

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Kultivace kmenových buněk zubní pulpy
v kultivačním médiu bez xenogenních látek**

Tereza Suchánková Kleplová

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

Hradec Králové

2023

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

Autor: MDDr. Tereza Suchánková Kleplová,
Stomatologická klinika LF HK a FNHK

Školitel: MDDr. Nela Pilbauerová, Ph.D.,
Stomatologická klinika LF HK a FNHK

Oponenti: prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA,
Stomatologická klinika dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol

doc. MUDr. Marie Bartoňová, CSc.,
Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
..... v od hod.

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

.....
prof. MUDr. Romana Koberová Ivančaková, CSc.

Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu
Stomatologie
Garant doktorského studijního programu Stomatologie

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	5
3. Materiál a metodika	6
4. Výsledky	10
5. Diskuse	14
6. Závěr	20
7. Literatura	21

Seznam zkratek

avDT	aritmetický průměr DT pro jednu buněčnou linii během jedné kultivace
avDT_mX	průměrný DT všech linií kultivovaných v médiu X
avPD	průměrný počet PD pro jednu buněčnou linii v průběhu jedné kultivace
avPD_mX	průměrný počet PD za pasáž všech linií kultivovaných v médiu X
CD	povrchový znak, který společně s dalšími určuje fenotyp dané buněčné linie
cPDs	celkový součet PD, obvykle pro jednu buněčnou linii během jedné kultivace
cPDs/p	kumulativní počet PD dosažených do určité pasáže
DT	čas potřebný ke zdvojnásobení buněčné populace počítáno na dobu trvání jedné pasáže, $DT (h) = PD/\text{čas trvání pasáže (h)}$
EKM	experimentální kultivační média
FCS	fetální telecí sérum
HLAII	antigeny HLA – D a DR
HP	lidská krevní plazma
hSCs	lidské kmenové buňky
hASCs	kmenové buňky vyskytující se v lidském organismu postnatálně
hESCs	lidské embryonální kmenové buňky
hMSCs	lidské mezenchymální kmenové buňky
hDPSCs	lidské kmenové buňky zubní dřeně
hADPSCs	lidské kmenové buňky zubní dřeně stálých zubů
hDDPSCs	lidské kmenové buňky zubní dřeně dočasných zubů
hNDPSCs	lidské kmenové buňky zubní dřeně kongenitálních zubů
m_cPDs_mX	medián kumulativního počtu PD ve všech liniích kultivovaných v médiu X
m_cPDs/p_mX	medián kumulativního počtu PD ve všech liniích kultivovaných v médiu X v určité pasáži
m_X	medián dále uvedené hodnoty
MEM	Eaglovo Minimální esenciální kultivační médium
PD	počet zdvojení buněčné populace v jedné pasáži, $PD = \log_2 (\text{počet sklizených buněk} / \text{nasazených buněk})$
PRP	lidská krevní plazma bohatá na trombocyty
SDav	směrodatná odchylka aritmetického průměru
SKM	standardní kultivační médium

Kultivace kmenových buněk zubní pulpy v kultivačním médiu bez xenogenních látek

Souhrn

Úvod: Tématem předkládané studie je kultivace kmenových buněk zubní pulpy (hDPSCs) v kultivačním médiu bez xenogenních komponent. Není přípustné, aby byly v klinické praxi používány buňky, které proliferovaly pod vlivem xenogenních (mimodruhových) látek. V případě hDPSCs se jedná především o fetální telecí sérum (FCS). Přestože jsou tyto suplementy považovány za zlatý standard kultivace mezenchymálních kmenových buněk (hMSCs) a vlastnosti s nimi kultivovaných buněk byly postulovány jako charakteristické a určující vlastnosti jednotlivých linií hMSCs. Tím vyvstává základní otázka, pokud a jak ovlivňují xenogenní krevní deriváty vlastnosti buněk a jejich růstové charakteristiky. Existují dvě možnosti náhrady těchto látek jako komplexů růstových faktorů, kdy jsou do média přidány pouze definované růstové faktory tzv. bezsérová média, nebo náhrada zvířecích krevních doplňků lidskými, ideálně autologními. Cílem provedeného výzkumu bylo pomoci ozřejmit odpovědi na tyto otázky, které jsou základní pro buněčnou terapii a zavedení do lékařské praxe.

Metodika: Kultivací 12 linií hDPSCs ze stálých, dočasných a natálních zubů ve 12 různých médiích jsme zjišťovali vliv FCS, derivátů lidské krve krevní plazmy (HP) a na destičky bohaté krevní plazmy (PRP) o různých koncentracích (2%, 10%, 20%) na pěstované buňky pomocí růstových charakteristik a fenotypové analýzy. Nejprve byly všechny linie kultivovány do 15. pasáže za standardních kultivačních podmínek a diferencovány v osteogenní, chondrogenní a adipogenní buněčnou linii k průkazu kmenovosti.

Výsledky: Dle výsledků této studie je krevní derivát s nejvyšší podporou růstu PRP v 10% koncentraci pro kmenové buňky zubní dřene stálých zubů (hADPSCs) a natálních zubů (hNDPSCs). Kmenové buňky zubní dřene dočasných zubů (hDDPSCs) nejlépe rostly v médiu s 10% koncentrací HP. Fenotypová analýza prokázala pozoruhodné rozdíly v expresi povrchových markerů, kdy buňky kultivované v médiích s deriváty lidské krve vykazovaly vyšší neurogenní potenciál a fenotyp bližší embryonálním kmenovým buňkám (hESCs), zatímco buňky kultivované s FCS vyšší tendenci k expresi znaků hematopoetické řady bližší progenitorovým buňkám.

Závěr: V naší studii jsme prokázali vliv druhu krevní náhražky na fenotyp hDPSCs s tím, že lidské krevní deriváty o 10% koncentraci jsou ideální náhradou FCS, nejen s ohledem na proliferační aktivitu, ale především na udržení nediferencovaného stavu a neurogenního potenciálu.

Klíčová slova: Mezenchymální kmenové buňky, zubní dřeň, lidské krevní deriváty, kultivace.

Human dental pulp stem cells cultured in xenogeneic-free supplemented media

Summary

Introduction: The topic of the study is the cultivation of dental pulp stem cells (hDPSCs) in a xenogeneic-free culture medium. It is not permissible to use cells upon growing under the influence of xenogeneic (extraneous) substances in human clinical practice. The most frequently used in cultivation of hDPSCs is fetal calf serum (FCS/FBS). Unfortunately, these supplements are widespread in hMSCs cultivation, and all gold standard hMSCs properties were postulated in cells cultivated using these supplements. This raises the basic question if and how xenogeneic blood derivatives affect the properties of cells and their growth characteristics. There are two options for replacing these xenogeneic substances in the culture medium: the so-called serum-free media, or human blood supplements, ideally autologous ones. The conducted research was aimed at identifying the effects of xenogeneic and human blood supplements on basic hDPSCs characteristics that are fundamental to introduce the cell therapy into regular medical practice.

Method: By culturing 12 hDPSC lines obtained from adult, deciduous, and natal teeth in 12 different culture media, we investigated the effect of FCS, human blood derivatives, i.e., blood plasma (HP), and platelet-rich blood plasma (PRP) of different concentrations (2%, 10%, 20%) on cultured cells using growth characteristics and phenotypic analysis. First, all lines were cultured up to the 15th passage under standard culture conditions and differentiated into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lines to demonstrate stemness.

Results: According to the results of this study, the blood derivative with the highest growth support for dental pulp stem cells of permanent teeth (hADPSCs) and natal teeth (hNDPSCs) is PRP at the concentration of 10%. hDDPSCs grew best in cultivation medium with 10% HP. Phenotypic analysis showed remarkable differences in the expression of cluster of differentiation markers. Cells cultured in media with human blood derivatives have the higher neurogenic potential and a phenotype resembling the embryonic stem cells (hESCs), while cells cultured with FCS tended to express features of the hematopoietic lineage resembling the progenitor cells.

Conclusion: In our study, we demonstrated the effect of the various types of blood substitutes on the hDPSCs proliferation rate and phenotype. The human blood derivatives at the concentration of 10% are an ideal substitute for FCS due to their positive effect on hDPSCs proliferative activity, and support hDPSCs the undifferentiated state and neurogenic potential.

Key words: Mesenchymal stem cells, dental pulp, human blood derivatives, cultivation.

1. Úvod

V dospělém organismu existují kmenové buňky jako skryté a nepatrné tkáňově specifické subpopulace tzv. dospělých kmenových buněk¹, které, díky schopnosti diferencovat ve více buněčných typů domovské tkáně nebo orgánu, hrají důležitou úlohu v udržení homeostázy². Jejich hlavním úkolem je regenerace a reparace poškozených struktur^{3,4} za současného zachování původní dormativní populace⁵. Jednou z populací lidských adultních kmenových buněk jsou kmenové buňky zubní dřeně (hDPSCs). Tyto buňky jsou cenné nejen relativně snadnou dosažitelností. Především jsou na nich pozitivně hodnoceny tyto parametry: Multipotence získaných buněk, jejich plasticita, rychlá kinetika buněčného cyklu, endogenní exprese některých faktorů pluripotence a jejich imunomodulační efekt^{6,7}. S rostoucím množstvím znalostí a porozuměním jejich chování a vlastnostem se ukazují jako vysoce potentní zdroj pro regeneraci mezodermálních, neurálních a ektodermálních buněk a tkání^{8,9}. hDPSCs získáváme ze tkáně zubní dřeně stálých zubů (hADPSCs), nejčastěji retinovaných (s dutinou ústní nekomunikujících) třetích dolních molárů, dále ze zubů dočasných (hDDPSCs) se zachovalou zubní dření. Nejnovějším a zároveň nejranějším typem hDPSCs jsou kmenové buňky zubní dřeně natálních/neonatálních zubů (hNDPSCs)¹⁰. hADPSCs jsou vývojově heterogenní skupinou s většinou morfologií a vysokou proliferační aktivitu během dlouhodobé kultivace¹¹. Tyto buňky také exprimují na svém povrchu mezenchymální znaky, stejně jako některé povrchové znaky embryonálních kmenových buněk – Nanog, Oct4, specifické embryonické antigen-3 a 4¹², což podporuje teorii o jejich pluripotentní kapacitě^{13,14}. Od roku 2000, kdy byly hADPSCs prvně izolovány a popsány¹⁵, jsou intenzivně studovány. hDDPSCs jsou v porovnání s hADPSCs ontogeneticky časnější buněčnou populací vykazující kratší dobu potřebnou pro zdvojení populace^{13,16,17} a vyšší telomerázovou aktivitu¹⁸. Z těchto důvodů jsou podle některých autorů hDDPSCs slibnějším zdrojem pro humánní buněčnou terapii a regenerativní medicínu¹⁹. Linie kmenových buněk zubní dřeně získaných z natálních/neonatálních zubů (hNDPSCs) jsou ojediněle zkoumanými buněčnými liniemi, neboť se natální a neonatální zuby manifestují v Evropě s četností 1:3500 živě narozených dětí²⁰. Dále pouze malé procento z nich má tvar a morfologii dočasných zubů s přítomnou pulpální tkáně, která obsahuje hNDPSCs. Tyto buňky vykazují charakteristiky blízké embryonálním kmenovým buňkám^{21,22}, což přisuzujeme velmi časnou izolaci těchto buněk z nejranějšího postnatálního vývojového stadia lidského organismu a zároveň z vyvíjející se tkáně²³. Již v roce 2009 předpověděl Huang, Gronthos a Shi¹⁹ existenci kmenových buněk také v zubní dřeni kongenitálních zubů. hNDPSCs byly izolovány, kultivovány (v kultivačním médiu s 15% FCS) a charakterizovány Karaözem a kol. v roce 2010²⁴ a Akpinarem a kol. v roce 2014¹⁸. Obě

skupiny popsaly hNDPSCs jako metabolicky aktivní kmenové buňky, které exprimují na svém povrchu mezenchymální znaky, znaky embryonálních kmenových buněk a nevykazují hematopoetické markery.

Terapie kmenovými buňkami je zajímavá a slibná cesta k regeneraci ztracených, či poškozených tkání. Již od roku 1968 se úspěšně a rutinně provádí transplantace kmenových buněk kostní dřeně²⁵. V případech, kdy nejsem schopni získat dostatečné množství buněk a je tedy nutné je *in vitro* expandovat, se stále potýkáme s nepříznivým množstvím neznámých, což neumožňuje bezpečné provedení klinických studií. Jediná možnost, jak se vyhnout selhání terapie a jejím nežádoucím účinkům, je dokonalé porozumění změnám, kterým buňky podléhají za měnících se vlivů prostředí²⁶. V současnosti rozpoznáváme dva hlavní faktory ovlivňující vlastnosti kultivovaných buněk: 1) interindividuální rozdíly dárců²⁷ a 2) složení kultivačního média²⁸. Z tohoto pohledu se jedná o xenogenní složky kultivačních médií, které s sebou nesou medicínské a etické námitky ohledně jejich použití k expanzi buněčných populací pro humánní použití²⁹⁻³¹. Aby bylo možné výzkumná data mezi sebou porovnávat, potvrdit jejich věrohodnost a umožnit tak jejich aplikaci v buněčné terapii byly vytvořeny právně závazné předpisy, které určují a popisují, za jakých podmínek by měla být původní buněčná linie expandována a dále kultivována (*EU Tissues and Cells Directive (2004/23/EC)* a *U. S. current good manufacturing practice guidelines*). Účelem je minimalizovat rozdíly mezi buněčnými liniemi stejného původu, riziko kontaminace, imunitní reakce a imunizace v důsledku virové infekce nebo internalizace xenogenních proteinů³². Aby byly splněny požadavky těchto nařízení, musí být zaveden systém kontroly kvality a čistoty vstupního biologického materiálu, stejně jako platnost a správnost samotného výzkumného protokolu³³. Výše uvedené důvody obrací pozornost části vědecké komunity k náhradě xenogenních doplňků arteficiálními, nebo alogenními krevními komponentami^{34,35}. Ačkoliv není ani alogenní doplňky možné standardizovat, jejich použitím se vyhneme internalizaci mimodruhových látek – především vyloučíme riziko zoonóz a imunogenicity^{27,28}. Přes všechny uvedené argumenty naprostá většina preklinických a zejména klinických studií využívá média s 10% až 20% koncentrací fetálního telecího séra (FCS), což jak předpokládáme, je důvodem relativně vysoké variability v získaných výsledcích (od proliferační aktivity, přes viabilitu, až po rozdíly v expresi povrchových znaků).

Fetální telecí sérum (FCS) se díky vysokému obsahu růstových stimulačních faktorů, a naopak nízkému podílu inhibičních růstových faktorů v kombinaci s neschopností vědy vytvořit odpovídající arteficiální náhradu, stalo nejvíce využívaným růstovým doplňkem v kultivačních médiích. FCS představuje zatím jedinou možnost, jak udržet vysokou proliferační aktivitu

buněčných linií bez nutnosti přidávat další doplňkové růstové faktory³⁶. Avšak použití vysokých koncentrací FCS během dlouhodobé kultivace hADPSCs může vést ke spontánní diferenciaci^{37,38}, nebo maligní transformaci³⁹⁻⁴². V předchozích studiích jsme prokázali, že hADPSCs mohou být úspěšně dlouhodobě kultivovány se zachováním stabilního karyotypu i v nízko-sérových médiích (2% FCS), doplněných o *epidermal growth factor* (EGF) a *platelet-derived growth factor BB* (PDGF-BB)⁴³. Použití těchto růstových faktorů bylo popsáno pro buňky kostní dřeně a multipotentní progenitorové buňky^{44,45}. Dále naše skupina prokázala, že i při tomto složení média si hADPSCs uchovávají širokou diferenciací kapacitu vyžrávat v osteogenní, chondrogenní, endoteliální, neurogenní a myogenní buněčné linie⁴⁶. Hlavní složkou standardně užívaného kultivačního média pro somatické mezenchymální kmenové buňky zubní dřeně je alfa varianta Eaglova základního minimálního média^{46,47}. Naše výzkumná skupina Suchánek a kol.⁴³ používá „Standardní kultivační médium“ (SKM) založené na patentu č. US 7,015,097 B1⁴⁸, které dále obohacuje o vyšší koncentraci antioxidantu kyseliny askorbové a L-glutaminu, směs antibiotik penicilinu a streptomycinu a komplement inzulinu, transferinu a selenu (ITS).

S ohledem na původ séra není možné zaručit stabilitu a neměnné složení jednotlivých šarží pro rozdílné složení endokrinních parametrů a jiných biologicky aktivních látek, odlišné množství proteinů atd.^{18,24,49}. Přesto mnoho současných klinických studií využívá kultivační média obohacená právě o FCS, přehlížejíce nejen nestabilní složení, ale především potenciální nebezpečí, které s sebou nese používání xenogenních komponent a zároveň opomíjejí nutnost verifikovat vliv takových doplňků na kultivované buňky. Nelze také pominout skutečnost, že FCS se získává z nenarozených, avšak již dobře vyvinutých telat během porážky březích krav^{50,51}. Tato etická otázka je o to palčivější, že dochází k prodlevě mezi usmrcením mateřského organismu a smrtí fétu. Při tomto procesu není užito analgetik, ani anestetik, neboť se jedná o vedlejší produkt produkce masa v potravinářském průmyslu⁵². Použití xenogenních suplementů je v zásadním rozporu s dobrou laboratorní a výrobní praxí⁵⁴⁻⁵⁶. Přesto zůstává stále fetální telecí⁵⁷ zdaleka nejrozšířenějším suplementem kultivačních médií^{58,59}. Z toho důvodu je většina vědeckých poznatků o vlastnostech buněk založena na jejich kultivaci v médiích obohacených o FCS⁵³. Z uvedeného vyvstává potřeba tyto vlastnosti objektivizovat. Nejlepším kandidátem je přímo čerstvý buněčný izolát, ale nízká koncentrace buněk primokultury neumožňuje provést nutné testy pro nedostatek substrátu. Nejlepším východiskem, jak vyřešit tuto situaci, se zdá náhrada dosud používaného FCS některou z komponent lidské krve (alogenního, lépe autologního původu), nebo přímo bezsérovým médiem^{12,60}.

Ani alogenní a bezsérová média nejsou prosta problémů. Výhodou bezsérových médií je čistota a úplná chemická definovatelnost a standardizace vstupních komponent. Tím je umožněna úplná kontrola nad kultivačními podmínkami při eliminaci potenciálního zdroje infekce. Avšak nebyl dosud vyvinut arteficiální produkt, který by byl schopen lépe než krevní deriváty pokrýt požadavky somatických kmenových buněk při kultivaci *in vitro*^{61,62}. Alogenní sérum, které je levnější variantou bezsérových doplňků, je univerzálně použitelné pro všechny typy buněk⁵⁸. Mezi tato séra patří deriváty lidské krve zahrnující autologní, nebo poolované lidské sérum, sérum z pupečnickové a menstruační krve a deriváty krevních destiček^{63,64}, díky čemuž je lze lehce získat. Ačkoliv, jak poznamenává Zhang a kol.⁶⁵, může i alogenní suplement vyvolat imunitní reakci, být zdrojem kontaminace organismu a rozdíly mezi dárcem a dárce, či dárce a příjemcem mohou bránit aplikaci kultivovaných hMSCs, většina výzkumníků se shoduje, že alogenní séra jsou jedinou široce přijatelnou náhradou FCS⁶⁶⁻⁷². Existuje mnoho druhů alogenních sér. Lidská krevní plazma (HP) a lidská krevní plazma obohacená o krevní destičky (PRP) jsou dva nejsnadněji izolovatelní zástupci této široké skupiny. Pokud se jedná o alogenní séra bylo prokázáno, že PRP překoná v mnohém FCS a je tedy jeho adekvátní náhradou^{73,74}. HP a PRP séra obsahují stejné růstové faktory a cytokiny, ovšem s rozdílnou koncentrací, která je dána degranulací krevních destiček v PRP, kdy dojde k uvolnění těchto látek do vnějšího prostředí. Z toho plyne 3,5 až 5krát vyšší množství volných růstových faktorů a cytokinů v PRP, než které se nachází v HP^{75,76}. Dle Bernarda a kol.⁷⁷ a Kiliana a kol.⁷⁸ vede větší podíl krevních destiček v PRP ke zvýšení prosperity kultivovaných buněk, intenzivnější migraci a pomáhá potlačit možnou imunitní reakci.

2. Cíle

Hlavním cílem naší studie bylo vybrat nejvhodnější derivát lidské krve k náhradě FCS, standardního základního doplňku alfa modikovaného Eaglova minimálního esenciálního média pro kultivaci hMSCs⁷⁹. Konkrétně jsme se v naší práci zaměřili na kultivaci hDPSCs v sérových expanzních médiích. Naším cílem bylo posoudit vliv alogeních krevních derivátů (PRP, HP) a xenogenního krevního derivátu (FCS) na hNDPSCs, hDDPSCs a hADPSCs. Ke splnění tohoto cíle byly vybrány 2%, 10% a 20% koncentrace testovaných krevních derivátů. Důvodem byla zjištění týkající se koncentrace FCS, nejdéle používaného krevního suplementu živných médií eukaryotních buněk^{80,81}. 2% koncentrace je dle recentní literatury i našich předchozích studií optimálním kompromisem mezi bezsérovou variantou růstového média a sérovým typem. 10% koncentrace je standardně používána k expanzi hMSCs a považuje se za zlatý standard. A 20% koncentrace vede často ke spontánní diferenciaci, což je možné interpretovat jako důkaz cytotoxicity⁸². V první řadě bylo našim úkolem prokázat kmenovost izolovaných buněk. Buňky jsem vystavily dlouhodobé kultivaci překračující počet populačních zdvojení somatických buněk bez známek senescence⁸³. Dalším ukazatelem byla jejich schopnost diferencovat v osteoblasty, chondroblasty a adipocyty. Zkoumaná přítomnost STRO-1 v buněčné membráně kultivovaných buněk (*single pass cell membrane protein*) je specifickým znakem hMSCs. K přímému průkazu sebeobnovy jsme použili průkaz telomerázy. Abychom byli schopni provést validní srovnání, zaměřili jsme se na porovnání buněčných charakteristik prostřednictvím proliferační aktivity, viability, morfologie, schopnosti diferenciaci, přítomnosti znaků pluripotence a široké analýzy povrchových znaků charakteristických obecně pro hMSCs, úžeji pro hDPSCs a jejich podtypy hADPSCs, hDDPSCs a hNDPSCs.

3. Materiál a metodika

Izolováno bylo 12 linií hDPSCs (hADPSC1-4, hDDPSCs1-4 a hNDPSCs1-4), které byly kultivovány do 3. pasáže ve SKM (v této pasáži byl získán dostatek buněk), většina buněk izolovaných linií byla zamrazena. Nezamražené buňky byly podrobeny testům průkazu kmenovosti. Po průkazu kmenovosti byly zamražené buněčné linie rozmrazeny a nasazeny v kvadriplikátu do 12 experimentálních médií. Každou z těchto buněčných populací jsme kultivovali od 4. do 9. pasáže. V 9. pasáži byla hodnocena viabilita a morfologie buněčných populací. S ohledem na možnosti pracoviště byla provedena fenotypová analýza u hADPSCs1-4 ve všech médiích, u hDDPSCs1-4 v 6 médiích a u hNDPSCs1-4 ve 2 médiích.

Ke statistické analýze rovnoměrně distribuovaných dat byl použit parametrický statistický test analýzy rozptylu (ANOVA), u nerovnoměrně distribuovaných dat neparametrický test porovnání středních hodnot pro více souborů dat (Friedmanův test) na PASS Sample Size Software (NCSS LLC, USA).

Po čtyřech liniích od každého námi porovnávaného typu hDPSCs (hADPSCs, hDDPSCs, hNDPSCs) bylo izolováno ze zubní pulpy natálních, dočasných a stálých zubů. Všichni dárci byli mladší 30 let – průměrný věk dárce natálního zubu byl 3 dny, dárce dočasného zubu 12 let a stálého zubu 18 let, mezi dárci byli 4 muži a 8 žen (tj. v poměru 1:2). Extrahovanými zuby byly u natálních zubů zuby v místě dolních středních řezáků, popř. dolní střední řezáky, z dočasných zubů se jednalo vždy o první dočasné moláry a mezi stálými zuby byly získány dolní třetí stálé moláry (Tab. 1). Indikací k extrakci dolních třetích stálých molárů jsou obtíže spojené s jejich prořezáváním, nebo vztahem k okolním strukturám (retence, semiretence, opakující se záněty perikoronárního vaku, těsný kontakt s distálním kořenem dolních druhých molárů), u dětí pak prevence vzniku ortodontických vad, u natálních zubů komplikace spojené s příjmem mateřského mléka u kojených dětí. Extrakce byly provedeny na základě medicínské indikace a po získání písemného informovaného souhlasu. Před podpisem informovaného souhlasu byl pacient nebo jeho zákonný zástupce obeznámen s teorií kmenových buněk a plánovaným experimentem. Izolace kmenových buněk zubní pulpy pro vědecké účely, včetně textu informovaného souhlasu a poučení, byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové ref. č. 200712 S01P. Extrakce zubů byla provedena dle standardního operačního protokolu extrakce za aseptických kautel v lokální anestezii na Stomatologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

dárce zubů a identifikace buněčných linií hDPSCs					
buněčná linie			dárce		
hDPSCs	označení linie	zub	označení	pohlaví	věk
hADPSCs	hADPSCs_1	38	A-1	XX	18L
hADPSCs	hADPSCs_2	48	A-2	XX	16L
hADPSCs	hADPSCs_3	38	A-3	XX	21L
hADPSCs	hADPSCs_4	38	A-4	XY	18L
hDDPSCs	hDDPSCs_1	54	D-1	XY	12L
hDDPSCs	hDDPSCs_2	64	D-2	XX	13L
hDDPSCs	hDDPSCs_3	74	D-3	XY	10L
hDDPSCs	hDDPSCs_4	54	D-4	XX	10L
hNDPSCs	hNDPSCs_1	071	N-1	XX	3D
hNDPSCs	hNDPSCs_2	081	N-2	XX	1D
hNDPSCs	hNDPSCs_3	071	N-3	XX	5D
hNDPSCs	hNDPSCs_4	071	N-4	XY	0D

Tab. 1: Identifikace buněčných linií hDPSCs dle dárce (XY – muž, XX – žena, L – let, D – den).

Odběr zubní dřeně extrahovaných zubů, izolace a kultivace kmenových buněk zubní dřeně byly provedeny v Laboratoři tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové dle Standardních operačních protokolů⁸⁴. Takto byly všechny hDPSCs expandovány do 3. pasáže. Ve 3. pasáži byla větší část linií hDPSCs zamrazena v kryokonzervačním médiu. Nezamražené hDPSCs byly použity k průkazu kmenovosti a schopnosti jednotlivých typů diferencovat ve zralé buněčné linie (osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciaci) (tzv. trojlineární diferenciaci). Standardní kultivační médium se skládá z těchto složek: alfa-MEM, 2% FCS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF-BB, 50 nM dexametazonu, 0,2 mM L-askorbát-2-fosfátu, 2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu a 10 µl/ml ITS. Viabilita byla hodnocena pomocí zobrazovacího systému automatického cytometru Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer. Hodnocení morfologie probíhalo před každým pasážováním a třetí den po nasazení. V inverzním mikroskopu jsme hodnotili především tvar buněk a jejich schopnost adherovat k povrchu kultivační nádoby. Imunocytochemické barvení znaků pluripotence hDPSCs probíhalo dle protokolu Siriboon et al.⁸⁵.

znak pluripotence	název primární protilátky	klonalita	číslo produktu	výrobce
STRO-1	Anti-STRO-1 Antibody	mono	MAB4315	Sigma-Aldrich, Německo
TELOMERÁZA	Anti-Telomerase Antibody	poly	SAB4502944	Sigma-Aldrich, Německo
NANOG	Anti-Nanog Antibody	mono	MABD24	Sigma-Aldrich, Německo
SOX-2	Anti-SOX-2 Antibody	mono	MAB4343	Sigma-Aldrich, Německo
OCT-4	Anti-OCT-4 Antibody	poly	AB3209	Sigma-Aldrich, Německo

Tab. 2: Protilátky k průkazu pluripotence hDPSCs.

K osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciaci byly hDPSCs ze 3. pasáže nasazeny do 6 kultivačních nádob v množství $2,5 \times 10^5$ buněk a kultivovány ve Standardním kultivačním médiu do dosažení 70-100% splývavosti. Následně byly kultivační nádoby rozděleny po 3 na experimentální a kontrolní. Kontrolní skupiny byly kultivovány dle Standardního kultivačního protokolu⁸⁴, skupiny testovací byly nasazena do diferenciacních médií, kde byly ponechány 4 týdny. Následně byly buňky sledovány nativně a fixovány a histologicky barveny k průkazu diferenciaci.

Poté, co byla kmenovost těchto buněčných populací prokázána, byly zamražené buňky rozmrazeny a každý typ hDPSCs nasazen v kvadruplikátu do dvanácti různých kultivačních médií, kde byl kultivován od 4. – 9. pasáže. Podstatou všech experimentálních kultivačních médií bylo Základní kultivační médium (ZKM). To se skládá z alfa MEM jako základní složky, která byla obohacena o 10 ng /ml EGF, 10 ng /ml PDGF-BB, 1 ng/ml FGF-2, 50 nM dexametazonu, 0,2 mM L-askorbát-2-fosfátu, 2 mM L-glutaminu a 100 IU/ml penicilinu s 100 µg/ml streptomycinu. Odběr a příprava derivátů lidské krve (HP, PRP) a jejich použití v kultivačním médiu byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové pod ref. č. 201011 S14P. Každý krevní derivát byl získán smísením vzorků pěti dárců. Krevní deriváty byly připraveny ve spolupráci s Transfúzním oddělením Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Níže uvedený výčet experimentálních kultivačních médií ukazuje rozdíly v jejich hlavních složkách. (Tab. 3).

médium A	ZKM + 2% FCS	médium B	ZKM + 2% FCS + ITS
médium C	ZKM + 2% HP	médium D	ZKM + 2% HP + ITS
médium E	ZKM + 2% PRP	médium F	ZKM + 2% PRP + ITS
médium G	ZKM + 10% FCS	médium H	ZKM + 20% FCS
médium I	ZKM + 10% HP	médium J	ZKM + 20% HP
médium K	ZKM + 10% PRP	médium L	ZKM + 20% PRP

médium	xenogenní	alogenní	FCS			HP			PRP			ITS		
			2%	10%	20%	2%	10%	20%	2%	10%	20%	2%	10%	20%
A	x		x											
B	x		x											x
C		x				x								
D		x				x								x
E		x								x				
F		x								x				x
G	x			x										
H	x				x									
I		x					x							
J		x							x					
K		x								x				
L		x											x	

Tab. 3: Složení kultivačních médií použitých v experimentu.

Fenotypovou analýzu jsme provedli v 9. pasáži kultivace jednotlivých linií hDPSCs v experimentálních médiích. Antigeny zkoumaných povrchových znaků jsou uvedeny v Tab. 4.

protilátka	fluorochrom	klon	protilátka	fluorochrom	klon	protilátka	fluorochrom	klon
anti-CD9	FITC	MM2/57	anti-CD49e	FITC	SAM-1	anti-CD146	PE	TEA1/34
anti-CD10	FITC	CB-CALLA	anti-CD63	FITC	CLBGran/12	anti-CD166	PE	3A6
anti-CD13	FITC	WM-15	anti-CD68	FITC	K51	anti-CD197	FITC	3D12
anti-CD14	FITC	RMO52	anti-CD71	FITC	YDJ1.2.2	anti-CD221	PE	1H7
anti-CD18	PE	2E6	anti-CD73	PE	AD2	anti-CD222	FITC	MEM-238
anti-CD19	FITC	J4.119	anti-CD81	FITC	JS-81	anti-CD235a	FITC	JC159
anti-CD29	FITC	TDM29	anti-CD90	FITC	F15-42-1	anti-CD271	FITC	ME20.4
anti-CD31	PE	MBC78.2	anti-CD105	PE	1G11	anti-CXCR4	PE	12G5
anti-CD33	PE	D3HL60.251	anti-CD106	PE	51-10C9	anti-HLA I	FITC	Tü149
anti-CD34	PE	581	anti-CD117	PE	YBS.B8	anti-INF β	FITC	MMHB-3
anti-CD44	PE	MEM-85	anti-CD119	PE	GIR-208	anti-HLA-DR	PE	Immu-357
anti-CD45	FITC	J.33	anti-CD133	PE	EMK08	anti-OC T3/4	PE	EM92
anti-CD49d	FITC	HP2/1	anti-CD140	PE	16A1	anti-STRO-1	FITC	STRO-1

Tab. 4: Použité imunofluorescenční protilátky s navázaným cytochromem.

4. Výsledky

Všechny linie hDPSCs byly nejprve kultivovány pro průkaz kmenovosti do 15. pasáže (vč.) ve SKM, podrobeny trojlineární diferenciací a průkazu přítomnosti STRO-1. Poté byly nasazeny do experimentálních médií, kde byly sledovány růstové charakteristiky a exprese povrchových znaků. Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných linií hADPSCs1-4 za 15 pasáží byl 54,10 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $53,95 \pm 6,12$ cPDs. Medián času zdvojení buněčných linií hADPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68 \pm 18,58$ h. Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných linií hDDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 51,74 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $52,24 \pm 4,68$ cPDs. Medián času zdvojení buněčných populací hDDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68 \pm 18,58$ h. Medián kumulativního počtu zdvojení buněčných linií hNDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 65,44 cPDs a jejich aritmetický průměr byl $65,03 \pm 1,30$ cPDs. Medián času zdvojení buněčných populací hNDPSCs1-4 za 15 pasáží byl 43,68 h a jejich aritmetický průměr byl $43,68 \pm 18,58$ h.

Trojlineární diferenciaci, tj. osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciaci, byla provedena u všech linií hADPSCs, hDDPSCs a hNDPSCs. K tomuto účelu byly použity buňky z 6. pasáže. Výsledkem histologických barvení po osteogenní diferenciaci hDPSCs byl průkaz osteoidu podle von Kossy a vápníkových depozit alizarinovou červení. Vizualizovali jsme intracelulární tukové kapénky v buněčné kultuře hDPSCs vystavené působení adipogenního média pomocí olejové červení. Chondrogenní diferenciaci byla potvrzena přítomností glykosaminoglykanů chrupavčité tkáně.

Metodou imunocytochemické detekce jsme prokázali u hADPSCs a hDDPSCs přítomnost proteinového markeru mezenchymálních kmenových buněk STRO-1 a enzymu reverzní transkriptázy telomerázy. Kmenové buňky zubní dřeně natálních zubů nesou některé transkripční faktory a znaky pluripotence shodné s hESCs. Imunofluorescenčním barvením, doplněným o barvení buněčných jader pomocí DAPI, jsme prokázali přítomnost jaderného transkripčního faktoru NANOG, zásadního znaku pluripotence a schopnosti diferenciaci, definujícího embryonální kmenové buňky. Dále byly prokázány transkripční faktory OCT-4 a SOX2. Barvením metodou Fast Blue byla prokázána vysoká úroveň alkalické fosfatázy (ALP), enzymu vysoce aktivního v embryonálních a neurálních kmenových buňkách.

Pokud shrneme výsledky růstových charakteristik hDPSCs v experimentálních médiích, pak nejvyšší proliferační aktivity dosahovaly hADPSCs1-4 v médiu K (10% PRP), medián PD byl 7,68, přibližně o 2 PD více než v médiu D (2% HP + ITS) s 5,67 PD. Sestupně následovala

média F (2% PRP+ITS) s 4,85 PD, B (2% FCS+ITS) s 4,34 PD a I (10% HP) s 4,07 PD. Nejméně růst hADPSCs1-4 podporovalo médium H (20% FCS) s 1,66 PD. Nejvyššího počtu populačních zdvojení bylo dosaženo opět v médiu K (47,44 PD) s odstupem následovala média D (33,94 PD), B (25,30 PD) a I (24,96 PD). Dle očekávání bylo dosaženo nejnižšího počtu populačních zdvojení v médiu H (11,24 PD), překvapivě nízké úrovně proliferační aktivity dosahovaly také buňky v médiu A (12,51) a E a F (u obou shodně 13,14 PD). Nejrychleji proliferovaly hADPSCs1-4 v médiu K, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 11,35 h. S odstupem přibližně 4 hodin následovaly buňky kultivované v médiu D (16,90 h), následované buňkami v médiu F (19,95 h), B (21,10 h) a (22,23 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali u hADPSCs1-4 v živném médiu H (57,51 h) a médiu E (56,24 h). Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly hDDPSCs1-4 v médiu I (10% HP), medián populačního zdvojení během kultivace v 10% HP byl 4,35, což je přibližně o 1,5 populační zdvojení více v médiu K (10% PRP) s 2,89 PD. Sestupně následovala média F (2% PRP+ITS) s 2,52 PD, B (2% FCS+ITS) s 2,46 PD a J (20% HP) s 2,16 PD. Nejnižší podporu růstu poskytovala média C (2% HP) s 0,77 PD a H (20% FCS). Nejvyššího počtu populačních zdvojení hDDPSCs1-4 bylo dosaženo v médiu I (25,30 PD), druhým bylo médium K (16,19 PD); následovala média F (13,91 PD), B (13,12 PD) a J (13,03 PD). Nejnižšího počtu populačních zdvojení bylo dosaženo v médiu C (4,81) a nízkých hodnot v médiu H (5,55), L (6,17 PD), A (6,42 PD) a E (6,48 PD). Nejrychleji proliferovaly hDDPSCs1-4 v médiu I, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 20,84 h s odstupem přibližně 12,5 hodin následovaly buňky kultivované v médiu K (33,33 h), sestupně buňky v médiu B (35,45 h), F (36,57 h) a J (43,02 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali hDDPSCs1-4 v médiu C (127,34 h) a H (105,25 h).

Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly hNDPSCs1-4 v médiu K (10% PRP), medián populačního zdvojení během kultivace byl 16,92, přibližně o 7 populační zdvojení více než v médiu D (2% HP+ITS), kde tato hodnota dosahovala 11,06 PD. Sestupně následovala média I (10% HP) s 8,12 PD a L (20% PRP) s 6,34 PD. Nejnižší proliferační aktivita se projevila v médiu A (2% PRP) s 1,93 PD. Nejvyššího počtu populačních zdvojení hNDPSCs1-4 bylo dosaženo v médiu K (39,42 PD), sestupně pak v médiu D (68,00 PD), I (48,33 PD), L (39,42 PD) a G (37,57 PD). Nejnižší počet populačních zdvojení byl pozorován v médiu A (12,27). Nejrychleji proliferovaly hNDPSCs1-4 v médiu K, kdy čas zdvojení buněčné populace dosahoval 5,53 h s odstupem přibližně 3 hodin následovaly buňky kultivované v médiu D (8,55 h), s větším odstupem buňky v médiu I (11,71 h), L (15,03 h) a G (15,87 h). Nejpomalejší růst jsme pozorovali u hNDPSCs1-4 v živném médiu A (44,62 h) a H (31,83 h).

Buněčná morfolgie hDPSCs kultivovaných v médiu s 2 % PRP+ITS odpovídala obecně představě o jejich morfolologii. Jednalo se o buňky protáhlého, vřetenitého tvaru podobné fibroblastům. hDPSCs expandované v kultivačním médiu s 2 % FCS byly oválnější. Buňky rostoucí v médiu s 10 % PRP byly oproti všem ostatním protáhlejší a hůře adherovaly k povrchu kultivační nádoby. Naopak silně a velkou plochou lnuly k povrchu buňky s mnohočetnými výběžky cytoplazmy expandované s 10 % HP. Zaznamenali jsem změnu morfologie u buněk kultivovaných v 10 % HP, které silně adherovaly k povrchu kultivační nádoby velkou plochou svého buněčného těla. Všechny ostatní buňky si zachovaly původní vřetenovitý tvar. Viabilita hDPSCs v médiu s 2% FCS+ITS, 2% PRP+ITS a 10% PRP byla vyšší než 90 %, v médiu s 10% HP byla vyšší než 85 % a v médiu s 2% HP+ITS byla 75,93 %.

Fenotypová analýza hADPSCs1-4 byla provedena ve všech experimentálních médiích. hADPSCs1-4 neměly na svém povrchu vyjádřeny znaky HLAII a CD106. Negativní byly také na přítomnost znaku CD49d a CD49e, mimo média H, kde byla zjištěna nízká pozitivita. CD31 byl negativní ve většině médií, mimo médium C a E (nízká pozitivita CD31), K (střední pozitivita CD31) a v médiu L, kde byla zjištěna pozitivita CD31 vysoká. CD45 byl negativní také ve většině médií, mimo média A, B, D, H (nízká pozitivita pro CD45). CD34 byl negativní ve většině médií, mimo médi I a K (nízká pozitivita CD34) a médium L (střední pozitivita CD34). CD271 byl ve většině médií negativní, mimo média A, B, H, L (nízká pozitivita CD271). Povrchové znaky CD166 a CD29 vykazovaly ve všech buněčných populacích vysokou pozitivitu. CD9 byl vysoce pozitivní ve většině médií, mimo médium G (střední pozitivita CD9) a médium H (znak CD9 nevyjádřen). CD63 byl vysoce vyjádřen ve většině médií, mimo médium H a I (střední pozitivita CD63). HLAI vykazoval vysokou pozitivitu ve většině médií, mimo médium G a H (střední pozitivita HLAI). CD13 vykazoval vysokou pozitivitu ve většině médií, mimo médium I, J a K (střední pozitivita CD13) a médium L (nízká pozitivita CD13). CD44 byl vysoce pozitivní ve většině médií, mimo média E, F a K (nízká pozitivita CD44) a L (znak CD44 nepřítomen). CD73 a CD 90 shodně vykazoval ve většině médií vysokou pozitivitu, mimo média E a F (střední pozitivita CD73 a CD90), médium K (nízká pozitivita CD73 a CD90) a médium L (znak CD73, ani CD90 nevyjádřen). Ostatní povrchové znaky nevykazovaly jednoznačný většinový příklon ke stupni vyjádření. CD10 byl v médiích A, E, G, I nepřítomen, v médiích B, C, D, H, J, K nízce pozitivní, v médiu L středně pozitivní a v médiu F vysoce pozitivní, CD18 byl v médiích H a J nepřítomen, v médiích A, E, K, L nízce pozitivní, v médiích G, a I středně pozitivní a v médiích B, D, F vysoce pozitivní. CD71 byl nepřítomen v médiu G, H a L, nízce pozitivní v médiích A a J, středně vyjádřen

v médiích B, C, D, E, I a vysoce vyjádřen v médiích F, K a L. CD105 byl nepřítomen v médiu K a L, nízce pozitivní v médiích D, E, F, G, středně pozitivní v médiu D a E a vysoce pozitivní v médiích B, C, H a I. CD117 byl nepřítomen v médiu J, nízce pozitivní v médiích A, B, C a G, středně pozitivní pro média D a E a vysoce pozitivní v médiích F, K a L. CD146 nebyl vyjádřen v médiích G, J, a I, nízce pozitivní v médiích A a E, středně pozitivní v médiích C, H a K a vysoce pozitivní v médiích B, D, F a L. CD184 byl nepřítomen v médiu A, G, H a J, nízce pozitivní v médiích B, C, D, E a I, nízce pozitivní v médiích B, C, D, E, a I, středně pozitivní v médiu F a vysoce pozitivní v médiích K a L. STRO-1 byl pozitivní u všech buněk hADPSCs1-4 nad 5 % (v rozmezí 5,01-28,73 %).

Fenotypová analýza hDDPSCs byla provedena pouze ve vybraných experimentálních médiích, tj. A, B, F, I, K, H (Tab. 44). Zcela negativní byly buněčné populace hDDPSCs1-4 na HLAI, CD106, CD18, CD31, CD49d, CD49e, CD133 a CD197. CD 45 nebyl ve většině médií vyjádřen, mimo médium B a F (nízká pozitivita CD45). CD34 nebyl ve většině médií vyjádřen, mimo médium H (střední pozitivita CD34). Vysokou pozitivitu vykazovaly ve všech médiích povrchové znaky CD73 a HLAI. Znaky CD9, CD13, CD44, CD29, CD90, CD166, CD222 a CD271 byly ve všech médiích vysoce pozitivní, mimo média H (negativní pro CD9 a CD222; nízce pozitivní pro CD271; středně pozitivní pro CD13 a CD166), médium K (středně pozitivní pro CD44, CD90 a Střední pozitivitu vykazovaly znaky CD105, CD146 a CD117 ve většině médií, mimo médium H (nízce pozitivní pro CD105 a negativní pro CD117), médium K (vysoce pozitivní pro CD105, CD146 a CD117), médium I (vysoká pozitivita pro CD105 a CD146), médium F (vysoká CD271), médium F (středně pozitivní pro CD44), médium A (středně pozitivní pro CD29), médium I (středně pozitivní pro CD271). pozitivita pro CD 117). Převážně nízkou pozitivitu mají v námi zkoumaných buněčných populacích hDDPSCs1-4 povrchové znaky CD63, CD71, CD184, CD10, mimo médium H (negativní pro CD63, CD184 a CD10, vysoce pozitivní pro CD71), médium K (vysoce pozitivní pro CD71 a CD184), médium F (středně pozitivní pro CD10 a CD184). STRO-1 byl u všech hDDPSCs1-4 nad 9 % (9,06 – 11,02 %). Fenotypová analýza hNDPSCs byla provedena pouze ve vybraných experimentálních médiích, tj. B a F. Zcela negativní byly buněčné populace hDDPSCs1-4 pro HLAI. Povrchové znaky CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD71, CD73, CD90, CD166, CD222, INF beta, OCT3/4, HLAI byly v obou médiích vysoce pozitivní. CD 18 byl vysoce pozitivní v médiu F a nepřítomen v médiu B. Znaky CD31, CD34, CD117, CD133, CD146, CD197 byly v médiu F vysoce pozitivní, v médiu B nízce pozitivní. Povrchové znaky CD49d, CD105, CD106, CD184 a CD271 byly v médiu F vysoce pozitivní, v médiu B středně pozitivní. STRO-1 byl u všech hNDPSCs1-4 vysoce pozitivní, nad 90 % (90,95-99,99 %).

5. Diskuse

Ve výzkumu se od roku 2005 zaměřujeme na snížení obsahu FCS jako xenogenní komponenty v kultivačním médiu pro hDPSCs⁴³. V předchozích studiích se jeho množství podařilo snížit na 2% koncentraci, ale ne zcela vyloučit²³. V této práci jsme prokázali, že lze nahradit FCS deriváty lidské krve v kultivačních médiích, aniž by došlo ke snížení proliferační aktivity. Abychom získali data, která bude možno porovnat, testovali jsem 12 různých médií na 12 buněčných liniích hDPSCs. Jsme si plně vědomi, že mohla mít kultivace během prvních třech pasáží v médiu s 2 % FCS+ITS vliv na pozorované vlastnosti, na druhou stranu provedené analýzy jasně potvrdily rozdíly ve fenotypu, morfologii i proliferační aktivitě. Přestože již byly provedeny studie porovnávající vliv médií obohacených o FCS nebo krevní deriváty na buněčné vlastnosti⁸⁶, jak poukázala prostřednictvím metaanalýzy dat získaných z publikovaných studií Palombella a kol.⁸⁷, není možné tato data statisticky zhodnotit. Stejně jako většina výzkumných skupin jsme u všech linií před započítáním experimentu prokázali kmenovost dlouhodobou kultivací, přítomností telomerázy, STRO-1 a trojlineární diferenciaci^{88,89}.

Nejvyšší proliferační aktivitu vykazovaly buněčné linie hADPSCs kultivované v médiu s 10 % PRP v souladu se studií⁹⁰. Dle růstových křivek se nejúspěšnější kultivační média obohacená o krevní suplementy pro kultivaci hADPSCs řadí sestupně takto – 10 % PRP (1.), 2 % HP+ITS (2.), 2 % PRP+ITS (3.), 2% FCS+ITS (4.) a 10% HP (5.). Je pozoruhodné, že pozitivita základních povrchových znaků hMSCs u hDPSCs kultivovaných v jednotlivých médiích velmi kolísá (CD73, CD90, CE102, CD34, CD45 a HLA I-); a to narozdíl od málo úspěšných růstových médií, kde dosahuje vysoké shody (2 % HP, 20 % HP, 10 % FCS). Ani recentní literatura se zcela neshoduje na panelu pro hDPSCs⁹. V médiích s vysokou proliferační aktivitou se vyskytují povrchové znaky základního panelu pro hMSCs v těchto hodnotách: 10 % PRP (CD7+, CD90+, CD105-, CD34+, CD45-, HLAII-), 2 % HP+ITS (CD73+++ , CD90++++, CD105+++ , CD34-, CD45+, HLA II-), v médiu s 2 % PRP+ITS (CD73++ , CD90++ , CD105+ , CD34-, CD45-, HLAII-), 2 % FCS+ITS (CD73+++ , CD90+++ , CD105+++ , CD34-, CD45+) a médiu obohacené o 10 % HP (CD73++++, CD90+++ , CD105+++ , CD34+, CD45+, HLA II-). V preferovaném kultivačním médiu, které umožnilo hADPSCs nejrychlejší proliferační aktivitu, tedy médiu s 10% PRP, byly buňky pozitivní na zcela jiné znaky kmenových buněk, a to CD9+++ , CD29+++ , CD63+++ , CD166+++ , CD71+++ , CD117+++ , CD184+++ a postrádaly znaky CD45, CD49, CD105, CD106 a CD271. Obecně pro buňky kultivované v prvních pěti médiích s vysokou aktivitou růstu (viz. výše) platí tento panel znaků kmenových buněk: CD9+++ , CD29+++ , CD63+++ , HLA I+++ , CD166+

CD45-, CD49-, CD106-, CD271-, HLAI). Receptor pro *Stem Cell Factor*, cytokinový receptor pro kmenové buňky a zároveň glykoprotein, který reguluje jejich diferenciaci, CD117 a receptor CD71 nezbytný pro erythropoézu a neurologický vývoj nesly hADPSCs kultivované nejen v médiu s 10 % PRP, ale také s 2 % PRP+ITS. Buňky kultivované v médiu s 2 % HP+ITS a 2 % FCS+ITS vykazovaly stejný profil povrchových znaků jako mezenchymální kmenové buňky pupečníku a amnia (CD13+, CD29+, CD 44+, CD73+, CD90+, CD105+), pouze pro buňky amnia je profil rozšířen o CD166+ a CD34-, CD49-⁹¹ s tím rozdílem, že byly níže pozitivní pro CD45, kdy u výše zmíněných buněk tento znak absentuje. Celému profilu pak odpovídaly hADPSCs kultivované v médiu s 2 % PRP+ITS a v médiu s 10 % HP. Není bez zajímavosti, že hADPSCs kultivované v médiích s vysokou podporou růstu (viz. výše) exprimují na svém povrchu znak embryonálních kmenových buněk CD9⁹² a jsou pro něj dokonce vysoce pozitivní. Tyto buňky svým fenotypovým profilem odpovídají spíše ranějším buněčným typům, než obecně nesou kmenové buňky zubní dřeně stálých zubů, a to především buňkám dentálního folikulu⁹³. Podobně vysokou expresí povrchového znaku CD63 odpovídají fenotypu postulovanému pro kmenové buňky zubní pulpy dočasných zubů¹¹. Ideálně panel postulovaný pro hMSCs⁹⁴ splňují hADPSCs kultivované v médiu s 2% HP (8. médium v podpoře růstu ze 12) (CD73+++ , CD90+++ , CD105+++ , CD34- , CD45- , HLA II). Následované buňkami v růstovém médiu s 20% HP (12. médiu, tedy nejhorší) (CD73+++ , CD90+++ , CD105++ , CD34- , CD45- , HLAI-). Dále s klesající pozitivitou znaků v médiu s 10% FCS (7. médium) (CD73+++ , CD90+++ , CD105+ , CD34- , CD45- , HLA II-). A nakonec v médiích s 2% PRP (10. médium) a 2% PRP+ITS (3. médium), kde znaky dosahovaly shodné positivity/negativity (CD73++ , CD90++ , CD102+ , CD34- , CD45- , HLA II-). Obecně uznávaný profil hADPSCs je CD29+ , CD44+ , CD73+ , CD90+ , CD105+ , CD117+ , CD146+ , CD271+ , CD166+ a STRO-1+ , CD34- , CD45- , CD106- , HLAI I-)^{19,95-98}. Tomuto profilu odpovídají hADPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS a 2 % FCS+ITS. Přestože nejlepších růstových hodnot dosahovaly hADPSCs v médiu s 10 % PRP, jejich fenotypový profil se výrazně lišil od postulovaného základního panelu povrchových znaků pro hMSCs⁹⁴. Minimálním kritériím pro hMSCs (CD73+ , CD90+ , CD105+ a CD34- , CD45 – a HLA II-)⁹⁴ odpovídají hADPSCs kultivované v médiích s 2 % HP, 10 % HP, 20 % HP a hraničně s 10 % HP, 2 % HP+ITS a 20 % FCS. Média s obsahem PRP vykazují zajímavou tendenci ke snižování positivity CD73, CD90, CD105 (nízká pozitivita) a zároveň naprosto postrádají CD34 a CD45. Se zvyšujícím se procentuálním zastoupením PRP (10 %, 20 %) nejprve ztrácí CD105, u 20 % PRP jsou pak CD73, CD90 také negativní, naopak opačný trend má CD34, které je v 10 % PRP níže pozitivní, ve 20 % PRP již středně pozitivní. Negativní pro znak HLA II jsou hADPSCs

ve všech médiích. Všechny buněčné populace hADPSCs byly pozitivní na STRO-1, povrchový znak stromálních prekurzorových buněk, dále na CD166, CD63, HLA I, CD9, CD29 a zároveň negativní pro CD106. Nízkou pozitivitu pro nervový růstový receptor CD271 vykazovaly buňky hADPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS, 2 % FCS+ITS, 20 % FCS a 20 % PRP. Znak perivaskulárních buněk CD146 nesly všechny buňky, mimo buněk kultivovaných v 10 % FCS, 10 % HP a 20 % HP, nízkou pozitivitu pro tento znak byly buňky v růstových médiích 2 % FCS a 2 % PRP. Ueda a kol.⁹⁹ připomíná, že CD146 negativní buňky jsou považovány za buňky, které jsou v případě potřeby schopné migrovat do poškozené tkáně a diferencovat v odontoblasty a které mají mnoho shodných vlastností s hMSCs, díky nimž jsou schopné regenerovat zubní dřev *in vivo*. Absence CD34, jakožto znaku hematopoetických buněk nebo buněk endotelia, a znaku CD 45, běžného leukocytárního antigenu, byla u námi kultivovaných buněk hADPSCs téměř absolutní, mimo buňky z 20% FCS, u nichž ve shodně se studií Laino a kol.¹⁰⁰. Buňky hADPSCs kultivované bez PRP vykazovaly také obdobný fenotypový profil jako mezenchymální buňky získané z pupečníku (CD13+, CD29+, CD44+, CD105+, CD166+, HLA I+, CD45-, CD34-)¹⁰¹. Receptor růstového faktoru kmenových buněk CD117 je exprimován na povrchu většiny hADPSCs⁷⁹. Tento závěr potvrdila také naše studie s výjimkou buněk v médiu s 20 % HP. Zajímavé je, že čím vyšší podíl PRP byl v médiu obsažen, tím více rostla pozitivita tohoto znaku. Zároveň se na profilu hADPSCs (CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, HLAII-) shoduje většina autorů^{102,103}. S absencí znaku CD44 a CD105 se setkáváme u vysoce koncentrovaných médií s obsahem PRP (10 % a 20 %). Buněčné adhezivní molekuly CD44, CD146 a CD166 jsou nesené na povrchu naprosté většiny námi analyzovaných buněčných populací, stejně jako popisuje Rojewski a kol.¹⁰⁴. Ovšem narozdíl od tohoto autora jsou buňky námi kultivované zcela negativní na přítomnost adhezivní molekuly CD106, na tzv. VCAM-1. Buněčnými integriny, hlavními mediátory adheze mezi buňkami a extracelulární matrix, jejichž přítomnost jsme zjišťovali, byly CD18, CD29 a CD49e, CD49d a CD13, jeden ze znaků nesený prekurzory kmenových buněk. Tyto znaky byly ve všech námi pozorovaných buněčných populacích pozitivní. CD18, integrinů beta-2, byl pozitivní u buněk rostoucích ve většině médií, mimo dvou médií s vysokým obsahem krevního derivátu, tj. 20 % FCS a 20 % HP. Na členy rodiny Integrinů alfa byly všechny buňky negativní. I v literatuře hodnoty těchto molekul u hMSCs a i jiných progenitorových buněk, např. hematopoetické řady, výrazně variiují¹⁰⁵. Nejvíce se profilu prekurzorů kmenových buněk svými povrchovými znaky blíží hADPSCs kultivované ve 2 % PRP+ITS (CD10+, CD13+, CD71+, CD90+, CD105+, CD117+)¹⁰⁴. Dle studie Halfona a kol.¹⁰⁶ by mohla nízká exprese

CD106, kterou jsme pozorovali v 9. pasáži hADPSCs v naší práci, znamenat již přechod od hMSCs k diferencovanějším buněčným populacím, např. osteogenním fibroblastům.

Námi kultivované buňky dočasných zubů ve všech médiích postrádaly povrchové znaky CD18 (receptor komplementu), CD31 (adhezivní molekula krevních destiček pro buňky endotelu), CD34 (adhezivní molekula pro hematopoetické buňky), CD45 (*recognize leukocyte common antigen*) receptor typu C proteinové tyrosin fosfatázy vyskytující se v různých izoformách na všech hematopoetických buňkách kromě červených krvinek a plazmatických buněk, rodinu integrinů CD49, CD106 (adhezivní molekula, endoteliální ligand pro integrin alfa4beta1), CD133 (marker klidových kmenových buněk), CD197 (chemokinový receptor na lymfatických tkáních aktivovaných B a T lymfocyty) a HLA II. Ve shodě s hADPSCs byly pozitivní pro znaky CD9, CD44, CD73, CD90, CD105 a CD166 (obecné znaky hMSCs), CD13, CD29, CD146, CD222, CD271. Pouze buňky kultivované v 20 % PRP se liší a zachovávají si pozitivitu jen některých uvedených znaků, tj. CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD271 a HLA I. Střední až vysoká exprese CD146 je považována za základní CD znak hDDPSCs¹⁹. Stejně tak dříve zmíněná studie Huanga a kol.¹⁹ uvádí CD13+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD146+, CD34- a CD45- jako typický profil hDDPSCs. Vysoká povrchová exprese CD44, CD105 a negativita znaku CD34 odpovídající recentní literatuře¹⁰⁷. Dle Leie a kol.¹¹ charakterizuje hDDPSCs tento panel fenotypových znaků: CD13+, CD29+, CD31+, CD44+, CD45+, CD63+, CD71+, CD90+, CD105+, CD117+, CD146+, CD166+, STRO-1+. Oproti tomuto panelu se naše zjištění liší v následujících pozorováních – žádná z linií hDDPSCs nenesla znak CD31, ale všechny byly pozitivní na znak CD271, který reguluje růst neuronů, migraci, diferenciaci a buněčnou smrt během života kmenových buněk, a CD222, který je považován za hlavní růstový faktor v těle plodu během těhotenství a je vysoce exprimován v centrálním nervovém systému¹⁰⁸. Pouze u buněk kultivovaných v 20 % PRP byl povrchový znak CD222 nízce pozitivní. Analýza povrchových znaků ukázala pozitivitu CD45 u hDDPSCs kultivovaných v médiu s 2 % FCS a 2 % FCS+ITS, a naopak absenci znaků CD105, CD117 a CD63 kultivovaných v růstovém médiu obohaceném o 20 % PRP.

hDDPSCs nejlépe rostly v kultivačním médiu s 10 % HP, toto médium v podpoře proliferace bylo následované médii v tomto pořadí 10 % PRP, 2 % PRP+ITS a 2 % FCS+ITS. Společný panel povrchových znaků hDDPSCs kultivovaných v těchto médiích vypadal takto: CD9+++ , CD13+++ , CD29+++ , CD44 , CD73+++ , CD90+++ , CD105+++ , CD117+++ , CD146+++ , CD166+++ , CD222+++ , CD271+++ , HLAI+++ , CD63+ , CD18- , CD31- , CD34- , CD45- , CD49d- , CD49e- , CD106- , CD133- , CD197- , HLA II- . Tato exprese povrchových znaků se velmi podobá povrchovým znakům hMSCs v pupenech končetin při jejich vývoji^{109,110}.

Shrneme-li vyjádření povrchových znaků hDDPSCs ukazuje se, že se jednalo o velmi homogenní populaci s vyrovnaným chováním a vysokou expresí znaků raných mezenchymálních kmenových buněk. Nepotvrdili jsme sdělení jiných výzkumných skupin, že se hDDPSCs budou během kultivace v různých růstových médiích chovat podobně jako hADPSCs^{11,12,47}. Buněčný růst nejvíce podporovalo médium obsahující 10 % HP. Jednalo se o mnohem homogennější populaci s vyjádřenějšími neurálními znaky.

hNDPSCs zdaleka nejlépe proliferovaly v médiu s 10 % PRP. Ke srovnání fenotypu jsme zvolili buňky ze dvou médií se suplementem lidské krve a fetální telecí krve, kde byl buněčný růst nejvyrovnanější během dlouhodobé kultivace, tj. hNDPSCs kultivované v médiu s 2 % FCS+ITS a 2 % PRP+ITS. Fenotyp těchto dvou buněčných populací se zásadně lišil. Buňky kultivované v médiu s 2 % PRP+ITS toto médium udrželo v nediferencovaném stavu, nebo stavu velmi rané diferenciacní fáze, ve které by se pravděpodobně nacházely v makroorganismu při jeho vzniku. Usuzujeme tak na základě kombinace s vysokou pozitivitou znaků pluripotence, stejně jako například Malek a Besinger¹¹¹ u mezenchymálních kmenových buněk placenty. Tyto buňky vykazují vysokou pozitivitu STRO-1, INF beta a OCT $\frac{3}{4}$, tj. znaků pluripotence^{112,113}. Stejně jako embryonální kmenové buňky exprimují na svém povrchu CD9, CD90, CD117, které značí nediferencovaný stav. Pozitivita znaku CD184 se dá vysvětlit přítomností progenitorů v buněčné populaci hESCs¹¹⁴⁻¹¹⁶. Znaky CD106, CD271, které kromě endoteliálních progenitorových buněk exprimují také dendritické buňky, které navíc produkují INF beta, na který byly buňky hNDPSCs také pozitivní. Což by potvrzovalo jejich neurogenní potenciál^{117,118}. hNDPSCs vykazují vysokou pozitivitu všech povrchových znaků, na které byly testovány, ve shodě s jinými studiemi^{22,24}. A to nejen typických pro hMSCs, ale také hematopoetické markery, markery embryonálních buněk. hNDPSCs vykazují naprosto unikátní kombinaci vysoké exprese HLA I, HLA II a hMSCs znaků. Toto naše zjištění je v rozporu s popisem exprese povrchových znaků hNDPSCs¹⁸.

hMSCs kultivovaná v médiích různého složení vykazovala shodné změny morfologie se změnami již dříve popsány^{119,120}. Zajímavé bylo pozorování, že proliferační aktivitu podporuje více 10 % PRP než 2 % PRP+ITS, ač u FCS je tento jev obrácený. Toto zpomalení růstu koreluje i s buněčnou morfologií rozložitých buněk silně lnoucích k povrchu kultivační nádoby. Podobná pozorování provedl Suchánek a kol. (2009). Nejrychlejší tvorbu buněčných kolonií a proliferaci jsme pozorovali v médiu s 10 % PRP (10% HP u hDDPSCs), což koresponduje s teorií, že PRP zlepšuje proliferaci hMSCs^{121,122}. Média s 2 % FCS a 2 % HP obohacená o ITS, EGF a PDGF vykazovala shodnou proliferační aktivitu, ovšem nižší než 10 % PRP (10 % HP u hNDPSCs). Proto usuzujeme, že tyto tři doplňky sice podporují hDPSCs

natolik, aby rostly, přesto však předpokládáme, že v lidské krvi existují ještě mnohem silnější růstové a stimulační faktory. Otázkou zůstává, které povrchové znaky jsou skutečně charakteristické pro hDPSCs a které jsou dány suplementy růstových médií.

6. Závěr

Přes veškerý pokrok ve výzkumu kmenových buněk není zatím možné uznat buněčnou terapii jako léčebný postup v humánní medicíně¹²³⁻¹²⁵. Jedním z hlavních důvodů je používání doplňků kultivačních médií pocházejících z jiného živočišného druhu během expanze lidských kmenových buněk¹²⁶⁻¹²⁸. Fetální telecí sérum je nejužívanějším xenogenním krevním derivátem doplňujícím kultivační média o velké množství růstových faktorů, které se dosud nepodařilo uspokojivě chemicky definovat a nahradit. Nevýhodou užívání FCS je jeho schopnost zásadně ovlivňovat vlastnosti kultivovaných buněk, tím silněji, čím déle trvá jejich kultivace. FCS je zároveň velice účinný a levný zdroj růstových a stimulačních faktorů⁸⁷. Jelikož se nejedná o uměle vyráběnou komponentu, nýbrž o přírodní produkt získávaný z těl telecích plodů exsanguinací, nelze FCS šarže unifikovat¹²⁹. Tato skutečnost je problematická stran metodiky experimentů a přijetí získaných výsledků^{56,130}. Avšak tento problém sdílejí všechny deriváty krve jak lidské, tak zvířecí^{131,132}. Kultivační médium obsahující 10 % PRP (10 % HP u hDDPSCs) je dle našich zjištění ideální alogenní náhradou FCS. Zvyšuje proliferační aktivitu, potlačuje většinu povrchových markerů spojovaných s nádorovými kmenovými buňkami a zásadně neovlivňuje markery pluripotence, pokud jsou u buněčné linie přítomny^{133,134}. Dle recentní literatury udržuje PRP hDPSCs schopné diferencovat v buňky endotelu a perivaskulárního niché, ale především v neurální buněčné linie¹³⁵⁻¹³⁸. Díky těmto poznatkům nastává čas na otázku, zdali není třeba přehodnotit parametry, především pozitivitu povrchových znaků, kterými posuzujeme příslušnost adultních kmenových buněk k zárodečnému listu. K posunu od preklinického výzkumu k běžné klinické praxi zbývá urazit ještě velký kus cesty. Největším problémem zůstávají nedostatečná kritéria, podle kterých kmenové buňky zařazujeme, dále též ovlivnění buněk kultivačními podmínkami a délkou kultivace *in vitro*, obtížně při kultivaci monoklonálních buněčných linií, a nakonec i dostatečně kritický přístup ke klinickým studiím a jejich cílům.

7. Literatura

- ¹ Zhang, J. (2021). Origin, evolution and function of pluripotent stem cell niches in the meridian system.
- ² Varghese, B., Ling, Z., & Ren, X. (2022). Reconstructing the pulmonary niche with stem cells: a lung story. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 1-12.
- ³ Ding, Z., Pan, X., Wang, X., Xie, H., & Ye, Q. (2021). Interactions between induced pluripotent stem cells and stem cell niche augment osteogenesis and bone regeneration. *Smart Materials in Medicine*, 2, 196-208.
- ⁴ Lou, S., Duan, Y., Nie, H., Cui, X., Du, J., & Yao, Y. (2021). Mesenchymal stem cells: Biological characteristics and application in disease therapy. *Biochimie*, 185, 9-21.
- ⁵ Pshennikova, E. S., & Voronina, A. S. (2022). Dormancy: There and Back Again. *Molecular Biology*, 56(5), 735-755.
- ⁶ Moshtagh, P. R., Emami, S. H., & Sharifi, A. M. (2013). Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(3), 451-458.
- ⁷ Sawangmake, C., Nowwarote, N., Pavasant, P., Chansiripornchai, P., & Osathanon, T. (2014). A feasibility study of an in vitro differentiation potential toward insulin-producing cells by dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 452(3), 581-587.
- ⁸ Tziafas, D., & Kodonas, K. (2010). Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *Journal of endodontics*, 36(5), 781-789.
- ⁹ Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., & Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(5), 511-523.
- ¹⁰ Timothy, C. N., Samyuktha, P. S., & Brundha, M. P. (2019). Dental pulp Stem Cells in Regenerative Medicine—A Literature Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(8), 4052-6.
- ¹¹ Lei, T., Zhang, X., & Du, H. (2021). Characteristics, classification, and application of stem cells derived from human teeth. *Stem Cells International*, 2021.
- ¹² Chen, J., Zheng, X., Rao, N., Huang, Y., Liu, J., Li, Y., & Zhang, J. (2021). Key markers and epigenetic modifications of dental-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells International*, 2021.
- ¹³ Kerkis I., Kerkis A., Dozortsev D. Stukart-Parsons G.C., Gomes Massironi S.M., Pereira L.V., Caplan A.I., & Cerruti H.F. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 184 (3-4),105-116, 45-15)
- ¹⁴ Yalvac, M. E., Ramazanoglu, M., Rizvanov, A. A., Sahin, F., Bayrak, O. F., Salli, U., ... & Kose, G. T. (2010). 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*, 10(2), 105-113.
- ¹⁵ Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625-13630.
- ¹⁶ Morscheck C., Völlner F., Saugspier M., Brandl C., Reichert T.E. Driemel O., & Schmalz G. (2010) Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human

- exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*, 4(4), 433-440.
- ¹⁷ Nourbakhsh N., Soleimani M., Taghipour Z., Karbalaie K., Mousavi S., Talebi A., Nadali F., Tanhaei S., Kiyani G.A., Nematollahi M., Rabiei F., Mardani M., Bahramiyan H., Torabinejad M., Nasr-Esfahani M.H., & Baharvand H. (2011) Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol*, 55(2),189-195.
- ¹⁸ Akpınar, G., Kasap, M., Aksoy, A., Duruksu, G., Gacar, G., & Karaoz, E. (2014). Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells International*, 2014.
- ¹⁹ Huang, G. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792-806
- ²⁰ Holden, E., DeSeta, M., Siddik, D., & Bhujel, N. (2022). Natal and neonatal teeth: A review and management recommendations. *Journal of Neonatal Nursing*
- ²¹ Rezende, K., Imparato, J. C. P., de Oliveira, F. R. A. N. Ç. A., Carvalho, D., Rochs, M. O., & Bönecker, M. (2018). Dental Pulp Stem Cells from Natal Teeth: Isolation and Morphological Study. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 12(3).
- ²² Shetty, H., Kakade, A., Shetty, S., Neelakantan, P., Nagar, S., Desai, R. S., & Beri, K. (2018). Immunohistochemical characterization of stem cell and differentiation markers of the dental pulp of human natal teeth. *Future Science OA*, 4(10), FSO342.
- ²³ Suchanek, J., Soukup, T., Visek, B., Ivancakova, R., Kucerova, L., & Mokry, J. (2009). Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 153(1).
- ²⁴ Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., ... & Sarıboyacı, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and cell biology*, 133(1), 95-112.
- ²⁵ Kumar, R., Sharma, A., Pattnaik, A. K., & Varadwaj, P. K. (2010). Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 1(1), 43.
- ²⁶ Tatullo, M., Marrelli, M., Falisi, G., Rastelli, C., Palmieri, F., Gargari, M., ... & Benagiano, V. (2016). Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 29(1), 3-8.
- ²⁷ Katsara O., Mahaira L.G., Iliopoulou E.G., Moustaki A., Antsaklis A., Loutradis D., Stefanidis K., Baxevanis C.N., & Papamichail M, Perez S.A. (2011) 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 Dev.*, 20(9),1549-61.
- ²⁸ Suchánek J, Suchánková Kleplová T, Kapitán M, Soukup T. (2013) The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 56, 142-149.
- ²⁹ Mannello F., Tonti G.A. (2007) 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*, 25(7), 1603-1609

- ³⁰ Rowland, A. L. (2021). *The Immunogenicity of Mesenchymal Stem Cells* (Doctoral dissertation).
- ³¹ Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., ... & Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Science of Animal Resources*, 42(5), 775-799.
- ³² Mochizuki, M., & Nakahara, T. (2018). Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 1-15
- ³³ Kilic, P. (2021). Quality Management Systems (QMSs) of human-based tissue and cell product manufacturing facilities. *Stem Cells and Good Manufacturing Practices*, 263-279.
- ³⁴ Halme D.G., Kessler D.A. (2006) FDA regulation of stem-cell-based therapies. *New Engl J Med*, 355(16),1730 –1735
- ³⁵ WHO (1997) Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: Memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*, 75,505–513.
- ³⁶ Van Der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W., Fu, J., ... & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. *Altex*, 35(1), 1-20
- ³⁷ Tseng, P. Y., Chen, C. J., Sheu, C. C., Yu, C. W., & Huang, Y. S. (2007). Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(2), 95-102.
- ³⁸ Gou, S., Wang, C., Liu, T., Wu, H., Xiong, J., Zhou, F., & Zhao, G. (2010). Spontaneous differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes without malignant transformation after long-term culture. *Cells Tissues Organs*, 191(3), 185-192.
- ³⁹ Zeng, Y., Liu, L., Huang, D., & Song, D. (2023). Immortalized cell lines derived from dental/odontogenic tissue. *Cell and Tissue Research*, 1-15.
- ⁴⁰ Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martín, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., & Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research*, 65(8), 3035-3039.
- ⁴¹ Wang, J., Sridurongrit, S., Dudas, M., Thomas, P., Nagy, A., Schneider, M. D., ... & Kaartinen, V. (2005). Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Developmental biology*, 286(1), 299-310.
- ⁴² Røsland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., ... & Schichor, C. (2009). Long-term cultures of bone marrow–derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research*, 69(13), 5331-5339.
- ⁴³ Suchánek, J., Soukup, T., Ivancakova, R., Karbanová, J., Hubková, V., Pytlík, R., & Kucerova, L. (2007). Human dental pulp stem cells-isolation and long term cultivation. *ACTA MEDICA-HRADEC KRALOVE-*, 50(3), 195.
- ⁴⁴ Gronthos, S., & Simmons, P. J. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro.
- ⁴⁵ Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., & Verfaillie, C. M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation*, 109(3), 337-346.

- ⁴⁶ Karbanová, J., Soukup, T., Suchánek, J., Pytlík, R., Corbeil, D., & Mokry, J. (2011). Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs*, 193(6), 344-365.
- ⁴⁷ Govindasamy, V., Abdullah, A. N., Ronald, V. S., Musa, S., Aziz, Z. A. C. A., Zain, R. B., ... & Kasim, N. H. A. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *Journal of endodontics*, 36(9), 1504-1515.
- ⁴⁸ Furcht, L. T., Verfaillie, C. M., & Reyes, M. (2006). *U.S. Patent No. 7,015,097B1*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- ⁴⁹ Cheever, M., Master, A., & Versteegen, R. (2017). A method for differentiating fetal bovine serum from newborn calf serum. *BioProcess J*, 16(1).
- ⁵⁰ Versteegen, R. J., Murray, J., & Doelger, S. (2021). Animal welfare and ethics in the collection of fetal blood for the production of fetal bovine serum. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 38(2), 319-323.
- ⁵¹ Weber, T., Wirths, F., Brakebusch, N., & Van der Valk, J. (2021). Reply to comment “Animal welfare and ethics in the collection of fetal blood for the production of fetal bovine serum”. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 38(2), 324-326.
- ⁵² Weber, T., & Wagner, K. (2021). Replacing fetal bovine serum (FBS) in research and testing. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 38(1), 163–164.
- ⁵³ Dimarakis I., Levicar N. (2006) Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells*, 24 (5), 1407–1408
- ⁵⁴ Yamanaka, S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell stem cell*, 27(4), 523-531.
- ⁵⁵ Sekiya I., Larson B.L., Smith J.R., Pochampally R., Cui J.G., Prockop D.J. (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6), 530 –541
- ⁵⁶ Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., & Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem cells*, 27(9), 2331-2341.
- ⁵⁷ Honn, K. V., Singley, J. A., & Chavin, W. (1975). Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 149(2), 344-347.
- ⁵⁸ Weyand, B., Dominici, M., Hass, R., Jacobs, R., & Kasper, C. (Eds.). (2013). *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. Springer Berlin.
- ⁵⁹ Taihi, I., Pilon, C., Cohen, J., Berdal, A., Gogly, B., Nassif, A., & Fournier, B. P. (2022). Efficient isolation of human gingival stem cells in a new serum-free medium supplemented with platelet lysate and growth hormone for osteogenic differentiation enhancement. *Stem cell research & therapy*, 13(1), 1-14.
- ⁶⁰ Maharajan, N., Cho, G. W., Choi, J. H., & Jang, C. H. (2021). Regenerative therapy using umbilical cord serum. *in vivo*, 35(2), 699-705.
- ⁶¹ Li, Q., Zhao, D., Chen, Q., Luo, M., Huang, J., Yang, C., ... & Liu, T. (2019). Wharton’s jelly mesenchymal stem cell-based or umbilical vein endothelial cell-based serum-free coculture with cytokines supports the ex vivo expansion/maintenance of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-9.
- ⁶² Dakhore, S., Nayer, B., & Hasegawa, K. (2018). Human pluripotent stem cell culture: current status, challenges, and advancement. *Stem cells international*, 2018.
- ⁶³ Sriramulu, S., Banerjee, A., Di Liddo, R., Jothimani, G., Gopinath, M., Murugesan, R., ... & Pathak, S. (2018). Concise review on clinical applications of conditioned medium derived

from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs). *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 12(3), 230.

- ⁶⁴ Bozorgmehr, M., Gurung, S., Darzi, S., Nikoo, S., Kazemnejad, S., Zarnani, A. H., & Gargett, C. E. (2020). Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: biological properties and clinical application. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 497.
- ⁶⁵ Zhang, Q., Sun, X., Ding, J., He, P., Liu, Y., Cheng, H., ... & Meng, X. (2015). Autoserum: An Optimal Supplement for Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Liver-Injured Rats. *Stem Cells International*, 2015.
- ⁶⁶ Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F., Zander A.R. (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*, 32 (12), 1212–1225.
- ⁶⁷ Kobayashi T., Watanabe H., Yanagawa T., Tsutsumi S., Kayakabe M., Shinozaki T., Higuchi K., & Takagishi K. (2005) Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex-vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br* , 87(10),1426 – 1433.
- ⁶⁸ Lin H.T., Tarng Y.W., Chen Y.C., Kao C.L., Hsu C.J., Shyr Y.M., Ku H.H., & Chiou S.H. (2005) Using human plasma supplemented medium to cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplant Proc*, 37 (10), 4504–4505.
- ⁶⁹ Shahdadfar A., Fronsdal K., Haug T., Reinholt F.P., Brinckmann J.E. (2005) 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*, 23(9),1357–1366.
- ⁷⁰ Stojkovic, P., Lako, M., Przyborski, S., Stewart, R., Armstrong, L., Evans, J., ... & Stojkovic, M. (2005). Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(7), 895-902.
- ⁷¹ Mizuno, N., Shiba, H., Ozeki, Y., Mouri, Y., Niitani, M., Inui, T., ... & Kurihara, H. (2006). 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*, 30(6), 521-524.
- ⁷² Müller I., Kordowich S., Holzwarth C., Spano C., Isensee G., Staiber A., Viebahn S., Gieseke F., Langer H., Gawaz M.P., Horwitz E.M., Conte P., Handgretinger R., & Dominici M. (2006) Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 8(5), 437– 444.
- ⁷³ Lang, S., Loibl, M., & Herrmann, M. (2018). Platelet-rich plasma in tissue engineering: hype and hope. *European Surgical Research*, 59(3-4), 265-275.
- ⁷⁴ Kirsch, M., Rach, J., Handke, W., Seltsam, A., Pepelanova, I., Strauß, S., ... & Lavrentieva, A. (2021). Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 598389.
- ⁷⁵ Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L. Dohan A.J.J., Mouhyi J., & Gogly B. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e51-5.
- ⁷⁶ Marx R.E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.*, 10(4), 225-228.

- ⁷⁷ Bernardo, M. E., Avanzini, M. A., Perotti, C., Cometa, A. M., Moretta, A., Lenta, E., ... & Locatelli, F. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of cellular physiology*, 211(1), 121-130.
- ⁷⁸ Kilian, O., Flesch, I., Wenisch, S., Taborski, B., Jork, A., Schnettler, R., & Jonuleit, T. (2004). Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *European journal of medical research*, 9(7), 337-344.
- ⁷⁹ Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19-31.
- ⁸⁰ Mishra, V., & Heath, R. J. (2021). Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8411.
- ⁸¹ Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.
- ⁸² Tancharoen, W., Aungsuchawan, S., Pothacharoen, P., Bumroongkit, K., Puaninta, C., Pangjaidee, N., ... & Thaojamnong, C. (2019). Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*, 19(6), 5123-5132.
- ⁸³ Kameda, M., Mikawa, T., Yokode, M., Inagaki, N., & Kondoh, H. (2021). Senescence research from historical theory to future clinical application. *Geriatrics & Gerontology International*, 21(2), 125-130.
- ⁸⁴ Suchánek, J. (2013). *Dental pulp stem cells* (Doctoral dissertation).
- ⁸⁵ Siriboon, C., Lin, Y. H., Kere, M., Chen, C. D., Chen, L. R., Chen, C. H., ... & Ju, J. C. (2015). Putative porcine embryonic stem cell lines derived from aggregated four-celled cloned embryos produced by oocyte bisection cloning. *PloS one*, 10(2), e0118165.
- ⁸⁶ Sukmawati, D., Junaidi, H., & Syaidah, R. (2021). Human platelet-rich plasma as a biological stimulant for proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomedicine*, 41(2), 168-173.
- ⁸⁷ Palombella, Silvia, et al. "Systematic review and meta-analysis on the use of human platelet lysate for mesenchymal stem cell cultures: comparison with fetal bovine serum and considerations on the production protocol." *Stem cell research & therapy* 13.1 (2022): 1-31.
- ⁸⁸ Jin, R., Song, G., Chai, J., Gou, X., Yuan, G., & Chen, Z. (2018). Effects of concentrated growth factor on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418817505.
- ⁸⁹ Zhang, M., Jiang, F., Zhang, X., Wang, S., Jin, Y., Zhang, W., & Jiang, X. (2017). The effects of platelet-derived growth factor-BB on human dental pulp stem cells mediated dentin-pulp complex regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2126-2134.
- ⁹⁰ Saeed, M. A., Abd El-Rahman, M., Helal, M. E., Zaher, A. R., & Grawish, M. E. (2017). Efficacy of human platelet rich fibrin exudate vs fetal bovine serum on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *International journal of stem cells*, 10(1), 38.
- ⁹¹ Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*, 83(1), 48-61

- ⁹² Cai, J., Olson, J. M., Rao, M. S., Stanley, M., Taylor, E., & Ni, H. T. (2005). Development of antibodies to human embryonic stem cell antigens. *BMC Developmental Biology*, 5(1), 1-7.
- ⁹³ Lindroos, B., Mäenpää, K., Ylikomi, T., Oja, H., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(2), 329-335.
- ⁹⁴ Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S. & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- ⁹⁵ Machado, E., Fernandes, M. H., & de Sousa Gomes, P. (2012). Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113(6), 728-733.
- ⁹⁶ Gandia, C., Arminan, A. N. A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., ... & SEPulveda, P. I. L. A. R. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells*, 26(3), 638-645.
- ⁹⁷ Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9), 726-736.
- ⁹⁸ Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H., ... & Choung, P. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue engineering*, 13(4), 767-773.
- ⁹⁹ Ueda, M., Fujisawa, T., Ono, M., Hara, E. S., Pham, H. T., Nakajima, R., ... & Kuboki, T. (2014). A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem cell research & therapy*, 5(1), 1-10.
- ¹⁰⁰ Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., d'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., ... & Papaccio, G. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17(3), 511-515.
- ¹⁰¹ Sousa, B. R., Parreira, R. C., Fonseca, E. A., Amaya, M. J., Tonelli, F. M., Lacerda, S. M., ... & Resende, R. R. (2014). Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*, 85(1), 43-77.
- ¹⁰² Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., ... & Bagnara, G. P. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80(6), 836-842.
- ¹⁰³ Wada, N., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2011). Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells. *Stem cells and development*, 20(4), 647-659.
- ¹⁰⁴ Rojewski, M. T., Weber, B. M., & Schrezenmeier, H. (2008). Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), 168-184.
- ¹⁰⁵ De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., ... & Fraser, J. K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*, 89(2-3), 267-270.
- ¹⁰⁶ Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., & Ginis, I. (2011). Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem cells and development*, 20(1), 53-66.

- ¹⁰⁷ Wen, J., Li, H. T., Li, S. H., Li, X., & Duan, J. M. (2016). Investigation of modified platelet-rich plasma (mPRP) in promoting the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49.)
- ¹⁰⁸ Malysheva, O. V., & Ordyan, N. E. (2022). Insulin-Like Growth Factor 2: New Roles for a Known Molecule. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 52(1), 175-182.
- ¹⁰⁹ Marín-Llera, J. C., & Chimal-Monroy, J. (2018). A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture. *Cell Biology International*, 42(5), 570-579.
- ¹¹⁰ Jiao, F., Wang, J., Dong, Z. L., Wu, M. J., Zhao, T. B., Li, D. D., & Wang, X. (2012). Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 14(4), 324-333.
- ¹¹¹ Malek, A., & Bersinger, N. A. (2011). Human placental stem cells: biomedical potential and clinical relevance. *Journal of Stem Cells*, 6(2), 75.
- ¹¹² Wu, G., & Schöler, H. R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*, 3(1), 1-10.
- ¹¹³ Ng, V. Y., Ang, S. N., Chan, J. X., & Choo, A. B. (2010). Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem cells*, 28(1), 29-35.
- ¹¹⁴ Tey, S. R., Mueller, M., Reilly, M., Switalski, C., Robertson, S., Sakanaka-Yokoyama, M., & Suzuki, M. (2022). Cell Surface Proteins for Enrichment and In Vitro Characterization of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Myogenic Progenitors. *Stem cells international*, 2022
- ¹¹⁵ Aparicio, J. G., Hopp, H., Choi, A., Comar, J. M., Liao, V. C., Harutyunyan, N., & Lee, T. C. (2017). Temporal expression of CD184 (CXCR4) and CD171 (L1CAM) identifies distinct early developmental stages of human retinal ganglion cells in embryonic stem cell derived retina. *Experimental eye research*, 154, 177-189.
- ¹¹⁶ Sundberg, M., Jansson, L., Ketolainen, J., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Skottman, H., ... & Narkilahti, S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 2(2), 113-124.
- ¹¹⁷ Mortada, I., Mortada, R., & Al Bazzal, M. (2017). Dental pulp stem cells and neurogenesis. *Stem Cells: Biology and Engineering*, 63-75.
- ¹¹⁸ Ishizaka, R., Hayashi, Y., Iohara, K., Sugiyama, M., Murakami, M., Yamamoto, T., ... & Nakashima, M. (2013). Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*, 34(8), 1888-1897.
- ¹¹⁹ Motaln, H., Schichor, C., & Lah, T. T. (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 116(11), 2519-2530.
- ¹²⁰ Yang, Y. H. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., & Barabino, G. A. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem cell research & therapy*, 9, 1-14.
- ¹²¹ Tonti, G. A., & Mannello, F. (2002). From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera?. *International Journal of Developmental Biology*, 52(8), 1023-1032.

- ¹²² Shafaei, H., Esfandiari, E., & Baghernezhad, H. (2017). Evaluation of morphology and immunophenotype of mesenchymal stem cells after switching of bovine serum of media to human serum. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(151), 105-113.
- ¹²³ Strauer, B. E., & Kornowski, R. (2003). Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 107(7), 929-934.
- ¹²⁴ Segers, V. F., & Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, 451(7181), 937-942
- ¹²⁵ Mousaei Ghasroldasht, M., Seok, J., Park, H. S., Liakath Ali, F. B., & Al-Hendy, A. (2022). Stem cell therapy: From idea to clinical practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2850.
- ¹²⁶ Golchin, A., Seyedjafari, E., & Ardeshirylajimi, A. (2020). Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: present or future. *Stem cell reviews and reports*, 16, 427-433.
- ¹²⁷ Herberts, C. A., Kwa, M. S., & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of translational medicine*, 9(1), 1-14.
- ¹²⁸ Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747-754.
- ¹²⁹ Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., Bork, S., Walenda, T., Koch, C., ... & Wagner, W. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(7), 888-898.
- ¹³⁰ Hemeda, H., Giebel, B., & Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2), 170-180.
- ¹³¹ Fernandez-Rebollo, E., Mentrup, B., Ebert, R., Franzen, J., Abagnale, G., Sieben, T. & Wagner, W. (2017). Human platelet lysate versus fetal calf serum: these supplements do not select for different mesenchymal stromal cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- ¹³² Anitua, E., Zalduendo, M., Troya, M., Alkhraisat, M. H., & Blanco-Antona, L. A. (2022). Platelet-rich plasma as an alternative to xenogeneic sera in cell-based therapies: A need for standardization. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6552.
- ¹³³ Sheguti, T. M., & Santos, A. R. (2022). Platelet-rich plasma (PRP) as an alternative to fetal bovine serum (FBS) in the culture of mesenchymal stem cells in cell therapy. *J Stem Cell Res Ther*, 7(1), 26-28.
- ¹³⁴ Ismail, A., & Praptiningsih, R. S. (2022). Combination of decidual dental stem cell and platelet rich plasma in fibroblast formation in the jawbone regeneration of Wistar rats. *ODONTO: Dental Journal*, 9, 155-161.
- ¹³⁵ Retana-Lobo, C., & Reyes-Carmona, J. (2022). Immunohistochemical characterization of stem cell, vascular, neural, and differentiation markers in the apical papilla and dental pulp of human teeth at various stages of root development. *Journal of Histotechnology*, 1-11.
- ¹³⁶ Hu, Z. B., Chen, H. C., Wei, B., Zhang, Z. M., Wu, S. K., Sun, J. C., & Xiang, M. (2022). Platelet rich plasma enhanced neuro-regeneration of human dental pulp stem cells in vitro and in rat spinal cord. *Annals of Translational Medicine*, 10(10).
- ¹³⁷ Li, X., Hou, J., Wu, B., Chen, T., & Luo, A. (2014). Effects of platelet-rich plasma and cell coculture on angiogenesis in human dental pulp stem cells and endothelial progenitor cells. *Journal of endodontics*, 40(11), 1810-1814.
- ¹³⁸ Madanagopal, T. T., Tai, Y. K., Lim, S. H., Fong, C. H., Cao, T., Rosa, V., & Franco-Obregón, A. (2021). Pulsed electromagnetic fields synergize with graphene to enhance dental pulp stem cell-derived neurogenesis by selectively targeting TRPC1 channels. *Eur Cell Mater*, 41, 216-32

Curriculum vitae

Jméno a příjmení: Tereza Suchánková Kleplová
Titul MDDr.
Datum a místo narození: 23.06.1988 Hradec Králové
Adresa: Vrchovnice 17, 503 03 Vrchovnice, Česká republika
Telefon: +420 739 062 974
E-mail: tereza.suchankova@fhk.cuni.cz, tereza.suchankova@fnhk.cz
Národnost: česká

Vzdělání:

1999–2007 osmileté všeobecné gymnázium, Lepařovo gymnázium, Jičín
2007–2012 magisterský studijní program Zubní lékařství, LFHK, UK
2012 - * studium doktorského studijního programu Stomatologie, LFHK, UK
(přerušeno z důvodu rodičovské dovolené od 2016-2019)
2020-* zařazena do specializačního vzdělávání v oboru Klinická stomatologie
(GID:174024)

Další vzdělání:

2012 Oprávnění zvláštní odborné způsobilosti k výkonávání činnosti zvláště důležitých z hlediska radiační ochrany, ev.č. 710458, SÚJB
2019 Osvědčení odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle zákona na ochranu zvířat proti týrání ev.č. 03722, Ministerstvo zemědělství ČR
2017-2020 Povinná praxe v nakládání s GMO opravňující samostatné nakládání a dohled nad uzavřeným nakládáním s GMO I. kategorie, Ústav histologie a embryologie LFHK, UK

Členství v odborných a profesních společnostech:

2005–2014 Společnost preventivní stomatologie
2012 - * Česká stomatologická komora

H-index (WOS) 5

Počet citací bez autocitací 52

ORCID ID 0000-0003-0541-7094

Researcher ID CYL-5831-2022

Povolání:

- 2012–2017 zubní lékař a odborný zástupce v soukromé ambulantní praxi, Dentine, Jičín
- 2019–2020 vedoucí, Radioizotopové laboratoře a vivárium LFHK, UK
- 2020-2021 vedoucí, Vivárium LFHK, UK
- 2019-2021 osoba odpovědná za péči o laboratorní zvířata za LFHK, UK
- 2019-2021 osoba odpovědná za nakládání s geneticky modifikovanými laboratorními zvířaty za LFHK, UK
- 2019-2021 člen Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat LFHK, UK
- 2019-2021 osoba zmocněná k zastupování LFHK, UK ve správním řízení o schválení projektu pokusů
- 2014 - * zubní lékař, Stomatologická klinika FN HK
- 2012-* odd. Záchovné stomatologie
- 2021-* odd. Dentoalveolární a maxillofaciální chirurgie
- 2014 - * asistent, Stomatologická klinika LFHK, UK

Výzkumná činnost:

- 2014 Klinická studie zdravotnického prostředku pro fy Contipro
- indikující a aplikující lékař
- 2019–2021 Vivárium LFHK, UK
- dohled, plánování a provádění výzkumu *in vivo*, práce s GMO *in vivo*
- práce s radioizotopy
- 01/2010 - * Laboratoř tkáňových kultur, Ústav histologie a embryologie LFHK, UK
- provádění a plánování experimentů *in vitro*

Odborné stáže:

- 01–02/2011 Přírodovědecká fakulta, Katedra molekulární biologie a biotechnologie, Institut biomedicínského výzkumu, Národní autonomní univerzita Mexika, Mexiko
- implementace protokolů izolace a kultivace kmenových buněk zubní pulpy v rámci výzkumu „Sinus lift pomocí kmenových buněk kostní dřene indukujících oseointegraci“ prof. Dr. Karlena Gazariana
-

- 01-02/2011 Fakulta zubního lékařství, Oddělení postgraduálních studií a výzkumu, Národní autonomní univerzita v Mexiku, Mexiko
- stáž na odd. Dentoalveolární chirurgie, Parodontologie a Endodoncie
- 01-02/2011 Médica Sur, Mayo clinic care network member, Mexico City, odd. Maxilofaciální chirurgie pod vedením prof. Dr. Juana Carlose López Noriegy
- asistence při operačních rekonstrukčních výkonech v orofaciální oblasti

Odborné kurzy:

- 22.-26.4.2013 Hydrogely na bázi biopolymerů, Škola molekulárních biotechnologií – Lékařské nanobiotechnologie, Univerzita Pardubice, ČVUT, Univerzita Palackého v Olomouci a Contipro a.s., Dolní Dobrouč
- 13.11.2019 Sedace během diagnostických a terapeutických výkonů ve FNHK, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny FNHK
- 8.-9.11.2019 Konference Válečné Medicíny 2019, Via Protect a FVZ UO v Brně, Hradec Králové

Granty:

- hlavní řešitel:
 - Grant ROCHE pro student 1. ročníku doktorského studia LF HK - 2013/2014 “ Krevní deriváty jako náhrada fetálního telecího séra při dlouhodobé kultivaci kmenových buněk zubní pulpy“.
 - Grantová agentura univerzity Karlovy 304313/2013 - „Diferenciace kmenových buněk zubní pulpy dočasných zubů “
 - OP PIK Lubrikace a regenerace fascií hyaluronanem registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/19_262/0020005 (2020-2022) – hlavní řešitel za LFHK pro rok 2020
- vedlejší řešitel
 - Grantová agentura univerzity Karlovy 341021 - „Efekt využití nanomateriálů v prevenci formování epidurální jizvy po provedení laminektomie. Experimentální studie na králicích“

Publikační aktivita:

- kapitola v knize:
 - 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*

- původní práce – první autor:

- Suchánková, K. T., Browne, K. Z., Soukup, T., & Suchánek, J. (2016). In vitro kultivace kmenových buněk zubní pulpy dočasných zubů v nízkoprocentním xenogenním médiu. *Czech Stomatology & Practical Dentistry/Ceská stomatologie a Praktické zubní lékařství*, 116(1).
- Kleplová, T. S., Soukup, T., Řeháček, V., & Suchánek, J. (2014). 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 Kralove)*, 57(3), 119-126.

- původní práce – spoluautor:

- Matonohová, J., Husby, J., Toropitsyn, E., Stupecká Divoká, L. Husby, A., **Suchánková Kleplová, T.**, ... & Velebný, V. (2023). Injecting Hyaluronan In the Thoracolumbar Fascia: A Model Study. *International Journal of Biological Macromolecules*. Manuscript Number: IJBIOMAC-D-23-01496 – under review
- Pilbauerova, N., Schmidt, J., **Suchankova Kleplova, T.**, Soukup, T., & Suchanek, J. (2022). Effect of Human Platelet Lysate as Cultivation Nutrient Supplement on Human Natal Dental Pulp Stem Cell In Vitro Expansion. *Biomolecules*, 12(8), 1091. (IF 2021 = 6.064, Q2)
- Pilbauerova, N., Soukup, T., **Suchankova Kleplova, T.**, Schmidt, J., & Suchanek, J. (2021). The effect of cultivation passaging on the relative telomere length and proliferation capacity of dental pulp stem cells. *Biomolecules*, 11(3), 464. (IF 6.064, Q2)
- Schmidt, J., Pilbauerova, N., Soukup, T., **Suchankova-Kleplova, T.**, & Suchanek, J. (2020). Low molecular weight hyaluronic acid effect on dental pulp stem cells in vitro. *Biomolecules*, 11(1), 22. (IF 6.064, Q2)
- Suchánek, J., Ivančáková, R. K., Mottl, R., Browne, K. Z., Pilneyová, K. C., Pilbauerová, N., ... & **Suchánková Kleplová, T.** (2019). Hyaluronic Acid-Based Medical Device for Treatment of Alveolar Osteitis—Clinical Study. *International journal of environmental research and public health*, 16(19), 3698. (IF 2.849, Q2) (korespondující autor)
- Pilbauerova, N., Soukup, T., **Kleplová, T. S.**, & Suchanek, J. (2019). Enzymatic isolation, amplification and characterization of dental pulp stem cells. *Folia biologica*, 65(3), 124-133. (IF 0,691, Q4)
- Suchánek, J., Browne, K. Z., Nasry, S. A., **Kleplová, T. S.**, Pilbauerová, N., Schmidt, J., & Soukup, T. (2018). Characteristics of human natal stem cells cultured in allogeneic medium. *Brazilian Dental Journal*, 29, 427-434. (IF 1,044, Q4)

- Suchánek, J., **Kleplová, T. S.**, Rehacek, V., Browne, K. Z., & Soukup, T. (2016). Proliferative capacity and phenotypical alteration of multipotent ectomesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth cultured in xenogeneic and allogeneic media. *Folia Biologica*, 62(1), 1. (IF 0,939, Q4)
- Simkova, D., Kharraishvili, G., Korinkova, G., Ozdian, T., **Suchánková-Kleplová, T.**, Soukup, T., ... & Bouchal, J. (2016). The dual role of aspirin in breast cancer progression. *Oncotarget*, 7(32), 52045. (IF 5,168)
- Suchánek, J., **Kleplová, T. S.**, Kapitán, M., & Soukup, T. (2015). The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica*, 56(4), 142-149.
- Kapitán, M., **Kleplová, T. S.**, & Suchánek, J. (2015). A Comparison of Three Rubber Dam Systems in Vivo: A Preliminary Study. *Acta Medica*, 58(1), 15-20.
- Suchánek J., **Suchánková Kleplová T.**, Soukup T.: Kmenové buňky zubní pulpy – možnosti jejich diferenciaci in vitro. LKS, 2012, 22(3): 56-61

Prezentace:

- **Suchánková Kleplová T.**: Historie amalgámu, Mezinárodní kongres Pražské dentální dny, Česká stomatologická komora, Praha, 21. 9. 2017
- **Suchánková Kleplová T.**: Mykóza sinus sphenoidalis, XIX. Sazamův den – Stomatologická klinika LF UK a FN v Hradci Králové, Hradec Králové, 6. 11. 2015
- **Suchánková Kleplová T.**: Diferenciace kmenových buněk zubní pulpy dočasných zubů, XIX. vědecká konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové 21. 1. 2015
- **Suchánková Kleplová T.**: Deriváty lidské krve jako náhrada fetálního telecího séra při kultivaci kmenových buněk, Trombocyty v netransfuzních aplikacích - Společnost pro bioimplantologii ČLS JEP, Brno, 3. 12. 2014
- **Suchánková Kleplová T.**: Human blood plasma and human blood platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells, 10th Postgraduate Medical Students Conference Faculty of Medicine Charles University in Hradec Králové, Hradec Králové, 20. 11. 2014
- **Suchánková Kleplová T.**: Nové materiály na bázi hydroxidu vápenatého, XVIII. Sazamův den - Stomatologická klinika a Radiologická klinika LF UK a FN v Hradci Králové, Hradec Králové, 14. 11. 2014
- **Suchánková Kleplová T.**: Substituce fetálního telecího séra v kultivačním médiu pro kmenové buňky pomocí derivátů lidské krve, Den výzkumných prací - Ústav klinické a experimentální stomatologie 1. LF UK, Praha, 6. 6. 2014

Patenty, prototypy:

- SUCHÁNEK, Jakub – SUCHÁNKOVÁ KLEPLOVÁ, Tereza. *Sada nástrojů a nástroj pro vyjmutí zalomeného fragmentu stomatologického nástroje z kořenového kanálku.*CZ001 – Úřad průmyslového vlastnictví. Číslo dokumentu: 308328. Uděleno: 02.04.2020. – patent
- SUCHÁNEK, Jakub – SUCHÁNKOVÁ KLEPLOVÁ, Tereza. *Prototyp vytahováku k odstranění zalomeného kořenového nástroje.* 2019. CZ. Interní identifikace: prototype – N2290_2. – prototyp
- SUCHÁNEK, Jakub – SUCHÁNKOVÁ KLEPLOVÁ, Tereza. *Prototyp vrtáku k odstranění zalomeného kořenového nástroje.* 2019. CZ. Interní identifikace: prototype – N2290_1a. – prototyp