

골 조직 치유과정에서 Collagen 막의 효과

김재봉 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 전 인류의 구강내에 발생하는 질환으로 임상적으로 다양한 증상을 나타내고, 치은출혈과 종창, 치주낭의 형성 및 치조골의 파괴를 일으켜 성인에 있어 치아상실의 주된 원인이 되고 있다. 이러한 치주조직의 파괴에 대한 원인을 규명하고, 질환의 진행과정을 차단, 방지하며 지지조직을 재생시키는 데 치주치료의 목적이 있다.

치주질환을 비롯하여 여러 원인에 의해 악골의 일부가 상실되고 자생적 회복을 이룰 수 없는 경우 임상적으로 자가골과 다양한 골대용 생체 재료를 이용한 골이식술¹⁻³⁾ 및 차폐막을 이용한 조직유도재생술^{4,5)}이 이용되고 있으며 그 외에 실험적으로 성장인자를 적용시키는 방법⁶⁻⁸⁾이 활발히 연구되어져 오고 있다.

성장인자의 적용법은 다양한 방법이 있으나 주로 성장인자함유매개체를 사용한 방법이 보고되고 있으며 현재까지 각종 문헌에 보고된 함유매개체로는 methylcellulose gel⁹⁾, polyorthoester membrane¹⁰⁾, porous polysulfone¹¹⁾, tricalcium phosphate¹²⁾, fibronectin¹³⁾, 탈회동결건조골¹⁴⁾, collagen^{8,12,15)} 등이 있다.

이 중 collagen은 고등척추동물의 단백질중 가장 많은 양을 차지하며, 총단백량의 20-30%를 차지하는

단백질로서 피부, 골, 인대, 연골, 치아 등에 높은 농도로 존재한다^{16,17)}. Collagen은 높은 인장강도, 낮은 신장성을 가지며 항원성이 낮고 상처치유 및 혈액응고를 촉진시키며 교차결합을 조절하여 원하는 성질을 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁻²¹⁾ 이러한 성질을 이용하여 다양한 생체재료로 이용되고 있는데 인공심장판막²²⁾, 인공고막²³⁾, 인공신장의 투석막¹⁹⁾, 연조직증강 및 연조직 결손의 회복²⁴⁻²⁶⁾ 등을 위한 생체재료로 사용되어져 왔으며, 그 외에 지혈제로 광범위하게 이용되어져 왔다^{27,28)}.

치주영역에서는 조직유도재생술을 위한 차폐막^{29,30)}, 치주점막수술에서 구개부 공여부의 출혈조절을 위한 지혈제^{31,32)} 등으로 이용되고 이식재 및 약제의 함유매개체^{8,12,15,33-35)}로의 사용이 연구되고 있으며, gel³⁶⁾, sponge³⁷⁾, solutions³⁸⁾, membrane^{29,30)} 등의 다양한 형태가 보고되고 있고, 조직의 회복을 촉진시킬 목적으로 collagen을 세포의 기질, 이식재나 약제의 매개체로 사용한 많은 연구가 진행되어 왔다. 시험관적 실험에서, Rovira 등³⁹⁾은 calcium phosphate, elastin, collagen의 중합체에서 사람의 골전구세포가 분화의 방해 없이 세포의 증식이 일어난다고 보고하였고, Mizuno 등⁴⁰⁾은 type I collagen matrix가 조골세포의 분화를 위한 적절한 환경을 제공한다고 보고하였다.

생체실험에서, Marchand 등⁴¹⁾은 절단된 척수에

collagen matrix를 주입시 증식하는 결체조직과 이중 세포들을 위한 scaffold를 형성하여 치유를 촉진시킨다고 보고하였고, Blumenthal 등³³⁾, Yaffe 등³⁸⁾은 치주질환으로 인한 3벽성 골내병소에 각각 collagen gel과 solution을 적용시 collagen이 치주인대세포에 화학주성을 나타내고, 상피세포의 치근단방향으로의 이동을 방해한다고 보고하였으며, Bell 등³⁴⁾은 tricalcium phosphate, hydroxyapatite를 collagen과 혼합하여 쥐의 하악에 형성된 결손부에 적용시, collagen에 의한 조직의 치유방해는 없었다고 보고하였고, Helm³⁵⁾등은 자가골과 혼합된 collagen gel이 골아세포의 성장을 위한 골전도성 기질을 제공한다고 보고하였다.

Collagen을 성장인자 함유매개체로서 사용한 보고로서, Nevins 등¹⁵⁾은 상악동의 기저막을 거상하고 BMP를 함유한 collagen을 적용시 새로운 골이 형성되며 collagen에 의한 면역반응이나 독성반응은 없었다고 보고하였고, Horisaka 등⁴²⁾은 BMP를 collagen solution에 혼합하여 적용시 collagen이 새롭게 형성된 결체조직과 세포를 위한 공간을 제공하고 서서히 흡수되어 골로 대체된다고 보고하였다.

이에 반해, Mattsson 등⁴³⁾은 collagen 지혈제를 쥐의 하악에 형성한 골결손부에 적용시 만성염증이 관찰되고 골의 치유를 방해한다고 보고하였고, Solheim 등⁴⁴⁾은 collagen paste가 골유도성을 방해하고 대식세포에 의한 만성염증을 유발한다고 보고하였으며, 조 등¹²⁾은 혈소판유래성장인자의 함유매개체로 collagen을 사용시 염증반응이 심하게 나타나며 성견의 치근이개부병변의 치유를 저해하였다고 보고하여 생체에 적용된 collagen에 대해 다양한 조직반응이 나타남을 시사하였다.

따라서, 생체적용시 적용된 collagen이 골조직 치유에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 백서의 두개부에 인위적으로 결손부를 형성하고 collagen 막을 적용시켜 생체에서의 반응을 조직학적으로 살펴 보아, 향후 골조직 치유시 및 약제 매개체로서의 사용 가능성을 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 약 2개월된 200g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계의 백서 24마리를 실험대상으로 사용하였으며, 대조군과 실험군에 각 12마리씩 배정하여 동일조건하에서 고정사료로 사육하였다.

2. 외과적 수술 방법

실험동물은 32.5mg/kg sodium pentobarbital(근화제약, 한국)을 복강주사하여 전신마취시키고, 수술부위의 털을 깨끗이 제거한 후 zephiran으로 소독하였다. 1:80,000 에피네프린이 함유된 2% 리도카인을 지혈 및 국소마취의 목적으로 두개부 표피에 주사하고, #15 수술도로 두개부의 정중부를 절개하여 전층판막을 거상하였다. 지름 5mm의 trephine bur로 측두골에 결손부를 형성하며, 골삭제시 열발생을 방지하기 위해 식염수로 세척을 시행하였다. 대조군은 결손부만을 형성하고, 실험군에는 식염수를 흡수시킨 collagen 막(COLLATAPE®, COLLA-TEC, INC, U.S.A.)을 삽입한 후, 5-0 vicryl®을 사용하여 봉합하였다.

3. 실험동물의 희생 및 조직표본의 제작

술 후 감염을 방지하기 위해 1주일간 1.5ml/kg ampicillin을 1일 1회 근육주사하고, 술 후 3, 7, 14, 21일에 대조군과 실험군에서 각 군당 3마리씩의 백서를 paraformaldehyde(이하 PFA)로 관류고정하여 희생시켰다. 측두골을 채취하여 즉시 4% PFA 용액에 추가고정하고 10% EDTA 용액에 2주간 탈회하였다. 충분히 탈회가 이루어진 뒤, 통법에 따라 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μ m의 박절표본을 제작, hematoxylin-eosin(이하 H-E) 염색하에 검경하여 치유양상을 관찰하였고, 파골세포의 활성을 관찰하기 위해 tartrate resistant acid phosphatase(이하 TRAP) 염색을 시행하였다.

4. 대식세포에 대한 Immunohistochemical stain

적용된 collagen의 흡수양상을 관찰하기 위해 대식세포에 대한 immuno- histochemical stain을 ABC kit(VECTASTAIN®, Vector Laboratory Inc. U.S.A)를 사용하여 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) method⁴⁵⁾로 아래와 같이 시행하였다. 조직표본을 ethanol과 xylene으로 deparaffinization 및 rehydration시키고, phosphate buffered saline(이하 PBS) 용액으로 10분간 세척한 후 endogeneous peroxidase activity를 제거하기 위해 3% peroxide에 10분간 침수시켰다. 다시 PBS 용액으로 2분간 3회 세척하고 1시간동안 normal serum으로 block을 시행한 후 primary antibody를 적용하여 4℃에서 약 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 2분간 3회 PBS용액으로 다시 세척하고 biotinylated secondary antibody를 적용하여 30분간 반응시켰다. PBS 용액으로 2분간 3회 세척 후 10분간 enzyme conjugate를 적용하고 다시 PBS 용액으로 2분간 3회 세척한 후 발색을 위해 substrate-chromogen mixture(3,3'- diaminobenzidine in Tris-HCl buffer containing 6% hydrogen peroxide)를 적용하여 현미경으로 대식세포의 발색을 관찰하고, 발색이 나타나면 증류수로 세척하여 반응을 중지시키며 1% methyl green으로 대조염색을 시행하였다.

III. 연구성적

1. 조직학적 소견(H-E 염색)

(1) 실험 3일의 조직학적 소견

대조군에서 골결손부는 섬유성결체조직으로 채워져 있으며, 골결손부의 가장자리에서 염증세포의 침윤에 의한 급성염증소견이 관찰되었다. 실험군의 골결손부에 적용된 collagen 막이 보이고 골결손부의 가장자리에 염증세포의 침윤에 의한 급성염증 소견이 관찰되었다. 대조군과 실험군 공히 새로운 골형성의 소견은 보이지 않았다(Figure 1, 2 참조)

(2) 실험 7일의 조직학적 소견

대조군과 실험군 모두 염증세포의 침윤에 의한 염증소견이 관찰되었으며, 골결손부의 가장자리에서 미약한 골조직 형성으로 골성회복 소견이 관찰되었다(Figure 3, 4 참조).

(3) 실험 14일의 조직학적 소견

대조군에서 실험 7일에 비해 염증세포의 침윤이 감소되어 나타났으나, 실험군에서는 염증세포의 침윤에 의한 염증소견이 관찰되었다. 대조군과 실험군 모두에서 점차적인 골성회복이 관찰되었으며, 실험군에서 적용된 collagen 막의 흡수가 관찰되었다(Figure 5, 6 참조).

(4) 실험 21일의 조직학적 소견

대조군과 실험군 모두에서 염증세포의 침윤에 의한 염증은 거의 소실되었으며 점진적인 골성회복이 관찰되었으나 결손부의 완전한 골성회복은 이루어지지 않았다. 실험군에서 적용된 collagen 막의 흡수가 관찰되며 대조군과 실험군 사이의 골조직 치유양상은 큰 차이가 없었다(Figure 7, 8 참조)

2. 파골세포 활성소견

전반적인 소견으로 볼 때, 대조군과 실험군에서 특이적인 파골세포의 활성은 관찰되지 않았다(Figure 9, 10 참조).

3. 대식세포에 대한 immunohistochemical stain

대조군에서는 대식세포가 관찰되지 않았으며, 실험군에서 collagen 막의 흡수가 나타난 14일에 적용된 collagen의 섬유성 구조사이로 다수의 응집된 대식세포가 관찰되었다(Figure 11 참조).

IV. 총괄 및 고안

치주치료의 궁극적인 목적은 파괴된 치주조직 결

손부에 신생골과 신생백악질 형성 그리고 그 사이에 기능적으로 배열된 치주인대가 형성되는 치주조직의 재생이다. 최근에 치주조직의 재생에 관여하는 여러 조직에 대한 성질과, 이들 각종 세포의 고유성장 및 화학주성이 규명되고 조직치유과정에서 신속한 세포의 이동과 증식이 중요하다는 것이 밝혀지면서 치유에 관여하는 세포의 성장 및 활성을 조절하려는 노력이 시행되어져 왔다. 이러한 연구에서 성장인자가 조절인자로서 중요하다고 알려지고⁴⁶⁾ 있으며, 실험적으로 이들 성장인자를 적용하여 조직의 치유 촉진을 도모한 연구⁶⁻⁸⁾와 성장인자의 적용법으로 성장인자 함유매개체의 사용에 대한 연구⁹⁻¹⁵⁾가 활발히 진행되어져 오고 있다.

성장인자함유매개체는 생체에서의 사용이 궁극적인 목적이므로 일반적인 생체재료의 조건을 가져야 하며, 생체재료로 사용되기 위해서는 여러 가지 요구조건이 있으나, 일반적으로 목적에 맞는 성질 및 생체적합성이 있어야 한다. 각종 문헌에 보고된 성장인자함유매개체 중 collagen은 화학적 및 물리적 방법으로 처리하여 원하는 성질을 얻을 수 있는데, 화학적인 방법으로는 glutaraldehyde, formaldehyde, metal ion 등으로 처리시 생체분해에 대한 저항성이 높아지는 것으로 알려져 있고^{20,47)} hyaluronic acid와 중합시 효소에 의한 분해에 저항성이 증가되며 팽창성은 감소한다고 알려져 있다⁴⁸⁾. 물리적인 방법은 자외선 조사 및 열처리가 있으며 collagen의 기계적 성질 특히, 점조도를 변화시키는 것으로 보고^{9,49)}되고 있다. 본 실험에 사용된 collagen은 bovine type I collagen을 aldehyde로 화학적 처리한 것으로⁴⁷⁾ 유리치은이식술시 공여부의 지혈제로 사용되어져 왔으며 collagen의 삼중나선구조가 혈소판을 응집하여 지혈작용을 촉진시키는데 lysin의 6-아미노군이 중요한 역할을 하는 것으로 보고^{19-21,32)}되고 있다. 이러한 collagen 지혈제는 그 구조자체가 섬유형태이기 때문에 섬유사이의 공간으로 인해, 액체물질에 침수했을 경우 약제를 함유할 여백이 많다는 점을 이용하여 약제 함유매개체로서의 사용가능성이 많이 보고^{12,19,20,32)}되어 왔다.

Ratner⁵⁰⁾는 생체재료의 생체 내에서의 반응을 4가

지로 분류하여 보고하였다. 첫째, 전형적인 foreign-body reaction으로, 다형핵백혈구, 대식세포 등의 세포들이 강하게, 그러나 비특이적으로 반응하는 것으로 비록, 반응의 강도가 약한 경우 정상적인 반응으로 간주되지만 조절이 되지 않는 경우, 섬유화, 반흔 형성, 만성 염증 등을 유발한다. 둘째, 세포의 반응이 미약하여 생체에서 불활성인 경우이고, 셋째, 생체재료와 세포가 특이적으로 반응하여 세포의 분화가 촉진되는 경우이며, 넷째, 세포가 생체재료내로 함입되어 세포가 정상적인 생리적 기능을 하는 경우이다.

Collagen으로 만들어진 생체재료는 생체내에서 비교적 양호한 생체적합성을 나타내는 것으로 보고되고 있는데, collagen의 항원성은 주로 telopeptide에 의해 생기고 이것은 효소나, 화학적 방법에 의해 제거될 수 있으며^{19,20,51)}, 교차결합을 통해 이 부분을 비활동적으로 만들 수 있고^{19,52)}, DeLustro 등^{21,24)}은 연조직 결손 수정시 bovine collagen으로 만들어진 주입형태의 collagen이 소수의 환자에서 국소적인 과민반응을 보이거나 과민반응이 제한적이며 collagen이 흡수됨에 따라 과민반응이 사라진다고 보고하였으며 이는 연조직 결손의 수정에 쓰이는 다른 collagen 생체재료에서도 유사한 결과가 보고^{25,51)}되고 있다.

Collagen이 조직의 치유를 돕는 생체재료로서 사용된 보고로서, Doillon 등¹⁸⁾, Chvapil 등²⁰⁾은 collagen의 섬유성구조로 인한 다공(porosity)이 collagen 내로의 세포의 유입을 가능하게 해준다고 보고하였으며, Deporter 등⁵³⁾은 골결손부에 적용된 collagen이 골전도성 물질로 작용하여 골조직의 치유를 촉진시킨다고 보고하였고, Marchand 등⁴¹⁾은 절단된 척수에 collagen matrix를 주입시 증식하는 결체조직과 이종세포들을 위한 scaffold를 형성하여 치유를 촉진시킨다고 보고하였다. DeLustro 등²¹⁾은 type I collagen이 골단백질의 대부분을 차지하는 구조단백질이고 유기질의 90%이상을 차지하며, 따라서 골결손부의 치유시 가교역할을 하는 기질로서 collagen이 사용될 수 있고, 골형성 세포의 성장을 위한 scaffold의 역할을 한다고 보고하였다. 그러나, 이러한 보고와는 대조적으로 DeLustro 등²¹⁾은 생체에 적용된 collagen의 비교원성 불순물이 염증반응 및 면역반응을

증가시킬 수 있다고 보고하였고, 조 등¹²⁾, Mattsson 등⁴³⁾, Solheim 등⁴⁴⁾은 collagen에 의해 염증반응이 발생하고, 골조직 치유를 저해한다고 보고하여, 생체에 적용된 collagen에 대해 다양한 조직반응이 나타남을 시사하였다. 따라서, collagen의 생체적용시 적용된 collagen이 골조직 치유에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 백서의 두개부에 인위적으로 결손부를 형성하고 collagen 막을 적용시켜 생체에서의 반응을 조직학적으로 살펴보고, 향후 골조직 치유시 및 약제 매개체로서의 사용가능성을 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

본 실험에서 연조직의 전반적인 치유양상은 대조군에서는 14일째부터 염증반응이 감소되었으나, 실험군에서는 14일째까지 염증반응이 지속되었고 21일째부터 염증이 감소되었는데, 이는 성견의 치근이 개부병소에 혈소판유래성장인자-BB의 함유매개체로서 collagen을 적용하여 14일째의 조직소견에서 염증세포의 침윤을 보고한 조 등¹²⁾의 연구와 유사한 결과이다. 본 실험에서는 21일째부터 염증이 감소되어 나타났으나 Solheim 등⁴⁴⁾은 collagen paste를 피하에 삽입 후 4주째의 조직소견에서 대식세포에 의한 만성염증을 보고하였고, Mattsson 등⁴³⁾은 토끼의 하악에 형성한 골결손부에 collagen 지혈제를 삽입시 1주와 2주까지 다핵거대세포 및 림프구에 의한 염증반응이 일어났으며, 8주째까지 지속되었다고 보고하였는데 이러한 염증의 지속은 collagen 적용부위, 사용한 collagen 및 실험동물의 차이에 기인하는 것으로 사료되고 collagen 적용군에서 염증반응이 더 심하게 나타나는 것은 본 실험과 일치하였다. 따라서, 적용된 collagen이 연조직 치유에 있어 주위 연조직에 대한 염증유발인자로 작용하는 것으로 사료된다.

본 실험의 전반적인 골조직 치유양상은 대조군과 실험군 모두 7일째부터 골결손부의 가장자리에서 미약한 골조직 형성으로 골성회복 소견이 관찰되었고, 21일째까지 대조군과 실험군 모두 점진적인 골성회복이 관찰되었으나 결손부의 완전한 골성회복은 이루어지지 않았으며 대조군과 실험군 사이의 골조직 치유양상은 큰 차이가 없었다. 본 실험에서는 염증

반응이 대조군에 비해 실험군에서 더 심하게 나타났으며, 이러한 염증반응이 골조직 치유를 저해한다는 보고로서, Ripamonti 등⁵⁴⁾은 생체재료에 대한 반응으로 다핵거대세포의 유입 및 염증반응이 골형성을 방해하였다고 보고하였고, Pinholt 등⁵⁵⁾은 collagen에 의해 유발된 만성 염증이 골조직의 재생을 저해하였다고 보고하였으며, Sela 등⁵⁶⁾은 염증반응에 의한 골조직 재생의 방해가 낮은 pH 때문이라고 제안하였다. 실험군의 염증반응이 더 심했음에도 전반적인 골조직 치유양상은 차이가 없는 것으로 관찰된 본 실험과 골조직 치유 저해가 나타난 이들 실험 사이에 차이점이 나타나는 이유는 위 연구들에서는 염증이 4주이상 지속되었으나 본 실험에서는 3주째에 염증이 소실되었기 때문으로 사료되며, 합성골의 매개체로서 collagen을 사용하여 생체에 적용하고 골조직치유양상을 관찰하여 양호한 결과를 보고한 Blumenthal 등³³⁾, Bell 등³⁴⁾, Nery 등⁵⁷⁾의 실험들에서는 최소 4주이후의 조직소견을 보고하고 있어 초기의 조직치유양상을 알 수가 없으며, 본 실험에서는 3주째에 염증반응이 소실되었으므로 위 연구들과의 골조직 치유양상의 비교가 어렵다.

그리고, 골흡수에 주로 관여하는 파골세포의 활성을 관찰하기 위해 시행한 TRAP stain 결과 실험군에서 특이적인 파골세포의 활성이 관찰되지 않았으며, 이는 적용된 collagen이 골대사에 관여하는 파골세포의 활성에 영향을 주지 않은 것을 나타낸다. 그러므로, 실험군에서 연조직에 대한 염증반응이 대조군에 비해 심하게 나타났으나, 대조군과 실험군 사이의 골조직 치유에는 차이가 없고, 적용된 collagen에 대한 특이적인 파골세포의 활성도 관찰되지 않는 것으로 미루어 적용된 collagen이 비록, 골조직의 재생을 촉진시키는 기질로 작용하지는 않았지만, collagen에 의한 염증반응이 골조직의 재생을 방해할 정도로 심하게 발생하지는 않으며 collagen이 골조직 치유에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

대식세포는 염증반응과 세포성 면역뿐만 아니라 조직의 치유에도 관여하는 세포로서 손상된 조직에서 조직의 치유에 매우 중요한 역할을 하며⁵⁸⁾ 성장인자를 분비하여 조직의 치유를 돕는 것으로 보고⁵⁹⁾되

고 있다. 본 연구에서 초기에는 대식세포의 반응이 미약하였으나 실험군에서 collagen의 흡수가 시작된 14일째에 collagen의 섬유성 구조사이로 다수의 응집된 대식세포가 관찰되었으며, collagen이 대식세포에 대해 화학주성을 유발하는 주요인자라는 Postlethwaite 등⁶⁰⁾의 보고와 bovine collagen에 human monocyte를 적용하여 24시간동안 배양한 후 collagen 양을 측정하여 collagen이 대식세포에 의해 분해된다고 한 Ciapetti 등⁶¹⁾의 보고로 볼 때 본 실험에서 적용된 collagen의 흡수가 주로 대식세포에 의해 이루어지는 것으로 사료된다.

따라서, collagen의 적용에 따른 본 실험의 조직치유양상은 연조직의 염증반응은 더 심하게 발생하나 이로 인한 골조직의 치유 방해는 미약하고, 생체에서 대식세포에 의해 분해되는 것으로 사료되며, 자가골이나 합성골, 성장인자 등의 약제 매개체로서 생체에 응용될 수 있을 것으로 사료되고, 향후 더욱 복잡한 질환처치에서의 효과와 다양한 약제를 함유한 매개체로 사용된 경우에서 collagen의 역할에 대해 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주과학 영역에서 조직의 치유를 촉진시킬 목적으로 collagen을 세포의 기질, 이식재나 약제의 매개체로 사용한 많은 연구가 진행되어 왔으나, 지금까지 생체조직의 반응이 다양하게 보고되고 있다. 따라서, collagen의 생체적용시 적용된 collagen이 골조직 치유양상에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 백서의 두개부에 인위적으로 결손부를 형성하고 collagen 막을 적용시켜 생체에서의 반응을 조직학적으로 살펴본바, 향후 골조직 치유시 및 약제 매개체로서의 사용가능성을 보고자, 약 2개월된 200g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계의 백서 24마리를 대조군과 실험군에 각 12마리씩 배정하고 지름 5mm의 trephine bur로 측두골에 결손부를 형성하여, 대조군은 결손부만을 형성하고, 실험군에는 식염수를 흡수시킨 collagen 막(COLLATAPE®, COLLA-TEC, INC. U.S.A.)을 삽입하였다. 술 후 3, 7, 14, 21일에 대조군

과 실험군에서 각 군당 3마리씩의 백서를 희생시켜 H-E 염색하에 검경하여 전반적인 치유양상을 관찰하였고, 파골세포의 활성을 관찰하기 위해 TRAP 염색을 시행하였으며, 대식세포에 대한 immunohistochemical stain을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연조직의 전반적인 치유양상은 대조군에서는 14일째부터 염증반응이 감소되어 있으나, 실험군에서 14일째까지 염증반응이 지속되었고 21일째부터 염증이 감소되는 것으로 관찰되어 실험군에서 염증세포의 침윤에 의한 연조직 염증 반응이 더 심하게 나타났다.
2. 전반적인 골조직 치유양상은 대조군과 실험군 모두 7일째부터 골결손부의 가 장자리에서 미약한 골조직 형성으로 골성회복 소견이 관찰되었고, 21일째까지 대조군과 실험군 모두 점진적인 골성회복이 관찰되었으나 결손부의 완전한 골성회복은 이루어지지 않았으며 대조군과 실험군 사이의 골조직 치유양상은 큰 차이가 없었다.
3. 실험군에서 적용된 collagen에 대해 특이적인 대식세포 반응이 14일째에 관찰 되었다.

이상의 결과를 미루어 볼 때 백서의 두개골결손부에 적용된 collagen은 초기치유과정에서 연조직의 염증반응을 지속시켰으나 collagen에 의한 염증반응이 골조직의 재생을 방해할 정도로 심하게 발생하지는 않으며, 생체에서 대식세포에 의해 분해되므로 자가골이나 합성골, 성장인자 등의 약제의 매개체로서 생체에 응용될 수 있으리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Schallhorn, R. G. : Present status of osseous grafting procedures, J. Periodontol., 48 : 570-575, 1977.
2. Meffert, R. M., Thomas, J. R., Hamilton, K. M., and Brownstein, C. N. : Hydroxyapatite as an

- alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects, *J. Periodontol.*, 56 : 63-73, 1985.
3. Barney, V. C., Levin, M. P., and Adams, D. F. : Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study, *J. Periodontol.*, 57 : 764-770, 1986.
4. Cortellini, P., and Bowers, G. M. : Periodontal regeneration of intrabony defects : An evidence-based treatment approach, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 15 : 128-145, 1995.
5. Mellonig, J. T., and Nevins, M. : Guided bone regeneration of bone defects associated with implants : An evidence-based outcome assessment, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 15 : 168-185, 1995.
6. Lynch, S. E., Castilla, G. R., Williams, R. C. et al. : 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.
7. Becker, W., Lynch, S. E., Lekholm, U. et al. : A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants, *J. Periodontol.*, 63 : 929-940, 1992.
8. Rutherford, R. B., Ryan, M. E., Kennedy, J. E. et al. : 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.
9. Lynch S. E., Buser D., Hernandez, R. A. et al. : 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.
10. Busch, O., Solheim, E., Bang, G., and Tornes, K. : Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bio-erodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 11 : 498-505, 1996.
11. Mailhot, J. M., Sharawy, M. M., Galal, M. et al. : Porous polysulfone coated with platelet-derived growth factor-BB stimulates proliferation of human periodontal ligament fibroblasts, *J. Periodontol.*, 67 : 981-985, 1996.
12. 조무현, 박광범, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치주이개부병변 의 조직재생에 미치는 효과, *대한치주과학회지*, 23 : 535-563, 1993
13. 김용태, 한주석, 유형근, 신형식 : Fibronectin과 성장인자의 단독 혹은 복합 투여가 배양 인체 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 효과, *대한치주과학회지*, 25 : 239-252, 1995.
14. 정성민, 이만섭, 박준봉 : 탈회동결건조골에 혼합한 형질변형 성장인자 (TGF- β)가 골조직 재생에 미치는 효과, *대한치주과학회지*, 25 : 357-371, 1995.
15. Nevins, M., Kirker, C., Nevins, M. et al. : Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 16 : 9-19, 1996.
16. Stryer, L. : Connective-tissue proteins : Collagen and elastin, *Biochemistry*, Toppan press, Pp 206-226, 1975.
17. 고재경, 채범석, 이동호 외 12인 : Collagen, 생화학, 고문사, Pp 95-99, 1989.
18. Doillon, C. J., Whyne, C. F., Brandwein, S.,

- and Silver, F. H. : Collagen-based wound dressings : Control of the pore structure and morphology, *J. Biomed. Mater. Res.*, 20 : 1219-1228, 1986.
19. Stenzel, K. H., Miyata, T., and Rubin, A. L. : Collagen as a biomaterial, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3 : 231-253, 1974.
 20. Chvapil, M. : Collagen sponge : Theory and practice of medical applications, *J. Biomed. Mater. Res.*, 11 : 721-741, 1977.
 21. DeLustro, F., Dasch, J., Keefe, J., and Ellingsworth, L. : Section III. Basic science and pathology : Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 260 : 263-279, 1990.
 22. Khor, E. : Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprosthesis, *Biomaterials*, 18 : 95-195, 1997.
 23. Goycoolea, M. V., Muchow, D. C., Scholz, M. S. et al. : In search of missing links in otology. I. Development of a collagen-based biomaterial, *Laryngoscope*, 101 : 717-726, 1991.
 24. DeLustro, F., Smith, S. T., Sundsmo, J. et al. : Reaction to injectable collagen : Results in animal models and clinical use, *Plast. Reconstr. Surg.*, 79 : 581-592, 1987.
 25. Spira, M., Liu, B., Xu, Z. et al. : Human amnion collagen for soft tissue augmentation-biochemical characterizations and animal observations, *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 : 91-96, 1994.
 26. Matsui, R., Okura, N., Osaki, K. I. et al. : Histological evaluation of skin reconstruction using artificial dermis, *Biomaterials*, 17 : 995-1000, 1996.
 27. Abbot, W. M., and Austen, W. G. : Microcrystalline collagen as a topical hemostatic agent for vascular surgery, *Surgery*, 75 : 925-933, 1974.
 28. Cobden, R. H., Thrasher, E. L., and Harris, W. H. : Topical hemostatic agents to reduce bleeding from cancellous bone, *J. Bone and Joint Surg.*, 58 : 70-73, 1976.
 29. Blumenthal, N. and Steinberg, J. : The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects, *J. Periodontol.*, 61 : 319-327, 1990.
 30. Parodi, R., Carusi, G., Santarelli, G. et al. : Guided tissue regeneration employing a collagen membrane in a human periodontal bone defect : A histologic evaluation, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 17 : 283-291, 1997.
 31. Saroff, S. A., Cahsens, A. I., Eisen, S. F., and Levey, S. H. : Free soft tissue autografts : Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation, *J. Periodontol.*, 53 : 425-428, 1982.
 32. Stein, M. D., Salkin, L. M., Freedman, A. L., and Glushko, V. : Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogingival surgery, *J. Periodontol.*, 56 : 35-38, 1985.
 33. Blumenthal, N., Sabet, T., and Barrington, E. : Healing responses to grafting of combined collagen : Decalcified bone in periodontal defects in dogs, *J. Periodontol.*, 57 : 84-90, 1986.
 34. Bell, R., and Beirne, O. R. : Effect of hydroxylapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 46 : 589-594, 1988.
 35. Helm, G. A., Sheehan, J. M., Jane, J. A. et al. : Utilization of type I collagen gel, demineralized bone matrix, and bone morphogenetic protein-2 to enhance autologous bone lumbar spinal fusion, *J. Neurosurg.*, 86 : 93-100, 1997.

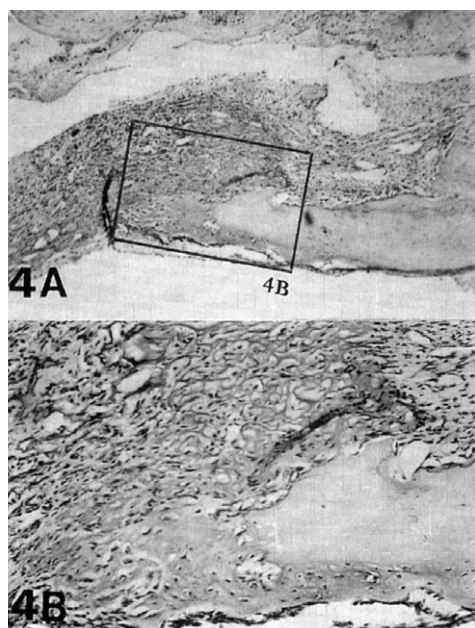
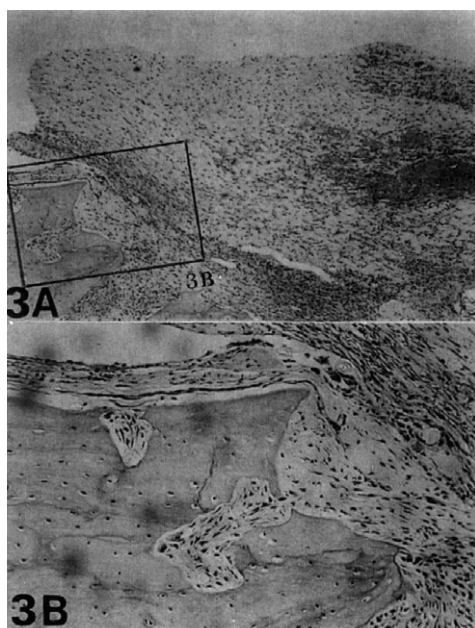
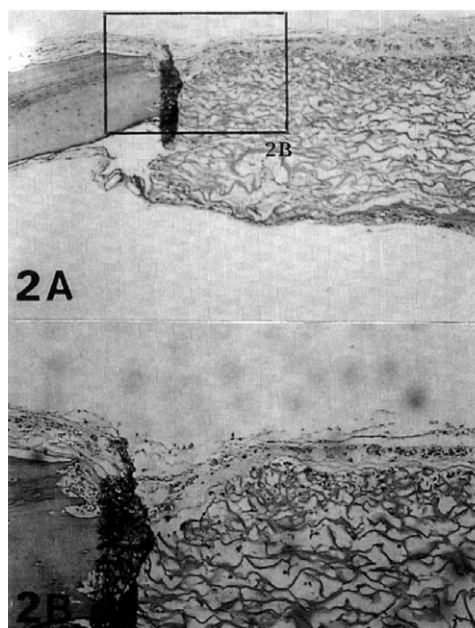
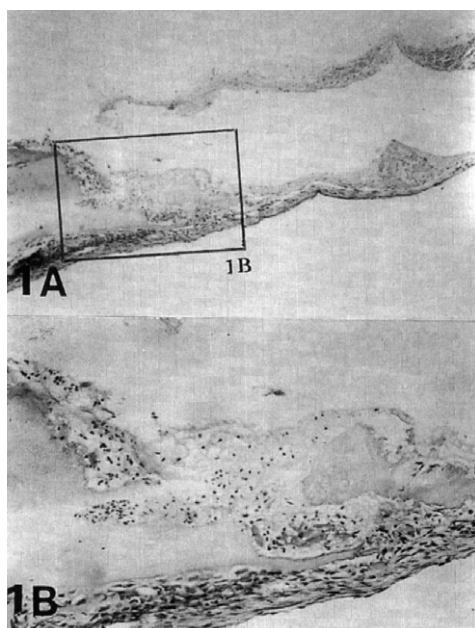
36. Levy, P., Nevins, A., and LaPorta, R. : Healing potential of surgically -induced periodontal osseous defects in animals using mineralized collagen gel xenografts, *J. Periodontol.*, 52 : 303-306, 1981.
37. Mannai, C., Leake, D., Pizzoferrato, A. et al. : Histologic evaluation of purified bovine tendon collagen sponge in tooth extraction sites in dogs, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 61 : 315-323, 1986.
38. Yaffe, A., Ehrlich, J., and Shoshan, S. : Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog, *J. Periodontol.*, 55 : 623-628, 1984.
39. Rovira, A., Amedee, J., Bareille, R., and Rabaud, M. : Colonization of a calcium phosphate/elastin-solubilized peptide-collagen composite material by human osteoblasts, *Biomaterials*, 17 : 1535-1540, 1996.
40. Mizuno, M., Shindo, M., Kobayashi, D. et al. : Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo, *Bone*, 20 : 101-107, 1997.
41. Marchand, R., and Woerly. S. : Transected spinal cords grafted with in situ self-assembled collagen matrices, *Neuroscience*, 36 : 45-60, 1990.
42. Horisaka, Y., Okamoto, Y., Matsumoto, N. et al. : Histological changes of implanted collagen material during bone induction, *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 : 97-103, 1994.
43. Mattsson, T., Anderssen, K., Koendell, P. A., and Lindskog, S. : A longitudinal comparative histometric study of the biocompatibility of three local hemostatic agents, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 19 : 47-50, 1990.
44. Solheim, E., Pinholt, E. M., Bang, G., and Sudmann, E. : Effect of hemostatics on bone induction in rats : A comparative study of bone wax, fibrin- collagen paste, and bio-erodible polyorthoester with and without gentamicin, *J. Biomed. Mat. Res.*, 26 : 791-800, 1992.
45. Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase technique, *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 577-580, 1981.
46. Terranova, V. P., and Wikesj, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of periodontium, *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
47. Hutmacher, D., Hrzeler, M. B., and Schliephake, H. : A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 11 : 667- 678, 1996.
48. Rehkov, M., Bako, D., Vizrov, K. et al. : Properties of collagen and hyaluronic acid composite materials and their modification by chemical crosslinking, *J. Biomed. Mater. Res.*, 30 : 369-372, 1996.
49. Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D. et al. : Physical crosslinking of collagen fibers : Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment, *J. Biomed. Mater. Res.*, 29 : 1373-1379, 1995.
50. Ratner, B. D. : Society for biomaterials 1992 presidential address : New ideas in biomaterials science - a path to engineered biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27 : 837-850, 1993.
51. Pachence, J. M. : Collagen-based devices for soft tissue repair, *J. Biomed. Mater. Res.*, 33 : 35-40, 1996.
52. Vardaxis, N. J., Ruijgrok, J. M., Rietveld, D. C. et al. : Chemical and physical properties of collagen implants influence their fate *in vivo*

- as evaluated by light and confocal microscopy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 : 1013-1025, 1994.
53. Deporter, D. A., Komori, N., Howley, T. P. et al. : Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria, *Calcif. Tissue Int.*, 42 : 321-325, 1988.
 54. Ripamonti, U., Schnitzler, C. M., and Cleaton-Jones, P. C. : Bone induction in a composite allogeneic bone/alloplastic implant, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 47 : 963-969, 1989.
 55. Pinholt, E. M., Solheim, E., Bang, G., and Sudmann, E. : Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats : A comparative study of fibrin-collagen paste, fibrin sealant, and polyorthoester with gentamicin, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 50 : 1300-1304, 1992.
 56. Sela, J., Applebaum, J., and Uretzky, G. : Osteogenesis induced by bone matrix is inhibited by inflammation, *Biomater. Med. Devices. Artif. Organs.*, 14 : 227-237, 1986.
 57. Nery, E. B., Eslami, A., and Van Swol, R. L. : Biphasic calcium phosphate ceramic combined with fibrillar collagen with and without citric acid conditioning in the treatment of periodontal osseous defects, *J. Periodontol.*, 61 : 166-172, 1990.
 58. Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., and Kaplan, A. M. : The role of macrophages in wound repair : A review, *Plast. Reconstr. Surg.*, 68 : 107-113, 1981.
 59. Singh, J. P., and Bonin, P. D. : Purification and biochemical properties of a human monocyte-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85 : 6374-6378, 1988.
 60. Postlethwaite, A. E. and Kang, A. H. : Collagen and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes, *J. Exp. Med.*, 143 : 1299-1307, 1976.
 61. Ciapetti, G., Verri, E., Granchi, E. et al. : *In vitro* assessment of phagocytosis of bovine collagen by human monocytes/macrophages using a spectro- photometric method, *Biomaterials*, 17 : 1703-1707, 1996.

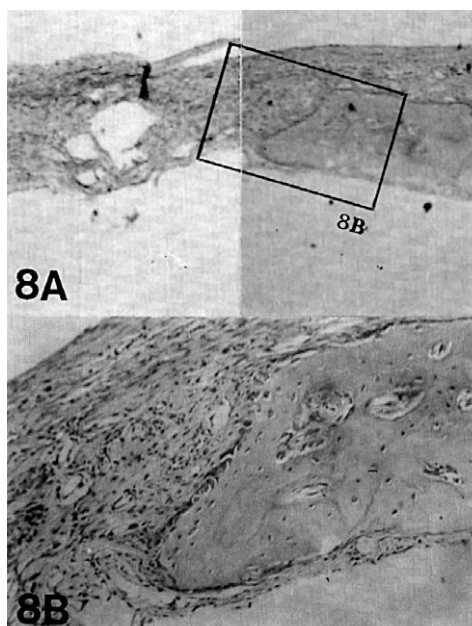
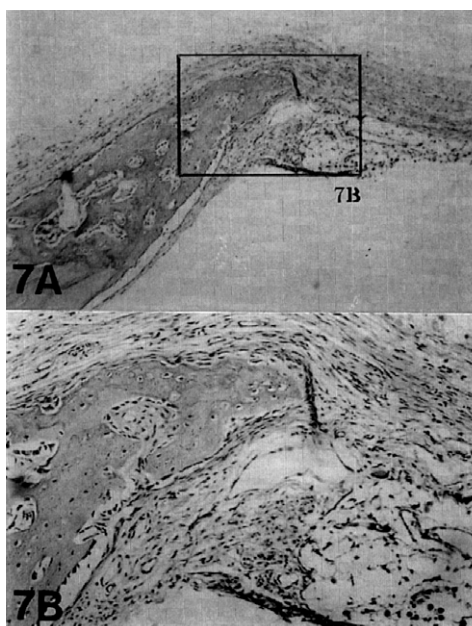
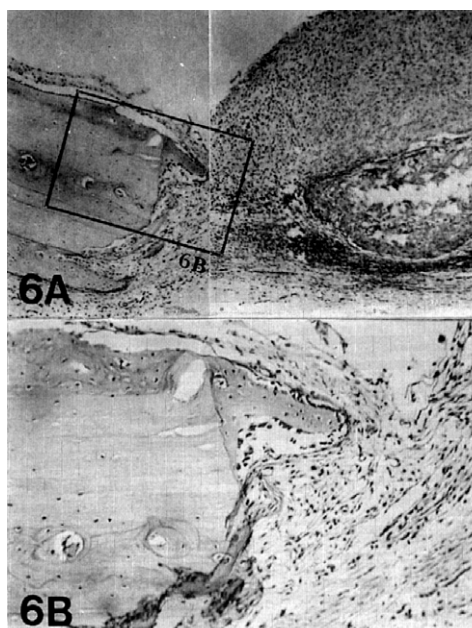
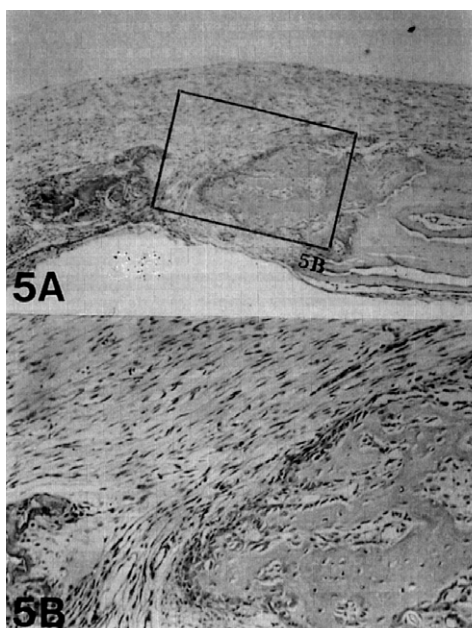
사진부도 설명

- Figure 1. Control Group(3 days), (H&E, 1A×40, 1B×100)
Photomicrographs show fibrous connective tissue throughout most of the defect and infiltrated inflammatory cells on the periphery of the defect.
- Figure 2. Experimental group(3 days), (H&E, 2A×40, 2B×100)
Photomicrographs show fibrillar collagen membrane of the defect and remarkable inflammatory cells infiltrated on the defect.
- Figure 3. Control group(7 days), (H&E, 3A×40, 3B×100)
Photomicrographs show infiltrated inflammatory cells and some appositional growth of new bone on the periphery of the defect.
- Figure 4. Experimental group(7 days), (H&E, 4A×40, 4B×100)
Photomicrographs show infiltrated inflammatory cells on the implanted collagen and edge of defect. Some appositional growth of new bone on the periphery of the defect is observed.
- Figure 5. Control group(14 days), (H&E, 5A×40, 5B×100)
Inflammatory cells are reduced compare to day 7, but, most area of defect is filled with fibrous connective tissue. Note that appositional growth of new bone on the periphery of the defect.
- Figure 6. Experimental group (14 days), (H&E, 6A×40, 6B×100)
Infiltrated inflammatory cells are still observed and some appositional growth of new bone on the edge of the defect is showed. Note that resorption of implanted collagen
- Figure 7. Control group(21 days), (H&E, 7A×40, 7B×100)
Inflammatory cells are almost disappeared and trabecular bone formation is observed.
- Figure 8. Experimental group(21 days), (H&E, 8A×40, 8B×100)
Photomicrographs show reduced Inflammatory cells and trabecular bone formation. Note that biodegradation of implanted collagen.
- Figure 9. Control group, TRAP×100
(A : 3 days, B : 7 days, C : 14days, D : 21 days)
Photomicrographs show osteoclasts associated with remodeling of newly formed bone at day 14 and day 21.
- Figure 10. Experimental group, TRAP ×100
(A : 3 days, B : 7 days, C : 14days, D : 21 days)
Photomicrographs show osteoclasts on the implanted collagen and newly formed bone, but specific relationship between implanted collagen and osteoclasts activity is not observed.
- Figure 11. Immunohistochemistry for macrophages, ×100
(A : control group, 14 days B : Experimental group, 14 days)
Photomicrographs show aggregated macrophages on the implanted collagen.

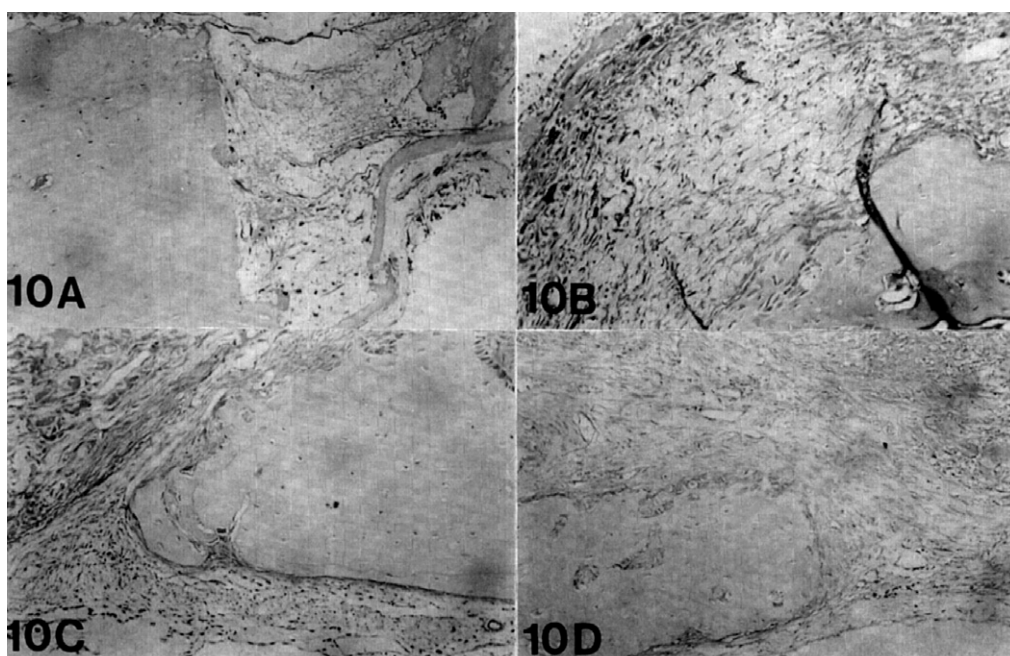
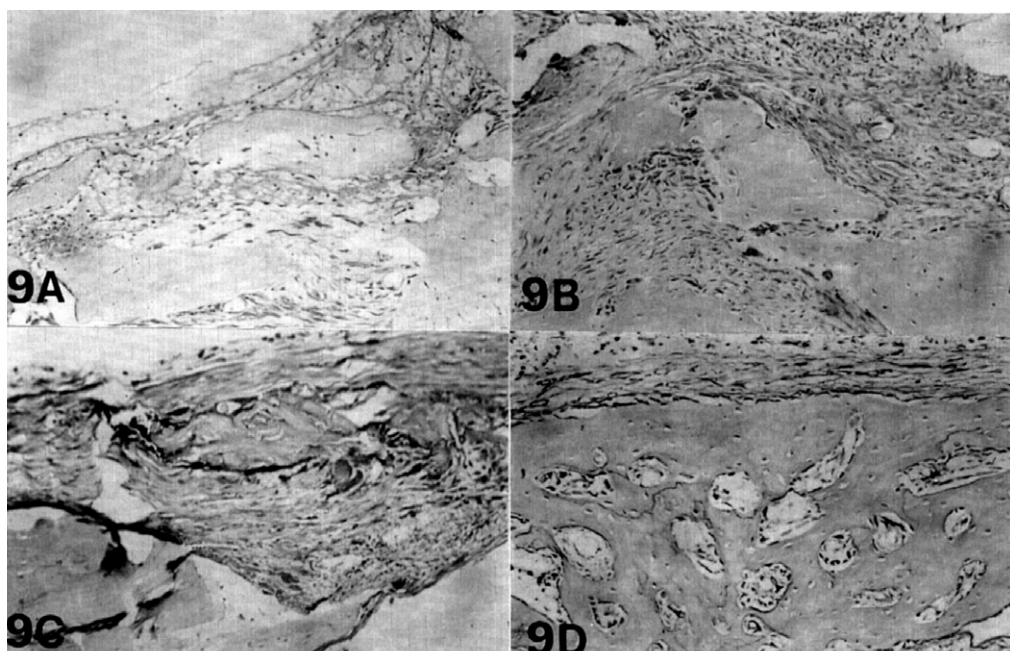
사진부도(1)



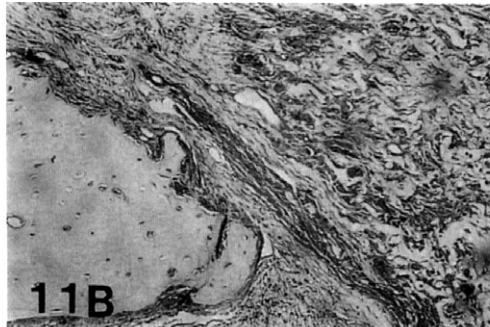
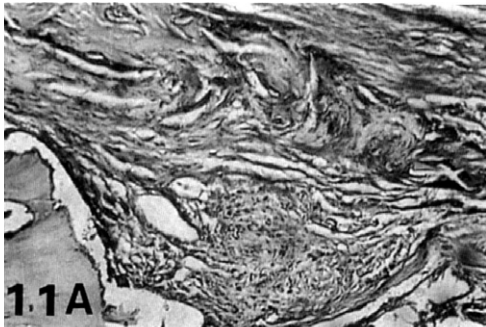
사진부도(Ⅱ)



사진부도(Ⅲ)



사진부도(Ⅳ)



The Effect of Fibrillar Collagen on Bony Healing of Calvarial Defect in Rats

Jae-Bung Kim, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology School of Dentistry, Kyungpook National University

Many researches have been reported that collagen as cellular stroma, matrix of grafting materials, mediator of agents for the purpose of promoting healing process *in vivo*, but the responses *in vivo* were seen various. The goal of this experiment is to assess the effect of collagen on bony healing, through histological evaluation of implanted collagen on the calvarial defect in rats. 2-month-old Sprague-Dawley, 24 rats were used and 12 rats assigned to each group of control and test. Defect of 5mm in diameter was made on the calvarial bone with trephine bur. Following thorough saline rinse, defect of control group was left in empty and that of experimental group was filled with fibrillar collagen(COLLATAPE®, COLLA-TEC, INC. U.S.A.) soaked in saline.

3 rats in each group were sacrificed at 3, 7, 14, 21 days after operation respectively, and the tissue blocks were prepared for light microscope with H-E for evaluation of overall healing, with TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) for evaluation of osteoclastic activity and with immunohistochemical staining for macrophages.

The results were as follows :

1. In the control group, inflammatory responses were disappeared at day 14, but, in the experimental group inflammatory infiltrates were reduced at day 21. Thus, the experimental group showed more severe soft tissue inflammation than control group.
2. Both control and experimental group showed slight appositional growth at day 7 and gradual bony growth to 21th day. But, complete bony healing of the defect was not shown. There was no significant difference in bony healing between control and experimental group
3. Specific response of macrophages for implanted collagen was observed at day 14 in the experimental group.

In conclusion, although fibrillar collagen caused inflammation of soft tissue during initial healing period, inflammatory responses by fibrillar collagen didn't inhibit bony regeneration and implanted collagen was biodegraded by macrophages. Thus, we expect that fibrillar collagen can be used for useful mediator of graft materials or growth factors.