

**Univerzita Karlova**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

**Jakub Suchánek**

**Hradec Králové**

**2019**

**Univerzita Karlova**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Kmenové buňky izolované ze zubní dřevě stálých, dočasných  
a natálních zubů

Dental pulp stem cells derived from dental pulp of  
permanent, deciduous and natal teeth

MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.

## **Prohlášení autora:**

Prohlašuji tímto, že jsem habilitační práci zpracoval samostatně a 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 své práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové,

MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval doc. MUDr. V. Hubkové, CSc., emeritní přednostce Stomatologické kliniky LF UK a FN v Hradci Králové, za možnost pracovat na tomto renomovaném klinickém pracovišti, a zahájit tak svou akademickou činnost. Zvláště pak jí děkuji za zprostředkování možnosti vědecké spolupráce s Ústavem histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové. Děkuji též doc. MUDr. R. Slezákovi, CSc., současnému přednostovi kliniky, který mě v mé vědecké práci nadále podporoval. Stejně tak patří moje poděkování kolegům z pracoviště, kteří mě v době méj občasné nepřítomnosti zastupovali.

Moje díky patří také prof. MUDr. J. Mokrému, Ph.D., přednostovi Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové, který mně umožnil využít zázemí tohoto ústavu a pracovat v něm. Velký dík patří také MUDr. T. Soukupovi, Ph.D., a laborantce paní H. Rückerové, s nimiž jsme zaváděli všechny postupy izolace a kultivace kmenových buněk izolovaných ze zubní dřevě, a to zejména za jejich cenné rady a konzultace našich postupů.

V neposlední řadě, o to však více, musím poděkovat mé manželce MDDr. T. Suchánkové Kleplové za podporu a zázemí. Zejména díky jejímu pochopení jsem měl možnost plně se věnovat svým odborným aktivitám.

## **Obsah**

<b>1 Úvod</b>	6
1.1 Kmenové buňky	6
1.2. Kultivační médium	7
1.2.1 Bezsérová kultivační média	10
1.2.2 Alogenní/autologní suplementy kultivačních médií	10
1.3 Teoretický úvod do problematiky kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene	11
1.3.1 Protocols for Dental-Related Stem Cells Isolation, Amplification and Differentiation	12
<b>2 Kmenové buňky zubní dřene</b>	43
2.1 Human dental pulp stem cells - isolation and long term cultivation	46
2.2 Dental pulp stem cells and their characterization	53
2.3 Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low-serum containing medium	58
2.4 Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions	80
2.5 Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells	86
2.6 The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells	97
2.7 Human plasma and human platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells	105
2.8 Enzymatic isolation, amplification and characterization of dental pulp stem cells	113
2.9 Shrnutí vlastních poznatků o kmenových buňkách zubní dřene	123
2.9.1 Obecné vlastnosti kmenových buněk zubní dřene	123
2.9.2 Vliv složení kultivačního média	124
<b>3 Kmenové buňky zubní dřene dočasných zubů</b>	126
3.1 Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis	128
3.2 In vitro kultivace kmenových buněk zubní pulpy dočasných zubů v nízkoprocentním xenogenním médiu	135

3.3 Proliferative Capacity and Phenotypical Alteration of Multipotent Ecto-Mesenchymal Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Cultured in Xenogeneic and Allogeneic Media	144
3.4 Shrnutí vlastních poznatků o kmenových buňkách zubní dřene dočasných zubů	158
3.4.1 Obecné vlastnosti kmenových buněk zubní dřene dočasných zubů	158
3.4.2 Vliv složení kultivačního média	159
<b>4 Kmenové buňky zubní dřene natálních/neonatálních zubů</b>	160
4.1 Characteristics of Human Natal Stem Cells Cultured in Allogeneic Medium	164
4.2 The Differentiation Potential of Human Natal Dental Pulp Stem Cells into Insulin- Producing Cells	173
4.3 Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth	180
4.4 Shrnutí vlastních poznatků o kmenových buňkách zubní dřene natální a neonatálních zubů	193
4.4.1 Obecné vlastnosti kmenových buněk zubní dřene natální a neonatálních zubů	193
<b>5 Závěr</b>	194
<b>6 Literatura</b>	196

## 1 Úvod

Habilitační práce "Kmenové buňky izolované ze zubní dřene stálých, dočasných a natálních zubů" je koncipována jako soubor komentovaných publikací, které shrnují naše dosavadní výsledky při studiu kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene natálních, dočasných a stálých zubů.

Habilitační práce obsahuje kapitolu z monografie "*Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. S. 1.: Springer International Publishing, 2016" oceněnou v roce 2017 rektorem Univerzity Karlovy v rámci významných monografií, a dále 14 publikací, na kterých se habilitant podílel jako první autor či spoluautor. Tyto práce byly publikovány v recenzovaných časopisech (8x) nebo časopisech s IF (6x) v tomto zastoupení: *Folia Biologica (Praha)* 3x, *Scientific Reports* 1x, *Cells Tissue and Organs* 1x, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1x, *Acta Medica (Hradec Králové)* 5x, *Biomedical Papers* 1x, *Brazilian Dental Journal* 1x, *Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství* 1x.

Společným tématem výše jmenovaných publikací je zavedení protokolu izolace a kultivace kmenových buněk zubní dřene stálých, dočasných a natálních zubů, charakterizace jejich biologických vlastností, snaha autorů o poznání vlivu fetálního telecího séra v kultivačním médiu na kultivované kmenové buňky a vývoj kultivačního média, v němž by bylo fetální telecí sérum nahrazeno jiným suplementem.

### 1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (KB) lze obecně charakterizovat jako mateřské buňky ostatních buněčných řad tvořících mnohobuněčný organismus. První kmenová buňka vzniká spojením spermie a vajíčka, a dává tak vznik celému organismu. V tomto organismu jsou kmenové buňky zodpovědné za vývoj a obnovu jednotlivých tkání. Následně jsou proto uchovávány v neaktivním stavu pro případnou regeneraci poškozených tkání (dormativní somatické kmenové buňky).

Na rozdíl od somatických buněk (SB) jsou kmenové buňky obdařeny několika unikátními vlastnostmi. Jednou z těchto vlastností je přítomnost telomerázy, která umožňuje po proběhlém dělení dosyntetizovat zkrácený úsek telomer, a tak zajistit jejich neomezený proliferační potenciál a teoreticky i nesmrtelnost těchto buněčných populací. Obecně lze říci,

že díky zkracování telomer nejsou somatické buňky schopny překročit tzv. Hayflickův limit, který činí cca 42 populačních zdvojení, neboť dříve podlehnou senescenci.

Další zásadní vlastností, která odlišuje KB od SB, je schopnost jejich asymetrického dělení a diferenciaci v širokou škálu zralých buněčných elementů. Tato vlastnost zůstává v různé míře zachována u všech linií kmenových buněk. Dle schopnosti diferenciaci dělíme KB na totipotentní (zygota), multipotentní (embryonální kmenové buňky) a pluripotentní (např. mesenchymální kmenové buňky). Totipotentní zygota je schopna vyžrávat v jakoukoliv tkáň vznikajícího embrya a na rozdíl od embryonální kmenové buňky (EKB) je schopná dát vzniku i extraembryonální tkáni – trofoblastu. EKB jsou buněčnou linií izolovanou ze vznikajícího embrya v období blastocysty, konkrétně z embryoblastu. Izolace těchto buněk je většinou spojena se zánikem embrya, a proto experimentální práce s těmito buňkami vyvolává mnoho etických otázek. Nejzralejší linií KB jsou pluripotentní kmenové buňky, které jsou schopny diferencovat pouze v tkáni příslušného zárodečného listu. Teoreticky mohou být izolovány v jakékoliv fázi života mnohobuněčného organismu; a to od začátku organogeneze. Dceřinou linií mesenchymálních kmenových buněk jsou buňky progenitorové. Tyto buňky jsou tzv. oligopotentní, a mají tak velmi omezenou schopnost diferenciaci. Poslední buněčnou linií v řadě maturace jsou buňky prekurzorové, které jsou již jen unipotentní. Linie progenitorových a prekurzorových buněk nejsou schopny neomezené proliferace a nejsou proto považovány za formu kmenových buněk, nýbrž za buňky somatické.

## **1.2 Kultivační médium**

Terapie kmenovými buňkami je zajímavá a slibná cesta k regeneraci ztracených či poškozených tkání. Přestože na vědeckém poli kultivace buněk došlo od roku 1968 k velkému pokroku, stále se potýkáme s množstvím neznámých veličin; což neumožňuje bezpečné provedení klinických studií (1, 2). Jediná možnost, jak se vyhnout selhání případné terapie a jejím nežádoucím účinkům, je dokonalé porozumění změnám, kterým podléhají vlastnosti MKB za měnících se vlivů prostředí (3, 4, 5). V současnosti rozpoznáváme dva hlavní faktory ovlivňující vlastnosti kultivovaných MKB, jimiž jsou interindividuální rozdíly dárců (6, 7, 8) a složení kultivačního média (9). Z tohoto pohledu se jedná zejména o xenogenní složky kultivačních médií, které s sebou nesou medicínské a etické námitky ohledně jejich použití v humánní medicíně (10).



Aby bylo možné výzkumná data mezi sebou porovnávat, potvrdit jejich věrohodnost, a umožnit tak jejich aplikaci v buněčné terapii, byly vytvořeny dva následující právní předpisy, jimiž jsou směrnice Evropské unie *EU Tissues and Cells Directive (2004/23/EC)* (11, 12) a v USA platná *U. S. current good manufacturing practice guidelines (cGMP)* (13), jež určují a popisují, za jakých podmínek by měla být původní buněčná linie izolována a dále kultivována. Účelem těchto předpisů je minimalizovat rozdíly mezi buněčnými liniemi stejného původu, minimalizovat riziko kontaminace, imunitní reakce a imunizace v důsledku virové infekce, nebo internalizace xenogenních proteinů (14, 15). Aby byly splněny požadavky těchto nařízení, musí být zaveden systém kontroly kvality a čistoty vstupního biologického materiálu, stejně jako platnost a správnost samotného výzkumného protokolu.

Z tohoto důvodu se pozornost části vědecké komunity obrací k náhradě kultivačních médií s obsahem xenogenních doplňků buď chemicky definovanými uměle vytvořenými médii, která neobsahují žádné komponenty získané z krve, nebo médii obohacenými pouze o komponenty krve lidské, ideálně krve autologní (16, 17). Ačkoliv není možné standardizovat ani komponenty lidské krve, jejich použitím se vyhneme internalizaci zvířecích látek a především vyloučíme riziko přenosu zoonóz a imunogenicity (18, 19, 20).

Přes výše uvedené argumenty využívá naprostá většina preklinických a hlavně klinických studií média s 10-20% koncentrací fetálního telecího séra (FCS), což pravděpodobně vede k variabilitě získaných výsledků, a to od proliferační aktivity, přes viabilitu, až po rozdíly v expresi povrchových znaků. Ukazuje se, že MKB podléhají vlivem vysokých koncentrací FCS spontánní diferenciaci, kdy je časový faktor závislý na hodnotě koncentrace FCS (21). Tento vliv není omezen pouze na MKB; byl pozorován například u prekursorů adipocytů, kdy použití FCS vede ke zvýšené aktivitě glycerolfosfát-dehydrogenázy, a způsobuje tak jejich diferenciaci (22). Proliferační aktivita neurálních progenitorů je redukována, pokud jsou kultivovány v kultivačním médiu s FCS bez přidání cytokinů (23).

Díky vysokému obsahu růstových stimulačních faktorů a naopak nízkému podílu inhibičních růstových faktorů (v kombinaci s neschopností vědy vytvořit odpovídající arteficiální náhradu) se stalo FCS nejvíce využívaným růstovým doplňkem v kultivačních médiích. Dosud se při izolaci a expanzi MKB často spoléhá na média obsahující vysoké koncentrace FCS ( $\geq 10\%$ ), což umožňuje lepší adhezi buněk primokultury k povrchu kultivační nádoby (24, 25, 26), především ale jedinou xenogenní/arteficiální možnost, jak udržet vysokou proliferační aktivitu buněčných linií bez nutnosti přidávat další doplňkové růstové faktory

(10). Avšak použití vysokých koncentrací FCS během dlouhodobé kultivace MKB může vést ke spontánní diferenciaci (27, 28, 29), nebo maligní transformaci (30, 31, 32).

S ohledem na původ séra není možné zaručit stabilitu a neměnné složení jednotlivých šarží FCS (33, 34). Přesto řada recentních klinických studií využívá kultivační média obohacená právě o FCS, přehlížejíce nejen nestabilní složení, ale především potenciální nebezpečí, které s sebou nese používání xenogenních komponent. Zároveň jejich autoři opomíjejí nutnost verifikovat vliv takových doplňků na kultivované buňky. Zejména hovězí sérové proteiny mohou být jednoduše internalizovány kmenovými buňkami a stimulovat tak imunogenitu v organismu příjemce následovanou závažnými komplikacemi (18, 15, 35). Dokonce může dojít i k přenosu virové nebo prionové nákazy (19, 20). Toto sérum obsahuje mnoho polypeptidů, které mohou indukovat metabolické a morfologické změny kultivovaných buněk (36, 23). Všechny zmíněné vedlejší účinky jsou dobře popsány, přesto nejsou tyto poznatky v řadě klinických studií náležitě reflektovány. Studií, která ilustruje tuto praxi, může být například práce o léčbě infarktu myokardu myoblasty kultivovanými v médiu doplněném FCS, která vyústila ve vznik smrtelné maligní ventrikulární arytmie recipienta (37); dalším příkladem je kupříkladu práce o léčbě nedostatku adenosinové deaminázy autologními T lymfocyty kultivovanými v médiu s FCS, která vedla ke vzniku specifických protilátek proti fetálnímu telecímu séru (38).

Použití xenogenních suplementů není pouze zcela v rozporu se správnou laboratorní a výrobní praxí (39, 17, 40, 41, 42). Existuje velké množství důkazů, že při aplikaci MKB kultivovaných v xenogenním médiu se mohou u příjemce vyskytnout vážné zdravotní problémy. Kocaoemer et al. (2007) upozornili na případy popsané v literatuře, kdy aplikace takto připravených buněk vyvolaly vážné imunitní reakce způsobené pravděpodobně internalizací bovinních proteinů (18, 35, 38, 43, 44). Suchánek et al. (2013) také poukázali na nestabilitu karyotypu, která může způsobit maligní transformaci buněk (45); Bruinink (2004) a Dictus (2007) pozorovali metabolické a morfologické změny, které vedly k pozorované větší variabilitě v chování hMSCs (23, 36); Halme a Kessler (2006) (19) a také WHO (1997)

(20) zdůraznili nebezpečí transferu zoonóz, především virových a prionových infekcí, na lidského příjemce (37; 44). Z výše uvedených důvodů mezinárodní lékařská komunita usiluje o zákaz používání xenogenních suplementů během klinických testů na lidech a v medicíně obecně (17, 20, 39). Přes všechny výše uvedené výhrady zůstává fetální telecí/bovinní sérum (FCS/FBS) (33) zdaleka nejrozšířenějším suplementem v experimentálních *in vitro* kultivacích MKB, především pro vysokou koncentraci růstových faktorů (46). Z toho důvodu

je většina vědeckých poznatků o hMSCs založena na jejich kultivaci v médiích obohacených o FCS (16).

Z uvedeného vyplývá potřeba objektivizovat vlastnosti MKB, bohužel malé množství buněk izolovaných z tkáně neumožňuje provést nutné testy ihned po izolaci a je zapotřebí KB po nějakou dobu expandovat v *in vitro* podmínkách. Tímto ale může dojít ke změně vlastností těchto buněk. Naší snahou tedy musí být nalezení takovou náhradu FCS, která vlastnosti kultivovaných KB měnit nebude, nebo změny budou minimální. Nejlepším východiskem se zdá substituce dosud používaného FCS některou komponentou lidské krve (alogenního, lépe autologního původu), nebo přímo bezsérovým médiem.

### **1.2.1 Bezsérová kultivační média**

Ani alogenní a bezsérová média nejsou prosta problémů. Přestože složení bezsérového média může být standardizováno, plně chemicky definováno, čímž bude umožněna plná kontrola nad kultivačními podmínkami při eliminaci potenciálního zdroje zoonóz, ukázala se pro některé typy MKB naprosto nevhodná (18, 19, 43, 44, 47). Obecně v nich buňky vykazují nízkou proliferační aktivitu a získání potřebného počtu KB pro analýzy je obtížné (48). Dosud nebyl vyvinut arteficiální produkt, který by byl fakticky schopen pokrýt požadavky MKB při kultivaci *in vitro* (49); přestože by chemicky definované bezsérové médium mělo být, v důsledku vyloučení nekontrolovatelných proměnných, ideální pro pionýrskou vědeckou práci, jako je charakterizace nových buněčných linií, nebo výhodou pro snazší reprodukovatelnost výsledků.

### **1.2.2 Alogenní/autologní suplementy kultivačních médií**

Dalším suplementem, kterým se dá nahradit xenogenní doplněk, je alogenní sérum, které je levnější variantou než bezsérové doplňky a je univerzálně použitelné pro všechny typy MKB (46). Tato séra jsou deriváty lidské krve zahrnující autologní nebo směsné lidské sérum, sérum z pupečnickové krve a deriváty krevních destiček (46), díky čemuž jsou lehce dosažitelná. Ačkoliv, jak poznamenávají Zhang et al. (49), může i alogenní suplement vyvolat imunitní reakci, může být zdrojem kontaminace organismu. Rozdíly mezi dárcem a příjemcem mohou bránit aplikaci kultivovaných MKB. Většina výzkumníků na poli lidských kmenových buněk se shoduje v konstatování, že alogenní séra jsou jedinou široce přijatelnou náhradou FCS (50, 51, 52, 53, 54, 55, 56). Existuje mnoho druhů alogenních sér - lidská krevní plasma (human plasma, HP) a lidská krevní plasma obohacená o krevní destičky

(platelet rich plasma, PRP) jsou běžně izolované krevní deriváty. Pokud se jedná o alogenní séra, bylo prokázáno, že PRP předčí v mnohém FCS a je tedy jeho adekvátní náhradou (49).

HP a PRP séra obsahují ty samé růstové faktory a cytokiny, ovšem s rozdílnou koncentrací, která je dána degranulací krevních destiček v PRP, při níž dojde k uvolnění těchto látek do vnějšího prostředí. Z toho plyne 3,5-5x větší množství volných růstových faktorů a cytokinů v PRP, než jaké se nachází v HP (57, 58). Konkrétně se jedná o tyto růstové faktory, jimiž jsou růstový faktor z krevních destiček (PDGF), transformační růstové faktory  $\beta 1$  a  $\beta 2$  (TGF  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), endoteliální růstový faktor z krevních destiček, interleukin 1 (IL-1), základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), krevní destičky aktivující faktor 4 (PAF-4) a mnoho dalších (59, 60). Dle Bernarda et al. (2007) a Kiliana et al. (2004) vede větší podíl krevních destiček v PRP ke zvýšení prosperity kultivovaných buněk, intenzivnější migraci a pomáhá potlačit možnou imunitní reakci (46, 61).

### **1.3 Teoretický úvod do problematiky kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene**

Populace kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene byla poprvé identifikována v roce 2000. Izolována byla ze zubní dřene stálého třetího moláru. Do roku 2005 existovalo celosvětově pouze několik málo pracovišť (včetně Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové), které tento buněčný typ studovali, a rozšiřovali tak teoretické poznatky o nich. Postupně byly identifikovány i další populace mezenchymálních kmenových buněk ze zubní dřene dočasné dentice, nadpočetných zubů, ale i z tkání, které se na vývoji zubu podílejí, nebo jsou se zubem funkčně spjaté. Pro celou skupinu kmenových buněk izolovaných ze zubních tkání, popř. tkání spojených se zubem, se využívá anglický název „dental related stem cells“.

Během vývoje zubu se na tvorbě zubní dřene podílí ještě jedna buněčná populace, která pochází z kmenových buněk migrujících z neurální lišty (62, 63). Tyto buňky dávají v zubní dřeni vzniknout vysoce specializovanému buněčnému typu – odontoblastům, podílejí se na tvorbě Hertwigovy epiteliální lišty, na vzniku periodontální štěrbině a na inervaci zubní dřene (64, 65). I tato populace MKB si zachovává spící populaci tzv. lidských postmigratorních kmenových buněk odvozených z neurální lišty (66). Tyto dospělé multipotentní kmenové buňky ektomezenchymu jsou schopné přispět k regeneraci mezodermálních, neurálních a

ektodermálních buněk a tkání (67, 68). Z tohoto důvodu se vlastnosti kmenových buněk zubní dřeně mohou lišit od základních charakteristik postulovaných pro MKB (69, 70).

Dále se předpokládá, že některé specifické charakteristiky KBZD jsou ovlivněny prostředím zubní dřeně. Zubní dřeň je velmi specifický typ tkáně. Je zajímavé, že i u dospělých jedinců stále vykazuje charakteristiky nezralé tkáně s vysokým obsahem mezibuněčné hmoty (tzv. rosolovité vazivo). Hypotéza, která se snaží tuto odlišnost vysvětlit, staví na časném a skoro dokonalém ohraničení zubní dřeně od okolních tkání (šířka foramen apicis dentis u M3 činí průměrně 0,2 mm (71), na jejím úplném oddělení od mikrobiálního prostředí dutiny ústní, na vysoké denzitě sensorické nervové sítě a bohaté mikrocirkulaci. Neméně důležité je také formování zubní papily na základě migrace a kondenzace buněk neurální lišty (ektomezenchymu) do mezenchymu formující se ústní dutiny (72); z tohoto útvaru následně vzniká zubní dřeň.

**1.3.1 Suchánek J, Brown KZ, Suchánková Kleplová T, Mazurová Y. Protocols for Dental-Related Stem Cells Isolation, Amplification and Differentiation. In: Zavan B, Bressan E. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. Schwitzeland: Humana Press, 2016. 27-56.**

Publikace shrnuje poznatky o jednotlivých „Dental related stem cells“ liniích. Pojednává tedy nejen o kmenových buňkách izolovaných přímo ze zubní dřeně, ale například i z folikulu vyvíjejícího se zubu, z tkáně pokrývající apex vyvíjejícího se kořene, z periodontia atd. Stručně shrnuje i vývoj jednotlivých zubních tkání a vysvětluje jejich rozdílné vlastnosti, zejména ve vztahu k diferenciacímu potenciálu. Popisuje různé možnosti izolace jak zubní dřeně, tak i samotných kmenových buněk, dále pak rozdílné způsoby kultivace a složení kultivačních médií. V závěru je uvedeno několik příkladů diferenciací protokolů a možností, jak ověřit úspěšnost samotné diferenciaci.

## **Publikace 1.3.1**

## 2 Kmenové buňky zubní dřene

Souhrnný název "kmenové buňky zubní dřene" je vyhrazen pro linie kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene stálých zubů. Ze zubní dřene zubů dočasných, natální/neonatální nebo nadpočetných je také možné izolovat kmenové buňky; pro ně se však užívají odlišná označení. Důvodem této diskrepance v názvosloví je fakt, že kmenové buňky ze zubní dřene stálých zubů (KBZD) byly izolovány jako první z celé rodiny "dental related stem cells". Nejčastějším zdrojem linií KBZD jsou třetí moláry, které jsou indikovány k extrakcím z důvodu relativně často se vyskytujících zdravotních obtíží, které mohou působit, a dále pak první a druhé premoláry, které jsou nejčastěji extrahovány z důvodu ortodontické léčby.

Postup naší práce na poli bádání o KBZD byl ovlivněn zejména tím, že v roce 2005, kdy jsme tento buněčný typ začali studovat, existovalo pouze velmi málo publikací, které se této problematice věnovaly. Zejména chyběly metodické články popisující postup při izolaci jak zubní dřene ze zubu samotného, tak i proces izolace kmenových buněk ze zubní dřene, a dále pak kultivační podmínky. Naší snahou tedy bylo nastavit standardní operační protokoly v naší laboratoři, a umožnit tak studium kmenových buněk zubní dřene za standardizovaných podmínek. V pozdější fázi výzkumu jsme se začali více věnovat možným negativním dopadům fetálního telecího séra (FCS) a snaže tento xenogenní suplement v kultivačním médiu nahradit. Výsledkem naší práce bylo celkem 13 publikací věnující se těmto tématům, z čehož 5 jich bylo otištěno v časopisech s IF. Pro účely habilitační práce jsem vybral celkem 8 prací, které představují průřez naším výzkumem.

Publikace 2.1 Suchánek J., Soukup T., Ivančaková R., Karbanová J., Hubková V., Pytlík R., Kučerová L.: *Human dental pulp stem cells - isolation and long term cultivation. Acta Medica (Hradec Králové) 2007;50(3):195-201* je první publikací vzešlou z našeho pracoviště, věnující se problematice kmenových buněk zubní dřene. Práce popisuje různé postupy při izolaci zubní dřene jako takové, a dále srovnává základní biologické vlastnosti kmenových buněk zubní dřene s vlastnostmi kmenových buněk izolovanými z kostní dřene. Výsledkem je zavedení účinné, avšak vůči kmenovým buňkám šetrné metody izolace zubní dřene z *cavum pulpae*. V této publikaci se také poprvé poukazuje na možnost využití ITS supplementu (*Insulin, Transeferrin, Sodium Selenite*) při kultivaci kmenových buněk a na možnost snížení obsahu fetálního telecího séra v kultivačním médiu.

Publikace 2.2 Suchánek J., Soukup T., Višek B., Ivančaková R., Kučerová L., Mokřý J. *Dental pulp stem cells and their characterization. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*

*Czech Repub. 2009;153(1):31-36* navazuje na výsledky publikace 2.1 a hodnotí přínos využití ITS supplementu při kultivaci kmenových buněk zubní dřene. Výsledky studie prokázaly, že KBZD v médiu s nízkým obsahem FCS obohaceném o ITS supplement si udržují fenotyp typický pro kmenové buňky a vykazují vysokou proliferační aktivitu.

Výsledkem publikace 2.3 *Karbanová J., Soukup T., Suchánek J., Pytlík R., Corbeil D., Mokřý J. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low-serum containing medium. Cells Tissues Organs, 2011;193(6):344-65. Epub 2010 Nov 11* je rozsáhlá charakterizace vlastností a diferenciačního potenciálu KBZD stálých zubů, kultivovaných v optimalizovaném kultivačním médiu dle publikace 2.2. Práce dokládá, že námi navržené složení média (snížení obsahu FCS na 2 % a obohacení o ITS supplement) neovlivňuje tzv. kmenovost buněk, a tyto si zachovávají všechny žádoucí parametry (schopnost diferencovat ve zralé buněčné elementy a fenotyp odpovídající nezralým buněčným typům), jež mezenchymální kmenové buňky definují.

Publikace 2.4 *Karbanová J., Soukup T., Suchánek J., Mokřý J. Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. ACTA MEDICA (Hradec Králové) 2010;53(2):79-84* se detailně věnuje potenciálu KBZD diferencovat v buňky produkující kostní tkáň jak ve formě monolayeru, tak ve 3D struktuře. Výsledkem je průkaz schopnosti KBZD diferencovat se v přítomnosti TGF- $\beta$ 3 a BMP-2 v buňky produkující kostní matrix ve standardním a tzv. bezsérovém kultivačním médiu. Na druhou stranu studie ukázala, že přítomnost samotného růstového faktoru TGF- $\beta$ 3 není dostatečným stimulem k diferenciaci, neboť KBZD se v takto připraveném kultivačním médiu diferencují v buňky produkující kostní tkáň jen neochotně a velmi pomalu.

Studie 2.5 *Mokřý J., Soukup T., Micuda S., Karbanová J., Visek B., Brcáková E., Suchánek J., Bouchal J., Vokurková D., Ivancáková R. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:673513. Epub 2010 Oct 4* se věnuje schopnosti sebeobnovy KBZD, kterou hodnotí měřením délky telomer, a porovnáním výsledku experimentu s proliferační aktivitou těchto buněk. Výsledkem je zjištění, že přes přítomnost telomerázy dochází během dlouhodobé *in vitro* kultivace KBZD ke zkrácování telomer. Pravděpodobným důvodem tohoto jevu je velmi intenzivní proliferační aktivita KBZD a ovlivnění aktivity telomerázy kyslíkovými radikály v podmínkách *in vitro* kultivace. Závěrem studie je doporučení považovat délku telomer v úvodní fázi kultivace za důležitý ukazatel proliferačního potenciálu KBZD.



Publikace 2.6 Suchánek J., Suchánková Kleplová T., Kapitán M., Soukup T.: *The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. ACTA MEDICA (Hradec Králové) 2013;56(4): 142-149* a publikace následující 2.7 Suchánková Kleplová T., Soukup T., Řeháček V., Suchánek J. *Human plasma and human platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells. ACTA MEDICA (Hradec Králové) 2014; 57(3):119–126* se věnují vlivu FCS na kultivované buňky a možnostem snížení obsahu FCS v kultivačním médiu nebo jeho úplným nahrazením. Publikace 2.6 prokazuje negativní vliv vyšší koncentrace FCS na KBZD, zejména na stabilitu karyotypu. Publikace 2.7 navrhuje složení média, ve kterém FCS není přítomno. Jako náhradu FCS lze využít lidskou krevní plazmu nebo lépe lidskou plazmu bohatou na krevní destičky. Studie 2.7 prokázala srovnatelné výsledky při kultivaci KBZD v médiu s FCS, a v médiu, kde bylo FCS nahrazeno lidskou krevní plazmou bohatou na krevní destičky.

Publikace 2.8 Pilbauerová N., Soukup T., Suchánková Kleplová T., Suchánek J.: *Enzymatic isolation, amplification and characterization of dental pulp stem cells. Folia Biologica (Praha) 65, 124-133 (2019)* se vrací k základnímu protokolu izolace kmenových buněk ze zubní dřevě. Jejím cílem byla snaha zkrátit dobu, po kterou jsou KBZD vystaveny působení štěpících enzymů, což může vést k jejich poškození. Původní složení izolačního média (kolagenáza, dispáza, Hankův balancovaný solný roztok a PBS) bylo nahrazeno 0,05 % roztokem trypsinu. Tímto došlo k redukci potřebného času enzymatické disociace z původních 60 min. na 10 min. KBZD izolované tímto postupem nadále vykazují všechny vlastnosti charakteristické pro KBZD.

## **Publikace 2.1**

## **Publikace 2.2**

## **Publikace 2.3**

## **Publikace 2.4**

## **Publikace 2.5**

## **Publikace 2.6**

## **Publikace 2.7**



## **Publikace 2.8**

## **2.9 Shrnutí vlastních poznatků o kmenových buňkách zubní dřene**

Kmenové buňky zubní dřene se pro nás díky své dostupnosti staly nejvíce studovanou linií z rodiny dental related stem cells. Od začátku experimentů jsme izolovali zubní dřene z více než 200 zubů a úspěšně jsme izolovali více než 100 buněčných linií. Tato relativně nízká úspěšnost je dána zejména snahou optimalizovat postup samotného vyjmutí zubní dřene a izolace KB z tkáně samotné. I přes různé „sofistikované“ pokusy izolace zubní dřene se ukázalo, že nejvyšší úspěšnost má odštípnutí kořenů pomocí Luerových kleští v místě cemento-sklovinné hranice a široké otevření dřevné dutiny. Stejně tak se v průběhu našich experimentů ukázalo, že vhodnou metodou izolace KBZD je enzymatická disociace. V původních protokolech jsme využívali enzymů kolagenázy a dispázy. Izolační protokol byl ale v posledních 2 letech opět aktualizován, a tak nyní s výhodou využíváme pouze 0,05% roztok trypsinu. V současné době se úspěšnost izolace pohybuje okolo 75 % a největším rizikem je pro ni kontaminace linie plísní.

### **2.9.1. Obecné vlastnosti kmenových buněk zubní dřene**

Prokázali jsme, že po izolaci KBZD z jedné zubní dřene získáme 46 +/- 6 (10-108) colony forming units, což představuje počet izolovaných KBZD z jedné zubní dřene. KBZD mají v průměru 14,0 +/- 0,8  $\mu\text{m}$  a jsou vřetenité. Viabilita KBZD v případech vyhovujících podmínek nikdy neklesla pod 85 %. Proliferační aktivita buněk byla odvislá od pasáže, ve které byla měřena. Obecně se dá říct, že KBZD mají vysokou proliferační aktivitu, která se pro prvních 30 populačních zdvojení se pohybuje okolo 40 hodin a následně stoupá k 65 hodinám. KBZD typicky exprimují ve vysokém procentu znaky CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 a CD166. Naopak velmi nízké, spíše negativní, jsou pro znaky CD18, CD31, CD34 a CD45. Variabilita exprese znaků CD105 a CD106 se zdá být spojena se schopností KBZD diferencovat ve zralé buněčné elementy, a proto tento fenomén nyní studujeme. Dále KBZD vykazují pozitivitu na některé znaky EKB, např. STRO-1, SOX-2, OCT3/4 a Nanog. Též je možné v nich detekovat vimentin a nestin. I přestože byla v KBZD telomeráza detekována pomocí imunocytochemických metod, a ke zkracování telomer by nemělo docházet, bylo v průběhu dlouhodobé pasáže prokázáno, že ke zkracování délky telomer dochází. Zkrácení délky telomer velmi dobře koreluje s prodlužováním času potřebného pro zdvojení populace. Zdá se, že rychlost syntézy telomer nepokryje jejich ztrátu v průběhu

extenzivní kultivace v *in vitro* podmínkách. Na tomto jevu se mohou podílet dva faktory, jimiž jsou oxidativní stres plynoucí z *in vitro* kultivace a 2) MKB v organismu nikdy takto vysoké proliferační aktivity nedosahují, a tudíž syntéza telomer není dostatečně rychlá, aby pokryla ztrátu během proliferace v *in vitro* podmínkách. V průběhu našich experimentů jsme byli opakovaně schopni diferencovat KBZD do buněk produkujících kostěnou a chrupavčitou extracelulární hmotu, ale i do buněk nesoucí znaky endoteliálních a neurálních buněk, buněk hladké svaloviny, kardiomyocyty a v buňky produkujících inzulin. Přestože diferenciaci v adipocyty je považována za základní vlastnost všech MKB, na rozdíl od například kmenových buněk kostní dřeně je velmi obtížné donutit KBZD v adipocyty diferencovat. Postupně jsme zkoušeli několik různých protokolů, ne vždy s pozitivním výsledkem. I když byl výsledek diferenciaci pozitivní, většinou bylo možné najít pouze několik málo tukových vakuol uvnitř buněk a většina buněk tyto vakuoly neobsahovala.

### **2.9.2 Vliv složení kultivačního média**

Na rozdíl od ostatních autorů kultivujících KBZD v médiu s 10 nebo 20 % FCS jsme se od počátku snažili takto vysoké koncentraci FCS vyhnout. Naše standardní kultivační medium obsahuje 2 % FCS a přidané růstové faktory (platelet derived growth factor a epidermal growth factor) a dále insulin-transferin-selenite suplement. Při porovnání výsledků kultivace v médiu s 10 % FCS mají KBZD v námi navrženém médiu vyšší proliferační aktivitu. Dále z našich experimentů vyplývá, že právě přidavek růstových faktorů a insulin-transferin-selenite suplementu je klíčový pro dobu potřebnou ke zdvojení populace. KBZD kultivované v media bez růstových faktorů a pouze s 2 % FCS vykazovaly poloviční proliferační aktivitu. Obsah FCS neměl vliv na základní fenotypové znaky, které KBZD vykazovaly. Přesto naše výsledky ukazují, že vyšší obsah FCS vede k zvýšení počtu chromozomálních aberací. Množství těchto chyb navíc s délkou kultivace vzrůstá. V rámci projektu PurStem (7. rámcový projekt EU), jehož cílem bylo vytvořit serum-free kultivační médium, jsme testovali několik dostupných variant tzv. serum-free médií, v nichž KBZD proliferovaly vždy jen velmi pomalu, pokud vůbec. Další možností náhrady FCS v kultivačním médiu je využití derivátů lidské krve. I přesto, že deriváty lidské krve mají některá negativa stejná jako FCS (nejednotnost složení, riziko přenosu infekce) a dokonce mají i některá negativa navíc (možnost obsahu metabolitů léčiv, nižší obsah růstových faktorů), jsou pro potenciální klinické využití KB přijatelnější než FCS. Dle výsledků naší studie je možné nahradit

FCS pomocí HP, nebo PRP. V případě nahrazení 2 % FCS v médiu s růstovými faktory a ITS suplementem pomocí 2 % HP nebo 2 % PRP jsou výsledky srovnatelné. Jako nejvýhodnější se zdá být užití média s 10 % PRP, ve kterém měly KBZD nejvyšší proliferační aktivitu. Avšak vzhledem ke snaze snížit dopad variability složení a možných nežádoucích účinků PRP jsme se rozhodli v dalších experimentech využívat spíše variantu kultivačního média s 2 % PRP obohacenou o růstové faktory a ITS.

### 3 Kmenové buňky zubní dřeneč dočasných zubů

Kmenové buňky izolované ze zubní dřeneč dočasných zubů (SHED - Stem cells from human exfoliated deciduous teeth) byly druhou izolovanou a definovanou linií kmenových buněk z rodiny dental related stem cells. Jejich zdrojem jsou dočasné zuby nejčastěji extrahované z ortodontických důvodů, popřípadě z důvodu přítomnosti nesanovatelné kariézní léze nebo zuby po traumatu, ale vždy zuby vitální. V kontrastu s názvem se tyto kmenové buňky neizolují z dočasných zubů, u kterých došlo ke spontánní eliminaci. Během spontánní eliminace dochází k resorpci kořene, otevření prostoru, který býval dřevnou dutinou, a nahrazení původní tkáň zubní dřeneč tkání gingivy.

SHED pro náš tým představují zejména druhou linii kmenových buněk, na které můžeme ověřit použitelnost postupů optimalizovaných na KBZD. Z tohoto důvodu jsou tyto vědecké práce metodicky podobné publikacím 2.2, 2.3 a 2.7. Výsledkem výzkumu byly celkem 3 publikace věnující se SHED, z čehož byla 1 otištěna v časopise s IF.

Publikace 3.1 - *Suchánek J., Višek B., Soukup T., Kamal El-Din Mohamed S., Ivančaková R., Mokry J. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. ACTA MEDICA (Hradec Králové) 2010;53(2):93-99* 1 navazuje podobně jako publikace 2.3 výsledky publikace 2.2 a testuje námi navrženou úpravu kultivačního média (snížený obsah FCS, obohacení o ITS suplement). Dále porovnává vlastnosti SHED a KBZD v tomto médiu kultivovaných. Výsledkem je důkaz vhodného složení navrženého média i pro dlouhodobé kultivaci SHED v *in-vitro* podmínkách.

Publikace 3.2 - *Suchánková Kleplová T., Browne K.Z., Soukup T., Suchánek J.: In vitro kultivace kmenových buněk zubní pulpy dočasných zubů v nízkoprocentním xenogenním médiu. Čes. Stomat. a Prakt. Zubní Lék. (2016) 115 (1): 3–11* ověřuje skutečnost, že si SHED kultivované v médiu s 2 % FCS a ITS suplementem udržují znaky typické pro kmenové buňky, a jsou tedy nadále schopny vyžrávat v širokou škálu buněčných typů.

Publikace 3.3 - *Suchánek J., Suchánková Kleplová T., Řeháček V., Browne K.Z., Soukup T. Proliferative Capacity and Phenotypical Alteration of Multipotent Ecto-Mesenchymal Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Cultured in Xenogeneic and Allogeneic Media. Folia Biologica (Praha) (2016); 62: 1-14* obdobně jako práce 2.7 popisuje výsledky kultivace SHED v médiu, ve kterém bylo FCS nahrazeno lidskou krevní plazmou nebo lidskou krevní plazmou bohatou na krevní destičky. Výsledky potvrzují, že i linie SHED jsou

schopny proliferovat v médiu, které neobsahuje FCS, udržet si fenotyp mezenchymálních kmenových buněk a schopnost diferencovat ve zralé buněčné populace.

## **Publikace 3.1**

## **Publikace 3.2**



## **Publikace 3.3**

### **3.4 Shrnutí našich poznatků o kmenových buňkách zubní dřeni dočasných zubů**

Zubní dřeň dočasných zubů se jeví jako velmi výhodný zdroj MKB z několika důvodů, extrahovaný zub je v čase nahrazen zubem stálým a pacientovi tak nevzniká žádná zdravotní újma, a izolované KB jsou ještě méně vyzrálé než KBZD, a jsou proto pro in vitro kultivaci výhodnější. Avšak tento jejich zdroj představuje i jistá rizika, neboť vždy extrahujeme zub, který je již prořezán do dutiny ústní a je tak vyšší riziku kontaminace linie, zub extrahujeme velmi mladému jedinci, pro něhož extrakce může představovat traumatický zážitek, a zub by měl být extrahován v době, kdy má alespoň 1/3 původní délky kořenů. V opačném případě hrozí, že zubní dřeň je již částečně nebo zcela nahrazena tkání gingivy, a tak může dojít k izolaci jiného typu MKB. Také objem tkáně zubní dřeni dočasných zubů je v porovnání s objemem zubní dřeni stálých zubů výrazně menší, a proto se dá předpokládat, že i množství MKB uvnitř této dřeni je nižší. SHED tak pro nás představovaly sekundární linii MKB, na které jsme ověřovali výsledky získané při experimentech s KBZD.

#### **3.4.1 Obecné vlastnosti SHED**

V porovnání s KBZD jsou SHED spíše okrouhlé, klasický vřetenitý tvar získávají až se zvyšující se konfluencí v kultivační nádobě. Velikost SHED je v průměru 14,3 +/-2,0  $\mu\text{m}$  a odpovídá v průměru velikosti KBZD, ale s výrazně větší odchylkou. Viabilita SHED byla stejně jako v případě KBZD velmi vysoká a nikdy neklesla pod 85 %. Proliferační aktivita buněk byla odvislá od pasáže, ve které byla měřena. Obecně lze konstatovat, že SHED mají vysokou proliferační aktivitu srovnatelnou s KBZD, která se pro prvních 24 populačních zdvojení se pohybuje okolo 28 hodin a následně stoupá k 54 hodinám. SHED typicky exprimují ve vysokém procentu znaky CD29, CD44, CD73, CD90, CD117 a CD166. Naopak velmi nízce, spíše negativní je exprese znaků CD18, CD31, CD34 a CD45. V průběhu našich experimentů jsme byli opakovaně schopni diferencovat SHED do buněk produkujících kostěnou a chrupavčitou extracelulární hmotu, ale i do buněk nesoucích znaky endoteliálních a neurálních buněk, buněk hladké svaloviny, kardiomyocyty, do buněk produkujících inzulin, též do buněk obsahující tukové vakuoly.

### **3.4.2 Vliv složení kultivačního média**

V případě nahrazení FCS pomocí derivátů lidské krve při kultivaci SHED jsme potvrdili výsledky získané z předchozího experimentu s KBZD. Nejvyšší proliferační aktivita byla opět v médiu s 10 % PRP, výsledky v médiu se 2 % FCS, 2% HP a 2 % PRP vždy obohacené o růstové faktory a ITS suplement byly srovnatelné. Médium obsahující 10 % HP se ukázalo jako zcela nevyhovující, SHED v tomto médiu neproliferovaly.

#### 4 Kmenové buňky zubní dřeně natálních/neonatálních zubů

Natální nebo také neonatální zuby jsou v dutině ústní přítomny již při narození (NT), nebo erupují do 1 měsíce po narození (NNT) (73) (**Obr.1A**). Dříve byly také označovány jako fetální či vrozené zuby, jako zuby raného dětství, nebo také jako dentice předčasná či dentice dočasné předcházející (74). Podle většiny autorů neexistuje korelace mezi jedním z pohlaví a vyšším výskytem této anomálie (75). Natální zuby se vyskytují třikrát častěji než zuby neonatální (76, 77). Vzhled a vyzrálost neonatálních zubů se příliš neliší od prořezávajících zubů dočasných (78) (**Obr.1B**). Tvorba kořene je u NT/NNT většinou hrubě narušena předčasnou erupcí, kdy není ještě založena Hertwigova pochva (79). Střední dolní řezáky tvoří 85 % NT/NNT, 11 % jsou horní dočasné špičáky, 3% dolní dočasné moláry a 1% připadá na horní dočasné moláry (77). Většinou se jedná o bilaterální lokalizaci. V 90 – 99 % se jedná o zuby dočasné dentice, pouze 1 – 10 % tvoří zuby nadpočetné (80). Stejný závěr vyplývá ze Štamfejeleho studie (81) - natálními zuby jsou nejčastěji předčasně prořezané dolní střední řezáky, což naznačuje i „ageneze“ dočasných zubů; jejich prořezání souvisí s rychlým, či předčasným vzorcem prořezávání spíše než s vysokým uložením zubních zárodků. Při předčasném prořezání dočasných zubů vidáme přibližně v 80 % dotvořenou korunku zubu bez kořenů (82), což logicky rezultuje v jejich přílišnou mobilitu a brzkou přirozenou ztrátu či nutnost extrakce (83). Přesto se některé NT/NNT dočkají přirozené exfoliace (81). Anomální vývoj stálé dentice, resp. chybění stálých nástupců či výskyt jejich deformit, např. mikrodoncie, se zdá jako raritní, přesto se vyskytující jev (84).



Obr 1: A) natální zuby u novorozence 3. den po porodu, B) extrahované natální zuby.

Existuje více teorií vzniku NT/NNT. Jako nejpravděpodobnější se jeví povrchového uložení zubních zárodků dočasné dentice, což pravděpodobně koreluje s dědičností (87). Jedná se o dědičnost autozomálně dominantní (79). Familiární přenos se pohybuje v rozmezí 6-72 % dle regionu a etnika (88). S dědičností by mohla souviset také teorie vzniku NT/NNT podle Clerguau-Guerithaulta, kteří vidí příčinu ve zvýšené osteoblastické aktivitě v oblasti zubního zárodku (89). Spekuluje se také o jiných příčinách, jako je hormonální dysbalance, nutriční deficit a hypovitaminóza v důsledku narušeného zdraví matky (90). Jiné teorie mluví o hormonální stimulaci, horečce a exantému matky během těhotenství (73), nebo o vlivu vrozené syfilis, která může erupci zubů uspišit i zpomalit (90). V roce 2010 publikovali Štamfejl a spol. teorii, že NT/NNT jsou důsledkem akcelerovaného dentálního růstu. Fauconnier a Gerardy (1953) postulovali rozdíl mezi předčasnou a časnou erupcí (91). Časná erupce je dána celkovými faktory (např. dědičnost, nebo hormonální disbalance), zatímco předčasná erupce je čistě patologickým procesem, který vede ke vzniku nekompletního zubu bez kořene, který prořeže ve velmi krátkém čase. Struktura, která je podkladem tohoto procesu, se označuje jako expulzivní Capdepontův folikul. Tato struktura vzniká na podkladě traumatu alveolu během porodu za vzniku vředu, díky kterému se infekce šíří až k dentálnímu foliklu prostřednictvím *gubernaculum dentis persistente*, což vede ke flegmóně a edému, a tím k předčasné ztrátě postiženého zubu (92).

Vzácně se NT/NNT nevyskytují izolovaně, nýbrž jsou součástí projevů některých vývojových vad a symptomů. Neexistuje však přesvědčivý důkaz o pozitivní korelaci mezi výskytem NT/NNT a zmiňovanými systémovými poruchami (75). Poruchy spojované s výskytem NT/NNT jsou dále doprovázeny rozštěpem rtu a patra, vzácně kyklopií (93, 94, 95, 96). Mezi ně řadíme Jadasson-Lewandowskyho syndrom (pachyonychia congenita), Pierre Robinův syndrom, Ellis van Creveldův syndrom (chondro-ektodermální dysplázie), androgenitální syndrom, Hallerman-Streiffův syndrom (okulo-mandibulární dyscefalie s hypotrichózou), kraniofaciální dysostózu, Rubinstein-Taybi syndrom (mnohočetná steatocystoma), Sotův syndrom, syndrom Majevského, syndrom Wiedeman-Rautenstrauchův (neonatální progerie), syndrom Pfeifer-Weber-Christianův, *epidermolysis bullosa hereditaria simplex* včetně van der Woudeova a Walker-Warburgova syndromu (97, 98). Dále se NT/NNT druzí s výskytem reaktivní hyperplázie vaziva (99, 100), oboustrannými hamartomy mandibuly (101), pyogenního granulomu, periferních osifikujících fibromů (102), palatinální cysty, oboustranných lymfangiomů alveolárního výběžku a středového zářezu na alveolu horní čelisti (98), komplexními kraniofaciálními anomáliemi (103), Mohrova syndromu (104),

oligodontie, syringomů (105), cutis gyratum, acanthosis nigricans (106), Turnpennyovy ektodermální dysplázie (107), primárního kongenitálního glaukomu (108), anencefalie s rozštěpem patra (109), obrovského kongenitálního melanocytového névu (110), restriktivní dermatie (111). Tyto anomálie zubů mohou být prvním varovným znakem vývojové poruchy, a proto je třeba na ně brát zřetel v diferenciální diagnostice (112).

Většina NT/NNT je malými kuželovitými útvary hnědožluté barvy, bez kořenů a pulpní tkáně. Absence kořenů vede k vysokému stupni patologické pohyblivosti - viklavosti a jejich snadné spontánní exfoliaci. Viklavost je provázána otokem dásně s občasným krvácením z dané oblasti (113, 97). Histologicky se většinou jedná o nezralé zuby s nepravidelnou strukturou dentinových tubulů, hypomineralizovanou sklovinou a s absencí nebo počátkem tvorby Hertwigovy pochvy, což vysvětluje absenci kořene, anebo již je zubní kořen na začátku svého vývoje (113, 83). V NT/NNT, kde je přítomna i zubní dřev, histologicky nalézáme velkou bohatě vaskularizovanou dřev, slabou vrstvu skloviny, pravidelnou genezi dentinu a často poruchu formování cementu. Všechny tyto projevy pravděpodobně souvisí s rychlostí předčasné erupce těchto zubů.

Kmenové buňky izolované ze zubní dřevě natálních/neonatálních zubů (hNDP-SCs - human natal dental pulp stem cells) jsou velmi málo prostudovanou buněčnou linií. V současné době jsme celosvětově jedním ze dvou pracovišť, které má možnost tento buněčný typ studovat. Důvodem je jednak nízký výskyt natálních/neonatálních zubů - s ohledem na region a etnikum se manifestují s četností 1:800 v Asii až 1:3500 živě narozených dětí v Evropě. Jejich studium však vyžaduje velmi úzkou spolupráci porodníka/neonatologa, zubního lékaře a pracoviště věnujícího se studiu "dental related stem cells". V současné době se nerozlišuje, zda se jedná o zuby natální, nebo neonatální (zuby prořezané do 1 měsíce věku), nebo zda se jedná o předčasně prořezané zuby dočasné dentice, či o zuby nadpočetné. NT/NNT jsou obecně považovány za vývojovou anomálii ve smyslu předčasného prořezání dočasných zubů, buď pozdně prenatalně, nebo časně postnatalně. NT/NNT jsou, až na nečetné výjimky, z důvodu častého výskytu vážných komplikací při výživě novorozence extrahovány.

Rozhodujeme-li o ponechání NT/NNT *in situ*, pak pouze v případě, že zub je asymptomatický a nebrání v příjmu potravy (73). Předpokládá se, že zub, který v ústech vydržel čtyři měsíce, má dobrou prognózu. Stejně spekulativní je teorie o udržení místa pro stálé nástupce, pokud je NT/NNT součástí dočasné dentice. V případě, že je zub nadpočetný, vykazuje velkou mobilitu, je málo vyvinut, nebo je spojen s růstem měkkých tkání, vyskytuje-li se komplikace

dřeňového původu, pak je indikován k extrakci (99).

Získání buněčné linie z tohoto zdroje je tedy sekundárním využitím odebrané tkáně. V danou chvíli, tzn. po odstranění z dutiny ústní, jsou tyto zuby považovány za biologický odpad. Proto získání kmenových buněk z tohoto zdroje nebudí zásadní etické dilema. Přestože se jedná o jev poměrně vzácný, vykazují tyto buňky výjimečné vlastnosti mezi MKB. Tuto skutečnost si vysvětlujeme obdobím izolace, neboť se jedná o buňky z nejranějšího postnatálního vývojového stadia lidského organismu a zároveň z vyvíjející se tkáně.

Výsledkem naší práce na tomto poli jsou dosud 3 publikace věnující se hNDP-SCs, z nichž byly dvě uveřejněny v časopise s IF. Publikované práce nejsou řazeny chronologicky dle data vydání. Studie prezentovaná v publikaci 4.1 předcházela studii 4.2, která již využívá linie hNDP-SCs charakterizované v práci 4.1.

Práce 4.1 - *Suchánek J., Browne KZ., Nasry SA., Suchánková Kleplová T., Pilbauerová N., Schmidt J., Soukup T: Characteristics of Human Natal Stem Cells Cultured in Allogeneic Medium. Brazilian Dental Journal (2018) 29(5): 427-434* charakterizuje základní biologické vlastnosti, fenotyp hNDP-SCs, a potvrzuje schopnost hNDP-SCs diferencovat ve tři základní zralé mezenchymální buněčné linie. Na rozdíl od ostatních buněčných typů studovaných v naší laboratoři jsme hNDP-SCs již od počátku kultivovali v námi navrženém médiu obsahujícím 2 % lidské krevní plazmy bohaté na krevní destičky a obohacené o ITS suplement. Jedná se tedy o charakterizaci linie kultivované v tzv. *xenogeneic-free* kultivačním médiu.

Výsledkem studie 4.2 - *Suchanek J., Nasry A., Soukup T.: The Differentiation Potential of Human Natal Dental Pulp Stem Cells into Insulin-Producing Cells. Folia Biologica (Praha) (2017); 63, 132-138* je průkaz schopnosti hNDP-SCs diferencovat v buněčný typ produkující inzulin. Stejně jako  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků jsou i kmenové buňky izolované ze zubní dřeně všech typů dentice embryologicky odvozené z neurální lišty, a mají tak potenciál diferencovat do tohoto buněčného typu.

Publikace 4.3 - *Pisal RV, Suchanek J, Siller R; et al. Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth. Sci Rep, 2018;8:6168, doi: 10.1038/s41598-018-24421-z. Accessed October 6, 2018* charakterizuje hNDP-SCs ještě širěji, a prokazuje přítomnost markerů, které hNDPS-SCs sdílí s kmenovými buňkami izolovanými z lidských embryí. Dále jsme v této studii hNDP-SCs pomocí Sendai

viru reprogramovali SHED na tzv. *induced pluripotency stem cells*. Z výsledků této studie vyplývá, že reprogramování hNDP-SCs je úspěšnější než reprogramování fibroblastů.



## **Publikace 4.1**

## **Publikace 4.2**

## **Publikace 4.3**

#### **4.4 Shrnutí vlastních poznatků o kmenových buňkách zubní dřene natálních a neonatálních zubů**

Zubní dřev NT/NNT představuje unikátní zdroj velmi mladé populace MKB. Získat jakoukoliv jinou linii MKB z jedince staršího několika dní je z etického hlediska velmi obtížné a těžko ospraveditelné. hNDP-SCs nám tak umožňují rozšířit poznání nejen o liniích dental related stem cells, ale obecně o MKB odebraných v brzké fázi postnatálního vývoje. Na rozdíl od ostatních experimentů jsme hNDP-SCs kultivovali pouze v médiu se 2 % PRP, obohaceném o růstové faktory.

##### **4.4.1 Obecné vlastnosti kmenových buněk zubní dřene natálních a neonatálních zubů**

Při porovnání s KBZD a SHED jeví hNDP-SCs morfolonii bližší KBZD. Jsou spíše vřetenité s vícero dlouhých výběžků, kterými se udržují v kontaktu. Viabilita hNDP-SCs byla stejně jako v případě KBZD a SHED velmi vysoká a nikdy neklesla pod 90 %. Proliferační aktivita buněk byla odvislá od pasáže, ve které byla měřena. Obecně se dá říct, že hNDP-SCs mají ze všech námi studovaných linií nejkratší čas potřebný ke zdvojení populace. Pro prvních 7 pasáží se populační doubling time pohybuje okolo 26,8 hodin a následně stoupá k 49 hodinám. hNDP-SCs vykazovaly naprosto unikátní fenotypový profil, neboť byly vysoce pozitivní pro všechny testované znaky včetně CD34 a CD45, které jsou považovány za znaky typické pro hematopoetickou populaci buněk. Jsou pozitivní i na znaky neurální MKB (nestin, neurofilamenta, beta3-tubulin) a znaky EKB (Sox-2, CXCR-4). U hNDP-SCs jsme byli schopni prokázat diferenciaci v buňky produkující osteogenní, chondrogenní matrix a v buňky produkující insulin.

## 5 Závěr

Lidské mezenchymální kmenové buňky byly poprvé popsány v sedmdesátých letech 20. století, a postupně se staly příslibem pro léčbu mnoha onemocnění a posttraumatických stavů. První klinické testování bylo zahájeno v roce 1995. Od té doby byly provedeny stovky klinických studií, kdy byly tyto buňky pacientům experimentálně transplantovány se střídavou úspěšností a překvapivým výskytem nežádoucích účinků. Tím se ukázalo, že rutinnímu klinickému využití kmenových buněk v humánní medicíně brání mnoho nedořešených otázek. Jednou z těchto překážek je i využívání xenogenních suplementů při kultivaci adultních mezenchymálních kmenových buněk, a to zejména fetálního telecího séra.

Xenogenní doplňky kultivačního média mohou ohrozit úspěšnost léčby pacienta na dvou úrovních, a to již před implantací buněk, tzn. během "*in vitro*" fáze, během níž dochází zejména ovlivnění stability karyotypu, změny fenotypu a ovlivnění metabolických drah kultivovaných buněk, nebo po transplantaci, kdy takto kultivované buňky mohou vést k rozvoji nežádoucí imunitní reakce, též k přenosu zoonóz či prionové infekce, atd. Z těchto důvodů bylo užití xenogenních doplňků v kultivačním médiu v humánní medicíně zakázáno. To ale stále neznamená, že by se FCS přestalo užívat v preklinickém výzkumu. Vlastnosti takto kultivovaných buněk jsou zákonitě modulovány přítomností této xenogenní komponenty. Otázkou zůstává, nakolik jsou takto získaná data validní a spolehlivá.

Od roku 2005 jsme standardizovali postup odběru, transportu a izolace buněk. Široce charakterizujeme buňky zubní dřeně v odlišných médiích, abychom tak objasnili vliv jednotlivých sérových komponent. V naší práci jsme popsali vliv fetálního telecího séra na kmenové buňky zubní dřeně stálých (KBZD) a dočasných zubů (SHED). Následně jsme navrhli složení kultivačního média bez tohoto suplementu. Prokázali jsme, že linie KBZD, SHED a hNDP-SCs jsou schopné v tomto kultivačním médiu proliferovat a nadále si uchovávají schopnost diferenciaci v širokou paletu zralých buněčných populací. Výhodou kmenových buněk z rodiny "*dental related stem cells*" je zejména velmi rychlá proliferační aktivita, široký diferenciací potenciál, odolnosti vůči spontánní transformaci ve zralé buněčné typy v průběhu dlouhodobé kultivace a relativně snadná dostupnost; zejména pak u linií SHED a KBZD.

Využití kmenových buněk ve stomatologii, např. k léčbě zubního kazu, nebo k vytvoření nového zubu v *in vitro* podmínkách, naráží na mnoho technických překážek a je v současné době spíše využíváno k popularizaci výzkumu. Mnohem perspektivnější a pro klinickou praxi

potřebnější je využití těchto buněk k léčbě celkových onemocnění. Vzhledem ke svému embryonálnímu původu by linie SHED, KBZD a hNDP-SCs mohly být vhodné například pro léčbu neurodegenerativních onemocnění a diabetes mellitus I. typu. Dále pak, vzhledem k prokázanému diferenciačnímu potenciálu, k léčbě onemocnění chrupavek, svaloviny a mnoha dalších tkání mezenchymálního původu. Zubní dřev spolu s ostatními tkáněmi podílejícími se na vývoji zubu představují velmi slibný zdroj adultních kmenových buněk pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu.

V navazujícím období plánujeme zaměřit naše výzkumné aktivity na popsání vlivu kryokonzervace na fenotyp, buněčnou proliferaci a diferenciaci; s následnou úpravou kryokonzervačního protokolu, a dále pak na tvorbu vhodných nosičů pro buněčnou transplantaci, která by měla být zakončena ověřením v *in vivo* experimentech.

## 6 Literatura

1. VOLAREVIC, Vladislav, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International journal of medical sciences*, 2018, 15.1: 36.
2. MARKS, Peter W., et al. Clarifying stem-cell therapy's benefits and risks. *N Engl J Med*, 2017, 376.11: 1007-1009.
3. CALIARI, Steven R., et al. Dimensionality and spreading influence MSC YAP/TAZ signaling in hydrogel environments. *Biomaterials*, 2016, 103: 314-323.
4. MA, Teng; TSAI, Ang-Chen; LIU, Yijun. Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 108: 44-50.
5. TSCHUMPERLIN, Daniel J.; LIU, Fei; TAGER, Andrew M. Biomechanical regulation of mesenchymal cell function. *Current opinion in rheumatology*, 2013, 25.1: 92.
6. KATSARA, Olga, et al. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 2011, 20.9: 1549-1561.
7. GOVINDASAMY, Vijayendran, et al. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem cells - an economic and commercial angle. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2010, 46.9: 764-773.
8. YI, Qiao, et al. Analysis of senescence-related differentiation potentials and gene expression profiles in human dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*, 2017, 203.1: 1-11.
9. SUCHÁNEK, Jakub, et al. The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica*, 2013, 56.4: 142-149.
10. MANNELLO, Ferdinando; TONTI, Gaetana A. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!. *Stem cells*, 2007, 25.7: 1603-1609.
11. RENNER, Matthias, et al. Regulation for gene and cell therapy medicinal products in Europe. In: *Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver*. Springer, Tokyo, 2016. p. 105-123.
12. HAUSKELLER, Christine; BAUR, Nicole; HARRINGTON, Jean. Standards, harmonization and cultural differences: examining the implementation of a European Stem Cell Clinical Trial. *Science as Culture*, 2019, 28.2: 174-199.

13. PHINNEY, Donald G., et al. Manufacturing mesenchymal stromal cells for clinical applications: A survey of Good Manufacturing Practices at US academic centers. *Cytotherapy*, 2019.
14. KINZEBACH, Sven; BIEBACK, Karen. Expansion of mesenchymal stem/stromal cells under xenogenic-free culture conditions. In: *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application I*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 33-57.
15. SPEES, Jeffrey L., et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, 2004, 9.5: 747-756.
16. DIMARAKIS, Ioannis; LEVICAR, Natasa. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells*, 2006, 24.5: 1407- 1408.
17. SEKIYA, Ichiro, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem cells*, 2002, 20.6: 530-541.
18. MARTIN, Maria J., et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature medicine*, 2005, 11.2: 228.
19. HALME, Dina Gould; KESSLER, David A. FDA regulation of stem-cell-based therapies. 2006.
20. AGUZZI, A., et al. Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. 1997.
21. SOTIROPOULOU, Panagiota A., et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 2006, 24.2: 462-471.
22. SYPNIEWSKA, G., et al. Effects of age, obesity and growth-hormone on adipogenic activity in human plasma. *International journal of obesity*, 1987, 11.3: 263-273.
23. DICTUS, Christine, et al. Comparative analysis of in vitro conditions for rat adult neural progenitor cells. *Journal of neuroscience methods*, 2007, 161.2: 250-258
24. GRONTHOS, Stan, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97.25: 13625-13630.
25. KERKIS, Irina, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184.3-4: 105-116.



26. YALVAC, M. E., et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The pharmacogenomics journal*, 2010, 10.2: 105.
27. TSENG, Pang-Yen, et al. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2007, 69.2: 95-102
28. HO, Jennifer H., et al. Cell contact accelerates replicative senescence of human mesenchymal stem cells independent of telomere shortening and p53 activation: roles of Ras and oxidative stress. *Cell transplantation*, 2011, 20.8: 1209-1220.
29. FU, Wei-Li, et al. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood retain their pluripotency, but undergo senescence during long-term culture. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2015, 21.10: 1088-1097.
30. RUBIO, Daniel, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research*, 2005, 65.8: 3035-3039.
31. WONG, Rebecca SY. Mesenchymal stem cells: angels or demons?. *BioMed Research International*, 2011, 2011.
32. RØSLAND, Gro Vatne, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research*, 2009, 69.13: 5331-5339.
33. HONN, Kenneth V.; SINGLEY, John A.; CHAVIN, Walter. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1975, 149.2: 344-347.
34. ZHENG, Xiaoyang, et al. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress*, 2006, 22.5: 1294-1300.
35. HEISKANEN, Annamari, et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells*, 2007, 25.1: 197-202.
36. BRUININK, A., et al. Effects of serum and serum heat-inactivation on human bone derived osteoblast progenitor cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, 15.4: 497-501.
37. CHACHQUES, Juan C., et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *International journal of cardiology*, 2004, 95: S29-S33.

38. TUSCHONG, Laura, et al. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Human gene therapy*, 2002, 13.13: 1605-1610.
39. DIMARAKIS, Ioannis; LEVICAR, Natasa. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells*, 2006, 24.5: 1407- 1408.
40. BIEBACK, Karen; KINZEBACH, Sven; KARAGIANNI, Marianna. Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. *Stem cells international*, 2010, 2010.
41. BIEBACK, Karen; KINZEBACH, Sven; KARAGIANNI, Marianna. Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. *Stem cells international*, 2010, 2010.
42. WUCHTER, Patrick, et al. Evaluation of GMP-compliant culture media for in vitro expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology*, 2016, 44.6: 508-518.
43. KOCAOEMER, Asli, et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem cells*, 2007, 25.5: 1270-1278.
44. SPEES, Jeffrey L., et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, 2004, 9.5: 747-756.
45. SUCHÁNEK, Jakub, et al. The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica*, 2013, 56.4: 142-149.
46. WEYAND, Birgit, et al. (ed.). *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
47. FROUD, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Developments in biological standardization*, 1999, 99: 157-166.
48. BRUNNER, Daniel, et al. The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 2010, 27.1: 53-62.
49. KLEPLOVÁ, Tereza Suchánková, et al. Human plasma and human platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells. *Acta Medica*, 2014, 57: 119.
50. STUTE, Norbert, et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental hematology*, 2004, 32.12: 1212-1225.

51. KOBAYASHI, Tsutomu, et al. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2005, 87.10: 1426-1433.
52. LIN, H. - T., et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. In: *Transplantation proceedings*. Elsevier, 2005. p. 4504-4505.
53. SHAHDADFAR, Aboulghassem, et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem cells*, 2005, 23.9: 1357-1366.
54. STOJKOVIC, Petra, et al. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23.7: 895-902.
55. MIZUNO, Noriyoshi, et al. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell biology international*, 2006, 30.6: 521-524.
56. MÜLLER, Ingo, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 2006, 8.5: 437-444.
57. DOHAN, David M., et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2006, 101.3: e45-e50.
58. MARX, Robert E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?. *Implant dentistry*, 2001, 10.4: 225-228.
59. DOHAN, David M., et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2006, 101.3: e37-e44.
60. DOHAN, David M., et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2006, 101.3: e51-e55.
61. KILIAN, O., et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *European journal of medical research*, 2004, 9.7: 337-344.
62. KADAR, K., et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60.Suppl 7: 167-175.

63. NOURBAKHS, Nosrat, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 2011, 55.2: 189-195.
64. DONOGHUE, Philip CJ; RÜCKLIN, Martin. The ins and outs of the evolutionary origin of teeth. *Evolution & development*, 2016, 18.1: 19-30.
65. LUUKKO, Keijo; KETTUNEN, Päivi. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: lessons from mouse models. *Experimental cell research*, 2014, 325.2: 72-77.
66. CHUNG, Il-Hyuk, et al. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. *Stem cells*, 2009, 27.4: 866-877.
67. NUTI, N., et al. Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2016, 12.5: 511-523.
68. JEON, Byeong-Gyun, et al. Differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues into non-mesodermal lineage. *Animal Cells and Systems*, 2015, 19.5: 321-331.
69. REN, Huaijuan, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from umbilical cord, dental pulp, and menstrual blood as sources for cell therapy. *Stem cells international*, 2016, 2016.
70. KARAÖZ, Erdal, et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and cell biology*, 2011, 136.4: 455.
71. ABARCA, J., et al. Morphology of the physiological apical foramen in maxillary and mandibular first molars. *International journal of morphology= Revista internacional de morfologia*, 2014, 32.2: 671.
72. CHAI, Yang, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 2000, 127.8: 1671-1679.
73. MASSLER, Maury; SAVARA, Bhim Sen. Natal and neonatal teeth: a review of twenty-four cases reported in the literature. *The Journal of pediatrics*, 1950, 36.3: 349-359.
74. RONK, S. L. Multiple immature teeth in a newborn. *The Journal of pedodontics*, 1982, 6.3: 254-260.
75. CUNHA, Robson Frederico, et al. Natal and neonatal teeth: review of the literature. *Pediatric dentistry*, 2001, 23.2: 158-162.

76. MAHESWARI, N. Uma; KUMAR, B. P.; KARUNAKARAN, S. "Early baby teeth": Folklore and facts. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2012, 4.Suppl 2: S329.
77. ALVAREZ, M. P.; CRESPI, P. V.; SHANSKE, A. L. Natal molars in Pfeiffer syndrome type 3: a case report. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 1993, 18.1: 21-24.
78. ANNEROTH, GÖRAN, et al. Clinical, histologic and microradiographic study of natal, neonatal and pre-erupted teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 1978, 86.1: 58-66.
79. BODENHOFF, Jessie; GORLIN, Robert J. Natal and neonatal teeth: folklore and fact. *Pediatrics*, 1963, 32.6: 1087-1093.
80. EL KHATIB, K., et al. Natal teeth: apropos of five cases. *Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale*, 2005, 106.6: 325.
81. ŠTAMFELJ, Iztok, et al. Size, ultrastructure, and microhardness of natal teeth with agenesis of permanent successors. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2010, 192.4: 220-226.
82. LUNT, Roger C.; LAW, David B. A review of the chronology of eruption of deciduous teeth. *The Journal of the American Dental Association*, 1974, 89.4: 872-879.
83. KATES, George A.; NEEDLEMAN, Howard L.; HOLMES, Lewis B. Natal and neonatal teeth: a clinical study. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 1984, 109.3: 441-443.
84. MARCUSHAMER, Mauricio; KING, D. L.; MCCOURT JR, James W. Microdontic teeth succedaneous to natal teeth: a report of two cases. *Pediatr Dent*, 1992, 14.6: 400-401.
85. SPOUGE, J. D.; FEASBY, W. H. Erupted teeth in the newborn. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1966, 22.2: 198-208.
86. ANEGUNDI, R. T., et al. Natal and neonatal teeth: A report of four cases. *JOURNAL-INDIAN SOCIETY OF PEDODONTICS AND PREVENTIVE DENTISTRY*, 2002, 20.3: 86-92.
87. HALS, Einar. Natal and neonatal teeth: Histologic investigations in two brothers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1957, 10.5: 509-521.
88. ZHU, JIANFU; KING, D. Natal and neonatal teeth. *ASDC journal of dentistry for children*, 1995, 62.2: 123.
89. SEMINARIO, Ana Lucía; IVANCAKOVÁ, Romana. Natal and neonatal teeth. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2004, 47.4: 229-33.
90. BORAS, V. Vucicevic; ZAINI, Z. Mohamad; SAVAGE, N. W. Supernumerary tooth with associated dentigerous cyst in an infant. A case report and review of differential diagnosis. *Australian dental journal*, 2007, 52.2: 150-153.

91. FAUCONNIER, H.; GERARDY, L. Precocious or premature dentition. *Archives de stomatologie*, 1953, 8.2: 84.
92. COSTA, C. A. A. Odontopediatria na prevenção de possíveis distúrbios dento-maxilo-faciais. *Odontopediatria, 3th ed, Rio de Janeiro: Coelho Branco Fº*, 1952, 104.
93. STEWART, Ray E.; PRESCOTT, Gerald H. *Oral facial genetics*. CV Mosby, 1976.
94. DE ALMEIDA, Cristiane Machado; GOMIDE, Marcia Ribeiro. Prevalence of natal/neonatal teeth in cleft lip and palate infants. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 1996, 33.4: 297-299.
95. BRANDT, Stephen K.; SHAPIRO, Steven D.; KITTLE, Paul E. Immature primary molar in the newborn. *Pediatr Dent*, 1983, 5.3: 210-213.
96. PÖYRY, M.; RANTA, R. Anomalies in the deciduous dentition outside the cleft region in children with oral clefts. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia*, 1985, 81.2: 91-97.
97. NIK-HUSSEIN, Nik Noriah, et al. Supernumerary teeth in the premaxillary region: its effects on the eruption and occlusion of the permanent incisors. *Australian orthodontic journal*, 1990, 11.4: 247.
98. CAMM, Jeffrey H.; MOURINO, Arthur P. Multiple anomalies of a newborn: report of case. *The Journal of the American Dental Association*, 1987, 114.3: 335-336.
99. SINGH, S., et al. Reactive fibrous hyperplasia associated with a natal tooth: A case report. *J Indian Soc Pedo Prev Dent*, 2004, 22.22: 183-186.
100. SETHI, Harsimran Singh, et al. Natal tooth associated with fibrous hyperplasia—a rare case report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 2015, 9.4: ZD18.
101. BUTINI OLIVEIRA, Luciana, et al. Gingival fibrous hamartoma associated with natal teeth. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2005, 29.3: 249-252.
102. MUENCH, M. G.; LAYTON, S.; WRIGHT, J. M. Pyogenic granuloma associated with a natal tooth: case report. *Pediatric dentistry*, 1992, 14.4: 265.
103. STANEK, Jerzy, et al. Case of complex craniofacial anomalies, bilateral nasal proboscides, palatal pituitary, upper limbs reduction, and amnion rupture sequence: disorganization phenotype?. *Pediatric and Developmental Pathology*, 2001, 4.2: 192-202.
104. RHOUMA, A.; HORNEFF, G. Mohr-Claussen Syndrome or Oro-Facial-Digital Syndrome (OFDS) Type-II. *Klinische Pädiatrie*, 2014, 226.02: 78-79.
105. MORRISON, P. J.; YOUNG, I. D. Syringomas, natal teeth and oligodontia: a new ectodermal dysplasia?. *Clinical dysmorphology*, 1996, 5.4: 363-366.

106. BEARE, J. M.; DODGE, J. A.; NEVIN, N. C. Cutis gyrate, acanthosis nigricans and other congenital anomalies A new syndrome. *British Journal of Dermatology*, 1969, 81.4: 241-247.
107. TURNPENNY, P. D., et al. A four generation hidrotic ectodermal dysplasia family: an allelic variant of Clouston syndrome?. *Clinical dysmorphology*, 1995, 4.4: 324-333.
108. MANDAL, Anil K.; DAS, Taraprasad; GOTHWAL, Vijaya K. Angle closure glaucoma in nanophthalmos and pigmentary retinal dystrophy: a rare syndrome. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2001, 49.4: 271.
109. MARAKOGLU, Kamile, et al. Anencephalic infant with cleft palate and natal teeth: a case report. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 2004, 41.4: 456-458.
110. GIANT, C. N. N. Giant congenital nevocellular nevus and natal teeth. *Indian pediatrics*, 1996, 33: 417.
111. MAU, Ulrike, et al. Restrictive dermopathy: report and review. *American journal of medical genetics*, 1997, 71.2: 179-185.
112. BLOCH-ZUPAN, A., et al. Oro-dental features as useful diagnostic tool in Rubinstein–Taybi syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2007, 143.6: 570-573.
113. BERMAN, D. S.; SILVERSTONE, L. M. Natal and neonatal teeth. A clinical and histological study. *British dental journal*, 1975, 139.9: 361-364.