

Rabbit calvaria를 이용하여 hyaluronic acid (HA)를 처리한 poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) 차폐막들의 골 생성능력에 대한 비교 연구

김남숙¹ · 윤귀덕¹ · 방몽숙¹ · 양홍서¹ · 임현필¹ · 강성수² · 박상원^{1*}

전남대학교 ¹치의학전문대학원 보철학교실, ²수의과대학

연구목적: 본 연구는 hyaluronic acid (HA)를 poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)에 적용하여 새로 개발된 차폐막들을 실험군으로, 차폐막이 사용되지 않은 조건과 시중에 사용 중인 collagen membrane (Ossix™)을 이용한 조건을 대조군으로 하여, 토끼 두개골에 형성된 골 결손부에 4, 8, 12주간 적용하고 조직학적인 관찰을 함으로써 골 재생 능력을 비교 평가하고자 한다.

연구 재료 및 방법: 12마리의 웅성 가토 두개골에, 6 mm 직경의 골 결손부를 4개씩 형성하였다. 각각의 결손부는 5가지 중 하나의 차폐막으로 덮여졌다: No-membrane, Collagen, PLGA, HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA. 4주, 8주, 그리고 12주 후 두개골을 절단하여 H-E 염색한 후 조직학적 분석을 하였다.

결과: 본 연구에서, 차폐막을 사용하지 않은 군에서 골형성은 12주 후에 나타났으며, 골 결손부를 일부 채우고 있었다. 신생골은 하방의 뇌경막을 따라 형성되었고 결손부의 상부는 결합조직과 지방으로 채워져 있었다. 콜라겐 차폐막인 Ossix™는 4주 후부터 신생골을 보였으며 신생골은 차폐막을 따라 형성되어 있었고 12주 까지 차폐막이 유지되었다. PLGA, HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA는 4주 후부터 골 재생을 보이고 8주 후에 결손부를 전반적으로 채우고 있다. 12주에는 기존 골과 구분이 되지 않으며 잘 융합되어 있음을 알 수 있다. 차폐막은 4주 후부터 명확히 구분되지 않고 흡수되어 있었다.

결론: PLGA와 HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA는 대조군에 비해 골의 형성이 빠르고 성숙 또한 빠르게 나타났으나, HA의 적용에 따른 차이를 보이지 않았으며 4주 후부터 흡수되어 차폐막으로써 임상에서 사용하기 위해서는 흡수 기간을 연장하여 조절 가능하도록 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. (대한치과보철학회지 2010;48:158-65)

주요단어: Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA), 히알루론산, 차폐막, 골재생

서론

차폐막에 대한 초기 연구에서는 치주 결손 처치에 이를 이용하는 것에 주된 관심을 기울였으나, 현재는 치조제 결손의 증강을 촉진하고, 임플란트 주변 골 치유를 향상시키며, 완전한 골 재생을 유도할 뿐만 아니라, 골이식 결과를 개선하고, 실패한 임플란트를 치료하기 위한 목적으로도 사용하게 되었다.¹ 그 임상 적용이 증가함에 따라, 다양한 종류의 차폐막이 개발되었으며, 그 중 흡수성 차폐막은 추가적인 이차 수술이 필요하지 않아 환자의 불편감과 비용을 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있어 사용이 증가하고 있다.^{1,2}

이러한 흡수성 차폐막은 임상에서 골 고정, 외과적 봉합, 조직 공학, 그리고 조절성 약물 방출을 위한 비계로 사용되고 있다.^{3,5} poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)는 흡수성 차폐막의 하나로 안정성과 흡수성을 가지며 세포독성이 없다는 점과 흡수 기간을 조절하고 차폐막의 모양을 부여하기 쉬운 장점을 가진다.⁶ 그러나 PLGA는 흡수 과정에서 국부적인 염증 반응을 일으키는 경우가 있다.^{6,7} 또한, Ishaug과 Ochi 등에 의해 개발된 지방족 폴리에스테르의 삼차원적 비계는 좋은 세포 부착을 보이지만, 차폐막으로써의 중합체의 세포 친화성은 콜라겐 코팅된 차폐

막에 비해 좋지 못하다.⁸⁻¹¹

차폐막의 단점을 보완하기 위해 여러 가지 일차 이차적인 물질들을 사용하는 것에서 더 나아가 생체적합성을 향상시켜서 안정성을 도모하면서 더욱 더 효능을 높이도록 하는 몇 가지 변형이 시도되고 있다. 사용되어지는 물질 중 히알루론산 (HA)은 세포의 기질에 편재하는 성분으로 세포핵과 세포질 모두에 일시적으로 나타난다. 이는 세포의 이동, 부착, 증식을 조장하여, 형태형성, 상처 치유, 염증과 전이와 같은 과정에서 중요한 역할을 한다.¹¹⁻¹³ Marinucci 등에 따르면 HA에 대한 연구에서, HA 차폐막에 골아세포를 배양했을 때 type I collagen, alkaline phosphatase, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)의 분비가 매우 향상되었다고 밝혔다. 그리고 골형성 시 HA에 의해 골아세포의 증식이 촉진 되었으며, 이는 차폐막의 종류가 골아세포에 직접적인 영향을 줌으로써 골 재생을 촉진함을 의미한다.¹⁴

차폐막에 대한 HA의 효과에 대한 연구가 다양하게 행해지고 있으나, 현재까지 PLGA 차폐막과 HA의 혼합 적용이 생체 적합한지, 흡수되는 기간이 어느 정도인지에 대한 연구가 부족하고, 실제 임상과 관련하여 골 재생 능력이 평가되지 않았다. 따라서 본 연구는 HA를 PLGA에 적용하여 새로 개발된 차폐막들을 실험군으로, 차폐막이 사용되지 않은 조건과 시중에

*교신저자: 박상원

500-757 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 치의학전문대학원 보철학교실 062-530-5639; e-mail, psw320@chonnam.ac.kr

원고접수일: 2010년 4월 1일 / 원고최종수정일: 2010년 4월 9일 / 원고채택일: 2010년 4월 15일

사용 중인 collagen membrane (Ossix™, Implant Innovations, Inc., Palm Beach, FL, USA) 을 이용한 조건을 대조군으로 하여, 토끼 두 개골에 형성된 골 결손부에 4, 8, 12주간 적용하고 조직학적인 관찰을 함으로써 골 재생 능력을 비교 평가하고자 한다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

연구에 사용된 재료를 Table I에 요약하였다. HA를 적용한 차폐막은 다음과 같은 방법으로 제작되었다.

(1) HA-ADH 및 HA-ADH-PLGA의 합성 (PLGA)

우선 HA 100 mg을 20 mL의 distilled water에 녹여 5 mg/mL의 HA solution을 만든다. Solution에 ADH (1.736 g)를 넣은 후 10분간 서로 교반하였다. 1 N의 HCl을 이용하여 pH를 4.8로 조절하고, 50%의 ethanol 20 mL를 추가로 넣은 후 30분간 교반하였다. 이후 EDC (0.191 g)을 투입하고 1 N HCl을 이용 pH를 4.8로 조절하고, 2시간 동안 반응시켰다. 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 상승시켜 반응을 종료한 후, 7,000 MWCO 삼투압튜브에 넣어 10 mM NaCl solution에서 세척하였다. 이후 25%의 ethanol을 이용 몇 차례 세척 후 3일간 동결 건조하여 HA-ADH를 합성하였다.

HA-ADH-PLGA는 우선 PLGA 200 mg을 5 mL의 DMSO에 녹이고, DCC (3.1 mg)와 NHS (1.73 mg)을 첨가하였다. 또한 HA-ADH 5 mg을 5 mL의 DMSO에 넣어 용해시킨 후 위의 두 solution을 12 시간 동안 반응시킨 후, 3일간 동결 건조하여 합성하였다.

(2) HA-ADH-PLGA film의 제작

HA가 적용된 PLGA film으로 HA-ADH-PLGA/PLGA (HA-PLGA와 PLGA의 blending film)와 HA-ADH-PLGA-PLGA (HA-ADH-PLGA에 PLGA coating film)가 사용되었다.

먼저 HA-ADH-PLGA/PLGA Film은 solvent casting 방법을 이용하여 제작하였다. HA-ADH-PLGA (MW 20,000)와 PLGA (MW 20,000)는 각각 10 mg/ml의 비율로 chloroform (5 ml)에 녹였다. 이때 HA-PLGA의 비율은 1/0, 1/1, 2/1, 1/2 그리고 0/1의 비율로 하였다. 각각의 solution은 서로 혼합하여 5분간 교반하였다. 이후 fil-

Table I. Characteristics of tested membranes

Membrane	Origin	Weeks	N
No-membrane (NM)		4	3
		8	3
		12	3
Collagen (C) (Ossix™)	bovine	4	3
		8	3
		12	3
PLGA (P)	synthetic	4	3
		8	3
		12	3
HA-coated-PLGA (HCP)	synthetic	4	3
		8	3
		12	3
HA-PLGA/PLGA (HPP)	synthetic	4	3
		8	3
		12	3

tration을 시행한 후 위의 HA-PLGA/PLGA solution을 poly (tetra-fluoroethylene) petri-dish에 넣고 실온에서 2일간 건조시켰다.

또한 HA-PLGA-PLGA Film은 PLGA Film을 위와 같은 방법으로 제작한 후, EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)를 포함한 HA-PLGA solution에 넣은 후 실온에서 24 시간 반응시킨 후 건조하였다.

2. 실험 방법

체중 3.3 - 3.5 kg인 12마리의 웅성 가토 (New Zealand White rabbit)를 염산 자일리신 (Rompun®, Biellkorea, Seoul, Korea) 4 mg/kg와 염산 케타민 (Ketalar®, Yuhan.Co., Seoul, Korea) 65 mg/kg을 혼합하여 근육주사하여 마취하고, 두부의 정수리 부분의 털을 깎고, 포타딘으로 소독하였다. 시상봉합을 따라 피부와 골막을 통과하여 20 mm 길이로 절개하여 전층 판막을 거상하여 두정골을 노출시켰다. 6 mm 직경의 trephine bur를 주수 하에 이용하여 시상봉합을 중심으로 좌, 우 2개씩 1마리에 4개의 골 결손부를 형성하였다 (Fig. 1A-B). 차폐막을 defect 외부로 최소 2 mm 덮을 정도로 적용하였다 (Fig. 1C). 차폐막은 no membrane, collagen, PLGA, HA coated PLGA, HA-PLGA/PLGA 5가지 군으로 한 개체에 처음 4가

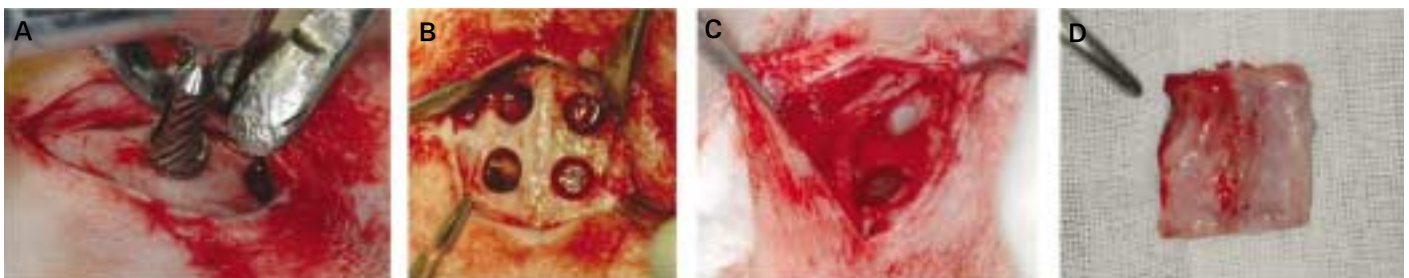


Fig. 1. A, 6 mm diameter critical size calvarial defect was created with saline cooled trephine drill; B, 4 defects were trephined, 2 on each side of the sagittal suture. 4 defects were covered with different membranes; C, Each membrane was cut and placed individually to extend beyond the defect margins by approximately 2 mm; D, Skin incision was made, and the calvarium was removed.

지를 시계방향으로 순서대로 적용하고, 다음 개체는 collagen 부터 시계방향으로 순서대로 적용하였다. 같은 방법으로 차폐막을 적용하여 개체에서 차폐막 적용 부위가 좌,우,상,하로 고르게 위치 하도록 하였다. 흡수성 봉합사를 이용해 골막 봉합하여 차폐막을 고정하였으며 수술용 실크를 이용해 피부 봉합을 시행하였다. 마취에서 회복된 후 사육실로 옮겼으며, 3일간 시술 부위에 포타딘을 이용해 소독 하였고, 항생제 (Baytril® 50 injection, Biellkorea, Seoul, Korea)를 10 mg/kg를 하루에 두번, 진통소염제 (Ketopro®, unibiotech co. LiD, Seoul, Korea) 를 3 mg/kg로 3일간 주사하였다. 실험 기간 동안 고형사료를 공급하고 분리된 실내 사육실을 이용하였다.

4주, 8주, 12주에 각 실험군을 4마리씩 희생하여 x-ray 촬영으로 골 결손부를 확인하였고, 각각의 결손부를 포함하도록 골절단을 하였다 (Fig. 1D). 포르말린용액에 넣어 고정시킨 후 통법에 따라 비탈회 표본을 제작하였다. Diamond saw (IsoMet4000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)를 이용해 결손부의 가장 긴 직경을 포함하도록 절단하고, 사포를 이용해 연마하여 두께 30 - 50 μ m가량의 조직표본을 제작하였다. 제작된 표본을 HE 염색을 시행하여 광학현미경 (Leitx Orthoplan microscope-Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 조직학적 관찰을 실시하였다. 시편 수는 차폐막 적용 기간에 따라 16개씩으로 한 군의 시편은 4개이며 나머지 군은 3개의 시편으로 구성되었다.

결과

각각의 조직학적 소견은 차폐막의 종류에 따라 치유 기간에 따라 정리하였다.

1. No-membrane 군

4주째에 골 절단면의 모습은 기존 골의 상방과 하방으로 골이 흡수된 소견을 보인다. 신생골의 형성은 보이지 않고 있으며 골 결손부의 상방에 섬유성 조직이 채워져 있는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2A). 8주째에 골형성은 기존 골의 측면에서 부분적으로 형성되어 있다. 골의 측면에 섬유성 조직을 보이며 골 결손부의 중앙부에는 골이 전혀 형성되지 않은 것을 알 수 있다 (Fig. 2B). 12주째에 골 결손부에 부분적으로 신생골의 골양 형태를 보인다. 골형성은 하방 경계를 따라 형성되어 있으며, 상방으로는 중앙부의 함몰 형태를 보인다. 기존 골과 신생골은 융합되지 않고 명확한 구분이 가능하다 (Fig. 2C).

2. Collagen (Ossix™)군

4주째에 상방에 차폐막이 잘 유지되어 있으며 흡수되지 않고 있다. 차폐막은 공간을 잘 유지하고 있으며 함몰되지 않고, 차폐막을 따라 골이 형성되어 있으며 새로 형성된 골에 차폐막이 직접적으로 접촉되어 있다. 골형성은 기존 골과 차단

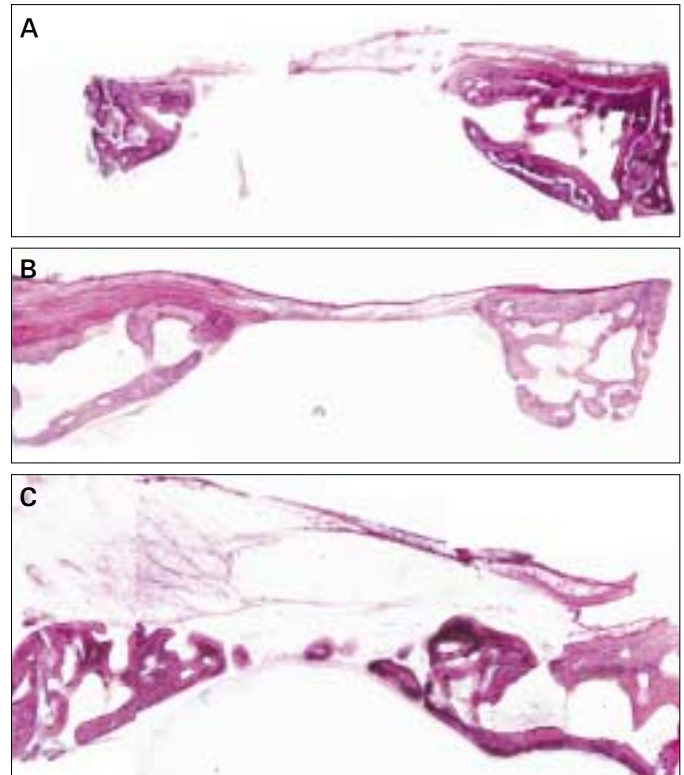


Fig. 2. Transversal histologic sections of defects in no-membrane group. A, at 4 weeks; B, at 8 weeks; C, at 12 weeks (HE; original magnification, \times 20).

따라 형성되어 전체 공간의 상방을 채우고 전 길이를 따라 형성되었다. 신생골과 기존 골의 경계가 명확한 모습이다 (Fig. 3A). 8주째에 차폐막은 잘 유지되고 있으나 염색의 정도가 균일하지 않다. 골형성이 미약하여 전체 길이로 골 가교를 이루지 못하고 있으며 결손부의 중앙부위에는 골형성이 보이지 않는다. 차폐막과 기존 골 사이로 연조직의 침투를 보이고 있다 (Fig. 3B).

12주째에 차폐막은 그 형태를 유지하고 있으나, 염색의 정도가 다른 것으로 보아 흡수되고 있는 것으로 보인다. 흡수는 양측의 기존 골 부위에서 먼저 이루어지는 것으로 보인다. 차폐막 하방으로 신생골이 보이며 전체 길이를 통해 형성되어 있으나 골결손을 모두 채우지는 못하고 있으며 기존 골에서 중심부로 향한 골형성이 미약하며 차폐막을 따라 형성되어 있다 (Fig. 3C).

3. PLGA군

4주째에 PLGA 차폐막은 차폐막 하방으로 빈 공간이 있으며 그 안에 골이 형성되어 있는 양상이다. 차폐막은 흡수되어 명확히 구분되지 않으며 골 결손부에 골양 조직이 형성되어 있으며 전 길이를 통해 골 가교를 이룬다. 기존 골과 신생골이 구분되지만 융합되는 양상을 보이며 골 조직 상방의 차폐막 함

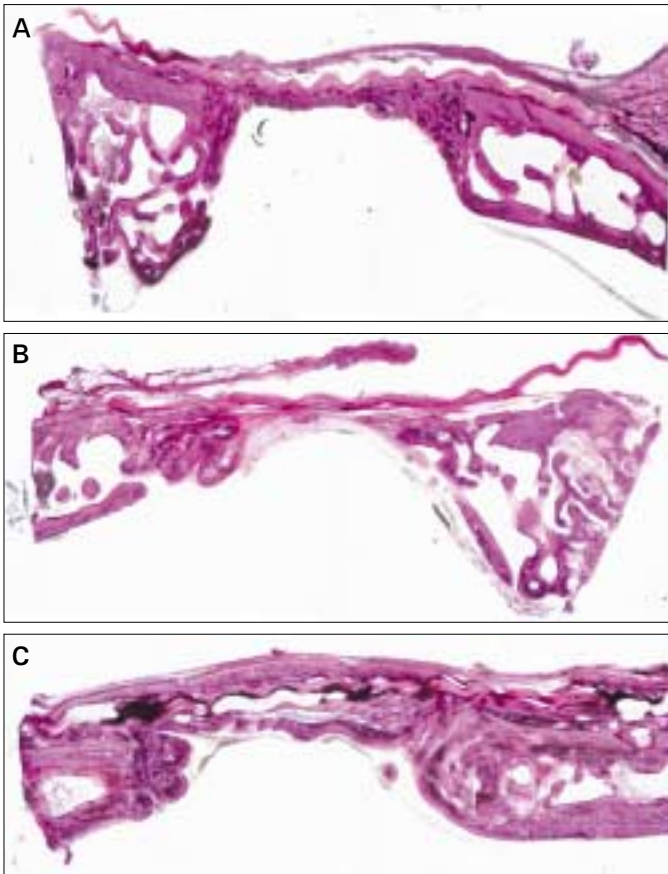


Fig. 3. Transversal histologic sections of defects covered with Ossix™ membrane. A, at 4 weeks; B, at 8 weeks; C, at 12 weeks (HE; original magnification, $\times 20$).

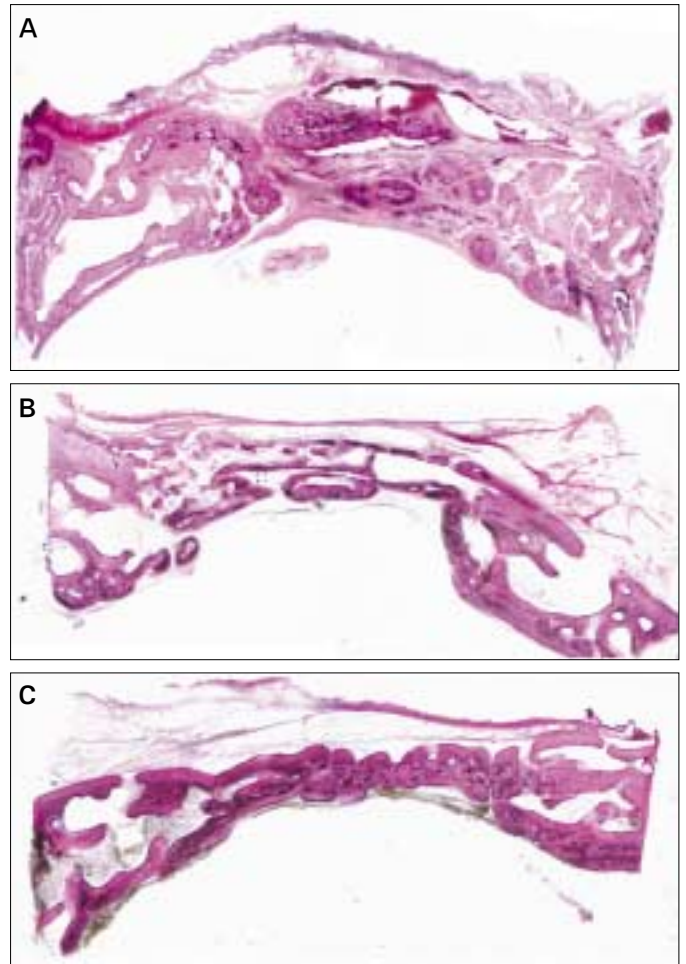


Fig. 4. Transversal histologic sections of defects covered with PLGA membrane. A, at 4 weeks; B, at 8 weeks; C, at 12 weeks (HE; original magnification, $\times 20$).

물을 보이지 않는다 (Fig. 4A). 8주째에 PLGA 차폐막은 골형성이 전 길이를 통해 이루어져 있으며, 결손부위의 2/3 정도를 채우고 있다. 골양조직이 서로 연결되어 골가교를 이루며 상방으로 형성된 골은 치밀골판이 형성되는 양상이다. 기존 골과 신생골은 잘 융합되어 구분이 어렵다. 차폐막의 구분이 어렵고 함몰양상은 뚜렷하지 않다 (Fig. 4B). 12주째에 PLGA 차폐막에서 골형성은 전 길이를 통해 이루어져 있으며 기존 골과 잘 융합되어 있다. 골 결손부를 모두 채우고 있으나, 원래의 골에 비해 상, 하로 얇아진 것을 알 수 있다. 상, 하로 치밀골판과 골수강의 형태를 보이지는 않는다. 차폐막은 보이지 않으며 모두 흡수된 것으로 생각된다 (Fig. 4C).

4. HA-coated-PLGA (HCP) 군

4주째에 HA-coated-PLGA 차폐막은 양측 골 절단부에 신생골의 골양 형성을 보이며 차폐막 하방으로 골이 형성되어 있다. 전 길이를 통해 골가교를 형성하지는 못하고 있으나 기존

골 상방으로 골이 형성되어 있다. 차폐막의 명확한 구분은 어려우며 신생골 하방으로 섬유성 조직을 보인다 (Fig. 5A). 8주째에 HA-coated-PLGA 차폐막에서 골형성은 전 길이를 통해 이루어져 있으나 중앙부위에 약간의 함몰이 보인다. 형성된 신생골은 기존 골과 잘 융합되어 있으며 구분이 어렵고 골 결손부의 상방 함몰부위를 제외하고 모두 채우고 있는 모습이다. 차폐막의 구분은 어렵다 (Fig. 5B). 12주째에 HA-coated-PLGA 차폐막에서 신생골은 전체 골결손 부위를 채우고 있다. 상방으로 치밀골판이 형성되고 있는 것을 알 수 있으며, 신생골과 기존골의 경계는 명확하지 않으며, 잘 융합되어 있다. 골 소주는 기존 골에 비해 크기가 더 작은 양상이며 차폐막은 보이지 않는다 (Fig. 5C).

5. HA-PLGA/PLGA (HPP) 군

4주째에 HA-PLGA/PLGA 차폐막에서는 차폐막 하방으로 신생골이 형성되어 전 길이를 통해 골가교를 이루며 기존 골 상

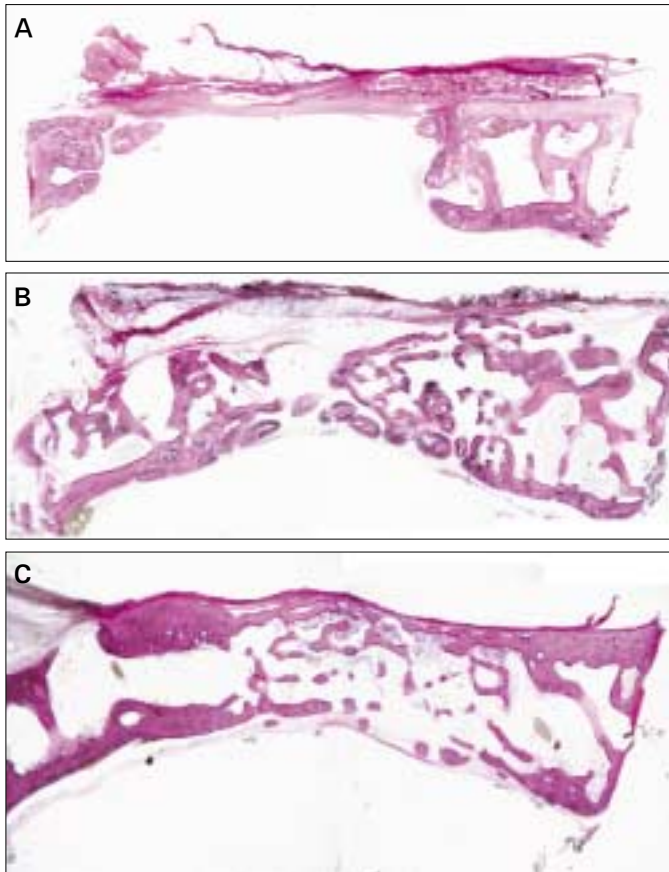


Fig. 5. Transversal histologic sections of defects covered with HA-coated-PLGA membrane. A, at 4 weeks; B, at 8 weeks; C, at 12 weeks (HE; original magnification, $\times 20$).

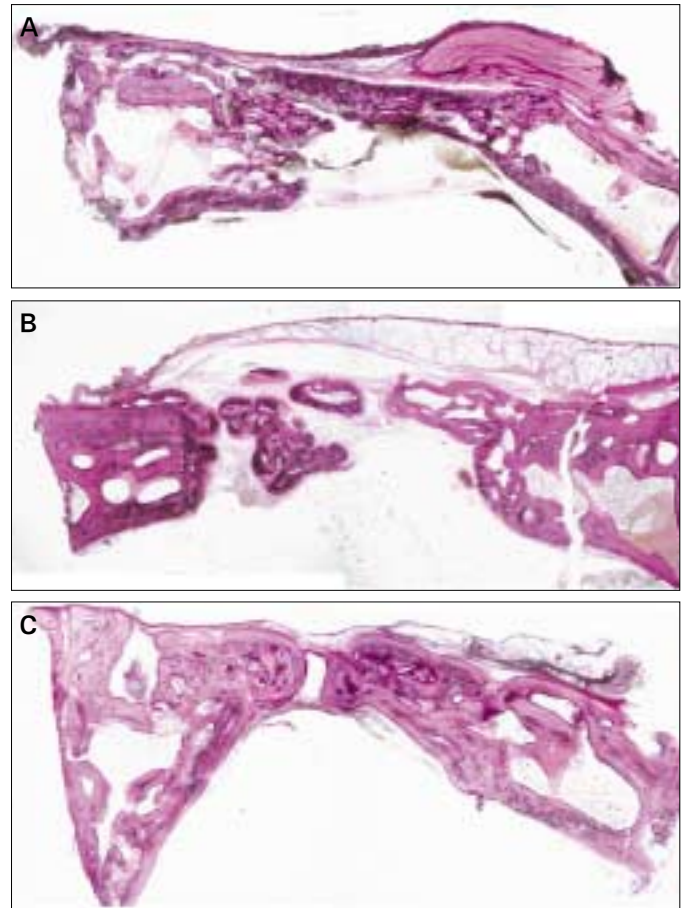


Fig. 6. Transversal histologic sections of defects covered with HA-PLGA/PLGA membrane. A, at 4 weeks; B, at 8 weeks; C, at 12 weeks (HE; original magnification, $\times 20$).

방에서도 차폐막 하방으로 골이 형성되어 있다. 기존 골과 신생골은 잘 연결되어 있으나 골 결손 부위를 모두 채우지는 못하고 있다. 차폐막은 흡수가 진행되는 양상이며 하방의 골과 접촉하지 않는다 (Fig. 6A). 8주째에 HA-PLGA/PLGA 차폐막에서 골형성은 전 길이를 통해 이루어져 있으며, 신생골은 기존 골과 잘 융합되어 있고 골 결손부의 1/2 정도를 채우고 있다. 상방으로 치밀골판이 형성되는 모습이나, 전 길이로 연장되어 있지는 않다. 차폐막의 구분은 어렵다 (Fig. 6B). 12주째에 HA-PLGA/PLGA 차폐막에서 중앙 부위를 제외한 부위에 신생골이 형성되어 있으며, 신생골은 기존골과 잘 융합되어 구분되지 않는다. 차폐막은 구분되지 않는다 (Fig. 6C).

고찰

차폐막은 조직유도 재생 술식에서 효과적으로 이용되며, 추가적인 이차 수술의 부담이 없기 때문에 흡수성 차폐막의 사용이 증가하고 있다.¹² 흡수성 차폐막은 크게 천연물질과 합성 물질로 구분되는데, 천연물질의 하나인 collagen 차폐막은 재생

조직에 대한 좋은 세포 친화성과 생체 적합성을 가진다. 그러나 이러한 collagen 차폐막은 보통 강도가 약해 조작하기가 어렵고 정상적인 조직 치유 과정에 맞추어 흡수 속도를 조절하기가 어렵다. 최근에는 합성 고분자 중합체인 PLA, PGA, PLGA가 개발되고 조직유도 재생술에 적용하기 위해 연구되고 있으며 임상에서 골 고정, 외과적 봉합, 조직 공학, 그리고 조절성 약물 방출을 위한 비계로 사용되고 있다. 이러한 중합체 중 PLGA는 좋은 생체 적합성과 체내의 자연적인 대사산물로 분해되는 것과 같은 장점이 있어 국부적인 생활성 물질의 전달자로의 사용에 대한 연구가 행해지고 있다.³⁴ Nam 등은 조직 공학을 위해 많은 기공을 가진 PLGA 비계를 제작하였는데, 충분한 세포 파종을 위해, 그리고 산소와 영양분의 이동을 위해 개방된 기공 구조를 갖는 이러한 비계가 세포 부착, 증식 그리고 분화에 있어서 중요한 역할을 한다고 하였다.⁵ 이처럼 PLGA는 안정성과 흡수성을 가지며 세포독성이 없다는 점과 흡수 기간을 조절하고 차폐막의 모양을 부여하기 쉬운 장점을 가지고 있어 본 연구에서 실험 재료로 선택하였다.

그러나 PLGA 차폐막이 모든 경우에 이상적으로 이용할 수

있는 것은 아니다. PLA, PLLA, PGA를 이용한 흡수성 차폐막은 합성 고분자 중합체로서 분해 시에 다량의 염증세포를 집결시킨다. Bergsma의 골 고정을 위해 사용된 PLA 나사를 생조직 검사에서 약 4년에서 6년간 지속되었고 late localized foreign-body type 반응을 일으켰다고 보고하였으며, Bostman의 연구에 따르면 PGA로 된 고정용구에서도 이러한 반응이 관찰되나, 수술 후 더 빠른 시간 내에 나타났다고 하였다.¹⁵⁻¹⁷ Thomas 등의 차폐막에 대한 조직학적 연구에서, PLGA로 제작된 차폐막은 6주 까지 유지되었으나 12주 후에는 분해되었으며 2주 후부터 차폐막 주변으로 섬유성 피막이 형성되고 염증세포의 침윤을 보였다고 보고하였다.¹⁷

차폐막의 이러한 단점을 보완하기 위해 차폐막을 화학적으로 변화시키려는 시도가 행해지고 있으며, 그 중 하나가 HA를 이용하여 세포 친화성을 높이고 생체적합성을 증가시키는 것이다.¹¹ Lee 등은 PLGA와 HA가 혼합된 비계와 PLGA 단독으로 사용된 비계를 이용한 생체 외 실험에서 HA가 혼합된 비계가 더 높은 세포 부착을 보였다고 하였으며, HA는 세포 친화도를 증가시키는데 도움을 줄 뿐만 아니라 비계 내부로 물과 영양분의 이동을 보다 쉽게 하는 경향이 있다고 하였다.¹² 또한, West 등은 작은 HA 조각 (oligosaccharides)이 생체 내에서 angiogenesis를 자극하고 생체 외 세포 실험에서 혈관 내피세포의 증식과 이주를 자극한다고 하였으며, HA의 대사는 angiogenesis를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 하였다.¹³ 본 연구에서는 PLGA 차폐막의 세포 친화도를 증가시키며 조직 적합성을 높이기 위해 HA를 이용하였다.

차폐막을 사용하지 않는 군에서는 섬유성 조직과 지방조직이 골 결손 부위를 부분적으로 채우고 있었으며 골형성 정도가 미약하였다. 이에 비해 차폐막을 사용한 4가지 군에서는 효과적으로 차폐막의 역할을 하여 골 결손부 상부로부터 골이 채워지는 양상을 보였다. Ossix™는 12주 후에도 모양이 그대로 유지되고 있으며 차폐막을 따라 신생골이 형성되는 양상을 보인다. 3가지 실험군들은 모두 4주 후에 차폐막을 구분하기 어려웠으나 골형성이 8주 후에 골 결손부의 일부분이 채워진 Ossix™와 비교해 대부분 채워져 있으며, 12주 후에는 골이 성숙하여 기존 골과 구분이 어려운 것을 보여준다. 신생골 형성에 대한 정량적 분석이 이루어지지 않았지만, 실험군이 대조군에 비해서 골 형성이 많은 것을 보여준다.

실험군 간의 비교 연구 결과는 PLGA와 HA가 혼합된 PLGA를 비교했을 때, 3가지 군 모두에서 차폐막을 따라 섬유성 피막의 형성은 보이지 않았고, 흡수 정도가 모두 유사하게 나타났다.

결론

본 연구에서, 차폐막을 사용하지 않은 대조군에서 골형성은 12주 후에 나타났으며, 골 결손부를 일부 채우고 있었다. 신생골은 하방의 뇌경막을 따라 형성되었고 결손부의 상부는 결합 조직과 지방으로 채워져 있었다. 콜라겐 차폐막인 Ossix™는 4주

후부터 신생골을 보였으며 신생골은 차폐막을 따라 형성되어 있었고 12주 까지 차폐막이 유지되었다. PLGA, HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA는 4주 후부터 골 재생을 보이고 8주 후에 결손부를 전반적으로 채우고 있다. 12주에는 기존 골과 구분이 되지 않으며 잘 융합되어 있음을 알 수 있다. 차폐막은 4주 후부터 명확히 구분되지 않고 흡수되어 있었다.

PLGA와 HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA는 대조군에 비해 골의 형성이 빠르고 성숙 또한 빠르게 나타났으나, HA의 적용에 따른 차이를 보이지 않았다. 4주 후부터 흡수되어 차폐막으로써 임상에서 사용하기 위해서는 흡수 기간을 연장하여 조절 가능하도록 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ozimeric N, Bal B, Oygur T, Balos K. The effect of a collagen membrane in regenerative therapy of two-wall intrabony defects in dogs. *Periodontal Clin Investing* 2000;22:22-30.
2. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:58-62.
3. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deli Rev* 1997;28:5-24.
4. Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:1925-133.
5. Nam YS, Yoon JJ, Park TG. A novel fabrication method for macroporous scaffolds using gas foaming salt as porogen additive. *J Biomed Mater Res* 2000;53:1-7.
6. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterials development for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2347-59.
7. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003;20:1-16.
8. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski M, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997;36:17-28.
9. Ochi K, Chen G, Ushida T, Gojo S, Segawa K, Tai H, Ueno K, Ohkawa H, Mori T, Yamaguchi A, Toyama Y, Hata J, Umezawa A. Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone generation in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen sponge. *J Cell Physiol* 2003;194:45-53.
10. Kim SY, Kanamori T, Boumi Y, Wang PC, Shinbo T. Preparation of porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) membranes by a phase inversion process and investigation of their morphological changes as cell culture scaffolds. *J Appl Polym Sci* 2004;92:2082-92.
11. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:79-87.
12. Lee CT, Lee YD. Preparation of porous biodegradable poly(lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid blend scaffolds: characterization, in vitro cells culture and degradation behaviors. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:1411-20.

13. West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 1989;183:179-96.
14. Marinucci L, Lilli C, Baroni T, Becchetti E, Belcastro S, Balducci C, Locci P. *In vitro* comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in bone regeneration. *J Periodontol* 2001;72:753-9.
15. Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G. Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995;16:25-31.
16. Bostman OM, Pihlajamäki HK, Partio EK, Rokkanen PU. Clinical biocompatibility and degradation of polylactide screws in the ankle. *Clin Orthop Relat Res* 1995;320:101-9.
17. von Arx T, Nina Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: A histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:843-53.

Evaluation on the bone regenerative capacity of hyaluronic acid applied poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) membranes in rabbit calvarial defect

Nam-Sook Kim¹, DDS, MSD, PhD, Kwi-Dug Yun¹, DDS, MSD, Mong-Sook Vang¹, DDS, MSD, PhD,

Hong-So Yang¹, DDS, MSD, PhD, Hyun-Phil Lim¹, DDS, MSD, Sung-Soo Kang², MSD, PhD, Sang-Won Park^{1*}, DDS, MSD, PhD

¹Department of Prosthodontics, School of Dentistry, ²College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Purpose: The objective of the present study was to histologically evaluate durability and bone regeneration capacity of new synthetic membranes in comparison to clinically available collagen membrane. **Material and methods:** To the skulls of 12 rabbits, we created 4 bone defects of 6 mm in diameter on each of them. Each of defects were covered with at least one of 5 membranes: No membrane, Collagen (Ossix™), PLGA, HA-coated-PLGA and HA-PLGA/PLGA. After 4, 8, 12 weeks, we cut the skulls and dyed with H-E. And then, the histologic observation was done. **Results:** In current study, the control group which did not use the membrane showed bone regeneration at 12 weeks and covered the bone defect partially. New bones were formed through the underneath of endocranium, and the upper defect was filled with connective tissues and fats. Collagen membrane (Ossix™) showed new bones after 4 weeks, and they were formed through the membrane which maintained until 12 weeks. PLGA, HA-coated-PLGA, HA-PLGA/PLGA showed bone regeneration after 4 weeks and after 8 weeks, they mostly filled defects. At 12 weeks, we could find new bones and previous bones almost look alike and also, they united well. Membranes were unnoticeable after 4 weeks and were absorbed. **Conclusion:** Bone formation and maturation of PLGA, HA-coated-PLGA and HA-PLGA/PLGA were faster than the control group. They showed no difference on the application of HA and after 4 weeks, they were absorbed. (*J Korean Acad Prosthodont* 2010;48:158-65)

Key words: Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid), Hyaluronic acid, Membrane, Bone regeneration

*Corresponding Author: Sang-Won Park

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Chonnam National University, 77 Yongbong-Ro, Buk-gu, Gwang-Ju, 500-757, Korea

+82 62 530 5638; e-mail, psw320@chonnam.ac.kr

Article history

Received April 1, 2010/ Last Revision April 9, 2010/ Accepted April 15, 2010