

Metodiky odběru zubní pulpy pro izolaci a kultivaci kmenových buněk

Ivančaková R.¹, Soukup T.², Suchánek J.¹, Karbanová J.²

¹Stomatologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové,
přednostka doc. MUDr. V. Hubková, CSc.

²Ústav histologie a embryologie LF UK, Hradec Králové,
přednosta doc. MUDr. J. Mokřý, Ph.D.

Souhrn

Mezenchymové kmenové buňky (MKB) jsou schopné spontánně generovat celé spektrum buněk mezenchymového původu. Navíc jsou schopny konverze i v elementy odlišných zárodečných listů. Takový terapeutický potenciál lze očekávat pouze od lidských embryonálních KB, které však nesplňují předpoklad histokompatibility s tkáněmi příjemce. MKB lze navíc izolovat z relativně snadno přístupného zdroje, jakým je zubní pulpa, na rozdíl od takových tkáňově specifických KB, jakými jsou např. neurální KB. Za použití námi vytvořených metod kultivace KB izolovaných z lidské kostní dřeni jsme identifikovali KB ve tkáni zubní pulpy.

Kmenové buňky zubní pulpy (KBZP) jsme izolovali z extrahovaných dočasných/stálých zubů za použití protokolu enzymatické disociace. Získané buňky jsme kultivovali v médiu s 2% FBS a růstovými faktory a pasážovali třikrát týdně přes 55 populačních zdvojení, a to u všech pacientů.

Naše výsledky ukázaly, že izolované KBZP jsou homogenní populací kmenových buněk schopných sebeobnovy s obdobnou charakteristikou jako MKB kostní dřeni.

Klíčová slova: kmenové buňky – zubní pulpa – metodika odběru

Ivančaková R., Soukup T., Suchánek J., Karbanová J.: Methods of Tooth Pulp Sampling for Isolation and Cultivation of Stem Cells

Summary: Mesenchymal stem cells (MSC) are capable of spontaneous generation of a whole spectrum of cells of mesenchymal origin. Moreover, they can converse even into elements of different embryonic stems. Such therapeutic potential may be expected only on human embryonic SC which, however, do not fulfill histocompatibility with the recipient tissues. Moreover, MSC may be isolated from relatively easily accessible source such as dental pulp, in contrast to such tissue specific SC as for example neural SC. When using the method of cultivation of SC isolated from human bone marrow we developed, SC were identified in the dental pulp tissue.

Stem cells of dental pulp (SCDP) were isolated from extracted primary/permanent teeth with the application of enzyme dissociation protocol. The obtained cells were cultivated in the medium with 2% FBS and passaged three times weekly over 55 population divisions in all patients.

Our results have shown that the isolated SCDP represent a homogeneous population of stem cells capable of self-renewal with similar characteristics as MSC of bone marrow.

Key words: stem cells – dental pulp – sampling method

Čes. Stomat., roč. 106, 2006, č. 5, s. 131–135.

ÚVOD

Kmenové buňky (KB) se ve vznikajícím organismu zakládají jako jedny z prvních buněčných populací. Jejich hlavní úlohou je produkce specializovaných buněčných typů při současném zachování populace KB až do dospělosti. Z tohoto důvodu jsou KB obdařeny biologickými vlastnostmi, které je odlišují od všech ostatních buněk v tkáních. Zatímco za vývoje je jejich hlavní funkcí vytvoření základu jednotlivých orgánů, v dospělosti slouží k udržení

homeostázy jednotlivých tkání a k jejich reparaci.

Mezenchymové kmenové buňky (MKB) jsou vzácné buněčné elementy vyskytující se např. v kostní dřeni s frekvencí zhruba 2–5 na 1 milion jaderných buněk [1]. Jedná se o klíčové buňky zodpovědné za vytvoření a udržení struktury stromatu kostní dřeni. MKB jsou v současné době intenzivně studovány pro své schopnosti podpory krvetvorby, modulace imunitních funkcí a diferenciaci směrem ke specializovaným tkáním (kost, chrupavka, šlacha, srdeční sval aj.).

Disponují značným proliferačním [2] a diferenciálním potenciálem [3, 4]. MKB se nabízejí pro potenciální, široké klinické využití (buněčná a genová terapie) a laboratorní modelování.

Lidské MKB, jejichž izolaci a ex vivo expanzi se věnujeme, byly mimo jiné lokality v lidském organismu identifikovány i v zubní pulpě. Gronthos a spolupracovníci [5] tyto buňky jako první izolovali, kultivovali a obecně charakterizovali. Další jejich práce [6, 7] dokládají schopnost seboobnovy kmenových buněk zubní pulpy (KBZP), schopnost diferenciace ve zralé buněčné typy, regenerace mikroprostředí zubní pulpy a vysoký proliferační potenciál. Stejní autoři také diskutují distribuci KBZP uvnitř zubní pulpy a zaměřují se především na srovnání perivaskulárního niché KB z kostní dřene a zubní pulpy.

Ve světové literatuře se hromadí stále více dokladů o tom, že nejperspektivnějším typem buněk pro regenerační medicínu je právě mezenchymová KB. MKB je schopna spontánně generovat celé spektrum buněk mezenchymového původu. Navíc je MKB schopna konverze i v elementy odlišných zárodečných listů (v rámci tzv. plasticity KB) – nervové buňky [8], hepatocyty [9] atd. Takový terapeutický potenciál lze očekávat pouze od lidských embryonálních kmenových buněk, které však nesplňují předpoklad histokompatibility s tkáněmi konkrétního příjemce. MKB lze navíc izolovat z relativně snadno přístupného zdroje, jakým je zubní pulpa, na rozdíl od takových tkáňově specifických KB, jakými jsou např. neurální KB.

Na základě výše uvedených faktů, a protože zubní pulpa představuje ohraničený a od ostatních tkání oddělený kompartment, který si uchovával stavbu typickou pro primitivní (embryonální) tkáň, se domníváme, že KB v ní obsažené by měly vykazovat spíše vlastnosti časných (embryonálních) KB. Protože zubní pulpa není homogenní, je polarizovaná, předpokládáme zde existenci 2 kompartmentů (subodontoblastického – SO a perivaskulárního – PV) jinak bohatých na KB. Předpokládáme také různý původ KB v těchto kompartmentech.

K ověření našich předpokladů bylo nutné optimalizovat metodiky odběru, izolace a kultivace KBZP v podmínkách pro MKB izolované z lidské kostní dřene. Tyto metodiky s prvními výsledky kultivace KBZP jsou tématem našeho sdělení.

METODY

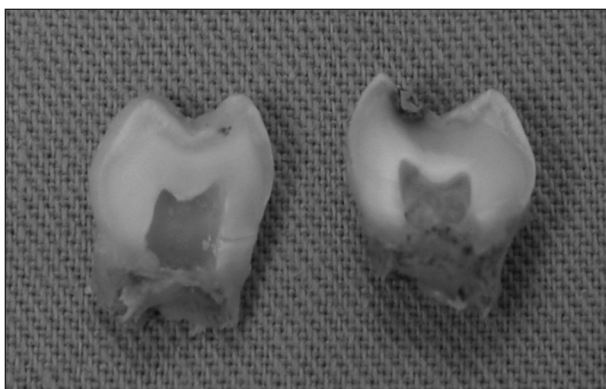
Do našeho souboru jsme zařadili podle níže uvedených kritérií celkem 12 pacientů Stomatologické kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, u kterých byla indikována extrakce zubu. Každý pacient je před

odběrem zubu pro výzkumné účely krátce seznámen s teorií kmenových buněk a podepisuje informovaný souhlas. Pokud se jedná o odběr zubu u dítěte, informovaný souhlas podepisuje zákonný zástupce. Informace pro nemocné a text informovaného souhlasu schválila Etická komise LK UK a FN v Hradci Králové. Při zařazení do studie jsou osobní data pacientů uchována s plnou ochranou důvěrnosti podle platných zákonů ČR. Extrakce jsou plánovaným zákrokem a pacientovi tím nevzniká žádná újma, nedochází k žádnému vyšetření ani zákroku navíc.

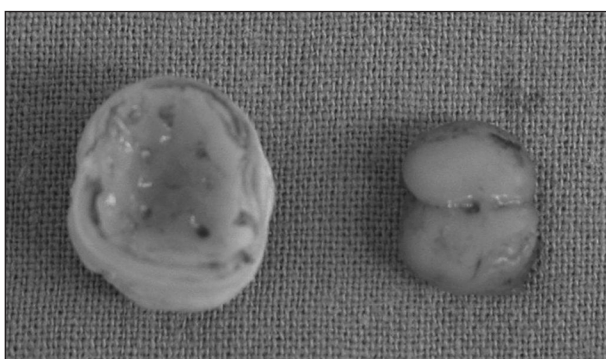
Pro odběr zubní dřene jsme zvolili čtyři skupiny extrahovaných zubů. U dospělých pacientů se zubní pulpa získává po extrakci již prořezaných či semiretinovaných třetích molárů nebo po germektomií třetích molárů, které svojí polohou či sklonem nemohou fyziologicky prořezat do ústní dutiny. U dětí se zubní dřeň odebírá z extrahovaných dočasných jednokořenových zubů vykazujících známky resorpce zubního kořene, která však nepřesahuje polovinu délky zubního kořene. K extrakci jsou dočasné zuby indikovány pro úraz nebo fyziologickou resorpci u pacientů dětského oddělení Stomatologické kliniky v rámci běžného ošetření. Poslední skupinou extrahovaných zubů jsou premoláry, které jsou u dětí indikovány k extrakci z ortodontických důvodů a u kterých ještě nedošlo k dokončení vývoje zubního kořene.

Metodiku odběru rozdělujeme podle toho, zda zub prořezává či je již prořezaný, a je tudíž vystaven infekčnímu prostředí ústní dutiny, nebo je retinovaný, a nehrozí přenos infekce do laboratoře tkáňových kultur. V obou případech je zub extrahován za standardních podmínek v lokální anestezii. U zubů prořezaných do ústní dutiny následuje po jejich extrakci ošetření sterilní gázou napuštěnou dezinfekčním roztokem (Gutar). Tím odstraníme mikrobiální povlak a poté zuby transportujeme v Hankově balancovaném solném roztoku (HBSS, Gibco) s antibiotiky (gentamycin, streptomycin, amfotericin a penicilin) při teplotě 4 °C. V případě retinovaných zubů nebo germektomií, probíhá extrakce za sterilních podmínek. Takto získaný zub transportujeme v HBSS médiu bez antibiotik, taktéž při teplotě 4 °C.

Vlastní odběr pulpy se provádí v laboratoři tkáňových kultur. Nejobtížnější je získat pulpu ze zubů s dokončeným vývojem kořene. Takové zuby fixujeme sterilním mulovým čtvercem na pevné podložce a provedeme longitudinální řez ve směru dlouhé osy zubu sterilním diamantovým kotoučovým brouskem. Během řezu chladíme brousek fyziologickým roztokem. Tím získáme dvě identické poloviny zubu (obr. 1) a materiál k odběru. Zubní dřeň exkavujeme z *cavum pulpae* ostrým sterilním exkavátorem (Henry Schein Inc., UK) tak, abychom zachytili tkáň pulpy



Obr. 1. Dvě přibližně stejné poloviny zubu po longitudiálním řezu diamantovým kotoučovým brouskem.



Obr. 2. Pohled do cavum pulpae zubu po germektomii a vybavená zubní pulpa.

i v těsné blízkosti dentinu a získali tak subodontoblastickou vrstvu dřeně. Tkáň zubní dřeně se spolu s extrahovaným zubem uloží každé zvlášť do sterilních zkumavek s HBSS médiem. Při této technice hrozí poškození buněk pulpy nejen mechanicky, ale i termicky.

Pokud nedošlo k uzavření foramen apicale, můžeme pulpu vybavit pomocí exstirpační jehly, což je technicky snazší a vyvarujeme se tím i termického poškození buněk zubní pulpy. Nejsnazší je odběr pulpy ze zárodku zubu (obr. 2). Pulpa široce komunikuje s okolím zubu a je velmi dobře přístupná.

Izolace KBZP je prováděna enzymatickou disociací při 37 °C enzymy dispázou (Gibco) a kolagenázou typu I (Sevapharma). Získané frakce:

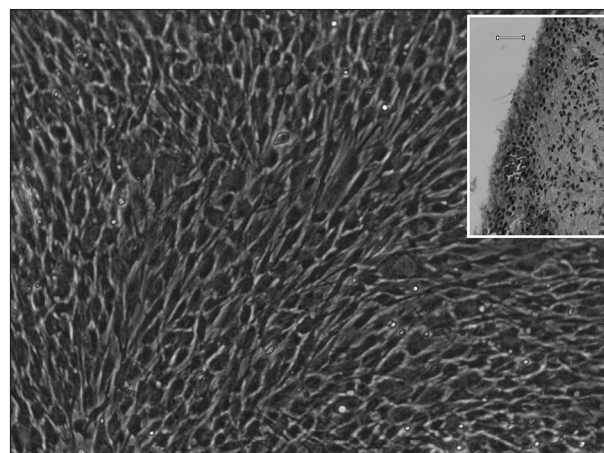
- a) z tvrdých částí a povrchových vrstev pulpy;
- b) z centrální části zubní pulpy; nasazujeme na misky s plastovým povrchem pro tkáňové kultury (Sarstedt).

Buňky kultivujeme při 37 °C za aerobních podmínek (5% CO₂), a to v modifikovaném expanzním médiu pro kultivaci lidských mezenchymových progenitorových buněk získaných aspirací kostní dřeně (MPCs) [10] s 2 % fetálního bovinního séra (FBS) a růstovými faktory (EGF, PDGF-BB). Buňky z primokultury disociujeme trypsini-

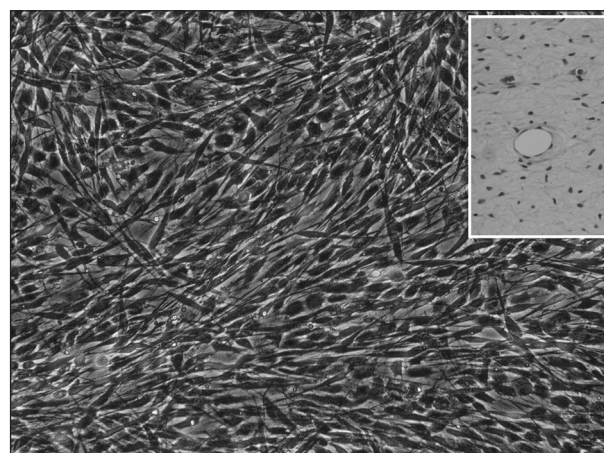
zaci a rozesazujeme v poměru 1:3. K dalšímu pasážování přistupujeme vždy při dosažení 70% splývavosti buněk v kultivačních nádobkách. Analýzu viability, distribuce průměrů a počtů buněk provádíme pomocí přístroje ViCell (Beckman Coulter).

VÝSLEDKY

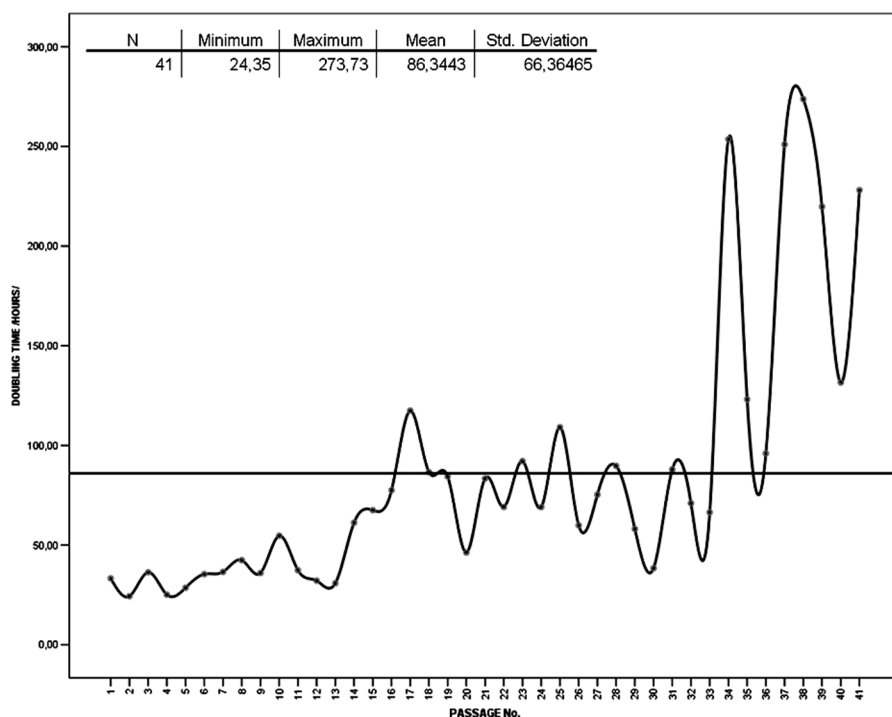
Naše pracovní hypotézy se potvrdily. Izolovali jsme KBZP z obou kompartmentů (SO, PV) extrahovaných třetích molárů (obr. 3, obr. 4) a také ze zubní pulpy exfoliovaného řezáku. Tyto elementy jsme jako první in vitro expandovali přes 60 populačních zdvojení v médiu pro kultivaci MPC kostní dřeně. Čas potřebný na zdvojnásobení populace buněk (tzv. doubling time) se pohyboval v rozmezí 24-50 hodin pro iniciálních 40 populačních zdvojení. Později, po cca 50 populačních zdvojení, tento čas vzrostl z 60 na 270 hodin (graf 1). Po celou dobu kultivace jsme navíc sledovali viabilitu buněk, která byla průměrně 98,3 +/- 0,6 %.



Obr. 3. Monolayer KBZP, SO kompartment, 30. pasáž, histologické srovnání.



Obr. 4. Monolayer KBZP, PV kompartment, 30. pasáž, histologické srovnání.



Graf 1. Dynamika času potřebného ke zdvojení populace KBZP v průběhu kultivace.

Všechny izolované linie KBZP byly iniciálně i po dosažení tzv. Hayflickova limitu (63 populačních zdvojení) cytogeneticky normální (vykazovaly normální karyotyp v 7 po sobě následujících experimentech).

DISKUSE

Zubní pulpa představuje ohraničený a od ostatních tkání oddělený kompartment, který si uchoval stavbu typickou pro primitivní (embryonální) tkáň. Základy zubů se formují z ektodermových zubních lišt (laminae dentales) a z mezenchymu, který pochází jednak z mezodermu téže oblasti a jednak z buněk kraniální partie crista neuralis, které vycestovaly do lokalit budoucích zubů. Již na základě tohoto vývojového faktu lze v zubní pulpě očekávat dvě populace KB, které jsou ve vzájemné interakci a měly by vykazovat spíše vlastnosti časných (embryonálních) KB. Lze také očekávat jejich odlišnou distribuci v rámci vlastní zubní pulpy.

Úkolem těchto KB in vivo je podle nečetných literárních údajů především produkovat potomstvo (fibroblasty, pericyty, odontoblasty) s cílem doplnění buněčných typů, které se v pulpě zubu nacházejí (v rámci obměny zubní pulpy).

Na základě našich zkušeností s kultivací MPC buněk z kostní dřeně jsme se snažili zachytit tyto primitivní buňky také v zubní pulpě. Kultivaci KBZP v modifikovaném MPC médiu podle Reye-

sové [10] jsme udrželi KBZP v primitivním stavu a jejich biologickým chováním jsme ozřejmili, že KBZP mají podobné chování jako MPC získané z kostní dřeně.

První autoři, kteří publikovali práce o izolaci a kultivaci KBZP [5, 6], předpokládají, že tyto elementy pocházejí z oblastí kolem cév – z oblasti perivaskulárního niché. Plánovanou disociací zubní pulpy ve dvou krocích jsme oddělili dvě frakce – tj. dvě subpopulace KBZP z odlišných kompartmentů. Charakteristikou těchto subpopulací a ze spektra spontánně diferencovaného potomstva budeme moci v budoucnu usuzovat na původ KBZP. Chceme tak při-

spět do diskuse o niché KBZP a jejich distribuci ve vlastní zubní pulpě.

Nastavením metodiky výběru nemocných (dočasná vs trvalá dentice) jsme se pokusili ozřejmit vliv krevního zásobení na niché KBZP. Krevní zásobení je naprosto zásadním faktorem pro formování niché kmenových buněk v nejrůznějších tkáních. Např. v oblasti subependymální zóny mozku, která představuje niché pro neurální kmenové buňky. Endotelové buňky krevních cév zde produkují neurotrofické faktory a jejich bazální membrány váží velké množství růstových faktorů, což ovlivňuje chování KB [9]. Dalším dokladem významu cévního zásobení pro formaci niché a udržení tkáňově specifických KB je eliminace KB Lieberkühnových krypt v gastrointestinálním traktu po ozáření - bylo popsáno, že zde dochází k trombotizaci cév, a tím k narušení niché, které sekundárně vede k zániku KB.

Naše dosud nepublikované nálezy dokládají, že námi izolované buňky zubní pulpy mají vlastnosti KB a je možné je dlouhodobě kultivovat in vitro a diferencovat v osteogenní a chondrogení elementy. Jsou tyto buňky skutečně pluripotentní a schopné produkce buněčných typů jiných než vzniklých spontánní diferenciací? Je možné KBZP reprogramovat v jiné buňky než ty, které zubní pulpu normálně konstituují? Jaká je distribuce a interakce diskutovaných dvou populací KBZP? Odpovědi na tyto otázky se pokusíme zodpovědět při dalším řešení této problematiky.

Poděkování:

Autoři děkují kolektivu Stomatologické kliniky LF UK a FN a laborantkám Ústavu histologie a embryologie LF UK za pomoc a vynikající spolupráci.

Práce vznikla v rámci Výzkumného záměru FN HK, MZO 00179906.

LITERATURA

1. **Minguel, J. J., Erices, A., Conget, P.:** Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001, č. 226, s. 507-520.
2. **Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. et al.:** Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, č. 97, s. 3213-3218.
3. **Pittengel, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. et al.:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, č. 284, s. 143-147.
4. **Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D. et al.:** Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, č. 92, s. 4857-4861.
5. **Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J. et al.:** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, č. 97, s. 13625-13630.
6. **Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W. et al.:** Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.*, roč. 81, 2002, č. 8, s. 531-535.
7. **Shi, S., Gronthos, S.:** Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, roč. 18, 2003, č. 4, s. 696.
8. **Sanchez-Ramos, J. et al.:** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*, 2000, č. 164, s. 247-256.
9. **Doetsch, F.:** A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003, č. 13, s. 543-550.
10. **Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T. et al.:** Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, roč. 98, 2001, č. 9, s. 2615-2625.

MUDr. Romana Ivančáková
Stomatologická klinika LF UK a FN
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

**KAZUISTIKY Z MOLEKULÁRNÍ GENETIKY**

Jan Lebl, Milan Macek jr., hlavní autoři a pořadatelé

Obsáhlý soubor 70 kazuistik dětských pacientů s monogenními onemocněními, na němž se podílel více než stočlenný autorský kolektiv odborníků z České republiky i ze zahraničí, obsahuje ty nejzajímavější případy z jejich klinické praxe. Autoři se soustředili jak na nejčastější choroby, tak i na onemocnění vzácná, ale z různých pohledů důležitá (buď z etnického hlediska, nebo z hlediska modelových patogenetických aspektů). Sborník je rozčleněn do 15 okruhů, týkajících se jednotlivých onemocnění (hyperglykémie, malý vzrůst, hemostáza, hypertenze, obezita, bolesti břicha, plicní onemocnění, poruchy sluchu, štítná žláza, nadledviny, lipidy, kriticky nemocný novorozenec, neurogenetická onemocnění, vývojové anomálie, srdeční vady), a doplněn bohatou fotodokumentací.

Autoři kazuistik uvedené příběhy se svými pacienty osobně prožili; jsou mezi nimi příběhy smutné i příběhy se šťastným koncem, všechny ale přispěly k poznání a poučení.

Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-418-0, formát 155 x 225 mm, brož., 219 str., cena 190 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz