

백서 두개골 결손부에서
항생제를 함유한 키토산 차단막의
골재생 유도 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

채 경 준

백서 두개골 결손부에서
항생제를 함유한 키토산 차단막의
골재생 유도 효과

지도 최 성 호 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

채 경 준

채경준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

많은 부족함 속에서 많은 분들의 도움으로 이 작은 결실을 맺게 되었습니다. 실험의 시작부터 이 논문이 완성되기까지 늘 따뜻한 관심과 지도로 이끌어주신 최성호 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 많은 조언과 관심으로 지켜봐 주신 김종관 교수님, 채중규 교수님, 조규성 교수님, 김창성 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한 늘 가까운 곳에서 조언을 주신 정의원 선생님, 김태균 선생님께 감사드립니다.

수련생활과 대학원 생활에 늘 힘이 되주고 의지가 되어준 2년차 동기들 박지은, 송대석, 이지현, 장인권, 조익현에게도 마음깊이 감사드립니다. 그리고 대학원 담당 홍지연 선생님과 1년차 선생님들께도 감사드립니다.

그리고 무엇보다 학생때부터 지금까지 늘 아낌없는 사랑과 헌신적인 도움으로 든든하고 따뜻한 버팀목이 되어준 사랑하는 나의 아내 정인과 항상 한없는 따뜻함이 되어주신 아버지, 어머니, 장인, 장모님 그리고 동생 보경이에게 감사드리며 이 논문을 드립니다.

모든 분들께 진심으로 감사드립니다.

2005년 12월
저자썸

목 차

도표 및 사진부도 목차	iii
국문 요약	iv
I. 서론.....	1
II. 연구재료 및 방법.....	5
가. 연구재료.....	5
1. 실험 동물.....	5
2. 테트라싸이클린이 첨가 된 키토산 차단막	5
나. 연구방법.....	7
1. 실험군 설정.....	7
2. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치.....	7
3. 조직학적 관찰.....	8
III. 결과.....	9
가. 대조군.....	9
나. 실험 1군.....	10
다. 실험 2군.....	11
라. 실험 3군.....	12
마. 실험 4군.....	13
IV. 총괄 및 고찰.....	15
V. 결론.....	21
참고문헌.....	23
사진부도 설명.....	31

사진부도.....	34
영문요약.....	37

도표 및 사진부도 목차

Figure 1. Tetracycline blended Chitosan membranes	34
Figure 2. Calvarial defect and surgical procedures	34
Figure 3. Control, 2 weeks (HE×10)	35
Figure 4. Control, 8 weeks (HE×10)	35
Figure 5. Experimental group 1, 2 weeks	35
5-a. (HE×10)	35
5-b. (HE×100)	35
Figure 6. Experimental group 1, 8 weeks	35
6-a. (HE×10)	35
6-b. (HE×100)	35
Figure 7. Experimental group 2, 2 weeks (HE×10)	36
Figure 8. Experimental group 2, 8 weeks (HE×100)	36
Figure 9. Experimental group 3, 2 weeks (HE×10)	36
Figure 10. Experimental group 3, 8 weeks (HE×100)	36
Figure 11. Experimental group 4, 2 weeks (HE×100)	36
Figure 12. Experimental group 4, 8 weeks (HE×10)	36

국문요약

백서 두개골 결손부에서 항생제를 함유한 키토산 차단막의 골재생 유도 효과

치주 치료의 최종 목적은 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하는 것뿐만 아니라 이미 파괴된 지지조직을 기능적으로 재생시키는데 있다. 이를 위하여 다양한 치료법과 재료의 개발에 많은 노력을 기울여 왔다. 최근 키틴으로부터 추출된 키토산에 대한 관심이 증가하고 있다. 키토산은 키틴 분자를 deacetylation 시킴으로써 형성되며 치주영역에서 골대체물 및 차단막으로써 널리 연구되어지고 있다. 최근 많은 동물 실험을 통해 그 유익성이 입증되고 있다. 테트라사이클린은 만성 치주질환 및 치은염의 치료에 사용되어지고 있다.

이 연구의 목적은 백서 두개골 결손부에 적용된 테트라사이클린이 함유된 키토산 차단막의 골재생 효과를 평가해 보기 위함이다.

이에 본 연구에서는 백서 두개골에 trephine bur를 이용하여 8mm 지름의 결손부를 형성하였다. 대조군에는 아무것도 이식하지 않고 4개의 실험군에는 키토산 차단막을 부직포 형태, 스폰지 형태로 제작하여 결손부에 이식하였다. 부직포 형태와, 스폰지 형태의 차단막은 각각 테트라사이클린 용액, 키토산-테트라사이클린 용액에 침지시켜 4가지 형태로 제작되었다. 술 후 2주, 8주에 희생하고 치유 결과를 조직학적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를

얻었다.

1. 테트라싸이클린을 함유한 키토산 차단막의 사용은 임상적으로 우수한 치유 양상을 나타내었다.

2. 부직포 형태, 스폰지 형태의 실험군에서 모두 대조군에 비해 신생골 형성이 활발하게 나타났다. 조골세포와 골성조직이 8주 소견에서도 나타났으며, 결손 부 변연과 경뇌막 뿐만 아니라 인접한 골막 부위에서도 신생골의 형성이 관찰되었다.

3. 각 실험군 사이에서는 유의할 만한 특징적인 소견이 나타나지 않았으며, 1,2,3,4 실험군 모두에서 8주까지 차단막의 분해 양상은 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 테트라싸이클린 항생제가 함유된 다양한 키토산 차단막은 치주질환에 이환된 치주조직의 골조직 유도 재생을 위한 차단막으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 키토산, 테트라싸이클린, 재생

백서 두개골 결손부에서 항생제를 함유한 키토산 차단막의 골재생 유도 효과

연세대학교 대학원 치의학과
(지도 최 성 호 교수)
채 경 준

I. 서 론

치주치료는 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하고 질환에 의해 손상된 치주조직을 기능적으로 재생시키는 데에 궁극적인 목적을 두고 있다. 치주조직의 재생은 감염성, 염증성 질환에 이환된 치근면에 신생 백악질의 침착, 신생골의 형성과 함께 새로운 치주인대 섬유유착의 기능적인 삽입, 배열, 그리고 치은조직의 구조화가 이루어지는 것을 의미한다.³³

치주조직은 치은 상피, 치은 결합조직, 치조골 및 치주인대의 네 가지로 구성되며 이 중에서 치주인대 및 치조골로부터 유래된 세포가 치주조직의 재생과 밀접한 관련이 있다고 하였다.²² Caton등은⁶ 일반적인 비외과적, 외과적 시술 및 골 이식술로는 긴 접합상피로의 치유 밖에 얻을 수 없다고 하였으며 따라서 치주조직의 궁극적인 재생을 위해서는 치주 창상 부위로부터 상피 세포와 치은 결합조직의 세포들을 차단하여 상대적으로 성장속도가 느린 치주인대 및 치조골로부터 유래된 세포들이 원활하게 성장할 수 있는 조건을 만들어 주는 것이 필요하다고 하였다.^{16,29} 이에 따라 1980년

대에 들어와서 차단막을 이용하는 조직유도 재생술이 치주조직 재생을 위한 치료 방법으로 소개되었으며 여러 종류의 차단막이 사용되어졌다. 차단막으로는 Millipore filter가 초기에 사용되었으며^{1,30} 현재 차단막으로 많이 사용되는 재료로는 Millipore filter와 비슷한 성질을 갖는 expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE)막을 들 수 있다. e-PTFE 차단막은 1980년대 후반부터 동물실험 및 임상연구를 통하여 현재 효과를 인정받고 있는 소재인데, 조직에 대한 차폐능력이 뛰어나고 신체내에서 완전히 불활성 물질로 남아있기 때문에 생체안정도와 생체친화성이 좋은 물질이다.^{2,4} 이러한 차단막은 치은 상피의 치근단 방향으로의 이주에 대한 방어벽 역할을 하면서 선택적 세포들만 치근면으로 모일 수 있도록 함으로써 이전의 전통적 치주치료의 많은 한계를 극복할 수 있는 가능성을 제시해 주고 있지만 이는 재생에 필요한 세포 과정을 촉진 시키지는 못한다는 한계점을 가지고 있다. 또한 e-PTFE 막은 제거를 위한 이차수술이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이를 피하기 위하여 여러 가지 생체분해성 차단막들이 개발되어져 왔다.^{11,13,14} 생체분해성 차단막들은 혈병이 충분히 형성되고, 세포들의 선택적 재군집이 일어날 때까지 흡수되지 않고 공간을 유지해야 하는 물리적, 생물학적 특성을 가져야 한다. 이러한 생체분해성 차단막들의 재료로는 type I collagen¹⁵, atelocollagen 또는 cartilage과 같은 교원질^{3,7,41}과 polyglactin⁹, polyurethane⁴² 그리고 polylactic acid^{12,20,35} 등의 생체분해성 고분자들이며, 치주조직 재생 효과 면에서 다양한 결과를 보이고 있다.

키토산은 키틴을 해중합(depolymerization)하고, 부분적으로 탈아세틸화(deacetylation)하여 얻어지는 N-acetyl-glucosamine과 N-glucosamine

의 공중합체이다. 키틴은 게나 새우와 같은 갑각류의 껍질, 메뚜기와 같은 곤충류의 표피와 외각, 버섯이나 효모와 같은 균류의 세포벽 등 자연계에서 널리 분포하고 있어 쉽게 얻을 수 있다. 키토산은 생분해가 가능하고 독성이 없는 중합체로서 생체적합성이 우수한 것으로 알려져 있으며³⁹ 여러 동물실험에서 지혈^{17,18}과 창상치유 증진^{24,25}에 효과가 있는 것으로 알려졌다. 또한 구강창상 증진에 있어서도 Sapelli³⁶ 등이 키토산 분말이 치주낭, 구개창상, 발치와의 치유에 도움이 된다는 임상결과를 발표하였고, Muzzarelli²⁶ 등도 키토산 겔을 치주병소에 적용하였을 때 조직화가 증진되면서 섬유화가 감소되어 치아동요 및 치주낭이 현저히 감소하였다고 보고하였다. 따라서 키토산을 이용한 흡수성 차단막을 조직유도 재생술에 적용함으로써 치주조직 재생과 환자의 불편감과 경제적 부담을 경감시킬 수 있는 장점을 갖는다.

한편 치주질환은 여러 종류의 세균에 의한 감염성 질환이므로 기계적인 치태 제거 외에 전신적 혹은 국소적인 항세균 제재를 투여함으로써 질환의 발생과 심도를 감소시킬 수 있다. 기계적인 치태 제거는 술자의 수기에 의해 많이 좌우되고, 약물 도달이 어려운 부위에는 효과적이지 못할 수 있어 항생제 요법이 대두되고 있다.⁸ 항생제의 적용 방법으로는 섬유(fiber) 형태나 연고 등의 국소적 적용 방법과 경구 투여를 통한 전신적 적용 방법이 있다. 그러나 경구 투여 방법의 경우 병소에 최소 억제 농도를 유지하기 위하여 많은 양의 약물이 투여되어야 하며, 이로 인해 신체 내 다른 부위에서 부작용이 일어날 수 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해서 기술이 용이하고 치주낭 내에서 약물이 최소 억제 농도로 방출되고, 치주 조직에 자극이 없이 완전히 생분해 되는 약물 전달 장치의 개발이 진행되고 있

다.²³ 치주질환 치료에 널리 이용되고 있는 항생제에는 테트라사이클린, 독시사이클린, 메트로니다졸 등이 있는데, 이중 테트라사이클린은 항균 효과 외에도 상아질 표면에 섬유아세포가 부착하는 것을 촉진시키고⁴⁰, 교원질 분해 효소에 대한 억제 작용도 갖는¹⁰ 등 다양한 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 국소적으로 도포 또는 투여하였을 때 치주 치료 효과에 유용하게 사용되고 있는 약물이다. 더욱이 치주조직 재생유도술에 있어 술 후 감염 등의 원인으로 인하여 불완전한 재생이 일어나는 경우가 종종 보고 되고 있어 점차적으로 항생제 요법의 중요성이 더욱 증가되고 있다.

본 연구에서는 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에서 항생제를 함유한 생분해성 키토산 차단막을 적용하여 골조직 재생 유도 능력을 조직학적으로 관찰 평가하여 다소의 지견을 얻었기 때문에 이를 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

가. 연구재료

1. 실험동물

본 연구에서는 체중 250-300g의 수컷 백서(Sprague Dawley rat) 50마리를 사용하였다.

실험 부위는 두개골을 이용하였다. 실험동물은 연세 임상의학연구센터의 지침에 따랐다.

2. 테트라사이클린이 첨가 된 키토산 차단막

키토산을 이용하여 부직포를 제조하였다. Crimper를 사용하여 인치당 8~10개로 crimping한 키토산 섬유를 5cm 길이의 단섬유로 자른 후 carding 기를 사용하여 얇은 단층의 웹을 만들었다. 얇은 단층의 웹을 여러 층으로 하여 needle punching, calendering을 거치면서 부직포를 제조하였다. 항생제는 테트라사이클린* 캡슐을 사용하였다.

(1) 부직포 형태의 차단막 제조

테트라사이클린의 첨가 방법에 따라 두 종류의 테트라사이클린-키토산 부직포를 제조하였다. 첫 번째 방법은 제조된 키토산 부직포를 1 wt% 테트라사이클린 항생제 수용액에 10분 동안 침지시켜 테트라사이클린이 충분히 흡수되게 한 후, 40℃에서 24시간 건조하여 제조하였다. 이렇게 제조

* 테트라사이클린 캡슐, 종근당, 한국

된 부직포 차단막을 실험 1군으로 하였다 (Figure 1-a).

두 번째 방법은 3 wt%의 아세트산 수용액에 5 wt% 키토산을 완전히 용해시켜 키토산 용액을 준비하였다. 키토산 용액에 1 wt%의 테트라싸이클린을 첨가하여 키토산/테트라싸이클린 혼합액을 만들었다. 제조된 키토산/테트라싸이클린 용액에 10분 동안 키토산 부직포를 침지시켜 충분히 흡수되게 한 후 40℃에서 24시간 건조하였다. 건조 후 5 wt%의 수산화나트륨 수용액에 6시간 동안 침지하여 중화하고, 증류수로 수 회 세척하였다. 40℃에서 24시간 건조하여 키토산 부직포 표면에 항생제를 함유한 키토산이 코팅된 차단막을 제조하여 실험 2군으로 하였다 (Figure 1-b).

(2) 스폰지 형태의 차단막 제조

테트라싸이클린의 첨가 방법에 따라 두 종류의 테트라싸이클린-키토산 스폰지를 제조하였다. 첫 번째 방법은 3 wt%의 아세트산 수용액에 5 wt%의 키토산을 완전히 용해시켜 키토산 용액을 준비하여 몰드에 담은 후 동결 건조하였다. 5 wt%의 수산화나트륨 수용액 6시간 동안 침지시켜 중화하고 증류수로 수 회 세척하였다. 40℃에서 24시간 건조하여 스폰지 차단막을 제조하였다. 제조한 키토산 스폰지를 1 wt% 테트라싸이클린 항생제 수용액에 10분간 침지하여 테트라싸이클린이 충분히 흡수되게 한 후, 40℃에서 24시간 건조하여 제조한 것을 실험 3군으로 하였다 (Figure 1-c).

두 번째 방법은 3 wt%의 아세트산 수용액에 5 wt%의 키토산을 완전히 용해시켜 키토산 용액을 준비하고 1 %(w/w)의 테트라싸이클린을 첨가하여 키토산/테트라싸이클린 용액을 준비하였다. 몰드에 담아 동결 건조한 후 5 wt%의 수산화나트륨 수용액에 6시간 침지하여 중화하고 증류수로

수 회 세척하였다. 40℃에서 24시간 건조하여 제조한 스폰지 차단막을 실험 4군으로 하였다 (Figure 1-d).

나. 연구방법

1. 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 것도 이식하지 않은군을 대조군으로 부직포와 스폰지 형태의 키토산-테트라싸이클린 차단막 각 1,2,3,4군을 실험군으로 설정하였다. 각 군은 수술 후 2주, 8주의 치유기간을 두고 희생하여 관찰하였는데 각 주별로 5마리씩 실험하여 총 50마리를 사용하였다.

2. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치 (Figure 2)

각 군의 백서를 Ketamine hydrochloride (Ketalar^{®†})를 근육주사(70mg/kg)하여 전신마취 시키고, 두부제모를 시행하고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술 부위는 2% 리도카인[‡](1:10만 에피네프린 함유)으로 침윤마취한 후 백서의 전두골 전방부에서 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다 (Figure 2-a). 노출된 두개골의 상면에 내경 8mm trephine bur[§]를 이용하여 지름 8mm의 원형 결손을 형성하였다 (Figure 2-b). 실험군에는 각각의 실험재료를 결손부에 위치시키며, 대조군은 아무 처치도 하지 않았다 (Figure 2-c). 두피를 덮고 4-0 Ethilon^{®¶}로 봉합하고, 1주 후 발사하였다 (Figure 2-d).

† 케타민 Ketalar, Yuhan Co., Seoul, Korea

‡ 1:100,000 epi., Yuhan Co., Seoul, Korea

§ trephine bur, 3i, FL, USA

¶ Ethylon[®], Ethicon, Edinburgh, Scotland, UK

3. 조직학적 관찰

실험동물을 술 후 각 군당 2주와 8주 후에 10마리씩 희생시키고, 실험부위를 적출하였다.

적출부위를 20% 중성 포르말린에 10일간 고정시킨 후, 7일간 EDTA-HCl로 탈회시킨 후 통법에 따라 paraffin에 포매하였다 포매된 표본을 5 μ m 두께로 실험 부위 중단을 전편으로 만든 후, HE stain으로 염색 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

임상적인 치유양상은 일반적으로 특이점 없이 진행되었다. 차단막의 노출이나 염증소견, 그리고 수술부위의 다른 합병증은 나타나지 않았으며 우수한 임상적 치유 양상을 나타내었다. 결손부를 포함한 두개골 부위에 대해 조직학적 평가가 이루어 졌다.

가. 대조군

1) 2주 소견

결손부 변연과 하방의 경뇌막 주위에 국한되어 신생골이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 신생골은 삼각형 형태로 형성되어 있고, 조골세포에 의해 둘러싸여 있는 것이 관찰되었으며, 신생골 주위 및 창상 부위는 얇고 성긴 섬유성 결합조직으로 둘러싸여 있었다. 신생골의 말단에는 골성조직(osteoid)이 관찰되고 혈관 및 강들이 나타나고 있다. 결손부는 성긴 결합조직이 불규칙하게 흩어져 있으며 주위로 대식세포를 관찰할 수 있었다 (Figure 3).

2) 8주 소견

2주에 비해 더 잘 정돈되고 균일한 섬유성 결합조직에 의해 신생골이 둘러싸여 있으며, 결손부의 결합조직도 더 성숙된 양상을 나타내고 있다. 신생골은 골막부위 및 경뇌막 부위에서 성숙한 형태를 띠고 있다. 골막 부위의 신생골 말단에서만 약간의 조골 세포가 나타나고, 드문드문 강(lacunae)내에 골세

포가 위치하며 골성조직 또한 2주에서보다 감소한 소견을 보인다. 골막부위는 잘 정돈된 섬유조직을 나타내고, 혈관이 잘 발달되어 있는 것을 볼 수 있다. 결손부는 2주에 비해 섬유조직이 성숙되고 잘 배열된 섬유조직과 섬유아세포가 관찰된다 (Figure 4).

나. 실험 1군

1) 2주 소견

같은 시기의 대조군에 비해 많은 혈관 증식, 조골 세포의 침윤이 관찰된다. 대조군에 비해, 더 넓은 부위의 결손부 변연에서 신생골 형성이 진행되는 것이 관찰되었다. 대조군과 마찬가지로 신생골 말단 부위에 조골세포들이 둘러싸고 있으며 골성조직이 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 결손부에는 키토산 차단막 잔사들이 흡수되지 않은 채로 성긴 결합조직에 둘러싸여 있으며 잔사 주변부로 대식세포들이 잔사를 탐식하고 있는 것이 관찰되었다. 결손부의 결합조직에도 많은 혈관의 증식이 나타나며, 대조군에 비해 섬유성 결합조직의 밀도가 높고 섬유아세포들이 많이 관찰되고 있다 (Figure 5-a,b).

2) 8주 소견

2주와 마찬가지로 결손부의 3면에서 신생골 형성이 이루어지고 있다. 2주 소견에 비하여 조골세포와 골성조직이 감소되었으나 조직내에 계속적으로 나타나는 것이 관찰되었다. 결손부의 변연에서 강내에 갇힌 골세포가 많이 관찰되고 골조직이 치밀하여져서 골이 성숙화되는 형태를 관찰할 수 있으며, 골 개조가 이루어져서 기존골과 혼화되는 양상이 나타난다. 결손부의 결합조

직도 2주에 비해 치밀해진 양상을 나타내고 있으나, 키토산 차단막 잔사는 아직 완전히 흡수되지 않고 결합조직 내에 많이 남아있는 것을 관찰할 수 있다. 차단막 잔사 주변부에서 거식세포의 탐식 작용이 나타나고 있다 (Figure 6-a,b).

다. 실험 2군

1) 2주 소견

결손부 침단과 골막 부위, 경뇌막 상부로 골무 형태의 신생골 침착이 관찰되었다. 신생골의 변연부에는 조골세포들이 주변을 둘러싸고 있으며 많은 양의 골성 조직도 관찰되었다. 대조군이나 실험 1군에 비하여 골수강이 큰 신생골과 골성조직의 양상을 나타내었으며, 혈관 분포도 많은 것을 관찰할 수 있었다. 결손부에는 결합조직과 인접하거나 결합조직 내에 흡수되지 않은 필름 형태의 키토산 차단막 잔사들이 많이 남아있었다. 실험 1군에 비하여 거의 흡수되지 않은 상태의 차단막 잔사가 관찰되었으며, 경뇌막, 골막과 연결된 결합조직은 비교적 치밀하고 잘 정돈되어 있고 혈관이 잘 발달된 것을 관찰할 수 있었다. 결합조직과 분리된 차단막 잔사는 비교적 큰 덩어리 형태로 흡수되거나 용해되지 않은 형태를 띠고 있으나, 결합조직 내의 잔사는 약간 분해되고 있는 것을 볼 수 있다 (Figure 7).

2) 8주 소견

2주에 비해 치밀한 신생골의 성숙을 볼 수 있으며, 조골세포가 더 멀리까지 이주한 것을 확인할 수 있다. 다른 실험군이나 대조군과 마찬가지로 8주의 소

견에서는 조골세포의 수가 2주에 비해 감소하며 골성조직이 성숙한 골로 대체된 양상을 확인할 수 있으나 약간의 골성조직은 계속적으로 나타나고 있다. 결손부 변연의 결합조직도 2주에 비해 잘 정돈된 형태를 띠고 있으나 차단막 잔사는 여전히 흡수되지 않고 남아있는 것을 볼 수 있다. 차단막의 잔사는 결합조직의 피막으로 둘러싸여 있으며 2주에 보였던 거식세포는 거의 나타나지 않는다 (Figure 8).

라. 실험 3군

1) 2주 소견

다른 군과 마찬가지로 결손부 변연에서 신생골과 골성조직이 나타나며 조골세포가 둘러싸고 있다. 결손부 첨단 및 경뇌막, 골막에서 이어진 결합조직과 인접하여 신생골이 생성되고 있으며 다수의 조골세포가 두드러지게 보이고 있다. 다른 군과 마찬가지로 골무 형태로 결손부 변연에서부터 신생골 형성이 관찰되나, 경뇌막이나 골막의 중앙 부위에서의 신생골 형성은 거의 나타나지 않아 골의 두께가 증가되는 것은 볼 수 없었다. 결합조직에는 섬유아세포가 많이 나타나고 있으며, 흡수되지 않은 차단막 잔사와 출혈 양상이 많이 나타나고 있다. 차단막 잔사는 긴 세포의 기질 형태를 띠고 있으나 피막 형성 등은 나타나지 않고 결합조직과 분리된 형태를 띠는 것을 관찰할 수 있다 (Figure 9).

2) 8주 소견

2주에 비해 두드러지게 성숙된 골 형태를 볼 수 있다. 조골세포는 거의 나타

나지 않으며 골성조직도 거의 치밀한 성숙골로 대체되는 형태를 띠고 있다. 신생골과 기존 골간의 경계가 모호해져 가고 있으나 성장선(incremental line)같은 선으로 경계 지어진다. 결손부의 결합조직은 비교적 성긴 형태를 띠고 있으며, 역시 흡수되지 않은 차단막 잔사가 관찰된다. 2주에 비해 주변에 다른 반응이나 탐식작용 없이 차단막은 섬유조직성 피막에 의해 잘 둘러싸여 있으며 주변으로 밀집된 섬유아세포와 교원성 결합조직이 나타나고 있다. 경뇌막이나 골막 중앙으로부터의 골생성은 나타나고 있지 않다 (Figure 10).

마. 실험 4군

1) 2주 소견

골막에 인접한 부분과 결손부 첨단에서 활발한 신생골 형성이 관찰되어진다. 큰 골수강과 골성조직이 관찰되어지며 변연부로 조골세포가 둘러싸고 있다. 다른 군의 2주 소견에 비해 비교적 치밀한 신생골이 관찰되었다. 신생골의 주변에는 경뇌막과 골막에서 이어지는 치밀하고 성숙된 결합조직이 둘러싸고 있으며 섬유아세포가 치밀하게 존재하고 있다. 결손부 중앙의 결합조직은 성긴 형태를 띠고 있으며 역시 흡수되지 않은 차단막 잔사와 출혈 성향들이 나타나고 있다. 4군의 차단막 잔사는 다른 군에 비해 작게 분해되지 않고 연결되어 있는 형태를 보이고 있다 (Figure 11).

2) 8주 소견

2주에 비해 성숙화된 신생골 형태를 나타내고 있다. 골성조직은 거의 치밀한 성숙골로 대체되었고 조골세포도 나타나지 않는다. 신생골 부위도 강내에

간헐 골세포를 보이고 있으며 골수강도 거의 관찰되지 않는다. 변연부에 인접한 결합조직 내에도 차단막 잔사가 나타나고 있으며, 결손부 중앙에도 거의 흡수되지 않은 필름 형태의 차단막 잔사가 관찰되었다. 또한 다른 실험군과 달리 차단막 잔사 주변으로 섬유성 결합조직의 피막이 관찰되지 않았다 (Figure 12).

IV. 총괄 및 고찰

치주치료를 시행하는 최종 목적은 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하는 것뿐만 아니라 이미 파괴된 치주지지 조직을 형태적, 기능적으로 재생시키는 데 있다. 현재 파괴된 치주조직의 재생을 위해서 시행되는 술식으로는 골 이식술과 치주조직 유도재생술이 있으나 골 형성, 백악질 형성, 섬유소 형성 능력에 있어 그 능력이 제한적이기 때문에 이를 극복하기 위한 다양한 재료들의 개발이 시급한 상황이다.

최근 생체 적합성과 항균작용, 창상 치유 촉진 등의 생물학적 작용, 우수한 기계적 특성으로 관심이 증가하고 있는 키토산은 키틴을 강알칼리로 처리하여 탈 아세틸화 시킨 유도체로서 구조적으로 하이알유론산과 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1500kd인 생체분해성 물질이다. 일반적으로 다당류의 경우에는 효소에 의해 가수분해가 일어나며, 키틴과 키토산의 경우에도 이러한 기전으로 분해되는 것으로 보고되고 있는데 lysozyme이 가장 효과적인 효소로 알려져 있다. Lysozyme의 경우 외부 자극이 없는 경우에도 대식세포에 의해 지속적으로 분비되는데, 체내에 매식된 키토산은 대식세포를 자극하게 되어 lysozyme의 분비를 증진시키게 된다.

백 등은 치주인대 섬유아세포를 채취하여 키토산을 적용시킨 결과 키토산이 치주인대 섬유 아세포의 교원질 생성을 증가시키고, 조골 세포로의 분화를 유도한다고 보고하였으며⁴⁷ Klokkevold 등도 in vitro 실험에서 키토산이 백서 두개골 세포의 석회화 결절 형성에 영향을 미친다고 하였다¹⁹. 또한 키토

산이 조골세포와 같은 골전구세포의 이동과 분화를 촉진시키는 기질의 역할을 하는 반면에 골 형성을 방해하는 세포의 기능을 억제하여 간접적으로 골 형성을 증진시킬 수 있다고 하였다. Malette나 Muzzarelli 등은 동물실험을 통해 키토산이 골형성을 증진시킨다는 사실을 보고하였다^{21,27}. 정 등의 실험에서도 백서 두개골 결손부에 키토산 액을 적용시킨 결과 골재생에 효과를 나타낸다고 하였으며⁵⁰, 김 등은 키토산을 흡수성 콜라겐 스폰지 전달체를 이용해 백서 두개골에 적용 시킨 결과 골재생에 있어 우수한 효과를 나타내었다고 보고하였다⁴⁶. 또한 성견 치주 골내낭에 키토산 부직포를 적용시킨 치주조직 유도재생술의 평가에 있어서도 신생골 생성을 촉진시키며 신생 백악질의 형성을 촉진시킨다는 연구 결과들이 보고 되어져서 치주 영역에 있어서도 관심의 대상이 되어오고 있다^{31,43,44}.

치주조직 유도재생술에 있어서 조직의 재생과 성숙이 이루어지기까지 충분한 기간 동안 차단막이 오염이나 감염되지 않고 온전하게 유지되어야 할 필요성이 있다. 하지만, 치유기간 동안 차단막이 빈번하게 노출되어 세균이 집락화 하여 신생조직의 성숙을 방해 한다고 알려져 있다.³⁸ 또한 이미 치면에 존재하고 있던 세균에 의한 세균괴의 증가가 세균의 이차적 군집에 대한 기초를 제공하기 때문에 조기 세균의 부착이 막의 세균 오염에 더 중요하다고 보고되고 있으며, 막 표면에 부착된 세균이 부착 증진에 영향을 준다고 하였다.²⁸ 따라서 차단막의 초기 세균 집락화를 저지하거나 감소시키기 위하여 전신적, 또는 국소적인 항생제의 투여가 필요할 수 있다. 그러나 전신적인 항생제 투여는 모든 치주조직에 약물이 도달하여 약물 치료기간 동안 세균의 성장을 억제할 수 있지만, 병소에서의 유효 농도 유지를 위하여 많은 양의 약물이 투여되어야 하며, 이로 인해 신체내 다른 부위에서 부작용이 일어날 수 있고, 저항

균주가 생성되고, 기회감염을 일으킬 수 있는 문제점을 갖고 있다. 따라서 항세균 제재를 치주낭에 직접 투여하여 그 효과가 일정기간 동안 지속적으로 유지될 수 있는 국소 약물 투여 방법에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 이러한 controlled drug delivery system을 이용할 경우에는 적은 양의 약물로 충분히 유효 농도를 유지할 수 있고, 약물의 효과가 증진되며, 약물이 병소 부위에 도달되어 치주낭 내 잘 유지될 수 있는 장점이 있다. 또한 세균의 군집상태에서는 항생제의 도달이 어려워 약제 효과가 감소되므로 초기에 세균 부착을 막을 수 있도록 차단막 자체에 약제를 처리함으로써 세균 집락화를 감소시키려는 연구가 이루어지고 있다. 김 등은 흡수성 차단막 재료로 이용되는 calcium sulfate에 테트라사이클린을 함유시켜 일정 기간까지 항생제의 농도가 유지되는 것을 관찰하여 서방형 국소 약물 송달 제재의 가능성을 보고하였다⁴⁵.

본 연구에서는 생체 적합성 및 생분해성이 뛰어난 흡수성 키토산 차단막에 테트라사이클린 항생제를 함유시켜 다양한 형태로 제조하여 키토산 자체의 효과 외에 항생 효과를 통한 치주 질환 치료의 가능성을 타진해 보고자 하였다. 키토산 차단막의 골재생 유도능력을 관찰하기 위하여 기존의 연구들과 유사하게 백서 두개골 결손부 실험 모델⁵을 선택하였는데, 미성숙한 동물의 경우 성장이 완료된 동물에 비해 우수한 치유능을 가지고 있기 때문에, 차단막 고유의 능력을 평가하기 위하여 완전히 성숙된 동물을 선택하였다. 백서의 두개골은 안면골이나 하악골과 같은 피질골로서, 해부학적으로는 하악골과 같이 피질골 사이에 해면골이 존재하며 생리학적으로는 위축된 하악골과 유사하므로 실험 결과를 치주조직에 연결시켜 연구가 가능할 것으로 보인다. 내경 8mm의 trephine bur를 이용하여 백서 두개골에 임계 크기 결손부³⁷를

형성하였는데, 두개골 결손부 형성 시 결손부 골 재생에 중요한 영향을 미치는 경뇌막을 손상시키지 않도록 주의해야 한다. 실험 재료로는 테트라사이클린 수용액과 테트라사이클린/키토산 용액에 키토산 부직포를 침적시켜 제조된 두가지 형태의 부직포 차단막과 키토산 용액을 동결 건조하여 테트라사이클린을 함유시킨 두가지 형태의 스폰지 차단막을 이용하였다.

테트라사이클린이 병원성 세균에 대한 항생 효과를 가지기 위해서는 최소 억제 농도가 4~8 $\mu\text{g/ml}$ 이상이 되어야 하며, 골흡수를 억제하기 위해서는 5~10 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 농도가 요구된다³⁴. 따라서 장기간 동안 일정량씩 항생제가 방출되어야 차단막이 흡수되는 기간까지 항생 효과를 가진다고 기대할 수 있으나 본 연구에서 이용된 차단막들의 경우 항생제 방출이 6일 이후에는 나타나지 않았다^{48,49}. 또한 백서 두개골 결손부에 있어 차단막에 대한 세균의 군집을 측정할 수 없었고, 테트라사이클린 항생제의 경우 골성장 및 골 대사에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있으므로 조직학적 관찰만으로는 테트라사이클린 항생제의 영향을 평가하는데 어려움이 있다. 따라서 테트라사이클린의 영향을 평가하기 위해서는 차단막의 물성 조작을 통하여 서방형 테트라사이클린의 방출 거동 시간을 연장하고 백서 두개골 결손부에 이식된 차단막에 대한 세균 검사가 동반되어야 할 것으로 사료된다. 다만 임상적인 관찰에서 염증반응이나 기타 이물 반응이 전혀 나타나지 않았고 발사 시기나 희생시기까지 우수한 치유와 유지 결과를 볼 수 있었다.

골성장 양상에 있어서 대조군의 경우 골재생이 주로 경뇌막과 절단면 변연부에서 이루어져서 신생골이 삼각형 형태를 나타내었다. 이에 비해 모든 실험군에서는 경뇌막과 절단면 뿐만 아니라 상부 골막 안쪽에서도 잔존골 주변으로 골성장이 이루어져서 골무와 같은 양상을 띠는 것을 관찰할 수 있었다. 골

성조직(osteoid)은 골재생이 활발하게 진행되고 있으며 향후에도 진행될 것을 나타내는데, 대조군의 경우에는 2주에 신생골 전방에 많은 양의 골성조직이 위치해 있으나 8주에는 골성조직이 성숙된 골로 거의 대체되었고 조골세포도 거의 나타나지 않아 골 성장이 거의 멈추었음을 나타내고 있다. 실험군에서는 1,2,3,4 군 모두 대조군에 비해 조금 더 많은 신생골 형성을 관찰할 수 있었다. 이는 실험군의 경우 경뇌막과 결손부 변연에서 뿐만 아니라 변연부에 인접한 골막 부위에서도 신생골의 골성장이 일어났기 때문이며, 8주 소견에서도 약간의 조골세포가 나타나며 골성조직이 나타나는 것으로 보아 골성장이 진행되고 있는 것으로 생각할 수 있다. 위와 같은 조직학적 관찰에서 항생제를 함유한 키토산 차단막이 우수한 골재생을 이루는데 있어 가능성을 가지고 있다고 볼 수 있다.

각 군의 2주 소견을 볼 때 이 시기는 결손부의 비유합 수렴기으로써 혈종과 섬유소가 감소하고 교원질의 조직화가 이루어지는 시기로 결손부 변연으로부터 중앙 부위로 신생골 형성이 섬 모양으로 나타나는 시기이다. 모든 군에서 2주의 해면골 침착은 대부분 골결손부 변연에서 이루어져 있는 것을 볼 수 있는데, 이는 초기 골형성이 결손부위의 골소주 간극으로부터 골 결손부 변연 부로의 골내 조직 증식의 결과인 것을 알 수 있다.

대조군의 8주 소견에 있어서는 성숙기의 소견대로 조골세포가 거의 나타나고 있지 않으며, 골성조직도 감소하여 성숙된 골양상을 보여주고 있다. 결손부 전역에는 두껍고 잘 조직화된 교원질 결합조직이 나타나고 있어서 성숙된 반흔 조직의 양상을 보인다.

다양한 형태의 차단막을 사용한 실험군에 있어서는 각 군 사이에 특징적으로 두드러진 신생골 성장의 차이는 보이지 않았으나 대조군에 비해서 활발한

신생골 형성을 관찰할 수 있었으며, 8주 소견에 있어서도 대조군에 비해 많은 골성조직이 보여져서 골성장의 가능성이 남아있는 것으로 생각된다. 또한 이 결과는 기존의 여러 동물실험 및 in vitro 실험과 일치한다.

실험군의 결과를 볼 때 1,2,3,4 군 모두 2주와 8주 소견에서 차단막의 잔사가 나타나고 있다. 치주조직의 재생을 위해서 생분해성 차단막은 6주 정도만 본래의 형태를 유지하면 충분한 것으로 알려져 있다.³² 따라서 본 실험에 사용된 차단막들은 분해 시간에 있어서는 차단막으로서 기능을 하기에 충분한 것으로 생각되어진다. 다만 실험 1,3군에 비해 실험 2,4군의 차단막 잔사가 필름 형태로 거의 흡수되지 않는 소견을 보여 항생제를 침지시키는 과정이 키토산 차단막의 흡수 형태에 영향을 미치는 것으로 사료되며 적절한 흡수시기를 위하여 제조방법에서의 보완이 필요할 것으로 생각된다. 그리고 조직 소견상에서 골막 부위의 결손부에 있어서 섬유성 결합조직이나 결손부 변연의 신생골 부위에서 조직이 눌러 있는 형태를 관찰할 수 있는데, 차단막에 있어서 공간 유지의 기능이 중요한 인자로 작용하므로 차단막의 물성 조작을 통해 차단막의 견고성을 증진시킬 필요가 있는 것으로 사료된다.

위와 같은 연구 결과에서 테트라사이클린을 함유한 다양한 형태의 차단막은 백서 두개골의 결손부에서 골 조직 재생을 증진시킬 수 있는 것으로 보이나, 항생제의 방출과 그 영향, 계측을 통한 골 조직 재생의 객관화 등은 향후에 보완, 연구되어야 할 것이다. 또한 차단막의 물성 보완 및 흡수 속도의 조절 등이 이루어져야 할 것이며, 계통발생학 적으로 더 진화된 동물의 치주조직을 대상으로 한 실험을 통해 장기적인 골조직 및 치주조직의 재생유도 효과에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구는 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에 항생제가 함유된 당양한 형태의 키토산 차단막을 이식했을 때 골조직 재생 유도 능력을 조직학적으로 관찰 평가하기 위하여 실시되었다.

백서 두개골에 trephine bur를 이용하여 8mm 지름의 원형 결손부를 형성하고 대조군에는 아무것도 이식하지 않고, 실험군에는 테트라사이클린을 함유한 키토산 차단막을 부직포 형태, 스폰지 형태로 제작하여 결손부에 이식하였다. 술 후 2주, 8주에 희생하고 치유 결과를 조직학적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 테트라사이클린을 함유한 키토산 차단막의 사용은 임상적으로 우수한 치유 양상을 나타내었다.
2. 부직포 형태, 스폰지 형태의 실험군에서 모두 신생골 형성이 활발하게 나타났다. 조골세포와 골성조직이 8주 소견에서도 나타났으며, 결손부 변연과 경뇌막 뿐만 아니라 인접한 골막 부위에서도 신생골의 형성이 관찰되었다.
3. 각 실험군 사이에서는 유의할 만한 특징적인 소견이 나타나지 않았으며, 1,2,3,4 실험군 모두에서 8주까지 차단막의 분해 양상은 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 테트라싸이클린 항생제가 함유된 다양한 키토산 차단막은 치주질환에 이환된 치주조직의 골조직 유도 재생을 위한 차단막으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Aukhil I, Simpson DM, Schaberg TV.: An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs. *J. Periodont. Res.*,18:643-654, 1983.
2. Becker W, Becker BE, McGuire MK.: Localized ridge augmentation using absorbable pins and e-PTFE barrier membranes. A new surgical technique. case reports. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 13:49-61. 1984.
3. Blumenthal N, Steinberg J.: The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone collagen gel implants in human infrabony defects. *J. Periodontol.*, 61:319-327, 1990.
4. Caffesse RG, Domingez LE, Nasjleti CA, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA.: Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration. *J. Periodontol.*, 61:45-50, 1990.
5. Caton J., Morta L., Gandini L., Laskaris B.: Non-Human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J. Periodontol.*, 65:1143-1150, 1994.
6. Caton J, Nyman S, Zander H.: Histometric evaluation of periodontal surgery II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J. Clin. Periodontol.*, 7:224-231, 1980.

7. Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ.: Effect of collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs. *J. Periodontol.*, 64:878-882, 1993.
8. Drisko CH.: Non-surgical pocket therapy, pharmacotherapeutics. *Ann. Periodontol.*, 1:499-509, 1996.
9. Fleisher N, Waal HD, Blom A.: Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910). *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 8(2): 45-54, 1988.
10. Golub LM, Ciancio S, Rammamurthy NS, Leung M, McNamara TF.: Low-dose doxycycline therapy: Effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J. Periodontol. Res.*, 25:321-330, 1990.
11. Gottlow J.: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices; Initial healing and long-term results. *J. Periodontol.*, 64:1157-1167, 1993 (supplement).
12. Gottlow J, Laurell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H, Bogentoft C.: Periodontal tissue response to a new bioabsorbable guided tissue regeneration device: A longitudinal study in monkeys. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 14:437-449, 1994.

13. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 11:494-503, 1984.
14. Greenstein G, Caton JG.: Biodegradable barrier and guided tissue regeneration. *Periodontology* 2000, 1:36-45, 1993.
15. Hyder PR, Dowell P, Shingh G, Dolby AE.: Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen.: Analysis of properties. *J. Periodontol.*, 63:182-186, 1992.
16. Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J.: The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. *J. Clin. Periodontol.*, 13:145-150, 1986.
17. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Temperton AJ, Economou SG.: Chitosan: Evaluation of a new hemostatic agent. *Curr. Surg.*, 47:37-39, 1990.
18. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN.: Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 49:858-863, 1991.
19. Klokkevold PR, Vandermark L, Kenney EB, Bernard GW.: Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro. *J. Periodontol.*, 67:1170-1175, 1996.

20. Magnusson I, Batich C, Collins BR.: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J. Periodontol.*, 59:1-7, 1988.
21. Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED.: Chitin in nature and technology. In: Muzzarelli RA, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. *Chitosan Effect in Nature and Technology*. New York: Pleum press, 435-442, 1986.
22. Melcher AH: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47:256-260, 1976.
23. Michalowicz BS, Pilstrom BL, Drisko CH, Cobb CH, Killoy WJ, Caton JG, Lowenguth RA, Quinones C, Encarnacion M, Coodson JM.: Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers maintenace response. *J. Periodontol.* 52: 613-620, 1995.
24. Minami S, Okamoto A, Matsuhashi A, et al.: Applications of chtin and chitosan in animals. In: Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, eds. : *Advances in chitin and chitosan*. London: Elsevier Applied Science, 61-69, 1992.
25. Muzzarelli RA, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini B.: Biological activity of chitosan: Ultrastructural study. *Biomaterials*, 9:247-252, 1988.

26. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnali A, Filippini O, Baldassarre V.: Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10:598-603, 1989.
27. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G.: Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15: 1075-1081, 1994.
28. Nowzari H, Matian F, Slots J.: Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membranes for guided tissue regeneration inhibit healing. *J. Clin. Periodontol.*, 22:469-474. 1995.
29. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.*, 9:257-265, 1982.
30. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 9:291-296, 1982.
31. Pang EK, Paik JW, Kim SK, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Kim CK, Choi SH.: Effect of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts In vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J. Periodontol.* 76(9):1526-1533, 2005.

32. Polson AM.: Periodontal regeneration. Current status and directions. Quintessence books, p.159, 1994.
33. Polson A, Caton J.: Factors influencing periodontal repair and regeneration. J. periodontol., 53: 617-625 1982.
34. Rifkin BR, Vermillo AT, Golub LM.: Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. J. Periodontol. 64(8):819-827, 1993.
35. Robert PM, Frank RM.: Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane. J. Periodontol., 65:414-422, 1994.
36. Sapelli PL, Baldassare V, Muzzarelli RA, Emanuelli M.: Chitosan in dentistry. Chitin in Nature and Technology, 507-512, 1986.
37. Schmitz JP, Hollinger JO.: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin.Orthop., 205:299-308, 1986.
38. Selvig KA, Nilveus RE, Fitzmorris L, Kertsen B, Khorsandi SS.: Scanning electron microscopic observation of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regeneration in humans. J. Periodontol., 61:515-520, 1990.

39. Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, Saimoto H.: Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16:43-49, 1994.
40. Somerman MJ, Foster RA, Vorsteg G, Progebin K, Qynn RA.: Effect of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J. Periodontol. Res.*, 23:154-159, 1988.
41. Tanner M, Solt CW, Vudhakanok S.: An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. *J. Periodontol.*, 59:524-530, 1988.
42. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S.: Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. *J. Clin. Periodontol.*, 19:633-640, 1992.
43. Yeo YJ, Jeon DW, Kim CS, Choi SH, Cho KS, Lee YK, Kim CK.: Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J. Biomed. Mater. Res.* 72(B):86-93, 2005.
44. 계승범, 손성희, 최상묵.: Chitosan과 chitosan-cellelose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구. *대한 치주과학회지*. 28(4):611-625, 1998.

45. 김성희, 최성호, 조규성, 채중규, 박광균, 김종관.: 테트라싸이크린 함유 calcium sulfate의 서방형 국소 약물 송달 효과에 대한 연구. 대한 치주과학회지, 27(4):751-765, 1997.
46. 김수경, 석헌주, 김창성, 조규성, 채중규, 김종관, 최성호.: 백서두개골 결손부에서 키토산/흡수성 콜라겐 전달체의 골재생. 대한 치주과학회지, 33(3):457-574, 2003.
47. 백정원, 이현정, 유윤정, 조규성, 김종관, 최성호.: 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향. 대한 치주과학회지, 31(4):823-832, 2001.
48. 임기형, 김경남, 김광만, 최성호, 민우기, 이수복, 정용식, 이용근.: 항생제를 함유한 키토산 차단막의 물리적 특성 및 약물 방출 거동. 대한 치과기재학회지, 43(2): 67-74, 2005.
49. 장기성, 이수복, 이범훈, 민우기, 김원근, 정용식, 최성호, 이용근.: 테트라싸이클린을 함유한 기능성 키토산 차단막의 제조. 한국 섬유공학회지, 42(3):155-160, 2005.
50. 정의원, 서종진, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관.: 백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생유도 효과. 대한 치주과학회지, 30(4):851-870. 2000.

사진부도 설명

Figure 1. 테트라싸이클린이 함유된 키토산 차단막

- 1-a. 실험 1군. 키토산 부직포를 1 wt% 테트라싸이클린 항생제 수용액에 10분 동안 침지시켜 제조한 부직포 형태의 차단막
- 1-b. 실험 2군. 5 wt% 키토산 용액과 1wt% 테트라싸이클린의 혼합액에 키토산 부직포를 10분 동안 침지시켜 제조한 부직포 형태의 차단막
- 1-c. 실험 3군. 키토산 스폰지를 1 wt% 테트라싸이클린 항생제 수용액에 10분 동안 침지시켜 제조한 스폰지 형태의 차단막
- 1-d. 실험 4군. 5 wt%의 키토산 용액과 1 wt%의 테트라싸이클린의 혼합액을 건조시켜 제조한 스폰지 형태의 차단막

Figure 2. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

- 2-a. 백서의 두부 제모 후 침윤마취, 두피 절개 후 두개골의 상면 노출 소견
- 2-b. 노출된 두개골의 상면에 trephine bur로 지름 8mm의 원형 결손 형성
- 2-c. 결손부에 각 군의 실험 재료 위치
- 2-d. 봉합 후 소견

Figure 3. 결손부에 아무 처치하지 않은 대조군. 술 후 2주 소견. 화살표는 결손부의 경계를 나타낸다 (HE×10).

Figure 4. 대조군. 술 후 8주 소견. 화살표는 결손부의 경계를 나타낸다 (HE×10).

Figure 5. 실험 1군. 술 후 2주 소견

5-a. 신생골이 결손부 경계와 경뇌막의 상부에서 형성되고 있다. 화살표는 결손부의 경계를 나타낸다 (HE×10).

5-b. 신생골과 골성조직이 나타나고 있으며, 신생골을 둘러싸고 있는 잘 배열된 결합 조직을 볼 수 있다. 화살표는 결손부 경계와 신생골의 접촉면을 나타낸다 (NB: new bone) (HE×100).

Figure 6. 실험 1군. 술 후 8주 소견

6-a. 신생골과 기존골의 혼화 양상이 나타나며, 골이 성숙됨. 흡수되지 않은 차단막 잔사가 보여진다. 화살표는 결손부 경계를 나타낸다 (HE×10).

6-b. 흡수되지 않은 키토산 차단막 잔사가 나타나며, 결합 조직은 치밀하게 잘 배열되어 있다. 화살표는 거식세포의 차단막 잔사 탐식 작용을 나타낸다. (CMR: chitosan membrane remnant, GC: giant cell, CT: connective tissue) (HE×100).

Figure 7. 실험 2군. 술 후 2주 소견. 결손부의 경계부와 골막 부위, 경뇌막 상부로 골무 형태의 신생골 침착이 나타난다. 거의 흡수되지 않은 필름 형태의 차단막 잔사가 나타난다. 화살표는 결손부 경계를 나타낸다 (HE×10).

Figure 8. 술 후 2주에 비해 성숙된 골 형태가 나타난다. 치밀한 결합조직내로 섬유성 피막 조직에 의해 잘 경계 지워진 차단막 잔사가 나타난다 (NB: new bone, CMR: chitosan membrane remnant, CT: connective tissue) (HE×100).

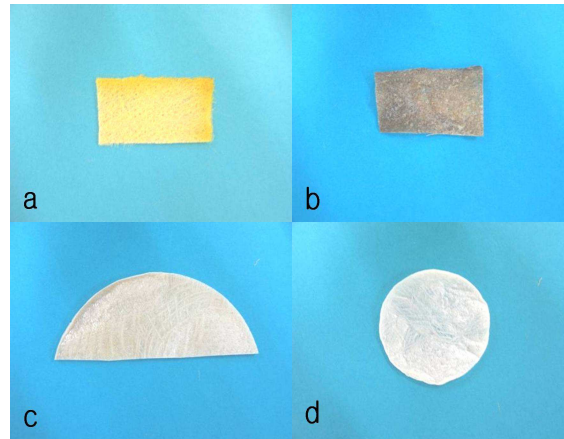
Figure 9. 실험 3군. 술 후 2주 소견. 결손부 첨단과 골막 부위, 경뇌막 상부로 골무 형태의 신생골 침착이 관찰된다. 결손부 결합 조직 내에 흡수되지 않은 차단막 잔사와 출혈 양상이 나타난다 (HE×10).

Figure 10. 실험 3군. 술 후 8주 소견. 성숙된 골형태를 나타내고 있으며, 기존골과 혼화되는 양상을 나타낸다. 차단막은 섬유조직성 피막에 의해 잘 경계 지어지고 있으며 주변으로 밀집된 섬유 아세포와 교원성 결합조직을 볼 수 있다. 화살표는 섬유성 피막을 나타낸다 (NB: new bone, OB: old bone, CMR: chitosan membrane remnant) (HE×100).

Figure 11. 실험 4군. 술 후 2주 소견. 활발한 신생골 형성이 나타나며 큰 골수강과 골성조직이 나타난다. 화살표는 조골세포를 나타낸다 (NB: new bone, CMR: chitosan membrane remnant) (HE×100).

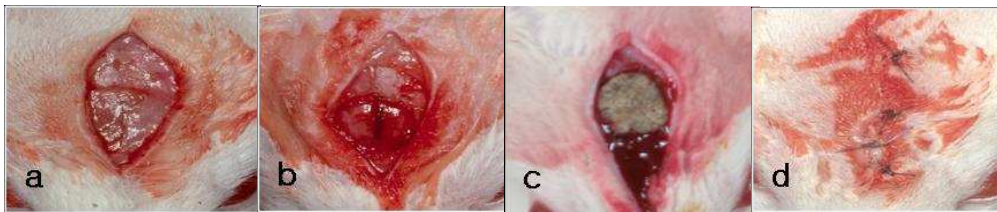
Figure 12. 실험 4군. 술 후 8주 소견. 화살표는 결손부 경계를 나타낸다 (HE×10).

사진부도



- 1-a. 실험 1군. 부직포 형태 차단막
- 1-b. 실험 2군. 부직포 형태 차단막
- 1-c. 실험 3군. 스폰지 형태의 차단막
- 1-d. 실험 4군. 스폰지 형태의 차단막

Figure 1. 테트라싸이클린이 함유된 키토산 차단막



- 2-a. 백서의 두개골 상면 노출
- 2-b. 지름 8mm 원형 결손 형성
- 2-c. 실험 재료 위치
- 2-d. 봉합

Figure 2. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

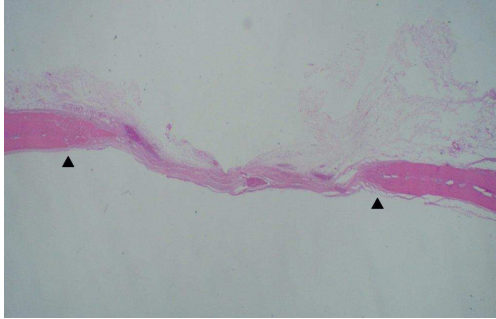


Figure 3. Control 2 weeks (HE×10)

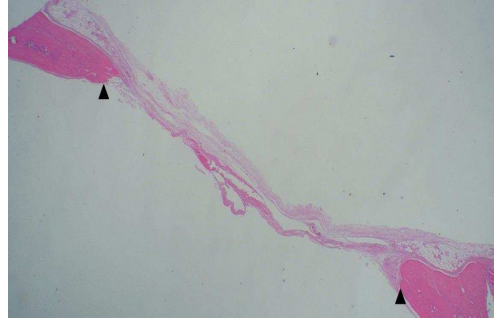


Figure 4. Control 8 weeks (HE×10)



Figure 5-a. Exp.-1, 2 weeks (HE×10)

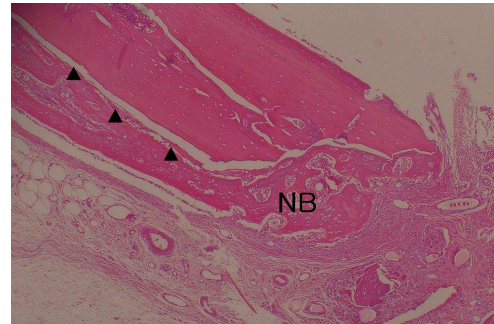


Figure 5-b. Exp.-1, 2 weeks (HE×100)



Figure 6-a. Exp.-1, 8 weeks (HE×10)

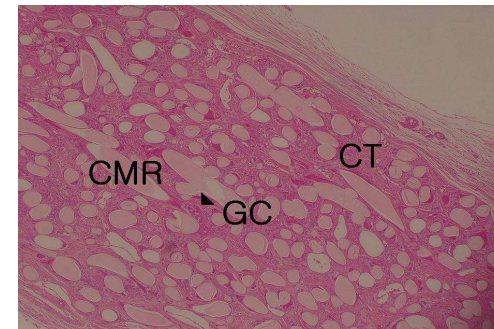


Figure 6-b. Exp.-1, 8 weeks(HE× 100)

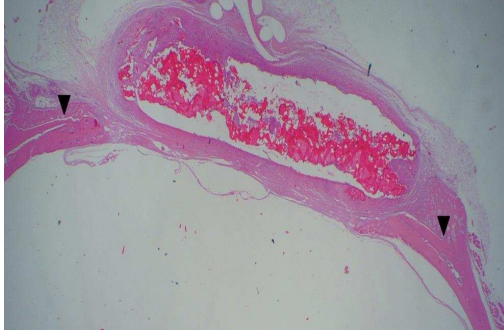


Figure 7. Exp.-2, 2 weeks (HE×10)

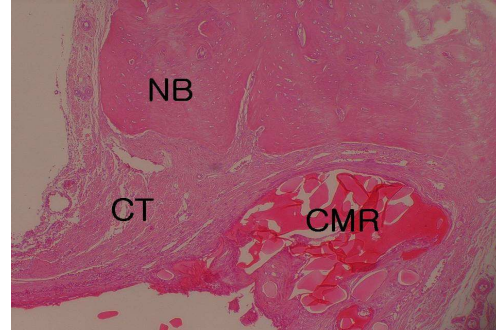


Figure 8. Exp.-2, 8 weeks (HE×100)



Figure 9. Exp.-3, 2 weeks (HE×10)

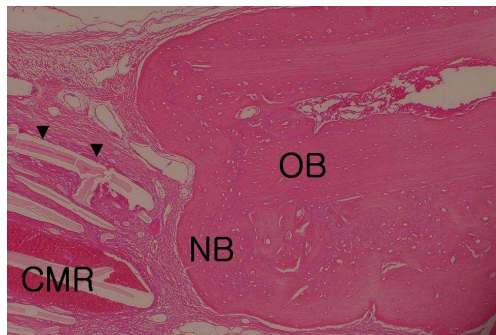


Figure 10. Exp.-3, 8 weeks (HE×100)

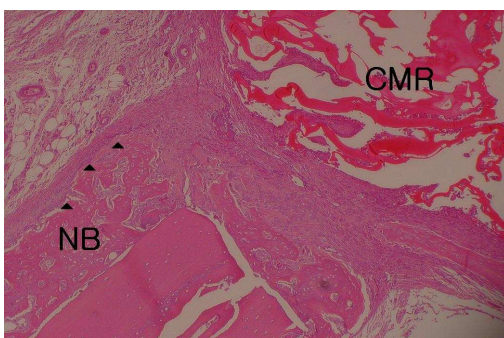


Figure 11. Exp.-4, 2 weeks (HE×100)



Figure 12. Exp.-4, 8 weeks (HE×10)

Abstract

The Bone regenerative effects of tetracycline blended chitosan membranes on the calvarial critical size defect in Sprague dawley rats

Gyung Joon Chae, D.D.S.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Prof. Seong Ho Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

The major goals of periodontal therapy are the functional regeneration of periodontal supporting structures already destructed by periodontal disease as well as the reduction of signs and symptoms of progressive periodontal disease. There have been many efforts to develop materials and therapeutic methods to promote periodontal wound healing.

There have been increasing interest on the chitosan made by chitin. Chitosan is a derivative of chitin made by deacetylation of side chains. Chitosan has been widely studied as bone substitution and membrane material in periodontology. Many experiments using chitosan in various animal models have proven its beneficial effects.

Tetracycline has been considered for use in the treatment of chronic periodontal disease and gingivitis.

The aim of this study is to evaluate the osteogenesis of tetracycline blended chitosan membranes on the calvarial critical size defect in Sprague Dawley rats. An 8mm surgical defect was produced with a trephine bur in the area of the midsagittal suture. The rats were divided into five groups: Untreated control group versus four experimental group. Four types of membranes were made and comparative study was been done. Two types of non-woven membranes were made by immersing non-woven chitosan into either the tetracycline solution or chitosan-tetracycline solution. Other two types of sponge membranes were fabricated by immersing chitosan sponge into the tetracycline solution, and subsequent freeze-drying. The animals were sacrificed at 2 and 8 weeks after surgical procedure. The specimens were examined by histologic analyses. The results are as follows:

1. Clinically the use of tetracycline blended chitosan membrane showed great healing capacity.
2. The new bone formations of all the experimental group, non-woven and sponge type membranes were greater than those of control group. But, there was no significant difference between the experimental groups.
3. Resorption of chitosan membranes were not shown in any groups at 2 weeks and 8 weeks.

These results suggest that the use of tetracycline blended chitosan membrane on the

calvarial defects in rats has significant effect on the regeneration of bone tissue in itself. And it implicate that tetracycline blended chitosan membrane might be useful for guided tissue regeneration.

Key words: chitosan, tetracycline, regeneration.