Chitosan과 chitosan-cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구

계승범* · 손성희** · 최상묵*

*서울대학교 치과대학 치주과학교실
**삼성생명과학연구소 임상의학연구센터, 삼성의료원 치과진료부, 성균관대학교 의과대학

I. 서론

치주 치료의 궁극적인 목적은 질환에 의해 손상된 치주조직을 재생시키는 것이라고 할 수 있다. 치주조직의 재생은 질환에 의해 파괴된 부위에 치주인대와 치조골과 같은 결합조직 성분이 새로이 형성되고, 질환에 이환된 치근에 새로운 백악질이 형성되는 것과 관련이 있다[1].

치주조직은 치은 상피, 치은 결합조직, 치조골 및 치주인대의 네 가지로 구성되며 이중에서 치주인대 및 치조골로부터 유래된 세포가 치주조직의 재생과 밀접한 관련이 있다고 하였다[2]. Caton 등[3]은 원숭이를 이용한 실험에서 일반적인 비외과적, 외과적 시술 및 골 이식술로는 긴 접합상피로의 치유 밖에 얻을 수 없다고 하였다. 따라서 소실된 치조골, 백악질 및 치주인대의 재생을 유도하기 위해서는 치주 창상부위로부터 상피 세포와 치은 결합조직의 세포들을 차단하여 상대적으로 성장 속도가 늦은 치주인대 및 치조골로부터 유래된 세포들이 원활하게 성장할 수 있는 조건을 만들어 주는 것이 필요하다는 이론이 제기되었다[4-6]. 위 이론을 바탕으로 1980년대에 들어서 차폐막을 이용하는 조직 유도 재생술이 치주조직 재생을 위한 치료 방법으로 소개되었다[7].

차폐막으로는 Millipore filter가 초기에 사용되었으며,[7, 8] 현재 차폐막으로 많이 사용되는 재료로는 Millipore filter와 비슷한 성질을 갖는 expanded polytetrafluoroethylene(e-PTFE)막을 들 수 있다. e-PTFE막은 1980년대 후반부터 동물실험 및 임상연구를 통하여 현재 효과를 인정받고 있는 소재인데, 조직에 대한 차폐능력이 뛰어나고, 신체 내에서 완전히 불활성 물질로 남아있기 때문에 생체안정도와 생체친화성이 좋은 물질이다[9, 10]. 그러나 e-PTFE 막은 제거를 위해 이차수술이 필요하기 때문에 이를 피하기 위하여 여러 가지 생체분해성 차폐막들이[11-13] 개발되어져 왔다. 이런 생체분해성 막들은 혈병이 충분히 형성되고, 세포들의 선택적 재군집이 일어날 때까지 흡수되지 않고 공간을 유지해야 한다. 이런 목적으로 연구되고 있는 생체분해성 차폐막의 소재들은 type I collagen,[14] atelocollagen 또는 cargile과 같은 교원질과[15-19] polyglactin 910,[20, 21] polyurethane[22] 그리고 polylactic acid[23-27] 등의 생체 분해성 고분자들이며, 치주조직 재생

이 연구는 삼성생명과학연구소 연구비(C-98-030)의 보조로 이루어 졌음.

효과 면에서 다양한 결과를 보이고 있다.

생체분해성 물질은 생체 재료 분야 특히 창상치유, 조직 재생, 조절성 약물 송달 분야에서 점차 그 중요성이 증가하고 있다. 대표적인 천연 생체분해성 다당류에는 전분, mucopolysaccharide, chitin 등이 있으며 이 중에서도 chitin과 이를 탈아세틸화시킨 산물인 chitosan(poly-N-acetylglucosaminoglycan)은 결정화가 가능하고,[28] 우수한 기계적 특성을[29, 30] 가지고 있기 때문에 특히 주목을 받고 있다.

Chitin은 cellulose 다음으로 가장 풍부한 자연 생중합체로서 새우, 게, 바닷가재 등과 같은 무척추동물의 외골격 뿐만 아니라 곰팡이의 세포벽 및 곤충 표피의 중요한 구조 성분이다. Chitin과 이의 유도체인 chitosan이 포유동물의 창상치유에 도움이 된다는 사실은 지난 수 세기동안 추측되어져 왔지만, chitosan의 성분에 대한 연구는 1960년대에서부터야 비로소 본격적으로 시행되었다. Reynolds 등[31]은 창상치유 증진에 있어서 N-acetylglucosamine의 사용의 과학적 근거를 제시하였으며, 이후 chitosan을 이용한 여러 동물실험에서 chitosan은 지혈과[32-35] 창상치유 증진에[36-40] 효과가 있는 것으로 알려졌다.

최근에 들어서 chitosan의 구강 창상치유 증진 효과에 관한 인체 실험들이 보고되고 있는데, Sapelli 등[41]은 chitosan분말이 치주낭, 구개 창상, 발치와의 치유에 도움이 된다는 임상결과를 발표하였다. Muzzarelli 등[42]도 chitosan gel을 치주 병소에 적용하였을 때 치아동요도 및 치주낭이 현저히 감소하였다고 보고하였으며, 또한 발치와와 치근절제 부위에 chitosan gel을 적용하여 새로운 골조직 형성이 증진되었음을 방사선 사진과 생검을 통해 관찰하였다.[43]

본 연구의 목적은 위에서 언급한 바와 같이 골조직 형성 및 창상치유 증진 효과가 있는 chitosan 제재를 이용하여 제작한 차폐막의 생체적합성 및 흰쥐 두개관에서의 골조직 재생유도능력을 평가하는데 있다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 차폐막의 제조

게의 껍질은 키틴질과 탄산칼슘, 단백질, 색소로 구성되어 있다. 그 껍질로부터 탄산칼슘은 5% 염산용액에 24시간 동안 실온에 방치하여 제거하였고, 단백질은 5% 알칼리 용액에 5시간동안 끓여서 제거하였다. 색소는 0.5% 과망간산 칼륨 용액에 1시간 동안 산화시켜 제거하고, 남은 과망간산 칼륨은 옥살산으로 환원하여 순수한 chitin을 제조하였다. 이 chitin을 60 mesh로 분쇄하여 50% 알칼리 용액에 100℃에서 5시간동안 처리하여 탈아세칠화 92%의 chitosan을 제조하였다.

정제된 chitosan을 4% 초산 용액 중에 chitosan이 3%가 되도록 용해시킨 후 여과하여 0.1N-NaOH용액으로 pH가 중성이 될 때까지 조절하고, 여기서 생성된 침전물을 물로 충분히 세척한 후 필터에 여과하여 걸러진 chitosan을 압착 건조하여 chitosan 차폐막을 제조하고 건조하였다. 제조된 chitosan 차폐막의 두께는 100 ㎛이었으며, 인장강도와 신도는 길이 25mm, 너비 10mm의 차폐막에서 각각 253.24 g/mm^{2}과 17%였다.

Chitosan-cellulose 차폐막은 정제된 chitosan을 4% 초산 용액 중에 chitosan이 2%, cellulose가 1%가 되도록 용해시킨 후 이 용액을 여과하여 페트리 접시에 일정 용액을 주입하고 산포한 후에 건조기에 건조시키고, 2N-NaOH 용액 중에서 2시간 동안 실온에서 잔존 초산을 제거한 후 세척하고 건조하여 제조하였는데, 차폐막의 두께는 100 ㎛이었으며, 인장강도와 신도는 길이 25mm, 너비 10mm의 차폐막에서 각각 303.75 g/mm^{2}과 37%였다.

2. 세포 활성도 측정

실험에 사용할 세포를 배양하기 위해서 서울대학교치과병원에 교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제1소구치의 치석 및 치태등을 제거하고, 큐렛으로 치근의 치경부측 1/3의 치은 조직을 제거한 후 발거하여 100 U/ml penicillin(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)과 100 ㎍/ml streptomycin(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)이 첨가된 α-MEM(Gibco Laboratories, Grand Island, USA) 생검배지에 침수시켰다. 생검배지로 5회 세척 후 치근 중간 1/3부위의 치주인대를 채취하여 세절한 다음 35mm 세포배양 접시에 고르게 분산시켜 100U/ml penicillin(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)과 100 ㎍/ml streptomycin(Gibco Laboratories, Grand Island, USA) 및 10% fetal bovine serum(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)이 첨가된 α-MEM(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)을 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5계대 배양시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2를 계속 공급하였다. 계대배양한 치주인대 세포를 0.25% trypsin-EDTA(Gibco Laboratories, Grand Island, USA) 용액으로 처리한 후 원심 분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구계산기로 well당 1×10^5 개의 세포수가 되게하여 접종한 후 배양하였다. 24시간 후 배양액을 교환하고 48시간 후 배양액을 제거한 후 Hank's balanced salt solution(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)으로 세척하였다. Chitosan 및 chitosan-cellulose로 제작한 차폐막을 5×5mm로 자르고 각각을 ethylene oxide gas로 소독한 후 각 well에 넣고 배양액을 200 ㎕가 되게 하였다. 이들을 24시간 배양하고 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 용액 50㎕를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 50㎕씩 첨가하였다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, Bohannon, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료가 들어있지 않은 α-MEM 배양액 well을 사용하였고 모든 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

3. 차폐막의 조직반응 및 분해

체중 300-350gm의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat) 8마리를 대상으로 실험을 하였다. 흰쥐를 염산케타민(50mg/ml, 유한양행, Seoul, Korea)을 근육주사(70mg/kg)하여 마취한 후, 등의 털을 깎고 피하조직에 chitosan과 chitosan-cellulose 차폐막을 1×1cm의 사각형 크기로 잘라서, 적절한 간격으로 여섯 부위에 각각 3매씩을 매식하고 봉합하였다. 매식 후 1, 2, 4, 6 주에 2마리씩 동물을 희생시키고, 매식물을 주위조직과 함께 절제해 내었다. 절제해낸 조직을 formalin에 고정한 후, hematoxylin-eosin(HE)으로 염색하고, 광학현미경(Olympus BH-2, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 조직학적 소견 및 흡수양상을 관찰하였다.

4. 동물 실험

체중 300-350gm의 수컷 흰쥐(Spraque-Dawley rat) 45마리를 15마리씩 무작위로 추출하여 세 군으로 분류하였다. 각 군의 흰쥐를 염산케타민(50mg/ml, 유한양행, Seoul,Korea)을 근육주사(70mg/kg)하여 마취한

후, 두부의 털을 깎고 수술중의 안정과 편리를 위해 흰쥐의 머리를 두부고정기(cephalostat)에 고정하였다. 수술부위를 소량의 2% lidocaine HCl (1:100,000 epinephrine, 유한양행, Seoul, Korea)로 침윤마취를 한 후, 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시키고, trephine bur(3i Implant Innovations Inc., West Palm Beach, USA)를 사용하여 뇌막에 손상을 주지 않도록 하면서 직경 8mm의 원형 결손부를 형성하였다. 제1군은 대조군으로 차폐막을 덮지 않았으며, 제2군은 chitosan 차폐막을, 제3군은 chitosan-cellulose 차폐막을 각각 결손부에 위치시키고 두피를 덮어 봉합하였다. 차폐막을 매식한 후 1주, 2주, 4주에 각 군 당 5마리씩 실험 동물을 희생시키고 두개관을 절제하였다.

5. 골조직 재생유도능력 평가

(1) 방사선 계측학적 분석

디지털 방사선 영상을 얻기 위해 절제한 두개관을 경막면이 위를 향하도록 영상판에 위치시키고 65cm 거리에서 25mA, 32kVp, 0.25초로 방사선 사진을 촬영(Senographe 600T, GE, Waukesha, USA)하고, 촬영한 방사선 사진을 10배로 확대하여 컴퓨터 모니터 상에 재현하고, 두개관 결손부 중앙의 방사선불투과 정도를 기준으로 하여 이보다 방사선불투과 정도가 높은 두개관 결손부의 방사선불투과상의 면적(%)을 IBAS Image Analyser system(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 계측하였다.

(2) 광학 현미경 관찰 및 조직 계측학적 분석

각 군의 시편을 10% formalin에 고정한 후 5% nitric acid에 넣어 탈회과정을 거치고 paraffin포매를 하여 4 ㎛ 두께로 관상면으로 절단하였다. 절단된 조직편들 중에서 결손부의 가운데 부위를 포함하는 조직편을 선택하여, hematoxylin-eosin(HE) 염색법과 Masson-trichrome 염색법으로 염색하고, 광학현미경하에서 관찰한 후, 100배 배율로 확대된 조직표본 상을 컴퓨터 모니터 상에 재현하고, IBAS Image Analyser system(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 두개관 결손부의 신생골조직의 면적(mm^2)을 계측하였다.

6. 통계 분석

세포 활성도 평가에 있어서 대조군과 실험군간의 차이를 보기 위하여 t-test($P<0.01$)를 실시하였다. 방사선 계측학적 분석 결과와 조직 계측학적 분석 결과는 two way ANOVA로 군과 시간간의 상호 작용이 없음을 확인한 후, one way ANOVA로 각 주당 군간의 실험결과에 유의한 차이가 있는지를 통계적으로 검증하였다. 사후 검증 방법으로는 최소 유의차 검정법(Least Significant Difference)을 사용하였다($P<0.05$).

Ⅲ. 결과

Table 1. Effects of chitosan and chitosan-cellulose membranes on the growth and survival of human periodontal ligament cells(n=5 for all control and experimental groups)

	Absorbance(Mean±SD)	Percent to control
Chitosan	0.304±0.036	92.8
Chitosan-cellulose	0.335±0.023	102.2
Control	0.327±0.004	100

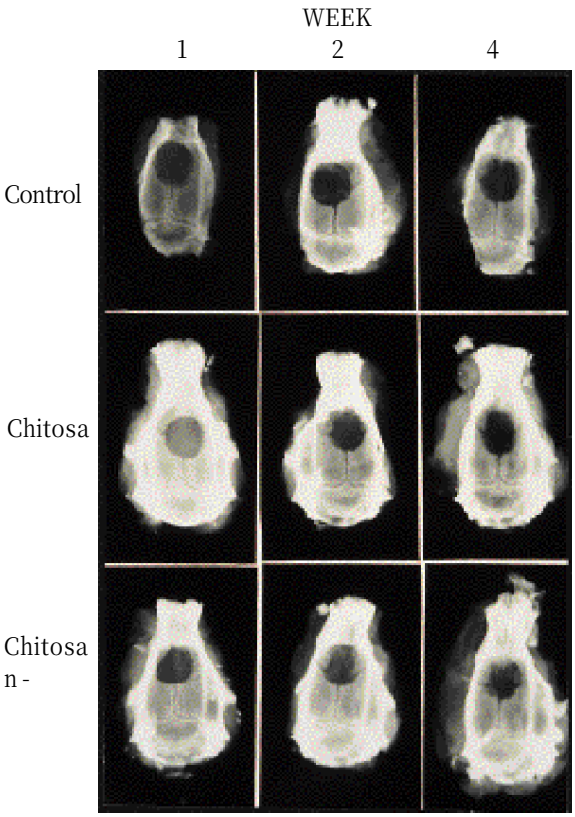

Figure 9. Radiographs of calvarial defects at

1. 세포 활성도 측정

세포 활성도 측정 결과 chitosan 차폐막과 chitosan - cellulose 차폐막은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 따라서 chitosan과 chitosan - cellulose 차폐막은 치주인대세포의 활성에 유해한 작용을 하지 않는 것으로 사료된다.

2. 차폐막의 조직 반응 및 분해

(1) 매식 1주

Chitosan 및 chitosan - cellulose 차폐막 주변으로 띠 모양의 염증세포 침윤이 보이고, 섬유모세포 및 모세 혈관의 증식과 소량의 교원질 침착이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

(2) 매식 2주

차폐막 매식 후 2주에는 chitosan 및 chitosan - cellulose 차폐막 주변에 염증 세포의 침윤이 감소하고 섬유화가 증가되는 양상을 보였다(Fig. 3, 4).

(3) 매식 4, 6주

차폐막 매식 후 4주부터는 염증이 거의 소실되었고, 섬유화가 더욱 진행되었다(Fig. 5, 6). 매식 6주에는 섬유화가 진행되어 매식된 차폐막 주변으로 교원성 조직에 의한 피막의 형성이 관찰되었으며, 6주까지 차폐막의 분해 양상은 관찰되지 않았다(Fig. 7, 8).

3. 골조직 재생유도능력 평가

(1) 방사선사진상 소견 및 방사선 계측학적 분석

방사선사진상 소견을 보면, 1주에서는 두개관 결손부 변연을 따라 소량의 방사선불투과상이 관찰되었다. 2주에서는 대조군과 실험군 모

Table 2. Radiomorphometric data(%) for rat calvarial defects at 1, 2, 4 weeks after surgery(mean±SD; n=5 for all control and experimental groups)

	1week	2weeks	4weeks
Control	10.32±2.60	19.12±5.25	20.77±5.31
Chitosan	14.13±3.37	25.11±4.35	29.74±5.96*
Chitosan - cellulose	13.17±2.84	26.68±4.58*	33.38±6.13*

* : Significantly different from control group at the same time point($P<0.05$).

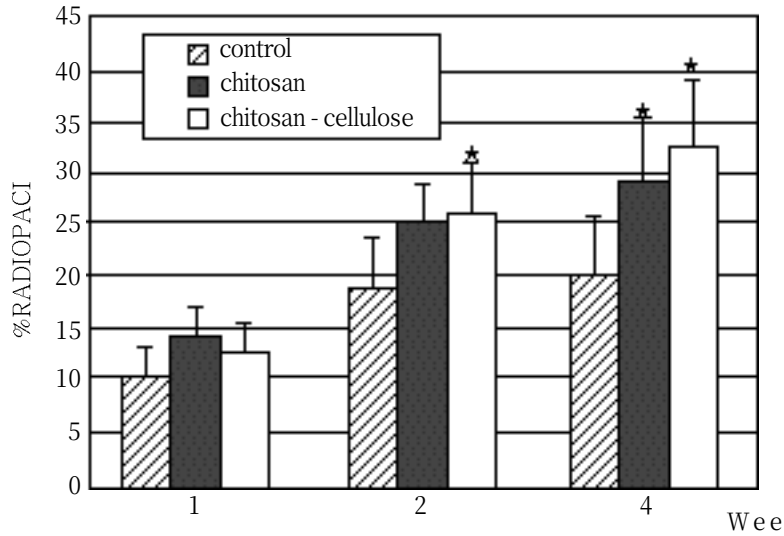

Figure 10. Area of radiopacity measured within defects presented as a percentage of the area of the original 8mm defect. Statistically significant difference(P<0.05) from control at the same

Table 3. Histomorphometric data(mm²) for rat calvarial defects at 1, 2, 4 weeks after surgery(mean± SD; n=5 for all control and experimental groups)

	1week	2weeks	4weeks
Control	0.09±0.02	0.19±0.06	0.55±0.17
Chitosan	0.11±0.02	0.28±0.10	0.73±0.15
Chitosan - cellulose	0.11±0.03	0.29±0.09	0.83±0.15*

* : significantly different from control group at the same time point(P<0.05).

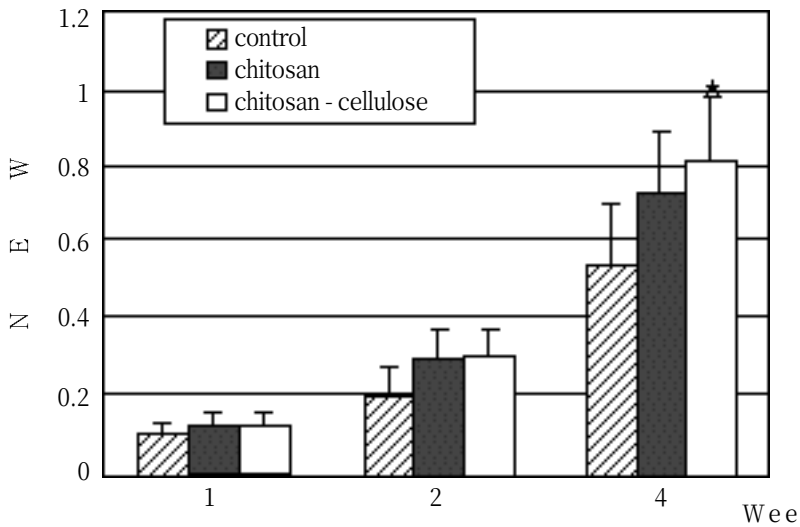

Figure 11. Area of new bone measured within coronal, mid - defect sections of calvarial defects. Statistically significant difference(P<0.05) from control at the same time point is indicated by

두에서 결손부위 변연으로부터 중앙부위로 방사선불투과상이 늘어나는 양상을 보였으나 그 정도에 있어서는 실험군과 대조군 사이에 차이를 보였다. 4주에 실험군에서 방사선불투과상이 2주에 비해 증가하였으며, 특히 chitosan - cellulose 차폐막 매식군에서는 결손부 변연과 연결되지 않은 섬 모양의 방사선불투과상도 관찰되었다(Fig. 9).

방사선 계측학적 분석 결과에서도 chitosan 및 chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군에서 대조군에 비하여 방사선 불투과 면적이 증가하였으며, chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군은 2주와 4주에서, chitosan 차폐막을 매식한 군은 4주에서 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$)(Table 2, Fig. 10).

(2) 조직 계측학적 분석

흰쥐의 두개관 결손부에 형성된 신생골의 면적을 computer image analysis system을 이용하여 계측한 결과 방사선 계측학적 분석 결과와 비슷한 양상을 보였다. 1주에서 실험군과 대조군 사이에 신생골 형성량에 유의한 차이가 없었으며, 2주에서는 모든 군에서 1주에 비하여 신생골 형성이 많았고, 실험군과 대조군 사이에 신생골 형성량에 차이가 나기 시작했다. 하지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 4주에서는 신생골 형성량에 있어서 chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$)(Table 3, Fig. 11).

(3)조직 소견

① 1주 조직 소견

대조군의 골결손부에서 신생골의 형성이 제한되어 일어났다. 결손부 대부분은 섬유성 결합조직에 의해 관통된 양상을 보였고, 육아 조직의 증식과 교원질 침착 및 출혈이 관찰되었다(Fig. 12).

실험군에서는 chitosan 및 chitosan - cellulose 차폐막에서 모두 결손부 변연으로부터 중앙을 향하여 신생골의 형성이 관찰되고, 대조군과 마찬가지로 육아조직의 증식과 출혈이 관찰되었다(Fig. 13, 14).

② 2주 조직 소견

대조군에서는 1주에 비해서 결손부 변연에서 신생골의 형성이 증가하였으나 결손부 대부분은 결합조직으로 채워져 있었으며, 섬유화가 더 진행된 양상을 보였다(Fig. 15).

Chitosan 차폐막을 매식한 군에서도 1주에 비해서 결손부 변연에서 신생골의 형성이 증가되었으며, 신생 소주골은 더욱 성숙해진 양상을 보였다. 경막쪽에서도 신생골의 침착이 진행되어 골의 두께가 증가되는 양상을 보였다(Fig. 16).

Chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군에서도 1주에 비해서 결손부 변연에서 중앙 부위로 신생골 형성이 많이 일어났으며, 기존골의 윗면에서도 신생골의 침착이 관찰되었다(Fig. 17).

③ 4주 조직 소견

대조군에서는 결손부 변연에서 신생골의 형성이 증가되었으며, 결손부에서는 섬유화가 더욱 진행된 양상이 관찰되었다(Fig. 18).

Chitosan 차폐막을 매식한 군에서도 신생골의 형성이 결손부 변연으로부터 중앙을 향하여 증가하였으며, 기존골의 윗면에서도 신생골의 형성이 상당히 많이 일어났다. 소주골의 형태는 더욱 치밀해지고 좀더 성숙된 골과 미성숙된 골이 혼합된 양상을 보였다. 골형성의 양상은 골결손 부위 절단면에서는 두께가 두껍고 중앙 부위로 갈수록 얇아지는데, 이렇게 형성된 골은 결손부의 경막면을 따라 위치하였다(Fig. 19).

Chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군에서도 결손부를 가로지르며 신생 소주골과 골수조직이 풍부하게 발달되었고, 기존에 있던 골 내에서도 골개조가 일어나는 것이 관찰되었다. 결손부에서는 chitosan 차폐막을 매식한 군과

마찬가지로 출혈이 거의 흡수되었고 섬유화가 더욱 진행되었다(Fig. 20).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

Chitosan은 chitin을 강알칼리로 처리하여 탈아세틸화시킨 유도체로서, 구조적으로 hyaluronic acid와 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1500kd인 생체분해성 물질이다.[44]

일반적으로 다당류는 효소에 의해 가수분해가 되며, Chitin과 chitosan도 이와 같은 기전으로 분해되는 것으로 보고되고 있다[45]. Chitin과 chitosan의 가수분해에 가장 효과적인 효소는 lysozyme인데,[46, 47] lysozyme에 의해서 분해된 단량체는 다시 세포외 기질에서 glycosaminoglycan을 재형성하는데 이용된다[48]. Lysozyme은 체내에 편재하는 것으로 알려져 있는데, 특히 혈액, 타액, 그리고 악하선에 많이 존재한다. Lysozyme은 외부 자극이 없는 경우에도 대식세포에 의해서 지속적으로 분비되는데, 체내에 매식된 chitosan은 대식세포를 자극하여 lysozyme의 분비를 증진시키고, 이와 더불어 N-acetyl-β-glucosaminidase, tumor necrosis factor, interleukin, interferon 등도 분비시킨다[49].

Cellulose는 생체 내에서 분해가 서서히 일어나는 물질로서, 이 실험에서 차폐막의 분해 시간을 더 연장시킬 목적으로 사용하였다. 실험결과 6 주까지는 chitosan 차폐막과 chitosan-cellulose 차폐막을 매식한 군 모두에서 분해가 관찰되지 않았는데, 치주 조직의 재생을 위해서 생체분해성 차폐막은 6주 정도만 본래의 형태를 유지하면 충분한 것으로 알려져 있다[50]. 따라서 chitosan과 chitosan-cellulose차폐막은 분해 시간에 있어서 차폐막으로서 기능을 하기에 충분한 것으로 생각된다.

물질 표면에 양이온 그룹이 존재하는 경우에는 비가역적인 강한 세포 유착이 일어나기 때문에, 체내에 매식시 심한 염증 반응이 일어나는 것으로 알려져 있다[51]. 하지만 우리들의 실험에서 chitosan은 반복 단위마다 양이온의 일차 아민(cationic primary amine)이 있음에도 불구하고 눈에 띄는 이물반응을 나타내지 않았는데, 이는 Tomihata 등[52]의 연구와 일치하며, 이들은 그 이유가 chitosan이 생체불활성이어서 주변조직에 강한 자극을 주지 않기 때문이라고 하였다.

세포 활성도 측정 결과 chitosan과 chitosan-cellulose 차폐막은 치주인대세포의 활성에 유해한 작용을 하지 않는 것으로 나타났다. 세포 활성도 측정 실험 시에 차폐막의 소독은 ethylene oxide gas로 하였으며, 이런 경우 잔류된 ethylene oxide가 세포 독성을 나타낼 수 있으므로[53] 실험군이 대조군에 비해 활성도가 떨어질 수 있는데, 이 실험에서도 chitosan 차폐막에서 통계적으로 유의하지는 않지만 세포 활성도가 대조군에 비해 낮게 나타났다.

이 실험에서 흰쥐의 두개관을 이용하여 실험하였는데, 흰쥐의 두개관은 악안면 영역의 골조직 재생술의 평가에 적절한 실험 모델로 알려져 있다[54]. 두개관은 안면골이나 하악골과 같은 막성골로서, 해부학적으로는 하악골과 같이 피질골 사이에 해면골이 존재하며, 생리학적으로는 위축된 하악골과 유사하다고 하였다[55].

계통발생학적으로 하등 동물은 골 재생능력이 매우 크기 때문에,[56] 골 결손 부위의 재생에 관한 동물 실험 시에 이를 고려하여야 한다. 또한 같은 종(species)인 경우 미성숙한 동물은 완전히 성숙한 동물에 비해 상대적으로 골 결손 부위의 치유가 더 잘 일어나기 때문에, 골 결손 부위 치유를 관찰하기 위한 실험에서는 필히 성장이 완료된 동물을 이용하는 것이 필요하다[57]. 따라서 우리들의 실험에서도 성장이 거의 완료된 300-350gm의 흰쥐를 사용하였다. 골 결손 부위의 치유량은 많은 부분에서 결손부의 크기에 좌우된다[58]. 그러므로 동물실험 시 자연적으로 치유될 수 있는 크기 이상의 결

손부위를 형성하여야 한다. 이러한 크기의 실험적 골 결손부를 임계치수 결손(critical size defect)라고 하며, 흰쥐(Sprague - Dawley rat) 두개관의 경우는 임계치수 결손이 직경 8 mm 크기로 보고되고 있으며,[59] 이 실험에서도 이 수치에 따라서 실험을 하였다.

Schmitz 등[54]은 흰쥐 두개관 결손부의 치유과정을 염증기, 유착불능 확립기, 성숙기의 세 단계로 구분하였다. 염증기는 결손부 형성 후 처음 10일까지의 기간으로 염증과 섬유소 및 적혈구의 결집이 특징적이며, 초기에는 호중구가 많이 관찰되고 이후 섬유모세포 모양의 세포들로 대체된다고 하였다. 우리들의 실험에서도 1주에서 육아조직의 증식과 출혈 및 섬유소가 관찰되었고, 실험군에서는 신생골의 형성도 관찰되었다. 유착불능 확립기는 결손부 형성 후 11일부터 20일까지의 기간으로 혈종과 섬유소가 감소하고 교원질의 조직화가 일어나기 시작한다고 하였으며, 결손부 변연으로부터 중앙 부위로 신생골 형성이 섬 모양으로 관찰된다고 하였다. 이 실험에서도 2주까지는 섬유소가 관찰되었고, 결손부 변연에서 중앙 부위로 신생골의 형성이 증가하였으며, 실험군에서는 신생골이 기존골의 윗면과 경막면에서도 관찰되었다. 성숙기는 결손부 형성 후 21일째부터 시작되는데, 결손부가 성숙된 반흔 조직의 양상을 보이며 섬유모세포 사이에 교원질이 다발 형태로 잘 배열되어있는 것이 관찰되고, 28일째부터는 결손부의 경막 부위에 골수조직이 현저하게 나타난다고 하였다. 이 실험에서도 4주에 대조군에서 섬유화가 상당히 진행된 양상을 보였고, 실험군에서는 차폐막 주변으로 교원성 조직에 의한 피막이 형성되는 양상을 보였다.

우리들의 실험에서 초기 해면골 침착은 대부분 골결손부 변연에서 이루어졌는데, 이는 초기 골형성이 결손부위의 골소주 간극으로부터 골결손부 변연으로의 골내 조직 증식의 결과임을 의미한다. 동물실험 시에 경막이 손상되지 않도록 주의를 하였는데, Reid 등[60]은 경막의 유지가 골재생에 중요한 요소라고 하였다. 이 실험에서 골형성의 양상이 결손부의 절단면에서는 두께가 두껍고, 중앙 부위로 갈수록 얇아지며 이렇게 형성된 골은 결손부의 경막면을 따라서 위치하였는데, 이와 같은 골형성 양상은 Reid 등의 주장과 일치하였다.

신생골의 형성이 결손부 변연 전체에서 같은 속도로 진행되지는 않는다. 그런데 조직 계측학적 분석에서는 두개관을 관상면으로 절단하므로 절단된 부위의 신생골의 형성 정도가 분석 결과의 평가에 커다란 영향을 미칠 수 있다. 따라서 우리들의 실험에서는 방사선 계측학적 분석을 병행하여 이런 오차를 줄이고자 하였다.

이 실험의 방사선 및 조직 계측학적 분석 결과에서 보면, chitosan 및 chitosan - cellulose 차폐막이 대조군에 비해 신생골의 형성이 유의성있게 많이 일어났는데, 이 결과는 여러 동물실험 및 in vitro 실험과 일치하였다. Klokkevold 등[61]은 in vitro실험에서 chitosan을 투여한 경우 흰쥐 두개관 세포가 대조군에 비해서 유의성있게 석회화 결절을 많이 형성하였다고 하였으며, chitosan이 조골세포와 같은 골전구세포의 이동과 분화를 촉진시키는 기질의 역할을 하는 반면, 섬유모세포와 같이 골 형성을 방해하는 세포의 기능을 방해하여 간접적으로 골형성을 증진시킬 수 있다고 하였다. Malette 등[62]은 개의 요골에 결손부를 형성하고 대조군에는 생리식염수를 적용한 결과, 결손부에서 일반적인 골 생성 - 흡수의 골 개조 순서를 보이며 가골(callus)이 형성된 반면, chitosan으로 처리한 부위에서는 가골의 형성 없이 바로 피질골로 치유가 됨을 관찰하였다. Muzzarelli 등[63]도 양의 대퇴골에 7mm 직경의 결손부를 형성하고 40일 후에 chitosan적용부위에서 석회화된 결절이 관찰된 반면, 대조군에서는 골 유도의 증후가 관찰되지 않는다고 하였다.

저자들의 실험의 결과는 chitosan 제재가 아닌 다른 종류의 차폐막을 이용한 실험과도 그

결과가 비슷한 양상을 보였다. Dahlin 등[64]은 흰쥐의 두개관에 e-PTFE 차폐막을 매식한 후 3주와 6주에서 29.6%의 신생골 형성을 얻었다고 하였는데, 이 실험에서도 방사선 계측학적 분석 결과 4주에서 chitosan 차폐막을 매식한 경우 29.74%, chitosan-cellulose 차폐막을 매식한 경우 33.38%의 신생골 형성을 얻었다. Brunel 등[65]은 흰쥐의 두개관에 세 가지 종류의 교원질 차폐막을 매식한 후 20일과 30일의 신생골 형성양의 평균이 0.71-0.84mm^{2}이라고 보고하였는데, 이 실험에서도 4주에서 chitosan 차폐막을 매식한 경우 0.73mm^2, chitosan-cellulose 차폐막을 매식한 경우 0.83mm^{2}의 신생골 형성을 얻었다.

Chitosan은 골형성을 증진시키기 위하여 다른 재료들과 혼합하여서도 사용되었다. Ito 등[66, 67]은 chitosan과 수산화인회석, chitosan과 β-tricalcium phosphate의 자가 경화 혼합물을 개발하였으며, 이들 재료를 치주 결손부에 골 충전용 paste로 사용할 수 있다고 하였다. Kawakami 등[68]은 Ito등[66]의 방법에 의해 제조한 chitosan-수산화인회석 자가 경화 paste를 토끼의 경골에 적용하여 방사선 사진으로 관찰한 결과 골양의 불규칙한 방사선 불투과상을 관찰하였고, 이것이 조직학적으로 연골조직과 골조직이라고 판명하였으며, 따라서 chitosan-수산화인회석 자가 경화 paste가 골전도성을 가지며 임상적으로 생체활성 골 대체물질로 사용될 수 있음을 보고하였다. Chitosan 차폐막은 e-PTFE 차폐막이나 polylactide-polyglycolide 공중합체 차폐막에 비하여 견고성이 떨어지는 단점이 있는데, 위의 실험 결과를 볼 때 chitosan에 수산화인회석 혹은 β-tricalcium phosphate와 같이 견고성을 증진시킬 수 있고 골전도 능력도 있는 물질을 혼합하여 사용할 경우 이러한 단점을 보완 할 수 있을 것으로 생각된다.

Chitosan은 창상 치유 증진과 골조직 형성 증진 작용 외에도 다양한 기능들이 보고되고 있다. Muzzarelli 등[69]은 N-carboxybutyl chitosan에 노출된 여러 미생물들이 두드러진 형태 변화를 보였으며, 이런 항미생물 작용의 기전은 chitosan이 세균 표면에서 만들어지는 산성 중합체와 상호작용해서 전해질 복합체를 형성하는 것과 관련이 있는 것 같다고 하였다. 또한 Tarsi 등[70]은 chitosan이 Streptococcus mutans가 수산화인회석에 부착하는 것을 억제한다고 하였다. Hirano 등[71]은 lysozyme과 chitinase에 의한 효소 가수분해 속도는 N-acetyl group의 치환속도에 의해서 조절할 수 있다고 하였다. 앞으로 이와 같은 특성들을 활용하여 chitosan을 치아우식증 및 치주질환 예방과 조절된 약물 유리를 위한 약물송달체계의 기저물질 등으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 보아 chitosan제재를 이용한 차폐막은 흰쥐의 두개관 결손부에서 골조직 재생을 증진시킬 수 있는 것으로 보이나, 향후 차폐막의 물성 보완 및 계통발생학적으로 더 진화된 동물의 치주조직을 대상으로 한 실험을 통해 장기적인 골조직 및 치주조직의 재생유도 효과에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

창상 치유의 증진과 골조직의 형성에 효과가 있는 chitosan 제재를 이용한 차폐막의 생체적합성을 알아보기 위해 치주인대 세포의 활성도에 미치는 효과 및 흰쥐 피하조직에서의 조직반응과 분해양상을 관찰하였으며, 골조직 재생유도능력을 평가하기 위해 흰쥐의 두개관 결손부에 차폐막을 매식하여 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Chitosan 차폐막과 chitosan-cellulose 차폐막은 치주인대 세포의 활성에 유해한 영향을 미치지 않았다.

2. Chitosan 차폐막과 chitosan - cellulose 차폐막은 흰쥐의 피하조직에서 1주에 염증반응을 나타내었으나, 2주부터는 염증이 감소하고 섬유화가 진행된 양상을 보였고, 4주부터는 염증이 거의 소실되었으며, 6주까지 차폐막의 분해 양상은 관찰되지 않았다.
3. 방사선 계측학적 분석을 이용한 두개관의 골조직 재생유도능력 평가에서 대조군에 비해 실험군들에서 신생골에 의한 결손부의 폐쇄가 많이 일어났으며, chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군은 2주와 4주에서, chitosan 차폐막을 매식한 군은 4주에서 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$).
4. 조직 계측학적 분석을 이용한 두개관의 골조직 재생유도능력 평가의 결과는 방사선 계측학적 분석 결과와 비슷한 양상을 보였으며, 4주에서 chitosan - cellulose 차폐막을 매식한 군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$).

이상의 결과로 보아 chitosan 제재를 이용한 차폐막은 치주질환시 골조직 유도재생을 위한 차폐막으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅵ. 참고 문헌

1. Polson AM, Caton J.: Factors influencing periodontal repair and regeneration. J Periodontol, 53: 617 - 625, 1982.
2. Melcher AH.: On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol, 47: 256 - 260, 1976.
3. Caton J, Nyman S, Zander H.: Histometric evaluation of periodontal surgery II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. J Clin Periodontol, 7: 224 - 231, 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. 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.
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. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol, 9: 290 - 296, 1982.
8. Aukhil I, Simpson DM, Schaberg TV.: An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs. J Periodont Res, 18: 643 - 654, 1983.
9. Becker W, Becker BE, McGuire MK.: Localized ridge augmentation using absorbable pins and e - PTFE barrier membranes. A new surgical technique. case reports. Int J Periodont Rest Dent, 14: 49 - 61, 1994.
10. Caffesse RG, Dominguez LE, Nasjleti CA, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA.: Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration. J Periodontol, 61: 45 - 50, 1990.
11. Gottlow J.: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non -

resorbable devices ; Initial healing and long - term results. J Periodontol, 64: 1157 - 1167, 1993(supplement).
12. 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.
13. Greenstein G, Caton JG.: Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. Periodontology 2000, 1: 36 - 45, 1993.
14. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE.: Freeze - dried, cross - linked bovine type I collagen.: Analysis of properties. J Periodontol, 63: 182 - 186, 1992.
15. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Grosskopf A, Noff M.: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. J Periodontol, 59: 380 - 386, 1988.
16. Tanner M, Solt CW, Vudhakanok S.: An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. J Periodontol, 59: 524 - 530, 1988.
17. Blumenthal N, 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.
18. Chung KM, Salkin LM, Stein MD, Freedman AL.: Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. J Periodontol, 61: 732 - 736, 1990.
19. Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ.: Effect of a collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs. J Periodontol, 64: 878 - 882, 1993.
20. Fleisher N, Waal HD, Bloom A.: Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh(Polyglactin 910). Int J Periodont Rest Dent, 8(2): 45 - 54, 1988.
21. Gager AH, Schultz AJ.: Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane (Polyglactin 910) with and without ossseous grafting. J Periodontol, 62: 276 - 283, 1991.
22. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S.: Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. J Clin Periodontol, 19: 633 - 640, 1992.
23. Brekke JH, Olson RJ, Scully JR, Osbon DB.: Influence of polylactic acid mesh on the incidence of localized osteitis. Oral surg Oral Med Oral Pathol, 56: 240 - 245, 1983.
24. Gottlow J, Laurell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H, Bogentoft C.: Periodontal tissue response to a new bioabsorbable guided tissue regeneration device : A longitudinal study in monkeys. Int J Periodont Rest Dent, 14: 437 - 449, 1994.
25. Magnusson I, Batich C, Collins BR.: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. J

Periodontol, 59: 1 - 7, 1988.
26. Laurell L, Gottlow J, Nyman S, Falk H, Fornell J, Johard G.: Gingival response to Guidor, a bioabsorbable device in GTR - therapy. J Dent Res, 71(AADR Abstracts 1536): 298, 1992.
27. Robert PM, Frank RM.: Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane. J Periodontol, 65: 414 - 422, 1994.
28. Ogawa K, Yui T.: Crystallinity of par - tially N - acetylated chitosans. Biosci Biotech Biochem, 57: 1466 - 1469, 1993.
29. Tokura S, Nishi N, Noguchi J.: Studies on chitin III. Preparation of chitin fibers. Polymer J, 11: 781 - 786, 1979.
30. Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S.: Highly deacetylated chitosan and its properties. J Appl Polym Sci, 28: 1909 - 1917, 1983.
31. Reynolds BL.: Wound healing III: Artificial maturation of arrested regenerate with an acetylated amino sugar. Am Surgeon, 26: 113 - 117, 1960.
32. Brandenberg G, Leibrock LG, Shuman R, Malette WG, Quigley H.: Chitosan: A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tis - sue. Neurosurg, 15: 9 - 13, 1984.
33. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Templeton AJ, Economou SG.: Chitosan: Evaluation of a new hemo - static agent. Curr Surg, 47: 37 - 39, 1990.
34. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN.: Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. J Oral Maxillofac Surg, 49: 858 - 863, 1991.
35. Klokkevold PR, Subar P, Fukayama H, Bertolami CN.: Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits with platelet dysfunction induced by epoprostenol. J Oral Maxillofac Surg, 50: 41 - 45, 1992.
36. Prudden JF, Migel P, Hanson P, Friederich L, Balassa LL.: Discovery of a potent pure chemical wound healing accelerator. Am J Surg, 119: 560, 1970.
37. Balassa LL, Prudden JF.: Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration. In: Muzzarelli RA, Pariser ER, eds. Proceedings of the 1st International Conference on Chitin and Chitosan. Cambridge, MA: MIT Press, 1978.
38. Muzzarelli RA, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini B.: Biological activ - ity of chitosan: Ultrastructural study. Biomaterials, 9: 247 - 252, 1988.
39. Van der Lei B, Wildevuur ChRH.: Improved healing of microvascular PTFE prostheses by induction of a clot layer: An experimental study in rats. Plast Reconst Surg, 84: 960 - 968, 1989.
40. Minami S, Okamoto A, Matsuhashi A, et al.: Applications of chitin and chi - tosan in animals. In:Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, eds. : Advances in Chitin and Chitosan. London: Elsevier Applied Science, 61 - 69, 1992.
41. Sapelli PL, Baldassare V, Muzzarelli RA, Emanuelli M.: Chitosan in den - tistry. Chitin in Nature and

Technology, 507 - 512, 1986.
42. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnaloni A, Filippini O, Baldassarre V.: Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. Biomaterials, 10: 598 - 603, 1989.
43. Muzzarelli RA, Biagini G, Bellardini M, Simonelli L, Castaldini C, Fratto G.: Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. Biomaterials, 14: 39 - 43, 1993.
44. Sandford PA.: Chitosan : Commercial uses and potential applications. In: Skjak - Braek G, Anthonsen T, Sandford P, eds. Chitin and Chitosan. London: Elsevier Applied Science, 51 - 70, 1989.

45. Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, Saimoto H.: Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. Int J Biol Macromol, 16: 43 - 49, 1994.
46. Amano K, Ito E.: The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. Eur J Biochem, 85: 97 - 104, 1978.
47. Pangburn SH, Trescony PV, Heller J.: Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. Biomaterials, 3: 105 - 108, 1982.
48. Muzzarelli RA.: In vivo biochemical significance of chitin - based medical items. Polymeric Materials for Biomedical Applications(Eds S. Dumitriu and M. Szycher), Marcel Dekker, New York, USA, 1992.
49 . Pinkus GS, Said JW.: Proliferation of intracytoplasmatic lysozyme in normal tissues, myeloproliferative disorders, hairy cell leukemia and other pathological processes. Am J Pathol, 89: 351 - 362, 1977.
50. Polson AM.: Periodontal Regeneration. Current Status and Directions. Quintessence books, P159, 1994.
51. Okada T, Ikada Y.: Tissue reactions to subcutaneously implanted surface - modified sil - icones. J Biomed Mater Res, 27: 1509 - 1518, 1993.
52. Tomihata K, Ikada Y.: In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacety - lated derivatives. Biomaterials, 13: 567 - 575, 1997.
53. Brunsvold MA, Mellonig JT.: Bone grafts and periodontal regeneration. Periodontology 2000, 1: 80 - 91, 1993.
54. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD.: Characterization of rat calvarial nonunion defects. Acta Anat, 138: 185 - 192, 1990.
55. Schmitz JP, Hollinger JO.: The critical size defect as an experimental model for cran - iomandibulofacial nonunions. Clin Orthop, 205: 299 - 308, 1986.
56. Bays RA.: Current concepts in bone grafting. In Irby WB. and Shelton DW.(eds.) : Current Advances in Oral and Maxillofacial Surgery, vol.4. St. Louis, CV. Mosby, p.109, 1983.
57. Prolo DJ, Pedrotti PW, Burres KP, Oklund S.: Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. Clin Orthop, 108: 230, 1982.
58. Simmons DJ.: Fracture healing. In Urist MR. (ed.) : Fundamental and Clinical Bone Physiology. Philadelphia JB. Lippincott, p.291, 1980.
59. Takagi K, Urist MR.: The reaction of the dura to bone morphogenetic protein in repair of skull defects. Ann Surg, 196: 100, 1982.
60. Reid CA, McCarthy JG, Kolber AB.: A study of regeneration in parietal bone defects in rabbits. Plast Reconstr Surg, 67: 591 - 596, 1981.
61. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW.: Osteogenesis enhanced by chitosan(Poly - N - Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro. J Periodontol, 67: 1170 - 1175, 1996.
62. Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED.: Chitin in nature and technology. In; Muzzarelli

RA, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. Chitosan Effect in Nature and Technology. New York: Pleum Press, 435 - 442, 1986.
63. Muzzarelli RA, Mattioli - Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G.: Stimulatory effect on bone formation exerted by a modi - fied chitosan. Biomaterials, 15: 1075 - 1081, 1994.
64. Dahlin C, Alberius P, Lindhe A.: Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. J Neurosurg, 74: 487 - 491, 1991.
65. Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benque E, Marin P, Zahedi S.: Regeneration of rat cal - varial defects using a bioabsorbable membrane technique: Influence of collagen cross - linking. J Periodontol, 67: 1342 - 1348, 1996.
66. Ito M, Yamagishi T, Sugai T.: Experimental development of a chitosan - Bonded hydroxyapatite bone filling paste. J Jpn Soc Dent Mater Devi, 9: 608 - 616, 1990.
67. Ito M.: In vitro properties of a chitosan - bonded hydroxyapatite bone filling paste. Biomaterials, 12: 41 - 45, 1991.
68. Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M, Eda S.: Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan - bonded hydroxyapatite self - hardening paste. Biomaterials, 13: 759 - 763, 1992.
69. Muzzarelli RA, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE.: Antimicrobial properties of N - carboxybutyl chitosan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34(10): 2019 - 2023, 1990.
70 Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C.: Inhibition of Streptococcus mutans adsorption to hydroxyapatite by low - molecular - weight chitosans. J Dent Res, 76(2): 665 - 672, 1997.
71. Hirano S, Tsuchida H, Nagao N.: N - acetylation in chitosan and the rate of its enzymatic hydrolysis. Biomaterials, 10: 574 - 576, 1989.

사진부도(Ⅰ)

사진부도(Ⅱ)

사진부도(Ⅲ)

Explanation of Figures

Figure 1. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan membrane(M) implanted in rat for 1 week(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 2. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan - cellulose membrane(M) implanted in rat for 1 week(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 3. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan membrane(M) implanted in rat for 2 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 4. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan - cellulose membrane(M) implanted in rat for 2 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 5. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan membrane(M) implanted in rat for 4 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 6. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan - cellulose membrane(M) implanted in rat for 4 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 7. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan membrane(M) implanted in rat for 6 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 8. Optical micrograph of the subcutaneous tissue surrounding chitosan - cellulose membrane(M) implanted in rat for 6 weeks(Hematoxylin - Eosin staining ×100).

Figure 12. Histologic section of control calvaria at 1 week. New bone formation was minimal. Granulation tissue and hemorrhage were observed. Arrow indicates the margin of the original defect(Masson's trichrome staining ×40).

Figure 13. Histologic section from defect treated with chitosan membrane at 1 week. New bone(open arrowheads) progressed from defect margin toward the center of the defect. Arrow indicates the margin of the original defect(Masson's trichrome staining ×40).

Figure 14. Histologic section from defect treated with chitosan - cellulose membrane at 1 week. New bone(open arrowheads) with central extension was seen at the wound edge(arrow)(Masson's trichrome staining ×40).

Figure 15. Histologic section of control calvaria at 2 weeks. Trabeculae of woven bone(open arrowheads) grew into the center of the defect. But most of the defect was filled with a loosely organized connective tissue. Arrow indicates the margin of the original defect(Masson's trichrome stain ×40).

Figure 16. Histologic section from defect treated with chitosan membrane at 2 weeks. New bone formation(open arrowheads) was observed from the margin and the dural side of the defect. Arrow indicates the margin of the original defect(Masson's trichrome stain ×40).

Figure 17. Histologic section from defect treated with chitosan - cellulose membrane at 2 weeks. The bone regeneration has advanced from the margin(arrow). The

woven bone was also observed along the superior surface of the old bone. Open arrowheads indicate the new bone(Masson's trichrome stain ×40).

Figure 18. Histologic section of control calvaria at 4 weeks. New bone formation(open arrowheads) was increasing from the defect margin(arrow). Fibrosis has advanced between the wound edges (Masson's trichrome stain ×40).

Figure 19. Histologic section from defect treated with chitosan membrane at 4 weeks. The bone regeneration was increasing from the margin of the defect. Near the edge of the defect smaller islands tended to flow together forming larger island, as well as merging with the marginal new bone. Arrow indicates the margin of the original defect. Open arrowheads indicate the newly formed bone (Masson's trichrome stain ×40).

Figure 20. Histologic section from defect treated with chitosan-cellulose membrane at 4 weeks. Numerous bony trabeculae and interposed bone marrow were noted. Arrow indicates the margin of the original defect. Open arrowheads indicate the newly formed bone(Masson's trichrome stain ×40).

- Abstract -

Guided bone regenerative effect of chitosan and chitosan-cellulose membranes

Seung - Beom Kye*, Seong - Heui Son**, Sang - Mook Choi*
*Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University
**Institute of Oral Health and Science, Samsung Medical Center, and Center for Clinical Research, SBRI, Sungkyunkwan University School of Medicine

Chitosan has been known as a wound healing agent. The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility and guided bone regenerative effect of chitosan and chitosan - cellulose membranes. The effects of chitosan and chitosan - cellulose membranes on the growth and survival of human periodontal ligament cells were examined by rapid colorimetric MTT(tetrazolium) assay, and the tissue response and resorption pattern were observed by implanting the membranes into the subcutaneous tissue of the back of rats for 6 weeks. To evaluate the guided bone regenerative potential of membranes, the amount of newly formed bone in the rat calvarial defects(8mm in diameter) was measured by histomorphometry and radiomorphometry 1,2 and 4 weeks after implantation of membranes. Chitosan and chitosan - cellulose membranes showed no adverse effect on the growth and survival of human periodontal ligament cells. When membranes were subcutaneously implant - ed, inflammatory reaction was observed at 1 week and which gradually subsided 2 weeks after implantation. Membranes remained intact throughout the experimen - tal period of 6 weeks. Radiomorphometric analysis of the craniotomy sites revealed that chitosan and chitosan - cellulose mem - brane implanted sites showed increased radiopacity over control. Statistically sig - nificant differences with control were found in chitosan - cellulose membrane implanted group at 2 and 4 weeks, and chitosan membrane implanted group at 4 weeks($P<0.05$). Histomorphometric data indicated a pattern of osseous healing simi - lar to radiomorphometric analysis. There was a statistically significant difference between control and chitosan - cellulose membrane implanted group at 4 weeks($P<0.05$). These results implicate that chitosan and chitosan - cellulose mem - brane might be useful for guided bone regeneration.

Key words: chitosan, chitosan - cellulose, biodegradable membrane, guided bone regeneration, biocompatibility