

약물함유 생체분해성 차폐막의 세포 활성도 및 골조직 유도재생 효과

김원경* · 최상묵* · 한수부* · 권영혁*** · 정종평* · 이승진**

*서울대학교 치과대학 치주과학교실 및 치학연구소

**이화여자대학교 약학대학 제약학과

***경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주 치료의 목적은 치주질환으로 인하여 파괴된 조직을 재생하고, 치주인대섬유에 의해 치조골과 치근 사이의 신부착을 이루는것이다. Melcher는 치주 수술 후 치근면에 재형성(repopulation)되는 세포들은 각기 다른 표현형을 나타내므로, 치유 과정 중 이들 세포들에 의해 치근면 부착 양상이 결정된다고 하였다¹⁾. 또한 이들 세포 중 치주인대와 치조골로부터 유래된 세포들이 치조골 형성 능력이 있으며, 치주인대로부터 유래된 세포들만이 치주인대를 재생시킬 능력이 있다는 가설을 세웠다. 이후 치주 창상 회복에 관한 일련의 연구들을 통해 치주인대를 제외한 치주조직 즉, 치은 상피조직, 치은 결체조직 및 치조골로부터 유래된 세포들이 치근면에 재형성될 때 치주인대 섬유에 의해 치조골과 치근이 연결되는 대신, 상피조직 및 결체조직의 치근면 접착, 치근 흡수 또는 치아강직이 관찰되었다^{2~7)}. 따라서 소실된 치조골의 재생과 신생 백악질 및 치주인대의 재생을 유도하기 위해서는 치주 창상 부위로부터 상피세포와

치은 결체조직 세포들을 차단해야 한다는 이론이 제기되었다. 위 이론을 바탕으로 1980년대에 들어서 차폐막을 이용하는 조직유도재생술이 치주 재생을 위한 치료 방법으로 소개되었다⁸⁾. 차폐막으로는 Millipore filter^{8~10)}가 초기에 사용된 이래, 1980년대 후반부터 expanded polytetrafluoroethylene(e-PTFE) 차폐막이 사용되어 동물실험^{11~14)}뿐만 아니라 임상실험^{15~19)}에서도 치주 재생 효과가 입증되었다. 그러나 이 재료는 생체 내에서 흡수되지 않으므로 차폐막 제거를 위한 2차 수술이 필요한 단점이 있다. 이런 단점을 해결하기 위해 최근에는 생체 분해성 차폐막을 이용한 연구가 활발히 시행되고 있다. Type I collagen^{20~22)}, cargin²³⁾ 같은 교원질과 polyglactin 910²⁴⁾, polylactide-polyglycolide copolymer^{25, 26)}, polyurethane²⁷⁾, polylactic acid^{28, 29)} 등의 생체 분해성 고분자들이 연구되고 있으며, 치주재생 효과면에서 다양한 결과들이 보고되고 있다.

한편 성장인자는 체내에서 분비되어 다양한 세포 활동을 촉진하므로써 창상 치유에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 치주 재생

*본 논문은 한국 과학재단 연구비(94-0403-05) 지원에 의하여 이루어 졌음.

치치의 하나로서 치주인대 세포들의 이동, 증식 및 기질 합성을 촉진시키는 특정 성장인자를 사용하는 방법에 대해 활발히 연구되고 있다. 이러한 성장인자 가운데 하나인 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)는 분자량이 30 KDa인 조절 단백질로서 polypeptide chain 2개(A, B)가 서로 disulfide bond로 연결되어 있고, 동종 이량체(PDGF-AA, PDGF-BB) 및 이종 이량체(PDGF-AB)로 존재하며, 이들은 기능과 효과면에 있어서 서로 차이가 있다고 밝혀졌다³⁰⁾. 이들 가운데 PDGF-BB는 in vitro에서 치주인대 섬유아세포 및 골아세포에 대해 강한 화학주성 효과가 있으며, 이들 세포의 증식과 신생 교원질 및 신생골의 형성을 촉진한다고 보고되었다^{31~33)}. 동물 실험에서 PDGF-BB와 인슐린 성장인자^{34~36)} 또는 PDGF-BB와 dexamethason³⁷⁾을 혼합하여 치근면에 도포했을 때 치주조직의 재생이 촉진되었으며, 제3급 치근 분지부 병소에서 e-PTFE 차폐막과 병행하여 PDGF-BB를 치근면에 도포했을 때 차폐막을 단독으로 사용했을 때보다 치주 재생 효과가 우수하였다^{38, 39)}. 또한 PDGF-BB를 임플란트 표면에 도포했을 때 임플란트 주위의 골재생을 촉진시켜 대조군보다 임플란트 주위에 골유착이 빨리 일어났음이 보고되었다⁴⁰⁾.

치주 치치에 부가적으로 널리 사용되고 있는 tetracycline은 대부분의 치주염 원인균에 대해 높은 항균 효과를 보이며⁴¹⁾ 치근면을 탈회시키고⁴²⁾ 상아질 표면에 섬유아세포의 부착을 촉진하는 작용이 있음이 알려져 있다⁴³⁾. 또한 교원질 분해 효소에 대한 억제 효과^{44~49)} 및 골흡수를 억제하고 신생골의 형성을 촉진하는 효과가 동물 및 임상 실험을 통해 보고되었다^{50~52)}.

치주질환은 부분적으로 prostaglandin의 생성에 의해 매개되며, 이들의 생성을 억제하는 비스테로이드성 소염진통제들의 치주질환 진

행과정에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁵³⁾. Flurbiprofen은 비스테로이드성 소염제 중의 하나로서 동물^{54~56)} 및 임상 실험^{57~59)}을 통해 다른 비스테로이드성 소염제들보다 골 소실에 대한 억제 효과가 크다고 알려져 있다.

따라서 앞에서 언급한 성장인자나 약물들을 차폐막과 병행하여 사용한다면 차폐막의 물리적 차폐 기능과 더불어 이들의 치주 조직에 대한 효과로 인해 차폐막을 단독으로 사용하는 것보다 치주재생 효과가 증진될 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 국소약물송달 기법을 차폐막에 적용하여 차폐막으로부터 적정 농도의 약물을 결손부로 방출시킨다면 약물을 경구로 투여할 때처럼 결손부까지 약물이 도달하는 과정에서 약물 농도가 소실되는 것을 막을 수 있고, 약물 투여량을 감소시킬 수 있으므로 약물의 전신적 부작용을 피할 수 있다. 또한 약물 유지 시간이 짧아 지속적인 약물의 효과를 얻기 어려운 국소도포의 단점을 보완할 수 있다.

Tetracycline과 flurbiprofen이 함유된 poly-l-lactic acid와 polyglycolic acid의 생체분해성 차폐막을 제작, 실험한 김 등의 연구⁶⁰⁾에서 약물 함유 생체분해성 차폐막이 치주조직 재생 유도를 위해 이용될 수 있음을 제시한 바 있다.

이 연구의 목적은 tetracycline, flurbiprofen 및 PDGF-BB를 각각 함유시킨 다공성 생체분해성 차폐막을 대동물 실험에 적용하기에 앞서 생체 내에서 약물의 방출양상을 측정하고, 차폐막에 대한 세포 접착도 실험을 통해 차폐막과 조직의 접합성을 관찰하며, 차폐막에 함유된 PDGF-BB의 활성화도 및 백서 두개골에서 초기 골 조직 재생유도 능력을 평가하는 데에 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 차폐막의 제조

poly-L-lactic acid(PLLA, Purac Biochem Co., Gorinchem, Holland)를 염화메틸렌-에틸 아세테이트 혼합용액에 10% w/v가 되도록 녹인 후, 여기에 tetracycline(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 및 flurbiprofen(Taeguk Pharm. Co., Seoul, Korea)의 농도가 차폐막 중량의 5, 10, 15 및 20%가 되도록 혼합하였다. 이것을 polyglycolic acid(PGA) mesh (Samyang Co., Seoul, Korea)에 피복시키고 24시간 상온에서 건조한 후 다시 진공 건조시켰다.

PDGF-BB를 함유하는 차폐막을 제조하기 위해서 먼저 PLLA용액을 PGA mesh 상에 피복시키고 상온 건조하였다. PDGF-BB (Genzyme, CA, USA)를 차폐막 1cm²당 각각 100, 200, 400ng씩 되도록 함량을 달리하여 친수성 고분자인 polyvinylalcohol(PVA)용액 (Hayashi Pure Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan)에 혼합한 후, 이것을 앞서 제작한 차폐막에 다시 피복시키고 건조하였다.

2. 약물함유 차폐막의 세포 접착도 실험

실험에 사용할 세포를 배양하기 위해서 서울대학병원에 교정치료를 위해 내원한 환자의 제1소구치의 치은조직을 사용하였다. 채취 직전에 큐렛(Gracey, Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA)을 이용하여 치석 및 치태를 제거하고 생리식염수로 여러번 세척하였다. 국소마취를 시행하고 치간 부위에 내사면 절제를 가한 후 정상 치은조직을 채취하였다. 채취된 조직편을 100ug/ml penicillin(Gibco Lab., Grand Island, NY, USA)과 100ug/ml streptomycin(Gibco Lab. Grand Island, NY, USA)이 첨가된 -MEM(Gibco) 생검배지에 침수시켰다. 채취된 치은조직을 약 1 mm³으로 세절한 다음 35mm 세포배양 접시에 고르게 분산시켜 100ug/ml penicillin과 100ug/ml streptomycin 및 FBS 10%가 첨가된 α -MEM

을 이용하여 세포배양을 시행하였으며 3일간격으로 배양액을 교환해주면서 5세대 배양시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다.

24 well plate에 약물을 넣지 않은 차폐막, 10% tetracycline함유 차폐막, 10% flurbiprofen 함유 차폐막, 200ng/cm² PDGF-BB함유 차폐막을 각각 직경 1 cm 크기로 잘라 well의 바닥에 놓고 차폐막 주변에 agarose를 부어 차폐막을 고정함으로써 배양액 첨가로 차폐막이 부유하는 것을 방지하였다. 차폐막이 고정된 24 well plate는 UV-irradiation법에 의해 10분간 소독하였다. 계대 배양한 치은 섬유아세포를 0.25% trypsin-EDTA(Gibco)용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포 부유액을 만들고 표준 혈구계산기로 well당 1×10⁵개의 세포수가 되게 하여 well에 부착된 차폐막에 접종한 후 배양조건에 따라 24시간 배양하였다.

세포가 부착된 차폐막을 세척하여 부착되지 않은 세포는 제거하고 0.1M 인산완충 생리식염수(PBS, pH 7.4)에 녹인 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 40분간 전고정하였다. 고정 후 0.1M 완충 생리식염수로 세척하고 다시 0.1M 인산완충 생리식염수에 1% 농도로 녹인 osmium tetroxide로 0°C에서 40분간 후고정하였다. 이것을 -70°C에서 24시간 보관한 후 동결건조 하였다.

동결 건조된 시료는 gold-palladium을 도포하여 주사전자 현미경(Jeol Jsmcf-35, Japan)으로 관찰하였다.

또한 차폐막에 부착된 세포의 수를 측정하기 위해 세포가 부착된 차폐막을 세척하여 미부착 세포를 제거한 후 trypsin-EDTA를 가하여 차폐막에 부착된 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포를 배양액 1ml를 가하여 부유시키고 여기에 Isotone용액을 가하여 20ml의 세포 부유액을 만들어 coulter-counter를 사용하여

세포의 수를 측정하였다.

3. 차폐막에 함유된 PDGF-BB의 활성도 검사

차폐막에 함유된 PDGF-BB의 활성도를 검사하기 위해 PDGF-BB가 치은 섬유아세포의 세포 활성화에 미치는 효과를 평가하였다.

차폐막의 세포 접촉도 실험에서와 동일한 방법으로 5세대 배양시킨 치은 섬유아세포를 0.25% trypsin-EDTA(Gibco)용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로 부터 세포 부유액을 만들고 표준 혈구 계산기로 well당 1×10^5 개의 세포수가 되게 하여 접종한 후 배양하였다. 24시간 후 배양액을 교환하고 48시간 후 배양액을 제거한 다음, Hank's balanced salt solution(HBSS)(Gibco)으로 세척하였다. 시료로는 용출기에서 24시간 동안 $200\text{ng}/\text{cm}^2$ PDGF-BB함유 차폐막으로 부터 방출된 PDGF-BB 용액 이것과 같은 농도의 표준 PDGF-BB 희석액을 사용하였다. 이들을 각각 96 well plate에 $50\mu\text{l}$ 씩 넣고 여기에 배양액 $150\mu\text{l}$ 씩을 혼합하였다. 24시간 배양한 후 생리식염수에 용해한 methyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(Sigma) 용액 $50\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 MTT용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(Sigma)를 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, Bohannon, CA, USA)로 570nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료가 들어있지 않은 α -MEM 배양액 well를 사용하였고 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율(%)로 계산하였다.

4. 생체내 약물 방출 실험

체중 200-250gm의 백서(Sprague-Dawley

rat) 77마리를 무작위로 추출하여 한 군당 7마리씩 11군으로 분리하였다. Ketamine HCl(케타라, 유한양행, 한국)을 $10\text{mg}/\text{kg}$ 근육주사 하여 마취한 후 등의 털을 깎고 0.5% chlorhexidine으로 소독하였다. 백서의 등에 적절한 간격으로 여섯 부위에 10mm 길이로 수평 절개한 후 7mm 직경의 원형으로 제작한 5, 10, 15, 20% tetracycline함유 차폐막 및 flurbiprofen함유 차폐막과 100, 200, $400\text{ng}/\text{cm}^2$ PDGF-BB함유 차폐막을 피하조직에 매식하였다. PDGF-BB의 잔존 농도를 측정하기 위해 PDGF-BB¹²⁵I를 함유한 차폐막을 이용하였다.

백서 한 마리에 동일한 종류의 차폐막을 매식하였으며, 매식 후 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21, 28일째 각 군에서 한 마리씩 무작위로 추출하여 희생시키고 차폐막을 채취하였다. tetracycline 및 flurbiprofen함유 차폐막은 high pressure liquid chromatograph(HPLC, Waters, USA)로 차폐막에 잔존하는 약물의 농도를 분석하였으며, PDGF-BB함유 차폐막은 γ -scintillation counter로 잔존하는 PDGF-BB¹²⁵I의 농도를 측정하였다.

5. 골조직 유도재생 효과

(1) 동물 수술

체중 300-350gm의 백서(Sprague-Dawley rat) 48마리를 여덟마리씩 무작위로 추출하여 여섯군으로 분류하였다. 각 군의 백서는 entobar(Hanlim Pharm Co., Seoul, Korea)를 복강주사($30\text{mg}/\text{kg}$)하여 마취한 후, 두부의 털을 깎고 백서의 머리를 두부 고정기(cephalostat)로 고정하였다. 0.5% chlorhexidine으로 수술부위를 소독하고, 소량의 2% lidocaine HCl(1:100,000 epinephrine)으로 침윤 마취를 한 후, 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 절개하고 두개골을 노출시켰다. 편측 측두골에 trephine bur(3i Implant Innovations Inc., West Palm Beach, FL, USA

)를 사용하여 뇌막에 손상을 주지 않도록 하면서 직경 5mm의 원형 결손부를 형성하였다. 제1군은 음성 대조군으로 차폐막을 덮지 않았으며, 제2군은 양성 대조군으로 약물을 함유하지 않은 차폐막을, 제3군은 tetracycline 10%함유 차폐막을, 제4군은 flurbiprofen 10%함유 차폐막을, 제5군은 PDGF-BB 200ng/cm²함유 차폐막을, 제6군은 PDGF-BB 400ng/cm²함유 차폐막을 각각 결손부에 위치시키고 두피를 덮어 봉합하였다. 차폐막을 매식한지 1주, 2주째 각 군당 4마리씩 실험동물을 희생시키고 두개골을 절제하였다.

(2) 광학 현미경 검사 및 조직 계측학적 분석
각 군의 시편을 두 그룹으로 분리하여 한 그룹은 10% formalin에 고정 후 nitric acid에 넣어 탈회과정을 거치고 paraffin포매를 하여 4-7mm 두께의 조직편을 제작한 후 Masson-trichrome으로 염색하여 광학 현미경(Olympus BH-2, Olympus Ltd., Japan)하에서 조직소견을 관찰하였다. 나머지 시편은 70% 에탄올에 고정 후 탈수과정을 거쳐 methylmethacrylate acrylic resin에 포매 하여 경화시켰다. 경화된 시편을 Exakter microcutting system(Exakt-Apparateb, Hamburg, Germany)로 200-300 μ m의 두께로 절단하고 Exakter grinding system(Exakt-Apparateb, Hamburg, Germany)을 이용하여 20-30 μ m의 두께로 연마표본을 제작한 후 Von Kossa염색을 하였다. 광학 현미경에서 20배 배율로 확대된 조직표본 상을 video camera를 통해서 컴퓨터 모니터 상에 재현한 후, Global Lab Image Analysis system(Data Translation Inc, Malboro, MA, USA)을 이용하여 두개골 결손부의 석회화된 조직의 면적(mm²)을 계측하였다.

6. 통계 분석

각종 약물함유 차폐막 및 약물 비함유 차폐

막에 대한 치은 섬유아 세포의 접착도와 차폐막에 함유된 PDGF-BB의 치은 섬유아 세포 활성화도에 미치는 효과를 one-way ANOVA를 이용하여 통계분석 하였고 $p < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 평가하였다.

III. 연구 결과

1. 약물함유 차폐막의 세포 접착도 실험

각종 약물 함유 차폐막 및 약물 비함유 차폐막에 부착된 치은 섬유아 세포의 수를 계측한 결과, flurbiprofen함유 차폐막은 약물 비함유 차폐막보다 부착 세포수가 적었으며, tetracycline함유 차폐막은 약물 비함유 차폐막보다 부착 세포수가 약간 많았으나 통계적 유의성은 없었다($p < 0.05$). PDGF-BB함유 차폐막은 다른 차폐막보다 부착 세포수가 많았으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(그림 1).

약물 비함유 차폐막에 부착된 세포는 차폐막에 부착이 개시된 구형 및 세포 외형이 길게 신장된 형태를 보이기도 하였으나 대부분의 세포는 세포질이 방사선상으로 확장된 편평한 모양으로 나타났다(그림 2). Tetracycline

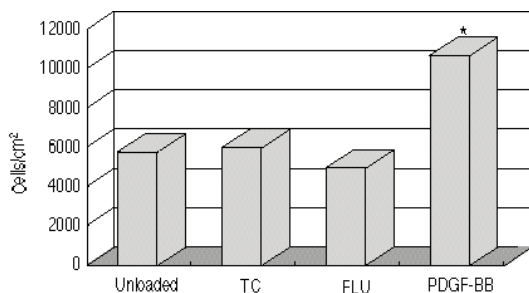


그림 1 Amount of gingival fibroblasts attached to the drug-loaded membranes.

Unloaded : drug-unloaded membrane, TC : 10% tetracycline-loaded membrane, FLU : 10% flurbiprofen-loaded membrane PDGF-BB : 200ng/cm² PDGF-BB loaded membrane.

*, Significantly different from other groups($p < 0.05$)

함유 차폐막에는 약물 비함유 차폐막과 비교할 때 다량의 치은 섬유아세포가 부착된 것을 관찰할 수 있었다. 부착 형태 역시 약물 비함유 차폐막에 비해 안정함을 보여주었다. 이때 전개된 세포는 평활하였으며 초기 부착 개시 시기에 보이는 미세용모(microfilament) 및 돌기(process)들은 보이지 않았다(그림 3). Flurbiprofen 함유 차폐막은 약물 비함유 차폐막과 비교했을 때 부착된 세포 수는 유사하나 그 양상이 다른데, 대부분의 세포가 구형을 이루고 있으며 세포질이 확장되거나 부착된 형태를 보이지 않았다. 일부만이 부착된 형태를 보였으나 대부분 표면의 미세공 안에 포착된 형태를 보여주고 있다(그림 4). PDGF-BB함유 차폐막에는 상당량의 치은 섬유아세포가 안정하게 부착되어 있으며 세포의 형태는 편평하고 옆으로 길게 신장된 방추상(spindle shape)으로 박판상(lamellapodia)을 갖고 있었다(그림 5). 특히 이 실험군에서는 이 시기에 세포분열에 의한 치은 섬유아세포의 증식도 관찰할 수 있었다.

2. 차폐막에 함유된 PDGF-BB의 활성도 검사

치은 섬유아세포 활성도에 있어서 차폐막으

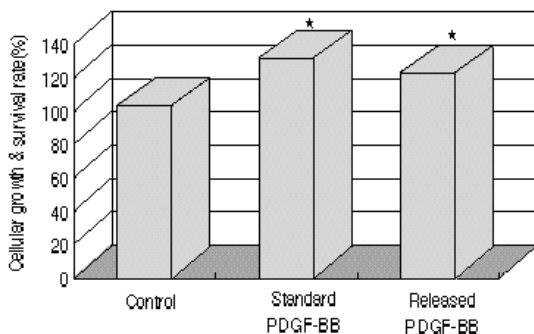


그림 6 Activity of PDGF-BB released from the membrane on the cellular growth and survival rate.

*, Significantly different from the control($p < 0.05$)

로 부터 방출된 PDGF-BB 실험군과 표준 PDGF-BB 실험군 모두 대조군보다 유의성 있게 높은 활성도를 보였으며 두 실험군 사이에는 유의적인 차이가 없었다(그림 6). 따라서 PDGF-BB를 차폐막에 함유시킨 후에도 이것의 생물학적 활성도는 유지되는 것으로 사료된다.

3. 생체내(in vivo) 약물 방출 실험

Tetracycline 5, 10, 15, 20%를 함유한 차폐막으로부터 1일째 각각 20, 52, 65, 96ug/ml로 약물이 최대방출된 이후 방출 속도가 감소하였으나 방출이 지속되어 4주동안 총 100, 130, 172, 300ug/ml의 약물이 방출되었다. 약물 함유량이 많을수록 일별 방출량도 증가한 양상을 보였다(그림 7).

Flurbiprofen 5, 10, 15, 20%를 함유한 차폐막으로부터 각각 1일째 12.5, 36, 83, 125ug/ml의 약물이 방출된 이후 4주동안 43, 150, 180, 230ug/ml의 약물이 방출되었다(그림 8). 15%

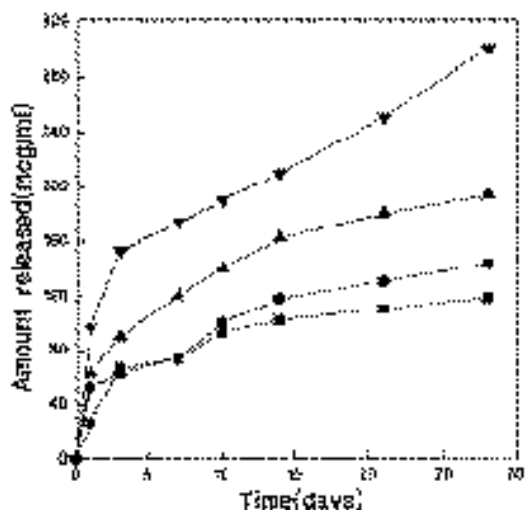


그림 7 In vivo tetracycline release from membranes Effects of loading contents on drug release kinetics.

(■) 5%, (●) 10%, (▲) 15%, (▼) 20%

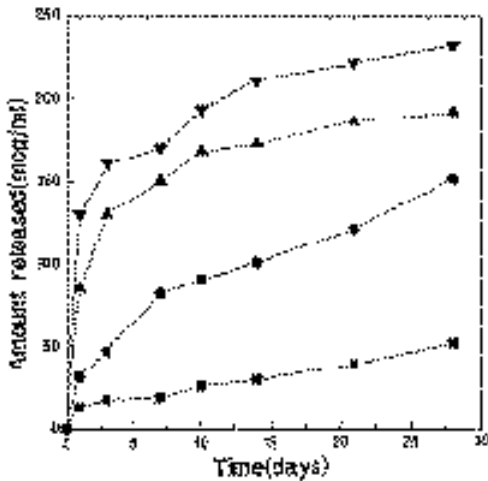


그림 8 In vivo flurbiprofen released from membranes. Effects of loading contents on drug release kinetics.
(■) 5%, (●) 10%, (▲) 15%, (▼) 20%

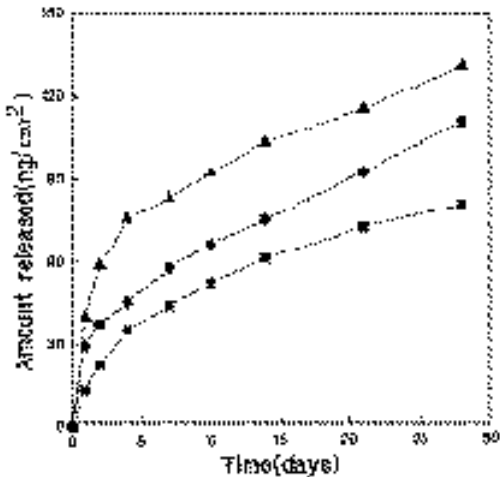


그림 9 In vivo PDGF-BB release from membranes. Effects of loading contents on drug release kinetics.
(■) 100ng, (●) 200ng, (▲) 400ng.

및 20% flurbiprofen 함유 차폐막은 최대 방출 이후 방출 속도가 급격히 감소되어 2주째부터 평균 일별 방출량이 5% flurbiprofen 함유 차폐막과 유사하였다. 반면에 10% flurbiprofen 함유 차폐막은 1주째부터 거의 일

정한 속도로 방출되어 일별 방출량이 다른 농도의 차폐막보다 높았다.

PDGF-BB 100, 200, 400ng/cm²를 함유한 차폐막의 경우 1일째 각각 13, 29, 40ng/cm²의 PDGF-BB가 방출된 후 4주 동안 총 80, 110, 130ng/cm²로 방출되었다(그림 9). PDGF-BB 함유 차폐막은 초기 최대 방출 이후 방출속도가 거의 일정하였다.

4. 골조직 유도재생 효과

(1) 1주 조직 소견

1군(음성 대조군, 차폐막을 덮지 않은 군)의 골 결손부에는 신생골의 형성이 극히 제한되어 일어났다. 결손부 대부분은 섬유성 결체조직에 의해 관통된 양상을 보였고, 염증세포의 침윤과 혈관들의 생성을 관찰할 수 있었다(그림 10).

2군(양성 대조군, 약물 비함유 차폐막 군)의 경우에는 경막(dura mater)쪽에서 음성 대조군보다 신생골 및 신생 골수 조직의 형성이 약간 증가하였으나 대부분의 결손부에는 결체조직이 존재하였으며 염증세포의 침윤도 관찰할 수 있었다(그림 11).

3군(10% tetracycline 함유 차폐막 군)에서는 1군 및 2군보다 결손부 변연으로부터 신생골이 중앙을 향하여 현저하게 성장하였으며 일부 표본에서는 신생골에 의해 골폐쇄가 일어난 소견도 관찰되었다(그림 12).

4군(10% flurbiprofen 함유 차폐막 군)에서는 차폐막 직하방에 섬유성 결체조직이 띠(band) 형태로 존재하고 그 하방에 섬세한 신생 골소주와 골수 조직이 발달하였으며 경막쪽에서 보다 많은 신생골이 형성되었다(그림 13).

5군(PDGF-BB 200ng/cm² 함유 차폐막 군)에서도 차폐막 직하방에는 결체조직이 존재하며 그 하방에는 골 결손부를 가로지르면서 상당한 양의 신생골이 형성되었다(그림 14).

6군(PDGF-BB 400ng/cm² 함유 차폐막 군)

의 경우에도 결손부에 많은 양의 골소주 및 골수 조직이 존재하며, 경막쪽에서 부분적으로 신생골에 의해 폐쇄된 양상이 관찰 되기도 하였다(그림 15).

2, 3, 4, 5 및 6군에서 차폐막은 전체적인 형태를 잘 유지하고 있었으며 차폐막 주변에 염증세포 침윤이 관찰되었다.

(2) 2주 조직 소견

1군에서는 1주 때보다 결손 변연부로부터 신생골의 형성이 증가하였으나 대부분의 결손 부는 결체조직으로 채워져 있었다(그림 16).

2군의 경우, 1군보다 많은 양의 신생골이 결손부 중앙을 향하여 형성되었는데 특히 경막 쪽보다 차폐막 쪽에서 신생골 형성이 두드러졌다. 또한 결손부 변연에서 멀어질수록 신생골의 두께는 얇았다. 결손부 중앙에는 섬세한 결체조직 섬유와 혈관들이 존재하였다(그림 17).

3군에서는 1주 때와 마찬가지로 1군 및 2군보다 신생골의 형성이 많이 일어났으며 결손부를 가로지르면서 신생 골소주 및 골수 조직이 풍부하게 발달되었고 일부 표본에서 결손부가 완전히 신생골에 의해 폐쇄된 양상도 관찰되었다(그림 18).

4군의 경우에도 결손부 변연으로부터 신생골이 현저하게 형성되어 부분적으로 골폐쇄를 보였다(그림 19).

5군에서는 대부분의 결손부가 신생 골소주 및 골수 조직으로 연결된 양상을 보였다(그림 20).

6군에서는 5군과 마찬가지로 결손부가 신생골에 의해 연결되었으나 신생골의 두께는 결손부 중앙으로 갈수록 얇았다(그림 21).

2, 3, 4, 5, 6군 모두 1주 때보다 신생골의 양이 증가하였고 보다 치밀한 양상을 보였다. 차폐막을 사용한 모든 군에서 차폐막 표면의 일부가 소량 흡수되고 차폐막 주변에서 대식세포 및 염증 세포를 관찰할 수 있었으나 차

폐막의 전체적인 형태는 비교적 잘 유지되고 있었다.

(3) 조직계측학적 분석

백서의 두개골 결손부에 형성된 신생골의 면적을 computer image analysis system을 이용하여 계측한 결과, 1주 및 2주 조직 소견과 비슷한 양상을 보였다(그림 22). 1주째 음성 및 양성 대조군에서는 신생골의 생성이 극히 소량이었으나 실험군에서는 상당한 양의 신생골이 형성되었다.

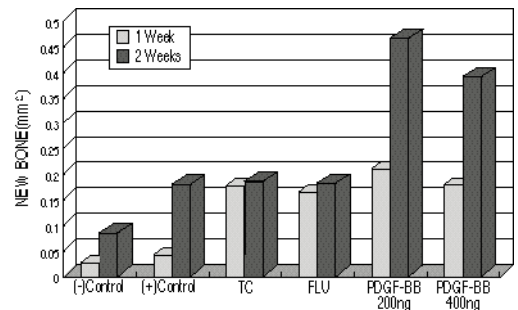


그림 22 Histomorphometric data for rat calvarial defects at 1 and 2 weeks post-implantation

2주째는 모든 군에서 1주째와 비교할 때 신생골 형성이 많았으며, 음성 대조군에 비해 양성 대조군 및 실험군에서 신생골 형성이 많이 일어났다. 특히 PDGF-BB 함유 차폐막 군에서 신생골 형성이 가장 많이 일어난 것으로 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

치주 재생 및 골 재생을 위한 치료로서 차폐막을 이용한 조직유도 재생술이 널리 이용되어 왔다. 그러나 차폐막을 단독으로 사용하는 경우, 차폐막의 상단부(coronal portion)와 치아의 완전한 밀착이 어려우므로 상피세포의 하방 증식을 완전히 차단할 수 없으며³⁸⁾,

제3급 치근 분지부 병소나 광범위한 골 결손 부에서는 치주 재생 및 골 재생에 한계가 있는 것으로 밝혀졌다^{38, 39, 61}). 이런 한계를 극복하기 위해 여러가지 방법이 시도되어 왔으며, 그 일환으로 본 실험에서는 tetracycline, flurbiprofen 및 PDGF-BB를 차폐막과 함께 사용하였다. PDGF-BB를 이용하는 방법으로는 수용성 gel³⁶⁾을 치근면에 도포하거나 methylcellulose^{34, 35, 40)}와 collagen matrix³⁷⁾같은 carrier molecule이 사용되어 왔는데, 수용성 gel이나 methylcellulose를 통해서 PDGF-BB의 효과를 지속적으로 얻기 어려웠으며 불용성 collagen은 창상 부위에 오랫동안 잔존함으로써 새로운 치주조직의 형성을 방해하는 문제점이 있다. 또한 tetracycline과 flurbiprofen을 기존과 같이 전신적으로 투여할 경우, 손상 부위에서 약효를 지속적으로 유지하기 위해서는 많은 양의 약물을 장기간 투여해야 하므로 이에 따른 부작용의 위험이 있다. 본 실험에서는 이러한 문제점을 보완하기 위해 차폐막을 국소약물 전달체로 이용하였다. 이 방법은 결손부에서 약효를 지속적으로 유지시킬 수 있을 뿐만 아니라 약물에 의한 전신적 부작용을 최소화 할 수 있다. 또한 carrier molecule이 따로 필요하지 않으므로 결손부에서 치주인대 세포나 골아세포들의 이동 및 증식을 방해하지 않는다. 다만 차폐막이 분해되는 과정에서 면역반응이 일어날 수 있는데, 김 등은 차폐막 매식 후 6주 동안 특이한 조직 이물 반응은 없었다고 하였다⁶⁰⁾.

차폐막의 요구 조건의 하나로서 조직과 접합성이 좋아야 한다^{61, 62)}. 차폐막을 결손부에 위치시켰을 때 주위의 결체조직이 차폐막과 접합됨으로써 차폐막이 제 위치에 고정되어 치유 부위의 안정을 꾀할 수 있으며, 상피조직의 하방 증식 및 외부로부터의 세균 침입을 효과적으로 막을 수 있다. 또한 차폐막이 연조직에 의해서 완전히 피개되기 어렵거나, 차폐막이 완전히 피개되었다더라도 치은 퇴축

에 의해 차폐막이 노출될 경우, 노출된 부위로 결체조직 세포들이 이동하여 차폐막을 피개할 수 있다면 치주조직 재생 효과가 감소되는 것을 막을 수 있다. 따라서 차폐막 표면으로 세포의 접착과 이동은 필수적이라 할 수 있겠다. 본 실험결과, PDGF-BB 및 tetracycline함유 차폐막에서 약물 비함유 차폐막보다 세포 접착도가 컸다. 특히 PDGF-BB 함유 차폐막에서 가장 높은 세포 접착도를 보였는데 그 이유는 PDGF-BB가 섬유아세포, 골아세포 등의 중배엽 기원 세포들에 대한 화학주성 효과가 뛰어나며 이들 세포의 분화 및 증식을 촉진했기 때문으로 생각한다.

Tetracycline함유 차폐막에서 PDGF-BB 함유 차폐막보다는 낮지만 약물 비함유 차폐막보다 높은 세포 접착도를 보인 것은 고농도(200ug/ml)가 아니면 위해작용 없이 섬유아세포의 접착을 촉진시키는 tetracycline의 작용에 의한 것으로 생각한다. 그러나 약물 비함유 차폐막에 비해 flurbiprofen함유 차폐막에서 세포 접착도가 낮은 것은 약물이 음전하를 띄고 있으므로 이것이 치은 섬유아세포와 반발 작용을 일으켜 접착을 방해한 것으로 보인다.

주사 전자 현미경으로 관찰 시, 접착 세포수가 많은 PDGF-BB함유 차폐막에서는 세포 형태가 옆으로 길게 신장된 방추상으로 박판상(lamellapodia)이 발달되어 있었던 반면, 접착 세포수가 제일 적은 flurbiprofen함유 차폐막에서는 세포들이 대부분 구형이었다. 이런 현상은 Willingham 등의 연구 결과와 일치하는데, 이들은 정상적인 접착 기능을 갖는 섬유아세포들이 접착력이 낮은 기질에 노출될 때 미세 용모(microfilament)는 사라지고 세포의 형태가 구형으로 변화한다고 하였다⁶³⁾.

PDGF-BB와 같은 peptide성 약물을 차폐막에 함유시킬 때 중요한 점은 이들의 활성을 유지하는 것이다. 화학 변화나 주위 환경에 의해서 peptide가 분해되거나 활성이 저하되기 쉬우므로 차폐막에 PDGF-BB를 함유시킨

후 활성도 변화를 고찰할 필요가 있다. Peptide의 활성도를 평가하는 데 있어서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)나 enzyme linked immunoabsorbant assay(ELISA) 혹은 peptide 특유의 작용의 변화를 관찰하는 방법이 이용되어 왔는데, SDS-PAGE의 경우 측정 범위가 100ug 이상이어야 하는 반면 PDGF-BB의 용출 범위는 ng단위이므로 측정이 곤란하였다. 본 연구에서는 섬유아세포에 대한 PDGF-BB의 증식 촉진 작용을 이용하여 치은 섬유아세포의 세포활성도 검사(cellular growth and survival assay)를 시행하였다. 검사 결과, 차폐막에 PDGF-BB를 함유시키기 전과 후의 세포 활성도에 차이가 없었으므로 PDGF-BB의 활성은 유지되는 것으로 사료된다.

약물함유 차폐막의 생체내 방출 양상을 보면 tetracycline함유 차폐막은 약물 농도가 높을수록 평균 일별 방출량이 증가하였다 반면, flurbiprofen함유 차폐막은 최대방출 이후 15% 및 20% 함유 차폐막의 방출 속도가 급격히 감소하여 2주째부터 10% 함유 차폐막에서 평균 일별 방출량이 가장 많았다. 따라서 flurbiprofen은 10% 함유 농도일 때 가장 바람직한 방출 양상을 보이는 것으로 사료되었다. 한편 김 등의 약물 농도에 따른 세포 독성 실험에서 tetracycline 및 flurbiprofen의 함유 농도가 15% 이상일 때 세포 독성이 있는 것으로 나타났다⁶⁰⁾. 이들 실험 결과에 근거하여 차폐막에 대한 세포 접촉도 실험과 골조직 유도 재생 실험 시, 10% 농도의 tetracycline 및 flurbiprofen 함유 차폐막을 사용하였다.

생체내 약물방출 양상의 조사는 골조직 유도 재생에 있어서 약물의 필요량을 결정하는데 필수적이라고 볼 수 있다. 그러나 지금까지 국소부위에서 얼마동안 어느 정도의 약물 유지량이 필요한지 보고된 바 없다. 다만 in vitro 실험을 통해서 Matsuda 등은 PDGF-BB의 농도가 0.1-1.0ng/ml일 때 치주인대세포들

의 증식이 촉진되었으며 10ng/ml의 농도에서 최대 효과를 보였다고 하였다³¹⁾. 또한 Oates 등은 0.1-50ng/ml의 PDGF-BB 농도에서 치주인대세포의 세포 분열이 농도에 비례하여 증가되었다고 하였다³²⁾. 본 실험에서 200ng/cm² 및 400ng/cm²의 PDGF-BB함유 차폐막으로부터 PDGF-BB가 1일째 최대방출량(29, 40 ng/cm²) 이후 4주동안 일별 방출량이 2-20ng/cm²이었으므로 PDGF-BB가 유효 농도로 장시간 방출되었다고 본다. 그러나 방출된 PDGF-BB는 조직 내에서 거대식세포 및 효소 등에 의해 빨리 분해되거나 다른 형태로 전환될 수 있으므로 국소 부위에서 얼마동안 방출 농도를 유지할 수 있는지 추측하기는 어렵다.

Tetracycline은 4-8ng/ml의 농도에서 치주 병인균에 대한 항균 효과를 보이며⁴¹⁾ in vitro 실험 결과, 5-10ug/ml의 농도에서 골 흡수를 억제 하였다⁵²⁾. 본 실험에서는 10% tetracycline함유 차폐막으로부터 2주까지의 평균 일별 방출량이 이 범위 내에 속하였으므로 최소한 2주동안 항균 효과와 골 흡수 억제 효과를 기대할 수 있으리라 추측된다. 이러한 결과는 Markman이 tetracycline을 첨가시킨 cellulose 차폐막을 이용하여 백서의 생체 내에서 약물 방출 실험한 결과, 첫날 218ug/ml의 최대 농도에 도달한 후 12일까지 20um/ml 이상의 농도를 유지시킨 것과 비교할 수 있다⁶⁴⁾. 그러나 교원질 분해 효소 억제 효과에 있어서 McCulloch 등⁴⁶⁾과 Burns 등⁶⁵⁾의 in vitro 실험에 의하면 Tetracycline의 IC₅₀은 각각 130ug/ml, 156ug/ml이었으므로 본 실험에서 방출된 농도에 비해 상당히 높았다. 따라서 골조직 유도 재생 실험에서 교원질 분해효소 억제 효과에 의한 골조직 재생 촉진은 낮으리라 생각한다.

골재생 유도 물질의 효과를 측정하기 위해서는 자연적으로 절대 치유가 불가능한 임계 치수 결손(critical size defect, CSD)만큼의 인

위적인 손상을 주어야 정확한 평가를 얻을 것으로 예측된다.

보통 백서의 CSD를 4-8mm로 보고하였는데⁶⁶⁾, 동물의 연령, 손상 부위, 내인성 요인에 의해 차이가 나므로 CSD를 정확히 결정하기는 어렵다. 본 실험에서는 CSD를 측정하여 결손부의 크기를 설정하지는 않았으며, 차폐막을 넣지 않은 음성 대조군 및 약물 비함유 차폐막을 넣은 양성 대조군의 결과를 실험군의 결과와 비교함으로써 약물함유 차폐막의 골조직 유도재생 효과를 평가하였다. 보다 객관적인 평가를 위해 광학 현미경에서 조직 소견을 관찰하였고 이와 병행하여 비탈회 표본에 Von Kossa 염색을 한 후 조직 계측을 통해 결손부에 형성된 신생골의 양을 정량화하였다⁶⁷⁾. Von Kossa 염색시 석회화된 골이 질산은(AgNO_3)과 반응하는데 석회화가 안된 골양 조직과는 반응이 일어나지 않으므로 조직 계측 결과와 조직 소견 사이에 차이가 있을 것으로 예측되었다. 그러나 본 실험에서 탈회 표본의 조직 양상과 조직 계측 결과 사이에는 큰 차이가 없었다.

차폐막 매식 1주 후 소견에서는 약물 비함유 차폐막 군에 비해 tetracycline 및 flurbiprofen 함유 차폐막 군에서 골조직 유도재생 효과가 크게 나타났으나, 2주 후 소견에서는 이들 사이에 큰 차이가 없었다. 이는 수술 과정에서 있을 수 있는 세균 감염이나 염증 반응에 의하여 약물 비함유 차폐막 군에서는 골조직 재생이 방해받을 수 있으나 약물 함유 차폐막 군에서는 약물의 항균 작용이나 소염 작용에 의해 골조직 재생이 크게 영향을 받지 않는다. 시간이 지나면서 세균 감염 및 염증반응이 감소함에 따라 약물 비함유 차폐막 군에서도 차폐막에 의한 골조직 유도재생이 일어나므로 약물 함유 차폐막 군과 골조직 재생 정도가 유사해졌으리라 추측된다. 반면에 PDGF-BB 함유 차폐막 군에서는 PDGF-BB 효과에 의해 결손 부위로 골아세

포들의 이동이 촉진되고 세포 분열을 통해 증식되면서 기질 합성이 활발히 이루어짐에 따라 다른 군보다 골조직 유도재생 효과가 우수했던 것으로 생각한다.

이상의 연구에서 약물함유 차폐막 중 특히 PDGF-BB 함유 차폐막은 골 결손부에서 PDGF-BB의 활성을 유지하면서 유효 농도로 방출되어 골조직 유도재생을 촉진할 수 있는 것으로 보이나, 향후 대동물 실험을 통해 장기적인 골조직 및 치주 조직의 유도재생 효과에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구는 poly-L-lactic acid와 polyglycolic acid로 제작한 다공성 생체분해성 차폐막에 치주 재생 효과가 있는 tetracycline, flurbiprofen 및 PDGF-BB를 각각 함유시켜 차폐막에 대한 치은 섬유아세포의 접착도와 차폐막에 함유된 PDGF-BB 활성도를 평가하였고, 백서의 피하조직에서 차폐막의 약물 방출을 측정하였으며, 백서의 두개골 결손부에서 약물함유 차폐막의 초기 골조직 유도재생 효과를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 접착도는 PDGF-BB 함유 차폐막에서 약물 비함유 차폐막, tetracycline 및 flurbiprofen 함유 차폐막보다 통계적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).
2. 차폐막에 함유시키기 전의 PDGF-BB와 함유시킨 후의 PDGF-BB 사이에는 세포 활성도에 있어서 유의한 차이가 없었다 ($p < 0.05$).
3. 모든 약물함유 차폐막은 1일째 최대 방출을 보인 후 4주동안 약물이 지속적으로 방출되었으며 특히 PDGF-BB 함유 차폐막은 약물 방출 속도가 거의 일정하였다. Tetracycline 및 PDGF-BB 함유 차폐막은 약물 함유량이 많을수록 평균 일별 방출량이 많았으며, flurbiprofen 함

유 차폐막은 10% 함유 차폐막에서 1주 이후부터 평균 일별 방출량이 제일 많았다.

4. 초기 골조직 유도재생 효과는 약물 함유 차폐막 중 특히 PDGF-BB 함유 차폐막에서 가장 크게 나타났다.

따라서 약물함유 차폐막 중 특히 PDGF-BB 함유 차폐막은 골 결손부에서 차폐 역할 뿐만 아니라 초기 회복기간 동안 PDGF-BB의 활성을 유지하면서 유효 농도로 방출되어 차폐막의 골조직 유도재생 효과를 증진시킬 수 있으리라 생각한다.

참고문헌

1. Melcher AH. : "On the repair potential of periodontal tissues." J Periodontol 47 : 256-260, 1976.
2. Karring T, Nyman S, Lindhe J. : "Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue." J Clin Periodontol 7 : 96-105, 1980.
3. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. : "Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue." J Clin Periodontol 7 : 394-401, 1980.
4. 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.
5. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. : "New attachment formation as a result of controlled tissue regeneration." J Clin Periodontol 11 : 494-503, 1984.
6. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. : "New attachment formation on

teeth with a reduced but healthy periodontal ligament." J Clin Periodontol 12 : 51-60, 1985.

7. 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.
8. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. : "New attachment following surgical treatment of human periodontal disease." J Clin Periodontol 9 : 290-296, 1982.
9. Aukhil I, Simpson DM, Schaberg TV. : "An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs." J Periodont Res 18 : 643-654, 1983.
10. Magnusson I, 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.
11. Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. : "Periodontal regeneration via selective cell repopulation." J Periodontol 58 : 546-552, 1987.
12. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. : "New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs." J Periodontol 59 : 589-594, 1988.
13. Claffey N, Mostinger S, Ambruster J, Egelberg J. : "Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs." J Clin Periodontol 16 : 12-16, 1989.
14. Claffey N, Hahn R, Egelberg J. :

- "Effect of placement of occlusive membranes on root resorption and bone regeneration during healing of circumferential periodontal defects in dogs." *J Clin Periodontol* 16 : 371-377, 1989.
15. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. : "New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports." *J Clin Periodontol* 13 : 604-616, 1986.
 16. Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. : "Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man." *J Clin Periodontol* 14 : 618-620, 1987.
 17. Becker W, Becker BE, Prichard JF, Caffesse R, Rosenberg E, Grasso JG. : "Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method : Three case reports." *J Periodontol* 58 : 819-826, 1987.
 18. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. : "Guided tissue regeneration in degree II furcation involved mandibular molars. A clinical study." *J Clin Periodontol* 15 : 247-254, 1988.
 19. Becker W, Becker BE, Berg L, Prichard J, Caffesse R, Rosenberg E. : "Root isolation for new attachment procedures." *Int J Periodontics Restorative Dent* 8(3) : 9-23, 1988.
 20. Van Swol RL, Ellinger R, Pfeifer J, Barton N, Blumenthal N. : "Collagen membrane barrier therapy to guided regeneration in class II furcation in humans." *J Periodontol* 64 : 622-629, 1993.
 21. Mundell RD, Mooney MP, Siegel MI, Losken A. : "Osseus guided tissue regeneration using a collagen barrier mambrane." *Int J Oral Maxillofac Surg* 51 : 1004-1012, 1993.
 22. Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ, Wikesjo UME. : "Effect of a collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs." *J Periodontol* 64 : 878-882, 1993.
 23. Card SJ, Caffesse RG, Smith B, Nasjleti C. : "New attachment following the use of a resorbable membrane in treating periodontitis in beagle dogs." *Int J Periodontics Restorative Dent* 9 : 59-69, 1989.
 24. Gager AH, Schultz AJ. : "Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane(Polyglactin 910) with and without osseous grafting : Case reports." *J Periodontol* 62 : 276-283, 1991.
 25. Gottlow J. : "Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices ; Initial healing and long-term results." *J Periodontol* 64 : 1157-1165, 1993.
 26. Vuddhakanok S, Slot CW, Mitchell JC, Foreman DW, Alger FA. : "Histologic evaluation of periodontal attachment apparatus following the insertion of a biodegradable copolymer barrier in humans." *J Periodontol* 64 : 202-210, 1993.
 27. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S. : "Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polactic acid or polyurethane." *J Clin Periodontol* 19 : 633-640, 1992.

28. Robert PM, Frank RM. : "Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane." *J Periodontol* 65 : 414-422, 1994.
29. Lundgren D, Laurell L, Gottlow J, Rylander H, Mathisen T, Nyman S, Rask M. : "The influence of the design of two different bioresorbable barriers on the results of guided tissue regeneration therapy. An intra-individual comparative study in the monkey." *J Periodontol* 66 : 605-612, 1995.
30. Caffesse RG, Quinones CR. : "Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration." *Periodontology* 2000 1 : 69-79, 1993.
31. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. : "Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro." *J Periodontol* 63 : 515-525, 1992.
32. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. : "Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro." *J Periodontol* 64 : 142-148, 1993.
33. Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego Jr. DJ, Shyr Y, Smith BA. : "The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium : An autoradiographic study on dogs." *J Periodontol* 65 : 429-436, 1994.
34. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. : "A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration." *J Clin Periodontol* 16 : 545-548, 1989.
35. Lynch SE, Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell H, Reddy MS, Antoniades HN. : "The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing." *J Periodontol* 62 : 458-467, 1991.
36. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. : "Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys." *J Periodont Res* 27 : 285-290, 1992.
37. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. : "Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys." *J Clin Periodontol* 20 : 537-544, 1993.
38. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. : "Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor." *J Periodontol* 66 : 462-477, 1995.
39. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. : "Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy." *J Periodontol* 66 : 522-530, 1995.
40. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. : "Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results

- of a pilot study in beagle dogs." J Periodontol 62 : 710-716, 1991.
41. Genco RJ. : "Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases." J Periodontol 52 : 545-558, 1981.
 42. Wikesjo UME, Christersson LA, Genco RJ, et al. : "A Biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment conditions dentin surfaces." J Periodont Res 21 : 322-329, 1986.
 43. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, Diflorio RM, Lyall RM, Wikesjo UME et al. : "A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth." J Periodont Res 21 : 330-337, 1986.
 44. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, et al. : "Tetracycline inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease." J Periodont Res 19 : 651-655, 1984.
 45. Golub LM, Lee WHM, Mcnamara TF, Ramamurthy NS, Zambon RJ, Ciacio S. : "Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources." J Periodont Res 20 : 12-23, 1985
 46. McCulloch CAG, Briek P, Overall C, Aitken S, Lee W, Kulkarni G. : "Randomized controlled trial of doxycycline in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients : antimicrobial activity and collagenase inhibition." J Clin Periodontol 17 : 616-622, 1990.
 47. Sasaki T, Ramamurthy NS, Yu Z, Golub LM. : "Tetracycline administration increases protein(presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozotocin-induced diabetic rats." J Periodont Res 27 : 631-639, 1992.
 48. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, Uitto VJ, Golub LM. : "Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus." J Clin Periodontol 19 : 146-149, 1992.
 49. Ingman T, Sorsa T, Suomalmmnen K, HalinenS, Lindy O, Lauhio A, Saari H, Konttinen, Golub LM. : "Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases." A review article. J Periodontol 64 : 82-88, 1993.
 50. Rifkin BR, Gomes BC, Kleckner A, Ramamurthy NS, Golub LM. : "An ultrastructural and morphometric study of effects of minocyclineand metronidazole on bone resorption." J Dent Res 65 : 517, 1986.
 51. Rifkin B, Sanavi F, Kleckner A, Gomes B, Ramamurthy NS, Golub L. : "A non-antibacterial tetracycline inhibits bone resorption in organ culture." J Dent Res 67 : 2068, 1988.
 52. Rifkin BR, Vernillo 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 : 819-827, 1993.
 53. Vogel RI, Schneider L, Goteiner D. : "The effects of a topically-active non-steroidal anti-inflammatory drug on

- ligature-induced periodontal disease in the squirrel monkey." J Clin Periodontol 13 : 139-144, 1986.
54. Jeffcoat MK, Williams RC, Wechter WJ, et al. : "Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles." J Periodont Res, 21 : 1-10, 1986.
 55. Offenbacher S, Braswell LD, Loos AS, Johnson HG, Hall CM, McClure H, Orkin JL, Strobert EA, Green MD, Odle BM. : "Effects of flurbiprofen on the progression of periodontitis in macaca mulatta." J Periodont Res 22 : 473-481, 1987
 56. Williams RC, Offenbacher S, Jeffcoat MK, Howell TH, Johnson HG, Hall CM, Wechter WJ, Goldhaber P. : "Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles : Effect on crevicular fluid arachidonic acid metabolites compared with effect on alveolar bone loss." J Periodont Res 23 : 134-138, 1988.
 57. Jeffcoat MK, Williams RC, Reddy MS, English R, Goldhaber P. : "Flurbiprofen treatment of human periodontitis: Effect on alveolar bone height and metabolism." J Periodont Res 23 : 381-385, 1988.
 58. Heasman PA, Benn DK, Kelly PJ, Seymour RA, Aitken D. : "The use of topical flurbiprofen as an adjunct to non-surgical management of periodontal disease." J Clin Periodontol 20 : 457-464, 1993.
 59. Jeffcoat MK, Reddy MS, Haigh S, Buchanan W, Doyle MJ, Meredith MP, Nelson SL, Goodale MB, Wehmeyer KR. : "A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis." J Periodontol 66 : 329-338, 1995.
 60. 김동균, 이승진, 정종평. : "약물함유 생체분해성 차폐막의 유도조직재생에 관한 연구." 치대 논문집, 18(2) : 47-73, 1994.
 61. Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. : "Devices for dentoalveolar regeneration." J Periodontol 66 : 495-505, 1995.
 62. Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P. : "Migration of gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials." J Periodontol 67 : 236-244, 1996.
 63. Willingham WC, Yamada KM, Yamada SS, Pouyssegur J, Pastan I. : "Microfilament bundles and cell shape are related to adhesiveness to substratum and are dissociable from growth control in cultured fibroblasts." Cell 10 : 375-580, 1977.
 64. Markman C, Fracalanzza SEL, Novaes JR, Novaes AB. : "Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration." J Periodontol 66 : 978-983, 1995.
 65. Burns F, Stack M, Gray R, Paterson C. : "Inhibition of purified collagenase from alkaline-burned rabbit corneas." Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 1569-1575, 1989.
 66. Kleinschmidt JC, Hollinger JO. : "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions." Clin Orthop 205 : 299-308, 1986.
 67. Hollinger JO, Buck D, Schmitz JP. : "Quantitative light microscopy : A powerful tool to assess bone." Clinics in plastic surgery 21 : 463-475, 1994.

사진부도 설명

- 그림 2 Scanning electron micrograph of gingival fibroblasts attached to a drug-unloaded membrane.($\times 1000$)
- 그림 3 Scanning electron micrograph of gingival fibroblasts attached to a 10% tetracycline loaded membrane.($\times 1000$)
- 그림 4 Scanning electron micrograph of gingival fibroblasts attached to a 10% flurbiprofen loaded membrane.($\times 1000$)
- 그림 5 Scanning electron micrograph of gingival fibroblasts attached to a 200ng/cm² PDGF-BB loaded membrane.($\times 1000$)
- 그림 10 Section from defect untreated after 1 week. New bone(B) formation was minimal and fibrous connective tissue(C) containing inflammatory cells was prominent. OB; old bone (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 11 Section from defect treated with drug-unloaded membrane after 1 week. New bone(B) formation was minimal and infiltration of inflammatory cells along the membrane(M) was noted. (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 12 Section from defect treated with 10% tetracycline loaded membrane after 1 week. New bone(B) formation was prominent beneath the membrane(M) C; connective tissue(Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 13 Section from defect treated with 10% flurbiprofen loaded membrane after 1 week. Defect was filled with a delicate expanse of new bony trabeculae and interposed marrow, and fibrous connective tissue(C) was noted just beneath the membrane(M). (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 14 Section from defect treated with 200ng/cm² PDGF-BB loaded membrane after 1week. Abundant amount of new bone(B) formed were observed between fibrousconnective tissue(C) in the defect. M; membrane(Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 15 Section from defect treated with 400ng/cm² PDGF-BB loaded membrane after 1 week. Remarkable new bone(B) formation was observed and connective tissue(C) wasinterposed in the defect. M ; membrane (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 16 Section from defect untreated after 2 week. New bone formation(B) from defectmargin was minimal. OB; old bone, C ; connective tissue (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 17 Section from defect treated with drug-unloaded membrane after 2 week. New bone(B) progressed from defect margin toward the center of the defect. C ; connective tissue M ; membrane (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 18 Section from defect treated with 10% tetracycline loaded membrane after 2 week. Numerous bony trabeculae and interposed bone marrow(B) were noted. C; connective tissue, M ; membrane (Masson's trichrome stain, $\times 40$)

- 그림 19 Section from defect treated with 10% flurbiprofen loaded membrane after 2 week. Defect was partially bridged by new bone and osteoid. M ; membrane (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 20 Section from defect treated with 200ng/cm² PDGF-BB loaded membrane after 2 week. Most of defect area were filled with new bone(B) but fibrous connective tissue(C) was interposed. M; membrane (Masson's trichrome stain, $\times 40$)
- 그림 21 Section from defect treated with 400ng/cm² PDGF-BB loaded membrane after 2 week. Defect was bridged by new bony trabeculae(B) and marrow. C ; connective tissue M; membrane(Masson's trichrome stain, $\times 40$)

사진부도 (1)

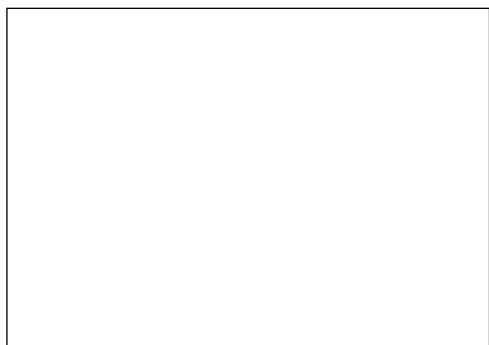


그림 2

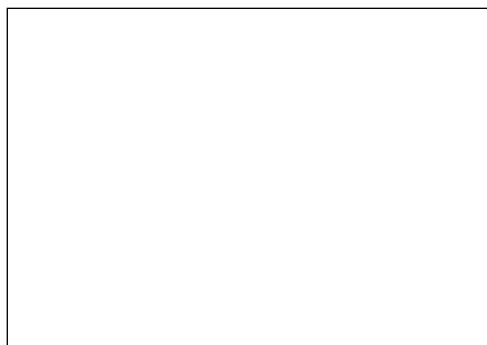


그림 3

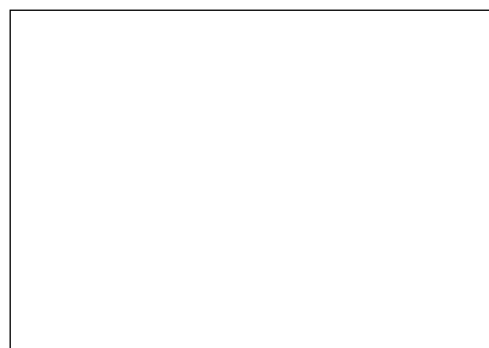


그림 4

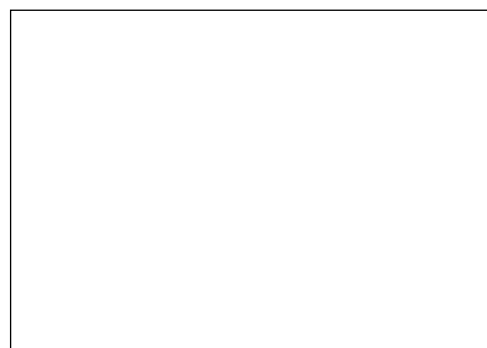


그림 5

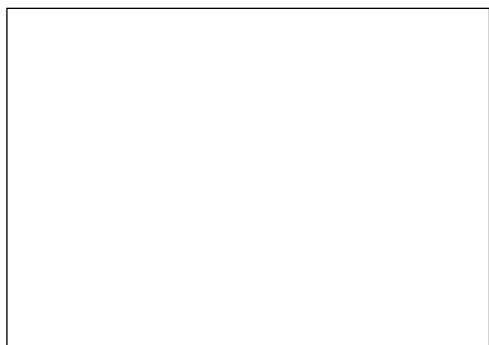


그림 10



그림 11

사진부도 (II)



그림 12



그림 13



그림 14



그림 15



그림 16

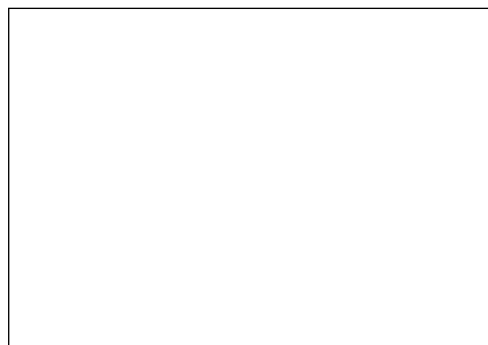


그림 17

사진부도 (Ⅲ)

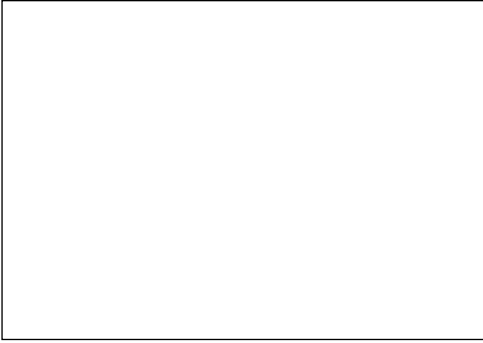


그림 18

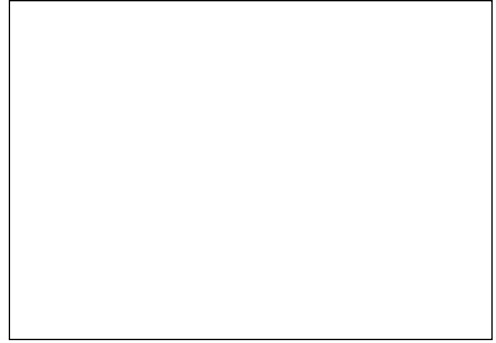


그림 19



그림 20



그림 21

Cellular activity and guided bone regenerative effect of drug-loaded biodegradable membranes

Won-Kyeong Kim*, Sang-Mook Choi*, Chong-Pyoung Chung*,
Soo-Boo Han*, Young-Hyuk Kwon***, Seung-Jin Lee**

*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University
and Dental Research Institute

**Dept. of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University

***Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The purpose of this study was to evaluate the effects of tetracycline(TC), flurbiprofen, and PDGF-BB loaded biodegradable membranes on the cell-attachment, the activity of loaded PDGF-BB, in vivo release kinetics, and guided bone regenerative potentials. To evaluate the cell attachment to membranes, the number of gingival fibroblasts attached to each membrane(10% TC, 10% flurbiprofen, 200ng/cm² PDGF-BB loaded membranes, drug-unloaded membrane) was counted by coulter counter and the morphologic pattern of attached cells was examined under SEM. To determine whether the activity of loaded PDGF-BB is sustained, the cellular growth and survival rate of gingival fibroblasts was used for both standard PDGF-BB and loaded PDGF-BB. For evaluation of in vivo release kinetics, drug-loaded membranes were implanted on the dorsal skin of the rats. On 1, 3, 7, 10, 14, 21, and 28 days after implantation, the amount of remaining drugs were measured by HPLC assay for TC and flurbiprofen, and by γ -scintillation counter for PDGF-BB¹²⁵. For evaluation of guided regenerative potential, the amount of new bone in the calvarial defects(5mm in diameter) of the rat was measured by histomorphometry 1 and 2 weeks after implantation of membranes. The number of cells attached to the PDGF-BB loaded membrane was largest as compared with the other membranes.($p < 0.05$) The activity of loaded PDGF-BB was not significantly different from the activity of standard PDGF-BB.($p < 0.05$) After initial burst release of drug during the first 24 hours, drugs were gradually released for 4 weeks. Especially the release rate of PDGF-BB was nearly constant during 4 weeks. PDGF-BB loaded membranes(200, 400ng/cm²) were effective in guided bone regeneration as compared with drug-unloaded membrane. These results implicate that drug-loaded biodegradable membranes might be a useful for guided bone regeneration.

Key words ; drug-loaded biodegradable membrane, guided bone regeneration, flurbiprofen,PDGF-BB, tetracycline