

인간 치주인대 유래 섬유모세포에 대한 흡수성 교원질 차폐막의 생체적합성

권용대 · 이백수 · 주성숙*

경희대학교 치과대학 구강악안면외과, *경희대학교 치과대학 구강해부학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:272-278)

BIOCOMPATIBILITY OF ABSORBABLE COLLAGEN MEMBRANES IN HUMAN PDL-DERIVED FIBROBLASTS IN VITRO

Yong-Dae Kwon, Baiksoo Lee, Sung-Sook Jue*

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery,

*Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Kyung-Hee University

Purpose: This study is designed to evaluate biocompatibility of three types of absorbable collagen GBR membrane *in vitro*.

Material and Method: The human PDL fibroblasts culture was obtained through typical way and the cells used in the experiment was forth passage. The membranes examined were Experimental group A, B, C. All the 3-experimental groups were made of bovine pericardium and the membranes were excised into 5×5mm respectively. The samples of the membranes were fixed on the 24-well plate with the double-sided adhesive tape. Then, 2ml of cell suspension which included 2×10⁶ cells was inoculated into the 24-well plate, and the cells were cultured for 1 week. Cellular viability and the alkaline phosphatase activity were measured with ELISA. The membranes in the culture were processed to examine with SEM.

Results: The survival rate was highest in control and Experimental group A is the next, group B and group C in order of the value. The values are analyzed for statistical difference using Wilcoxon test. All the values of experimental groups are significantly lower than those of control, and the values among the experimental groups significantly differ from each other. Alkaline phosphatase level was identical order with the viable cell rate. SEM examination revealed that the PDL fibroblasts adherent on culture dish (control) and group A were spindle-shaped, but on group B and C, the cells were round-shaped without processes.

Key words: Fibroblast, Collagen membrane, Biocompatibility

I. 서 론

조직유도재생술(GTR) 및 골유도재생술(GBR)에 이용될 수 있는 차폐막으로서의 특징으로는 생체적합성, 조직통합성(tissue integration), 세포차단성(cell occlusivity), 공간유지를 위한 물리적 특성, 임상에서 다루기 편해야 하는 성질이 있다^{1,3)}. 이상적으로 증식, 이주, 분화, 성숙의 기능을 위해서 세포들은 어떤 기질에 부착되어야 하는데 차폐막이 세포의 부착을 촉진시킬 수 있으면 좋을 것이다. Machtei 등⁴⁾이 지적했듯이 다시 꺼낸 차폐막의 내면에서 결합조직의 존재는 치주조직 재생을 증진시키는 한 요소가 될 수 있다. 최초의 효과적인 일세대 차폐막

은 비흡수성으로서 주로 expanded-polytetrafluorethylene(e-PTFE)으로 만들어졌는데, 차폐막으로써의 능력은 동물실험 및 임상 연구에서 여러 차례 입증되어왔다. 하지만 이러한 비흡수성 차폐막은 막의 제거를 위한 이차적인 수술이 필요하다는 것과 임상에서 그 조작이 다소 까다롭다는 제한점을 가지고 있다. 비흡수성 차폐막을 제거하기 위한 외과적 술식은 재생된 골조직 등에 좋지 못한 영향을 미칠 수도 있다. 또한 실제 임상에서 비흡수성 차폐막은 흡수성 차폐막에 비해 조작하기가 어려울 뿐만 아니라, 술후 구강내로 조기에 막이 노출되면 수술부위에 세균의 증식이 나타나서 차폐막을 예정보다 빨리 제거해야만 하는 상황이 발생하기도 한다^{5,6)}.

이러한 단점들을 극복하고자 여러 가지 흡수성 차폐막들이 개발되었다. 흡수성 차폐막들은 초기에 poly-lactic이나 polyglycolic acid와 같은 물질로 만들어졌으며 최근에는 돼지나 소의 제1형 교원질이나 제3형 교원질로 만들어진 흡수성 차폐막에 관한 개발과 연구가 많이 진전되었다. 교원질은 섬유모세포에 대한 화학 주성과 지혈작용 등의 성질이 있으며 항원성이 적고 이주하는 세포에 대해 비계(scaffold)로 작용한다⁷⁾. 진피에서

권 용 대

130-701 서울특별시 동대문구 회기동 1
경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Yong-Dea Kwon

Dept. of OMFS, Dental College, KyungHee University
Hoegidong 1, Dongdaemunku, Seoul, 130-701, Korea
Tel: 82-2-958-9440 Fax: 82-2-966-4572

추출한 제1형 교원질을 이용하여 만든 차폐막은 동물실험 및 임상 연구에서 우수한 결과를 보여 주었으며 멀티센터 연구를 통해 교원질 차폐막이 비흡수성 차폐막과 거의 유사한 임상성적을 나타내었다⁸. 이러한 장점에도 불구하고 교원질로 이루어진 흡수성 차폐막 역시 한계를 가지고 있다. 임상에서 사용시 공간을 유지하기 위한 물리적 강도가 부족하여 이에 대한 보강이 필요한 경우도 있으며 또한 구강내로 조기 노출되면 너무 빨리 흡수가 진행되어 감염이나 차폐막으로써의 기능을 조기에 상실하기도 한다. 결국 교원질 차폐막의 체내 흡수는 차폐막의 필수요건인 세포차단성을 상실하게 할 수 있으므로 교원질의 체내 분해 속도를 통제할 수 있는 방안이 대한 연구도 진행되어 왔다.

여러 가지 교원질 흡수성 차폐막들이 개발되어 시판되고 있으며 이들 각각의 차폐막들은 그 조성과 구조에서 차이가 있지만, 상피세포의 이주를 막고 창상부로 치조골 재생능을 갖는 치주인대 세포, 골세포, 백악모세포 등의 이주를 촉진시키는 기능을 한다.

차폐막 자체가 치주조직에 존재하는 세포들에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 Payne⁹의 연구를 비롯하여 몇몇 학자들에 의해 이루어진 바 있으나 흡수성 교원질 차폐막이 인간 치주인대 섬유모세포의 증식과 분화에 미치는 대한 정보는 많지 않다.

본 연구에서는 소의 심막 교원질로 이루어진 3종류의 흡수성 차폐막에 대해서 인간 치주인대 섬유모세포의 부착, 증식과 분화를 조사하여 이들 흡수성 차폐막의 생체 적합성에 대하여 실험적으로 평가하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포배양

20대 초반의 남자로부터 얻은 대구치 및 소구치 치근의 중간 1/3부분을 클린벤치 내에서 멸균상태의 외과용 수술도 또는 치과용 큐렛 등을 이용하여 치주인대를 긁어내고 배양접시에서 초대배양을 실시하였다. 배양조건은 37°C, 95% 대기와 5% 이산화탄소의 환경으로 배양 인큐베이터를 조절하였다. 배양액은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium; Wellgene, Seoul, Korea)에 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum; Wellgene, Seoul, Korea)과 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였다. 약 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였고 계대배양을 통해 얻은 4대째 세포들을 이용하여 실험을 실시하였다.

2. 실험군 및 대조군 설정

실험에 쓰인 차폐막 3종 모두 소의 심막의 교원질을 이용해 만든 흡수성 차폐막으로 각각을 실험군 A, B, C로 명명하였다. A는 동결건조 처리한 순수 교원질 차폐막이며, B는 생체내 흡

수를 지연시키기 위하여 글루타알데하이드 가교결합(glu-taraldehyde cross-linking)을 한 것이며, C는 B에 항혈전제인 heparin sulfate 처리를 한 차폐막이다. 대조군은 차폐막을 부착하지 않은 일반적인 배양접시표면으로 설정하였다.

3. 실험 방법

실험군 A, B, C의 각 차폐막을 5×5mm의 정사각형 크기로 잘라 멸균상태의 양면테이프를 이용하여 24-well 배양기에 부착하였다.

배양 접시 위에 배양된 인간 치주인대 섬유모세포들을 트립신-EDTA로 떼어내고 원심분리하여 만든 세포괴를 깨뜨려 얻은 세포부유액 샘플을 채취한다. 트립판 블루를 사용하여 샘플을 염색하고 혈구계산관(hemocytometer)상에서 세포수를 계산하여 10% 우태아혈청과 항생제를 함유한 DMEM 1ml당 약 1×10⁴ 개의 인간 치주인대 섬유모세포를 포함하는 세포부유액으로 만들어, 앞에서 준비한 24-well 배양기에 세포 부유액을 2ml씩 넣고 1주일간 배양하였다. 배양액을 2~3일 간격으로 교환하였으며 세균이나 진균등으로 인한 오염 소견은 보이지 않았다.

배양 1주째, 각각의 실험 표본들은 MTT분석, 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활성 검사 그리고 주사전자현미경(SEM) 관찰을 위해 준비되었다.

(1) MTT 분석

MTT분석은 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 이 검사법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포수에 비례해서 흡광도(optical density)를 나타낸다. 5 mg/ml로 MTT용액을 제조하여 24-well 배양기의 실험표본에 넣고 약 3시간 동안 인큐베이터에 넣어 반응시켰다. 그 후 DMSO(dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, USA)를 넣어 세포들을 용해시켰다.

흡광도는 ELISA 측정기(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) 및 Microplate Manager 4.0(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)를 사용하여 570nm의 파장하에서 측정되었다.

(2) 알칼리성 인산분해효소 활성 검사

배양된 세포들을 배양액을 제거한 후 인산완충용액(PBS)으로 씻어내어 존재할 수 있는 각종 세포외기질 및 기타 성분을 제거한다. 1%의 Triton X-100을 넣고 약 30분간 반응시킨다. 상업적으로 판매되는 알칼리성 인산분해효소 측정 키트(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)를 이용하여 충분히 반응시킨 후 0.4M NaOH 용액을 넣어 반응을 중지시키고 ELISA측정기로 405nm의 파장하에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy; SEM) 검사 24-well 배양기에 있는 표본들을 2.5% 글루타알데하이드를 포함한 인산완충용액으로 고정하여 약 4°C에 저장하고 농도를 점진적으로 올린 알코올을 통해 탈수하였다. 각각의 표본들은 임계점 건조기(Critical point dryer; HCP-2, Eiko engineering, Japan)와 금속코팅기(Ion coater; IB-3, Hitachi, Japan)을 통한 건조와 금속코팅 과정을 거쳐 표본을 준비하였다. 주사전자현미경은 일본 Hitachi사의 S-3200모델을 사용하였다.

4. 통계처리

통계처리를 위해서는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하였으며 ELISA 측정기에 의한 각각의 측정치를 Wilcoxon검정을 이용하여 그 유의성을 검정하였다($p < 0.05$). 또한 도표의 출력을 위해서는 SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하였다.

III. 연구결과

1. MTT분석

실험기간 동안 배양기의 세균이나 진균에 의한 오염 소견은 보이지 않았다. MTT분석은 각 배양기에서 채취한 실험군 A, B, C 및 대조군의 샘플을 ELISA 측정기에 넣어 측정 하였다.

측정 결과 대조군에서 가장 높은 값을 나타내었으며 그 다음이 실험군 A로 비교적 대조군에 근접한 측정치를 보였다. 그 다음으로 실험군 B의 측정치가 높은 값을 보였으며 실험군 C가 가장 낮은 측정값을 나타내었다(Fig. 1).

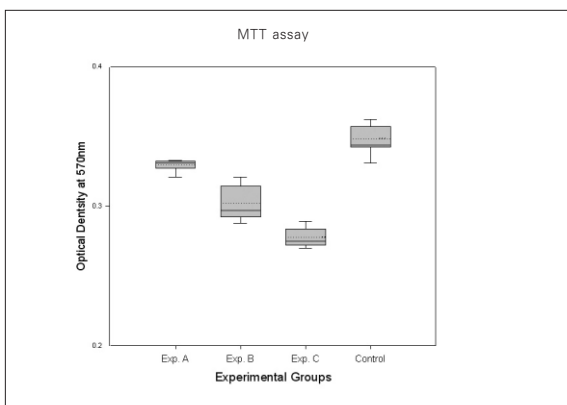


Fig. 1. Boxplot with outliers for the cell viability on different collagen membranes and control, evaluated after 7-day incubation in human PDL fibroblasts suspension. Raw data comparison may allow the direct visualization of the difference between experimental groups and control.

Wilcoxon검정에 의한 검증 결과 실험군 A, B, C 모두 대조군에 대하여 유의한 차이를 보였다. 동일한 제조사의 유사제품인 실험군 B와 실험군 C간의 통계적 유의성에 대해서도 유의한 차이를 보였다. 한편 실험군 A는 $p < 0.01$ 경우에 유의한 차이를 보이지 못하였다.

2. 알칼리성 인산분해효소 활성 검사

알칼리성 인산분해효소 활성검사 역시 각 배양기에서 채취한 실험군 A, B, C 및 대조군의 샘플을 ELISA 측정기에 넣어 측정하였다.

측정 결과 MTT 분석과 마찬가지로 대조군에서 가장 높은 값을 나타내었으며 실험군 A, 실험군 B, 실험군 C의 순으로 측정되었다(Fig. 2).

Wilcoxon검정 결과 실험군 A는 대조군에 대하여 유의한 결과를 나타내었으며, 실험군 B, 실험군 C 각각에 대해서도 유의성 있는 결과를 나타내었다. 실험군 B, 실험군 C 역시 대조군에 대해 유의한 차이를 보였으며 서로 다른 각각의 실험군 간에서도 유의성 있는 결과를 나타내었다.

3. 주사전자현미경 관찰

실험군 A, B, C 및 대조군을 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 세포의 형태는 다른 모양을 나타내었다.

대조군에서 보이는 인간 치주인대 섬유모세포는 방추형의 모양을 하고 있으며 비교적 평평한 상태로 퍼져있는 모습이었으며 세포 돌기를 내고 있었다(Fig. 3).

실험군 A의 관찰 결과 대조군과 다소 비슷한 방추형의 모양

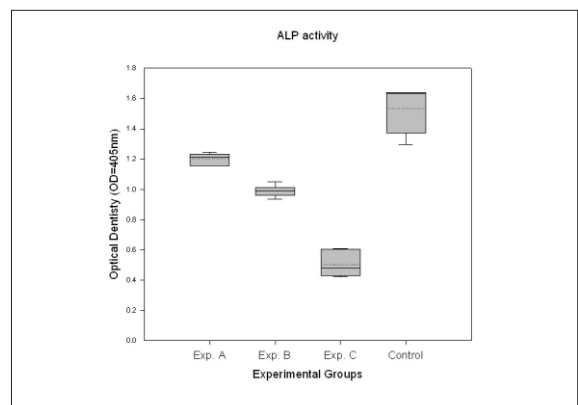


Fig. 2. Boxplot with outliers for ALP activity on different collagen membranes and control, evaluated after 7-day incubation in human PDL fibroblasts suspension. Raw data comparison may allow the direct visualization of the difference between experimental groups and control.

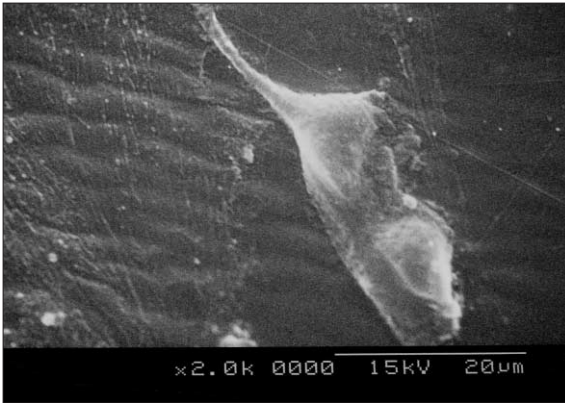


Fig. 3. Spindle-shaped PDL fibroblast on dish plate (Control).

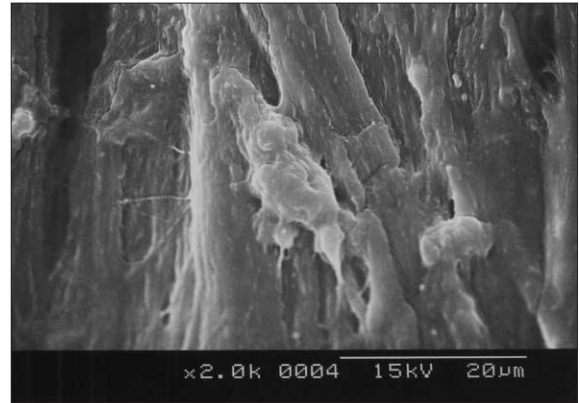


Fig. 4. Spindle-shaped and flat PDL fibroblast with cellular processes (Group A).



Fig. 5. Relatively round and flat shaped PDL fibroblasts (Group B).

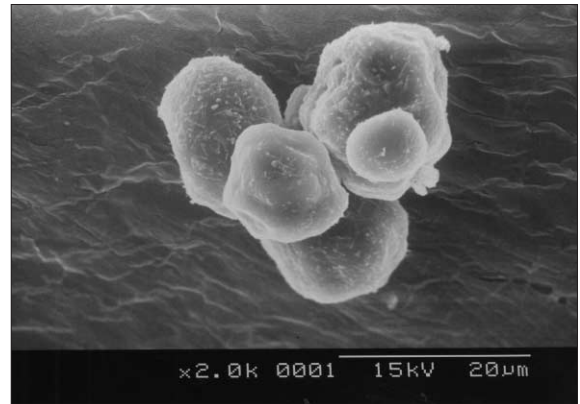


Fig. 6. Round shaped PDL fibroblasts without cellular process (Group C).

을 보이고 있었으나 대조군보다는 편평하지 못한 양상을 띄었다. 역시 세포돌기들을 내고 있는 모습도 관찰되었다(Fig. 4).

실험군 B와 실험군 C에서의 인간 치주인대 섬유모세포의 모습은 서로 비슷한 모양으로 나타났으며 이들은 방추형이라기 보다는 대부분 구형의 모양으로 관찰되었다. 세포돌기나 lamellopodia와 같은 구조들은 거의 보이지 않았다(Fig. 5, 6). 관찰결과 실험군 B와 C는 실험군 A나 대조군에 비해서 세포의 부착이나 증식에 있어 생체적합성이 떨어지는 것으로 보여진다.

IV. 고 찰

조직공학의 발달로 여러 가지 생체 재료가 개발되면서 치과 영역에 대한 연구도 가속화되었다. 그 중 치조골 상실을 극복하기 위한 많은 시도가 있었고 다양한 술식들이 소개되었으며 재료의 연구 및 개발 또한 지금까지 활발히 진행되고 있다. 뿐만 아니라, 각종 성장인자들에 대한 연구와 함께 치주조직에서의 선택적인 세포의 증식을 위한 각종 차폐막들이 개발되어

왔다. 근래에 이르러서는 흡수성 물질을 이용한 차폐막이 주목을 이루고 있다. 차폐막에 대한 초기 연구에서는 치주조직의 결손을 수복하기 위한 것이 주된 연구분야였으나, 현재는 치조체 결손부를 증강하여 임플란트를 식립할 수 있게 하고 임플란트 주변의 골치유를 향상시키며 골이식의 결과를 개선하기 위해 많이 사용되고 있다¹⁰⁾.

생체재료로 많이 이용되는 천연고분자 물질은 세포외기질(extracellular matrix)과 단백질로서 교원질, 섬유결합소(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin) 등이 대표적인 것 들이다. 그 중에서도 단백질을 생체재료로 개발하는 관점에서 보면 교원질이 구강 안면 조직을 비롯한 생체 대부분의 조직에 퍼져 있으며 손상 부위가 생길 경우 교원질과 같은 세포외기질을 공급해주면 세포들이 생활력을 갖을 수 있을 것으로 생각되므로 교원질을 이용한 조직 재생은 매우 의미가 있을 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 최근 새로이 만들어진 각종 흡수성 교원질 차폐막에 대한 배양된 인간 치주인대 섬유모세포의 부착, 분화 및 증식을 실험적으로 평가하기 위해 시행되었다.

치과적 관점에서 교원질은 치유과정의 혈병 형성에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 다른 물질에 비해 흡수성 차폐막으로서 우수한 생물학적 성질을 갖고 있다. 또한 치주인대 섬유모세포 및 치은 섬유모세포의 화학주성인자이며 인체의 다른 부위에서와 마찬가지로 치주조직의 주된 구성성분 중 하나이기도 하다⁷. 만일 인체내에서 조직적합성을 보이지 못하는 물질이라면 염증반응을 일으키게 될 것이며 이식한 골이나 이식체들의 조기 흡수 등으로 인해 차폐막으로서의 기본 기능을 쉽게 상실하게 될 것이다. 90년대부터 교원질 차폐막에 대한 연구가 많이 이루어지면서 치은유래 섬유모세포 및 MC3T3-E1과 같은 세포주를 이용하여 세포의 차폐막에 대한 반응을 관찰한 문헌들이 발표되었으나¹² 인간의 치주인대 및 골조직에서 직접 배양된 세포를 통한 연구는 아직까지 많지 않다. Simain-Sato 등은 쥐의 치은점막에서 섬유모세포를 추출하고 이를 흡수성 차폐막에 배양하여 차폐막 상의 세포들의 형태가 다르게 변하는 것을 관찰하였으며¹³ Takata 등은 쥐의 치주인대 섬유모세포를 배양하여 각종 흡수성 교원질 차폐막에 대한 생체 적합성을 연구하였고 MC3T3-E1 세포주를 이용하여 각종 교원질 차폐막으로 세포들의 이주능에 대한 연구를 시행한 바 있다^{15,16}. Payne 등은 인간 치은 섬유모세포의 e-PTFE와 poly-lactic acid 차폐막으로의 이주를 연구하였으며⁹ 또한 Rothamel 등은 인간의 치주인대 섬유모세포와 뼈모세포를 여러 가지 교원질 차폐막에 배양하여 생체적합성을 연구하였다⁶.

인간 치주인대 섬유모세포를 이용한 본 연구에서는 실험군 A, B, C의 세가지 흡수성 교원질 차폐막을 평가하였다. MTT 분석 결과 대조군에서 가장 높은 값을 보이고 실험군 A, B, C의 순으로 그 값을 나타내었다. 정도의 차이는 있으나 알칼리성 인산분해효소 활성검사에서도 동일한 순서로 나타났다. 이러한 결과는 실험에서 이용된 모든 교원질 차폐막이 세포의 부착, 분화 및 증식을 저해한다라는 것을 뜻한다고 볼 수 있다. 이는 여러 가지 교원질 차폐막에서 인간 치주인대 섬유모세포의 수를 측정된 다른 연구자들의 연구 결과와 유사하다^{14,16}. 본 연구를 비롯해 위의 연구들 모두 배양 환경을 통한 실험적 연구라는 한계성때문에 배양접시의 바닥에 부착되고 증식된 치주인대 섬유모세포가 가장 많았다¹⁶.

MTT 분석은 어떠한 물질이나 과정이 세포의 생존에 미치는 영향을 조사할 수 있는 널리 알려진 방법으로 각각의 실험군인 각 교원질 차폐막들이 인간 치주인대 섬유모세포의 부착과 증식에 어떠한 영향을 미치는가를 조사할 수 있었다. Takata 등¹⁴의 연구는 면역조직화학적 염색방법을 통하여 세포의 수와 알칼리성 인산분해효소의 활성을 평가한 것이다. 그의 연구 결과 소의 제1형 atecollagen으로 만들어진 BioMend[®]는 같은 원료로 만들어진 Tissue Gide[®]나 poly-lactid / polyglycolic acid의 공중합체인 Resolute[®]와 같은 차폐막보다 초기에 낮은 세포의 부착과 증식을 보였다고 하였으며 이는 차폐막의 구성성분 자체 및 표면이 세포의 증식에 영향을 미치는 것을 암시한다고 볼 수 있다. Kononen 등은 티타늄의 표면처리가 인간의 치은 섬유모세포의 부착에 미치는 영향에 대해 발표한 바 있으며¹⁷

Bower 등은 섬유모세포들이 미세하고 고온 표면에 보다 친화성을 보이며 골모세포들은 거칠고 다공성의 표면에 보다 잘 부착하며 광화물질의 생산도 활발하다고 하였다¹⁸. 세포가 기질에 붙는 과정은 4 단계로 이루어져 있는데 당단백의 기질에로의 부착, 세포접촉, 부착과 퍼짐으로 구성된다¹⁹. 일반적으로 세포의 이주와 증식은 위의 단계가 일어난 후에야 시작되며 이러한 것을 고려하면 본 연구에서 쓰인 모든 차폐막은 생체적합성을 보이고 있으며 세포독성은 보이지 않는 것으로 짐작할 수 있다. 역시 Takata 등은 흡수성 차폐막과 비교하기 위해 e-PTFE에 대해서도 치주인대 섬유모세포의 부착과 증식에 대해 관찰하였으나 e-PTFE에서는 세포의 부착과 증식이 거의 일어나지 못하였다¹⁴.

다른 연구자들의 연구 결과와 본 연구결과를 통해 같은 교원질로 이루어진 흡수성 차폐막들 간에도 각종 실험 결과에 있어 각각 다른 측정치를 나타냄을 알 수 있다. BioMend[®]와 Bio-Gide[®], Ossix[®]는 모두 교원질로 만들어진 흡수성 차폐막이지만 치주인대 섬유모세포를 배양하여 그 세포수를 측정된 결과 Bio-Gide[®]와 Ossix[®]는 비슷한 결과를 보였으나 BioMend[®]는 통계학적으로 유의할 만한 수준으로 적은 세포수를 보였다¹⁶. 본 연구에서도 실험군 A, B, C는 모두 소의 심막에서 추출한 제1형 교원질로 만들어진 흡수성 차폐막이었으나 MTT 분석 결과 그 측정치가 각 그룹간에 통계학적으로 유의할 만한 차이를 보여 같은 원료로 만들어졌지만 치주인대 섬유모세포의 생존율에 각각 다른 영향을 주는 것으로 나타났다.

BioMend[®]는 소의 제1형 교원질로 글루타알데하이드를 이용한 가교결합방식으로 만들어졌으며 Bio-Gide[®]는 교차결합을 하지 않은 돼지의 제1, 3형 교원질로 만들어졌다. Ossix[®]는 소의 제1형 교원질을 효소가교결합방식(enzyme-cross-linking)으로 제작된 차폐막이다.

본 연구에서 쓰인 재료는 실험군 A가 동결건조처리된 소의 심막 제1형 교원질이며 실험군 B는 글루타알데하이드 가교결합, 실험군 C는 글루타알데하이드 가교결합시킨 후 heparin sulfate로 처리를 한 것이다. 여러 가지 장점에도 불구하고 그동안 e-PTFE가 차폐막으로서 자리를 확고하게 지키고 있을 수 있던 이유중 하나가 우수한 임상성적 이외에도 비흡수성이기 때문에 지속적인 세포 차단성에 있기도 하지만, 흡수성 차폐막은 흡수되는 과정에서 치유중인 창상이나 치태내에서 발견되는 효소들에 의해 초기에 흡수되어 세포 차단성을 초기에 상실하여 성공적인 조직유도재생술을 달성하지 못하였기 때문이다.

Sela 등은 몇가지 치주질환의 원인균들이 생산하는 효소들에 대한 BioMend[®]와 Bio-Gide[®]의 흡수성향을 연구하여 어떠한 효소가 어느 차폐막의 분해에 영향을 주는가에 대해 보여주었다²⁰. 이러한 흡수를 지연시켜 물리적 성질을 보완하기 위해 교원질 분자를 가교 결합시키는 수단으로써 자외선, 글루타알데하이드 등을 사용하여 물리적, 생물학적 성질을 조절하는 방법이 차폐막의 제조에도 사용되었으며²¹ 글루타알데하이드 처리를 통해 생체내에서 자연적으로 일어나는 분해과정을 효과적으로 늦출 수 있게 된다. 이를 이용하여 그동안 인공혈관,

인공심장판막등이 제작되어 왔다. 그렇지만 글루타알데하이드는 세포독성을 갖는 물질로서 가교에 관여하지 않는 잔존 글루타알데하이드가 서로 중합하여 세정 과정을 거친다 하더라도 모두 제거되지 않고 교원질내에 남아 체내에서 서서히 유출되므로 세포독성을 나타내어 부작용을 일으킨다는 연구 결과들이 있다²³. 각 제조회사들이 이러한 부작용을 줄이기 위해 노력함에도 불구하고 여러 연구논문에서 보듯이 *in vitro*에서 글루타알데하이드가 사용된 차폐막에서는 생체적합성이 떨어지는 것으로 보고되고 있다^{12,14,15,16}. 본 연구에서도 글루타알데하이드로 처리한 실험군 B와 C에서 세포의 부착과 증식이 통계학적으로 유의하게 실험군 A와 대조군에 비해 낮았으며 알칼리성 인산분해효소 활성 역시 낮게 나타났다. 그렇지만 실제 임상에서는 여러가지 요인들이 존재하기 때문에 실험실적 환경에서 밝혀진 결과들로 조사된 차폐막들의 능력을 일률적으로 평가하는 것은 어렵다. 다른 연구자들의 동물실험 결과 상업적으로 판매되는 소의 1형 교원질에 글루타알데하이드 처리를 한 것과 돼지의 제1형, 3형 교원질에 글루타알데하이드 처리가 되지 않은 것을 사용하여 임플란트 주위의 열개형(*dehiscence*) 결손부를 치료한 연구 결과 두 가지 모두 조직학적으로 우수한 결과를 나타내었다²³.

흡수성 교원질 차폐막의 생물학적, 물리적 성질을 개선하기 위해 글루타알데하이드와 같은 물질로 처리하는 것 이외에도 *heparin sulfate*와 섬유결합소를 내층에 첨가한 이중막 구조의 차폐막이 개발되기도 하였다. 섬유결합소는 섬유모세포의 화학주성 인자로 작용하며 외층의 조기 흡수때 상피세포의 이주를 막는 이차적인 방벽으로 작용할 수 있으며 이러한 이중구조를 갖는 차폐막의 내층은 섬유결합소와 *heparin sulfate*의 전달 시스템으로도 작용하게 된다²⁰.

본 연구에서 세포증식 대한 연구와 함께 알칼리성 인산분해효소에 대한 연구도 시행하였다. 알칼리성 인산분해효소는 경조직 생성능을 갖는 세포에서 나타나는 효소 중 하나로 그 값으로 경조직 생성능을 갖는 세포로의 분화 정도를 가늠할 수 있다. 실험군 C에서 특히 알칼리성 인산분해효소의 측정치가 낮았는데 비율적으로 보아 MTT분석과 비교하면 더욱 낮은 수치를 보였다. 이는 세포의 부착과 증식도 낮지만 세포가 원래의 경조직 생성능을 갖는 섬유모세포로 분화하는 데도 장애를 갖는 것으로 보인다. 주사전자현미경상의 관찰도 대조군과 실험군 A에서는 방추형의 세포 외형을 갖추고 있지만 실험군 B, C에서는 거의 구형에 가까운 외형을 보이고 있으며 세포돌기들도 보이지 않았다. 이러한 세포의 외형은 기질에 대한 세포의 친화성을 판단하는 척도로 생각할 수 있다. 편평해 보이는 세포들은 세포돌기를 내는 것으로 볼 수 있고 둥근 구형의 모양을 한 세포들은 편평한 모양의 세포들보다 더 낮은 비율로 증식하는 것으로 보고 되었다²⁵. 이러한 보고를 근거로 하면 실험군 B, C에서는 세포가 부착하여 분화, 증식하기에 좋지 못한 기질이며 생체적합성이 저조한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 앞에서 언급했듯이 글루타알데하이드를 이용한 가교결합 때문인 것으로 여겨진다²³. 또한 글루타알데하이드 처리외에

heparin sulfate 처리를 한 실험군 C에서는 오히려 실험군 B보다도 낮은 세포부착, 증식 및 알칼리성 인산분해효소 활성을 나타낸 것으로 보아 이러한 처치가 실험적으로는 생체적합성을 향상시키는데 오히려 방해가 되었다고 볼 수 있다. 그렇지만 *in vitro*상에서 얻어진 결과로는 *in vivo*내에서의 복잡한 많은 상호작용들을 모두 다 재현할 수 없으므로 *in vivo*모델에서 체계적인 동물실험을 통해 본 연구의 결과를 확인할 필요가 있다. 또한 조직유도재생술에 관여하는 다른 세포들의 적합성에 대해서도 논의되어야 하며 조직유도재생술의 성공을 위해서는 생체내에 매식되는 차폐막들의 물리적, 화학적인 조성을 이해하고 매식되는 주변 생물학적 환경에 대한 이해가 고려되어야 한다. 또한 생체적합성을 감소시키는 요소에 대한 연구가 보다 필요할 것이며 이를 최소화하기 위한 연구와 노력이 경주되어야 할 것이다.

V. 결 론

조직유도재생술을 위한 흡수성 교원질 차폐막은 그 자체로 인간 치주인대 섬유모세포의 부착, 분화 및 증식에 영향을 미치는 것으로 사료되며 본 연구에서는 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포의 부착과 증식에 있어서는 대조군인 배양접시 표면에서 가장 활발한 부착과 세포의 증식이 일어났으며 실험군 A가 그 다음, 실험군 B, C의 순서였다.
2. 알칼리성 인산분해 효소 활성 검사결과를 통한 경조직 생성능을 갖는 세포로의 분화정도도 평가 역시 대조군에서 가장 높았으며 실험군 A, B, C의 순서였다.
3. 주사전자현미경 관찰 결과 대조군에서는 방추형의 세포 외형과 세포돌기를 볼 수 있었으며 실험군 A에서도 역시 방추형의 세포외형을 보이는 것으로 보였다. 실험군 B와 C에서는 세포들의 외형이 구형을 보이고 있었으며 세포돌기들의 발달도 인정하기 어렵다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 차폐막의 생체내 흡수를 연장시키기 위한 글루타알데하이드 처리 및 실험군 C에서의 *heparin sulfate* 처리는 실험실 환경에서 인간 치주인대 섬유모세포의 부착, 증식 및 분화를 저해하였다고 사료된다.

참고문헌

1. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494-503.
2. Caffesse RG, Dominguez LE, Nasjleti CE, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA: Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J Periodontol* 1990;61:45501.
3. Gottlow J: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term result. *J Periodontol* 1993;64:1157-1165.
4. Machtei EE, Cho MI, Dunford R, Norderyd J, Zambon JJ, Genco RJ: Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy. *J Periodontol* 1994;65:154-161.

5. Selvig KA, Kersten, BG, Chamberlain AD, Wikesjo UM, Nilveus RE: Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electronmicroscopic evaluation of retrieved membranes vs. clinical healing. *J Periodontol* 1992;63:974-978.
6. Temprow PJ, Nalbandian J: Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations. *J Periodontol* 1993;64:162-168.
7. Yaffe A, Ehrlich J, Shoshan S: Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol* 1984;55:623-628.
8. Yukna CN, Yukna RA: Multicenter evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human class II furcations. *J Periodontol* 1996;67:650-657.
9. Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P: Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol* 1996;67:236-244.
10. Hammerle CHF, Lang NP: Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:9-18.
11. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA: Evaluation of implants placed with barrier membranes. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:274-280.
12. Wang H-L, Miyauchi M, Takata T: Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. *J Periodont Res* 2002;37:340-344.
13. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Kalykakis GK, Heinen E, Defresne MP, De Pauw MC, Grisar T, Legros JJ, Legrand R: Culture of gingival fibroblasts on bioabsorbable regenerative materials in vitro. *J Periodontol* 1999;70:1234-1239.
14. Takata T, Wang H-L, and Miyauchi M: Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodont Res* 2001;36:322-327.
15. Takata T, Wang H-L, Miyauchi M: Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:332-338.
16. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertzen M, Scherbaum W, Becker J: Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:443-449.
17. Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I: Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1325-1341.
18. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM: Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1992;7:302-310.
19. Burrige K, Molony L, Kelly T: Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci (Suppl)* 1987;8:211-229.
20. Sela MN, Kohavi D, Krausz E, Steinberg D, Rosen G: Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:263-268.
21. Quteish D, Dolby AE: The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1992;19:476-484.
22. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1980;14:753-764.
23. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL: Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:80-90.
24. Pitaru S, Noff M, Grosskopf A, Moses O, Tal H, Savion N: Heparan sulfate and fibronectin improve the capacity of collagen barriers to prevent apical migration of the junctional epithelium. *J Periodontol* 1991;62:598-601.
25. Folkman J, Moscona A: Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978;273:345-349.