
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Capacitatea osteogenică a celulelor stem derivate din structuri dentare

Doctorand: **Bianca-Nausica Petrescu**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu-Septimiu Câmpian**

Cluj-Napoca, 2021



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Celule stem mezenchimale prezente în țesuturi dentare și potențialul lor osteogenic	17
1.1. Noțiuni teoretice privind celulele stem	17
1.2. Celule stem mezechimale adulte	18
1.2.1. Tipuri de celule stem mezenchimale prezente în cavitatea orală	19
1.2.1.1. Celule stem izolate din sacul folicular (DFSC)	19
1.2.1.2. Celule stem izolate din pulpa dentară (DPSC)	20
1.2.1.3. Celule stem izolate din papila apicală (APSC)	20
2. Arhitectura țesutului osos	21
2.1. Structura macroscopică a țesutului osos	21
2.2. Structura microscopică a țesutului osos	22
2.2.1. Osteoblaste	23
2.2.2. Osteocite	24
2.2.3. Osteoclaste	25
2.3. Structura moleculară a țesutului osos	25
2.3.1. Substanța organică	25
2.3.2. Substanța anorganică	26
2.4. Mecanisme fiziologice care au loc la nivelul țesutului osos	26
3. Regenerarea osoasă	27
3.1. Introducere în ingineria tisulară	27
3.2. Regenerarea osoasă ghidată	27
3.3. Celulele stem în regenerarea osoasă	27
4. Regenerarea osoasă a celulelor stem sub influența diverselor substanțe	29
4.1. Canabidiolul	29
4.1.1. Canabidiol – structură și funcții	29
4.1.2. Canabidiolul în regenerarea osoasă	31
4.2. Vitamina D	31
4.2.1. Vitamina D – structură și funcții	31
4.2.2. Influența Vitaminei D asupra regenerării osoase	33
4.3. Alți factori care pot influența regenerarea osoasă	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39

2. Studiul 1 – Izolarea și caracterizarea celulelor stem recoltate din țesuturi dentare și diferențierea spre linia osoasă	41
2.1. Introducere	41
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	42
2.3. Material și metodă	43
2.4. Rezultate	53
2.5. Discuții	62
2.6. Concluzii	63
3. Studiul 2 – Inițierea diferențierii osoase a celulelor stem izolate din țesuturile dentare, sub influența unor diferiți factori de mediu	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	65
3.3. Material și metodă	66
3.4. Rezultate	68
3.5. Discuții	74
3.6. Concluzii	75
4. Studiul 3 – Evaluarea capacității Cannabidiolului și a vitaminei D3 de stimulare a regenerării osoase	77
4.1. Introducere	77
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	79
4.3. Material și metodă	79
4.4. Rezultate	81
4.5. Discuții	88
4.6. Concluzii	90
5. Concluzii generale	91
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	93
REFERINȚE	95

Cuvinte cheie: celule stem mezenchimale, inginerie tisulară, regenerare osoasă, Cannabidiol, Vitamina D3, pulpă dentară, papilă apicală, folicul dentar, dexametazonă, mediu osteogenic, osteoblaste.

INTRODUCERE

În prezent, regenerarea osoasă reprezintă o mare provocare pentru medicii stomatologi practicanți și chirurghi, acest proces putând fi efectuat prin numeroase metode și tehnici, dar fără a fi în totalitate predictibile sau controlabile.

Celulele stem au un potențial regenerativ impresionant, acestea având o capacitate mare de proliferare și diferențiere spre mai multe linii celulare. Celulele stem mezenchimale adulte, izolate din țesuturi dentare, adițional caracteristicilor anterior menționate, prezintă un avantaj care se datorează ușurinței cu care acestea pot fi recoltate. Recoltarea celulelor stem mezenchimale din structuri dentare se realizează din țesuturile dinților complet incluși, care nu pot fi redresați ortodontic spre a erupe și a-și exercita rolul pe arcada dentară. Aceste unități dentare nu pot fi utilizate cu niciun alt scop, iar în situațiile în care nu sunt păstrate pentru recoltarea de celule stem, acesta sunt aruncate și potențialul celulelor se pierde.

Există numeroase tehnici de regenerare osoasă, utilizate în chirurgia dento-alveolară și maxilo-facială, dar toate aceste strategii de obținere de țesut osos prezintă limitări, motiv pentru care sunt necesare studii suplimentare, pentru descoperirea unor strategii inovative care să prezinte mai multe avantaje și cât mai puține limitări.

Celulele stem utilizate în teza de față au fost recoltate din trei tipuri de țesuturi dentare: folicul dentar, papilă apicală și pulpă dentară. După izolarea celulelor, cu ajutorul testelor de laborator, s-a demonstrat potențialul regenerativ al acestora și au fost caracterizate fenotipic prin flowcitometrie, real-time PCR și marcarea imunocitochimică, după care s-a indus diferențierea celulelor către mai multe linii celulare, pentru a li se demonstra pluripotența și implicit, capacitatea de stemness.

În continuare s-au realizat două studii care demonstrează în ce măsură mediile de cultură cu compoziție diferită, conținând diverși potențiatori ai diferențierii, influențează capacitatea de diferențiere a celor trei tipuri de celule utilizate.

Ultimele două studii s-au realizat comparând în paralel cele trei tipuri de celule și, de asemenea, confruntându-se rezultatele obținute, pentru a se evalua care dintre medii este cel mai eficient și oferă cele mai bune rezultate.

Studiile din prezenta teză de doctorat oferă o perspectivă inovativă asupra îmbunătățirii regenerării osoase, care va putea fi continuată prin studii viitoare, ceastă abordare fiind un instrument util clinicienilor.

Studiul 1 – Izolarea și caracterizarea celulelor stem recoltate din țesuturi dentare

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost izolarea celulelor stem din pulpa dentară, sacul folicular și papila apicală ale unui singur subiect uman și dovedirea caracteristicilor de stemness ale acestora.

Material și metodă

În vederea realizării studiului, celulele au fost izolate din cele trei tipuri de țesut, recoltat de la 4 molari de minte aparținând aceluiași subiect uman. Testele utilizate pentru dovedirea caracterului de stemness al celulelor au fost: caracterizarea fenotipică, prin utilizarea citometriei de flux și a analizei genetice și diferențierea fiecărui tip de celule către alte trei linii celulare: osoase, condrogenice și adipogenice..

Rezultate

Celulele izolate din țesuturile dentare au prezentat caracteristicile celulelor stem mezenchimale, dar au fost prezentate profiluri diferite pentru fiecare linie celulară. Cel mai tipic profil a fost găsit la celulele stem recoltate din pulpa dentară, 90-100% dintre celule fiind pozitive pentru CD29, CD49e, CD73, CD90, CD105 și au exprimat genele de reglare cheie în menținerea pluripotenței și auto-reînnoirea Oct3 / 4 și Nanog și gena mezenchimală caracteristică, vimentina.

Cellulele izolate din foliculul dentar au avut un nivel mai scăzut de expresie pozitivă pentru CD29, dar o intensitate ridicată pentru CD49e, CD73, CD90, CD105, CD166, iar profilul genetic a arătat o expresie ridicată pentru gena Oct3 / 4. DFSC diferențiat în celule osoase cu cel mai bun nivel de mineralizare, condroblaste și adipocite.

Celulele izolate din papila apicală au prezentat o populație celulară mai heterogenă, deoarece citometria de flux a dezvăluit o pozitivitate scăzută pentru CD29 și CD105 și 18-30% din celule au fost pozitive pentru CD73, CD90, CD105 și CD166.

Celulele recoltate din pulpa dentară și din sacul folicular au prezentat o capacitate superioară de diferențiere osteogenică și condrogenică și adipogenică decât celulele recoltate din papila apicală.

Concluzii

Prin studiul efectuat s-a demonstrat faptul ca cele 3 linii celulare izolate prezintă caracteristicile necesare pentru a fi considerate celule stem mezenchimale adulte și pot fi folosite pentru experimente viitoare mai complexe.

Studiul 2 – Inițierea diferențierii osoase a celulelor stem izolate din țesuturile dentare, sub influența unor diferiți factori de mediu

Obiective

Acest studiu a pornit de la premisa că deși există numeroase studii științifice, publicate în literatură, legate de procesul de diferențiere a celulelor stem in vitro, un studiu comparativ al acestor protocoale, dar și a răspunsului celular la acest proces de inducție osteogenică poate aduce în discuție aspecte noi. Efectul factorilor de creștere (BMP-2) sau al cortizonului, dar și comportamentul fiecărei linii celulare, în funcție de țesutul de origine, va fi studiat în acesta secțiune.

Material și metodă

S-a efectuat diferențierea celulelor stem luate în studiu sub influența a trei medii: mediu de diferențiere osteogenic simplu, mediu de diferențiere osteogenic complex și

mediu de diferențiere osteogenic simplu fără dexametazonă, după care s-au comparat rezultatele.

Rezultate

Prezența dexametazonei este esențială în diferențierea osoasă a celulelor izolate din foliculul dentar. Pentru celelalte linii celulare **din papila apicală și pulpă dentară**, absența dexametazonei nu a împiedicat procesul de osteogeneză, doar l-a încetinit.

Prezența BMP2 în mediul de diferențiere complex nu a accelerat sau augmentat procesul de diferențiere, comparativ cu mediul osteogenic simplu. Doar celulele derivate din papila apicală au prezentat un proces de mineralizare mai intens.

Concluzii

Mediul osteogenic simplu ce conține dexametazonă, acid ascorbic și β -glicerofosfat este cel mai bun inductor al diferențierii osoase pentru toate cele trei linii celulare folosite.

Studiul 3 - Evaluarea capacității Cannabidiolului și a vitaminei D3 de stimulare a regenerării osoase

Obiective

Acest studiu propune o nouă metodă a utilizării Cannabidiolului și vitaminei D3 pentru o diferențiere osteogenică mai bună și mai rapidă a celulelor stem derivate din țesuturi dentare.

Material și metodă

Celulele stem luate în studiu au fost tratate cu diferite medii osteoinductive, conținând Cannabidiol și vitamina D3. Tratamentele au fost efectuate la diferite doze din cele două substanțe și viabilitatea a fost evaluată cu ajutorul testului Alamar Blue, după 24, 96 ore și 8 zile în mediu standard de cultură pentru celule stem, iar testul Alizarin Red a fost folosit pentru determinarea gradului de mineralizare.

După 10 zile de inducere a diferențierii, celulele au fost supuse evaluării prin RT-PCR a genelor implicate în diferențierea osteogenică.

Rezultate

Celulele stem din pulpa dentară au arătat o creștere lentă a valorilor fluorescenței pentru tratamentele cu Vitamina D3.

Mediul osteogenic complex a indus cea mai bună mineralizare pentru celulele stem din papila apicală, singur sau în combinație cu Vitamina D3.

Celulele stem din papila apicală au răspuns cel mai bine la tratamentul Cannabidiol cu niveluri ridicate de ARN pentru osteopontin, osteonectină și osteocalcină.

Concluzii

Celulele stem din cele trei tipuri de țesuturi răspund diferit la aceiași stimuli osteogeni. Celulele stem din pulpa dentară s-au dovedit a avea cel mai bun potențial osteogenic atunci când sunt tratate cu Vitamina D3.

Cea mai mică doză de Cannabidiol a indus cea mai bună expresie a proteinelor osoase pentru celulele stem din papila apicală.

Concluzii generale

1. Studiul de față demonstrează că cele trei linii celulare izolate din structuri dentare: folicul dentar, țesut pulpar, papilă apicală, îndeplinesc criteriile necesare pentru a putea fi încadrate în categoria de celule stem mezenchimale adulte.
2. Celulele stem incluse în acest studiu prezintă un potențial foarte mare în ingineria tisulară, datorită capacității mari de proliferare și diferențiere, izolării facile și capacității de a-și păstra proprietățile (expresia genică și fenotipică a markerilor de stemness) atunci când sunt stocate pe perioade mari de timp.
3. Utilizarea acestor celule pentru regenerarea osoasă reprezintă o perspectivă promițătoare de viitor deoarece acestea se pot diferenția chiar și spontan spre linia osoasă, dar fără ca procesul de diferențiere să fie previzibil sau controlat.
4. Cele trei tipuri de celule folosite în studiu au demonstrat caracteristici diferite, în ceea ce privește capacitatea de diferențiere și potențialul imunogenic. Cunoașterea precisă a acestor caracteristici va ajuta la obținerea unei predictibilități și la controlarea procesului de regenerare tisulară.
5. Mediul osteogenic simplu este cel mai eficient în vederea diferențierii osoase a celor trei linii celulare folosite.
6. Celulele stem din pulpa dentară au avut cel mai mare potențial osteogenic sub influența vitaminei D3.
7. Cea mai mică doză de Cannabidiol a produs cea mai bună expresie a proteinelor osoase pentru celulele stem recoltate din papila apicală.
8. Celulele stem recoltate din foliculul dentar au avut cea mai mare capacitate de mineralizare la tratamentele cu Cannabidiol și vitamina D3.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de față prezintă potențialul osteogenic al celulelor stem izolate din folicul dentar, papilă apicală și țesut pulpar, sub influența mai multor medii de cultură.

Studiile efectuate sunt de mare actualitate, fapt demonstrat prin publicarea rezultatelor cercetării în reviste internaționale de specialitate.

Astfel, primul studiu demonstrează că celulele stem din țesut pulpar, papilă apicală și folicul dentar pot fi izolate și cultivate cu ușurință. Aceste celule au fost caracterizate, supuse unor teste specifice, în paralel, pentru a li se dovedi capacitatea de stemness.

Studiile efectuate demonstrează că dexametazona are un efect benefic de potențiator al diferențierii osteogenice, în timp ce BMP2 s-a dovedit a avea un efect limitat.

Vitamina D3 s-a dovedit a fi un stimulent mai potent al diferențierii celulelor stem mezenchimale către linia osoasă, în comparație cu Cannabidiol.

Nu au fost găsite în literatură studii care să evalueze capacitatea tipurilor de celule stem mezenchimale, folosite în aceste studii, de a se diferenția către linia osoasă sub influența Cannabidiol individual, sau în comparație cu vitamina D3.

Rezultatele obținute în aceste studii oferă noi perspective asupra regenerării osoase cu celule stem mezenchimale recoltate din structuri dentare, care ar putea revoluționa ingineria tisulară, prin potențialul lor deosebit de promițător.

SUMMARY OF THE PHD THESIS

Osteogenic capacity of stem cells derived from dental structures

Ph.D. Student: **Bianca-Nausica Petrescu**

Ph.D. Coordinator: **Prof. Dr. Radu-Septimiu Câmpian**

Cluj-Napoca, 2021



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Mesenchymal stem cells present in dental tissues and their osteogenic potential	17
1.1. Theoretical notions regarding stem cells	17
1.2. Adult mesenchymal stem cells	18
1.2.1. Types of mesenchymal stem cells present in the oral cavity	19
1.2.1.1. Stem cells isolated from the dental follicle(DFSC)	19
1.2.1.2. Stem cells isolated from dental pulp (DPSC)	20
1.2.1.3. Stem cells isolated from the apical papilla (APSC)	20
2. Bone tissue architecture	21
2.1. Structura macroscopică a țesutului osos	21
2.2. Microscopic structure of bone tissue	22
2.2.1. Osteoblasts	23
2.2.2. Osteocytes	24
2.2.3. Osteoclasts	25
2.3. Molecular structure of bone tissue	25
2.3.1. Organic matter	25
2.3.2. Inorganic substance	26
2.4. Physiological mechanisms that occur in the bone tissue	26
3. Bone regeneration	27
3.1. Introduction to tissue engineering	27
3.2. Guided bone regeneration	27
3.3. Stem cells in bone regeneration	27
4. Bone regeneration of stem cells under the influence of various substances	29
4.1. Cannabidiol	29
4.1.1. Cannabidiol - structure and functions	31
4.1.2. Cannabidiol in bone regeneration	31
4.2. Vitamin D	31
4.2.1. Vitamin D - structure and functions	31
4.2.2. The influence of Vitamin D on bone regeneration	33
4.3. Other factors that can influence bone regeneration	33
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Aim/obiective	39
2. Study 1 - Isolation and characterization of stem cells harvested from dental tissues and differentiation to the bone line	41

2.1. Introduction	41
2.2. Aims	42
2.3. Material and method	43
2.4. Results	53
2.5. Discussions	62
2.6. Conclusions	63
3. Study 2 - Initiation of bone differentiation of stem cells isolated from dental tissues, under the influence of various environmental factors	65
3.1. Introduction	65
3.2. Aims	65
3.3. Material and method	66
3.4. Results	68
3.5. Discussions	74
3.6. Conclusions	75
4. Study 3 - Assessment of the ability of Cannabidiol and vitamin D3 to stimulate bone regeneration	77
4.1. Introduction	77
4.2. Aims	79
4.3. Material and method	79
4.4. Results	81
4.5. Discussions	88
4.6. Conclusions	90
5. General conclusions	91
6. Originality and innovative contributions of the thesis	93
REFERENCES	95

Keywords: mesenchymal stem cells, tissue engineering, bone regeneration, Cannabidiol, Vitamin D3, dental pulp, apical papilla, dental follicle, dexamethasone, osteogenic environment, osteoblasts.

INTRODUCTION

Currently, bone regeneration is a major challenge for dental practitioners and surgeons, this process can be performed by many methods and techniques, but without being entirely predictable or controllable.

Stem cells have an impressive regenerative potential, they have a high capacity of proliferation and differentiation to several cell lines. Adult mesenchymal stem cells (MSCs), isolated from dental tissues, in addition to the aforementioned characteristics, they have the advantage of being very easy to harvest. The harvesting of mesenchymal stem cells from dental structures is done from fully enclosed tooth tissues, which cannot be orthodontically straightened to erupt and they cannot play a role in the dental arch. These dental units cannot be used for any other purpose, and in situations where they are not used for stem cell harvesting, they are discarded and the potential of the cells is lost.

There are many bone regeneration techniques used in dento-alveolar and maxillofacial surgery, but all these strategies for obtaining bone tissue have limitations, which is why further studies are needed to discover innovative strategies that have several advantages and as few limitations as possible.

The stem cells used in the present thesis were harvested from three types of dental tissues: dental follicle, apical papilla and dental pulp. After isolating the cells, laboratory tests demonstrated their regenerative potential and were phenotypically characterized by flow cytometry, real-time PCR and immunocytochemical labeling, after which the cells were differentiated into several cell lines to demonstrate their pluripotency, indicating their stemness characteristics.

The following two studies demonstrate the extent to which culture media with different compositions, containing various enhancers of differentiation, influence the ability to differentiate the three types of cells.

The last two studies were performed by comparing the three cell types results and also comparing the results obtained with the different culture media, in order to evaluate which of the environments is the most efficient and and which cell line provides the best results.

The studies in this Ph.D. thesis offer an innovative perspective on improving bone regeneration, which can be continued by future studies, this approach being a useful tool for clinicians.

Study 1 - Isolation and characterization of stem cells harvested from dental tissues

Objective

The aim of this study was to isolate stem cells from the dental pulp, dental follicle and apical papilla of a single human subject and to prove their stemness characteristics.

Material and method

In order to conduct the study, the cells were isolated from the three types of tissue, harvested from 4 impacted third molars belonging to the same human subject. The tests used to prove the stemness character of the cells were: phenotypic characterization, using flow cytometry and genetic analysis and differentiation of each cell type to three other cell lines: osteogenic, chondrogenic and adipogenic.

Results

The cells isolated from the dental tissues showed the characteristics of mesenchymal stem cells, but different profiles were presented for each cell line. The most typical profile was found in the stem cells harvested from dental pulp, 90-100% of the cells being positive for CD29, CD49e, CD73, CD90, CD105 and expressed key regulatory genes in maintaining pluripotency and self-renewal Oct3 / 4 and Nanog and the characteristic mesenchymal gene, vimentin.

The cells isolated from the dental follicle had a lower level of positive expression for CD29, but a high expression for CD49e, CD73, CD90, CD105, CD166. Their genetic profile showed a high expression for the Oct3 / 4 gene. Dental follicle stem cells differentiated in osteoblasts with the best level of mineralization, chondroblasts and adipocytes.

Cells isolated from the apical papilla showed a more heterogeneous cell population, as flow cytometry revealed low positivity for CD29 and CD105 and 18-30% of the cells were positive for CD73, CD90, CD105 and CD166.

Cells harvested from the dental pulp and also from the dental follicle showed a higher capacity of osteogenic and chondrogenic and adipogenic differentiation than the cells harvested from the apical papilla.

Conclusions

The study showed that the 3 isolated cell lines have the necessary characteristics to be considered adult mesenchymal stem cells and can be used for more complex future experiments.

Study 2 - Initiation of bone differentiation of stem cells isolated from dental tissues, under the influence of various environmental factors

Objective

Although there are numerous scientific studies, published in the literature, related to the process of stem cell differentiation in vitro, a comparative study of these protocols and the cellular response to this process of osteogenic induction can lead to discuss new issues. The effect of growth factors (BMP-2) or cortisone, but also the behavior of each cell line, depending on the tissue of origin, will be studied in this section.

Material and method

The stem cells were differentiated under the influence of three type of medium: simple osteogenic differentiation medium, complex osteogenic differentiation medium and simple osteogenic differentiation medium without dexamethasone, after which the results were compared.

Results

The presence of dexamethasone is essential in the bone differentiation of cells isolated from the dental follicle. For the other cell lines, harvested from dental pulp and apical papilla, the absence of dexamethasone did not prevent the process of osteogenesis but only slowed it down.

The presence of BMP2 in the complex differentiation medium did not accelerate or increase the differentiation process compared to the simple osteogenic medium. Only cells derived from the apical papilla showed a more intense mineralization process.

Conclusions

The simple osteogenic medium containing dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate is the best inducer of bone differentiation for all three cell lines used.

Study 3 - Assessment of the ability of Cannabidiol and vitamin D3 to stimulate bone regeneration

Objective

This study proposes a new method of using Cannabidiol and vitamin D3 for a better and faster osteogenic differentiation of stem cells derived from dental tissues.

Material and method

The stem cells studied were treated with various osteoinductive media, containing Cannabidiol and vitamin D3. Treatments were performed with different doses of the two substances and viability was assessed using the Alamar Blue test after 24, 96 hours and 8 days in standard culture medium for stem cells, and the Alizarin Red test was used to determine the degree of mineralization.

After 10 days of induction of differentiation, cells were subjected to RT-PCR evaluation of genes involved in osteogenic differentiation.

Results

Stem cells in the dental pulp showed a slow increase in fluorescence values for Vitamin D3 treatments.

The complex osteogenic environment induced the best mineralization for apical papilla stem cells, alone or in combination with Vitamin D3.

Apical papilla stem cells responded best to the treatment of Cannabidiol with high levels of RNA for osteopontin, osteonectin and osteocalcin.

Conclusions

Stem cells from the three types of tissue respond differently to the same osteogenic stimuli. Stem cells from the dental pulp have been shown to have the best osteogenic potential when treated with Vitamin D3.

The lowest dose of Cannabidiol induced the best bone protein expression for apical papilla stem cells.

General conclusions

1. The present study demonstrates that the three stem cell lines isolated from dental structures: dental follicle, pulp tissue, apical papilla, meet the necessary criteria to be classified as adult mesenchymal stem cells.
2. The stem cells included in these studies have a great potential in tissue engineering, due to their high capacity for proliferation and differentiation, easy isolation and ability to retain their properties (gene and phenotypic expression of stemness markers) when stored for long periods of time.
3. The use of these cells for bone regeneration is a promising prospect for the future because they can differentiate even spontaneously towards the bone line, but without the process of differentiation being predictable and controlled.
4. The three cell types used in the study have demonstrated different characteristics in terms of differentiation capacity and immunogenic potential. Accurate knowledge of these characteristics will help to achieve predictability and control the process of tissue regeneration.
5. Simple osteogenic medium is the most effective osteogenic differentiation for the three types of cells used.
6. Dental pulp stem cells had the highest osteogenic potential under the influence of vitamin D3.
7. The lowest dose of Cannabidiol caused the best bone protein expression for the stem cells from the apical papilla.
8. Dental follicle stem cells had the highest mineralization capacity when treated with Cannabidiol and vitamin D3.

Originality and innovative contributions of the thesis

The present thesis presents the osteogenic potential of stem cells isolated from dental follicle, apical papilla and dental pulp, under the influence of several culture media.

The studies carried out are very topical, as demonstrated by the publication of research results in international journals.

Thus, the first study demonstrates that stem cells from dental pulp, apical papilla and dental follicle can be easily isolated and cultured. These cells were characterized, using specific tests in parallel, to prove their stemness capacity.

Studies show that dexamethasone has a beneficial effect of enhancing osteogenic differentiation, while BMP2 has been shown to have a limited effect.

Vitamin D3 has been shown to be a more potent stimulant of mesenchymal stem cell differentiation to the bone line compared to Cannabidiol.

No studies have been found in the literature to assess the ability of mesenchymal stem cell types, used in these studies, to differentiate into osteogenic cells under the influence of individual Cannabidiol, or compared to vitamin D3.

The results obtained in these studies offer new perspectives on bone regeneration with mesenchymal stem cells harvested from dental structures, which could revolutionize tissue engineering, through their particularly promising potential.