

약물함유 생체분해성 차폐막의 유도조직재생에 관한 연구

김동균¹ · 이승진² · 정종평¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실, ²이화여자대학교 약학대학

I. 서 론

차폐막을 이용한 조직유도재생술식은 치주질환으로 파괴된 치주조직을 효과적으로 재생시키기 위한 목적으로 연구되고 있다. 일반적으로 치주수술 후에는 치유과정에서 각 조직들마다 성장하는 속도에 차이가 있기 때문에 성장속도가 늦은 조직들을 원활하게 성장할 수 있는 조건을 만들어 주는 것이 필요하다. 치주결손부를 Millipore filter를 사용하여 상피세포로부터 격리하여 재생속도가 늦은 조직들도 충분히 성장할 수 있도록 하는 치료 방법은 효과적인 것으로 알려져 왔다¹⁻⁷.

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 인정을 받고 있는 소재인데, 조직에 대한 차폐능력이 뛰어나고, 신체 내에서 완전히 불활성 물질로 남아있기 때문에 생체안정도와 생체친화성이 좋은 물질이다.^{8,9} 그러나 이것은 반드시 2차적인 제거수술이 필요하므로 최근에는 생체내에서 분해가 이루어져 부가적인 제거수술이 필요 없는 생체분해성 차폐막(biodegradable barrier membrane)에¹⁰⁻¹⁴ 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이런 목적으로 연구되고 있는 생체분해성 차폐막의 소재들은 type

1 collagen¹⁵, atelocollagen 또는 cargin과 같은 교원질과¹⁶⁻²⁶ polyglactin 910과^{27,28} polylactide-polyglycolide 공중합체²⁹, polyurethane³⁰ 그리고 polyactic acid³¹⁻³⁵ 등의 생흡수성합성고분자들이다. 생체분해성 차폐막들은 효과면에서 계속적인 수정보완이 요구되고 있는데, 앞으로는 그 자체에 항균효과나 조직성장을 촉진하는 물질을 함유한 개량된 차폐막도 나타날 것으로 기대되고 있다.

한편 치주염증의 진행은 prostaglandin의 생성에 의해 매개되는데 이 prostaglandin의 생성을 억제하는 비스테로이드성 소염제들의 치주질환의 진행 과정에 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.³⁶⁻³⁹ 비스테로이드성 소염제중의 하나인 flurbiprofen은 동물실험에서 낮은 농도(0.02 mg/kg)로도 성견의 치조골 흡수 속도를 억제함이 보고되고⁴⁰, 임상연구를 통해서 치주치료에도 상당한 효과가 있는 것으로 보고되었다⁴¹. 또한 tetracycline은 항균효과 이외의 다른 특성들을 갖고 있는 것으로 알려져 있는데, 상아질 표면에 섬유아세포가 부착하는 것을 촉진시키기도 하고⁴², 교원질분해효소에 대해 억제효과(anti-collagenase)도 있으며⁴³⁻⁴⁸, 특히 국소적으로 도포 또는 투여하였을 때 신생골의 형성을 돕는다는 것이 보고되고 있는⁴⁹, 치주치료에 있어서 유용하게 사용되는 약물이다. 따라서 이러한 약물을 차폐막에 병행하여 사용할 수 있다면 좋은 치료효과를 기대할 수 있

* 본 논문은 한국과학재단 1994 특정기초·협력 연구과제 연구비(94-0403-05-02-3) 지원에 의하여 이루어짐.

을 것으로 생각된다.

이 연구의 목적은 치주치료에 많이 사용되는 약물인 flurbiprofen 또는 tetracycline을 poly-L-lactic acid(PLA)와 polyglycolic acid(PGA)로 제작된 생체분해성 차폐막내에 함유시켜 치주재생을 위해 좀더 효과적인 차폐막이 될 수 있는가를 보기 위함이다. 이 연구에서는 약물함유생체분해성차폐막을 제작하고 물리적인 성질을 살핀후, 함유시킨 약물의 방출을 측정하고, 생체친화성과 분해양상을 보았으며, 골조직재생유도능력을 평가하였다.

II. 실험재료 및 방법

가. 차폐막의 제작 및 물성실험

PGA (viscosity 18,000 poise)(Samyang Co., Seoul, Korea)를 용융하여 방사기(Extrusion system Ltd., Drighlington, England)로 250°C에서 방사를 하여 tube knitter(Koike Ltd., Nara, Japan)로 편직을 했다. 이때 망사의 초기 강도는 5.2 g/d 이고 신도는 20% 였다. 제작된 망사를 펴서 고정하고 분자량 300,000의 poly(L-lactide)(Polyscience Inc., Warrington, PA, USA)를 피막시킨 후, 상온에서 24 시간 건조하고 다시 진공건조시켰다. 약물을 함유시킬 때는 flurbiprofen (Samil Pharm. Co., Seoul, Korea) 또는 tetracycline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 PLA와의 무게비가 5, 10, 20% 씩 되게 하여 혼합하였다. 차폐막의 형태는 주사전자현미경(JSM 53CF, JEOL Co, Tokyo, Japan)으로 양쪽 표면 및 단면도를 촬영하여 관찰하였다.

용질에 대한 투과실험에서는 순환기를 사용하여 37±0.5°C로 유지시킨 수욕에 horizontal diffusion cell(수직막형 cell)을 설치하여 약물시료부(doner compartment)에는 rose bengal (Mwt: 1049.84) (BDH Ltd., Poole, England)을, 투과부(receptor compartment)에는 완충용액(phosphate buffer: pH 7.4)을 넣고 제작한 각각의 차폐막을 직경 2 cm 크기로 하여 투과실험을 하였다. 이때 자석식교반기(magnetic stirrer)를 사용하여 300

rpm으로 교반하였다. 단, 투과부의 투과액(medium)이 소량이므로 포화로 인한 투과의 저하를 고려하여 예정된 시간간격으로 전량의 투과액을 취한 뒤 새 완충용액을 넣어 실험하였다(medium whole exchange). 투과부내의 약물농도는 UV-spectrophotometer (Beckman Du65, Beckman Instrument Inc., Fullerton, CA, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

차폐막으로부터의 약물방출 측정을 위해 각각의 제작된 차폐막을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 넣은 후 shaking water bath (Dongyang Science Co., Buchon, Korea)에서 37°C, 15 rpm을 유지시키고 일정시간 간격으로 방출액을 채취하여 UV-spectrophotometer를 사용하여 flurbiprofen은 247 nm에서, tetracycline은 372 nm에서 각각의 농도를 정량하였다.

나. 세포활성도에 미치는 효과

실험에 사용할 세포배양을 위해서 서울대학병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제1 소구치의 치은조직을 사용하였다. 채취직전에 큐렛(Gracey, Hu-Friedy Co, Chicago, IL, USA)을 이용하여 치석 및 치태등을 제거하고 생리식염수로 여러번 씻어내었다. 국소마취를 시행하고 치간부위에 내사면 절제를 가한 다음 정상치은조직을 채취하였다. 채취된 조직편을 100 U/ml penicillin (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)과 100 µg/ml streptomycin(Gibco)이 첨가된 α-MEM (Gibco) 생검배지에 침수시켰다. 채취된 치은조직을 약 1 mm²로 세절한 다음 35 mm 세포배양 접시에 고르게 분산시켜 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin 및 10% FBS가 첨가된 α-MEM을 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5 계대 배양시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다.

계대배양한 치은섬유아세포를 0.25% trypsin-EDTA(Gibco)용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구계

산기로 well 당 1×10^5 개의 세포수가 되게하여 접종한 후 배양하였다. 24시간 후 배양액을 교환하고 48시간 후 배양액을 제거한 후 Hank's balanced salt solution(Gibco)으로 세척하였다. 차폐막은 약물을 넣지 않은 것과 5%, 10%, 20%로 flurbiprofen 또는 tetracycline을 넣은 것을 3×5 mm 로 자르고 각각 ethylene oxide gas로 소독한 후 각 well에 넣고 배양액을 200 μ l가 되게 하였다. 이들을 24시간 배양하고 생리식염수에 용해한 methyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma) 용액 50 μ l를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT 용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(Sigma)를 50 μ l씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, Bohannon, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료가 들어있지 않은 α -MEM 배양액 well 을 사용하였고 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

다. 차폐막의 흡수 및 조직반응

체중 200 - 250 gm의 백서(Sprague-Dawley rat) 24 마리를 대상으로 실험을 하였다. 백서를 에테르로 마취한 후 등의 털을 깎고 0.5% chlorhexidine으로 소독하고 피하조직에 e-PTFE (Gore-Tex periodontal material, W.L. Gore & Associates Inc., Flagstaff, AZ, USA), polyglactin 910(Vicryl, Johnson and Johnson, Somerville, NJ, USA), 그리고 PLA와 PGA로 제작한 차폐막을 6 mm \times 6 mm의 사각형 크기로 마리 당 각각 4 개씩 매식하고 봉합하였다. 매식 후 0, 1, 2, 4, 6, 8 주에 동물을 희생시키고 매식물을 주위조직과 함께 절제해 내었다. formalin에 고정한 후 haematoxylin-eosin(HE)과 Masson-trichrome특수염색법으로 염색하고 광학현미경(Olympus BH-2, Olympus Co, Tokyo, Japan)으로 조직학적 소견 및 흡수양상을 관찰하였다.

라. 백서 두개골조직재생유도

체중 300 - 350 gm의 백서 42 마리를 Entobar

(Hanlim Pharm Co., Seoul, Korea)를 사용하여 intraperitoneal(30 mg/kg)로 마취하고 두부의 털을 깎은 후 0.5% chlorhexidine으로 수술 부위를 소독하였다. 수술 중의 안정과 편리를 위해 백서의 머리를 두부고정기(cephalostat)에 고정하고, 전두골 앞쪽에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 절개하고 피부와 점막 부위를 바깥 쪽으로 젖힌 후 두개골을 노출시켰다. 측두골의 양쪽을 round bur(SSW HP-6, SS White Burs Inc., Lakewood, NJ, USA)를 사용하여 뇌막등에 손상을 주지 않도록 하여 직경 5 mm의 구멍을 뚫었다. 약물을 함유시키지 않은 차폐막과 10%의 flurbiprofen과 10%의 tetracycline을 각각 함유시킨 차폐막은 오른쪽에 형성된 구멍위에 위치시키고 두피를 덮어 3-0 봉합사(black silk)로 봉합하였다. 반대편은 e-PTFE를 넣거나 아무런 막을 넣지 않은 상태로 봉합하였다. 차폐막을 매식한지 5 주째에 실험동물을 모두 희생시키고 두개골을 절제해내고 구멍의 크기를 vernier calipers로 측정하였다. 구멍 주위에 신생골이 형성된 정도는 구멍의 장단축의 평균치로 계산하고, 직경이 1 mm 이하, 1-3 mm 사이, 3 mm 이상 되는 것들을 각각 3단계로 나누어 분류하였다. 수술부위가 오염되거나 차폐막이 노출된 것들은(17마리) 모두 대상에서 제외하였다. 절제된 표본은 formalin에 고정하고 nitric acid에 넣어 탈회한 후 HE염색과 Masson-trichrome염색을 하여 광학현미경으로 조직소견을 관찰하였다.

치은섬유아세포의 활성화도에 각 차폐막들이 미치는 영향은 ANOVA와 Mann-Whitney test를 이용하여 통계분석을 하였으며, 백서 두개골에 대한 차폐막들의 골조직재생유도능력은 Kruskal-Wallis test와 Wilcoxon Rank sum test로 분석하였다.

III. 연구결과

가. 차폐막의 구조 및 물성

제작된 차폐막은 두께가 150 μ m이다. 주사전자현미경을 통하여 본 막내의 미세공의 크기는 직경이 8 μ m 정도 였다(Figure 1). 또한 단면도를 보

있을 때, 막 내부의 미세공은 8 μm 정도였다 (Figure 2 와 3).

제작된 차폐막은 표면의 소수성 때문에 침수 (wetting)가 지연되어 초기지연시간(lag time)을 보이거나, 24시간 이후부터는 침수됨에 따라 약물의 투과성이 급격히 증가됨을 보였고, 차폐막에 대한

약물의 투과실험 결과는 Figure 4와 같다. 또한 약 7일간 용출기에서 약물방출실험을 한 결과에서, flurbiprofen은 7일간 일정한 속도(zero order release)로 약물이 방출되었으며, 5%, 10% 약물을 함유시킨 경우에는 총량의 6%와 9%정도가, 20% 약물을 함유시킨 경우에는 50% 정도가 7일동안에

Figure 1. 제작된 차폐막의 주사전자현미경적 소견. 표면에 대략 직경 8 μm 정도의 미세구멍이 관찰된다.

Figure 2. 제작된 차폐막의 단면에 대한 주사전자현미경적 소견.

Figure 3. Figure 2의 단면을 확대한 주사전자현미경적 소견.

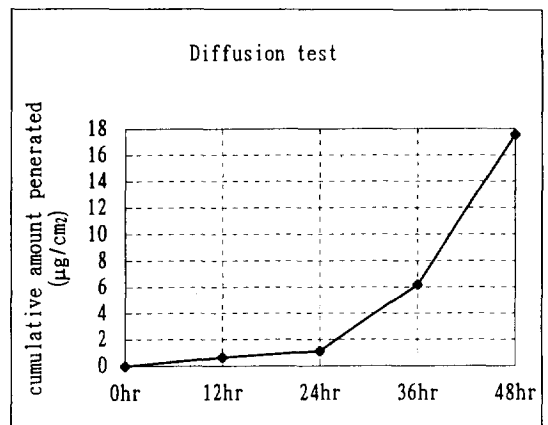


Figure 4. 용질(rose bengal)이 차폐막을 통과하는 투과실험에서는 초기에는 침수(wetting)에 걸리는 시간 때문에 투과가 느리게 일어났지만, 24시간 후 부터는 용질의 투과가 빠르게 일어나는 경향을 보이고 있다.

방출되었다(Figure 5). Tetracycline의 경우에는 초기 6시간 이내에 초기최대방출을 보였으며, 그후 느린속도로 약물이 방출되었는데 tetracycline의 함유량에 따른 각 차폐막의 방출양상은 Figure 6과 같다.

나. 세포독성실험 결과

세포독성실험결과는 다음의 표와 같은데 flurbiprofen과 tetracycline을 각각 20% 씩 봉입시킨 경우에만 독성이 나타나며 약물을 넣지 않은

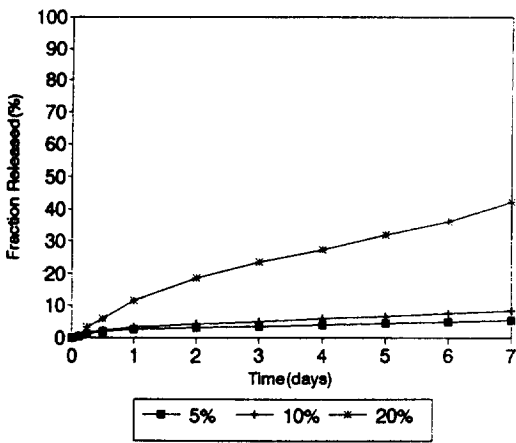


Figure 5. 차폐막으로부터 7일간 방출되는 flurbiprofen의 총량 비율.

것과 5%, 10% 씩 넣은 것은 아무것도 넣지 않은 대조군에 비해 별다른 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 따라서 차폐막 자체에 의한 독성은 관찰되지 않았다.

다. 생체분해성차폐막의 조직반응 및 분해

1. 생체분해성 차폐막의 조직소견 : 1주째에는 치밀한 염증세포의 침윤과 대식세포가 다수 관찰되며 이물세포도 보였다. 매식체의 파편들이 이물

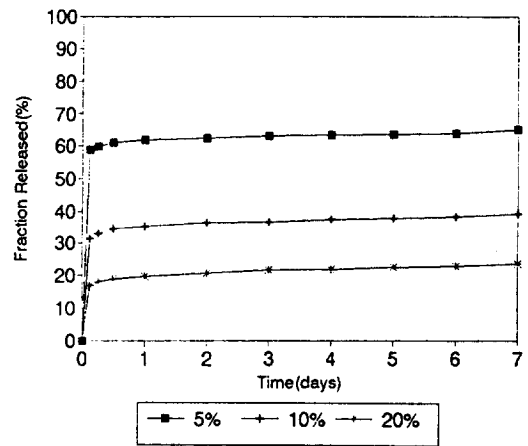


Figure 6. 차폐막으로부터 7일간 방출되는 tetracycline의 총량 비율.

Table 1. 세포배양 후 각 농도의 약물을 함유시킨 차폐막들이 나타내는 세포독성. flurbiprofen (FLU)을 20% 함유시킨 경우와 tetracycline(TC)을 20% 함유시킨 경우에만 치은섬유아세포에 대해 유의성 있게 독성을 보였으며, 약물을 넣지 않은 경우(drug unloaded)와 5%, 10% 씩 약물을 함유시킨 경우에는 대조군과 비교할 때 세포독성이 나타나지 않았다. (* P<0.05) ANOVA와 t-test.

	absorbance (M ± SD)	percent to control
drug unloaded	0.279 ± 0.036	104
FLU 5%	0.271 ± 0.030	101
FLU 10%	0.253 ± 0.012	95
FLU 20%	0.084 ± 0.059	32*
TC 5%	0.271 ± 0.027	101
TC 10%	0.260 ± 0.019	97
TC 20%	0.198 ± 0.023	74*
Control	0.268 ± 0.009	100

거대세포에 의해 흡수되는 소견을 보였다. 2주째에는 매식체의 분해가 더욱 진행되어 매식체의 분편을 대식세포가 탐식하는 것이 보였다(Figure 7). 4주째에도 이물반응은 지속적으로 진행되고 있으며, 주변의 광범위하던 염증이 약간 감소되었고, 차폐막 내부로 결체조직이 조금씩 침입해 들어오는 양상을 보인다(Figure 8). 6주째에는 매식체가 분리 소화되고 이물반응과 염증반응이 크게 소실되었다(Figure 9). 8주째에는 매식체가 급격히 분해되어 조각들이 흩어져 있으며 분편 사이에 결체

조직이 차지해 있고, 염증 및 이물반응이 지속적으로 있었다(Figure 10).

2. e-PTFE의 조직소견 : 1주째에는 매식체가 대식세포로 둘러싸여 있고 주변조직에 만성염증세포의 침윤이 뚜렷하다. 2주째에는 매식체가 1주와 동일한 상태로 대식세포에 의해 싸여있고, 만성염증세포의 침윤이 있으며, 매식체 내부공간에도 대식세포와 염증세포의 침윤이 관찰되었다(Figure 11). 4주째에는 대식세포의 파괴와 염증세포의 침윤정도가 약화되어 있으며 매식체에는 특이한 변

Figure 7. 생체분해성 차폐막(M)의 백서 피하조직내에서의 조직소견. (2주)(x40)

Figure 8. 생체분해성 차폐막(M)의 백서 피하조직내에서의 조직소견. (4주)(x40)

Figure 9. 생체분해성 차폐막(M)의 백서 피하조직내에서의 조직소견. (6주)(x40)

Figure 10. 생체분해성 차폐막(M)의 백서 피하조직내에서의 조직소견. (8주)(x40)

화가 없었다. 6주와 8주째에는 염증이 감소하고 매식체는 계속 대식세포의 피막으로 덮여있었다.

3. Polyglactin 910의 조직소견 : 1주째에는 분해된 매식체가 많이 관찰되고 대식세포들에 의해 둘러싸여 있다. 매식체의 다발들이 일정한 간격으로 분리 배열되고 나머지 분해된 조직들은 육아조직으로 대체되었다. 4주째에는 염증이 거의 없으며 매식체의 다발이 분리되었다(Figure 12). 6주째에는

주로 대식세포에 둘러싸인 잔존 매식물과 매식물 사이의 육아조직이 존재하며, 8주째에는 대식세포의 피막으로 싸인 매식체가 관찰되었다(Figure 13).

라. 골조직재생유도 능력

백서의 손상된 두개골에 대한 각 차폐막들의 골조직재생유도에 의한 골폐쇄량 측정결과는 Table

Figure 11. e-PTFE 차폐막(G)의 백서 피하조직내에서의 조직소견.(4주)(x40)

Figure 12. Polyglactin 910(V)의 백서 피하조직내에서의 조직소견.(4주)(x40)

Figure 13. Polyglactin 910(V)의 백서 피하조직내에서의 조직소견.(8주)(x40)

Figure 14. 백서의 두개골 결손부의 자연적인 치유 상태. 골결손부에 어떤 차폐막도 넣지 않았으며, 신생골(NB)의 형성은 적게 일어나고 손상부는 결체조직(CT)에 의해 관통되는 양상을 보인다. Br: Brain(x100)

2 와 같다. 차폐막을 넣은 모든 실험군들은 차폐막을 넣지 않은 대조군에 비해 골폐쇄가 많이 일어났다. 10% tetracycline을 함유시킨 차폐막을 사용한 실험군은 대조군에 비해 신생골에 의한 골폐쇄가 유의성있게 일어났으며, 다른 차폐막을 사용한 실험군들보다 신생골에 의한 골폐쇄가 많이 일어난 것이 관찰되었다(Table 2). 그러나 차폐막을 넣은 실험군들은 간에는 차폐막의 종류에 따른 차이가 통계학적으로 유의성있게 나타나지는 않았다.

백서의 두개골에서의 조직소견에서는 아무런 차폐막도 덮지않은 골결손부의 경우에는 신생골의 형성이 적게 일어났으며, 골결손부내에 결체조직이 관통하고 있는 양상이 관찰된다(Figure 14). 약물을 넣지않은 차폐막(Figure 15)과 flurbiprofen을

넣은 차폐막의 경우(Figure 16)에도 신생골의 형성은 관찰되지만 tetracycline을 넣은 차폐막의 경우보다는 신생골의 형성이 적었다. Tetracycline을 넣은 차폐막의 경우에는 차폐막의 하방에 신생골에 의한 골폐쇄가 다른 차폐막보다 많이 일어났으며(Figure 17-19), 완전한 골폐쇄가 일어난 것도 관찰된다 (Figure 20). e-PTFE막의 경우에도 막의 직하방에 신생골의 형성이 일어나는 것이 관찰되는데 (Figure 21), 주변골과의 변연봉쇄가 비교적 좋게 보이며, 이것은 e-PTFE막이 약물함유차폐막보다 유연성이 있기 때문인 것처럼 보였다. 그러나 골결손부의 중앙부쪽에서는 공간확보의 부족으로 인해 신생골의 형성이 매우 얇게 일어나는 것도 관찰된다.

Table 2. 백서의 손상된 두개골에 여러가지 종류의 차폐막(10% flurbiprofen(Flu),10% tetracycline(Tc), 약물을 넣지 않은 막, e-PTFE막)을 넣고 5주 동안 골조직재생을 유도하였을 때, 신생골에 의해 골폐쇄가 되고 남은 결손부의 크기. 10% tetracycline을 넣은 차폐막에서 대조군에 비해 유의성 있는 골폐쇄가 일어났다 (* p<0.05).

defect size (diameter)	10% FLU membrane	10% TC membrane	drug unloaded membrane	e-PTFE membrane	control
0 - 1 mm	1	3*	1	1	0
1 - 3 mm	6	4	5	5	4
3 - 5 mm	2	0	3	1	6
total	9	7	9	7	10

Figure 15. 약물을 넣지않은 차폐막(M) 하방에 신생골(NB)이 형성되는 양상. Br: Brain (x40)

Figure 16. Flurbiprofen을 넣은 차폐막의 하방에 신생골의 형성이 일어나고 있다. 신생골의 형성이 비교적 적게 일어났다.(x100)

IV. 총괄 및 고찰

이 연구는 치주치료에 널리 사용되는 약물인 flurbiprofen과 tetracycline을 polyactic acid(PLA)

와 polyglycolic acid(PGA)로 제작한 생체분해성차폐막내에 함유시키고, 이것이 치주재생을 좀더 효과적으로 할 수 있는가를 보기위하여 PGA로 제작한 망사에 약물을 넣은 PLA를 얇게 입혀서 생

Figure 17. Tetracycline을 넣은 차폐막(TCM) 하방에 형성되는 신생골(화살표)에 의한 골폐쇄가 상당히 일어난모습. 화살표 부위가 신생골과 기존골과의 경계를 나타내고 있다.(x40) Br: Brain

Figure 18. Figure 17의 가운데 골폐쇄가 아직 덜 일어난 부분에 대한 고배율 사진. (x100) NB: 신생골

Figure 19. Tetracycline을 넣은 차폐막 하방에 형성되는 신생골(화살표)에 의해 골폐쇄가 상당히 일어났지만 부분적으로는 결체조직에 의해 관통이 일어나고 있는 모습이 보인다.(x40)

Figure 20. Tetracycline을 넣은 차폐막(TCM) 하방에 형성되는 신생골(화살표)에 의해 골폐쇄가 완전히 일어난 모습. (x40)

약물의 함입이 쉬우며, 분해기간이 보통 6 - 8 개월이므로 충분한 기간 동안 조직재생유도를 할 수 있을 것으로 보인다^{50,51}. 최근에는 PLA와 함께 음전하를 띠는 PLA oligomer를 혼합하여 조직반응을 좋게하는 연구들도 있다³⁵. 동물실험에서 음전하를 띠는 비드(bead)를 쥐의 두개골 결손부위에 넣었을 때 전하가 없거나 양전하를 띠는 비드보다 신생골형성이 더 많이 일어났다는 보고가 있다⁵². 그러나 이 oligomer의 음전하에 의한 영향은 보고된 바 없으며, oligomer는 약물방출조절이 어려우므로 약물함유차폐막으로 사용되기에는 적합하지 않은 것으로 생각된다.

Figure 21. e-PTFE 차폐막(G)을 넣은 경우, 차폐막 하방에 신생골(NB)이 형성되고 있다. 화살표 부위부터 신생골형성이 일어난 것으로 추정된다. (x40)

체분해성차폐막을 제작하고 물리적인 성질을 살핀 후, 함유시킨 약물의 방출을 측정하고, 세포배양 및 동물실험을 통해 생체친화성과 분해양상을 보았으며, 백서의 두개골에서 골조직재생유도능력을 평가하였다.

차폐막의 물리적 성질에 대한 조건을 살펴보면, 차폐막은 막 자체가 조직과 융합(tissue integration)되면서 세포들을 분리(cell separation)시킬 수 있어야 하며, 임상적으로 조작이 쉬우면서도 공간확보(space making)를 할 수 있도록 강도를 지녀야 한다⁷. 생체분해성합성고분자들은 약물방출속도와 분해기간 및 물리적 성질을 조절하기가 비교적 용이한 특성이 있다^{50,51}. PLA를 소재로 하여 복잡하고 정교한 구조를 갖도록 제작된 차폐막과^{32,34} PLA와 PGA를 공중합시켜 여러가지 물리적 성질 및 분해속도 등을 조절한 polyglactin 910 차폐막 등이^{27,28} 그 예라고 하겠다. PGA는 결정성이 높아서 이를 녹이는 용매가 거의 없으므로 열로 녹여야 하며 PLA 보다 분해속도가 빠르다는 특징이 있다. 또한 강도가 높고 직조성도 좋아 흡수성 봉합사로 많이 이용되고 있다. 반면에 PLA는 대부분의 유기용매에 잘 녹기 때문에 열을 가할 필요가 없으므로 열에 의해 변성이 일어나기 쉬운

이 연구에서 제작된 고분자막에 대한 주사전자 현미경 소견에서 대략 8 μm 인 미세공이 형성되었는데, 용질의 차폐막 투과실험에서도 용질(rose bengal: Mwt, 1049,84)이 차폐막을 통과했기 때문에 비슷한 크기 또는 작은 분자량을 갖는 영양분들은(Mwt, glucose 180, sucrose 342) 통과가 가능할 것으로 보이며, 차폐막 매식시의 창상부의 초기 영양공급도 가능할 것으로 생각된다. 차폐막이 주변의 결체조직과 융합된다는 관점에서 보면 막의 변연부, 특히 치관부쪽은 중앙의 차폐부에 비해 큰 미세공 또는 틈새를 가지는 것이 유리할 것으로 생각되지만 동물실험결과 조직과의 융합에는 별 어려움이 없는 것으로 보이며, 차폐막의 강도가 골과의 밀착에 더 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이 실험에서 제작된 차폐막의 두께는 대략 150 μm 정도였는데 이는 e-PTFE 막과 비슷한 정도의 두께이며, e-PTFE 보다는 더 뽀뽀하게 느껴졌는데, 차폐막이 뽀뽀하면 공간확보에는 유리하겠지만 주변의 골과 접착성이 부족해지기 쉽고, 매식 후에 이물감이 느껴질 가능성이 있을 수 있으므로 앞으로 유연성을 향상시키는 연구가 필요하다.

위에서 언급한 기본적인 물성은 성장을 바라는 조직이 충분히 성장할 수 있을 때까지 반드시 유지되어야 한다. 이 실험에서는 백서의 피하조직에 매식된 차폐막이 6주까지는 막의 골격을 유지하고 있었으며, 8주째에는 결체조직이 막을 뚫고 통과하는 양상을 보여, 적어도 6주까지는 조직에 대해 차폐효과가 있을 것으로 생각된다. 치주조직의 재생을 위해서는 통상적으로 4 - 6주 정도면 충분한

치유기간으로 보고 매식한 차폐막을 제거하게 되므로, 본 실험에서 제작된 차폐막은 충분한 기간 동안 차폐역할을 할 수 있다고 하겠다.

일반적으로 생체재료의 가장 중요한 성질은 생체친화성이지만, 생체분해성재료는 재료자체의 친화성은 물론, 분해산물의 친화성까지 요구된다. 즉, 재료가 효소 또는 비효소에 의해 분해되고 그 분해산물이 체액에 용해되어 대사 또는 배설되지 않으면 안된다. 따라서 생체분해성 재료의 생체친화성은 비흡수성재료보다 엄격히 제한될 수 밖에 없다⁵⁴⁻⁵⁶. Type 1 collagen, atelocollagen 그리고 cartilage 등의 교원질차폐막은 지혈작용이 있고⁵⁷ 섬유아세포에 대해 화학주성효과도 있으며, 세포가 이동할 때 발판역할을 한다는³⁵ 장점이 있다. 그러나 이들은 약간의 항원성을 갖고 있으며, 임상에서 사용될 때 가끔 섬유화(fibrosis) 등을 일으키는 부작용에 대한 임상증례들이^{58,59} 보고된 바 있다. 이 연구에서 사용된 재료들은 모두 합성고분자들로서 천연고분자인 교원질차폐막에 비해 항원성이 적은 것으로 알려져 있다⁶⁰⁻⁶². 그러나 PLA 와 PGA는 가수분해되어 lactic acid와 glycolic acid로 되며 마지막으로는 이산화탄소와 물로 분해되기 때문에⁵⁶, 항원성에 의한 국소적 또는 전신적 독성은 적을 것으로 생각되지만 어느정도의 국소적인 독성은 있을 것으로 예상된다.

이 연구에서 세포배양을 통한 독성실험 결과를 볼 때, 20% 씩 약물을 함유시킨 경우에는 많은 세포독성을 보였지만, 10% 이하의 약물을 함유시킨 경우와 약물을 함유시키지않은 경우에는 세포독성을 거의 보이지 않았으므로 고분자 자체에 의한 독성은 거의 없는 것으로 보인다. 20% 씩 약물을 함유시킨 차폐막의 경우에는 높은 약물농도에 의한 조직독성이 일어날 수 있으며, 차폐막의 유연성이 떨어져 물성이 나빠질 가능성이 있으므로 이후부터는 10% 약물을 함유시킨 차폐막만으로 연구를 계속하였다. 차폐막의 소독은 ethylene oxide gas로 하였는데, 이런 경우 잔류된 ethylene oxide가 세포독성을 나타낼 수 있으므로⁶² 실험군이 대조군에 비해 약간 세포활성도가 떨어지는 현상이 있을 수도 있겠으나 그 오류는 고려하지 않았다.

조직반응을 보기위해 백서의 피하조직에 차폐

막을 매식했을 때, 1주와 2주에는 심한 염증반응이 나타났지만, 4주째 이후에는 염증반응이 상당히 감소하고 약한 정도의 염증반응만이 지속되었다. 이 결과는 대조군의 e-PTFE막과 비슷한 정도의 염증반응이었으며 조직에 대한 독성은 e-PTFE 처럼 거의 없는 것으로 여겨진다.

생체재료의 피하조직 매식시 형성되는 섬유성 피막에 관한 국제치과연맹의 생체적합성 평가 기준에서⁶³ 2주 및 12주 경과 후 피막이 잘 형성되어 있고, 염증반응이 없는 경우와 2주 경과 후에는 다형핵백혈구, 임파구, 형질세포, 대식세포, 이물거대세포등이 나타나나, 12주 경과 후에 염증세포들이 감소하는 경우는 생체적합성이 있는 재료로 평가하며, 2주에 무반응 또는 경미한 염증반응을 보인 것이 12주에 중등도 또는 심한 조직반응을 보이거나 양쪽 모두에서 중등도반응을 보이는 것은 생체적합성이 없는 것으로 평가하였는데, 이 연구의 피하조직 매식실험에서는 8주까지는 시간이 지남에 따라 염증이 증가되지 않고 있으므로 12주까지 매식을 할 경우에도 생체적합성에서는 별 문제가 없을 것으로 생각된다.

Tetracycline계 항생제들은 치주병인균들에 대해 상당한 감수성을 나타내기도 하지만^{49,72} 다른 비항생제효과(non-antibiotic effect)도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Tetracycline HCl은 상아질에 도포하였을 때 상아질표면에 흡착되어 fibronectin의 상아질 표면에 대한 결합을 증가시키고 이 흡착된 fibronectin이 상피세포의 하방증식과 부착을 억제함과 동시에 섬유아세포의 부착과 성장을 촉진시키기도 하며^{64,65}, 치주인대세포에 대해 화학주성을 나타낸다는 보고⁶⁶도 있다. 그밖의 비항생제효과로서, 이미 일반의료분야에서 이 특성만을 이용한 치료가 많이 이루어지기도 하는데, 교원질분해효소억제능력(anti-collagenase activity)이 있다⁶⁷⁻⁷⁰. 몇몇의 연구에 의하면 적은 용량의 doxycycline을 장기복용 시킬 때, 치은열구의 미생물에 영향을 주지 않은 상태에서 치주낭내의 교원질분해효소가 줄어들었다고 했다.^{42,43} 그러나 다른연구에서는 보통으로 tetracycline을 복용했을 때의 약물농도로는 이런 교원질분해효소억제 효과를 기대하기 어렵다고 하였고⁶⁸, 이런 효과는 약물농도에 의존하는 것으로 추정하였다⁶⁹. 또한 다른 실험실연구에서⁷⁰

호중구(neutrophil)와 치은열구액내의 교원질분해 효소에 대한 doxycycline의 유효억제농도(IC₅₀)는 15-30 μM이었지만, 섬유아세포의 교원질분해효소에 대해서는 280-510 μM이었으므로 교원질분해효소의 종류에 따라 TC의 IC₅₀ 농도차가 크다고 하겠다. 또한 Burns 등에⁷¹ 의하면, 토끼의 각막(cornea)에서 분리한 교원질분해효소연구에서 doxytetracycline, minocycline과 tetracycline의 IC₅₀은 각각 7, 84, 156 μg/ml이었다(15, 190 그리고 350 μM). 이에 의하면 tetracycline의 경우에는 교원질분해를 억제하기 위해서는 156 μg/ml의 농도가 되어야 하는데, 이는 tetracycline의 일반적인 치주병인균에 대한 유효약물농도인 4-8 μg/ml 보다도⁷² 아주 높은 농도이다. 물론 실험실에서 이루어지는 생체의 연구와 생체내에서의 실질적인 유효약물농도는 큰 차이가 있을 수 있으므로 각 교원질분해효소들에 대한 약물의 실질적인 억제능력이 실험실의 농도와 일치한다고 보기는 어렵지만, 약물의 농도에 따라 그 효과가 다르게 나타날 수는 있다고 생각된다. 이런 높은 약물농도는 보통의 전신적투여로는 도달되기 어려우며 국소약물송달체계(local drug delivery)에 의해서 가능하기 때문에 (>1,300 μg/ml)⁴³ 약물을 차폐막에 함유시키는 것은 효과적인 방법이라고 할 수 있다. 치주의 교원질분해효소 억제에 대해서는 생체내 연구에서도 밝혀진 바 있으므로, tetracycline을 함유한 차폐막에 대한 치료효과가 기대된다. 또한 감염된 치근의 상아세관내에는 세균이 존재하는 것으로 알려져 있는데⁷³, 이것이 실질적으로 어떤 역할을 하는가는 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 그러나 이는 상아세관이 치주낭 재감염의 서식처로 이용될 가능성을 나타내므로 이에 대한 대처방법이 필요할 수 있다. 10%의 tetracycline을 사용할 경우에도 어느정도까지는 상아질내로의 침투가 가능하기는 하지만⁷³, 국소약물송달에 의한 방법으로는 약물이 상아세관내로 10 μm까지도 tetracycline이 들어갈 수 있기 때문에 치근면의 내부까지 치료하는 것은 국소약물송달체계를 이용하는 것이 효과적이다.

백서의 두개골에 대한 골조직재생유도능력실험 결과에서 tetracycline을 함유한 차폐막을 사용한 경우는 아무런 차폐막도 넣지 않은 경우에 비해

유의성 있게 효과가 있는 것으로 나타났으며, flurbiprofen이 함유되거나 약물이 함유되지 않은 차폐막 그리고 e-PTFE막을 사용한 경우들도 대조군에 비해서 약간의 차이를 보였다. 원래 골조직의 손상은 어느정도까지는 자연적으로 완전히 치유되기 때문에, 자연적으로는 절대 치유가 불가능한 임계치수결손(critical size defect) 만큼의 인위적 손상을 준다면 골조직재생을 촉진하는 재료들에 대해 명확히 평가를 할 수 있을 것이다. 여러 연구들에서 임계치수결손이 백서의 두개골의 경우 2 mm 에서 8 mm 까지로 다양하게 보고되고 있는데⁷⁴, 임계치수결손은 같은 종류의 동물에서도 손상부위 뿐만 아니라 나이에 의해서도 변화가 많으므로⁷⁴⁻⁸⁰ 정확한 손상크기를 결정하는 것은 어려운 것으로 보인다. 이 실험에서는 직경 5 mm의 원형결손을 손상의 크기로 설정했는데, 신생골에 의해 완전히 밀폐가 일어난 것은 적었다. 따라서 임계치수손상을 찾지는 못하였고 이 차폐막이 골조직의 재생을 얼마나 도울 수 있었는가만을 보았으며, 신생골이 생성되는 양상만을 조직학적 소견을 통해서 관찰하였다. 조직학적 소견에서 tetracycline을 함유한 차폐막 하방에는 신생골의 형성이 e-PTFE막에 비해 두텁게 일어났는데 이것은 이 차폐막이 e-PTFE보다 더 뽀뽀해서 e-PTFE보다 공간확보면에서 우수하기 때문인 것으로 생각된다. Tetracycline을 함유한 차폐막을 사용하였을 때 다른 차폐막들을 사용한 경우에 비해 골폐쇄가 비교적 많이 일어난 이유는 tetracycline을 함유한 차폐막이 수술후에 발생하는 감염과 염증을 줄여서인지 아니면 tetracycline의 다른 성장 촉진효과에 기인된 것인지는 분명치 않다.

약물함유차폐막이 e-PTFE 또는 약물이 함유되지 않은 차폐막과 비슷한 정도로만 조직재생유도능력을 가진다면 차폐막에 함유된 약물자체에 의한 효과는 계속 존재할 것으로 생각되며 적어도 전신적인 약물투여에 따른 부작용은 크게 줄어들 것으로 생각된다.

이 연구에서는 백서의 두개골을 대상으로 연구하였지만 앞으로는 계통발생학적으로 더 진화된 동물의 치주조직을 대상으로 연구를 하여 임상치료에 적용가능한 결과를 얻도록 해야 할 것이다. 또한 어떤 종류의 약물과 성장인자를⁸¹ 차폐막에

포함시키는 것이 가장 효과적일까에 대한 연구도 계속 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

이 연구는 치주치료에 널리 사용되는 약물인 flurbiprofen과 tetracycline을 polylactic acid(PLA)와 polyglycolic acid(PGA)로 제작한 생체분해성차폐막내에 함유시키고, 이것이 치주재생을 좀더 효과적으로 할 수 있는가를 보기위하여 PGA로 제작한 망사에 약물을 넣은 PLA를 얇게 입혀서 생체분해성차폐막을 제작하고 물리적인 성질을 살핀 후, 함유시킨 약물의 방출을 측정하고, 세포배양 및 동물실험을 통해 생체친화성과 분해양상을 보았으며, 백서의 두개골에서 골조직재생유도능력을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ① 5, 10, 20% tetracycline과 20% flurbiprofen가 포함된 차폐막으로부터 방출되는 약물은 7 일경에 대략 30-60% 정도였으며, 5%와 10% flurbiprofen가 포함된 차폐막으로부터 방출되는 약물의 농도는 6-9% 정도였다.
- ② 세포배양실험에서는 20%씩 약물을 함유시킨 경우를 제외하고는 차폐막들이 세포독성을 보이지 않아, 고분자자체에 의한 세포독성은 거의 없는 것으로 나타났다.
- ③ 백서의 피하조직내에서는 특이한 조직반응이 없었으며, 대략 4-6주째부터는 결체조직에 의해 차폐막이 뚫리기 시작하므로 4-6주까지는 차폐효과를 가질 수 있는 것으로 보였다.
- ④ 백서의 두개골조직 재생유도실험에서는 차폐막을 사용한 실험군들이 차폐막을 사용하지 않은 대조군에 비해 신생골에 의한 결손부폐쇄가 많이 일어났으며, 10% tetracycline을 함유시킨 차폐막을 사용한 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게($P<0.05$) 결손부폐쇄가 많이 일어났다.

이상의 결과로서 약물함유생체분해성차폐막은 치주조직재생유도를 위한 차폐막으로 이용될 가능성이 있다고 생각된다.

참고문헌

1. Claffey N, Motsinger S, Ambruster J, Egelberg J. Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound in dogs. *J Clin periodontol* 1989;16:12-16.
2. Froum SJ, Gomez C. Periodontal regeneration. *Current Opinion Periodontol* 1993:111-128.
3. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biologic concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontology* 2000 1993;1:26-35.
4. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstam K, Sundin Y. Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol* 1993(supplement):64:1116-1128.
5. Minabe M. Critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. *J periodontol* 1991; 62:171-179.
6. Minabe M, Kodama T, Hori T, Watanabe Y. The wound healing reaction followong palatal gingivectomy in rats. *J Periodont Res* 1989; 24:178-185.
7. Scantlebury T. 1982-1992: A decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1993(supplement): 64:1129-1137.
8. Becker W, Becker BE, McGuire MK. Localized ridge augumentation using absorbable pins and e-PTFE barrier membranes: A new surgical technique. case reports. *Int J Periodont Rest Dent* 1994;1:49-61.
9. Caffesse RG, Dominguez LE, Nasjleti CA, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration(GTR). *J Periodontol* 1990; 61:45-50.
10. Galgut P, Pitrola R, Waite I, Doyle C, Smith R. Histologic evaluation of biodegradable and

- non-degradable membrane placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 581-768.
11. Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices ; Initial healing and long-term results. *J Periodontol* 1993 (supplement):64:1157-1167.
 12. Gottlow J, Lawrell L, Rylander H, Lundgren D, Rudolfsson I, Nyman S. Treatment of infrabony defects in monkeys with bioresorbable and non-resorbable GTR devices. *J Dent Res* 1993 (IADR Abstracts 823):206.
 13. 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.
 14. Greenstein G, Caton JG. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology* 2000 1993;1:36-45.
 15. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: analysis of properties. *J Periodontol* 1992;63:182-186.
 16. Blumenthal NM. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membrane in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64:925-933.
 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* 1990;61:319-327.
 18. Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ, Wikesjö UME. Effect of a collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs. *J Periodontol* 1993;64:878-882.
 19. Chung KM, Salkin LM, Stein MD, Freedman AL. Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1990;61:732-736.
 20. Garrett S, Loss B, Chamberlain D, Egelberg J. Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric acid conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 383-389.
 21. 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.
 22. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-Avidam O, Noff M. Collagen membrane Prevents the apical migration of epithelium during Periodontal wound healing. *J Periodont Res* 1987;22:331-333.
 23. 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* 1988; 59:380-386.
 24. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M. Collagen Membrane prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue during periodontal wound healing in dogs. *J periodont Res* 1989;24:247-253.
 25. Tanner M, Solt CW, Vudhakanok S. An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. *J Periodontol* 1988;59: 524-530.
 26. Yaffe A, Ehrlich J, Shoshan S. Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol* 1984;55:623-628.
 27. Gager AH, Schultz AJ. Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane(Polyglactin 910) with and without osseous grafting; Case reports. *J Periodontol* 1991; 62: 276-283.
 28. Schultz AJ, Gager AH. Guided tissue regeneration using an absorbable membrane (Polylactin 910) and osseous grafting. *Int J*

- Periodont Rest Dent 1990:10:9-17.
29. Vuddhakanok S, Solt CW, Mitchell JC, Foreman DW, Alger FA. Histologic evaluation of periodontal attachment apparatus following the insertion of a biodegradable copolymer barrier in humans. *J Periodontol* 1993;64:202-210.
 30. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. *J Clin Periodontol* 1992;19:633-640.
 31. Brekke JH, Olson RaJ, Scully JR, Osbon DB. Influence of polylactic acid mesh on the incidence of localized osteitis. *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 1983;56:240-245.
 32. Gottlow J, Lawrell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H, Bogentoft C. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: A longitudinal study in monkeys. *Int J Periodont Rest Dent* 1994;14:437-449.
 33. Magnusson I, Batich C, Collins BR. New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J Periodontol* 1988; 59: 1-7.
 34. Lawrell L, Gorrlow J, Nyman S, Falk H, Fornell J, Johard G. Gingival response to Guidor, a bioabsorbable device in GTR-therapy. *J Dent Res* 1992;71(AADR Abstracts 1536):298.
 35. Robert PM, Frank RM. Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane. *J Periodontol* 1994;65:414-422.
 36. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH. Topical flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles. *J Periodont Res* 1988;23:166-169.
 37. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell Th, Hall CM, Johnson HG, Wechter WJ, Goldhaber P. Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles; Comparison of effect on bone loss. *J Periodont Res* 1987;22:403-407.
 38. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM, Goldhaber P. Ibuprofen: An inhibition of alveolar bone resorption in beagles. *J Periodont Res* 1988;23:225-229.
 39. Williams RC, Offenbacher S, Jeffcoat MK, Howell TH, Johnson HG, Hall CM, Wechter WJ, Goldhaber P. Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles; Effect on crevicular fluid arachidonic acid metabolites compared with effect on alveolar bone loss. *J Periodont Res* 1988;23:134-138.
 40. Heasman PA, Seymour RA. The effect of a systemically administered non-steroidal anti-inflammatory drug (flurbiprofen) on experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol* 1989;16:551-556.
 41. Jeffcoat MK, Williams RC, Reddy MS, English R, Goldhaber P. Flurbiprofen treatment of human periodontitis: Effect on alveolar bone height and metabolism. *J Periodont Res* 1988;23:381-385.
 42. Somerman MJ, Foster RA, Vorsteg G, Progebin K, Wynn RA. Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J Periodont Res* 1988;23:154-159.
 43. Golub LM, Ciancio S, Rammamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: Effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodont Res* 1990;25:321-330.
 44. Golub LM, Goodson JM, Lee HM, Vidal AM, McNamara TF, Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit tissue collagenases: Effects of ingested low-dose and local delivery systems. *J Periodontol* 1985:93-97.
 45. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, Kapoor A, Zambon J, Ciancio S, Schneir M, Perry H. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity.

- J Periodont Res 1984;19:651-655.
46. Ingman T, Sorsa T, Suomalainen K, Halinen S, Lindy O, Lauhio A, Saari H, Kontinen YT, Golub LM. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. J Periodontol 1993;64:82-88.
 47. Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM. Blocking periodontal disease progression by inhibition tissue-destructive enzymes : A potential therapeutic role for tetracycline and their chemically modified analogs. J Periodontol 1993;64:819-827.
 48. Sasaki T, Ramamuthy NS, Yu Z, Golub LM. Tetracycline administration increases protein (presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozotocin-induced diabetic rats. J Periodont Res 1992;27:631-639.
 49. Goodson JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. Periodontology 2000 1994;5:142-168.
 50. Tarcha PJ. Polymers for controlled drug delivery. CRC press. 1991.
 51. Tsuruta T, Hayashi T, Kataoka K, Ishihara K, Kimura Y. Biomedical applications of polymeric materials. CRC press 1993.
 52. Krukowski M, Shivery RA, Osdoby P, Eppley B. Stimulation of craniofacial and intramedullary bone formation by negatively charged beads. J Oral Maxillofac Surg 1990; 48:468-475.
 53. Salonen JL, Persson RG. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. J Periodont Res 1990;25:215-221.
 54. 김종여, 고재승, 황성명. 세포배양 및 피하조직매식에 의한 수산화인회석과 생체활성유리의 생체적합성에 관한 연구. 대한구강해부학회지 1992;16:49-75.
 55. 서활, 민병구. 생체재료학 입문. 지성출판사. 1993:138-158.
 56. Chasin M, Langer R. Biodegradable polymers as drug delivery systems. Marcel Dekker. 1990:1-43.
 57. Stein MD, Salkin LM, Freedman AL, Glushko V. Collagen sponge as a topical hemostatic agent on mucogingival surgery. J Periodontol 1985;56:35-38.
 58. Chung AF, Menon J, Dillon TF. Acute postoperative retroperitoneal fibrosis and ureteral obstruction secondary to the use of Avitene. Am J Obstet Gynecol 1978;132:908-909.
 59. Park SA, Giannattasio C, Tancer ML. Foreign body reaction to the intraperitoneal use of Avitene. Obstet Gynecol 1981;58:664-667.
 60. DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA, McPherson JM. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. J Biomed Mat Res 1986;20:109-120.
 61. Cutright DE, Beasley JD, Perez B. Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures. Oral Surg 1971;32:165-173.
 62. Brunsvold M, Mellonig JT. Bone grafts and periodontal regeneration. Periodontology 2000 1993;1:80-91.
 63. Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1980 :30:140-188.
 64. Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, DiFlorio RM, Terranova VP. A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. J Periodont Res 1986;21:322-329.
 65. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ. A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. J Periodont Res 1986;21:330-337.

66. Terranova VP, Hic S, Franzetti LC, Lyall RM, Wikesjö UME. A biochemical approach to periodontal regeneration: Assays for specific cell migration. *J Periodontol* 1987;58:247-256.
67. Breedveld FC, Dijkmans AC, Mattie H. Minocycline treatment for Rheumatoid arthritis: An open dose finding study. *J Rheumatol* 1990;17:43-46.
68. Greenwald RA, Golub LM, Lavietes B, Ramamurthy NS, Gruber B, Laskin RS, McNamara TF. Tetracycline inhibit human synovial collagenase in vivo and in vitro. *J Rheumatol* 1987;14:28-32.
69. Suomalainen K, Sorsa T, Golub LM, Ramamurthy N, Lee HM, Uitto VJ, Saari H, Kontinen Y. Specificity of the anticollagenase action of tetracyclines: Relevance to their anti-inflammatory potential. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1992;36:227-229.
70. Yu LP, Smith AN, Hasty KA, Brandt KD. Doxycycline inhibits type XI collagenolytic activity of extracts from human osteoarthritic cartilage and of gelatinase. *J Rheumatol* 1991;18:1450-1452.
71. Burns F, Stack M, Gray R, Paterson C. Inhibition of purified collagenase from alkaline-burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30 :1569-1575.
72. Walker CB, Gordon JM, McQuilkin SJ, Niebloom TA, Socransky SS. Tetracycline: Levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. *J Periodontol* 1981;52:613-616.
73. Christersson LA, Norderyd OM, Puchasky CS. Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:88-95.
74. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 1986;205:299-308.
75. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. *J Neurosurg* 1991;74:481-491.
76. Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: An experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:1106-1114.
77. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81: 672-676.
78. Linde A, Thoren C, Dahlin C, Sandberg E. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: An experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:892-897.
79. Melcher AH, Accursi GE. Osteogenic capacity of periosteal and osteoperiosteal flaps elevated from the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol* 1971;16:573-580.
80. Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 1980;65:553-559.
81. Caffesse RG, Quinones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000 1993;1:69-79.

Drug-loaded biodegradable membranes for guided tissue regeneration

Dong-Kyun Kim¹, Seung-Jin Lee², Chong-Pyoung Chung¹

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

²*College of Pharmacy, Ewha Woman's University*

The purpose of this study was to evaluate drug-loaded biodegradable membranes for guided tissue regeneration(GTR). The membranes were made by coating mesh of polyglycolic acid(PGA) with polylactic acid(PLA) containing 10% flurbiprofen or tetracycline. The thickness of membrane was $150 \pm 30 \mu\text{m}$, and the pore size of surface was about $8\mu\text{m}$ in diameter. The release of drugs from the membrane was measured in vitro. Cytotoxicity test for the membrane was performed by gingival fibroblast cell culture, and the tissue response was observed after implant of membrane into the dorsal skin of the rat for 8 wks. Ability to guided tissue regeneration of membranes were tested by measuring new bone in the calvarial defects(5mm in diameter) of the rat for 5 weeks. The amount of flurbiprofen and tetracycline released from membrane were about 30-60% during 7 days. Minimal cytotoxicity was observed in the membrane except 20% drug containing membrane. In histologic finding of rat dorsal skin, many inflammatory cells were observed around e-PTFE, polyglactin 910 and PLA-PGA membrane after 1 or 2 weeks. PLA-PGA membrane was perforated by connective tissue after 4 or 6 weeks, and divided as a segment at 8 weeks. In bone regeneration guiding potential test, tetracycline loaded membrane was most effective ($p < 0.05$). In histologic finding of rat calvaria, new bone formation was greater in defects covered by membrane than in defects uncovered. Tetracycline loaded membrane might be a useful barrier for GTR in periodontal treatment.

Keywords ; drug-loaded biodegradable membrane, polyglycolic acid, polylactic acid, tetracycline, flurbiprofen, GTR.