

# Nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng hợp chất octacalcium phosphate/collagen khi mang protein tạo hình xương người tái tổ hợp typ 2 liều thấp trong tái tạo xương

## Research on the application of octacalcium phosphate/collagen composite to carry low-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration

Nguyễn Điện Biên

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

### Tóm tắt

*Mục tiêu:* Đánh giá việc sử dụng octacalcium phosphate/collagen (OCP/Col) như một chất mang để giảm nồng độ protein tạo hình xương người tái tổ hợp typ 2 (rhBMP-2) mà vẫn đạt hiệu quả. *Đối tượng và phương pháp:* Nghiên cứu thực nghiệm mô tả cắt ngang có đối chứng so sánh. Đĩa xốp Atelocollagen-ACS hoặc OCP/Col được ngâm tẩm với các nồng độ rhBMP-2 khác nhau và được cấy ghép vào 60 con chuột có tổn thương khuyết hổng xương sọ. Mô cấy ghép được lấy sau 4, 6 tuần. *Kết quả:* Có sự hình thành mô cứng đồng nhất trong các tổn thương của nhóm OCP/Col ở tất cả các nồng độ rhBMP-2. Nhóm ACS có 0,25µg rhBMP-2 hầu như không tạo xương. Mật độ khoáng xương ở tất cả các nhóm không phụ thuộc vào nồng độ rhBMP-2. Sự hình thành xương tiến triển phụ thuộc vào nồng độ rhBMP-2 ở cả 2 nhóm. Vùng xương mới ở nhóm OCP/Col nhiều hơn đáng kể so với nhóm ACS. *Kết luận:* OCP/Col có thể là chất mang rhBMP-2, giảm được đến 1/4 liều hiệu quả của rhBMP-2, tránh được các biến chứng do rhBMP-2 ở liều cao gây ra.

*Từ khóa:* rhBMP-2, tái tạo xương, collagen, octacalcium phosphate, protein tạo hình xương người typ 2.

### Summary

*Objective:* To evaluate the effective use of octacalcium phosphate/collagen (OCP/Col) as a carrier to reduce the concentration of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) but still be effective. *Subject and method:* A cross-sectional descriptive experimental study with comparative control. Atelocollagen-ACS or OCP/Col sponge discs were impregnated with different concentrations of rhBMP-2 and implanted in 60 mice with calvarial bone defects. The transplanted tissue was obtained after 4, 6 weeks. *Result:* There was perform hard tissue formation in the defects of the OCP/Col groups at all concentrations of rhBMP-2. The ACS group had 0.25µg of rhBMP-2 showed almost no bone formation. Bone mineral density in all groups was independent of rhBMP-2 concentration. Progressive bone formation was dependent on rhBMP-2 concentration in both groups. The new bone area was significantly more in the OCP/Col groups than in the ACS groups. *Conclusion:* OCP/Col can be a carrier of

Ngày nhận bài: 5/10/2021, ngày chấp nhận đăng: 28/12/2021

Người phản hồi: Nguyễn Điện Biên, Email: dentistbien@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

rhBMP-2, reducing the effective dose of rhBMP-2 by up to 1/4, avoiding complications caused by rhBMP-2 at high doses.

*Keywords:* rhBMP-2, bone regeneration, collagen, octacalcium phosphate, recombinant human bone morphogenetic protein 2.

## 1. Đặt vấn đề

Tái tạo xương là một thách thức trong phẫu thuật răng hàm mặt vì có nhiều trường hợp cần tái tạo xương ở vùng này. Mất hoặc tiêu xương hàm gây ra nhiều hậu quả nghiêm trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng ăn nhai, thẩm mỹ. Vật liệu ghép xương cũng như kỹ thuật ghép xương vùng này cũng có ít nhiều khác biệt so với khi ghép xương tại các vùng khác trên cơ thể do môi trường trong miệng, hoạt động của các cơ quanh miệng, cơ hàm cũng như kết quả thẩm mỹ biểu hiện phần lớn ngay lập tức sau ghép... Trong thực hành lâm sàng, ghép xương tự thân vẫn là tiêu chuẩn vàng để tái tạo xương vì cả tính năng tạo xương và tiêu xương vượt trội. Tuy nhiên, kỹ thuật này có một số nhược điểm như tính sẵn có hạn chế và tỷ lệ mắc bệnh tại vị trí hiến. Hydroxyapatite (HA) và  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) đã được áp dụng rộng rãi trong các thực hành lâm sàng; tuy nhiên, những vật liệu này đã không thay thế được ghép xương tự thân dù chúng có tính tương thích sinh học vượt trội và khả năng tạo xương bề mặt (osteoconductivity). Lí do là chúng không có khả năng quy nạp xương (osteoinductivity) [8]. Protein tạo hình xương người tái tổ hợp typ 2 (rhBMP-2), là một trong những protein quy nạp xương quan trọng nhất. Trong phẫu thuật răng hàm mặt, nó đã được phê duyệt để sử dụng lâm sàng trong phục hồi huyết răng sau nhổ và nâng xoang hàm trên tại Mỹ. rhBMP-2 cho thấy khả năng tái tạo xương ưu việt, tuy nhiên, một số tác dụng phụ đã được báo cáo như phù nề cục bộ hay khả năng gây ung thư khi sử dụng ở liều cao [3]. rhBMP-2 được lưu trú tại vị trí tổn thương xương bằng chất mang và được giải phóng dần dần để tạo xương. Sự kích thích tăng trưởng của rhBMP-2 chỉ có hiệu quả khi được khu trú và duy trì trong vài tuần.

Xốp atelocollagen (ACS) hiện được sử dụng làm chất mang rhBMP-2 và đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp phép. Tuy nhiên, đã có nhiều bài báo chứng minh ACS sẽ giải phóng rhBMP-2 ngay lập tức [2]. Do đó, cần phải tìm được một chất mang có khả năng duy trì giải phóng rhBMP-2 một cách tự động và có tính năng, hoạt động như một chất thay thế xương.

Octacalcium phosphate (OCP) là tiền chất trực tiếp của apatit sinh học, chuyển đổi bền vững thành apatit sinh học và không thể đảo ngược trong các điều kiện sinh lý. Hơn nữa, OCP đã được chứng minh tăng cường sự biệt hóa của tế bào tạo xương và có hiệu quả trong việc tái tạo xương vì khả năng tái tạo xương cao [9] hay khả năng hấp thụ nhanh so với HA hoặc  $\beta$ -TCP [4]. Để cải thiện đặc tính vật lý của nó, một hỗn hợp bao gồm OCP và collagen (OCP/Col) đã được phát triển. OCP/Col đã được chứng minh là mang lại khả năng tái tạo xương tăng cường đáng kể so với  $\beta$ -TCP hoặc HA collagen. BMP-2 được biết là hấp thụ trong cả canxi photphat và collagen [7]. Do đó, chúng tôi đề xuất rằng OCP/Col có thể là chất mang ưu việt cho rhBMP-2 để giảm thiểu liều rhBMP-2 hiệu quả. Mục tiêu của nghiên cứu này là để đánh giá tiềm năng tạo xương của rhBMP-2 liều thấp được mang trên OCP/Col so với khi được mang trên ACS.

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Chuẩn bị OCP, OCP/Col, atelocollagen

OCP được tổng hợp bằng cách kết tủa trực tiếp và sàng để thu được hạt có kích thước 300–500 $\mu$ m. Dung dịch collagen đã được chuẩn bị của công ty NMP collagen PS (Nhật Bản). Các hạt OCP đã sàng được trộn vào dung dịch collagen. Tỷ trọng OCP trong OCP/Col được điều chỉnh thành 77% trọng lượng. Hỗn hợp này được đông khô, xử lý khử nhiệt

bằng nhiệt và khử trùng bằng cách sử dụng chiếu xạ tia gamma để cho ra sản phẩm cuối là các đĩa có đường kính 5mm. rhBMP-2 được hòa tan trong nước cất ở nồng độ 0,00, 0,01 và 0,04 $\mu$ g/ $\mu$ l. Sau đó, 25 $\mu$ l dung dịch rhBMP-2 được nhỏ vào mỗi đĩa OCP/Col hoặc ACS (nhóm đối chứng). Các vật liệu này được lần lượt kí hiệu là 0,00 OCP/Col, 0,25 OCP/Col, 1,00 OCP/Col, 0,00 ACS, 0,25 ACS, và 1,00 ACS.

## 2.2. Động vật và quy trình cấy ghép

60 con chuột đực 10 tuần tuổi đã được sử dụng. Cấy ghép được tiến hành dưới gây mê toàn thân. Sau khi khử trùng vùng mổ, rạch da hình vòng cung từ vùng tiền não thất trái sang phải qua vùng trán. Màng xương của vùng vòm sọ bị gạt sang bên. Sử dụng mũi khoan có đường kính 5mm trên tay khoan điện để tạo ra một tổn thương khuyết hổng xương vòm sọ có độ dày hết xương, đường kính 5mm dưới sự tưới nước muối sinh lý liên tục. Vật liệu cấy ghép sau đó được cấy vào phần khuyết của xương vòm sọ. Năm con chuột được cấy ghép cho mỗi nhóm. Sau khi cấy ghép vật liệu, màng xương và da được đặt và khâu lại. Ở nghiên cứu này, các mô cấy ghép được thu thập tại thời điểm bốn và sáu tuần sau phẫu thuật. Toàn bộ thí nghiệm đều được thực hiện tại Trung tâm Thí nghiệm Động vật của Đại học Nagasaki và tuân theo các quy trình đã được Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật địa phương của Đại học Nagasaki phê duyệt.

## 2.3. Phân tích hình thái và phân tích định lượng xương bằng chụp Micro-CT

Phân tích hình ảnh để định lượng và hình thái của xương mới hình thành được thực hiện bằng máy chụp Micro-CT trong các điều kiện tiêu chuẩn (90kV, 150mA, hai phút). Trong phân tích ba chiều bằng phần mềm phân tích cấu trúc (TRI/3D-BON), vùng xương mới hình thành sau khi lấy mẫu sẽ được phân tích mật độ khoáng xương (Bone Mineral Density-BMD), với mật độ được thiết lập từ 300mg/cm<sup>3</sup> và 1.500mg/cm<sup>3</sup> và phạm vi chiết xuất của xương được xác định trong khoảng từ 300mg/cm<sup>3</sup> đến 1.100mg/cm<sup>3</sup>.

## 2.4. Chuẩn bị mô và kiểm tra mô học

Sau khi chụp Micro-CT, các mẫu được ngâm trong PBS qua đêm và cố định trong 4% paraformaldehyde 24 giờ. Các mẫu sau đó được khử trùng bằng EDTA trong 10 ngày và rửa bằng nước cất. Tiếp đến, các mẫu vật được cắt thành hai mảnh từ trung tâm của tổn thương và được nhúng vào parafin tạo thành khối. Các lát cắt mẫu vật dày 5 $\mu$ m được cắt từ khối parafin rồi nhuộm bằng hematoxylin và eosin. Hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi quang học (AxioCam ERc 5s, ZEISS).

## 2.5. Đo định lượng vùng xương vỏ và xương tuỷ

Định lượng vùng xương vỏ và xương tuỷ trong mô cấy ghép được đo tại các mặt cắt mô học ở gần trung tâm của tổn thương. Dữ liệu xương vỏ và xương tuỷ được trích xuất bằng Adobe Photoshop® CS6 Extended. Sau khi chuyển đổi sang ảnh JPEG, thể tích dữ liệu (Kilobyte) của xương vỏ và xương tuỷ được đo bằng trình xem ảnh Windows 10.

## 2.6. Phân tích thống kê

Phân tích thống kê tất cả dữ liệu Micro-CT được thực hiện bằng JMP® phiên bản 13 (Viện SAS, Cary, NC, Hoa Kỳ). Sự thay đổi theo thời gian của mỗi giá trị BMD của nhóm OCP/Col được phân tích bằng một bài kiểm tra so sánh nhiều đối tượng không tham số. Giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD). Giá trị p nhỏ hơn 0,05 có ý nghĩa thống kê.

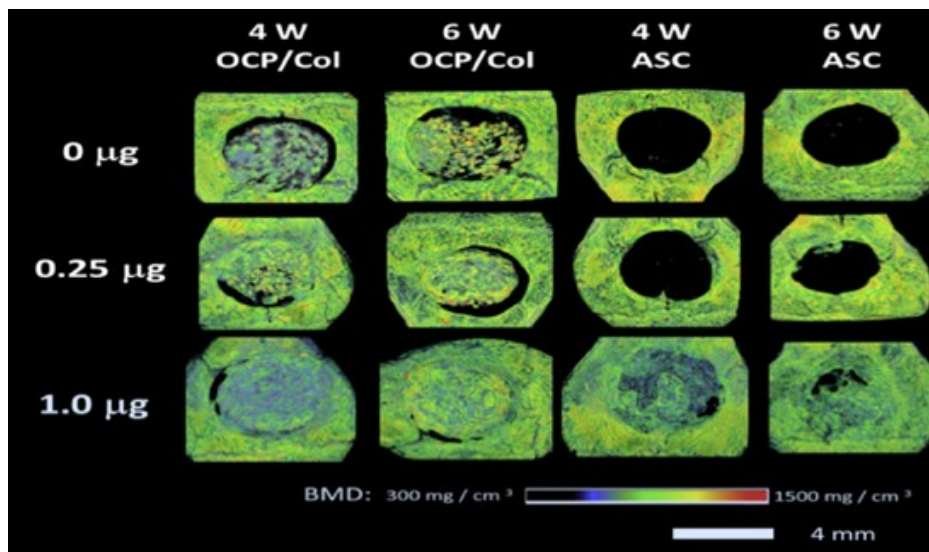
Toàn bộ quá trình nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Vật liệu tái sinh và phẫu thuật răng hàm mặt, Đại học Y Nagasaki dưới sự giám sát của giáo sư-chủ nhiệm khoa.

## 3. Kết quả

### 3.1. Phân tích hình thái bằng Micro-CT

Phân tích hình thái cho thấy nhóm 0,00 và 0,25 ACS hầu như không hình thành mô cứng, trong khi nhóm 1,00 ACS có cho thấy sự hình thành mô cứng ở mức độ nhất định. Ngược lại, sự hình thành mô cứng được ghi nhận trong tổn thương của cả nhóm OCP/Col ở tất cả các nồng độ rhBMP-2. Đồng thời ở

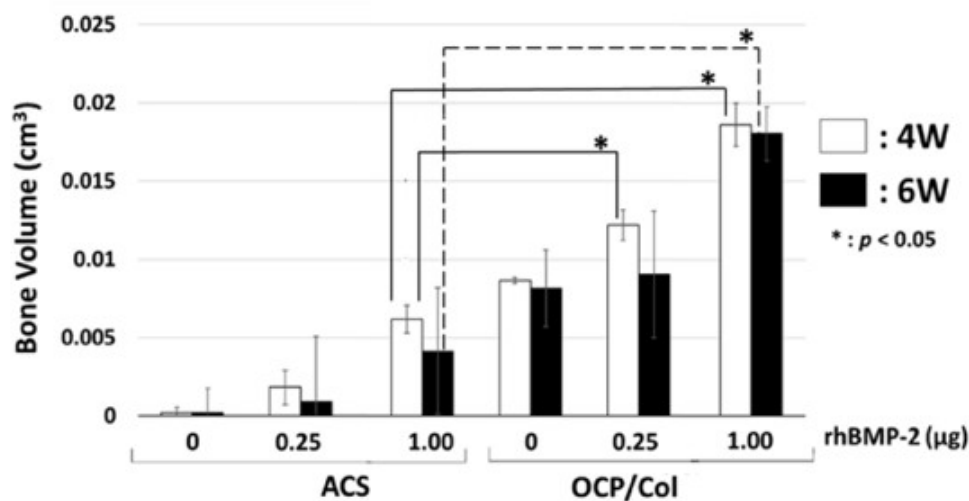
nhóm này, vùng sáng cản sóng có phụ thuộc nồng độ rhBMP-2 (Hình 1).



Hình 1. Sự hình thành mô cứng trong nhóm ACS và OCP/Col.

### 3.2. Phân tích hình thái thể tích xương mới bằng phân tích hình ảnh Micro-CT

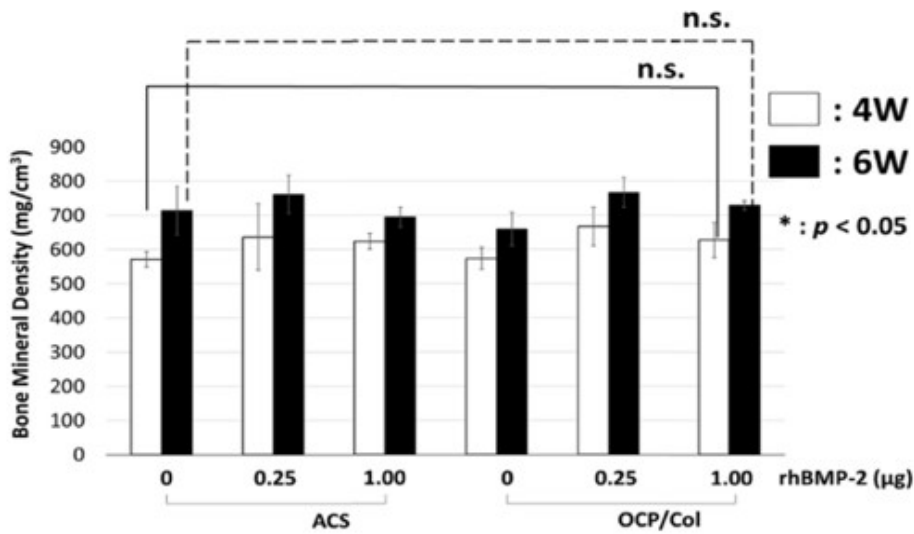
Nhóm OCP/Col tạo ra lượng thể tích xương mới nhiều hơn nhóm ACS. Cụ thể, 0,25 OCP/Col và 1,00 OCP/Col cho thấy thể tích xương mới hình thành tăng đáng kể so với 1,00 ACS - nhóm có thể tích xương cao nhất trong các nhóm ACS, ở 4 tuần. Ở thời điểm 6 tuần, nhóm 1,00 OCP/Col cho thấy sự gia tăng đáng kể về thể tích xương so với 1,00 ACS (Hình 2).



Hình 2. Thể tích xương của các nhóm ACS và OCP/Col

### 3.3. Mật độ khoáng xương

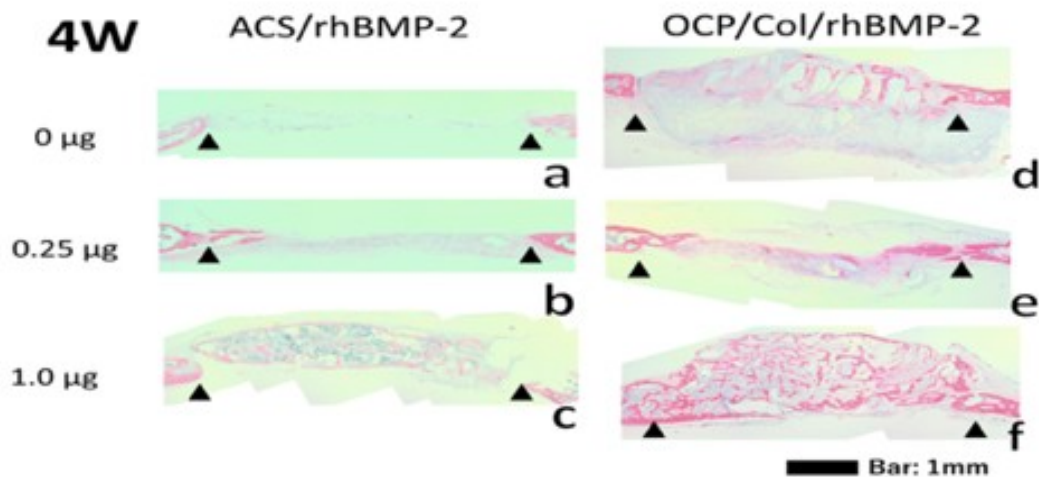
BMD có xu hướng tăng từ 4 đến 6 tuần sau cấy ghép ở tất cả các nhóm. Không có sự khác biệt đáng kể về BMD giữa nhóm ACS và OCP/Col. Ví dụ: BMD của nhóm 1,00 OCP/Col là nhóm tạo ra khối lượng xương cao nhất không khác biệt đáng kể so với nhóm 0,00 ACS ở cả bốn và sáu tuần (Hình 3).



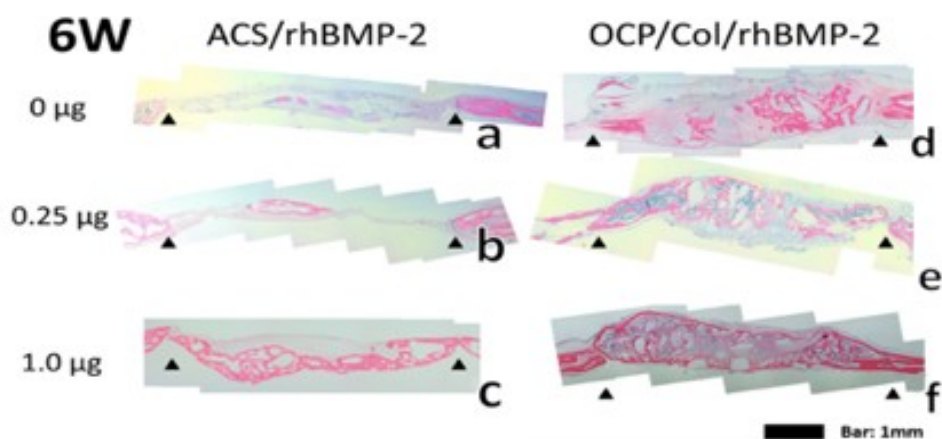
Hình 3. Mật độ khoáng xương của nhóm ACS và OCP/Col

3.4. Đánh giá mô học

Nhóm 0,00 và 0,25 ACS cho thấy không có sự hình thành xương tại tổn thương, trong khi nhóm 1,00 ACS cho thấy một lượng nhất định xương mới được hình thành sau bốn tuần. Mặt khác, ở nhóm OCP/Col, diện tích xương mới tăng dần khi nồng độ rhBMP-2 tăng lên (Hình 4). Nhóm 0,00 và 0,25 ACS cho thấy sự hình thành xương nhẹ ở vị trí tổn thương còn nhóm 1,00 ACS cho thấy đã có sự kết nối giữa rìa xương quanh tổn thương với xương mới sau sáu tuần. Ngược lại, nhóm OCP/Col cho thấy sự hình thành xương rõ rệt so với nhóm ACS (Hình 5). Hầu như tất cả nhóm được cấy ghép ACS đều bị hấp thụ vật liệu cấy ghép, trong khi nhóm OCP/Col vẫn còn được duy trì, đặc biệt là ở nồng độ rhBMP-2 thấp hơn. Ngoài ra, xương mới hình thành ở nhóm OCP/Col dày hơn ở nhóm ACS. Ta cũng có thể thấy nhóm OCP/Col với rhBMP-2 có sự hình thành xương trưởng thành nhiều hơn cùng với tủy xương.



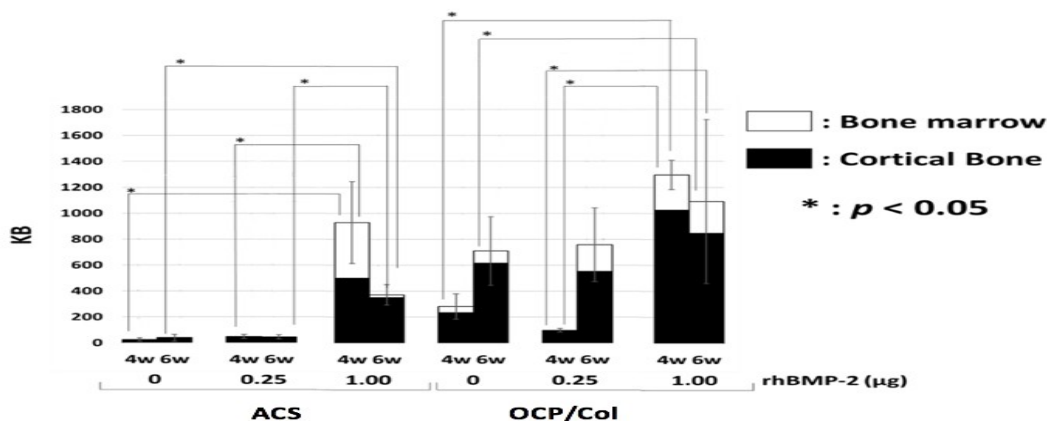
Hình 4. Hiệu quả của ACS và OCP/Col khi có và không có rhBMP-2 đến sự hình thành xương ở các tổn thương 4 tuần sau phẫu thuật.



**Hình 5.** Hiệu quả của ACS và OCP/Col khi có và không có rhBMP-2 đến sự hình thành xương ở các tổn thương 6 tuần sau phẫu thuật.

**3.5. Đo định lượng vùng xương vỏ và xương tủy**

Diện tích của vùng xương vỏ và vùng tủy xương mới hình thành được đo bằng các mẫu mô học cho thấy một xu hướng tương tự, đó là thể tích xương được đo bằng micro-CT tăng lên theo sự tăng nồng độ rhBMP-2 đối với cả nhóm ACS và OCP/Col. Diện tích xương mới của các nhóm OCP/Col thì cao hơn diện tích của các nhóm ACS ở cùng các nồng độ tương ứng rhBMP-2. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát giữa mức thấp hơn (0,00, 0,25) và cao hơn (1,00) nồng độ rhBMP-2 trong cả nhóm ACS và OCP/Col (Hình 6). 0,25 OCP/Col, là nồng độ thấp nhất của rhBMP-2, cho thấy vùng xương tương tự với 1,00 ACS sau 6 tuần.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của ACS và OCP/Col khi có và không có rhBMP-2 trên các vùng xương vỏ và tủy xương ở 4 và 6 tuần sau phẫu thuật.

**4. Bàn luận**

Khi sử dụng BMP nói chung trong lâm sàng, việc lựa chọn một chất mang thích hợp là vô cùng quan trọng vì nhiều nguyên nhân. rhBMP-2 sẽ khuếch tán trong một thời gian ngắn khi được sử dụng tại chỗ nếu không có chất mang, do đó cần có chất mang thích hợp để phân phối, lưu giữ và giải phóng BMP-2

một cách bền vững [7]. Trong thực hành lâm sàng hiện tại, ACS là chất mang tiêu chuẩn cho rhBMP-2 được bán thương mại. Tuy nhiên, phải sử dụng nồng độ rhBMP-2 cao khi ACS được sử dụng làm chất mang [5]. Như đã chứng minh trước đây, liều cao của BMP-2 gây ra các tác dụng phụ lâm sàng nghiêm trọng như hình thành xương quá phát, tiêu xương do huỷ cốt bào trung gian, tạo tế bào lipid

không mong muốn và ung thư. Ngoài ra, rhBMP-2 liều cao có thể gây phù và sưng tấy cấp tính, dẫn đến tắc nghẽn đường thở gây tử vong khi dùng ở vùng miệng và hàm mặt [10]. Do đó, nên áp dụng rhBMP-2 liều thấp để tránh những tác dụng phụ này. Trong sản phẩm thương mại, nồng độ của rhBMP-2 với chất mang ACS là 1,5 $\mu$ g/ $\mu$ l khi dùng cho người và tổng liều không quá 12mg trong 8CC thể tích xương ghép.

Có một số lý do tại sao OCP/Col là chất mang tiềm năng vượt trội cho rhBMP-2 so với ACS. Đầu tiên, theo một báo cáo trước đây, bản thân OCP/Col có hoạt tính quy nạp xương [6]. Như thể hiện trong Hình 1, 4 và 5, sự hình thành xương mới đã được quan sát ở vùng rìa tổn thương ở nhóm OCP/Col không có rhBMP-2, cho thấy rằng OCP/Col có tạo ra quá trình tạo xương bề mặt cũng như quá trình quy nạp xương. Rõ ràng rhBMP-2 làm tăng hoạt động quy nạp xương của OCP/Col, vì OCP/Col với rhBMP-2 gây ra sự hình thành xương trưởng thành với xương vỏ và tủy xương nhiều hơn so với OCP/Col không có rhBMP-2 (Hình 1, 4 và 5). BMD có xu hướng tăng phụ thuộc vào thời gian, nhưng không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể. Cũng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm ACS và OCP/Col với nồng độ rhBMP-2 khác nhau (Hình 3). Điều này cho thấy rằng mặc dù chất lượng của xương tương tự nhau, nhưng số lượng là khác nhau giữa ACS và OCP/Col với tư cách là chất mang. Thứ hai, thành phần của OCP/Col thuận lợi để sử dụng làm chất mang rhBMP-2 vì rhBMP-2 được biết là liên kết chặt chẽ với canxi photphat và collagen (là những thành phần chính của OCP/Col). Người ta suy đoán rằng rhBMP-2 được giải phóng khi OCP và collagen bị phân hủy, cho phép việc phát hành chậm rhBMP-2 [1]. Tàn dư của OCP/Col vẫn được quan sát thấy sau khi cấy ghép 6 tuần, trong khi ACS đã được hấp thu hoàn toàn. Điều này có thể hỗ trợ cho việc giải phóng bền vững rhBMP-2 với OCP/Col làm chất mang. Hơn nữa, rhBMP-2 ảnh hưởng đến quá trình hóa học cũng như quá trình tế bào gốc trung mô tăng sinh và biệt hóa thành các nguyên bào xương, do đó, cấu trúc xốp của OCP/Col (bao gồm collagen) là môi trường thích hợp cho sự di chuyển của tế bào. Cuối cùng,

OCP/Col có độ bền cơ học vượt trội so với ACS. Chúng tôi quan sát thấy rằng xương mới hình thành trong nhóm cấy ghép OCP/Col dày hơn so với xương trong nhóm cấy ghép ACS (Hình 4 và 5). Phát hiện này cho thấy OCP/Col đủ cứng để chống lại áp lực từ vật da. rhBMP-2/ACS đã được chấp thuận ứng dụng lâm sàng để bảo tồn huyết răng sau nhổ và nâng xoang hàm trên ở vùng răng hàm mặt. Tại những vùng này, chất liệu implant không bị áp lực vì được bao bọc bởi thành xương. Tuy nhiên, chất liệu cấy ghép cần có độ bền cơ học nhất định trong trường hợp nâng xương ổ răng. Về mặt này, rhBMP-2 với OCP/Col có thể là một vật liệu cấy ghép tốt để tái tạo xương có hướng dẫn (Guide Bone Regeneration-GBR) vì nó có cả độ cứng và tính linh hoạt.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh khả năng tái tạo xương vượt trội đối với các tổn thương khuyết hổng xương vòm sọ chuột với rhBMP-2 được mang trên OCP/Col. Bản thân OCP/Col có hoạt tính quy nạp xương, nhưng rhBMP-2 liều thấp đã giúp tăng cường hoạt động của hoạt tính này. Theo phân tích định tính sử dụng Micro-CT và các kiểm tra mô học, nồng độ rhBMP-2 có thể giảm xuống dưới 1/4 lần khi sử dụng OCP/Col làm chất mang so với ACS (Hình 2 và 6). Gần đây, nhu cầu tái tạo xương ổ răng ngày càng gia tăng trước sự phổ biến của phương pháp trồng răng implant. Chúng tôi gợi ý rằng rhBMP-2 với OCP/Col có thể là vật liệu cấy ghép lý tưởng cho GBR vì tính năng quy nạp xương vượt trội cũng như các đặc tính cơ học về độ cứng và tính linh hoạt của nó.

## 5. Kết luận

Tóm lại, mặc dù bản thân OCP/Col là một chất ghép xương tốt, nó cũng có thể là chất mang cho rhBMP-2, giúp làm giảm liều hiệu quả của rhBMP-2, từ đó có thể áp dụng trong lâm sàng một cách an toàn, hiệu quả và đáng tin cậy hơn.

## Tài liệu tham khảo

1. Boerckel JD, Kolambkar YM et al (2011) *Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration*. Biomaterials 32: 5241-5251.

2. Brown KV, Li B et al (2011) *Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release*. Tissue Eng Part A 17: 1735-1746.
3. Carreira A, Lojudice F et al (2014) *Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives*. J Dent Res 93: 335-345.
4. Kamakura S, Sasano Y et al (2002) *Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than  $\beta$ -tricalcium phosphate and hydroxyapatite*. J Biomed Mater Res Part A 59: 29-34.
5. Kawai T, Tanuma Y et al (2016) *Clinical safety and efficacy of implantation of octacalcium phosphate collagen composites in tooth extraction sockets and cyst holes*. J Tissue Eng 7: 2041731416670770.
6. Kouketsu A, Matsui K et al (2020) *Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic factors to promote bone regeneration*. J Tissue Eng Regen Med 14: 99-107.
7. Lee YH, Lee BW et al (2019) *Application of alginate microbeads as a carrier of bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 107: 286-294.
8. Lichte P, Pape HC et al (2011) *Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence*. Injury 42: 569-573.
9. Suzuki O, Kamakura S et al (2006) *Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite*. Biomaterials 27: 2671-2681.
10. Woo EJ (2012) *Adverse events reported after the use of recombinant human bone morphogenetic protein 2*. J Oral Maxillofac Surg 70: 765-767.