

혈소판유래성장인자를 함유한 TCP/chitosan 미세과립이 신생골조직 형성에 미치는 영향에 관한 연구

설양조^{1,3} · 이주연² · 계승범³ · 이영규³ · 김원경^{1,4} · 이용무¹
구 영¹ · 한수부¹ · 이승진² · 정종평¹ · 류인철^{1*}

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²이화여자대학교 약학대학 약학과

³성균관대학교 의과대학 삼성의료원 치과진료부 치주과

⁴서울아산병원 치과

I. 서론

외상 또는 감염으로 인한 골조직의 손상이 있는 경우 골조직 이식이 많이 시행되고 있다¹⁾. 현재 자가 골 및 많은 종류의 동종골, 이종골 이식이 시행되고 있는데, 이 재료들은 각각 이식공여부 추가수술, 질병을 옮길 수 있는 점, 그리고, 면역반응을 일으킬 수 있는 점 등의 문제점들을 안고 있다. 이런 문제점들이 없는 골조직대체물질을 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 골조직을 재생시키기 위한 골조직대체물질은 다음과 같은 요건을 충족시켜야 한다. 우선, 생체적합성이 뛰어나야 하며, 생분해성이어야 한다. 또, 적절한 크기의 다공성구조로 이루어져 있어야 하며, 적절한 기계적 강도를 가져야 한다²⁾. 최근에는 성장인자가 골재생에 미치는 영향에 관한 연구가 많이 진행되면서, 골이식재에 성장인자를 함유시켜 골이식재의 골형성능력을 향상시키는 방법이 많이 시도되어지고 있으며 성장인자 등의 약물을 함

유할 수 있는가, 그리고 그 효과가 서서히 지속적으로 나타나도록 조절할 수 있는가 하는 점이 골이식재에 새로이 요구되어지고 있다.

다양한 종류의 세라믹과 고분자 중합체들이 골조직을 재생시키기 위해 연구되었다. 특히, hydroxyapatite (HA)와 tricalcium phosphate (TCP) 등은 골전도성이 뛰어나고 직접 골조직과 결합하는 장점을 갖고 있어 골이식재 개발을 위해 많이 연구되었지만^{3,5)}, 부서지기가 쉬우며 강도가 약한 문제점으로 실제 임상에서는 아직 많이 사용되지 않고 있다^{6,7)}. 현재 임상에서 많이 이용되어지고 있는 BioOss® (Geistlich Biomaterials, Wolhuser, Switzerland)는 제조공법상 성장인자 등의 약물을 함유하기가 어려운 단점이 있어 새로운 요구조건을 충족시키지는 못하고 있다. 세라믹만의 단점을 극복하기 위해 세라믹과 콜라겐^{8,9)} 또는 세라믹과 폴리락타이드^{7,10-14)}, 혹은 세라믹과 다분 흡수성 중합체^{15,16)}를 만들어 우수한 결과를 보고하고 있지만, 아직 제품화되지는 않고 있다.

*This work was supported by the grant of the Ministry of Science and Technology, Seoul, Korea. (M1-0015-00-0025)

교신 저자: 류인철, 서울특별시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 110-749

Chitosan(poly-N-acetylglucosaminoglycan)은 생체 적합성이 우수하며 생체 내에서 분해된다¹⁷⁻¹⁹⁾. 또, chitosan은 세포의 부착, 증식을 증가시키는 특징들을 갖고 있으며, 상처 부위에서 초기에 성장인자와 수용체 그리고 부착 단백질과 상호작용을 하여 네트워크를 형성할 때 중요한 역할을 한다²⁰⁾. 또, chitosan이 마크로파지를 자극하여 형질전환성장인자 β -1(transforming growth factor β -1)과 혈소판유래성장인자(platelet derived growth factor BB, PDGF-BB)를 생산하게 하고 이들 성장인자가 세포의 기질이 많이 생산되도록 한다는 보고²¹⁾도 있다.

Tricalcium phosphate는 생체친화성이 뛰어난 세라믹으로 골전도성이 우수하여 골조직 성장의 기질로 작용할 수 있음이 보고되고 있다²²⁻²⁴⁾. 이것은 생체내에서 12개월에서 18개월 사이에 완전히 흡수되어 기능적으로나 해부학적으로나 원래의 골조직과 유사한 조직으로 대체가 된다²⁵⁻²⁶⁾고 하며 최근에 골 대체물질로 상당히 많이 연구되어지고 있다.

혈소판유래성장인자는 치주인대세포와 골아세포에 화학주성을 나타내며, 이 세포들의 분열을 촉진시키고²⁷⁾, 동물실험에서 치주조직²⁸⁻³⁰⁾과 골조직³¹⁾의 재생을 증가시키는 것으로 보고되었다. 하지만, 투여한 성장인자가 충분한 기간동안 유효 농도로 조직 내에 남아있지 않고 4일만에 대부분 제거되는 문제점²⁸⁾이 있었다.

이번 연구의 목적은 chitosan과 tricalcium phosphate를 혼합하여 미세과립을 제조하고, 미세과립 상에 골아세포를 배양하여 세포 수와 증식의 양상을 알아보고, 혈소판유래성장인자를 방출이 지연되도록 미세과립 내에 함유시켜 골결손부위에서 골조직의 재생에 어떤 영향을 미치는지를 알아보는 것이다.

II. 재료 및 방법

이번 연구에서는 TCP/chitosan 미세과립을 제조하여 형태를 관찰하였고, TCP/chitosan 미세과립 상에서의 골아세포를 배양하여 증식 및 부착에 관한 연구를 하였다. 또, 제조된 TCP/chitosan 미세과립에 혈소판유래성장인자를 함유시켜 방출의 양상을 보

았으며, 신생골형성에 어떤 영향을 미치는지를 연구하였다.

1. 재료

Chitosan (Tae-Hoon Bio., Kyong Book, Korea)과 Lysozyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 그리고, tricalcium phosphate(Showa Chemicals, Osaka, Japan)를 준비하였다. PDGF-BB 와 ¹²⁵I 동위원소가 부착된 PDGF-BB를 각각 Genzyme (Cambridge, MA, USA)과 Amersham (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. β -glycerol phosphate, L-ascorbic acid 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, Trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS), α -minimum essential medium (α -MEM) 등은 Gibco (Grand island, NY, USA)에서 구입하였다.

2. TCP/chitosan microgranules의 제조

98%로 탈아세틸화된 chitosan (4g)을 3% 아세트산 용액에 녹였다. Tricalcium phosphate (2g)을 chitosan 용액에 골고루 퍼지게 한 후, 고온 천으로 걸러 불순물을 제거하였다. 혼합물을 부드럽게 저어주면서 NaOH/ethanol/water (4/20/76)(w/v/v)를 주사기로 분당 5ml씩 넣었다. 미세과립의 크기는 주사기를 통해 공기를 불어넣음으로써 조절되어지는데, 공기의 흐름은 압력계가 달려있는 압력조절기를 통해 조절되었다. 만들어진 미세과립은 pH가 중성이 될 때까지 증류수로 씻었고, 400-800 um 사이의 미세과립을 골라내어 동결건조 시켰다. 혈소판유래성장인자가 함유된 미세과립을 형성할 때는 선택적으로 고른 TCP/chitosan 미세과립 20 mg 당 300 ng 의 혈소판유래성장인자를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 보관 후 동결 건조 시켰다.

3. 주사전자현미경 관찰

미세과립을 gold sputtering을 통해 coating 시키고, (Sputter Coater, POLARON SC 7620, VG

Microtech, England) 형태를 알아보기 위해 주사전자 현미경 (JEOL Model JSM 5200, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

4. 세포 증식 관찰

BioOss[®], chitosan 미세과립, 그리고 TCP/chitosan 미세과립 20 mg을 각각 24-well 세포배양판에 넣고, 배양액에 들어있는 MC3T3-E1 세포 (2×10^4 cells/ml)를 각 재료 위로 떨어뜨렸다. 배양액은 1 ml의 α -MEM, 10 mM의 15% FBS, 1 %의 antibiotic-antimycotic solution, 10 mM의 sodium β -glycerol phosphate, 50 ug/mL의 L-ascorbic acid, 그리고 10^{-7} M의 dexamethasone으로 만들었다. 배양할 때 기체는 일 반공기 95 %, 이산화탄소 5 %로 하였고, 온도는 37°C를 유지하였다. 하루가 지난 후에 미세과립을 다른 배양접시에 옮겨 계속 배양하였고, 3일 마다 배양액을 교환하였다. 세포 수 측정 시에 각 재료를 우선 HBSS로 부드럽게 세척하고, 4 mM EDTA에 trypsin (2.5%)을 혼합한 효소를 이용하여 부착된 세포들을 기질에서 떨어뜨렸다. 활력 세포 수를 측정하기 위해 trypan blue exclusion 방법을 이용하였다.

세포가 각 재료상에서 증식하는 모양을 배양 7일째와 28일째에 관찰하였다. 세포 배양 7일째에 각 재료를 배양접시에서 꺼내어 2.5% glutaraldehyde (Sigma)를 첨가한 0.1 M의 PBS (pH = 7.4)에서 30 분간 고정시킨 후, 0.1 M의 PBS로 세척하였다. 그리고, 1% osmium tetroxide (Polyscience Inc., PA, USA)로 염색한 후에 얼음 위에 30-40분 동안 둔 후, 탈이온수로 세척하였다. 고정된 표본을 통법에 따라 알코올로 탈수시키고 동결 건조한 후, gold sputtering을 하여 주사전자현미경으로 관찰하였다. 세포 배양 28일째에 각 재료를 배양접시에서 꺼내어 3.7% formaldehyde에서 하룻밤 동안 고정시켰고, 70% ethanol에 넣어두었다. 조직표본을 탈수시킨 후, 파라핀으로 포매시켰고, 6um 두께로 하여 절단하였다. Hematoxylin-eosin 염색을 한 후, 광학현미경 (Olympus BH-2 light microscope, Olympus Optical Co., Osaka, Japan)으로 검사하였다.

5. 혈소판유래성장인자 방출 실험

¹²⁵I-부착 혈소판유래성장인자 (10uCi, Amersham, UK)를 비방사성의 PDGF-BB와 섞어서 1 uCi의 방사선량으로 희석시킨 후에 TCP/chitosan 미세과립 20 mg 당 300 ng의 혈소판유래성장인자를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 보관 후 동결건조시켰다. ¹²⁵I-부착 혈소판유래성장인자에서 유리 ¹²⁵I의 양은 reverse phase HPLC를 통해 확인해본 결과 5% 이하로 나타났다. 만들어진 혈소판유래성장인자-TCP/chitosan (PDGF-TCP/chitosan) 미세과립을 10 ml의 포스페이트 완충액(Phosphate buffer solution, PBS, pH = 7.4)이 들어있는 용기에 넣은 후, 37°C 수조에 넣고 15 rpm으로 회전시켰다. 각 측정시기별로 완충액을 교환하였고, 제거한 완충액에 들어있는 PDGF-BB의 양을 gamma counter (Cobra II, Packard Instrument, Meriden, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

6. 골조직 재생 능력

골조직재생능력을 알아보기 위해 두개골원형골결손 모델을 이용하였다. chitosan 미세과립, TCP/chitosan 미세과립, PDGF-TCP/chitosan 미세과립 및 BioGran (Orthovita Inc., Malvern, PA, USA)을 준비하였다. New Zealand white rabbits (평균 체중: 2.5 kg)을 xylazine (3.5mg/kg body wt.)으로 근육주사하여 마취시킨 후, 두개골 부위를 베타딘으로 소독하고, 국소마취를 2% lidocaine 용액으로 시행하였다. 두개골 부위의 피부를 박리한 후, 골막을 거상시켰다. Trepine bur를 이용하여 생리식염수를 충분히 뿌려주면서 직경 8 mm의 원형골결손부를 형성하였다. 이 골결손부에 준비한 재료로 골이식을 하였는데, 미세과립은 골결손부당 약 20 mg을 넣었다. 음성 대조군으로는 골이식을 하지 않았다. 골막과 피부를 각각 5-0 chromic gut, 4-0 silk (Ethicon, Somerville, NJ, USA)로 이중 봉합하였다. 실험동물을 4주 후에 희생시키고, 채취한 표본은 포르말린 용액에 넣어 고정시켰다. Super Low-viscosity Embedding Media (Polysciences Inc., PA, USA)로 조직을 포매하고,

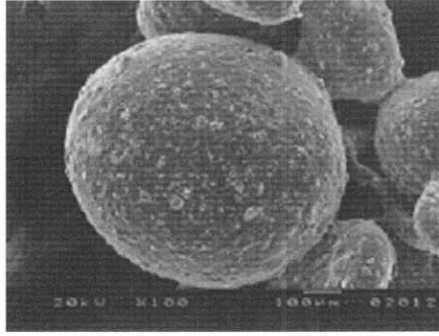


Figure 1. Scanning electron microscopic view of TCP/chitosan microgranules. (Bar = 100 μm , Original magnification: $\times 100$.)

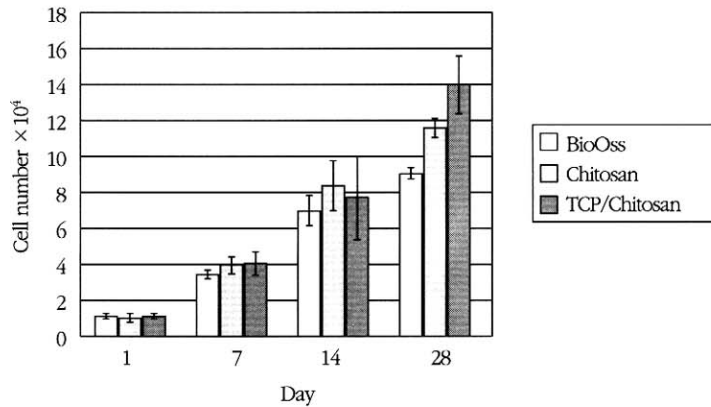


Figure 2. Osteoblast proliferation level of TCP/chitosan microgranules after 1, 7, 14, 28 days of culture. Data are presented as mean \pm standard error (n=6). At 28 days of culture, cell number of TCP/chitosan microgranule was more than that of others without significant differences.

Exakt Cutting-Grinding system (Exakt Apparateb, Hamburg, Germany)으로 표본을 20 μm 두께로 제작한 후, basic fuchsin과 toluidine blue (multiple staining kit, Polyscience Inc., PA, USA)로 염색하여 비탈회표본을 제작하였다. 표본을 광학현미경 (Olympus BH-2 light microscope, Olympus Optical Co., Osaka, Japan)으로 검사하였다.

7. 통계 분석

모든 측정은 3배수 이상으로 시행하였고, 평균값과 표준오차를 구하였다. 통계분석에는 ANOVA (SPSS

10.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 시행하였다.

III. 결과

1. TCP/chitosan 미세과립의 형태

만들어진 미세과립은 구형(球形)이었고, 크기는 250-1000 μm 의 범위 내에 있었다. TCP/chitosan 미세과립의 주사전자현미경 사진에서 원형을 이루고 있는 것은 chitosan 성분이며, 혼합된 TCP가 표면에 존재하는 경우에는 크고 작은 무수한 돌기를 형성하고 있었다. 이로 인해 만들어진 TCP/chitosan 미세과

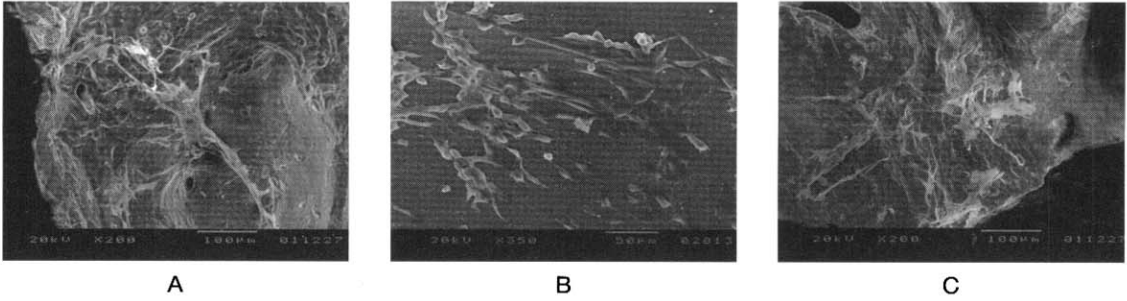


Figure 3. Scanning electron microscopic view of osteoblasts on (A) BioOss®, (B) chitosan microgranules, (C) TCP/chitosan microgranules seeded with 2×10^4 cells/well and cultured for 7 days. Attached osteoblasts were interconnected in A, C. Individual cells were flat and very closely attached on the chitosan microgranule in B. (Bar = 100 μ m in A and C, 50 μ m in B)

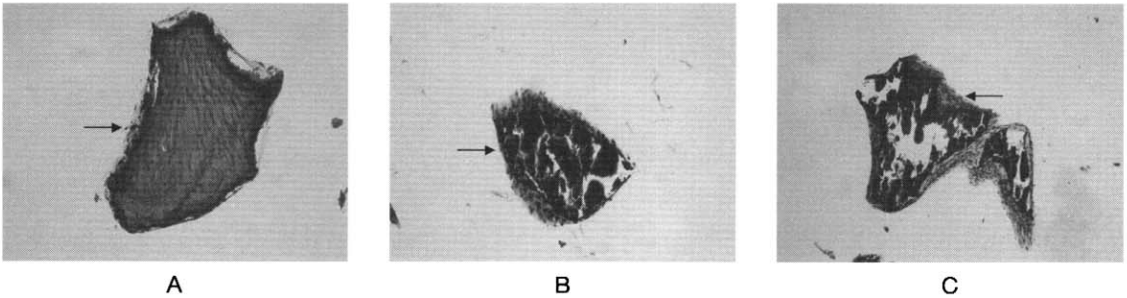


Figure 4. Light microscopic view of (A) BioOss® (original magnification $\times 100$), (B) chitosan microgranules (original magnification $\times 100$), (C) TCP/chitosan microgranules (original magnification $\times 400$). Cells were seeded at 2×10^4 cells/well and cultured for 28 days. Cells were only on the surface of BioOss®. On the contrary, cells on the microgranules were in multi-layer and interconnected each other (B,C). Arrows indicate attached osteoblasts.

립의 표면은 상당히 거칠었고, 구형의 미세과립들이 서로간에 조그만 공간을 형성하는 모양도 관찰되었다 (Figure 1). TCP를 혼합하지 않은 chitosan 미세과립에서는 표면에 TCP 돌기가 없고 부드러운 표면을 보이고 있었다(Figure 3-B).

2. 골아세포의 증식

BioOss®, chitosan 미세과립, 및 TCP/chitosan 미세과립 상에서 MC3TC-E1 세포의 증식을 1, 7, 14, 28 일동안 측정하였다. 각 군에서 세포들은 점진적으로 증식하는 양상을 보였으며, 28 일째의 세포 수는 BioOss®, chitosan, 그리고 TCP/chitosan 미세과립에

서 각각 $9.03 \pm 0.30 \times 10^4$, $11.50 \pm 0.18 \times 10^4$, 그리고 $13.88 \pm 1.59 \times 10^4$ 이었다(Figure 2). TCP/chitosan 미세과립상에서의 세포 수가 Bio-Oss®와 chitosan 미세과립 상에서의 그것보다 많았지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

BioOss®, chitosan 및 TCP/chitosan 미세과립 상에서 7 일간 배양한 후 관찰한 주사전자현미경 그림 (Figure 3)에서 BioOss®(A)와 TCP/chitosan 미세과립(C) 상에 접종된 세포가 상당히 많아 표면을 거의 모두 덮고 있었으며, 세포들끼리 서로 접촉되어 있었다. Figure 3-B는 chitosan 미세과립에서 세포가 적게 부착하고 있는 부분이며 세포들이 길다란 돌기를 내면서 기질 표면에 잘 부착되어 있음을 볼 수 있었다.

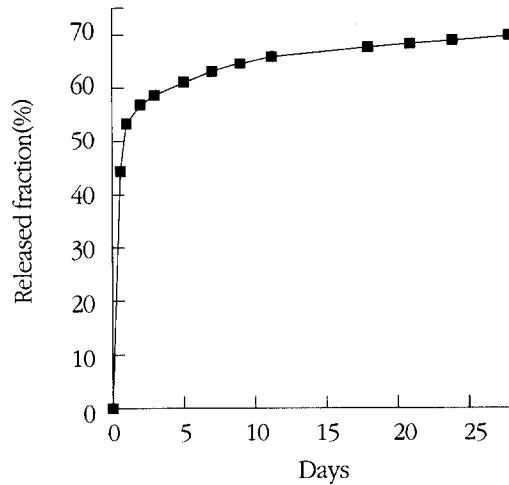


Figure 5. Cumulative release of PDGF-BB from TCP/chitosan microgranules in accordance with time. 300 ng of PDGF-BB was loaded in 20mg of TCP/chitosan microgranules.

BioOss[®], chitosan, TCP/chitosan 미세과립 상에서 28 일간 배양 된 골아세포의 광학현미경 검사(Figure 4)에서 BioOss[®]에는 접종된 골아세포가 표면에 한 층으로 존재하고 있었고, chitosan, TCP/chitosan 미세과립에는 표면에도 세포들이 존재하였고, 미세과립 사이에 형성된 공간에서는 세포들이 여러 층을 이루면서 존재하는 모습도 보였다.

3. PDGF-BB 방출 실험

PDGF-TCP/chitosan 미세과립으로부터 혈소관유래성장인자의 방출을 측정한 결과(Figure 5), 전체용량(300 ng)의 53 %가 처음 2일 동안 방출되었고, 그 이후에 5일간은 매일 12 ng 씩 방출되었다. 그 이후에는 방출되는 양이 많이 줄어들었지만 약 27일 동안 방출이 이어졌다.

4. 골재생 유도 능력

BioGran[®], chitosan 미세과립, TCP/chitosan 미세과립, 그리고 PDGF-TCP/chitosan 미세과립을 토끼 두개골결손부에 이식한 실험에서(Figure 6), 골이식을 하지 않은 부위(Figure 6-A)에서는 신생골형성이

골결손부 가장자리에만 소량으로 보였고, 골조직이 식을 한 부위(Figure B-E)에서는 골결손부 가장자리로부터 시작된 신생골형성이 중앙부위로 연장되어 있었다. BioGran[®], chitosan 미세과립, TCP/chitosan 미세과립을 이식한 부위에서의 골형성은 서로간에 큰 차이를 발견할 수 없었으나, PDGF-TCP/chitosan 미세과립을 이식한 부위에서는 나머지 군에서보다 골소주가 두꺼웠고, 형성된 골조직이 더 성숙되어 있었다(Figure 6-E).

IV. 총괄 및 고찰

현재 골 대체물로 이용되어지고 있는 재료들 중 BioOss[®]와 BioGran[®]의 입자 크기는 각각 250-1000 um, 300-355 um³²⁾이다. 이번 연구에서 제조된 chitosan 미세과립 및 TCP/chitosan 미세과립의 크기는 250-1000 um의 범위 내에 있었고 제조된 미세과립들은 둥근 형태로 서로간에 작은 공간을 형성하고 있었다(Figure 1). 이 소공은 골이식재로 사용되었을 때 골조직의 성장, 영양분의 이동통로, 혈관성장의 공간으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 만들어진 chitosan 미세과립의 표면은 다소 부드럽고(Figure 3-B), TCP/chitosan 미세과립은 TCP가 작은

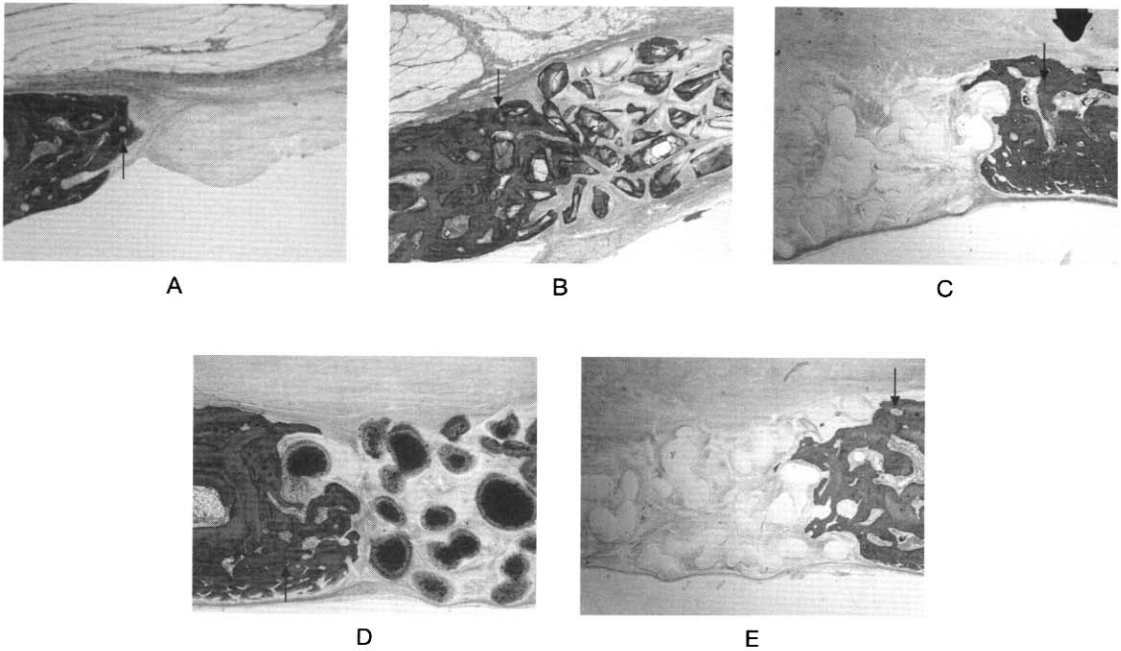


Figure 6. Histologic findings of TCP/chitosan microgranules in rabbit calvarial defects after 4 weeks implantation. (A) No treatment, (B) BioGran[®], (C) chitosan microgranules, (D) TCP/chitosan microgranules, (E) PDGF-TCP/chitosan microgranules, Bone margin was indicated by the arrow (↑). PDGF-TCP/chitosan microgranules grafted sites(E) showed thicker trabeculae pattern and faster maturation of new bone. (Basic fuchsin and toluidine blue multiple staining, original magnification × 40).

돌기 모양으로 표면으로 나와있어 거친 표면을 형성하고 있었다. 기질에 세포가 부착할 때 부드러운 표면보다 거친 표면에 더 잘 부착하는 점^{33,34}과 TCP가 생체친화성이 뛰어난 흡수성세라믹²⁸⁻³⁰이라는 점에서 chitosan 미세과립보다 TCP/chitosan 미세과립이 세포 초기 부착에 더 유리하리라 생각된다. TCP가 생체친화성이 뛰어나고 골조직 성장의 기질로 작용²⁸⁻³⁰하는 장점이 있지만, TCP를 생체 내에 매식할 경우, 매식체가 원래 자리에 있지 않고 움직이는 문제점이 있어 TCP 분말을 콜라겐³⁵ 혹은 젤라틴³⁶과 혼합하여 이 문제점을 해결하려는 연구도 있었다. 이번 연구에서 만들어진 TCP/chitosan 미세과립은 chitosan 표면에 TCP가 돌출되어있는 형태였으며 조각이 쉬웠고 골 결손부내에서 유지도 잘 되었기에 TCP/chitosan 미세과립은 TCP와 chitosan의 장점을 모두 가지고 있는 것으로 여겨진다.

BioOss[®], chitosan, TCP/chitosan 미세과립 상에서 골아세포의 증식을 1, 7, 14, 28 일동안 관찰하였는데 (Figure 2), 거친 표면을 가진 TCP/chitosan 미세과립이 세포 부착에 더 유리하리라 예상되었지만, 1일째의 경우에서 실제 부착된 세포 수는 유의한 차이를 보이지 않았다. 모든 군에서 세포 수는 점진적으로 증가하였으며, 28일째에서 TCP/chitosan 미세과립 상에서의 세포 수는 유의한 차이를 보이지는 않았지만, Bio-Oss[®]와 chitosan 미세과립의 그것보다 많이 존재하는 것으로 나타났다.

세포가 증식하고 분화하는데에는 세포의 부착과 이동이 중요한 요소이므로 생체재료 상에서 세포의 부착, 증식은 그 재료가 생체재료로 사용될 수 있는가를 평가하는 중요한 요소이다. 골아세포들이 7 일째에 chitosan 미세과립 표면에 납작하게 잘 부착되어 있는 모습(Figure 3-B)과 TCP/chitosan 미세과립

상에서 증식이 활발하게 일어나 상당히 많은 수로 존재하는 모습(Figure 3-C)을 통해 제조된 미세과립들이 세포 독성이 높지 않은 것을 알 수 있었다. 미세과립에 세포를 28일 동안 배양한 관찰에서는 세포들이 미세과립 표면에도 부착하였지만, 미세과립 사이에서 여러 층 구조로 증식하고 있는 모습을 보였는데(Figure 4), 이것은 미세과립의 표면에 부착한 세포들이 더 증식하여 미세과립 사이에 형성된 공간(Figure 1)을 채운 것으로 생각된다. 세포가 분화하는데 있어 인접한 세포들끼리의 상호작용이 중요하고, 배양하는 세포가 3차원적으로 위치하면 세포간의 상호작용이 더 잘 일어나므로^{37,38)} 미세과립상에서 증식하는 모습은 골아세포의 분화에 유리하게 작용하리라 예상된다.

성장인자 등의 단백질은 생체조직 내로 투여되면 주위조직액에 의해 희석이 되고 조직내의 효소에 의해 분해가 되므로, 생체 내에서 효과적인 농도로 적정기간 동안 유지되도록 하기는 쉽지가 않다. 조직내에서 혈소판유래성장인자를 수용성 젤 성분에 포함시켜 비글건의 치주조직재생에 이용한 실험²⁸⁾에서 혈소판유래성장인자의 반감기는 4.2시간이었으며 4일 정도가 지나면 96% 이상이 사라졌고 2주 후에는 이식부에서 전혀 확인할 수 없었다고 하였다. 이번 실험에서 TCP/chitosan 미세과립으로부터 방출된 혈소판유래성장인자는 처음 2 일간의 방출량이 전체 용량(300 ng)의 53%였고, 그 후 5일간 매일 12 ng 씩 방출되었다. 전체적으로 약 27일간 소량이지만 지속적으로 방출되는 것으로 나타났다. 혈소판유래성장인자(PDGF-BB)는 0.1에서 100 ng/ml 범위에서 농도와 비례하여 골아세포의 분열과 화학주성을 증가시킨다^{39,40)}고 하므로, 최소한 1 주일 이상은 효과적인 농도 이상으로 유지되었을 것으로 생각된다. 이번 연구에서 27일까지 방출이 일어난 것은 미세과립을 제조할 때 혈소판유래성장인자의 일부가 미세과립 내부에 들어가 있다가 미세과립이 천천히 분해될 때 방출되기 때문으로 생각된다. 혈소판유래성장인자가 주위 조직에 영향을 미치기 위해서는 초기에 충분히 방출되어야 하지만, 이번에 연구된 PDGF-TCP/chitosan 미세과립에서의 초기 방출량은 약간

많은 듯하며, 이것을 줄이면서 나머지 기간 동안 좀 더 높은 농도로 방출되게 개선시킬 필요가 있어 보인다.

치주관막 수술 중에 혈소판유래성장인자 등을 조직에 직접 투여한 동물실험에서^{28,29)} 상당히 많은 양(1-3 ug)을 투여하였는데, 이번 실험에서는 혈소판유래성장인자 300 ng이 함유된 미세과립을 토끼 두개골원형결손부에 이식하여 다른 군과는 차별화 되는 결과(Figure 6)를 보였다. 성장인자를 골이식재에 함유시키려는 시도는 이전에도 있었는데^{41,42)}, Stephan 등⁴³⁾은 특히 혈소판유래성장인자를 BioOss[®]와 콜라겐의 혼합물에 흡착시켜 혈소판유래성장인자의 방출과 골아세포에 미치는 영향에 관한 연구를 하였다. 이 연구에서는 BioOss[®]와 콜라겐의 혼합물을 만들고 혈소판유래성장인자를 그 표면에만 흡착을 시킨 것이며, 혈소판유래성장인자의 30%가 처음 10 일동안에 방출되었다고 하였으나, 그 이후에 나머지 양이 어느 정도로 방출되었는지에 대한 언급은 없었다.

BioGran[®], chitosan 미세과립, TCP/chitosan 미세과립 군 사이에는 큰 차이 없는 조건을 보였지만, 골이식을 전혀 하지 않은 토끼의 두개골결손부에서는 4주 후에 골결손부 가장자리에만 소량의 골조직이 형성되었고 대부분 섬유성결합조직으로 치유되었고, PDGF-TCP/chitosan 미세과립 군에서는 골소주의 모양이 다른 군에서보다 더 두텁고, 골 성숙이 빠르게 진행되었는데(Figure 6), 기존의 연구^{31,44)}에서도 이와 비슷한 결과를 보였다.

V. 결론

이번 연구에서는 chitosan 미세과립, TCP/chitosan 미세과립, 그리고, PDGF-TCP/chitosan 미세과립을 제조하여 골대체물질로 사용될 수 있을지를 알아보았다. 제조된 TCP/chitosan 미세과립은 chitosan 미세과립보다 골아세포의 부착에 유리해보였고, 골아세포가 미세과립 상에 부착, 증식한 모습을 확인하였다. TCP/chitosan 미세과립에 혈소판유래성장인자를 함유시켰을 때, 혈소판유래성장인자가 1 주일간 유효하게 방출되었고, 그 후로도 소량씩 지속적으로

방출되었다. 토끼 두개골결손부에서 혈소판유래성장인자를 함유시킨 TCP/chitosan 미세과립 군에서는 형성된 골소주가 두꺼웠고, 골조직의 성숙이 빨리 진행된 것으로 나타났다. 이 실험의 결과로 혈소판유래성장인자가 함유된 TCP/chitosan 미세과립은 골대체물질로서의 가능성을 보였다.

VI. 참고문헌

- De Boer HH. History of bone grafts. *Clin Orthop Rel Res* 1998;226:292-298.
- Jain AK, Panchagnula R. Skeletal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2001;206:1-12.
- Kitsugi T, Yamamuro T, Takeuchi H, Ono M. Bonding behavior of three types of hydroxyapatite with different sintering temperatures implanted in bone. *Clin Orthop Rel Res* 1988;234:280-290.
- Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R et al. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int* 1999;64:83-90.
- Saffar JL, Colombier ML, Detienville R. Bone formation in tricalcium phosphate filled periodontal intrabony lesions. Histological observations in humans. *J Periodontol* 1990;61:209-216.
- Cooke FW. Ceramics in orthopedic surgery. *Clin Orthop* 1992;276:135-146.
- Verheyen CC, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K. Evaluation of hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behavior. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1277-1296.
- Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, Kitago H, Kajimoto T, Iwayama Y. Formation of apatite-collagen complexes. *J Biomed Mater Res* 1996;31: 43-49.
- TenHuisen KS, Martin RI, Klimkiewicz M, Brown PW. Formation and properties of a synthetic bone composite: Hydroxyapatite- collagen. *J Biomed Mater Res* 1995;29:803-810.
- Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T et al. Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *J Biomed Mater Res* 2000;50:410-419.
- Zhang R, Ma PX. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res* 1999;45:285-293.
- Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T et al. Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *Biomaterials* 2000;21:889-898.
- Ignajatovic N, Tomic S, Dakic M et al. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials* 1999;20:809-816.
- Ignajatovic N, Plavsic M, Miljkovic MS, Zivkovic LM, Uskokovic DP. Microstructural characteristics of calcium hydroxyapatite/poly-L-lactide based composites. *J Microsc* 1999;196:243-248.
- Liu Q, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Nano-apatite/polymer composites: Mechanical and physicochemical characteristics. *Biomaterials* 1997;18:1263-1270.
- Liu Q, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Composite biomaterials with chemical bonding between hydroxyapatite filler particles and PEG/PBT copolymer matrix. *J Biomed Mater Res* 1998;40:490-497.
- Muzzarelli RA, Baldassare V, Conti F et al. Biological activity of chitosan : ultrastructural study. *Biomaterials* 1988;9:247-252.
- Olsen R, Schwartzmiller D, Weppner W, Winandy R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In : G. Skjak-Brak, T. Anthonsen, P. Sandford, editors, *Chitin and chitosan*. 1988;813-828

19. Demarger-Andre S, Domard A. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydr Polym* 1993;22:117-126.
20. Suh F, Howard JK, Mathew WT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering : a review. *Biomaterials* 2000;21:2589-2598.
21. Ueno H, Nakamura F, Murakami M et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophage. *Biomaterials* 2001;22:2125-2130.
22. Jarcho M. Biomaterials aspects of calcium phosphates properties and applications. *Dent Clin North Am* 1986;30:25-30.
23. Egli PS, Muller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clin Orthop Rel Res* 1998;232:127-131.
24. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1987;18:323-330.
25. Szabo G, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Nemeth Z. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;Sep-Oct;16(5):681-692.
26. Szucs A, Suba Z, Martonffy K, et al. The importance of the pure-phase--tricalcium phosphate (Cerasorb) in preprosthetic surgery. *Fogorv Szle* 2000;93:45-52.
27. Graves DT, Kang YM, Kose NM. Growth factors in periodontal regeneration. *Compendium Continuing Educ Dent* 1994;18:S672-677.
28. Lynch SE, Williams RC, Polson AM et al. A combination of platelet-derived and insulin like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16:545-548.
29. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC 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* 1991;62:458-467.
30. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: Results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994;65:1158-1168.
31. Lee YM, Park YJ, Lee SJ et al. The bone regenerative of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 2000;71:418-424.
32. Schallhorn RG. Long term evaluation of osseous grafts in periodontal therapy. *Int Dent J* 1980;30:101-104.
33. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR et al. Response of MG63 osteoblast like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-2232.
34. Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment. *Biomaterials* 1992;13:123-128.
35. Sugaya A, Minabe M, Hori T et al. Effects on wound healing of tricalcium phosphate-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. *J Periodontal Res* 1990;25:60-63.
36. Lin FH, Yao CH, Sun JS, Liu HC, Huang CW. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials* 1998;19:905-917.

37. W.M. Saltzman, M.R. Parkhurst, P. Parsons-Wingerter, W.H. Zhu. Three-dimensional cell cultures mimic tissues, *Ann N Y Acad Sci*, 1992;665:259-73.
38. Vournakis JN, Runstadler Jr. PW. Optimization of the microenvironment for mammalian cell culture in flexible collagen microspheres in a fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology* 1991;17:305-326.
39. Matsuda N, Lin WL, Kumar M, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic response of rat periodontal ligament cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-525.
40. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993;64:142-148.
41. Ripamonti U, Ma SS, Heever B, Reddi AH. Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in rat calvarial defects of adult primates. *Plas Reconstr Surg* 1992;90:382-393.
42. Ziegler J, Mayr-Wohlfart U, Kessler S, Breitig D, Gnther KP. Adsorption and release properties of growth factors from biodegradable implants. *J Biomed Mater Res* 2002;59:422-428.
43. Stephan EB, Renjen R, Lynch SE, Dziak R. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. *J Periodontol* 2000;1887-1892.
44. Lee JY, Nam SH, Im SY et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan based biomaterials. *J Control Release* 2002;78(1-3):187-197.

The effect of PDGF-BB loaded TCP/ chitosan microgranules on new bone formation

Yang-Jo Seol^{1,3}, Jue-Yeon Lee², Seung-Beom Kye³, Young-Kyu Lee³, Won-Kyeong Kim^{1,4}, Yong-Moo Lee¹,
Young Ku¹, Soo-Boo Han¹, Seung-Jin Lee², Chong-Pyoung Chung¹, In-Chul Rhyu^{1*}

¹ Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

² Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University

³ Department of Periodontics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine

⁴ Department of Dentistry, Asan Medical Center

The purpose of this study was to evaluate newly fabricated tricalcium phosphate(TCP)/chitosan microgranules as bone substitutes. TCP/chitosan microgranules were fabricated by dropping TCP-chitosan suspension into the NaOH/ethanol solution. The size of microgranules could be controllable via airflow rate. PDGF-BB was loaded into the fabricated granules via freeze-drying methods(300 ng/20 mg). To evaluate cell proliferation, cultured osteoblasts cell lines(MC3T3-E1) was dropped on the BioOss[®], chitosan microgranules, TCP/chitosan microgranules and cultured for 1, 7, 14, and 28 days. Scanning electron microscopic observation was done after 7 days of culture and light microscopic examination was done after 28 days of culture. PDGF-BB release from the microgranules was tested. Rabbit calvarial defects(8 mm in diameter) were formed and chitosan, TCP/chitosan, PDGF-TCP/chitosan microgranules, and BioGran[®] were grafted to test the ability of new bone formation. At SEM view, the size of prepared microgranules was 250-1000 um and TCP powders were observed at the surface of TCP/chitosan microgranules. TCP powders gave roughness to the granules and this might help the attachment of osteoblasts. The pores formed between microgranules might be able to allow new bone ingrowth and vascularization. There were no significant differences in cell number among BioOss[®] and two microgranules at 28 day. Light and scanning electron microscopic examination showed that seeded osteoblastic cells were well attached to TCP/chitosan microgranules and proliferated in a multi-layer. PDGF-BB released from TCP/chitosan microgranules was at therapeutic concentration for at least 1 week. In rabbit calvarial defect models, PDGF-TCP/chitosan microgranules grafted sites showed thicker bone trabeculae pattern and faster bone maturation than others. These results suggested that the TCP/chitosan microgranules showed the potential as bone substitutes.

Keywords : bone substitutes, chitosan, tricalcium phosphate, microgranules, PDGF-BB.