

백서두개골 결손부에서 천연물유래 탄산칼슘염 골대체의 골치유에 관한 조직계측학적 평가

이충호¹, 장제희², 이재목¹, 서조영¹, 박진우^{1*}

1. 경북대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

2. 경북대학교 대학원 치의학과 치주과학교실

Histomorphometric evaluation of bone healing with natural calcium carbonate-derived bone substitutes in rat calvarial defect

Chung-Ho Lee¹, Je-Hee Jang², Jae-Mok Lee¹, Jo-Young Suh¹, Jin-Woo Park^{1*}

1. Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

2. Department of Periodontology, Graduate School of Dentistry, Kyungpook National University

ABSTRACT

Purpose: This study investigated the osteoconductivity of natural calcium carbonate-derived bone substitutes, hen eggshell (ES), and compared with those of commercial bone substitutes.

Materials and Methods: Osseous defects created in the rat calvaria were filled with particulated ES(ES-1), ES with calcium-deficient hydroxyapatite surface layer (ES-2), Biocoral(Inotek, France), and Bio-Oss(Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland). After 4 and 8 weeks of healing, histomorphometric analysis was performed to evaluate the amount of newly formed mineralized bone area (NB%).

Results: Histologic and histomorphometric analysis showed new bone formation and direct bony contact with the grafted materials in all groups. At 4 weeks, Biocoral group showed greater NB% compared to Bio-Oss and ES-1 groups ($P<0.05$). At 8 weeks, Biocoral and ES-2 groups showed significantly greater NB% compared to Bio-Oss group ($P<0.05$).

Conclusion: These results indicate that natural calcium carbonate-derived bone substitutes with microporous calcium-deficient hydroxyapatite surface layer may be an effective materials treating osseous defects. (*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:83-90)

KEY WORDS: bone substitute; calcium carbonate; osteoconductivity; histomorphometry.

서론

자가골은 골결손을 회복하기 위한 가장 이상적인 이식재이지만 채득을 위한 추가적인 수술부위가 필요하고 이로 인한 합병증 발생의 가능성이 있으며, 구강내 공여부의 위축이 심한 경우 채취량의 한계가 있다는 단점을 지닌다. 이로 인해 자

가골 이식재를 대체하기 위한 골대체재에 관해 많은 연구, 개발이 이루어져 왔다. 이 중 탄산칼슘염(CaCO_3) 조성의 산호가 치과와 정형외과 영역에서 골결손을 치유하기 위한 주요한 골 이식재의 하나로 원래의 아라곤나이트(aragonite) 형태나 수열반응을 통해 수산화인회석(hydroxyapatite)으로 전환된 두 가지 형태로 사용되어진다¹⁻³⁾. 산호유래의 탄산칼슘염은 생체 내에서 완전히 흡수되며, 골형성의 개시에 필요한 탄산인회석(carbonated apatite) 단계로의 표면전환과정이 필요하지 않기 때문에 다른 골대체재에 비해 신속한 골형성을 이룰 수 있는 것으로 알려졌다^{3,4)}. 이와 더불어 현재 사용중인 여러 종류의 골대체 중 하나인 우골에서 유래한 이중골 이식재인 Bio-Oss(Geistlich Pharma, Wolhusen, 스위스)는 임플란트와 연관

Correspondence: Dr. Jin-Woo Park

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1, Samduk 2Ga, Jung-Gu, Daegu 700-412, Korea

e-mail: jinwoo@knu.ac.kr, Tel: 82-53-420-5954, Fax: 82-53-257-6883

* 본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A060106).

접수일: 2008년 3월 3일; 채택일: 2008년 3월 12일

한 골증강수술과 치주결손부의 회복에 있어서 광범위하게 사용되어지고 있다⁵⁻⁷⁾.

산호와 유사한 광물조성을 가지는 것으로 알려진 조류의 난각은 약 95%의 탄산칼슘염으로 이루어져 있으며, 칼사이트(calcite)상으로 존재한다. 이러한 난각을 골대체재로서 사용하기 위한 시도가 있었으며, 이에 관한 소수의 연구는 블록형태 또는 분쇄된 형태의 타조의 난각(Ostrich eggshell)은 실험동물의 골결손부에서 대부분 섬유성결합(fibrous union)에 의해 치유된 양상을 보고하였다⁸⁻¹⁰⁾. 타조의 난각에 비해 두께가 얇고 치밀성이 덜한 닭의 난각은 구하기가 쉽고, 질병전염성의 가능성을 완전히 배제할 수 없는 이종골 이식재인 우골이나 동종골 이식재인 탈회동결건조골에 비해 멸균이 용이하다는 장점을 지닌다. 최근의 골이식재의 표면개질에 관한 연구에서 고온, 고압의 혹독한 반응조건을 이용하지 않고 비교적 온화한 반응조건의 생체모방법(biomimetic method)을 이용하여 형성된 칼슘포스페이트층 코팅이 표면의 미세다공성 특성과 증가된 반응성으로 인해 골이식재로 사용시 장점을 지닐 수 있을 것으로 제시되었다¹¹⁻¹³⁾.

본 연구에서는 생체 내에서 완전히 흡수되며 생체적합성을 지닐 것으로 기대되는 닭의 난각을 이용하여 생체모방법에 의해 추가적인 처리를 시행한 골대체재의 골전도성을 평가하고자 하였다. 이를 위해 제조한 이식재를 실험동물의 골결손부에 충전 후 신생골 형성을 포함한 골치유 양상을 상용의 골대체재인 탄산칼슘염 조성의 Biocoral(Inoteb, 프랑스)과 이종골 이식재인 Bio-Oss를 조직계측학적으로 비교, 평가하였다.

재료 및 방법

1. 골이식재의 준비

분쇄된 닭의 난각을 세척과정 후 mill과 sieve를 이용하여 평균 300 μ m의 입자를 준비하였다. 이를 sodium hypochlorite와 sodium hydroxide 용액을 이용하여 기본적인 유기질 제거과정을 거친 후(ES-1), 10 mM의 Ca^{2+} , 2.5 mM의 H_2PO_4^- , 1.5 mM의 HCO_3^- 조성의 과포화 석회화 용액을 이용하여 생체모방법을 통해 칼슘조성이 부족한 수산화인회석(calcium-deficient hydroxyapatite, CDHA)으로 구성된 마이크로 단위 표면구조의 코팅층을 가진 골이식재를 제작하였다(ES-2). 다른 추가적인 처리를 시행하지 않은 원래의 난각인 ES-1과 유사한 광물조성을 가진 Biocoral과 이종골 이식재인 Bio-Oss를 대조군으로 사용하였다. 실험에 사용한 각 이식재의 표면형태는 주사전자현미경(S-4300; Hitachi, 일본) 관찰에서 각기 다른 미세표면구조를 나타내었다(Fig. 1).

2. 동물실험

총 16마리의 백서(Sprague-Dawley rat, 평균 체중 350 g)를 사용하였고, 경북대학병원 동물실험연구위원회의 승인하에 본 실험을 시행하였다. Ketamine(Ketara; 유한양행, 대한민국)과 xylazine(Rompun; 유한양행)을 근주하여 전신마취

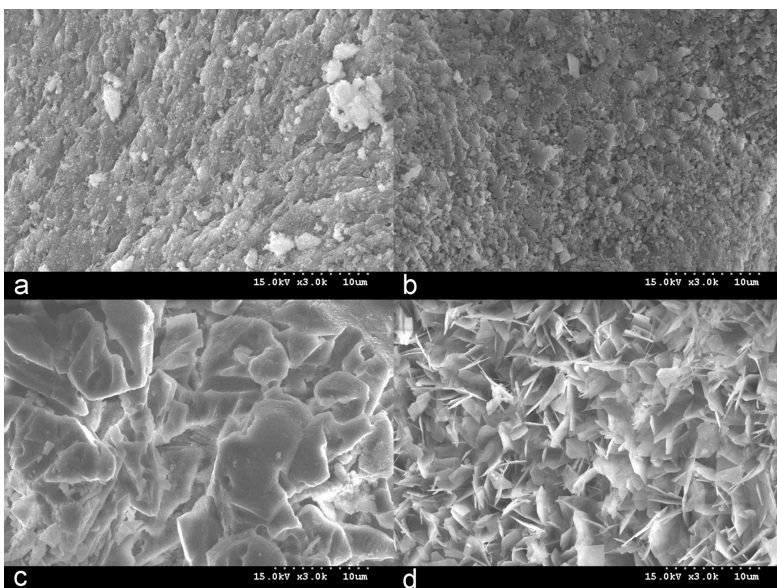


Figure 1. Scanning electron microscope images of Bio-Oss(a), Biocoral(b), ES-1(c), and ES-2(d) at a magnification of $\times 3000$.

시행 후 수술부위를 면도하고 소독하였다. 2% 리도카인(유한양행)을 이용하여 부가적인 국소마취를 시행한 후 두개골의 정중부에 절개를 시행하고, 전층판막을 거상 후 외경 5 mm의 trephine bur(메가젠 임플란트, 대한민국)를 이용하여 양측 성으로 골결손부를 형성하였다. 실험동물은 각 8마리씩 두 군으로 분류하여 실험동물군 1은 각기 좌, 우측 결손부에 Bio-Oss와 Biocoral을 충전하였고, 실험동물군 2는 각기 좌, 우측 결손부에 ES-1과 ES-2를 충전하였다. 수술 4주와 8주 후에 치유기간당 8마리씩, 각 동물군당 4마리씩의 동물을 희생 후 원래의 결손부를 포함한 블록시편을 채취한 후 통상적인 방법에 의해 탈회시편을 제작 후 Masson's trichrome 염색을 시행하여 조직시편을 제작후 조직계측학적 평가를 시행하였다.

3. 조직계측학적 평가

조직계측학적 분석은 광학현미경(BX51; Olympus, 일본)과 이에 연결된 디지털 카메라(CC-12; Soft Imaging System, 독일)를 이용하여 획득한 영상을 컴퓨터 모니터 상에서 이미지 분석시스템(i-Solution; iMTechnology, 대한민국)을 이용하여 trephine에 의해 형성된 전체 결손부내에 존재하는 광물화된 신생골형성량(newly formed mineralized bone area%, NB%)을 정량적으로 분석하였다.

4. 통계분석

각 군의 NB%값을 SAS통계분석시스템을 이용하여 처리 후, one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 각 군 간에 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

결과

1. 조직학적 관찰

1) 실험동물군 1

Bio-Oss를 이식한 결손부는 4주 소견에서 신생골 형성이 주로 결손부 변연에 인접한 부위에 한정되어 관찰되었으며, 일부 경막과 인접한 부위에서 소량의 신생골 형성을 나타내었고(Fig. 2a), 8주 소견에서 신생골 형성은 4주에 비해 약간 증가하였으나 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 결손부의 상당 부분이 섬유성 결체조직으로 채워진 양상을 보였다(Fig. 3a). Biocoral을 이식한 결손부는 4주에서 변연과 인접한 부위에 서뿐만 아니라 중앙 부위에서도 상당량의 신생골 형성이 관찰되었으며(Fig. 2b), 8주 소견에서는 전체 결손부가 신생골로 연결된 치유양상을 나타내었다(Fig. 3b). 4주와 8주에서 신생골 형성을 보인 부위에서 대부분의 이식재가 신생골과의 직접적인 접촉양상을 보였으며, 8주에서 이식된 Biocoral 입자는 상당량 흡수가 진행된 양상을 관찰할 수 있었다.

2) 실험동물군 2

ES-1을 이식한 결손부는 신생골 형성이 4주에서는 주로 결손부 변연과 인접한 부위와 일부 중앙 부위에서 관찰되었고(Fig. 2c), 8주 소견에서는 4주에 비해 신생골 형성이 현저히 증가하여 전체 결손부에 걸친 신생골 형성을 나타내었다(Fig. 3c). 신생골에 의해 둘러싸인 이식재의 외층이 일부 흡수된 양상을 관찰할 수 있었으며, 이 부위에서 신생골은 이식재와 직접적인 접촉 양상을 나타내었다. ES-2를 이식한 결손부의 신생골 형성은 4주에서 결손부 변연과 인접한 부위에서 주로

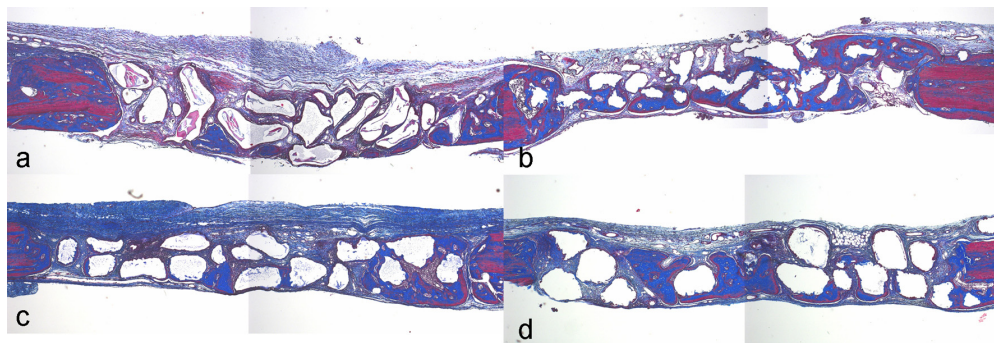


Figure 2. Histological sections of Bio-Oss(a), Biocoral(b), ES-1(c), and ES-2(d) grafted defects at 4 weeks of healing. Stained with Masson's trichrome.

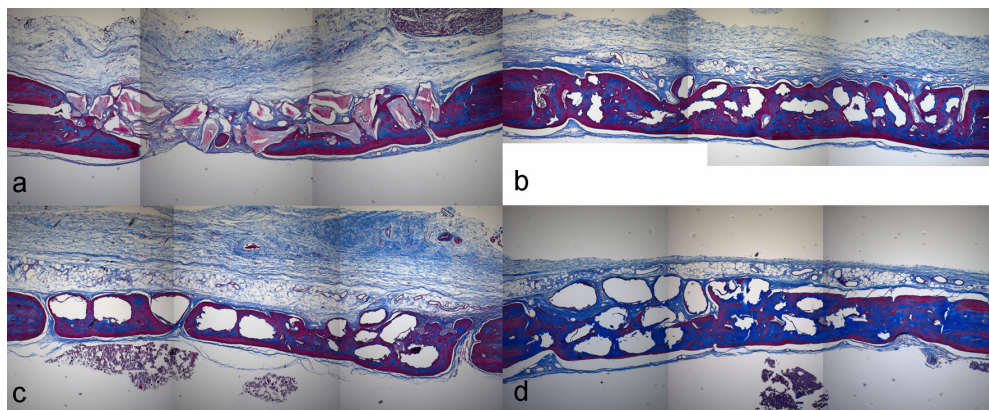


Figure 3. Histological sections of Bio-Oss(a), Biocoral(b), ES-1(c), and ES-2(d) grafted defects at 8 weeks of healing. Stained with Masson's trichrome.

관찰되었지만 중앙 부위에서도 상당량의 신생골 형성을 나타내었다(Fig. 2d). 8주에서 대부분의 결손부가 신생골로 채워진 양상을 보였으며, 신생골에 함유된 이식재는 일부 흡수가 진행된 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3d).

2. 조직계측학적 분석

각 군의 조직계측학적 분석의 결과를 Table 1에 나타내었다. 광물화된 신생골 형성량(NB%)은 이식 4주에 Biocoral 이식군에서 가장 높았으며, 이러한 차이는 Bio-Oss를 이식한 군과 ES-1을 이식한 군과 비교시 통계학적으로 유의하였다($P<0.05$). 8주의 NB%는 Biocoral을 이식한 군과 ES-2를 이식한 군에서 가장 높았으며, 이 두 군의 NB%값은 Bio-Oss를 이식한 군에 비해 통계학적으로 높은 수치를 나타내었다($P<0.05$). 치유기간에 따른 NB%는 모든 군에서 4주에 비해 8주에서 더 증가한 양상을 나타내었지만, 이러한 차이는 Bio-coral과 ES-2를 이식한 군에서만 유의하였다($P<0.05$).

고찰

탄산칼슘염의 광물조성을 가진 산호는 수열반응을 통해 수산화 회석으로 전환된 입자나 블록의 형태 또는 원래의 광물조성을 가진 상태로 우수한 골전도성을 지닌 골이식 대체재로 치과와 정형외과 영역에서 사용되고 있다¹⁻³. 수산화인회석으로 전환되지 않은 산호유래 탄산칼슘염은 생체 내에서 빠른 흡수가 일어나는 것으로 보고되었으며, 다른 종류의 골대체재에 비해 골형성 초기 단계에서 탄산인회석으로의 전환과정을 필요로 하지 않기에 신속한 골형성을 나타낼 수 있는 것으로 제시되었다^{3,4,14}.

타조의 난각은 산호와 유사한 광물조성을 가지며, 이를 골 대체재로 이용하기 위한 소수의 연구가 보고되었다. 하지만 부가적인 처리과정을 시행하지 않은 분말형태의 타조 난각은 실험동물에 이식시 과도한 염증반응은 유발하지 않았으나, 또한 신생골 형성도 극히 제한적이었으며 대부분 섬유성조직에

Table 1. Histomorphometric Analysis of the New Bone Formation (mean \pm SD)

	New bone formation (%)	
	4 weeks (n=4)	8 weeks (n=4)
Bio-Oss	15.1 \pm 3.6 ^A	20.8 \pm 8.4 ^A
Biocoral	34 \pm 7.2 ^B	47.4 \pm 6.5 ^{B*}
ES-1	18.3 \pm 4.3 ^A	33.3 \pm 14.7 ^{AB}
ES-2	22.6 \pm 7.2 ^{AB}	45.4 \pm 9.1 ^{B*}

^{A,B} The same letters are not significant by Tukey's multiple comparison at $\alpha=0.05$.

* Statistically significant difference between two healing periods ($p<0.05$ by *t*-test).

의해 치유된 것으로 보고되었다⁸⁻¹⁰⁾. 본 연구에서는 타조의 난각에 비해 유용성이 좋고 이종골유래 또는 동종골유래 골대체재에 비해 멸균이 용이한 닭의 난각을 부가적인 표면처리를 시행한 분말형태의 이식재로 제조하여 유사한 조성의 Biocoral과 현재 골재생 수술에서 광범위하게 사용되고 있는 생물학적 탄산인회석(biologic carbonated apatite) 상태의 이종골유래 골대체재인 Bio-Oss와 비교하여 실험동물의 골결손부에 이식하여 신생골 형성을 포함한 골전도성을 평가하였다.

백서의 두개골 결손부에 이식한 4주와 8주의 조직계측학적 평가에서 세척과정과 기본적인 유기질 제거과정을 시행 후 부가적인 표면처리과정을 시행하지 않은 분쇄된 난각 이식재인 ES-1은 심각한 염증반응을 유발하지 않으면서 Bio-Oss와 유사하거나 약간 증가한 신생골 형성을 나타내었다. Biocoral을 이식한 골결손부는 4주의 치유기간에서 다른 골대체를 이식한 결손부와 비교시 가장 높은 신생골 형성을 나타내었으며, 이러한 차이는 ES-1과 Bio-Oss군과 비교시 통계학적으로 유의하였으며, 이는 산호유래 탄산칼슘염 이식재가 초기 골형성 반응을 촉진한다는 다른 연구결과와 일치한다^{3,4,14)}. 치유 8주에서 Biocoral을 이식한 결손부에서 상당량의 이식재의 흡수를 관찰할 수 있었으며, 신생골 형성량은 부가적인 표면처리를 시행한 난각 이식재인 ES-2와 유사하였으며, 이들 두 군은 Bio-Oss를 이식한 군과 비교시 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 과포화석회화용액을 이용하여 생체모방법을 통해 다공성의 수산화인회석으로 전환된 표면층을 가진 난각 이식재는 energy dispersive spectroscopy(EDS) 분석에서 약 1.5정도의 Ca/P 비율을 지닌 CDHA의 특성을 나타내었으며, 이는 생체모방법을 이용한 다른 연구의 결과와 유사하였다¹¹⁾. ES-2를 이식한 골결손부는 4주에서는 평균 신생골 형성량이 Biocoral보다는 낮은 경향을 나타내었지만, 8주에서는 거의 유사하였으며 5 mm 크기의 골결손부가 완전한 골가교(bony bridging)에 의해 치유된 양상을 나타내었다.

백서의 두개골에서의 임계크기결손(critical size defect)은 직경 약 8 mm인 것으로 알려졌으나^{15,16)}, 많은 연구에서 4~6 mm 크기의 골결손부를 이용한 경우에서도 골전도성을 평가하는데 있어서 의미가 있는 것으로 제시되었다¹⁷⁻²⁰⁾. 이러한 골결손부 모델은 8 mm 크기의 임계크기결손 모델에 비해 시술이 용이하고 또한 술 후 합병증의 가능성도 낮아 제한된 치유기간이 부여된다면 유용한 결손부 모델이 될 것이다

^{18,20)}. 실험동물에 이식된 골대체재의 신생골 형성과 관련한 많은 연구에서 몇몇 연구는 오히려 충전된 이식재가 자연적인 골형성을 저해하는 것으로도 보고하였다^{18,19,21-25)}. 골유도재 생물 모델을 이용한 Bio-Oss의 골전도성에 관한 연구와 더불어^{21,22)}, Handschel 등²³⁾은 Wistar rat의 두개골에 형성한 비임계크기 결손부에 이식된 삼인산칼슘인산염(tricalcium phosphate) 이식재가 술 후 6개월에서 완전한 골치유 양상을 보인 이식재를 충전하지 않은 대조군에 비해 대부분 섬유성조직으로 치유가 일어난 것으로 보고하였다. 관련 예비연구에서 백서두개골에서 5 mm 크기의 결손부 모델은 치유 8주에서 이식재를 충전하지 않은 대조군에서도 일부 결손부의 완전한 골가교 양상을 나타내었다. 하지만 이식재를 충전한 군에 비해 원래의 결손부 두께는 회복하지 못하여 양호한 골전도성을 지닌 이식재를 충전할 경우 원래의 결손부 크기의 회복이라는 관점에서 볼 때 완전한 치유양상은 기대할 수 없다는 단점을 지닌다. 4 mm 크기의 백서두개골 결손부를 이용한 다른 연구에서 실험에 사용된 여러 종류의 이식재는 4개월의 치유과정에서도 일부 합성골 이식재가 신생골 형성을 오히려 저해함을 보고하였고, 골전도성이 양호한 이식재를 사용시 이식재를 충전하지 않은 대조군에 비해 현저히 우수한 신생골 형성을 나타내지는 않았지만, 신생골에 잘 융합된 이식재가 골가교를 촉진함으로써 결손부를 효과적으로 회복함을 보고하였다²⁰⁾. 상기의 여러 논문의 결과를 참조하여 백서두개골에서의 5 mm 크기의 결손부 모델이 시술의 편의성, 그리고 적절한 치유기간을 이용한다면 이식재의 골전도성을 평가하는데 있어서 유용한 모델이 될 것으로 생각되어 본 연구에 이용하였다. 5 mm 크기의 백서두개골 결손부 모델을 이용한 본 실험의 조직계측학적 평가에서 난각유래 이식재는 8주의 치유기간에서 우수한 신생골 형성을 보였고, 비임계크기결손부의 자연적인 골치유과정을 저해하지 않는 것으로 나타났다.

골이식재의 골형성능은 이식재의 화학적 조성뿐만 아니라 마이크론 단위의 미세표면구조가 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{26,27)}. 생체모방법을 통해 형성된 마이크론 크기의 얇은 판상형 표면형태를 가진 CDHA 특성의 ES-2이식재는 증가된 표면적과 부가적인 미세다공성의 구조로 인해 체액내의 성장인자 등을 포함하여 골형성 과정을 촉진할 수 있는 단백질의 흡입을 촉진함으로써 추후 골형성에 관여하는 세포의 활성을 촉진하는데 기여함으로써 신생골 형성을 증진한

것으로 생각된다²⁸⁻³⁰⁾. 치밀한 형태와 1.67의 Ca/P비율을 가지는 수산화인회석에 비해 생체모방법으로 제조된 칼슘조성이 낮은 불완전 결정성의 인회석결정은 생체 내에서 흡수가 높고 이로 인해 체내 칼슘과 포스페이트 이온의 방출을 증가함으로 결정도가 높은 인회석에 비해 반응성이 높은 것으로 알려졌다^{31,32)}. 이에 비해 이중골 이식재인 탄산인회석 조성의 Bio-Oss는 소수의 동물실험 결과를 제외하면, 생체 내에서 흡수가 매우 더디거나 거의 일어나지 않는 것으로 알려졌으며, 이로 인해 이식재와 조직의 계면에서의 충분한 이온의 방출과 칼슘포스페이트층의 재침착이 지연됨으로 인해 본 실험에 사용된 다른 이식재와 비교시 비교적 낮은 신생골 형성을 나타낸 것으로 생각해 볼 수 있다³³⁻³⁵⁾. 결론적으로 본 연구결과를 통해 백서의 두개골 결손부에 이식된 난각유래의 골대체재는 양호한 신생골 형성을 나타내었으며, 분쇄된 난각분말을 유기물제거과정을 포함하여 적절한 표면처리과정을 동반할 경우 우수한 골전도성을 가진 골대체재로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Coughlin MJ, Grimes JS, Kennedy MP. Coralline hydroxyapatite bone graft substitute in hindfoot surgery. *Foot Ankle Int* 2006;27:19-22.
- Velich N, Nemeth Z, Toth C, Szabo G. Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. *J Craniofac Surg* 2004;15:38-41.
- Yukna RA, Yukna CN. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1998;25:1036-1040.
- Guillemin G, Patat JL, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res* 1987;21:557-567.
- Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol* 2000;71:1015-1023.
- Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Gera I, Reich E. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) combined with a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:259-267.
- Valentini P, Abensur DJ. Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:556-560.
- Dupoirieux L, Pourquier D, Souyris F. Powdered eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. *J Craniomaxillofac Surg* 1995;23:187-194.
- Dupoirieux L, Neves M, Pourquier D. Comparison of pericranium and eggshell as space fillers used in combination with guided bone regeneration: An experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:40-46.
- Dupoirieux L, Pourquier D, Neves M, Teot L. Resorption kinetics of eggshell: an in vivo study. *J Craniofac Surg* 2001;12:53-58.
- Li F, Feng QL, Cui FZ, Li HD, Schubert H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surf Coat Technol* 2002;154:88-93.
- Choi JS, Bobdnaski D, Koller M et al. Calcium phosphate coating of nickel-titanium shape-memory alloys. Coating procedure and adherence of leukocytes and platelets. *Biomaterials* 2003;24:3689-3696.
- Tas AC, Aldinger F. Formation of apatitic calcium phosphates in a Na-K-phosphate solution of pH 7.4. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:167-174.
- Vuola J, Goransson H, Bohling T, Asko-Seljavaara S. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* 1996;17:1761-1766.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defects as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;2:237-293.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defects as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Orthop* 1986;205:299-308.
- Blom EJ, Klein-Nulend J, Yin L, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor β -1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:609-616.
- Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998;9:310-316.
- Donos N, Lang NP, Karoussis I et al. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or

- enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:101-111.
20. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 2004;26:475-482.
21. Slotte C, Lundgren D. Augmentation of calvarial tissue using non-permeable silicone domes and bovine bone mineral. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:468-476.
22. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:137-143.
23. Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U et al. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 2002;23:1689-1695.
24. Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K et al. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *J Craniofac Surg* 2005;16:63-70.
25. Conejero JA, Lee JA, Ascherman JA. Cranial defect reconstruction in an experimental model using different mixtures of bioglass and autologous bone. *J Craniofac Surg* 2007;18:1290-1295.
26. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:195-200.
27. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratio of HA/-TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1992;63:729-723.
28. Wang C, Duan Y, Markovic B et al. Proliferation and bone-related gene expression of osteoblasts grown on hydroxyapatite ceramics sintered at different temperature. *Biomaterials* 2004;25:2949-2956.
29. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RAJ et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:779-788.
30. Yuan H, Zou P, Yang A et al., Zhang X, de Bruijn JD, de Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:717-721.
31. Neo M, Nakamura T, Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite formation of three kinds of bioactive materials at an early stage in vivo: A comparative study by transmission electron microscopy. *J Biomed Mater Res* 1993;27:999-1006.
32. Yubao L, Klein CPAT, Xingdong Z, de Groot K. Formation of a bone apatite-like layer on the surface of porous hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 1994;15:835-841.
33. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:241-249.
34. Yildirim M, Spiekermann H, Handt A, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histological and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:23-33.
35. Sartori S, Silvestri M, Forni F et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:369-372.