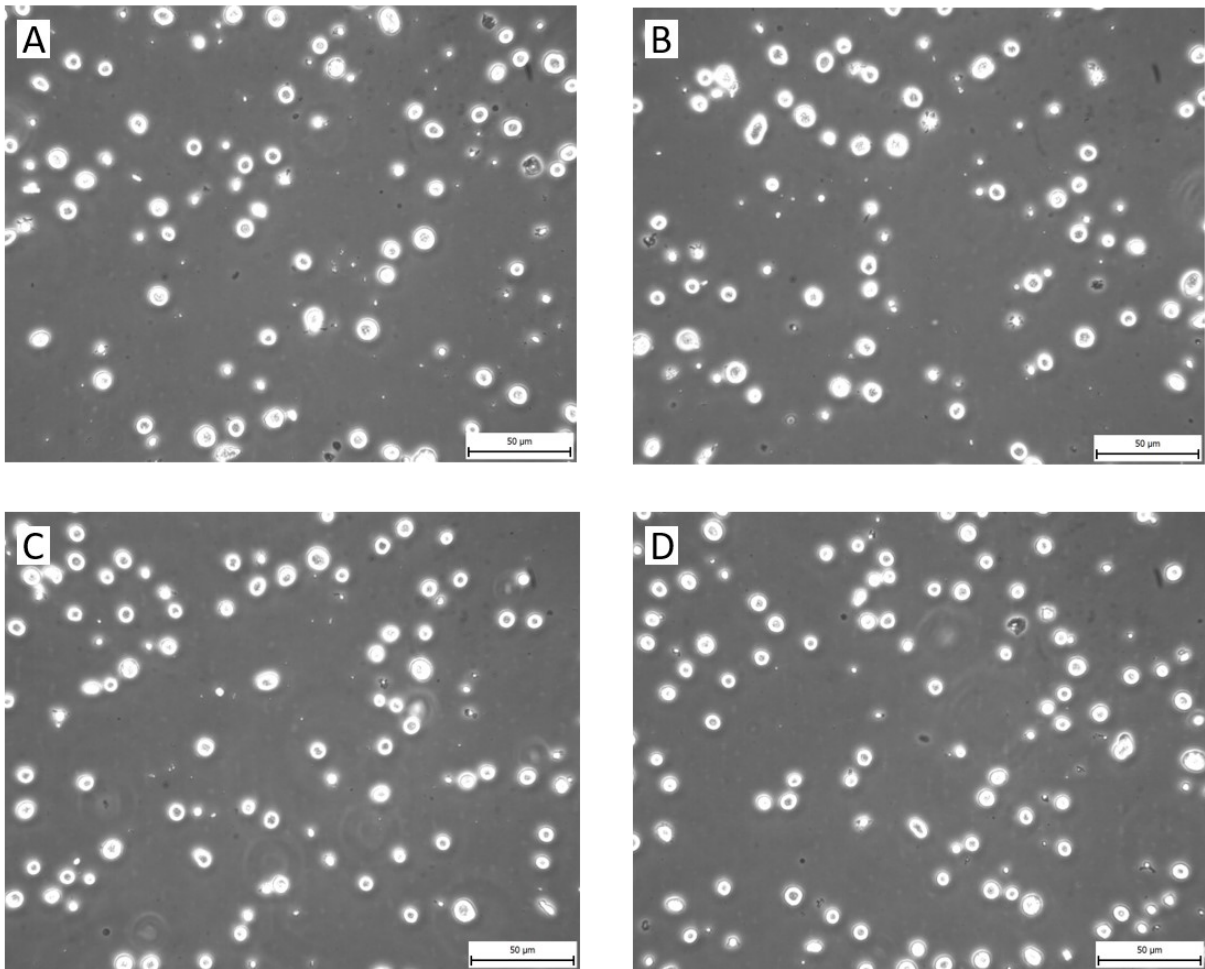
4.2 Experiment s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou

4.2.1 Izolace KBZD

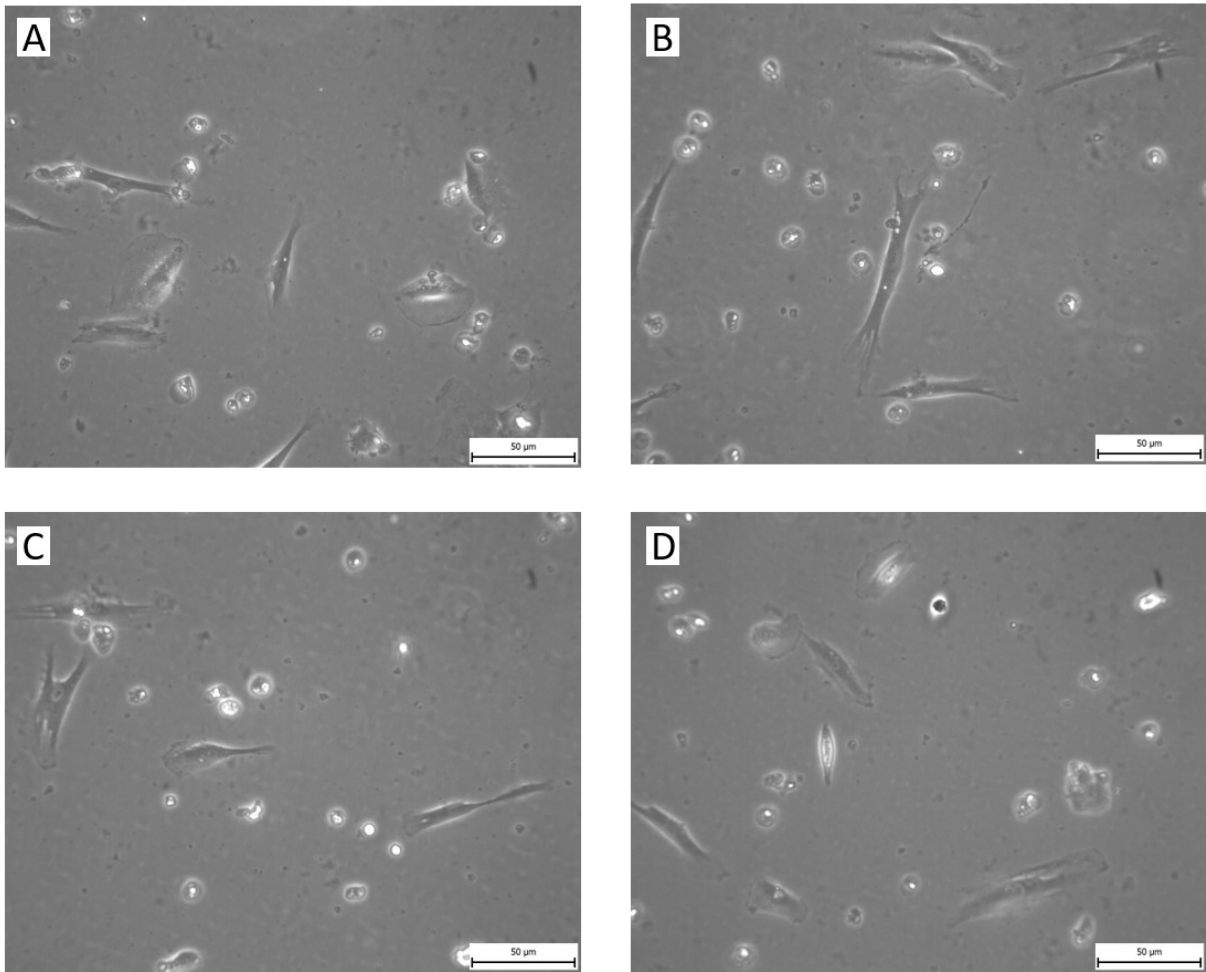
Úspěšně jsme pro experiment s NM KH izolovali 5 linií KBZD. Linie byly pro potřeby experimentu označeny jako linie 1, linie 2, linie 3, linie 4 a linie 5. Linie 1 byla získána z ektopicky uloženého retinovaného dolního třetího moláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byla žena ve věku 14 let, která byla celkově zdravá a neužívala žádné léky. Linie 2 byla získána ze semiretinovaného dolního třetího moláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byla žena ve věku 15 let, která byla celkově zdravá a neužívala žádné léky. Linie 3 byla získána z retinovaného horního druhého premoláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byl muž ve věku 13 let s Aspergerovým syndromem, který neužíval žádné léky. Linie 4 byla získána ze semiretinovaného dolního třetího moláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byla žena ve věku 15 let, která byla celkově zdravá a neužívala žádné léky. Linie 5 byla získána ze semiretinovaného dolního třetího moláru s nedokončeným vývojem kořenů, dárce byla žena ve věku 15 let, která byla celkově zdravá a neužívala žádné léky.

4.2.2 Kultivace KBZD

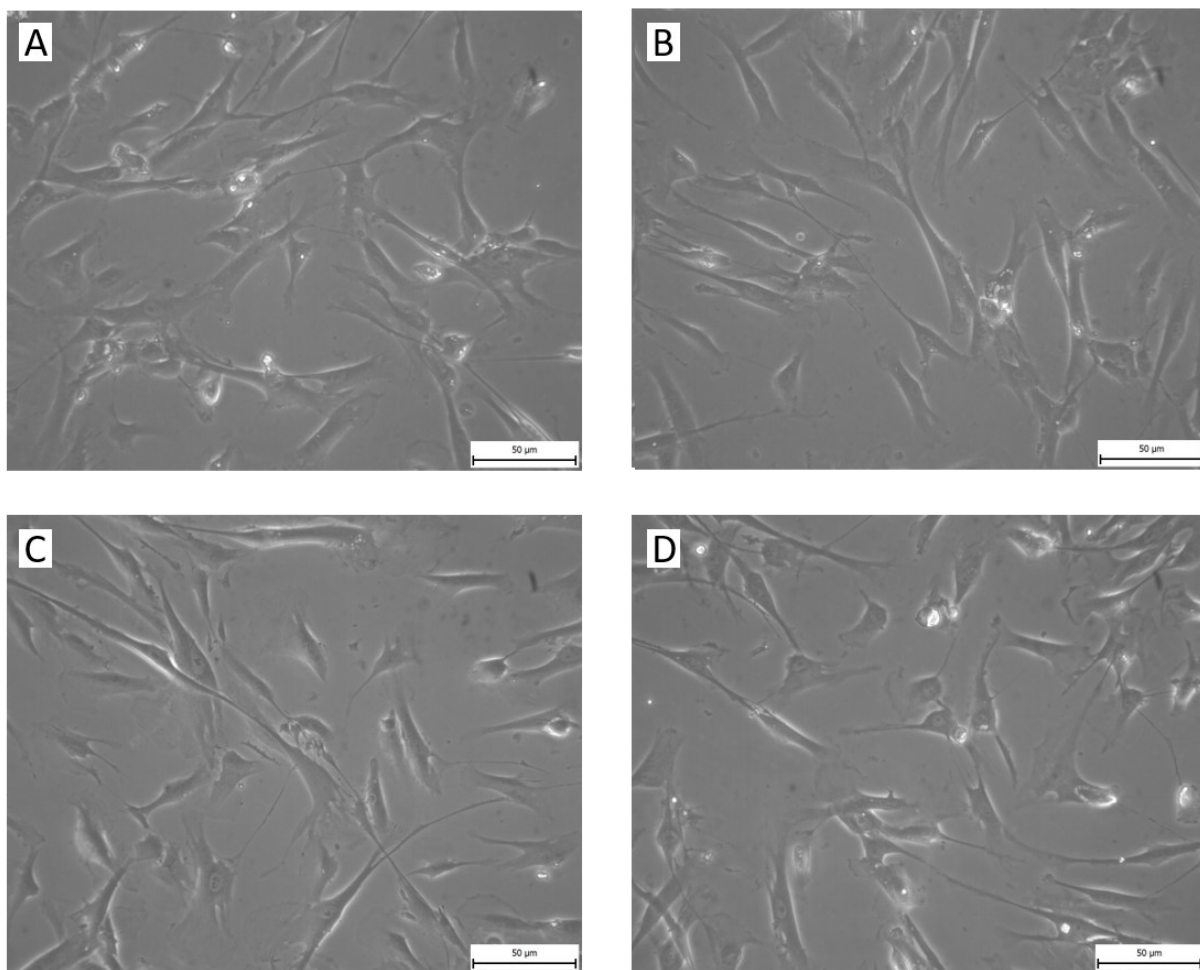
Linie 1-5 byly po rozmrazení nasazeny v rámci pasáže 0 do kontrolního kultivačního média, expandovány a následně po dosažení 70% konfluency pasážovány do médií kontrola / E1 / E2 / E3 v rámci pasáže 1. V jednotlivých pasážích byly buňky pozorovány pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Po nasazení buňky plavaly v médiu a měly kulovitý tvar (obr. 21). Tyto buňky začaly v následujících hodinách přisedat k adherentnímu povrchu kultivační nádoby a získávaly vřetenovitý tvar (obr. 22). Mikroskopicky nebyly pozorovány rozdíly v adhezivnosti mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích. Za 72 hodin byly pozorovatelné přisedlé buňky, které se vzájemně dotýkaly svými výběžky (obr. 23). Nebyly pozorovány rozdíly v adhezivnosti či shlukování mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích. Kultivační média byla měněna každé 3 dny a v rámci tohoto procesu byla adherentní plocha kultivační nádoby oplachována PBS. Po oplachu nebyla pozorována změna adheze mezi buňkami kultivovanými v kontrolním a experimentálních médiích. Buňky byly takto kultivovány po 6 pasážích, během kterých pozorování pod mikroskopem neodhalilo rozdíly v adhezivnosti či shlukování buněk.



Obrázek 21. Kmenové buňky zubní dřeně mobilizované a volně plovoucí v kultivačním médiu okamžitě po pasáži - linie 5 v 5. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Fotografie v reprezentativním poli zobrazují buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích E1 (B), E2 (C) a E3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem.



Obrázek 22. Kmenové buňky zubní dřeně v kultivačním médiu přisedající k adherentnímu povrchu kultivační nádoby 12 hodin po pasáži - linie 5 v 5. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Fotografie v reprezentativním poli zobrazují buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích E1 (B), E2 (C) a E3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem.



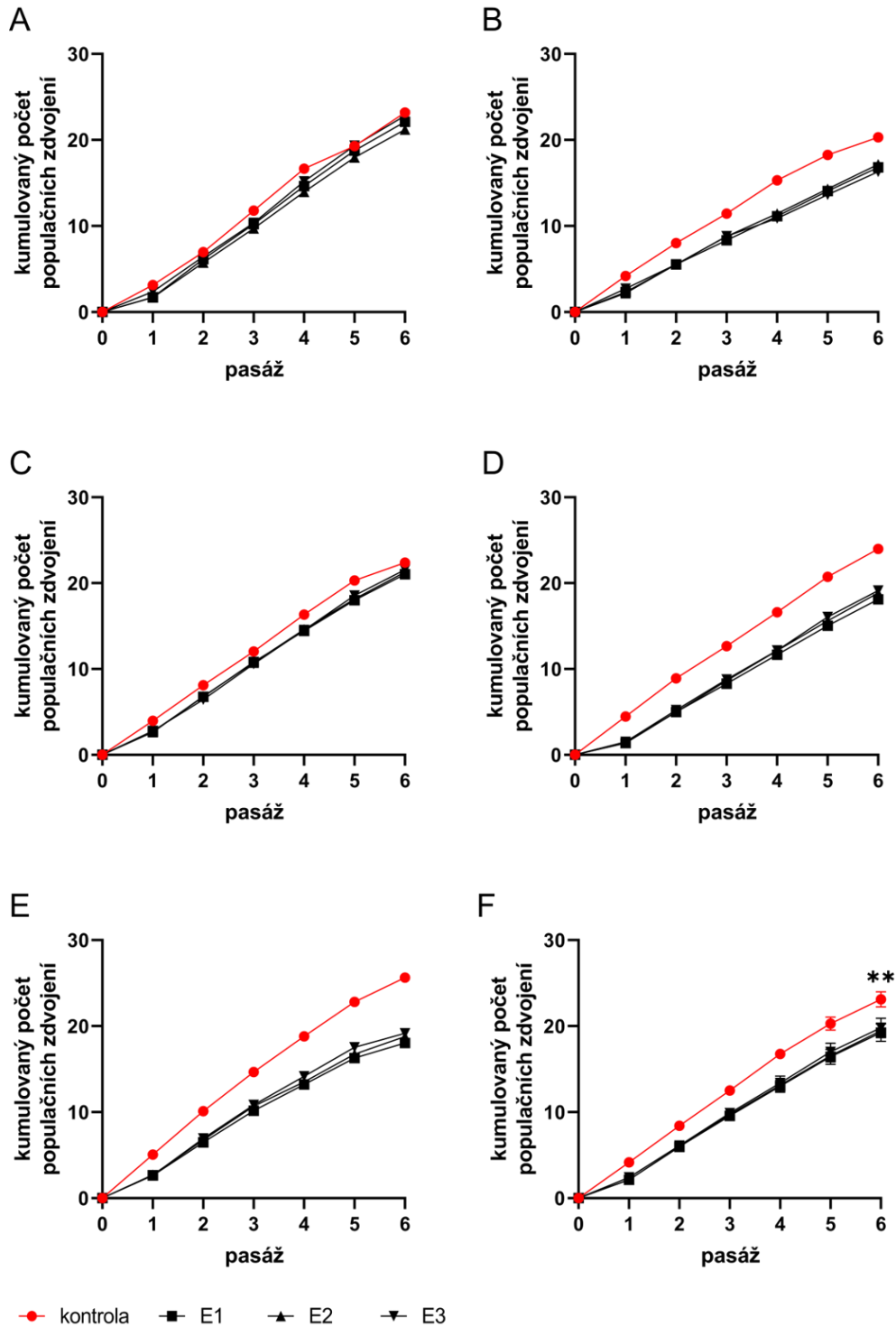
Obrázek 23. Kmenové buňky zubní dřeně v kultivačním médiu přisedlé k adherentnímu povrchu kultivační nádoby 72 hodin po pasáži - linie 5 v 5. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Fotografie v reprezentativním poli zobrazují buňky kultivované v kontrolním médiu (A) a v experimentálních médiích E1 (B), E2 (C) a E3 (D) pozorované pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

4.2.3 Proliferační aktivita

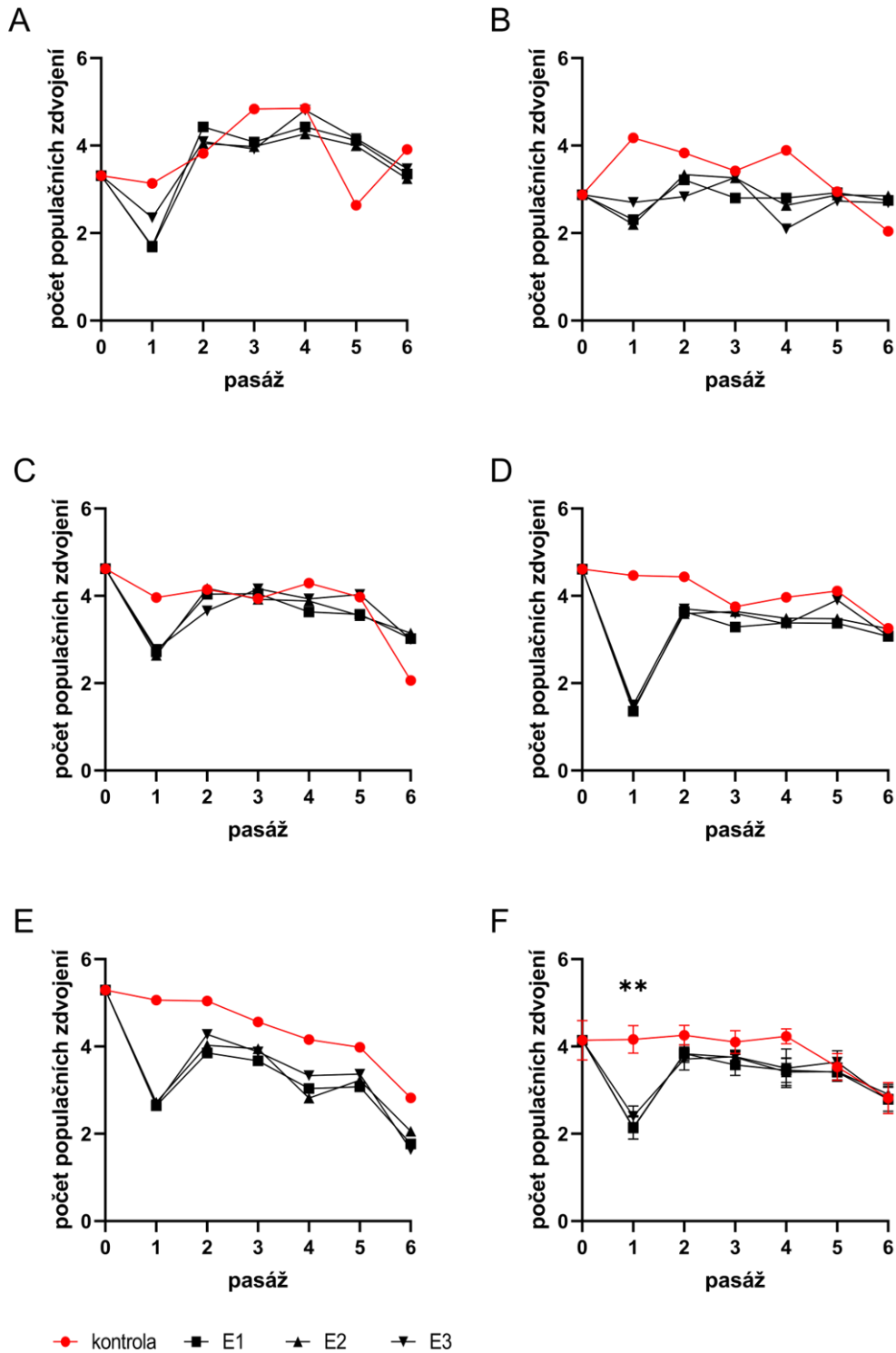
Proliferační linie 1-5 byla sledována od 0. do 6. pasáže ve všech kultivačních médiích. Kumulovaný počet populačních zdvojení kontrolní skupiny byl u všech linií vyšší v porovnání s experimentálními skupinami. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení v 6. pasáži pro linie 1-5 kultivované v kontrola / 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. Při vyhodnocení statistické významnosti kumulovaného počtu populačních zdvojení byla při porovnání kontrolní skupiny vůči všem experimentálním skupinám získána statistická významnost $p = 0,023$, porovnání kontrolní skupiny vůči jednotlivým experimentálním skupinám bylo s následující významností: kontrola-E1: $p = 0,0015$; kontrola-E2: $p = 0,0143$; kontrola-E3: $p = 0,0864$ (Friedmanův test, Dunnův post hoc test). Mezi experimentálními skupinami navzájem nebyl statisticky významný rozdíl v kumulovaném počtu populačních zdvojení. Hodnoty kumulovaného počtu populačních zdvojení každé pasáže linií 1-5 jsou graficky vyobrazeny v grafu 6.

Detailní analýza proliferační aktivity jednotlivých pasáží prokázala v porovnání s kontrolní skupinou výrazný pokles počtu populačních zdvojení v 1. pasáži u všech experimentálních skupin. Tento efekt byl přítomen u všech linií. Při vyhodnocení statistické významnosti počtu populačních zdvojení v 1. pasáži byla při porovnání kontrolní skupiny vůči všem experimentálním skupinám získána statistická významnost $p = 0,016$, porovnání kontrolní skupiny vůči jednotlivým experimentálním skupinám bylo s následující významností: kontrola-E1: $p = 0,0033$; kontrola-E2: $p = 0,0033$; kontrola-E3: $p = 0,1416$ (Friedmanův test, Dunnův post hoc test). Hodnoty počtu populačních zdvojení každé pasáže linií 1-5 jsou uvedeny v tabulce 6 a graficky vyobrazeny v grafu 7.



Graf 6. Kumulovaný počet populačních zdvojení v pasáži 0-6 experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Grafy znázorňují kumulativní populační zdvojení linie 1-5 (A-E) a průměr linií 1-5 se středními chybami průměru vyneseny jako chybové úsečky (F). Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3). Statistická analýza byla provedena Friedmanovým testem následovaným Dunnovým post hoc testem, ** $p < 0,005$.



Graf 7. Počet populačních zdvojení v pasáži 0-6 experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Grafy znázorňují počet populační zdvojení linie 1-5 (A-E) a průměr linií 1-5 se středními chybami průměru vnesenými jako chybové úsečky (F). Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3). Statistická analýza byla provedena Friedmanovým testem následovaným Dunnovým post hoc testem, ** $p < 0,005$.

	pasáž	0	1	2	3	4	5	6
kontrola	linie 1	3,31	3,14	3,82	4,84	4,85	2,64	3,91
	linie 2	2,88	4,18	3,83	3,42	3,89	2,95	2,04
	linie 3	4,62	3,96	4,15	3,94	4,29	3,97	2,06
	linie 4	4,61	4,47	4,44	3,75	3,97	4,11	3,26
	linie 5	5,29	5,06	5,04	4,56	4,16	3,98	2,82
E1	linie 1	-	1,70	4,43	4,08	4,43	4,12	3,35
	linie 2	-	2,31	3,22	2,80	2,80	2,92	2,75
	linie 3	-	2,72	4,04	4,05	3,63	3,58	3,02
	linie 4	-	1,36	3,64	3,29	3,38	3,37	3,07
	linie 5	-	2,64	3,85	3,67	3,04	3,08	1,77
E2	linie 1	-	1,68	4,05	3,98	4,27	4,00	3,24
	linie 2	-	2,20	3,34	3,26	2,63	2,87	2,85
	linie 3	-	2,64	4,17	3,92	3,88	3,55	3,15
	linie 4	-	1,41	3,59	3,64	3,49	3,48	3,25
	linie 5	-	2,72	4,03	3,95	2,82	3,23	2,06
E3	linie 1	-	2,35	4,09	3,92	4,81	4,16	3,47
	linie 2	-	2,70	2,83	3,27	2,10	2,73	2,69
	linie 3	-	2,78	3,66	4,16	3,93	4,03	3,00
	linie 4	-	1,50	3,70	3,60	3,36	3,91	3,08
	linie 5	-	2,67	4,28	3,88	3,33	3,37	1,64

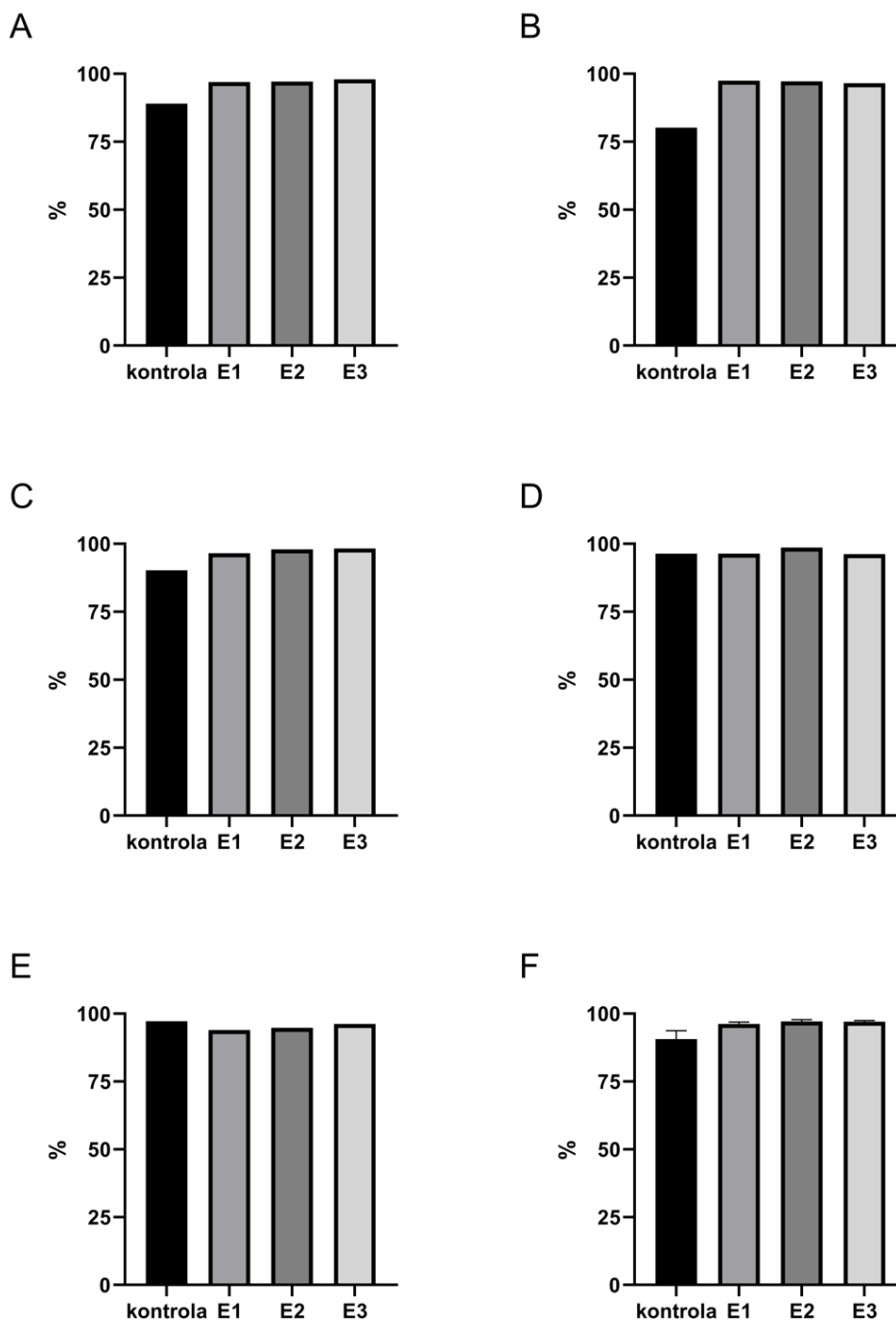
Tabulka 6. Populační zdvojení během kultivace kmenových buněk zubní dřeně v experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Tabulka zobrazuje populační zdvojení linií 1-5 kultivovaných v kontrolním médiu (kontrola) v pasážích 0-6 a v experimentálních médiích (E1-3) v pasážích 1-6.

4.2.4 Viabilita

Viabilita KBZD byla změřena v poslední pasáži. Jak kontrolní skupina, tak i experimentální skupiny vykázaly vysokou viabilitu, která nebyla negativně ovlivněna přítomností NM HK. Viabilita buněk všech experimentálních skupin byla vyšší než 94 %. V kontrolní skupině byly hodnoty viability v rozmezí 80,2-97,2 %. V porovnání s kontrolní skupinou byla viabilita experimentálních skupin vyšší u linií 1-3 a obdobná u linií 4 a 5. Tyto rozdíly nebyly statisticky významné.

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 %. Hodnoty graficky vyobrazeny v grafu 7.

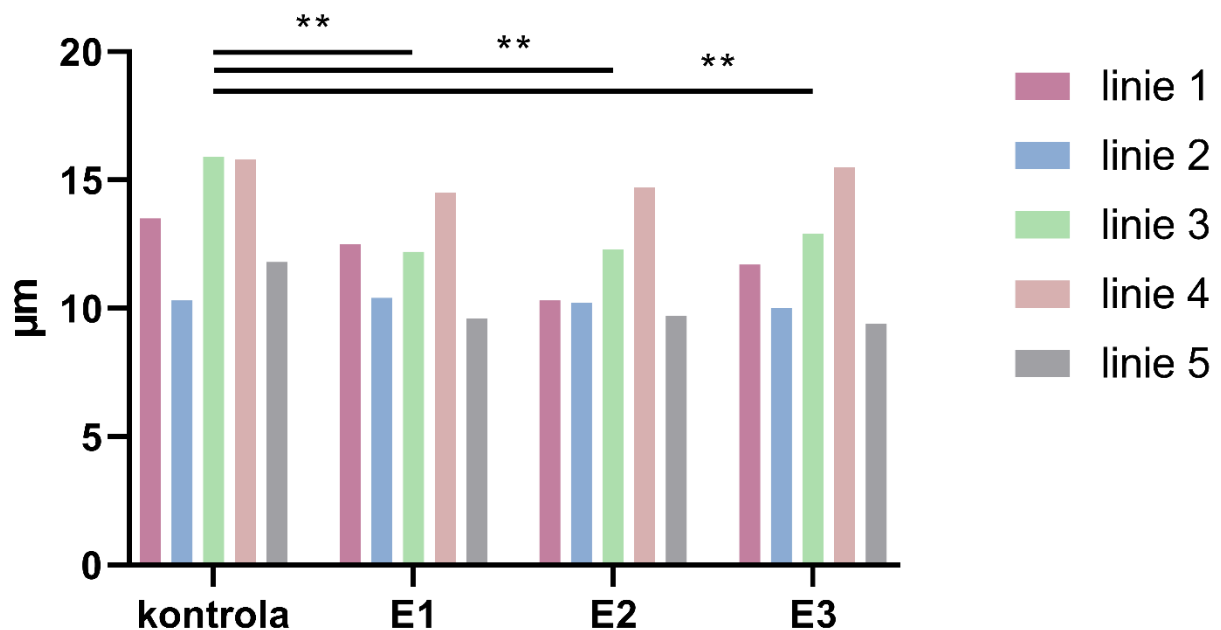


Graf 8. Viabilita buněk na konci 6. pasáže experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Grafy znázorňují procenta živých buněk v populaci linie 1-5 (A-E) a jako průměr linií 1-5 se středními chybami průměru vyneseny jako chybové úsečky (F). Buňky byly kultivovány ve standardním kultivačním médiu (kontrola) a v experimentálních médiích (E1-3). Statistická analýza neodhalila statisticky významná rozdíl mezi kontrolní a experimentálními skupinami.

4.2.5 Velikost buněk

Velikost průměru buněk byla měřena v mobilizovaném stavu v buněčné suspenzi, tedy ve stavu, kdy buňky zaujímaly kulovitý tvar. Pro každou linii byl vypočítán medián velikosti průměru buněk a byla provedena statistická analýza metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (angl. one-way ANOVA) následovaná post hoc testem Fisherovou metodou nejmenšího významného rozdílu (angl. Fisher's least significant difference (LSD) post hoc test). Průměr KBZD kultivovaných v experimentálních médiích byl statisticky významně menší než průměr KBZD kultivovaných v kontrolním médiu. Mezi experimentálními skupinami navzájem nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

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



Graf 9. Medián průměru kmenových buněk zubní dřeně na konci 6. pasáže experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. 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; ** $p < 0,005$.

4.2.6 Analýza povrchových znaků

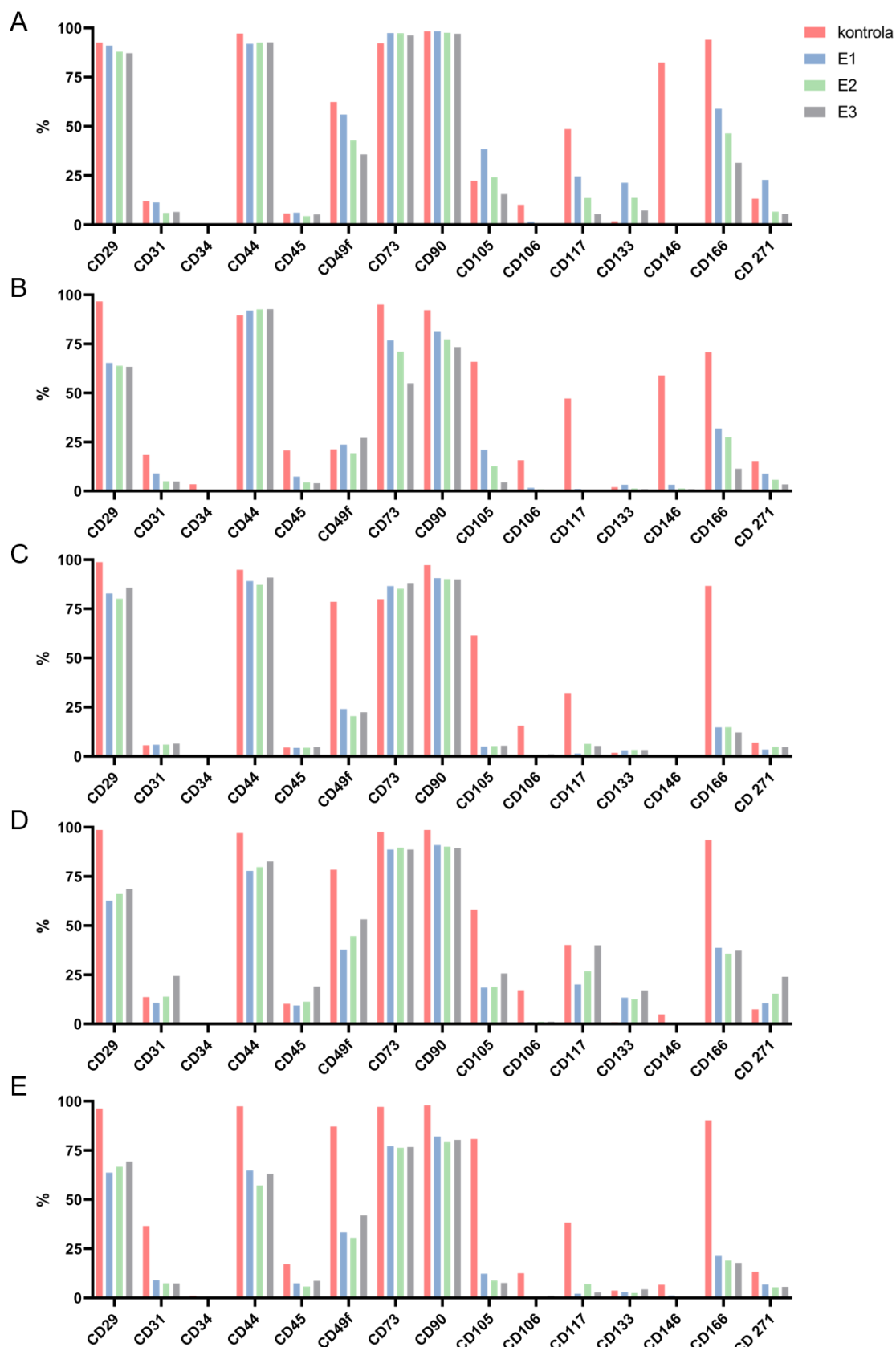
Pro analýzu fenotypu byla vyšetřena pozitivita povrchových znaků KBZD linií 1-5 v 6. pasáži. Statistickou analýzou všech znaků při porovnání kontrolní skupiny a experimentálních skupin bylo zjištěno, že KH má statisticky významný vliv na fenotyp KBZD.

Kromě CD133 a CD271 byla v kontrolní skupině zaznamenána vyšší pozitivita všech analyzovaných znaků než v experimentálních skupinách, a to: CD29 (*), CD31, CD34 (*), CD44, CD45, CD49f, CD73, CD90 (***), CD105, CD106 (*), CD117 (*), CD146 (*), CD166 (***) (Friedmanův test). Pro CD271 byla pozitivita v kontrolní a experimentálních skupinách obdobná a CD133 byl exprimován v experimentálních skupinách více než v kontrolní skupině. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Byla pozorována interindividuální variabilita v reakci jednotlivých linií na KH. Nejmenší rozdíly mezi buňkami kultivovanými v kontrolním médiu a v experimentálních médiích bylo zaznamenáno u linie 1, výrazný vliv byl naopak pozorován u linie 5 (pro porovnání viz graf 10).

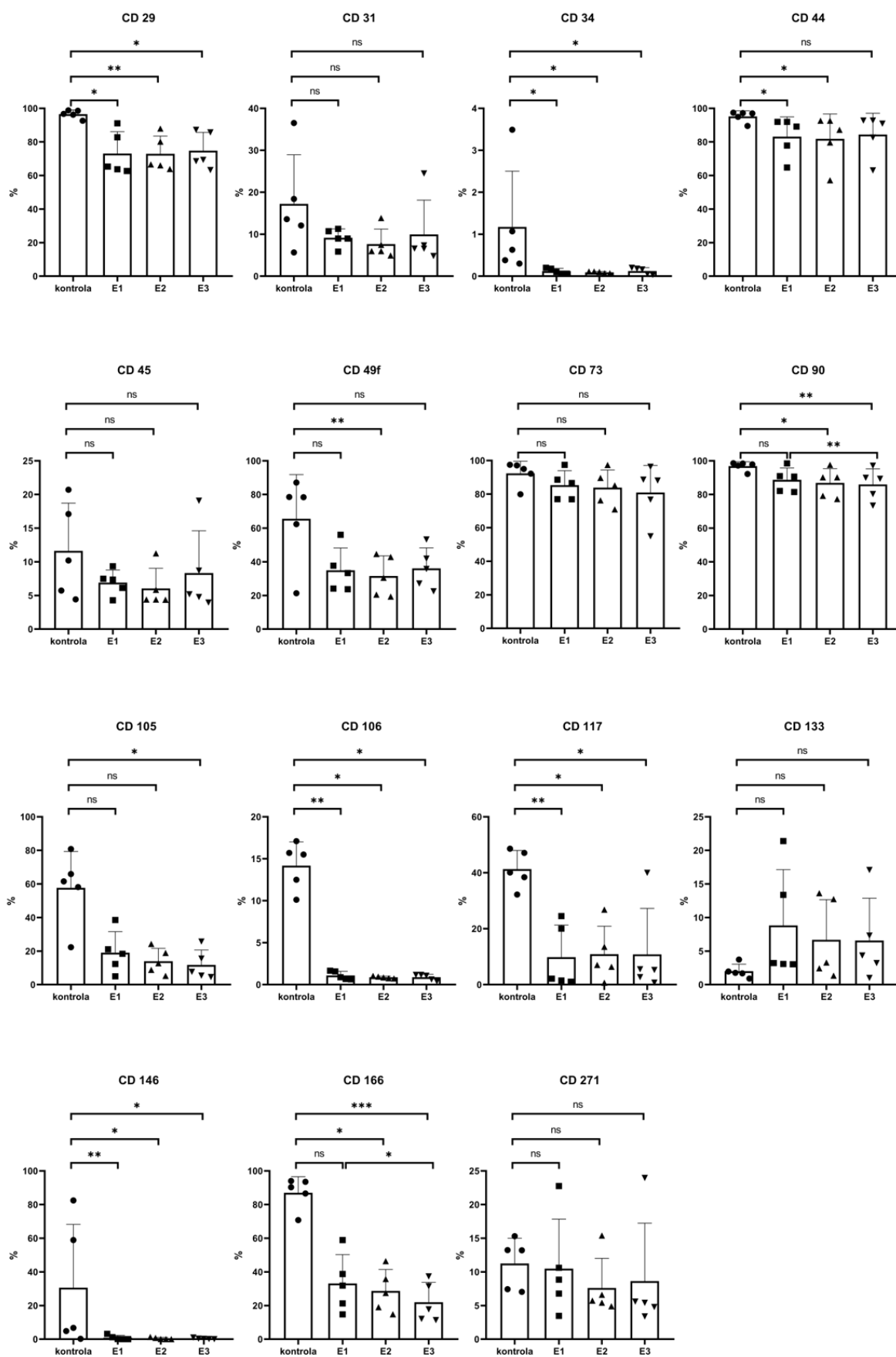
Následně byla provedena analýza jednotlivých znaků. Statistická analýza byla provedena mezi kontrolní a všemi experimentálními skupinami a i mezi všemi experimentálními skupinami navzájem použitím Friedmanova testu následovaného Dunnovým post hoc testem. Výsledky analýzy jsou vyobrazeny v grafu 11.

	kontrola					E1					E2					E3				
	linie 1	linie 2	linie 3	linie 4	linie 5	linie 1	linie 2	linie 3	linie 4	linie 5	linie 1	linie 2	linie 3	linie 4	linie 5	linie 1	linie 2	linie 3	linie 4	linie 5
CD29	92,60	96,70	98,80	98,60	96,20	91,06	65,32	82,76	62,68	63,69	87,92	63,86	80,16	66,02	66,60	87,20	63,25	85,70	68,54	69,29
CD31	12,07	18,40	5,65	13,60	36,50	11,27	8,97	5,85	10,72	8,96	5,97	4,93	5,98	13,86	7,46	6,57	4,81	6,56	24,48	7,34
CD34	0,30	3,49	0,38	0,63	1,07	0,06	0,20	0,18	0,10	0,06	0,07	0,11	0,07	0,11	0,10	0,03	0,16	0,05	0,18	0,20
CD44	97,18	89,50	94,90	97,00	97,40	91,93	91,93	89,13	77,83	64,77	92,61	92,61	87,17	79,68	57,15	92,73	92,73	90,91	82,62	63,05
CD45	5,72	20,70	4,42	10,20	17,10	6,12	7,36	4,28	9,34	7,47	4,39	4,39	4,35	11,25	5,83	5,18	3,95	4,77	19,07	8,69
CD49f	62,38	21,30	78,50	78,40	87,10	56,08	23,67	24,06	37,68	33,33	42,84	19,32	20,47	44,63	30,49	35,71	27,07	22,49	53,23	41,90
CD73	92,19	95,00	79,90	97,50	97,10	97,43	76,91	86,58	88,62	77,00	97,36	70,92	85,18	89,61	76,27	96,30	54,90	88,09	88,59	76,73
CD90	98,36	92,20	97,20	98,60	97,90	98,42	81,48	90,63	90,90	82,06	97,62	77,29	90,16	90,15	79,16	97,09	73,40	89,94	89,31	80,28
CD105	22,30	65,90	61,50	58,10	80,80	38,54	21,07	4,96	18,42	12,33	24,24	12,75	5,22	18,89	8,76	15,57	4,53	5,41	25,68	7,64
CD106	10,12	15,70	15,50	17,10	12,50	1,58	1,66	0,68	0,88	0,64	0,74	0,86	0,96	1,04	0,76	0,38	0,62	1,16	1,16	1,06
CD117	48,60	47,10	32,20	40,10	38,40	24,52	1,05	1,48	20,03	2,15	13,54	0,68	6,38	26,82	7,02	5,48	0,70	5,25	39,99	2,70
CD133	1,68	1,95	1,75	0,90	3,73	21,39	3,21	3,03	13,37	3,08	13,62	1,33	3,29	12,73	2,43	7,30	0,99	3,21	17,08	4,34
CD146	82,47	58,90	0,22	4,81	6,73	0,04	3,21	0,01	0,11	1,17	0,06	1,33	0,02	0,12	0,77	0,08	0,99	0,06	0,21	0,36
CD166	94,00	70,80	86,60	93,50	90,30	58,93	31,86	14,74	38,70	21,27	46,41	27,47	14,82	35,71	19,01	31,47	11,34	12,10	37,31	17,75
CD 271	13,24	15,30	7,03	7,43	13,20	22,75	8,85	3,46	10,61	6,78	6,59	5,72	4,89	15,40	5,42	5,41	3,39	4,78	23,96	5,59

Tabulka 7. Procentuální pozitivita sledovaných povrchových znaků KBZD linií 1-5 v 6. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3).



Graf 10. Procentuální pozitivita sledovaných povrchových znaků KBZD linií 1-5 (A-E) v 6. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Buňky byly kultivovány v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3).

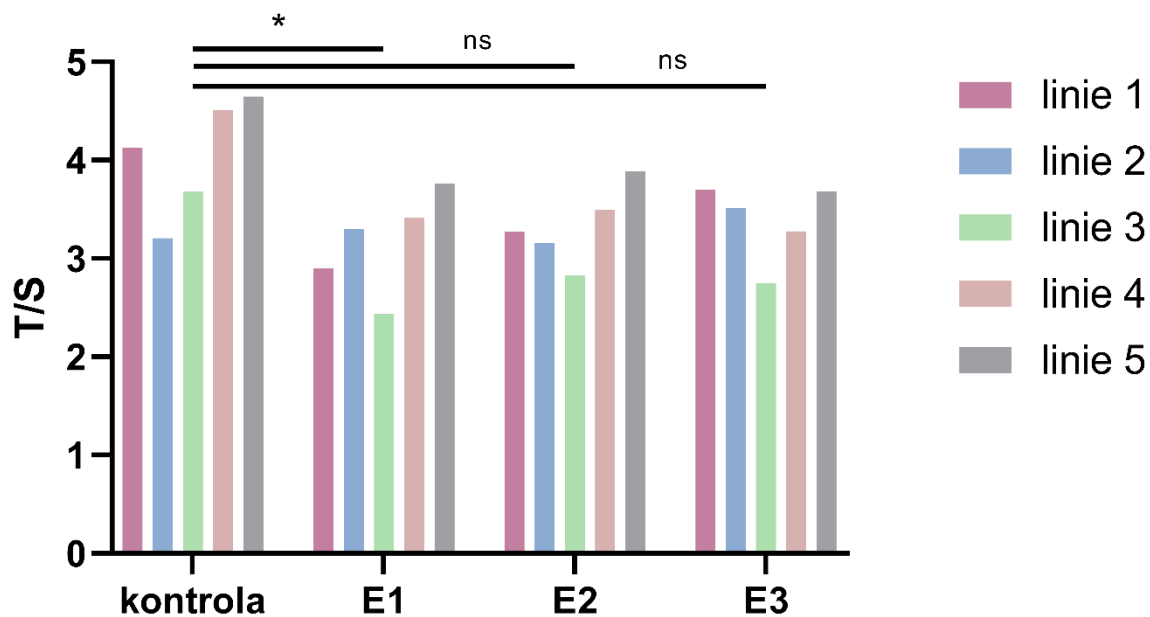


Graf 11. Analýza povrchových znaků kmenových buněk zubní dřevě linie 1-5 v 6. pasáži experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Grafy demonstrují procenta buněk v populaci barvených fluorochromaticky značenými protilátkami proti jednotlivým povrchovým znakům. Průměr skupiny je vyneseno jako 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.

4.2.7 Relativní telomerová délka

Relativní telomerová délka byla měřena v 5. pasáži a data byla zpracována modifikovanou metodou dle Cawthona. Ve všech experimentálních skupinách linií 1, 3, 4 a 5 byla relativní telomerová délka menší v porovnání s kontrolou. U linie 2 byla relativní telomerová délka experimentálních skupin E1 a E3 vyšší než u kontroly a v experimentální skupině E2 nižší než u kontroly. Statistická analýza mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami vykazovala statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a experimentální skupinou E1. Mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami E2 a E3 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Mezi experimentálními skupinami navzájem nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Ke statistické analýze byl použit Friedmanův test a Dunnův post hoc test.

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: $p = 0,0864$. Výsledky ilustrovány v grafu 12.



Graf 12. Relativní telomerová délka kmenových buněk zubní dřene na konci 5. pasáže experimentu s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou. Graf demonstruje poměr množství telomerové DNA (T) ku množství DNA single copy genu (S) linií 1-5 kultivovaných v kontrolním médiu (kontrola) a experimentálních médiích (E1-3). Statistická analýza byla provedena Friedmanovým testem následovaným Dunnovým post hoc testem; * $p < 0,05$. Statisticky nevýznamné výsledky vůči kontrolní skupině jsou označeny jako ns, rozdíly mezi experimentálními skupinami navzájem jsou statisticky nevýznamné.

5 Diskuse

KBZD jsou dobře dostupnou populací adultních mezenchymálních KB, jejichž odběr nezatěžuje dárce nad rámec plánovaného a z medicínského důvodu indikovaného zákroku. Díky jejich vysoké proliferační schopnosti je možno z několika desítek KB z jednoho zubu expandovat populaci do řádu milionů a jejich široká diferenciací schopnost umožňuje následné variabilní použití. KBZD mohou diferencovat v odontoblasty, osteoblasty, chondroblasty, myoblasty, adipocyty, buňky produkující insulin či endoteliální a neurální buňky a tento potenciál je možné využít v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně s přesahem tkání oboru stomatologie a maxilofaciální chirurgie. V orální oblasti výsledky studií naznačují, že *in vivo* aplikace KBZD do defektů čelistních kostí může podpořit jejich hojení a několik prací se věnuje i podpoře osteointegrace dentálních implantátů do kosti čelistí za použití KBZD [172-178]. Další práce popisují indukci regenerace zubní dřevě po aplikaci KBZD do dřevových dutin nevitálních zubů [179-181]. Počet prací na tato témata se rozšiřuje a lze předpokládat, že stejně jako v jiných oborech bude regenerativní medicína využívající kmenové buňky stále více akcentována i ve stomatologii a maxilofaciální chirurgii.

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 [182]. Díky tomu, že tato aplikace je již schváleným a studii podloženým postupem, je použití KH k těmto účelům bezpečné, a tedy lze za bezpečné považovat i samotné nosiče, které jsou zhotoveny ze stejného materiálu. Aplikaci nosiče z KH jsme ověřili i na našem pracovišti v rámci klinického výzkumu [183]. Nosič z kyseliny hyaluronové však nenesl buňky, ale byl vehikulem pro oktenidin-dihydrochlorid – antiseptickou sloučeninu používanou např. k dezinfekci dutiny ústní. Tento preparát byl vkládán do extrakčních ran postižených alveolární ostitidou (*alveolitis sicca*) s pozitivním účinkem na hojení. Preparát vykazoval nejen ránu obturující účinek, ale vedl i k snížení bolesti a plně se v ráně rozložil. 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 biodegradačních 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. Proto se v rámci našeho výzkumného projektu na téma vlivu KH na KBZD zaměřujeme na vliv KH o různých molekulárních hmotnostech na KBZD. V rámci této práce jsou prezentovány výsledky prvních dvou experimentů na toto téma.

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 nízko, středně a vysokomolekulární KH na buňky. Experimentem jsme se nesnažili získat statisticky významná data, na jejichž základě bychom definovali působení KH na KBZD, ale záměrem bylo zjistit, zda je vůbec možné KBZD v takovém prostředí kultivovat a využít tyto informace pro statisticky robustnější experimenty, které by se následně zaměřily na jednotlivá spektra molekulárních hmotností KH. 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. U použité KH byla výrobcem deklarována farmaceutická čistota – tento detail považujeme za velmi důležitý, neboť přítomnost nečistot, např. endotoxinů, může vést ke zkreslení či znehodnocení výsledků experimentu.

První problém experimentu byl technického charakteru. Jednalo se o rozpuštění KH v kultivačním médiu. Vzhledem k tomu, že KH kolem sebe ve vodném prostředí vytváří solvatační obal, dochází při vsypání práškové KH do média k tvorbě partikulí, na jejichž povrchu je gelová fáze tekutina-KH a uvnitř partikule je suchý prášek. Tato fáze brání řádnému promísení KH a média, které tak není možné pro experimenty použít. Řešením problému bylo zahřívání média na teplotu 37 °C a jeho důkladné míchání a třepání, což vedlo k plnému rozpuštění KH v médiu. Tento postup jsme pracovně pojmenovali „aktivní rozpouštění za tepla“. Efektivita mísení se zvýšila, pokud byla KH rozpouštěna v prostém Eaglovo minimálním esenciálním médiu v α modifikaci a až následně byly přidány suplementy, antibiotika a antimykotika, což výrazně omezilo pění při třepání. Alternativou k metodě zahřívání, třepání a míchání je ponechání KH v médiu po 24 hodin při 4 °C, kdy dojde k samovolnému rozpuštění. Pracovně jsme tento postup pojmenovali „pasivní rozpouštění za studena“. Více se nám osvědčila studená metoda, neboť nevyžaduje aktivní zapojení výzkumníka, její nevýhodou je však nutnost přípravy média v předstihu alespoň 24 hodin. Pozorovali jsme i rozdíl v rozpustnosti mezi jednotlivými frakcemi. Nejdéle se rozpouštěla VM KH, nejrychleji pak NM KH. Tento fenomén je dán vyššími hodnotami kohezivně-disperzního indexu (angl. cohesion–dispersion index) pro VM KH v porovnání s NM KH a také delším časem a vyšší energií nutnou pro proces „dientanglementu“, tedy rozpletení dlouhých molekulárních řetězců, které jsou do sebe na molekulární úrovni zapleteny [184, 185].

Odběr zubů, izolace, mobilizace, expanze a kryokonzervace KBZD byly úspěšné zejména díky dlouhodobé zkušenosti naší laboratoře s těmito postupy a precizně zpracované metodice. Neznámou nám však byla schopnost buněk adherovat a proliferovat za přítomnosti KH. Ta může tyto procesy ovlivnit jak funkčně, např. vazbou na povrchové receptory, ale i fyzicky, např. sedimentací na adhezní povrch kultivační nádoby a limitací adheze buněk. Buňky jsme proto po nasazení do experimentálních médií pozorovali pod fázovým mikroskopem a sledovali jejich adhezi a proliferaci. Mikroskopické pozorování neodhalilo rozdíly v adhezenci mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami. Limitací tohoto pozorování je, že bylo založeno na empirickém hodnocení výzkumníkem a nebylo objektivizováno. Této limitace jsme si byli vědomi a v případě, že bychom pozorovali rozdíly, jsme byli připraveni tyto kvantifikovat použitím programu ImageJ [186]. Rozdíly v proliferaci byly objektivizovány a hodnoceny na konci každé pasáže a v pilotním experimentu jsme nezaznamenali výrazných rozdílů. Stejně tak nebylo zaznamenáno významných změn buněčné viability mezi jednotlivými médii. Tímto jsme ověřili, že buňky v experimentálních médiích adherují k povrchu, proliferují 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 níže diferencovaným fenotypem [187]. 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 vzhledem k tomu, že obdobné výsledky byly pozorovány i v experimentu s NM KH, budou diskutovány v rámci tohoto experimentu. Expresí CD44 nebyla výrazně změněna, byť se jedná o znak, který obvykle bývá přítomností KH ovlivněn a má vztah k mineralizaci [167, 188]. 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.

Rozdíly v expresi jednotlivých znaků mezi liniemi, které jsou patrné z grafu 4, jsou u KBZD obvyklým fenoménem. KBZD jsou v mnoha ohledech fenotypově heterogenní

skupinou KB a při porovnávání vlivu proměnných na povrchové znaky je proto důležité porovnávat trendy v rámci linie, nikoliv sumární hodnoty kontrolní a experimentálních skupin, což je nutné zohlednit ve volbě statistické metody. Tato problematika bude detailněji rozvedena v diskuzi k experimentu s NM KH. Pilotní experiment neposkytuje dostatek dat pro validní statistickou analýzu, neboť do něj byly zapojeny jen dvě linie KBZD. Účelem vyšetření fenotypu bylo získat obecný přehled o změnách fenotypu KBZD pod vlivem KH. Tato data jsme následně využili v navazujících experimentech k zacílení analýzy na povrchové znaky, u kterých byl nejvyšší předpoklad ovlivnění 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.

Při plánování designu experimentu zaměřeném na vliv NM KH na KBZD bylo nejprve nutné zvolit vhodné fragmenty. Vzhledem k neexistenci pevně definovaných mezních hodnot, které by určovaly, jaké molekulární hmotnosti jsou nízké, střední nebo vysoké, je výklad této problematiky napříč vědeckými pracemi variabilní. Ve vědecké literatuře se můžeme setkat často s hranicí 500 kDa, která je pomyslnou linií mezi NM a VM KH, ale takto široké dělení je pro naše experimentální využití zcela nevhodné, neboť neodpovídá biodegradačním produktům KH produkované HYALs. Pro účely našeho výzkumu jsme se proto rozhodli zaměřit na takové frakce KH, 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, které budou jejich štěpením biodegradovány. Molekulární hmotnosti produktů těchto enzymů jsou známé, a pro účely experimentu jsme proto zvolili řetězce KH, které jim odpovídají – 800 Da, 1600 Da a 15 000 Da. Dalším důležitým parametrem je koncentrace KH v médiu. Bylo nutné zvážit, zda navážku definovat jako hmotnostní procento nebo vycházet z koncentrace molární. Vzhledem k tomu, že jsme chtěli docílit stejného počtu molekul KH v objemu média napříč experimentálními skupinami, zvolili jsme koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$. Zároveň bylo záměrně zvoleno několika molekulárních hmotností z obdobného spektra, neboť výsledky práce měly reflektovat obecně vliv NM KH. Tento postup byl zvolen, jelikož jsme nevěděli, zda u krátkých molekul KH, jejichž vliv na KBZD nebyl popsán, nebude každá ze zvolených frakcí působit odlišně. Tato hypotéza

se nepotvrdila, data napříč experimentálními skupinami se lišila minimálně a prezentované výsledky tak lze považovat za obecně platné pro dané spektrum KH. Vzhledem k velmi podobným výsledkům napříč experimentálními skupinami lze tyto vnímat i jako „kultivační replikace“ jejichž homogenita v rámci jedné linie reflektuje dobrou replikovatelnost výsledků. 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 jsme i v tomto experimentu sledovali, zda přítomnost KH neovlivňuje adhezenci buněk k povrchu kultivační nádoby. Byl zvolen stejný postup jako u pilotního experimentu, který neodhalil rozdíly v adhezenci buněk kultivovaných v kontrolním a experimentálních médiích. Stran viability jsme nepředpokládali, že by NM KH měla na buňky cytotoxický efekt, jelikož se jedná o molekulu vyskytující se v jejich přirozeném prostředí. 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 [189]. 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 [190]. 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. Následně byla provedena detailní analýza proliferační aktivity v jednotlivých pasážích, kterou byl zjištěn rapidní pokles proliferační aktivity buněk v experimentálních skupinách v první pasáži. Tento fenomén se vyskytoval pouze v první pasáži a nebyl zaznamenán v žádné z dalších pasáží. První pasáž byla od ostatních odlišná tím, že právě v této pasáži byly buňky poprvé nasazeny do experimentálních médií. Jednalo se tedy o náhlou změnu kultivačního prostředí. Možným vysvětlením prudkého poklesu v proliferační aktivitě je tak právě náhlá změna kultivačního prostředí spočívající v přítomnosti KH. Tento nálezn 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. Velmi zásadní je proto zjištění, že tento fenomén byl přítomen pouze v první pasáži, tedy v iniciační fázi kontaktu KBZD s novým prostředím, a následně již nebyl pozorován. 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.

Poté, co jsme ověřili, že NM KH nemá cytotoxický efekt a z dlouhodobého hlediska nemá výrazně negativní vliv na proliferační aktivitu KBZD, jsme se zaměřili na ovlivnění fenotypu buněk. Na základě dat z vědecké literatury jsme předpokládali, že obecně popisovaný vliv KH na povrchové znaky KBZD bude pozorovatelný i u NM KH. Jelikož ale neexistovala žádná data, která by se týkala vlivu fragmentů HYALs na KBZD, bylo nutné navrhnout panel sledovaných znaků široce s důrazem na povrchové znaky týkající se kmenovosti, diferenciaci, 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 vykazovalo 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 [191]. Výsledky korespondují se závěry práce Bringhof et al., která popisuje pozitivní korelaci mezi CD105 a CD166 v mezenchymálních KB [192]. Tyto nálezy mohou indikovat negativní vliv NM KH na expresi markerů asociovaných s fibroblasty a angiogenezí. CD31 a CD106, které jsou adhezivními molekulami typickými pro endoteliální buňky, byly ve všech skupinách exprimovány níže. 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. Průměrná pozitivita tohoto znaku v kontrolních skupině byla přibližně 14 %, v experimentálních skupinách pak < 1 %. CD106 je také nazýván vaskulární celulózní adhezivní molekula 1 (angl. vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Jedná se o buněčný povrchový protein, který mediuje adhezi leukocytů a endoteliálních buněk a byla popsána jeho cytokiny indukovaná exprese [193]. 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 znatelně 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 [194]. Dále studie uvádí, že exprese tohoto znaku je ovlivněna kultivačními podmínkami buněk a přítomností proteinů extracelulární matrix. Autoři také popisují, že tyto změny jsou regulovány cestou proteinkinázy B (PKB, též Akt) a inhibitory buněčného cyklu proteiny p53 a p21. Obdobné statisticky signifikantní snížení exprese v experimentálních skupinách bylo pozorováno i u CD117 (transmembránový receptor pro tyrosin kinázu, c-KIT). CD117 ovlivňuje signalizační kaskádu proteinkinázy B a má významnou roli v proliferaci, diferenciaci, adhezi, motilitě a angiogenezi u hematopoetických a nádorových stem-like cells (kmenovým buňkám podobné buňky) [195, 196]. 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. U linií 1 a 4 byla pozitivita buněk na CD133 v porovnání s liniemi 2, 3 a 5 v pořadí médií E1 / E2 / E3 5,6 / 5,6 / 4,3 krát vyšší. 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 [37, 197]. Tento náález je obtížné interpretovat, neboť znak CD133 je ve vztahu ke KBZD obecně považován za nedostatečně definovaný, jeho hodnoty exprese se liší napříč studii a ke správné interpretaci je na toto téma třeba dalších výzkumů [198]. Inverzní efekt byl pozorován u exprese CD146 (melanoma cell adhesion molecule, 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 [199]. U KBZD byly ale CD146+ buňky také identifikovány jako subpopulace promotorů pro regeneraci dentinových a dřeňových tkání a byla u nich zjištěna vysoká exprese alkalické fosfatázy (ALP), která je markerem diferenciace KBZD směrem k

odontoblastům a osteoblastům podobným buňkám [200, 201]. 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. Vysoká variabilita CD146 u KBZD, kterou jsme pozorovali v kontrolní skupině, byla popsána i jinými autory [40, 41, 202]. Přestože rozdíly v expresi CD146 mezi kontrolní a experimentální skupinou nejsou statisticky významné, je důležité zdůraznit rozptýl jednotlivých hodnot v kontrolní skupině a silný kontrast k uniformitě dat ve skupinách experimentálních. Variabilita KBZD je jedním z intenzivně studovaných a velmi aktuálních témat a jelikož zatím nebylo uspokojivě vysvětleno, může i tento pozorovaný fenomén přispět k jeho pochopení [42, 43, 203]. Proto považujeme za důležité komentovat tento výsledek detailněji. Při analýze exprese CD146 je patrné, že kontroly linií 1 a 2 byly CD146 pozitivní v 82,5 a 58,9 %. Kontroly linií 3-5 vykazovaly CD146 pozitivitu v 0,2, 4,8 a 6,7 %. V experimentálních skupinách byla ale exprese CD146 všech linií pouze v úzkém rozmezí 0,02-3,21 %. I když nebyla příčina variability exprese CD146 v kontrolní skupině v této ani v jiných studiích vysvětlena, je zřejmé, že v médiích obohacených o NM KH došlo u všech linií, včetně linií 1 a 2, k výraznému snížení a homogenizaci hodnot exprese tohoto znaku. Je předmětem hypotézy, zda původní odlehle hodnoty kontrol linií 1 a 2 byly zapříčiněny interindividuální variabilitou a pokud ano, zda byly tyto individuální znaky potlačeny přítomností NM KH. Zároveň je zajímavé i zjištění, že i pokud ze statistické analýzy vyloučíme linie 1 a 2, u kterých je pokles zcela zřejmý, výsledky srovnání kontrol a experimentálních skupin linií 3-5 poskytují také statisticky relevantní rozdíly: kontrola-E1 $p = 0,0269$; kontrola E2 $p = 0,0578$, kontrola-E3 $p = 0,1138$. Tyto výsledky ukazují, že i když je exprese CD146 v populaci KBZD variabilní, přítomnost NM KH vede pravděpodobně k jeho supresi ve všech liniích KBZD bez ohledu na jejich originální hodnotu exprese CD146. Mechanismus tohoto fenoménu může přispět k pochopení variability CD146 napříč liniemi. K potvrzení těchto hypotéze by však bylo nutné ověření na větším statistickém souboru.

V souladu s definicí mezenchymálních KB podle Dominici et al. byla pozorována nízká exprese povrchových znaků CD34 a CD45, a to ve všech skupinách [204]. CD34 je transmembránový fosfoglykoprotein, který je typickým markerem primitivních pluripotentních stromálních a hematopoetických KB [204]. V práci Alraies et al. byl CD34 byl identifikován jako možný marker pro stromální subset KBZD s původem

v neurální liště. Tento subset je distribuován variabilně napříč donory a i mezi jednotlivými zuby od jednoho dárce. CD34 analýza je jedním z možných nástrojů k identifikaci populací bohatých na tuto subpopulaci s původem v neurální liště a jejich klinickou aplikaci [205]. 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 (např. metodou fluorescent assisted cell sorting).

CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor, NGFR) je markerem, který se vyskytuje na povrchu mezenchymálních KB z různých tkání včetně tkání zubních [206, 207]. Práce Alvarez et al. popisuje CD271 jako marker, který se v populaci KBZD pojí s vysokou proliferační kapacitou a širokým diferenciačním potenciálem [207]. 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 [208, 209]. 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.

6 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, prolifерují 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 přidavkem 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.

7 Seznam citací použité literatury

- [1] Shahriyari L, Komarova NL. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLOS One*, 2013; 8:e76195.
- [2] Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019; 10:1-22.
- [3] Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*, 2009; 30:204-213.
- [4] Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M. An introduction to stem cell biology and tissue engineering. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier, 2015:1-13.
- [5] Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nature Medicine*, 1996; 2:198-203.
- [6] Vierck J, McNamara J, Dodson M. Proliferation and differentiation of progeny of ovine unilocular fat cells (adipofibroblasts). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 1996; 32:564-572.
- [7] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage - like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis & Rheumatism*, 2003; 48:418-429.
- [8] Young HE, Black Jr AC. Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 2004; 276:75-102.
- [9] Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in Cancer Research*, 2008; 100:133-158.
- [10] Karamzadeh R, Eslaminejad MB. Dental-related stem cells and their potential in regenerative medicine. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. London: IntechOpen, 2013.
- [11] Ikeda E, Yagi K, Kojima M, et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 2008; 76:495-505.
- [12] 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.

- [13] Sukarawan W, Osathanon T. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: Biology and Therapeutic Potential. In: Phuc VP ed. Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization and Applications. London: IntechOpen, 2017:55.
- [14] 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.
- [15] Zhang J, Ding H, Liu X, et al. Dental follicle stem cells: tissue engineering and immunomodulation. Stem Cells and Development, 2019; 28:986-994.
- [16] Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. BioMed Research International, 2019; 2019:6104738.
- [17] Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. International Journal of Stem Cells, 2015; 2015:972313.
- [18] Venkatesh D, Kumar KM, Alur JB. Gingival mesenchymal stem cells. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 2017; 21:296.
- [19] Gronthos S, Mankani M, Brahimi 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.
- [20] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003; 100:5807-5812.
- [21] Seo B-M, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. The Lancet, 2004; 364:149-155.
- [22] Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biology, 2005; 24:155-165.
- [23] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLOS One, 2006; 1:e79.
- [24] Zhang Q, Shi S, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. The Journal of Immunology, 2009; 183:7787-7798.

- [25] Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, 2010; 133:95.
- [26] Ercal P, Pekozer GG, Kose GT. Dental stem cells in bone tissue engineering: current overview and challenges. *Cell Biology and Translational Medicine*, 2018; 113-127.
- [27] Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine*, 2017; 49:644-651.
- [28] Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Frontiers of Medicine*, 2019; 13:152-159.
- [29] Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2015; 6:29.
- [30] Manivasagam G, Reddy A, Sen D, et al. Dentistry: Restorative and Regenerative Approaches. In: Narayan R ed. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Amsterdam: Elsevier, 2019:332-347.
- [31] 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.
- [32] Tsutsui TW. Dental pulp stem cells: advances to applications. *Stem Cells Cloning*, 2020; 13:33.
- [33] Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, et al. Human dental pulp stem cells grown in neurogenic media differentiate into endothelial cells and promote neovasculogenesis in the mouse brain. *Frontiers in Physiology*, 2019; 10:347.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.

- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Pilbauerova N, Soukup T, Kleplova TS, Suchanek J. Enzymatic Isolation, Amplification and Characterization of Dental Pulp Stem Cells. *Folia biologica*, 2019; 65:124-133.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Goldberg M, Hirata A. The dental pulp: composition, properties and functions. *JSM Dentistry*, 2017; 5:1079.
- [47] Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*, 2016; 28:78-88.

- [48] Cyphert JM, Trempus CS, Garantziotis S. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *International Journal of Cell Biology*, 2015; 2015.
- [49] Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 1934; 107:629-634.
- [50] Levene PA, López-Suárez J. Mucins and mucoids. *Journal of Biological Chemistry*, 1918; 36:105-126.
- [51] Beauregard H. Étude du corps vitré. *Journal d'anatomie et de physiologie*, 1880; 16:233-272.
- [52] Kendall FE, Heidelberger M, Dawson MH. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 1937; 118:61-69.
- [53] Selyanin M, Boykov P, Khabarov V, Polyak F. The history of hyaluronic acid discovery, foundational research and initial use, in hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine. In: Selyanin M, et al. eds. *Hyaluronic Acid*. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd Chichester, 2015:1-9.
- [54] Thonard JC, Migliore SA, Blustein R. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Cultures of Streptococci. *Journal of Biological Chemistry*, 1964; 239:726-728.
- [55] Balazs EA. Hyaluronate based compositions and cosmetic formulations containing same. Patent number: US-4303676-A. USA, 1981.
- [56] Balazs EA. Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. Patent number: US-4141973-A. USA, 1979.
- [57] Akasaka H, Komasaki H, Arai T. Fermentation method for producing hyaluronic acid. Patent number: US-4801539-A. USA, 1989.
- [58] Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari medicina*, 2008; 53:397-411.
- [59] Li J, Qiao M, Ji Y, et al. Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 152:199-206.
- [60] Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers*, 2020; 12:1800.

- [61] Chistyakov DV, Astakhova AA, Azbukina NV, et al. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influences Oxylipins Synthesis in Course of Neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20:3894.
- [62] Rivas F, Zahid OK, Reesink HL, et al. Label-free analysis of physiological hyaluronan size distribution with a solid-state nanopore sensor. *Nature Communications*, 2018; 9:1037.
- [63] Jing W, DeAngelis PL. Synchronized chemoenzymatic synthesis of monodisperse hyaluronan polymers. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:42345-42349.
- [64] de Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV, et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 2016; 15:1-19.
- [65] Sze JH, Brownlie JC, Love CA. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*, 2016; 6:67.
- [66] 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.
- [67] Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltes L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*, 2009; 16:1718-1745.
- [68] Bala E, Hazarika R, Singh P, Yasir M, Shrivastava R. A biological overview of Hyaluronidase: A venom enzyme and its inhibition with plants materials. *Materials Today: Proceedings*, 2018; 5:6406-6412.
- [69] Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 2018; 10:701.
- [70] Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews*, 2006; 106:818-839.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] Frenkel JS. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*, 2014; 11:159-163.
- [74] Ignatova EY, Gurov A. Principles of extraction and purification of hyaluronic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1990; 24:211-216.
- [75] Amagai I, Tashiro Y, Ogawa H. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. *Fisheries Science*, 2009; 75:805-810.
- [76] Boeriu CG, Springer J, Kooy FK, van den Broek LA, Eggink G. Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013; 2013.
- [77] O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C, Lansing M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1994; 16:283-286.
- [78] Mendichi R, Šoltés L. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid. *Journal of Inflammation Research*, 2002; 51:115-116.
- [79] Kim J-H, Yoo S-J, Oh D-K, et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996; 19:440-445.
- [80] Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 2011; 10:1-9.
- [81] Armstrong D, Cooney M, Johns M. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997; 47:309-312.
- [82] Im J-H, Song J-M, Kang J-H, Kang D-J. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009; 36:1337.
- [83] Huang W-C, Chen S-J, Chen T-L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2006; 32:239-243.

- [84] Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 2008; 99:8532-8536.
- [85] Jagannath S, Ramachandran K. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 2010; 48:148-158.
- [86] DeAngelis PL, Jing W, Graves MV, Burbank DE, Van Etten JL. Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science*, 1997; 278:1800-1803.
- [87] Yamada T. Method for separating/purifying hyaluronic acid and/or chitin. Patent number: JP-3989866-B2. Japan, 2004.
- [88] Jing W, DeAngelis PL. Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase: two active sites exist in one polypeptide. *Glycobiology*, 2000; 10:883-889.
- [89] Kogan G, Soltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007; 29:17-25.
- [90] Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992; 6:2397-404.
- [91] Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 2004; 4:528-39.
- [92] Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology*, 2013; 6:111-125.
- [93] Bothner H, Wik O. Rheology of hyaluronate. *Acta oto-laryngologica Supplementum*, 1987; 442:25-30.
- [94] Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 2012; 4:253-258.
- [95] Baumann L. Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology*, 2007; 211:241-51.
- [96] Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 2009; 1:461-468.
- [97] Jackson A, Gu W. Transport properties of cartilaginous tissues. *Current Rheumatology Reviews*, 2009; 5:40-40.

- [98] Hlaváček M. The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints--I. Mixture model of synovial fluid. *Journal of Biomechanics*, 1993; 26:1145-50.
- [99] Frost SJ, Weigel PH. Binding of hyaluronic acid to mammalian fibrinogens. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1990; 1034:39-45.
- [100] Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 1997; 242:49-55.
- [101] Park D, Kim Y, Kim H, et al. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Molecules and Cells*, 2012; 33:563-574.
- [102] 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.
- [103] Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews*, 2011; 91:221-64.
- [104] Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2010; 126:1172-1180.
- [105] Longaker MT, Chiu ES, Adzick NS, et al. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Annals of Surgery*, 1991; 213:292-296.
- [106] Iocono JA, Ehrlich HP, Keefer KA, Krummel TM. Hyaluronan induces scarless repair in mouse limb organ culture. *Journal of Pediatric Surgery*, 1998; 33:564-7.
- [107] Hu M, Sabelman EE, Cao Y, Chang J, Hentz VR. Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2003; 67:586-92.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.

- [111] Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 2006; 85:699-715.
- [112] Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, 1983; 220:1177-9.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, Koh TJ, Gemeinhart RA. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2015; 1:481-493.
- [117] Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 1980; 40:435-446.
- [118] Suzuki Y, Yamaguchi T. Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active oxygen release. *Agents Actions*, 1993; 38:32-7.
- [119] Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, et al. Activation and transforming growth factor-beta production in eosinophils by hyaluronan. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000; 23:444-51.
- [120] West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985; 228:1324-6.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] 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.
- [125] Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275:27641-9.
- [126] 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.
- [127] 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.
- [128] Sato H, Takahashi T, Ide H, et al. Antioxidant activity of synovial fluid, hyaluronic acid, and two subcomponents of hyaluronic acid. Synovial fluid scavenging effect is enhanced in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatology*, 1988; 31:63-71.
- [129] Soltés L, Mendichi R, Kogan G, et al. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*, 2006; 7:659-68.
- [130] Juranek I, Stern R, Šoltés L. Hyaluronan peroxidation is required for normal synovial function: An hypothesis. *Medical Hypotheses*, 2014; 82:662-666.
- [131] Albano GD, Bonanno A, Cavalieri L, et al. Effect of High, Medium, and Low Molecular Weight Hyaluronan on Inflammation and Oxidative Stress in an In Vitro Model of Human Nasal Epithelial Cells. *Mediators of Inflammation*, 2016; 2016:8727289-8727289.
- [132] Evanko SP, Potter-Perigo S, Petty LJ, Workman GA, Wight TN. Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF- β 1 Induction of Lung Myofibroblasts. *Matrix Biology*, 2015; 42:74-92.

- [133] McCarthy JB, El-Ashry D, Turley EA. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018; 6:48.
- [134] Kultti A, Li X, Jiang P, et al. Therapeutic Targeting of Hyaluronan in the Tumor Stroma. *Cancers*, 2012; 4.
- [135] Wu M, Cao M, He Y, et al. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *The FASEB Journal*, 2015; 29:1290-1298.
- [136] Dahl LB, Dahl IM, Engström-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1985; 44:817-22.
- [137] Hällgren R, Samuelsson T, Laurent TC, Modig J. Accumulation of hyaluronan (hyaluronic acid) in the lung in adult respiratory distress syndrome. *The American Review of Respiratory Disease*, 1989; 139:682-7.
- [138] Waldenström A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hällgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 1991; 88:1622-8.
- [139] Lewis A, Steadman R, Manley P, et al. Diabetic nephropathy, inflammation, hyaluronan and interstitial fibrosis. *Histology and Histopathology*, 2008; 23:731-9.
- [140] de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *The American Journal of Pathology*, 2003; 163:121-33.
- [141] Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2014; 5:101-101.
- [142] Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 2013; 92:1262-1279.
- [143] 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.

- [144] 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.
- [145] Kim JH, Moon MJ, Kim DY, Heo SH, Jeong YY. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers*, 2018; 10.
- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] Ahearne M, Fernández-Pérez J, Masterton S, Madden P, Bhattacharjee P. Designing Scaffolds for Corneal Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 2020; 30:1908996.
- [149] 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.
- [150] Haugen HJ, Basu P, Sukul M, Mano JF, Reseland JE. Injectable Biomaterials for Dental Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21.
- [151] 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.
- [152] 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.
- [153] 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.
- [154] Heljak M, Swieszkowski W, Kurzydłowski KJ. Modeling of the Degradation Kinetics of Biodegradable Scaffolds: The Effects of the Environmental Conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014; 131.
- [155] Zhang H, Zhou L, Zhang W. Control of scaffold degradation in tissue engineering: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2014; 20:492-502.

- [156] Hortensius R, Harley B. 2.16 Collagen-GAG materials. In: Ducheyne P ed. *Comprehensive Biomaterials II*. Oxford: Elsevier, 2017:351-380.
- [157] Martins JP, Ferreira MP, Ezazi NZ, et al. 3D printing: prospects and challenges. In: Uskoković V, Uskoković DP eds. *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine*. Amsterdam: Elsevier, 2018:299-379.
- [158] Fillion MC, Phillips NC. Pro-inflammatory activity of contaminating DNA in hyaluronic acid preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2001; 53:555-61.
- [159] 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.
- [160] Suchánek J, Browne K, Kleplová T, Mazurová Y. Protocols for Dental-Related Stem Cells Isolation, Amplification and Differentiation. In: Barbara Z, Eriberto B eds. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. Cham: Humana Press, 2016:27-56.
- [161] Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*, 2018; 20:479-498.
- [162] Mokry J, Soukup T, Micuda S, et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010; 2010:673513.
- [163] 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.
- [164] Compton KB. *Synthesis and Characterization of Methacrylated Hyaluronan-Based Hydrogels for Tissue Engineering*. Thesis and Disertations. University of Tennessee. Tennessee, 2014.
- [165] 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.
- [166] 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.

- [167] 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.
- [168] Jensen J, Kraft DC, Lysdahl H, et al. Functionalization of polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and β -TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Tissue Engineering Part A*, 2015; 21:729-39.
- [169] 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.
- [170] 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.
- [171] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30:e47-e47.
- [172] Manimaran K, Sharma R, Sankaranarayanan S, Perumal SM. Regeneration of mandibular ameloblastoma defect with the help of autologous dental pulp stem cells and buccal pad of fat stromal vascular fraction. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 2016; 6:97-100.
- [173] Chamieh F, Collignon A-M, Coyac BR, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific Reports*, 2016; 6:38814-38814.
- [174] Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant*, 2011; 20:1003-13.
- [175] Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 2019; 11:e373-e381.
- [176] Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2011; 26:947-54.

- [177] Sushmita V, Kumar JC, Hegde C, Kurkalli B. Interaction of dental pulp stem cells in bone regeneration on titanium implant. An in vitro study. *Journal of Osseointegration*, 2019; 11:553-560.
- [178] Guzalinuer A, Muhetaer H, Wu H, Paerhati A. Experimental study on the transforming growth factor β 3 combined with dental pulp stem cells in early bone integration of implant. *Chinese Journal of Stomatology*, 2018; 53:259-263.
- [179] Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, et al. Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. *Journal of Dental Research*, 2018; 97:1137-1143.
- [180] Zhu X, Zhang C, Huang GT, et al. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *Journal of Endodontic*, 2012; 38:1604-9.
- [181] Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Tissue Engineering Part A* 2015; 21:550-63.
- [182] Graça MFP, Miguel SP, Cabral CSD, Correia IJ. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2020; 241:116364.
- [183] 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.
- [184] Falcone SJ, Palmeri DM, Berg RA. Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006; 76:721-8.
- [185] Miller C, A B, Koenig, L J. A review of polymer dissolution. *Progress in Polymer Science*, 2003; 28:1223.
- [186] Rasband WS. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 1997-2018
- [187] Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research*, 2002; 12:321-9.
- [188] 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.

- [189] 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.
- [190] 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.
- [191] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*, 2003; 17:984-992.
- [192] 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.
- [193] 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.
- [194] 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.
- [195] 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.
- [196] Edling CE, Hallberg B. c-Kit—A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007; 39:1995-1998.
- [197] 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.
- [198] 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.
- [199] 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.

- [200] 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.
- [201] 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.
- [202] Nam H, Kim G-H, Bae Y-K, et al. Angiogenic Capacity of Dental Pulp Stem Cell Regulated by SDF-1 α -CXCR4 Axis. *Stem Cells International*, 2017; 2017:8085462.
- [203] Yang C, Chen Y, Zhong L, et al. Homogeneity and heterogeneity of biological characteristics in mesenchymal stem cells from human umbilical cords and exfoliated deciduous teeth. *Biochemistry and Cell Biology*, 2019; 98:415-425.
- [204] 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.
- [205] 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.
- [206] 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.
- [207] 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.
- [208] Macrin D, Alghadeer A, Zhao YT, et al. Metabolism as an early predictor of DPSCs aging. *Scientific Reports*, 2019; 9:2195.
- [209] 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.