

성견에서 거친 표면을 가지는 임플란트에서 골형성에 관한 조직형태계측학적인 평가

문철웅¹ · 김수관¹ · 김학균¹ · 문성용¹ · 임성철² · 오지수¹ · 백성문¹

조선대학교 ¹치과대학 구강악안면외과학교실, 조선대학교 ²의과대학 병리학교실

Abstract

HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION OF OSTEOGENESIS WITH BRUSHITE IMPLANT SURFACES IN DOGS

Chul-Woong Moon¹, Su-Gwan Kim¹, Hak-Kyun Kim¹,
Seong-Yong Moon¹, Sung-Chul Lim², Ji-Su Oh¹, Sung-Mun Baik¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,

²Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University

This study evaluated the influence of smooth and brushite-coated implant surfaces in dogs. The first through fourth mandibular premolars were extracted from eight young adult dogs. Twelve weeks after extraction, implantation was performed at the extraction sites. In total, 40 implant fixtures were implanted in the dog mandibles. Twenty machined implants served as controls and twenty brushite-coated surfaces served as tests. Dogs were sacrificed 2 and 4 weeks after implantation. The hemi-mandibles were obtained and processed histologically to obtain non-decalcified sections. Longitudinal sections of each implant were made and analyzed using light microscopy. The overall implant success rate was 83.3%. Histomorphometrically, the experimental group had a better percentage of bone-implant contact than the control group ($p<0.05$) and there was a significant difference between the 2- and 4-week groups after implantation ($p<0.05$). Our results suggest that the implant surface morphology influences the increase in peri-implant osteogenesis in the early period of peri-implant healing.

Key words: Osteogenesis, Implant surface, Dog

I. 서 론

임플란트는 현재 치과영역에서 필수적인 술식으로 인식될 만큼 중요한 치료방법으로 자리잡고 있다. 1969년 Branemark 등¹⁾에 의해 골유착이라는 용어가 정의된 이래 골유착성 임플란트를 시술한 환자에서 장기적인 경과 관찰을 통하여 장기간의 높은 생존율과 만족할 만한 결과들이 보고되고 있으며 골유착을 증진시키기 위한 연구가 지금도 활발히 이루어지고 있다. Albreksson 등²⁾은 임플란트가 견고히 고정되고 적절한 골유착을 얻기 위한 요구조건으로 생체 친화성, 임플란트의 디자인과 표면상태, 식립될 부위의

골조직 상태, 외과적 술식, 임플란트에 가해지는 하중 등이 중요하다고 하였으며, 많은 연구들은 임플란트 표면의 형태, 화학적 구성, 거시적/미시적 표면구조(macro/microtopography) 등이 임플란트 골유착에 영향을 미치는 중요한 요소로 보고하고 있다.

티타늄은 우수한 기계적 성질과 생체 친화성^{3,4)}, 부식에 대한 높은 저항성, 세포독성이 없고, 임플란트 주변 조직에 대한 염증반응이 거의 없기 때문에⁵⁾ 임플란트 몸체의 재질로는 순수 티타늄이나 티타늄 합금을 주로 사용하며 표면의 처리 방식에 따라 임플란트 몸체를 가공하여 매끈한 면을 제공하는 평활표면(smooth, machined, turned surface)

과 임플란트 몸체에 수산화인회석 코팅(hydroxyapatite coating, HA coating), 티타늄 플라즈마 분사(titanium plasma spray, TPS), 입자분사(blasted), 입자분사후 산부식 및 단순 산부식 등으로 표면을 거칠게 하는 등의 여러 가지 방식이 있다⁵⁾.

임플란트 표면 구조는 임플란트에서 초기 골이 침착되는 데 중요한 역할을 하는데^{6,7)}, 거친 표면(rough surface)의 임플란트는 숙주의 골에 임플란트가 접촉되는 면적을 증가시키고 평활한 표면(smooth surface)의 임플란트에 비해 일차 안정성 뿐만 아니라⁸⁾ 임플란트 주위 골형성도 증가시키는 것으로 보고되며^{9,10)}, 다른 연구에서도 거친 표면의 임플란트는 골아세포의 활성을 증진시킬 수 있으며 임플란트 표면에 신생골이 직접 침착되게 함으로써 골유착의 비율이나 강도를 증가시킨다고 주장한다⁹⁾.

다양한 표면처리에 따른 임플란트 주위 골 치유에 대한 많은 실험연구들에서도 표면의 거칠기는 우수한 골유착을 가능케 한다고 나타났으며, 이를 근거로 임플란트 식립 후 조기 하중을 부여할 수 있게 되었다^{11,12)}.

최근의 연구에서는 표면을 거칠게 처리한 임플란트에서 임플란트 식립 후 1일 후부터 골아세포가 표면에 부착하여 골과 연관된 단백질을 침착시키며 임플란트가 생물학적인 고정을 얻기 위해서는 구조적으로 잘 형성된 경조직이 필요한데, 이는 식립 후 10-14일에 시작된다고 보고하였다¹³⁾. 이러한 관찰은 임플란트 표면에 대한 골아세포의 부착이 임플란트의 조기 생물학적 고정에 있어서 중요하다는 것을 제시하며 이상에서와 같이 임플란트의 표면 처리가 조기 골형성에 중요함을 알 수 있다. 본 연구의 목적은 평활한 표면을 가지는 임플란트(machined surface)와 거친 표면을 가지

는(brushite coating surface) 임플란트를 성견의 악골에 식립하여 조기 치유양상을 조직형태계측학적으로 평가하여 임플란트에서 표면의 차이가 임플란트의 골유착 여부에 대한 알아보는 데 있다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험 동물

생후 8-9개월된 12 kg내외의 잡종 성견 5마리를 대상으로 하였다. 모두 동일 조건하에 사육되었고 암수 구별은 없었으며, 건강상태는 모두 양호하였다(Fig. 1).

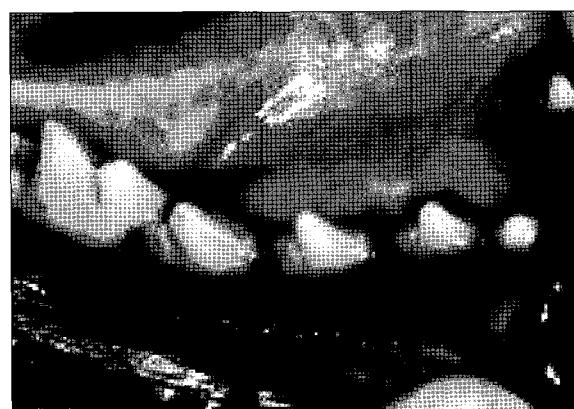


Fig. 1. Before extraction in a dog.

Table 1. Experimental design

Group		Number of implants
Control group	2 weeks	10
	4 weeks	10
Experimental group	2 weeks	10
	4 weeks	10

Control group : Smooth surface implant, Experimental group : Brushite coating surface implant.

Table 2. Experimental schedule

Extraction	→	Healing periods 12weeks	→	Implantation	→	Osseointegration 2 weeks 4 weeks	→	Sacrifice
------------	---	----------------------------	---	--------------	---	--	---	-----------

2) 임플란트

대조군은 평활한 표면의 임플란트 20개를 식립하였으며, 실험군은 직경 3.8 mm, 길이 8 mm의 brushite 코팅 처리된 20개의 임플란트 (DIO Implant, Korea)를 식립하였다. 한 마리당 각 4개의 임플란트를 식립하였다.

2. 실험방법

1) 마취

Xylazine(Rompun, Bayer Vetchem-Korea Co.), Ketamine(Ketara, 유한양행) 2 cc를 각각의 대퇴부에 근주로 전신마취 시킨 후 식립 부위의 출혈 방지와 통증 억제를 위해 2% lidocaine(1:100,000 epinephrine 함유)으로 침윤마취를 시행하였다.

2) 발치

각각의 성견에서 양측 하악 제1, 2, 3, 4 소구치를 발거하여 마리당 총 8개를 발거하였고, 발치 후 흡수성 봉합사를 이용해 봉합하였으며 12주의 치유기간을 부여하였다. 모든 군은 발치와 임플란트 매식 후 술 후 감염을 방지하기 위하여 Gentamycin을 3일간 2cc 씩 근주하였다(Fig. 2).

3) 임플란트 매식

동일한 방법으로 마취를 시행하고 판막거상을 위해 절개를 시행한 후 골막기자를 이용하여 전층판막으로 골막을 거상하였다. 성견 한 마리당 하악골 좌측에 brushite 표면 임플란트 4개, 우측에 평활한 표면 임플란트 4개를 식립하여 5마리의 성견에 총 40개(대조군 20개, 실험군 20개)의 임플란트를 매식하였으며 술 후 감염을 방지하기 위하여 gentamycin을 3일간은 2 cc, 2일간은 1 cc 근주 하였으며 식사는 유동식을 시행하였다(Figs. 3, 4).

3. 실험 평가

1) 조직형태계측학적 평가

매식 2주와 4주 후에 제거한 임플란트 시편은 즉시 70% alcohol에 6일간 고정하였으며 알코올 세척을 통해 탈수시킨 후 glycolmetacrylate resin(spurr Low-viscosity Embedding media, Polyscience, Earrington, PPA, USA)에 포매하였다. 중합시킨 시편을 high-precision diamond disc(Low speed diamond wheel saw 650, SBT, San clemente, CA, USA)를 사용하여 임플란트 장축방향으로 200 μm 두께로 절단후 최종적으로 lapping and polishing machine (OMNILAP 2000, SBT, San clemente, CA, USA)을 사용하여 30 μm 두께로 연마하였고 각 임플란트 당 1개의 슬라이드를 제작하여 Villanueva osteochrome bone stain(San clemente, CA, USA)을 시행 후 광학현미경(Olympus BX50, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.



Fig. 2. Extraction of mandibular premolars 1 to 4.

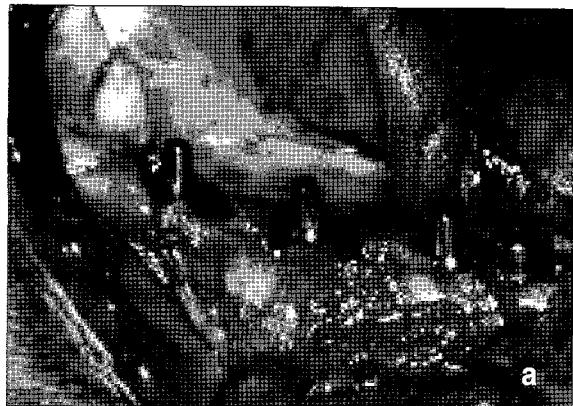
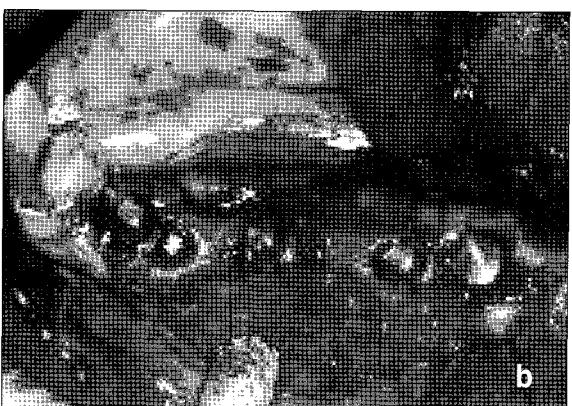


Fig. 3. Implantation 12 weeks after extraction: a. control group, b. experimental group.



조직형태계측학적 평가는 임플란트 나사선내의 신생골 충전율을 평가하였으며, 임플란트 전체에서 임플란트 나사선과 접촉하는 부위는 전부 평가를 시행하였다.

신생골 충전율 = 임플란트 나사선내의 신생골 면적/thread 밖 공간넓이 $\times 100\%$.

결과는 계산된 결과를 토대로 통계학적으로 분석하였다 (Student t-test, P<0.05).

2) 통계학적 분석

조직표본으로 신생골 충전율이 측정되었고 Student t-test로 통계학적 분석이 시행하였다. 임플란트 2주 후와 4주 후 대조군과 실험군간의 골 충전율에 대해 독립 표본 t-검정으로 통계학적 분석을 시행하였다.

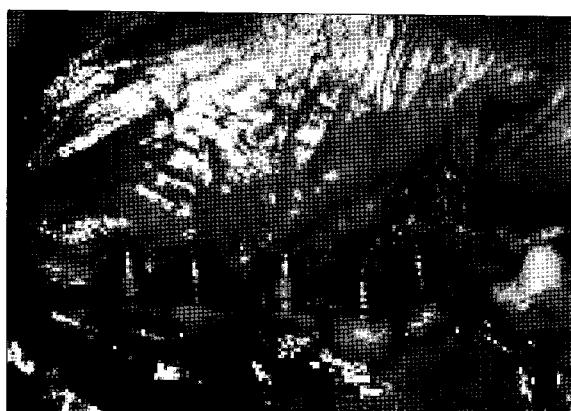


Fig. 4. Sutures.

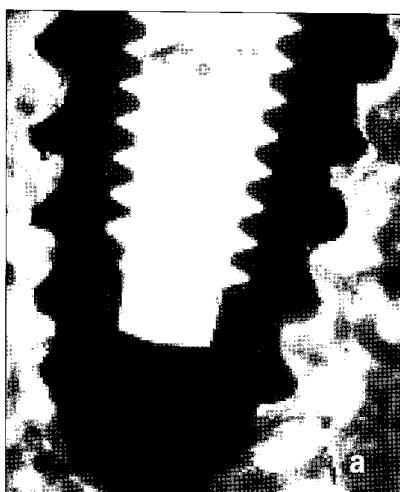


Fig. 5. Control group at 2 weeks. New lamellar trabecular bone was seen in the threaded portion of the smooth surface implant. Villanueva osteochrome bone stain: a. $\times 15$, b. $\times 40$.

III. 실험결과

1. 신생골 충전율

실패한 임플란트는 여기에 포함하지 않았다. 대조 1군에서는 총 9개의 임플란트에서 평균 47.25%의 신생골 충전율을 나타냈고, 대조 2군에서는 총 8개의 임플란트에서 평균 50.32%의 신생골 충전율을 나타냈다. 실험 1군에서는 총 9개의 임플란트에서 평균 49.86%의 신생골 충전율을 나타냈고, 실험 2군에서는 총 10개의 임플란트에서 평균 56.90%의 신생골 충전율을 나타냈다.

골유착 2주째의 대조군과 실험군의 신생골 충전율은 각각 $47.25 \pm 7.79\%$ 과 $49.86 \pm 2.63\%$ 으로 각각 비슷한 신생골 충전율을 나타내어 평활한 표면 임플란트와 brushite coating 임플란트에서는 비슷한 수치를 나타냈으며, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

골유착 4주째의 대조군과 실험군의 신생골 충전율은 $50.32 \pm 4.35\%$ 과 $56.90 \pm 3.18\%$ 로, brushite 표면 임플란트에서 높은 골 충전율을 보였고 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 골유착 2주째의 실험군과 골유착 4주째의 실험군에서 신생골 충전율은 각각 $49.86 \pm 2.63\%$ 과 $56.90 \pm 3.18\%$ 로 2주군에 비해 4주군에서 더 골 충전률이 높아 시간이 경과함에 따라 골신생과 골유착이 더 잘 이루어진 것으로 평가되었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Figs. 5-8, Table 3).



Fig. 6. Experimental group at 2 weeks. Immature new bone formation was observed at the implant surface, and no inflammation was observed at the brushite-coated surface implant. Villanueva osteochrome bone stain: a. $\times 15$, b. $\times 40$.



Fig. 7. Control group at 4 weeks. New bone formation and the ingrowth of new bone were seen on the smooth surface implant surface. Villanueva osteochrome bone stain: a. $\times 15$, b. $\times 40$.

Table 3. New bone forming rate around the implants (%)

	Osseointegration period	
	2 weeks	4 weeks
Control group	47.25 ± 7.79	50.32 ± 4.35
Experimental group	49.86 ± 2.63	$56.90 \pm 3.18^*$

Control group : Smooth surface implant, Experimental group : Brushite coating surface implant,

* Statistically significant difference relative to Experimental group, $P < 0.05$.

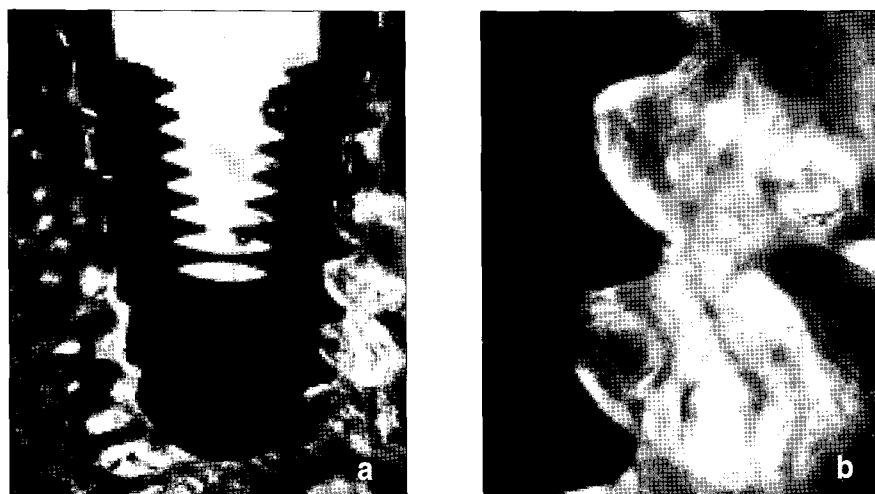


Fig. 8. Experimental group at 4 weeks. New lamellar trabecular bone was seen at the brushite-coated surface implant surface. Villanueva osteochrome bone stain: a. $\times 15$, b. $\times 40$.

IV. 총괄 및 고찰

임플란트는 손실된 치아를 수복하기 위한 방법의 하나로 선택되고 있으며, 최근 더 나은 성공률을 위해 다양한 방법으로 연구가 이루어지고 있다. 임플란트의 성공을 위해서는 골유착이 필수적이며 골유착을 얻기 위한 요구조건에는 매식부위의 골조직 상태, 매식체의 생체 친화성, 적절한 외과적 술식, 임플란트에 가해진 외력, 그리고 보철물 설계가 있으며^{2,14)}, 임플란트의 성공적인 골유착을 얻기 위해서는 발치후 발치와의 충분한 골형성과 성숙이 일어난 다음에 임플란트를 매식해하는 것도 고려된다. 임플란트 매식시에 초기 안정성을 얻을 수 있는 적절한 골이 있는 경우에는 발치 직후 임플란트 식립이 추천되기도 하지만 이 연구에서는 골충전율과 골유착을 평가함에 있어서 발치와 내부 연조직의 영향을 배제하기 위하여 발치 후 12주 후 임플란트를 식립함으로써 충분한 치유기간을 부여하였다.

임플란트를 위해 선택되는 금속은 생역학적 특성이 우수한 티타늄으로^{3,4)}. 티타늄(Ti)과 티타늄합금(Ti-6Al-4V)은 골유착성 임플란트에 첫 번째로 선택되는 금속이다^{15,16)}. 임플란트는 이를 기공, 열처리, machining, 마무리 및 멸균과정을 통해 제작된다. 최근의 많은 연구들은 기존의 평활한 표면은 티타늄 임플란트보다 임플란트 몸체를 거칠게 처리함으로써 임플란트의 골유착과 초기 안정성을 증진시킨다고 보고하고 있다^{17,18)}.

임플란트의 거친 표면은 골-임플란트 접촉율과 골유착 정도를 증가시키기 위해서 사용되며 Bower 등¹⁹⁾은 골유착 과정에서 골형성에 큰 역할을 하는 조골세포는 거친 티타늄

표면에 초기 부착을 하며 표면 거칠기는 조골세포의 성숙과 분화에도 영향을 미치는 반면, 섬유모세포는 거친 표면보다 평활한 표면에 잘 부착한다고 하였다. Piattelli 등²⁰⁾은 골조직의 무기질 침착과 골세포성숙의 지표인 alkaline phosphatase의 활동이 거친 표면에서 활발하다고 하였다.

임플란트 몸체에 수산화인회석 코팅(HA coating)을 하거나, 티타늄 플라즈마 분사(TPS), 입자분사(blasted), 입자분사후 산부식 및 단순 산부식 등으로 표면을 거칠게 하는 여러 가지 표면 처리 방식이 있으며 이 중 수산화인회석(hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), bioglass, brushite 등과 같은 bioactive한 물질을 티타늄 표면에 부착시킴으로써 매식 후 골과의 화학적 결합을 증진시킨 임플란트도 좋은 골유착을 보이는 것으로 보고되고 있다²¹⁻²³⁾.

brushite (화학식: $\text{CaHPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) coating 임플란트는 Ca와 P의 비율이 1.0인 Calcium-phosphate(Cap)의 일종으로 성장이 빠른 유아의 과정된 뼈에서 발견이 되었고, 뼈의 광화작용에서 매개체의 기능을 한다. Brushite는 hydroxyapatite에 비해 쉽게 용해가 되어 높은 농도의 칼슘이온과 인산염이온을 제공함으로써 빠른 골 생성과 높은 광화작용(mineralization)을 일으킨다. 코팅의 두께는 $15 \pm 5\text{ }\mu\text{m}$ 이며, BioTite-H의 코팅층은 식립시에는 윤활작용을 하고, 식립후에는 Brushite 성분이 임플란트의 거친 표면 속과 뼈와의 경계면에 남아서 빠른 골유착과 뼈의 광화작용(mineralization)을 촉진시킨다.

본 연구에서는 brushite coating 임플란트가 평활한 티타늄 임플란트에 비해 4주군의 골 충전율에서 각각 $56.90 \pm$

3.18%와 $50.32 \pm 4.35\%$ 을 보임으로써 brushite가 더 우수한 골유착을 보이는 것으로 나타났다. 또한 실험군인 brushite coating 임플란트에서 2주군과 4주군에 있어서 골 충전율이 각각 $49.86 \pm 2.63\%$ 과 $56.90 \pm 3.18\%$ 으로 4주군에서 더 높은 충전율을 보이는 것으로 보아 시간이 지남에 따라 골형성 및 골유착이 증진되는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 임플란트 식립 후 치유 초기단계에서의 골유착의 정도 및 골 충전율을 평가하여 brushite coating으로 표면을 거칠게 처리한 임플란트가 평활한 표면의 임플란트보다 조기 안정성이 우수하였다는 것을 검증하였으나 장기간의 추적관찰을 통한 임플란트 생존율 평가 및 brushite coating의 시간 경과에 따른 변화 등에 대해 더 많은 임상적, 통계학적 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 실험군으로서 20개의 brushite coating 임플란트와 대조군으로서 20개의 평활한 티타늄 임플란트를 성견의 하악골에 식립한 후 조기 치유양상을 관찰하기 위한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골유착 2주째의 대조군과 실험군의 신생골 충전율은 각각 $47.25 \pm 7.79\%$ 과 $49.86 \pm 2.63\%$ 으로 각각 비슷한 신생골 충전율을 나타내어 평활한 표면 임플란트와 brushite coating 임플란트에서는 비슷한 수치를 나타냈으며, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. 골유착 4주째의 대조군과 실험군의 신생골 충전율은 $50.32 \pm 4.35\%$ 과 $56.90 \pm 3.18\%$ 로, brushite 표면 임플란트에서 높은 골 충전율을 보였고 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).
3. 실험군(brushite coating implant)은 골유착 2주째와 4주째의 신생골 충전율이 각각 $49.86 \pm 2.63\%$ 과 $56.90 \pm 3.18\%$ 로 2주군에 비해 4주군에서 더 신생골 충전율이 높아 시간의 경과에 따라 골 형성이 많았으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

이상의 결과로 보아 골유착 부여기간이 증가함에 따라 신생골 충전율이 증가하는 것으로 나타나 시간의 경과에 따라 골유착이 증가하는 것으로 보이며, 표면처리를 시행한 군에서 표면처리를 시행하지 않은 군보다 신생골 충전율이 증가하는 것으로 나타나, 임플란트의 성공률 및 생존율을 증가시키기 위하여는 표면처리를 시행한 임플란트를 식립하고 골유착 기간을 더 부여하는 것이 필요하리라고 사료된다.

참고문헌

1. Branemark PI, Adell R, Breine U et al : Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg 3 : 81, 1969.
2. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA et al : Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthop Scand 52 : 155, 1981.
3. Breme J, Steinhauser E, Paulus G : Commercially pure titanium Steinhauser plate-screw system for maxillofacial surgery. Biomaterials 9 : 310, 1988.
4. Browne M, Gregson PJ : Effect of mechanical surface pre-treatment on metal ion release. Biomaterials 21 : 385, 2000.
5. Albrektsson T, Hansson HA : An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. Biomaterials 7 : 201, 1986.
6. Shirakura M, Fujii N, Ohnishi H et al : Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effects of surface conditions on bone formation. Clin Oral Implants Res 14 : 687, 2003.
7. Franchi M, Fini M, Martini D et al : Biological fixation of endosseous implants. Micron 36 : 665, 2005.
8. Vercaigne S, Wolke JGC, Naert I et al : Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-sprayed-coated implants placed in the cortical bone of goats. J Biomed Mater Res 41 : 41, 1998.
9. Buser D, Schenk RK, Steinemann S et al : Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 25 : 889, 1991.
10. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A et al : Bone response to unloaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface : A histomorphometric study in the canine mandible. J Biomed Mater Res 40 : 1, 1998.
11. Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM et al : A histological comparison in the dog of porous-coated vs. threaded dental implants. J Dent Res 69 : 1138, 1990.
12. Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V et al : Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants 7 : 491, 1992.
13. Meyer U, Joos U, Mythili J et al : Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. Biomaterials 25 : 1959, 2004.
14. Albrektsson T : Direct bone anchorage of dental implants. J Prosthet Dent 50 : 255, 1983.
15. Parr GR, Gardner LK, Toth RW : Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. J Prosthet Dent 54 : 410, 1985.
16. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA et al : Implant materials, designs, and surface topographies : Their effect in osseointegration. A literature review. Int J Oral Maxillofac Implants 15 : 675, 2000.
17. Shirakura M, Fujii N, Ohnishi H et al : Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effect of surface conditions on bone formation. Clin Oral Implants Res 14 : 687, 2003.
18. Zechner W, Tangl S, Furst G et al : Osseous healing characteristics of three different implant types. A histologic and histomorphometric study in mini-pigs. Clin Oral Implants Res 14 : 150, 2003.

19. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA et al : Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. Int J Oral Maxillofac Implants 7 : 302, 1992.
20. Piattelli M, Scarano A, Paolantonio M et al : Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. J Oral Implantol 28 : 2, 2002.
21. Wataha JC : Materials for endosseous dental implants. J Oral Rehabil 23 : 79, 1996.
22. Lacefield WR : Current status of ceramic coatings for dental implants. Implant Dent 7 : 315, 1998.
23. Hench LI, Wilson J : Surface-active biomaterials. Science 226 : 630, 1984.

저자 연락처

우편번호 501-825

광주광역시 동구 서석동 421번지

조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

김 수 관

원고 접수일 2007년 11월 6일

제재 확정일 2008년 3월 5일

Reprint Requests

Su-Gwan Kim

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chosun Univ.

421, Seosuk-dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-825, Korea

Tel: 82-62-220-3815 Fax: 82-62-228-7316

E-mail: sgckim@chosun.ac.kr

Paper received 6 November 2007

Paper accepted 5 March 2008