

Tetracycline 처리된 조직유도재생술용 차폐막의 약제유리양상 및 구조적 변화

이성미 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환을 치료하는 궁극적인 목적은 염증 과정을 해소시키고 질병에 이환된 치근면에 새로운 백악질의 형성과 교원섬유의 배열, 정상적인 접합상피의 형성과 치조골의 재생을 포함한다. 치석제거술 및 치근면활택술, 치은 연하소파술 및 치주판막술을 포함한 통상적인 치주치료시 치주조직의 완전한 재생보다는 긴 접합상피에 의해 치유된다¹⁾. 그래서 치주수술 후 치유되는 동안 다양한 세포성분중 신부착에 기여하는 세포의 선택적인 증식을 유도하는 조직유도재생술이 차폐막을 이용하여 행해지고 있다^{2~7)}.

조직유도재생술시 비흡수성막과 흡수성막이 이용되고 있는데, 비흡수성막은 생체내에서 분해가 되지 않으므로 4-6주후에 제거해야 하는 단점이 있다. 이것은 환자나 술자에게 부담이 되고 치유초기에 재생된 조직의 성숙을 방해할 수 있으며, 막이 구강환경에 노출되었을 때 감염이나 오염될 가능성이 있다. 따라서 흡수성막에 대한 관심이 증가되고 있고, 흡수성막을 이용한 생체 실험과 제거된 막의 세균 오염상에 대해서도 연구가 활발히 이루어지고 있다.

Brex 등⁸⁾은 이미 치면에 존재하고 있던 세균에 의한 세균괴의 증가가 세균의 2차적 군집에 대한 기초를 제공하기 때문에 조기세균의 부착이 막의 세균오염에 더 중요함을 강조하였다. Nowzari 등⁹⁾은 막 표면에 부착된 세균이 부착증진에 영향을 준다고 하였고, Temporo와 Nalbandian¹⁰⁾도 막의 유지기간동안 세균의 오염이 결합조직 재생에 악영향을 준다는데 동의하였다. Simion 등^{11~13)}은 세균이 e-PTFE막의 내면까지 침투하는데 3-4주의 기간이 필요하므로 구강내에 노출된 지 4주 이내에 막을 제거해야 한다고 하였다. 조직유도재생술은 술후 치유기간 동안 연조직 퇴축으로 인해 노출된 막의 오염과 감염의 위험성을 줄이기 위해 항생제의 투여가 필요하고, 부가적인 항생제의 투여나 구강세정이 세균의 수를 줄이고 결과적으로 부착수준을 증가시킬 수 있다는 보고들이 있었다^{13~18)}.

또한 Freitas 등²⁷⁾은 차폐막에 일단 부착된 세균이 glycocalyx biofilm에 의해 보호되면 항균제에 저항성을 나타낸다고 하였다. 따라서 초기에 세균부착을 막을 수 있도록 차폐막에 약제처리함으로써 집락화를 감소시키는 방법이 효과적일 수 있다. 이러한 시도로서 Markman 등²⁸⁾은 400 μ g/ml의 tetracycline을

포함한 cellulose membrane 절편을 쥐의 복강에 주입하여 12일 후 20.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 유리됨을 관찰하였고, Holen등²⁹⁾은 양이온 표면활성제인 tridodecylmethylammonium chloride를 이용하여 e-PTFE 차폐막으로의 tetracycline 흡착이 개선되었다고 하였다.

이에 본 연구는 조직유도재생술을 위해 사용되는 차폐막중 비흡수성막으로 두종의 PTFE막과 두종의 흡수성막에 tetracycline 처리한 후 시간에 따른 약제 유리 양상이 차폐막간에 차이가 있는지 비교하고, 막의 구조적 변화를 함께 알아보고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

조직유도재생술용 차폐막중 비흡수성막으로 두종의 PTFE막(Gore tex[®], W.L. Gore & Associates Inc., USA ; Tefgen[®], American Custom Medical, USA)을 이용하고, 흡수성막으로 collagen막(Biomend[®], Collatec Co., USA)과 polyglycolide & polylactide copolymer(Resolut[®], W.L. Gore & Associates Inc., USA)을 이용하였다(표 1).

2. 연구 방법

(1) 차폐막의 처리

차폐막은 직경이 4mm가 되게 원형으로 만들어 사용하였다. 막은 표면활성제인 5% tridodecylmethylammonium chloride(Aldrich Chem Co., USA) 에탄올액에 침수시킨 후 공기로 건조시키고, 100mg/ml tetracycline 용액(유한사이나미드, pH 8)에 1분간 침수후 37°C에서 건조하여 준비하였다²⁹⁾.

(2) 용액내 약제유리양상

시험관에 6개의 막을 위치시키고 막 1개당 0.2ml의 인산완충용액(pH 7.4)을 매일 교환하였으며, 각 추출액은 UV spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu Co., Japan)로 276nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline용액의 흡광도를 측정한 후 직선회귀분석하여 표준곡선을 구하였으며 이로부터 유리된 tetracycline 농도를 산출하였다.

(3) 약제유리후 차폐막의 항균활성도

처리된 막은 매일 0.2ml의 인산완충용액내에서 약제를 유리시킨 후 1일, 1주, 2주, 4주째 제거하여 사용시까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 20ml의 Nutrient broth(Difco laboratory, USA)에 Bacillus cereus를(KCTC 1012 strain) 37°C에서 18시간동안 호기성 배양하여 UV spectrophotometer 550nm에서 균의 혼탁도가 0.15가 되도록 준비하고, 1.7% agar가 첨가된 Mueller-Hinton broth(Difco

표 1 The membranes used in this experiment

Group	General Material	Commercial Name	Physical characteristics
I	e-PTFE	Gore-Tex	flexible, nonabsorbable, porous
II	PTFE	Tefgen	flexible, nonabsorbable, non-porous
III	collagen	Biomend	flexible, biodegradable
IV	polyglycolide & polylactide copolymer	Resolut	stiff, biodegradable

laboratory, USA)를 멸균하여 50°C로 식혔다. Broth agar 100ml당 2ml의 *Bacillus cereus* 배양액을 섞어 9cm직경의 평판에 10ml씩 부어 굳힌 후 막을 위치시키고, 37°C에서 12시간 호기성 배양하였다. 배양 후 Vernier calipers를 이용하여 세균성장 억제대의 직경을 측정하였다.

(4) 주사전자현미경 관찰

비흡수성막의 표면활성제 처리 후 표면구조의 변화를 관찰하고 흡수성막의 인산완충용액내 침수시 시간에 따른 변화유무를 알아보기 위해 용액에 침수시킨지 1-4주후 막을 제거하여 관찰하였다. 시편의 처리는 막을 제거하여 1차 고정액(2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 두시간 담근 후 carcodylate buffer로 세척하고, osmium tetroxide로 두시간 2차 고정 후 세척하여 30%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100% 에탄올 용액으로 탈수하였다. Isoamyl acetate와 100%

알코올을 1:1, 3:1로 섞은 용액에 위치시킨 후, isoamyl acetate 원액에 24시간 침수하여 임계점(critical point)까지 건조시켰다. 건조시킨 막에 gold를 20-30nm로 피복시켜 주사전자현미경(JSM-5400, JEOL., Japan)으로 관찰하였다.

III. 연구성적

1. Tetracycline의 용액내 유리양상

Tetracycline 농도는 1, 2일째에 흡수성막에서 더 높게 나타났으며, 3일째부터 Resolut®의 농도는 급격히 감소하였고 Biomend®는 4일째부터 비흡수성막에 비해 농도가 낮게 나타났다. 두종의 PTFE막과 Resolut®는 5일째까지, Biomend®는 4일째까지 4µg/ml 이상의 농도를 유지하였고, 비흡수성막은 9일째까지, 흡수성막은 7일째까지 1µg/ml 이상의 농도를 유지하였다.

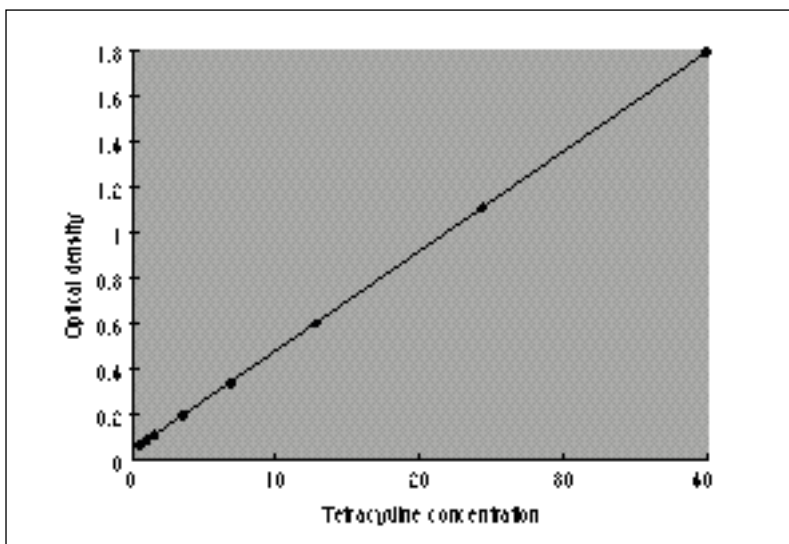


그림 1 Standard curve for tetracycline concentration

(The curve was drawn by regression analysis of the absorption peak of standard concentration at 276nm on UV spectrophotometer)

표 2 Concentration of tetracycline released to phosphate buffered saline from tetracycline-treated membranes($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Day	N	group of membrane discs			
		I	II	III	IV
1	4	894.4 ± 361.75	546.93 ± 248.55	1326.01 ± 533.44	1024.77 ± 279.86
2	3	85.86 ± 20.66	51.99 ± 22.38	98.47 ± 31.56	88.32 ± 17.66
3	3	24.40 ± 7.30	17.11 ± 7.74	21.37 ± 6.30	13.44 ± 0.85
4	3	9.15 ± 2.14	8.46 ± 2.60	6.97 ± 2.89	9.66 ± 0.22
5	3	4.89 ± 0.87	5.00 ± 2.21	3.42 ± 1.72	6.04 ± 0.90
6	3	3.94 ± 0.72	3.57 ± 1.65	2.03 ± 0.95	2.45 ± 0.87
7	3	2.44 ± 0.82	2.41 ± 1.30	1.39 ± 0.72	1.64 ± 0.43
8	2	2.04 ± 0.26	2.37 ± 1.06	0.76 ± 0.22	0.88 ± 0.20
9	2	1.31 ± 0.36	1.18 ± 0.65	0.73 ± 0.11	0.37 ± 0.46
10	2	0.85 ± 0.38	0.94 ± 0.38	0.40 ± 0.16	0.39 ± 0.87
11	2	0.46 ± 0.21	0.33 ± 0.23	0.09 ± 0.05	ND
12	2	0.43 ± 0.21	0.87 ± 0.87	0.10 ± 0.13	ND
13	2	0.55 ± 0.24	0.77 ± 0.49	0.02 ± 0.11	ND
14	2	0.54 ± 0.23	0.56 ± 0.33	0.02 ± 0.08	ND
17	1	0.58	0.56	ND	ND
20	1	0.45	0.56	ND	ND
24	1	0.21	0.65	ND	ND
28	1	ND	ND	ND	ND

ND : not detected N : number of specimens Values are mean \pm SD.

I : Tefgen®, II : Gore-Tex , III : Biomend ®, IV: Resolut®

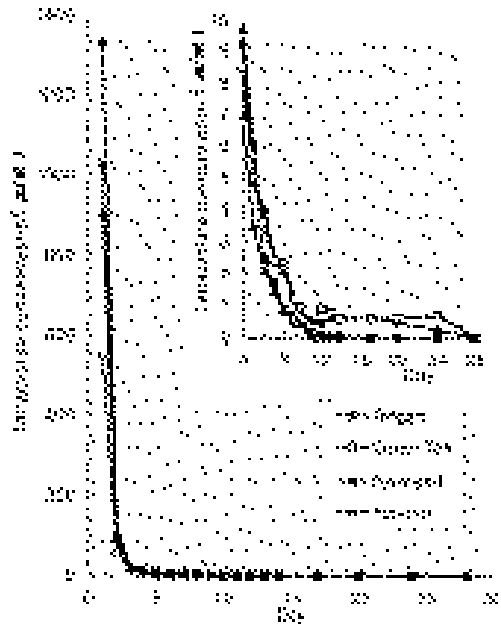


그림 2 Desorption kinetics of drug from TC treated membranes in phosphate buffered saline. The curve was drawn by the data in table 2.

표 3 The accumulated amount of drug released in phosphate buffered saline from tetracycline treated membranes(μg)

Day	group of membrane discs			
	I	II	III	IV
1	1073.28	652.28	2121.60	1640.00
2	1176.30	718.68	2279.15	1781.31
3	1205.58	739.21	2313.34	1802.82
4	1216.56	749.37	2324.50	1818.28
5	1222.43	755.37	2329.97	1827.94
6	1227.15	759.66	2333.22	1831.86
7	1230.08	762.55	2335.45	1834.50
8	1232.52	765.40	2336.67	1835.91
9	1234.10	766.82	2337.84	1836.51
10	1235.11	767.95	2338.48	1837.13
11	1235.66	768.34	2338.62	1837.13
12	1236.18	769.39	2338.77	1837.13
13	1236.84	770.31	2338.80	1837.13
14	1237.11	770.70	2338.93	1837.41
17	1237.81	771.56	2338.93	1847.41
20	1238.35	772.05	2338.93	1847.41
24	1238.60	772.83	2338.93	1847.41
28	1238.60	772.83	2338.93	1847.41
Total amounts of TC absorbed into membrane discs($6 \times 0.1256\text{mm}^2 = 0.7536\text{mm}^2$)				
	2000	1800	2625	2499

I : Tefgen®, II : Gore-Tex®, III : Biomend®, IV: Resolut®

흡수성막은 초기 약제유리농도가 비흡수성 막에 비해 훨씬 높게 나타났으나 시간에 따라 빠른 유리 양상을 보인 반면에, 비흡수성 막은 초기 농도는 흡수성막에 비해 낮지만 더 오랫동안 약제가 유리되었다. Tefgen®에서 가장 서서히 약제가 유리되었고, 3일째에 다른 군에 비해 높은 농도를 유지하였으며 Tefgen®과 Gore-Tex®는 유사한 유리양상을 보였다(표 2, 그림 2).

단위면적당 막(1개당 : 0.1256mm^2 , $0.1256 \times 6 = 0.7536\text{mm}^2$)에 흡착된 tetracycline의 총량은 Tefgen®은 $2000\mu\text{g}$, Gore-Tex®는 $1800\mu\text{g}$, Biomend®는 $2625\mu\text{g}$, Resolut®는 $2499\mu\text{g}$ 으로

흡수성막에서 더 많은 양의 약제가 흡수되었고, 약제의 누적유리량은 흡착된 약제의 총량에 비해 Tefgen®은 61.9%, Gore-Tex®는 42.9%, Biomend®는 89.1%, Resolut®는 73.9%로 나타났다(표 3).

2. 약제유리후 차폐막의 잔류항균활성

약제유리후 막의 항균활성을 위해 측정된 균의 성장억제대는 네종류의 막이 1일에는 크기가 비슷했다. 그러나 1, 2, 4주 표본은 흡수성막이 비흡수성막에 비해 억제대크기가 훨씬 감소하였다(표 4).

표 4 Inhibition diameter of TC treated membrane discs after drug desorption into phosphate buffered saline(cm)

day	group of membrane disc			
	I	II	III	IV
1	3.57±0.21	3.73±0.12	3.80±0.21	3.67±0.31
7	2.18±0.36	1.98±0.1	1.68±0.25	0.55±0.48
14	1.77±0.42	1.54±0.19	1.29±0.11	ND
28	1.34±0.19	1.07±0.19	0.90±0.33	ND

ND : not detected

Values are mean±SD.

I : Tefgen®, II : Gore-Tex®, III : Biomend®, IV: Resolut®

3. 주사전자현미경 관찰

2종의 PTFE막은 양이온 표면활성제의 처리 유무에 따른 표면구조의 변화가 관찰되지 않았으며, 이중 Tefgen®은 소공이 없는 섬유망 구조를 보인 반면 Gore-tex®는 solid & smooth node로 구성되어 있고 섬유구조에 의해 연결되어 Tefgen®에 비해 훨씬 느슨한 구조를 보였다.

흡수성막중 Biomend®는 1주째부터 구멍이 형성되고 막구조가 파괴됨을 관찰할 수 있었고, 4주까지 점차 진행되었다. Resolut®는 막구조의 분해는 관찰되지 않았으나 섬유배열이 느슨해진 것을 확인할 수 있었고 1일, 1주, 2주째에는 섬유구조에 tetracycline결정의 부착이 관찰되었고, 거친 표면구조를 보였으며, 4주째에는 결정의 수가 감소되어 있고, 2주 이전의 소견에 비해 평활한 표면을 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

치주처치의 궁극적인 목적은 주위의 치조골이 재생되고 질병에 이환된 치근면상에 새로운 백악질이 형성되고 그 위로 교원섬유가 삽입되는 신부착을 이루는 것이다. 그러나 통상적인 치주치료는 상피세포의 이주속도가 빨라 긴 접합상피에 의해 치유가 된다. 그래

서 상피의 이주를 막고 선택적으로 치주인대 세포와 치조골세포에 의한 치유를 유도하는 조직유도재생술이 많은 관심을 모으고 있다.

조직유도재생술용 차폐막은 흡수성막과 비흡수성막으로 나뉘는데 2차수술이 필요한 비흡수성막의 단점을 보완하여 흡수성막들이 개발되고 있으나 이 막은 조직의 재생과 성숙이 이루어지기에 충분한 기간동안 막이 온전하게 유지되어야 할 필요성이 요구된다.

차폐막의 노출을 예방하려는 많은 시도에도 불구하고 치유기간동안 막의 노출이 빈번하게 일어나며 세균이 이곳에 집락화되어 신생조직의 성숙을 방해하게 된다^{30~31)}. 차폐막이나 치근면에 선구적 세균이 먼저 집락화되어 2차적 세균의 응집을 위한 기초를 제공함으로써 감염이 야기되므로 초기 세균의 집락을 저지하거나 감소시키기 위해 전신적 혹은 국소적인 항생제의 투여가 필요할 수 있다. Metzler 등³²⁾은 조직유도재생술후 21일간 전신적으로 doxycycline을 투약하여 신부착의 증가를 얻을 수 있었다고 보고하였고, Becker³³⁾은 tetracycline을, Lekovic 등³⁴⁾은 penicillin을 사용함으로써 부착증진양을 증가시킬 수 있었다고 하였다. Demolon 등^{15~16)}은 Augmentin을 사용함으로써 1주 후 P. intermedia, F. nucleatum, B. forsythus의 감소를 관찰하였고 결과적으로 신부착이 증진되

있음을 보고하였다. 이에 반하여 Frandsen 등³⁵⁾은 metronidazole의 투약이 세균을 완전히 억제하지 못했음을 지적하였고, Novaes 등³⁶⁾도 술전후 penicillin과 doxycycline의 투약 및 chlorhexidine의 국소도포에도 불구하고 Haemophilus와 Capnocytophaga와 같은 그람 음성균주들이 관찰됨을 보고하였다.

그러나 전신적인 약제의 투약은 많은 부작용과 치주병인균에 효과적인 치은열구액 농도를 유지하기 어렵기 때문에 최근에는 국소적으로 약물을 송달하려는 노력들이 이루어져왔다. 또한 단일 세균상태에서는 항생제 감수성을 나타내지만 세균 군집상태에서는 항생제의 도달이 어려워 약제효과가 감소되므로²⁷⁾, 초기부터 세균의 부착을 억제하여 막의 오염을 줄이고자 차폐막으로의 약제흡착을 위한 연구들이 이루어졌다. Markman 등²⁸⁾은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tetracycline이 함유된 cellulose membrane 절편을 이용한 in vivo 및 in vitro 실험에서 쥐의 복강에 주입하여 12일째에 20.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 유리됨을 관찰하였고, Holen 등²⁹⁾은 양이온 표면 활성제를 사용하여 매식인공치 표면이나 e-PTFE 차폐막로의 tetracycline 흡착이 개선되었다고 하였다.

본 연구에서 e-PTFE 막은 소수성이고 표면 장력이 낮아서 약제의 흡착율이 떨어지기 때문에 Holen 등²⁹⁾이 사용한 방법으로 양이온 표면활성제인 tridodecylmethylammonium chloride(TIMAC)로 처리하였고, 사용된 tetracycline용액의 pH는 약 알카리로 유지시켜 치주병인균에 대한 항균제 활성화에는 영향을 주지않고 약제의 흡착율을 개선시키고자 하였다. 그에 반하여 흡수성막은 친수성을 띄므로 표면활성제 처리에 상관없이 많은 양의 약제흡수를 보였다.

Tetracycline은 4-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 치주병인균에 효과적이고^{19~20)}, 교원질분해효소와 골흡수를 억제하고^{22~23)} 치근면 탈회 효과²¹⁾가 있어 신부착을 증진시키기 위해 치근면 처치나 국소

약물송달제재로 이용되고 있다. Baker 등³⁷⁾은 항생제의 치주병인균에 대한 최소억제농도연구에서 tetracycline의 MIC₉₀이 A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, F. nucleatum은 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, B. intermedius는 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E. corrodens는 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 제시하였고 minocycline은 더 낮은 농도에서 균주에 대한 감수성을 보인다고 하였다. 또한 정 등³⁸⁾은 A. actinomycetemcomitans 균주의 항생제 감수성에 대한 연구에서 tetracycline의 최소억제농도가 1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 라고 보고하였다. 이에 의거하여 본 실험에서도 1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 기준으로 정량한 결과, 비흡수성막과 Resolut[®]는 5일째까지 Biomend[®]는 4일째까지 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이 유리되었고, 비흡수성막은 9일째까지 흡수성막은 7일째까지 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이 유리됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과는 tetracycline 처리된 조직유도재생술용 차폐막이 국소약물송달제재 역할을 할 수 있음을 제시하고 있다.

본 실험에서 막에 흡착된 tetracycline의 총량은 단위면적당(0.7536mm²) Tefgen[®]은 2000 μg , Gore-Tex[®]는 1800 μg , Biomend[®]는 2625 μg , Resolut[®]는 2499 μg 으로 비흡수성막에서 흡수성막에 비해 약제 흡착량은 낮았지만 더 오랫동안 서서히 유리되었다. 약제의 누적유리량은 흡수된 총량에 비해 Tefgen[®]은 61.9%, Gore-Tex[®]는 42.9%, Biomend[®]는 89.1%, Resolut[®]는 73.9%가 유리되어 약제의 누적유리량이 흡착된 약제의 총량에 비해 적게 나타났다. 그 이유로서는 막에 약제결합후 완전히 유리되지 않았을 가능성과, 약제농도를 측정하는데 있어 용액내 약제유리농도에 대해서는 흡광도를 측정하였고 막의 잔류항균활성은 세균성장억제대를 측정했기 때문으로 추정된다.

치은열구액내에는 다양한 세포성분과 전해질, 탄수화물과 단백질을 포함한 유기성분, 효소, 대사산물 및 세균등을 포함하고 있는데 본 실험에서는 교환액으로서 전해질 성분만을

고려한 인산완충용액을 사용하였다. 교환액의 양도 Challacomb³⁹⁾가 보고한 0.5-2.4ml/day의 치은열구액과 타액의 양을 고려하여 막 1개당(0.1256mm²) 0.2ml의 volume을 이용하였으므로 생체내에서의 유리 양상과 차이가 날 것으로 사료된다. Tetracycline처리된 치근절편의 약제유리양상에 대한 연구에서 Wikesjö 등²¹⁾은 교환액으로 10% bovine serum albumin(BSA)을 포함한 수용액을 사용하여 48시간후 4.2µg/ml가 유리됨을 보고하였고, 정 등⁴⁰⁾은 증류수를 사용하여 6.2µg/ml가 유리됨을 관찰하였다. 본 연구의 예비실험에서도 인산완충용액으로 교환한 경우와 3.5% BSA 함유 용액으로 교환한 경우, Gore-Tex[®]와 Biomend[®]의 약제유리양상의 차이를 비교시, BSA 함유 용액을 사용한 경우에 약제가 더 서서히 유리되었고, 이 결과는 Wikesjö의 실험 결과와 일치하였다.

주사전자현미경 관찰에서 표면활성제 처리에 의한 비흡수성막의 구조적 변화는 관찰되지 않았다. 흡수성막은 비흡수성막에 비해 막내 섬유간 공간이 더 크게 나타났는데 이로 인해 약제흡수가 용이했고 급속하게 유리되는 양상을 보였다. 용액내 침수된 흡수성막중 Resolut[®]는 4주에 걸쳐 흡수소견은 관찰되지 않았으나 섬유구조가 느슨해졌으며, Biomend[®]는 1주부터 부분적인 막구조의 파괴를 보였다. 흡수성막의 이론적 흡수기전으로 collagen 막은 세균과 중성구에서 형성된 효소에 의해 아미노산으로 분해되고, polyglycolide & polylactide polymer는 hydrosoluble monomer의 유리에 의해 분해된다⁴¹⁾. 그러나 본 연구에서 collagen 막은 교원질분해효소의 작용이 없었음에도 막구조의 분해상을 보여 주었다.

생체내에서 국소적으로 투여시 tetracycline은 치주낭내로 유리된 후 백악질에 의해 흡수되어, 막이 제거되거나 막내 약제농도가 떨어진 이후에도 백악질이 계속적인 약제 저장고로 작용하여 교원질파괴효소의 활성을 막

고 섬유아세포에 의한 치주인대 재생에 기여할 수 있다.

본 연구의 결과에서 국소적으로 tetracycline을 처리한 차폐막으로부터 약제가 1주이상 지속적으로 유리되어 조직유도재생술시 차폐막이 국소약물송달체재의 역할을 할 수 있음을 보여주었고, 치은열구액내 유기성분, 치근면으로의 흡착 가능성, 치은열구액의 양등을 고려해볼 때 생체내 치은열구액환경에서는 약제 유리율이 다를 수 있으나 술 후 치유결과에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 치은열구환경에서 tetracycline처리한 차폐막의 약제유리양상 및 균억제활성에 대한 연구가 향후 필요할 것이다.

V. 결 론

본 실험은 치주병인균에 효과적이며 교원질 분해를 억제한다고 알려진 tetracycline을 수종의 조직유도재생술용 차폐막에 처리한 후 막으로부터의 약제유리양상을 알아보기 위해 시행되었다.

비흡수성막으로 두종의 PTFE막(Tefgen[®], Ammerican Custom Medical, USA : Gore-Tex[®], W.L. Gore & Associates Inc., USA)과 흡수성막으로 polyglycolide & polylactide copolymer막 (Resolut[®], W.L. Gore & Associates Inc., USA)과 collagen 막(Biomend[®], Collatec Co., USA)을 이용하여 직경이 4mm가 되게 원형으로 잘라 5% tridodecylmethylammonium chloride의 에탄올 용액에 담가 건조시킨 후, tetracycline 100mg/ml 용액(pH 8)에 1분간 담근 다음 건조시켰다. 처리된 막은 인산완충용액에 담가 유리된 약제 농도를 UV spectrophotometer로 측정하였고, 1일-4주후 막의 잔류항균활성은 Bacillus cereus를 Mueller Hinton agar에서 배양한 후 균의 성장 억제대로서 측정하였다. 그리고 표면활성제 처리에 따른 비흡수성막의 구조적

변화와 인산완충용액내 침수에 따른 흡수성 막의 분해상을 주사전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흡착된 tetracycline의 총량은 단위면적당 (0.7536mm^2) Tefgen[®]은 $2000\mu\text{g}$, Gore-Tex[®]는 $1800\mu\text{g}$, Biomend[®]는 $2625\mu\text{g}$, Resolut[®]는 $2499\mu\text{g}$ 이었다.
2. 인산완충용액으로 유리되는 tetracycline 농도는 두종의 비흡수성막과 Resolut[®]는 5일째까지, Biomend[®]는 4일째까지 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이었고, Tefgen[®]과 Gore-Tex[®]는 9일째까지, Biomend[®]와 Resolut[®]는 7일째까지 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이였다. 비흡수성막이 흡수성막에 비해 초기 유리 농도는 낮았지만 더 오랫동안 유리되었다.
3. 약제 유리후 차폐막의 항균활성을 위한 균의 성장 억제대는 4종의 막에서 1일에는 비슷했으며, 1주이후에는 흡수성막이 비흡수성막에 비해 훨씬 감소하였다.
4. 주사전자현미경 관찰시 비흡수성막과 Resolut[®]는 막의 변화를 보이지 않았지만 Biomend[®]는 1주째부터 막구조의 분해상이 관찰되었다.

참고문헌

1. Melcher AH : On the repair potentials of the periodontal disease. J Periodontol 47 : 256-260, 1978.
2. 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.
3. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE : New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. J Periodontol 59 : 589-594, 1988
4. Magnusson L, Nyman S, Karring T,

- Egelberg J : Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. J Periodont Res 20 : 201-208, 1985.
5. Gottlow J, Laurell L, Lundgren D : Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device ; A longitudinal study in monkeys. Int J Periodontics Restorative Dent 14 : 437-449, 1994.
6. Becker W, Burton BE, Mellonig J, Caffesse RG, Warrer K, Caton JG, Reid T : A prospective multi-center study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane ; 1-year results. J Periodontol 67 : 641-649, 1996.
7. Blumenthal NM : A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. J Periodontol 64 : 925-933, 1993.
8. Brex M, Theilade J, Attstrom R : A ultrastructural quantitative study of significance of microbial multiplication during early plaque growth. J Periodont Res 18 : 177-186, 1983.
9. Nowzari H, Matian F, Slots J : Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membrane for guided tissue regeneration inhibit healing. J Clin Periodontol 22 : 469-474, 1995.
10. Temporo PJ, Nalbandian J : Colonization of retrieved ePTFE membranes : Morphological and microbiological observations. J Periodontol

- 64 : 162-168, 1993.
11. Simion M, Trisi P, Maglione M, Piatelli A : A preliminary report on a method for studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria in vitro : A scanning electron microscopic and histologic study. *J Periodontol* 65 : 755-761, 1994.
12. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D : A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent* 14 : 167-180, 1994.
13. Simion M, Trisi P, Maglione M, Piatelli A : Bacterial penetration in vitro through GTAM membrane with and without topical chlorhexidine application. A light and scanning electron microscopic study. *J Clin Periodontol* 22 : 321-331, 1995.
14. Frandsen EVG, Sander L, Arnbjerg D, Warrer K, Karring T : Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration : Clinical findings. *J Periodontol* 65 : 914-920, 1994.
15. Demolon IA, Persson GR, Moncla BJ, Johnson RH, Ammons WF : Effects of antibiotic treatment on clinical conditions and bacterial growth with guided tissue regeneration. *J Periodontol* 64 : 609-616, 1993.
16. Demolon IA, Persson GR, Moncla BJ, Johnson RH, Ammons WF : Effects of antibiotic treatment on clinical conditions with guided tissue regeneration : One-year results. *J Periodontol* 65 : 713-717, 1994.
17. Nowzari H and Slots J : Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 21: 203-210, 1994.
18. Nowzari H, MacDonald ES, Flynn J, London RM, Morrison JL, Slots J : The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration. *J Periodontol* 67 : 694-702, 1994.
19. Gordon JM, Walker CB, Murphy JC, Goodson JM, Socransky SS : Tetracycline : Levels achievable in GCF and in vitro effect on subgingival organisms. Part I. Concentrations in crevicular fluid after repeated doses. *J Clin Periodontol* 52 : 609-612, 1981.
20. Walker CB, Gordon JM, McQuilkin SJ, Niebloom TA, Socransky SS : Tetracycline : Levels achievable in GCF and in vitro effect on subgingival organisms. Part II. Susceptibilities of periodontal bacteria. *J Periodontol* 52 : 613-616, 1981.
21. Wikesjö UME, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Diflorio RM, Terranova VP : A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodont Res* 21 : 322-329, 1986.
22. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF : Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res* 19 : 651-655, 1984.
23. Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS,

- Zambon J, Ciancio S : Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources, *J Periodont Res* 20 : 12-23, 1985.
24. Terranova VP, Franzetti LC, Diflorio RM, Lyall RM, Wikesj UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ : A biochemical approach to periodontal regeneration ; Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth, *J Periodont Res* 21 : 330-337, 1986.
 25. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ : Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form, *J Periodontol* 54 : 580-585, 1983.
 26. Demirel K, Baer PN, McNamara TF : Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro ; Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin, *J Periodontol* 62 : 312-316, 1991.
 27. Freitas LB, Rundegren J, Arnebrant T : The binding of delmopinol and chlorhexidine to *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with varying degrees of surface hydrophobicity, *Oral Microbiol Immunol* 8 : 355-360 , 1993.
 28. Markman C, Fracalanza SEL, Novaes AB Jr, Novaes AB : Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration, *J Periodontol* 66 : 978-983, 1995.
 29. Holen S, Nowzari H, Bakker I, Slots J : Binding tetracycline to teeth and other hard surfaces in the Mouth, 14th ICOB IADR abs 28 : P-30, 1996.
 30. Selvig KA, Nilveus RE, Fitzmorris L, Kertsen B, Khorsandi SS : Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regeneration in humans, *J Periodontol* 61 : 515-520, 1990.
 31. Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain ADH, Wikesj UME, Nilveus RE : Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes ; Scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing, *J Periodontol* 63 : 974-978, 1992.
 32. Metzler DG, Seamons BC, Mellong JT, Gher ME, Gray JL : Clinical evaluation of guided tissue regeneration in the treatment of maxillary class II molar furcation invasions, *J Periodontol* 62 : 353-360, 1991.
 33. Becker W, Becker BE, Berg L, Prichard J, Caffesse R, Rosenberg E : New attachment after treatment with root isolation procedures ; Report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects, *Int J Periodontics Restorative Dent* 8 : 9-23, 1988.
 34. Lekovic V, Kenney EB, Carranza FA, Danilovic V : Treatment of class II furcation defects using porous hydroxyapatite in conjunction with a polytetrafluoroethylene membrane, *J Periodontol* 61 : 575-578, 1990.
 35. Frandsen, EVG, Sander L, Arnbjerg D, Theilade E : Effect of local

- metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration ; Microbiological finding. J Periodontol 65 : 921-928, 1994.
36. Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Francischetto IF, Novaes AB : Bacterial colonization of the external and internal sulci of cellulose membranes at time of retrieval, J Periodontol 66 : 864-869, 1995.
 37. Baker PJ, Slot J, Genco RJ, Evans RT : Minimal inhibitory concentrations of various antimicrobial agents for human oral anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 24 : 420-424, 1983.
 38. 정현주, 정종평, 손성희 : 구강내 Actinobacillus actinomycetemcomitans 분리균주의 항생 제 감수성에 관한 연구. 대한치주과학회지 17 : 11-18, 1987.
 39. Cimansoni G : Crevicular fluid updated, 43-44, 1983.
 40. 정은희, 정현주 : 치근면에 도포된 tetracycline의 유리 양상에 관한 연구. 대한치주과학회지 19 : 116-124 , 1989.
 41. Wang HL, Yuan K, Burgett F, Shyr Y, Syed S : Adherence of oral microorganisms to guided tissue regeneration membranes : An in vitro study. J periodontol 65 : 211-218, 1994.

사진부도 설명

그림 1 A) SEM view of Tefgen® membrane which was not treated by tridodecylmethyl-ammonium chloride($\times 2000$)

B) SEM view of Tefgen® membrane which was treated by tridodecylmethyl-ammonium chloride($\times 2000$)

Any structural change due to cationic surfactant was not observed.

그림 2 A) SEM view of Gore-Tex® membrane which was not treated by tridodecylmethyl-ammonium chloride($\times 100$)

B) SEM view of Gore-Tex® membrane which was treated by tridodecylmethyl-ammonium chloride($\times 100$)

Any structural change due to cationic surfactant was not observed.

그림 3 A) SEM view of Biomend® membrane, 1 day after immersion in PBS. No Change of membrane structure was observed.($\times 2000$).

B) SEM view of Biomend® membrane, 7 day after immersion in PBS.

Destruction of membrane structure was observed($\times 2000$).

C) SEM view of Biomend® membrane, 14 day after immersion in PBS.

Porosities and fibrillar fragmentation were observed($\times 2000$).

D) SEM view of Biomend® membrane, 28 day after immersion in PBS.

Destruction of membrane structure was progressed($\times 2000$).

그림 4 A) SEM view of Resolut® membrane, 1 day after immersion in PBS.

Tetracycline crystals attached to fibril were observed($\times 100$).

B) SEM view of Resolut® membrane, 7 day after immersion in PBS.

Tetracycline crystals attached to fibril were observed, but no evidence of destruction in membrane structure was observed($\times 100$).

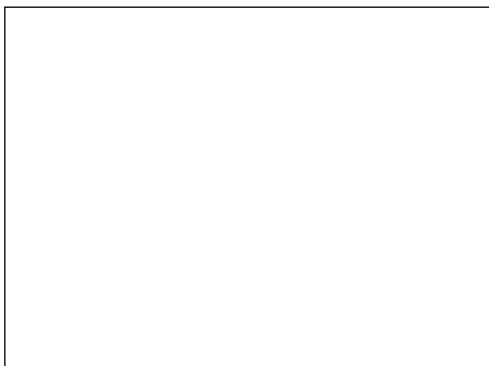
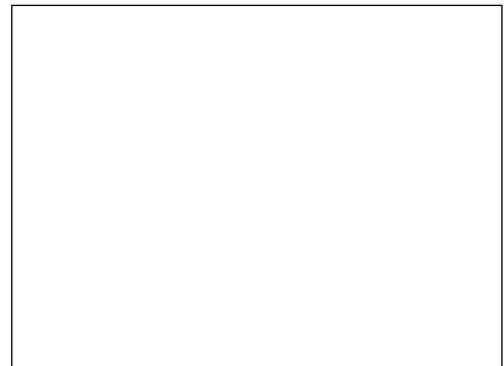
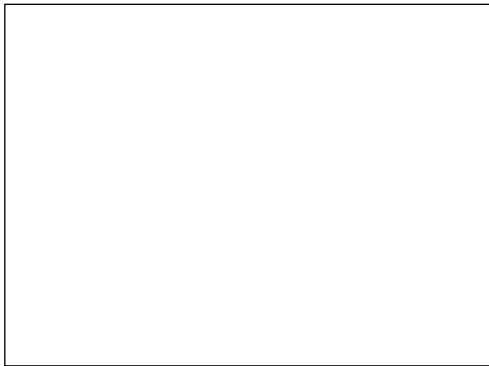
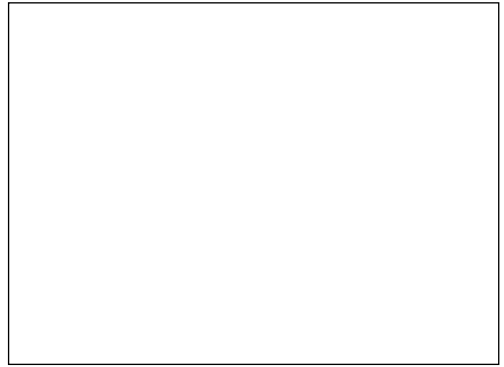
C) SEM view of Resolut® membrane, 14 day after immersion in PBS.

The amount of tetracycline crystals decreased compared to the membranes of 1 day and 7days after immersion($\times 100$).

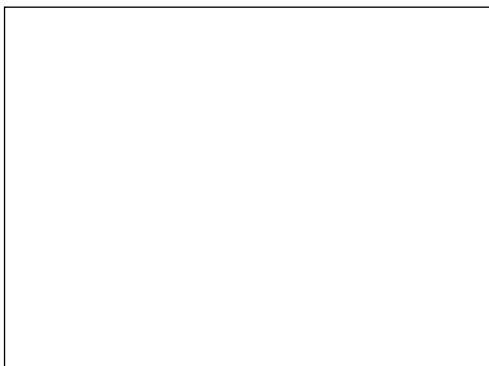
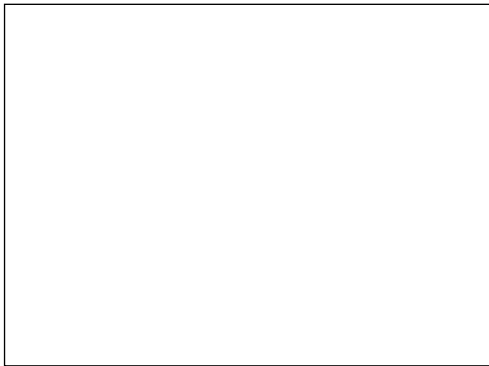
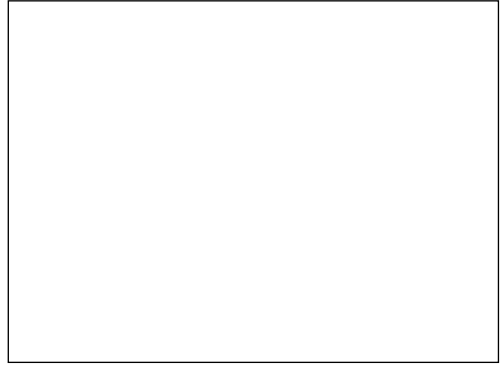
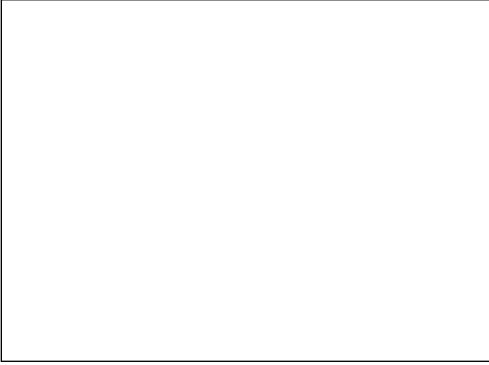
D) SEM view of Resolut® membrane, 28 day after immersion in PBS.

Few Tetracycline crystals attached to fibril were observed. Fibrillar structure tended to be loose($\times 100$).

이성미 논문사진부도 (1)



이성미 논문사진부도(II)



Desorption Kinetics and Structural Changes of Tetracycline Treated Barrier Membranes for Guided Tissue Regeneration

Sung-Mi Lee, Hyun-Ju Chung

Department of Periodontology, College of Dentistry, Chonnam National University

Tetracycline is known to be effective in eliminating periodontopathogens and have collagenolytic activity. This study was performed to observe the desorption kinetics and structural changes of tetracycline-treated barrier membranes for guided tissue regeneration.

Four kinds of barrier membranes were tested : Tefgen®(American Custom Medical, USA) and Gore-Tex®(W.L. Gore & Associates Inc., USA) as nonresorbable membranes ; Resolut(polyglycolide & polylactide copolymer, W.L. Gore & Associates Inc., USA) and Biomend®(collagen, Collatec Co., USA) as resorbable membranes. The membranes were cut into discs(diameter : 4mm) and were immersed in 5% tridodecylmethylammonium chloride(TIMAC) ethanol and air-dried. The membrane discs were absorbed with 100 μ g/ml tetracycline solution(pH 8) for one minute and dried. For desorption kinetics, TC treated discs were immersed in phosphate buffered saline solution(PBS, pH 7.4). PBS was exchanged daily and TC concentration was measured by absorbance at 276nm on UV spectrophotometer.

To measure remaining antibacterial activity, discs of 1 day to 4 weeks after desorption were placed on Mueller Hinton agar containing Bacillus cereus and incubated aerobically in 37°C for twelve hours and the inhibition diameters were measured. To observe the structural change of membranes after TIMAC treatment or immersion in PBS, the membrane discs were examined under SEM.

The results were as follows :

1. Total amounts of TC absorbed into membrane discs(0.7536mm²) were 2000 μ g, 1800 μ g, 2625 μ g and 2499 μ g for Tefgen®, Gore-Tex®, Biomend® and Resolut®.
2. The concentration of TC released from barrier membrane discs was maintained over 4 μ g/ml until the fifth day in nonresorbable membranes and Resolut®, but until the fourth day in Biomend®. Until the ninth day in nonresorbable membranes and until the seventh day in resorbable membranes, the TC concentration was maintained over 1 μ g/ml.

3. The four membrane discs in the first day showed similar size of inhibition zone. One to four weeks later, the inhibition zone was much smaller in resorbable membrane discs than nonresorbable membrane discs.
4. Any structural change due to treatment of TIMAC was not observed on the nonresorbable membranes. Resolut® did not show any structural change except fibrillar loosening during immersion period, but Biomend showed destruction of membrane structure from the first week of immersion.

This study indicates that tetracycline treated barrier membranes lead to the sustained release of tetracycline for over 7 days. This slow release pattern of tetracycline may contribute to the favorable clinical outcome of guided tissue regeneration.