

## 자가기질혈관분획을 이용한 수지골 결손 환자의 치료

정태원 · 지이화 · 김덕우 · 동은상 · 윤을식

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

### Treatment of Phalangeal Bone Defect Using Autologous Stromal Vascular Fraction from Lipoaspirated Tissue

Taewon Jeong, M.D., Yi Hwa Ji, M.S.,  
Deok Woo Kim, M.D., Ph.D., Eun Sang Dhong, M.D., Ph.D.,  
Eul Sik Yoon, M.D., Ph.D.

Department of Plastic Surgery and Reconstructive Surgery,  
Korea University College of Medicine, Ansan, Korea

**Purpose:** Adipose-derived stromal cells (ASCs) are readily harvested from lipoaspirated tissue or subcutaneous adipose tissue fragments. The stromal vascular fraction (SVF) is a heterogeneous set of cell populations that surround and support adipose tissue, which includes the stromal cells, ASCs, that have the ability to differentiate into cells of several lineages and contains cells from the microvasculature. The mechanisms that drive the ASCs into the osteoblast lineage are still not clear, but the process has been more extensively studied in bone marrow stromal cells. The purpose of this study was to investigate the osteogenic capacity of adipose derived SVF cells and evaluate bone formation following implantation of SVF cells into the bone defect of human phalanx.

**Methods:** Case 1 a 43-year-old male was wounded while using a press machine. After first operation, segmental bone defects of the left 3rd and 4th middle phalanx occurred. At first we injected the SVF cells combined with demineralized bone matrix (DBM) to defected 4th middle phalangeal bone lesion. We used P (L/DL)LA [Poly (70L-lactide-co-30DL-lactide) Co Polymer P (L/DL)LA] as a scaffold. Next, we implanted the SVF cells combined with DBM to repair left 3rd middle phalangeal bone defect in sequence. Case 2 was a 25-year-old man with crushing hand injury. Three months after the previous surgery, we implanted the SVF cells combined with DBM to restore right 3rd middle phalangeal bone defect by syringe injection. Radiographic images were taken at follow-up hospital

visits and evaluated radiographically by means of computerized analysis of digital images.

**Results:** The phalangeal bone defect was treated with autologous SVF cells isolated and applied in a single operative procedure in combination with DBM. The SVF cells were supported in place with mechanical fixation with a resorbable macroporous sheets acting as a soft tissue barrier. The radiographic appearance of the defect revealed a restoration to average bone density and stable position of pharyngeal bone. Densitometric evaluations for digital X-ray revealed improved bone densities in two cases with pharyngeal bone defects, that is, 65.2% for 4th finger of the case 1, 60.5% for 3rd finger of the case 1 and 60.1% for the case 2.

**Conclusion:** This study demonstrated that adipose derived stromal vascular fraction cells have osteogenic potential in two clinical case studies. Thus, these reports show that cells from the SVF cells have potential in many areas of clinical cell therapy and regenerative medicine, albeit a lot of work is yet to be done.

**Key Words:** Stromal vascular fraction, Adipose stem cells, Bone, Adipose tissue

## I. 서 론

현재 다양한 연부조직 및 골의 결손을 보충하기 위하여 배아줄기세포를 이용한 연구나 골수나 지방에서 유래된 줄기세포를 이용하여 좋은 결과를 얻은 다양한 연구들이 보고되고 있다.<sup>1</sup> 하지만 배아줄기세포 및 성체줄기세포의 경우 공여부의 제공이 필요하고 악성화 가능성 등에 대해서도 완전한 연구가 이루어지지 못하였다. 또 식품의약품 안전청에서도 줄기세포의 안정성이 확보되지 않은 상태에서 임상적으로 이용하는 것을 제한하고 있어 이러한 줄기세포를 이용하여 임상적인 치료에 이용하는 것은 현재로서는 매우 어려운 일이다.

한편, 최근 성형외과 영역에서는 쉽게 얻을 수 있는 지방조직에 대한 연구가 활발하며, 특히 지방조직에서 채취한 성체줄기세포에 대한 연구결과가 많이 발표되고 있다.<sup>1-6</sup> 지방조직에서 얻는 성체줄기세포는 공여부 손실이 적으며, 쉽게 많은 양을 채취할 수 있는 장점을 가지고

Received March 23, 2011

Revised May 17, 2011

Accepted May 23, 2011

**Address Correspondence:** Eul Sik Yoon, M.D., Ph.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Ansan Hospital, 516 Gojan-dong, Danwon-gu, Ansan-si, Gyeonggi 425-707, Korea. Tel: 031) 412-5070/Fax: 031) 475-5074/E-mail: yesanam2@korea.ac.kr

있고, 골수에서 추출한 줄기세포처럼 근육, 지방, 신경, 골, 연골 등의 다양한 세포로 분화될 수 있음이 여러 논문에서 확인되었다.<sup>14</sup>

하지만, 이러한 분화된 지방줄기세포를 얻기 위한 배양과정의 안정성에 대해 연구가 미흡하여 실제 임상적인 적용에는 한계가 있다. 이러한 이유로 지방줄기세포 중에서 배양 전 단계의 이종세포복합물인 기질혈관분획 [SVF (Stromal vascular fraction); 세포 입상체 (pellet), 이하 SVF]에 대한 관심이 커지고 있으며, 이 SVF를 이용하여 골 결손 부위를 재건한 실험적 논문이 발표되기도 하였다.<sup>7</sup>

따라서 저자들은 임상적으로 쉽게 이용이 가능한 지방조직으로부터 SVF를 얻었으며, 배양 전 단계의 이종세포복합물인 SVF를 골전도 및 골유도 능력이 있는 것으로 알려진, 광물제거골기질 (탈회골; demineralized bone matrix; DBM. 이하 광물제거골기질)과 혼합하여, 실제 골 결손 환자에게 있어서 골형성에 미치는 영향을 임상적 적용을 통해서 고찰하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 환자군 및 지방줄기세포의 이식

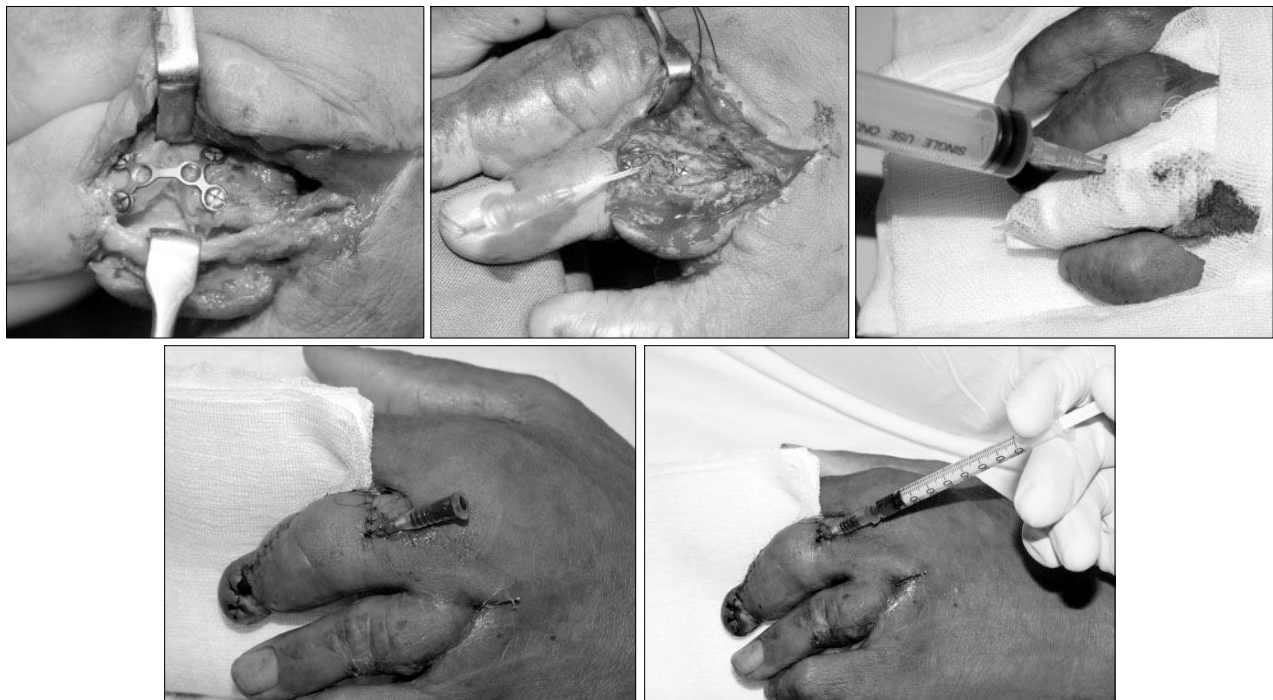
#### 증례 1

43세의 남자 환자로 프레스 기계에 의한 좌측 수부 압궐 손상

을 주소로 본원에 내원하였다. 내원 당일 좌측 제 3수지의 재혈관화 및 K-강선을 이용한 관절적 정복술을 시행하였다. 수술 2개월 후 좌측 제 3수지의 재혈관화는 성공적이었으나 좌측 제 4수지의 피부 결손의 호전이 없어 좌측 서혜부로부터 원위피판 (distant flap)을 시행하였다. 수상 4개월 후 좌측 제 2수지 및 제 4수지의 골 결손 소견이 관찰되어 장골로부터 골 이식술을 시행받았다. 그 후 좌측 제 4수지의 편위가 관찰되어 수상 15개월 후 교정적 절골술 및 K-강선 및 티타늄 판을 이용하여 교정하였으며, 좌측 제 2수지의 편위에 대하여 수상 후 18개월에 교정적 절골술 및 K-강선을 이용한 관절 고정술을 시행하였다.

다양한 교정술 후에도 복합골절의 합병증으로 인하여 좌측 제 3수지 및 제 4수지의 변형 및 단축이 발생하였다. 우선 제 4수지의 단축 및 변형을 교정하기 위하여 과거의 티타늄 판을 제거하였으며, 절골술을 시행하고 공간의 확보를 위하여 새로운 티타늄 판을 이용하여 고정하였다. 추가적인 지지체 역할이 필요하여 임상적으로 사용되는 흡수성 중합체인 P (L/DL)LA [Poly (70L-lactide-co-30DL-lactide) Co Polymer P (L/DL)LA] (GmbH Synthes, Oberdorf, Switzerland)을 사용한 후 바늘을 삽입해 놓은 상태에서 봉합을 마쳤다. 수술 후 첫날 환자의 지방흡인액 50 ml에서 추출한 SVF를 광물제거골기질과 혼합하여 투여하였다 (Fig. 1).

제 4수지의 SVF 주입 후 4개월에 골 결손의 호전을 확인하고 제 3수지의 변형을 추가적으로 교정하기 위하여 좌측 제 3수지에 두 번째 SVF 주입을 계획하였다. 동일하게 과거의 티타늄 판을 제거하였으며, 골 결손이 관찰되었으나 추가적인 고정은 필요하지 않아 동일하게 바늘을 삽입해 놓은 상태에서 봉합을



**Fig. 1.** Case 1. (Above, left) For preparation of SVF cells injection, performed corrective osteotomy and titanium plate insertion on left 4th finger. (Above, center) Absorbable polymer P (L/DL) LA was inset into bone defect. (Above, right) SVF cells injection on left 4th finger. (Below, left) The secondary surgery was performed in the same way. The next day we prepared SVF cells injection. (Below, right) SVF cells injection on left 3rd finger.



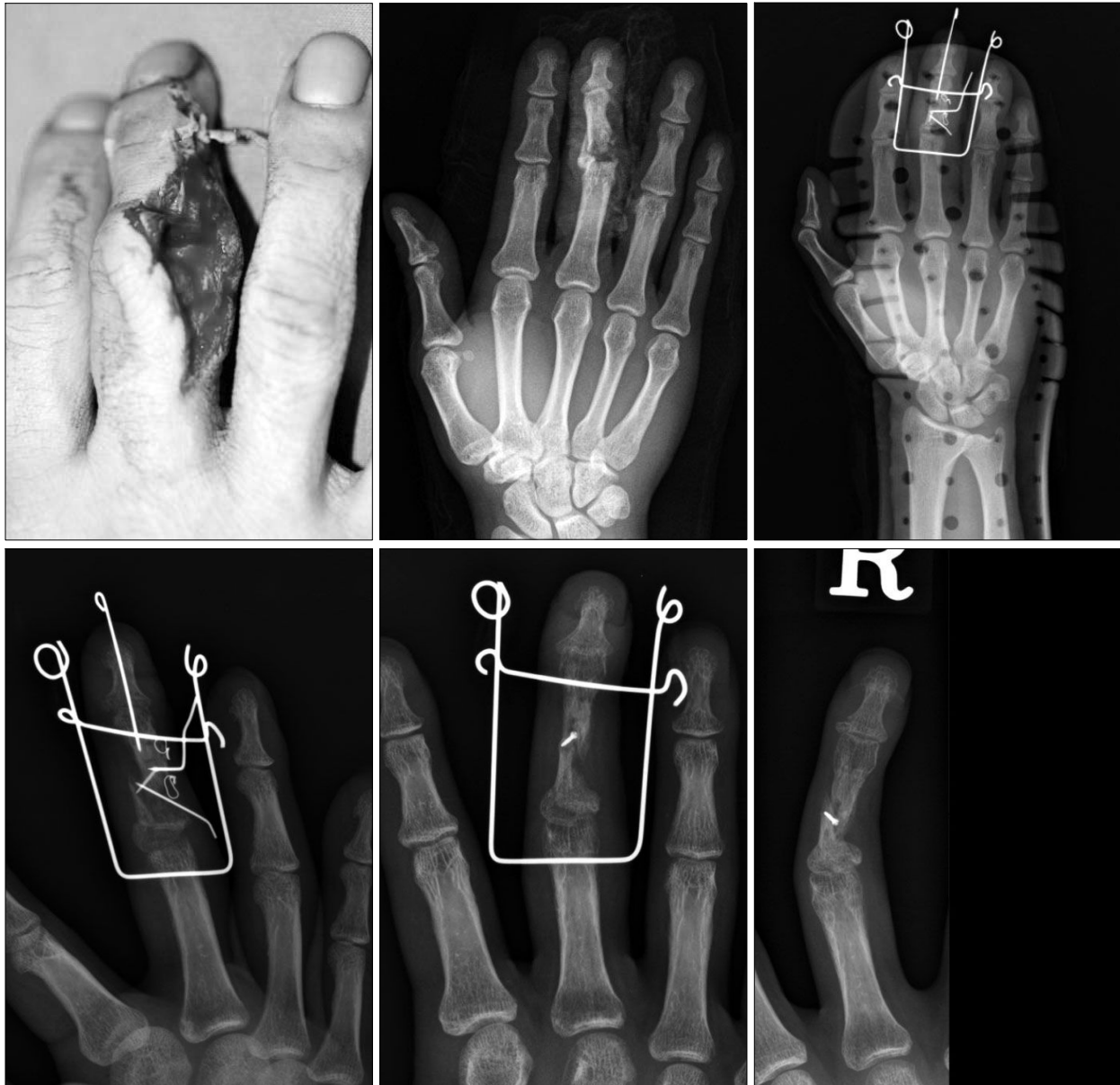
**Fig. 2.** Case 1. (Above, left) A 43-year-old man was wounded a crushing injury. (Above, center) After bone grafts and corrective osteotomy on left 2nd and 4th finger, bone defects were seen on the left 3rd and 4th middle phalangeal bone area. (Above, right) 3 months after SVF cells injection on left 4th finger. (Below, left) After 4 months after first SVF cells injection, left 4th middle phalangeal bone defect was restored. We decided additional SVF cells injection to left 3rd finger. (Below, center) 7 months after SVF cells injection of left 4th finger. 3 months after SVF cells injection of left 3rd finger. (Below, right) 12 months after SVF cells injection of left 4th finger. 8 months after SVF cells injection of left 3rd finger. The titanium plate was removed.

마쳤다. 수술 후 다음 날 환자의 지방흡인액 50 ml에서 추출한 SVF를 광물제거골기질과 혼합하여 투여하였다(Fig. 1). 두 번째 SVF 주입으로부터 8개월 후에 남아 있는 티타늄 판을 제거하고 경과관찰 하였다(Fig. 2).

#### 증례 2

25세의 남자 환자로 기계에 인한 우측 수부의 압궐 손상을

주소로 본원에 내원하였다. 내원 당일 Suzuki 프레임, K-강선 및 철선을 이용한 관혈적 정복술 및 인대봉합술을 시행하였다. 수술 후 3개월 후 Suzuki 프레임 및 K-강선의 고정은 유지되었으나 개방성 골절 및 복합 골절로 인한 수지의 변형 및 골 결손 부분이 관찰되었다. SVF 주입 전에 K-강선 및 철선을 제거한 후 금속 나사를 이용하여 결손 부위를 보강하고 환자의 지방흡인액 50 mL에서 추출한 SVF를 광물제거골기질과 혼합하여 골 결손



**Fig. 3.** Case 2. (Above, left) A 25-year-old man with open fracture of right 3rd finger. (Above, center) Pre-operative radiographic image. (Above, right) After first surgery, open reduction and internal fixation with K-wire, wiring were done. (Below, left) 3 months after first operation, the bone defect of right 3rd middle phalanx was seen. (Below, center) 1 months after SVF cells injection. (Below, right) 4 months after SVF cells injection.

이 관찰되는 부분에 투여하였다. 수술 후 4개월 동안 경과관찰 하였다 (Fig. 3).

**나. 지방줄기세포 지지체 및 광물제거골기질의 준비**

증례 1의 환자에서 좌측 제 4수지의 경우 골 결손 부위가 광범위하여 SVF를 일정 영역에 유지해야 했으며, 이 목적으로 사용된 지지체 (scaffold)로 흡수성 중합체인 P (L/DL) LA [Poly (70L-lactide-co-30DL-lactide) Co Polymer P (L/DL)LA] (GmbH Synthes, Oberdorf, Switzerland)를 사용

하였다. 이 중합체는 FDA 승인받은 물질로 안와골절의 재건을 위해 임상적으로 유용하게 사용되고 있는 흡수성 중합체이다.<sup>8</sup> 또한 지방줄기세포와 혼합되어 사용된 광물제거골기질로는 상업적으로 널리 사용되는 DBX<sup>®</sup> (Putty, Synthes, Paoli, PA, USA)를 이용하였다.

**다. 분화되지 않은 지방줄기세포가 포함된 입상체의 준비**  
대상 환자의 복부에 부분 마취를 시행하고, 지방조직을 채취하였다. 채취한 지방조직을 인산원충식염수 [phosphate

buffered saline (PBS)]로 처리하고, 0.075% 제1형 콜라게나제 [collagenase type I (Sigma, St. Louis, MO)]를 첨가하였다. 37°C의 진탕항온수조 (Water bath shaker)에 넣고 165 rpm으로 35분간 원심분해하여 불필요한 세포성분을 제거하였다. 첨가한 0.075% 제1형 콜라게나제의 반응을 중화하기 위하여 Dulbecco's modified Eagles medium-high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)을 첨가하였다. 처리한 용액을 tube에 넣고 2000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 불필요한 상층액을 제거하고 지방줄기세포를 함유하고 있는 SVF를 채취하였다.

### 라. 재생된 골의 확인

재생된 골을 확인하기 위하여 외래 추적관찰 중에 방사선 사진을 촬영하였다. 방사선 영상의 조작은 Brain3dsp<sup>®</sup>-Rat Skull Hole Model (NosDIAtch, Korea) 프로그램을 이용하였다. 또한 동일 프로그램을 이용하여 방사선 밀도 측정 (radiodensitometry)을 하였다.

## III. 결 과

두 환자 모두 경과관찰 한 결과 골절 부위의 안정성을 유지하고 있었으며, 지방줄기세포 이식 전 관찰되었던 골 결손 소견은 호전된 모습이었다. 방사선학적 소견상 골절 및 결손부위가 주위골과 융합된 소견을 보였으며 (Fig. 2, Fig. 3), 방사선사진의 골밀도분석 (Radiodensitometry)의 결과는 증례 1의 제 4수지에서 65.2%, 증례 1의 제 3수지에서 60.5%, 증례 2에서 60.1%의 결손부의 평균 골밀도를 보여 주었다.

## IV. 고 찰

현재 생명공학 분야에서 연구가 활발한 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포와 다양한 신체 조직에서 채취한 성체줄기세포가 있다.<sup>1</sup> 그 중 배아줄기세포는 다양한 조직으로 분화될 수 있어 조직의 결손을 재건하는데 이상적인 줄기세포라고 할 수 있다. 그러나 분화를 제어하는 것이 어려워 악성화의 가능성이 있으며, 윤리적인 문제가 있어 실제 임상적인 적용에 어려움이 있다.

하지만 성체줄기세포의 경우에는 이미 분화가 된 신체조직에서 채취하기 때문에 안정성의 문제 및 윤리적인 제한점을 피할 수 있다는 장점이 있다. 특히 환자의 통증을 유발하고 많은 양을 얻기 힘든 골수줄기세포 보다는 공여부의 손실이 적고 채취가 비교적 간단한 지방줄기세포가 최근 성형

외과 영역에서 연구가 활발하다.<sup>1-6</sup> 최근 Zuk<sup>2</sup> 등에 따르면, 골수줄기세포와 마찬가지로, 지방조직에서 추출한 성체줄기세포도 생체 외 실험에서 근육, 지방, 골, 연골 등 여러 가지 세포로 분화될 수 있다는 것을 보고 하였다. 또한 골형성에 대해서는 Hattori<sup>9</sup> 등이 백서를 이용하여 분화된 지방줄기세포와 골수줄기세포의 골형성능의 차이가 없음을 보고 하였다.

이러한 연구결과들은 대부분 배양의 과정을 거쳐 분화된 지방줄기세포를 이용하여 시험을 진행 하였는데, 현재 우리나라의 실정상 이처럼 배양된 지방줄기세포를 이용하여 치료를 시도하려면 식품의약품 안전청에 승인된 시설을 갖춘 세포배양실에서 분화를 진행하고 배양을 시켜야 하기에 실제 임상적 적용에 어려움이 있다.

이러한 임상적용의 한계로 인하여 최근에는 지방조직에서 추출된 세포를 배양과정을 거치지 않은 SVF를 사용한 연구결과가 발표되고 있는데 Lendeckel 등<sup>7</sup>은 외상으로 두개골의 결손이 발생한 7세의 소아에게 장골로부터 채취한 해면골과 지방흡입을 통해서 얻은 SVF를 피브리글루와 함께 두개골 결손부위에 이식함으로써 성공적으로 골 결손을 재건하였다는 보고를 하였다. 본 임상 증례에서도 지방줄기세포 중 배양 전 단계의 이중세포복합물인 SVF가 골생성의 효과가 있다는 것을 확인한 것으로 중요한 의의를 가지는 것이다.

본 연구에서는 SVF를 광물제거골기질과 혼합하여 치료를 진행하였다. 이 광물제거골기질에는 성장인자 중 BMP (Bone morphogenetic proteins)가 포함되어 있기에 골아세포의 침윤 및 분화를 촉진하여 골유도능 (osteinduction)이 있으며, 골모세포로 분화 및 내연골화를 통해 골전도능 (osteoconduction)이 있는 것으로 알려져 있다. 이 외에도 포함된 잔류 칼슘 성분, 프로테오글리칸, 콜라겐 등을 함유하고 있어 SVF의 골형성을 도와 뼈의 석회화를 용이하게 하고, 세포의 부착 및 침윤을 용이하게 해준다.<sup>10</sup>

이러한 광물제거골기질의 특성으로 인하여 광물제거골기질과 SVF를 동시에 사용하였을 때 광물제거골기질 자체의 골형성능이 SVF의 골생성 결과로 해석될 수 있다. 그러나 저자들이 SVF의 임상적용 전에 시행하였던 백서의 두개골 결손 모델을 통한 연구에 있어 광물제거골기질만을 단독으로 투여한 실험군에서 단순 방사선촬영 및 방사선 밀도를 측정 하였을 때 결손부의 평균 골밀도의 증가 (39.94%)를 보였으나, 광물제거골기질과 SVF를 같이 포함한 실험군에서 가장 우월한 평균 골밀도의 증가 (57.69%)가 관찰되어, SVF의 골형성능이 있음을 발표하였다.<sup>13</sup> 따라서 임상적 적용에 있어 최선의 치료를 위하여 SVF에 광물제거골기질을 혼합하여 치료를 진행하였다.

증례 1의 환자에서 좌측 제 4수지의 경우 골 결손 부위가 넓고, 관절부위의 고정상태를 유지하기 어려워 안정적인 지지체 (scaffold)를 보강하고 SVF와 광물제거골기질을 주입하였다. 이 지지체는 흡수성 중합체인 P(L/DL)LA [Poly(70L-lactide-co-30DL-lactide) Co Polymer P(L/DL)LA] (GmbH Synthes, Oberdorf, Switzerland)를 사용하였으며, 이 중합체는 시간이 경과하게 되면 자연분해 되고 골 형성에 필요한 공간을 만들어 주는 효과가 있다. 하지만 이러한 중합체가 자연 분해 되면서 염증반응 및 독성물질을 발생 시키기 때문에 이식된 지방 줄기세포의 증식에 영향을 끼칠 수 있다.<sup>8</sup> 이 연구에서는 이러한 증식 저해 효과를 막기 위하여 임상적으로 가장 흔하게 사용되는 중합체인 PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) 보다는 상대적으로 늦게 분해 되고 안정성이 높다고 알려진 P(L/DL)LA를 사용하였다.<sup>8,11</sup>

저자들은 이 연구에서 외래 추적관찰 시 촬영된 방사선 사진을 이용하여 방사선 밀도 측정 (radiodensitometry)을 시행하고, 골밀도 분석을 시행하였다. 단순 방사선 사진을 이용한 골병변의 판독에 있어 골 결손을 판단하는 경우 관찰자의 임상 경험, 방사선촬영 환경 등의 외적인 조건에 많은 영향을 받게 되기 때문에 객관적인 판독이 어렵다. 그러나 Morea 등<sup>12</sup>은 현재 대형병원에서 운용하고 있는 디지털화된 방사선 영상을 컴퓨터를 이용하여 정량적 분석을 시행한다면 골밀도의 측정에서 믿을 만하고 민감도 높은 수단임을 보고하였다. 따라서 본 연구에 있어 저자들은 디지털 방사선 영상을 사용하고, 관련 프로그램[Brain3dsp<sup>®</sup>-Rat Skull Hole Model (NosDIAtch, Korea)]을 통하여 방사선 밀도를 측정하였다.

본 연구는 수부 골 결손 환자 2례를 통하여 분화하지 않은 지방줄기세포를 포함한 배양하지 않은 신선지방조직 세포인 SVF를 광물제거골기질과 첨가하여 주입하고 증례에 따라서는 흡수성 지지체를 사용하여 골 생성이 촉진된다는 결과를 얻었다. 본 연구에서 광물제거골기질, 분화하지 않은 지방줄기세포 및 흡수성 지지체 등의 복합적인 상호 작용 또는 단일 물질 작용에 의한 골형성능에 대한 개별적인 해석은 불가능하다는데 이 연구의 제한점이 있을 수 있다. 또한 제한된 환자군 및 외상에 의한 골 결손만을 대상으로 하여 비교적 단기간의 기간에 걸쳐 추적관찰을 시행하여, 향후 많은 환자군을 대상으로 한 장기간의 추적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

수부 골 결손 환자의 치료에 있어서 광물제거골기질 (DBM)과 배양하지 않은 지방줄기세포가 포함된 분화 전

지방줄기세포의 입상체 (SVF)를 골 결손 부위에 주입하면 골생성이 유도된다는 것을 확인하였다. 따라서, 배양하지 않은 지방줄기세포가 포함된 세포의 입상체는 골 결손을 복원하는 것과 같은 재생의학 연구에 실용적으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## REFERENCES

1. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR: *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 13: 619, 2007
2. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211, 2001
3. Dhar S, Yoon ES, Kachgal S, Evans GR: Long-term maintenance of neuronally differentiated human adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Eng* 13: 2625, 2007
4. Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, Deugarte DA, Lee Y, Zuk PA, Hedrick MH, Benhaim P: Tissue-engineered bone from BMP2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* 115: 1665, 2005
5. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampira M, Pasini A, Sbarbati A: Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 119: 1409, 2007
6. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Sato K, Murase S, Koshima I, Yoshimura K: Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 121: 401, 2008
7. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP: Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370, 2004
8. Al-Sukhun J, Tornwall J, Lindqvist C, Kontio R: Bioresorbable poly-L/DL-lactide (P[L/DL]LA70/30) plates are reliable for repairing large inferior orbital wall bony defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 47, 2006
9. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M: Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 178: 2, 2004
10. Leupold JA, Barfield WR, An YH, Hartsock LA: A comparison of ProOsteon, DBX, and collagraft in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 79: 292, 2006
11. Landes CA, Ballon A, Roth C: Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P(L/DL)LA implants: a 5-year inpatient biocompatibility and degradation experience. *Plast Reconstr Surg* 117: 2347, 2006
12. Morea C, Dominguez GC, Coutinho A, Chilvarquer I: Quantitative analysis of bone density in direct digital

- radiographs evaluated by means of computerized analysis of digital images. *Dentomaxillofac Radiol* 39: 356, 2010
13. Rhee SC, Ji YH, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon ES: *In vivo* evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev* 20: 233, 2011