

**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)**

**SPECIALITATEA: 341.01 – INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI
CELULARE**

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:

NACU Viorel,
doctor habilitat în științe medicale,
profesor universitar

Consultant științific :

BURLACU Valeriu,
doctor în științe medicale,
profesor universitar

Autor:

SAMSON Stella

Chișinău, 2023

© Samson Stella, 2023

CUPRINS

ADNOTARE (română, rusă și engleză)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. SURSE DE CELULE STEM PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ.....	16
1.1. Celula stem – definiții și concepte generale.....	16
1.2. Clasificarea celulelor stem.....	23
1.3. Surse pentru obținerea celulelor stem.....	25
1.4. Trialuri clinice cu utilizarea celulelor stem dentare.....	33
1.5. Sinteza capitolului 1	35
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	36
2.1. Caracterizarea generală a cercetării efectuate: etapele și designul studiului.....	36
2.2. Metode de cercetare.....	40
2.3. Prelucrarea statistică a rezultatelor	49
2.4. Sinteza capitolului 2	49
3. STRUCTURA CELULARĂ A DINTELUI	51
3.1. Dezvoltarea embrionară a dinților temporari și permanenți.....	51
3.2. Structura macro- și microscopică a dintelui.....	52
3.3. Determinarea volumului camerei pulpare prin tomografia computerizată.....	60
3.4. Cultivarea celulelor obținute din pulpa dentară.....	64
3.5. Sinteza capitolului 3.....	71
4. INGINERIA TISULARĂ A PULPEI DENTARE.....	73
4.1. Decelularizarea pulpei dentare.....	73
4.2. Evaluarea efectului citotoxic al pulpei dentare decelularizate prin metoda MTT pe culturi celulare obținute din măduva osoasă.....	84
4.3. Sinteza capitolului 4.....	86
DISCUȚII.....	87
CONCLUZII GENERALE.....	95
RECOMANDĂRI PRACTICE.....	96
BIBLIOGRAFIA	97
ANEXE.....	108

Anexa 1. Acte de implementare a rezultatelor obținute.....	108
Anexa 2. Brevet de invenție	109
Anexa 3. Diplome și distincții	110
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	114
CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI	115

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).

LISTA ABREVIERILOR

ADN	–	<i>actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
ALP	–	fosfatază alcalinică (engl. <i>alkaline phosphatase</i>)
ARN	–	acid ribonucleic
ASC	–	celule stem adipoase (engl. <i>adipose stem cells</i>)
BMP	–	proteină morfogenetică osoasă (engl. <i>bone morphogenetic proteins</i>)
CSMMO	–	celule stem mezenchimale derivate din măduva osoasă (engl. <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
CSH	–	celule stem hematopoietice
CSM	–	celule stem mezenchimale (engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
DFSC	–	celule stem din foliculul dentar
DMEM	–	mediu Dulbecco Eagle modificat (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DPSC	–	celule stem adulte dentare
EDTA	–	acid etilendiaminotetraacetic
EDA	–	displazia ectodermală
FBS	–	ser fetal de bovine (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FGF	–	factor de creștere a fibroblastelor
GF	–	factor de creștere
EPSC	–	celule stem epiteliale
FATR	–	fosfatază acidă tartrat rezistentă
FIV	–	fertilizare <i>in vitro</i>
HLA	–	antigen leucocitar uman (engl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HDPSC	–	(engl. <i>human dental pulp stem cells</i>)
MCI	–	masă celulară internă
IPS	–	celule stem pluripotente induse
LIF	–	factor de inhibiție leucemică
MEC	–	matrice extracelulară (engl. <i>extracellular matrix</i>)
MTT	–	compusul bromurii de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazolium
PDGF	–	factor de creștere derivat din plachete (engl. <i>platelet derived growth factor</i>)
PDL	–	ligament parodontal
PDLSC	–	celulele stem din ligamentul parodontal
PGE ₂	–	prostaglandină E ₂
PLA	–	celule procesate lipoaspirate (engl. <i>processed lipoaspirate cells</i>)
PLSC	–	celule stem din ligamentul parodontal
PRP	–	plasmă sangvină bogată în trombocite
SBF	–	ser bovin fetal
SCF	–	factor al celulelor stem
SCAP	–	celule stem din papila apicală
SDS	–	sulfat de sodiu
SHED	–	celule stem din dinți temporari
SCO	–	celule stem ombilicale
TC	–	tomografie computerizată
TGF- β	–	factor de creștere transformator β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TNF- β	–	factor de necroză β (β -Tumor necrosis factor)
TRAP	–	fosfataza acida tartrat rezistentă (engl. <i>tartrate resistant acid phosphatase</i>)

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Biologia celulelor stem este în prezent una dintre cele mai excitante direcții de cercetare biomedicală datorită perspectivelor promițătoare referitoare la 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 [1,3].

În pofida tuturor beneficiilor menționate, există numeroase probleme etice, legislative și politice care limitează manipularea embrionilor umani. O abordare alternativă, care exclude aceste inconveniente, este utilizarea celulelor stem izolate din organisme adulte, care au capacitatea de a se autoregenera perioade lungi de timp și de a da naștere unui număr limitat de tipuri de celule mature. Deși existența celulelor stem adulte a fost semnalată începând cu anul 1963, până în anul 2000 investigațiile celulelor stem hematopoietice (CSH), ale celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă (CSMMO), ale celulelor stem neurale și ale celulelor satelit musculare au fost limitate [3, 137]. În anul 2001, Zuk și colaboratorii au publicat prima lucrare privind izolarea unor celule din lipoaspirat uman, pe care le-au numit celule procesate lipoaspirate (PLA), care se găsesc în fracția stromal-vasculară a țesutului adipos [152, 153]. În anul 2002, aceiași cercetători au izolat din cultura primară a celulelor PLA o populație de celule stem adulte (ASC), care exprimă markerii de suprafață specifici celulelor stem mezenchimale (CSM) și posedă potențial de diferențiere adipogenic, condrogenic, osteogenic și miogenic [152, 153].

Descoperirea științifică semnificativă transformă țesutul adipos într-o sursă bogată în celule stem cu un potențial mare pentru medicina regenerativă. Mai mult decât atât, aceste celule pot fi recoltate în număr mare, prin metode minim invazive, 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 [23].

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

Vindecarea rănilor este un proces ce poate fi perturbat de diverse condiții patologice de tipul diabetului, al imunosupresiei etc. Aplicarea individuală, în regiunea leziunii, a factorilor de creștere implicați în vindecare nu a dus la obținerea rezultatelor scontate. Această situație nefavorabilă s-a înregistrat, probabil, din cauza 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 [14, 15].

Odată cu caracterizarea profilului secretor al celulelor, s-a constatat că aceste celule secretă majoritatea factorilor implicați în regenerarea rănilor și că, după implantare, rămân viabile și secretă factori de creștere în mod continuu, ca răspuns la stimulii mediului în care se află, simulând astfel perfect procesul normal de vindecare [23]. Pe lângă toate acestea, ASC-urile pot modula nișa de celule stem ale țesutului-gazdă prin stimularea recrutării endogene de celule stem și promovarea diferențierii lor către acele tipuri celulare specializate necesare pentru regenerare/vindecare. Nu în ultimul rând, acestea pot furniza antioxidanți și proteine chaperone la situsul ischemic [48, 50].

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, a înlocuirii sau a 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 grefe biocompatibile și biodegradabile, pentru a umple complet volumul defectului [64].

Progresele înregistrate în ingineria materialelor și în optimizarea proceselor de fabricare a structurilor tridimensionale (3-D) destinate aplicațiilor de inginerie tisulară au permis dezvoltarea unor sisteme de cultivare *ex vivo* a celulelor. În plus, noile abordări în ceea ce privește proiectarea acestor structuri au facilitat direcționarea diferențierii celulelor stem în anumite tipuri celulare mature [35, 36].

O nouă provocare a ingineriei materialelor o reprezintă viabilitatea scăzută a celulelor direct implantate, fie ca urmare a neintegrării lor în țesut, fie ca urmare a efectelor citotoxice pe care le exercită țesutul-gazdă asupra lor. Leziunile sau organele afectate prezintă medii ostile pentru celulele sănătoase din cauza concentrației mari de citokine inflamatorii. Prin urmare, un rol suplimentar al construcțiilor destinate ingineriei tisulare ar fi protejarea celulelor implantate de sistemul imunitar al gazdei, eliminând, totodată, necesitatea administrării unui tratament de imunosupresie, pentru a asigura supraviețuirea grefei [67, 97, 105].

Medicina regenerativă, bazată pe metodologia terapiei celulare și a ingineriei tisulare, este un domeniu multidisciplinar în curs de dezvoltare, care implică biologie, medicină și manipulare

genetică. Acest tip de terapie are ca scop menținerea, restaurarea sau sporirea funcției țesuturilor și organelor, ajutând astfel la tratamentul unor boli umane cu severitate variabilă: de la situații cronice la cele amenințătoare de viață. În bolile care evoluează cu compromiterea funcției țesuturilor sau a organelor, cercetarea celulelor stem promite să ne ofere o cale eficientă spre terapia regenerativă. Totuși, aplicarea acestor cercetări în tratamentul bolilor umane nu este posibilă fără o cunoaștere aprofundată a proprietăților biologice ale tuturor tipurilor de celule stem [1, 12].

În contextul unei anumite boli, trebuie să se decidă, în primul rând, care este cel mai eficient tip de celulă stem: embrionară sau provenită din organismul adult. De asemenea, este necesară identificarea unei surse de celule stem disponibile în număr mare, care să nu determine preocupări etice [60].

Dezvoltarea celulelor stem în medicina dentară va genera, în timp, o revoluție mai mare decât cea pe care au inițiat-o implanturile dentare.

Aliajele metalice, compozitele și chiar implanturile din titan nu sunt soluții permanente. Însă din celulele stem din pulpa dinților temporari și permanenți se poate produce substratul necesar pentru formarea dintelui. Dinții sunt o sursă ușor accesibilă pentru a recolta celule stem postnatale din diferite țesuturi, inclusiv din pulpa dentară, ligamentul parodontal, foliculul dentar, papila apicală și din dinții în curs de dezvoltare. Gronthos *et al.* au fost primii care au izolat *celulele stem din pulpa dentară* a molarilor 3 [37, 59]. Aceste celule sunt foarte proliferative și pot să se diferențieze în diferite tipuri de celule, care sunt capabile de a forma complexul dentină-pulpă, dar nu os lamelar, după transplantul *in vivo* [34]. Trei ani mai târziu, Miura *et al.* au obținut *celulele clonogenice* din dinții temporari, pe care le-au diferențiat în *odontoblaste*, *adipocite* sau *celule neuronale* [90].

Celulele stem atât din pulpa dentară a dinților temporari, cât și din dinții permanenți sunt situate în nișa perivasculară și exprimă markerul CSM-lor STRO-1 și markerul pericitar CD146 [8, 38].

Celulele stem sunt celule nediferențiate, capabile să se reînnoiască. Prin diferențiere, ele au potențialul de a se dezvolta în multe linii celulare diferite. Tipurile de celule stem se deosebesc în funcție de specificul celulelor pe care le pot crea și localiza în corp. În ultimii ani de studii s-a demonstrat că țesuturile dentare moi sunt o sursă de celule stem. Structura țesuturilor moi s-a dovedit promițătoare și are ca rezultat regenerarea țesuturilor sau a organelor cavității bucale. Acolo există mulți factori care pot produce resorbția osoasă din cauza extracției ori a pierderii dinților sau din cauza cariilor și complicațiilor intervenite, a traumatismelor ori a fracturilor radiculare sau chiar din cauza bolii parodontale. La pacienții edentați, resorbția osoasă continuă

de-a lungul vieții, în special la mandibulă, ceea ce face dificilă înlocuirea dinților lipsă cu implanturi dentare [62].

Așadar, ținând cont de aspectele complexe pe care le impun celulele stem în practica stomatologică, considerăm că realizarea acestui studiu este de 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.

Ipoteza de cercetare:

Dintele nu este doar un element cu funcție de masticatie, ci reprezintă, totodată, o structură vie, activă, care constă din mai multe componente. Pornind de la complexitatea structurală a dintelui și de la lipsa unor mecanisme naturale de restabilire a dinților pierduți, au fost formulate următoarele ipoteze de cercetare:

- Între componentul celular al elementelor dintelui și vârstă, tipurile dinților (molari, incisivi etc.) există o relație evidentă.
- Celulele dentare pot fi utilizate în terapia celulară și ingineria tisulară.
- Volumul camerei pulpare ar putea fi un marker în prognozarea cantității/numărului celulelor care pot fi obținute din pulpa dentară.
- Este posibilă crearea, prin inginerie tisulară, a unor dinți vii, pentru înlocuirea celor pierduți.
- Pulpa dentară alogenă decelularizată ar putea servi ca tramă pentru recelularizarea cu celulele pacientului și revascularizarea dinților devitalizați.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese

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 colagen, 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.

Inovația și originalitatea științifică ale rezultatelor obținute

1. Elaborarea modalității de evaluare a volumului camerei pulpare prin tomografia computerizată (TC).
2. Determinarea componentelor celulare în funcție de valorile camerei pulpare la diferite grupuri de dinți.
3. Efectuarea decelularizării pulpei dentare și a altor aspecte ce țin de recelularizarea ei cu celule obținute din măduvă osoasă sau din pulpa dentară.
4. Determinarea amplasării celulelor CD34 și CD45 în pulpa dentară și a capacității celulelor din pulpa dentară de a se diferenția în osteoblaste și condrocite.

Problema științifică rezolvată

Prin cercetarea noastră au fost evidențiate particularitățile de obținere a celulelor stem dentare și posibilitățile de utilizare a acestora în diverse domenii ale medicinei moderne, precum și posibilitatea implementării în Republica Moldova a metodelor de obținere a celulelor progenitoare din aparatul dentar în ingineria tisulară, în particular, și în 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 baza TC.

De asemenea, caracterul aplicativ este accentuat de posibilitatea obținerii unor grefe celulare pentru medicina regenerativă destinate restabilirii țesuturilor afectate din regiunea maxilo-facială.

Implementarea inovației în practică

Rezultatele investigațiilor au fost implementate în procesul instructiv-metodic la Catedra anatomie și anatomie clinică, cursul opțional de medicină regenerativă pentru studenții anului IV ai Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Ca metode de cercetare au fost utilizate în Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare din cadrul aceleiași instituții.

Aprobarea rezultatelor științifice

Materialele tezei au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor evenimente științifice:

- 1) Conferința științifică anuală a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” 2012, 2015;
- 2) Congresul Internațional al Studenților și Tinerilor Medici „MedEspera”, ediția a IV-a, 2012;
- 3) Conferința Internațională de Nanotehnologie și Inginerie Biomedicală, 2013, 2021;
- 4) Salonul internațional de invenție „PRO INVENT”, ediția a XI-a, 2013, Cluj-Napoca, (Diplomă de excelență și Medalia de aur);
- 5) Expoziția Europeană a Creativității și „Inovării EURO INVENT”, 2013, Iași (Diplomă de excelență și Medalia de argint);
- 6) Международный салон изобретений и новых технологий «Новое Время» VIII, 2013 г. Севастополь (Диплом почтения);
- 7) Sesiunea a XIX-a a Zilelor Medicale Balcanice, Republica Moldova, 2013;
- 8) Conferința Internațională de Management al Tehnologiei Sănătății, ediția a 3-a, Chișinău, 2016;
- 9) Reuniunea Europeană a Societății Internaționale pentru Ingineria Țesuturilor și Medicină Regenerativă, TERMIS, Davos, Elveția, 2017.

Rezultatele tezei au fost aprobate în cadrul:

- 1) Ședinței Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare și a Catedrei de anatomie și anatomie clinică, Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (Proces-verbal nr. 2 din 16 ianuarie 2023);
- 2) Ședinței Seminarului științific de profil 321. Medicină generală și 341. Biotehnologii cu aplicație în medicină; Specialitățile: 321.24. Transplantologie, 341.01. Inginerie tisulară și culturi

celulare, „Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (Proces-verbal nr. 4 din 16 februarie 2023).

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.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este expusă pe 117 de pagini și include: introducere, 4 capitole, discuții, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 153 de titluri, 3 anexe, 34 de figuri și 17 tabele.

În *introducere* sunt argumentate actualitatea și necesitatea cercetării științifice, reflectate datele despre impactul celulelor stem, descrise scopul și obiectivele tezei, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică, valoarea aplicativă a tezei și aprobarea rezultatelor.

În *capitolul 1* sunt prezentate definițiile, conceptele generale, datele și criteriile de clasificare a celulelor stem. Acest capitol conține o sinteză a rezultatelor prezentate în literatura de specialitate privind conceptul modern de utilizare a celulelor stem. Totodată, s-a insistat în mod deosebit pe rolul celulelor stem de a se diferenția în multiple tipuri celulare în timpul vieții.

În *capitolul 2* sunt descrise detaliat materialul și loturile de studiu, precum și metodologia cercetării. Etapele cercetării, metodele de investigație utilizate și principiile de aplicare a testelor de laborator reprezintă celelalte componente ale capitolului. Totodată, capitolul conține o descriere minuțioasă a metodelor de analiză statistică aplicate în cunoașterea fenomenului studiat. În capitol sunt inserate 4 tabele și 7 figuri.

În *capitolul 3* sunt înfățișate rezultatele studiului, în special privind componentul celular al dintelui; volumul camerei pulpare; modalitățile de obținere/extragere a celulelor și cultivarea lor în medii de cultură. Alt aspect reflectat în acest capitol ține de identificarea prin colorare tricrom Masson a structurilor de colagen și prin imunohistochimie a celulelor CD34 și CD45 pozitive. Capitolul conține 6 tabele și 14 figuri.

În *capitolul 4* sunt abordate modalitățile de decelularizare a pulpei dentare. În acesta am evidențiat ideea că utilizarea unor compuși, de exemplu hidroxidul de calciu sau mineralul agregat trioxid, promovează dentinogeneza. Capitolul include 2 tabele și 13 figuri.

Discuții - conține analiza, argumentarea și deliberarea rezultatelor studiului propriu-zis, care sunt confruntate cu abordările și datele obținute de alți cercetători, reflectate în literatura mondială.

Concluzii generale și recomandări reflectă toate dovezile obținute în cercetarea efectuată în domeniul de studiu.

Bibliografia este constituită din 153 de titluri.

1. SURSE DE CELULE STEM PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ

1.1. Celula stem – definiții și concepte generale

Celula stem este o celulă specială, care are capacitatea unică de a se reînnoi și de a da naștere celulelor specializate. Deși majoritatea celulelor din corp, cum ar fi celulele miocardice sau epiteliale, sunt desemnate să conducă o funcție specifică, celula stem este nediferențiată și rămâne nediferențiată până când primește semnalul specific pentru a se modifica într-o celulă specializată. Capacitatea lor proliferativă combinată cu abilitatea lor de a deveni celule specializate le identifică ca celule stem [49, 50].

Celulele stem au o capacitate remarcabilă de a se diferenția în multiple tipuri celulare în timpul vieții, în afară de aceasta, în multe țesuturi ele constituie un sistem intern de reparare, fiind supuse unor procese de diviziune continuă atât timp cât organismul rămâne viu. Atunci când celula stem se divide, fiecare celulă derivată are potențialul de a rămâne în stadiul de celulă stem sau de a se diferenția în alte tipuri celulare, cu funcții specializate [13, 49].

Celulele stem se diferențiază de alte tipuri celulare prin două caracteristici esențiale. În primul rând, sunt nespecializate, capabile de a se reînnoi prin diviziune celulară chiar și după perioade lungi de inactivitate. În al doilea rând, în anumite condiții fiziologice sau experimentale, pot fi induse spre formarea unor celule specifice țesuturilor sau organelor. La nivelul anumitor organe, cum ar fi măduva osoasă, celulele stem se divid cu regularitate pentru a repara și a regenera țesuturi îmbătrânite sau distruse. În alte organe, precum pancreasul sau miocardul, acestea se divid doar în anumite condiții [1, 10].

Proprietățile care caracterizează celulele stem:

- 1) sunt capabile să se dividă și să se reînnoiască pe perioade lungi de timp;
- 2) sunt nespecializate;
- 3) se pot diferenția în celule specializate.

Spre deosebire de celulele musculare, hematice sau nervoase, care, în mod normal, nu se pot replica, celulele stem sunt capabile de replicare sau proliferare [14]. O populație de celule stem care proliferază pe o perioadă de câteva luni în laborator poate da naștere unui număr de milioane de celule. Dacă celulele rezultate continuă să fie nespecializate, celulele stem păstrează capacitatea să se reînnoiască pe termen lung [23].

La ora actuală, cercetătorii încearcă să înțeleagă două chestiuni fundamentale legate de capacitatea de reînnoire a celulelor stem pe termen lung: capacitatea celulelor stem embrionare de

a prolifera în laborator fără a se diferenția și lipsa acestei capacități la celulele stem adulte, care nici nu prezintă factorii ce reglează în mod normal proliferarea și reînnoirea celulelor stem [134].

O altă proprietate fundamentală a celulelor stem este că nu au o structură specifică unui țesut, astfel încât să poată efectua funcții specifice. Cu toate acestea pot da naștere celulelor specializate, cum ar fi cele miocardice, hematice, nervoase și dentare [128].

În timpul diferențierii, celulele traversează mai multe etape, devenind din ce în ce mai specializate. Procesele de semnalizare intra- și extracelulare nu sunt încă pe deplin înțelese. Semnalele interne sunt generate de factorii de transcripție intracelulari dispersați sub forma unor insule de ADN care transportă informații codificate, destinate tuturor structurilor celulare și funcțiilor acestora [80]. Semnalele externe ale diferențierii celulare includ substanțe secretate de alte celule, contactul fizic cu celulele învecinate și anumite molecule prezente în mediul microscopic. Interacțiunea semnalelor în timpul diferențierii determină ADN-ul celular să acumuleze markeri epigenetici care restricționează expresia ADN-ului la nivelul celulei, pentru ca aceasta să poată trece prin procesul de diviziune [107, 109].

Există încă multe semne de întrebare cu privire la diferențierea celulelor stem, la căile de semnalizare și similaritatea lor pentru toate celulele. Oferirea răspunsurilor la aceste întrebări complexe poate determina identificarea unor noi posibilități de diferențiere a celulelor în laborator. Cercetările în embriogeneză au demonstrat existența unei clase de celule stem cu capacitatea de a se diferenția în orice celulă a corpului uman. Acestea sunt numite celule pluripotente, însemnând că au potențialul de a se diferenția în oricare din cele peste 200 de tipuri celulare cunoscute. Celulele stem cu această proprietate unică provin din embrioni și celule fetale [59].

O celulă stem este definită ca o celulă care poate continuu produce celule descendente nealterate și, în plus, are capacitatea de a genera celule cu proprietăți diferite și restrânse.

Celulele stem se pot diviza simetric sau asimetric. Diviziunile asimetrice păstrează numărul de celule stem nemodificate, totodată generează celule cu care, în procesul de diferențiere, obțin proprietăți specifice. Aceste celule se pot multiplica fie ca celule progenitoare, fie ca celule amplificatoare de tranzit sau se reînnoiesc în mod independent, astfel generând orice tip de țesut pe durata vieții. Aceasta este o proprietate-cheie pentru o terapie de succes. Capacitatea de extindere a celulelor stem în cultură reprezintă un pas indispensabil pentru medicina regenerativă și a fost depus un efort considerabil pentru a evalua consecințele cultivării celulelor stem [111, 126].

Celulele stem nu pot fi identificate cu certitudine în orice țesut, acestea sunt identificate prin stabilirea proprietăților indirecte, cum ar fi expresia unor proteine de suprafață [83]. Cu toate acestea, niciunul dintre aceste criterii nu sunt specifice. Evaluarea capacității de autoreînnoire se

bazează pe izolarea și transplantarea unor tulpini pure de celule, urmate de transplantul în serie și reconstituirea pe termen lung a unui țesut. În ultimii ani, celulele stem au fost folosite pe larg în mai multe discipline medicale pentru repararea și regenerarea defectelor țesuturilor și organelor (de exemplu: os, ligament, inimă). Noile abordări terapeutice sunt în mare parte inspirate de volumul cunoștințelor noastre în dezvoltarea embrionară [17, 21].

Scopul medicinei regenerative este de a reproduce *in vitro* mecanismele și procesele pe care natura le folosește în timpul inițierii morfogenezei unui organ. În acest context, cercetarea în domeniul celulelor stem are un potențial mare în menținerea homeostaziei, repararea și regenerarea țesuturilor și organelor corpului uman. Posibilitatea manipulării celulelor stem *in situ* prin folosirea moleculei specifice de semnalizare sau prin extinderea lor *ex vivo* este un domeniu incitant de cercetare [31, 94, 136]. Prin urmare, medicina regenerativă a devenit un câmp experimental în izolarea, manipularea celulelor stem embrionare și adulte pentru crearea de noi țesuturi funcționale, care vor înlocui organele lipsă sau defectele tisulare. Celulele stem embrionare și adulte au fost investigate intens și se încearcă utilizarea lor la crearea *in vitro* de noi organe, cum ar fi ficat, piele, cord, mușchi și țesuturi scheletice. Celulele stem adulte care posedă un potențial limitat de diferențiere pot fi ușor izolate de la un pacient după amplificare *in vitro* și, prin diferențiere, ar putea fi reinjectate la același pacient, evitând astfel respingerea imună, ca în cazul alogrefelor sau al xenogrefelor. Cu toate acestea, cunoștințele în tehnologia de manipulare a celulelor stem sunt încă limitate în toate disciplinele medicale și dictează necesitatea unor noi abordări științifice, strategice în toate domeniile, inclusiv stomatologie. Terapia cu celule stem constituie o provocare inclusiv pentru domeniul stomatologiei [16, 32, 103].

Celula stem embrionară

Celulele stem embrionare sunt, de obicei, derivate în culturi celulare din embrioni fertilizați *in vitro* în faza de blastocist. Celulele embrionare umane sunt generate prin transferarea celulelor din stratul intern al blastocistului pe un mediu de cultură unde se divid. Celulele embrionare se pot diviza pe mediul de cultură până la șase luni fără a se diferenția, păstrându-și pluripotența [140].

Celulele pluripotente au abilitatea de a da naștere tuturor tipurilor celulare ale organismului. În ultimii ani au fost făcute numeroase progrese în înțelegerea bazei moleculare a pluripotenței. Transcriptomul celulelor stem embrionare a fost intens studiat pentru a identifica mecanismele moleculare de reînnoire și pluripotență. Aceste studii au relevat componente și structuri arhitecturale ale rețelei de reglare transcripțională a pluripotenței și sugerează faptul că factorii de transcripție mențin statusul pluripotent la nivelul cromatinei accesibile. Fluctuațiile rețelei transcripționale pot determina variația stării de pluripotență cu posibilități diferite de reînnoire și diferențiere [105]. Celulele stem embrionare reprezintă prototipul pluripotenței, fiind

utilizate ca un excelent sistem de studiu al diferențierii celulare atât în condiții fiziologice, cât și patologice. Acestea au, de asemenea, un mare potențial de aplicabilitate terapeutică, având în vedere abilitatea de a se diferenția *in vitro*. Un pas important spre aplicarea terapeutică îl reprezintă identificarea moleculelor și a căilor de semnalizare care guvernează proliferarea și diferențierea lor [19, 33].

Celulele stem embrionare sunt derivate *in vitro* din masa celulară internă (MCI) a blastocistului. O altă sursă de celule pluripotente poate fi derivată *in vitro* din celulele germinale primordiale embrionare. Ambele au același profil transcripțional, care a fost examinat minuțios în vederea identificării factorilor moleculari și a mecanismelor de control al pluripotenței.

Pentru a studia transcriptomul celulelor stem embrionare, s-au utilizat analize ale expresiei secvențiale, analize seriale ale expresiei genice, iar pentru a defini amprenta moleculară a celulelor stem pluripotente, au fost comparate profilurile de expresie ale celulelor stem embrionare cu cele ale celulelor diferențiate [4, 17, 22, 113, 130], ale celulelor provenite din alte faze embrionare [131], ale altor celule pluripotente și ale celulelor stem adulte sau ale celulelor stem embrionare provenite de la alte specii [151]. Concluzia acestor studii a evidențiat că există unele gene care se exprimă predominant sau exclusiv la nivelul celulelor pluripotente, cum ar fi Oct4, Nanog, Rex1 și Utf1. De asemenea, a fost determinată acțiunea anumitor căi de semnalizare la nivelul celulelor stem embrionare, precum Jak/Stat, Bmp, Wnt și factorul de creștere a fibroblastelor (FGF). Multe dintre aceste studii demonstrează o reprezentare excesivă a factorilor de transcripție, de remodelare a cromatinei și de reparare a ADN-ului în transcriptomul pluripotent, sugerând faptul că acesta joacă un rol esențial în pluripotență. În timpul diferențierii *in vitro*, genele asociate pluripotenței sunt inhibitate constant, indiferent de metoda de diferențiere, în timp ce genele induse sunt dependente de metoda de diferențiere [104].

Expresia predominantă sau exclusivă a unei gene la nivelul celulelor stem embrionare nu asigură suficiente dovezi ale rolului ei în procesul de reînnoire sau pluripotență. S-a demonstrat că unele gene care sunt exprimate predominant la celulele stem embrionare sunt regulatori importanți ai pluripotenței. Combinând profilul de expresie cu interferențe ARN, au fost descoperiți noi regulatori ai procesului de autoreînnoire a celulelor stem embrionare [5, 106].

Genele coexprimate la nivelul celulelor pluripotente sunt reglate de aceiași factori de transcripție. O serie de factori de transcripție au fost identificați ca fiind exprimați la nivelul celulelor stem embrionare și implicați în menținerea pluripotenței [108, 127].

Celulele stem embrionare umane sunt similare celor provenite de la șoareci din punctul de vedere al proprietăților de autoreînnoire și al abilității de a da naștere tuturor celulelor din cele trei straturi embrionare. Deci, nu este surprinzător faptul că ambele exprimă componentele rețelei

transcripționale ale pluripotenței. Totuși, există diferențe între țintele acestor factori de transcripție și între celulele stem embrionare umane și cele provenite de la șoareci. Aceste diferențe sunt reflectate în divergența dintre transcriptomul uman și cel al șoarecelui și sunt corelate cu diverse cerințe în privința citokinelor și a factorilor de creștere. De exemplu, mai multe componente ale căii de semnalizare a FGF-ului sunt exprimate la nivelul celulelor stem embrionare umane și sunt absente la șoareci [110]. Diferențele dintre celulele stem embrionare umane și cele animale pot reprezenta programe transcripționale specifice. Mai mult decât atât, există o corespondență mai mare între genele exprimate la nivelul celulelor stem embrionare umane și cele epiblastice ale șoarecilor decât între acestea și celulele stem embrionare animale. Este, așadar, posibil ca celulele stem embrionare umane și cele animale să corespundă unor etape diferite de dezvoltare embrionară [54, 57].

Astfel, există dovezi substanțiale că atât căile de semnalizare conservate, cât și cele divergente acționează pentru a regla autoreînnoirea, iar pluripotența celulelor stem embrionare acționează pentru a regla procesele de înnoire și pluripotență și la om, și la animal. Deși celulele stem embrionare provenite de la șoareci reprezintă un model de studiu excelent al proceselor de dezvoltare fiziologică și al diverselor stări patologice, trebuie manifestată precauție atunci când rezultatele sunt extrapolate pe celulele stem embrionare umane.

Celula stem adultă

Celula stem adultă este o celulă nediferențiată, întâlnită printre celulele diferențiate în țesuturi sau organe, care este capabilă să se reînnoiască și să se diferențieze pentru a forma o parte sau toate tipurile celulare specializate din țesutul sau organul respectiv. Principalul rol al celulelor stem adulte este de a întreține și a regenera țesuturile în care rezidă [58].

Cercetările asupra celulelor stem adulte au început în urmă cu aproximativ 50 de ani, când s-a descoperit că măduva osoasă conține cel puțin două tipuri de celule stem. Prima populație este cea a celulelor stem hematopoietice, iar cea de-a doua – cea a celulelor stromale: CSM din care se diferențiază celulele țesutului osos, muscular, țesuturile dentare [74].

Celulele stem adulte rezidă dintr-o arie specifică a fiecărui țesut – nișa celulelor stem – rămânând în stare inactivă pentru mari perioade de timp, până când sunt activate de necesitatea fiziologică de apariție a unor celule noi, de anumite procese patologice sau de lezarea țesutului respectiv.

În mod normal, există un număr mic de celule stem adulte la nivelul fiecărui țesut și acestea, odată îndepărtate din organism, au capacitate limitată de diviziune. În organism celulele stem adulte sunt la dispoziția țesuturilor pentru o perioadă lungă de timp și pot da naștere tipurilor celulare mature cu formă caracteristică, structuri și funcții specializate țesutului respectiv.

O serie de experimente au demonstrat faptul că anumite celule stem adulte pot fi diferențiate în tipuri celulare prezente în alte organe sau țesuturi decât cele în care rezidă. Acest proces se numește *transdiferențiere*. Multe țesuturi adulte ale mamiferelor își mențin starea de sănătate printr-o continuă reînnoire care presupune „turnover” celular. Ca răspuns la traumă, la diverse stări patologice sau la suprasolicitare, organismul fie repară, fie regenerează țesuturile. Aceste două posibilități se deosebesc prin faptul că regenerarea rezultă din formarea unui nou țesut diferit de cel inițial ca organizare structurală, conținut și funcție celulară, în timp ce prin reparație rezultă o concentrație mare de țesut fibros, cicatrizare, organizare structurală limitată și funcție diminuată. Anumite țesuturi au abilități regenerative datorate celulelor progenitoare rezidente la acest nivel. Alte țesuturi conțin celule diferențiate care au capacitatea de „a se dediferenția” și a reintra într-o fază proliferativă înainte de a se diferenția din nou. Multe tipuri de celule hematice derivă din celule stem hematopoietice. În plus, la nivelul măduvei osoase rezidă celule stem multipotente, capabile să regenereze diferite tipuri de țesuturi [50, 96].

Caracterizarea celulelor proliferative din măduva osoasă care au potențial de diferențiere a fost studiată pe multiple modele experimentale, inclusiv șoareci, porcușori de Guineea, șobolani, iepuri, câini, cai și oameni. Chiar dacă multe rapoarte sugerează faptul că acestea sunt celule stem adulte, caracterizarea lor a fost de multe ori incompletă.

Pe parcursul studiilor, fost izolată și caracterizată o populație omogenă de celule provenite din măduva osoasă și s-a arătat că aceste celule pot fi diferențiate în linii condrogenice, osteogenice și adipogenice. S-a demonstrat faptul că celulele provenite dintr-o singură clonă celulară pot fi diferențiate în aceste trei linii celulare și de aceea au fost denumite CSM. CSM-urile umane sunt cel mai bine caracterizate dintre speciile mamiferelor și au fost izolate din măduva osoasă provenită de la mai mult de 500 de donatori voluntari. Cultivarea CSM permite înțelegerea mai bună a celulelor progenitoare importante pentru multe țesuturi și pentru dezvoltarea unor noi protocoale terapeutice în regenerare tisulară. Măduva osoasă a fost mulți ani considerată o sursă de celule progenitoare ale sistemului hematopoietic, dar studiul precursorilor țesuturilor de contact la nivelul măduvei a fost început de Friedenstein, Owen și colaboratorii [84].

Într-o serie de publicații au fost descrise celulele de tip fibroblaste prezente în măduva osoasă, care pot fi izolate prin aderare la suprafața vasului de cultură, prin simpla înlăturare a celulelor neaderente. Celulele aderente aveau inițial o formă de suveică, dar căpătau rapid aspect de fibroblast. Ele aveau capacitate evidentă de proliferare, dar multe din ele nu puteau forma colonii. Totuși, culturile se extindeau extensiv, pentru a asigura celule pentru studii de creștere și transplant. Celulele au fost numite celule formatoare de colonii fibroblastice, iar celulele similare au fost denumite celule stromale provenite din măduva osoasă, unități fibroblastice formatoare de

colonii, celule precursorale osteogenice, celule progenitoare provenite din măduva osoasă. După implantarea în camera de difuziune, studiile histologice au evidențiat diferențierea acestora în celule osoase sau cartilaj [3]. Recent a fost posibilă utilizarea unor celule diferite din punct de vedere genetic sau transducerea ADN-ului unor celule [84, 89].

Pentru a diferenția celulele implantate de cele ale gazdei au fost utilizați diferiți markeri. Aceste studii nu au demonstrat însă potențialul multilinar al unei celule individuale [138].

Izolarea și cultivarea unei populații omogene de celule mezenchimale umane din măduva osoasă a fost pentru prima oară efectuate de Caplan, Hayneworth și colaboratorii, aceștia preparând anticorpi care s-au dovedit a fi utili în caracterizarea celulelor. Ulterior, s-a obținut îmbunătățirea tehnicii de izolare pentru a obține o populație celulară bine definită și reproductibilă, având o omogenitate de 99%, dovedită prin măsurarea de flowcitometrie. Cu ajutorul CSM-ilor purificate este posibilă diferențierea către multiple linii celulare mezenchimale în studii efectuate *in vitro* pe parcursul a 2-3 săptămâni [61].

Anticorpii monoclonali împotriva moleculelor de suprafață s-au dovedit a fi utili în identificarea CSM-urilor umane în timpul izolării și multiplicării pe mediu de cultură, dar nu s-a identificat un anticorp specific care să identifice fără echivoc CSM-urile. Anticorpii acestor celule asigură și markerii specifici care pot fi urmăriți în timpul diferențierii osteogenice. Caracterizarea unor markeri adiționali de suprafață asigură un profil molecular extins pentru caracterizarea acestor celule [11]. CSM-urile umane pot influența populațiile celulare aflate în vecinătatea lor sau la distanță prin secretarea unor mediatorii precum factorul de inhibiție leucemică (LIF), factorul celulelor stem (SCF), de stimulare a coloniilor granulocitare (G-CSF), interleukinal (1L-I), interleukina 6 (IL-6), interleukinal (IL-II) [60].

CSM-urile au avantajul unei proliferări extensive pe mediu de cultură spre deosebire de alte celule aflate în stadiul de diferențiere primară. Limitarea CSM-urilor se referă la faptul că nu sunt nemuritoare, devenind senescente după mai multe pasaje. Așadar, se impune rezolvarea de rutină a unor noi populații de CSM-uri. Acestea sunt, în mod normal, celule diploide care nu sunt afectate de oncogene sau de virus ca alte linii celulare sau modele experimentale. Această proprietate permite CSM-urilor să fie utilizate pentru a studia semnalele de transducere și reglarea genetică fără limitele impuse de liniile celulare diferențiate [108].

Deși multe lucruri rămân încă neclare în legătură cu rolul CSM-urilor în regenerarea tisulară, abilitatea lor de creștere și diferențiere în multiple linii celulare *in vitro* dovedește calitatea lor de celulă stem. Nutrienții bazali, densitatea celulară, organizarea spațială și forțele mecanice, precum și factorii de creștere și citokinele par a avea o influență profundă în inițierea creșterii celulelor stem [111].

După izolarea inițială, celulele nu intră într-o fază de creștere și formează lent colonii. Deocamdată nu este clar dacă acest lucru se datorează faptului că celulele se confruntă cu criza unui nou mediu, cu lipsa factorilor de creștere necesari, a interacțiunilor celulă-matrice sau a interacțiunilor intercelulare. Însă s-a demonstrat că abilitatea CSM-urilor de a răspunde la semnale specifice este importantă pentru determinism, diferențierea funcțională și pentru integrarea în țesuturile înconjurătoare. Urmează a se cerceta dacă CSM-urile izolate *in vitro* au aceleași faze proliferative ca și cele aflate în măduva osoasă neagresată. Totuși, CSM-urile izolate din măduva osoasă reprezintă o sursă importantă de celule stem pentru diferențierea mai multor linii celulare mezenchimale, de aceea cercetările asupra acestora trebuie continuate. Deslușirea relației dintre studiile *in vitro* și rezultatele implantării va face posibilă înțelegerea biologiei acestora și dezvoltarea terapiilor cu CSM [95, 144].

1.2. Clasificarea celulelor stem

Celulele stem sunt fundația fiecărui organ și țesut din corpul uman. Există multe tipuri de celule stem, care provin din diferite locuri ale corpului sau care se formează în momente diferite ale vieții noastre. Acestea includ celule stem embrionare, care există doar în primele etape de dezvoltare, și diferite tipuri de celule stem specifice țesuturilor (sau adulte), care apar în timpul dezvoltării fetale și rămân în corpul nostru de-a lungul vieții. Toate celulele stem se pot autoreînnoi (fac copii ale lor) și se pot diferenția (se dezvoltă în celule mai specializate). Dincolo de aceste două abilități critice, totuși celulele stem variază foarte mult în funcție de ceea ce pot și nu pot face și de circumstanțele în care pot și nu pot face anumite lucruri. Acesta este unul dintre motivele pentru care cercetătorii folosesc toate tipurile de celule stem în investigațiile lor. Celulele stem au fost clasificate în [1]:

- 1) celulele stem de origine embrionară;
- 2) celule stem specifice unor țesuturi concrete (neural, muscular, cardiac, intestinal etc.);
- 3) celule stem mezenchimale;
- 4) celule stem pluripotente induse.

1. *Celulele stem de origine embrionară* sunt obținute din masa celulară interioară a blastocistului – o bilă de celule, în principal goală, care, la om, se formează de la 3 până la 5 zile după ce o celulă-ou este fertilizată de un spermatozoid. Un blastocist uman are aproximativ dimensiunea punctului de deasupra acestui „i”. În dezvoltarea normală, celulele din interiorul masei celulare interioare vor da naștere la celule mai specializate, care, la rândul lor, dau naștere întregului corp – toate țesuturile și organele noastre. Cu toate acestea, atunci când oamenii de știință extrag masa celulară interioară și cresc aceste celule în condiții speciale de laborator, ei

păstrează proprietățile celulelor stem embrionare. Celulele stem embrionare sunt pluripotente, ceea ce înseamnă că pot da naștere fiecărui tip de celule din corpul complet format, dar nu și placentei și cordonului ombilical. Aceste celule sunt incredibil de valoroase, deoarece oferă o resursă regenerabilă pentru studiul dezvoltării normale și al bolilor, precum și pentru testarea medicamentelor și a altor terapii. Celulele stem embrionare umane au fost derivate, în principal, din blastociste create prin fertilizarea *in vitro* (FIV) pentru reproducerea asistată, care nu mai erau necesare [22].

2. *Celulele stem specifice țesuturilor* (denumite și celule stem somatice sau adulte) sunt mai specializate decât celulele stem embrionare. De obicei, aceste celule stem pot genera diferite tipuri de celule pentru țesutul sau organul specific în care trăiesc. De exemplu, celulele stem formatoare de sânge (sau hematopoietice) din măduva osoasă pot da naștere la globule roșii, globule albe și trombocite. Cu toate acestea, celulele stem care formează sânge nu generează celule hepatice sau pulmonare sau cerebrale, iar celulele stem din alte țesuturi și organe nu generează globule roșii sau albe sau trombocite. Unele țesuturi și organe din corpul uman conțin celule stem specifice țesuturilor a căror sarcină este să înlocuiască celulele din acel țesut care se pierd în viața normală de zi cu zi sau în răni, cum ar fi cele din piele, sânge și mucoasa intestinului. Celulele stem specifice țesuturilor pot fi dificil de găsit în corpul uman și nu par să se autoreînnoiască în cultură la fel de ușor ca celulele stem embrionare [30, 139].

3. Este posibil ca termenul *celulă stem mezenchimală* (CSM) să fie utilizat cu referire la celulele izolate din stromă, țesutul conjunctiv care înconjoară alte țesuturi și organe. Aceste celule sunt numite de către mulți oameni de știință *celule stromale*. Primele CSM au fost descoperite în măduva osoasă și s-au dovedit a fi capabile să producă celule osoase și adipocite. De atunci au fost cultivate din alte țesuturi, cum ar fi grăsimea și sângele din cordonul ombilical. Se crede că diferite CSM au proprietăți de celule stem și chiar imunomodulatoare, fiind testate ca tratamente pentru multe tulburări, însă până în prezent există puține dovezi că acestea sunt benefice. Oamenii de știință nu au elucidat pe deplin dacă aceste celule sunt, cu adevărat, celule stem sau ce tipuri de celule sunt capabile să genereze. Însă aceștia au ajuns la un consens că nu toate CSM-urile sunt la fel și că toate caracteristicile lor depind de unde provin din organism și de modul în care sunt izolate și crescute [41, 144].

4. *Celulele stem pluripotente induse* (IPS) sunt celule care au fost proiectate în laborator prin conversia celulelor specifice țesutului, cum ar fi celulele pielii, în celule care se comportă ca celulele stem embrionare. Celulele IPS sunt instrumente esențiale pentru oamenii de știință în procesul de studiere a dezvoltării normale și a debutului și progresiei bolii și sunt, de asemenea, utile pentru dezvoltarea și testarea de noi medicamente și terapii. În timp ce celulele IPS au multe

dintre caracteristicile celulelor stem embrionare, inclusiv capacitatea de a da naștere la toate tipurile de celule din organism, ele nu sunt identice. Oamenii de știință explorează aceste diferențe și semnificația lor. În primul rând, primele celule IPS au fost produse prin utilizarea virusurilor pentru a introduce copii suplimentare ale genelor în celulele specifice țesuturilor. Cercetătorii experimentează multe modalități alternative de a crea celule IPS, astfel încât acestea să poată fi utilizate, în cele din urmă, ca sursă de celule sau țesuturi pentru tratamente medicale [92].

1.3. Surse pentru obținerea celulelor stem

Drept surse pentru obținerea celulelor stem servesc următoarele tipuri de celule:

- 1) *celulele autologice* – donatorul și recipientul este una și aceeași persoană;
- 2) *celulele alogene* – donatorul și recipientul sunt indivizi diferiți, dar de aceeași specie;
- 3) *celulele xenogene* – donatorul și recipientul sunt din specii diferite;
- 4) *celulele stem pluripotente induse*;
- 5) *celulele singenice* – de la gemeni monoziagoți.

Dintele se formează în urma interacțiunii epiteliale și mezenchimale, de aceea vor rezulta două populații diferite de celule stem ce urmează să fie luate în considerare: celule stem epiteliale (EPSC), care dau naștere la ameloblast, și CSM, care formează odontoblastele, cementoblastele, osteoblastele, fibroblastele și ligamentul parodontal [9, 44].

Astfel, ingineria dentară, folosind celule stem, se bazează pe izolarea și asocierea lor ca recombinante *in vitro* sau în condiții *ex vivo* de a evalua, în primul rând, morfogeneza dintelui și, în al doilea rând, diferențierea celulelor în celule specifice dentare, care va forma dentina, smalțul, cementul și osul alveolar. În funcție de originea celulelor stem, pot fi folosite diferite abordări. Multe studii recente s-au concentrat pe localizare de țesuturi, organe la adulți în care identifică populații de celule stem adulte. Celulele stem adulte sunt nediferențiate, au un ciclu lent și sunt înconjurate de celulele vecine și matricea extracelulară (MEC). Acest micromediu este specific pentru fiecare compartiment de celule stem, însă există probabilitatea să fie influențat de factori precum vascularizația sau presiunea de încărcare. Înțelegerea acestor micromedii și reglementarea lor este cheia spre reproducerea cu succes a unor astfel de nișe [7, 42, 111, 117].

Autocelulele

Autocelulele stem mature sunt considerate actualmente unul dintre materialele cu cea mai mare perspectivă pentru terapia cu celule și pentru ingineria tisulară [1, 94]. Spre deosebire de celelalte celule embrionare, autocelulele au capacități de proliferare și de diferențiere mai limitate, dar, totodată, pot fi considerate ca cel mai bun material pentru terapia celulară. Măduva osoasă, sângele ombilical este o sursă sigură de celule predecesorii; ea este bogată în celule de acest tip și

mulți autori cercetează posibilitatea utilizării lor în optimizarea și în activizarea procesului reparator tisular [2, 4, 13, 66, 107].

Există tehnologii de obținere a celulelor stem din sângele periferic, după administrarea prealabilă a preparatelor hematopoietice, care stimulează exodul celulelor stem din măduva osoasă în patul sangvin. Astfel, folosind utilaj special, are loc separarea și utilizarea lor pentru transplantare [66]. Unii autori consideră că sângele periferic este sărac în CSM [10]. Avantajele utilizării autocelulelor din măduva osoasă, țesutul adipos sunt evidente: lipsește conflictul imun (rejetul grefei); este redusă la minimum posibilitatea de contaminare a pacientului cu maladii hematotransmisibile; metoda este binevenită din punct de vedere moral și etic [3]. Dezavantajul constă în diminuarea numărului de celule stem odată cu vârsta: s-a calculat că la naștere unei celule stem îi revin 10 000 de celule sangvine, la 15 ani raportul este de 1:100 000 și la 50 de ani de 1:500 000.

Există studii care indică posibilitatea obținerii celulelor stem, practic, din toate țesuturile, inclusiv din mucoasa nazală, țesutul adipos, cordonul ombilical [2, 141].

Utilizarea celulelor măduvei osoase pentru regenerarea osului este argumentată prin existența în măduva osoasă a celulelor predecesorii. Din CSM-urile localizate în stroma măduvei osoase se pot dezvolta, în anumite condiții, osteoblaste, fibroblaste, condroblaste și adipocite. Injectarea transcutanată a măduvei osoase extrase în focar a fost utilizată pentru tratamentul pseudartrozelor, chisturilor osoase și în necroza aseptică de cap femural. Concentrația și cantitatea celulelor stem din transplant asigură eficacitatea tratamentului grefei celulare [98, 99, 143].

Unele lucrări descriu utilizarea plasmei sangvine bogate în trombocite (PRP) în tratamentul dereglărilor de consolidare a osului. Factorii de creștere secretate de aceste celule (PDGF) pot stimula angiogeneza, deplasarea în focarul celulelor pluripotente mezenchimale, monocite, macrofage [82].

La autocelule, de asemenea, pot fi atribuite celulele din sângele cordonului ombilical, care se colectează la nașterea fătului într-un container steril, din care se separă celulele stem și se crioconservează, păstrându-se la temperaturi joase timp îndelungat. În caz de necesitate, ele se utilizează pentru tratamentul donatorului [2, 7, 52].

Celulele embrionare obținute prin clonare (transfer de nucleu) cu informația genetică a recipientului pot fi considerate ca autocelule, deoarece conțin informația genetică a pacientului.

Celule stem dentare

CSM-urile pot fi izolate din surse diferite. Au fost descrise pentru prima dată în măduva osoasă de Friedenstein în 1970 [3]. CSM-urile au fost extensiv caracterizate *in vitro* prin expresia markerilor cum ar fi STRO-1, CD146 sau CD44. STRO-1 este un antigen de suprafață celulară utilizată pentru a identifica precursori osteogenici în măduva osoasă, CD146 este un marker pericitar și CD44 este un marker de CSM. CSM-urile posedă o capacitate mare de autoreînnoire, precum și potențial de a se diferenția în linii mezodermale, formând astfel cartilaj, oase, țesut adipos, musculatura scheletică și stroma țesutului conjunctiv. Potențialul CSM-urilor dentare pentru regenerarea dinților a fost intens studiat în ultimii ani și au fost evaluate pentru ingineria tisulară dentară [55, 72, 83, 135, 149].

Izolarea celulelor stem postnatale dintr-o sursă ușor accesibilă este indispensabilă pentru ingineria tisulară și aplicația clinică. Descoperirile recente au demonstrat izolarea de celule progenitoare mezenchimale din pulpa dinților temporari umani. Aceste celule au fost numite SHED (celulele stem din dinți temporari) și au prezentat o mare plasticitate, deoarece acestea ar putea diferenția în neuroni, adipocite, osteoblaste și odontoblaste. *In vivo* celulele SHED pot induce formare de os sau dentină, dar, spre deosebire de pulpa dentară, celulele stem adulte dentare (DPSC) nu au reușit să producă un complex dentină – pulpă [20, 128, 129].

DPSC-urile. După o afecțiune a țesutului dentar, pulpa dentară este implicată într-un proces numit *dentinogeneză reparatorie*, în care celulele elaborează și depun un nou strat de dentină [127]. S-a demonstrat că pulpa dentară conține precursori capabili de a forma odontoblaste sub semnale corespunzătoare [127]. Printre aceste semnale sunt hidroxidul de calciu sau calciul fosfat, care constituie materiale folosite de stomatologi pentru coafajul direct sau indirect în tratamente dentare. Celulele progenitoare din pulpa dentară nu au fost identificate în mod clar, dar unele date sugerează că pericitele sunt capabile să diferențieze în osteoblaste și, de asemenea, în odontoblaste [8, 25, 56].

Celulele stem din papila apicală (SCAP) au fost izolate și potențialul lor de a se diferenția în odontoblaste a fost comparat cu cel al celulelor stem din ligamentul parodontal (PDLSC). SCAP-urile prezintă o rată de proliferare mai mare și pare mai eficientă decât PDLSC pentru formarea dinților. Important este faptul că SCAP-urile sunt ușor accesibile, deoarece pot fi izolate din molarii 3 permanenți [20, 51, 133].

Celulele stem din foliculul dentar (DFSC) au fost izolate de la cel al molarilor de minte și exprimă markerii celulelor stem Notch1, STRO-1 și nestină. Aceste celule pot fi menținute în cultură timp de cel puțin 15 pasaje. STRO-1 a DFSC-urilor pozitive se pot diferenția în cementoblaste *in vitro* și sunt capabile să formeze cementul *in vivo*. Celule foliculare dentare

imortalizate sunt capabile de a recrea un nou ligament parodontal (PDL) după implantare *in vivo* [55, 63, 65].

PDLSC-urile. Ligamentul parodontal este un țesut specializat situat între cement și osul alveolar și are rol de întreținere și suport al dinților. Regenerarea continuă a acestuia poate implica celule progenitoare mezenchimale care se formează din foliculul dentar. PDL conține celule STRO-1 pozitive, care întrețin o anumită plasticitate, deoarece acestea pot adopta fenotipuri adipogenice, osteogenice și chondrogenice *in vitro*. Este evident că PDL însuși conține celule progenitoare, care pot fi activate pentru a autoreînnoi și a regenera alte țesuturi, cum ar fi cementul și osul alveolar [43, 45, 65].

CSMMO-urile au fost testate pentru capacitatea lor de a recrea țesut parodontal. Aceste celule sunt capabile să formeze *in vivo* cementul, ligamentul parodontal și osul alveolar după implantare în defectele țesuturilor parodontale. Astfel măduva osoasă oferă o sursă alternativă de CSM pentru tratamentul bolilor parodontale [43, 73]. CSMMO-urile împărtășesc numeroase caracteristici cu DPSC și sunt capabile de a forma structuri osoase asemănătoare cu cele ale dintelui. Cu toate acestea, CSMMO-urile afișau un potențial odontogenic mai mic decât DPSC-urile [77, 91], care indică faptul că CSM-urile de la diferite origini embrionare nu sunt echivalente. Într-adevăr, DPSC-urile derivă din creasta celulelor neuronale, în timp ce CSMMO-urile provin din mezoderm. În plus, compararea potențialului osteogenic și adipogenic de CSM-urile de origine diferită arată că, deși celulele transportă markeri genetici comuni, aceștia nu sunt echivalenți și sunt deja angajați față de o cale de diferențiere specifică [100, 112]. Angajamentul ar putea apărea la condiționarea celulelor stem de micromediul lor specific sau de la nișa de celule stem. CSM-urile pot fi, de asemenea, obținute din mai multe surse, cum ar fi membrana sinovială [40] și periostul [97]. Deoarece populațiile acestor celule afișează proprietăți biologice distincte în funcție de țesutul lor de origine rămâne să fie determinată sursa care ar putea fi utilizată în stomatologie [115, 132].

Țesutul adipos este o sursă de celule stem adulte. Deși, încă din 1964, Rodbell a raportat izolarea unei populații de celule din țesutul adipos al șobolanilor după digestia cu collagenază, aderente la plastic, abia în 2001 s-a dovedit existența celulelor stem în fracția stromal vasculară izolată din lipoaspirate umane. Randamentul obținerii celulelor ASC depinde de zona din care este prelevat țesutul adipos și de tehnica chirurgicală utilizată (excizie sau diverse proceduri de liposucție). Celulele ASC prezintă un imunofenotip similar cu cel al CSM în stadiul nediferențiat, fac parte din categoria celulelor stem multipotente, având capacitatea de diferențiere adipogenică, condrogenică și osteogenică. În plus, în condiții specifice, celulele ASC pot suferi diferențiere în celule endoteliale ce participă la formarea de noi vase sangvine, în miocite ce reprezintă o

perspectivă promițătoare în repararea țesutului cardiac în urma infarctului sau a leziunilor ischemice, în hepatocite și chiar în celule neuronale. Mecanismul molecular al diferențierii adipogenice este insuficient cunoscut, existând clar deosebiri între procesul *in vivo* și *in vitro*. În general, sunt cunoscuți hormonii, citokinele și factorii de creștere implicați în adipogeneza *in vitro*, ceea ce permite selectarea unui mediu de creștere care să favorizeze procesul [39, 73, 78, 120].

De asemenea, există studii care sugerează implicarea cascadelor de semnalizare cAMP/protein kinaza A și diacilgliceroli/protein kinaza C în promovarea adipogenezei prin intermediul unor liganzi ai proteinelor G. Hormoni de tipul insulinei și glucocorticoizilor declanșează adipogeneza prin creșterea expresiei C/EBP β și C/EBP δ . Aceștia din urmă induc împreună expresia factorului de transcripție KLF5 (Krüppel-like transcription factor 5), care activează, la rândul său, promotorul PPAR γ 2. *In vivo*, MEC a țesutului adipos reprezintă o structură tridimensională, precum și o sursă de factori de creștere/diferențiere care modulează migrarea, proliferarea, angiogeneza, răspunsul imun etc. Una dintre primele modificări observate în diferențierea adipocitelor este depunerea collagenului la interfața MEC-celulă și biogeneza membranei bazale. Studii realizate pe adipocite, *in vitro*, au demonstrat că, în cursul diferențierii, scade nivelul collagenului tip I și tip III și crește conținutul de tip IV, laminină și glicozaminoglicani. De asemenea, scade fibronectina pericelulară. Pentru diferențierea preadipocitelor este necesară o sinteză activă de collagen [39, 146].

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, a înlocuirii sau a regenerării unui țesut sau organ lezat. Beneficiile celulelor ASC în ingineria tisulară și medicina regenerativă sunt variate. În primul rând, introducerea lor într-un țesut bolnav poate stimula recuperarea datorită secreției de citokine și de factori de creștere. În plus, ele pot modula „nișa de celule stem” ale țesutului-gazdă, prin stimularea recrutării endogene de celule stem și promovarea diferențierii lor către acele tipuri celulare specializate necesare pentru regenerare/vindecare. Nu în ultimul rând, ele pot furniza antioxidanți și proteine chaperone la situsul ischemic [28, 87, 94, 102].

Spre deosebire de grefele autologice de țesut, disponibile pe scară largă, dar care prezintă numeroase limitări, strategiile de inginerie tisulară actuale își propun crearea de suporturi implantabile care să mimeze cât mai exact micromediul natural al celulelor pentru care sunt concepute. Astfel, ele trebuie să furnizeze o matrice optimă la care celulele să adere și care să le permită, în același timp, proliferarea și diferențierea.

Culturile celulare alogene

În acest tip de celule sunt evidențiate celulele stem de origine embrionară, care, de obicei, sunt colectate din embrionul în fază de blastocist, într-o perioadă de 5 zile de la fecundarea oocitului de către spermatozoid, și sunt colectate din masa celulară localizată în interiorul blastocistului, din care se dezvoltă 3 foițe embrionare (ectoderm, mezoderm și endoderm). Aceste grefe de celule pot servi drept sursă pentru obținerea de celule stem, deoarece dispun de o capacitate mare de proliferare și multiple posibilități de diferențiere în tipuri de celule necesare pentru transplantarea în încercarea de a trata diferite defecte și maladii. Celulele respective sunt totipotente, din ele se pot dezvolta orice tip de celule caracteristice organismului matur. În pofida faptului că celulele embrionare deja au fost utilizate în tratamentul experimental *in vivo* (studii experimentale) și pe pacienți cu diferite patologii, posibilitatea utilizării lor în tratamente pe pacienți în instituțiile medicale generează mai multe discuții, preponderent de origine etică. Totodată, în afară de problemele de origine etică, se atestă și altele: aceste celule, fiind foarte active, există pericolul și riscul de malignizare, dar și de posibile reacții adverse, cum ar fi rejetul grefelor celulare transplantate. Prin manipularea celulelor de origine embrionară, savanții au generat tulpini celulare stem imortalizate [97, 104].

Există alte surse de celule stem, cum ar fi membrana amniotică, din care, prin metode experimentale (iepuri), au fost dobândite celule stem din învelișurile amniotice. Ulterior din ele au fost cultivate celule stem predecesoare *in vitro* pe o meșă construită din collagen. Aceste grefe au fost utilizate în recuperarea unui defect al membranei amniotice ca rezultat al fetoscopiei.

Celulele fetale pot fi izolate din sângele fetal, măduva osoasă și din alte țesuturi fetale, cum sunt ficatul și rinichiul. Se cunoaște că țesuturile fetale nu au un sistem imun maturat, ceea ce face posibilă o reacție imunologică mai blândă la aceste țesuturi, inclusiv la celulele obținute din ele, fapt care reduce probabilitatea reacțiilor imune după transplantare [96].

Sângele fetal este bogat în celule stem hematopoietice (CSH), care proliferază mai rapid decât celulele cordonului ombilical sau celulele măduvei osoase de la adult. În primul trimestru, sângele fetal conține o populație de CSM care susțin hematopoieza și se pot diferenția în mai multe linii celulare [2, 96].

Majoritatea celulelor care formează țesuturile fetale sunt în proces de diferențiere, adică slab diferențiate, totodată au proprietăți mari de proliferare și de diferențiere și se pot implica în procesul de regenerare a țesuturilor și organelor. Originare din țesuturile fetale, celulele predecesoare, la utilizarea în tratamentul diferitor maladii prin implantare în organismul primitorului, pot să se diferențieze și să se transforme în celule identice cu cele din loja (regiunea) în care au fost inoculate [140]. Capacitatea de proliferare celulară este dependentă de densitatea

cu care sunt înșămânțate și de gradul de viabilitate în mediul existent. Pe parcursul creșterii și proliferării, celulele elimină, pe lângă alte substanțe, ca rezultat al metabolismului celular, o cantitate impunătoare de factori de creștere și de diferențiere.

Astfel, la inocularea celulelor, împreună cu mediul nutritiv în care cresc, se administrează o cantitate anume de citokine și factori de creștere caracteristici tipului de celule crescute, care pot participa la stimularea regenerării țesuturilor. Grefele celulare sus-numite sunt colectate de la embrioni umani, obținuți în cadrul avorturilor medicale, efectuate, de obicei, în termenul de 8-12 săptămâni. Altă sursă de celule fetale alogene o reprezintă celule fetale obținute din sângele cordonului ombilical, placentă sau din lichidul amniotic [2, 144, 146].

O cale care ar putea soluționa necesitatea obținerii unei cantități suficiente de celule pentru transplant ar fi clonarea sau așa-numitul transfer nuclear (de nucleu somatic) într-un oocit denucleat, care permite obținerea celulelor asemănătoare celulelor izogenice (celulele obținute de la gemeni monoziгоți). Aceste celule sunt practic identice cu cele ale recipientului (pacientului) și această modalitate ar putea soluționa problema deficitului materialului donator. Urmează o cale lungă de evaluare și perfecționare a tehnologiilor de obținere a celulelor prin aceste tehnologii relativ noi.

Celule fetale de origine alogenă pot fi obținute într-o cantitate mare. Folosirea lor pe scară largă este limitată din cauza barierei imunologice, care împiedică încorporarea țesuturilor incompatibile. Acest fapt se confirmă prin următorul argument: blastocistul, deși conține și antigenii tatălui, necompatibili cu ai mamei, nu se respinge, cu toate că lipsește bariera placentară. Celulele stem embrionare aflate în cultură cu T-limfocite inhibă proliferarea lor. Luând în considerare capacitatea de proliferare și diferențiere a celulelor predecesoare de origine embrionară și capacitatea imunologică diminuată, acestea reprezintă o sursă bogată pentru medicina de regenerare și inginerie a țesuturilor [2, 142, 145].

Donatorii maturi, de asemenea, pot oferi o gamă largă de celule de origine alogenică. Ca surse de celule ar fi celulele obținute din depourile de măduvă osoasă roșie de la nivelul metafizelor osoase, al oaselor bazinului, al sternului. Aceste surse ar putea asigura medicina regenerativă cu celule pentru tratamentul maladiilor hematopoietice, dar și al țesuturilor și organelor lezate [1, 148, 150]. În prezent, pentru recuperarea țesuturilor și organelor, sunt folosite celule de origine alogenă, obținute din depourile organismului de măduvă osoasă. Pentru tratarea cu succes a unor maladii oncologice ale sângelui, a anemiilor, a maladiilor imunodeficiente, a leucemiilor, se folosește transplantarea celulelor alogene de origine hematopoietică, care sunt stocate în băncile de celule stem. Ceea ce limitează utilizarea acestor metode este posibilitatea rejektului acestor celule transplantate, în cazul în care sistemul antigenului leucocitar uman (HLA) al donatorului nu

corespunde sau corespunde numai parțial cu cel al donatorului de măduvă osoasă. Anume din aceste considerente rețeaua de bănci de celule stem care au apărut în ultimul timp sunt îndreptate spre soluționarea acestei probleme, oferind o gamă mai largă de grefe celulare pentru selectare [94, 118, 136].

Celule ombilico-placentare umane

Stocarea sângelui din cordonul ombilicului a început relativ recent, în 1988, în Franța, după ce a fost realizat primul transplant de celule stem din sângele ombilical în cazul unui copil de 6 ani care suferea de anemia Fancony. Astfel, sângele cordonului ombilical a devenit încă o sursă de CSH și a adus la crearea unor bănci de CSH din sângele cordonului ombilical. Sângele cordonului ombilical are mai multe avantaje: colectarea sângelui ombilical nu reprezintă dificultăți și nu-i provoacă niciun efect negativ donatorului. Sângele ombilical, care reprezintă o grefă de celule stem hematopoietice, se poate colecta și păstra după nașterea copilului, creând o rezervă de celule stem hematopoietice. Probabilitatea transmiterii maladiilor la transplantarea acestui material este redusă la minimum datorită efectuării investigațiilor necesare gravidei până la naștere și datorită testării nemijlocite a sângelui colectat. Totodată, este asigurată posibilitatea efectuării testelor imunologice necesare până la transplantare. Un grup de autori sud-coreeni au prezentat un caz clinic de tratament cu celule obținute din sângele ombilical al unei femei cu traumatism al măduvei spinării. Au fost inoculate subdural și subarahnoidian câte 1 milion de celule, fără să fie efectuată testarea compatibilității lor după sistemul HLA. La două săptămâni de la inoculare, pacienta a început să miște picioarele. Complicații legate de transplantare nu au fost înregistrate [2, 47].

Din dezavantajele SCO putem evidenția că toată cantitatea de celule colectată prin această metodă poate să nu fie suficientă pentru un copil corpulent sau pentru un adult, deoarece volumul optimal pentru o grefare reușită încă nu este stabilit, ceea ce constituie un factor limitativ important. La fel, încă nu se cunoaște cu precizie durata de viabilitate a SCO în condițiile în care se păstrează în băncile de sânge. În datele publicate este indicat termenul de 10-15 ani (după care ar urma recuperarea funcțională a celulelor stem). Majoritatea unităților de sânge utilizate până în prezent au fost crioconservate pentru un termen de 6 ani și mai puțin [1, 94].

Au fost efectuate mai multe studii cu utilizarea grefelor de la donatori neînruțiți, în care au fost implicați între 18 și 562 de subiecți. Majoritatea pacienților au beneficiat de grefe care prezentau o incompatibilitate HLA.

Dovezile emergente arată că diferite țesuturi adulte ale corpului uman adăpostesc cantități mici de CSM adulte care au potențialul de a da naștere la toate tipurile de celule ale țesutului specific în care se află. Aceste celule au fost găsite în măduva osoasă, mușchi, grăsime, creier, cartilaj, pulpă dentară etc. Eforturile de cercetare realizate anterior au arătat că CSM adulte au un

potențial terapeutic larg datorită capacității lor de a se diferenția față de mai multe tipuri de celule adulte în condiții adecvate. Această proprietate unică caracterizează CSM adulte ca potențiali candidați pentru aplicații biomedicale și clinice. În ultimul deceniu, țesuturile extraembrionare umane (placenta, membranele amniotice și cordonul ombilical), precum și lichidele placentare umane (lichidul amniotic și sângele din cordonul ombilical) au fost definite ca surse de CSM ceea ce reprezintă un mare interes pentru medicină. Placenta umană este un organ fetomatern, care funcționează ca o barieră naturală între mamă și făt și joacă un rol crucial pentru nutriție și toleranța imună pe toată perioada dezvoltării fetale. Din punct de vedere anatomic, placenta poate fi împărțită în patru regiuni: epitelial amniotic, mezenchimal amniotic, mezenchimal corionic și trofoblastic corionic. Urmează ca oamenii de știință în domeniu să cerceteze proprietățile imunomodulatoare ale placentei umane, precum și aplicabilitatea clinică a unor astfel de părți placentare precum membranele amniotice pentru vindecarea rănilor, tratamentul arsurilor și reconstrucția cavității bucale. Datorită structurii și funcțiilor specifice placentei, CSM-urile extraembrionare umane reprezintă tipuri de celule stem care combină unele proprietăți ale celulelor stem embrionare pluripotente cu alte proprietăți ale CSM-urilor multipotente. Datorită relației strânse ontogene cu celulele stem embrionare, CSM-urile derivate din diferite regiuni placentare, precum și din lichidul amniotic și sângele din cordonul ombilical au caracteristici imunoprivilégiare, o plasticitate mai largă și proliferază mai repede decât CSM-urile adulte. Mai mult decât atât, placenta umană este în mod normal aruncată după naștere, iar celulele pot fi izolate evitând orice preocupări etice [14, 18].

1.4. Trialuri clinice cu utilizarea celulelor stem dentare

Biologia celulară, în general, și biologia celulelor stem embrionare sau adulte, în particular, permit, la ora actuală, desfășurarea unor direcții interesante de cercetare, care trebuie explorate în vederea de a identifica întregul spectru al tipurilor de celule stem care prezintă anumite caracteristici utile pentru tratamentul diferitelor maladii. În timp ce pluripotența și capacitatea de reînnoire a celulelor stem embrionare sunt bine cunoscute, potențialul terapeutic al celulelor stem adulte și fetale rămâne doar parțial elucidat [1, 29].

Anomaliile comune, precum ageneziile dentare sau leziunile corono-radiculare, nu reprezintă afecțiuni fatale, dar au o importanță clinică majoră. Deși rămân multe întrebări importante fără răspuns, cum ar fi natura exactă a celulelor capabile să dea naștere țesuturilor dentare, asigurarea unei surse indicate pentru înlocuirea structurilor orale și rezultatele care arată abilitatea celulelor nondentare cultivate pentru a înlocui mezenchimul embrionar,

transformându-l în primordiu dentar complet la nivelul maxilarului adult, oferă o posibilitate reală pentru țesuturile dentare produse *in vitro* și transplantate autolog în terapia umană [3].

Bineînțeles că și alte surse celulare au fost luate în considerare pentru potențialul lor plastic. O astfel de sursă a fost reprezentată de celulele stem embrionare, care, deși sunt capabile să dea naștere celulelor progenitoare, ridică numeroase probleme de etică de importanță critică. Avantajul distinctiv al utilizării CSM-urilor este faptul că sunt celule stem recoltate de la donatori capabili să-și exprime consimțământul informat [2, 88].

Dinții au o compoziție structurală complexă, care asigură atât duritate, cât și durabilitate. Cu toate acestea, structura lor este vulnerabilă la traume și infecții bacteriene. Când dintele este deteriorat, dar încă într-o stare de a putea fi tratat, regenerarea unor părți din structura dintelui poate preveni sau întârzia pierderea întregului dinte. Acest fapt este de o importanță majoră, deoarece pierderea dinților afectează nu numai funcțiile de bază ale aparatului stomatognat, dar și calitatea vieții. Răspunsul regenerativ al dinților la deteriorarea și degenerarea structurală este divers, deoarece dinții sunt structuri complexe. Dintre toate structurile dentare doar smalțul este incapabil de regenerare în structura sa inițială, în timp ce țesuturile rămase posedă această calitate în grade diferite, în funcție de mai mulți factori. Pulpa dentară joacă un rol important în regenerarea dinților, prin participarea la un proces numit dentinogeneză reparatorie. Când țesutul pulpar este expus unei pierderi de dentină, terapia prin coafajul direct permite pulpei de a forma un strat nou de dentină. S-a observat că utilizarea diferiților compuși, cum ar fi hidroxidul de calciu și mineral agregat trioxid, promovează activitatea dentinogenezei [75, 81].

Celulele care rămân în partea sănătoasă a pulpei migrează în cea afectată, proliferază datorită factorilor de creștere eliberați din jurul dentinei-matrice și atașează stratul necrotic pentru a forma osteodentină. Mai târziu, celulele atașate de osteodentină diferențiază în odontoblaste pentru a produce dentină tubulară, formând astfel dentina reparatorie. Acest țesut mineralizat precoce păstrează integritatea pulpei și servește ca barieră de protecție. Când dintele este în continuare deteriorat, regenerarea dentinară devine dificilă, deoarece necesită o pulpă sănătoasă. Astfel, traumele mai mari sau cariile avansate sunt tratate prin terapie endodontică, în care întreaga pulpă este înlăturată și înlocuită cu un material de obturare canaliculară. Cu toate acestea, pulpa vie este esențială pentru menținerea homeostaziei și longevității dintelui. O formă ideală de terapie ar putea consta în abordări de regenerare în care pulpa necrotică este eliminată și înlocuită cu țesuturi pulpare regeneratoare pentru revitalizarea dinților. În special, terapia pulpară de regenerare ar reconstitui țesutul normal continuu la frontiera dintre pulpă și dentină, prin reglementarea proceselor țesuturilor specifice de dentinogeneză reparatorie [66, 121].

Două tipuri de regenerare a pulpei dentare pot fi luate în considerare în funcție de situațiile clinice: regenerarea parțial *in situ* a pulpei sau sinteza *de novo* a înlocuirii totale a pulpei. Ingineria tisulară și regenerarea țesutului pulpar dentar rămâne încă o sarcină dificilă. Un țesut pulpar regenerat trebuie să fie funcțional competent: să fie vascularizat, să conțină celule similare cu cele ale pulpei naturale, să fie capabil de a da naștere la noi odontoblaste, să producă dentină nouă și să fie inervat. Primul pas pentru ingineria tisulară este de a izola celule cu fenotipuri corecte și a le propaga în medii de cultivare adecvate [6, 123, 125].

1.5. Sinteza capitolului 1

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

2. Literatura de specialitate în domeniu nu prezintă o viziune unică asupra ponderii și a rolului celulelor stem din dinte în calitate de surse de celule pentru medicina regenerativă. Evidențierea acestor date în prezenta cercetare va permite identificarea anumitor căi și soluții privind utilizarea celulelor stem din dinte în medicina practică.

3. Stabilirea vârstei și a dinților favorabili de a fi colectați ca sursă de celule pentru terapia celulară reprezintă elemente determinative în dezvoltarea domeniului de cercetare. În acest context, este necesară evaluarea potențialului pulpei dentare, la femei și bărbați, ca sursă de celule stem pentru tratament. Urmează a fi dezvoltată posibilitatea determinării prin metode neinvazive a numărului posibil de celule nucleate stem din pulpa dentară.

4. Se impune identificarea unor modalități și tehnici de revitalizare a dintelui devitalizat sau de creare a dinților prin intermediul ingineriei tisulare.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Pornind de la ipoteza de cercetare și în scopul realizării obiectivelor tezei, în perioada 2012-2021 am realizat acest studiu, în care am efectuat o caracterizare a celulelor nucleate din țesuturile dentare, precum și o analiză comparativă a acestora.

Pentru realizarea acestui studiu am apelat la diverse metode de cercetare, cu fixarea fenomenelor observate și cu explicarea dinamicii, a tendințelor și a corelației acestora cu diverși factori.

Prezenta cercetare a fost realizată în patru etape:

Etapa I. Definirea problemei și elaborarea planului de cercetare

1. Analiza surselor științifice și metodico-didactice în domeniul de cercetare
2. Formularea 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 tehnicilor de acumulare a materialului studiat
2. Înregistrarea observațiilor pe parcursul efectuării studiilor experimentale și completarea fișelor cu datele obținute

Etapa III. Analiza comparativă a rezultatelor obținute

Etapa IV. Analiza statistică și sinteza rezultatelor obținute

2.1. Caracterizarea generală a cercetării efectuate: etapele și designul studiului

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 ianuarie 2013).

Studiul actual, inclusiv cel experimental, a fost realizat în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare și al Catedrei de anatomie și anatomie clinică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „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 cu greutatea de $0,450 \pm 1,500$ kg. Animalele experimentale au fost întreținute în condiții similare cu hrană identică.

Intervențiile chirurgicale s-au efectuat cu respectarea strictă a condițiilor aseptiei și antisepsiei și în conformitate cu prevederile Comitetului Internațional pentru Utilizarea și Îngrijirea Animalelor. Toate animalele au fost tratate în conformitate cu politicile și principiile

îngrijirii animalelor de laborator, precum și cu protocoalele bioetice ale Uniunii Europene (86/609/CEE). Animalele au fost adăpostite în cuști individuale, fabricate din metal și plastic hipoalergen, într-o cameră prevăzută pentru animalele de laborator, unde au fost menținute o temperatură constantă de 22°C și o umiditate relativă de 55%, cu ventilarea încăperii de 18-20 de ori timp de o oră și cu un ciclu lumină-întuneric de 12 ore. Animalele aveau acces liber la hrană echilibrată în vitamine și minerale și la apă. Perioada de adaptare și de observație a fost de o săptămână înainte de intervenția chirurgicală. Toate animalele au fost vaccinate conform planului veterinar și nu erau purtătoare de boli transmisibile.

Conform tabelului 2.1, pentru a avea un lot reprezentativ de animale, au fost investigate 25 de animale. De la fiecare animal s-au extras câte 2 molari (fig. 2.1), astfel în studiu au fost incluși 50 de molari extrași de la purceluși vietnamezi.

Tabelul 2.1. Repartizarea dinților colectați pe grupe

Sursa dinților	Numărul de subiecți	Dinți extrași	Vârsta (ani)	Greutatea
Dinți umani	100	100	6 – 35	-
Dinți purceluși vietnamezi	25	50	4,8 ± 1,2 luni	0,450 ± 1,500 kg

Studiul desfășurat pe dinții colectați de la animalele de laborator (purceluși vietnamezi)

Animalele au fost operate sub anestezie generală, prin administrarea intramusculară a amestecului de Calypsol (Ghedeon Rihter) și Apaurin (KRKA), în raport 1:1, volumul anestezicului a fost utilizat în funcție de greutatea animalului și a constituit 1 ml de amestec/kg la masa corporală. Pentru a micșora sensibilitatea țesuturilor, local a fost infiltrată o soluție de lidocaină 2% 2 ± 0,8 ml. A fost prelucrată cavitatea bucală cu soluție de betadină, iar după efectuarea sindesmotomiei a avut loc extracția propriu-zisă a molarilor superiori și inferiori, cu suturarea plăgii restante cu fire resorbabile (fig. 2.2; 2.3). Dinții extrași au fost prelucrați cu soluție de 70% etanol, apoi au fost plasați în eprubete sterile, care conțineau mediu nutritiv DMEM (HIMEDIA), +4°C pentru a fi transportați în laborator pentru procedurile de izolare a celulelor.

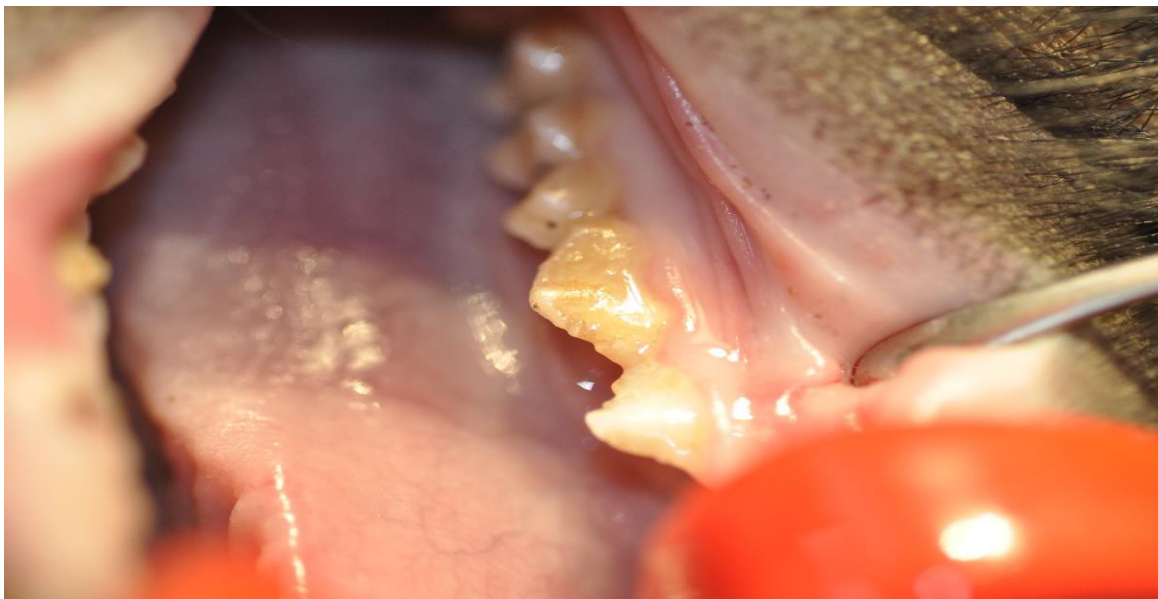


Fig. 2.1. Extragerea dinților la purceluși vietnamezi – câte 2 molari de la fiecare purceluș vietnamez



Fig. 2.2. Prelucrarea chirurgicală a plăgii după extracție

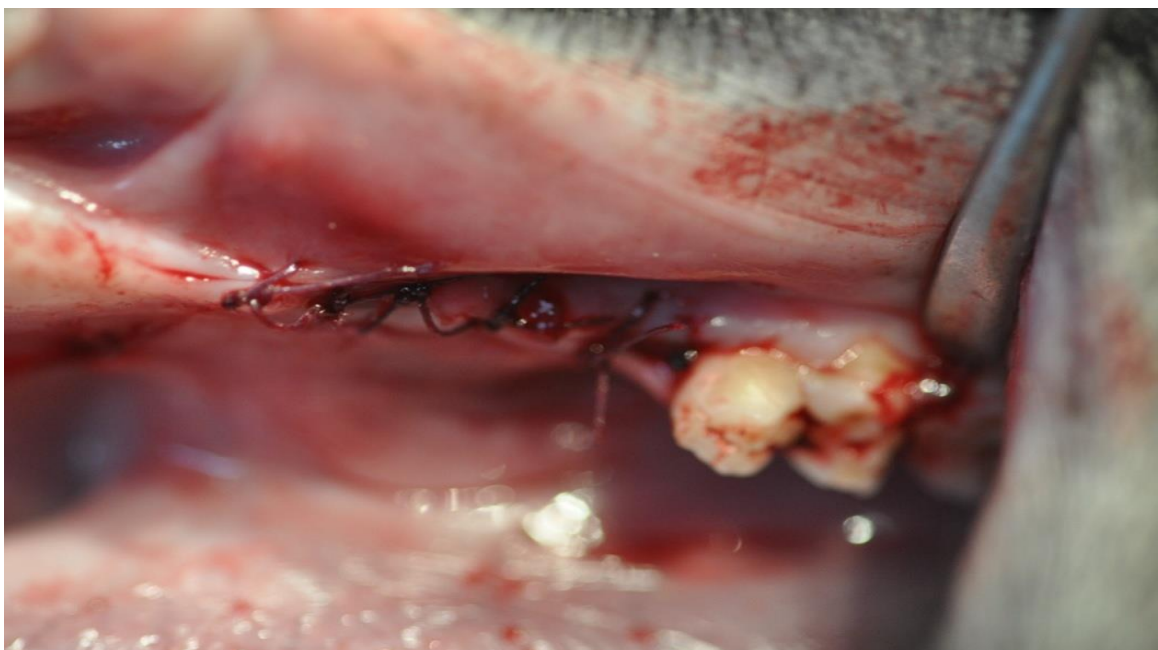


Fig. 2.3. Sutura plăgii după extracție cu fire din material resorbabil

Studiul efectuat pe dinții colectați de la subiecți umani

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

- 1) Lotul de cercetare L_1 , care a inclus 70 de dinți permanenți extrași de la subiecți umani: 35 de femei și 35 de bărbați, cu vârsta cuprinsă între 20-35 de ani;
- 2) Lotul de cercetare L_2 , care a inclus 30 de dinți temporari extrași de la copii: 15 de sex feminin și 15 de sex masculin, cu vârsta cuprinsă între 6-12 ani (tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Repartizarea în loturi de studiu a dinților colectați de la subiecți umani

Lotul	Dinți permanenți	Dinți temporari	Vârsta (ani)	Sex masculin	Sex feminin
L_1	70		20 – 35	35	35
L_2		30	6 – 12	15	15

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.

Studiul în cauză a fost realizat în conformitate cu cerințele Comitetului de etică a cercetării, în baza unui acord informat sau a unui acord informat proxim de la fiecare pacient. Pentru atingerea obiectivelor trasate, au fost efectuate cercetări conform Protocolului de investigare

clinică, care cuprinde colectarea și interpretarea datelor anamnestice ale examenului clinic obiectiv și rezultatele examinărilor paraclinice.

Pe parcursul studiului am utilizat următoarele metode de colectare a datelor: interviuarea pacienților conform unui chestionar special elaborat, analiza documentației medicale pentru completarea datelor, aprecierea rezultatelor investigațiilor clinice și paraclinice.

Dinții au fost extrași din motive ortodontice și profilactice. După prelucrarea cavității bucale cu soluție de betadin, a fost efectuată anestezia locală cu soluție Septanest 4% – 1,7 ml. După efectuarea sindesmotomiei, s-a recurs la extracția propriu-zisă a dintelui, apoi la aplicarea suturii. Dinții extrași au fost prelucrați cu soluție de 70% etanol, plasați în eprubete sterile, ce conțineau mediu nutritiv DMEM (HIMEDIA), antifungice, antibiotice, pentru a fi transportați în laborator și pentru a realizate apoi procedurile de izolare.



Fig. 2.4. Tub în care se plasează pulpă dentară în soluție de mediu nutritiv DMEM cu 10% ser bovin fetal

2.2. Metode de cercetare

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) [124], dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras). Dispozitivul a fost revăzut să nu cauzeze supraîncălzirea dintelui extras, să fie mai simplu în utilizare, mai ieftin în producere și să permită extragerea integră a pulpei dentare. În prealabil, măsura demontabilă și componentul de fragmentare demontabil au fost supuse sterilizării la temperatura de 180°C pentru 45 min. După prelucrarea dintelui extras cu antiseptici, acesta a fost plasat pe măsura demontabilă în așa fel ca suprafața ocluzală a dintelui să fie perpendiculară cu tija de compresie. La răsucirea tijei filetate

prin intermediul mânerului, componentul de fragmentare a acționat prin compresie asupra dintelui, fragmentându-l. Astfel s-a obținut pulpa radiculară și coronară (fig. 2.4). După obținerea pulpei dentare și plasarea într-un mediu nutritiv steril, dispozitivul a fost dezasamblat, iar părțile componente ale acestuia au fost curățate și sterilizate (fig. 2.5).

Dispozitivul utilizat corespunde cerințelor și normelor sanitare, fiind executat din material inoxidabil și destinat pentru fabricarea instrumentarului medical [79].

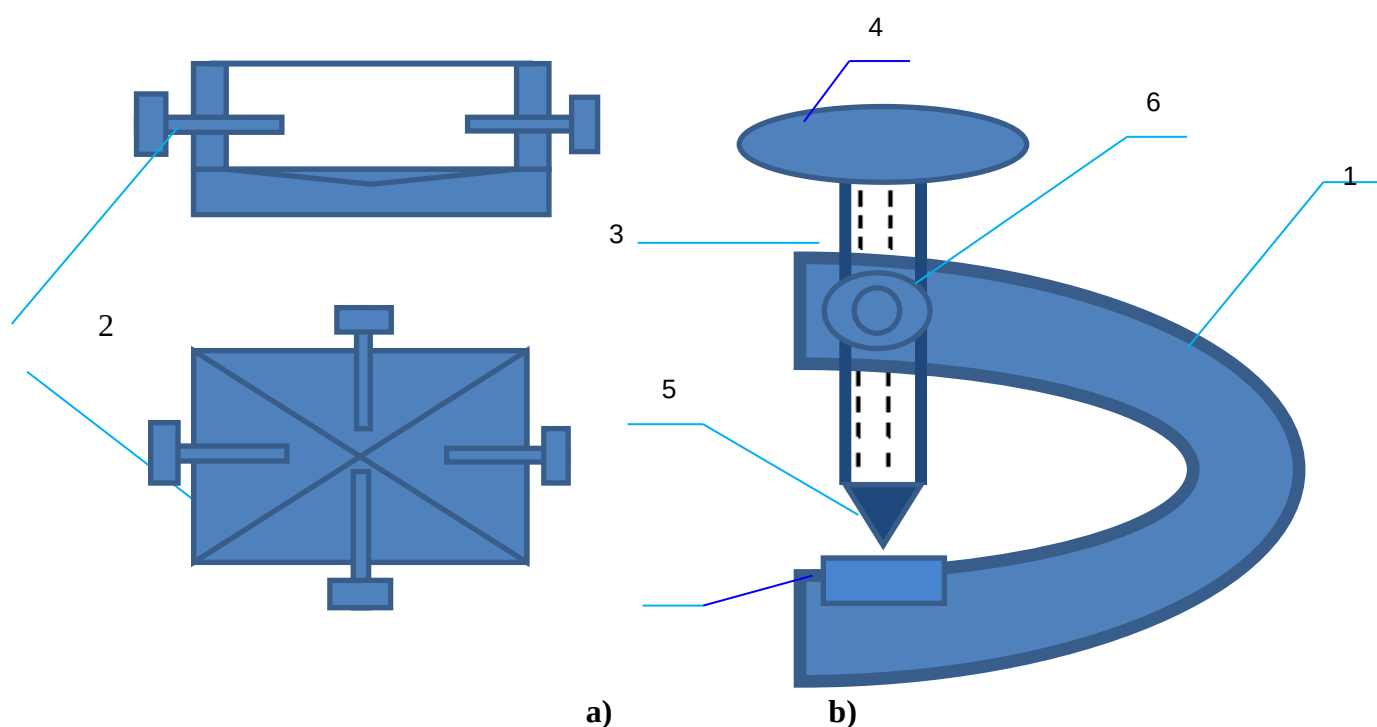


Fig. 2.5. Dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras:

- a) – măsura demontabilă, în secțiune și din superior; b) – aspectul lateral al dispozitivului;**
a) și b) conțin soclul stabilizator, reprezentat de un dispozitiv metalic în formă de potcoavă (elipsă) – 1, pe el este fixată o măsura demontabilă – 2, dreptunghiulară cu o eminență 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.

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 (tabelul 2.3, 2.4). 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).

Tabelul 2.3. Repartizarea în loturi de studiu a dinților colectați de la subiecți umani conform metodelor de izolare a celulelor nucleate din pulpa dentară

Lotul	Dinți permanenți	Dinți temporari	Vârsta (ani)
Lotul I (metoda enzimatică)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32
Lotul II (metoda prin explant)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32
Lotul III (metoda prin explant cu fixarea sub lamelă în mediu)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32

Tabelul 2.4. Repartizarea în loturi de studiu a dinților colectați de la purceluși vietnamezi conform metodelor de izolare a celulelor nucleate din pulpa dentară

Lotul	Dinți purceluși vietnamezi	Vârsta (luni)
Lotul I (metoda enzimatică)	16	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30
Lotul II (metoda prin explant)	16	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30
Lotul III (metoda prin explant cu fixarea sub lamelă în mediu)	18	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30

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. (fig. 2.6), În

grupurile I și III, fragmentele au fost digerate într-o soluție de 1 mg/ml collagenază/dispază 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 μ g/ml streptomicină și 1 μ g/ml amfotripsină B [16]. Grupurile II și III au fost acoperite cu o lamelă, pentru a fixa țesutul și a împiedica mișcarea acestuia în mediu. Toate speciemenle au fost incubate la 37°C și 5% CO₂ 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.

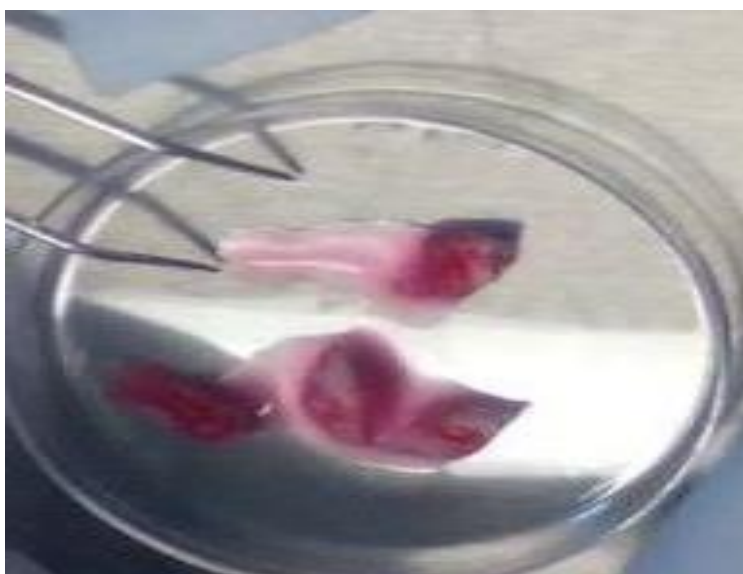


Fig. 2.6. Pulpe dentare native extrase din dinți permanenți, plasate în vase Petri cu mediu nutritiv

Cultivarea celulelor în vase de cultură

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/dispază 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 ($p < 0,05$).

Metode de diferențiere a celulelor

Diferențierea osteogenică (odontoblastică)

În scopul de a induce diferențierea osteogenică (odontoblastică), celulele la o densitate de $3500/\text{cm}^2$ au fost cultivate în DMEM, cu 10% FBS, 1% penicilină-streptomicină, 0,1 mM dexametazonă (Sigma), 50 M ascorbat-2-fosfat (Sigma), 10 mM glicerofosfat (Sigma). Mediul a fost schimbat la fiecare 3-4 zile. Celulele din mediul bazal au fost folosite pentru control. Pentru a demonstra diferențierea osteogenică, după 21 de zile, celulele au fost fixate și colorate pentru ALP [118, 128].

Diferențierea condrogenică (cultura Micromass)

Celulele din culturi subconfluente au fost detașate cu 0,05% tripsină în 0,01% EDTA, numărate și utilizate pentru a genera culturi Micromass. Așadar, $2,5 \times 10^5$ celule au fost centrifugate la 500 rpm în tuburi de polipropilenă conice de 15 ml, iar paletele rezultate au fost cultivate timp de 4 săptămâni. Culturile de control au fost crescute în compoziție chimică definită un ser-free mediu, constând din DMEM suplimentat cu 1 μM insulină bovină, 8 nM apo-transferină, 8 nM BSA, 4 μM acid linoleic, 1 mM piruvat de sodiu. Pentru a induce diferențierea condrogenică, mediul de control a fost suplimentat cu 10 ng/ml TGF, 100 nM dexametazonă și 250 μM ascorbat 2-fosfat. Culturile au fost incubate timp de 4 săptămâni la 37°C , într-o atmosferă care conține 5% CO_2 , umiditatea 85%, mediul a fost schimbat la fiecare 2-3 zile. Agregatele de celule au fost recoltate la 2 și 4 săptămâni, apoi fixate și prelucrate pentru histologie [68].

Metodele macro- și microscopice de studiere a țesuturilor dentare

După prelevarea pieselor anatomice (pulpei dentare), în funcție de lotul experimental, cu maximă atenție au fost preparate și inspectate formațiunile adiacente. În acest proces au fost luate în considerare forma, consistența și vascularizarea. După înlăturarea țesuturilor dure, regiunea a

fost prelevată în bloc (macropreparat), cu marcarea lui ulterioară. Preparatele au fost păstrate în soluție de formalină tamponată cu concentrația de 10% și pH neutru [27, 93].

Investigațiile microscopice la nivelul de studiu al macropreparatelor s-au efectuat conform metodelor tradiționale. Preparatele au fost deshidratate în soluție alcoolică de concentrație ascendentă, ulterior fiind incluse în blocuri de parafină. Din aceste blocuri s-au făcut secțiuni histologice cu grosimea de 5 μ m la microtomul cu glisieră. Studiarea microscopică, cu obținerea imaginilor lamelor histologice, s-a efectuat cu ajutorul microscopelor MICROS (Austria), dotate cu sistem digital de captare a imaginii (camera CAM V300 color). Au fost captate mai multe imagini histologice în format JPEG, care au fost utilizate la documentarea studiului menționat.

Colorarea cu soluție de hematoxină și eozină

Studiu histologic

Pieseile au fost prelucrate prin intermediul tehnicii histologice clasice, pentru a fi incluse în parafină. După deparafinare, secțiunile reușite au fost colorate cu hematoxină-eozină (70 de preparate): nucleeele s-au colorat în albastru-închis, în timp ce citoplasma – în diverse nuanțe de roz, colagenul în roz-pal. La colorația după Giemsa, nucleeele sunt albastre, citoplasma – bleu. Granulele se colorează diferit: eozinofilele – în portocaliu, celulele granulocitare tinere – în roșu-violet. Țesuturile dure dentare au fost colorate cu hematoxină-eozină și apoi s-au realizat preparate șlif din acestea. Pentru a vizualiza morfologia generală a celulelor, secțiunile au fost colorate cu hematoxină și eozină. Hematoxina colorează nucleeele cu albastru, în timp ce citoplasma, țesutul conjunctiv și alte structuri extracelulare au fost colorate cu roz sau roșu de eozină. Secțiunile selectate au fost deparafinate cu spălări histocleare de 2 x 10 min. și apoi rehidratate printr-o serie gradată de spălări cu etanol de 2 min. (100%, 90%, 70% și 50%). Ulterior, secțiunile au fost spălate timp de 10 min. în apă distilată, înainte de scufundare în hematoxină Erhlich timp de 10 min. Hematoxina în exces a fost îndepărtată prin spălarea secțiunilor sub jet de apă timp de 10 min. Apoi, secțiunile au fost clătite scurt în apă distilată și apoi scufundate în alcool acid (0,5% HCl, 70% etanol) timp de 15 sec. După care secțiunile au fost colorate cu eozină apoasă 0,5% timp de 2 min. și spălate în apă distilată înainte de deshidratare printr-o serie de spălări cu etanol (70%, 90% și două 100%) timp de 2 min. fiecare. După curățarea în două schimbări de histoclear, secțiunile au fost acoperite cu Neo-Mount® sub hotă. Secțiunile au fost vizualizate în câmp luminos cu ajutorul microscopului Zeiss (Axioskope 2 plus) și capturate cu un AxioCam HRC, prin intermediul software-ului Axiovision.

Colorarea cu albastru de anilină

Lamelele au fost plasate în două spălări histocleare, câte 10 min. fiecare, urmate de rehidratare în spălări descrescătoare cu etanol (100%, 90%, 70%, 50%), la 2 min. fiecare. După o spălare cu apă deionizată de 2 min., lamelele au fost colorate cu hematoxilina Ehrlich timp de 10 min. După aceea, secțiunile au fost spălate ușor în apă curentă timp de 10 min. și clătite cu apă deionizată înainte de colorare cu albastru anilină 2,5% timp de 2 min. Apoi lamelele au fost clătite scurt în apă deionizată și scufundate în acid acetic 1% timp de 5 min., după care a urmat altă clătire cu apă deionizată. Lamelele au fost deshidratate cu etanol 90% (1 min.) și două spălări cu etanol 100%, la 5 min. fiecare. Înainte de acoperire cu Neo-Mount, lamelele au fost curățate în două spălări de 5 min. cu histoclear și lăsate să se usuce peste noapte la temperatura camerei într-o hotă [76, 93].

Microscopia electronică prin scanare a fost utilizată la studierea structurii de suprafață a pulpei dentare native și decelularizate. Pentru aceasta, pulpele dentare extrase au fost spălate în PBS și au fost plasate în soluție de 2% de glutaraldehidă (pH 7.2 – 7.4) (SIGMA) pentru 2 ore, apoi au fost deshidratate în soluție de acetonă. După uscare, mostrele au fost acoperite cu praf de aur, după care au fost studiate la microscopul electronic prin scanare Vega Tescan (fig. 2.7) în Laboratorul de testare a materialelor din cadrul Universității Tehnice a Moldovei. Intensitatea curentului a fost de $30,0 \pm 0,2$ kV. Această metodă a fost utilizată pentru studierea particularităților de structură ale suprafeței pulpei dentare native și decelularizate. De asemenea, a fost posibilă determinarea aderenței celulelor obținute din pulpa dentară la suprafața cultivată.

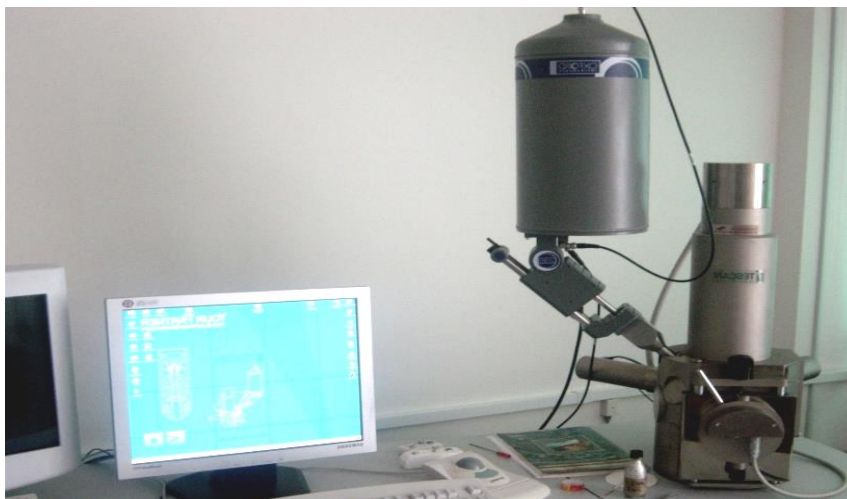


Fig. 2.7. Microscop pentru baleiaj electronic Vega Tescan

Studierea grefelor celulare

În Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare au fost studiate 60 de culturi celulare, obținute din diverse pulpe dentare: dinți purceluși vietnamezi – 50 și umani – 70. Studiarea vitală a proliferării celulelor nemijlocit în mediul de cultură s-a efectuat la microscopul inversat, cu contrast de fază KXD.

Pentru caracterizarea histologică din sedimentul celular, au fost preparate frotiuri uscate la aer și fixate în metanol absolut și vopsite după Romanovschi-Giemsa. Studiarea citologică s-a realizat cu microscop optic (amplificarea 400). Viabilitatea celulelor a fost apreciată prin vizualizare în microscopul optic după plasarea lor în soluție cu albastru de trepan – au fost considerate neviabile celulele în care, din cauza deteriorării membranei celulare, a pătruns colorantul, iar celula a căpătat o culoare albastră-închis.

Teste imunohistochimice

Din blocurile de parafină s-au făcut secțiuni cu grosimea de 5 μm la microtomul cu glisieră. După deparafinare cu xilol, secțiunile reușite se colorează conform protocolului propus de către producător. Culturile celulare au fost fixate în soluție de 2,0% de glutaraldehidă (SIGMA) pentru 20 min., iar apoi au fost procesate conform protocolului producătorului (set pentru marcarea celulelor pozitive (SIGMA)).

Pentru evidențierea celulelor stem, în cultura celulară cu fenotipul CD 34 și CD45 au fost utilizați markeri specifici CD 34 și CD45. S-a apelat la metoda indirectă tristadială – avidină-biotină-peroxidază. Tehnica a fost aplicată pe frotiuri din culturi celulare obținute din măduva osoasă, după fixarea prealabilă în soluție de formaldehidă 2% (SIGMA). S-a produs inhibarea peroxidazei endogene cu o soluție de apă oxigenată 3% (20 min.), iar după spălare în PBS, legarea situsurilor nespecifice cu ser de cal, s-a adăugat anticorpul primar specific, cu incubarea timp de 12 ore la temperatura camerei. După aceasta, s-a spălat repetat în soluție PBS și s-a adăugat anticorpul secundar, biotinitat, care a fost incubat în cameră umedă timp de 30 min. la temperatura camerei. S-a spălat repetat în soluție PBS, incubat 45 min. cu streptavidină (LSAB kit, DAKO), apoi s-a spălat în apă și s-a adăugat soluție de diaminobenzidină, care a produs un precipitat de culoare brună în citoplasma sau nucleul celulei. După montarea lamelei, acestea s-au cercetat la microscopul optic și celulele colorate (CD 34 pozitive) au fost apreciate procentual la numărul total de celule.

Tomografia computerizată

TC a devenit o metodă indispensabilă în practica dentară. Aceasta se utilizează pe scară largă în tratamentul endodontic pentru examinarea morfologiei canalelor radiculare.

TC utilizată la măsurarea și calcularea volumului camerei pulpare poate furniza informații mai precise în scopul prognozării numărului posibil de celule din pulpa dentară. În acest sens, a fost utilizat aparatul Kodak 9500 (Dental Systems, Carestream Health), operat la 90 kVp, cu dimensiunea voxelului de 300 μm și cu câmpul vizual de 90 x 150 mm. Toate măsurările au fost realizate în plan coronal. Selectarea corespunzătoare a secțiunii a fost efectuată în modul următor: inițial planul coronar al molarului a fost aliniat în conformitate cu punctul de vedere axial și sagital al dintelui, apoi acesta a fost ajustat astfel încât punctul de vedere coronar să reprezinte o secțiune longitudinală dreaptă a dintelui de la vârful cuspidului la furcație.

Colorația cu roșu de alizarină pentru analiza mineralizației

O soluție de 40 mM Alizarin roșu (BDH, Marea Britanie) a fost ajustată la 10 mM pH4.2 cu acid acetic (BDH, Marea Britanie) (Gregory *et al.*, 2004). Colorarea a fost realizată prin fixarea celulelor în 10% paraformaldehidă (VWR, UK) timp de 30 min., apoi ele au fost spălate cu PBS, după care s-a adăugat soluție de roșu de alizarină 1ml la fiecare vas de cultură, agitând ușor cu expoziție timp de 20 min. Excesul de colorant a fost îndepărtat prin spălare cu soluție PBS. Lamelele au fost examinate la microscopul optic, fiind evaluate aglomerațiile vopsite în culoare roșietică, care indică structuri mineralizate produse de osteoblastele aflate în cultură.

Studierea morfologică

În condiții de laborator au fost studiați 30 de dinți temporari și 70 de dinți permanenți. Studiarea vitală a proliferării celulelor nemijlocit în mediul de cultură s-a efectuat la microscopul inversat, cu contrast de fază Olympus și KXD.

Pentru caracterizarea histologică din sedimentul celular au fost preparate froțiuri uscate la aer, fixate în metanol absolut și vopsite după Romanovschi-Giemsa. Studiarea citologică s-a realizat cu microscop optic (amplificarea x 400). Viabilitatea celulelor a fost apreciată prin colorare cu albastru de trepan și vizualizare microscopică. Sunt considerate neviabile celulele în care pătrunde colorantul din cauza deteriorării membranei celulare.

Examinarea microscopică a lamelor histologice a fost efectuată cu ajutorul microscopelor Nikon Eclipse E600 și Nikon Labothot-2. Prin intermediul unei camere foto digitale Muticam-5 au fost obținute mai multe imagini ale micropreparatelor în format JPEG, care au fost utilizate la documentarea cercetărilor efectuate.

Pentru cuantificarea celulelor s-a utilizat metoda *hot-spot*, care reprezintă o tehnologie manuală, folosită pentru cuantificarea elementelor din lamelele histologice. Cuantificarea a fost efectuată cu microscopul optic la amplificarea $\times 200$, prin identificarea a 3 sau 5 zone aleatorii în care structurile din câmpurile selectate au fost numărate, cu calcularea mediei aritmetice.

Densitatea structurilor studiate a fost calculată în porțiunile superioară, medie și inferioară ale pulpei dentare.

Calcularea ratelor, a proporțiilor, a valorilor medii, a dispersiilor, a testelor neparametrice și a erorilor, construirea graficelor în funcție de rezultatele calculului s-au realizat prin intermediul programului computerizat Microsoft Excel, pentru a asigura veridicitatea rezultatelor. Parametrii calitativi au fost prezentați în tabele de congruență.

2.3. Prelucrarea statistică a rezultatelor

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

Calcularea ratelor, a proporțiilor, a valorilor medii, a dispersiilor, a testelor neparametrice și a erorilor, construirea graficelor în funcție de rezultatele calculului s-au realizat prin intermediul programului Microsoft Excel.

Media aritmetică ponderală a fost calculată după formula $x = \Sigma x/n$, unde Σ (sigma) = suma; x = valoarea individuală; n = numărul total de observații.

Deviația standard exprimă media devierilor de la media aritmetică: $DS = \sqrt{\Sigma(x-x)^2/n}$.

Eroarea standard (ES) a mediei este un indice care exprimă gradul de încredere al mediei: $ES = DS/\sqrt{n}$, unde ES măsoară dispersia mediilor posibile la multiple eșantioane de populație. Forța sa este invers proporțională cu variabilitatea individuală. Cu ajutorul erorii standard a fost stabilit „intervalul de încredere”, adică limitele între care se situează, aproape sigur, media respectivei serii (valoarea $p < 0,05$ a fost considerată relevantă, ceea ce confirmă diferența statistic semnificativă dintre loturile studiate). Metoda analitică a verificat ipotezele și a condus la aprecierea indicațiilor pentru diverse metode de tratament.

2.4. Sinteza capitoului 2

1. Materialul de studiu al actualei cercetări a inclus dinți de la persoane tinere cu diferite vârste: de la 6 și până la 35 de ani. Investigațiile imunohistochimice au implicat pulpe dentare în care au fost evaluate celulele CD34 și CD45 pozitive. Totalitatea numărului de obiecte morfologice confecționate și evaluate prin preparate histologice a constituit 70 de unități.

2. Pentru executarea colorațiilor specifice, histologice și histochimice, materialul biologic colectat a fost secționat în secțiuni cu grosimea de 5 μ m, care, după secționare, au fost montate pe lame standarde histologice. Pentru efectuarea colorațiilor imunohistochimice, pe lame silanate au fost montate secțiuni cu grosimea de 3 μ m. În această lucrare s-au utilizat metode histologice

(colorație cu hematoxilină eozină, albastru de anilină și tricromă Masson) și histochimice (CD34; CD45). Datele obținute au fost examinate prin metode statistice care au permis evaluarea corectă a rezultatelor obținute, enunțarea concluziilor și a recomandărilor practice.

3. Rezultatele studiului actual indică faptul că pulpa dentară adultă conține celule stem care pot fi izolate și extinse eficient. Aceste celule pot fi una dintre sursele de regenerare după leziuni pulpare. Ele ar putea fi valoroase și în abordările terapeutice bazate pe celule.

4. Studiile suplimentare în acest domeniu pot oferi o înțelegere sporită a ceea ce se întâmplă cu aceste celule la recoltare și în timp în cultură. Aceste informații sunt importante în dezvoltarea procedurilor de izolare celulară *in vitro*, pentru utilizarea ulterioară în experimente și pentru elaborarea de biotehnologii sau terapii celulare noi.

3. STRUCTURA CELULARĂ A DINTELUI

3.1. Dezvoltarea embrionară a dinților temporari și permanenți

Dezvoltarea embrionară, după fecundarea oocitului de către spermatozoid, debutează cu formarea unui embrion monocelular, care începe ulterior să se divizeze în celule, astfel că la ziua 5-7 formează blastocistul – structură formată dintr-un strat exterior – trofoblastul, și MCI. MCI a blastocistului, din care se formează embrionul, reprezintă sursa de celule stem care se pot replica pe o perioadă lungă de timp și de a se diferenția în diferite tipuri celulare.

Dezvoltarea dentiției la om reprezintă o serie de evenimente, începând cu determinarea regională a dentiției și a familiilor dentare: grupul incisiv, grupul molar etc., și finalizând cu stabilirea morfologiei individuale a fiecărui dinte.

Dinții se dezvoltă prin interacțiuni între țesuturile epiteliale și mezenchimale pe parcursul embriogenezei. Datorită formei și structurilor diferite ale dinților, aceștia pot fi considerați ca organ.

Forma dentară este determinată de expresia diferitelor gene în regiunile mezenchimului maxilar, reprezentate, în special de genele homebox – care dirijează celulele precursori și diferențierea dentară [26]. Acestea acționează asupra celulelor mezenchimale înaintea inițializării proceselor de odontogeneză, pentru a induce forma viitoarelor structuri dentare. În stadiul de clopot apare o structură epitelială – nodul de smalț, care este specifică pentru morfogeneza coronară.

Mugurii dentari se dezvoltă de-a lungul laminei dentare – viitoarea arcadă dentară. FGF-urile și proteinele morfogenice osoase (BMP) dirijează procesele de diferențiere, în special la nivelul membrelor și regiunii faciale. În primele faze, FGF8 este implicat în specificația regională a fețelor orale ale primului arc branhiar. În fazele ulterioare apare expresia factorului Pax9, care este necesar pentru morfogeneza dintelui.

Startul proceselor de morfogeneză dentară este reprezentat de interacțiunea dintre epiteliul oral și celulele mezenchimale derivate din creasta neurală. În săptămâna a 6-a de dezvoltare a embrionului uman, celulele mezenchimale sunt nediferențiate. Ameloblastele se formează din celulele epiteliale, iar celelalte, cum ar fi odontoblastele, cementoblastele, celulele pulpare, ligamentul parodontal, sunt formate din celulele mezenchimale [117].

La etapa de dezvoltare, între inițierea morfogenezei și apariția coroanei dentare, se formează mugurele dentar. Mugurele dentar apare la început ca o excrescență a laminei dentare, care continuă dezvoltarea specifică organului și marchează transferul de la țesutul epiteliul la cel

mezenchimal. Se diferențiază celulele specifice dintelui – odontoblastele din mezenchim, ameloblastele din epitelii, cu producerea matricei dentare și amelare [7].

Fiecare țesut dentar se formează într-un mod unic și într-un mod strâns reglat, unde un țesut ghidează sau susține formarea celuilalt. Odontogeneza timpurie este caracterizată printr-o interacțiune epitelial-mezenchimală, care este, de asemenea, un model pentru formarea altor organe, cum ar fi foliculii de păr sau glandele exocrine. Epiteliul este derivat din endodermul embrionar, în timp ce mezenchimul este derivat din creasta neurală craniană. Îngroșările placodale ale epiteliului bucal de-a lungul laminei dentare induc, mai întâi, o condensare celulară a mezenchimului subiacent. Primordiul dintelui trece apoi prin diferite stadii morfologice, formând un mugure, un capac și, ulterior, un stadiu de clopot. În timp ce epiteliul dă naștere smalțului, mezenchimul este sursa pulpei ulterioare, a aparatului parodontal și a substanțelor dure, precum dentina și cimentul. Apoi componentele epiteliale își pierd competența odontogenă inductivă, în timp ce o inducție reciprocă începe de la mezenchim. Aceste diafonii reciproce sunt guvernate de un program de semnalizare, constând dintr-un număr mare de molecule care interacționează în căile de semnalizare. Exemple majore ale acestor factori sunt familii precum BMP, FGF, wingless/Int1 (Wnt), hedgehog (Hh) sau displazia ectodermală (EDA), care funcționează ca inductori morfogenetici. Morfogeneza este condusă de centrele de semnalizare, care orchestrează interacțiunile tisulare și sunt implicate în dimensiunea și modelarea unui singur dinte. Pe lângă semnalizarea celulară, forțele tisulare, de exemplu, printr-o contracție epitelială, condensare mezenchimală sau biomecanică osoasă, participă la formarea morfologiei dintelui [117, 121].

3.2. Structura macro- și microscopică a dintelui

Organul dentar

Odontonul (organul dentar) este alcătuit din 2 componente: odonțiul și parodonțiul. Organul dentar este un complex format din țesuturi dure nevascularizate: smalțul, dentina și pulpa dentară moale vascularizată inervată. Pulpa dentară este strâns asociată cu dentina și găzduiește odontoblaste, DPSC), pericite și alte populații celulare. Vasele de sânge care pătrund în pulpă hrănesc celulele rezidente, în timp ce nervii participă la schimbul de informații senzoriale dintre pulpă și mediul oral.

Pulpa dentară

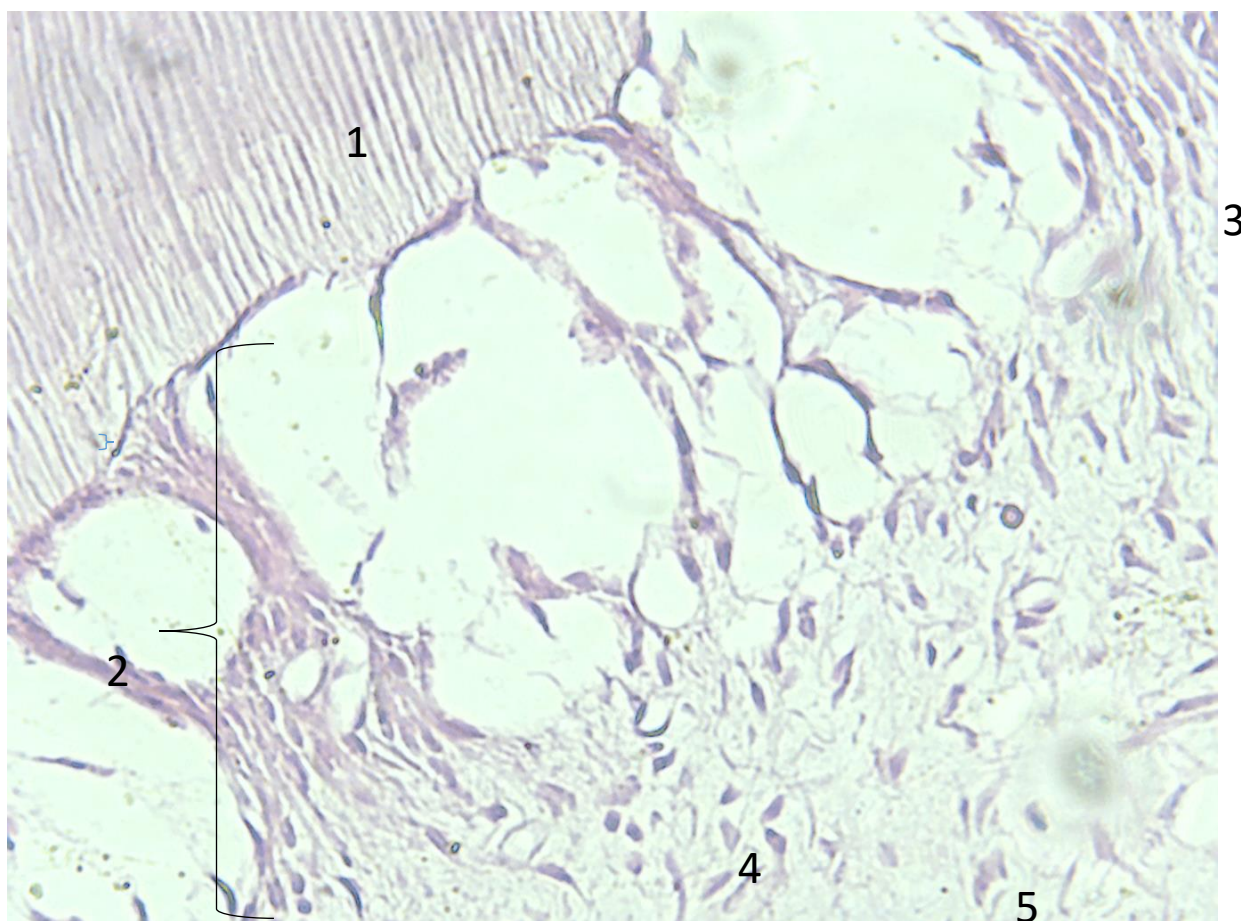


Fig. 3.1. 1 – structura tubulară a dentinei; 2 – pulpa cu stratul bogat în celule formate din: 3 – odontoblaste, 4 – fibroblaste și 5 – țesut conjunctiv lax, H-E, x 140

Complexul pulpodentar este format dintr-un parenchim conjunctivo-vascular, ocupă cavitatea dintelui și reprezintă unitatea biologică fundamentală a dintelui (fig. 3.1).

Această cavitate este mai largă la nivelul coroanei și are o formă asemănătoare cu ea, numită cavitatea coronară (camera pulpară), care se prelungește prin canale radiculare magistrale cu un diametru de aproximativ 1 mm, care se deschid la nivelul apexului printr-un orificiu îngust apical (*foramen apicis dentis*). Forma pulpei reproduce la dimensiuni mai mici forma exterioară generală a dintelui și se mulează perfect după pereții cavității (fig. 3.2).

Pulpa dentară este înconjurată de dentina mineralizată, care îi oferă fixare și protecție.

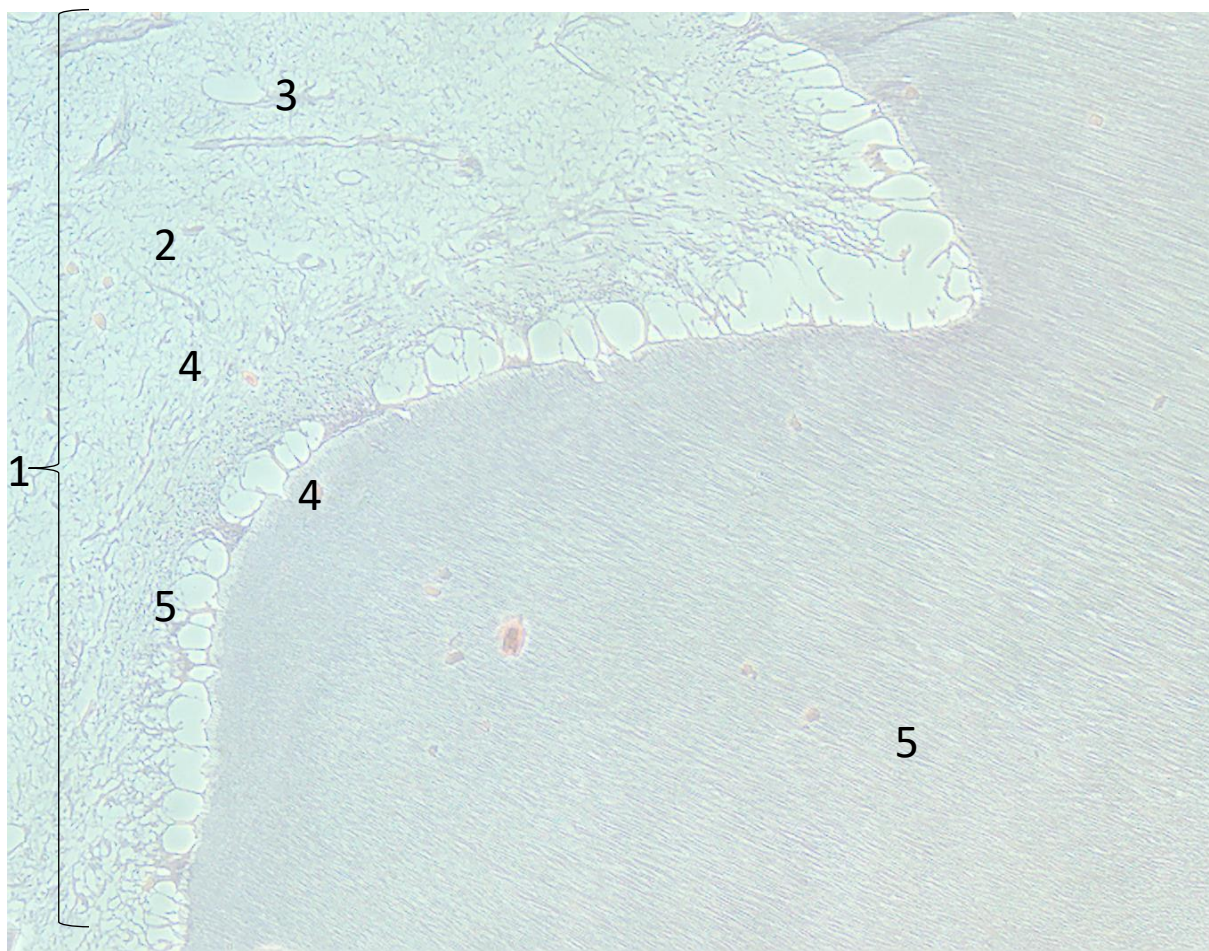


Fig. 3.2. Pulpa stratului coronar. 1 – pulpa dentară; formată din 2 – țesut conjunctiv lax; 3 – vase sangvine; 4 – predentina și 5 – dentina cu structurile tubulare. H-E, x 90

Aceasta comunică cu țesutul conjunctiv alveolar prin foramenul apical, canalele accesorii laterale și canalele deltei apicale. Canalele se întind în sens radiculo-triturant până la 3 mm de la apex; celelalte canale laterale, accesorii se întâlnesc pe toată lungimea rădăcinii, predominând în jumătatea apicală și în zona furcației, iar o parte dintre ele se obturează cu dentină și cement.

Zona centrală (pulpa propriu-zisă) este un amestec dispersat de celule, substanță fundamentală și fibre conjunctive, conține vase sangvine și fascicule nervoase pulpare. Celulele au dimensiuni variabile între 25-40 μ și se dispun în palisade.

Odontoblastele se află la periferia organului pulpar, în care se găsesc prelungirile citoplasmice periferice, prelungirile directe centrale, ce alcătuiesc plexul periferic Retterer, plexul central al lui Weil, fibrele nervoase amielinice care se insinuează printre odontoblaste și se prelungesc în canaliculele dentare. Zona Weil este o zonă săracă în celule dendritice, fibroblastele sunt situate subiacent zonei de odontoblaste, fiind reprezentată în regiunea coronară cu o grosime

de 40 μ m, lipsind uneori în pulpa radiculară, totodată, la nivel coronar, densitatea celulară este mai mare (celule mezenchimale, fibroblaste, macrofage, limfocite) și celule Höhl.

Celulele pulpare se împart în 4 grupuri:

- 1) *celule înalt specializate* – odontoblastele (fig. 3.3, e);
- 2) *celule „de bază”* – fibroblaste (fig. 3.3, c);
- 3) *celule rotunde ale lui Weil sau celulele lui Höhl*;
- 4) *celule cu rol de apărare* (fig. 3.3, f) – macrofage, mastocite, plasmocite, limfocite, leucocite.

Studierea pulpei dentare în colorația hematoxină-eozină evidențiază o componentă dentară intens celularizată. Distribuția celulelor se prezintă neuniformă, astfel că s-a observat aranjarea acestora în câteva straturi. Porțiunea periferică a pulpei este reprezentată de stratul odontoblastelor, stratul slab celular și stratul intens (bogat) celular, iar cea mai largă porțiune a pulpei – de miezul pulpei (fig. 3.3).

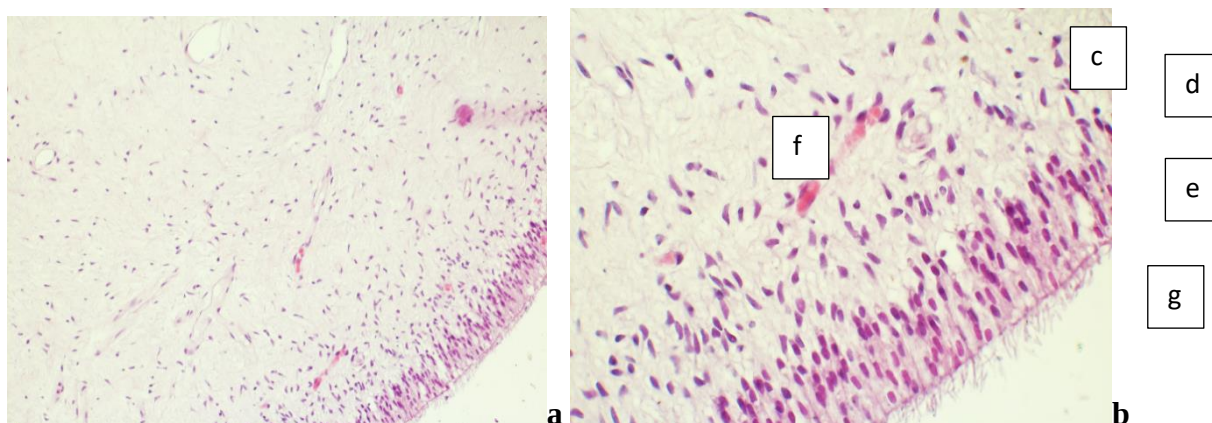


Fig. 3.3. Distribuția celulară a pulpei dentare. a – $\times 10$; b – $\times 40$; c – zona bogată în celule; d – zona fără celule; e – odontoblaste; f – alte tipuri de celule (fibroblaste, macrofage, mastocite, plasmocite, limfocite, leucocite); g – predentina. Colorația H-E

Distribuția celulelor potențial stem a fost neuniformă, numeric acestea predominau în zona bogat celulară în comparație cu miezul pulpei. Densitatea celulelor stem din zona bogat celulară a variat de la 12-21 celule/câmp, uneori acestea fiind localizate în nemijlocită apropiere de odontoblaste. În miezul pulpei, celulele stem erau localizate frecvent în apropierea vaselor sangvine de calibru mediu și mic, iar densitatea acestora a variat de la 4-12 celule/câmp. Densitatea medie a celulelor potențial stem în ambele arii studiate a fost calculată și prezentată în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Densitatea celulelor potențial stem în pulpa dentară

	N	Stromă	P
Celulele potențial stem din stratul bogat celular	14	$17,21 \pm 2^* < 0,001$	
Celulele potențial stem din miezul pulpei	14	$6,26 \pm 2^* < 0,001$	

** $M \pm DS$, n – număr de cazuri incluse în studiu, p – valoare obținută prin test Student.*

Celulele stem se caracterizează morfologic printr-un nucleu hipercrom, de formă rotundă, mai rar de formă ovală, citoplasmă mult redusă (fig. 3.4). Majoritatea celulelor stem au fost de talie mică-medie în comparație cu alte celule învecinate (tabelul. 3.2, 3.3).

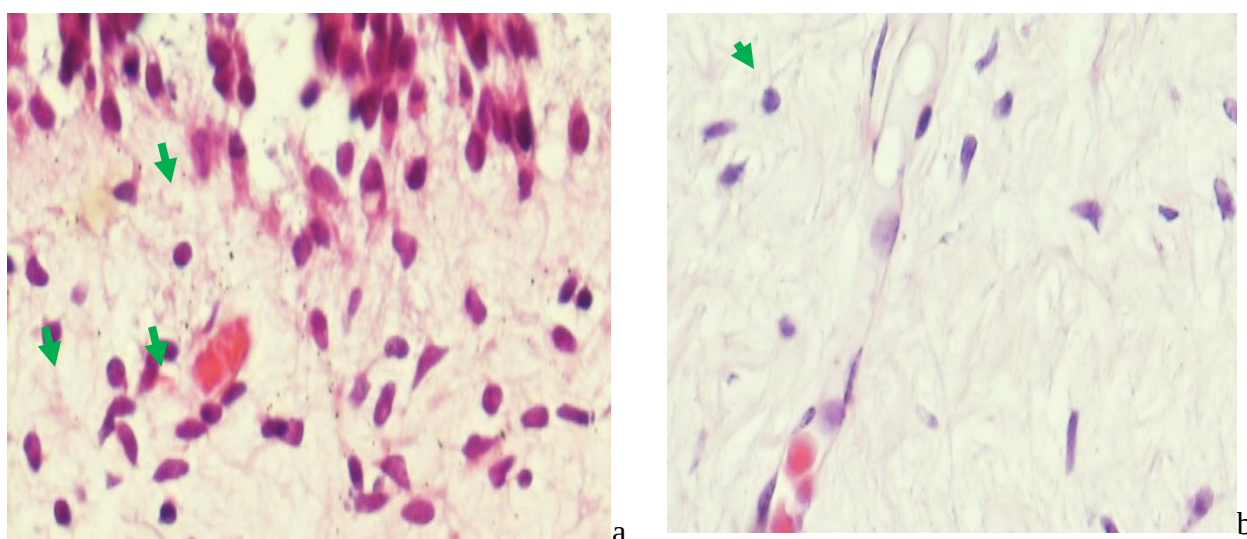


Fig. 3.4. Aspecte morfologice ale celulelor stem din pulpa dentară: a – zona bogat celulară, $\times 60$; b – miezul pulpei, $\times 60$; colorația HE

Odontoblastul este fiecare dintre celulele diferențiate specifice pulpei dentare. Acestea sunt așezate una lângă alta, la periferia pulpei dentare, având o formă cilindrică sau ovalară sau cuboidală sau a unei prisme poligonale, cu o înălțime între 30-50 μm , cu diametrul de 5-7 μm . Până la mijlocul rădăcinii are o formă cuboidă, iar spre apex – o formă plată, fusiformă, cu prelungiri citoplasmatiche periferice. În pulpa dentară sunt prezente, în forme libere, fibre de collagen, fibre de reticulină, fibre Von Korff în zona Weil, fibre oxitalanice, glucozaminoglicani și fibre elastice în pereții vasculari. Substanța fundamental este hidratată și eozinofilă, mai pronunțată la tineri.

Tabelul 3.2. Celule potențial stem din zona bogat celularizată și din regiunea miezului

Nr. crt.	Celule potențial stem din zona bogat celulară				Celule potențial stem din zona miezul pulpei			
	1	2	3	Media	1	2	3	Media
1.	20	21	18	19,67	10	6	11	9,00
2.	17	25	20	20,67	12	8	8	9,33
3.	18	21	19	19,33	8	7	9	8,00
4.	19	16	15	16,67	6	8	8	7,33
5.	15	17	15	15,67	5	5	4	4,67
6.	12	12	15	13,00	4	4	4	4,00
7.	20	16	20	18,67	6	8	8	7,33
8.	15	20	20	18,33	7	10	10	9,00
9.	17	17	17	17,00	6	5	5	5,33
10.	19	14	16	16,33	5	5	5	5,00
11.	16	16	16	16,00	4	4	4	4,00
12.	17	17	17	17,00	5	5	5	5,00
13.	14	18	15	15,67	3	6	4	4,33
14.	18	16	17	17,00	5	6	5	5,33
Deviația standart				1,98				1,98
Mediana				17,0				5,3
IIQ				15-18				4-8

Smălțul dentar

Smălțul este cel mai mineralizat țesut acelular din corpul uman, format din 95% cristale de hidroxiapatită și 5% materie organică și apă în greutate [10, 11]. Smălțul este supus uzurii pe tot parcursul vieții. Cu toate acestea, spre deosebire de alte țesuturi mineralizate ale corpului uman, smălțul nu poate fi regenerat din cauza naturii sale acelulare.

Dentina

Dentina este un țesut acelular calcificat, format din 70% hidroxiapatită, 20% fază organică și 10% apă. Formarea dentinei este executată de odontoblaste (sau dentinoblaste), care sunt celule de origine mezenchimală. În timpul dentinogenezei, odontoblastele migrează către pulpa dentară și depun collagen de tip I, III și V, proteoglicani și alte proteine matriceale, care asigură baza de nucleare pentru cristalele de hidroxiapatită. Pe lângă mineralizarea mediată de schele, precipitarea mineralelor și mineralizarea determinată de veziculele matricei derivate din celule au loc în diferite etape ale dentinogenezei.

Tabelul 3.3. Cuantificarea celulelor CD34 pozitive în pulpa dentară

Nr. crt.	Celule CD34+			Media
	1	2	3	
1.	12	12	7	10,33
2.	10	10	10	10,00
3.	16	12	12	13,33
4.	25	23	23	23,67
5.	24	19	20	21,00
6.	18	15	19	17,33
7.	19	12	18	16,33
8.	28	22	22	24,00
9.	18	20	22	20,00
10.	25	20	22	22,33
11.	25	17	24	22,00
12.	25	23	24	24,00
13.	14	21	14	16,33
14.	23	14	14	17,00
15.	24	20	18	20,67
16.	15	12	14	13,67
17.	23	15	21	19,67
18.	25	16	22	21,00
19.	14	10	16	13,33
20.	15	19	16	16,67
21.	10	12	11	11,00
Deviația standard				4,54
Mediana				17,3
IIQ				13-21

Parodonțiul

Parodonțiul este componenta organului dentar, care cuprinde țesuturile ce mențin și susțin dintele. Acesta este constituit din cement, desmodonțiu și os alveolar și este divizat în două porțiuni: marginal și cel apical. Parodonțiul marginal este localizat superficial și are 2 componente: mucoasa gingivală și ligamentele supraalveolare (fig. 3.5).

Parodonțiul apical oferă suportul necesar pentru a menține dinții în funcțiune. Este format din patru componente principale: gingia, ligamentul parodontal, cementul și osul alveolar. Fiecare

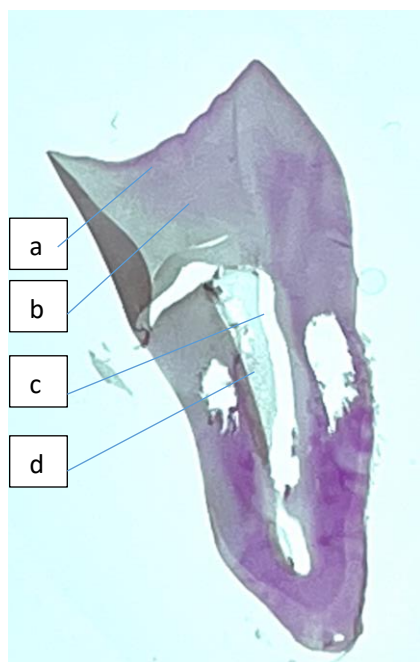


Fig. 3.5. Secțiunea dintelui – molar I: a – smalt; b – dentină; c – cameră pulpară; d – pulpă dentară). Colorație cu H-E, x 10

dintre aceste componente este distinctă în locație, arhitectură și proprietăți biochimice, care se adaptează pe parcursul vieții structurii. De exemplu, pe măsură ce dinții răspund la forțe sau migrează medial, osul se resoarbe pe partea de presiune și este adăugat pe partea de tensiune.

Cementul este un țesut avascular calcificat subțire între dentină și ligamentul parodontal, care este produs de cementoblaste. Cementul conține collagen tip I, sialoproteină osoasă, osteopontină, glicoproteine și proteoglicani dispuși într-o rețea fibroasă cu depozite de hidroxiapatită. Diferite tipuri de cement sunt prezente în regiuni distincte ale rădăcinilor dentare mature: cementul acelular subțire este

depus în jurul zonei dintelui cervical și dedesubt, în timp ce cementul gros cu cementocite prinse și procesele lor care pătrund în cement se localizează la vârfurile rădăcinii.

Studiile histologice indică, de asemenea, că un strat subțire de cement acelular dens se află sub cementul celular la vârful rădăcinii și joacă un rol important în metabolismul mineral al cementului. Volumul cementului se mărește de-a lungul duratei de viață și nu este supus unor remodelări precum oasele. Precursorii de cementoblast sunt prezenți în ligamentul parodontal și pot fi mobilizați pentru regenerarea cementului dacă este necesar.

Ligamentul parodontal este format din țesut conjunctiv, cu predominarea țesutului fibros și este situat între rădăcina dintelui și alveolă. Acesta este un țesut bine vascularizat, cu multiple celule plasate în jurul rădăcinii dintelui adiacent osului alveolar, care trece în țesutul conjunctiv al gingiei și comunică cu canalele vasculare în os.

Osul alveolar reprezintă porțiuni ale maxilei și mandibulei. Procesul alveolar asigură fixarea dintelui, formează aparatul de fixare a rădăcinii dentare cu cementul radicular și desmodonțiu și diminuează presiunea forțelor masticatorii aplicate pe dinte. Procesul alveolar apare concomitent cu erupția dentară, iar în cazul pierderii dintelui are loc o regresie a acestuia.

3.3. Determinarea volumului camerei pulpare prin tomografia computerizată

TC a devenit o metodă indispensabilă în practica dentară, care se utilizează pe scară largă în tratamentul endodontic, pentru examinarea morfologiei canalelor radiculare.

Pentru a măsura și a calcula volumul camerei pulpare, TC poate furniza informații mai precise în scopul prognozării numărului posibil de celule din pulpa dentară.

În vederea calculării numărului de celule stem din camera pulpară, am determinat volumul camerei pulpare. În acest studiu au fost examinați prin TC dinți sănătoși: 40 de molari superiori și 40 de molari inferiori de la 40 de pacienți maturi (20 de femei și 20 de bărbați, cu vârsta cuprinsă între 18-45 de ani). S-au format următoarele loturi de studiu: femei cu vârsta de 8-30 de ani (tabelul 3.4), femei cu vârsta de 31-45 de ani (tabelul 3.5), bărbați cu vârsta 18-30 de ani (tabelul 3.6), bărbați cu vârsta de 31-45 de ani (tabelul 3.7). Imaginile CBCT au fost realizate cu ajutorul aparatului Kodak 9500 (*Dental Systems, Carestream Health*), operat la 90 kVp, cu dimensiunea voxelului de 300 μ m și un câmp vizual de 90 x 150 mm. Toate scanările au fost făcute prin protocolul recomandat de producător.

În același timp, toate măsurările 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 ale 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 (fig. 3.7).

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. Ușoara diferență care ar fi putut surveni la determinarea punctelor a fost neglijabilă și nu a afectat măsurarea.

Volumul camerei pulpare s-a calculat după formula: $V = h * L * l$, unde $h = A+B+C+D$ (fig. 3.6).

Măsurările 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.

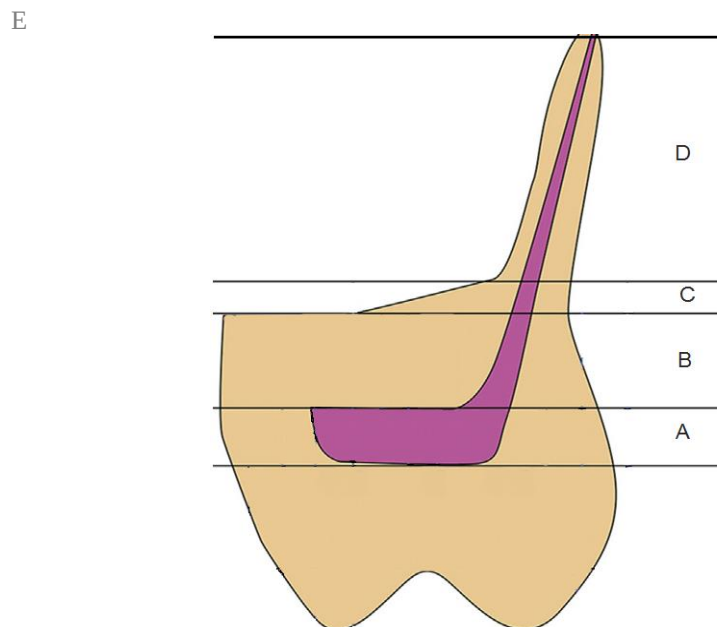


Fig. 3.6. Liniile care au folosit ca reper pentru determinarea volumului camerei pulpare

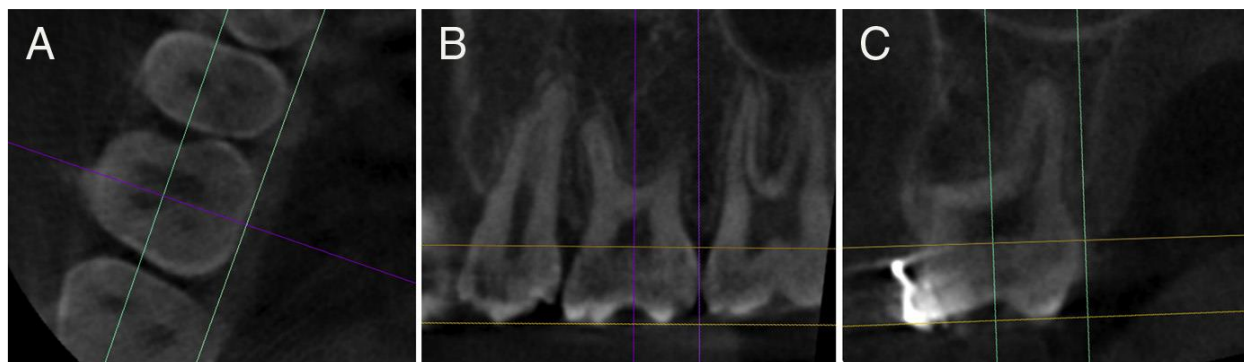


Fig. 3.7. TC. Imagini ce identifică parametrii utilizați în măsurarea volumului camerei pulpare a molarului de minte. A – vedere axială; B – vedere sagitală; C – linia verde a planului sagital trece de-a lungul axei longitudinale a dintelui. Linia galbenă a planului axial trece perpendicular pe linia planului sagital și este paralelă cu suprafața ocluzală

Tabelul 3.4. Măsurări realizate prin TC a volumului camerei pulpare la molarii superiori și inferiori la femei și bărbați vârsta 18-45 de ani

Nr. crt.	Tip dinte	Volumul camerei pulpei dentare			
		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	0,7265
3.	Molar III superior	16,560	16,700	1,3	0,8199
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

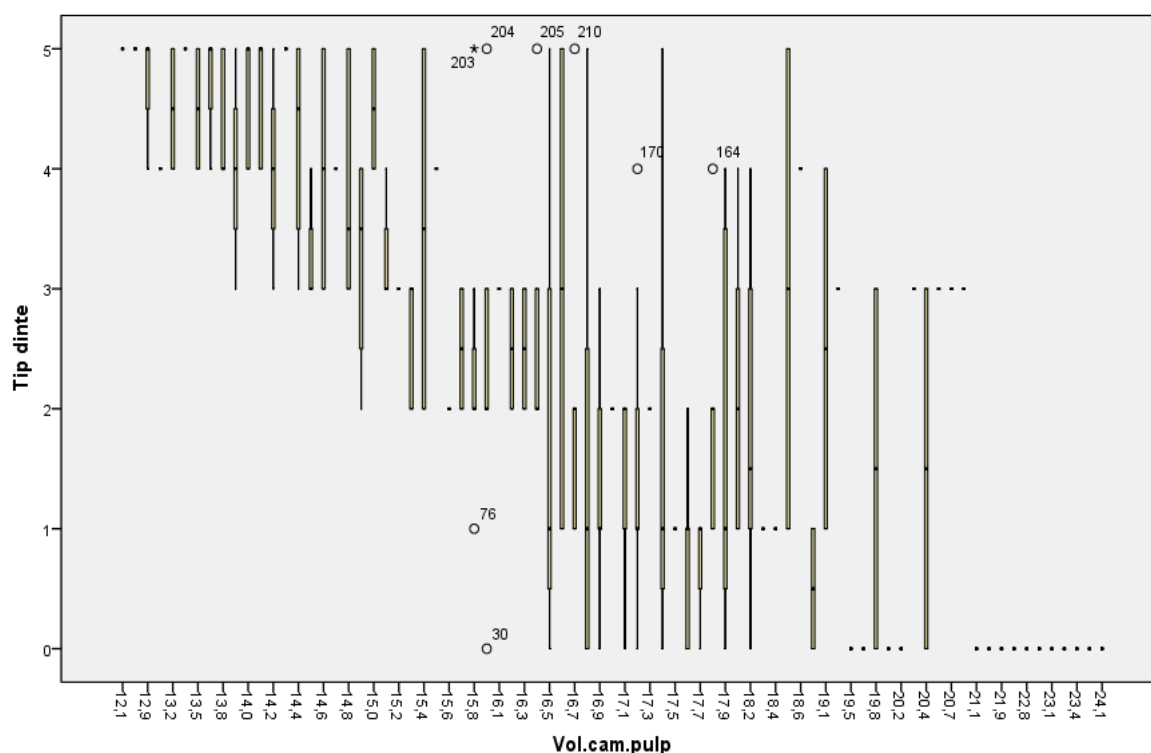


Fig. 3.8. Diagrama la volumul camerei pulpare a molarilor superiori și inferiori la femei și bărbați, vârsta 18-45 de ani

Conform diagramei (fig. 3.8), constatăm faptul că inițial indicii din loturile experimentale erau identici, alternând, iar la final volumul camerei pulpare a crescut de la molarul 3 superior la

molarul 1 superior, pe când la molarii inferiori procesul este invers descrescător – de la molarul 3 inferior spre molarul 1 inferior (fig. 3.9).

Actualmente, TC 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 (tabelul 3.4).

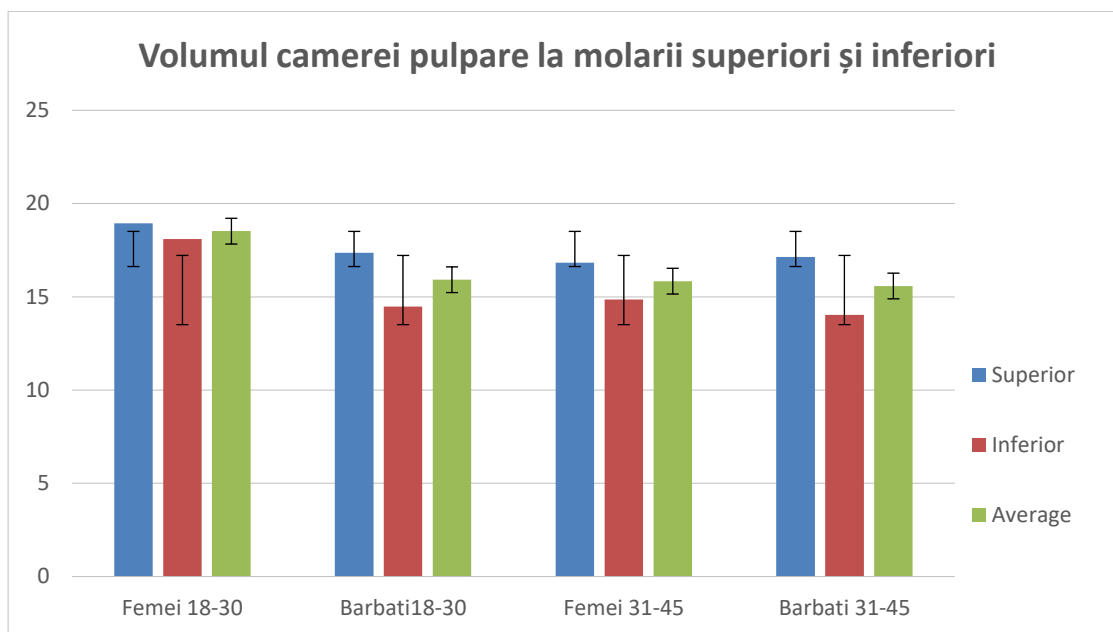


Fig. 3.9. Volumul camerei pulpare la molarii superiori și inferiori la femei și bărbați

Pe parcursul studiului a fost investigată relația dintre vârsta și volumul camerei pulpei molarilor superiori și inferiori. Sexul și vârsta sunt două variante de estimare a volumului camerei pulpare, ceea ce s-a demonstrat în studiul nostru. 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 [114].

Măsurările imaginilor scanate tridimensional permit determinarea parametrilor camerei pulpare folosind un standard definit de abordare spațială. Acest studiu evidențiază prezența potențială a volumului camerei pulpare pe diferite adâncimi în zona furcăției și identificarea parametrilor cu ajutorul TC.

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

3.4. Cultivarea celulelor obținute din pulpa dentară

Colectarea celulelor nucleate din pulpa dentară

Materiale necesare:

- un dinte sănătos;
- mediu nutritiv – 10 ml;
- cutii Petri sau cutii de cultură TC 60 mm – 2;
- eprubetă de 15 ml;
- pipetă 5 ml – 1;
- seringă 5 ml – 1;
- foarfecă – 2;
- pensă – 2;
- șervețele de tifon – 5;
- alcool 70% – 20ml;
- bisturiu – 1;
- recipient cu gel super rece – 1

Protocolul:

1. În hota cu flux laminar de aer, în condiții sterile, se dezinfectează dintele cu alcool de 70% (fig. 3.10). Acesta se secționează cu ajutorul unui fierestrău oscilant sau al unui dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras – brevet de invenție MD 559 (13)Y, A61C 19/00 (2006.01). Se extrage pulpa dentară care se spală atent cu PBS și se plasează în ceșcuță Petri cu 3-5 ml de mediu nutritiv, care, pentru a diminua metabolismul, se pune pe recipientul cu gel super rece sau pe gheață.

2. Digestia se face cu fermenți.

3. Se transferă suspensia celulară din cutie într-o eprubetă de 15 ml, cu ajutorul unei pipete de 5 ml. Se omogenizează suspensia celulară din eprubetă cu pipeta.

4. Se numără celulele. Se păstrează la rece.



Fig. 3.10. Molarul 3.8 după extragere

Izolarea celulelor stem din pulpa dentară. Dinții (n = 110) au fost împărțiți aleatoriu în trei grupuri (tabelul 3.5, 3.6). Din 110 probe, 36 au fost incluse în grupul I (metoda de digestie enzimatică); 36 – în grupul II (metoda prin explant), iar 38 de probe – în grupul III (metoda prin explant cu secționarea pulpei în fragmente și fixarea lor sub lamelă de sticlă în mediul nutritiv).

Tabelul 3.5. Repartizarea în loturi de studiu a dinților colectați de la subiecți umani conform metodelor de izolare a celulelor nucleate din pulpa dentară

Lotul	Dinți permanenți	Dinți temporari	Vârsta (ani)
Lotul I (metoda enzimatică)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32
Lotul II (metoda prin explant)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32
Lotul III (metoda prin explant cu fixarea sub lamelă în mediu)	10	10	Media 23,7 DS 7,9 Mediana 25 IIQ 20-32

Tabelul 3.6. Repartizarea în loturi de studiu a dinților colectați de la purceluși vietnamezi, conform metodelor de izolare a celulelor nucleate din pulpa dentară

Lotul	Dinți purceluși vietnamezi	Vârsta (luni)
Lotul I (metoda enzimatică)	16	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30
Lotul II (metoda prin explant)	16	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30
Lotul III (metoda prin explant cu fixarea sub lamelă în mediu)	18	Media 16,2 DS 13,6 Mediana 11 IIQ 11-30

Cu ajutorul dispozitivului de fragmentare a dintelui extras se separă partea coronară de cea radiculară și astfel obținem pulpa dentară. După spălarea cu tampon fosfat salin (PBS), pulpa dentară se fragmentează cu bisturiul în bucăți cu dimensiunile de $1 \times 1 \pm 0,5\text{mm}$. În grupul I,

fragmentele obținute din pulpa dentară 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% FBS, 100 U/ml penicilină-G, 100 μ g/ml streptomicină și 1 μ g/ml amfotripsină B. În grupul II, fragmentele din pulpa dentară au fost plasate pe vasul de cultură, aplicate pe ele câte o picătură de mediu nutritiv și lăsate în incubatorul CO₂ pentru 2 ore, ca să se atașeze fragmentele la suprafața vasului de cultură, după care a fost adăugat mediul de cultură. În lotul III, fragmentele pulpare, mărunțite în prealabil, au fost acoperite cu o lamelă sterilă de sticlă, pentru a fixa țesutul și a împiedica mișcarea acestuia și, ulterior, a fost adăugat mediul nutritiv corespunzător. Toate speci­menele au fost incubate la 37°C și 5% CO₂ în incubator. Mediul a fost schimbat la fiecare 3 zile. După obținerea unei confluente de 70-80% în vasul de cultură, celulele au fost detașate cu soluția preparată *ex tempore*, conținând 0,25% tripsină și 1mM EDTA în raportul de 1:5.

Culturile celulare au fost examinate zilnic prin microscopie cu contrast de fază, pentru a verifica creșterea, morfologia, dar și eventuala contaminare bacteriologică sau fungică.

Cultivarea celulelor în vase de cultură

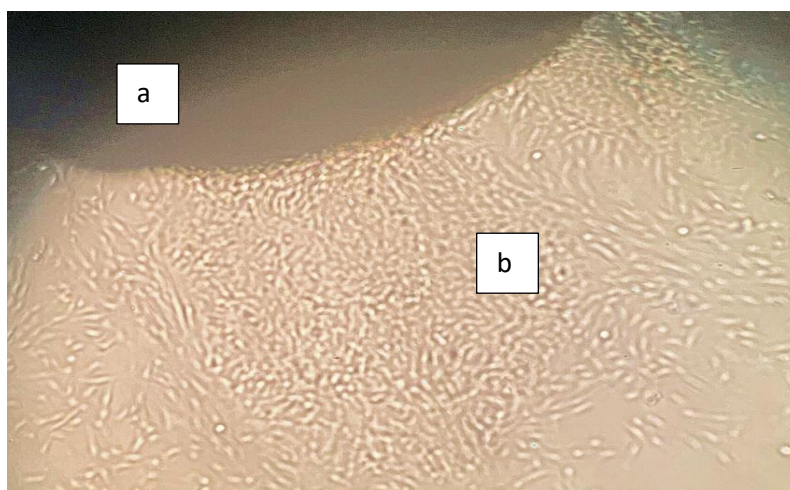


Fig. 3.11. Inițierea cultivării celulelor prin cultura de organ. A 12-a zi de cultivare:
a – pulpa dentară; b – celulele *fibroblast like*, care se expandează radial de la țesut spre periferie

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 de la plasarea inițială. Celulele atașate sunt *fibroblast-like*. Digestia segmentelor de pulpă cu collagenază/dispoză distrug schela pulpară, celulele fusiforme sunt observate la 2-3 zile de la 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. 3.11).

Prin aplicarea fâșiei de sticlă de menținere/fixare pe fragmentele de pulpă dentară, la 2 zile de la 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 ($p < 0,05$), (fig. 3.12, 3.13).

4. Cultura celulară

3. Digestia enzimatică a pulpei dentare

2. Extragerea pulpei dentare

1. Extragerea molarului

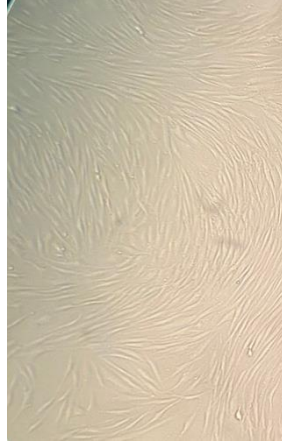
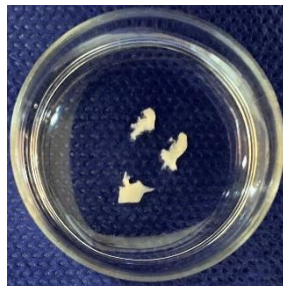


Fig. 3.12. Etapele cultivării celulelor pulpei dentare prin digestie enzimatică, lotul I

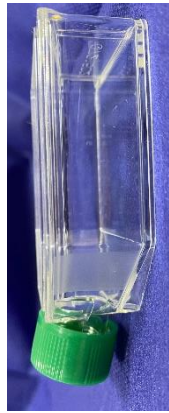
1. Extragerea molarului



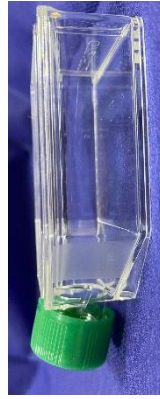
2. Extragerea pulpei dentare



3. Plasarea fragmentelor pulpei dentare în vasul de cultură în mediu nutritiv



3.a. Fragmente libere



3.b. Fragmente libere cu aplicarea unui suport pe fragmentele pulpei dentare



4. Cultura celulară

Fig. 3.13. Etapele cultivării celulelor pulpei dentare prin cultura de organ (explant), lotul II și III

Diferențierea celulelor stem din pulpa dentară în osteoblaste

Materiale utilizate: CSM obținute din pulpa dentară; mediu de cultură – 50 ml; mediu nutritiv de cultură osteogen – 100 ml; cutii de cultură celulară TC 30 mm; pipete serologice; mediu nutritiv – 150 ml; FBS; PBS.

Pregătirea soluțiilor: mediu de cultură: mediu nutritiv cu FBS – 10%.

Mediul osteogen este format din: mediu nutritiv; FBS – 10%; dexametazonă – 0,1mM; B-glicerofosfat de Ca – 10 mM; vitamina C – 50 mM.

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 prezintă un rezultat optim în procesul de cultivare. A fost utilizată grefa celulară obținută din pulpa dentară. După procesarea și separarea celulelor mezenchimale, acestea au fost cultivate în 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.

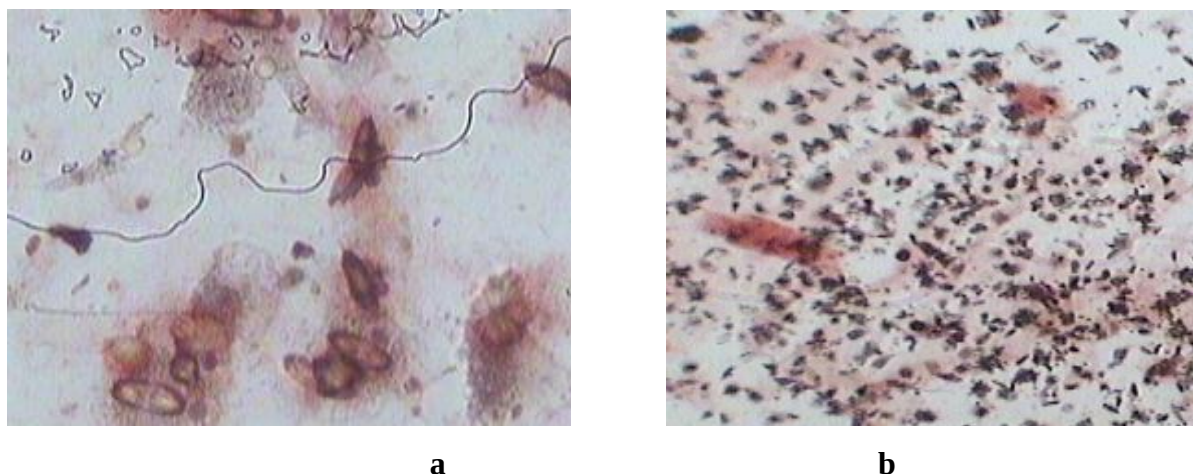


Fig. 3.14. Diferențierea celulelor mezenchimale din pulpa dentară în odontoblaste.
Colorație alizarină red.: a – x 100; b – x 40

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 1mM. 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 fermenții 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, colagenul de tip I, osteonectina și osteoclacina sunt markerii care indică activitatea osteoblastului.

3.5. Sinteza capitolului 3

1. Dimensiunile camerelor pulpare în funcție de gen au arătat că, pentru molarul 3, volumul camerei pulpare constituie la bărbați $17,2 \pm 2,3$ mm³ și $17,88 \pm 2,1$ mm³ la femei, diferența nefiind semnificativă.

2. Imaginile TC împreună cu metodele utilizate anterior constituie un instrument util și precis pentru a determina parametrii camerei pulpare, care permite evaluarea aproximativă a numărului de celule pe care le conține pulpa dentară.

3. Determinarea volumului camerei pulpare prin metodă 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.

4. Se impune aprecierea concordanței dintre volumul camerei dentare și conținutul de celule specific în ea și a concordanței dintre gen, amplasarea dintelui și vârsta donatorului.

4. INGINERIA TISULARĂ A PULPEI DENTARE

4.1. Decelularizarea pulpei dentare

Complexul dentină-pulpă este deteriorat prin metodele de activitate în domeniul stomatologiei curente și, deoarece formează un organ, am acționat pentru a nu afecta arhitectura acestei structuri. Materialul recoltat pentru acest studiu a fost obținut prin alegerea de material pulpar din totalul cazurilor.

În înțelegerea biologiei celulelor stem, în ultimii ani, s-au înregistrat progrese considerabile și au fost dezvoltate noi metode pentru obținerea acestora și dirijarea lor spre ariile afectate de boală. Dinții au o compoziție structurală complexă, care asigură atât duritate, cât și durabilitate. Cu toate acestea, structura respectivă este vulnerabilă la traume și infecții bacteriene.

Deteriorarea continuă a dintelui face dificilă regenerarea dentinară, deoarece necesită o pulpă sănătoasă. Astfel, cariile avansate prin complicații se soluționează prin terapii endodontice, în care pulpa este integral înlăturată și canalele sunt obturate cu un material special. Astfel, dintele devine un organ neviabil, iar pentru menținerea homeostaziei și a vitalității organului dentar este nevoie de o pulpă vie, care reprezintă o formațiune esențială pentru atingerea acestui scop.

Când dintele este deteriorat, dar încă posibil de tratat, regenerarea unor părți din structura dintelui poate preveni sau întârzia pierderea întregului dinte. Acest fapt este de o importanță majoră, deoarece pierderea dinților afectează nu numai funcțiile de bază ale aparatului stomatognat, dar și calitatea vieții. Răspunsul regenerativ al dinților la deteriorarea și degenerarea structurală este divers, din toate structurile doar smalțul este incapabil de regenerare în structura sa primară, în timp ce celelalte țesuturi au această capacitate, care este, desigur, dependentă de mai mulți factori.

Pulpa dentară joacă un rol hotărâtor în regenerarea țesutului dentar, prin procesul de dentinogeneză reparatorie. În cazul unei pierderi de dentină, acțiunea terapeutică de cofaj direct sau indirect ajută pulpa să formeze un strat nou de dentină. Utilizarea unor compuși, de exemplu hidroxidul de calciu sau mineralul agregat trioxid, promovează dentinogeneza. Celulele din partea sănătoasă a pulpei migrează și proliferază în cea afectată, prin concursul factorilor de creștere care sunt în anturajul matricei dentinei, atașându-se la stratul bolnav și formând osteodentina. Ulterior, se diferențiază în odontoblaste care produc dentină reparatorie. Acest țesut mineralizat precoce păstrează integritatea pulpei și servește ca barieră de protecție. O formă ideală de terapie ar putea consta în abordări de regenerare în care pulpa necrotică este eliminată și înlocuită cu țesuturi pulpare regeneratoare pentru revitalizarea dinților. În special, terapia pulpară de regenerare

ar reconstitui țesutul normal continuu la frontiera pulpă-dentină, prin reglementarea proceselor țesuturilor specifice de dentinogeneză reparatorie [7, 118]. Două tipuri de regenerare a pulpei dentare pot fi luate în considerare în funcție de situațiile clinice: regenerarea parțială *in situ* a pulpei sau sinteza *de novo* a pulpei pentru înlocuirea totală a ei.

Ingineria tisulară și regenerarea țesutului pulpar dentar ar părea actualmente o sarcină complicată. Ca un dinte să fie funcțional, acesta trebuie să fie bine vascularizat, componenta celulară să fie similară cu cea a pulpei native, care ar fi aptă de a favoriza apariția odontoblastelor, formarea dentinei și restabilirea sistemului nervos dentar.

Pentru ingineria tisulară a dintelui/pulpei dentare este necesară izolarea celulelor cu fenotipuri corecte, multiplicarea lor în medii de cultură, ceea ce a fost realizat în prima parte a lucrării.

Pulpa dentară este un țesut moale, situat în cavitatea pulpară, multistructural, fiind 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 și necroza pulpară sunt boli frecvente, cauzate de traumatisme și carii dentare [117]. Cu volumul mic al canalului radicular și foramenul apical îngust, alimentarea cu sânge a pulpei poate deveni insuficientă. Prin urmare, odată ce pulpa este inflamată, deseori 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 diferenția în diferite celule din pulpă pentru a obține o regenerare funcțională a pulpei. Schelele joacă un rol important în ingineria țesuturilor, oferind o structură spațială temporară, tridimensională și o componentă a MEC pentru a menține mediul regenerativ și funcția celulelor stem. MEC este esențială pentru diferențierea, proliferarea, supraviețuirea și migrarea celulelor. Schelele construite pentru a imita MEC promovează regenerarea țesuturilor și a organelor. În regenerarea pulpei dentare au fost utilizate mai multe carcase, schele, inclusiv acidul polilactic și colagenul. Cu toate acestea, problema majoră care persistă este lipsa MEC a pulpei dentare, limitând astfel capacitatea de a forma dentina.

Prin urmare, este esențial să se construiască o schelă pentru regenerarea pulpei dentare care să conțină MEC caracteristică organului pulpar, pentru a promova diferențierea odontoblastelor și formarea dentinei. MEC naturală acelulară este utilizată ca schelă biologică pentru păstrarea structurii anatomice a organului natural și a MEC. Acestea includ colagenul I (COL I), colagenul

III (COL III), fibronectina și laminina, care promovează migrarea, proliferarea și diferențierea celulelor. MEC naturală acelulară a fost utilizată pentru regenerarea inimii, a ficatului, a plămânilor etc. Prin urmare, studiul de față a investigat structura și compoziția MEC decelularizate a pulpei dentare cu integritatea rețelei vasculare. Acest studiu a fost realizat în conformitate cu cerințele Comitetului de etică a cercetării pe baza unui acord informativ al fiecărui pacient. Pentru atingerea obiectivelor evidențiate în acest studiu, cercetările au fost efectuate conform protocolului de investigație clinică, care include colectarea și interpretarea datelor: rezultatele anamnestice, examenul clinic obiectiv și examenul paraclinic. Am folosit metode informaționale de colectare a datelor: interviuarea pacienților conform chestionarului special elaborat, analiza documentației medicale pentru completarea datelor, evaluarea rezultatelor investigațiilor clinice și paraclinice, evaluarea dinamică a manifestărilor clinice. Dinții au fost extrași din motive ortodontice și profilactice.

După prelucrarea cavității bucale cu soluție de betadină, a fost efectuată anestezia locală cu soluție Septanest 4% – 1,7 ml. După efectuarea sindesmotomiei, s-a efectuat extracția propriu-zisă a dintelui, apoi a fost aplicată sutura. Dinții extrași au fost prelucrați cu o soluție de etanol 70% și plasați în eprubete sterile, cu 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: 1) cu agent de decelularizare – 0,25% sau 0,5% dodecil sulfat de sodiu (SDS) [20]; și 2) asigurarea perfuziei pulpei dentare cu soluție anticoagulantă (citrăt fosfat dextroză) înainte de decelularizare și apoi a decelularizării 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 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. 4.1). 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 avea o structură și o componență celulară caracteristică unei pulpe dentare sănătoase (fig. 4.8, 4.9).



Fig. 4.1. 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 (fig. 4.3).

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 conjunctivală este dezorganizată, peretele vascular, pe unele porțiuni, are conturul contractat și perivascular autolizat de elemente celulare.

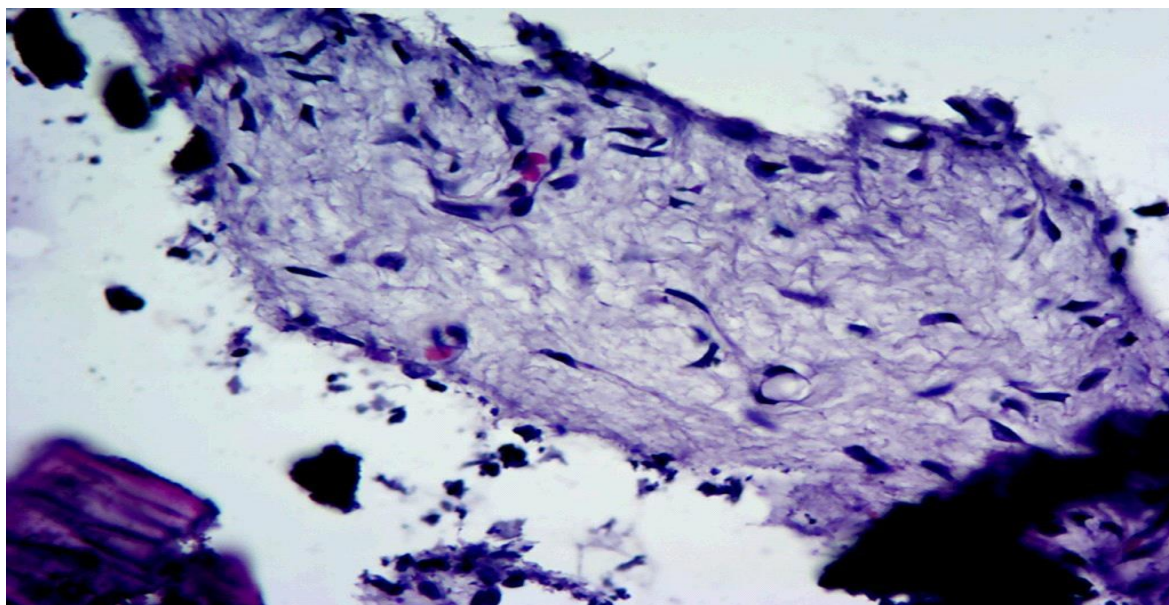


Fig. 4.2. Pulpă dentară decelularizată prin SDS fără spălare cu anticoagulant. H-E, x 90

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 reprezintă o condiție favorabilă pentru matricele utilizate în scopul recelularizării (fig. 4.2).

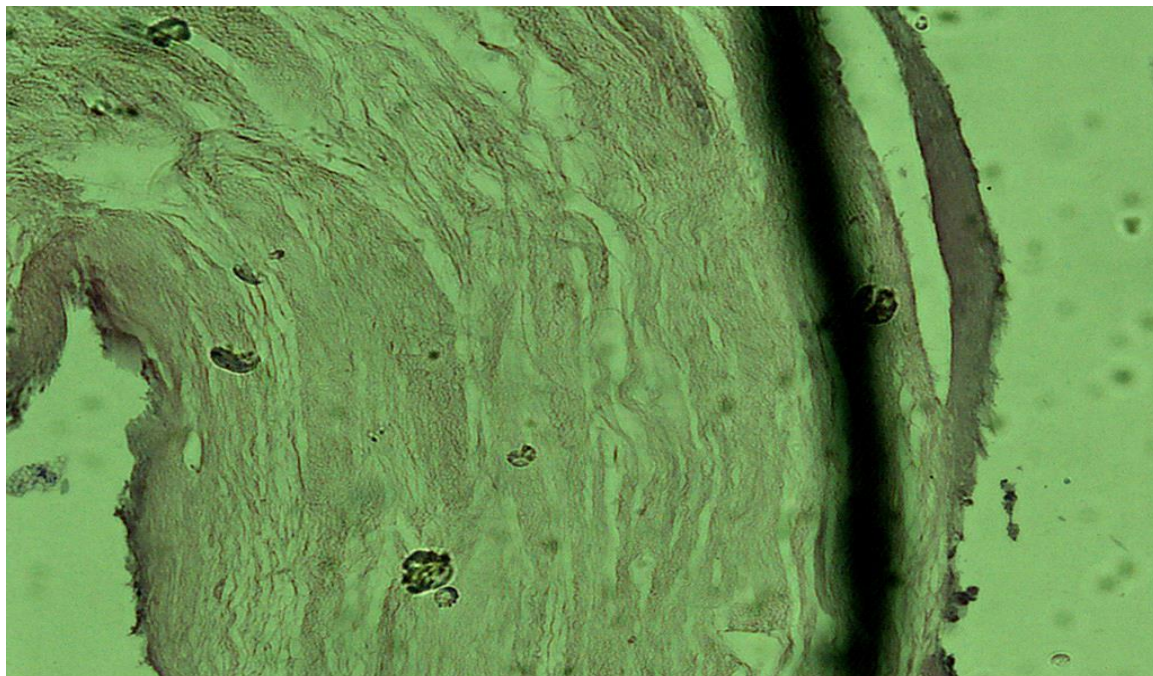


Fig. 4.3. Pulpa dentară decelularizată prin SDS cu spălare anticoagulantă. H-E, x 90

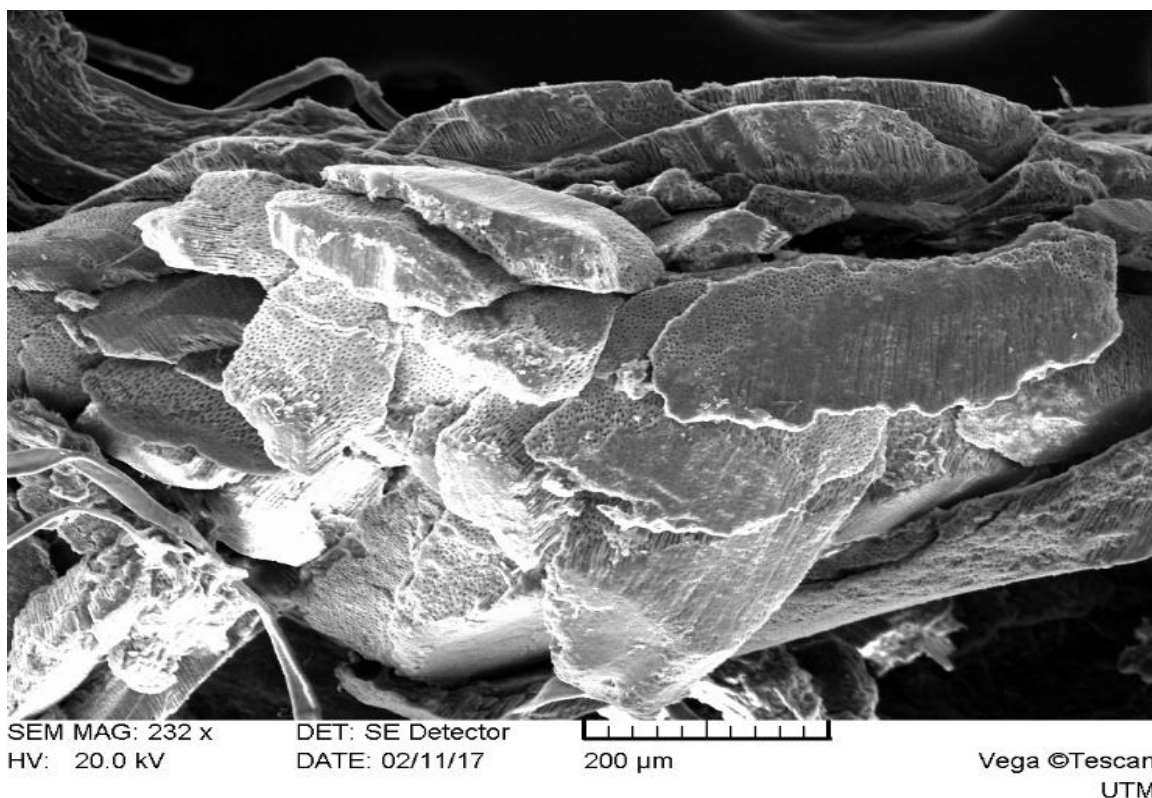


Fig. 4.4. Imaginea pulpei dentare umane decelularizate 24 de ore SDS. Baleiajul electronic prezintă structura poroasă a pulpei dentare decelularizate în secțiunile transversale

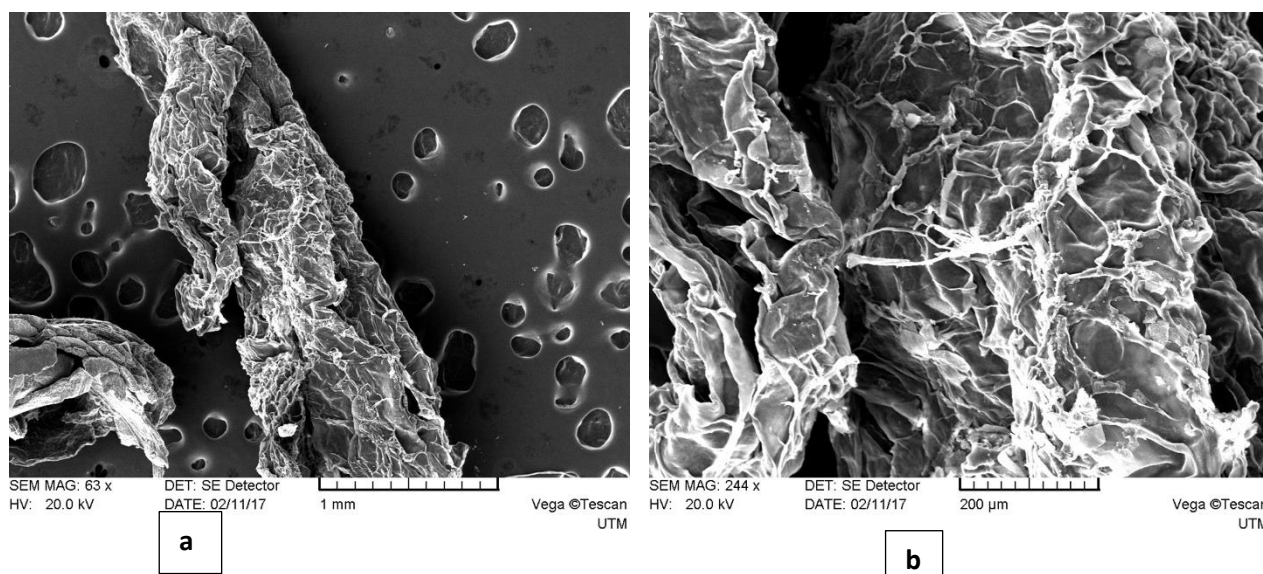


Fig. 4.5. Baleiaj electronic. Imaginea pulpei dentare umane după 24 de ore de decelularizare. Baleiajul electronic prezintă structura poroasă a pulpei dentare decelularizate, care este lipsită de elemente celulare: a – amplificarea x 63; b – amplificarea x 244

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) și o arhitectură bună de collagen păstrată (fig. 4.4, 4.5).

Pentru aprecierea calității decelularizării, adică posibile celule care au rămas după decelularizare, o altă metodă utilizată reprezintă cantitatea de ADN. ADN-ul 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 cu SDS și spălate anterior doar cu apă distilată la care concentrația este de 5,2-1,266 ng/μl. Această manifestare poate fi explicată 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.

De asemenea, după decelularizare, rămâne, în principiu, schela (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 proporțională 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 anticoagulant (tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Evaluarea conținutului de hidroxiprolină în pulpa dentară intactă și decelularizată prin diverse metode

Tipul probei	Conținutul de hidroxiprolină (mM/g)
Pulpa dentară intactă	$0,156 \pm 0,07$
Pulpa dentară decelularizată cu soluție de 0,5% SDS	$2,035 \pm 0,95$
Pulpa dentară decelularizată cu 0,25% de SDS și anticoagulant	$2,42 \pm 0,43$

Cantitatea mai mică de hidroxiprolină din țesutul intact se explică prin prezența celulelor. Aceeași cantitate de material luată pentru cercetarea țesutului intact conținea componente celulare și componenta țesutului conjunctiv, pe când în țesuturile schelei extracelulare predominau elementele țesutului conjunctiv. Faptul că, în procedura de decelularizare în care s-a utilizat anticoagulantul, conținutul de hidroxiprolină era mai mare demonstrează obținerea unei decelularizări mai eficiente. Totodată, prezintă și un conținut mai mic de reziduuri celulare.

O bună păstrare a schelei extracelulare ar permite diferențierea, proliferarea și menținerea funcționalității celulare după repopularea *in vitro*, care prezintă o prioritate în bioingineria organelor.

Rezultatele obținute în cercetarea noastră au arătat că matricele tridimensionale obținute conțin o cantitate mică de material celular rezidual, astfel încât matricele sunt mai puțin imunogene, ceea ce micșorează esențial posibilitatea unui rejet după transplantare.

De asemenea, detergenții care au fost utilizați în procesul de decelularizare provoacă liza și eliminarea celulelor, dar timpul de acțiune și concentrarea acestora trebuie monitorizat pentru conservarea proteinelor MEC.

Am obținut MEC de pulpă dentară utilizând detergent ionic SDS, care are potențial de solubilizare a membranei celulare și îndepărtare completă a celulelor, dar, conform literaturii de

specialitate, mai poate fi utilizat pentru a obține o matrice cu proprietăți chimice, fizice, biologice îmbunătățite și combinații ale acestor agenți [24]. Conceptul de bioinginerie a organelor presupune nu numai obținerea unei schele tridimensionale după îndepărtarea celulelor cu potențial imunogen, ci și conservarea structurilor rețelei vasculare pentru aprovizionarea eficientă cu oxigen și nutrienți [62, 70]. Conform studiilor experimentale, conservarea structurii microvasculare a MEC după decelularizare este esențială pentru funcționalitatea acesteia în cazul transplantului [94].

Decelularizarea este procedeul utilizat în ingineria tisulară pentru a izola MEC a unui țesut de celulele care îl populează, obținând o MEC a țesutului original, care poate fi utilizată în obținerea organelor artificiale și regenerarea tisulară. Transplantul de organe și țesuturi poate trata o varietate de probleme medicale, variind de la insuficiența de organe până la chirurgia cosmetică. Prin acest proces se creează un biomaterial natural, care reprezintă o schelă pentru creșterea celulară, diferențierea și dezvoltarea țesutului. Prin recelularizarea unei schele MEC cu celule proprii ale unui pacient, răspunsul imun advers este eliminat. În prezent sunt disponibile în comerț o gamă largă de schele MEC pentru ingineria tisulară.

Pentru studiul decelularizării pulpei dentare s-au utilizat pulpele dentare din molarii a 12 pacienți, din care 6 pulpe dentare au fost supuse procesului de decelularizare cu SDS 0,5% timp de 5 ore, urmat de spălarea acesteia în soluție NaCl 0,9% și fixarea în formalină de 10% pentru efectuarea analizei histologice. Pulpele dentare care nu au fost supuse decelularizării au fost fixate în formalină de 10% și analizate morfometric (fig. 4.6).

1. Extragerea
molarului



2. Extragerea pulpei
dentare



3. Decelularizarea



a) Soluție SDS 0,5%



b) Heparină +

Soluție SDS 0,5%

4. Liofilizarea



5. Pulpă dentară
decelularizată și
liofilizată



Fig. 4.6. Etapele decelularizării pulpei dentare cu: a) soluție SDS 0,5%; b) soluție SDS 0,5% după spălarea pulpei dentare în soluție de heparină

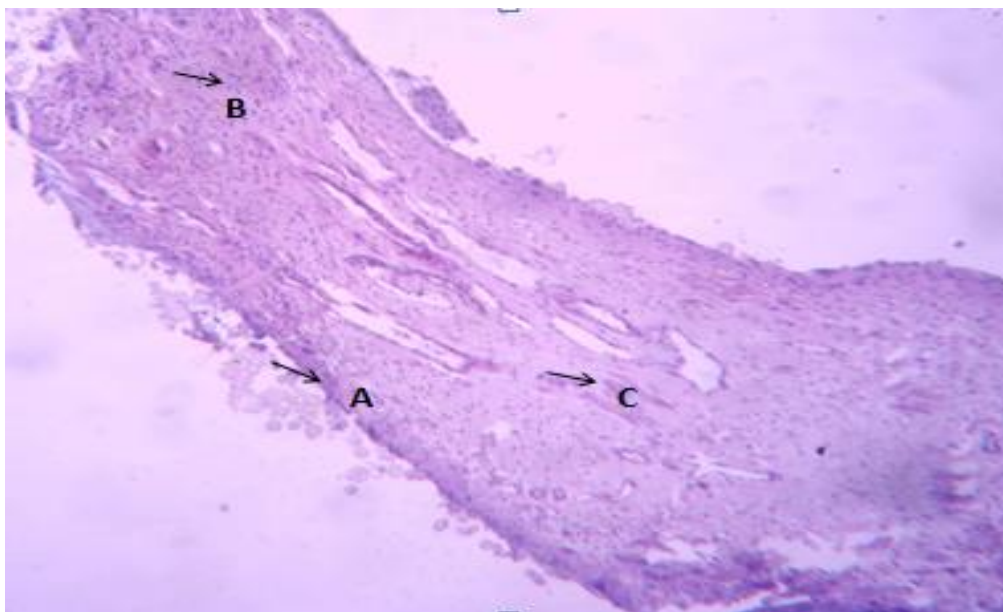


Fig. 4.7. Pulpă dentară normală. A – zona periferică, B – celulele pulpei dentare, C – zona centrală H-E, x 90

Pulpele dentare intacte analizate histologic prezintă următoarea structură: zona pulpară periferică, care conține stratul de odontoblaste, și zona pulpară centrală, care conține principalul

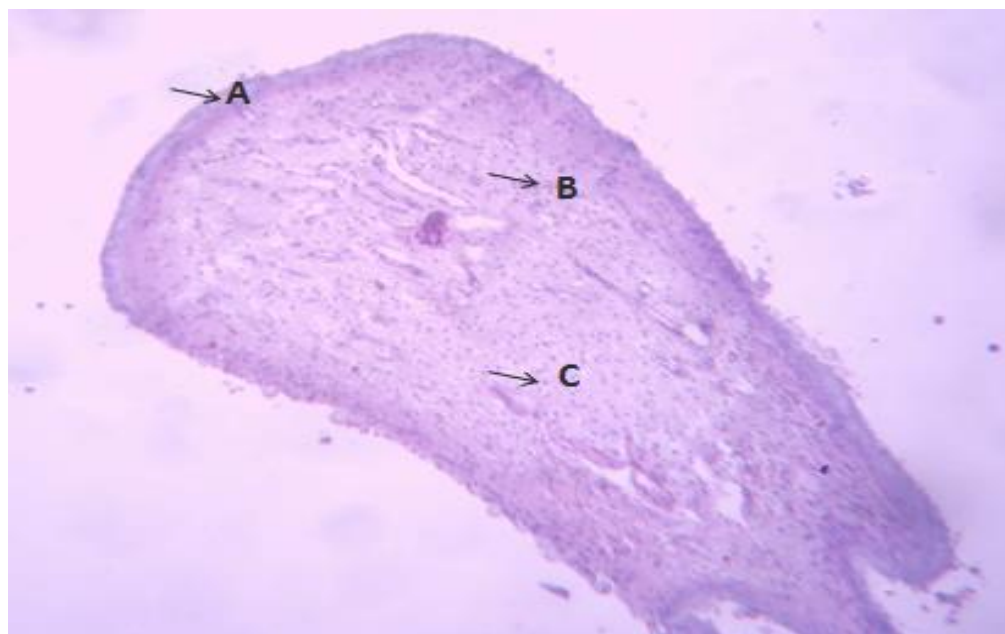


Fig. 4.8. Pulpă dentară nativă. A – Zona periferică, B – celulele pulpei dentare, C – Zona centrală H-E, x 90

sistem de susținere pentru pulpa periferică, sistem ce include vasele mari și nervii de la care pleacă plexuri spre straturile externe pulpare, iar principalele celule sunt fibroblastele și componentul de bază extracelular – collagenul (fig. 4.7).

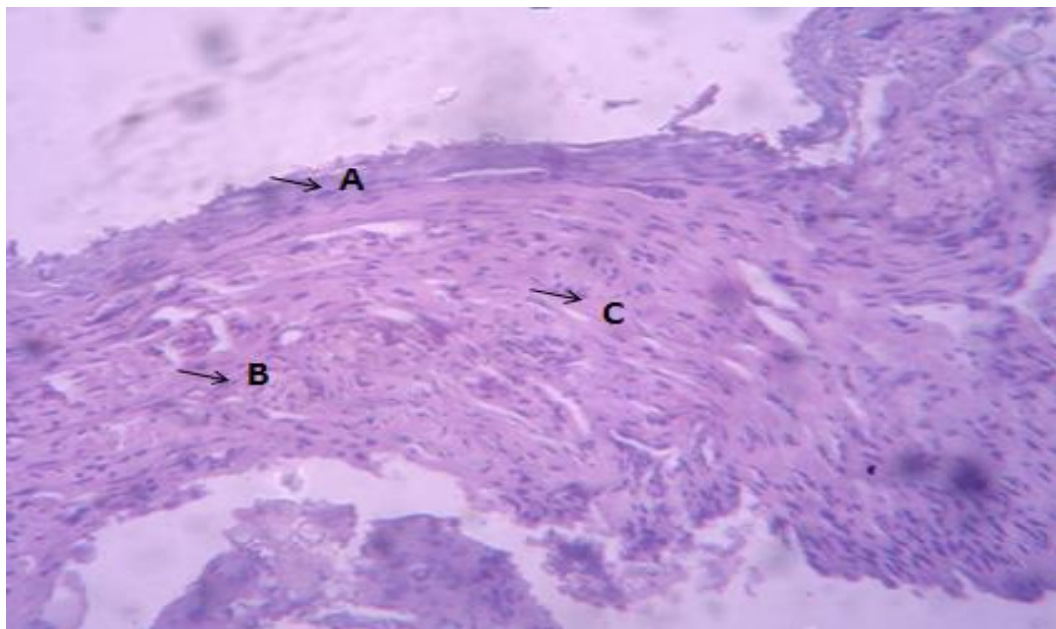


Fig. 4.9. Pulpă dentară nativă. A– zona periferică, B – celulele pulpei dentare, C – zona centrală (a) H-E, x 90

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 au manifestat o arhitectură conjunctivă organizată (fig. 4.10).

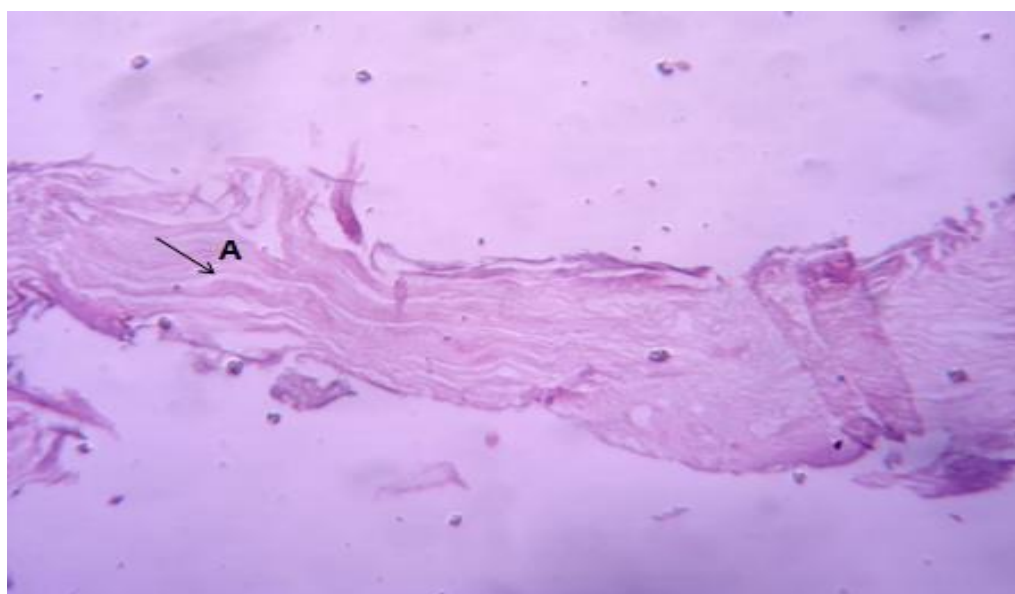


Fig. 4.10. Pulpă dentară decelularizată cu soluție SDS 0,5% (A), arhitectură conjunctivă a pulpei dentare, fibre collagenice H-E, x 90

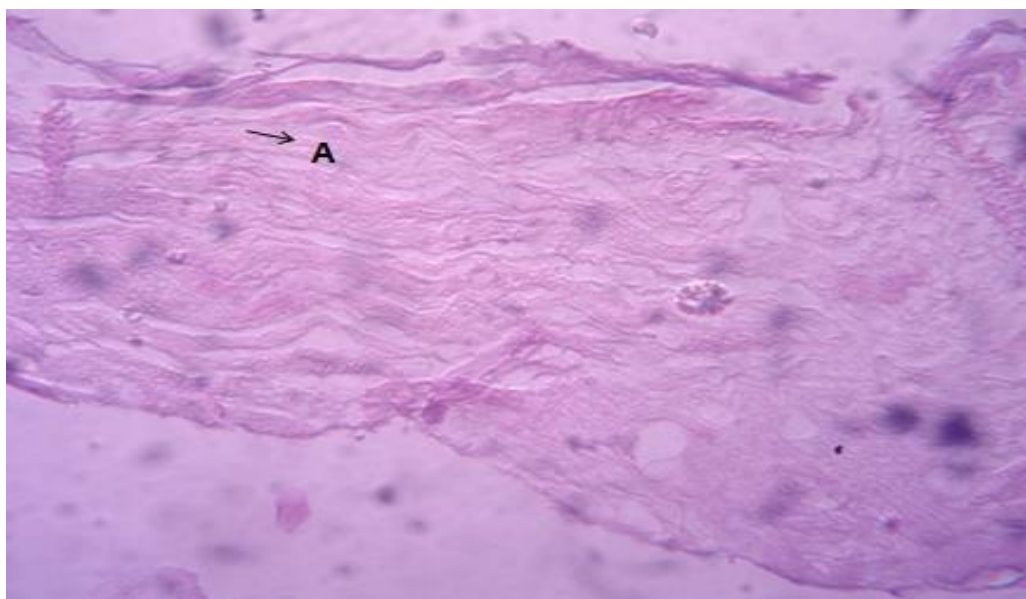


Fig. 4.11. Pulpă dentară decelularizată cu SDS (A), arhitectonică conjunctivă a pulpei dentare, fibre colagenice H-E, x 90

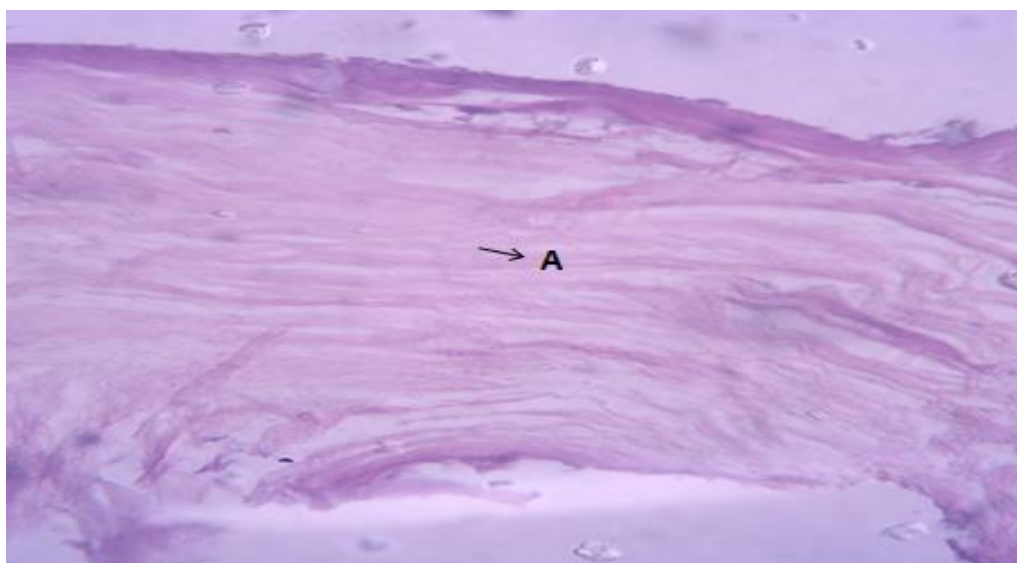


Fig. 4.12. Pulpă dentară decelularizată cu SDS (A), arhitectonică conjunctivă a pulpei dentare, fibre colagenice H-E, x 90

Toate pulpele dentare decelularizate au prezentat o decelularizare completă, prin lipsa elementelor celulare și obținerea unei MEC colagenice uniform decelularizate (fig. 4.11, 4.12).

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

În scopul evaluării efectului citotoxic al pulpei dentare decelularizate și al stabilirii dacă aceasta este, după procesarea efectuată – decelularizare, liofilizare, compatibilă cu celulele vii și

dacă nu au un efect citotoxic, 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 1 x 1 mm pentru experimentul de testare a toxicității.

În acest sens, au fost utilizate celule stem obținute din măduva 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 realizat pe plăci pentru cultivarea celulelor cu 96 de godeuri. Celulele au fost repartizate în cantitatea de 5×10^4 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 s-a monitorizat și lotul- martor, în care nu a fost plasată pulpă decelularizată. Evaluarea rezultatelor a fost efectuată prin citirea în Spectrofotometrul VersaMax, Microplate reader, SUA, cu lungimea de undă 570 nm (tabelul 4.2, figura 4.13).

Tabel 4.2. 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											

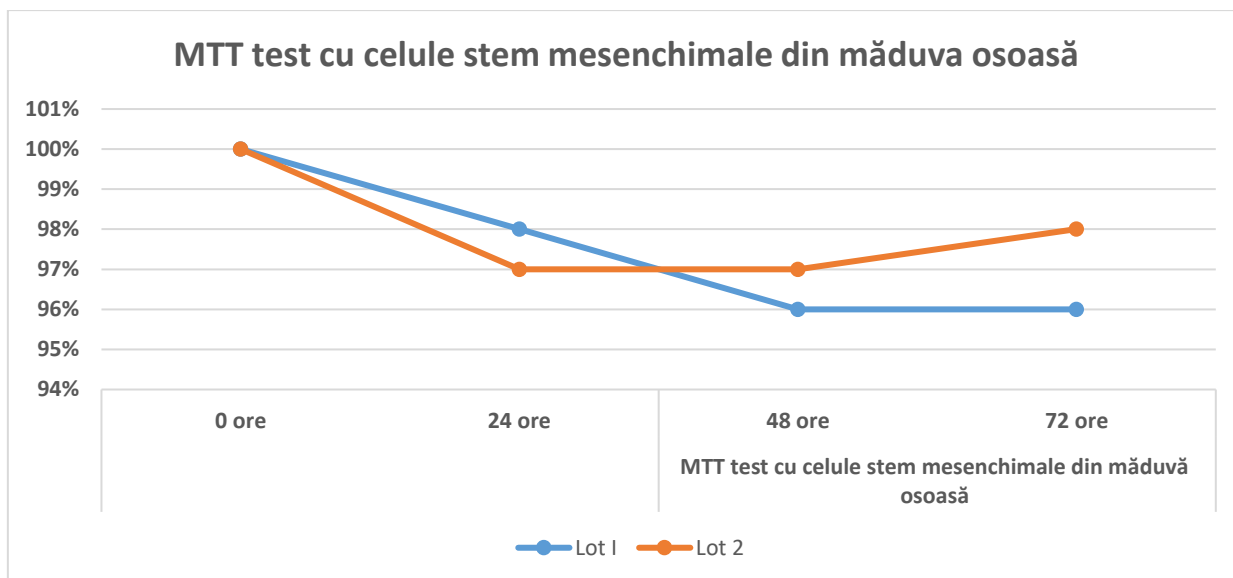


Fig. 4.13. Diagrama rezultatelor testului de toxicitate (MTT) a pulpei dentare decelularizate și liofilizate din loturile 1 și 2. Diferența statistic nesemnificativă a testului de toxicitate, $p > 0,05$

4.3. Sinteza capitolului 4

Ingineria tisulară și regenerarea țesutului pulpar dentar ar părea actualmente o sarcină complicată. Ca un dinte să fie funcțional, el trebuie bine vascularizat, iar componența celulară să fie similară cu cea a pulpei native, care ar fi aptă de a favoriza apariția odontoblastelor, formarea dentinei și restabilirea sistemului nervos dentar.

Pentru ingineria tisulară a dintelui/pulpei dentare, sunt necesare izolarea celulelor cu fenotipuri corecte, realizarea multiplicării lor în medii de cultură, efectuate, de fapt, în prima parte a lucrării.

Prin urmare, este esențial să se construiască o schelă destinată regenerării pulpei dentare care să conțină MEC caracteristică pulpei dentare, pentru a promova diferențierea odontoblastelor și formarea dentinei.

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 fosfat citrat dextroză asigură rezultate mai bune.

Menținerea arhitecturii conjunctive și a fibrelor de collagen, obținerea conținutului mai mare de hidroxiprolină în MEC prin metoda propusă de noi a demonstrat fezabilitatea lor ridicată pentru utilizarea ulterioară ca structură de bioinginerie în procesul de recelularizare.

DISCUȚII

Medicina regenerativă bazată pe metodologia terapiei celulare și a ingineriei tisulare este un domeniu multidisciplinar în curs de dezvoltare, care implică biologie, medicină și manipulare genetică. Acest tip de terapie are ca scop menținerea, restaurarea sau sporirea funcției țesuturilor și organelor, ajutând astfel la tratamentul unor boli umane cu severitate variabilă – de la situații cronice la cele care pun viața în pericol [1,122]. În bolile care evoluează cu compromiterea funcției țesuturilor sau a organelor, cercetarea celulelor stem promite să ne ofere o cale eficientă spre terapia regenerativă. Totuși, aplicarea acestor cercetări în tratamentul bolilor umane nu este posibilă fără o cunoaștere aprofundată a proprietăților biologice ale tuturor tipurilor de celule stem.

În contextul unei anumite boli, trebuie de decis, în primul rând, care este cel mai indicat tip de celulă stem: cea embrionară sau de tip adult [10]. De asemenea, este necesară identificarea unei surse de celule stem care să fie accesibilă și în număr mare, precum și să nu genereze preocupări etice [53, 69].

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 [94, 97]. 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 [94]. 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 [129]. 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 [123].

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.

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.

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 [114, 122].

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 [114].

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 [114]. 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 [114]. 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 [16]. 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

poftida 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). 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 [37, 114].

De remarcat faptul că astfel de măsurări și diferențele lor nu pot determina locația unde începe procesul de calcificare. Sunt necesare investigații suplimentare pentru a determina efectul cariilor și restaurări pe înălțimea camerei pulpei în raport cu fosa centrală [123].

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 pretratamentul 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. 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 aditivii 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. 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* [70, 85, 86].

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.

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 [121].

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 [118, 121]. 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 [117, 147, 148].

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. Eitem 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 [119, 147].

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 [126].

Luând în considerare toate acestea, cercetătorii și-au îndreptat atenția către celulele stem adulte sau către cele provenite din țesuturi fetale în căutarea unor populații precursore mai puțin controversate.

Distribuția largă și plasticitatea celulelor stem au fost apreciate de curând. Pe lângă sursele bine cunoscute provenite din măduva hematopoietică adultă sau mezenchim [1], populații adulte de celule stem au mai fost descoperite în țesutul adipos [78], ficat, țesut muscular [71], sistemul nervos central, piele și pulpa dentară [117].

Rapoarte recente sugerează că diferențierea celulelor stem adulte nu este restricționată la derivați ai țesuturilor în care rezidă. Studiile au demonstrat că celulele stem adulte se pot transforma în progenitori ai altor straturi germinative embrionare, proces numit *diferențiere transgerminală*. De exemplu, celulele stem ectodermale neurale pot fi diferențiale în derivați mezenchimal, inclusiv celule sangvine, celule musculare și endoteliale.

Plasticitatea celulelor stem adulte oferă posibilitatea de a dezvolta noi terapii celulare autologice. Celulele stem adulte pot oferi numeroase avantaje față de celulele stem embrionare. Totuși, utilizarea lor în terapii de regenerare nu este lipsită de obstacole. Mai multe rapoarte abordează problema plasticității celulelor stem adulte. Câteva studii au sugerat că plasticitatea transgerminală demonstrată atât *in vivo*, cât și *in vitro* este, mai degrabă, rezultatul fuzionării celulare decât al diferențierii propriu-zise. Pe de altă parte, unele studii au demonstrat transdiferențierea celulelor hematopoietice *in vivo* în absența fuziunii celulare [150].

Recent s-a demonstrat că CSM-urile transplantate în țesutul nervos al adultului nu au supraviețuit. Dimpotrivă, aceste celule și-au transferat markerii celulari (bromodeoxyuridine și bis-benzamide) către celulele gliale și neuronale, dând o falsă impresie de plasticitate a celulelor donatoare. Aceste rezultate, aparent contradictorii, au ridicat numeroase probleme cu privire la caracteristicile plasticității celulelor stem adulte și la potențialul terapeutic pe care îl prezintă.

Celulele stem embrionare derivate din embrioni în stadiul de blastocit sunt caracterizate de un potențial aproape nelimitat de regenerare și diferențiere.

Ele pot fi utilizate pentru a examina mecanismele de diferențiere ale celulelor progenitoare pentru a identifica semnalele specifice pentru întreținerea celulară, regenerarea celulară și activarea diferitelor căi de semnalizare.

Celulele stem fetale pot oferi un număr de avantaje terapeutice față de celulele stem embrionare, făcându-le interesante pentru tratamentele de înlocuire. Celulele stem fetale sunt ușor accesibile și provin din țesuturi extraembrionare care sunt, în mod normal, evacuate la naștere, inclusiv din cordonul ombilical și placentă [2], evitând astfel problemele de etică medicală. Celulele stem fetale proliferază rapid în mediu de cultură și prezintă plasticitate asemănătoare celulelor stem embrionare, dar, deocamdată, rămâne nedocumentată dezvoltarea tumorală *in vivo* [3]. Mai mult decât atât, celulele stem fetale pot fi mai indicate în cazul transplanturilor datorită caracteristicilor imunologice privilegiate [1, 3] .

Studiul mecanismelor moleculare care stau la baza morfogenezei dentare au evoluat considerabil în ultimii ani. S-a ajuns la concluzia că interacțiunile epiteliu-mezenchim sunt mediate de aceleași familii de proteine de semnalizare la toate vertebratele. Detaliile moleculare ale rețelelor de semnalizare au fost studiate în detaliu, în special familiile BMP, FGH, Hh, Wnt. Funcțiile acestor căi de semnalizare și interacțiuni tisulare au fost studiate pe culturi celulare și modele animale, relevând semnale inductive și ierarhii în cascada factorilor de transcripție. La ora actuală au fost studiate peste 200 de gene implicate în morfogeneza dentară. Analiza modelelor de expresie a acestor gene au relevat asocierea multor factori genetici în acest proces.

După studierea amănunțită a fazelor de morfogeneză, s-a încercat reproducerea proceselor embrionare în speranța obținerii țesuturilor dentare care ar putea fi transplantate la adulți [43].

Încercarea de a induce a treia dentiție se bazează pe găsirea unor factori de creștere și diferențiere care ar induce formarea țesuturilor dentare din nou la adult în cazul unor pierderi dentare. Mutația genei RUNX2, care este responsabilă de apariția displaziei cleidocraniene, manifestată prin apariția celei de-a treia dentiții. Astfel, aceasta ar fi o posibilă metodă de regenerare dentară. La momentul actual, la adult nu au fost găsite celule care ar fi sensibile la această genă [64].

În ultimii ani a fost studiată capacitatea de diferențiere a celulelor mezenchimale provenite din măduva hematogenă adultă către linia osteoblastică și odontoblastică. Studiile anterioare au demonstrat că CSM-urile pot fi diferențiate și în condrocite sau adipocite. Deși structurile osoase și dentinare sunt similare ca structură a matricei proteice, structura organică este total diferită. Procesele dinamice ale regenerării tisulare și mecanismele distincte de regenerare mediate de CSM-uri provenite din măduva hematogenă, precum și de cele provenite din complexul pulpo-

dentinar nu sunt pe deplin elucidate. Osteogeneza și dentinogeneza încep la 2-4 săptămâni posttransplantare și duc la regenerarea structurilor osoase și dentinare.

La 15 săptămâni posttransplantare se poate observa o cantitate mai mare de țesut mineralizat în comparație cu transplanturile după 8 săptămâni, ceea ce indică faptul că CSM-urile au capacitatea de a continua procesul de formare a țesutului mineralizat și după formarea structurilor specifice de organ. Acest lucru sugerează faptul că CSM-urile nu sunt capabile doar să se diferențieze spre linia osteoblastică sau odonoblastică *in vivo* în fazele inițiale ale transplantării, ci pot induce celulelor-gazdă participarea la regenerarea tisulară.

Dezvoltarea structurilor organice mediată de către celulele stem este un proces dinamic, care implică interacțiuni între celulele transplantate și mediul-gazdă. De fapt, structura organică rezultată este o structură himerică a componentelor celulare ale donatorului și ale gazdei.

Cel mai frecvent utilizate tipuri de celule stem pentru regenerarea osoasă orofacială au fost CSMMO-urile din creasta iliacă, DPSC, ASC, celulele stem derivate din periost și celulele osteoprogenitoare, care au fost aplicate pe lângă alte CSM derivate din diferite țesuturi dentare. Cu toate acestea, succesele obținute în refacerea completă a defectelor osoase ale mandibulei umane folosind DPSC și o schelă din burete de collagen au fost mult mai promițătoare. Sunt necesare investigații mai detaliate pentru a determina mecanismul real al osului nou- format în creșterea crestei mediată de SC (osteoinducție de către celulele transplantate sau osteoconducție de către celulele osteogene gazdă), deoarece acele CSMMO însămânțate ar putea elibera și GF-uri care induc celulele-gazdă și acționează ca o sursă de celule osteogene pentru formarea de oase noi. O astfel de diferențiere poate fi observată folosind studiile histomorfometrice și micro-CT pentru a demonstra că osul regenerat pe bază de celule derivă din celulele transplantate [68, 75].

Reținerea capacității și viabilității osteogene celulare sunt alte cerințe pentru producerea MEC în ingineria țesutului osos. Cu toate acestea, perspectivele rezultatului clinic al celulelor transplantate și consecințele lor imunologice sunt slab studiate, deși o cantitate tot mai mare de dovezi afirmă că celulele stem dentare pot fi utile pentru terapiile imune și regenerative. Migrarea și moartea celulelor transplantate au fost raportate în unele studii pe modele animale. În mod surprinzător, HDPSC-urile arată rezultate mai acceptabile în comparație cu CSMMO pentru regenerare. SHED-urile sunt, de asemenea, potențiali candidați pentru terapia regenerativă pe bază de celule stem dentare. Aceste populații SC au creat un viitor promițător pentru ingineria țesuturilor pe bază de celule stem ca soluție pentru înlocuirea unui dinte lipsă. Noile tratamente dentare pe bază de celule stem sunt, de asemenea, sugerate a fi utile pentru corectarea despicăturii palatine, dinții extrași, oasele maxilare, defectele parodontale și, de asemenea, pentru regenerarea biologică *de novo* a întregii structuri dentare. Regenerarea *de novo* a întregului dinte este scopul

final în stomatologie și reprezintă cea mai mare provocare pentru viitoarele cercetări clinice relevante. Cu toate acestea, nici un material de restaurare nu poate imita toate proprietățile fiziologice și biologice ale țesutului dentar; regenerarea sa este considerată benefică pentru îmbunătățirea depunerilor fiziologice de dentină și reducerea leziunilor interfaciale. În biologia regenerativă cranio-facială, strategiilor terapeutice regenerative ale parodonțiului li s-au acordat primordialitate; însă există limitări în ceea ce privește utilizarea grefelor osoase autologe, a alogrefelor sau a materialelor aloplastice în unele aplicații clinice [69, 120].

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 colagen, 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 aripiei 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.

3. Pentru cultivarea celulelor autologice din pulpa dentară, se recomandă utilizarea autoserului care poate fi obținut din sângele periferic al donatorului de dinte. Cantitatea de ser necesară pentru

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., NACU, V., FRIPTU, V., CIOBANU, P. *Ghid practic de prelevare a sângelui ombilico-placentar*. Chișinău, 2008, p. 36.
3. ABABII, I., CIOBANU, P., GHIDIRIM, GH., NACU, V. *Optimizarea regenerării reparatorii a țesuturilor și imunogenezei locale în contextul funcționării nanosistemelor naturale*. Chișinău: „Tipografia centrală”, 2011, p. 336.
4. AGHA-HOSSEINI, F., JAHANI, MA., JAHANI, M. *et al.* In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clinical Transplantation*, 2010, v. 24, pp. 23-25.
5. AMBELE, M.A., DHANRAJ, P., GILES, R., Adipogenesis: A complex interplay of multiple molecular determinants and Pathways, *Int J Mol Sci.*, 2020, pp. 45-49.
6. ALICIA, A., NAIMAH, Z., EZEDDINE, H. *et al.* Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering, 2019, pp. 80-85.
7. ARANA-CHAVEZ, V., MASSA, L. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8), 2004, pp. 1367-1373.
8. ASHRAF AL MADHOUN, M., SARDAR SINDHU, K., DANIA HADDAD, J. *et al.* Dental Pulp Stem Cells Derived from Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review, 2021, pp. 1-20.
9. AVERY, J., CHIEGO, D. *Essentials Of Oral Histology And Embryology: A Clinical Approach*. Third ed. Missouri, USA: Mosby Elsevier, 2006, pp. 100-110.
10. AUGELLO, A., KURTH, T.B., DE BARI, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur Cell Mater* 20, 2010, pp. 121-133.
11. AYDIN, S., ŞAHİN, F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol*, 2019, pp. 123–132.
12. BARRY, F. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69(3), 2003, pp. 250-256.
13. BELTRAMI, A. *et al.* Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow), *Blood*, 2007, 110, pp. 3438-3446.
14. BIANCO, P., ROBEY, P. Mesenchymal Stem Cell: clinical applications. *J. Clin. Invest* v.105, 2000, pp.1663-1668.
15. BONGSO, A., LEE, H., Stem cells: from bench to bedside. *World Scientific Publishing*

Co. Pte. Ltd., 2005, p. 561.

16. BAKOPOULOU, A., LEYHAUSEN, G., VOLK, J. *et al.* Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo-odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth . *Calcif Tissue Int.*, v. 88 (2), 2011, pp. 130-141.

17. BEANE, OS., DARLING, EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng.*, v. 40 (10), 2012, pp. 2079-2097.

18. BRANISTE, T., COBZAC, V., ABABII, P., PLESCO, I. *et al.* Menchymal stem cells proliferation and remote manipulation upon exposure to magnetic semiconductor nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 25, pp. 50-56.

19. BRANISTE, T., COBZAC, V., ABABII, P. *et al.* The influence of semiconductor nanoparticles upon the activity of mesenchymal stem cells. Springer, Cham, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2019, vol 77, pp. 607-611.

20. BURNETT, A., KUMAR, R., WESTPHAL, JD. *Cell proliferation and promoted differentiation of dental pulp-derived mesenchymal stem cells in vitro*, 2013, p. 110.

21. BUTUCEL, P., NACU, V., LISNIC, V. Bone marrow-derived mononuclear cells therapy for ischemic stroke. *MoldMedJournal*, 2019, pp. 61-69.

22. CALABRESE, E. Hormesis and embryonic stem cells. *Chem Biol Interact*, 2022, p. 24.

23. CANCEDDA, R., MASTROGIACOMO, M., BIANCHI, G., DERUBEIS, A., MURAGLIA, A., QUARTO, R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp.*, vol. 249, 2003, pp. 133-143.

24. CRAPO, PM., GILBERT, T. W., BADYLAK, SF. *An overview of tissue and whole organ decellularization processes.* *Biomaterials*, 2011, pp. 3233-3243.

25. CHEN, YK., HUANG, AHC., CHAN, AWS. Human dental pulp stem. Cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 40, 2011, pp. 793-800.

26. CHEN, S., XIE, H., ZHAO, S. *et al.* The Genes Involved in Dentinogenesis., *Organogenesis*, 2022, pp. 1-19.

27. CHIEKER, M. *et al.* The use of four - colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anatomy*, vol. 204, 2004, pp. 133-139.

28. CIAPETTI, G. *et al.* Human bone marrow stromal cells: *In vitro* expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials*, vol. 27, 2006, pp. 6150-6160.

29. COBZAC, V., JIAN, M., NACU, V. The efficiency of device for fixation and

cellularization of small sized grafts. International Conference on Innovative Research Iasi, 2021, pp. 45-48.

30. COBZAC, V., JIAN, M., GLOBA, T., NACU, V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. IFMBE Proceedings Book, 2021, pp. 334-341.

31. COBZAC, V., MOSTOVEI, A., JIAN M., NACU, V. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. MoldMedJournal, 2019, pp. 35-41.

32. COBZAC, V., VERESTIUC, L., JIAN, M. NACU, V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. Mater. Sci. Eng., 2019, pp. 56-58.

33. CLARKE, D., FRISÉN, J. Differentiation potential of adult stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11(5), 2001, pp. 575-580.

34. COUBLE, M. L. *et al.* Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66(2), 2000, pp. 129-138.

35. DANE, K., ALISA, E LEE., QILIN, XU. *et al.* Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Comprehensive Review. *Front Immunol*, 2021, pp.67-68.

36. 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.

37. D'AQUINO, R., DE ROSA, A., LAINO, G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology*, 2009, pp. 408-415.

38. DI BERNARDO, G., PIVA, R., GIORDANO, A., GALDERISI, U. Exploiting stem cell therapy: The 3rd meeting of stem cell research Italy. *J Cell Physiol*, v. 228 (4), 2013, pp. 911-914.

39. DJOUAD, F., JACKSON, WM., BOBICK, B. Activin A expression regulates multipotency of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.*, v. 1 (2), 2010, p. 11.

40. DE BARI, C. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44(8), 2001, pp. 1928-1942.

41. DING, G. *et al.* Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol* 223(2), 2010, pp. 415-422.

42. DIGKA, A., GOUNARI, E., KOUZI-KOLIAKOU, K. Effect of Long-Term Cryopreservation on the Stemness of Stem Cells Apical Papilla. *Int J Dent*, 2022, p. 8.

43. ELINGER, C., MATHIEU, E., RABINEAU, M., *et al.* Insertivity of dental pulp stem cells migration to substrate stiffness. *J. Biomaterials*, 2021, pp.76-79.
44. EMBERY, G. *et al.* Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(4), 2001, pp. 331-349.
45. ELDER, BD., ELESWARAPU, SV., ATHANASIOU, KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*, 2009, pp. 749-756.
46. EREMIA, V., BABUCI, S., PETROVICI, V., NEGRU, I., *et al.* Reconstrucția chirurgicală experimentală a defectelor diafragmatice prin utilizarea grefelor biologice decelularizate. Rezultate preliminare. *Arta Medica*, 2018, pp. 4-8.
47. FAWZY EL-SAYED, KM., ELSALAWY, R., IBRAHIM, N., *et al.* The Dental Pulp Stem/Progenitor Cells-Mediated Inflammatory-Regenerative Axis, 2019, pp. 445-460.
48. FERGAL, J., O'BRIEN, M. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, v. 14.(3), 2011, p. 1369.
49. FUCHS, E., SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100(1), 2000, pp. 143-155.
50. FUCHS, E. *et al.* Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6), 2004, pp. 769-778.
51. FUJII, S. *et al.* Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol* 215(3), 2008, pp. 743-749.
52. GLOBA, L., NACU, V. Caracteristica imunohistochimică a celulelor stem mezenchimale din complexul ombilicoplacentar. Archives of the Balkan Medical Union. The conference materials dedicated to the anniversary of 60 years since the founding of the Institute of Emergency Medicine, 2017, p. 50.
53. GUILLOTIN, B., BOURGET, C., REMY-ZOLGADRI, M., BAREILLE, R. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor celldifferentiation. *Cell Physiol Biochem.*, vol. 14, 2004, pp. 325-332.
54. GOLCHIN, A., CHATZIPARASIDOU, A., RANJBARVAN, P. Embryonic Stem cells in Clinical Trials: Current overview of Developmental Challenges. *Adv Exp Med Biol*, 2021, pp. 19-37.
55. GOVINDASAMY, V., ABDULLAH, AN., RONALD, VS. *et al.* Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*, v. 36 (9), 2010, pp. 1504-1515.

56. GOVINDASAMY, V., RONALD, VS., TOTEY, S. *et al.* Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of Dental pulp stem cells – an economic and commercial angle. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, v. 46, 2010, pp. 764-773.
57. 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.
58. GURUSAMY, N., ALSAYARI, A., RAJASINGH, S., RAJASINGH, J. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 2018, pp. 18-20.
59. GRONTHOS, S., ZANNETTINO, A. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. *Methods Mol Biol* 449, 2008, pp. 45-57.
60. 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.
61. HAYNESWORTH, S.E., GOSHIMA, J., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992, pp. 81–88.
62. HUANG, GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci* (Elite Ed), v. 3, 2011, pp. 788-800.
63. HUNG, E. *et al.* Dental pulp-derived stem cell (DPSC) survival and viability may correlate with specific patient demographics, 2013, pp. 109-120.
64. 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.
65. IKEDA, H. *et al.* Engineering Bone Formation from Human Dental Pulp and Periodontal Ligament-Derived Cells. *Ann Biomed Eng.*, 2010, p.130.
66. IOHARA, K. *et al.* Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 24(11), 2006, pp. 2493-2503.
67. JAUME, CANDELL RIERA. Stem Cell Implantation Is Clinically Feasible but, Will it Be Effective, 2004, pp. 191-193.
68. JIAN, M., COBZAC, V., MOSTOVEI, A., NACU, V. The procedure of bone cells obtaining, culture and identification. Springer, Cham, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2019, pp. 595-599.
69. JIAN, M., COBZAC, V., NACU, V. The isolation of fibroblasts by volumetric regulation cycles. IFMBE Proceedings Book, 2021, pp. 325-333.
70. JIAN, M., COBZAC, V., MOGHILDEA, I., POPESCU, V., NACU, V. Techniques of liver decellularization. *MoldMedJournal*, 2018, pp. 21-24.

71. JIAN, M., COBZAC, V., VARTIC, V., NACU, V. Hepatocytes isolation from adult rats for liver recellularization. *MoldMedJournal*, 2019, pp. 13-17.
72. JO, YY., LEE, HJ., KOOK, SY., CHOUNG, HW. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.*, V. 13 (4), 2007, pp. 767 -773.
73. JONES, E. A. *et al.* Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46(12), 2002, pp. 3349-3360.
74. KARBANOVÁ, J., SOUKUP, T., SUCHÁNEK, J. *Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Impacted Third Molars Cultured in Low Serum - Containing Medium. Cells Tissues Organs*, 2010, p. 58.
75. KARL, M., PALARIE, V., NACU, V., GROBECKER-KARL, T. Pilot Animal Study Aimed at Assessing the Mechanical Quality of Regenerated Alveolar Bone. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2020, pp. 313-319.
76. KARL, M., PALARIE, V., NACU, V., CHELE, N., STEINER, C., GROBECKER-KARL, T. Micromotion phenomena at the implant bone interface: A biomechanical and histomorphometric study. *Journal of Dental and Maxillofacial Surgery*, 2018, pp. 6- 63.
77. KADAR, K., KIRALY, M., PORCSALMY, B. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*, v. 60 (Suppl 7), 2009, pp. 167-175.
78. KHAZAEI, S., KHADEMI, A., HOSSEIN, M. *et al.* Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Odontoblast-Like Cells: A Preliminary *In Vitro* Study, 2021, pp. 288–293.
79. KILKENNY, C., BROWNE, W.J., CUTHILL, I.C., EMERSON. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*, 2010, pp. 94-98.
80. KOLF, C. M. *et al.* Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9(1), 2007, p. 204.
81. LEE, SY., CHIANG, PC., TSAI, YH. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod.*, v. 36 (8), 2010, pp. 1336-1340.
82. LEE, JY., NAM, H., PARK, YJ. The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, v. 47 (2), 2011, pp. 157-164.
83. LV, F.J., TUAN, R.S., CHEUNG, K.M., Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2014 pp. 1408–1419.

84. Lin, Z., He, H., Wang, M., Liang, J. Micro RNA – 130a controls bone marrow mesenchymal stem cells differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate, 2019, pp. 34-39.
85. MACAGONOVA, O., RISNIC D., COCIUG A., NACU V. Comparative analysis of the skin decellularization methods. *The Moldovan Medical Journal*, 2021, pp.79-86.
86. MALCOVA, T., BĂLUȚEL, T., CIUBOTARU, A., NACU, V. Tissue engineering of heart valves—challenges and opportunities. *MoldMedJournal*. 2019, pp. 49-55.
87. MALCOVA, T., GLOBAL, L., VASCAN, A., ȚUGU, I. E., STOIAN, A., NACU, V. Mechanical and morphological characterization of decellularized umbilical vessels as tissue engineering scaffolds. *IFMBE Proceedings. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*, 2019, pp. 589-594.
88. MARRELLI, M., CODISPOTI, B., SHELTON, R.M. et al. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Front Physiol*, 2018, pp. 89-95.
89. MINGJIAN, DU., ZHILIAN, I. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science*, 2018, pp.704-709.
90. MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10), 2003, pp. 5807-5812.
91. 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.
92. MOURAD, A.M., ALHUSAIN, J.A., AMER, M. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening., *Cells*, 2021, pp. 56-59.
93. MUREȘAN, E. Tehnici de histologie normală și patologică. București, 1974, pp. 280-302.
94. NACU, V., LABUSCA, L. Medicină regenerativă și nanomedicină. Tipografia Sirius SRL, 2021, p. 179.
95. NACU, V. Ingineria tisulară în recuperarea defectului osului radial în experiment. *Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”*, v. 4, 2007, pp. 245-251.
96. Nacu V. Metodele biologice de stimulare a procesului reparator osos. *Curierul medical*. Chișinău, nr. 3 (309), 2009, pp. 37-45.
97. Nacu V. *Optimizarea regenerării osoase posttraumatice dereglate*. Chișinău: „Tipografia Sirius”, 2010, p. 188.
98. NACU V. Grefă compozită celulară utilizată în defect critic experimental al osului

radial. *Revista Romană de Anatomie funcțională și clinică, macro- și microscopică și de Antropologie*. Iași, v. VII, nr. 3, 2008, pp. 375-380.

99. NACU V. Recuperarea defectului de dimensiune critică al osului parietal la iepure prin grefe compozite. *Curierul medical*. Chișinău, nr. 6, 2008, pp. 66-72.

100. NACU, V., COSCIUG, S., COBZAC, V., ȚÎMBALARI, T. Medicina regenerativă în restabilirea țesuturilor scheletice. *Arta Medica*. Chișinău, 2017, pp. 30-33.

101. OHSHIMA, H. *et al.* The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol* 50(2), 2005 pp. 153-157.

102. OLIVIER, E. N., LAMIN, M., *et al.* High-Efficiency Serum-Free Feeder-Free Erythroid Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecules, 2016, pp. 1394–1405.

103. PROCKOP, D. J. Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biology*, 2016, pp. 7-13.

104. PAPATHANASOPOULOS, A., GIANNOUDIS, P. V. Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Injury*, v. 39, suppl 2, 2008, pp. 21-32.

105. PARSON, ANN B. *The Proteus Effect: Stem Cells and Their Promise for Medicine*, Washington, 2004, p. 312.

106. PAN, G., THOMSON, J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*, 2007, pp. 42-49.

107. PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, v. 284, 1999, pp. 143-147.

108. 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.

109. RALSTON, A., SHAW, K. Gene expression regulates cell differentiation, *Nature Education*, 2008, p. 127.

110. RAINA, D., FABRIS, F., MORELLI, L.G., SCHRÖTER, C. Intermittent ERK oscillations downstream of FGF in mouse embryonic stemcells. *Development*, 2022, pp. 89-96.

111. RASTEGAR, F. *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2(4), 2010, pp. 67-80.

112. RICCIO, M., RESCA, E., MARALDI, T. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *Eur J Histochem*, v. 54 (4), 2010, p. 46.

113. RUCH, J. V. *et al.* Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39(1), 1995, pp. 51-68.

114. **SAMSON, S.**, NACU, V. The dental pulp chamber evaluation by using cone-beam computed tomography. *Moldovan Medical Journal*. 2021; 64 (2), pp. 49-52. ISSN 2537-6381.

115. **SAMSON, S.,** BURLACU, V., ZOTA, E., NACU, V. Stem cells in the future of dental care. *Curierul Medical*. 2011, nr. 3(321), pp. 35-40. ISSN 1857-0666.
116. **SAMSON, S. et al.** Dintele ca sursă de celule stem. *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.
117. **SAMSON, S. et al.** Dental pulp stem cell for regenerative medicine. *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.
118. **SAMSON, S.** Techniques of dental pulp decellularization, *The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*. Chisinau, 2021, pp. 480-483. ISBN 978-3-030-92328-0.
119. **SAMSON, S.** Stem cells in dental care. *The 4th international Medical Congress for Students and young doctors MedEspera*. Chișinău, 2012, pp. 223-224. ISBN 978-9975-47-174-9.
120. **SAMSON, S.,** NACU, V., BURLACU, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells for regenerative medicine. *The 3rd International Conference Health Technology Management*. Chișinău, 2016, pp. 109-110.
121. **SAMSON, S.,** NACU, V. Bone non union treatment by autologous cells grafts. In: *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*. Davos, Switzerland, 2017, p. 734.
122. **SAMSON, S.,** NACU, V., BURLACU, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells. *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. Chișinău, 2013, p.110. ISSN 0041-6940.
123. **SAMSON S. ș.a.** *Dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras*. MD 559 (13)Y, A61C19/00 (2006.01); Cererea depusă 2012.11.30, BOPI, nr. 11/2012.
124. SHI, S., BARTOLD, PM., MIURA, M. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005, v. 8 (3), pp. 191-199.
125. SHINYA YAMANAKA. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges, *Cell Stem Cell*, 2020, pp. 523-531.
126. SLOAN, AJ., WADDINGTON, RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*, 2009, v. 19 (1), pp. 61-70.
127. SUCHÁNEK, J., VISEK, B., SOUKUP, T. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2010, v. 53 (2), pp. 93-99.

128. SUCHANEK, J., SOUKUP, T., VISEK, B. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*, 2009, v. 153 (1), pp. 31-35.
129. STANGENBERG L. *et al.* Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on realtime reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng.*, 2005, v. 11, pp. 855-864.
130. SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441(7097), 2006, pp. 1075-1079.
131. SONG, J. S. *et al.* Differentiation and regenerative capacities of human odontoma-derived mesenchymal cells. *Differentiation* 77(1), 2009, pp. 29-37.
132. SONOYAMA, W. *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34(2), 2008, pp. 166-171.
133. SHAHDADFAR , A. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 2005, vol. 23, pp. 1357-1366.
134. TANDON, S., SAHA, R., RAJENDRAN, R., NAYAK, R. Dental pulp stem cells from primary and permanent teeth: quality analysis. *J Clin Pediatr Dent*, 2010, v. 35, pp. 53-58.
135. ȚÎMBALARI, T., LOZAN, O., NACU, V. Istoricul dezvoltării transplantului de țesuturi și celule: articol de sinteză. *MJHS*, 2017, pp. 108-122.
136. TIMBALARI, T., CODREANU, I., LOZAN, O., NACU, V. Assessment of human tissue transplantation activities in the Republic of Moldova. IFMBE Proceedings. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. 2019, pp. 621-626.
137. TRUSLER, O., HUANG, Z., GOODWIN, J. Cell surface markers for the identification and study of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*, 2018, pp. 36-43.
138. UEDA, M., TOHNAI, I., NAKAI, H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artif. Organs*. 2001, vol. 25, nr 3. pp. 164-171.
139. VAZIN T., FREED W.J. Human embryonic stem cells: derivation, culture and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 2010;28(4):589-603. doi: 10.3233/RNN-2010-0543.PMID: 20714081.
140. VATER, C. *et al.* Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7(2), 2011, pp. 463-477.
141. VIȘNEVSCHI, S., MALCOVA, T., CALISTRU, A., NACU, V. Stem-cell therapies in critical limb ischemia. *The Moldovan Medical Journal*, 2021, pp. 63-67.
142. WADDINGTON, RJ., YOUDE, SJ., LEE, CP., SLOAN, AJ. Isolation of distinct

progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs*, 2009, v. 189(1-4), pp. 268-274.

143. WAGEY, R., SHORT, B. Isolation, enumeration, and expansion of human mesenchymal stem cells in culture. *Methods Mol Biol.*, 2013, pp. 315-334.

144. WOODS, EJ., PERRY, BC., HOCKEMA, JJ. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 2009, v. 59 (2), pp. 150-157.

145. WAGERS, A. J., WEISSMAN, I. L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116(5), pp. 639-648.

146. YANG, X., YANG, F., WALBOOMERS, XF. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010, V. 93 (1), pp. 247-257.

147. YASUI, T., MABUCHI, Y., MORIKAWA, S. *et al.* Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. *Inflamm Regener.*, 2017, pp. 38-50.

148. YU, J., HE, H., TANG, C., ZHANG, G. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol.* 2010, v. 11, p. 32.

149. YU, V., DAMEK-POPRAWA, M., NICOLL, SB., AKINTOYE, S. Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, v. 386 (4), pp. 661-665.

150. ZHANG, ZY., TEOH, SH., HUI, JH. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials*, 2012, v. 33 (9), pp. 2656-2672.

151. ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, 2001. 7 (2), pp. 211-228.

152. Zuk, P. A. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*, 2013, p.35.

153. Web Site Directory, România, 2022. <https://sfaturimedical.ro/celule-stem/> (accesat în data de: 1 decembrie 2022).

ANEXE

Anexa 1. Act de implementare a rezultatelor obținute brevet de invenție nr. 559

	Instituție Publică USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate
---	---

APROB
Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al ASM,
prof. univ., dr. hab. st. med.
 Stanislav GROPPA
2022

ACTUL nr. 10
DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI
(în procesul științifico-practic)

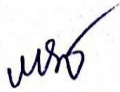
- Denumirea ofertei pentru implementare: DISPOZITIV PENTRU FRAGMENTAREA DINTELUI EXTRAS.**
- Autori:** NACU Viorel, SAMSON Stella, BURLACU Valeriu, ZOTA Eremia, PĂLĂRIE Victor.
- Numărul invenției:** Nr. 559 din 30 iunie 2013.
- Unde și când a fost implementată:** Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2012-2021.
- Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea dispozitivului care nu duce la supraîncălzirea dintelui extras, este mai simplu în utilizare, mai ieftin în producere și permite extragerea integră a pulpei dentare.
- Rezultatele:** Rezultatul consta în plasarea exactă a dintelui pe măsura reglabilă, fixării lui și acționării asupra lui cu o forță de compresie, ceea ce ne permite să obținem pulpa dentară si coronară integră. Propunerea este utilizată în practica experimentală în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare.

Prezenta invenție este implementată conform descrierii în cerere.

Sef Laborator de inginerie tisulară
și culturi celulare
dr. hab. st. med., prof. univ.

Șef Departament Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Coordonat:  E. Groza

 Viorel NACU

 Elena RAEVSCHI

1

Anexa 2. Brevet de invenție



Anexa 3. Diplome și distincții



VIII

МЕЖДУНАРОДНЫЙ САЛОН
ИЗОБРЕТЕНИЙ И НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
«НОВОЕ ВРЕМЯ»

«Устойчивое развитие во время перемен»



ДИПЛОМ
ПОЧТЕНИЯ
НАГРАЖДАЕТСЯ

V. Nacu, S. Samson,
V. Burlacu, E. Zota, V. Palarie
(Chisinau, Moldova)

for
DEVICE FOR FRAGMENTATION
OF THE EXTRACTED TOOTH

Президент
Международного жюри

профессор Пьер Фюмьер
(Бельгия)

Почетный
Президент Салона

профессор А. Онипко
(Украина)

Председатель
Наградной комиссии

профессор В.П. Гоч
(Украина)

г. Севастополь



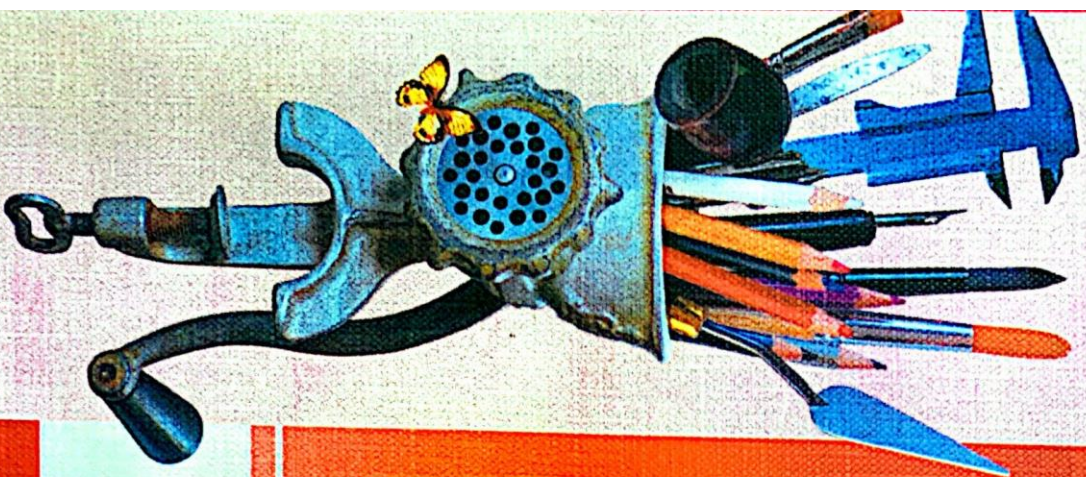
UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA
EXPO TRANSILVANIA CLUJ-NAPOCA
sub egida: MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE ȘI
ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMANIA, FILIALA CLUJ

SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENȚICĂ PRO INVENT editia a XI-a, 2013, Cluj-Napoca

DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ și Medalia de Aur

Se acordă UNIVERSITĂȚII DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"NICOLAE TESTEMITANU" REPUBLICA MOLDOVA, Nacu Viorela,
Samson Stella; Burlacu Valeriu; Zota Eremia
pentru DISPOZITIV PENTRU FRAGMENTAREA DINTILOR EXTRAS



PRESEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. AUREL VLAICU
Rector al
Universitatii Tehnice din Cluj-Napoca



PRESEDINTELE JURULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU



Scanned with CamScanner

DIPLOMA

DEVICE FOR FRAGMENTATION OF THE EXTRACTED TOOTH

NACU VIOREL, SAMSON STELLA, BURLACU VALERIU, ZOTA EREMIA

SILVER MEDAL

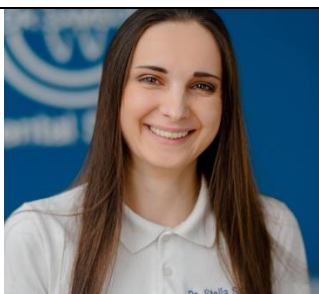
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Samson Stella , declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

6.10.2022

Samson Stella

CURICULUM VITAE

	
Prenume/nume:	Stella Samson
Adresa:	Republica Moldova, Chișinău, strada Braila, 21
Telefon :	+37369321793
E-mail:	stelutzas@gmail.com
Sex:	F
Data nașterii:	18 mai 1987
Naționalitate:	Republica Moldova
Experiență de muncă:	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare
Educație:	1994-2004 – Liceul Național „Mihai Viteazul”, or. Chișinău 2004-2009 – Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova 2009-2012 – Rezidențiat clinic în Stomatologie generală, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova 2012-2016 – Școala doctorală, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, specialitatea Anatomia omului 311.01
Domeniile de interes științific:	Medicina regenerativă, biomedicina, ingineria tisulară
Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:	1. 11.817.09.23A, „Eficacitatea celulelor stem în procesul de restabilire a țesutului hepatic”, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, 2011-2014, cercetător științific. 2. 14.519.04.05A, „Diferențierea celulelor stem dentare pentru ingineria tisulară”, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, 2015-2016, cercetător științific. 3. 15.817.04.04 F, „Ingineria tisulară în crearea și restabilirea țesutului hepatic”, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, 2015-2018, cercetător științific. 4. 20.80009.5007.20, „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară”, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, 2020-2023, cercetător științific.

Participări la foruri științifice naționale și internaționale:	1. Conferințele științifice anuale ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” 2012, 2015 2. Conferința Internațională de Nanotehnologie și Inginerie Biomedicală, 2013, 2021 3. Congresul Internațional al Studenților și Tinerilor Medici „MedEspera”, ediția a IV-a, 2012 4. Sesiunea a XIX-a a zilelor medicale balcanice, Republica Moldova, 2013 5. Conferința Internațională de Management al Tehnologiei Sănătății, ediția a 3-a, Chișinău 2016 6. Reuniunea europeană a Societății Internaționale pentru Inginerie a Țesuturilor și Medicină Regenerativă, TERMIS, Davos, Elveția, 2017 7. Salonul internațional de invenție PRO INVENT, ediția a XI-a, 2013, Cluj-Napoca (Diplomă de excelență și Medalia de aur) 8. Expoziția Europeană a Creativității și Inovării EURO INVENT, 2013, Iași (Diplomă de excelență și Medalia de argint) 9. Международный салон изобретений и новых технологий „Новое Время” VIII, г. Севастополь (Диплом почтения)
Publicații:	1. Samson, S., Nacu, V. The dental pulp chamber evaluation by using cone-beam computed tomography. <i>Moldovan Medical Journal</i>, 2021 2. Samson, S., Burlacu, V., Zota, E., Nacu, V. Stem cells in the future of dental care. <i>Curierul Medical</i>. 2011, nr. 3(321) 3. Samson, S. ș.a. Dintele ca sursa de celule stem. <i>Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”</i>. Chișinău, 2012, ediția a XIII-a, vol. 4 1.1.1. 4. Samson, S. ș.a. Dental pulp stem cell for regenerative medicine. <i>2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ICNBME-2013)</i>. 18-20 April 2013. Chișinău, 2013, pp. 443-446. 1.1.2. 5. Samson, S. Techniques of dental pulp decellularization, In: <i>The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering</i>. Chișinău, 2021, pp. 480-483. 1.1.3. 6. Samson, S. Stem cells in dental care. <i>The 4th international Medical Congress for Students and young doctors MedEspera</i>. Chișinău, 2012, pp. 223-224. 1.1.4. 7. Samson, S., Nacu, V., Burlacu, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells for regenerative medicine. <i>The 3rd International Conference Health Technology Management</i>. Chișinău, 2016, pp. 109-110.

	8. Samson, S., Nacu, V. ș.a. Bone non union treatment by autologus cells grafts. <i>European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society</i>. Davos, Switzerland, 2017, p. 734. 9. Samson, S., Nacu, V., Burlacu, V. Dental soft tissues – as a source of stem cells. În: <i>Materialele Sesiunii a XIX-a a Zilelor uniunii medicale balcanice și al II-lea Congres în medicina de urgență din Republica Moldova</i>. 22-24 septembrie 2013. Chisinau, 2013, p.110. 10. Samson S. ș.a. <i>Dispozitiv pentru fragmentarea dintelui extras</i>. MD 559 (13)Y, A61C 19/00 (2006.01); Cererea depusă 2012.11.30, BOPI, nr. 11/2012. 11. Brevetul de invenție a fost implementat în procesul științifico-practic în Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare. Act de implementare nr. 10 din 11aprilie 2022. (Total: 9 publicații; 2 lucrări fără coautori; 5 articole în reviste naționale; 4 articole în reviste internaționale; 1 brevet de invenție)																				
Limba maternă:	româna																				
Limbi străine cunoscute:	rusa, engleza. <table><tr><th colspan="2">Înțelegere</th><th colspan="2">Vorbire</th><th>Scriere</th></tr><tr><th>Ascultare</th><th>Citire</th><th>Participare la conversație</th><th>Discurs oral</th><th>Exprimare scrisă</th></tr><tr><td>☐ Rusă</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td></tr><tr><td>☐ Engleză</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td><td>☐ DA</td></tr></table>	Înțelegere		Vorbire		Scriere	Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă	☐ Rusă	☐ DA	☐ DA	☐ DA	☐ DA	☐ Engleză	☐ DA	☐ DA	☐ DA	☐ DA
Înțelegere		Vorbire		Scriere																	
Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă																	
☐ Rusă	☐ DA	☐ DA	☐ DA	☐ DA																	
☐ Engleză	☐ DA	☐ DA	☐ DA	☐ DA																	
Permis de conducere:	categoria B																				