

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U:611.314.018:602.9(043.2)

SAMSON STELLA

**ȚESUTURILE DENTARE MOI – SURSĂ DE CELULE STEM
PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ
(studiu experimental)**

341.01 – INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare și a catedrei Anatomie și anatomie clinică, IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Conducător științific: **NACU Viorel**, dr. hab. șt. med., profesor universitar.

Consultant științific: **BURLACU Valeriu**, dr. șt. med., profesor universitar.

Referenți oficiali: **ZOTA Ieremia**, dr. hab. șt. med., profesor universitar, membru corespondent al AȘM, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău.

KARL Matthias, dr. hab. șt. med., profesor universitar, Universitatea Saarland, Germania.

Componența consiliului științific specializat:

Președinte: **TOPOR Boris**, dr. hab. șt. med., profesor universitar.

Membrii: **TAGADIUC Olga**, dr. hab. șt. med., profesor universitar.

COCIUG Adrian, dr. șt. med.

MOSTOVEI Andrei, dr. șt. med., conferențiar universitar.

Susținerea va avea loc la 14.06.2023, ora 14:00, în ședința Consiliului științific specializat D 341.01-23-17, din cadrul IP USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD 2004.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP USMF „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC www.anacec.md.

Rezumatul a fost expediat la data de 12.05.2023

Secretar științific al Consiliului științific

Specializat, dr. șt. med., conferențiar universitar

_____ **TURCHIN Radu**

Conducător științific,

dr. hab. șt. med., profesor universitar

_____ **NACU Viorel**

Consultant științific,

dr. șt. med., profesor universitar

_____ **BURLACU Valeriu**

Autor _____

SAMSON Stella

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. Surse de celule stem pentru medicina regenerativă.....	7
2. Materiale și metode de cercetare.....	8
3. Structura celulară a dintelui.....	11
4. Ingineria tisulară a pulpei dentare	16
SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE.....	23
CONCLUZII GENERALE.....	27
RECOMANDĂRI PRACTICE	28
BIBLIOGRAFIE.....	29
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI.....	31
ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	32

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei

Biologia celulelor stem este în prezent una dintre cele mai actuale direcții de cercetare biomedicală datorită perspectivelor promițătoare pentru punerea în aplicare a unor noi strategii în medicina regenerativă.

Celulele stem sunt celule nespecializate, care au capacitatea de a se autoreplica nelimitat și de a se diferenția în mai multe tipuri celulare. Celulele stem embrionare au capacitatea de a prolifera nelimitat *in vitro* fără a-și pierde potențialul de diferențiere și pot da naștere tuturor tipurilor celulare dintr-un organism, ceea ce le face deosebit de atractive pentru medicina regenerativă [31].

Odată cu această descoperire, țesutul adipos s-a dovedit a fi o sursă bogată în celule stem cu un potențial mare pentru medicina regenerativă. Mai mult, aceste celule pot fi recoltate prin metode minim invazive, în număr mare, de la pacienți sănătoși care suferă intervenții chirurgicale de remodelare corporală (lipoaspirație). În ultimul deceniu, numeroase studii au furnizat date preclinice privind siguranța și eficacitatea utilizării celulelor ASC în viitoarele aplicații clinice [5].

Unele studii clinice au demonstrat posibilitatea utilizării ca sursă de regenerare a celulelor stem din țesut adipos în domenii medicale cum ar fi: chirurgia plastică, ortopedia, chirurgia oro-maxilo-facială și cardiacă [33].

Vindecarea rănilor este un proces care poate fi perturbat de diverse condiții patologice de tipul diabetului, imunosupresiei etc. Aplicarea individuală, în regiunea leziunii, a factorilor de creștere implicați în vindecare nu a dus la obținerea rezultatelor scontate. În aceste situații nefavorabile, probabil datorită implicării unui număr foarte mare de factori de creștere în acest proces complex. Pentru a obține rezultate optime, aplicarea locală, intermitentă a acestor factori nu este suficientă, fiind necesară prezența unei surse continue [7].

Medicina regenerativă este un domeniu de cercetare multidisciplinar care a evoluat în paralel cu biotehnologia și implică utilizarea de biomateriale, factori de creștere și celule stem în vederea reparării, înlocuirii sau regenerării unui țesut sau organ lezat. Soluția ideală pentru reconstrucția țesuturilor moi ar favoriza regenerarea *de novo* a țesutului adipos vascularizat, pornind de la precursori adipogenici implantați în scaffold-uri biocompatibile și biodegradabile, pentru a umple complet volumul defectului [6].

Dezvoltarea celulelor stem în medicina dentară va face în timp, o revoluție mai mare decât au făcut-o implanturile dentare. Aliajele metalice, compozitele și chiar implanturi din titan nu sunt soluții permanente [14].

Astfel din celulele stem din pulpa dinților temporari și permanenți se poate genera substratul necesar formării dintelui. Dinții sunt o sursă ușor accesibilă de a recolta celule stem postnatale de la diferite țesuturi, inclusiv pulpa dentară, ligamentul parodontal, foliculul dentar, papila apicală, din dinți în curs de dezvoltare. Gronthos et al. pentru prima dată a izolat celulele stem din pulpa dentară din molarii trei. Aceste celule sunt foarte proliferative și pot să se diferențieze în diferite tipuri de celule, ce sunt capabile de a forma complexul dentin-pulpă, dar nu os lamelar, după transplantul *in vivo* [2]. Trei ani mai târziu, Miura et al. au obținut celulele clonogenice de la dinții temporari și le-au diferențiat în odontoblaste, adipocite și celule neuronale [9]. Atât celulele stem din pulpa dentară a dinților temporari cât și permanenți sunt situate în nișă perivasculară și exprimă markerul celulelor stem mezenchimale STRO-1 și markerul pericitar CD146 [29].

Așadar, datorită aspectelor complexe pe care le impun celulele stem în practica stomatologică, considerăm că realizarea acestui studiu este de o reală importanță și de mare actualitate.

Scopul studiului: studierea celulelor progenitoare din țesuturile dentare moi, obținerea unei structuri 3D a pulpei dentare prin decelularizarea ei pentru utilizarea lor în medicina regenerativă.

Obiectivele studiului:

1. Evaluarea caracteristicilor pulpei dentare, a volumului, a componenței celulare.
2. Studierea modalității de obținere a celulelor din țesuturile dentare și confecționarea unui dispozitiv pentru obținerea pulpei dentare.
3. Caracterizarea celulelor stem din țesuturile dentare: studiu comparativ al activității celulelor obținute din diferite țesuturi dentare (dinți temporari și permanenți).
4. Evaluarea modalităților de decelularizare și recelularizare a pulpei dentare.
5. Elaborarea unor recomandări privind utilizarea celulelor stem obținute în medicina regenerativă.

Metodologiei cercetării științifice. Prezenta cercetare pornește de la preocupările actuale din domeniu la nivel global, urmărind continuarea studiilor în vederea elucidării posibilităților de a obține și a utiliza celulele stem din dinți în domeniul ingineriei tisulare a dinților. Acest studiu a fost efectuat pe dinți de la purceluși vietnamezi ($n = 50$) și dinți umani ($n = 100$). Pentru studierea elementelor histologice ale dintelui a fost utilizată colorația uzuală cu hematoxilină-eozină, iar pentru evidențierea structurilor colagenice – colorația tricrom Masson, astfel asigurându-se posibilitatea de a identifica patternurile de distribuție a fibrelor de collagen, precum și starea, organizarea acestora în structuri native și decelularizate.

Baleiajul electronic (SEM) a fost utilizat pentru evaluarea structurilor pulpei dentare decelularizate native și liofilizate.

Pentru studiul stromei dentare, la nivel molecular, au fost folosite inclusiv metode de analiză imunohistochimică a celulelor CD34 și CD45 pozitive. Cu ajutorul metodelor histochemice au fost evaluate distribuția acestora în pulpa dentară.

Noutatea și originalitatea științifică a cercetării.

1. A fost elaborată modalitatea de evaluare a volumului camerei pulpare prin tomografia computerizată.
2. Au fost determinate componentele celulare în dependență de valorile camerei pulpare la diferite grupuri de dinți.
3. În lucrarea dată a fost raportată efectuarea decelularizării pulpei dentare și aspecte ce țin de recelularizarea ei cu celule obținute din măduvă osoasă sau din pulpa dentară.
4. A fost definită amplasarea celulelor CD34 și CD45 în pulpa dentară și capacitatea celulelor din pulpa dentară de a se diferenția în osteoblaste și chondrocite.

Semnificația teoretică. Prin cercetarea efectuată au fost elucidate particularitățile de obținere a celulelor stem dentare și posibilității de utilizare în diverse domenii ale medicinei moderne, implementarea în Republica Moldova a metodelor de obținere a celulelor progenitoare din aparatul dentar pentru ingineria tisulară în particular și medicina regenerativă în ansamblu.

Valoarea aplicativă a lucrării. Importanța practică a prezentei cercetări științifice constă în elaborarea modalității de evaluare a potențialului celular al pulpei dentare în bază de tomografie computerizată. Posibilitatea obținerii unor grefe celulare pentru medicina regenerativă destinate restabilirii țesuturilor afectate din regiunea maxilo-facială.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele științifice expuse în lucrare au fost comunicate și discutate în cadrul diferitor foruri științifice naționale și internaționale: Conferință Internațională de Nanotehnologie și Inginerie Biomedicală, 2013, 2021, Congresul Internațional al Studenților și Tinerilor Medici "MedEspera", ediția a IV-a, 2012, Sesiunea XIX-lea a zilelor medicale balcanice, Republica Moldova, 2013, Conferință Internațională de Managementul Tehnologiei Sănătății, ediția a 3-a, Chișinău 2016, reuniunea europeană a Societății Internaționale pentru Inginerie Țesuturilor și Medicină Regenerativă, TERMIS, Davos, Elveția, 2017, salonul internațional de invenție PRO INVENT ediția a XI-a, 2013, Cluj-Napoca, Diplomă de Excelență și Medalia de Aur, Expoziția Europeană a Creativității și Inovării EURO INVENT, 2013, Iași, Diplomă de Excelență și Medalia de

Аргент, Международный салон изобретений и новых технологий “Новое Время” VIII, г. Севастополь, Диплом почтения.

Teza a fost discutată, aprobată și recomandată spre susținere la ședința comună a Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare cu Catedra anatomie și anatomie clinică a USMF “Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 2 din 16.01.2023) și Seminarul Științific de profil 321. Medicină generală; 341. Biotehnologii cu aplicație în medicină; Specialitatea: 321.24. Transplantologie, 341.01. Inginerie tisulară și culturi celulare (process verbal nr.4 din 16.02.2023).

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele investigațiilor au fost implementate în procesul instructiv-metodic la Catedra anatomie și anatomie clinică și cursul opțional de Medicină Regenerativă pentru studenții anului IV USMF „Nicolae Testemițanu”. Ca metode de cercetare au fost utilizate în Laboratorul Inginerie tisulară și culturi celulare din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”.

Publicații la tema tezei. Materialele tezei au fost reflectate în 9 publicații, inclusiv 2 lucrări fără coautori, 5 publicații în reviste naționale și 4 publicații în reviste internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza realizată în limba română este expusă pe 117 pagini. Teza constă din adnotări, introducere și 4 capitole, dintre care capitolul 1 prezintă reviu literaturii, capitolul 2 – materialul și metodele de cercetare, capitolele 3 și 4 – include datele obținute; discuții; concluzii; recomandări practice; bibliografie. Bibliografia include 153 de titluri de referințe. Lucrarea conține 34 figuri, 12 tabele și 3 anexe.

Cuvintele-cheie: celule stem, pulpa dentară, decelularizare, inginerie tisulară, grefe celulare.

CONȚINUTUL TEZEI

1. Surse de celule stem pentru medicina regenerativă

În capitolul dat a fost efectuată o analiză a publicațiilor existente la acest moment în domeniul cercetărilor efectuate în domeniul celulelor stem, preponderent în stomatologie.

Deși există numeroase lucrări științifice consacrate studierii morfologiei dintelui, structurii și posibilității utilizării componentului celular pentru obținerea de tulpini celulare nu sunt definite clar posibilitățile de obținerea a acestor celule din complexul dento-ligamentar.

Literatura de specialitate în domeniu nu conține un punct de vedere unic asupra ponderii și rolului celulelor stem din dinte în calitate de surse de celule pentru medicina regenerativă. Evidențierea lor în prezenta cercetare va permite identificarea anumitor căi și propuneri privind

utilizarea lor în medicina practică. Este foarte important de a cunoaște la care vârstă și care dinți ar fi mai favorabili de a fi colectați ca sursă de celule pentru terapia celulară. În acest context, este necesar de a elucida care poate fi aportul pulpei dentare ca sursă de celule stem, la femei și bărbați, pentru tratament. Trebuie evaluată posibilitatea determinării neinvazive a numărului posibil de celule nucleate stem din pulpa dentară.

Analizând aceste surse bibliografice s-a ajuns la concluzia că este necesară găsirea unor modalități, tehnici de revitalizare a dintelui devitalizat, sau posibila creare de dinți prin intermediul ingineriei tisulare.

2. Materiale și metode de cercetare

Pornind de la ipoteza de cercetare, în temeiul realizării obiectivelor tezei, pentru studierea modalității de obținerea a celulelor stem din țesuturile dentare, acest studiu a fost realizat, în perioada 2012-2021, prin care au fost caracterizate și efectuată o analiză comparativă a celulelor nucleate din țesuturile dentare. În acest scop au fost folosite diverse metode de cercetare, pentru fixarea fenomenelor evidențiate în acest studiu, totodată a fost elucidate dinamica, tendințele și corelația lor cu diverși factori.

Prezenta cercetare a fost realizată în patru etape:

Etapa I. Definirea problemei și elaborarea planului de cercetare.

1. Studierea situației existente în domeniu prin analiza literaturii științifice și metodico-didactice la tema vizată în cercetare.
2. Aprecierea scopului și a obiectivelor cercetării.
3. Determinarea volumului și a perioadei de studiu.

Etapa II. Acumularea și descrierea materialului studiat.

1. Elaborarea fișelor de evidență și a metodelor și posibilităților de acumulare a materialului studiat.
2. Înregistrarea observațiilor pe parcursul studiului pe măsura efectuării studiilor experimentale și completarea datelor în fișele studiilor experimentale.

Etapa III. Analiza comparativă a rezultatelor obținute.

Etapa IV. Analiza statistică și sinteza rezultatelor obținute.

Proiectul de cercetare și protocolul de studiu au fost aprobate de către membrii Comitetului de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr. 25 din 31.01.2013).

Studiul actual, inclusiv cel experimental a fost realizat în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare și a Catedrei de anatomie și anatomie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”.

Obiectele de studiu au fost molarii superiori și inferiori (n=50) extrași de la purceluși vietnamezi

(n=25) cu vârsta de $4,8 \pm 1,2$ luni și greutatea de $0,450 \pm 1,500$ kg și dinți extrași de la subiecți umani: dinți permanenți (n=70), dinți temporari (30).

Studiul efectuat pe dinții colectați de la subiecți umani.

Dinții colectați de la subiecți umani au fost separate în două loturi:

- Lotul de cercetare L_1 , care a inclus 70 de dinți permanenți extrași de la subiecți umani, 35 femei, 35 bărbați cu vârsta cuprinsă între 20-35 ani;
- Lotul de cercetare L_2 , care a inclus 30 de dinți temporari extrași de la copii 15 de sex feminin, 15 de sex masculin cu vârstă cuprinsă între 6 - 12 ani.

Criteriile de includere a dinților extrași în lotul de cercetare au fost:

- dinți intacti fără obturații cu două și trei rădăcini.

Criteriile de excludere a dinților extrași din lotul de cercetare au fost:

- dinții cu rădăcini sub formă de C, molari cu o singură rădăcină, dinți cariați sau cu restaurări mari.

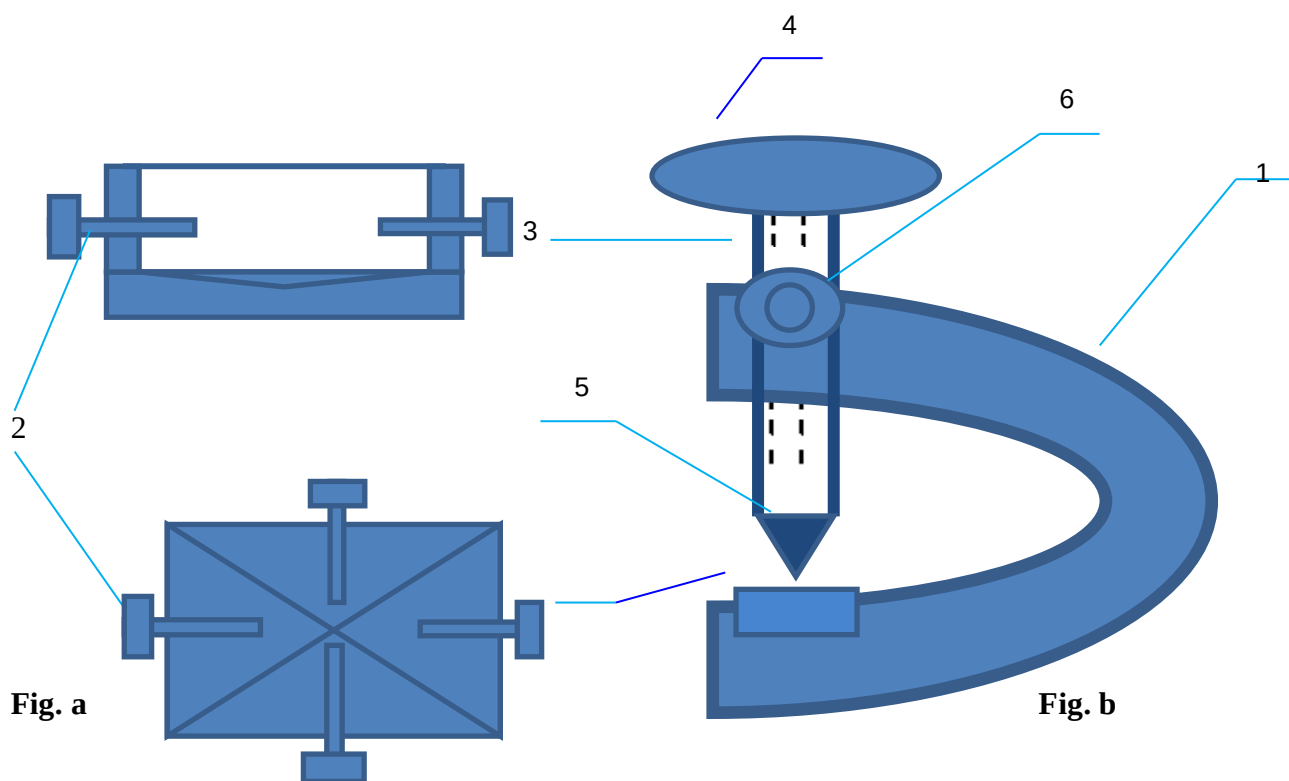


Fig. 1. Dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras.

Fig. a - măsura demontabilă, în secțiune și din superior; Fig. b - aspectul lateral al dispozitivului. Fig. a, b conține soclul stabilizator reprezentat de un dispozitiv metalic în formă de potcoavă (elipsa) (1), pe el este fixată o măsura demontabilă (2), dreptunghiulară cu o eminentă la mijloc, care este înzestrată cu un sistem special pentru fixarea dintelui ce constă din patru fixatoare filetate (3). La extremitatea superioară a soclului este solidarizată tija de compresie (4), cu mâner rotund filetat și componentul de fragmentare demontabil (5), cilindru (6)

În scopul simplificării procesului de obținere a pulpei dentare din dinte a fost confecționat un dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras (Brevet de invenție MD 559 (13)Y, A61C 19/00 (2006.01), dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras), care nu duce la supraîncălzirea dintelui extras și este mai simplu în utilizare. După prelucrarea dintelui extras cu antiseptici, se plasa pe masașă demontabilă, la răsucirea tijei, prin compresie, se obține pulpa radiculară și coronară (fig. 1).

Dispozitivul corespunde cerințelor și normelor sanitare, fiind executat din material inoxidabil, utilizat la fabricarea instrumentarului medical.

Metode de izolare a celulelor stem dentare.

Izolarea celulelor stem din pulpa dentară este relativ simplă. Dinții ($n = 110$) au fost împărțiți aleatoriu în trei grupuri. Din 110 probe, 36 au fost incluse în grupul I (metoda de digestie enzimatică); 36 – în grupul II (metoda prin explant) și 38 în grupul III (digestia bucăților de pulpă și fixarea lor sub lamelă în mediu).

Cu ajutorul dispozitivului de fragmentare a dintelui extras a fost separată partea coronară de cea radiculară și s-a obținut pulpa dentară. După spălarea cu tampon fosfat salin (PBS), pulpa dentară a fost fragmentată cu bisturiul în bucăți cu dimensiunile de $1 \times 1 \pm 0,5$ mm. În grupurile I și III, fragmentele au fost digerate într-o soluție de 1 mg/ml collagenază/dispoză timp de 30 min. la 37°C și centrifugate la 1200 rp timp de 5 min. Suspensiile celulare au fost însămânțate în vase de cultură de 60 mm, care conțineau modificarea alfa minimă esențială în mediu (α -MEM), cu 20% ser bovin fetal (FBS), 100 U/ml penicilină-G, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicină și 1 $\mu\text{g/ml}$ amfotripsină B. Grupurile II și III au fost acoperite cu o lamelă, pentru a fixa țesutul și a împiedica mișcarea acestuia în mediu. Toate specișenele au fost incubate la 37°C și 5% CO_2 în incubator. Mediul a fost schimbat la fiecare 3 zile. Celulele au fost trecute 1:5 cu 0,25% tripsină/1mM EDTA la fiecare 5 zile. Culturile celulare erau examinate zilnic prin microscopie cu contrast de fază, pentru a verifica creșterea, morfologia, dar și eventuala contaminare bacteriologică sau fungică. Numărul celulelor vii a fost determinat prin utilizarea soluției albastru de trepan de 1% cu ajutorul hemocitometrului.

Tomografia computerizată. Tomografia computerizată pentru a măsura și calcula volumul camerei pulpare poate furniza informații mai precise pentru a prognoza numărul posibil de celule din pulpa dentară. A fost utilizat aparatului Kodak 9500 (Dental Systems, Carestream Health) operat la 90 kVp, cu dimensiunea voxelului de 300 μm și un câmp vizual de 90x150 mm. Toate măsurătorile au fost realizate în plan coronal.

Prelucrarea statistică a fost realizată prin metodele descriptivă, analitică și statistică computerizate ale statisticii variaționale și ale analizei discriminante, metodei χ^2 (a fost evaluată semnificația pentru valorile relative, exprimate procentual).

3. Structura celulară a dintelui

Rezultatele au demonstrat diferențe morfologice în diferite grupuri. În grupul I (metoda enzimatică) au fost observate câteva colonii de celule în decurs de 4 zile de la plasarea inițială. Celulele atașate sunt *fibroblast-like*. Digestia segmentelor de pulpă cu collagenază/dispoză au distrus schela pulpară, celulele fusiforme au fost observate la 2-3 zile de la cultura primară. Prin metoda culturii de organ (explant), segmentele de pulpă nedigerată au prezentat o margine intactă și au produs celule mai târziu decât țesutul digerat. În cazul metodei explant au fost necesare 10-12 zile pentru a crește un număr suficient de celule. Migrația celulară prin periferie a fost, de asemenea, vizibilă în acest grup. Coloniile erau eterogene ca aspect, cu un fus în formă de butoi și o configurație rotundă. Celulele izolate prin această metodă au avut cea mai lentă rată de proliferare. În mod surprinzător, prin aplicarea de suport pe fragmentele de pulpă dentară la 2 zile de la începerea cultivării, au apărut populații eterogene de celule cu creștere rapidă. În acest grup cu plasticitate considerabilă, toate speciile au prezentat o rată crescută de creștere a celulelor stem. Rezultatul a demonstrat că a treia metodă a fost mai eficientă (mai mult de $6.5 \pm 3\%$), iar cea de a doua a fost mai puțin eficientă (aproximativ $3.8 \pm 1,2\%$) în izolarea celulelor stem și aceste diferențe au fost semnificative statistic ($p < 0,05$).

Tomografia computerizată, a devenit o metoda indispensabilă în practica dentară. Acesta se utilizează pe scară largă în tratamentul endodontic pentru examinarea morfologiei canalelor radiculare.

Pentru a măsura și calcula volumul camerei pulpare, tomografia computerizată poate furniza informații mai precise pentru a prognoza numărul posibil de celule din pulpa dentară. Scopul acestui studiu a fost de a utiliza TC pentru evaluarea volumului camerei pulpare la diferite persoane.

Pentru a calcula numărul de celule stem din camera pulpară, am determinat volumul camerei pulpare. În acest studiu au fost examinați prin TC, dinți sănătoși, 60 de molari superiori și 60 de molari inferiori de la 40 de pacienți maturi: 20 de femei și 20 de bărbați, cu vârsta cuprinsă între 18-45 ani. S-au format următoarele loturi de studiu: femei cu vârsta 18-30 ani (tabelul 3.4), femei cu vârsta 31-45 (tabelul 3.5), bărbați cu vârsta 18-30 (tabelul 3.6), bărbați cu vârsta 31-45.

Toate măsurătorile au fost realizate în plan coronal. Selectarea corespunzătoare a secțiunii a fost efectuată în modul următor: inițial planul coronal al molarului a fost aliniat în conformitate cu planurile axial și sagital al dintelui. Acesta a fost ajustat astfel încât punctul de vedere coronal să reprezinte o secțiune longitudinală dreaptă a dintelui de la vârful cuspidului la furcație.

După ce planul coronal a fost identificat din punctul de vedere axial, 5 linii au fost plasate pe 5 repere diferite pe dinte: A - începutul camerei pulpare, B - planșeul camerei pulpare, C - primul punct de separare între rădăcini (furcația) și D - ultimul punct de separare între rădăcini (la separarea completă a rădăcinii), E - vârful rădăcinii.

Toate reperele anatomice au fost approximate la puncte trasate, care au fost identificate în funcție de vizualizarea axială. Ușoară diferența care ar fi putut surveni la determinarea punctelor a fost neglijabilă și nu a afectat măsurătoarea.

Volumul camerei pulpare s-a calculat după formula: $V = h * L * l$, unde $h = A + B + C + D$. (Fig. 2).

Măsurătorile directe au fost luate între cele 5 linii, iar următoarele distanțe au fost calculate după cum urmează:

- A - începutul camerei pulpare până la planșeul camerei pulpare
- B - planșeul camerei pulpare până la primul punct de separare între rădăcini (furcația)
- C - primul punct de separare între rădăcini (furcația) până la ultimul punct de separare între rădăcini (la separarea completă a rădăcinii).
- D - ultimul punct de separare între rădăcini (la separarea completă a rădăcinii) până la vârful rădăcinii.
- E - vârful rădăcinii.

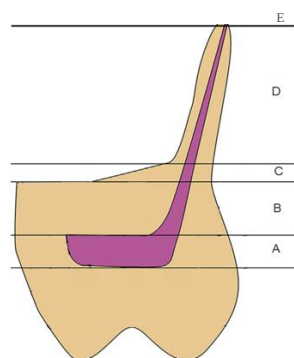


Fig. 2. Liniile care au folosit ca reper pentru determinarea volumului camerei pulpare

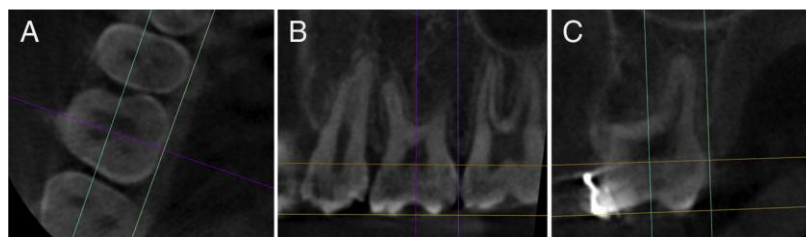


Fig. 3. Tomografie computerizată. Imagini ce identifică parametrii utilizați în măsurarea volumului camerei pulpare a molarului de minte.

(A) Vedere axială, (B) Vedere sagitală, (C) Linia verde a planului sagital trece de-a lungul axei longitudinale a dintelui. Linia galbenă a planului axial trece perpendicular pe linia planului sagital și este paralelă cu suprafața ocluzală

Tabelul 1. Măsurări realizate prin tomografia computerizată a volumului camerei pulpare la molarii superiori și inferiori la femei și bărbați vârsta 18-45 ani

		Volumul camerei pulpei dentare			
Nr.	Tip dinte	Media	Mediana	IIQ	DS
1	Molar I superior	19,503	19,200	4,5	2,4817
2	Molar II superior	17,541	17,500	1,2	,7265
3	Molar III superior	16,560	16,700	1,3	,8199
4	Molar I inferior	16,403	15,750	2,9	2,1113
5	Molar II inferior	15,130	14,450	2,9	1,8297
6	Molar III inferior	14,553	14,100	1,6	1,3923

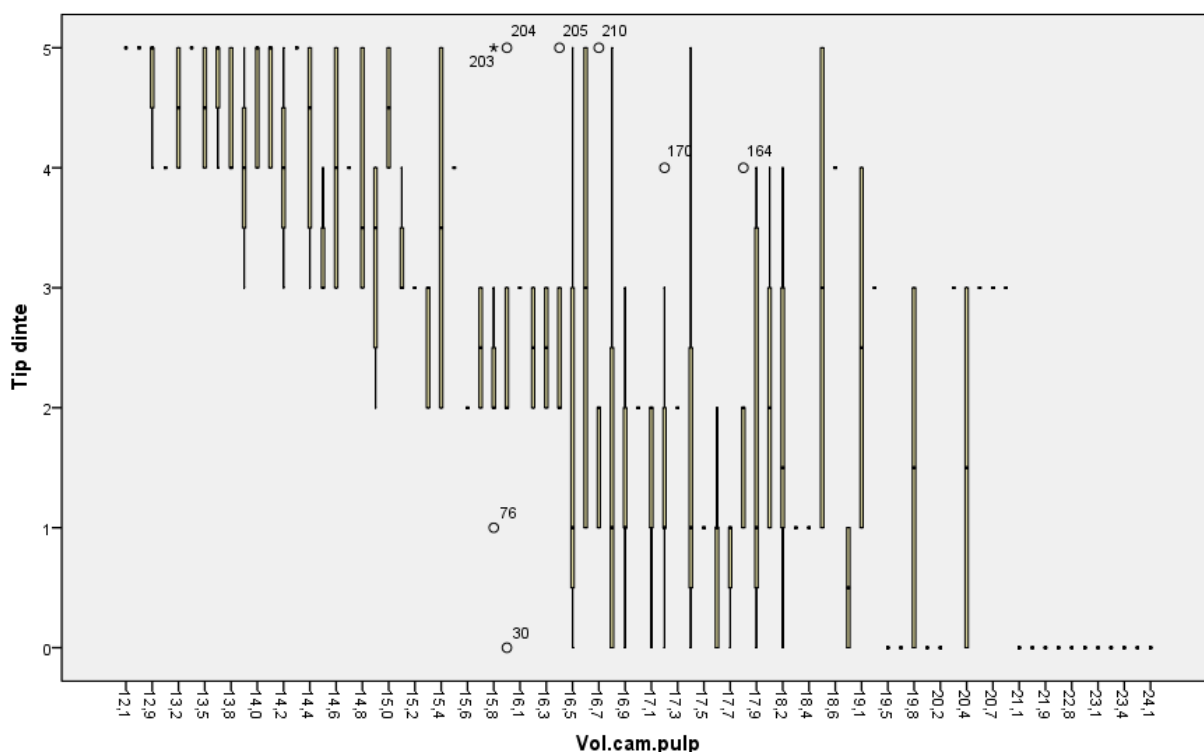


Fig. 4. Box plotul la volumul camerei pulpare la molarii superiori și inferiori la femei și bărbați vârsta 18-45 ani

Constatăm faptul că inițial indicii din loturile experimentale erau identici, alternând, pentru ca în final volumul camerei pulpare să crească de la molarul 3 superior la molarul 1 superior, la molarii inferiori este invers descrescător de la molarul 3 inferior spre molarul 1 inferior (Fig. 4). Actualmente,

tomografia computerizată, ne oferă posibilitatea de a calcula automat pe imaginile (tomogramele) digitale suprafețele care ne interesează. Datele obținute arată o corelație directă între înălțimea, lungimea, lățimea camerei pulpare și volumul ei. A fost investigată relația dintre vârstă și volumul camerei pulpei al molarilor superiori și inferiori. Sexul și vârsta sunt două variante de estimare a volumului camerei pulpare, ceea ce s-a dovedit în studiul de față. TC este un instrument important pentru măsurarea volumului camerei pulpei, în special pentru a aduna informații în ceea ce privește reperele camerei pulpare relevante pentru determinarea volumului.

Efectuarea măsurărilor imaginilor scanate tri-dimensional, permit de a determina parametrii camerei pulpare folosind un standard definit de abordare spațială. Acest studiu evidențiază prezența potențială pe diferite adâncimi în zona furcăției și identificarea acestora cu ajutorul TC.

În studiul de față, ne-am concentrat doar asupra dinților întregi, fără restaurări sau tratați endodontic pentru a permite o identificare adecvată din parametrii studiați.

Cultivarea celulelor în vase de cultură.

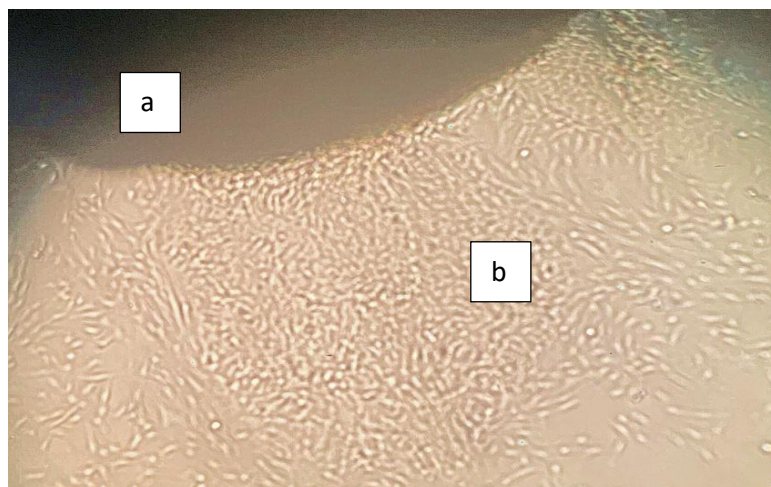


Fig. 5. Inițierea cultivării celulelor prin cultura de organ. A 12 zi de cultivare. a) pulpa dentară; b) celulele „fibroblast like” care se expandează radial de la țesut spre periferie

Rezultatele au demonstrat diferențe morfologice în diferite grupuri. În grupul I (metoda enzimatică) au fost găsite câteva colonii de celule în decurs de 4 zile după plasarea inițială. Celulele atașate sunt *fibroblast-like*. Digestia segmentelor de pulpă cu collagenază/dispază distrug schela pulpară, celulele fusiforme sunt observate la 2-3 zile după cultura primară. Prin metoda cultura de organ (explant), segmentele de pulpă nedigerată prezintă o margine intactă și produc celule mai târziu decât țesutul digerat. În metoda explant au fost necesare 10-12 zile pentru a primi un număr suficient

de celule (confluență celulară de 70-80%). Migrația celulară prin periferie a fost, de asemenea, vizibilă în acest grup. Coloniile erau eterogene ca aspect, cu un fus în formă de butoi și o configurație rotundă. Celulele izolate prin această metodă au avut cea mai lentă rată de proliferare (fig. 5).

Prin aplicarea fâșiei de sticlă de menținere/fixare pe fragmentele de pulpă dentară la 2 zile după începerea cultivării, au apărut populații eterogene de celule cu creștere mai rapidă. În acest grup, majoritatea specimenelor au prezentat o rată bună de creștere a celulelor stem. Analiza rezultatelor a demonstrat că în al treilea lot creșterea a fost mai eficientă (mai mult de $25 \pm 3\%$) comparativ cu lotul II ($p < 0,05$).

Diferențierea celulelor stem din pulpa dentară în osteoblaste

Pentru obținerea odontoblastelor din celulele măduvei osoase au fost studiate mai multe surse de specialitate, din care a fost selectată o metodă posibilă de executat în condițiile noastre și care dă un rezultat optim în procesul de cultivare. A fost utilizată grefă celulară obținută din pulpa dentară. După procesarea și separarea celulelor mezenchimale ele au fost cultivate pe mediu nutritiv DMEM.

Metodologia:

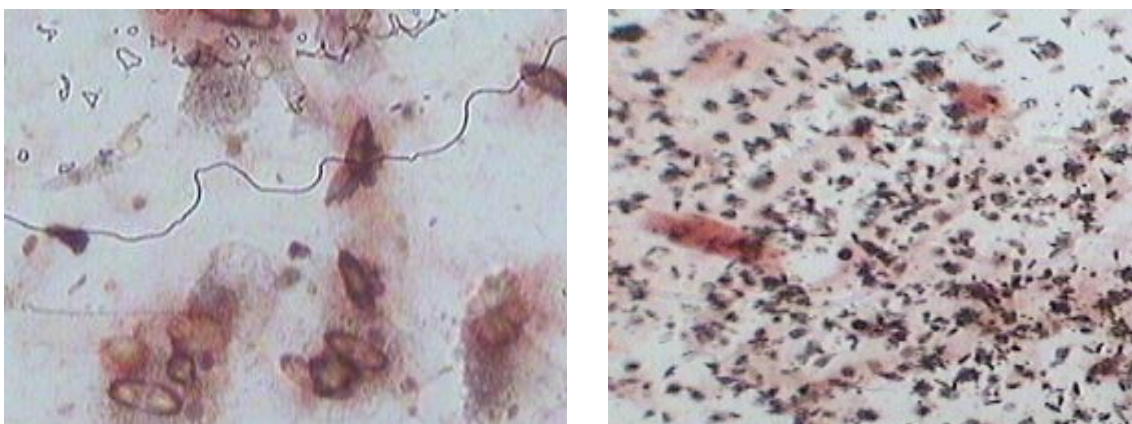
1. CSM au fost obținute prin protocolul de izolare a celulelor din pulpa dentară umană, cu concentrația celulelor în mediul nutritiv, la începutul cultivării, a constituit $0,25 \pm 0,01 \times 10^6/\text{ml}$ ($p < 0,05$). După aderarea celulelor mezenchimale la plastic, celelalte celule neaderente au fost înlăturate și a fost adăugat mediu nutritiv proaspăt și în condiții similare au fost cultivate timp de 3 zile.

2. În 3 cutii de cultură cu diametrul de 30 mm cu 1,25ml, 1,75 ml, 2,25 ml mediu de cultură, s-au adăugat celule mezenchimale din pulpa dentară, calculate în proporție de $2,5 \times 10^3$ celule la 1 ml de mediu nutritiv pentru cultivarea celulelor, și s-au plasează în incubatorul CO_2 la 37°C , umiditatea 85%.

3. Celulele rotunde aderente din pulpa dentară s-au transformat în celule cu citoplasma alungită asemănătoare fibroblastelor (fig. 3.14). Pentru diferențierea în osteoblaste, după obținerea unei confluențe celulare de minimum 70% pe suprafața godeului vasului de cultură s-a adăugat un mediu special, cu acțiune osteogenă: acid ascorbic 2×10^{-4} , β -glicerofosfat disodic 7×10^{-1} , dexametazonă 10^{-6}M .

4. La ziua 5, 7 și 9 s-au fixat celulele în câte 3 godeuri, în ziua a 9-a în una dintre cutii celulele s-au colorat cu HE (lot de verificare).

5. Rezultatele obținute atestă posibilitatea diferențierii celulelor stem din pulpa dentară *in vitro* în celule osteoblastice, ceea ce confirmă că celulele obținute sunt celule progenitoare și, totodată, că aceste celule ar putea fi utilizate pentru stimularea regenerării țesutului osos în defectele scheletului facial.



a.

b.

Fig. 6. Diferențierea celulelor mesenchimale din pulpa dentară în odontoblaste. Colorație alizarină red. a) x 100; b) x 40

Pentru vizualizarea celulelor, acestea au fost fixate în soluție de 2% glutaraldehidă, după care au fost colorate cu hematoxină-eozină. Celulele mezenchimale au fost decolate de la flaconul de cultură prin utilizarea soluției de tripsină 0,25% cu EDTA 1 mM. După eliminarea mediului nutritiv și spălarea celulelor cu PBS, soluția cu ferment a fost lăsată să acționeze timp de 5 min. la temperatura de 37°C, după care fermentii au fost inactivați cu mediu nutritiv care conține 15% SBF. Suspensia de celule obținută a fost centrifugată la 1000 rpm pentru sedimentarea lor, iar celulele obținute au fost resuspendate în mediu nutritiv și cultivate în plăci de cultură celulară cu 96 de godeuri, cu suprafața 0,5 cm², concentrația celulelor a constituit $2,5 \pm 0,12 \times 10^6$ per cm² ($p < 0,05$). În cadrul cercetării noastre am obținut dovada transformării și diferențierii celulare de la celule mononucleate la cele asemănătoare fibroblastelor și, ulterior, sub acțiunea factorilor specifici care determină diferențierea în celule osteogene – în celule de formă poligonală, caracteristice osteoblastelor în cultură. FA, collagenul de tip I, osteonectina și osteoclastina sunt markerii care indică activitatea osteoblastului..

3. Ingineria tisulară a pulpei dentare

Deoarece complexul pulpo-dentinar este agresat prin metodele de activitate în domeniul stomatologiei curente și deoarece formează un organ, am acționat pentru a nu afecta arhitectonica acestei structuri. Materialul recoltat pentru acest studiu a fost obținut prin alegerea de material pulpar din totalul cazurilor.

După prelucrarea cavității bucale cu soluție de betadină, se efectuează anestezie locală cu soluție Septanest 4% - 1,7 ml. După efectuarea sindesmotomiei are loc extracția propriu-zisă a dintelui, apoi se aplică sutura. Dinții extrași sunt prelucrați cu o soluție de etanol 70% și apoi plasați în eprubete sterile care conțin mediu nutritiv DMEM (HIMEDIA), antifungice, antibiotice, pentru a fi transportați

la laboratoare pentru proceduri de decelularizare. Pulpa dentară excizată a fost montată pe sistemul de perfuzie și spălată cu 1-1,5 litri apă distilată și ulterior decelularizată prin două metode: cu agent de decelularizare – 0,25% sau 0,5% dodecil sulfat de sodiu (SDS) [20] și a doua metodă, în care am asigurat perfuzia pulpei dentare cu soluție anticoagulantă (citrăt fosfat dextroză) înainte de decelularizare și apoi – decelularizare cu 0,25% sau 0,5% SDS. Ulterior, pulpa dentară a fost perfuzată cu 1-1,5 L de soluție de PBS 1%. Segmentele de pulpă dentară intactă și decelularizată au fost fixate în formol 10% și ulterior s-a efectuat pregătirea histologică a probelor și colorarea H-E. Extracția acizilor nucleici a fost efectuată conform protocolului de extracție QIAamp Blood Mini Kit (2003). Fiecare probă a fost cuantificată cu un spectrofotometru (Nano Drop 200 C Thermo Scientific). Conținutul de hidroxiprolină a fost determinat pe un spectrofotometru pe baza oxidării hidroxiprolinei în pirol sub acțiunea cloraminei B.

Evaluarea macroscopică a pulpei dentare la începutul experimentului a arătat că, după spălarea acesteia cu apă distilată (prima metodă) și cu apă distilată și citrat dextroză fosfat (a doua metodă), pulpa dentară a devenit mai palidă în comparație cu a doua (fig. 7). S-au observat însă diferențe vizuale de culoarea lichidului de perfuzie: lichidul de perfuzie obținut în urma spălării cu amestecul distilat și anticoagulant avea o culoare maro-intens, ceea ce se explică prin îndepărtarea mai eficientă a cheagurilor de sânge.

Histologic, pulpa dentară, are o structură și o componență celulară caracteristică unei pulpe dentare sănătoase.



Fig. 7. Proces de perfuzie a pulpei dentare cu detergent și soluție anticoagulantă

De asemenea, rezultatele macroscopice după decelularizare au arătat o decelularizare uniformă a pulpei dentare și o culoare albicioasă în al doilea lot experimental comparativ cu primul lot în care pulpa dentară a fost spălată fără soluție anticoagulantă, culoarea galbenă indicând prezența rezidului celular.

În cazul schelelor de pulpă dentară decelularizată fără folosirea soluției anticoagulante, am observat că există conglomerate celulare, detritus necrotic și celule autolizate. Arhitectura pulpei dentare conjunctivala este dezorganizată, peretele vascular este în unele porțiuni cu conturul contractat și perivascular autolizat al elementelor celulare.

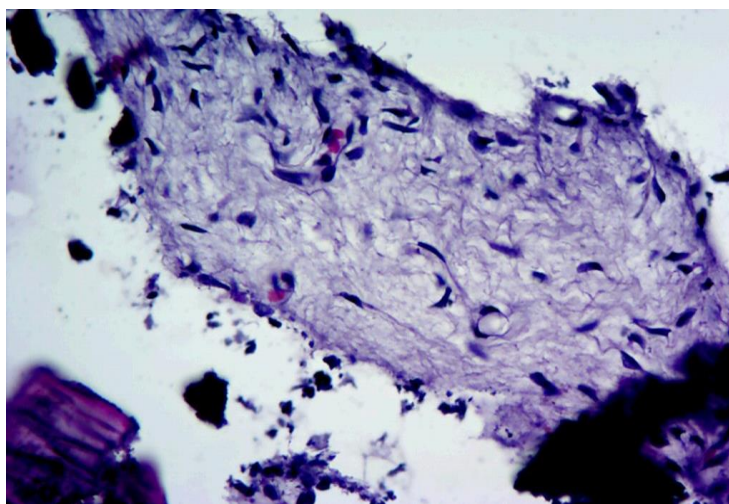


Fig. 8. Pulpă dentară decelularizată prin SDS fără spălare cu anticoagulant. H-E, x 90

Schelele pulpei dentare decelularizate cu SDS și spălate inițial cu anticoagulant au evidențiat histologic: conturul îngroșat al peretelui vascular central, arhitectura conjunctivală reținută. Conturul îngroșat al peretelui vascular este clarificat de prezența fibrelor de collagen care constituie o condiție favorabilă pentru matricele utilizate pentru recelularizare (fig. 8).

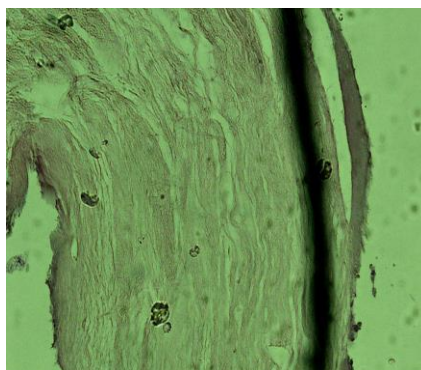


Fig. 9. Pulpă dentară decelularizată prin SDS cu spălare anticoagulantă. H-E, x 90

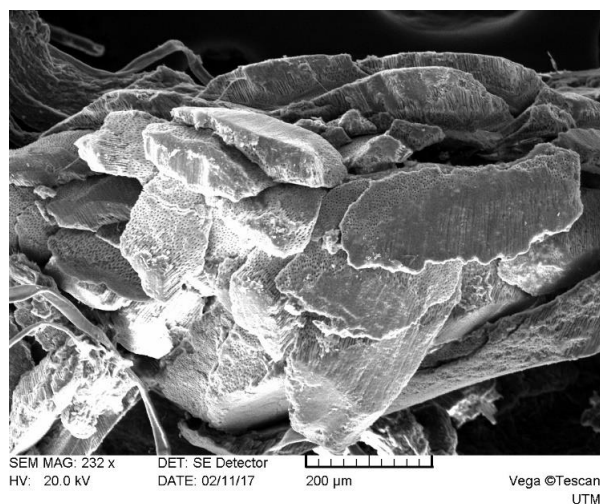
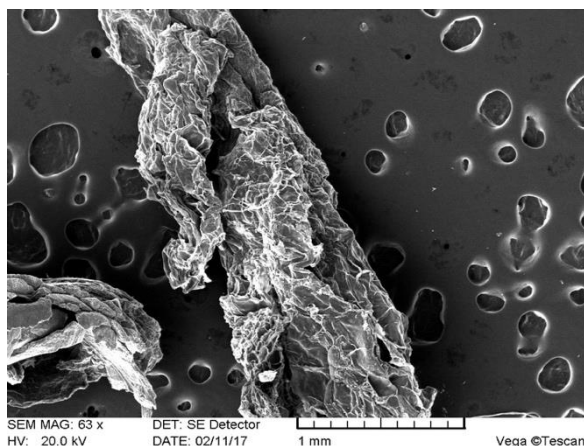
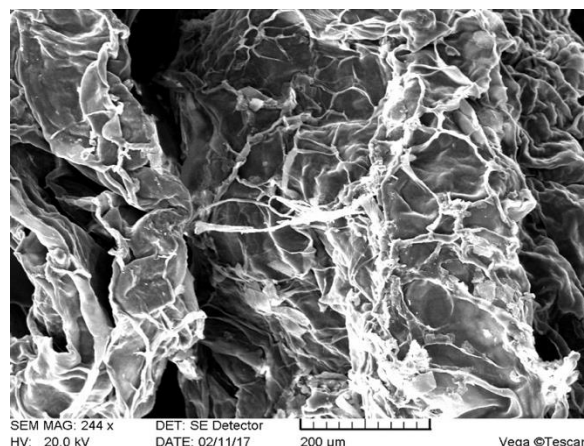


Fig. 10. Imagine a pulpei dentară umană decelularizată 24 ore SDS. Baleajul electronic arată structură poroasă a pulpei dentare decelularizată în secțiunile transversale



a



b

**Fig. 11. Baleaj electronic Imagine a pulpei dentară umană după 24 ore de decelularizare. Baleajul electronic arată structură poroasă a pulpei dentare decelularizată care este lipsită de elemente celulare
a) amplificarea 63x; b) amplificarea 244x**

Studiul histologic comparativ al schelelor de pulpă dentară decelularizată a demonstrat o eficacitate mai mare a decelularizării prin spălarea anterioară cu anticoagulant (fosfat citrat dextroză) cu o arhitectură bună de collagen păstrată.

Pentru aprecierea calității decelularizării, adică posibile celule care au rămas după decelularizare, o altă metodă utilizată reprezintă cantitatea de ADN. ADN reprezentând nucleul celulei, este normal să fie într-un țesut celularizat, dar cantitatea trebuie să fie diminuată radical după decelularizarea țesuturilor.

Dacă comparăm concentrația de ADN obținută din probele biologice din pulpa dentară supusă decelularizării prin ambele metode cu concentrația de ADN obținută din țesutul intact al pulpei dentare observăm că aceasta este mai mică. În probele obținute prin decelularizare cu SDS, care au fost spălate cu soluție anticoagulantă, concentrația de ADN a fost de 1,04, 0,25 ng/μl, ceea ce a constituit de 5 ori mai puține resturi celulare decât în probele decelularizate SDS și a fost spălată anterior doar cu apă distilată la care concentrația este de 1.266 ng/μl. Această manifestare poate fi explicat prin faptul că anticoagulantul folosit a permis îndepărtarea mai eficientă a cheagurilor de sânge, permițând astfel agentului de decelularizare ionic să treacă prin întreaga suprafață a pulpei dentare și să o elimine.

Deasemenea după decelularizare rămâne, în principiu, scheletul (matricea) țesutului, în cazul nostru a pulpei dentare, care este constituită preponderent din collagen. Astfel cantitatea de collagen pentru o unitate de volum, în matrice devine mai mare comparativ cu țesutul nativ. Întrucât caracterizarea schelelor extracelulare după decelularizare este o condiție necesară pentru repopularea celulară ulterioară *in vitro*, a fost determinat conținutul de hidroxiprolină liberă care se consideră a fi direct proporțional cu conținutul de collagen din materialul biologic analizat (pulpa dentară). Prin urmare, a fost obținută o cantitate de hidroxiprolină de $0,156 \pm 0,07$ mM/g de țesut uscat din material biologic intact, care este mult mai mică în comparație cu cantitățile de hidroxiprolină din probele decelularizate care sunt $2,035 \pm 0,95$ mM/g de țesut uscat prin metoda din care nu s-a folosit fosfat citrat dextroză și 0,22 prin metoda în care s-a folosit.

Pulpele dentare decelularizate cu soluție de sodiu dodecilsulfat de 0,5% au prezentat remanieri morfologice semnificative după eliminarea componentelor celulare ale zonei periferice și zonei centrale ale pulpei dentare și prezintă o arhitectonică conjunctivă organizată (fig. 12).

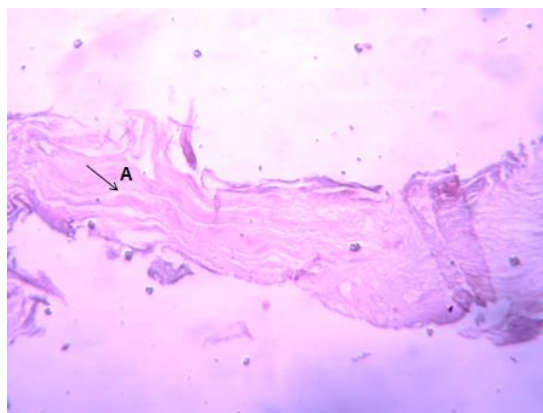


Fig. 12. Pulpa dentară decelularizată cu soluție SDS 0,5% (A), arhitectonică conjunctivă a pulpei dentare, fibre collagenice H-E x 90

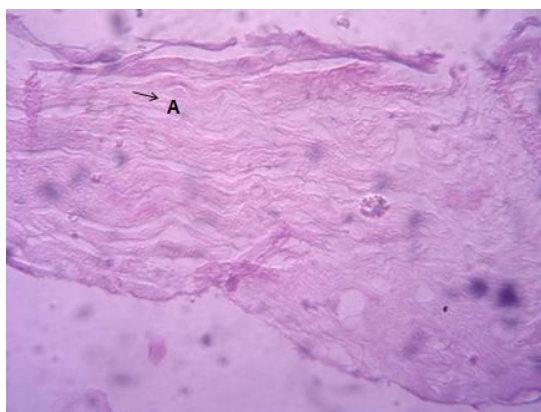


Fig. 13. Pulpă dentară decelularizată cu SDS (A), arhitectonică conjunctivă a pulpei dentare, fibre colagenice H-E x 90

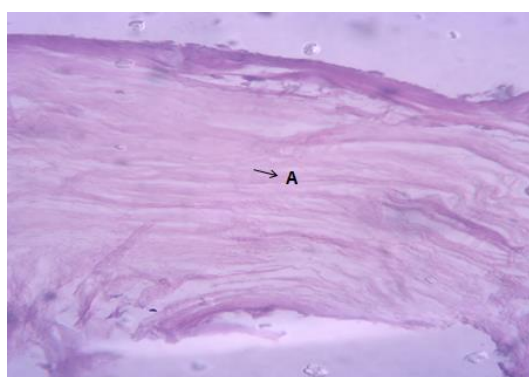


Fig. 14. Pulpă dentară decelularizată cu SDS (A), arhitectonică conjunctivă a pulpei dentare, fibre colagenice H-E, x90

Toate pulpele dentare decelularizate au prezentat o decelularizare completă prin lipsa elementelor celulare și obținerea unei matrici extracelulare colagenice uniform decelularizată.

Evaluarea efectului citotoxic al pulpei dentare decelularizate prin metoda MTT pe culturi celulare obținute din măduva osoasă.

Pentru evaluarea efectului citotoxic al pulpei dentare decelularizate, pentru a stabili dacă ea este, după procesarea efectuată – decelularizare, liofilizare, compatibilă cu celulele vii și dacă nu au un efect citotoxic. Pentru aceasta a fost utilizată metoda MTT pe culturi celulare obținute din măduva osoasă de iepure.

Pulpa dentară decelularizată și liofilizată, sterilă, a fost secționată în fragmente de 1x1 mm pentru experimentul de testare a toxicității.

Au fost utilizate celule stem obținute din măduvă osoasă de iepure, cultivate în soluție DMEM (HiMedia), cu 10% FBS, 5% CO₂, temperatura 37°C și umiditatea de 85% în incubatorul Binder. Experimentul a fost relizat pe plăci pentru cultivarea celulelor cu 96 de godeuri. Celulele au fost repartizate pe godeuri în cantitatea de 5x10⁴ celule pe godeu. După 24 de ore, necesare pentru

adaptarea celulelor, în godeuri au fost plasate câte un fragment de pulpă dentară, preparate în prealabil. Citirea a fost efectuată la 0 zile, până a fi plasate fragmentele de pulpă dentară decelularizată; la 24; 48 și 72 de ore după plasarea în mediu a fragmentelor examinate. Toate loturile au fost realizate în triplicate pentru fiecare termen, concomitent a fost și lotul martor în care nu au fost plasată pulpă decelularizată. Evaluarea rezultatelor a fost efectuată prin citirea în Spectrofotometrul VersaMax, Microplate reader, SUA în lungimea de undă 570 nm (Tabelul 2.; Figura 15).

Tabelul 2. Evaluarea efectului citotoxic al pulpei dentare decelularizate prin metoda MTT pe culturi celulare obținute din măduva osoasă

Pulpa decelularizată	Viabilitatea celulară la 24 ore, %				Viabilitatea celulară la 48 ore, %				Viabilitatea celulară la 72 ore, %			
	S1	S2	S3	Media	S1	S2	S3	Media	S1	S2	S3	Media
Lotul I	98	97	99	98	94	97	98	96,3	97	96	97	96,6
Lotul II	98	98	97	97,6	99	95	97	97	99	97	96	97,3
	p = 0,67				p = 0,54				p= 0,58			
	Diferență statistic nesemnificativă între loturile de pulpe decelularizate.											

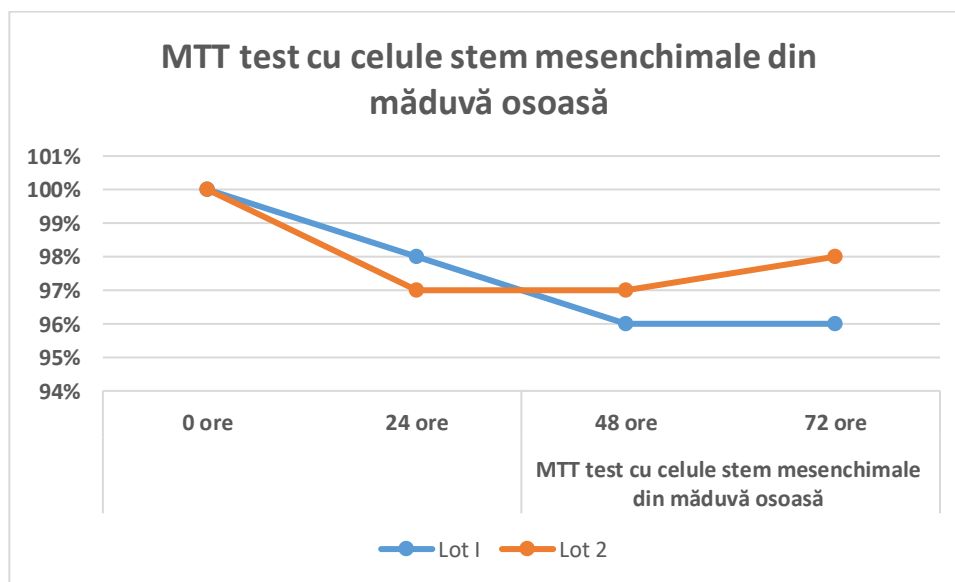


Fig. 15. Diagrama rezultatelor testului de toxicitate (MTT) ale pulpei dentare decelularizate și liofilizate din loturile 1 și 2. Diferență statistic nesemnificativă a testului de toxicitate. $p > 0.05$

SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

După câteva decenii de experimente, terapia cu celule stem devine o speranță pentru medicină. Cu fiecare experiment desfășurat, cunoștințele despre capacitățile celulelor stem sunt în creștere, deși rămân mai multe obstacole de depășit. În pofida acestor impedimente, influența celulelor stem în medicina regenerativă și transplantologie este imensă. În prezent, bolile neurodegenerative netratabile au posibilitatea de a deveni tratabile cu terapia de celule stem. Pluripotența indusă permite utilizarea de către pacient a propriilor celule [12]. Băncile de țesuturi devin din ce în ce mai populare, pe măsură ce adună celule care sunt o sursă eficientă pentru medicina regenerativă. Odată cu dezvoltarea terapiei de celule stem și a tuturor beneficiilor medicinei regenerative, suntem capabili să prelungim viața umană. Dinții sunt o sursă ușor accesibilă pentru a recolta celule stem postnatale de la diferite țesuturi, inclusiv din pulpa dentară, ligamentul parodontal, folicul dentar, papila apicală din dinți în curs de dezvoltare [28]. Pulpa dentară este un țesut moale, situat în cavitatea pulpară a dintelui, multistructural, compus din fibroblaste, odontoblaste, limfocite, celule endoteliale și alte celule. Pulpa dentară sănătoasă este importantă datorită funcțiilor formative, senzoriale și de protecție ale complexului pulpă-dentină. Funcțiile sale includ furnizarea de nutrienți dinților, formarea dentinei, detectarea, apărarea și alte funcții fiziologice. Pulpita ca boală și necroza pulpară prezintă patologii frecvente cauzate de traumatisme și carii dentare [4]. Cu volumul mic al canalului radicular și foramenul apical îngust, alimentarea cu sânge a pulpei este insuficientă; prin urmare, odată ce pulpa este inflamată, deseori, ea poate provoca necroză pulpară irecuperabilă. Odată cu dezvoltarea medicinei regenerative, regenerarea pulpei cu funcții biologice este o nouă direcție pentru tratarea bolilor pulpei dentare. Prin transplantarea celulelor stem împreună cu factori de creștere și o schelă biologică în cavitatea pulpară pregătită, celulele stem pot prolifera și se pot diferenția în diferite celule din pulpă, pentru a obține o regenerare funcțională a pulpei [17].

TC a devenit o metodă indispensabilă în practica dentară. Aceasta se utilizează pe scară largă în tratamentul endodontic pentru examinarea morfologiei canalelor radiculare. Măsurarea și calcularea volumului camerei pulpare prin TC furnizează informații mai exacte pentru a estima numărul posibil de celule din pulpa dentară [21].

Prin urmare, scopul acestui studiu a fost de a utiliza TC pentru evaluarea volumului camerei pulpare la diferite grupuri de dinți.

Determinarea volumului camerei pulpare prin metoda neinvazivă permite prezicerea cu aproximație a numărului de celule nucleate care pot fi obținute dintr-un dinte până la extragerea lui, astfel fiind excluși dinții cu potențial mai mic de celule [22].

Selectarea secțiunii optime pentru măsurarea parametrilor a fost partea critică a acestui studiu. Planul coronal a fost utilizat pentru cea mai bună vizualizare a întregii coroane și a zonei de furcație. Ajustarea imaginilor TC din partea vederii axiale și sagitale ne-a permis să selectăm secțiunea coronală optimă pentru a măsura parametrii privind reperele camerei pulpare [16].

Utilizând vizualizarea axială ca un ghid, ne-a permis amplasarea exactă a parametrilor doriți și a împiedicat suprapunerea parametrilor anatomici în diferite planuri. O astfel de standardizare ar asigura reproductibilitatea măsurărilor [13].

În acest studiu, prezentăm 2 tipuri de măsurări ale volumului camerei pulpare la molarii permanenți: 1) măsurări de la vârful cuspidului, cum ar fi în rapoartele anterioare efectuate de Musikants, și 2) măsurări din fosa centrală. Deoarece pregătirea de acces este adesea inițiată în centrul suprafeței ocluzale, fosa centrală pare a fi un punct de referință mai adecvat decât vârful cuspidului utilizat în studiile anterioare. În plus, multe variabile pot afecta înălțimea cuspidală, cum ar fi locația și dimensiunea [11]. Bifurcația este întotdeauna menționată ca un punct unde se termină structura dentară și se separă rădăcinile. Cu toate acestea, furcația este o zonă care rezultă din separarea a două sau mai multe rădăcini [32]. Cu ajutorul vederii axiale, a fost remarcat faptul că punctul de separare a rădăcinilor nu se poate întâmpla întotdeauna la același nivel de-a lungul întregii zone de furcație. S-au observat diferite adâncimi la nivelul bifurcației, mai frecvent întâlnite la maxilarul superior (69%) decât cel inferior (34%), indicând faptul că furcația este o zonă și nu poate fi menționată ca un punct [15]. Alinierea scanărilor în centrul dintelui poate duce la suprapunerea reperelor anatomice și la eșecul de a identifica cel mai coronal punct unde rădăcinile se separă. În acest studiu, am identificat zona de furcație la 2 niveluri diferite, ghidate prin vederea axială. Au fost identificate niveluri diferite de adâncime ale zonei de bifurcație. În pofida variației largi a lungimii dinților, înălțimea coroanei pare a fi foarte asemănătoare la toți molarii (8-9 mm de la fosa centrală și 10-11 mm de la vârful cuspidului) [8]. Distanța de la fosa centrală până la bifurcația la molarii maxilari (8,78-0,79 mm) a fost foarte asemănătoare cu cea a molarilor mandibulari (8,53-0,65 mm). Variația este, probabil, cauzată de discrepanța înălțimii cuspidale dintre molarii maxilarului superior și inferior. Înălțimea camerei pulpare a avut cea mai mare valoare pentru molarii maxilari (38,2%) și pentru cei mandibulari (44,4%). Aceste constatări au fost similare cu rapoartele anterioare. O astfel de variație mare este, probabil, cauzată de depunerea de dentină în curs de desfășurare, ceea ce reduce înălțimea camerei pulpare. Se poate interpreta că procesul de calcifiere apare la tavanul camerei pulpare ca un mecanism de protecție la stimulii externi. Acest detaliu a fost raportat de mai mulți autori – reducerea înălțimii camerei pulpare este rezultatul depunerii dentinei pe podea mai mult decât pe plafon [19].

Toate aceste metode dau naștere la celulele dentare care au proprietăți de celule stem. Efectele diferitelor metode de izolare a celulelor pulpare au fost puse, de asemenea, sub semnul întrebării. Unul dintre primele studii ale cercetătorului Nakashima au arătat că cele patru tipuri de separări enzimatică (tripsina, collagenaza cu și fără tripsină, amestec tripsină-collagenaza) nu au avut efect asupra caracteristicilor morfologice ale celulelor pulpare, dar pretratatamentul cu tripsină și metoda de digestie cu collagenază au dat cel mai mare număr de celule izolate. Cu toate acestea, metoda de digestie enzimatică permite dezvoltarea diferitelor tipuri de celule. Nakashima a raportat 3 morfologii diferite în ax, stelate și celulele epiteliale. Huang a arătat tipuri de colonii compacte și largi după digestie enzimatică. Deoarece digestia enzimatică asigură ca toate tipurile de celule să fie eliberate din țesut, nu este surprinzător să observăm diferite celule. Cu toate acestea, numai celulele care au un aspect fibroblastic au putut să supraviețuiască după mai multe pasaje ale celulelor mezenchimale promovate de mediul de cultură [25, 26]. DPSC-urile pot fi izolate prin trei metode: metoda digestiei enzimatică, metoda prin explant și metoda prin explant cu fixarea sub lamelă în mediu. Prima metodă implică colectarea țesutului pulpar în condiții sterile, cu digestia enzimelor corespunzătoare (collagenază, dispază, tripsină), cultivate în vase de cultură conținând, în special, mediul suplimentat cu aditivi necesari, a doua metodă implică faptul că pulpa extrasă este tăiată în segmente de 2-3 mm și direct incubată în vase de cultură conținând mediu esențial cu suplimente. Este, în general, necesară o perioadă de două săptămâni pentru a permite unui număr suficient de celule să migreze din țesut [10]. Odată ce aceste celule sunt cultivate pe o suprafață bidimensională, este posibil de a le transfera pe o structură tridimensională. Matricea oferă un mediu 3D pentru celule ca să se atașeze și să crească, prin urmare, mimând starea *in vivo* [27].

O problemă relevantă pentru utilizarea terapeutică a celulelor stem este cantitatea esențială de celule pentru a obține un efect optim. Extinderea celulelor stem în cultură este un pas crucial pentru medicina regenerativă și s-a făcut o încercare considerabilă de a evalua consecințele cultivării asupra comportamentului celulelor stem [21].

De obicei, au fost folosite două metode pentru a cultiva celulele stem ale pulpei dentare: 1) metoda de digestie a enzimelor și 2) metoda explantului. Datorită scăderii viabilității celulare legate de metoda de tratament cu enzime, cea a explantului a fost sugerată ca metodă secundară [30].

Al treilea molar se dezvoltă ultimul, așadar este, în mod normal, într-un stadiu incipient de dezvoltare. Studiile au arătat că molarii 3 impactați extrași sunt capabili să producă o cantitate optimă de țesut de pulpă dentară pentru izolarea DPSC-urilor. Un alt punct pozitiv este că recoltarea de celule stem din acest țesut neutilizat după extracție nu provoacă controverse etice.

În acest experiment, metoda de izolare a avut un efect benefic asupra expansiunii populației, iar cea de-a treia metodă îmbunătățită a oferit cea mai mare expansiune *in vitro* decât cele două metode menționate și poate oferi cele mai multe celule pentru aplicații biotehnologice și biomedicale. Huang și colaboratorii au comparat metodele de digestie cu enzime și explant și au constatat că celulele izolate prin digestia enzimatică au o rată de proliferare mai mare decât cele izolate prin cealaltă metodă [21]. Deși rezultatul nostru este similar cu cel al Huang și colaboratorii, se pare că celulele izolate prin metoda noastră îmbunătățită au fost mai puțin deteriorate și, prin urmare, au fost suficient de sănătoase pentru a se propaga mai mult timp *in vitro* decât celelalte metode. Poate că celelalte metode dăunează celulelor sau, alternativ, au eliminat elementele critice din nișa endogenă [23].

Cu metoda noastră îmbunătățită, la numai 1 până la 2 zile după cultura primară, au apărut populații eterogene de celule stem cu creștere rapidă. Există diferite tipuri de celule în pulpă. Odontoblastele, a căror funcție biologică este dentinogeneza, fac parte din suprafața exterioară a pulpei dentare. Capilarele și fibrele nervoase mici se ramifică în stratul subodontoblastic. Zona este bogată în celule ce conțin fibroblaste și celule nediferențiate. Zona pulpară centrală include vasele mari și nervii. Majoritatea celulelor pulpei sunt fibroblaste. Aceste celule prezintă variații mari în gradul lor de diferențiere. Poate că mai multe celule stem sunt capabile să formeze toate aceste celule. Emitem ipoteza că, posibil, există mai mult de un tip de celule stem în pulpă și că diferite metode de izolare ar putea identifica tipuri de celule distincte [24].

Deși potențialul terapeutic al celulelor stem este promițător, trebuie luate în considerare numeroase chestiuni înaintea utilizării clinice. Problemele de etică sau politicile guvernamentale restricționează izolarea și cultivarea celulelor stem embrionare umane. Privite din perspectiva siguranței, celulele stem embrionare pot dezvolta adesea tumori în urma transplantării. Mai mult decât atât, există posibilitatea ca celulele stem embrionare să nu depășească incompatibilitatea imunologică între gazdă și transplant [34].

CONCLUZII GENERALE

1. Dimensiunile camerelor pulpare în funcție de gen au arătat că, pentru molarul 3, volumul camerei pulpare constituie la bărbați $17,2 \pm 2,3 \text{ mm}^3$ și la femei $17,88 \pm 2,1 \text{ mm}^3$, diferența nefiind semnificativă. Pe parcursul cercetării a fost studiată modalitatea de obținere a celulelor din țesuturile dentare și de confecționare a unui dispozitiv pentru obținerea pulpei dentare.

2. Imaginile TC împreună cu metodele utilizate anterior constituie instrumente utile și precise pentru determinarea parametrilor camerei pulpei. Determinarea volumului camerei pulpare prin metoda neinvazivă permite prezicerea cu aproximație a numărului celulelor nucleate care pot fi obținute dintr-un dinte până la extragerea lui, astfel fiind excluși dinții cu potențial mai mic de celule.

3. Evaluarea comparativă a conținutului de țesuturi ADN după decelularizare prin cele două metode în raport cu țesutul intact demonstrează că metoda decelularizării pulpei dentare cu SDS și spălare cu soluție anticoagulantă de fosfat citrat dextroză prezintă rezultate mai bune.

4. Metoda de decelularizare utilizată menține arhitectura conjunctivă a fibrelor de collagen, conținutul de hidroxiprolină în MEC demonstrează fezabilitate pentru utilizarea ulterioară ca structură tridimensională în ingineria tisulară pentru recelularizare.

5. Se recomandă continuarea studiilor și elaborarea unui protocol/tehnologie de recelularizare a pulpei dentare decelularizate cu celule proprii, astfel ca celularizarea să fie uniformă și pe toată matricea.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Colectarea pulpei dentare, pentru obținerea celulelor, se efectuează la pacienții fără semne de infecție în regiunea dintelui, cu funcția normală a organelor vitale și a măduvei osoase colectate prin puncția aripii osului iliac sau a metafizei tibiale proximale, sub anestezie infiltrativă. Pentru cultivarea celulelor autologice din măduva osoasă, se recomandă utilizarea autoserului, care poate fi obținut din sângele periferic. Cantitatea de ser necesară pentru obținerea autogrefei celulare este de 12 ± 6 ml.

2. Pentru ingineria tisulară a dintelui/pulpei dentare, este necesară izolarea celulelor cu fenotip corespunzător din pulpa dentară, multiplicarea lor în medii de cultură, HAM, care conține 10% SBF sau autoser, umiditate 85%, 5% conținutul de CO_2 în incubator cu CO_2 , la temperatura de 37°C .

3. Pentru cultivarea mai eficace a celulelor din pulpa dentară, se recomandă utilizarea autoserului care poate fi obținut din sângele periferic al donatorului de dinte. Cantitatea de ser necesară pentru cultivare se recomandă a fi de 12 ± 6 ml.

4. Se recomandă efectuarea decelularizării pulpei dentare cu SDS 0,2% și spălarea ulterioară abundentă cu soluție de anticoagulant de fosfat citrat dextroză. Prin urmare, este esențial să se obțină o schelă pentru regenerarea pulpei dentare care să conțină MEC caracteristică pulpei dentare, pentru a promova diferențierea odontoblastelor și formarea dentinei.

5. Pentru a stabili că decelularizarea este completă, se recomandă efectuarea unui studiu morfologic în vederea vizualizării nucleelor rămase și a determinării conținutului de ADN în țesut.

6. Pentru o păstrare ulterioară a pulpei dentare decelularizate, se propune liofilizarea în vid, ceea ce permite păstrarea ei la temperatura mediului ambiant și facilitarea transportării.

BIBLIOGRAFIA

1. ABABII, I., CIOBANU, P., EȘANU, N. Actualități și perspective în transplantarea celulară. *Curierul Medical*. 2005. V.3 (285), pp. 42-47.
2. ABABII, I., CIOBANU, P., GHIDIRIM, GH., NACU, V. Optimizarea regenerării reparatorii a tesuturilor și imunogenezei locale în contextul funcționării nanosistemelor naturale. Chisinau. „Tipografia centrală”, 2011, p. 336.
3. BARRY, F. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69(3), 2003, pp. 250-256.
4. CHIEKER M. ș. a. The use of four - colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells, *J Anatomy*, vol. 204, 2004, pp. 133-139.
5. CIUDIN, E., MARINESCU, D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Iași, Ed., Moldogrup, 1997, p. 223.
6. COUBLE, M. L. et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66(2), 2000, pp. 129-138.
7. D'AQUINO, R., GIANPAOLO, P., GREGORIO LAINO. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews* 4.1, 2008, pp. 21-26.
8. ENNEKING, W. F., CAMPANACCI, D. A. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am.*, vol. 83, 2001, pp. 971-986.
9. FERGAL, J., O'BRIEN, M. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, V. 14. (3), 2011, p. 1369.
10. GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J. et.al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *pro c. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 97, 2000, pp. 13625 -13630.
11. GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8), 2000, pp. 531-535.
12. GRONTHOS, S., ZANNETTINO, A. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. *Methods Mol Biol* 449, 2008, pp. 45-57.
13. GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116(Pt 9), 2003, pp. 1827-1835.
14. HUANG, GT., SONOYAMA, W., CHEN, J., PARK, SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. V. 324 (2), 2006, pp. 225-236.
15. HUANG, GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)*. V 3, 2011, pp. 788-800.
16. HUANG, GT., SHAGRAMANOVA, K., CHAN, SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*. V. 32 (11), 2006, pp. 1066-1073.
17. HUNG, E. et. al. Dental pulp-derived stem cell (DPSC) survival and viability may correlate with specific patient demographics, 2013, pp. 109-120.
18. HUNG, C. N. et al. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. *Biomaterials* 32(29), 2011, pp. 6995-7005.
19. IOHARA, K., NAKASHIMA, M., ITO, M. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. V 83 (8), 2004, pp. 590-595.
20. KADAR, K. et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 7, 2009, pp. 167-175.
21. LANGER, R., VACANTI, J.P. Tissue engineering. In: *Science*. vol. 260, no. 5110, 1993, pp. 920-926.

22. MORI, G., CENTONZE, M., BRUNETTI, G. Osteogenic properties of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*, V. 24 (2), 2010, pp. 167-175.
23. NACU, V. Ingineria tisulară în recuperarea defectului osului radial în experiment. *Anale științifice ale USMF "Nicolae Testemițanu"*, V. 4, 2007, pp. 245-251.
24. OLIVIER, V., FAUCHEUX, N., HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery, *Drug Discov Today*, 9, 2004, pp. 803-811.
25. PASHLEY, D. H. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 7(2), 1996, pp. 104-133.
26. QUIRICI, N. et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by antinerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30(7), 2002, pp. 783-791.
27. REDDI, A. H. Role of extracellular matrix components in bone development and repair. *Connect.Tissue*. V. 21, 1989, pp. 13-14.
28. SAMSON, S. ș.a. Dental pulp stem cell for regenerative medicine. In: *2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ICNBME-2013)*. 18-20 April 2013. Chișinău, 2013, pp. 443-446. ISBN 978-9975-62-343-8.
29. SAMSON, S. Techniques of dental pulp decellularization, In: *The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*. Chisinau, 2021, pp. 480-483. ISBN 978-3-030-92328-0.
30. TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 38(3), 2004, pp. 314-320.
31. TZIAFAS, D. et al. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 28(2), 2000, pp. 77-92.
32. URIST, M.R., MIZUTANI, H., CONOVER, M.A., LIETZE, A., FINERMAN, G.A. Dentin, bone, and osteosarcoma tissue bone morphogenetic proteins. In: *Prog Clin Biol Res*. 1982, vol. 101, pp. 61-81.
33. VALTA, M. P. Regulation of osteoblast differentiation: A novel functions for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology* 2006, vol. 147, pp. 2171-2182.
34. WAGEY, R., SHORT, B. Isolation, enumeration, and expansion of human mesenchymal stem cells in culture. *Methods Mol Biol*. 2013, pp. 315-334.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

Lucrări științifice

Articole în reviste științifice

- în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei
- categoria B +

1. **SAMSON, S.**, NACU, V. The dental pulp chamber evaluation by using cone-beam computed tomography. In: *Moldovan Medical Journal*. 2021; 64 (2), pp. 49-52. ISSN 2537-6381.
 - categoria B
2. **SAMSON, S.**, BURLACU, V., ZOTA, E., NACU, V. Stem cells in the future of dental care. În: *Curierul Medical*. 2011, nr. 3 (321), pp. 35-40. ISSN 1857-0666.
 - categoria C
3. **SAMSON, S.** ș.a. Dintele ca sursa de celule stem. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 2012, ediția a XIII-a, vol. 4, pp. 481-484. ISSN 1857-1719.

Articole în culegeri științifice

- în lucrările conferințelor științifice internaționale

4. **SAMSON, S.** ș.a. Dental pulp stem cell for regenerative medicine. In: *2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ICNBME-2013)*. 18-20 April 2013. Chișinău, 2013, pp. 443-446. ISBN 978-9975-62-343-8.
5. **SAMSON, S.** Techniques of dental pulp decellularization, In: *The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*. Chisinau, 2021, pp. 480-483. ISBN 978-3-030-92328-0.

Rezumate în lucrările conferințelor științifice

- în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

6. **SAMSON, S.** Stem cells in dental care. In: *The 4th international Medical Congress for Students and young doctors MedEspera*. Chisinau, 2012, pp.223-224. ISBN 978-9975-47-174-9.
7. **SAMSON, S.**, NACU, V., BURLACU, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells for regenerative medicine. In: *The 3rd International Conference Health Technology Management*. Chisinau, 2016, pp. 109-110.

Teze în culegeri științifice

- în lucrările conferințelor științifice internaționale

8. NACU, V. ș.a. Bone non union treatment by autologous cells grafts. In: *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*. Davos, Switzerland, 2017, P734.

- în lucrările conferințelor științifice naționale

9. **SAMSON, S.**, NACU, V., BURLACU, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells. În: *Materialele Sesiunii a XIX-a a Zilelor uniunii medicale balcanice și al II-lea Congres în medicina de urgență din Republica Moldova*. 22-24 septembrie 2013. Chisinau, 2013, p.110. ISSN 0041-6940.

Brevete de invenții

- SAMSON S.** ș.a. *Dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras*. MD 559 (13)Y, A61C 19/00 (2006.01); Cererea depusă 2012.11.30, BOPI, nr. 11/2012.

ADNOTARE

Samson Stella „Țesuturile dentare moi – sursă de celule stem pentru medicina regenerativă”, teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2023

Structura tezei: lucrarea este expusă pe 117 pagini și include introducere, 4 capitole, discuții, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 153 de titluri. Teza este ilustrată cu 12 tabele, 34 de figuri și 3 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 9 lucrări științifice.

Cuvintele-cheie: celule stem, pulpă dentară, decelularizare, inginerie tisulară, grefe celulare.

Domeniul de studiu: medicină regenerativă, stomatologie, inginerie tisulară.

Scopul lucrării: studierea celulelor progenitoare din țesuturile dentare moi, obținerea unei structuri 3D a pulpei dentare prin decelularizarea acesteia pentru utilizarea lor în medicina regenerativă.

Obiectivele lucrării: evaluarea caracteristicilor pulpei dentare, a volumului, a componenței celulare; studierea modalității de obținere a celulelor din țesuturile dentare și confecționarea unui dispozitiv pentru obținerea pulpei dentare; caracterizarea celulelor stem din țesuturile dentare: studiu comparativ al activității celulelor obținute din diferite țesuturi dentare (dinți temporari și permanenți); evaluarea modalităților de decelularizare și recelularizare a pulpei dentare; elaborarea unor recomandări privind utilizarea celulelor stem obținute în medicina regenerativă.

Noutatea și originalitatea științifică: studierea procesului de obținere a celulelor stem din țesuturile dentare și a capacității lor de proliferare; confecționarea unui dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras.

Semnificația teoretică: crearea unui concept de obținere a celulelor stem dentare și evaluarea posibilității de utilizare a acestora în diverse domenii ale medicinei moderne, implementarea în Republica Moldova a medicinei regenerative în scopul utilizării tehnologiilor celulare.

Valoarea aplicativă a lucrării: tehnica analizată tinde a fi un prim pas în domeniul ingineriei tisulare, care va deschide noi căi în direcția obținerii unor structuri dento-parodontale din țesuturi vii, prelevate de la subiecți tineri. S-a studiat posibilitatea obținerii unor grefe celulare pentru medicina regenerativă destinată restabilirii țesuturilor afectate din regiunea maxilo-facială.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele studiului au fost implementate în procesul instructiv-metodic și de cercetare în cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, Banca de țesuturi și celule umane (act de implementare nr. 10, anexa 1).

АННОТАЦИЯ

Самсон Стелла «Мягкие ткани зуба – источник стволовых клеток для регенеративной медицины», диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Кишинэу, 2023

Структура работы: работа представлена на 117 листа основного текста и включает: введение, 4 главы, обсуждения, общие выводы и рекомендации, библиография насчитывает 153 источников. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами, 34 рисунками, 3 приложениями. Результаты опубликованы в 9 научных статьях, разработано одно изобретение.

Ключевые слова: стволовые клетки, пульпа, тканевая инженерия, децеллюляризация, трансплантаты клеток.

Область исследования: стоматология, регенеративная медицина, тканевая регенерация.

Задачи работы: оценка характеристик пульпы зуба, ее объема, клеточного состава; изучение способа получения клеток из тканей зуба и изготовление устройства для получения пульпы зуба; характеристика стволовых клеток тканей зубов, сравнительное изучение активности клеток, полученных из различных тканей зубов (временных и постоянных), оценка методов децеллюляризации и рецеллюляризации пульпы зуба, разработка рекомендаций по использованию стволовых клеток, полученных для регенеративной медицины.

Научная новизна и оригинальность: был изучен процесс получения стволовых клеток из тканей зубов и их способность к пролиферации. Было разработано устройство для дробления извлеченного зуба.

Теоретическое значение: создать концепцию для получения зубных стволовых клеток и использования их в различных областях современной медицины, внедрение в Молдове с точки зрения для использования в регенеративной медицине и клеточных технологиях.

Значение работы: этот предложенный метод предназначен в качестве первого шага в тканевой инженерии, чтобы открыть новые пути для получения стоматологических пародонтальных структур из живых тканей, взятых от молодых субъектов.

Внедрение научных результатов: результаты исследования были внедрены в медицинском университете «Николае Тестемицану», лаборатория Тканевой инженерии и клеточных культур (акт реализации № 10, приложение 1).

SUMMARY

Stella Samson „Dental soft tissues - source of stem cells for regenerative Medicine” PhD thesis in medical sciences, Chisinau, 2023

Structure of the thesis: the paper is exposed on 117 pages of electronic text and includes: introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 153 sources. The thesis is illustrated with 12 tables, 34 figures, 3 annexes. The results obtained are published in 9 scientific papers.

Key words: stem cells, dental pulp, tissue engineering, decellularization, cellular grafts.

Domain of study: dentistry, regenerative medicine, tissue engineering.

Purpose of the reaserch work: obtaining and characterization of stem cells from dental tissues for tissue regeneration.

Objectives: evaluation of dental pulp characteristics, volume, cellular composition; studying the method of obtaining cells from dental tissues and making a device for obtaining dental pulp; characterization of stem cells from dental tissues, comparative study of the activity of cells obtained from different dental tissues (temporary and permanent teeth), evaluation of methods of decellularization and recellularization of the dental pulp, development of recommendations for the use of stem cells obtained for regenerative medicine.

Novelty and scientific originality: the process of obtaining stem cells from dental tissues and their proliferation capacity has been studied. A device for fragmentation of the extracted tooth has been developed.

Theoretical significance: consists in the creation of a concept for obtaining dental stem cells and the possibility to use it in various fields of modern medicine, the implementation of regenerative medicine in the Republic of Moldova in the aspect of the use of cellular technologies.

Applied value of the reaserch work: this proposed technique is intended to be a first step in the field of tissue engineering that opens new pathways towards obtaining dento-periodontal structures, derived from living tissues, taken from young subjects.

Implementation of the scientific results: the results of the study were implemented in the instructive-methodical and research process within the USMF „Nicolae Testemitanu”, Laboratory of Tissue Engineering and Cell Culture, the Bank of Tissues and Human Cells (implementation certificate nr. 10, annexa 1).

SAMSON STELLA

**ȚESUTURILE DENTARE NOI - SURSĂ DE CELULE STEM
PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ
(studiu experimental)**

341.01 – INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 10.05.2023	Formatul hârtiei 60x84 1/16
Hârtie offset. Tipar offset.	Tiraj: 40 ex.
Coli de autor: 2.0	Comanda nr. 104

Centrul Editorial-Poligrafic *Medicina*
MD-2004, Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 194B
Tel. 022 205 112