

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno 2011

Nikol Reslová

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Laboratoř embryologie živočichů



Podmínky kultivace větších tkáňových štěpů

Bakalářská práce

Brno 2011

Nikol Reslová

Vedoucí práce: prof. MVDr. Ivan Míšek, CSc.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě rad a pokynů vedoucího a vědecké literatury, která je v práci řádně citována.

V Brně, dne 26.dubna 2011

Nikol Reslová

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MVDr. Ivanu Míškovi, CSc. za odborné vedení, čas a cenné rady, které mi poskytl při vypracování bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Vývoj a stavba zubu	8
3	Historie kultivací dentálních tkání	11
4	Kultivace zubů <i>in vitro</i>	15
4.1	Terminologie	15
4.2	Kultury	15
4.2.1	Buněčné kultury	15
4.2.1.1	Embryonální plátky.....	15
4.2.1.2	Plátkové kultury	16
4.2.1.2.1	Adherentní kultury	18
4.2.1.2.2	Plovoucí (suspenzní) kultury.....	18
4.2.2	Orgánové kultury a implantace štěpů.....	18
4.2.2.1	Kultivace na membráně vnějšího zárodečného obalu.....	18
4.2.2.2	Kultivace pod renální kapsulou	20
4.2.2.3	Explantátové kultury dentálních tkání	20
4.2.2.3.1	Media s embryonálním extraktem.....	21
4.2.2.3.2	Hanging-drop kultury	21
5	Problémy spojené s kultivací větších tkáňových štěpů a jejich řešení	23
5.1	Mikrodialýza	24
5.1.1	Princip mikrodialýzy	24
5.1.2	Mikrodialyzační katétry	25
5.1.3	Zanášení katéetrových membrán	27
5.1.4	Pumpovací metody	27
6	Regenerace a tkáňové inženýrství zubních tkání.....	29
6.1	Kmenové buňky	29
6.1.1	Embryonální kmenové buňky (ESC)	29
6.1.2	Mezenchymové kmenové buňky (MPC).....	29
6.1.3	Zubní kmenové buňky.....	30
6.1.3.1	Kmenové buňky zubní pulpy (DPSC)	30
6.1.3.2	Kmenové buňky exfoliovaných zubů (SHED)	31
6.1.3.3	Kmenové buňky periodontálního ligamentu (PDLSC)	31
6.1.3.4	Kmenové buňky periapikálního vaku (SCAP)	31

6.2	Tvorba zubů <i>de novo</i>	32
6.2.1	Využití tkáňových skeletů	32
6.2.2	Navození přirozeného vývoje.....	34
7	Závěr	35
	Použité zkratky	36
	Literatura	37

1 Úvod

Moderní populace se každodenně potýká s řadou traumatických stavů, problematických degenerativních i genetických onemocnění a dalšími nepříjemnostmi postihujícími lidské zdraví. Celá řada zmíněných vlivů může mít za následek nezaložení nebo úplnou ztrátu tkáně či celého orgánu. Četnost výskytu takovýchto zdravotních komplikací v poslední době až povážlivě narůstá a doposud nebyla objevena prakticky žádná stoprocentně uspokojujivá léčebná metoda. V průběhu let se podařilo vyvinout poměrně účinné postupy - autologní transplantace, aloplastické implantáty nebo protetické náhrady, nicméně se jedná o metody potýkající se s velkým množstvím nevýhod. Mezi nejzávažnější z nich patří nepřijetí nebo rejekce dárcovského štěpu, zvýšené riziko infekce v důsledku opakovaných chirurgických zákroků a špatná stabilita implantátu po jeho zavedení (implantaci).

Cílem mnoha vědeckých experimentů po celém světě je proto v současné době poskytnutí nového řešení – tzn. kultivace orgánu z malého štěpu, zárodku nebo kmenových buněk v podmínkách *in vitro* a tím získání pro pacienta dokonalé náhrady, která bude tělu vlastní. Jedná se však o relativně dlouhý proces, neboť je třeba najít nejvhodnější podmínky pro vývoj tkáně *ex vivo*, zajištění jeho dostatečné výživy a nutričního zásobení všech buněk a tím zamezení nekrotických změn. V případě zubních štěpů je v neposlední řadě nutno prozkoumat i regenerační potenciál zubních kmenových buněk. Výsledkem těchto snah by měl být dobře vyvinutý a funkční orgán nebo jeho základ vytvořený *de novo* bez použití arteficiálních materiálů, které nejsou tělu vlastní.

Ve své práci jsem se snažila formou rešerše shrnout co nejvíce poznatků týkajících se otázek kultivace větších tkáňových štěpů. Konkrétně jsem se zaměřila na tkáň zubu (vzhledem k pracovišti, pod jehož záštitou jsem práci zpracovala), na metody jejich kultivace *in vitro* a možnosti regenerace pro budoucí využití v medicíně.

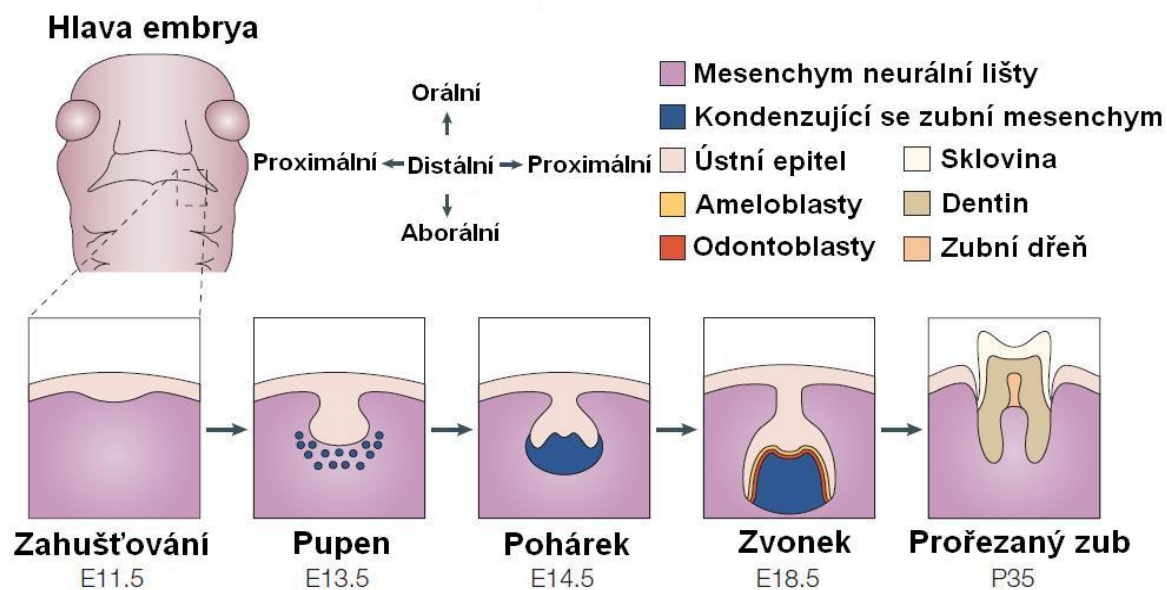
2 Vývoj a stavba zubu

Problematika odontogeneze byla nejčastěji studována na myším modelu (*mus musculus*), protože se po srovnání genových expresí během zubního vývoje ukázalo, že mezi lidskými a myšími zuby jsou v této oblasti jen nepatrné rozdíly. Výhodou myšího modelu je krátká generační doba, dostupnost protilátek a molekulárních sond, možnost vytvoření knock-out fenotypů a aplikace *ex vivo* metod (Tucker & Sharpe, 2004). K pochopení mechanismu utváření zubů významně přispěla také lidská geneticky podmíněná onemocnění, zahrnující ztrátu zubů (Lin *et al.*, 2007; Tucker & Sharpe, 2004).

Vývoj zubu (obr. 1) je charakterizován sérií recipročných interakcí mezi epitelem a mezenchymem, které mají za následek diferenciaci a prostorové uspořádání buněk pro vytvoření orgánu (Fleischmajer, 1967; Thesleff, 2003).

První známkou zubního vývoje je založení dentogingivální lišty (*lamina dentalis*) za lištou labio-gingivální. Vzniká invaginací proliferujícího epitelu do mezenchymu (Tucker & Sharpe, 1999), tzn., že desátý až jedenáctý den myšího embryonálního vývoje jsme schopni v epitelu pozorovat odontogenní zahušťování budoucích molárů a dvanáctý den se pak toto zahuštění invaginuje do vlastního mezenchymu, aby takto vytvořilo zubní lištu (Osumi-Yamashita *et al.*, 1994). V této fázi vývoje jsou určena místa na zubní liště, kde a kterým směrem se bude ubírat další vývoj jednotlivých zubů (Tucker & Sharpe, 1999). Následuje postupné rozšiřování zubní lišty do přilehlého mezenchymu a takto vznikají třináctý den vývoje pupenovitě ztluštěniny, které se formují v zubní pupeny (Tucker & Sharpe, 2004; Hay, 1961).

Čtrnáctý den začínají zubní pupeny nabývat tvaru kulovitých pohárků, stadium označujeme jako tzv. zubní pohárek (Peters & Balling, 1999). Během následujících dnů vzniká orgán skloviny (útvár podobný zvonu, odtud název stádia "zubní zvonek"), složený z vnitřního a vnějšího sklovinného epitelu, který objímá zakládající se zubní papilu (Ten Cate *et al.*, 2003) a indukuje zahušťování okolního mezenchymu, přičemž vzniká zubní vak obsahující kapiláry zajišťující výživu (Lesot *et al.*, 1996). Ze zubního epitelu (na vrcholu uvnitř zubního pupene) se vytvoří sklovinný uzal, který se následně stává signalizačním centrem, kontrolujícím další utváření zubu (Hay, 1961; Peters & Balling, 1999).



Obr. 1: Vývojová stádia zubu u myši (přepřacováno - Tucker & Sharpe, 2004)

Schématický čelní pohled na embryonální hlavu. Embryonální den (E) 11.5, ve výřezu místo tvorby spodních/mandibulárních molárů. Fáze vývoje zobrazeny od prvních náznaků zahušťování (E11.5) až po erupci zubu kolem pátého týdne (P35) po narození. Zárodek zubu se formuje z ústního epitelu a mezenchymu neurální lišty. Ve stádiu zvoneku se tvoří v místě interakce epitelu a mezenchymu v přilehlých vrstvách ameloblasty a odontoblasty. Tyto vrstvy produkují sklovinu a dentin definitivního zubu.

Ektodermové buňky orgánu skloviny se mění na ameloblasty - vnější (oploštělé) a vnitřní. Mezi těmito vrstvami se zbylé epitelové buňky mění na tzv. stratum intermedium (vrstvy kubických buněk překrývající vnitřní ameloblasty) a na pulpu skloviny (přiléhající k vnějším ameloblastům). Vnitřní ameloblasty působí na mezenchymové buňky povrchu zubní papily a indukují jejich diferenciaci v odontoblasty. Odontoblasty následně začínají produkovat predentin a poté i ameloblasty sklovinu.

Později ztrácejí zubní pohárky spojení se zubní lištou, která se rozpadá, a její buňky jsou resorbovány. Výjimkou zůstávají laterální části, které resorbci nepodléhají a následně se z nich tvoří stálé moláry. Pozůstatky lišty mohou perzistovat uvnitř dásně jako ostrůvky epitelu, nazývané sklovinné perly (Vacek, 2006).

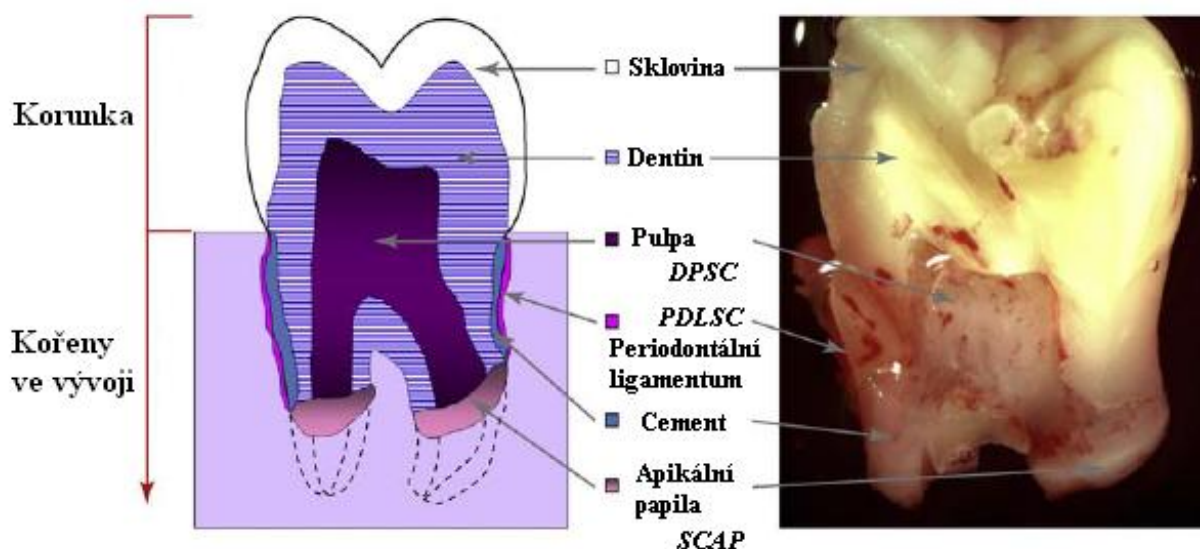
Dentinogeneze i amelogeneze začínají v oblasti hrotu budoucí korunky, tedy na vrcholu zubní papily (růstové centrum). Postupně pak přecházejí ke krčku, kde se stýká vnitřní a vnější sklovinný epitel a utváří cervikální kličku. Klička prorůstá apikálním směrem a má funkci formy pro ukládání dentinu v kořenové oblasti. Proces amelogeneze končí před prořezáním zubu, neboli před jeho erupcí dásní (Malínský, 1995). Ameloblasty se oplošťují, částečně keratinizují

a spolu se stratum intermedium dávají vznik redukovanému sklovinnému epitelu, který pokrývá korunku zubu a při prořezávání srůstá s epitelem gingivy. Postupné vytlačování korunky proti dásni má za následek poruchu cévního zásobení až nekrózu cév, dochází k odloučení narušené části gingivy v nejbližším okolí zubu a utvoření otvoru pro zub.

Buňky cervikální kličky postupně degenerují (mohou perzistovat jako epitelové ostrůvky) a spodní úsek dentálního vaku utváří kolem kořene cementogenní plášť, z jehož mezenchymových buněk se diferencují cementocyty produkující cement (Vacek, 2006). Zároveň s cementem se z vnější vrstvy mezenchymu zubního vaku vytváří periodoncium, které je tvořeno kolagenním vazivem, produkovaným fibroblasty.

Po ukončení vývoje zubu (obr. 2) zůstávají v periodontálním vazivu nezralé buněčné elementy, schopné diferenciaci ve fibroblasty, cementoblasty, osteoblasty či osteoklasty. Díky tomu je umožněna funkční přestavba alveolu i po ortodontickém nebo chirurgickém zákroku (Malínský, 1995).

Detailní objasnění celého procesu vývoje zubu je velice důležité pro pochopení zubního vývoje a proniknutí do problematiky kultivace zubní tkáně.



Obr. 2: Stavba třetího moláru i s příslušnými zdroji kmenových buněk (přepřacováno – Sharpe *et al.*, 2010)

3 Historie kultivací dentálních tkání

Vývoj dentálních tkání v embryonálních i postfetálních stádiích byl již mnohokrát a různými způsoby zkoumán, jak u kočky, psa, morčete, myši, králíka, tak i člověka.

Vůbec první studii týkající se kultivace dentálních tkání provedli Le Gros & Magitot (1874), kteří izolovali zárodky psích zubů 21-28 hodin po narození a naočkovávali je subkutánně morčatům nebo dospělým psům. Jednalo se o štěpy horní čelisti se zubními zárodky, izolovaný orgán skloviny, kompletní zubní zárodky, dřev, popřípadě izolovaný zubní pohárek. Všechny zubní zárodky naočkované morčatům byly ztraceny kvůli hnisání nebo resorpci. Ze štěpů, které byly naočkovány psům, se u sedmi z šestadvaceti kompletních zubních zárodků vytvořila sklovina i dentin a u dvou z šestnácti izolovaných dřevových štěpů se vytvořil dentin. Několik štěpů neprokázalo žádný nárůst a většina jich byla ztracena kvůli vyhnisání nebo resorpci. Vzhledem k tomu, že tyto experimenty byly provedeny ve dnech před vykonáním aseptise, získané výsledky se daly považovat za velmi uspokojivé.

Další experimenty kolem transplantací zubních zárodků prováděl Huggins *et al.* (1934). Očkovali neeruptované psí špičáky staré 3-6 týdnů na pojivovou tkáň břišní stěny nebo na stehno téhož psa. Odstranili kalcifikovaný pohárek dentinu a skloviny a explantovali zvláště sklovinný epitel i dentální papilu. Transplantací izolovaného epitelu se nevyvinula nová sklovina, ale izolovaná dentální papila začala produkovat dentin 14 dní po transplantaci. Pokoušeli se také různými způsoby očkovat sklovinný epitel a dentální papilu dohromady. Sklovina i dentin se diferencovali, avšak sklovina se ukládala pouze na dentin, zatímco dentin se vytvářel nezávisle na sklovině. V ostatních experimentech byl střed dřevě naprosto oddělen od vlastních odontoblastů a následně transplantován; nevytvořil se žádný dentin ani po 29 dnech, třebaže oddělená a samostatně transplantovaná vrstva odontoblastů již vytvářela malé ostrůvky dentinu ve stejném období. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že měkké tkáně zubních zárodků jsou schopny se ochotně diferencovat i při transplantaci do abnormálního prostředí mimo dutinu ústní.

Zlomovým bodem byla experimentální práce Glasstone (1936). Tato autorka uvedla řadu studií zaměřených na růst izolovaných embryonálních tkání *in vitro*, s ohledem na studium kapacity těchto tkání pro vlastní diferenciaci. Ačkoli byly zbaveny vaskulárního i nervového systému i spojení se sousedními strukturami, většina tkání se v průběhu kultivace vyvíjela poměrně běžným způsobem. Například kost se diferencovala *in vitro* velice ochotně (Fell, 1932), a poněvadž jsou kost a dentin velmi úzce příbuzné, zdálo se pravděpodobné, že se dentin bude

moci vyvíjet za stejných podmínek. Výsledky získané z těchto experimentů potvrzují závěry Hugginse *et al.* (1934), že izolovaná zubní tkáň je samo-diferencovatelná. Jejich důkazy však pramenily z transplantací zubního zárodku do břicha, zatímco Glasstone (1936) podala výsledky studie získané z kultivace zubních zárodků pomocí explantátové kultury a tedy v *in vitro* systému, který právě odstraněním všech cévních a nervových spojů vytváří komplexnější izolaci.

Následně se s podobnými studiemi roztrhl pytel. Významné experimenty shrnuje tab. 1. Výsledky všech probíhajících experimentů, které zahrnovaly heterologní, autologní, homologní i xenologní štěpy a využití metod tkáňové kultivace, byly až překvapivě uniformní. Celé zárodky zubů pokračovaly v téměř normálním vývoji; izolované sklovinné orgány dediferenciovaly nebo keratinizovaly; dentální pulpa bez odontoblastů se již dále nevyvíjela, zatímco izolovaná pulpa s odontoblasty prodělávala další vývoj a tvořila se nepravidelná vrstva dentinu (Huggins *et al.*, 1934). Bylo konstatováno, že přítomnost sklovinného orgánu je nezbytná pro diferenciaci odontoblastů a pro zajištění normálního tvaru zubu. Později se také doložilo, že i přítomnost epitelu hostitelské membrány zárodečného obalu může mít stejný vliv (Studitsky, 1939).

Mezi jednotlivými experimenty můžeme pozorovat rozdíly, do jaké míry se izolované zárodky zubů vyvinuly. Třebaže dentin se vytvářel ve všech experimentech, v případě skloviny, byla produkce velice variabilní. Dokud se neobjevil dentin, nedocházelo k diferenciaci ameloblastů a bez nich se nezačala formovat ani sklovina. V tkáňových kulturách se sice ameloblasty diferencovaly, avšak vyšší než raná stadia vývoje skloviny byla pozorována jen zřídka, zatímco v případě kultivovaných zubních zárodků již byly patrné vrstvy prizmatické skloviny (Huggins *et al.*, 1934; Willis, 1935; Fleming, 1952, 1953). Někdy docházelo v tkáňových kulturách také ke vzniku abnormálního dentinu (Glasstone, 1936) a u kultivovaných štěpů, které byly po dlouhou dobu ponechány v klidu, docházelo k formování osteodentinu (Huggins *et al.*, 1934; Fleming, 1952).

Hlavním zájmem většiny badatelů bylo zjistit, zda si zubní zárodky zachovají životaschopnost, a pouze pár z nich věnovalo pozornost i celkovému morfológickému vývoji zubů. Detailnější studii tohoto specifického aspektu vývoje provedla až Glasstone v roce 1938. Zjistila, že u potkaních i králičích molárů explantovaných ještě před objevením hrbolků se následně vyvíjel normální typ těchto hrbolků. Roku 1952 popsala i vytváření malých, ale kompletních molárů s plným počtem hrbolků u rozpůlených zubních zárodků (Glasstone, 1954).

Autor	Původ štěpu	Dárce	Místo vývoje štěpu	Příjemce
Le Gros a Magitot (1874)	celý zub sklovinný orgán části čelisti	štěně	podkoží	morče, pes
Huggins et al. (1934)	a) sklovinný orgán b) pulpa s a bez odontoblastů	štěně	podkoží	štěně
Willis (1935)	rozsekané čelisti	embryo potkana	mozek	potkan
Kostečka (1938)	(1) celý zub	embryo psa	podkoží	pes
Kostečka (1938)	(2) celý zub	pes	dutina ústní	pes
Kostečka (1938)	(3) rozsekané čelisti	embryo myši	mozek	myš
Sutro a Pomerantz (1939)	sklovinný orgán pulpa	kotě	dutina dřeně dlouhé kosti	kotě
Santone (1939)	celý zub	morče	játra, ledvina, ucho	morče
Studitsky (1939)	pulpa bez odontoblastů	potkan	membrána zárodečného obalu	kuře
Lapchinsky a Malinovský (1940a,b,c,1943)	(1) celý zub	pes	dutina dřeně dlouhé kosti	pes
Lapchinsky a Malinovský (1940a,b,c,1943)	(2) celý zub	štěně	dutina ústní	pes
Hahn (1941)	pulpa	štěně	vaječník	pes
Villafane a Gonzalez (1942), Villafane a Brero (1942)	celý zub	králík	podkoží	králík
Villafane a Gonzalez (1942)	celý zub	králík	dutina ústní	králík
Shapiro a Mclean (1945)	celý zub	kočka	dutina ústní	kočka
Fleming (1952b)	(1) celý zub	embryo myši	podkoží	myš, morče
Fleming (1952a)	(2) celý zub	embrya králíka, myši, morčete a člověka	oční komora	králík, myš, morče
Fleming (1952b)	(3) celý zub	embrya myši a potkana	mozek	myš a potkan
Glasstone (1936)	(1a) celý zub (1b) pulpa s a bez odontoblastů	embryo potkana	tkáňová kultura	myš a potkan
Glasstone (1938)	(2) celý zubní zárodek	embrya potkana a králíka	tkáňová kultura	myš a potkan
Glasstone (1952)	(3) rozpůlený zubní zárodek	embryo králíka	tkáňová kultura	myš a potkan
Nuckolls (1941)	celý zub	embrya myši a potkana	tkáňová kultura	myš a potkan
Losee (1943)	celý zub	embrya myši a potkana	tkáňová kultura	myš a potkan
Szabó (1954)	celý zub pulpa sklovinný orgán kalcifikovaná tkáň	embrya a dospělci myši a potkana	tkáňová kultura	myš a potkan

Tab. 1: Typy experimentů při kultivaci dentálních tkání v historii (přepřevzato - Glasstone, 1954)

Vědci nicméně stále hledali nejvhodnější metodu kultivace zubů. Následovala technika kultivace na CAM (chorio-allantoic membrane), která se stala tradiční metodou, poskytující vyživovací sterilní prostředí a umožňující prodloužení *in vitro* kultivovaných tkáňových štěpů (Studitsky, 1939; Glasstone 1954). Při jednotlivých experimentech jsou štěpy naočkovány na membránu chorio-allantoisu fertilního kuřecího vajíčka s cílem umožnit jejich další vývoj (Marais, 2010).

Po celých 25 let bylo za účelem sledování vývoje zubu populární očkování do přední komory oka (Kollar & Baird, 1970a). Metoda s sebou nesla imunologickou výhodu zpožděného odmítnutí cizích antigenů (Barker & Billingham, 1977). Takto naočkované zubní zárodky měly do dvou dnů zajištěnu kapilární výživu prostřednictvím ciliárních cév a během následujících 2 až 4 týdnů daly vznik zralým zubům (Lumsden, 1979). S úspěchem se setkaly i *in oculo* rekombinace oddělených epiteliálních a mezenchymálních komponentů zubního zárodku (Kollar & Baird, 1970b), které mohou přispívat ke kořenovému rozvoji s tvorbou periodontu (Yoshikawa & Kollar, 1981) i za využití geneticky odlišných, alogenních myší daného druhu (Palmer & Lumsden, 1987).

Experimenty zaměřené na kultivaci zubních zárodků *in oculo* prováděl Lubbock *et al.* (1996), přičemž se jim pomocí této techniky podařilo získat zuby histologicky normální, s plně vyvinutou korunkou, sklovinou, dentinem a dobře vaskularizovanou dření s aktivní vrstvou odontoblastů. Růst kořenů byl již velmi pokročilý, se zřetelným acelulárním i celulárním cementem. Potvrdili, že k terminální diferenciaci odontoblastů dochází pouze za přítomnosti epitelu, ať už se jedná o orgán skloviny (Glasstone, 1936), či Hertwigovu pochvu (Thomas & Kollar, 1989).

4 Kultivace zubů *in vitro*

4.1 Terminologie

Explantáty a štěpy – termíny vztahující se na tkáň, které byly kultivovány různým způsobem. V případě explantátu se jedná o přenos živé tkáně z embryí do vhodného, uměle vytvořeného prostředí pro *in vitro* kultivaci. Na rozdíl od toho jsou štěpy všechny tkáně transplantované živému hostiteli nebo příjemci. Štěpy jsou tedy například tkáň transplantované na CAM (chorio-allantoic membrane - membráně vnějšího zárodečného obalu) slepičích vajíček a pěstované *in ovo* nebo implantované pod ledvinové pouzdro myším a pěstované *in vivo* (Marais, 2010).

4.2 Kultury

Díky moderním metodám jsme schopni udržovat naživu mimo tělo původního organismu jednotlivé buňky či celé tkáně a orgány, po dobu přesahující 24 hodin. Tkáň se *in vitro* uchovává v pufrovaném roztoku, kam jsou dodávány živiny a napodobují se fyziologické podmínky *in vivo*. Tkáňové kultivace se postupně rozdělily do dvou linií: pěstování buněčných kultur a pěstování orgánových kultur nebo jejich zárodků (Sasaki & Ikura, 1991).

4.2.1 Buněčné kultury

Buněčná kultura poskytuje masu buněk neorganizované tkáně, kterou získáváme buď z buněčné suspenze či z jedné jediné buňky, např. nádorové. Izolované buňky vytváří v kultivační nádobě monolayer, tedy jednoduchou vrstvu o tloušťce jedné buňky (Sasaki & Ikura, 1991).

Mezi buněčné kultury bychom mohli zařadit i kultury větších embryonálních plátek.

4.2.1.1 Embryonální plátky

Chirurgické manipulace, jako jsou tkáňové štěpy a delece, byly využívány po dlouhou dobu a poskytovaly rámec, na kterém je založena moderní vývojová biologie. Tyto chirurgické přístupy často využívají ptačích embryí, protože jsou nejen lehce přístupné a manipulovatelné, ale navíc jsou známy i spolehlivé buněčné markery (Le Douarin, 1973; Tucker *et al.*, 1984).

Většina dosavadních znalostí o vývoji pochází z vyšetření mrtvých tkání. Pozorování vývojových procesů na živé tkáni je obtížné z důvodu fyzických a optických omezení. Díky metodě embryonálních plátek jsme však schopni přímo pozorovat vývoj v kultuře a vizualizovat děje pomocí mikroskopu (Hotary *et al.*, 1996). Techniky buněčné kultury nám umožňují

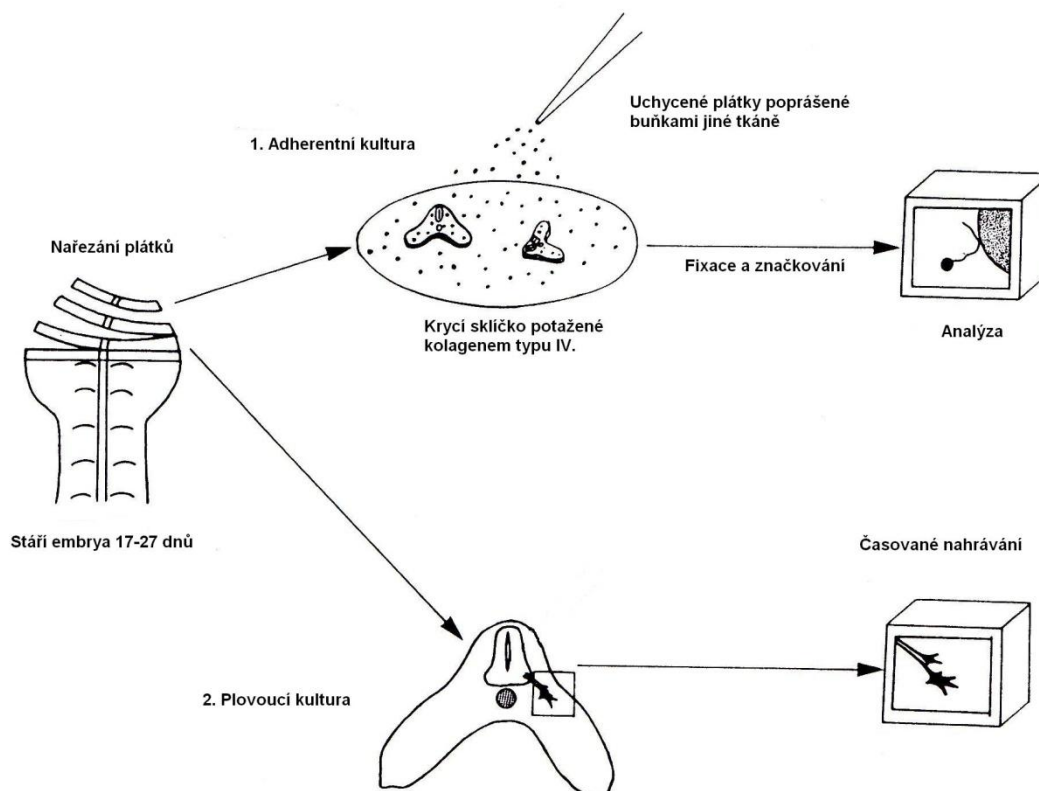
nahlédnout na interakce, molekuly a intracelulární mechanismy, které řídí buněčné pohyby, ve velmi zjednodušeném prostředí (Levi *et al.*, 1990; Kapfhammer & Schwab, 1992). Kultury jsou otevřené do prostředí a všechny vnitřní tkáně, které jsou za normálních okolností těžce přístupné nebo nepřístupné v rámci celého embrya, jsou v tomto případě volně dostupné. Tkáně pak mohou být poměrně lehce a velice specificky manipulovány jak fyzicky, tak i (méně specificky) chemicky. Obrovskou výhodou metody je relativně jednoduchá příprava, kultivace, minimální investice času a financí. Ačkoliv byla původně soustředěna především na studium periferního nervového vedení, nachází se pro ni spousta dalších možností uplatnění - tedy i pro studium vývoje zubních zárodků při *in vitro* kultivacích.

Ptačí embryonální plátky si zachovávají fyzikální a molekulární charakteristiky celého embrya a umožňují nám takto detailní studii probíhajících událostí v prostředí srovnatelném *in vivo*, které bychom na celém embryu nemohli moc dobře zkoumat. Mohou být nařezány z jakéhokoli regionu a v libovolné orientaci embrya, menší úpravy procedur se pak provádějí v závislosti na stáří embrya a použitém technickém vybavení. Na plátcích se mimo jiné sleduje, jak s tkání interagují nastříkané disociované buňky jiné tkáně a jak se začleňují do vývoje (Hotary *et al.*, 1996).

4.2.1.2 Plátkové kultury

Plátky mohou být kultivovány připevněné k substrátu každý zvlášť nebo volně plovoucí, záleží na prováděném experimentu. V experimentech, kde se analyzují fixované a barvené plátky (např. u buněk nasazených na plátku), je výhodnější mít plátky připevněné k substrátu, abychom měli usnadněná pozorování a zpracování. Dalším faktorem může být celková doba kultivace, protože nepřichycené končetinové pupeny se začnou po určitém čase kroutit. Někdy je zakroucení natolik závažné, že končetina takto zakryje celý povrch. Plovoucí kultury se používají v případech, kdy je potřeba s plátkem různě hýbat, např. při časovaném nahrávání endogenních buněčných pohybů (obr. 3).

Pro přípravu embryonálních plátků je nutno splňovat jistá kritéria, aby následně byly využitelné v různých experimentech. Plátky musí v kultuře zůstat životaschopné po dobu v rozmezí několika hodin až celých dnů. Dále by si měly zachovat přirozenou morfologii, tkáňové vztahy v rámci embrya, normální vývojové procesy a v neposlední řadě molekulární charakteristiky embrya. Všechna tato kritéria jsou po určité době experimentálně splňována až 2 dny. Po uplynutí této doby začne diferenciální růst tkáně narušovat strukturu plátku a ektoderm přerůstá přes celý povrch.



Obr. 3: Schéma využití metody embryonálních plátků (přepřacováno - Hotary *et al.*, 1996)

Základní postupy pro experimenty využívají buď adherentní kultury s naočkovanými buňkami nebo plovoucí kultury, u kterých se používá značkování pro časovanou videomikroskopii (na obrázku značkováný motorický axon).

Bohužel i u této metody se potýkáme s problémem nekrózy, stejně jako u všech technik, pracujících s objemnějšími tkáňovými štěpy. Trauma po nařezání na plátky nemá příliš škodlivý efekt, poněvadž povrch není pokrytý mrtvými buňkami či jiným buněčným odpadem. Za účelem potvrzení, že plátky uvnitř nejsou nekrotické (např. kvůli hypoxii), může být proveden test živých/mrtvých buněk barvením akridinovou žlutí nebo kalcein-AM/etidium homodimerem-1. Mrtvé buňky jsou v plátcích běžné, ale pouze v obvyklých částech embrya, které vykazují buněčnou smrt přirozeně, jako jsou například časné a pozdní nekrotické zóny končetin a oblasti plexů. Většina ostatních regionů vykazuje pouze občasné a široce rozptýlené mrtvé buňky (Hotary *et al.*, 1996).

4.2.1.2.1 Adherentní kultury

Kyselinou omytá krycí sklíčka potažená kolagenem IV. -typu poskytují plátkům dobrou přilnavost. Další testované substráty (laminin, polylysin a další komerčně připravené substráty) byly buď málo přilnavé, což mělo za následek špatně napojené nebo volně plovoucí plátky, nebo umožňovaly migraci buněk pryč z plátku a vedly ke ztrátě struktury. Přichycené plátky se udržují v mediu bez séra, protože jinak by ektoderm měl sklon rychle přerůst povrch plátku a zakrýt tak vnitřní tkáň nebo buňky rozprášené na povrchu. Pokud nejsou plátky nějak poškozené, měly by pevně přilnout ke sklíčku během jedné až pár hodin a zůstat přilepené i po celou dobu fixace a značkování např. fluorescenčními barvivami (Hotary *et al.*, 1996).

4.2.1.2.2 Plovoucí (suspenní) kultury

Vytvoří se speciálně zkonstruované komůrky, kde je umožněno s plátky kdykoli lehce pohybovat. Do podložního sklíčka se vyvrtá díra, která se překryje dalším krycím sklíčkem, připojeným pomocí silikonového tmelu. Takováto komůrka pak umožňuje pozorovateli vizualizovat či zaznamenat označené buňky a probíhající procesy v živém plátku díky možnosti přidržení plátku na dně pomocí krycího sklíčka. Dlouhodobé plovoucí kultury vyžadují navíc jemné kolíbání (Hotary *et al.*, 1996).

4.2.2 Orgánové kultury a implantace štěpů

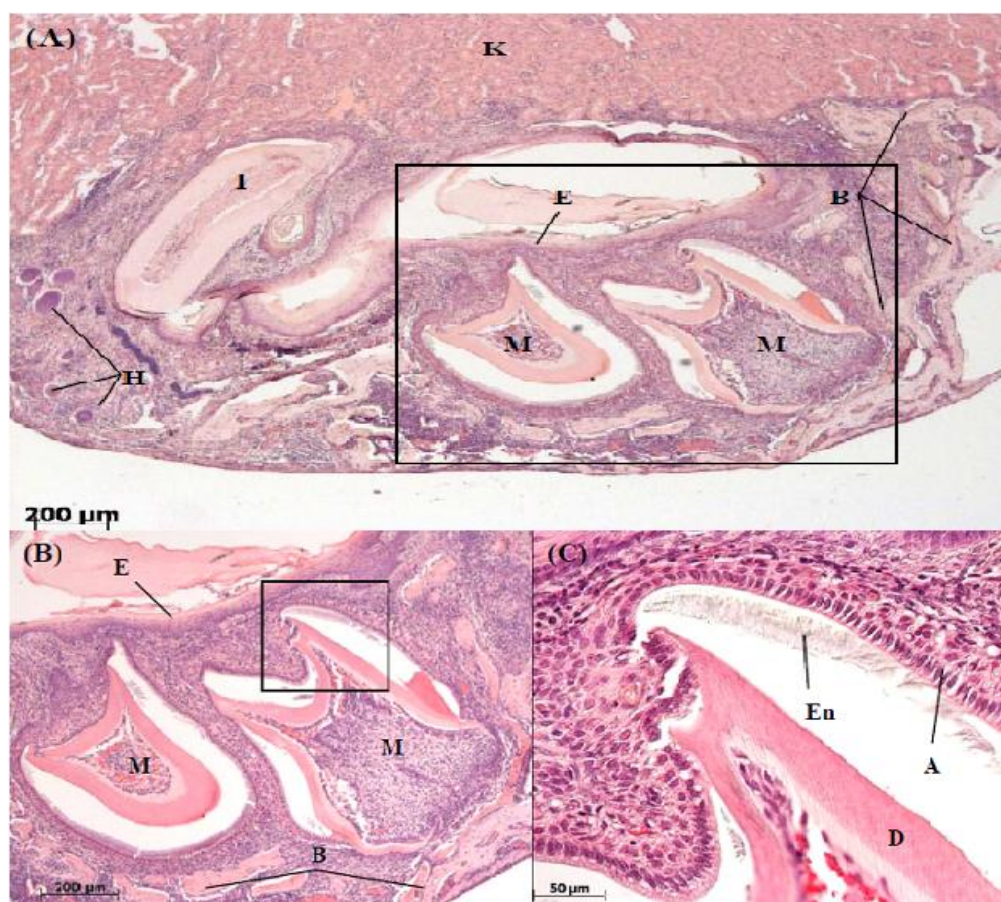
V orgánových kulturách jsou kultivovány kompletní zárodky či části orgánů. Jednotlivé buňky nejsou oddělené a mohou zde tedy působit jejich vzájemné interakce. Kultury *in vitro* mají pouze omezenou životnost z důvodu kompaktní struktury, která neumožňuje dostatečný přísun živin a kyslíku všem buňkám (Sasaki & Ikura, 1991).

4.2.2.1 Kultivace na membráně vnějšího zárodečného obalu

Jelikož se u experimentů očkování štěpů (zárodky zubů i další savčí tkáň) na různá místa v těle prokázala vaskularizace implantovaného štěpu cévami hostitelského organismu, zaměřila se Glasstone (1954) za použití techniky CAM na vaskularizaci orgánu skloviny, zejména pak u těch druhů, kde tento děj probíhá již v rané fázi vývoje zubu (přibližně 2-3 dny před vytvořením skloviny). Započaly tedy série experimentů, prováděné za stejných experimentálních podmínek. Účelem bylo studium vývoje savčích zubů, s velkým důrazem na utváření skloviny a srovnání růstu celých zubních zárodků na vnější membráně zárodečného obalu se zárodky kultivovanými v tkáňové kultuře, kvůli upřesnění důležitosti vaskularizace ve vývoji zubu. Výsledkem experimentů bylo zjištění, že při kultivaci na CAM se diferencovaly odontoblasty

i ameloblasty a zformoval se dentin i sklovina. Erytrocyty a krevní cévy z CAM pronikly pulpou i orgánem skloviny až po stratum intermedium. Vše probíhalo stejně jako za přirozeného vývoje, přičemž k vaskularizaci orgánu skloviny došlo ještě před utvořením skloviny.

I přes dosažené úspěchy metoda nedosahuje takových kvalit jako kultivace pod ledvinnou kapsulou, protože poměr přeživších štěpů je podstatně nižší. K nízkému přežívání mohou přispívat různé faktory, jako například schopnost hostitelské krve infiltrovat do štěpu (Glasstone, 1954), použité experimentální techniky, kvalita štěpů před samotným očkovaním (Slavkin & Bavetta, 1968), kolísání teploty nebo možné zavlečení infekce před, či v průběhu procedury. Velké množství tekutin nebo pohyb hostitelského mláděte uvnitř vajíčka může mít za následek posun štěpů z původní pozice (Miller, 1969).



Obr. 4: Kultivace zubního štěpu metodou RS (Marais, 2010)

Štěp půlky dolní čelisti myši E 12,5, kultivovaný 3 dny *in vitro* a následně 21 dní metodou RS u dospělé myši.

A) štěp obsahující řezák, dva moláry, kost, keratinizovaný vícevrstevný dlaždicový epitel, pojivovou tkáň a vlasové folikuly (x50)

B) zvětšený výřez z A) ukazuje detailně oba moláry (x100)

C) zvětšený výřez z B) ukazuje ameloblasty moláru, predentin a formující se sklovinu (x400)

Popisky: E - keratinizovaný vícevrstevný dlaždicový epitel, B – bone (kost), I – incisor (řezák), M – molár, H – hair follicle (vlasový folikul), K – parenchyma of kidney (ledvinový parenchym), A – ameloblasty, D – dentin, En – enamel (sklovina)

4.2.2.2 Kultivace pod renální kapsulou

Metoda kultivace pod renální kapsulou (RS) se dočkala velkého úspěchu. Nabízí totiž vhodnější prostředí pro dlouhodobější kultivace než očkování na CAM. Jednou z výhod je důležité zabránění dehydratace tkáně (Marais, 2010), protože zubní štěp aplikujeme přímo pod renální kapsulu (obr. 4) dospělé myši stejného genetického kmene (Míšek *et al.*, 2008).

Marais (2010) provedla studii s cílem zjistit, zda jsou embryonální kmenové buňky schopny diferencovat a přispívat k utváření zubu v kombinaci s embryonálním myším ektomezenchymem spodní čelisti *in vitro* a *in vivo*. Získané výsledky ukázaly, že 4 z celkových 10 štěpů přežily kultivační periodu a vyvinuly se z nich zuby. Prokázalo se, že pokud jsou zubní zárodky přeříznuty na polovinu a následně kultivovány, každá polovina dá vznik kompletnímu zubu (Glasstone, 1952). Jeden ze získaných zubů byl však menší než ostatní a pravděpodobně začal podléhat degeneraci. Vyskytl se však i případ, kdy některé mezenchymální tkáně byly odstraněny se zubním epitelem během počáteční separace tkáňových vrstev, a to mohlo mít za následek vývoj menšího zubu (Marais, 2010).

4.2.2.3 Explantátové kultury dentálních tkání

Metody explantátových kultur umožňují kultivaci mandibulárních explantátů a kultur zubních zárodků *ex vivo*. Výzkumné účely využívají nejčastěji opět myšího modelu, především díky podrobné znalosti molekulárních signálních drah uplatňujících se v průběhu vývoje zubu a dostupnému blokování genů (knock-out metoda). Kultury umožňují snadnou manipulaci bez potřeby chirurgických zásahů na živých zvířatech a splňují tedy koncept 3R (Míšek *et al.*, 2008), který se řídí principy náhrady, redukce a ohleduplnosti/replacement, reduction and refinement (Flecknell, 2002).

Explantát má zajištěn počáteční morfogenetický průběh odontogeneze stejný jako za situace *in vivo* (Míšek *et al.*, 2008), nicméně ve většině případů probíhá formace tkáně mnohem pomaleji. Glasstone (1936) při svých experimentech zaznamenala, že explantáty po 20 dnech kultivace *in vitro* neobsahovaly více dentinu, než normální zubní zárodek 4 dny po vzniku odontoblastů.

Několik autorů prokázalo, že za určitých okolností mohou odontoblasty měnit v průběhu *in vitro* kultivace svůj tvar. Po úplné diferenciaci získávají *in vivo* uspořádání a tvar kubického nebo cylindrického epitelu s podélnou osou buněk kolmou k vrstvě dentinu (Szabó, 1954). Mezi příčiny různých tvarových odlišností může patřit například deficiencie vitamínu A, kdy odontoblasty atrofují, ztrácejí polarizaci a jejich tvar se mění na vřetenovitý (Wolbach & Howe, 1933).

4.2.2.3.1 Media s embryonálním extraktem

Studie *s in vitro* kultivacemi zubních zárodků prokázaly, že růst a vývoj jsou nejrapidnější během prvních dnů kultivace (Glasstone, 1936, 1938; Lefkowitz *et al.*, 1954, 1956; Szabó, 1954). V těchto studiích obsahovaly media embryonální extrakt, který je znám svým obsahem látek stimulujících růst (Carrel, 1913). Kuřecí embryonální extrakt, dodaný pro explantáty zárodků molárů potkanů a myši, by mohl poskytovat dostatek nutričních hodnot pro 4 až 8 dnů kultivace, po jejichž uplynutí však dochází k degeneraci (obr. 5) zubní tkáně (Glasstone, 1936, 1938; Lefkowitz *et al.*, 1954). Zředěný homologní embryonální extrakt poskytuje potkaním explantátům vhodnější prostředí, ve kterém pokračuje zpomalený růst a vývoj i déle než 8 dnů (Lefkowitz *et al.*, 1954). V dalších studiích přežívání zubních explantátů pokračovalo po libovolně zvolené období. Dosažená zjištění naznačují, že v době odběru a zahájení kultivace se v orgánu vyskytuje obvykle reziduální živné medium, které dokud není spotřebované, je schopno po určitou dobu udržet růst a vývoj celého zubního zárodku.

Toto zjištění bylo pokládáno za důležité ke stanovení účinnosti embryonálního extraktu pro kultivaci. Byly porovnány výsledky kultivace v mediu bez embryonálního extraktu s podobnou dobou kultivace v mediu obsahujícím embryonální extrakt. Další studie pak byly prováděny jako vodítka ke zhodnocení přežívání, růstu a vývojového potenciálu reziduálního živného media v explantátech (Lefkowitz & Swayne, 1956).

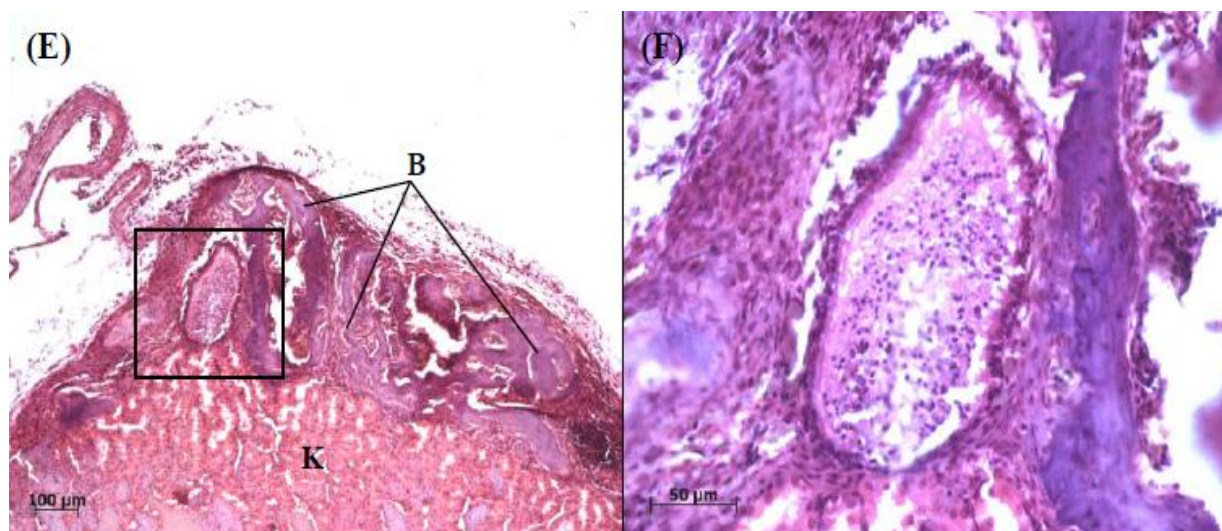
V současné době mají tyto metody jen historický význam, neboť byly velmi pracné a získání buněčných kolonií bylo nepatrné. Jsou nahrazeny kultivací buněk ve větších kultivačních nádobkách v plně syntetickém mediu, tedy v mediu o známém složení (<http://www.skriptar.cz/skripta-embryologie-histologie/14>).

4.2.2.3.2 Hanging-drop kultury

Jedná se o techniku původně vyvinutou pro mikrobiologické účely. Zajišťuje růst tkáně bez omezení plochy roviny a minimalizuje povrch celého vzorku, čímž je zpomalena evaporace. Klasická hanging-drop kultura je malá kapka kapaliny, visící z převráceného sklíčka, tvořená plazmou nebo jiným mediem umožňujícím růst tkáně. Poskytuje lepší podmínky než při nátěru vzorku na kultivační nádobu (menší gravitace a povrchové napětí) a lze pak lépe pozorovat tkáň i jednotlivé buňky ve 3D a bez deformace.

Metoda se rozšířila především do embryologie a dalších vědních oborů, začala být využívána pro *in vitro* kultivaci kultur nervových tkání nebo mločích a ptačích embryí (Navis, 2007). Pro kultivaci zubních štěpů tuto techniku použil Szabó (1954), konkrétně ji aplikoval pro analýzu buněčného složení se zaměřením na odontoblasty a buňky orgánu skloviny. Buňky sice

bývají často pozměněné během podmínek volného růstu, nicméně si jsou schopny zachovat charakteristické tvarové odlišnosti, zvyk růstu a vzájemné buněčné interakce *in vitro*.



Obr. 5: Degenerace tkáně (Marais, 2010)

Štěp ES + JM (embryonic stem cells + embryonic oral ectomesenchyme of the lower jaw) - jedná se o kombinaci embryonálních kmenových buněk s E 12,5 embryonálním ústním ektomezenchymem dolní čelisti. Kultivace 3 dny *in vitro* a následně 21 dní pod renální kapsulou myši.

E) štěp obsahuje kost, pojivovou tkáň a vyvíjející se zub, který vykazuje tvorbu predentinu (x100)

F) zvětšený výřez z E) ukazuje buněčnou degeneraci v zubních vrstvách

Popisky: B – bone (kost), K – parenchyma of kidney (ledvinový parenchym)

5 Problémy spojené s kultivací větších tkáňových štěpů a jejich řešení

Mezi nejzávažnější problémy spojené s tkáňovým inženýrstvím patří zásobení živinami a odstraňování odpadů, které jsou ve většině tkáňových kultur odkázány pouze na prostou difuzi (Li *et al.*, 2008). Prostou difuzí však nelze dosáhnout dostatečné výživy buněk, které jsou vzdálenější od povrchu tkáně, a to zvláště u objemnější tkáňových štěpů. Například kyslík ve tkáních difunduje pouze do vzdálenosti kolem 0,1 mm. Difuze do této vzdálenosti přitom probíhá v řádech sekund. Vztah vzdálenosti a doby nutné k difuzi nízkomolekulární neutrálně nabitě látky popisuje tab. 2.

Vzdálenost difuze	Doba nutná k difuzi
1 μm	0,5 ms
10 μm	50,0 ms
100 μm	5,0 s
1000 μm (1 mm)	8,3 min
10 000 μm (1 cm)	14,0 hod

Tab. 2: Vztah vzdálenosti a doby nutné k difuzi nízkomolekulární neutrálně nabitě látky uvnitř tkáně (Míšek 2010, ústní sdělení)

U objemných tkání (v našem případě zubních zárodků) kultivovaných za účelem klinických aplikací se nemůžeme na samotnou difuzi spoléhat. Právě zásobení tkáně je tedy největší komplikací, protože pokud není přísun živin dostatečný, nemohou buňky hlouběji uvnitř struktury normálně proliferovat nebo se dále diferencovat a dochází k jejich odumírání, což je možno pozorovat v nádorových sféroidech (Freyer & Sutherland, 1986). Buňky na povrchu štěpu lépe přežívají, produkují a akumulují extracelulární matrix snadněji než buňky hlubších vrstev, což může vést ke zhoršování poškození. Zvýšení hustoty matrix blízko povrchu tkáně totiž dále více znesnadňuje difuzi. Pěstovaná tkáň pak často bývá heterogenní s vysokou hustotou buněk při povrchu a naopak velmi malou hustotou v centru tkáně, kde mohou buňky i úplně chybět (Martin *et al.*, 2004). Jedná se o společný problém všech objemnějších tkání, které postrádají vaskulární síť. V těchto případech je žádoucí nedestruktivní metoda - umožňující rovnoměrnou distribuci živného media do celého objemu tkáně a monitorování změn metabolismu buněk, zajištění životaschopnosti buněk nebo lokální utváření struktury tkáně (Li *et al.*, 2008).

Proces pěstování tkání a orgánů pro lékařské účely je časově náročný a trvá týdny až měsíce než je dokončen (Seidel *et al.*, 2004; Freyria *et al.*, 2004; Seguin *et al.*, 2004). Monitorování stavu buněk a tkáně po celou dobu pěstování je nezbytné a provádí se nejlépe

online za pomoci nedestruktivní metody. Až na pár výjimek, jako je např. magnetická resonance - tzn. NMR nebo MRI (Lohmeier-Vogel *et al.*, 1989; Dijkema *et al.*, 1988; Potter *et al.*, 2000) či mikro-CT (Boyd *et al.*, 2006), jsou současné možnosti hodnocení průběhu kultivace tkání z velké části založeny na destruktivních biochemických nebo histologických metodách. Tyto metody sice poskytují kvalitní hodnocení finálního produktu, ovšem neumožňují monitorování probíhajících procesů během kultivace a vedou k destrukci tkáně. Nicméně i některé nedestruktivní metody s sebou nesou nevýhody – MRI a mikro-CT jsou příliš drahé pro rutinní užívání. Analýza metabolických produktů může poskytnout pouze údaje o buněčné aktivitě v rámci celého vzorku, což neumožňuje posoudit buněčné odpovědi na lokální změny životního prostředí či odhalit případnou nejednotnost v utváření tkáně, způsobenou například omezením přístupu živin a kyslíku (Martin *et al.*, 2004).

Zde se nabízí možnost využití alternativní metody online monitorování, využívající princip mikrodialýzy, která je schopna určit lokální produkci metabolitů a tkáňové komponenty v extracelulární tekutině. Metoda je miniinvasivní, nedestruktivní a neměla by nijak zasahovat do přirozené formace tkáně (Li *et al.*, 2008).

5.1 Mikrodialýza

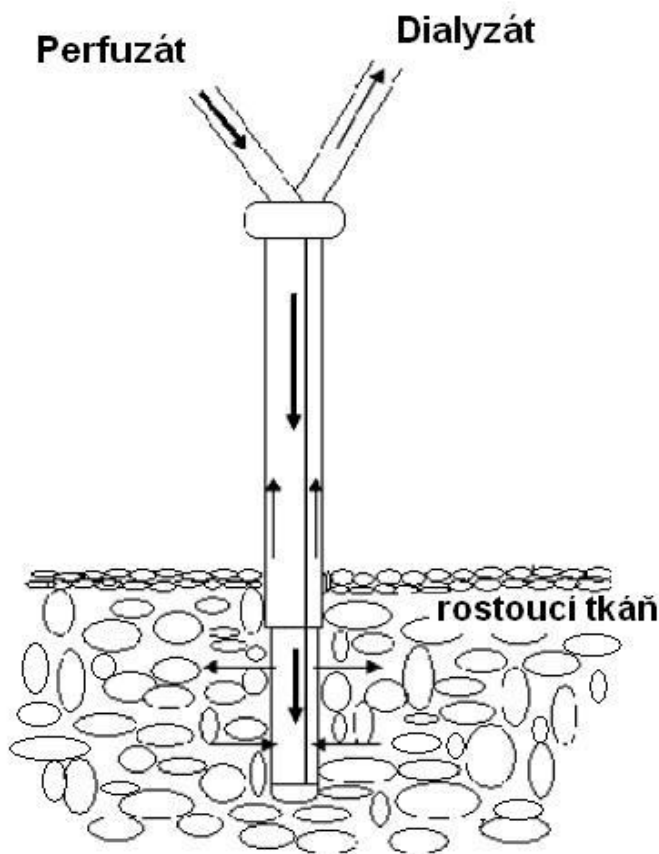
Monitorování stavu buněk a utváření tkáně v tří-dimensionální kultivované tkáni je velmi důležité pro dosažení úspěchu v rámci rozvoje tkáňového inženýrství. Za tímto účelem se využívá metoda mikrodialýzy. Umožňuje nepřetržité monitorování lokálního extracelulárního prostředí, buněčného metabolismu, funkce buněk a formování tkáně (Li *et al.*, 2008), což můžeme velice dobře uplatňovat právě při kultivacích tkáňových explantátů (Li *et al.*, 2006).

Počátky mikrodialýzy sahají přibližně 40 let zpět. Když profesor Ungerstedt v 60. letech 20. století zkoumal možnosti vyšetření funkce centrálního nervového systému, získal díky technologickým pokrokům dutá vlákna. Ta měla původně sloužit k vyšetřování hladin neurotransmiterů (např. dopaminu) a účelem bylo napodobit princip kapiláry ve tkáni tak, aby bylo možno získávat metabolity z extracelulárních prostor a následně je vyhodnocovat (Stahl *et al.*, 2001).

5.1.1 Princip mikrodialýzy

Současné možnosti mikrodialýzy jsou široké, hlavní využití však nachází v oblasti experimentální. Principem této metody je implantace katétru do kultivované tkáně (obr. 6). Do katétru je vháněna vnitřním lumenem tekutina na bázi Ringerova roztoku a vnějším lumenem je následně odváděna (Hejčl & Sameš, 2009). Dochází k perfuzi fyziologického roztoku (perfuzátu)

z katétru umístěného ve tkáni, který je tvořen semipermeabilní membránou z dutého vlákna. Molekuly z okolí katétru difundují skrze membránu po koncentračním gradientu. Roztok opouštějící katétr (dialyzát) obsahuje molekuly zájmu a může být shromažďován pro případnou analýzu. Velikost molekul difundujících skrze semipermeabilní membránu závisí na velikosti pórů (Li *et al.*, 2008).



Obr. 6: Princip mikrodialýzy (přepřacováno - Li *et al.*, 2008)

Roztok je vháněn pomocí perfuzních pump, které pumpují standardní rychlostí 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Katétrů napodobují kapiláry ve tkáních, dochází k difuzi metabolitů a dalších látek z extracelulárního prostředí. Odváděný roztok se dostává do krytu s jehlou, přičemž do krytů jsou aplikovány kónické mikroampulky, které se průběžně mění (podle rychlosti průtoku, standardně jednou za hodinu). Tekutinu z mikroampulek je možno následně vyšetřit v analyzátoru, laboratorně se nejčastěji využívají CMA 600 nebo novější přenosný ISCUS flex (Hejčl & Sameš, 2009).

5.1.2 Mikrodialyzační katétrů

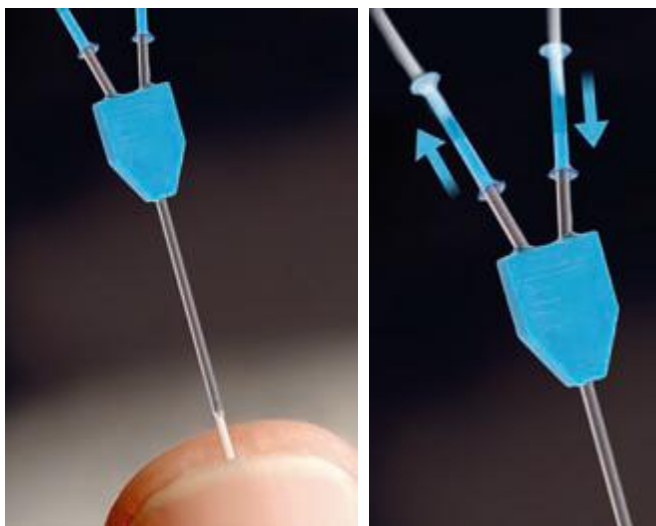
Výběr mikrodialyzačního katétru (obr. 7) a velikosti membránových pórů využívaných *in vitro* a *in vivo* závisí na charakteru molekul, které chceme pomocí této metody získat.

Molekuly menší než membránové póry mohou difundovat do vnitřního lumen, odkud jsou kontinuálně proudící tekutinou přenášeny do výstupní nádoby. Větší molekuly jsou membránovými póry odmítnuty. Proto je velikost membránových pórů kritickým faktorem pro selekci katétrů s membránami bez náboje. Teoreticky je MWCO mikrodialyzační membrány třikrát větší než molekulová hmotnost cílové molekuly dostatečné k šíření přes dialyzační membránu (Torto *et al.*, 1998).

Většina používaných katétrů má membrány s tzv. hodnotou cut-off (MWCO) kolem 20 kDa, vylučuje se vstup metabolitů s vyšší molekulární hmotností a zjednodušuje se tak následná analýza (Jones *et al.*, 2000; Henriksson, 1999; de la Peña *et al.*, 2000). Nicméně spousta biomolekul je větších, a proto se začaly využívat i další druhy katétrů s hodnotou 100 až 3000 kDa MWCO, hlavně pro svaly, šlachy, tukové a dermální tkáně (Li *et al.*, 2008).

Využití katérových membrán je přímo úměrné jejich délce a průměru (ploše membrány). Typické, komerčně dostupné katetry, jsou dlouhé 1-30 mm a vnější průměr se pohybuje v rozmezí 0,2-0,5 mm. Krom jiného by měly mít nízký difuzní odpor pro zajištění celkového koeficientu přenosu hmoty (Torto *et al.*, 2001). Důležitý je také materiál, ze kterého je katétr vyroben. Podle různých možností využití jsou dostupné membrány s odlišnými povrchovými vlastnostmi, jako je elektrostatický náboj a hydrofilicita. Právě povrchový náboj může nabývat větší důležitosti při určení, který protein projde membránou, než velikost membránových pórů. Při řešení systémů s nízkou iontovou silou je tato vlastnost zvláště důležitá (Wan *et al.*, 2005). Výběr takovýchto membrán z dutých vláken různých materiálů (polysulfon, polyamid, polykarbonát-polyéter kopolymer nebo polyétersulfon), odlišných povrchových morfolgií a velikostí pórů je veliký a komerčně dostupný (Li *et al.*, 2008).

Dialyzační vlastnosti membrán jsou běžně brány jako relativní, vzhledem k využití v konkrétním roztoku, a vyjadřují se jako procento roztoku/látek difundovaných z okolí katétru do perfuzátu. Koncentrace rozpuštěných látek v dialyzátu se rovná koncentraci látek v okolí v případě, že se průtok perfuzátu rovná 0. Jinak řečeno, koncentrace látek v dialyzátu bude vždy nižší než koncentrace mimo katétr (Jacobson *et al.*, 1985).



Obr. 7: Mikrodialyzační katétr distribuovaný firmou CMA Microdialysis AB v roce 2009

5.1.3 Zanášení katéetrových membrán

Používání membrán ve složitých systémech s sebou nese i jisté nevýhody. Nejzávažnější je zanášení membrán, které bývá spojováno s proteiny (Torto *et al.*, 1998). Stupeň znečištění, vyskytující se v *in vitro* a *in vivo* aplikacích se může lišit.

Boubriak *et al.* (2006) demonstrovali *in situ* monitorování membránového znečištění během kultivace tkáňové kultury, prostřednictvím sledování změn koncentrací fenolové červeně (PhR) v dialyzátu. PhR je vhodným kandidátem, protože se běžně vyskytuje v kultivačních mediích v konstantních koncentracích jakožto indikátor pH a v průběhu experimentu není spotřebováván buňkami. Může být tedy vhodně využita pro zhodnocení výskytu a rozsahu znečištění membrány.

Krom PhR lze využít k tomuto účelu také například radioaktivně značenou methylglukózu a fluorescenčně značené dextransy (Li *et al.*, 2008).

5.1.4 Pumpovací metody

Perfuze z mikrodialyzačního katétru může být dosaženo pomocí tří odlišných metod: push, pull nebo push-and-pull. Normálně se pumpa používá ke kontinuálnímu podávání perfuzátu katétre, přičemž se jedná o metodu push. Během práce tlačící pumpy je hydrodynamický tlak v katétru vyšší než tlak atmosférický a tlak v prostředí tkáně. Alternativou pro udržování průtoku je připojení pumpy k výstupu katétru, pak se jedná o metodu pull. V tomto případě je tedy hydrodynamický tlak v katétru nižší než tlak v prostředí. Oba případy jsou však nežádoucí a je třeba se jim vyhnout, protože jinak dochází ke ztrátám tekutiny z katétru nebo naopak k přílišnému nasávání dovnitř (Li *et al.*, 2008).

I přesto, že lze ztráty či nasávání minimalizovat zvýšením/snížením osmotického tlaku perfuzátu, je velice obtížné eliminovat tento problém úplně. Jedinou cestou, jak vyřešit tyto nedostatky, je využití dvou pump - metoda push-and-pull. Tekutina je zároveň pumpována dovnitř a vysávána ven ve stejném množství (Sjögren *et al.*, 2002).

6 Regenerace a tkáňové inženýrství zubních tkání

Zubní lékařství již běžně využívá možností transplantace zubů a zubních implantátů pro léčbu různých onemocnění zubů či pro obnovu ztracené zubní tkáně v důsledku traumatu nebo nezaložení zubního zárodku, nicméně ve výsledku stále nejsou tyto metody zcela uspokojivé.

Největší naděje jsou v posledních letech vkládány do tkáňového inženýrství. Výzkumy ukazují, že za pomoci kmenových buněk bude v blízké budoucnosti umožněna regenerace tvrdých i měkkých zubních tkání, čímž získáme možnost plnohodnotně nahradit celý ztracený zub (Míšek *et al.*, 2008).

6.1 Kmenové buňky

Jedná se o buňky, které můžeme definovat jako primitivní a nesespecializované – nemají charakteristiky žádné konkrétní tkáně. Vynikají svou proliferační aktivitou, přičemž se mohou neomezeně dělit a samoobnovovat. Nejdůležitější vlastností je schopnost transformace a následné diferenciaci v jakoukoli buňku dospělého organismu (Čížková, 2008).

6.1.1 Embryonální kmenové buňky (ESC)

U vyvíjejícího se embrya tyto buňky vyplňují blastocystu a jsou pluripotentní – schopné diferencovat se v téměř všechny typy tkání daného organismu. Dávají vznik buňkám všech tří zárodečných listů (endoderm, mezoderm a ektoderm), ale už nemají tak jako totipotentní blastomery schopnost vytvořit embryo a placentární tkáň. Z embryonálních kmenových buněk se během vývoje dále tvoří buňky multipotentní, již tkáňově specifické (Čížková, 2008).

6.1.2 Mezenchymové kmenové buňky (MPC)

Multipotentní mezenchymové kmenové buňky, někdy také nazývané mezenchymální progenitorové buňky (Minguell *et al.*, 2001), jsou spolu s buňkami hematopoetickými umístěny v kostní dřeni dospělého jedince. Získaly si pozornost díky přispívání k reparaci zejména pojivových tkání jako je kost, chrupavka a stroma kostní dřene (Rosocha *et al.*, 2008). Byla prokázána jejich diferenciaci *in vitro* i *in vivo* do mnoha dalších mezenchymálních tkání, ať už se jedná o šlachy, svaly či tukové tkáně (Majumdar, 1998). Dále byly MPC či jim podobné MPC-like buňky identifikovány v periodontálním ligamentu (Seo *et al.*, 2004), zubní pulpě stálých i dočasných zubů (Gronthos *et al.*, 2000) a mnoha dalších, proto jejich výskyt můžeme předpokládat ve většině tkání a orgánů. Díky snadné izolaci, kultivaci a vysokému potenciálu *ex vivo* expanze představují MPC atraktivní léčebný nástroj (Minguell *et al.*, 2001).

6.1.3 Zubní kmenové buňky

Poznatek, že i zuby obsahují kmenové buňky, byl založen na všeobecně známé reparační schopnosti dentinu, který je tvořen odontoblasty i po dokončení vývoje zubu. Izolace dentálních kmenových buněk byla umožněna na základě anatomického umístění, schopnosti tvořit kolonie, exprese markerů odpovídajících kmenovým buňkám a regenerace pulpy a dentinu *in vivo* (Sharpe & Yen, 2008). V případě dospělého člověka se podařilo tyto buňky izolovat především ze zubní dřeně, periapikálního vaku a periodontálního aparátu, popřípadě je lze získat i z kostní dřeně čelisti obklopující zuby (Jo *et al.*, 2007). Významným se stal i jejich průkaz u již vypadlých dočasných zubů (Miura *et al.* 2003). Buňky všech zmíněných oblastí pocházejí ze stejné linie buněk odvozených z neurální lišty a mají obecné vlastnosti stejné s MPC-like, včetně exprese genových markerů a diferenciací v mezenchymální tkáni *in vitro*, do jisté míry i *in vivo* (Sharpe *et al.*, 2010).

Dentální kmenové buňky si získaly v poslední době zvýšenou pozornost a výzkumy se zaměřují na jejich potenciál jakožto zdroje pro regeneraci a opravy zubů. Další pokusy s MPC a ESC demonstrovaly možnost tvorby zubů z nedentálních kmenových buněk napodobením mechanismu embryonálního vývoje. Ačkoliv se dentální tkáňové inženýrství, stejně jako tkáňové inženýrství jiných orgánů založené na kmenových buňkách, stále ještě potýká s mnohými problémy, zdá se být do budoucna adekvátním řešením zubních náhrad (Sharpe & Yen, 2008).

Kmenové buňky pro explantátovou kulturu získáme po odstranění epitelální a mezenchymální části zubního zárodku. Ty jsou následně překryty embryonálním epitelem, umístěny do kultury a několik dní kultivovány. Pár dní starý vykultivovaný systém se přenesou pod renální kapsuli. Díky této metodě nakonec můžeme získat plně mineralizovaný zub, klasického tvaru (Míšek *et al.*, 2008).

6.1.3.1 Kmenové buňky zubní pulpy (DPSC)

Vůbec poprvé byla možnost, že dentální pulpa obsahuje MPC, navržena během pozorování omezených samovolných oprav stimulovaných po těžkých poškozeních zubu, která penetrovala skrze sklovinu i dentin až do dřeně. Reparace obnášely tvorbu nových odontoblastů, které následně produkovaly nový dentin na opravu poškození (Smith & Lesot, 2001). Bylo tedy zřejmé, že populace odontoblastů musí být neustále udržována prekurzorovými buňkami z tkáně dentální pulpy. Během pokusů se izolovaly klonogenní, rychle proliferující buňky dentální pulpy třetích molárů dospělého jedince a následně se transplantovaly myším s cíleně sníženou imunitou. Ve výsledku docházelo k vytváření dentinové struktury, lemované lidskými,

odontoblastům podobnými buňkami, které obklopovala intersticiální tkáň připomínající dřev. Tímto způsobem se prokázala schopnost lidských DPSC tvořit dentino-pulpární komplex (Gronthos *et al.*, 2000).

6.1.3.2 Kmenové buňky exfoliovaných zubů (SHED)

U vypadlých dočasných zubů se podařilo izolovat kmenové buňky ze zbytků pulpy. Tyto buňky se však mírně odlišují od ostatních, mnohými znaky se připodobňují spíše kmenovým buňkám pupečnickové krve a poskytují tak snadno přístupný zdroj dostatečného počtu buněk pro využití v klinické praxi. SHED prokazují vysoký terapeutický potenciál, jsou ideálním zdrojem pro reparace dentálních tkání (Miura *et al.*, 2003), na rozdíl od DPSC jsou SHED schopny za podmínek *in vitro* diferencovat i v nedentální tkáň mezenchymálního původu a vykazují mnohem větší intenzitu proliferace (Sharpe *et al.*, 2010). Dále mohou indukovat tvorbu kosti a podle jejich schopnosti přežít v mozku myši s expresí neurálních znaků, budou pravděpodobně využitelné i pro reparace nervových tkání (Miura *et al.*, 2003). Výsledky jedné ze studií dokonce naznačují možnost využití SHED jako zdroje postnatálních kmenových buněk pro léčbu Parkinsonovy choroby (Sharpe *et al.*, 2010).

6.1.3.3 Kmenové buňky periodontálního ligamentu (PDLSC)

Periodontální ligamentum je vláknitá pojivová tkáň. Mezi cementem a vnitřní stěnou jamky alveolární kosti se nacházejí specializované buňky působící při žvýkání jako ‚tlumiče‘ (Sharpe *et al.*, 2010).

U zdravých zubů byly PDLSC nejhojněji prokázány v částech periodontia s cévami, v extravaskulárních oblastech je jejich výskyt méně obvyklý, avšak v oblasti koronální, apikální a furkace byly také zaznamenány. Při onemocněních periodontia pak dochází k zvýšení počtu kmenových buněk právě v extravaskulárních oblastech i v okolí cementu, což je zapříčiněno doplňováním a migrací buněk do místa poškození z paravaskulárních oblastí (Chen *et al.*, 2006).

Jedná se o kmenové buňky, které lze získat miniinvazivními metodami, následně namnožit *in vitro* a dále využívat nejen pro dentální účely. Projevily potenciál diferenciací v buňky osteogenní, adipogenní či chondrogenní a předmětem bádání je v současné době jejich budoucí využití pro vytvoření periodontálních vláken zubních implantátů (Gay *et al.*, 2007).

6.1.3.4 Kmenové buňky periapikálního vaku (SCAP)

Populace buněk je lokalizována na špičce zubních kořenů, u kterých ještě nebyl dokončen vývoj a růst. Tkáň apikální papily je přítomna pouze během vývoje kořenů, tedy jen v době před

erupcí zubu do dutiny ústní (Huang *et al.*, 2008). SCAP se izolují z dlouhodobě se vyvíjejících kořenů třetích molárů a do budoucna se jeví jako nejvhodnější zdroj pro regeneraci tkání zubního kořene, zejména pak cementu, dentinu nebo periodontálních vláken (Jo *et al.*, 2007). Jsou schopny diferenciací v odontoblasty a adipocyty, navíc stejně jako SHED projevují *in vitro* větší intenzitu proliferace než DPSC. Při experimentálních transplantacích SCAP společně s populací PDLSC do zubní jamky modelového organismu se tvořil dentin a periodontální ligamentum, což poukazuje na možnost tyto dvě populace kmenových buněk společně využít k formaci biologického kořene, který by se dal (po uzavření pomocí umělé korunky) použít podobným způsobem jako kovový implantát (Sharpe *et al.*, 2010).

Vzhledem k postradatelnosti třetích molárů stoupá jejich potenciál, jakožto zdroje progenitorových buněk pro mineralizované tkáně. Po extrakci a následné kryokonzervaci by mohly být hojně využívány pro autogenní i alogenní buněčné terapie (Lindroos *et al.*, 2008).

6.2 Tvorba zubů *de novo*

Náhrada ztracených nebo poškozených zubů se v současné době uskutečňuje skrze využití stálých či odnímatelných protéz a zubních implantátů, přičemž zájem o implantáty stále narůstá. Aplikace implantátu zahrnuje vyvrtání otvoru v čelisti, do nějž se našroubuje titanový násadec, který se následně zakryje pomocí plastové nebo keramické ‚zubní‘ korunky. Všeobecně fungují implantáty poměrně dobře. Zvláště, když je pro našroubování dostatek kosti. Komplikace a nezdary však přicházejí v případě, že je ztráta zubu doprovázená i úbytkem kostní hmoty. Řešením by bylo vytvoření biologického zubu *in vitro* přesně na míru a jeho následná transplantace pacientovi.

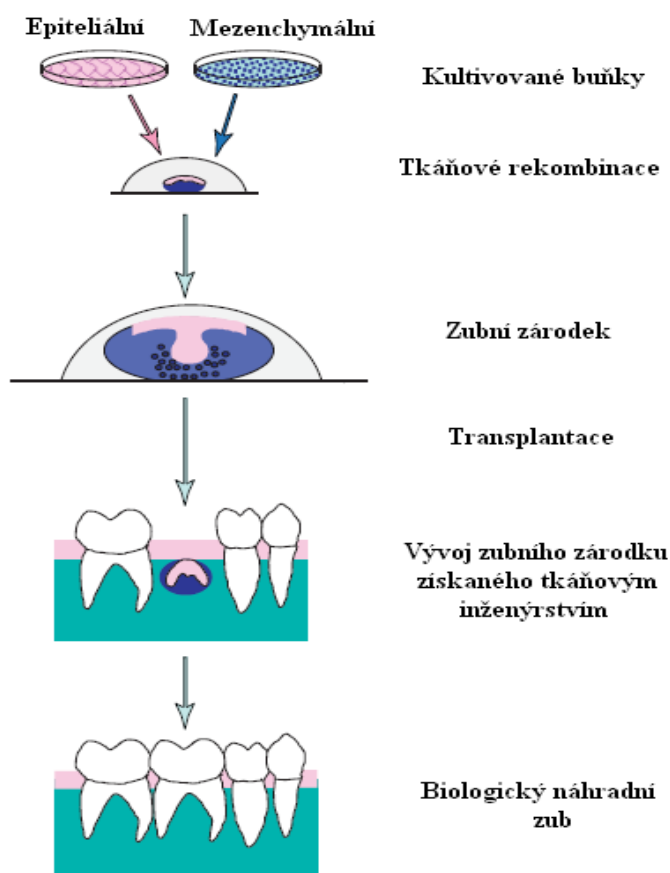
U zubu, jakožto orgánu, se setkáváme s nevýhodou – zuby jsou různých typů a tvarů, přičemž i stejné typy se vzájemně tvarově odlišují. Proto je třeba při tvorbě náhradních biologických zubů věnovat pozornost také regulaci tvaru zubu pro příslušný zubní kvadrant (Sartaj & Sharpe, 2006).

6.2.1 Využití tkáňových skeletů

Experimenty se zabývají dvěma základními způsoby, jak takový biologický zub *de novo* připravit. První z nejvýznamnějších přístupů pro výstavbu nových tkání využívá biologicky odbouratelné skelety/lešení (Sartaj & Sharpe, 2006), velice známým příkladem užití této techniky je experiment vědců Cao *et al.* (1997), kteří pěstovali lidské ucho na zádech myši.

Principem je nasazení disociovaných epiteliálních a mezenchymálních buněk zubního zárodka na předem navržené lešení. Buňky si ponechávají odontogenní charakter a následně

spolu interagují, čímž iniciují tvorbu nového zárodku (obr. 8). Lešení pak během růstu může udávat orgánu tvar, v případě zubu se tomu však zatím nedaří (Sharpe *et al.*, 2010). Pro formaci zubu tuto metodu poprvé vyzkoušel Young *et al.* (2002). Vytvořili několik lešení (polymerový skelet, strukturou především z kyseliny polyglykolové) podle různých typů zubů, která zaočkovali buňkami z raných zárodků třetích molárů prasat a potkanů. Posázená lešení implantovali na omentum potkanům s oslabenou imunitou a po 20-30 týdnech *in vivo* kultivace pozorovali zformované, malé (1-2mm) zubní korunky. Nicméně technika má nedostatky - získáváme pouze drobné zuby, které si nezachovávají tvar podle lešení a nedochází k žádné formaci kosti, do které by zub mohl zapustit své kořeny (Sartaj & Sharpe, 2006).



Obr. 8: Schématické znázornění tvorby biologického náhradního zubu (přepřacováno - Sharpe *et al.*, 2010)

Epiteliální a mezenchymální kmenové buňky expandují a vytvářejí tak dostatečné množství buněk. Díky přímému kontaktu obou populací dochází k jejich kombinacím a napodobují *in vivo* uspořádání. Vytváří se zárodek, odpovídající zubnímu pupenu či pohárku, kolem kterého kondenzuje mezenchym (tmavě modré tečky). Takový zárodek již může být transplantován do úst a ponechán samostatnému vývoji.

Technicky obtížnější, ale poměrně přitažlivou alternativou, nabízející dobrou kontrolu konstrukce, je individuální příprava důležitých částí zubu. Buňky stroma kostní dřeně (BMSC) a hydroxyapatit/fosforečnan vápenatý (HA/TCP) můžeme využít jako lešení pro vývoj alveolární

kosti, dále pomocí buněk zubní dřevě s HA/TCP ve tvarované formě korunky lze vybudovat tvrdé zubní tkáň a pulpu. Periodontální ligamentum upevňující zub v kosti získáme kultivací z PDLSC (Robey, 2005).

6.2.2 Navození přirozeného vývoje

Principem druhého přístupu je zopakování přirozeného procesu embryonálního vývoje zubu, založené na recipročních interakcích mezi epitelem a mezenchymem. Po vytvoření mezenchymu *in vitro* z nedentálních buněčných populací (agregace ESC, nervových kmenových buněk a buněk kostní dřevě) a přidání embryonálního orálního epitelu, vyvoláme v mezenchymu odontogenní reakci. Celek se transplantuje, kultivuje 10-14 dní metodou RS u dospělé myši a dává vznik zubu, kosti i měkkým tkáním. Tento přístup prokázal, že odontogenní procesy mohou být iniciovány i v různých buňkách nedentálního původu, ať už se jedná čistě o populace kmenových buněk či smíšenou populaci adultních buněk. Pro tkáňové inženýrství je zjištěná schopnost smíšených dospělých buněk vytvářet kostní a dentální tkáň významným pokrokem, protože se do budoucna možná nebude nemuset spoléhat pouze na kultury čistých kmenových buněk (Ohazama *et al.*, 2004).

Další možností by mohlo být vyvolání růstu nových zubů pomocí molekul účastnících se indukce během embryonálního vývoje nebo při výměně dočasného chrupu za stálý. Pozornost přitahuje například mutace genu *RUNX2*, která způsobuje kleidokraniální dysplazii, díky níž mají pacienti třetí sadu zubů (Otto *et al.*, 1997). Nicméně využití aktivace genů s sebou nese rizika nežádoucího vlivu i na další buněčné procesy a problémem zůstává také nepřítomnost buněk, ze kterých se zub vyvíjí, takže indukční molekuly nemají cíl působení (Sartaj & Sharpe, 2006).

7 Závěr

Dokonalé pochopení veškerých procesů týkajících se odontogeneze, od prvních interakcí mezi epitelem a mezenchymem až po erupci hotového zubu do ústní dutiny, je nezbytné pro reprodukci těchto dějů na dentálních tkáních i v podmínkách *in vitro*. Protože je zub (především třetí moláry) relativně postradatelný a jeho excize nijak neohrožuje pacientův život ani zdraví, představuje ideální model pro testování metod reprodukce či regenerace pomocí kmenových buněk i u specializovaných orgánových struktur v tkáňovém inženýrství. U zubů se tedy veškeré zákroky provádějí na zdravých jedincích (bez nutnosti imunosupresivní léčby) a v případě, že se s transplantátem něco stane, není problém jej nahradit bez ohrožení pacienta na životě. Získané poznatky by se následně daly aplikovat i na esenciální orgány a jejich transplantace, které by jinak nebylo možno plně uskutečnit.

Dalším mezníkem je vyvinutí dokonalých mikroperfuzních soustav, které budou orgánu rostoucímu *in vitro* nahrazovat vaskulární síť a zajišťovat výživu i odvod odpadních látek všem buňkám celého systému až do doby, kdy bude připraven k transplantaci do živého organismu. Za tímto účelem se v současné době experimentálně využívají soustavy založené na principu mikrodialýzy. Podle posledních studií se jedná o techniku plně vyhovující pro všechny potřebné děje a navíc poskytující nepřetržité monitorování lokálního mikroprostředí.

Tvorba zubů i ostatních orgánů *de novo* za pomoci kmenových buněk, s použitím znalostí o vývojových procesech a jejich molekulární podstatě, se zdá být skrze vhodnou metodiku tkáňového inženýrství velmi nadějnou terapií nejen v zubním lékařství. Jedná se o výzkum velice perspektivní a podle nejnovějších experimentů jde dokonce o terapii opravdu reálnou, poněvadž v případě myšího modelu se již povedlo získat plně vyvinuté zuby. K funkčním aplikacím v klinické praxi však ještě zbývá nutnost objasnění dalších významných mezníků v oblasti regenerativní medicíny.

Použité zkratky

BMSC (bone marrow stromal cells) - buňky stroma kostní dřeně

CAM (chorio-allantoic membrane) – membrána vnějšího zárodečného obalu

DPSC (dental pulp stem cells) - kmenové buňky zubní pulpy

E (embryonic day) – den embryonálního vývoje

ESC (embryonic stem cells) – embryonální kmenové buňky

HA/TCP (hydroxyapatite/tricalcium phosphate) - hydroxyapatit/fosforečnan vápenatý

mikro-CT (microtomography) – mikrotomografie

MPC (mesenchymal progenitor cells) - mezenchymové kmenové/progenitorové buňky

MRI (magnetic resonance imaging) – magnetická resonance

MWCO (molecular weight cut-off) – molekulární hmotnost molekul pro difuzi skrze membránu mikrodialyzačního katétru

NMR (Nuclear magnetic resonance) – spektroskopie nukleární magnetické resonance

PDLSC (periodontal ligament stem cells) kmenové buňky periodontálního ligamentu

PhR (phenol red) – fenolová červeň

RS (renal subcapsular grafting) - očkování pod renální kapsulu

SCAP (stem cells from the apical papilla) - kmenové buňky periapikálního vaku

SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth) – kmenové buňky dočasných exfoliovaných zubů

Literatura

- **Barker, C.F., Billingham, R.E.** 1977. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 25: 1-54.
- **Boubriak, O.A., Urban, J.P.G., Cui, Z.F.** 2006. Monitoring of lactate and glucose in tissue engineered constructs by microdialysis. *J Memb Sci.* 273: 77-83.
- **Boyd, S.K., Davison, P., Müller, R., Gasser, J.A.** 2006. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by *in vivo* micro-computed tomography. *Bone.* 39: 854-862.
- **Cao, Y., Vacanti, J.P., Paige, K.T., Upton, J., Vacanti, C.A.** 1997. Transplantation of chondrocytes utilising a polymer-cell construct to produce tissue engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 100: 297-302.
- **Carrel, A.** 1913. Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissue. *J Exper Med.* 17: 14.
- **Čížková, D.** 2008. Stem cells and their application for nervous tissue repair, pp. 17-51. In: Ostró, A. and Lešník, F. (eds). *Biologické aspekty regenerační medicíny.* Nakladatelství Olomouc, 228 pp.
- **Dijkema, C., de Vries, S.C., Booij, H., Schaafsma, T.J., van Kammen, A.** 1988. Substrate utilization by suspension cultures and somatic embryos of *Daucus carota* L measured by ¹³C NMR. *Plant Physiol.* 88: 1332-1337.
- **Fell, H.B.** 1932. The osteogenic capacity *in vitro* of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. *J Anat.* 66: 157-180.
- **Flecknell, P.** 2002. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 19(2): 73-78.
- **Fleischmajer, R.** 1967. Epithelial-mesenchymal interactions. *Science.* 157: 1472-1482.
- **Fleming, H. S.** 1952. Homologous and heterologous intra-ocular growth of transplanted tooth germs. *J Dent Res.* 31: 166-188.
- **Fleming, H. S.** 1953. Effect of certain concentrations of fluoride on enamel and dentine as formed in transplants of tooth germs and related studies. *J Dent Res.* 32: 469-485.
- **Freyer, J.P., Sutherland, R.M.** 1986. Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply. *Cancer Res.* 46: 3513-3520.
- **Freyria, A.M., Cortial, D., Ronzière, M.C., Guerret, S., Herbage, D.** 2004. Influence of medium composition, static and stirred conditions on the proliferation of and matrix protein

expression of bovine articular chondrocytes cultured in a 3D collagen scaffold. *Biomaterials*. 25: 687-697.

- **Gay, I.C., Chen, S., MacDougall, M.** 2007. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofacial Res*. 10: 149-160.
- **Glasstone, S.** 1936. The development of tooth germs *in vitro*. *J Anat*. 70: 260-266.
- **Glasstone, S.** 1938. A comparative study of the development *in vivo* and *in vitro* of rat and rabbit molars. *Proc roy Soc B*. 126: 315-330.
- **Glasstone, S.** 1954. The development of tooth germs on the chick chorio-allantois. *J Anat*. 88: 392-399.
- **Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, 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 of the United States of America*. 97: 13625-13630.
- **Hay, F.M.** 1961. The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisor and molars of the mouse. *Arch Oral Biol*. 3: 86-109.
- **Hejčl, A., Sameš, M.** 2009. Mikrodialýza v neurochirurgii. *Cesk Slov Neurol N*. 72/105(6): 511-517.
- **Henriksson, J.** 1999. Microdialysis of skeletal muscle at rest. *Proc Nutr Soc*. 58: 919-923.
- **Hotary, B.K., Landmesser, L.T., Tosney, K.W.** 1996. Chapter 6: Embryo slices. In: *Methods in cell biology*. 51: 109-124.
- **Huang, G.T.J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., Shi, S.** 2008. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endodont*. 34: 645-651.
- **Huggins, C. B., McCarroll, H. R., Dahlberg, A. A.** 1934. The transplantation of tooth germ elements and the experimental heterotopic formation of dentine and enamel. *J exp Med*. 60: 199-210.
- **Chen, S.C., Marino, V., Gronthos, S., Bartold, P.M.** 2006. Location of stative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 41: 547-553.
- **Jacobson, I., Sandberg, M., Hamberger, A.** 1985. Mass transfer in brain dialysis devices – a new method for the estimation of extracellular amino acid concentration. *J Neurosci Methods*. 15: 263-268.
- **Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung, Y.H., Kim, E.S., Yang, H.C., Choung, P.H.** 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 13: 767-773.

- **Jones, D.A., Ros, J., Landolt, H., Fillenz, M., Boutelle, M.G.** 2000. Dynamic changes in glucose and lactate in the cortex of the freely moving rat monitored using microdialysis. *J Neurochem.* 75: 1703-1708.
- **Kapfhammer, J.P., Schwab, E.M.** 1992. Modulators of neuronal migration and neurite growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 863-868.
- **Kollar, E.J., Baird, G.R.** 1970a. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganisation of the dental epithelium during tooth germ reconstruction. *J Embryol Exp Morph.* 24: 159-171.
- **Kollar, E.J., Baird, G.R.** 1970b. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morph.* 24: 173-186.
- **Le Douarin, M.N.** 1973. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol.* 30: 217-222.
- **Lefkowitz, W., Mardfin, D.F., Bodecker, C.F.** 1954. Cultivation of rat molar tooth germs in Carrel Flasks I. *J Dent Res.* 33: 189-200.
- **Lefkowitz, W., Swayne, P.** 1956. The cultivation of tooth germs in an embryo extract-free medium. *J Dent Res.* 35: 440-445.
- **Levi, G., Duband, J.L., Thiery, J.P.** 1990. Modes of cell migration in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol.* 123: 201-252.
- **Lesot, H., Vonesh, J.L., Peterka, M., Tureckova, J., Peterkova, R., Ruch, J.V.** 1996. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol.* 40: 1017-1031.
- **Li, Z., Boubriak, O.A., Urban, J.P., Cui, Z.F.** 2006. Microdialysis for monitoring the process of functional tissue culture. *Int J Artif Organs.* 29: 858-865.
- **Li, Z., Boubriak, O.A., Urban, J.P., Cui, Z.F.** 2008. Chapter 19: Tissue-engineering monitoring using microdialysis. pp 401-420. In: Polak, J. (eds). *Advances in tissue engineering.* Imperial College Press, London, 908 pp.
- **Lin, D., Huang, Yv., He, F., Gu, S., Zhang, G., Chen, Y., Zhang, Y.** 2007. Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ. *Dev Dyn.* 236: 1307–1312.
- **Lindroos, B., Mäenpää, K., Ylikomi, T., Oja, H., Suuronen, R., Miettinen, S.** 2008. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Bioph Res Commun.* 368: 329-335.

- **Lohmeier-Vogel, E., Skoog, K., Vogel, H., Hahn-Hägerdal, B.** 1989. ³¹P-nuclear magnetic resonance study of the effect of azide on xylose fermentation by *Candida tropicalis*. *Appl Env Microbiol.* 55: 1974-1980.
- **Lubbock, M.J., Harrison, V.T., Lumsden, A.G.S., Palmer, R.M.** 1996. Development and cell fate in interspecific (*mus musculus/mus caroli*) intraocular transplants of mouse molar tooth-germ tissues detected by *in situ* hybridization. *Archs Oral Biol.* 41: 77-84.
- **Lumsden, A.G.S.** 1979. Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J Biol Buccale.* 7: 77-103.
- **Majumdar, M.K.** 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 176: 57-66.
- **Malínský, J.** 1995. Histologie a embryologie orofaciální oblasti. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, 103 pp.
- **Marais, A.** 2010. The generation of teeth from mouse embryonic stem cells. Diplomová práce. University of the Witwatersrand, Johannesburg, 87 pp.
- **Martin, I., Wendt, D., Heberer, M.** 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 22: 80-86.
- **Miller, W.A.** 1969. Inductive changes in early tooth development: I. A study of mouse tooth development on the chick chorio-allantois. *J Dent Res.* 48: 719-725.
- **Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P.** 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 226: 507-520.
- **Míšek, I., Matalová, E., Kaňovská, K., Štembírek, J., Roubalíková, L.** 2008. Possibilities and challenges of tooth regeneration, pp. 207-213. In: Ostró, A. and Lešník, F. (eds). *Biologické aspekty regenerační medicíny.* Nakladatelství Olomouc, 228 pp.
- **Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S.** 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS.* 100: 5807-5812.
- **Navis, A.R.** 2007. Hanging Drop Tissue Culture, *Embryo Project Encyclopedia.* ISSN: 1940-5030.
- **Ohazama, A., Modino, S.A.C., Miletich, I., Sharpe, P.T.** 2004. Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth. *J Dent Res.* 83: 518-522.
- **Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Doi, H., Eto, K.** 1994. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol.* 164(2): 409-419.

- **Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., Owen, M.J.** 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 89: 765-771.
- **Palmer, R.M., Lumsden, A.G.S.** 1987. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Archs Oral Biol*. 32: 281-289.
- **de la Peña, A., Liu, P., Derendorf, H.** 2000. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Del Rev*. 45: 189-216.
- **Peters, H., Balling R.** 1999. Teeth: where and how to make them. *Trend Genet*. 15: 59-65
- **Potter, K., Butler, J.J., Horton, W.E., Spencer, R.G.** 2000. Response of engineered cartilage tissue to biochemical agents as studied by proton magnetic resonance microscopy. *Arthritis Rheum*. 43: 1580-1590.
- **Robey, P.G.** 2005. Postnatal stem cells for dental and craniofacial repair. *Oral Biosci Med*. 2: 83-90.
- **Rosocha, J., Cibur, P., Hulman, M., Holovská, V., Lehocká, L.** 2008. Human mesenchymal stem cells, pp. 52-76. In: Ostró, A. and Lešník, F. (eds). *Biologické aspekty regenerační medicíny*. Nakladatelství Olomouc, 228 pp.
- **Sartaj, R., Sharpe, P.T.** 2006. Biological tooth replacement. *J Anat*. 209: 503-309.
- **Sasaki, K., Ikura, K.** 1991. *Animal Cell Culture and Production of Biologicals*. Springer-Verlag, New York, 448 pp.
- **Seguin, C.A., Grynopas, M.D., Pilliar, R.M., Waldman, S.D., Kandel, R.A.** 2004. Tissue engineered nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate. *Spine*. 29: 1299-1306.
- **Seidel, J.O., Pei, M., Gray, M.L., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G.** 2004. Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. *Biorheology*. 41: 445-458.
- **Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., Shi, S.** 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364(9429): 149-155.
- **Sharpe, P.T., Yen, A.H.H.** 2008. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 331: 359-372.

- **Sharpe, P.T., Volponi, A.A., Pang, Y.** 2010. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trend Cell Biol.* 20: 715-722.
- **Sjögren, F., Svensson, C., Anderson, C.** 2002. Cutaneous biology: technical prerequisites for in vivo microdialysis determination of interleukin-6 in human dermis. *Br J Dermatol.* 146: 375-382.
- **Slavkin, H.C., Bavetta, L.A.** 1968. Organogenesis: Prolonged differentiation and growth of tooth primordia on the chick chorio-allantoic membrane. *Experientia.* 24(2): 192-194.
- **Smith, A.J., Lesot, H.** 2001. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12: 425-437.
- **Stähl, N., Ungerstedt, U., Nordström, Ch.** 2001. Brain energy metabolism during controlled reduction of cerebral perfusion pressure in severe head injuries. *Intensive Care Med.* 27(7): 1215-1223.
- **Studitsky, A. N. von.** 1939. Die Entwicklung der embryonalen Zahnpulpa in den Transplanten in der Chorio-Allantois. *Anat Anz.* 83: 304-310.
- **Szabó, G.** 1954. Studies on the cultivation of teeth *in vitro*. *J Anat.* 88: 32-44.
- **Ten Cate, A.R., Sharpe, P., Roy, S., Nance, A.** 2003. Development of the tooth and its supporting tissues. pp. 79-107. In: Nanci, A. (eds). *Ten Cate's Oral Histology.* Dev Str Func. Harcourt Health Sciences. St.Louis, 432 pp.
- **Thesleff, I.** 2003. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 116: 1647–1648.
- **Thomas, H.F., Kollar, E.J.** 1989. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Archs Oral Biol.* 34: 27-35.
- **Torto, N., Bång, J., Richardson, S., Nilsson, G.S., Gorgon, L., Laurell, T., Marko-Varga, G.** 1998. Optimal membrane choice for microdialysis sampling of oligosaccharides. *J Chromatogr A.* 806: 265-278.
- **Torto, N., Mwatseteza, J., Laurell, T.** 2001. Microdialysis sampling – challenges and new frontiers. *LC-GC.* 19: 462-475.
- **Tucker, C.G., Aoyama, H., Lipinski, M., Tursz, T., Thiery, J.P.** 1984. Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: Conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. *Cell Differ.* 14: 223-230.
- **Tucker, A., Sharpe P.** 1999. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: The right shape in the right place. *J Dent Res.* 78: 826-834.

- **Tucker, A., Sharpe P.** 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 5: 499-508.
- **Vacek, Z.** 2006. *Embryologie.* 1.vyd. Praha, Grada, 256 pp.
- **Wan, Y.H., Ghosh, R., Hale, G., Cui, Z.** 2005. Fractionation of bovine serum albumin and monoclonal antibody alemtuzumab using carrier phase ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng.* 90: 303-315.
- **Willis, R. A.** 1935. Experiments on the intra-cerebral implantation of embryo tissues in rats. *Proc roy Soc B.* 117: 400-412.
- **Wolbach, B.S., Howe, P.R.** 1933. The incisor teeth of albino rats and guinea pigs in vitamin A deficiency and repair. *Amer J Path.* 9: 275-293.
- **Yoshikawa, D.K., Kollar, E.J.** 1981. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Archs Oral Biol.* 26: 303-307.
- **Young, C.S., Terada, S., Vacanti, J.P., Honda, M., Bartlett, J.D., Yelick, P.C.** 2002. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 10: 695-700.

Elektronické zdroje

Skripta embryologie histologie - 14 [online]. c2011. [cit. 2011-1-24]. (<http://www.skriptar.cz/skripta-embryologie-histologie/14>).