

성견하악골의 신연 부위에서 골형성에 대한 혈소판-풍부 혈장의 효과

류수장 · 이충국* · 최병호*

순천향대학교 의과대학 천안병원 구강악안면외과, 연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실*

Abstract

EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA ON BONE FORMATION IN DISTRACTED AREA OF CANINE MANDIBLE

Soo-Jang Ryu, Choong-Kook Yi*, Byung-Ho Choi*

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Soonchunhyang University, Chonan Hospital

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Dental College, Yonsei University*

Distraction osteogenesis refers to the biological process responsible for new bone formation between bone segments by gradual distraction after osteotomy. For the past several years, various inconveniences including a protracted consolidation period that requires patients to wear a distractor frame longer, as well as higher medical costs, have not been remedied by improvements in osteotomy, distraction rate and monitoring system. Furthermore, side effects such as pin tract infections and soft tissue swelling may arise due to the long treatment period. These drawbacks form the rationale of this study which purports to seek a method by which the consolidation period can be reduced. This paper examines how platelet-rich plasma (PRP), known to facilitate osteogenesis, influences bone formation when applied in distracted area. Ten mongrel dogs, which were made to wear external distractor frames after osteotomy in both sides of the mandible, were used as subjects. After a 7day period of latency, distraction was carried out at a rate of 1mm/day for 14 consecutive days. After the onset of distraction, 2ml of PRP and a mixture of calcium gluconate and thrombin were injected into the center of the distracted callus on the left side of the mandible. The left was injected with PRP while the right side was set as the control site without PRP treatment. Execution at the onset of distraction and in 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks after the consolidation period, clinical and radiographic tests, bone mineral density examination, histological examination and histomorphometric analysis were conducted to compare both sides. The results are summarized as follows:

1. Based on the clinical examination at two weeks, more remarkable cortical bone formation was found on the buccal and lingual side of the distracted area in the PRP treatment site than in the control site. No visual difference was found between the PRP treatment site and the control site at four and eight weeks.
2. Based on the radiological examination, a distinct increase in the radiopaque appearance of the PRP treatment site was revealed at two weeks, but this increase appeared to slow down at four and eight weeks.
3. Examination of bone mineral density revealed a significant difference at two weeks with the PRP treatment site yielding density two times higher than the control site. This difference lessened after four weeks, and disappeared at eight weeks.
4. The histomorphometric examination revealed that about 20% more bony trabeculae area (20% higher) was formed in the PRP treatment site than in the control site.

In conclusion, it can be said that PRPs effect on stimulating bone formation in the PRP treatment site manifest as early as two weeks. Trabeculae formation likewise increased throughout the whole period. If this result can be applied to humans, the consolidation period can be reduced by injecting PRP into the distracted area.

Key words : Distraction osteogenesis, PRP(platelet-rich plasma), consolidation period, bony trabeculae, bone formation.

I. 서 론

신연 골형성술은 1954년 Ilizarov가¹⁾ 처음 발표한 후 정형외과 영역에서 골연장, 기형교정, 골결손부 수복에 효과적인 수단으로 사용돼 왔으며 꾸준히 발전을 계속해 왔다. 악안면 영역에서는 신연 골형성술을 최근에 사용하기 시작하였으나 빠른 발전을 이루고 있다. 선천성 하악골 발육부전이나 비대칭 안면기형에서 신연 골형성술을 이용하여 재건을 시도하고 있으며, 알의 제거

류 수 장

300-721, 충남 천안시 봉명동 23-20

순천향의과대학 천안병원 치과 · 구강악안면외과학교실

Soo-Jang Ryu

Dept of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Soonchunhyang Univ.

23-20, Bongmyeong-Dong, Cheonan, Choongnam, 300-721, Korea

Tel: 82-2-514-7636

E-mail: s600200@naver.net

나 사고 등으로 악골의 결손이 초래된 경우에도 신연 골형성술을 이용한 재건을 추구하고 있다. 신연 골형성술은 골절단 후 잠적된 신연을 통해 골절면 사이에 새로운 골을 형성시켜 줌으로써 골이식을 위한 자가골 채취시 동반되는 여러 가지 문제점을 해결할 수 있었다. 즉 자가골 채취로 인한 부가적 수술이 필요 없고, 공여부의 부작용, 수여부 골괴의 형태적 부조화, 이식 골편의 감염이나 비유합, 이식 골편의 흡수, 이식 골편 주위의 연조직 감염 등의 문제점을 해결할 수 있게 되었다. 그러나 신연 골형성술은 신연 후 강화기가 오래 걸린다는 단점이 중요한 문제로 남아 있다. 신연기를 오랜 시간 장악해야 하는 불편함과 경제적 부담을 줄 뿐만 아니라, 또한 비유합, 신경 손상, 국소적 부종의 심화, 조직의 괴사, 고정핀 주변 부위의 감염 등의 부작용을 초래할 수 있다. 이러한 부작용들을 줄이기 위하여 골형성을 가속시킬 여러 가지 실험적, 임상적 연구가 시행되었다. Okazaki 등은¹⁰ 재조합 섬유모세포 성장인자(recombinant fibroblast growth factor-2: rFGF-2)를, Nakamura 등은¹¹ 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factors: FGFs)를 골신연 부위에 투여한 후 골형성 효과에 대한 실험을 하였다. 이들 실험에서 성장인자가 골형성 자극 효과를 가지고 있음을 보고하였으나, 이들 성장인자에 대한 항체를 형성한다는 단점이 있다. Tubota 등은¹² 자가골 세포를 배양하여 골신연 부위에 투여한 결과 자가골 세포가 골형성을 촉진시키는 것을 보여주었으나 자가골 세포의 투여 방법에 대한 문제점이 있었다. 그 외에 기계적¹³, 전기적¹⁴, 방사선학적인 자극이나¹⁵, 전환성장인자(transforming growth factors: TGFs)¹⁶, 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factors: PDGF)¹⁷, 골형성 단백질(bone morphogenic proteins: BMPs)¹⁸ 등을 사용하여 강화 기간을 줄이려는 노력이 시행되어 왔다. 그러나 이러한 방법들은 아직까지도 동물 실험단계에 있으며, 임상적으로 그 유용성이 입증되지 않았을 뿐만 아니라 적용부위가 정형외과 영역에 국한되어 있었다. 최근에 Marx 등이¹⁹ 악안면 영역에서 골형성을 자극하는 방법의 하나로, 다양한 성장 요인을 가진 혈소판-풍부 혈장(platelet-rich plasma: PRP)을 겔(gel)로 만들어 하악골 재건을 위한 골 이식시 이용한 결과, 혈소판-풍부 혈장이 골형성을 촉진한다는 임상적 결과를 보고하였다. 그러나 현재까지 혈소판-풍부

혈장을 신연 후 강화기를 단축시키기 위한 방법으로 구강악안면 영역의 신연 골형성술에 적용한 논문은 발표된 것이 없다. 이에 본 실험에서는 신연 부위에 혈소판-풍부 혈장을 직접 투여하여 혈소판-풍부 혈장이 골형성에 어떤 영향을 미치는지 알아 보고자 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

10마리의 건강하고 성장중인 체중 15~18kg의 감종개를 실험에 사용하였다. 골신연 기구는 CK S MINI Fixator(stainless steel, Dong Kwang Medical Co., Ltd, Korea)을 사용하였고, 골내 고정나사는 길이 40mm, 지름 2.2mm의 Half Pin(stainless steel, Dong Kwang Medical Co., Ltd, Korea)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 골절단술과 신연장치의 장착 및 신연

Ketamine(케타라, 유한양행, 10mg/kg) 근육주사와 Rumpen(Xylazine, Bayer Korea, 0.3mg/kg) 정맥주사 하여 전신마취하였다. 양측에 악하 접근법을 통해 절개 후, 최소한의 골막을 박리한 후 하악 제 3, 4 소구치 사이에 골절단술을 시행하였다. 골절단 부위를 가로지르게 신연장치를 위치시킨 후 4개의 골내고정 pin으로 고정하였다 (Fig. 1a).

감염방지를 위해 세프피란(Cefpiran, 유한양행)을 1일 100mg씩 수술 후 5일 동안 근육주사하였고, 수술 후 7일 동안 유동식을, 이후에는 일반사료를 주었다. 신연장치 장착 7일 후부터 하루 1mm의 신연속도로, 하루에 두번씩 신연 시키면서 14일동안 신연하였다 (Fig. 1b).

2) 혈소판-풍부 혈장의 분리 및 투여

① 채혈 과정

에이씨디-에이액(Citric acid, 보인 메디카, 혈액 10ml당 1.5ml)을 튜브에 미리 넣어 놓고 상온에서 15ml의 혈액을 채혈하여 튜브

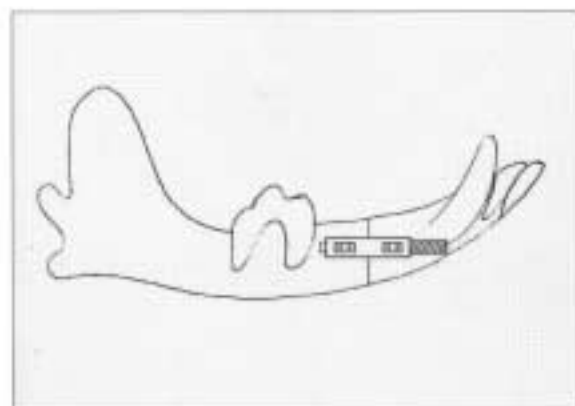


Fig. 1a. Schematic drawing of the osteotomy site and the distraction device applied on the mandibular body area.

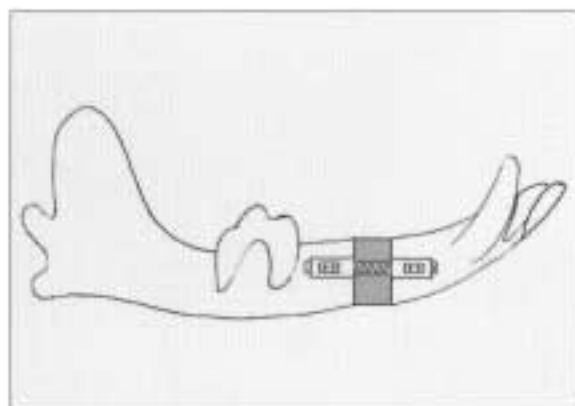


Fig. 1b. Schematic drawing of the device and the osteotomy site after completion of distraction.

에 보관하였다.

② 혈소판-풍부 혈장의 분리

채취된 혈액이 들어간 튜브와 이에 상응되는 균형튜브의 무게 균형을 맞추고, 3000rpm 속도로 3분간 원심분리를 시행하고, 상부 무명 혈장층과 연층을 함께 분리 채취하여, 새로운 튜브에 넣고, 5000rpm의 속도로 5분간 원심분리를 시행한 뒤, 연층을 포함하여 약 2ml 튜브에 남겨두고 상부 무명 혈장층을 버린 후 연층과 혈장층을 혼합하여 혈소판-풍부 혈장을 만들었다. 채취된 혈소판-풍부 혈장을 별도의 용기에 보관하고 글루콘산 칼슘용액(중외제약)과 트롬빈액(이면제약)을 1:1의 비율로 섞어서 3.9ml의 혼합액을 제조하였다. 채취된 2ml의 혈소판-풍부 혈장을 2.3ml 씩 3개의 주사기에 나누어 준비하고, 3.9ml의 글루콘산 칼슘-트롬빈 혼합액도 3개의 주사기에 각각 1.9ml 씩 나누어 준비하였다.

③ 혈소판-풍부 혈장의 투여

신연 마지막날 혈액을 채취한 동일한 성견에서 Ketamine(케타

라,유한양행, 10mg/kg) 근육주사와 Rumpen(Xylazine, Bayer Korea, 0.3mg/kg) 정맥주사 하여 전신마취한 후 준비된 혈소판-풍부 혈장과 혼합액을 하악골 좌측 신연 부위에 투여하였다. 이때 신연 중앙 부위는 상, 중, 하로 나누어 3부위에 투여하였으며 혈소판-풍부 혈장과 혼합액을 동일한 주사침을 이용하여 투여하였다. 우측 신연 부위는 혈소판-풍부 혈장을 투여하지 않고 대조 부위로 하였다.

3) 실험동물의 희생

신연 완료 후 1마리를 희생시켜 신연 부위의 변화를 비교할 수 있는 기준으로 삼았으며, 강하기 2, 4, 8주 후 각각 3마리씩 희생시켜 하악골을 적출하여 강하기 시기에 따른 골형성을 비교 관찰하였다 (Fig. 2, 3).

4) 방사선학적 검사 및 골밀도(bone mineral density) 검사

희생된 실견의 좌, 우측 하악골의 측면, 교합면 사진을 4kV and 3.5mA 조건하에 코닥필름(SO 343, Kodak Ltd, Rochester, USA.)을 사용하여 각각 촬영하였다. 골밀도 검사는 DEXA(dual



Fig. 2. Time Schedule in Control Sites.

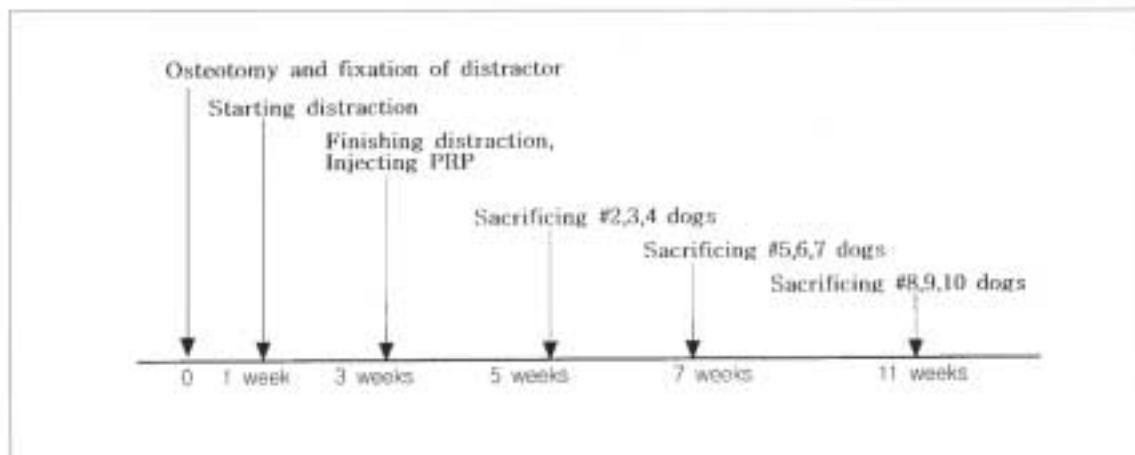


Fig. 3. Time Schedule in PRP Sites.

energy X-ray absorptiometry)을 이용한 골밀도 분석기(Lunar, expert #1095, USA.)로 15kVp, 1.0mA, 12mm/sec 속도로 측정하였다. 측정시 표본은 포르말린 용액에 5cm 길이로 넣어서 시행하고, 또한 측정 부위의 오차를 줄이기 위해 3회씩 반복 시행한 후 그 평균치로 결정하였다. 혈소판-풍부 혈장을 투여한 신연 중앙 부위가 다른 골밀도를 나타내는지 관찰하기 위하여 골신연 중앙부 5mm 범위에서 골밀도를 측정하였고 또한 신연부 전체(14mm)에서 골밀도를 측정하였다.

5) 조직학적 표본 제작 및 조직형태계측학적 분석(histomorphometric analysis).

Ketamine(케타라,유한양행, 10mg/kg) 근육주사와 Rumpen(Xylazine, Bayer Korea, 0.3mg/kg) 정맥주사 하여 전신마취한 상태에서 하악골의 1차 조직고정을 위해 양측 경동맥과 경정맥을 노출시킨 후 경정맥은 절단해서 열고, 경동맥에 주사침과 연동성 관류펌프를 이용하여 2.0% glutaraldehyde-2.5% paraformaldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)용액을 주입하였다.

하악골을 적출하여 신연 부위만 절단해 내었으며, 절단된 표본은 3일간 2.0% glutaraldehyde - 2.5% paraformaldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) 용액에 넣어 2차 고정하였다. 그리고 95%

nitric acid에서 2주간 탈회하였다.

탈회된 표본은 파라핀에 포매하고, 4µm 두께로 박절하여, 통법에 따라 hematoxylin-eosin과 Masson's-trichrome 염색을 하고 광학 현미경(Vanox-S research microscope, Olympus, Japan)을 이용하여 검경하였다. 조직형태계측학적 분석은 슬라이드영상에서 조직을 무작위로 5부위를 선택하여 40배의 광학 현미경으로 영상을 채득한 다음, 영상분석기(Image-Pro, Version 3.0, Cybernetics Media, USA.)를 사용하여 골소주 부위를 백분율로 산정한 후 5부위의 평균값을 계산하였다.

III. 실험 성적

1. 임상적 소견

임상적으로는 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 강화기 2주에 신연부의 힘, 설측에서 현저한 피질골 증가 소견을 보였으나 강화기 4, 8주에는 육안적 소견으로 차이를 분별하기 어려웠다 (Fig. 4a, 4b, Fig. 5a, 5b).

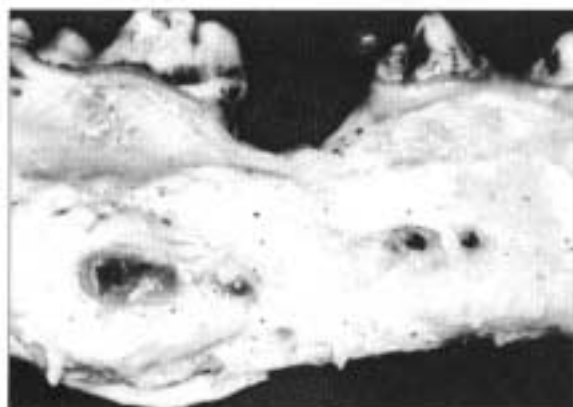


Fig. 4a. Buccal view of distracted callus of the control site at two weeks.

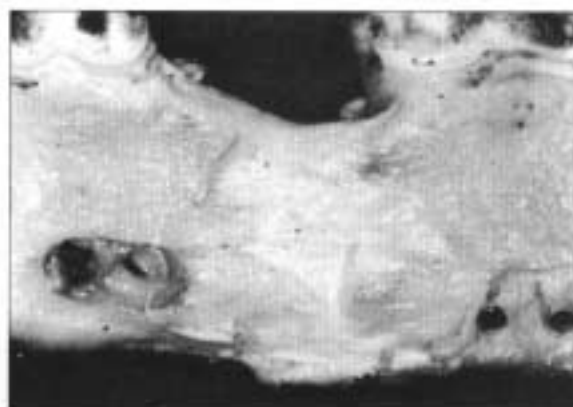


Fig. 4b. Buccal view of distracted callus of the PRP site at two weeks. There was more cortical bone formation.

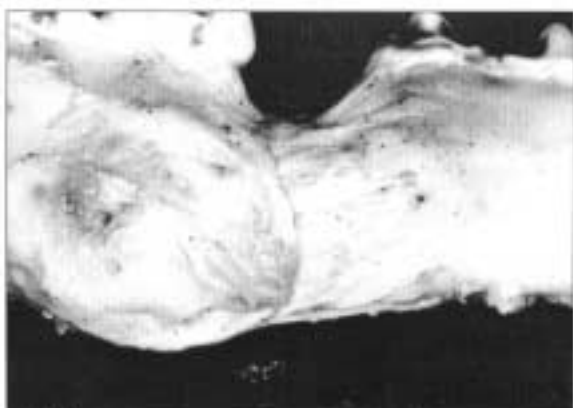


Fig. 5a. Lingual view of distracted callus of the control site at two weeks.



Fig. 5b. Lingual view of distracted callus of the PRP site at two weeks. There was more cortical bone formation.

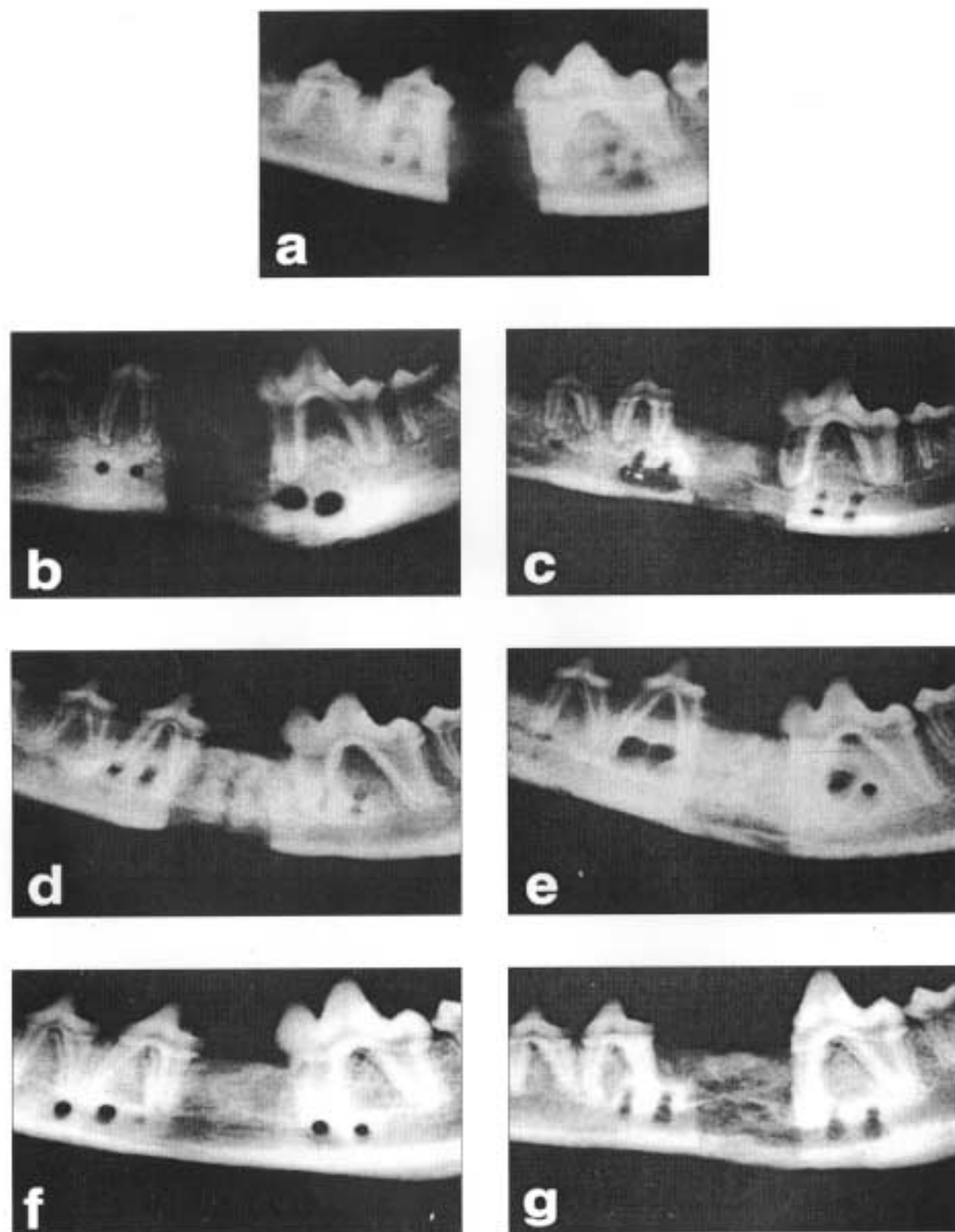


Fig. 6. Lateral radiological appearance of distracted callus treated by local injection of PRP, showing time course of effects of PRP on the distracted callus: a was radiography on the final day of distraction, b, d, f was control site at 2, 4, 8 weeks, c, e, g was PRP site at 2, 4, 8 weeks.

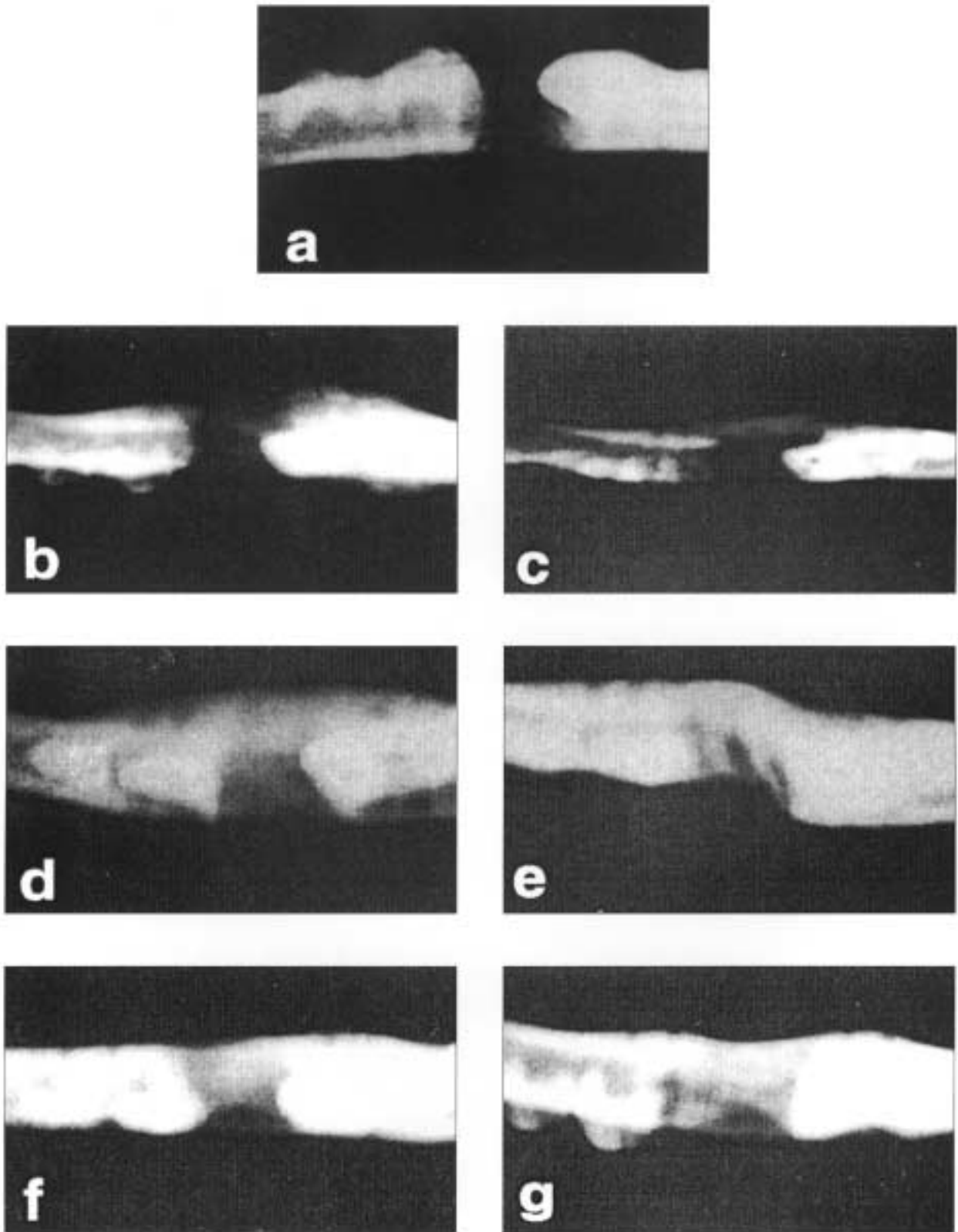


Fig. 7. Ocular radiological appearance of distracted callus treated by local injection of PRP, showing time course of effects of PRP on the distracted callus. a was radiography on the final day of distraction. b, d, f was control site at 2, 4, 8 weeks. c, e, g was PRP site at 2, 4, 8 weeks.

2. 방사선학적 소견

1) 측면사진

골신연 종료후 사진에서 미세한 방사선 불투과성이 양측 중앙부에서 나타나는 소견을 보였다 (Fig. 6a). 강화기 2주에는 대조 부위가 골신연 종료후 사진과 별 차이를 보이지 않았으나, 혈소판-풍부 혈장 투여 부위는 현저히 증가된 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 6b, 6c). 강화기 4주에는 대조 부위의 하연 부위에 방사선 투과성을 보였으나, 혈소판-풍부 혈장 투여 부위는 전체적으로 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 6d, 6e). 강화기 8주에는 대조 부위 및 혈소판-풍부 혈장 투여 부위 모두에서 전체적으로 방사선 불투과성을 보였으며, 또한 신연 부위의 상, 하연에 강화기 4주보다 더 뚜렷한 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 6f, 6g).

2) 교합면 사진

골신연 종료후 사진에서 방사선 투과성의 신연 부위를 협설측부, 근원심부에서 보였고, 미세한 방사선 불투과성이 양측 중앙부에서 나타나는 소견을 보였다 (Fig. 7a). 강화기 2주에는 대조 부위가 골신연 종료후 사진과 별 차이를 보이지 않았으나, 혈소판-풍부 혈장 투여 부위는 협설측부에서 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 7b, 7c). 강화기 4주에는 대조 부위가 신연 부위의 협설측부에 방사선 투과성을 보였으나, 혈소판-풍부 혈장 투여 부위는 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 7d, 7e). 강화기 8주에는 대조 부위 및 혈소판-풍부 혈장 부위 모두에서 전체적으로 방사선 불투과성을 보였으며, 또한 신연 부위의 협설측에 강화기 4주보다 더 뚜렷한 방사선 불투과성을 보였다 (Fig. 7f, 7g).

Table 1. Bone Mineral Density of distracted callus at 2, 4, 8 weeks(g/cm²). The range of interest(ROI) was 14mm in length of the distracted callus. Values are the mean±SD.

Consolidation Period	Control	PRP
2 weeks	0.289±0.017	0.643±0.157
4 weeks	0.558±0.005	0.691±0.144
8 weeks	0.932±0.048	0.999±0.053

Table 2. Bone Mineral Density of distracted callus at 2, 4, 8 weeks(g/cm²). The range of interest(ROI) was 5mm in length of the distracted callus. Values are the mean±SD.

Consolidation Period	Control	PRP
2 weeks	0.231±0.046	0.647±0.176
4 weeks	0.576±0.068	0.694±0.174
8 weeks	0.585±0.051	0.568±0.038

3. 골밀도(bone mineral density)

신연부 전체 범위에서(14mm) 골밀도를 측정한 결과 강화기 2주에 혈소판-풍부 혈장 투여 부위(0.643g/cm²)가 대조 부위(0.289g/cm²)에 비해 2배 이상의 높은 차이를 보였고, 4주에는 차이가 감소하다가, 8주에는 차이가 없었다 (Table 1).

골신연 중앙 범위(5mm)에서 골밀도를 측정한 결과 강화기 2주에 혈소판-풍부 혈장 투여 부위(0.647g/cm²)가 대조 부위(0.231g/cm²)에 비해 높은 차이를 보였으나, 4주후에서는 차이가 감소하다가, 8주후에서는 차이가 없었다 (Table 2).

4. 조직학적 소견

신연 완료후 소견으로, 교원섬유들이 장력방향에 평행하게 배열되고 그 사이 사이에 수 많은 섬유모세포 및 조골세포가 또한 평행하게 위치해 있는 소견을 보였다 (Fig. 8a, Fig. 9a, 9b).

강화기 2주 소견으로 대조 부위와 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 모두 신생 골소주 형성을 보였다(Fig. 8b, Fig. 10a). 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 더 치밀한 양상의 막성골화에 의한 골소주 형성이 상부(치조골부) 및 하연에서 일어나는 소견을 보였다 (Fig. 8c, Fig. 10b).

강화기 4주 소견으로, 대조 부위에서는 막성골화로 인한 골소주형성을 보였으나(Fig. 8d, Fig. 11a), 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에 비해서 현저히 골소주 부위가 적고, 덜 치밀한 소견을 보였다 (Fig. 8e, Fig. 11b).

강화기 8주 소견으로, 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 대조 부위보다 상, 하연부에 층판구조의 치밀골 형태의 골소주가 밀집된 성숙골 (phase II bone) 소견을 보였다 (Fig. 8f, 8g, Fig. 12a, 12b).

5. 조직형태계측학적 분석

혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 2, 4, 8주에서 모두 20% 이상 골소주 부위의 증가 소견을 보였다 (Table 3).

Table 3. Area of bony trabeculae on the distracted callus at 2, 4, 8 weeks(%). Values are the mean±SD.

Consolidation Period	Control	PRP
2 weeks	20.0±5.3	42.7±7.9
4 weeks	45.7±8.2	67.6±23.1
8 weeks	62.1±3.4	88.1±9.4

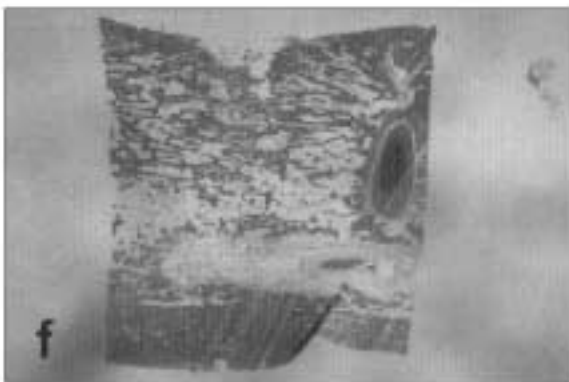
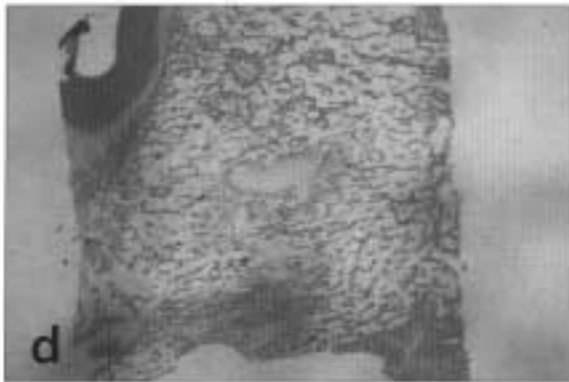
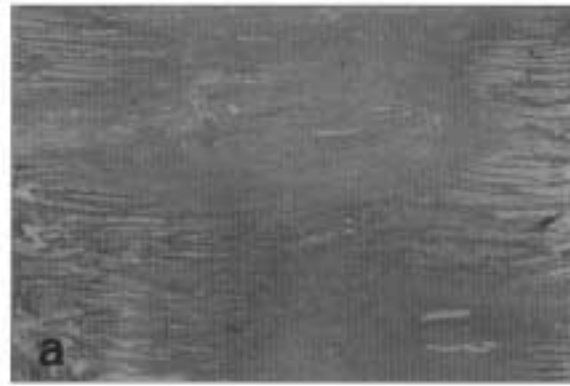


Fig. 8. Time course of effects of PFP on micrograph of distracted callus(M-T, x 10). a was micrograph on the final day of distraction, b, d, f were the control site, c, e, g were the PFP site at 2, 4, 8 weeks. There was more bony trabeculae on the PFP site, e, g) than the control site, d, f).

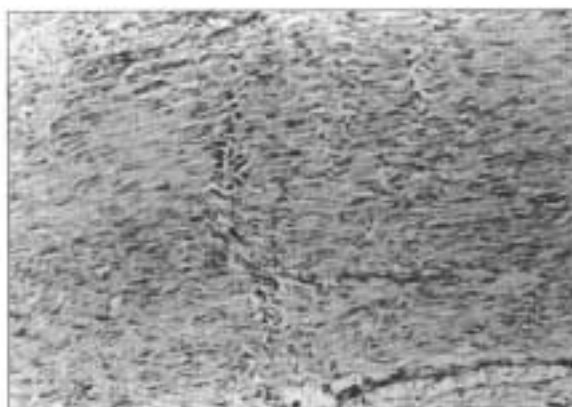


Fig. 9a. Micrograph after the distraction period was completed. Collagen fiber and fibroblast were located horizontally parallel along the tension vector. M-T, $\times 200$

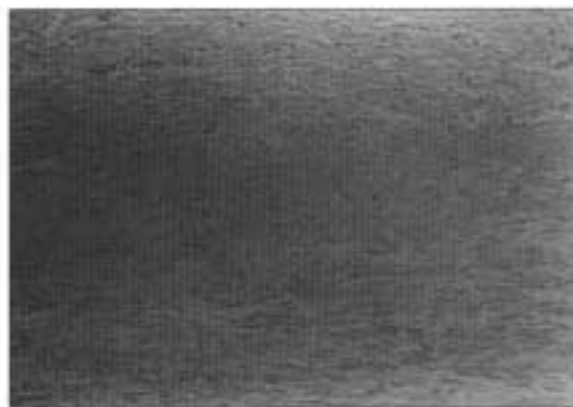


Fig. 9b. Micrograph after the distraction period was completed. H-E, $\times 100$



Fig. 10a. Micrograph of the the control site at 2 weeks. M-T, $\times 40$

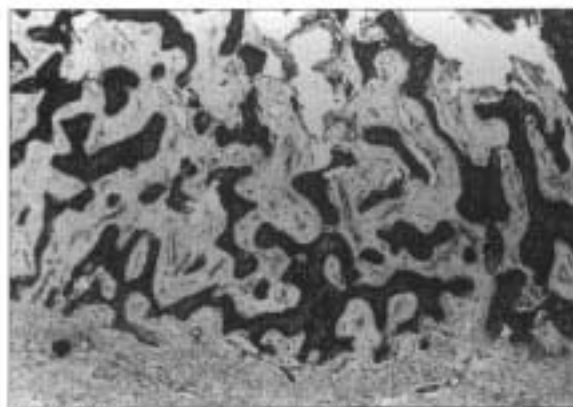


Fig. 10b. Micrograph of the PRP site at 2 weeks. There was more bony trabeculae than the control. M-T, $\times 40$

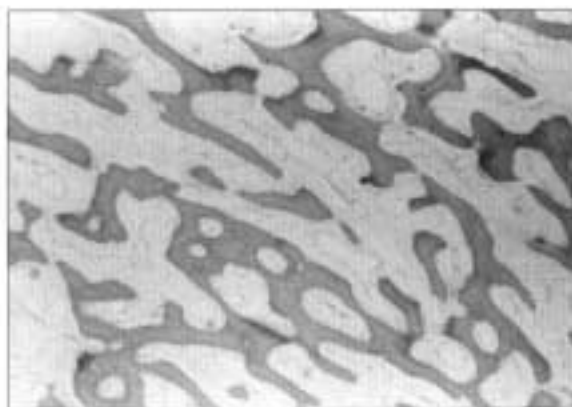


Fig. 11a. Micrograph of the control site at 4 weeks. H-E, $\times 40$

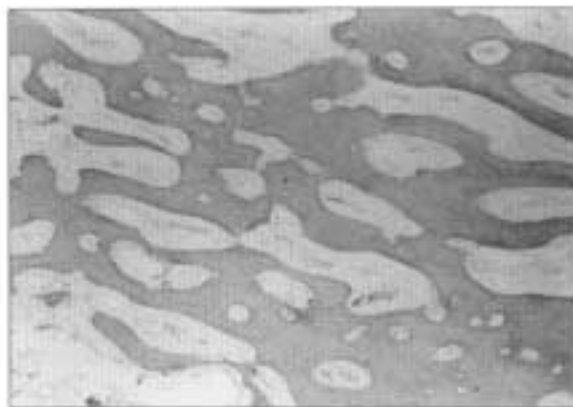


Fig. 11ba. Micrograph of the PRP site at 4 weeks. There was more bony trabeculae than the control. H-E, $\times 40$

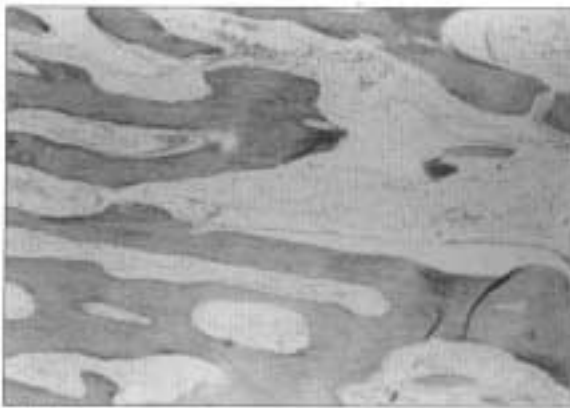


Fig. 12a. Micrograph of the control site at 8 weeks. H.E, X. 40

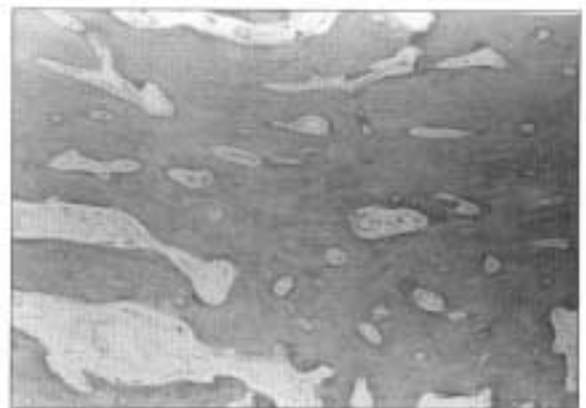


Fig. 12b. Micrograph of the PRP site at 8 weeks. There was more bony trabeculae than the control. H.E, X40

IV. 총괄 및 고찰

혈소판-풍부 혈장은 중요한 성장인자인 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 전환성장인자-베타(TGF- β , TGF- β) 및 인슐린성 성장인자(IGF-I)를 함유하고 있기 때문에 골결손 부위에 투여할 경우 골형성을 촉진시킬 수 있는 것으로 알려져 있다²³. 분자량이 약 30kd인 혈소판 유래 성장인자는²⁴ 혈소판 내 alpha granule 혹은 거대세포(macrophage)내에 존재하던 것이 분비되며, 간엽세포 분열이나 조골세포 증식 및 분화, 혹은 신생혈관 형성(neovascularization)시 작용하며,²⁵ 분자량이 약 25kd인 전환성장인자-베타는²⁶ 조골세포 발육의 초기 단계에서 특히 작용한다고 알려져 있으며,²⁷ 분자량이 7.7kd인 인슐린성 성장인자는 조골세포 계열의 세포들을 분열하게 유도하며, 또한 분화된 조골세포로부터 골형성을 자극하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다²⁸. 특히 혈소판-풍부 혈장은 자가체혈에서 채취할 수 있어서 독성이 없고, 면역거부 반응의 위험이 없는 장점을 가진다. 본 실험에서도 혈소판-풍부 혈장이 가지는 이러한 장점을 이용하고자 하였다. 본 실험결과에 따르면 혈소판-풍부 혈장은 골신연부에서도 골형성을 촉진시키는 것으로 관찰되었다. 이것은 Marx 등²⁹이 보고한 골결손 부위에서 혈소판-풍부 혈장이 골형성을 촉진한다는 결과와 유사한 결과이다.

골신연 부위에서 성장인자를 투여하여 골형성을 촉진시켜 강화를 단축시키고자 하는 시도는 여러 방법으로 시행되어왔다. Rauch 등³⁰은 가도의 잠골을 신연시키기 위해 골절단술 후 전환성장인자 베타1을 투여한 실험에서 골형성 효과가 없었다고 보고한 반면에, Yamane 등³¹은 가도의 경골을 신연시켜서, ED-71(2-hydroxypropoxy)-1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3)를 일주일에 두번씩 피하로 투여한 결과, 골밀도 및 가골의 부피 증가와, 더 많은 피질골이 형성됨을 보고하였다. Raschke 등³²은 가도의 경골을 신연시키면서 성장호르몬을 전신적으로 투여한 결과 강화 단계의 골형성을 가속시켜 하중을 견디는 물리적 견고성을 가지는 신생골의 형성을 보고하였다. Okazaki 등은³³ rFGF-2를, Nakamura 등은³⁴ FGFs를 골신연 부위에 투여한 실험에서 성장인자가 골형성 효과에 미치는 영향을 실험하여, 성장인자가 골형

성 자극 효과를 가지고 있음을 보고하였다. 이들의 실험에서는 성장인자를 전신적으로 투여하거나 용액상태로 투여했기 때문에 신연 부위에 미치는 성장인자의 작용시간이 불분명하였다. 이들은 또한 한가지 성장인자만 사용하였다. 반면에, 혈소판-풍부 혈장을 골신연 부위에 겔(gel)상태로 직접 투여한 본 실험에서는 겔이 생체내에서 서서히 흡수되므로, 겔이 포함하고 있는 성장인자를 용액으로 투여한 방법보다 더 효과적으로 작용했다고 사료되며, 또한 혈소판-풍부 혈장은 여러 가지 성장인자를 포함하므로 성장인자의 복합적인 투여가 가능하였다.

본 실험 결과에서 강화기 2주 즉, 강화기 초기에서 골형성 촉진 효과가 뚜렷이 관찰되었다. 골밀도 검사에서 강화기 2주에 혈소판-풍부 혈장을 투여한 부위가 대조 부위보다 2배 이상 차이를 보였고, 강화기 4, 8주를 지나면서 차이가 감소하였다. 방사선 검사에서도 강화기 2주에 혈소판-풍부 혈장을 투여한 부위에서 방사선 불투과성이 현저히 증가된 소견을 보였으며, 4주, 8주에 다소 증가된 소견을 보였다. Okazaki 등의 가도에서 골신연부에 rFGF-2를 투여한 실험에서도 강화기 초기에 골밀도가 증가하였다고 보고하였고, Tubota 등이 자가골 세포배양 후 골신연부에 주입한 실험에서도 강화기 4주보다도 2주에 골밀도가 크게 증가했다고 보고 하였다. 이것은 강화기 초기에 투여한 혈소판-풍부 혈장이 혈소판의 파괴에 의해 PDGF, TGF-베타, IGF가 방출됨으로써 신생혈관 형성과 조골세포의 증식 및 분화가 가속화 되어 골형성을 촉진한 결과로 사료된다. 강화기 4주, 8주를 지나면서 차이가 감소한 것은 대조 부위보다 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 강화기 2주 후부터 초기에 골개조 과정에 들어간 것으로 사료된다. 혈소판-풍부 혈장 투여후 초기에 특히 골형성 효과가 촉진된 또 다른 이유는 혈소판의 짧은 수명과 연관이 있는 것으로 사료된다. 골수는 일반적으로 체중 1kg당 6×10^9 거핵구(megakaryocyte)를 가지고 있으며, 각각의 거핵구는 수천개의 혈소판을 분비한다³⁵. 이렇게 만들어진 혈소판은 반감기가 5일 정도며, 9~10일후 소멸하는 수명밖에는 가지지 못한다³⁶. 이러한 사실에 근거할 때 혈소판-풍부 혈장의 효과를 지속적으로 내기 위해서는 강화 기간동안 혈소판-풍부 혈장의 반복적 투여 방법이 고려될 수 있다.

본 실험의 조직형태학적 분석에서 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 골소주부 형성에서 2, 4, 8주에 20% 이상 차이를 보였다. Stewart 등¹⁰⁾은 가도하악골의 신연 골형성술에 KGF를 투여한 결과 조직형태학적 분석에서 현저하게 골소주 부위가 증가했다고 보고 하였고, Marx 등은¹¹⁾ 하악골 재건을 위한 골 이식 환자의 술후 조직검사서 혈소판-풍부 혈장 투여군의 평균 골소주 부위가 대조군의 그것보다 약 20% 우수한 결과를 보여 본 실험의 분석결과와 유사한 긍정적 소견을 보고하였다. 신연 부위에서의 혈소판이 성장인자로서 영향을 직접적으로 미칠 수 있는 기간은 약 5~10일 밖에 안되는데도 불구하고, 본 실험의 골밀도 검사에서 강화기 2주후의 값이 떨어지지 않고 유지되며, 조직형태학적 분석결과 2, 4, 8주에 대조 부위보다 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 계속 20% 이상 골소주부 형성이 증가되었다. Marx 등은¹²⁾ 화학주성으로 이동된 대식세포들이 활성화되며 성장인자의 일차적인 자원인 혈소판을 대체함으로써 3일이 지난 후부터 이차적인 자원으로 이용될 수 있다고 보고하였는데, 본 실험에서도 같은 기간에 의해 혈소판-풍부 혈장 투여 부위에서 골소주 형성이 관찰한 전 기간에 걸쳐 증가된 것으로 사료된다. 또한 강화기 2주에 근원심의 양측 골절단면의 해면골과 골막에서의 신생혈관화에 따라 골형성이 혈소판-풍부 혈장의 여러 성장인자에 의해 가속화 된후, 골소주 형성이 계속 증가함으로써, 밀도가 높아진 미성숙골(phase I bone)이 성숙골(phase II bone)로 골개조 되는 과정에서도 계속 그 골밀도가 유지되기 때문으로 사료된다.

본 실험의 신연 가골(Distracted Callus)에 의한 골형성술은 골의 골절이나 절단후 생기는 가골을 신전시켜 신생골 형성을 유도하는 방법으로 대퇴골에 반복적인 신장력을 가하여 골 길이의 증가를 시도한 Coxliva에 의해 처음 정의되었다¹³⁾. 당시의 신연 골형성술은 부작용이 많아 한때 발전이 중단되었다. 그후 체계적인 연구가 Ilizarov에 의해 시행되어, Ilizarov효과로 알려진 두가지 신연 골형성술의 생물학적 원리, 즉 조직의 발생과 성장에 관여되는 tension-stress효과와 골과 관절의 모양에 영향을 주는 혈액 공급과 기계적 하중을 알아내고, 이를 임상에서 성공적으로 적용할 수 있게 하였다. 두개악안면 영역에서는 1973년에 Snyder가¹⁴⁾ 실험 동물의 하악골에 신연 골형성술을 적용한 연구를 처음 보고한 이래, 1977년 Michielli & Mioni가¹⁵⁾ 실험 동물의 하악골에 양측성 신연 골형성술을 보고하였고, 1990년 Karp는¹⁶⁾ 신연 가골 부를 조직형태학적으로 섬유 조직부(zone of fibrous tissue), 확장 골형성부(zone of extending bone formation), 골 개조부(zone of bone remodelling), 성숙골부(zone of mature bone), 4부위로 나누어 보고 하였는데, 지금까지 신연 골형성술의 생물학적 기초가 되고 있다.

Okazaki 등, Tubota 등은, 본 실험과정에서와 같이 Karp가 분류한 섬유조직 부위에 골형성이 가장 늦게 된다는 사실을 고려하여 골신연 완료후 신연부위의 중앙부에 성장인자 또는 세포를 투여하였고, Stewart 등 또는 Rausch 등은 골신연을 위한 골절단 술후 성장인자를 골절단 부위에 투여하였다. Stewart 등 또는 Rausch 등의 골밀도 검사결과에서는 골형성 촉진효과가 없었다

고 보고한 반면에 Okazaki 등, Tubota 등과 실험과정이 유사한 본 실험결과에서는 골형성 촉진효과가 초기에 크게 나타났다. Farhadi 등¹⁷⁾은 골신연시 발생하는 기계적인 자극에 의해 전환 성장인자 베타, 섬유모세포 성장인자, 인슐린성 성장인자 등의 발현을 유도한다고 보고하였는데, Stewart 등 또는 Rausch 등의 실험에서는 골신연 시작전에 성장인자를 투여해 신연 과정에서 유도되는 성장인자의 발현이 억제됨으로써 골형성 효과가 본 실험과 비교할 때 그만큼 반감된 것이라고 사료된다.

과거에는 사지에서와 같이 골신연에 의한 가골에 대한 평가를 방사선 사진 및 임상적으로 평가하였으나¹⁸⁾, 최근에는 강화기 동안에 형성되는 가골을 평가하여 골신연기의 조기제거 후 발생하는 합병증을 예방하기 위해 dual-energy X-ray absorptometry (DEXA)¹⁹⁾나 computed tomography²⁰⁾, 초음파²¹⁾등을 사용하고 있다. 이중 DEXA는 2개의 서로 다른 에너지를 가진 X-ray beam을 사용하여 그 차이에서 발생하는 값을 계산하여 밀도를 측정하는 기구이다²²⁾. 본 예비실험에서는 본실험에 사용 될 골밀도 측정기의 오차를 알기 위하여 골밀도를 3회 반복 측정한 후 오차의 범위를 계산하였다(오차<0.01g). 본 실험에서도 3회 반복 측정 후 그 평균으로 신연 가골을 평가하였다. Hamanishi 등은²³⁾ 가도의 경골에서 골연장 후 형성된 가골을 DEXA를 이용해 평가한 결과 %BMD(bone mineral density)가 최소한 70%는 넘어야 골신연기를 안전하게 제거할 수 있다고 보고하였다. 본 실험의 골밀도 검사에서 강화기 2주에 혈소판-풍부 혈장 투여 부위의 골밀도 값이 대조 부위의 값에 비해 2배 이상의 차이를 보여, 혈소판-풍부 혈장의 골형성 촉진효과가 강화기 단계의 신연 가골에 안전성을 부여해 줄 수 있다고 사료된다. 본 실험의 골밀도 검사에서 신연 중앙 부위와 신연 전체 부위를 따로 평가하였으나 골밀도 값의 차이가 없는 것으로 나타났는데, 그 이유는 결상대로 투여된 혈소판-풍부 혈장이 신연 중앙부에만 국한되지 않고 인접 신연 부위로 이동하였거나, 또는 신연 중앙부에 투여된 혈소판-풍부 혈장의 골형성 촉진효과가 근, 원심 골절단부까지 파급된 것이라고 사료된다. 실험 과정은 국소적으로 혈소판-풍부 혈장을 신연 부위의 중앙에 작용하는데 따른 어려움을 제외하고는 대조 부위의 실험과정과 동일하였으며, 신연 부위의 감염이나 비유합 등의 특이한 부작용을 초래하지는 않았다. 본 실험의 임상적 결과에서 강화기 2주때 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위에 비해 혈,설측으로 현저한 괴골 형성 소견을 보였으나 4, 8주에서는 육안적 소견으로 차이를 분별하기 어려웠다. 아마도 혈소판-풍부 혈장의 조기 골형성 촉진효과에 의한 것으로 사료된다.

지금까지 보고된 골형성 자극에 대한 다른 방법보다 혈소판-풍부 혈장을 이용한 방법은 자가 체혈에서 채취할 수 있어 독성이 없고, 면역거부반응의 위험이 없는 장점이 있어서 신연 골형성술 뿐만 아니라 다른 재건 술식에서도 골형성 촉진을 위해 사용 가능성을 제시한다. 골재건에 사용되는 골대체 물질이나 자가골과 혈소판-풍부 혈장을 혼합하여 사용할 수 있다고 사료되며, 향후 이들에 관한 연구와 사람에서의 신연골 형성술시 혈소판-풍부 혈장의 골형성 촉진 효과에 관한 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

성견하악골의 신연 부위에서 다양한 자가성장요인(autologous growth factor)을 가진 혈소판-풍부 혈장을 국소적으로 투여하여 혈소판-풍부 혈장이 골형성에 어떤 영향을 미치는지 알아 보고자 임상적 및 방사선학적 검사, 골밀도 검사, 조직학적 검사 그리고 조직형태계측학적 분석으로 혈소판-풍부 혈장을 투여한 부위와 대조 부위를 비교하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 임상 검사에서는 혈소판-풍부 혈장 투여부위가 대조부위보다 강화기 2주에 신연부의 혈, 설측에서 현저한 피질골 증가 소견을 보였으나 강화기 4, 8주에는 육안적 소견으로 차이를 분별하기 어려웠다
2. 방사선학적 검사에서는 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 강화기 2주에 방사선 불투과성이 현저히 증가된 소견을 보였으며, 4주 및 8주에도 다소 증가된 소견을 보였다.
3. 골밀도 검사에서는 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 강화기 2주에 2배 이상 높았으며, 4주에는 점차 차이가 감소하다가, 8주에는 차이가 없었다.
4. 조직형태계측학적 분석에서는 혈소판-풍부 혈장 투여 부위가 대조 부위보다 강화기 2, 4, 8주에 모두 20% 이상 골소주 부위의 증가를 보였다.

결론적으로, 성견하악골의 신연 후 혈소판-풍부 혈장을 투여한 부위에서 특히 강화기 초기에 골형성이 촉진되었으며, 관찰한 전 기간에서 골소주 형성이 증가된 소견을 보였다. 그러므로 사람에서도 신연 부위에 혈소판-풍부 혈장을 부여함으로써 신연 가골의 강화기를 단축시킬 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

1. Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Joint Dis Orthop Inst* 1988;48:1.
2. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 1989;249-81.
3. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 1989;265-84.
4. Lynch SE, Geneco BJ, Marx RE. Tissue engineering. *Quintessence* 1999;71-82.
5. Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM. Mandibular distraction osteogenesis: A historic perspective and future directions. *Am J of Orthod Dentofac Orthop* Vol 115, No 4 1999;448-60.
6. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura T, et al. Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 1999;64:542-6.
7. Nakamura K, Kurokawa T, Kato T, et al. Local application of basic fibroblast growth factor into the bone increases bone mass at the applied site in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 1996;115:344-6.
8. Nakamura K, Kawaguchi T, Aoyama I, et al. Stimulation of bone formation by intrasosseous application of recombinant basic fibroblast growth factor in normal and ovariectomized rabbits. *J Orthop Res* 1997;15:307-13.
9. Nakamura K, Kurokawa T, Kawaguchi T, et al. Stimulation of endosteal bone formation by intrasosseous local application of basic fibroblast growth factor in rabbits. *Revue du Rhumatisme (English ed)* 1997;64:101-5.

7. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone Vol. 24, No.2 February 1999*;81-8.
8. Frerenson M, Ibrahim K, Boles M, Bote H, Ganey. Distraction osteogenesis. *Clin Orthop Rel Res* 1994;301:19-30.
9. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, et al. Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop Rel Res* 1993;293:55-60.
10. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *Bone & Joint Surg*. 1999;125-9.
11. Bastiani GD, Aldeghri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by callus distraction(callotaxis). *J Pediatr Orthop* 1987;7:129-34.
12. Juenger TH, Klingmueller V, Howaldt HP. Application of ultrasound in callus distraction of the hypoplastic mandible: an additional method for the follow-up. *J of Cranio-maxillofac Surg* 1999;27:160-7.
13. Nielsen HM, Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1991;62:244-7.
14. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, et al. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;15:203-8.
15. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, et al. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Jt Surg(Am)* 1994;76:827-38.
16. Gerhart TN, Kirker Head CA, Kriz MJ, et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 1993;293:317-26.
17. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.
18. Greenlagh D. G. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996;41:159-67.
19. Antonaides HN. Human platelet derived growth factor(PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of there reduced sub-units. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7314-7.
20. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 1986;46:155-69.
21. Antonaides HN, Williams LT. Human platelet derived growth factor: Structure and functions. *Fed Proc* 1983;42:2630-4.
22. Roberts AB, Sporn MB. Physiologic actions and clinical applications of transforming growth factor beta(TGF-beta). *Growth Factors* 1993;8:1-9.
23. Miyazano K, Ten-Dijke P, Ichiyo H, Heldin CH. Receptors for transforming growth factor beta. *Adv Immunol* 1994;55:181-220.
24. Beck LS, DeGuzman L, Lee WP. One systemic administration of transforming growth factor-beta reverses age or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* 1993;93:2841-49.
25. Canalis E, Centrella M, Busch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989;83:60-5.
26. Rauch F, Lauzier D, Travers R, Groleux P, Hamdy R. Effects of locally applied transforming growth factor-beta1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone*, 2000 Jun, 26:6, 619-24.
27. Yamane K, Okano T, et al. Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone* 1999;24:3:187-93.
28. Harker LA, Finch CA: Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 1969;48:963.
29. Aster RH, Jandl JH: Platelet sequestration in man. I. Methods. *J Clin Invest* 1964;43:843.
30. Recommended methods for radioisotope platelet survival studies. Panel on Diagnostic Application of Radioisotopes in Hematology, International Committee for Standardization in Hematology. *Blood* 1977;50:1137.
31. Gualiani DC et al. A rapid method for estimating platelet survival time. *J Nucl Med* 1989;30:1550.
32. Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthop Rel Res* 1994;301:31-7.
33. Stewart KJ, Weyand B, van' t Hof RJ, et al. A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular

- distraction osteogenesis in rabbits. *British J of Plast Surg* 1999; 52: 543-50.
34. Codivilla A. On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles, and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 1905;2:353.
35. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ. Mandibular lengthening by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1973;51:506.
36. Michieli S, Miotto B. Lengthening of mandibular body by gradual surgical-orthodontic distraction. *J Oral surg* 1977;35:187.
37. Karp N, Thome CH, McCarthy JG, Sisson GA. Bone lengthening in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg* 1990;24:231.
38. Faradiéh RD, Dickenson R, et al. The role of transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in distraction osteogenesis of the mandible. *J Craniofac Surg* 1999; 10:1,80-6.
39. Panjaba MM, Walter SD, Karuda M, White AA, Lawson JP. Correlations of radiographic analysis of healing fractures with strength: a statistical analysis of experimental osteotomies. *J Orthop Res* 1985;3:212-8.
40. Panjaba MM, Lindsey RW, Walter SD, White AA. The clinician's ability to evaluate the strength of healing fractures from plain radiographs. *J Orthop Trauma* 1989;3:29-32.
41. Irtanov YM. Scanning electron microscopy of distraction regenerate. *Genij Ortopedic* 1996;2:5-131.
42. Aronson J. Experimental assessment of bone regenerate quality during distraction osteogenesis. In: Brighton CT, Friedlaender G, Lane JM(eds). *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994:441.
43. Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, Tanaka S. Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin Orthop Rel Res* 312:247-52.
44. Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, Tanaka S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. *Clin Orthop Rel Res* 1995;303:250-5.
45. Tjernstrom B, Thoumas KA, Pech P. Bone remodeling after leg lengthening: evaluation with plain radiographs, CT, MRI scans. *J Ped Orthop* 1992;12:751-5.
46. Smith SW, Sachdeva BCL, Cope JB. Evaluation of the consolidation period during osteodistraction using computed tomography. *Am J Orthod Dentofac Orthop Sep* 1999;254-63.
47. Wahner HW, Fogelman I. The evaluation of osteoporosis: Dual energy x-ray absorptiometry in clinical practice. *Martin Dunitz* 1994;25-6.
48. Hamanishi C, Yosii T, Tanaka S. Evaluation of the lengthened callus using DEXA. *Central Japan J Orthop Trauma* 1994;37:211.