

DISERTASI

**PERBEDAAN MEKANISME DAN EFEKTIFITAS PENYEMBUHAN
CRITICAL SIZE DEFECT MANDIBULA ANTARA BOVINE BONE
MINERAL – HUMAN AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELL
DAN AUTOGENOUS BONE GRAFT**

Penelitian Eksperimental Laboratoris



DAVID B. KAMADJAJA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2015

i

DISERTASI

**PERBEDAAN MEKANISME DAN EFEKTIFITAS PENYEMBUHAN
CRITICAL SIZE DEFECT MANDIBULA ANTARA BOVINE BONE
MINERAL – HUMAN AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELL
DAN AUTOGENOUS BONE GRAFT**

Penelitian Eksperimental Laboratoris



DAVID B. KAMADJAJA

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2015

ii

DISERTASI

PERBEDAAN MEKANISME DAN EFEKTIFITAS PENYEMBUHAN CRITICAL SIZE DEFECT MANDIBULA ANTARA BOVINE BONE MINERAL – HUMAN AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELL DAN AUTOGENOUS BONE GRAFT

Penelitian Eksperimental Laboratoris

Untuk memperoleh gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Dan diuji di hadapan
Panitia Ujian Akhir Tahap II (Terbuka)



DAVID B. KAMADJAJA

091070124

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2015

iii

**Disertasi ini telah diuji pada Ujian Akhir Tahap I (Tertutup)
tanggal 2 April 2015**

Panitia Penguji Disertasi

Ketua : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

Anggota : 1. Prof. R.M. Coen Pramono D., drg., SU., SpBM(K)

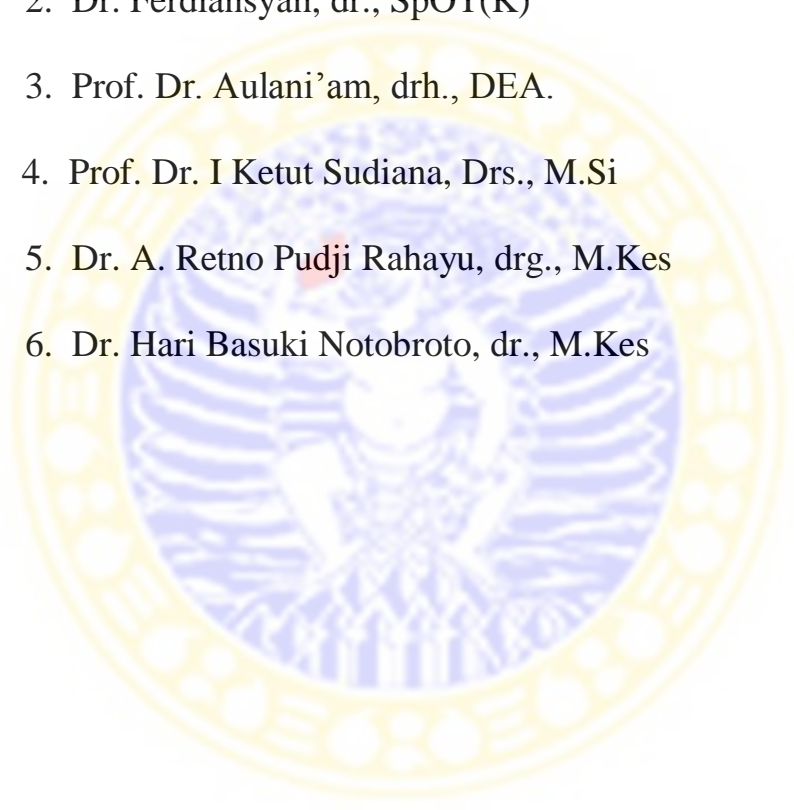
2. Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)

3. Prof. Dr. Aulani'am, drh., DEA.

4. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si

5. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes

6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes



Ditetapkan dengan Surat Keputusan

Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Airlangga

Nomer : 126/UN3.1.1/KD/2015

Tanggal : 30 Maret 2015

LEMBAR PENGESAHAN

Disertasi berjudul

**PERBEDAAN MEKANISME DAN EFEKTIFITAS PENYEMBUHAN CRITICAL
SIZE DEFECT MANDIBULA ANTARA BOVINE BONE MINERAL – HUMAN
AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELL DAN AUTOGENOUS BONE GRAFT
Penelitian Eksperimental Laboratoris**

**Telah disetujui
Pada tanggal 28 April 2015**

Kopromotor,

Dr. Ferdiansyah, dr., Sp.OT(K)
NIP 19640212 198911 1 001

Promotor,

Prof. Coen Pramono D, drg., SU, Sp.BM(K)
NIP 19540210 197901 1 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya mengucapkan puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas berkat dan perkenanNya sehingga penelitian dan disertasi ini dapat diselesaikan.

Disertasi ini selesai atas bimbingan, arahan, dorongan dan saran serta perbaikan dari banyak pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankan saya dalam kesempatan ini menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-setingginya kepada yang terhormat:

Prof. R.M. Coen Pramono D., drg., SU., SpBM(K) promotor, pembimbing akademik dan guru saya, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan jenjang doktor, dan yang di tengah-tengah kesibukan beliau, telah berkenan untuk menjadi promotor saya, memberikan dukungan, bimbingan, wawasan dan pemikiran yang sangat berharga selama saya melakukan penelitian dan penulisan disertasi ini. Saya menyampaikan terima kasih yang tak tak terhingga.

Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K) atas kesediaan beliau menjadi ko-promotor, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di Pusat Biomaterial dan Bank Jaringan RSUD Dr. Sotetomo, dan yang telah memberikan banyak masukan, arahan, wawasan dan pemikiran yang sangat berharga serta dorongan dan semangat kepada saya untuk menyelesaikan disertasi ini. Saya menyampaikan terima kasih yang tak terhingga.

Penyelesaian dan penyusunan disertasi ini juga mendapatkan bantuan yang sangat berharga dari berbagai pihak, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia Cq. Kemendikbud yang telah memberi kesempatan dan bantuan untuk mendapatkan Bea siswa Program Pascasarjana (BPPS).

Direktorat Perguruan Tinggi Cq Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si. selaku ketua LPPM Universitas Airlangga atas kesempatan untuk mendapatkan dana hibah penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dengan pembiayaan DIPA BOPTN 2013 dan 2014.

Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Prof. R.M. Coen Pramono D., drg., SU., SpBM(K), Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, dan Prof. Dr. Ruslan Effendi, drg., MS., Sp.KG, selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga masa jabatan 2005-2010, yang telah berkenan memberikan ijin kepada saya untuk menempuh pendidikan S3 Kedokteran di Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., SpPD, K-EMD, FINASIM, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., MS. selaku Wakil Dekan I, Prof. Djoko Santoso, dr., PhD., SpPD, K-GH, FINASIM, selaku Wakil Dekan II dan Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK(K) selaku Wakil Dekan III serta seluruh jajarannya.

Prof. Dr. Sri Hayati, SH, MS, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan seluas-luasnya kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., SpA(K), SpJP., FIHA., selaku ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor dan Prof. Dr. Haryanto J.M., dr., AIFM, selaku mantan Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah membantu dalam pelaksanaan pendidikan, ujian kualifikasi, proposal dan disertasi.

Prof. Dr. Nasronudin dr., Sp.PD-KPTI, selaku Ketua Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium ITD saat saya melakukan penelitian.

Prof. Dr. H. Fedik Abdul Rantam, drh., yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium stem cells Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga yang beliau pimpin, dan yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, dan wawasan di dalam bidang stem cell yang sangat bermanfaat untuk disertasi ini.

Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si yang telah bersedia meluangkan waktu untuk berkonsultasi di tengah kesibukan beliau, memberikan bimbingan dan masukan serta membantu proses pemeriksaan imunohistokimia.

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang berharga di dalam bidang statistik yang sangat membantu menyempurnakan penulisan disertasi ini.

Prof. Dr. Aulani'am, DEA., drh. selaku penguji eksternal yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang berharga, serta banyak membantu saya di dalam melaksanakan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang sangat bermanfaat untuk menyempurnakan penulisan disertasi ini.

Dr. Purwati, dr., SpPD, K-PTI, FINASIM, yang telah memberikan bimbingan, arahan dan masukan tentang ilmu dasar sel punca (Stem cell) dan biomolekuler, yang sangat berarti dalam menyusun, merencanakan desain penelitian dan penulisan disertasi ini.

Dodo Anondo, dr., MPH., selaku direktur RSUD Dr. Soetomo dan seluruh jajarannya yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk melakukan penelitian saya.

Dr. Heri Suroto, dr., Sp.OT(K), selaku Ketua Instalasi Pusat Biomaterial dan Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo yang telah memberikan kesempatan kepada saya, dan Bapak Lesmono beserta seluruh staf yang terlibat, untuk melaksanakan penelitian biomaterial rekayasa jaringan.

Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG (K), sebagai pembimbing klinis penelitian amniotic membrane di RSUD Dr. Soetomo yang telah memberikan bimbingan dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian saya.

Dr. Purwati, Sp.PD. KPTI-FINASIM, yang telah memberikan banyak masukan kepada saya dan membantu di dalam prosedur kultur stem cell pada Laboratorium Stem Cell ITD Universitas Airlangga

Wibi Riawan, S.Si, dosen pada Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah banyak memberikan masukan dan bantuan kepada saya khususnya dalam hal pemeriksaan immunostaining.

Helen Susilowati SKM, Annas Prasetyo Adi S.Si., Eryk Hendrianto S.Si, M.Si, Deya Karsari, drh., M.Si., dan Handoko serta semua staf di Laboratorium Stem Cell ITD Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini khususnya prosedur laboratorium stem cell, pemeriksaan imunositokimia dan prosedur eksperimen pada hewan coba.

Endah Sujani, S.Si., Perwitasari F. Lazzary R., S.T., dan Bapak Muchid, yang telah begitu banyak membantu terlaksananya penelitian ini khususnya dalam bidang Scanning Electron Microscope dan pemeriksaan immunohistokimia.

Para dosen Pascasarjana yang saya hormati : Prof. Dr. Aulani'am, DEA, Drh., Prof. Siswandono, Drs., MS., Prof. Dr. Yoes PD.,dr., MSc., SpParK., Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH, Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr., MS., SpPA(K), FIAC, Dr.Sunaryo, dr., MS., MSc., Prof. Dr. M. Zainudin, Apt., Dr. Florentina Sustini, dr., MS., Siti Pariani, dr., MS., MSc., PhD., Dr. FM. Judayana, dr., SpPK(K), dan para dosen Pascasarjana yang lainnya, yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan ketrampilan yang sangat berguna bagi peneliti dalam penyelesaian disertasi.

Dr. Chairul Anwar, drh., MS., PA.Vet(K), Dr. Eka Pramytha Hestianah, drh., M.Kes., PA.Vet(K), Suryo Kuncorojakti, drh., M.Vet., Lita Rakhma Yustinasari, drh., M.Vet. yang

dengan penuh dedikasi dan semangat yang tinggi telah banyak membantu penelitian saya khususnya dalam pemeriksaan spesimen histologi.

Ester Arjani Rachmat, drg., MS dan Dr. Pratiwi Soesilowati, drg., M.Kes. yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang sangat bermanfaat untuk penulisan disertasi ini.

Seluruh guru dan kolega saya para dosen di Departemen Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofasial Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof. R.M. Coen Pramono D, drg., SU., Sp.BM(K), Prof. Dr. Peter Agus drg., Sp.BM(K), Bambang Surjanto, drg., MS., Herdi Eko Pranjoto, drg., SU., Sp.BM., Achmad Harijadi, drg., MS., Sp.BM., Roberto M.Y. Simanjuntak, drg., MS., Sp.BM., R. Soesanto., drg., Sp.BM(K)., M. Lukman Bahar, drg., M.Kes, R. Aries Muharrom, drg., Sp.BM, Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BM dan Andra Rizqiawan, drg., Ph.D, Sp.BM yang telah memberikan dorongan dan dukungan moril kepada saya, dan dengan penuh pengertian dan kerelaan hati telah membantu segala tugas saya sebagai staf pengajar selama saya menempuh pendidikan jenjang doktor ini.

Endrajana, drg., MS., Sp.BM, guru dan sahabat sekaligus rekan seperjuangan saya yang senantiasa memberikan dukungan moril kepada saya selama menempuh pendidikan jenjang doktor ini. Keteladanan dan keikhlasan beliau telah memberikan inspirasi dan motivasi kepada saya di dalam melaksanakan tugas pekerjaan saya sebagai dosen.

Dr. Erma Safitri, drh., M.Si., temanku yang baik yang telah banyak berbagi ilmu dan pengalamannya di bidang penelitian dan yang selalu bersedia membantu saya selama saya menjalani pendidikan doktor ini.

Seluruh kolega dan teman-teman (Kempasser) Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Unair angkatan 2010 dengan ketua Dr. Agung Widodo, dr., MKes. yang selalu menjadi penyemangat dalam kekompakan angkatan 2010.

Orang tua saya yang saya cintai, papi Philippus Rudijanto Kamadjaja, drg., dan mami Elisabeth Herlani Untario, drg. (Alm), yang telah mengasuh dan mendidik saya dengan penuh

kasih sayang dan keteladanan dan yang telah memberi motivasi dan dorongan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan jenjang doktor ini.

Istriku tercinta, Liem Lilianita, yang dengan penuh kesabaran dan kasih sayang senantiasa memberikan dukungan, motivasi dan dorongan semangat kepada saya sejak awal sampai saya menyelesaikan pendidikan ini.

Kakak saya, M. Josef Kridanto Kamadjaja., drg., M.Kes., Sp.Pros(K) dan adikku, Daniel S. Kamadjaja, drg., MM. beserta keluarga yang selalu mendukung saya selama pendidikan ini.

Semua pihak yang telah membantu saya dalam penelitian dan penyelesaian pendidikan ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Besar harapan saya, semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan kedokteran dan kedokteran gigi dalam bidang ilmu bedah mulut dan maksilofasial khususnya dalam ruang lingkup rekayasa jaringan tulang dan bermanfaat untuk aplikasi klinis pada penderita yang memerlukan tindakan rekonstruksi rahang, sehingga harapan kesembuhan dan kualitas hidupnya menjadi lebih baik. Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa memberkati segala usaha dan upaya kita di dalam meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan sesama kita. Amin

RINGKASAN

Rekonstruksi mandibula merupakan tantangan di bidang bedah mulut dan maksilofasial. Metode baku emas rekonstruksi mandibula sampai saat ini adalah autogenous bone graft. Kelemahan autogenous bone graft adalah keterbatasan dalam bentuk, ukuran, dan ketersediaannya. Rekayasa jaringan tulang dengan mesenchymal stem cell (MSC)-based merupakan alternatif yang potensial terhadap autogenous bone graft. Penelitian eksperimental rekayasa jaringan untuk rekonstruksi defek tulang panjang dan mandibula hewan coba menunjukkan hasil yang memuaskan, akan tetapi bagaimana peran MSC di dalam proses penyembuhan defek tulang tersebut sampai saat ini masih belum banyak diketahui dengan pasti.

Penelitian rekayasa jaringan dengan berbasis MSC sering menggunakan autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BM-MSC) karena diketahui memiliki potensi osteogenik yang paling baik di antara jenis MSC dari sumber yang lain. Kekurangan BM-MSC adalah prosedur pengambilannya bersifat invasif dan menimbulkan morbiditas pada penderita, di samping itu kualitas MSC yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh kondisi fisik dan usia penderita. MSC alogenik, oleh karena itu, merupakan alternatif terhadap autologous BM-MSC. Mesenchymal stem cell dari membran amniotik manusia (hAMSC) merupakan salah satu jenis MSC yang potensial karena bersifat pluripoten dan immunomodulatory. Penelitian hAMSC untuk aplikasi rekayasa jaringan maksilofasial belum ada sampai saat ini.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan perbedaan mekanisme dan efektifitas penyembuhan critical size defect mandibula antara prosedur rekonstruksi dengan komposit scaffold bovine bone mineral (BBM) - hAMSC dan dengan metode autogenous bone graft.

Penelitian ini adalah true experimental dengan rancangan Post Test Only Control Group Design. Sebanyak 45 ekor New Zealand white rabbit dibagi ke dalam 3 kelompok waktu pengamatan yaitu minggu ke-1, ke-2, dan ke-12, masing-masing kelompok tersebut dibagi

menjadi 3 kelompok eksperimen yaitu kelompok perlakuan (BBM-hAMSC), kelompok kontrol I (scaffold (BBM)), dan kelompok kontrol II (ABG) sehingga didapatkan 9 kelompok penelitian yang masing-masing terdiri dari 5 ekor kelinci. Dibuat critical size defect pada mandibula kelinci, pada kelompok perlakuan defek dilakukan rekonstruksi dengan komposit scaffold BBM yang dibenahi hAMSC (BBM-hAMSC), pada kelompok kontrol I defek diisi dengan scaffold BBM saja (BBM), sedangkan pada kelompok kontrol II defek diisi dengan autogenous bone graft (ABG) yang diambil dari tulang crista iliaca kelinci yang sama. Lima belas ekor kelinci dikorbankan pada setiap kelompok waktu pengamatan. Variabel tergantung yang digunakan pada penyembuhan tahap awal (minggu ke-1 dan ke-2) adalah ekspresi VEGF, BMP2 dan Runx2, serta angiogenesis, pada tahap lanjut (minggu ke-12) adalah ekspresi osteocalcin, ketebalan serabut kolagen tipe I, luas trabekula tulang dan inkorporasi antara tulang baru dan tulang resipien.

Pada penyembuhan defek tahap awal (minggu ke-1 dan ke-2) hasil pengamatan histologi menunjukkan bahwa proses penyembuhan pada kelompok BBM-hAMSC dan ABG terjadi lebih awal dibandingkan dengan kelompok scaffold BBM. Pengamatan beberapa parameter penyembuhan menunjukkan hasil sebagai berikut. Ekspresi VEGF, sebagai signaling angiogenik, dan angiogenesis terjadi lebih awal pada kelompok ABG dan BBM-hAMSC dibandingkan kelompok BBM, ekspresi BMP2 (signaling osteogenik) dan Runx2 (marker diferensiasi osteogenik) pada kelompok ABG terjadi lebih awal dan kuat dari pada kelompok BBM-hAMSC dan BBM. Pada penyembuhan defek tahap lanjut (minggu ke-12) hasil pengamatan adalah sebagai berikut. Ekspresi Runx2 pada kelompok BBM-hAMSC dan ABG lebih tinggi dari pada kelompok BBM, ekspresi osteocalcin (marker osteoblas matur) pada kelompok BBM-hAMSC jauh lebih tinggi dari pada kelompok BBM dan ABG, sedangkan ketebalan serabut kolagen tipe-I pada kelompok ABG jauh lebih rendah dibandingkan kelompok BBM-hAMSC dan BBM. Ketiga parameter tersebut mewakili proses

osteogenesis yang terdiri atas jaringan mesenkim yang mengalami diferensiasi osteogenik, matriks osteoid yang tersusun dari serabut kolagen tipe-I dan matriks yang mengalami mineralisasi. Hasil pengamatan ketiga parameter tersebut di atas menunjukkan bahwa pada minggu ke-12 proses osteogenesis masih berlangsung pada ketiga kelompok penelitian, di mana pada kelompok BBM-hAMSC proses osteogenesis meliputi daerah yang lebih luas dari pada kelompok ABG. Hasil pengamatan pada minggu ke-12 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan luas trabekula tulang, yang mewakili kuantitas osteogenesis, dan inkorporasi antara tulang baru dan tulang resipien, yang mewakili kualitas osteogenesis setara antara kelompok BBM-hAMSC dengan kelompok ABG. Hal ini menunjukkan bahwa efektifitas penyembuhan critical size defect mandibula BBM-hAMSC setara dengan autogenous bone graft.

Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa pada penyembuhan critical size defect di mandibula: (1) aktifitas penyembuhan tahap awal pada autogenous bone graft lebih tinggi dibandingkan dengan BBM-hAMSC, sedangkan aktifitas osteogenik pada tahap lanjut penyembuhan lebih tinggi pada BBM-hAMSC dibandingkan dengan autogenous bone graft, (2) tidak terdapat perbedaan efektifitas penyembuhan antara BBM-hAMSC dan autogenous bone graft pada tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula

Temuan baru pada penelitian ini adalah: (1) mekanisme penyembuhan tahap awal dan tahap lanjut critical size defect di mandibula oleh kombinasi BBM-hAMSC dan autogenous bone graft dan (2) efektifitas penyembuhan critical size defect di mandibula oleh kombinasi BBM-hAMSC dan autogenous bone graft.

SUMMARY

Mandibular reconstruction has been a great challenge to oral and maxillofacial surgery. Gold standard for mandibular reconstruction is autogenous bone graft, however, it has limitation in shape, size, and its availability. Bone tissue engineering using mesenchymal stem cell (MSC) is a potential alternative to autogenous bone graft. Experimental study proved that tissue engineering used to reconstruct segmental defects in long bones and mandibles showed promising result. The mechanisms of bone healing and osteogenesis effectiveness, however, has not been fully understood until today.

MSC-based bone tissue engineering generally uses autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BM-MSC) due to its highest osteogenic capacity among other type of MSCs. However, it has limitations as it requires relatively invasive procedure to collect bone marrow aspirates which is a potential morbidity to the patients and the quality of MSC largely depends on the patient general health condition and age. Allogeneic MSC, therefore, is now being studied as an alternative to autologous BM-MSC. Human amniotic membrane mesenchymal stem cell (hAMSC), as one of the sources of allogeneic MSC, has recently been explored because of its pluripotential and immunomodulatory properties. Application of hAMSC in bone tissue engineering, however, has not been found in literature.

The aim of this study was to describe the difference in the mechanism and effectiveness of bone healing between composite scaffold bovine bone mineral - hAMSC and autogenous bone graft in the reconstruction of critical size mandibular defect.

This was a true experimental study with post test only control group design. Forty five New Zealand white rabbits were divided into 3 groups based on the time of observation which were first, second, and twelfth week, in each of the group they were further subdivided into 3 experimental groups based on method of defect reconstruction i.e. scaffold bovine bone mineral and hAMSC (BBM-hAMSC), scaffold BBM alone (BBM), and autogenous bone

graft (ABG), making a total of 9 groups consisting of 5 rabbits per group. Critical size defects measuring 5 x 10 x 4 mm were created at the inferior border of the mandibles, which were reconstructed with BBM-hAMSC, BBM alone, and ABG from iliac crestal bone, respectively. Fifteen rabbits were sacrificed after first, second and twelve weeks to collect the specimens for histology and immunohistochemistry staining. Expression of the VEGF, BMP2, Runx2 and the number of vascularity (angiogenesis) were analyzed in the first and second week, while expression of Runx2, osteocalcin, amount of collagen type-I fibres and trabecular area as well as scoring of incorporation between new and recipient bone were analyzed in the twelfth week.

Histology staining in the first and second week showed that tissue healing in BBM-hAMSC and ABG group started much earlier than BBM group. Immunohistochemistry staining showed that expression of VEGF, an angiogenic signaling, and angiogenesis occurred earlier in the BBM-hAMSC and ABG group compared with BBM group, while BMP2, an osteogenic signaling, and Runx2, a marker of osteogenic differentiation, were expressed earlier and stronger in ABG group than BBM-hAMSC and BBM group. Observation of healing at twelfth week were as follows. Expression of Runx2 in BBM-hAMSC and ABG group were significantly higher than BBM group, the amount of collagen type-I fibres in the BBM-hAMSC and BBM group were significantly higher than ABG group, and the expression of osteocalcin, a marker of mature osteoblast, in BBM-hAMSC group was significantly higher than ABG and BBM group. The result of analysis of those parameters indicated that osteogenesis process were still ensuing in all of the three groups at the end of twelfth week, with the osteogenesis process involving a relatively larger area of scaffold in the BBM-hAMSC group compared with ABG group. The result of analysis showed that there was no difference in trabecular area and bone incorporation, representing quantity and quality of osteogenesis, respectively, between BBM-hAMSC and ABG group. The result indicated that

the healing effectiveness of critical size mandibular defects of BBM-hAMSC was comparable to that of autogenous bone graft.

This study concluded that in the healing of critical size mandibular defects (1) early healing activities was higher in autogenous bone graft than BBM-hAMSC, while osteogenic activities in the late stage of healing was higher in BBM-hAMSC compared to autogenous bone graft, (2) there was no difference in healing effectiveness between composite BBM-hAMSC and autogenous bone graft in late stage of healing of critical size mandibular defects.

The new findings in this study were: (1) the mechanism of early and late stage of healing of critical size mandibular defects reconstructed with composite BBM-hAMSC and autogenous bone graft, and (2) the healing effectiveness of composite BBM-hAMSC and autogenous bone graft in the reconstruction of critical size mandibular defects.

