

가토 두개골 결손부에 이식된 β -TCP의 골치유과정에서 맥동전자기장의 영향에 관한 연구

김상우 · 황경균 · 임병섭 · 박창주 · 정일혁* · 백승삼** · 심광섭

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과,

*서울대학교 보라매 병원 구강악안면외과, **한양대학교 의과대학 병리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:360-373)

THE EFFECT OF PULSED ELECTROMAGNETIC FIELDS ON β -TCP GRAFT IN RABBIT CRANIAL BONE DEFECT

Sang-Woo Kim, Kyung-Gyun Hwang, Byung-Sup Lim, Chang-Joo Park,
Il-Hyuk Chung*, Seung-Sam Paik**, Kwang-Sup Shim

Department of Dentistry/Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine Hanyang University

**Department of Dentistry/Oral and Maxillofacial Surgery, Seoul National University Boramae Hospital*

***Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University*

The purpose of this research was to investigate whether pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation applied to the rabbit cranial defects grafted with β -tricalcium phosphate (β -TCP) could affect the new bone formation.

With 16 New Zealand white rabbits under the same condition, bilateral calvarial bone defects were formed around the sagittal suture line. The defect on the left side was grafted with β -TCP, while on the right side was grafted by harvested autogenous bone. PEMF was applied to 8 rabbits for 8 hours per day. The bony specimen were divided into 3 groups, the group 1 was autogenous bone grafted specimen, the group 2 was β -TCP grafted with PEMF, and the group 3 was β -TCP grafted without PEMF. We investigated the bone regeneration & growth factor expression at 2, 4, 6, and 8 weeks.

As a result, BMP 2 was expressed in the group 1 from 2 weeks, the group 2 from 4 weeks, and the group 3 from 6 weeks. BMP 4 was expressed in the group 1 from 2 weeks, in the group 2 and the group 3 from 4 weeks. 4. There was no significant difference in expression pattern of BMP 7, PDGF, VEGF, and TGF- β 1 during grafted bone regeneration in group 1, 2, and 3.

According to our results, PEMF stimulation could be effective on the new bone formation in animal study, and have a feasibility of clinical use.

Key words: Pulsed electromagnetic field (PEMF), Autogenous bone, β -tricalcium phosphate (β -TCP), Osteogenesis

I. 서 론

구강 악안면 영역의 골 결손은 치아소실, 치주질환, 악안면 외상 및 종양 등에 의해서 야기될 수 있다. 이러한 골 결손을 회복하기 위한 골이식 재료로 가장 효과적인 재료는 자가골이라 할 수 있다. 자가골은 동종골이나 이종골에 비해 교차 감염 가능성과, 이식면역반응이 없다는 장점을 가지고 있지만, 채취하는 과정에서 환자의 불편감과 두려움, 수술시간의 증가, 부

가적인 수술과 감염가능성, 공여부의 이차적인 흉터의 발생, 공여할 수 있는 골의 양의 제한성 등 많은 한계를 가지고 있다¹⁾. 이러한 한계로 인해서 동종골, 이종골, 인공골 등이 개발되고 소개되어지고 있지만, 동종골과 이종골 또한 전염성 질환의 감염 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 면에서, 생체친화성이 우수한 수산화인회석, 생체유리, 생체도재, 생체중합체 등의 인공 골대체 물질들이 연구되고 임상에서 사용되고 있다^{2,3)}. 합성골은 직접 골형성을 일으키기 보다는 골형성 세포가 기능할 수 있는 생체적 환경을 조성하는 비계(scaffold)의 역할을 하게 된다. 따라서 개발되고 있는 인공 골대체 재료의 골형성 과정을 촉진 또는 골형성을 증가시키기 위하여 골유도재생술, 피브린 글루, 혈소판 농축, 자가골과의 혼합, 골형성 세포를 직접 유도할 수 있는 골형성 단백질(BMP, bone morphogenic protein)의 첨가, 전기적 자극 및 맥동전자기장의 적용 등 여러 방법들로 시도되고 있다.

황 경 균

서울 성동구 행당동

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

Kyung-Gyun Hwang

Division of OMFS, Department of Dentistry College of Medicine, Hanyang Univ.

Hangdang-Dong, Sungdong-Gu, Seoul, 133-792, Korea

Tel: 82-2-2290-8676 Fax: 82-2-2290-8673

E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

전기 자극의 골조직에 대한 적용은 1953년 Yasuda⁹⁾가 골에서 기계적 응력에 의해서 미세한 전압이 발생됨을 발견하여 이를 압전기현상(piezoelectricity)이라 명명하였고, 이 미세 전류로 인하여 골형성이 촉진됨을 보고한 이후^{6,7)}, 정형외과분야에서 전기장 발생을 이용하여 골절부의 비유합을 치료하는데 많은 연구가 있었다⁸⁾. 치과역영에서는 Braden 등⁹⁾이 건조 하악골과 상아질에서의 전기적 성질에 대해서 연구하였으며, Cochran 등¹⁰⁾은 구강내 환경에서 치아와 골에 전기적인 영향을 줄 수 있는 요인들을 보고하였고, Norton¹¹⁾은 교정영역에서의 생전기적 효과에 대해서 고찰한 후 구개열 환자의 성장에 있어서 전기 자극을 이용한 치료 가능성을 제시하였다. 그리고, Vingerling 등¹²⁾은 골이식과 발치와에서 전기 자극이 골흡수를 막아준다는 보고를 하였고, Branham 등¹³⁾은 냉동 건조골 이식에서 전기 자극 효과에 대해 연구하였으며, Steiner 등¹⁴⁾은 임프란트와 골에서의 전기적 자극에 관하여 연구하였다.

맥동전자기장 자극법은 흔히 유도성 결합 전자기장이라고도 한다. 이는 전극을 삽입하지 않기에 수술부위의 감염을 막을 수 있으며, 적용되는 전자기장을 일정하게 유도할 수 있다. 맥동전자기장 장치는 두개의 원형 코일을 코일의 반경만큼의 간격이 되게 하고, 이들 코일들은 평행이 되게 설치하고, 맥동성 전류를 흘려 평등자계를 형성하게 한다. 펄스파 자계의 파형의 모양은 여러 가지로 변화시켜서 사용하는데, 치료의 대상과 부위에 따라 파형과 주파수 및 자기장의 세기는 달리 한다. 하지만 현재까지 이러한 전기적 자극의 적용 분야는 치조골의 재생, 악골골절의 치료, 교정 치료시 치아 이동 속도의 증가를 위한 보조적 수단 및 악골 성장의 유도 등에 국한되어 있었으며, 맥동전자기장이 적용된 연구들도 전기에너지가 골성장과 골결손부의 골 치유과정에서 골세포대사에 미치는 영향과 기전을 밝히려는 것이 대부분이었다. 인공골 이식부의 골치유 과정에 관련된 맥동전자기장의 효과에 관한 연구나 인공골의 골 재생을 촉진시키기 위한 방법으로의 맥동전자기장의 적용에 관한 연구는 미흡했기에, 저자는 본 논문을 통해 생체의 신경 및 근육에 손상을 주지 않는 범위라고 알려진 자속 세기 38 Gauss, 주파수 100 Hz인 맥동전자기장을 이용하여¹⁵⁾, 가토 두개골 결손부에 생체친화성 인공 골대체 재료인 β -tricalcium phosphate (β -TCP)와 자가골을 각각 이식한 후 맥동전자기장을 적용하여 골 치유과정에서의 BMP 2, 4, 7, PDGF, VEGF, TGF- β 1 성장인자의 발현에 대한 면역조직화학적 분석을 통하여 맥동전자기장이 이식된 인공 골대체 재료의 골치유를 촉진할 수 있는가를 알아보려고 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

(1) 맥동전자기장 발생장치 제작 : 본 실험에서 사용된 맥동전자기장 발생장치는 Gerling 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 제작하여

맥동주파수 100 MHz, 맥동폭 12 μ s, 자기력 선속밀도 38 Gauss를 가지는 맥동전자기장이 생성되도록 하였다. 내부장착장치는 이 장치 속에 장착하게 하되 골이식된 가토 두개골 결손부가 원형 코일들의 중심축에 놓이도록 고안하였다(Fig. 1).

펄스파 전자계 자극장치의 구성은 맥동 주파수 조정기(pulsed frequency modulator) 및 펄스폭 조정기(pulsed width modulator)를 갖는 신호 발생기(master pulse oscillator), 펄스파 전류 출력장치(pulsed current driving circuit) 및 전자계 자극코일(electromagnetic field stimulation coil)로 되어있다(Fig. 2).

(2) 실험동물

실험동물로는 성별 구별 없이 동일 조건하에 사육된 체중 1.6 kg전후의 New Zealand 가토 16마리를 사용하였다. 이 중 8마리는 양측 두개골에 골결손부를 형성하여 자가골과 β -TCP를 이식하였다. 나머지 8마리는 두개골 결손부에 β -TCP만 이식하여 하루 8시간씩 자속 58 Gauss, 주파수 100 Hz의 맥동전자기장을 적용시켰으며, 다른 8마리의 가토는 맥동전자기장을 적용시키지 않았으나 동일 조건을 주기 위하여 상자 속에 매일 8시간씩 넣어 두었다. 2, 4, 6, 8 주에 각각 2마리씩 희생시켰다. 골형성을 비교하기 위해서 자가골을 이식한 군을 1군, β -TCP를 이식한 후 맥동전자기장을 적용한 군을 2군, β -TCP를 이식한 군을 3군으로 하였다.

2. 연구 방법

(1) 수술방법

염산케타민(유한케타민[®], 유한양행) 1 ml와 Xylazine (Rompun[®], 한국바이엘) 1 ml를 근육 주사하여 마취를 유도하였고, 수술 중 지혈을 목적으로 1:10만 에피네프린이 함유된 2% 리도케인을 수술 부위에 주사하였다. 두개 정중부에 절개선을 주어 두개골의 봉합부를 노출시켰고, 골막하 박리는 양쪽 안와상연까지 골막에 손상을 주지 않게 시행하였다. 노출된 두개골에 비전두 봉합선을 피하여 뇌경막에 손상을 주지 않도록 하면서 양측에 bur로 직경 12 mm의 원형 결손부를 형성하였다(Fig. 3). 좌측에는 β -TCP를, 우측에는 좌우측에서 채취한 자가골을 이식하였다(Fig. 4). 골막은 4-0 catgut으로 피부는 3-0 silk로 봉합하였다. 수술 후 당일과 7일까지 수술 후 감염에 대한 처치를 목적으로 Gentamycin(동화황산겐타마이신[®], 동화약품) 2 ml를 근육주사하였다.

(2) 조직학적 관찰

각 그룹을 실험 후 2, 4, 6, 8주 간격으로 희생하여, 비전두 봉합선을 경계로 두경부를 절단한 후 4% paraformaldehyde로 6주간 고정을 시행하였다. 탈회는 0.1 M 인산완충용액으로 30분간 수세하여 0.1 M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA로 실온에서 80일 간 시행 하였다. 포매와 박절을 통해 표본으로 만들고 H&E 염색한 후 광학 현미경을 통해 검경하였다.

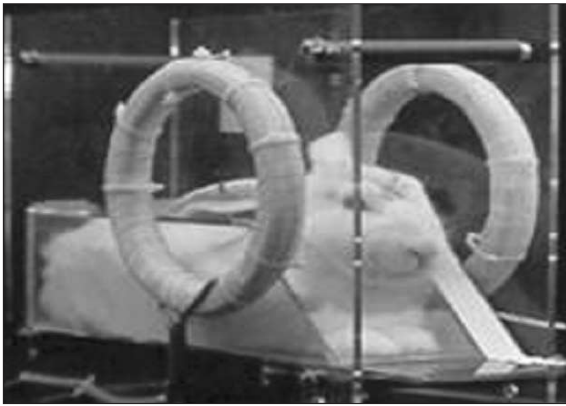


Fig. 1. Applied external animal holder assembly with Helmholtz coil to rabbit.



Fig. 2. Pulsed electromagnetic stimulator.



Fig. 3. Defect formation using a bur on calvarium.

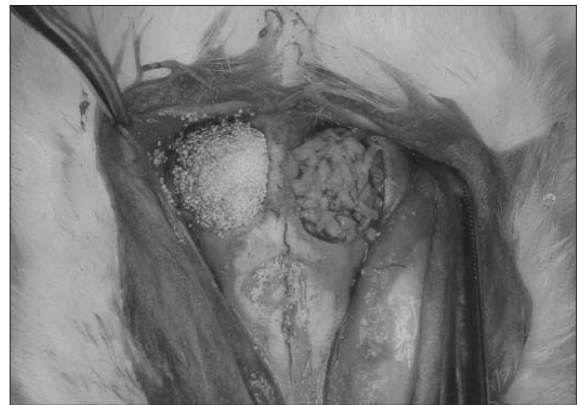


Fig. 4. Calvarial defects were grafted with autogenous bone(right) and β -TCP(left).

(3) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학 염색과 슬라이드 제작을 위하여 streptavidin-biotin법을 이용하였다. 먼저 박절편을 xylene으로 탈파라핀화한 후, 각 단계의 알콜을 거쳐 함수시켰다. 증류수로 3회 세척한 후 전 처치로 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)용액에 담근 상태에서 microwave로 5분씩 2회 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수 용액으로 10분간 처리 후 증류수와 phosphate buffer solution (PBS)로 세척하였다. DAKO LSAB kit (DAKO, U.S.A)의 blocking시약으로 20분간 처리하여 비특이적 IgG의 결합을 방지하였다. 그리고 상온에서 각각 BMP-2, -4, -7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 일차항체로 1시간이상 부란한 뒤 PBS로 3회 세척하였다. 일차항체로 polyclonal goat anti-BMP-2, -4, -7 (SantaCruz, U.S.A)와 anti-VEGF (SantaCruz, U.S.A), 그리고 monoclonal mouse anti-PDGF (SantaCruz, U.S.A)와 anti-TGF- β 1 (SantaCruz, U.S.A)를 각각 1:50으로 희석하여 사용하였다. 이 후 biotin이 표지된 이차항체로 15분간 부란한 후 PBS로 3회 세척하였다. Peroxidase가 표지된 streptavidin으로 15분간 부란시키고 PBS로 충분히 세척 하였다.

조직은 갈색의 DAB (3,3-diaminobenzidine)로 5분간 발색시킨 후 증류수로 충분히 세척하였고, Meyer's hematoxyline으로 대조염색한 후 permount로 봉입하였고 광학현미경하에서 관찰하였다. 각각의 슬라이드의 염색에 대하여서 염색이 된 경우를 양성으로 판독하였고, 염색의 정도에 따라 4단계로 나누어 표현하였다. 염색된 부분이 전체의 0-10%인 경우를 (+/-), 10-39%인 경우를 (+), 40-69%를 (++), 70-100%이상인 경우를 (+++)로 하여 2인의 병리학 전문의가 각각 판독한 바를 종합하여 판정하였다.

III. 연구 결과

16마리의 가토를 이용한 실험기간 동안 가토의 생활력 및 감염소견을 관찰한 결과 실험기간동안 합병증 없이 건강하였다. 조직학적 관찰 및 면역 조직화학을 이용한 관찰을 시행하기 전, EDTA로 80일간 탈회한 후 수술부위를 종단으로 절단하고 육안으로 관찰하여 가장 적절한 부위를 선택하여 파라핀 포매와 박절을 통해 조직학적 및 면역조직화학적 분석을 시행하였다.

1. 조직학적 관찰

1) 제 1군(자가골이 이식된 표본)

- (1) 2주: 이식골 주위로 약간의 신생골의 형성이 관찰되었고, 조골세포와 섬유아세포의 증식이 관찰되었다.
- (2) 4주: 이식골 주위로 2주때 보다 많은 신생골의 생성이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골 주변으로 다수의 핵을 가진 대식세포들의 활성이 관찰되었다(Fig. 5).
- (3) 6주: 이식골 주위로 4주때 보다 신생골의 생성이 많이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골은 대부분 신생골로 둘러싸여 있으며, 대식세포들의 활성은 관찰되지 않았다.
- (4) 8주: 이식골 주위로 6주때 보다 많은 신생골의 생성이 관찰되어 이식골은 완전히 신생골로 둘러싸여 있는 것

이 관찰되었다. 하지만, 신생골 주위의 조골세포들의 활성은 보이지 않았고, 전체적으로는 신생골의 생성보다는 골개조현상이 일어난 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

2) 제 2군(β -TCP이식후 PEMF가 적용된 표본)

- (1) 2주: 이식된 β -TCP주위에 많은 섬유아세포와 대식세포가 둘러싸고 있었다, 신생골의 형성은 관찰되지 않았으며, 골결손부의 변연부에서만 적은 신생골 생성이 관찰되었다.
- (2) 4주: 이식된 β -TCP주변으로 많은 다수의 핵을 가진 대식세포들의 활성이 관찰되고, 이들 주변으로 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 골결손부위의 중심부에 위치한 β -TCP에서는 신생골의 생성의 증가가 관찰되었다(Fig. 7).
- (3) 6주: 이식된 β -TCP주변으로 신생골의 생성이 4주에 비해 증가됨이 관찰되었으며, 신생골의 주위로 조골세포

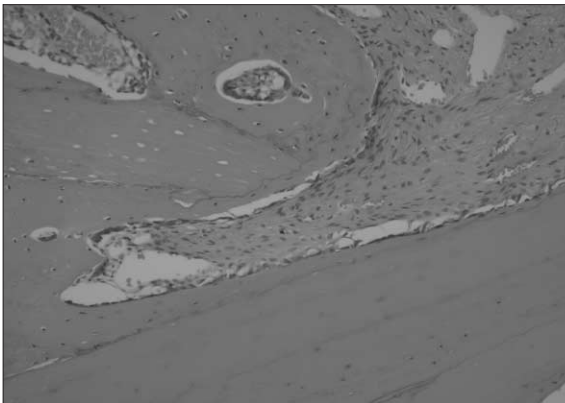


Fig. 5. Microscopic examination shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$, H&E stain).

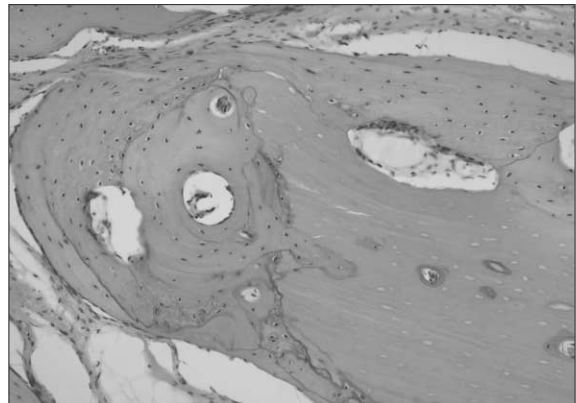


Fig. 6. Microscopic examination shows the autogenous bone graft, 8 weeks($\times 200$, H&E stain).

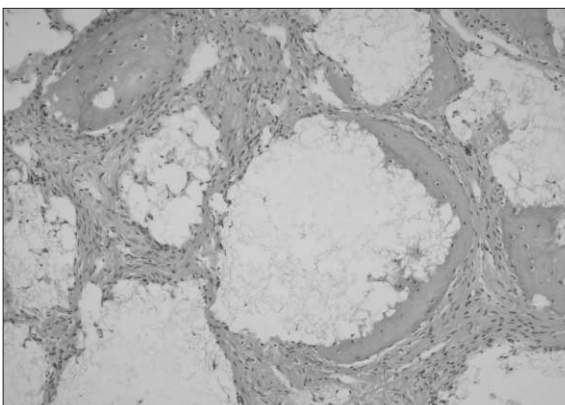


Fig. 7. Microscopic examination shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$, H&E stain).

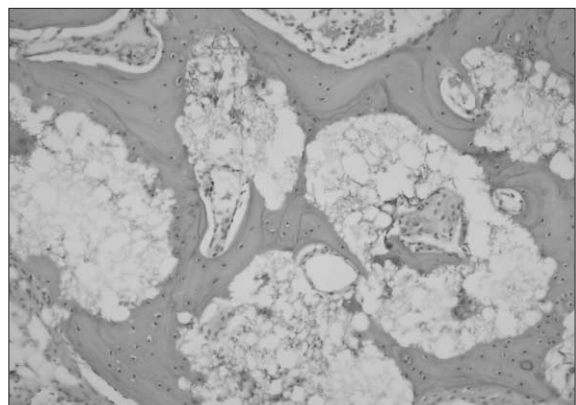


Fig. 8. Microscopic examination shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 8 weeks($\times 200$, H&E stain).

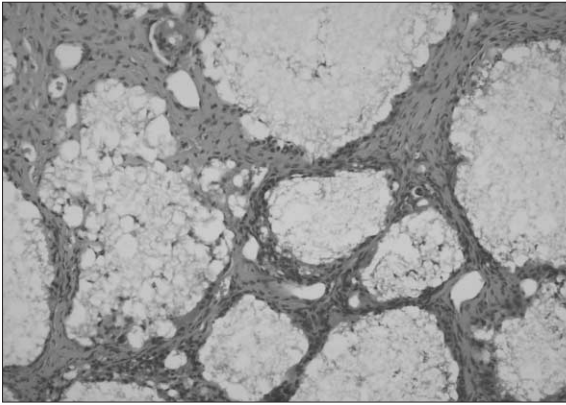


Fig. 9. Microscopic examination shows the β -TCP graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E stain).

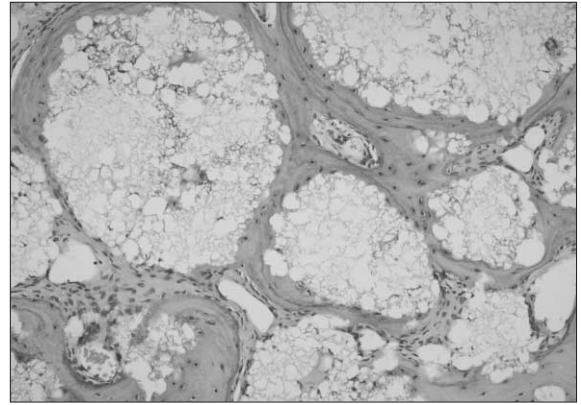


Fig. 10. Microscopic examination shows the β -TCP graft, 8 weeks ($\times 200$, H&E stain).

와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식을 관찰할 수 있었다. 다수의 핵을 가진 대식세포들의 활성화는 β -TCP주변에서 관찰되었다.

(4) 8주: 이식된 β -TCP주변으로 왕성한 신생골의 형성이 관찰되어, 이식된 β -TCP를 완전히 둘러싸는 신생골이 서로 연결된 것이 관찰되었다. β -TCP주변으로 간간이 다수의 핵을 가진 대식세포가 관찰되었다. 일부 β -TCP는 흡수되어 작은 크기로 관찰되고, 신생골의 주변으로는 활성화된 조골세포와 혈관이 많은 결체조직들이 관찰되었다(Fig. 8).

3) 제 3군(β -TCP이식후 PEMF가 적용되지 않은 표본)

(1) 2주: 이식된 β -TCP주위에 많은 섬유아세포와 대식세포가 둘러싸고 있었으나, 신생골의 형성은 관찰되지 않았고, 골결손부 주변의 자가골 인접부위에서만 적은 신생골의 형성이 관찰되었다.

(2) 4주: 이식된 β -TCP주변으로 많은 다수의 핵을 가진 대식세포들의 활성화가 관찰되고, 이들 주변으로 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 골 변연부의 β -TCP외에는 신생골의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 9).

(3) 6주: 이식된 β -TCP주변으로 신생골의 생성이 미약하게 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 다수의 핵을 가진 대식세포들의 활성화는 β -TCP주변으로 관찰되었다.

(4) 8주: 이식된 β -TCP주변으로 왕성한 신생골의 형성이 관찰되어, 이식된 β -TCP를 완전히 둘러싸는 신생골이 서로 연결된 것이 관찰되었다. β -TCP주변으로 간간이 다수의 핵을 가진 대식세포가 관찰되었다. 일부 β -TCP는 흡수되어 작은 크기로 관찰되고, 신생골의 주변으로는 활성화된 조골세포와 혈관이 많은 결체조직들이 관찰되었다(Fig. 10).

2. 면역조직화학적 분석

표본에서 BMP-2,-4,-7, PDGF, TGF- β 1의 발현양상을 다음과 같이 관찰하였다. BMP-2,-4,-7, TGF- β 1의 발현은 신생골 주변의 조골세포에서 주로 관찰되었고, PDGF와 VEGF의 발현은 신생골 주변의 조골세포와 혈관에서 주로 관찰되었다(Table 1-6).

1) 제 1군

(1) 2주: 이식골 주변의 조골세포에서 BMP-2는 +, BMP-4는 ++정도의 발현이 관찰되었고, BMP-7은 +++정도의 발현이 관찰되었다. 조골세포와 혈관에서는 +++정도의 PDGF, VEGF, TGF- β 1가 발현되었다.

(2) 4주: 이식골 주변의 조골세포에서 BMP-2,-4의 활성화(++/+++)이 2주에서 보다 증가하는 것이 관찰되었으며, 일부의 섬유아세포의 핵에서도 BMP-4의 활성화가 관찰되었다(Fig. 11, 12). BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현은 2주와 동일하게 +++정도의 높은 발현이 관찰되었다(Fig. 13-16).

(3) 6주: 이식골 주변의 조골세포에서 높은 BMP-2, -4의 활성화가 관찰되었으나, 4주에서 보다는 활성화가 전체적으로 떨어지는 것이 관찰되었다. 섬유아세포에서의 활성화도는 4주와 별다른 차이가 없었다. BMP-2의 발현도 4주에 비해서 다소 감소됨이 관찰되었다. 하지만, BMP 7, PDGF, VEGF, TGF- β 1가 발현은 2, 4 주와 동일하게 높은 발현이 관찰되었다.

(4) 8주: 이식골 주변의 조골세포의 수와 BMP-2,-4의 활성화가 현저하게 줄어든 양상이 관찰되었다(Fig. 17, 18). 그러나, BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현은 +++로 계속 높게 발현됨이 관찰되었다.

2) 제 2군

(1) 2주: 이식골 주변의 조골세포에서 +/-미만의 BMP-2,-4이 발현되었다. 조골세포와 혈관에서 +++정도의 BMP 7,

Table 1. Immunohistochemical study on BMP 2 expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	+	++	++	+	-	+	+	+	-	-	+	+/-
Sample 2	+/-	++	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 2. Immunohistochemical study on BMP 4 expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	++	+++	+++	++	-	+	+	+	-	+	+	+
Sample 2	++	+++	++	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 3. Immunohistochemical study on BMP 7 expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
Sample 2	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 4. Immunohistochemical study on PDGF expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Sample 2	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 5. Immunohistochemical study on VEGF expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Sample 2	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 6. Immunohistochemical study on TGF- β 1 expression

	Autogenous bone graft				β -TCP graft + PEMF				β -TCP graft			
	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W	2 W	4 W	6 W	8 W
Sample 1	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Sample 2	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

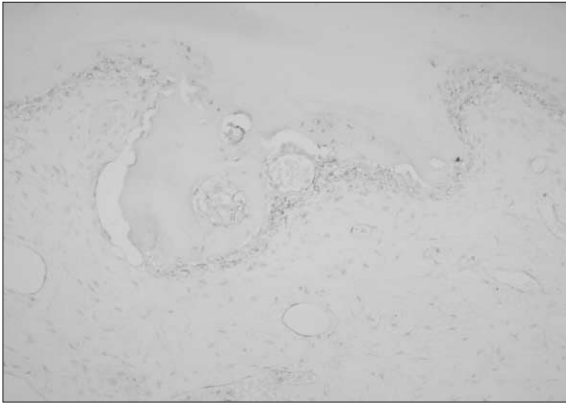


Fig. 11. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

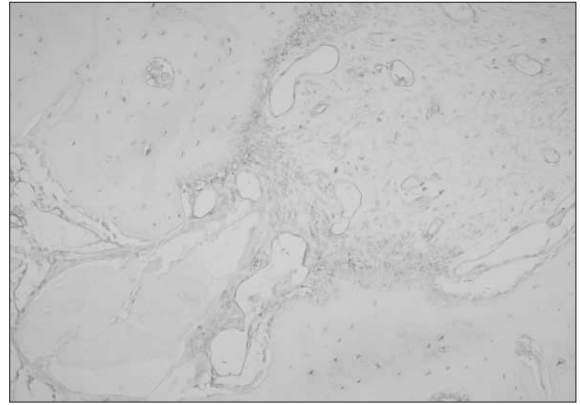


Fig. 12. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

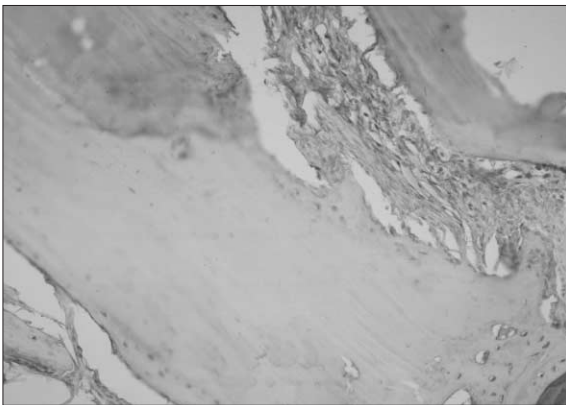


Fig. 13. Immunohistochemical examination of BMP 7 shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

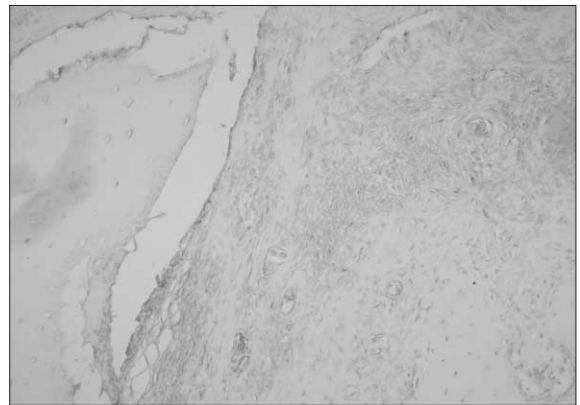


Fig. 14. Immunohistochemical examination of PDGF shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

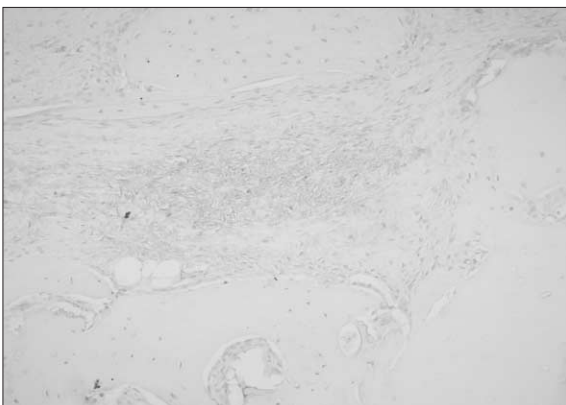


Fig. 15. Immunohistochemical examination of VEGF shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

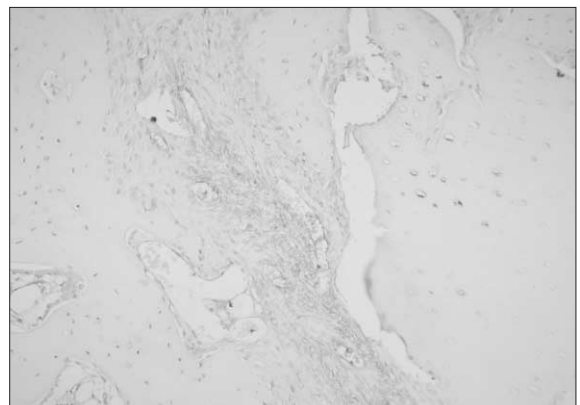


Fig. 16. Immunohistochemical examination of TGF β 1 shows the autogenous bone graft, 4 weeks($\times 200$).

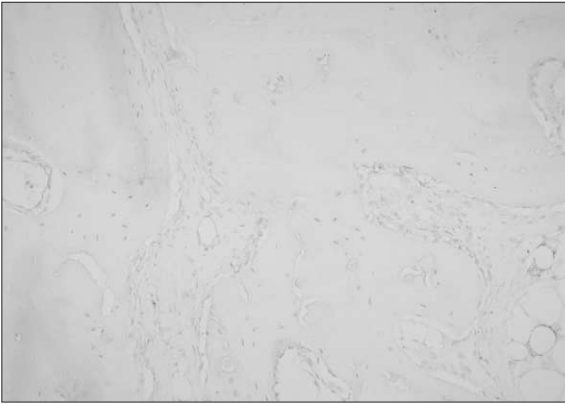


Fig. 17. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the autogenous bone graft, 8 weeks($\times 200$).

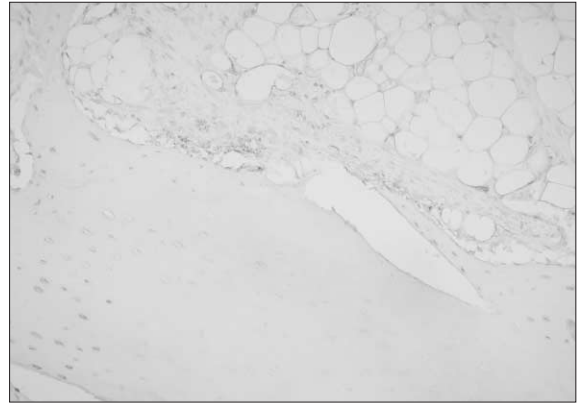


Fig. 18. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the autogenous bone graft, 8 weeks($\times 200$).

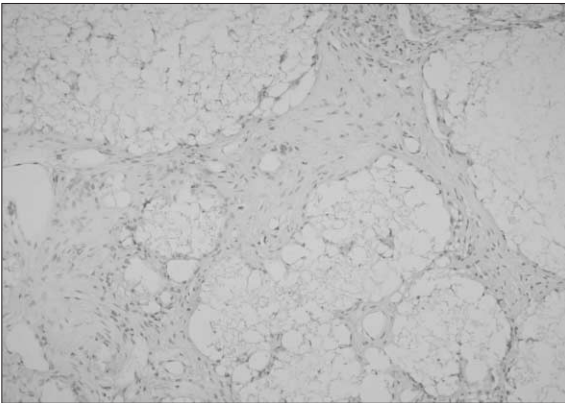


Fig. 19. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

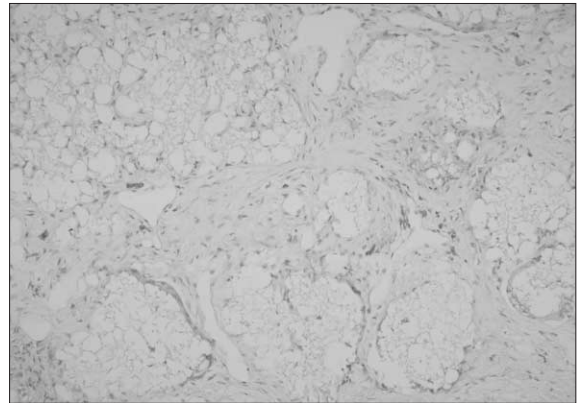


Fig. 20. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

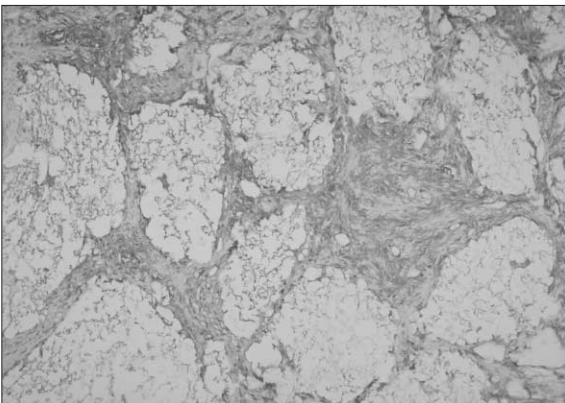


Fig. 21. Immunohistochemical examination of BMP 7 shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

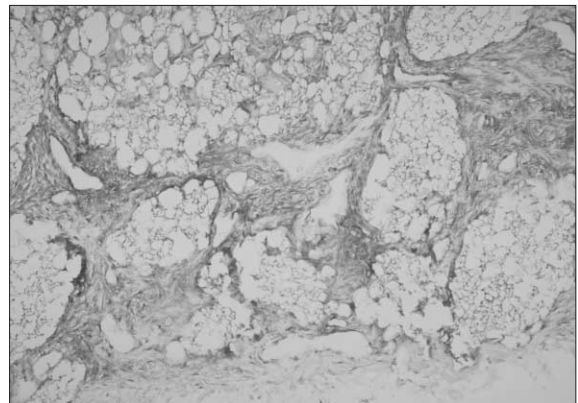


Fig. 22. Immunohistochemical examination of PDGF shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

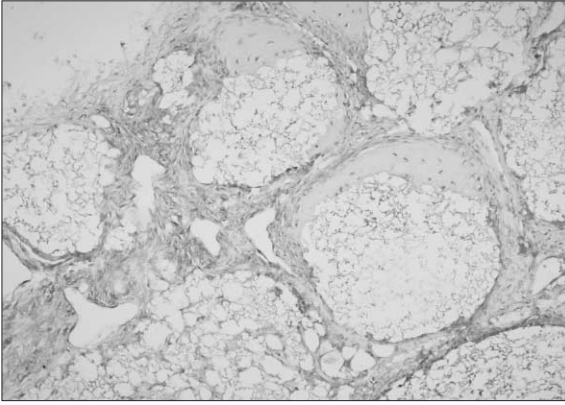


Fig. 23. Immunohistochemical examination of VEGF shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

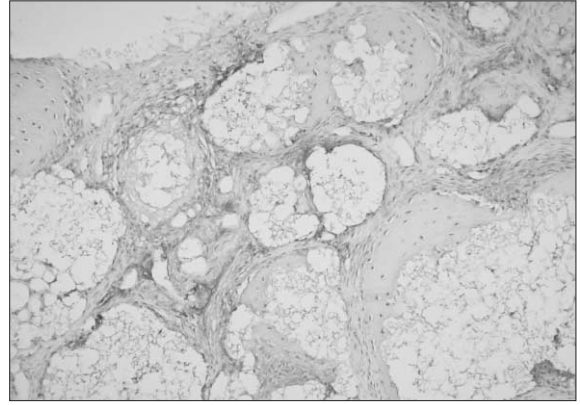


Fig. 24. Immunohistochemical examination of TGF- $\beta 1$ shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 4 weeks($\times 200$).

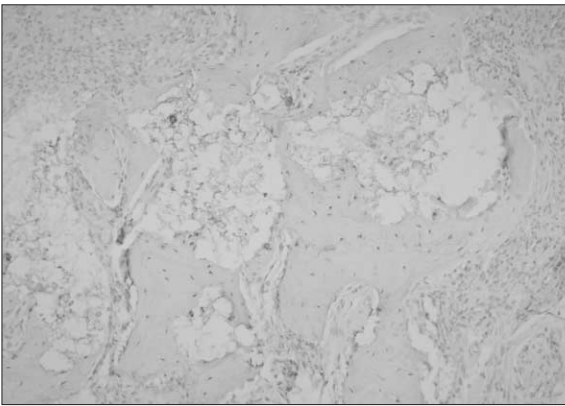


Fig. 25. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 8 weeks($\times 200$).

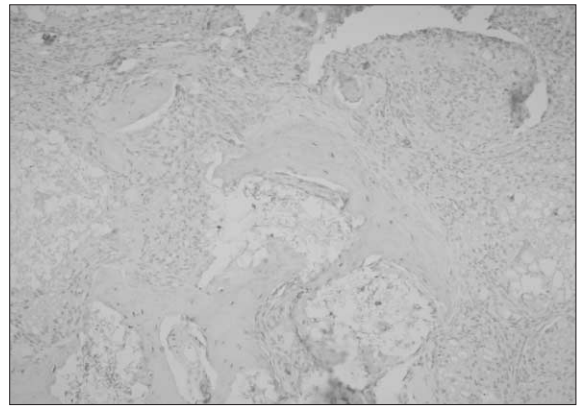


Fig. 26. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the β -TCP graft under pulsed electromagnetic field, 8 weeks($\times 200$).

PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현이 나타나 자가골 이식군과 비슷하게 발현되었다.

- (2) 4주: β -TCP 주변과 섬유아세포에서의 BMP 2, 4의 활성의 미약한 증가는 관찰되었다. 특히, BMP 2에서 보다 BMP 4에서 증가가 더 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 19, 20). 조골세포와 혈관에서 BMP 7, PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현은 +++정도로 2주와 비슷하게 높게 발현됨이 관찰되었다(Fig. 21-24).
- (3) 6주: BMP 2는 조골세포와 섬유아세포에서의 발현이 미약하게 증가함을 관찰하였다. β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP-4의 활성이 증가하는 것으로 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주와 별다른 증가를 보여주지 못하였다. 조골세포와 혈관에서 BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현은 2, 4주와 비슷하게 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.
- (4) 8주: BMP-2는 조골세포에서 발현이 약간 증가하는 양상

을 보였고(Fig. 25), β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP 4의 활성이 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 26). 그러나, BMP-2,4의 두드러진 증가는 관찰되지 않았다. 조골세포와 혈관에서 BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현은 전체적으로 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.

3) 제 3군

- (1) 2주: 이식골 주변의 조골세포에서 +/-미만의 BMP-2,4이 발현되었다. 조골세포와 혈관에서 +++정도의 BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현이 자가골 이식군과 비슷하게 관찰되었다.
- (2) 4주: β -TCP 주변과 섬유아세포에서의 BMP-2의 활성의 증가는 없었으나, BMP-4는 미약한 증가가 관찰되었다(Fig. 27, 28). 조골세포와 혈관에서 BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- $\beta 1$ 의 발현은 2주와 비슷하게 +++정도로

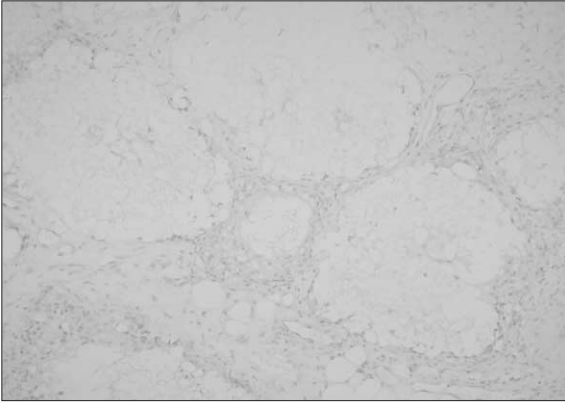


Fig. 27. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

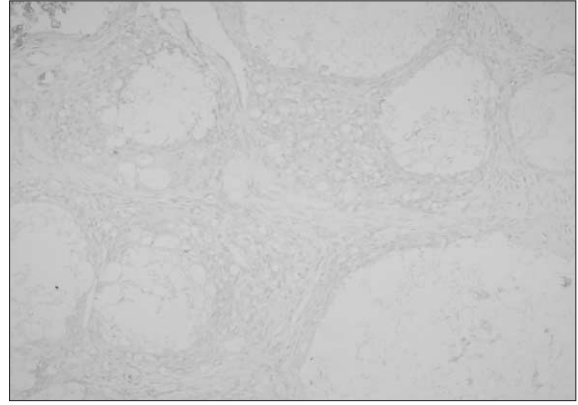


Fig. 28. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

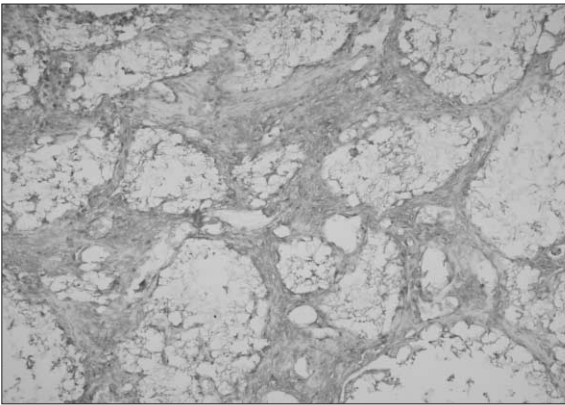


Fig. 29. Immunohistochemical examination of BMP 7 shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

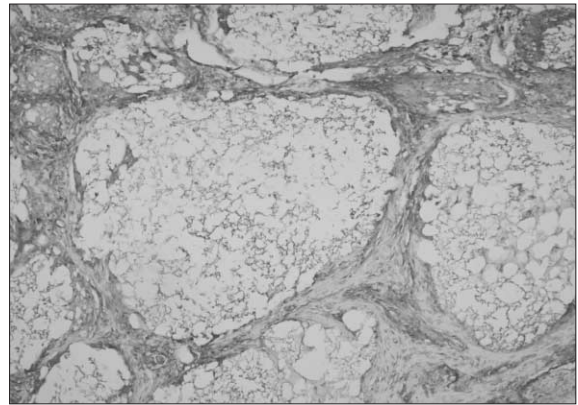


Fig. 30. Immunohistochemical examination of PDGF shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

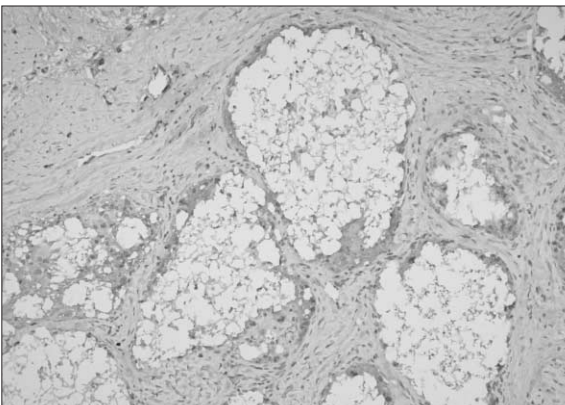


Fig. 31. Immunohistochemical examination of VEGF shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

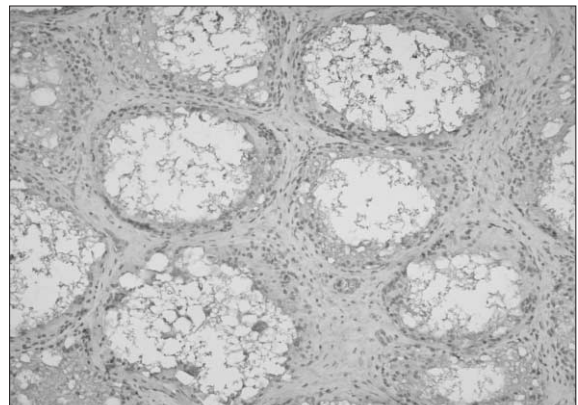


Fig. 32. Immunohistochemical examination of TGF- β 1 shows the β -TCP graft, 4 weeks($\times 200$).

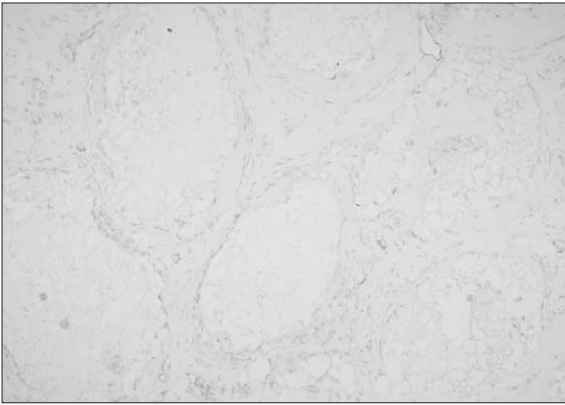


Fig. 33. Immunohistochemical examination of BMP 2 shows the β -TCP graft, 8 weeks($\times 200$).

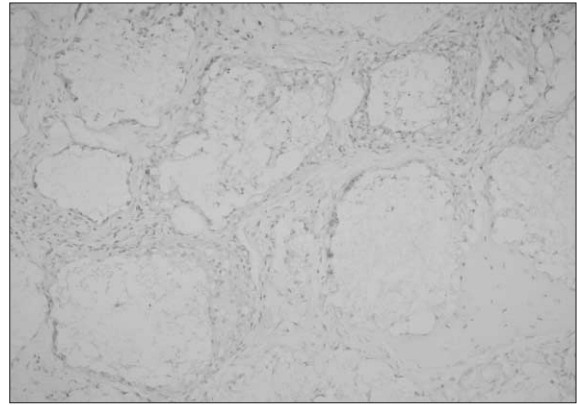


Fig. 34. Immunohistochemical examination of BMP 4 shows the β -TCP graft, 8 weeks($\times 200$).

높게 발현됨이 관찰되었다(Fig. 29-32).

- (3) 6주: 조골세포와 섬유아세포에서 BMP-2의 발현이 미약하게 증가함을 관찰하였다. β -TCP주변의 조골세포에서는 BMP-4의 활성이 증가하는 것으로 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주와 별다른 증가를 보여주지 못하였다. 조골세포와 혈관에서 BMP 7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현은 2, 4주와 비슷하게 +++정도로 높게 발현이 됨이 관찰되었다.
- (4) 8주: β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP 2의 발현이 약간 증가하는 양상을 보였고(Fig. 33), BMP-4의 활성은 미약하게 증가하는 것이 관찰되었으며 섬유아세포에서의 활성은 4주에 비해 별다른 증가를 보여주지 못하였다(Fig. 34). 조골세포와 혈관에서 BMP-7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현은 전체적으로 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고찰

생체도재인 β -TCP는 무균의 인공재료로 혈액이나 조직을 매개로 하는 감염 위험성이 없는 생체친화적인 인공 골대체 재료이다. β -TCP는 미세기공으로 연결된 생체활성재료로 hydroxyapatite보다 높은 용해도를 보이며, 다른 calcium phosphate ceramic보다 빠른 흡수를 보이고, 용출 및 흡수의 과정을 거쳐 자가골로 치환된다¹⁶⁾. Ducheyne¹⁷⁾등은 ceramic이 용해, 침전, 이온변화, 침착, 화학주성, 세포부착과 증식, 세포분화, 세포외기질형성이라는 기전을 통하여 골로 대체된다고 보고하였다. Lu 등¹⁶⁾은 TCP 이식시에 초기에는 물리적, 화학적인 용해 과정이 주로 발생하여 생체분해가 이루어지다가, 점차적으로 파골세포와 식세포의 분해과정에 의해서 형태의 흡수를 보이면서 골개조 현상이 일어난다고 보고하였다. Szabo 등³⁾은 실험에서 순수 β -TCP는 이식한 후 6개월이 지난 후에 일부 β -TCP의 과립이 새롭게 형성된 골에 매입되어 잔존함을 관찰하였고,

다양한 비율로 유골조직이나 연조직이 혼재되어 있었으며 골 유형은 대부분 lamellar type이었다고 보고하였다. 또한, 순수 β -TCP는 생체에서 완전히 흡수되는데 보통 12-18개월이 걸리며, 기능적 및 해부학적 측면에서 원래 골과 매우 유사한 골로 대체된다고 보고하였다. Wiltfang 등¹⁸⁾은 minipigs에 이식된 β -TCP의 골형성 과정에서 초기에는 hydrolytic-cellular degradation이 주로 일어나고, 후반기 20주 이상에서는 biofunctional remodeling이 일어난다고 하였다,

Yasuda⁹⁾는 골내에 역학적 자극시 전기 현상이 일어난다는 사실을 발견하고, 골에서 압전기현상이 생성된다고 보고하였다. 압전기현상은 전기적으로 평형을 이루는 상태에서 외부의 역학적 자극이 가해질 경우에 전기적인 평형이 깨어져 전기적 성질을 형성하는 것으로, 골에서 생성되는 압전기현상은 골을 형성하는 교원질성분들이 외부의 자극에 의해 재배치되는 과정에 생성된다고 보고하고 있다. 외부 자극에 의해서 형성되는 골의 전기적 성질을 설명하는 학설은 "streaming potential"로서 전해질들이 전하를 가진 작은 통로를 지나갈 때 전류를 형성한다는 것으로 신체 내에서의 골의 전기적 작용을 설명하는 것에 인용되고 있다. 이렇게 형성된 전류가 하나의 전기적 신호로 작용하여 세포 내에 골형성 기전에 작용한다고 알려져 있다¹⁹⁾.

전기 자극이 골의 성장과 형성을 촉진하기 위하여 세포대사에 미치는 효과에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 전기 자극은 세포막 수용기에 작용하여 이온유입과 c-AMP 농도에 영향을 미치며, 세포주기에 있어서 G2 phase의 세포를 M phase로 보내고, G0, G1 phase의 세포를 DNA synthesis phase로 활성화시킴으로서 세포증식을 유도한다고 하였다^{20,21)}. Heppenstall²²⁾에 의하면 전기 자극은 교원섬유의 분자구조를 재배열시켜 석회화의 초기과정을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 보고하였다. Norton 등²³⁾은 전기 자극이 골의 흡수와 생성에 모두 영향을 미칠 수 있으나, 그 효과는 세포의 종류, 세포주위의 환경 및 전기적 에너지의 종류에 따라 다양하게 나타난다

고 하였다. 전반적인 기전은 전기자극이 호르몬이나 화학 물질처럼 1차적 매개체로 작용하여 세포막이나 세포주위에 작용하여 칼륨과 나트륨 이온의 이동을 유발시키고, 이것에 의해서 adenylate cyclase의 활성화가 증가되어 2차 매개체인 c-AMP를 형성하여 세포대사와 세포분열에 변화를 일으켜 골형성 및 골개조에 참여하게 된다고 하였다. 그는 골단 연골 세포를 oscillating electrical field에 노출시켜 다량의 c-AMP를 검출함으로써 자신의 가설을 간접적으로 증명하였다. c-AMP가 증가하면 DNA 합성과 세포 분열은 억제되지만 세포 분화 즉 세포의 성숙은 진전된다고 하였는데, 이것은 골성장판에서 번식층과 성숙층간에 c-AMP농도가 다른 것과 마찬가지로이다.

생체에 적용하는 전기자극기는 적용방법에 따라서 삽입성, 준삽입성, 비삽입성으로 분류하고, 전류 자극의 종류에 따라 지속성(constant)과 맥동성(pulsed)으로 분류한다. 삽입성 전기자극기는 간편하고, 환자의 협조가 필요 없다는 장점이 있으나, 두 번의 수술과 감염 가능성, 적용되는 전류의 조절이 불가능하다는 단점이 있다. 준삽입성 전기 자극기는 간편하면서도 큰 수술이 필요 없다는 장점이 있는 반면, 환자의 협조가 필요하고 전극을 넣은 부위에 피부자극 및 염증이 생길 수 있다는 단점이 있다. Bassett 등²⁴⁾은 골내에 전극을 집어 넣어야 하는 삽입성이나 준삽입성 전기 자극기는 골내의 전극이 일부 전해(electrolysis)되어 전기 화학적 부산물을 만들어 이것들이 골화에 나쁜 영향을 미칠 수 있다고 주장하였다. 비삽입성 전기 자극기는 유도성 결합 전자장 자극법과 용량성 결합 전자장 자극법이 있다. 이것들은 수술을 하지 않기 때문에 감염의 문제는 없으나 환자의 주의 깊은 협조가 절대로 요구되는 단점이 있다. 유도성 결합 전자장 자극법은 용량성 결합 전자장 자극법과 달리 코일의 위치가 중요하다. 왜냐하면 용량성 결합 전자장 자극법은 양쪽 전극 사이에 있는 골에 전류를 균등히 유도하여 골형성이 광범위하게 형성되지만, 유도성 결합 전자장 자극법은 양쪽 코일의 중앙을 연결하는 축에만 골형성이 되기 때문에 이 축을 골결손부에 잘 맞추는 것이 무엇보다 중요하다.

Bassett 등²⁴⁾이 유합되지 않은 골절부와 선천성 가성 관절증에 처음으로 맥동전자기장의 적용을 시도하였고, 1979년 FDA에 의해 인체에 안전하고 효율적인 전기자극으로 공인되었다. 그 후 맥동전자기장은 정형외과 분야에서 많이 연구되었으며, 치의학 분야에서는 Hass²⁵⁾, Gerling 등¹⁵⁾이 맥동전자기장을 하악골과두에 적용하여 과두연골세포의 증식을 촉진시켜서 과두 성장에 미치는 영향을 연구하였다. 최근에는 Matsumoto 등²⁶⁾, Fini 등²⁷⁾, Buzza 등²⁸⁾이 맥동전자기장이 치과용 임플란트 주변의 골형성에 미치는 영향에 대해서 연구하였다. 실제로 맥동전자기장을 임상에 사용하기 위해서는 전기 자극이 생물의 발육단계나 성장단계에 유해한 작용을 유발해서는 안 된다. Gerling 등²¹⁾은 맥동전자기장이 하악 과두의 성장에 관한 실험장치와 고안에서 100 Hz와 38 Gauss의 자속은 근육과 신경의 흥분을 일으키지 않으며, 심한 발열반응도 일으키지 않는다고 보고하고 있다. Grissett²⁹⁾는 낮은 주파수와 자속에서는 신체에 유해한

작용을 하지 않는다고 보고하고 있다. 따라서 본 실험에서도 자속 세기는 38 Gauss, 주파수 100 Hz를 사용하였고, 실험 과정에서 가토의 성장과 행동에서 자기장에 의한 이상변화는 관찰되지 않았다.

Bolander³⁰⁾는 손상받은 골조직의 치유과정을 염증반응과 육아조직을 형성하는 단계, 막내골화 단계, 연골화 단계, 연골내골화 단계 등의 4단계로 분류하고, 골형성에 관련된 성장인자의 발현은 각 단계별로 다르게 나타난다고 보고하였다. 골형성과 골개조 과정에 관련된 BMP 또는 골형성에 관련된 단백질의 발현양상도 이식골의 치유과정에서 여러 단계에 따라서 다르게 나타난다. 파골세포에 의한 이식골의 흡수는 조골세포의 활성을 증가시켜 BMP의 발현을 활성화시킬 수 있다는 보고가 있다³¹⁾. BMP 2, 4는 골유도 인자로 미분화간엽세포의 연골분화를 자극하고, endochondral bone 형성을 유도한다. BMP 2, 4는 주로 혈소판이나 혈관내피세포에 집적되어 있다. 여러 가지 BMP들 중에서 BMP 2, 4는 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나기 때문에 BMP에 의한 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다. BMP 7은 OP-1 (osteogenic protein-1)이라 불리며, BMP-2와 함께 골형성을 유도시키는 능력이 있다고 보고된다. 하지만, Stenport 등³²⁾은 실험에서 작은 골결손에 rhBMP-7을 적용하였으나 효과적인 골형성은 관찰되지 않았다고 한다. 본 실험에서는 자가골 이식군, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군, β -TCP 이식군에서의 BMP 7의 발현은 2, 4, 6, 8주 모두에서 ++이상으로 유의한 차이가 없었으며, BMP 2,4의 발현보다는 많았다. BMP의 발현이 파골세포와 조골세포의 활성을 완전히 나타내지는 않지만, 골조직이 손상의 치유나 골형성에 관련된다고 보면 이식골 주변의 골형성 단백질의 발현은 골형성이 활발하게 일어나는 시기와 파골세포에 의해 이식골의 흡수 또는 분해과정이 일어나는 시기를 결정하는데 중요한 단서가 된다^{33,34)}. Lee 등³⁴⁾은 가토를 이용한 실험에서, 자가골 이식에 있어서는 4주를 기점으로 해서 BMP 2, 4의 발현이 감소하는 경향을 나타냈으며, 이는 자가골 이식에서 BMP와 관련된 골재생은 4주 이전에 일어남을 의미한다. 반면 β -TCP 이식후 BMP 2, 4의 발현은 4-12주로 갈수록 증가하는 것으로 보아 자가골 이식때 보다는 지연된 골재생을 보였다. 본 실험에서 BMP 2는 자가골 이식군에서 4주에 ++정도로 가장 높게 나타났고 점차적으로 감소하였으며, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군에서는 4주부터 +정도의 발현되었으나, β -TCP 이식군은 6주 이후에 +정도의 발현을 관찰되어 맥동전자기장이 BMP 2의 발현을 촉진시킴을 알 수 있었다. BMP 4는 자가골 이식군에서 4주에 +++정도로 가장 높게 나타났고, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군과 β -TCP 이식군에서는 4주부터 +정도의 발현을 보여서 BMP 2에서처럼 맥동전자기장의 효과를 관찰하지는 못하였다.

Watanabe 등³⁵⁾은 β -TCP와 platelet-rich plasma(PRP)를 섞으면 새로운 골의 형성이 약 8-10% 증가하였다고 보고하였고, 골유도능을 가진 PRP내의 cytokine은 TGF- β 1, TGF- β 2, PDGF, IGF-I 등이며 더 빠른 integration을 위해 사용될 수 있으며, 자가골 대용

으로도 사용될 수 있다고 하였다. 이런 cytokine은 골형성 및 혈관생 과정에 중요한 역할을 하며, 특히 PDGF는 거의 모든 상처치유반응에 관여하고 있으며, PDGF의 합성은 외부자극인 낮은 oxygen tension, thrombin, 다른 성장인자의 자극 등에 의해 증가하게 되고, 화학주성의 유도 및 미분화간엽세포의 활성을 자극한다. PDGF의 국소적 주입은 골형성을 유도하고, 몇몇 동물 모델에서 골아세포에 대한 mitogenic effect를 가진다고 보고하였다. 본 실험에서 PDGF의 발현은 자가골 이식군, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군, β -TCP 이식군에서 2주에 +++정도의 발현을 나타내어 주로 골재생 초기부터 높게 발현됨을 알 수 있었다. VEGF는 가장 잘 알려진 혈관형성의 유도인자로, 골의 초기치유에도 도움을 준다고 알려져 있다. Street 등³⁶⁾은 골의 초기치유 과정에서 VEGF의 발현도가 높다고 보고하였다. 본 실험에서도 자가골 이식군, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군, β -TCP 이식군에서 골재생 초기인 2주부터 VEGF, TGF- β 1의 발현도가 높게 관찰되어 위의 실험과 일치하였다. β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군과 β -TCP 이식군의 PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현시기와 신생골 형성시기는 자가골 이식군과 비슷하였고, BMP의 발현은 자가골 이식군에 비해 β -TCP 이식군이 늦었으나, β -TCP 이식한 후 맥동전자기장을 적용시킨 군에서는 β -TCP 이식군보다는 다소 빠른 발현이 관찰 되었다. 이 결과는 β -TCP의 신생골 형성이 자가골에 비해 늦어지는 이유로 신생혈관 생성의 지연보다는 자가골에 내재된 BMP의 부재 때문인 것을 시사하며, β -TCP 이식부에 맥동전자기장을 적용시키면 BMP의 발현을 촉진시켜서 초기의 신생골 형성 속도를 증가시키는 것으로 사료되어진다.

맥동전자기장이 골형성에 미치는 영향에 대한 확실한 작용기전은 아직 명확히 밝혀지지 않는 것이며, 최근 골형성을 촉진시키기 위하여 골성장 호르몬과 세포 및 분자수준에서의 연구들도 활발히 이루어지고 있다. 향후 임상적으로 사용 가능하고 효과적인 맥동전자기장을 가하는 장치에 대한 개발도 이루어져야 할 것이며, 맥동전자기장의 임상적 응용을 위해서는 자속밀도의 강도, 파형 및 빈도에 다른 생체에 미치는 영향과 골형성 정도에 대하여 보다 심도 있게 연구되어야 할 것이다. 또한 최근 들어 증가되고 있는 치과 임플란트 시술에 있어서 골유착 과정에서의 맥동전자기장의 효과에 대한 연구도 필요하다고 하겠다.

V. 결 론

본 연구는 가토 두개골 골결손부에 자가골과 β -TCP를 이식한 후 맥동전자기장을 자속 38 Gauss, 주파수 100 Hz를 하루 8시간씩 적용시켰고, 이식골의 치유과정을 2, 4, 6, 8주에서 조직학적인 관찰과 면역조직화법을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BMP 2의 발현은 1군에서 2주부터, 2군에서는 4주부터, 3군에서는 6주부터 발현됨을 관찰하였다.

2. BMP 4의 발현은 1군에서 2주때부터 관찰되었지만, 2군과 3군에서는 4주때부터 발현됨이 관찰되었다.

3. BMP 7, PDGF, VEGF, TGF- β 1의 발현은 골재생 기간에 1군, 2군, 3군에서 모두 +++정도로 높게 관찰되었다.

이상의 결과로 보아, 자속 38 Gauss, 주파수 100 Hz의 맥동전 자기장은 β -TCP 이식부에서의 골결손부 치유에 있어서 신생골 형성과 BMP 2의 발현면에서 효과적이라고 판단된다.

참고문헌

1. Laurencin CT: Bone Graft Substitutes. ASTM International 2003;180-187.
2. Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U et al: Intraindividual Comparative animal Study of α - and β -Tricalcium Phosphate Degradation in Conjunction with Simultaneous Insertion of Dental Implants. J Craniofac Surg 2001;12:59-68.
3. Szabo G, Suba Z, Hrabak K et al: Autogenous Bone Versus β -Tricalcium Phosphate Graft Alone for Bilateral Sinus Elevations(2- and 3-Dimensional Computed Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Evaluations): Preliminary Results. Int J Oral Maxillofac Surg 2001;16:681-692.
4. Bahn S, Plaster: A Bone substitute. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1966;21:672-681.
5. Saito M, Shimizu H, Beppu M et al: The role of β -Tricalcium Phosphate in vascularized periosteum. J Orthop Sci 2000;5:275-282.
6. Yasuda I: Piezoelectricity of living bone. J Kyoto Pref Univ Med 1953;53:325.
7. Yasuda I: Mechanical and electrical callus. Ann NY Sci 1974;238:457.
8. Peltier LF: A brief historical note on the use of electricity in the treatment of fracture. Clin Orthop 1981;161:4-7.
9. Braden M, Bairstow AG, Beider A, Ritter BG: Electrical and piezoelectrical properties of dental hard tissue. Nature 1966;212:1565-1566.
10. Cochran GVB, Pawluk RJ, Bassett CAL: Stress generated electrical potentials in the mandible and teeth. Arch Oral Biol 1967;12:917-920.
11. Norton LA: Implication of bioelectric growth control in orthodontics and dentistry. Angle Orthod 1975;45:34-42.
12. Vingerling PA, Vanderkuij P, Degroot K, Sillevius PAE: Non-invasive treatment of alveolar wounds. In Electrical properties of bone and cartilage. Graune and Stratton. New York 1979;341-346.
13. Branham GB, Triplett RG, Yeandle S, Vieras F: The effect of electrical current on the healing of mandibular freeze-dried bone allograft in dog. J Oral Maxillofac Surg 1985;43:403-407.
14. Steiner M, Ramp WK: Electrical stimulation of bone and its implications for endosseous dental implantation. J Oral Implant 1990;16:20-27.
15. Gerling JA, Sinclair PM, Roa RL: The effect of pulsating electromagnetic fields on condylar growth in guinea pigs. Am J Orthop 1985;87:211-223.
16. Lu J, Descamps M, Dejous J et al: The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. J Biomed Mater Res 2002;63:408-412.
17. Ducheyne P, Qiu Q: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. Biomaterials 1999;20:2287-303.
18. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA et al: Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium phosphate in minipigs. J Biomed Mater Res 2002;63:115-121.
19. Spadaro JA: Bioelectrical properties of bone and response of bone to electrical stimuli. In Bone. Vol 3, Boston, CRC Press, 1991;109-141.
20. Norton LA, Hanley KJ, Turkewicz J: Bioelectric perturbations of bone. Angle Orthod 1984;54:73-87.

21. Roden GA, Bourrett LA, Norton LA: DNA syntheses in cartilage cell stimulated by oscillating electrical field. *Science* 1978;199:690.
22. Happenstall BR: Constant direct current treatment for established non-union of the tibia. *Clin Orthop* 1983;178:179.
23. Norton LA, Rodan GA, Bourret LA: Epiphyseal cartilage c-AMP changes produced by electrical and mechanical perturbations. *Clin Orthop* 1977;124:59-68. 33. Bassett CAL: The development and application of pulsed electromagnetic fields(PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am* 1984;15:61-88.
24. Bassett CAL, Pilla AA, and Pawluk RJ: A nonoperative salvage of surgically-resistant pseudoarthrosis and non-union by pulsating electromagnetic fields. *Clin Orthop* 1977;124:128-143.
25. Hass DW: Pulsating electromagnetic current induction of mandibular condyles in the cat. *J Dent Res* 1984;63:335.
26. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Kaku T, Sakaguchi K: Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:354-60.
27. Fini M, Cadossi R, Cane V, Cavani F, Giavaresi G, Krajewski A, Martini L, Aldini NN, Ravaglioli A, Rimondini L, Torricelli P, Giardino R: The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res* 2002;20:756-63.
28. Buzza EP, Shibli JA, Barbeiro RH, Barbosa JR: Effects of electromagnetic field on bone healing around commercially pure titanium surface: histologic mechanical study in rabbits. *Implant Dent* 2003;12:182-7.
29. Grissett JD: Biological effects of electric and magnetic fields associated with ELF communications systems, *Proceeding of IEEE* 1980;68:98-104.
30. Bolander MR: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:165-170.
31. Kloen P, Di Paola M, Borens O et al: BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 2003;33:362-371.
32. Stenport VF, Johansson C, Heo SJ et al: Titanium implants and BMP-7 in bone: an experimental model in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:247-254.
33. Urist MR, Raskin K, Goltz D et al: Endogenous bone morphogenic protein : immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit' s ear : *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1382-1389.
34. Lee SH, Song SI, Hwang KG et al: The experimental study of the regeneration on β -TCP in rabbit cranial bone. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2004;30:282-291.
35. Watanabe K, Niimi A, Ueda M: Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:26-32.
36. Street J, Bao M, deGuzman L et al: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *PNAS* 2002;99:9656-9661.