

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Alveoler Yarıkların Onarımında Kök Hücre Uygulamaları: Deneysel Çalışma

Proje No: TSA-12-3974

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Doç.Dr.Banu Arzu ALKAN
Diş Hekimliği Fakültesi/ Periodontoloji A.D.

Araştırmacılar

PROF.DR. ALPER ALKAN Diş Hekimliği Fakültesi/ Ağız,Diş ve Çene Cerrahisi A.D.
Yard.Doç.Dr. ABDULLAH EKİZER Diş Hekimliği Fakültesi/ Ortodonti A.D.
Dr. ZEYNEP BURÇİN GÖNEN Diş Hekimliği Fakültesi/ Ağız,Diş ve Çene Cerrahisi A.D.
DOÇ.DR. SERVET ÖZCAN Fen Fakültesi/ Biyoloji A.D.
PROF.DR. YUSUF ÖZKUL Tıp Fakültesi/ Genetik A.D.
Yrd.Doç.Dr. SERPİL TAHERİ Tıp Fakültesi/ Genetik A.D.
DOÇ.DR. MEHMET FATİH SÖNMEZ Tıp Fakültesi/ Histoloji A.D.
YRD.DOÇ.DR. KORHAN ARSLAN Veterinerlik Fakültesi/ Genetik A.D.
ÖĞRENCİ GÜLER TOPRAK (Kurum Dışı Tez Öğrencisi)

Ocak 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

‘Alveoler Yarıkların Onarımında Kök Hücre Uygulamaları: Deneysel Çalışma’ isimli proje ERÜ BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GEREÇ VE YÖNTEM	8
3. BULGULAR	13
4. TARTIŞMA	19
KAYNAKLAR	23

ÖZET

Alveolar yarı, en sık görülen doğumsal kraniyofasiyal anomali olan yarı, dudak-damaklı bireylerde ortaya çıkmaktadır. Alveolar yarı, tedavisindeki hedefler fonksiyonel açıdan; nazolabial fistüllerin kapılması, maksiller dental arkın sağlamlık ve devamlılığı, yarı, komşuluğundaki dişlerin desteklenmesi, konuşmanın düzelmesi, buruna sıvı kaçıının önlenmesi, yarı, bölgesinde diş sürmesi için uygun zemin oluşturulmasıdır. Estetik açıdan ise; piriform bölgenin augmentasyonu ile dental arkla, dişlerin kozmetik açıdan uygun bir duruma getirilmesi ve burun alar tabanı için daha iyi bir destek sağlanması hedeflenir. Bu amaçla en sık olarak iliak kemikten alınan otojen greftleme yapılmaktadır. Bu yöntemin, 2 haftaya kadar sürebilen ve aksak yürümeye neden olan ağrı oluşturmaması, hastada ikinci bir donör saha açılması, uzamış ameliyat süresi/hastanede kalış zamanı, enfeksiyon riski, lateral femoral sinir parestezisi, hematoma gelişmesi ve skar gibi ciddi dezavantajları bulunmaktadır. Bu projenin amacı tavşanlarda alveolar yarı, defektlerinin onarımında kök hücre uygulamasının, kemik rejenerasyonu üzerine etkisinin incelenmesidir.

Bu amaçla kök hücre kaynağı olarak tavşanlardan elde edilen dental pulpa kaynaklı mezankimal kök hücreler (DPKMKH) kullanılmıştır. Tavşanlarda deneysel olarak hazırlanan alveolar yarı, defekti grup1'de otojen kemik, grup 2 'de polilaktik ko-glikolik asit iskelet üzerinde DPKMKH uygulanmış ve grup 3'te boş bırakılmıştır.2 ay sonra sakrifiye edilmiş ve histolojik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçta, grup 2'de grup3'e göre istatistiksel olarak anlamlı kemik rejenerasyonu tespit edilmiştir. Otojen kemik uygulanan gruptaki rejenerasyon diğer gruplara göre yüksek olsa da, DPKMKH uygulaması ile kemik rejenerasyonu gerçekleştirilebilir. İleri klinik uygulamalar planlanabilir.

Anahtar Kelimeler; Alveolar yarı, Kök hücre tedavisi, Kemik rejenerasyonu

ABSTRACT

The alveolar cleft was picked out because of the fact that it occurs in individuals with cleft lip-palates, which are the most common congenital craniofacial abnormalities. The objectives in the treatment of alveolar cleft in terms of functionality were: the closure of nasolabial fistula, the substantiality and permanence of the maxillary dental arch, supporting the teeth in the vicinity of the cleft, fixing speech problems, preventing any liquid from seeping into the nose, and forming a convenient basis for tooth eruption in the cleft zone. In terms of aesthetics, on the other hand, it was aimed that through the augmentation of the piriform area, the teeth be cosmetically optimised with the dental arch and that a better support be provided for the nasal alar base. To that end, the autogenous bone graft is most frequently performed. This method has serious disadvantages, such as causing pain that may last for about 2 weeks and cause lame walking, giving rise to a second donor site opening in patient, prolonged duration of operation / hospital stay, risk of infection, lateral femoral nerve paraesthesia, development of hematoma and scar. The aim of the study is to evaluate the effect of stem cell application in bone regeneration in experimentally created alveolar cleft of rabbits.

For this purpose, mesenchymal stem cells from dental pulp of rabbits were isolated. Experimentally created alveolar cleft in rabbits were grafted with autologous bone in group 1, with dental pulp stem cells on polylactic co-glycolic acid scaffold in group 2 and group 3 was left as empty control. The animals were sacrificed 2 months later and histologic analyses were performed.

As a result, the bone regeneration was detected statistically higher in group 2 than group 3. Although the new bone regeneration was higher in group 1, stem cell from dental pulp application may be an option for bone regeneration. Further clinical applications may be planned.

Key Words; Alveolar cleft, Stem cell therapy, Bone regeneration

1.GİRİŞ

Orofasial yarıklar; genetik geçişli sendromlarla, kromozomal anomalilerin fenotip bozukluğu sonucunda veya prenatal teratojenlerin etkisiyle ortaya çıkabilir. Yarık dudak damak, doğumsal kraniofasial defektlerin en sık görülenidir. Farklı toplumlarda görülme sıklığı, 1\500 ila 1\2000 arasında değişmektedir. Alveolar yarık, sıklıkla lateral kesici diş ile kanin diş arasındaki yarık olarak devam eder. Alveolar yarıkla beraber sıklıkla premaksiller hipoplaziye bağlı dental yer değişikliği ve dental agenezi, veya bölgede sünmüre diş varlığı görülebilir (Lithovius RH. ve ark,2013). Küçük bir çentikten alveoler segmentleri tamamen ayıran geniş boşluklara kadar değişen derecelerde olabilir.

Alveoler yarık tedavisinde amaç hem fonksiyonel hem de estetik olarak iyi sonuçlar elde etmektir (Cohen M ve ark.,1993). Fonksiyonel açıdan; nazolabial fistüllerin kapatılması, maksiller dental arkın sağlamlık ve devamlılığı, yarık komşuluğundaki dişlerin desteklenmesi, konuşmanın düzelmesi, buruna sıvı kaçaşının önlenmesi, yarık bölgesinde diş sürmesi için uygun zemin oluşturulması amaçlanır. Estetik açıdan ise; piriform bölgenin ögmentasyonu ile dental arkla, dişlerin kozmetik açıdan uygun bir duruma getirilmesi ve burun alar tabanı için daha iyi bir destek sağlanması amaçlanmaktadır (Cohen M ve ark.,1993; Tachimura T ve ark.,1997; Enemark H.ve ark, 1985). Günümüzde yaygın olarak kabul görmüş tedavi biçimi otojen greftler ile geleneksel sekonder onarımdır. En uygun greftleme zamanı lateral kesiciler çıktıktan sonra, kanin dişler çıkmadan önceki dönemdir (Radyolojik olarak kanin diş kökünün 2/3'ü oluştuğunda). Bu sayede kanin dişlerinin onarım sonrası kemik grefti içinde sürme imkânı olur.

Kök hücreler; kendisini sürekli yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan hücreler olarak tanımlanmaktadır (Bickenbach JR. ve ark, 2005, Taşlı NP. ve ark,2013). Mezankimal kök hücreler (MKH) salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. Hasarlı hücrelerin iyileşmesinde sekrete ettikleri çok sayıda biyoaktif molekülün yardımıyla enflamasyonu inhibe eder ve immün sistem modülasyonu sağlarlar. Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı klinik uygulamalar için büyük ilgi uyandırmaktadır (Liu Y.ve ark.,2013; Elsharawy M. ve ark,2011).

MKH'ler erişkin birçok dokudan elde edilebilir. 2000 yılında Gronthos (Gronthos S.ve ark., 2000) ve arkadaşları dental pulpadan kök hücre elde ettiklerini bildirdikten sonra 2003 yılında Miura ve arkadaşları insan süt dişlerinin pulpalarının da MKH 'ler barındırdığını bildirmişlerdir (Miura M.ve ark.,2003). Süt dişi kaynaklı MKH'ler yüksek proliferasyon, klonojenik ve multidiferansiasyon kabiliyetine sahiptir. Diğer erişkin kaynaklara göre daha kolay elde edilebilir olması, hastada ikinci bir donor saha yaratmaması avantajları arasındadır. Dental pulpa kaynaklı MKH'lerin osteojenik, dentinojenik, adipojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik farklılaştırılabildiği bildirilmiştir (Graziano A.ve ark,2008; Laino G.ve ark.,2005; Risbud MV.ve ark.2005). Literatürde daha sıklıkla odontogenezis çalışmalarında kullanılıyor olsa da dental pulpa kaynaklı MKH'in osteoindüktif kemik faktörleri (BMP) salgıladığı ve osteoblast oluşturabildiği invivo ve invitro çalışmalar ile gösterilmiştir (Graziano A ve ark. 2008; Li JH ve ark. 2011; Lee K ve ark. 2009).

Bu çalışmada amaç, tavşanlarda deneysel olarak hazırlanan alveolar yarıkların onarımında dental pulpa kaynaklı MKH'in etkisini araştırmaktır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Dental pulpa kaynaklı MKH izolasyonu için 2 adet 4 haftalık Yeni Zellenda tavşanının kesici dişlerinin çekimi yapıldı. Diş üzerindeki dişetine ait dokular uzaklaştırıldı. Diş üzerine klorheksidin jel uygulanarak dezenfeksiyonu sağlandı ve döner aletler kullanılarak pulpa çıkarılıp kültür kabına alındı. Elde edilen pulpal doku dispaz ve kollojenaz tip 1 'e maruz bıraktı. Pulpa dokusu tek hücre süspansiyonu oluşana kadar enzimatik olarak iyice parçalandı. Hücreler %15 FBS (Fatal Bovine Serum) ve 100 IU/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin içeren α -MEM de kültür edildi. Elde edilen hücreler iki adet 25 cm² plastik doku kültür flasklarına alındı ve 37 derecede nemli atmosfer içeren %5 CO₂ li etüvde 3 gün inkübe edildi. Plastik kültür kabına yapışma yeteneğine göre tabandaki hücreler izole edildi. Üçüncü günde

kırmızı kan hücreleri ve diğer yapışmayan (non-adherent) hücreler çıkarıldı ve büyümekte olan hücrelere yıkama besiyeri eklendi. Pasaj sıfırdaki (P0) bağlanmış hücrelerin yoğunluğu %70-%80 olduğunda pasajlandı. Pasajlama için hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandı ve % 0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile 37 derecede 5-10 dk inkübe edildi. Tripsini inaktive etmek için en az iki katı kadar serumlu büyüme medyumuna ilave edildi. Daha sonra hücreler 200g'de 10 dk santrifüj edilerek pellet oluşması sağlandı. Bunu takiben süpernatant atılacak ve resüspanse haldeki hücreler 1 ml medium ile tamamlanarak Thoma lamında sayılacaktır ve sonra 75 cm^2 'lik kültür kaplarında 1×10^6 hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde ekildi. 10-14 günlük periyotta her üç günde bir büyüme medyumunu değiştirildi ve hücreler yoğunluğa ulaştıkça pasajlandı.

Üçüncü pasajdaki MKH önce hücre kaplarından Tiripsin-EDTA (Invitrogen, Gibco, İngiltere) ile kaldırıldıktan ve santrifüj edildikten sonra hücre yığını PBS içerisinde çözülüp sayılarak ependorf tüplerine yaklaşık $1,5 \times 10^6$ hücre/tüp konsantrasyonda aktarıldı. Her bir tüpe farklı bir primer antikor eklenerek 1 saat inkübe edildi. Sonra hücreler 2 mL dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkanıp 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre yığını 100 μL dPBS içerisinde ikincil antikor ile 1 saat inkübe edildikten sonra 2 mL dPBS ile yıkanıp 500 mL dPBS içerisinde çözüldü ve akım sitometri tüplerine alınarak analiz yapıldı

(Primer antikorlar: CD34 , CD45, CD 14, CD73,CD29,CD90 (SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, ABD)

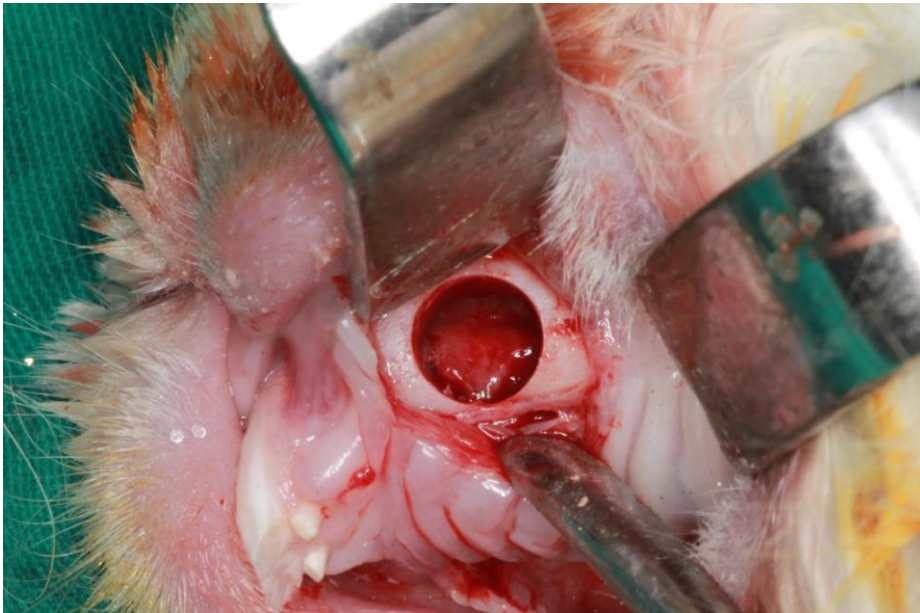
Osteojenik Farklılaşması

Kök hücreler, 3. pasajdan sonra %70 yoğunluğa ulaştıklarında besiyeri osteojenik farklılaşma uyarıcı medyumuna (DMEM içerisinde %10 FBS, 0.1 mmol deksametazon, 10 mmol β -gliserol-fosfat, 50 mmol askorbik asit) ile değiştirildi. Her üç günde bir farklılaşma besiyeri değiştirilerek MKH'in osteojenik farklılaşması sağlandı. Hücreler bu medyum ile kültüre edilmeye 10 gün boyunca devam edildi. 10 gün sonunda hücrelerin bir kısmı kantitatif Real-time PCR ile osteojenik farklılaşma gösterip göstermediklerini anlamak için hücrelerde genetik düzeyde alkalen fosfataz ve osteopontin ekspresyonu araştırıldı ve farklılaşma mediumuna alınmamış hücreler ile karşılaştırıldı. Bu amaçla farklılaştırma gerçekleştirilen 3. Pasajdaki 3×10^6 MKH'den High Pure RNA Isolation Kit ile total RNA izole edildi. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu nano drop spektrofotometre kullanılarak 260 nm'de ölçüldü. 1 mikrogram total RNA, oligo (dT) ve random heksamerler cDNA'ya ters transkribe edildi. RNA primeri ve dNTP karışımı 90 derecede 1 dk denatüre edildi. Sıcaklık 54 dereceye

getirilerek primerlerin bağlanması sağlandı. PCR reaksiyonları son olarak 72 derecede primerlerin uzaması adımı ile son buldu. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Osteojenik farklılaşma sırasında meydana gelen değişimi değerlendirmek için ayrıca alkalen fosfataz ile boyama yapıldı.

Polilaktik ko glikolik asit (PLGA üretimi hizmet alımı karşılığında Yeditepe Üniversitesinde üretilmiştir. 212-425µm çapındaki paraffin boncukları 45°C de 30 dakika ısıtılarak birbirleriyle bağlanmaları sağlandı. Oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine 1ml'lik 12% PLGA/1,4-dioxane solüsyonu hazırlanıp damlatıldı. 1,4-dioxane kurtulmak için karışım -25°C donduruldu. Parafin boncuklarından kurtulmak için kalıplar iki gün boyunca oda sıcaklığında 400ml hekzanda bekletildi. Hekzan her 6 saatte bir değiştirildi. Deney gününe kadar PLGA nitrojen buharında bekletildi.

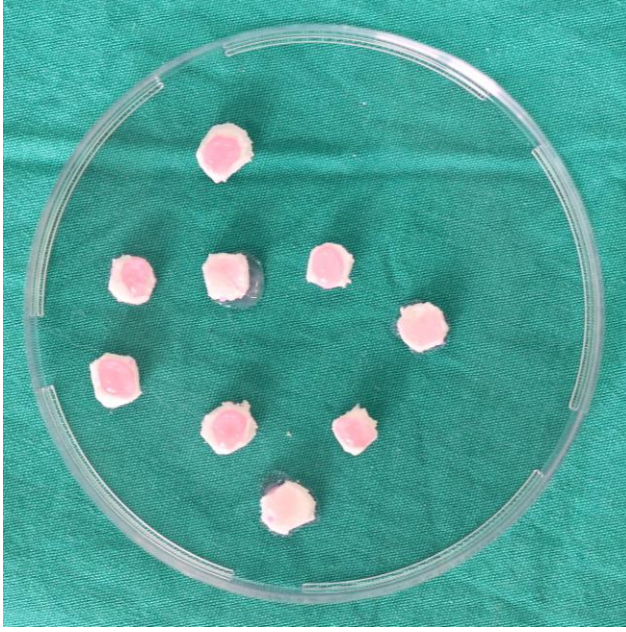
Çalışmada 30 tavşan kullanıldı. Genel anestezinin ardından bölgeye lokal anestezi uygulandı. Bukkal mukoperiostium nazal kavite tabanına doğru ve palatal mukoperiostium ise palatal fissüre doğru kaldırıldı. Trefin frez kullanılarak maksiler kemik oral ve nazal kavite birleşecek şekilde rezeke edildi (Şekil 2.1).



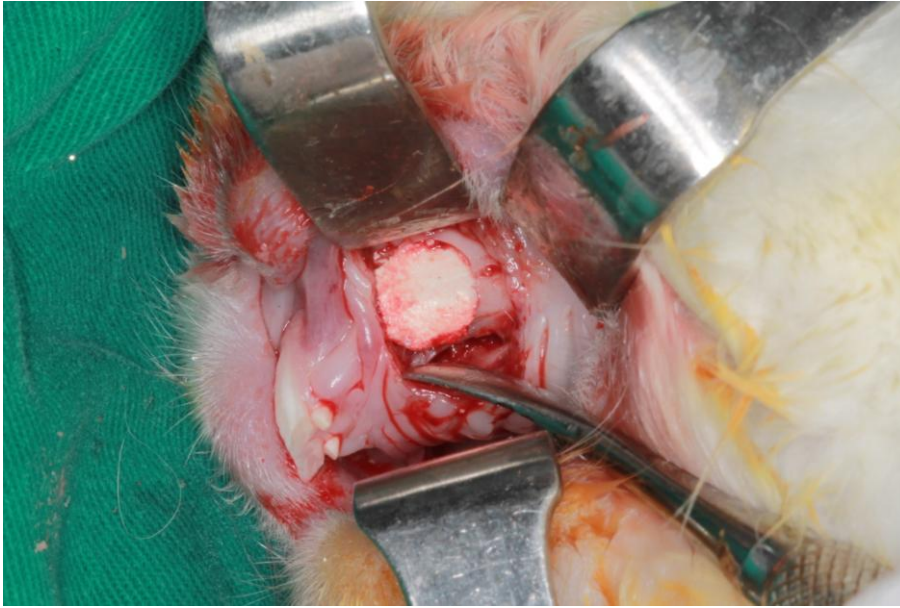
Şekil 2.1. Deneysel olarak oluşturulan alveolar yarık defekti

Tavşanlar 3 gruba ayrılmıştır. 1. Gruptaki 10 tavşanda defekt bölgesi çıkarılan kemiğin tekrar yerleştirilmesi ile otojen olarak greftlenmiştir. 2. Grupta PLGA iskelet üzerine osteojenik

olarak farklılaştırılmış DPKMHK'ler alınarak uygulanmıştır (Şekil 2.2 ve 2.3). 3.grupta ise bölge boş bırakılmıştır. Ardından bölge her grupta primer dikilerek kapatılmıştır. Ameliyat sonrası analjezik ve antibiyotik uygulanmıştır.



Şekil 2.2. PLGA iskelet üzerinde DPKMKH



Şekil 2.3. PLGA iskelet üzerine alınan DPKMKH'lerin deneysel alveolar yarık bölgesine uygulanması (Grup 2)

İşlemden 2 ay sonra yüksek doz anestezi ile hayvanların sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Histomorfometri için Örneklerin Hazırlanması

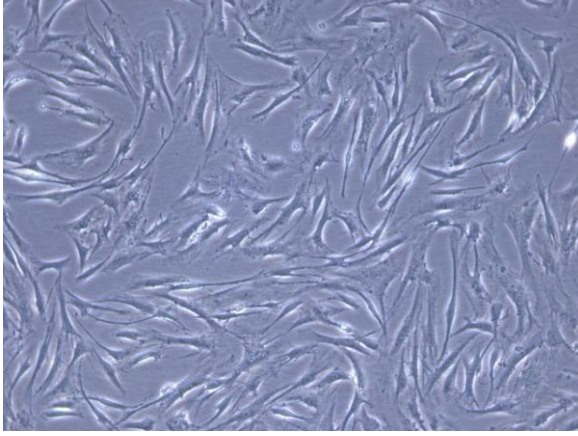
bütün hayvanların premaksillaları diseke edildi. Histomorfometrik analiz yapmak amacıyla %10'luk formalin solüsyonunda fikse edildi. %5'lik formik asitte (UN 1779, Merck, Darmstadt, Almanya) dekalsifiye edildi. Bu solüsyon ilk üç gün 12 saatte bir, daha sonraki günlerde her 24 saatte bir değiştirildi. Örnekler toplam 10 günde dekalsifiye edildi. Daha sonra fiksatiflerin uzaklaştırılması amacıyla bir akar altında yıkandı. Örnekler parafin bloklara gömülerek 3-5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Histolojik kesitler hematoxilen eosin ile boyandı. dijital kamera (Olympus CX41/DP25 Research System, Olympus Corp, Tokyo, Japan) bağlantılı Leica DMR (Westlar-Almanya) marka ışık mikroskopunda görüntülenip genel değerlendirilmesi yapıldıktan sonra defekt alanı görüntü analiz programı ile kantitatif olarak yeni kemik alanı piksel kare cinsinden değerlendirildi.

İstatistiksel Yöntem

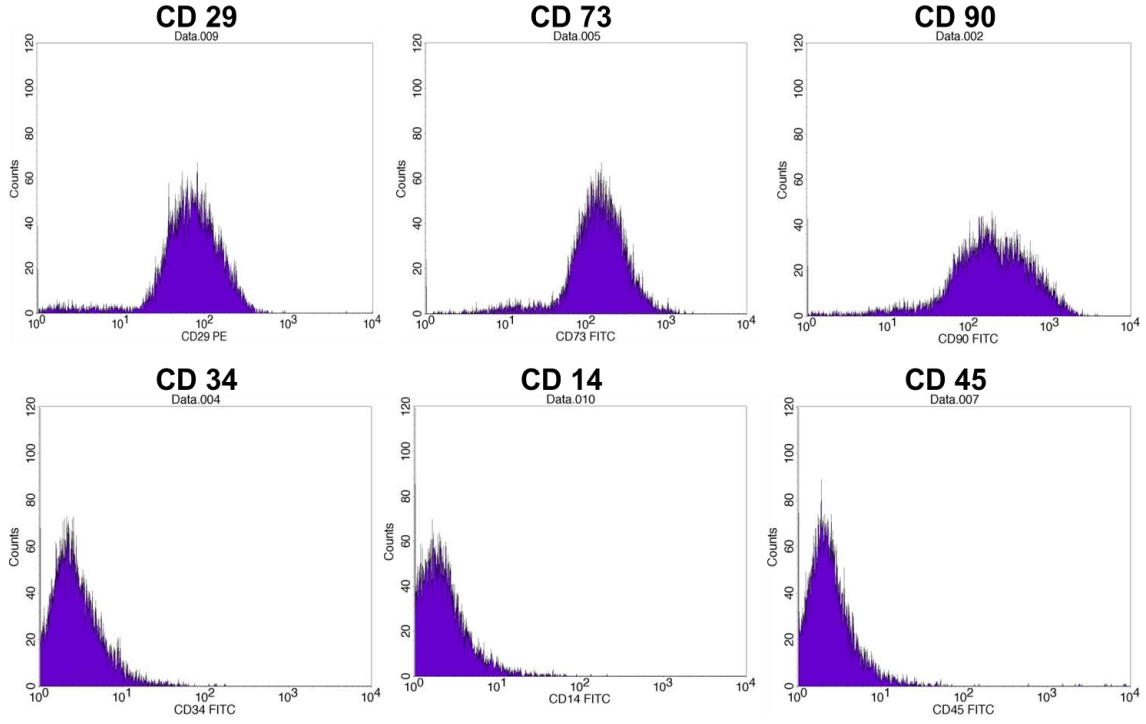
Veriler IBM SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, Illinois, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılımı 'Shapiro-Wilk' testi ile değerlendirildi. Gruplar tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Tekrarlı ölçümler bağımlı 2 örnek t testi ve tekrarlı ölçümler de varyans analizi ile karşılaştırıldı. Çoklu karşılaştırma testi Student-Newman-Keuls Methodu ile karşılaştırıldı. Çalışmamızda, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. SONUÇLAR

2 adet 4 haftalık Yeni Zelanda tavşanından kesici dişlerinin çekimi sonrası izole edilen ve çoğaltılan hücrelerin, üçüncü pasajının ardından MKH olduklarının doğrulanması amacıyla yüzey belirteçleri ile işaretlenerek akım sitometri cihazında sayımı yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Plastik kaba yapışma yeteneği olan 3.pasajdaki DPKMKH hücreleri



Şekil 3.2. Kök hücrelerin akım sitometri ile sayım sonuçları: MKH belirteçleri CD 29, CD 73 ve CD 90 için pozitif, buna karşın hematopoetik kök hücre belirteçleri CD 34 ve CD 14 ve CD45 için negatif oldukları gösterilmiştir.

Akım sitometri analizleri sonucunda dental pulpadan elde edilen MKH'in yüzey antijenleri olan CD 29, CD 73 ve CD 90 için pozitif ve hematopoetik kök hücre (HKH) belirteçleri CD 34 ve CD 14 ve CD 45 için negatif oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.2).

DPKMKH'in kemik hücrelerine dönüşme potansiyelinin ortaya konulması sırasında hücreler kültüre edilip belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra farklılaşma deneylerine başlanmış ve bu hücrelerin kemik hücrelerine dönüşmesi için uygun besi yeri ortamlarında 10 gün kadar bekletilmiştir. Kemik hücrelerine farklılaşma kantitatif Real-time PCR ile osteopontin (OP) ve alkalen fosfataz (ALP)'nin GAPDH'e göre normalize edilmesiyle değerlendirildi. Farklılaşma gerçekleştirilen hücrelerde ALP ve OP ekspresyonu kontrole göre artmış olduğu tespit edildi. Ayrıca Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi kemik hücre farklılaşmasının gösterilmesi için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. DPKMKH'in kemik hücrelerine farklılaşmaları sırasında sentezledikleri ALP miktarının arttığı tespit edilmiştir. Aynı miktarda farklılaşmış ve

farklılaşmamış DPKMKH'in ALP enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında zamana bağlı olarak ALP aktivitesinde kemik hücrelerine farklılaşmış hücrelerde farklılaşmayanlara oranla artan miktarlarda ALP aktivitesi ölçülmüştür.

Hücrelerin osteojenik farklılaşmaları gerçekleştirildikten sonra 15, 30, 45 ve 60'ıncı dakikalarda ALP aktiviteleri değerlendirilmiştir. ALP aktivitesi 15'inci dakikada 0,179 nm; 30'uncu dakikada 0,354 nm; 45'inci dakikada 0,420 nm; 60'ıncı dakikada 0,569 nm kadar belirlenmiştir. Farklılaşmamış DPKMKH'in ALP aktivitesinin ise bütün zamanlarda 0,1 nm civarında olduğu tespit edilmiştir.

Uygulamadan 2 ay sonra sakrifiye edilen tavşanların rezeke edilen alveolar yarık bölgesinde histomorfometrik ve histolojik incelemelerde, defekt bölgesini dolduran rejeneratın alanı, bu alandaki damar sayısı ve osteoblast sayısı ölçülmüştür (Şekil 3.2, 3.3) Buna göre defekt alanını dolduran rejeneratın alanı grup 1 ve grup 2, grup 3 'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır (Tablo 3.1- 3.3). Grup 1 ve 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Defekt alanını dolduran yeni kemik alanındaki osteoblast sayısı grup 1 'de grup 2 ve 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır (Tablo3.4-3.6)

Tablo 3.1. Yeni oluşan rejenerat (μm^2)

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1 (Otojen)	10	1165518,32	259387,96	1390009	1448931,5	NS
Grup 2 (DPKMKH)	10	970746,63	301352,095	1129026,8	1509441	

NS: İstatistiksel olarak anlamlı değil

Tablo 3.2. Yeni oluşan rejenerat (μm^2)

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1	10	1165518,32	259387,96	1390009	1448931,5	***
Grup 3 (Boş)	10	276448,762	274043,875	38905	670347,5	

$p < 0,001$ ***

Tablo 3.3. Yeni oluşan rejenerat (μm^2)

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 2	10	970746,63	301352,09	1129026,8	1509441	***
Grup 3	10	276448,76	274043,87	38905	670347,5	

$p < 0,001$ ***

Tablo 3.4. Yeni oluşan kemik alanındaki osteoblast sayısı

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1	10	77,1	7,80	63	77	**
Grup 2	10	65,78	11,57	49	66	

$p < 0,01$ **

Tablo 3.5. Yeni oluşan kemik alanındaki osteoblast sayısı

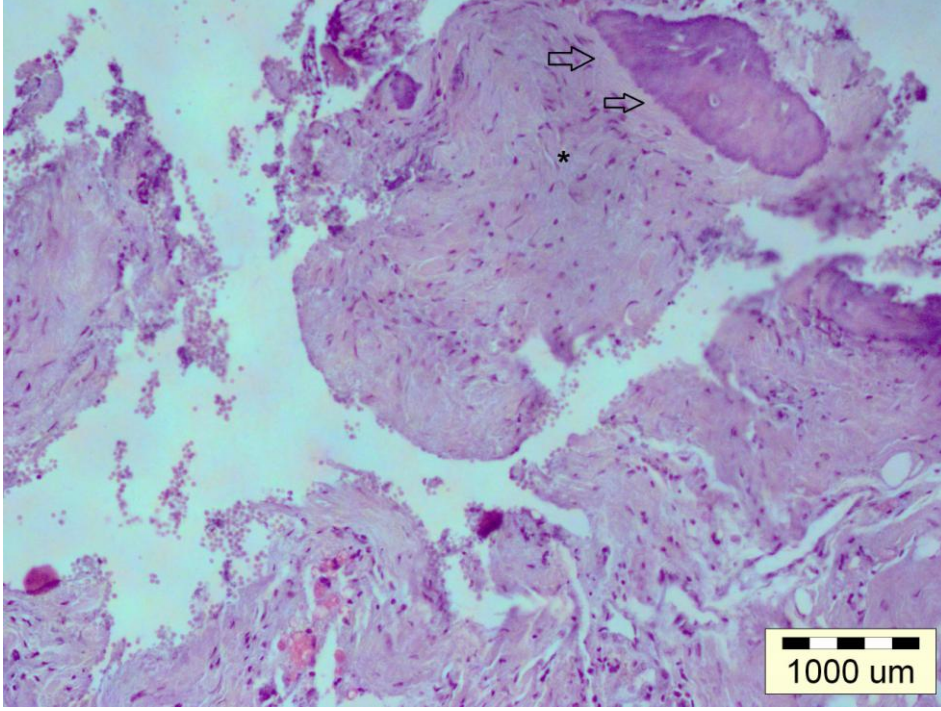
Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1	10	77,1	7,80	63	77	***
Grup 3	10	21,1	9,97	10	43	

$p < 0,001$ ***

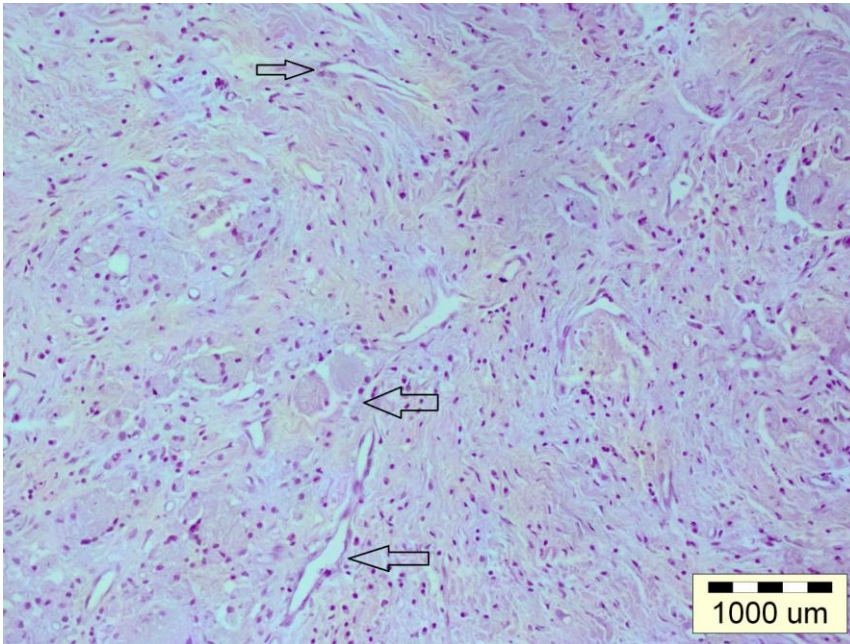
Tablo 3.6. Yeni oluşan kemik alanındaki osteoblast sayısı

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 2	10	65,78	11,57	49	66	***
Grup 3	10	21,1	9,97	10	43	

$p < 0,001$ ***



Şekil 3.3. * ile gösterilen osteoid yapıya doğru geçen rejenere bölgeyi gösterirken siyah oklar kemik yapının oluştuğu bölgeleri göstermektedir. (Hemotoksilen eozin, 20x)



Şekil 3.4. Siyah oklar rejenerat içindeki damarsal yapıları göstermektedir. (Hemotoksilen eozin, 20x)

Tablo 3.7. Yeni oluşan kemik alanındaki damar sayısı

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1	10	15,56	2,73	11	20	*
Grup 2	10	8,56	8,18	2	28	

$p < 0,05$ *

Tablo 3.8. Yeni oluşan kemik alanındaki damar sayısı

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 1	10	15,56	2,73	11	20	***
Grup 3	10	3,60	1,90	1	6	

$p < 0,001$ **

Tablo 3.9. Yeni oluşan kemik alanındaki damar sayısı

Grup	N	Ort.	S.S.	Min.	Maks.	t-test
Grup 2	10	8,556	8,17667577	2	28	NS
Grup 3	10	3,6	1,8973666	1	6	

NS: İstatistiksel olarak anlamlı değil

Defekt alanını dolduran yeni kemik alanındaki damarlanmanın grup1 ve grup 2 ‘de grup 3 ‘e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi (Tablo 3.6-3.8.).

4.TARTIŞMA

Alveolar yarı, en sık görülen doğumsal kraniyofasiyal anomali olan yarı dudak-damaklı bireylerde ortaya çıkmaktadır. Alveolar yarı tedavisindeki hedefler fonksiyonel açıdan; nazolabial fistüllerin kapılması, maksiller dental arkın sağlamlık ve devamlılığı, yarı komşuluğundaki dişlerin desteklenmesi, konuşmanın düzelmesi, buruna sıvı kaşının önlenmesi, yarı bölgesinde diş sürmesi için uygun zemin oluşturulmasıdır. Estetik açıdan ise; piriform bölgenin augmentasyonu ile dental arkla, dişlerin kozmetik açıdan uygun bir duruma getirilmesi ve burun alar tabanı için daha iyi bir destek sağlanması hedeflenir.

Sekonder alveolar greftleme amacı ile '*Boneless-bone grafting*' (*Gingivoperiosteoplasti*) (Skoog T.,1965) , otojen greft uygulamaları, allojenik/ alloplastik materyal uygulamaları yapılmaktadır. Günümüzde alveolar yarı onarımında en sık otojen greftler kullanılmaktadır (Sameshima GT ve ark.,1996).

-Otojen Greftler

İdeal donör greft alanı; yeterli kemik içermeli, greft kolay revaskülarize olup alıcı yatağa uyum sağlamalı, diş çıkışına engel olmamalı, greft alımı kolay olmalıdır. Ameliyat sonrası morbidite komplikasyonları az olmalıdır. En sık kullanılan kemik donör alanları; iliak krest, mandibula simfizis, kalvariya kemiktir.

İliak Kemik Grefti: Sekonder alveolar kemik greftlemede altın standart olarak iliak krest greftleri kullanılmaktadır. Görüş kolaydır, fazla miktarda kansellöz kemik alınabilir.

Kansellöz kemik içindeki fazla miktarda bulunan osteojenik hücrelerin varlığı ve 3 hafta gibi bir sürede revaskülarize olabilmesi, başarısının % 85-95 olması gibi avantajları bildirilmiştir (Horswell BB ve ark., 2003).Dezavantajları ise, 1-2 hafta kadar sürebilen aksayarak yürümeye neden olabilecek ağrının olması, hastada ikinci bir donör saha oluşması, kısıtlı miktarda kemik alınabilmesi, uzamış ameliyat süresi ve postoperatif hastanede kalış zamanı, enfeksiyon riski, lateral femoral sinir parestezisi riski, bölgede hematoma gelişmesi ve skardır (Eufinger H ve ark.,2000; Dawson KH ve ark.,1996)

Kalvariya Kemik Grefti: Kalvariya kemik grefti alınacak bölgenin, cerrahi sahaya yakın olması, skarın saç çizgisi içinde kalması avantajlarıdır (Frodel Jr JL.ve ark.,1993). Gözlenen ciddi komplikasyon riski düşük olsa da dura ve serebral yaralanma, hematoma, seroma, subdural hemoraji, nörolojik problem ihtimallerinden dolayı özellikle aileler soğuk bakmaktadır (Frodel Jr JL. ve ark.,1993; Kline RM ve ark.,1995) .

Mandibula simfizis Grefti: Membranöz bir kemik olan mandibular kemik greftinin minimal rezorbsiyon gösterdiği ve hızlı revaskülarize olduğuna inanılmaktadır (Enemark H. ve

ark.,2001) Ancak her ne kadar ameliyat alanına yakın olsa da bu alandan alınacak kemik miktarı sınırlıdır (Enemark H. ve ark.,2001; Sindet-Pedersen S.ve ark.,1990)

Literatürde de otojen greftlerin eldesi ile ortaya çıkan donör saha morbiditesi ve komplikasyonlardan kaçınmak için doku mühendisliği stratejileri geliştirilerek greft toplama ihtiyacını en aza indirmek amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik literatürde yapılan çalışmaları 3 başlık altında toplayabiliriz.

1) Otojen kemik greftinin kalitesini arttırmaya yönelik çalışmalar: otojen greftle beraber bölgeye PRP (Lee C.ve ark.,2009; Marukava E. Ve ark, 2011), fibrin glue (Segura-Castillo JL. Ve ark.,2005) veya membran uygulamaları ,(Peled M. ve ark. 2005)

2)Otojen greftin miktarını arttırmaya yönelik çalışmalar: otojen greftle beraber beta trikalsiyum fosfat (Wejis WLJ.ve ark., 2010) veya deproteinize sığır kemiği uygulamaları, (Thuaksuban N.ve ark., 2010)

3) Sentetik materyallerin otolog kemiğin yerine kullanıldığı çalışmalar: kollojen sünger üzerinde BMP-2 (Herford AS.ve ark, 2007) ,sığır kaynaklı hidsroksiapatit greft (Benlidayı ME.ve ark., 2013) veya rezorbe matriks üzerinde kemik iliği kaynaklı kök hücre uygulamalarıdır. (Gimbel M. ve ark., 2007).

3. başlıktaki çalışmalar hastada ikinci bir donör saha oluşturmada tedavi etmeyi amaçlayan çalışmalardır. Ancak, birçok dezavantajları mevcuttur. Maksillomandibuler defektlerin çoğunda kullanılabilen allojenik kemik greftleri düşük antijeniteye sahip olsalar da rejeksiyon riskleri her zaman bulunmaktadır. Enfeksiyona dirençleri olmadıklarından dolayı genellikle enfeksiyon sonucu kaybedilirler. Vericiden alıcıya geçebilecek önemli virüsler : HIV, Jakob-Creutzfeldt hastalığı ve Hepatit oluşturan virüs serileridir (Marx RE. ve ark,1993). Birçok alloplastik materyaller içerisinde, çene yüz bölgesinin rekonstrüksiyonları için hidroksilapatit(HA) ön plana çıkmıştır. HA, kalsiyum fosfat bileşiğinde en temel dezavantaj biyomekanik özelliğindedir. Birçok seramikler gibi bu materyaller kolay kırılabilen ve düşük sıkıştırılma rezistansına sahip materyallerdir. Bu materyallerin kemik oluşumunu indüklediği, osteokonduktif olup ancak sert doku gelişimine uygun oldukları gösterilmiştir (Alpaslan C. ve ark,1994; Salyer KE. ve ark., 1987). Salyer ve Hail kemiğin HA ile tamamen yer değiştirmesinin gerçekçi bir beklenti olmayacağını belirtmişlerdir (Salyer KE. ve ark., 1987). Ayrıca alloplastik malzemelerin içinden kanin dişin sürüp sürmeyeceği konusu halen tartışmalıdır (Feinberg SE.ve ark, 1988; Merkx MA ve ark.,1997; Araújo MG ve ark., 2001). Greftlerdeki tüm bu avantaj ve dezavantajlar göz önüne alındığında alveolar yarık onarımı için hastalarda günümüzde diğer hastalıkların tedavisinde umut vaat eden hücresel tedavi ürünleri ile onarım ihtiyacı oldukça açıktır.

Kök hücreler; kendisini sürekli yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan hücreler olarak tanımlanmaktadır (Bickenbach JR. ve ark, 2005, Taşlı NP.ve ark,2013) MKH'ler salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. Hasarlı hücrelerin iyileşmesinde sekrete ettikleri çok sayıda biyoaktif molekülün yardımıyla enflamasyonu inhibe eder ve immün sistem modülasyonu sağlarlar. Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı klinik uygulamalar için büyük ilgi uyandırmaktadır (Liu Y.ve ark.,2013; Elsharawy M. ve ark,2011). Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği 2006 yılında standart tanımlama kriterlerine göre MKH'ler; i) Standart kültür ortamlarında plastik ortama yapışmalıdır (adherasyon), ii) Yüzeylerinde CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini taşımalı CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alfa, CD19, HLA-DR gibi diğer hücrelere ait olabilecek belirteçleri taşımamalıdır, iii) In-vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdaga dönüşebilmelidir.

MKH'ler erişkin birçok dokudan elde edilebilir. 2000 yılında Gronthos (Gronthos S.ve ark., 2000) ve arkadaşları dental pulpadan kök hücre elde ettiklerini bildirdikten sonra 2003 yılında Miura ve arkadaşları insan süt dişlerinin pulpalarının da MKH 'ler barındırdığını bildirmişlerdir (Miura M.ve ark.,2003). Süt dişi kaynaklı MKH'ler yüksek proliferasyon, klonojenik ve multidiferansiasyon kabiliyetine sahiptir. Diğer erişkin kaynaklara göre daha kolay elde edilebilir olması, hastada ikinci bir donör saha yaratmaması avantajları arasındadır. Kemik iliği kaynaklı MKH 'ler ile karşılaştırıldığında daha immatür olduğu ve dolayısı ile daha çok çoğalma kapasitesi olduğu bildirilmiştir (Miura M.ve ark.,2003). Dental pulpa kaynaklı MKH'lerin osteojenik, dentinojenik, adipojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik farklılaştırılabildiği bildirilmiştir (Graziano A.ve ark,2008; Laino G.ve ark.,2005; Risbud MV.ve ark.2005). Literatürde daha sıklıkla odontogenezis çalışmalarında kullanılıyor olsa da dental pulpa kaynaklı MKH'in osteoindüktif kemik faktörleri (BMP) salgıladığı ve osteoblast oluşturabildiği invivo ve invitro çalışmalar ile gösterilmiştir (Graziano A.ve ark,2008; Li JH ve ark.,2011; Lee K.ve ark. 2009) Klinik olarak dental pulpa kaynaklı MHK ile kemik rejenerasyonu literatürde aynı ekibe ait 2 çalışma ile bildirilmiştir. Riccardo d'Aquino ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında mandibuler kemik defektlerinin onarımında kollojen sünger scaffold (iskelet) olarak kullanıp üzerine çekilmiş alt 20 yaş dişlerinden elde edilen dental pulpa kaynaklı kök hücreleri uygulamışlardır. 7 hastalık seride dental pulpal kök hücrelerin kemik rejenerasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (d'Aquino R.ve ark, 2009). Herhangi bir komplikasyon veya yan etki bildirmemişlerdir.2013 yılında aynı

araştırmacılar tarafından rejenere dokunun yüksek dansitede kemik yapı olduğunu ve tamamen vaskularize olduğunu bir önceki yayınlarındaki hastalarının 3 yıllık takibi ile bildirmişlerdir (Giuliani A.ve ark, 2013). Farelerde HA/trikalsiyum scaffold (Otaki S. ve ark, 2007) ve ratlarda PLGA scaffold (Graziano A.ve ark,2008) ile dental pulpa kaynaklı MKH ‘ın subkutanöz implantasyonu sonrası mineralize doku oluşumu invivo olarak gösterilmiştir. Gerçek bir kemik defekti varlığında mikroçevrenin de etkisi ile anjiyogenezis ve kemik remodelasyonunun daha da iyi olabileceği düşünülebilir.

Pourebrahim ve ark. 2013 yılında köpeklerde alveolar yarık onarımında betatrikalsiyum fosfat/ HA üzerinde adipoz kökenli MKH uygulamıştır. Kemik rejenerasyonunun otojen gruba göre daha az olduğunu ancak bu alanda bir alternatif olabileceğini bildirmişlerdir (Pourebrahim N.ve ark.,2013). Bizim projemizin sonuçları da Pourebrahim ve ark. (2013) sonuçları ile uyumludur.

PLGA bir biyomateryal olarak sahip olduğu özellikleri sayesinde peptid, protein ve ilaçların kontrollü salımında yaygın olarak kullanılmaktadır. PLGA insanlarda kullanılmak üzere U. S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylı biyo-bozunur polimerdir. Bu polimerlerin fizyolojik çevre ile biyo-uyumluluğunun olduğu, polimerin degradasyonu sonucu ortaya çıkan ürünlerin vücut tarafından dışarı atıldığı bilinmektedir. PLGA fiziksel olarak dayanıklı, hidrofobik ve esnek bir malzemedir. Tüm bu özellikler PLGA’ yı ilaç ve hücre taşınması için uygun kılmaktadır (Pan Z.ve ark, 2012; Zhu S.ve ark.,2013) Kemik rejenerasyonunu arttırmak amacı ile yeni iskeletler ile ileri çalışmalar planlanabilir.

Çalışmamızın sonucunda, tavşanlarda deneysel olarak hazırlanan alveolar yarık onarımında DPKMKH’lerin yeni kemik oluşumuna osteoblast sayısı ve anjiyogenezi arttırarak olumlu katkı sağladığını tespit ettik. Kemik rejenerasyonu otojen kemik uygulanan gruba göre daha az olsa da klinik uygulamalar göz önünde tutulduğunda yeni alternatif bir yöntem olabilecektir.

KAYNAKLAR

ALPASLAN C, Alpaslan G, Oygür T., Bone Reaction to Subperiosteally implanted Hydroxyapatite/ Collagen/ Glycosaminoglycans and Coral in the Guine Pig ,Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 77: 335-40, (1994).

ARAÚJO MG, Carmagnola D, Berglundh T, et al, Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs, J Clin Periodontol ,28:73, (2001).

BEHNİA H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R. ,Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, Aug;108(2):e1-6,(2009).

BEHNİA H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A., Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report, J Craniomaxillofac Surg, Jan;40(1):2-7,(2012).

BENLIDAYI ME, Tatli U, Kurkcu M, Uzel A, Oztunc H, Comparison of Bovine-Derived Hydroxyapatite and Autogenous Bone for Secondary Alveolar Bone Grafting in Patients With Alveolar Clefts, J Oral Maxillofac Surg 70:e95-e102, (2012).

BICKENBACH JR, Stern MM., Plasticity of epidermal stem cells: survival in various environments, Stem Cell Rev, 1(1):71-7, (2005).

C. LEE, K. Nishihara, T. Okawachi, Y. Iwashita, H. J. Majima, N. Nakamura, A quantitative radiological assessment of outcomes of autogenous bone graft combined with platelet-rich plasma in the alveolar cleft, Int. J. Oral Maxillofac. Surg, 38: 117–125, (2009).

CARTER L, Farman AG, Geist J, et al., American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology executive opinion statement on performing and interpreting diagnostic cone beam computed tomography, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo, 106: 561-562,(2008).

CHANG IC, Tsai CH, Chang YC, Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signalregulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts, J Biomed Mater Res A, 95:327- 332,(2010).

COHEN M, Polley JW, Figueroa AA., Secondary alveolar bone grafting, Clin plast surg, 20: 691,(1993).

D'AQUINO R, De Rosa A, Lanza V et al, Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes, Eur Cell Mater, 18:75– 83,(2009).

DAWSON KH, Egbert MA, Myall RW., Pain following iliac crest bone grafting of alveolar clefts, J Craniomaxillofac Surg, 24:151–4,(1996).

DOHAN DM, Choukroun J, Diss A et al., Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod , 101:e37-44,(2006).

ELSHARAWY M, Naim M, Greish S, Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 14 :288–293, (2012).

ENEMARK H, Krantz-Simonsen E, Schramm JE. , Secondary bonegrafting in unilateral cleft lip palate patients: indications and treatment procedure, *Int J Oral Surg*, Feb;14(1):2-10,(1985).

ENEMARK H, Jensen J, Bosch C., Mandibular bone graft material for reconstruction of alveolar cleft defects: long-term results, *Cleft Palate Craniofac J*, 38: 155–63,(2001).

EUFINGER H, Leppänen H., Iliac crest donor site morbidity following open and closed methods of bone harvest for alveolar cleft osteoplasty, *J Craniomaxillofac Surg*, 28:31–8,(2000).

FEINBERG SE, Vitt M, Effect of calcium phosphate ceramic implants on tooth eruption, *J Oral Maxillofac Surg* ,46:124, (1988).

FROMEL JR JL, Marentette LJ, Quatela VC, Weinstein GS., Calvarial bone graft harvest. Techniques, considerations, and morbidity, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*,119:17–23,(1993).

GIMBEL M, Ashley RK, Sisodia M, Gabbay JS et al, Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix, *J Craniofac Surg*, Jul;18(4):895-901,(2007).

GIULIANI A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, d'Aquino R, Tirino V, Papaccio G., Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications, *Stem Cells Translational Medicine*, 2: 316–324,(2013).

GRAZIANO A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G., Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration, *Stem Cell Rev*, 4(1):21–6,(2008).

GRONTHOS S, Mankani M, Brahimi J, et al, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Dec 5;97(25):13625-30, (2000).

HERFORD AS, Boyne PJ, Rawson R, Williams RP, Bone morphogenetic protein-induced repair of the premaxillary cleft, *J Oral Maxillofac Surg* , 65(11):2136–2141, (2007).

HIBI H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y, Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material, *Int J Oral Maxillofac Surg*, Jun;35(6):551-5,(2006).

HORSWELL BB, Henderson JM. , Secondary osteoplasty of the alveolar cleft defect, *J Oral Maxillofac Surg*,61: 1082–90,(2003).

KLINE RM, Wolfe SA., Complications associated with harvesting of cranial bone grafts, *Plast Reconstr Surg*, 95: 5–20,(1995).

LAINO G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al, A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB), *J Bone Miner Res*, 20(August (8)):1394–402,(2005).

LEE K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. Cell therapy for bone regeneration—bench to bedside, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 89(1):252–63,(2009).

LI D, Ye C, Zhu Y, Gou Z, Gao C., Enhancement of osteogenesis by poly(lactide-co-glycolide) sponges loaded with surface-embedded hydroxyapatite particles and rhBMP-2, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, May;100(4):1103-13, (2012)

LI JH, Liu DY, Zhang FM, Wang F, Zhang WK, Zhang ZT, Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering, *Chin Med J (Engl)*, 124(23):4022–8,(2011).

LIU Y, Li Z, Liu T, Xue X, Jiang H, et al, Impaired cardioprotective function of transplantation of mesenchymal stem cells from patients with diabetes mellitus to rats with experimentally induced myocardial infarction, *Cardiovascular Diabetology*, 10.1186/1475-2840-12-40,(2013).

LITHOVIUS RH, Ylikontiola LP, Harila V, Sándor GK., A descriptive epidemiology study of cleft lip and palate in Northern Finland, *Acta Odontol Scand*, Nov 21,(2013).

MARUKAWA E, Oshina H, Lino G, Morita K, Omura K, Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 39 :278e283, (2011).

MARX R E, Carlson E R., Tissue Banking Safety: Caveats and Precautions for the Oral and Maxillofacial Surgen, *J Oral Maxillofac Surg* 51,1372-1379, (1993).

MERKX MA, Maltha JC, van't Hoff M, et al, Tooth eruption through autogenous and xenogenous bone transplants: A histological and radiographic evaluation in beagle dogs, *J Craniomaxillofac Surg* , 25:212, (1997).

MIURA M, Gronthos S, Zhao M,et al, SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, May 13;100(10):5807-12, (2003).

OTAKI S., Ueshima, S., Shiraishi, K., Sugiyama, K., Hamada, S., Yorimoto, M., and Matsuo, O., Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice, *Cell Biol Int*, 31, 1191, (2007).

PAN Z, Ding J et al, Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine, *Interface Focus*, 6;2(3):366-77,(2012).

PELED M, Aizenbud D, Horwitz J, Machtei EE.,Treatment of osseous cleft palate defects: a preliminary evaluation of novel treatment modalities, *Cleft Palate Craniofac J*, Jul;42(4):344-8,(2005).

PISCIOTTA A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Gibellini L, et al., Human Serum Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo, *PLoS ONE*, 7(11), (2012)

POUREBRAHIM N, Hashemibeni B, Shahnaseri S et al, A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs, *Int J Oral Maxillofac Surg*, May;42(5):562-8,(2013).

RISBUD MV, Shapiro IM, Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering, *Orthod Craniofac Res*, 8(2):54–9,(2005).

SALYER KE, Taylor DB., Bone Grafts in Craniofacial Surgery, *Clinics in Plastic Surgery*, 14 (1) : 27-34, (1987).

SAMESHIMA GT, Banh DS, Smahel Z, Melnick M. , Facial growth after primary periosteoplasty versus primary bone grafting in unilateral cleft lip and palate, *Cleft Palate Craniofac J*,33: 300-5,(1996).

SCHULZE D, Heiland M, Thurmann H, Adam G., Radiation exposure during midfacial imaging using 4- and 16-slice computed tomography, cone beam computed tomography systems and conventional radiography, *Dentomaxillofac Radiol*, 33: 83-86,(2004).

SEGURA-CASTILLO JL, Aguirre-Camacho H, González-Ojeda A, Michel-Perez J, Reduction of bone resorption by the application of fibrin glue in the reconstruction of the alveolar cleft, *J Craniofac Surg*, Jan;16(1):105-12,(2005).

SINDET-PEDERSEN S, Enemark H., Reconstruction of alveolar clefts with mandibular or iliac crest bone grafts: a comparative study, *J Oral Maxillofac Surg*, 48: 554–60,(1990).

SÌMONPIERÌ A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM., The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: a new grafting protocol, *Implant Dent* ,18:102-111,(2009).

SKOOG T. ,The use of periosteal flaps in the repair of the primary palate, *Cleft Palate J*,2: 332-9,(1965).

TACHIMURA T, Hara H, Koh H. , Effect of temporary closure of oronasal fistulae on levator veli palatini muscle activity, *Cleft Palate Craniofac J*, 34: 505,(1997).

TAŞLI PN, Doğan A, Demirci S, Şahin F., Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro, *Biol Trace Elem Res*, Jun;153(1-3):419-27,(2013).

THUAKSUBAN N, Nuntanaranont T, Pripatnanont P, A comparison of autogenous bone graft combined with deproteinized bovine bone and autogenous bone graft alone for treatment of alveolar cleft, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*,39: 1175–1180,(2010).

WEIJS WL, Siebers TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Bergé SJ, Meijer GJ, Borstlap WA., Early secondary closure of alveolar clefts with mandibular symphyseal bone grafts and b-tri calcium phosphate (b-TCP), *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*, 39: 424–429,(2010).

ZHU S, Zhang B, Man C, Ma Y et al, Combined Effects of Connective Tissue Growth Factor-modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and NaOH-treated PLGA Scaffolds on Repair of Articular Cartilage Defect in Rabbits, *Cell Transplant*, Jul 11, (2013).

