EDTA를 이용한 치근면 처리가 치은섬유모세포의 초기 부착에 미치는 영향

김성봉 · 임기정 · 김상목 · 김병옥 · 한경윤

조선대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

정상적인 치주조직의 결합조직성 부착은 치은 및 치주인대의 섬유모세포, 치은상피, 혈관내피세포, 신경세포돌기, 치조골과 교원질, 당단백, 단백당과 같은 세포외기질복합체로 이루어진다[1]. 치주질환에 이환된 치근면은 결합조직 부착의 소실, 지지 치조골의 상실, 세균과 내독소에 의한 치근의 오염, 무기질의 밀도와 성분의 변화, 세포부착과 섬유의 발달을 위해 적절한 기질로 작용하는데 필요한 전구세포에 대한 주화성의 상실과 같은 병리적 변화가 초래될 수 있다[2]. 따라서 치주질환으로 인해 파괴된 조직의 재생을 위해서는 결합조직 세포가 치근면으로 이동하여 부착할수 있도록 치근면의 환경을 변화시켜 주어야 하며[3,4], 이를 위한 치근면 처치과정에 기계적인 방법으로 치석제거술 및 치근면활택술이 있다. 그러나 기계적 청소후 치근표면에는 도말층이 형성되어[5] 섬유모세포 부착 및 결합조직부착을 저해하고[6], 세균이 증식할 수 있는 기질로 제공되어[7] 치주조직의 치유를 방해할 수 있으므로 부가적으로 여러가지 약제를 이용한 치근처리 방법에 대한 연구가 이루어져 왔다.

치근면 처치를 위한 약제로 구연산(citric acid), fibronectin, 염산 테트라싸이클린(tetracycline hydrochloride, Tc - HCl), 인산(phosphoric acid), 불화석(stannous fluoride), ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), chlorhexidine, formalin, cetylpyridinium chloride, sodium - N - lauroyl sarcosine, zinc iontophoresis 등이 연구되어졌다[2,8 - 12]. 이중에서 구연산[13 - 16], 염산 테트라싸이클린[9,11,17,18]과 같은 산성의 화학요법제가 주로 이용되어져 왔는데, 많은 동물실험에서 도말층의 제거[19], 상아세관의 개방[20], 관간상아질의 탈회에 의한 교원질 기질의 노출[6], 내독소의 제거 및 항균작용[1]과 같은 치주조직의 재생에 긍정적인 효과가 보고되었다. 그러나 일련의 임상적 연구에서는 두드러진 개선이 인정되지 않았으며[2,7,9] 치유과정 동안 치근의 흡수 및 골성강직[12,21], 조직의 괴사[22], 치은퇴축을 초래하고 치조골의 회복을 방해[20]할 수 있다고 보고되어 결합조직의 치유를 증진시킬 수 있는 다른 형태의 치근면 처리방법의 필요성이 제기되었다.

EDTA는 중성 pH에서 Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, 및 Pb^{2+}와 같은 2가 양이온과 킬레이션을 형성하는 물질로 상아질내 칼슘이온과 반응하여 칼슘착염을 형성하여 치근면 활택시 생성된 도말층

을 제거하고 신선한 교원질 기질을 노출시켜 화학주성에 의한 섬유모세포의 이동을 촉진시키고, 생물학적 활성이 있는 성장인자를 유지하는 장소를 제공할 수 있음이 보고된 바 있다[6,19].

이에 본 연구는 치주질환에 이환된 치근면을 EDTA로 처리한 후 초기 세포부착 실험을 통하여 Tc-HCl 처리군 및 치근활택만 시행한 군과 비교 관찰함으로써 EDTA를 이용한 치근처리가 치은섬유모세포의 초기 부착에 대한 증진효과를 규명하고자 시행하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 치아

중증의 치주염으로 인해 발거된 27개의 상하악 구치부 치아를 연구재료로 선별하였는데, 심한 치아우식이나 수복 및 근관치료가 시행되어진 치아, 그리고 과도한 치근 만곡도나 원추형의 치근을 갖는 치아는 제외하였다.

2) 치은섬유모세포 배양

조선대학교 부속치과병원 치주과에 내원한 환자로부터 건강한 치은조직을 채취하여 항생제가 함유된 HBSS(Hank's balanced salt solution, Gibco)로 3-4회 세척한 후 배양접시 내에서 $1mm^3$ 내외 크기의 조각으로 세절하였다. 세절된 조직절편을 10% Fetal Bovine Serum과 100unit/㎖의 penicillin, 100μg/㎖의 streptomycin 및 2.5μg/㎖의 Fungizone이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) 배양액을 이용하여 37℃, 100% 습도, 5% CO_2가 공급되는 탄산가스배양기에서 배양하였으며 배양액은 2일 간격으로 교체하였다. 섬유모세포들이 조직절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시바닥을 덮는 단층을 이룬 후 3-5일 간격으로 계대배양하여 제5세대의 치은섬유모세포를 본 실험에 이용하였다.

2. 실험 방법

1) 시편의 제작

선택된 치아에 대하여 초음파치석제거기로 치석을 제거하고 생리식염수 세척과 함께 큐렛으로 3분동안 치근면활택술을 시행한 후 치근의 중앙 1/3 부분에서 직경 5mm, 두께 150-200㎛의 원형시편 27개를 만들었다.

2) 시편의 구분

제작된 시편을 치근면 처리를 하지않은 군, 50㎎/㎖ 농도의 Tc-HCl(Tetracycline -HCl, pH 1.52, 종근당) 수용액으로 처리한 군, 17% EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid, pH 7.4, Pulpdent®, Pulpdent Co., USA) 용액으로 처리한 군으로 분류하여 소독된 면구를 각각의 용액에 적셔 연마하는 방법(burnishing technique)으로 적용하였는데, 매 30초마다 새로운 면구로 교체하면서 총 3분간 적용시킨 후 인산완충생리식염수로 세척하였다. 3군은 세포배양시간에 따라 15분, 60분, 4시간 군으로 세분하였다.

3) 시편의 소독

모든 시편을 70% 알콜에 넣고 초음파세척기(BRANSON 8210)로 10분간 3회 처리한 후, 아세톤에서 10분간 2회 초음파 세척하고 건조시킨 다음 인산완충생리식염수로 3회 세척후 96-microwell 세포배양접시(NUNC™)에 옮겨 냉동 보관하였다. 실험 2일전에 냉동 보관된 시편을 새 배양접시로 옮기고 100unit/㎖의 penicillin, 100μg/㎖의 streptomycin 및 2.5μg/㎖의 Fungizone이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, U.S.A.)을 12시간 간격으로 교체해 주었으며, 실험전에 인산완충생리식염수로 최종 세척 및 건조시켜 본 실

험에 이용하였다.

4) 세포부착실험

총 27개의 시편들 중 각 군당 9개씩의 시편을 관찰할 시간에 따라 3개씩 나누어 세포배양접시(96-well, NUNC™)에 치근 처리된 면이 위로 향하도록 위치시킨 후 4×10^4/㎖개의 치은섬유모세포를 함유한 배양액 150㎕씩을 분주하여 동일한 조건하에서 배양하였다.

5) 부착된 세포수 산정

세포배양개시 15분, 60분, 그리고 4시간 후에 동일조건의 세척액으로 3회 세척한 후 세포배양접시로부터 시편을 제거하였다. toluidine-blue 염색 및 봉입 후 광학현미경하 100배 확대 상에서 시편당 무작위로 선택된 3부위를 사진촬영 하여 얻어진 인화사진 상에서 치근표면에 부착된 세포수를 산정하였다.

6) 통계학적 분석

각 군간의 부착된 세포수의 차이를 SPSS(Statistical Package for the Social Science) 통계프로그램에서 one-way ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성을 검사하였으며, Duncan's test로 사후검정을 실시하였다.

III. 실험성적

1. 부착된 치은섬유모세포수에 대한 평가

1) 치근면 처리군별 비교

세포 부착 실험에서 배양 15분 후 부착된 세포수가 치근면 처리를 하지 않은 군에서는

Table 1. Statistical analysis of the difference of the attached fibroblasts between groups at each incubation period

Group(n)	Incubation period(min.)		
	15	60	240
R/P only(9)	453.17±64.14	541.50±32.92	486.17±65.12
R/P + EDTA(9)	609.83±59.27	628.17±68.49	590.00±106.74
R/P + TC(9)	634.83±85.71	646.50±102.88	604.83±102.46

* : statistically significant difference.($p<0.05$)

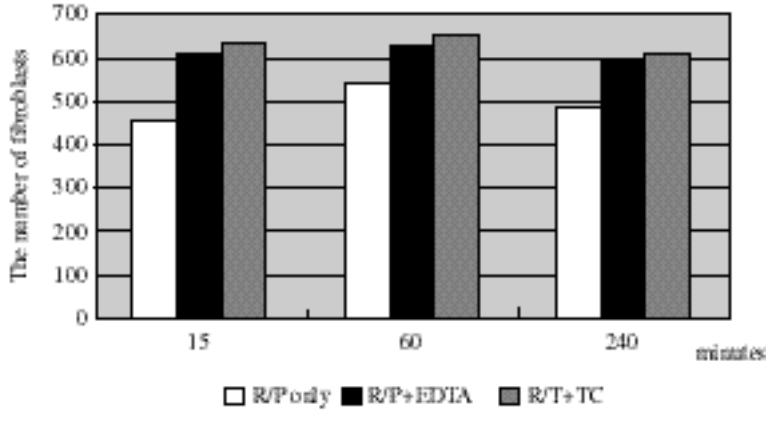


Figure 1. The comparison of the attached fibroblasts by different root treatment modalities

Table 2. Statistical analysis of the difference of the attached fibroblasts according to incubation periods in each group

Group(n) / Incubation period(min)	R/P only(9)	R/P+EDTA(9)	R/P+TC(9)
15	453.17±64.14	609.83±59.27	634.83±85.71
60	541.50±32.92	628.17±68.49	646.50±102.88
240	486.17±65.12	590.00±106.74	604.83±102.46

* : statistically significant difference($p<0.05$).

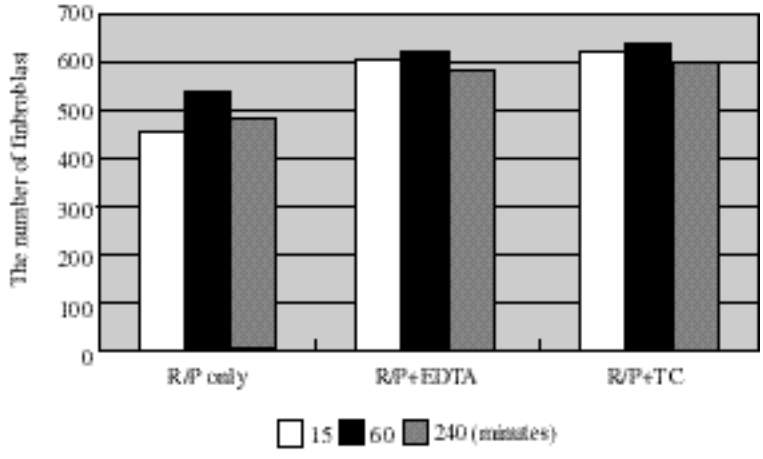
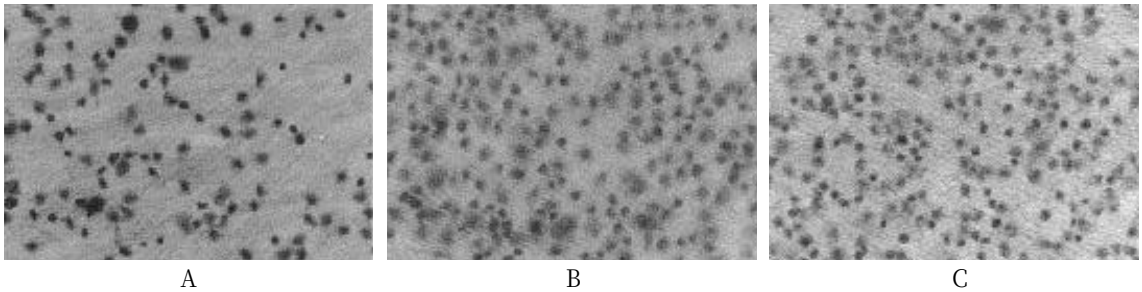


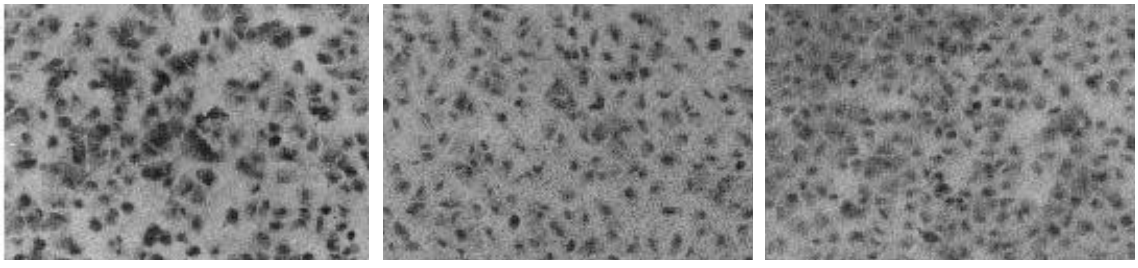
Figure 2. The comparison of the attached fibroblasts by different incubation periods.

453.17±64.14, EDTA 처리된 군에서는 609.83±59.27, 그리고 Tc - HCl 처리된군에서는 634.83±85.71으로 나타났다. 배양 60분 후 부착된 세포수는 각각 541.50±32.92, 628.17±68.48 및 646.50±102.88으로 나타났고, 배양 4시간 후 부착된 세포수는 각각 486.17±66.63, 590.00±106.74 및 604.83±102.46으로 나타났다. 배양 15분 후 EDTA 처리된 군과 Tc - HCl 처리된 군은 치근면 처리를 하지 않은 군보다 세포수가 유의성 있게 많았으나($p<0.05$), EDTA 처리된 군과 Tc - HCl 처리된 군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다



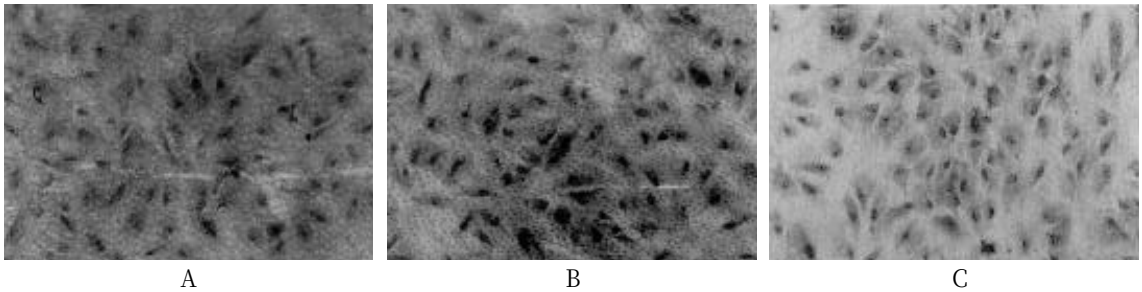
A B C

Figure 3. Light microphotograph of R/P only(A), R/P+EDTA(B), and R/P+TC(C) group after 15 min(×100).



A B C

Figure 4. Light microphotograph of R/P only(A), R/P+EDTA(B), and R/P+TC(C) group after 60min(×



A B C

Figure 5. Light microphotograph of R/P only(A), R/P+EDTA(B), and R/P+TC(C) group after 4 hr(×100).

(p>0.1). 배양 60분 및 4시간 후에는 모든 군에서 부착된 세포수의 차이에 유의성이 없었다(p>0.1) (Table 1, Figure 1).

2. 세포배양시간별 비교

치근면 처리를 하지 않은 군에서는 배양 15분 후와 배양 60분 사이에만 유의성 있는 차이를 보였을뿐(p<0.05), 다른 시간별 비교에서는 세포수의 차이에 유의성이 없었다(p>0.1). EDTA 처리군이나 TC 처리군에서는 모든 시간별 비교에서 배양시간에 따른 부착된 세포수의 차이에 유의성이 없었다(p>0.1)(Table 2, Figure 2).

3) 세포형태학적 관찰

배양 15분 후 세포의 양상은 호염기성 색소로 잘 염색된 원형의 핵들을 포함하는 타원형 혹은 원형의 치은섬유모세포들이 치근 표면에 부착되어 있는 소견을 보였다. 그러나 세포질은 전체적으로 풍부하지 않은 양상을 보였다(Figure 3). 배양 60분 후에는 세포 부착의 결과로 핵인(nucleoli)이 뚜렷한 원형의 핵들이 방추형 세포의 한쪽에 치우쳐 있었으며 세포질은 풍부하고 호염기성으로 잘 염색된 소견을 보였다(Figure 4). 배양 4시간 후에는 1-2개의 뚜렷한 핵인(nucleoli)을 가진 원형의 핵들이 타원형 혹은 길다란 방추형의 치은섬유모세포의 편측에 위치하고 있었다. 핵과 세포질의 호염기성 양상은 60분에 비하여 다소 감소되어 있었으나 세포질의 양은 더욱 풍부한 양상을 보였다(Figure 5).

IV. 총괄 및 고안

치주질환은 치아 주변의 결합조직 부착과 치조골의 상실, 접합상피의 하방증식 및 치근면의 병적 변성 등을 초래하여 치주조직의 원래 형태와 기능을 파괴하게 된다[5]. 따라서 치주치료

의 목적은 이러한 질환의 원인을 제거하여 질환의 진행을 억제시키고 파괴된 조직을 수복하며 나아가 질환의 재발을 예방하는데 있다. 파괴된 치주조직의 가장 이상적인 치유형태는 노출된 치근면으로의 신생백악질, 치조골, 치주인대의 재생이며[17], 이를 위해서는 치주인대나 결합조직의 섬유모세포가 치근면에 부착하거나 밀접하게 근접하여 정상 치주인대를 형성하는 교원질과 다른 결합조직 물질을 생산해야 한다[3,4].

치주수술 후에 신생 교원섬유소가 치근표면에 부착하는 기전에 관하여 Stahl등[23]은 새로 형성된 교원질 거대분자에 의해 치근으로부터 돌출된 기존의 비석회화된 교원질 섬유와 부착한다고 하였으며, Frank등[24]은 치근에 침착된 신생 백악질에 신생 교원질이 매입되어 부착이 일어난다고 하였다. 종합해 보면 섬유모세포가 먼저 치근면에 부착하는 것이 치주조직치유의 전제 조건이라고 볼 수 있다. Pitaru등[25]은 이렇게 새로이 형성된 신생 교원섬유는 역으로 치은섬유모세포에 대해 화학주성을 가져서 치근표면으로 부착을 유도하며, 대체로 탈회 표면에는 세포가 수직으로 배열되고 비탈회 표면에는 수평으로 배열되며 이는 탈회후 노출된 백악질의 교원섬유 사이에 섬유세포돌기가 매입되기 때문이라고 설명하였다.

임상에서 완벽한 치근활택이 불가능한 경우 이환된 치근을 그대로 두면 섬유모세포의 배열 및 교원질 합성을 방해하여 결합조직의 재부착에 장애가 되는데, Pitaru등[26]은 이환된 백악질이 잔존하면 내독소에 의해 섬유모세포의 부착이 억제된다고 하였으며, Lasho등[27]은 이환된 백악질을 제거하지 않은 상태에서 탈회한 경우 치근에 대한 부착효과가 없다고 보고하였다. Jones등[28]은 완벽한 치근활택술을 시행한 경우 건강한 치아와 거의 유사한 정도로 독성물질이 줄어들 수 있다고 보고하였고, Fernyhough등[3]은 이환된 백악질을 완전히 제거하였을 경우에 섬유모세포의 부착이 건강한 백악질에서의 경우와 동일하게 일어났다고 하였다. 그러나 O'Leary등[29]과 이등[30]은 이환된 백악질을 임상적으로 완전히 제거했다고 하더라도 조직학적으로는 완전한 제거가 어렵다는 것을 광학현미경 및 주사전자현미경 관찰에서 입증하였다.

본 연구는 모든 실험군에 대해 치석제거후 큐렛을 이용하여 임상에서 적용하는 것과 동일한 측방압을 가하여 치근활택을 시행하였으며, 생리식염수 세척을 포함하여 치아당 3분 동안 기구조작을 하였는데 기구조작 횟수로 환산하면 평균 60회 정도가 되었다. 치근면에서 효과적인 치근활택을 위한 기구조작 횟수와 관련해서 O'Leary 등[29]은 치근활택시 정상적인 기구조작에 의해 0.9 - 1.0mm정도의 조직이 제거되며, 임상에서 이환된 백악질을 제거하기 위해서는 최대 50회의 기구조작이 필요하다고 하였다. 문등[31]은 모든 치근에 대해 동일한 횟수의 기구조작을 시행한 결과 섬유모세포의 부착에 일관성 있는 결과를 나타내지 않았다고 하였으며, Coldiron등[32]은 질환에 이환 되지 않은 백악질을 완전히 제거하기 위해서는 최소한 20회 이상의 기구조작이 필요하나, 치아의 부위에 따라서는 70회 이상의 기구조작을 하더라도 백악질 잔사가 존재함을 조직학적으로 보고하면서 기계적 기구조작과 함께 부수적으로 화학적인 치근처리가 필요하다고 하였다.

구연산이나 Tc - HCl과 같은 탈회제의 작용기전에 관하여 Polson등[33]은 활택된 치근면의 도말층을 제거하여 섬유모세포의 부착을 촉진시킨다고 하였으며, Garrett등[34]은 탈회시 상아질 기질내 교원질을 노출시켜 새로운 백악질이 형성되지 않고도 신생 교원질이 직접 치근면에 결합할 수 있어 결합조직의 부착력이 증진된다고 하였다. Proye등[35]은 상피치유의 초기단계에 섬유소망이 비탈회 치근 보다 탈회 치근에 더 잘 부착하여 상피의 근단 이동을 기계적으로 방해함으로써 세포가 치근면으로 이동할 수 있는 비계역할을 한다고 하였다.

Boyko등[36]은 치질내 포함된 수산화인회석 보다는 노출된 교원질이 세포부착에 더 좋은 매개체를 제공한다고 하였으며, Lowenberg등[37]은 탈회된 경우에 교원섬유의 배열이 훨씬 빠르며 섬유모세포의 부착 및 배열도 탈회에 의하여 증진된다고 보고하였고, Larjava등[15]은 탈회된 치근면이 상피세포의 초기 이동 방향에 영향을 미침으로써 치면에 대한 결합조직 부착이 증진된다고 하였다.

치주조직의 신부착을 증진시키는데 있어 이들 탈회제의 효과는 다양하다. 외과적으로 형성한 치주결손부와 동물실험을 이용한 실험적 치주염, 사람을 대상으로 한 임상적 연구에서 결합조직의 치유나 골형성이 촉진되었다는 보고[11,16]가 있는 반면에, 치주인대세포의 치관 쪽으로의 이주저해, 골유착 및 치근의 흡수[18,38], 그리고 주변조직의 괴사[20,22]등과 같은 부작용도 보고되어 이들의 유해성에 대한 논란이 제기되었다.

이에 반해 중성의 킬레이트제인 EDTA는 아직까지 주변 치주조직에 대한 어떠한 유해성도 보고되지 않았으며, 치주조직의 잠재적 치유에 대한 가능성이 보고되었다. Bloml f등[6,19,20,22]은 EDTA가 질환에 이환된 치근에서 간엽세포에 독성이 있는 수산화인회석을 선택적으로 제거 하므로써 순수한 교원질 기질이 노출된다고 하였고, 비완충 형태의 산 처리제는 낮은 pH에 의해 도말층을 제거하는 반면 EDTA는 중성의 pH상태에서 상아질내 칼슘이온과칼슘착염을 형성하여 작용하기 때문에 산 처리된 표면에 비해 세포의 운동과 부착에 필수적인 교원질 섬유가 풍부하다고 하였다. Fernyhough등[3]은 EDTA가 치은이나 치주인대 섬유모세포에 대해 화학주성인자로 작용할 수 있어 섬유모세포의 이동을 촉진시킨다고 하였고, Bloml f등[19]은 재생요법에서 EDTA로 처리한 근표면은 피브린 결합에 중요하며 치주조직의 잠재적 치유에 대해 가장 적당한 상황을 제공해 준다고 하였다. 또한 EDTA에 의한 치근표면 처리의 임상응용에 대해 24% EDTA 용액이 분출되도록 고안한 초음파치석제거기와 개량 칩을 이용하여 치근활택을 시행한 결과, 물만 사용한 경우에 비해 보다 확실한 도말층의 제거 및 교원질 기질의 노출 향상을 보고하였다.

본 실험은 치주질환에 이환된 치근에서 치근면활택술만 시행한 군과 Tc - HCl 및 EDTA로 치근면 처리를 시행한 군간의 부착된 세포수를 각각 세포배양 15분, 60분, 그리고 4시간후에비교하였는데, 이는 치은섬유모세포의 초기부착이 30 - 45분이면 부착정도의 변화가 거의 없는 안정기에 도달한다고 한 Fardal등[14]의 보고를 참조하여 세포배양 시간대를 구분하였다.

또한 정확한 비교를 위하여 동일 세대의 세포를 이용하였으며 세대가 많이 지나면 세포의 특성이 달라질 수 있다는 이등[13], Murphy등[39]의 결과를 토대로 단일세포의 특성을 인정할 수 있는 5세대 세포를 이용하였다. 본 실험에 사용한 4×10^4/㎖개의 세포수는 Lowenberg등[40]이 초기 세포부착 실험에서 보고한 sub - confluent cell layer 상태로 주사전자현미경 소견에서 치근에 부착된 세포의 밀도와 이주의 정도, 그리고 세포의 표면형태 및 상태가 실험조건에 합당하다고 한 수치와 비슷하였다.

치은섬유모세포의 초기 부착과 관련하여 Fardal등[14]은 치주염에 이환된 치근을 치근활택을 시행하지 않은 부위와 치근활택을 시행한 부위, 그리고 완전히 정상인 부위에서 세포배양 60분 후의 부착된 세포수를 계측한 결과 군간에 유의성 있는 차이가 없다고 하였다. 또 치석에도 세포가 부착되며 세포의 상태가 건강한 경우 기구조작이 세포부착에 필수조건이 되지 않을 수도 있으며 질환에 이환된 기간에도 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 김등[8]도 이환치근의 표면 비처리군에서 치석 및 연조직만의 제거에 의한 세포 부착효과와 함께 세포독성의 상존가능성을 제시하였다. Lowenberg등[40]은 ^{51}Cr assay를 통해 초기 4시간 동안 탈회 치근과 비탈회 치근에 부착된 세포수 사이에 유의

성 있는 차이가 없다고 하였으나, Pitaru등[25]은 탈회된 상아질 이나 백악질이 비탈회쪽에 비해 세포부착 및 섬유대의 형성과 이주가 증가됨을 보고하면서 치은섬유모세포에 대한 화학주성 가능성을 언급하였다. 문등[31]은 Nd:YAG 레이저 조사후 치근면 처치를 하였을 때 치근면 활택술만 시행한 경우에 비하여 치근면에 대한 섬유모세포의 적합성이 증가되었다고 하였다.

본 실험에서 세포배양 시간에 따른 군간의 부착된 세포수를 비교하였을 때 세포배양 15분후에 EDTA 및 Tc - HCl로 탈회된 군에서 치근활택술만 시행한 군보다 유의성 있게 많았는데, 이는 치근면 탈회 후에 초기 치유과정에서 노출된 교원질이 결합조직의 재생에 필요한 세포의 화학주성, 이동 및 부착을 증진시킨 것으로 여겨진다[3,33,36]. 또한 세포배양 60분 후와 세포배양 4시간 후에 치근활택술만 시행한 군과 EDTA 탈회군 및 Tc - HCl 탈회군 간에 부착된 세포수 차이에 유의성은 없었다. 그 이유로는 세포 부착에 영향을 미칠 수 있는 내독소를 제거하기 위하여 초음파세척을 이용한 시편의 소독 처리후에 세포부착을 관찰하였기 때문으로 사료된다.

이환치근에 대한 치은섬유모세포의 부착양상에 관하여 이등[41]은 투과전자현미경 관찰에서 탈회된 치근 표면에는 조면내형질세망과 리보솜이 잘 발달하였으나, 비탈회된 치근 표면에는 공포를 다수 포함한 세포와 미약한 교원섬유의 형성을 보고하였다. 김등[8]은 주사전자현미경 관찰에서 탈회군에서의 세포는 길고 가느다란 세사상돌기를 많이 내면서 부착한 반면, 비탈회군에서는 세포 전체에 부정형의 유창성 결손부위가 존재했다고 보고하였다. 본 실험은 광학현미경하에서 관찰하였기 때문에 치은섬유모세포의 부착양상을 평가하기는 어려웠고 세포배양시간의 경과에 따른 세포의 형태만을 비교할 수 있었다. 세포배양 4시간 후의 치은섬유모세포는 배양 15분이나 60분에 비해 핵과 세포질의 호염기성 양상은 다소 감소하였으나, 1 2개의 뚜렸한 핵인과 세포질의 양은 더욱 풍부해졌으며 길다란 방추형의 세포형태를 보임으로써 시간이 경과할수록 세포의 극성이 증가됨을 관찰할 수 있었다.

시험관적 실험은 실험기간 동안 세균에 의한 감염을 방지하기 위해 멸균된 치근을 사용할 뿐만 아니라 철저한 무균상태의 조작이 요구되기 때문에 치주질환 유발 및 진행에 주요 원인인 치태내 세균이 치유와 신부착 과정에서 지속적으로 작용하게 되는 실제 임상 환경과는 차이가 있으며 실험결과의 해석 및 임상에의 적용에는 신중을 기해야 한다. 따라서 시험관적 실험의 결과를 토대로 생체실험을 포함한 추가적인 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주질환에 이환된 치근면에 대한 EDTA 처리가 치은섬유모세포의 초기 부착에 미치는 효과를 규명하기 위해서 중증의 치주염으로 인해 발거된 치아를 이용하여 치근활택술만 시행한 대조군, 50㎎/㎖ Tc - HCl 수용액 처리군 및 17% EDTA 처리군으로 구분하고 4×10^4/㎖ 개의 제5세대배양 치은섬유모세포를 이용한 세포부착실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포배양 15분후의 경우 EDTA 처리된 군과 Tc - HCl 처리된 군에서 대조군보다 부착된 세포수가 유의성 있게 많았다 ($p<0.05$). 그러나 EDTA 처리된 군과 Tc - HCl 처리된 군 사이에는 부착된 세포수 차이에 유의성이 없었다($p>0.1$).
2. 세포배양 60분후 및 4시간후 에서는 세 군간의 부착된 세포수 차이에 유의성이 없었다($P>0.1$).
3. EDTA 처리된 군 및 Tc - HCl 처리된 군의 경우 세포배양시간별 부착된 세포수 변화에 유의성이 없었다($p>0.1$). 그러나 대조

군의 경우 부착된 세포수가 세포배양 60분후 에서 세포배양 15분후에 비해 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$).

이상과 같은 결과는 치주질환에 이환된 치근에 대해 17% EDTA 용액을 이용한 치근면 처리가 Tc - HCl을 이용한 치근면 처리와 유사하게 치은섬유모세포의 초기 부착을 증진시킬 수 있음을 시사하였다.

Ⅵ. 참고문헌

1. 정현주. " Modification of the peri - odontally diseased root surface. "『대한치과의사협회지』***32(1)*:**26 - 32 ,1994.
2. Lowenguth, R.A. Blieden, T.M.. " Peridontal regeneration : root surface demineralization. " *Periodonto 2000* ***1*:**54 - 68, 1993.
3. Fernyhough, W. Page, R.C.. " Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on deminer - alized or fibronectin treated normal and diseased tooth roots. " *J Periodontol* **54:**133 - 140, 1983.
4. Nishimura, K. Hayashi, M. Matsuda, K. Shigeyama, Y. Yamaoka, A.. " The chemoattractive potency of peri - odontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblasts. " *J Periodont Res* ***24*:**146 - 148, 1989.
5. 이종원 · 김병옥 · 한경윤. " EDTA의 적용방법이 상아세관 개방에 미치는 영향에 관한 주사전자현미경적 연구. "『대한치주과학회지』***28(4)*:**731 - 742, 1998.
6. Bloml f, J. Lindskog, S.. " Root surface texture and early cells and tis - sue colonization after different etching modalities. " *Eur J Oral Sc* **103:**17 - 24, 1995.
7. Hideaki, H. Shinichi, T. Bjorn, K.. " The biologic concept for the use of EMDOGAIN® Ⅱ : The new concepts of the root surface conditioning and the Signaling system. " *Quintessence* **30(4):**50 - 58, 1998.
8. 김종우 · 최상묵. " 치근면 탈회 및 fibronectin 도포가 치은조섬유아세포 부착에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. "『대한치주과학회지』***18(1)*:**1 - 18, 1988.
9. Alger, F.A. Solt, C.W. Vuddhaknok, S. Miles, K.. " The histologic evaluation of new attachment in periodontally dis - eased human roots treated with tetra - cycline - hydrochloride and fibronectin. "*J Periodontol* ***61*:**447 - 455, 1990.
10. Işik, G. Ince, S. Onan, U.. " Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. " *J Clin Periodontol* **24:**589 - 594, 1997.
11. Wikesj , U.M.E. Christersson, L.A. Baker, P.J.." A biochemical approach to periodontal regeneration : tetracycline treatment conditions dentin surfaces. " *J Periodont Res* **21:**322 - 329, 1986.
12. Wikesj U.M.E. Claffey, N. Nilveus, R. Egelberg, J.." Periodontal repair in dogs : effect of root surfaces treatment with stanneous fluoride or citric acid on root resorption. " *J Periodontol* **62:**180 - 184, 1991.
13. 이 향 · 박준봉. " 치근면의 구연산 탈회가 치은섬유모세포의 부착 및 증식에 미치는 영향. "『대한치주과학회지』***18(2)*:**163 - 173, 1988.
14. Fardal, O. Aubin, J.E. Lowenberg,

B.F. Freeman, E.." Initial attachment of fibroblast - like cells to periodontally - diseased root surfaces in vitro." *J Periodontol* ***61:***529 - 535, 1990.

15. Larjava, H. Salonen, J. H kkinen, L. N rhi, T.." Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces in vitro." *J Periodontol* ***59:***95 - 99, 1988.
16. Nilveus, R. Bogle, G. Crigger, M. Egelberg, J. Selvig, K.A.." The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs(II). Healing after repeated surgery." *J Periodont Res* ***15:***550 - 554, 1980.
17. 정보미 · 정현주." 염산 Tetracycline 으로 처리된 치근면에 대한 섬유모세포의 부 착 효 과 ." 『 대 한 치 주 과 학 회 지 』 ***19(2):***108 - 115, 1989.
18. Claffey, N, Bogle, G. Bjorvant, K. Selvig, K.A. Egelberg, J.." Topical appli - cation of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles." *Acta Odontol Scand* **45:**141 - 146, 1987.

19, Bloml f, J. Bloml f, L. Lindskog, S.. " Smear removal and collagen exposure after non - surgical root planing followed by etching with EDTA gel preparation." *J Periodontol* **67:**841 - 845, 1996.

20. Bloml f, J. Bloml f, L. Lindskog, S.. " Long time etching at low pH jeopar - dizes periodontal healing." *J Clin Periodontol* **22:**464 - 468, 1995a.
21. Nishimura, K. Takada, K. Noguchi, Y. Yamaoka. A.. " In vitro Interaction between Gingival Fibroblasts and Various Root Surfaces." *J Electron Microsc* **38(1):**24 - 33, 1989.
22. Bloml f, J. Lindskog, S.. " Peri - odontal tissue - vitality after different etching modalities." *J Clin Periodontol* **22:**464 - 468, 1995b.
23. Stahl, S.. " Repair potential of the soft tissue and root interface." *J Periodontol* **48:**545 - 552, 1977b.
24. Frank, R. Fiore - Donno, G. Cimasoni, G. Matter, J.. " Ultrastructural study of epithelial and connective gingi - val reattachment in man." *J Periodontol* **45:**626 - 635, 1974.
25. Pitaru, S. Melcher, A.H.. " Organi -

zation of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: Relatioship between cells and mineralized and demineralized tissue. " *J Periodont Res* **22:**6 - 15, 1987.
26. Pitaru, S. Gray, J.E. Aubin Melcher A.H.. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts in vitro. "*J Periodont Res 19:*408 - 418, 1984.
27. Lasho, D.J. O'Leary, T.J. Kafrawy A.H.. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. "*J Periodontol* **54:**210 - 220, 1983.
28. Jones, W.A. O'Leary, T.J.. " The effectiveness of in vivo root planning in removing bacterial endotoxins. "*J Periodontol* **49:**337 - 445, 1978.
29. O'Leary, T.J. Kafrawy, A.H.. " Total cementum removal: A realistic objective? " *J Periodontol* ***54*:**221 - 226, 1983.
30. 이정호 · 이만섭." 치근활택술시 치근표면의 조도 및 주사전자현미경적 연구. "『대한치주과학회지』 ***14(1)*:**109 - 122, 1984.
31. 문혜성 · 임기정 · 김병옥 · 한경윤." Nd:YAG레이저조사후 치근의 처치방법들이 치은섬유모세포 부착에 미치는 영향에 관한 연구. "『대한치주과학회지』***26(3)***:701 - 714, 1996.
32. Coldiron, N.B. Yukna, R.A. Weir, J. Caudill, R.F.." A quantitative study of cementum removal with hand curettes. "*J Periodontol* **61:***2*93 - 299, 1990.
33. Polson, A.M. Frederick, G.T. Ladenheim, S. Hanes, P.J.. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. "*J Periodontol* **54:***2*10 - 220, 1984.
34. Garrett, J.S. Crigger, M. Egelberg, J.." Effects of citric acid on diseased root surfaces. "*J Periodont Res* **13:**155 - 163, 1978.
35. Polson, A.M. Proye, M.P.. " Fibrin linkage: A precursor for new attachment. " *J Periodontol* **54:**141 - 147, 1983.
36. Boyko, G.A. Brunette, D.M.Melcher, A.H.." Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. "*J Periodont Res* **15:***2*97 - 303, 1980.
37. Lowenberg, B.F. Aubin, J.E. Deporter, J.E. Sodek, J. Melcher, A.H.. Attachment, Migration, and Orientation of human gingival fibroblasts to collagen - coated, surface - demineralized, and untreated root slices. "*J Dent Res* ***64(9)*:**1106 - 1110, 1985
38. Klinge, B. Nilveus, R. Egelberg, J.." Bone regeneration pattern and ankylosis in experimental furcation defects in dogs. "*J Clin Periodontol* ***12*:**456 - 464, 1985.
39. Murphy, K.G. Daniel, J.C.." Human periodontal ligament in vitro : Cell culture passage effect on collagen gel contraction. "*J Periodont Res* ***22*:**342 - 347, 1987.
40. Lowenberg, B.F. Aubin, J.E.Pitaru, S. Melcher, A.H.. A new ^{51}Chromium assay for accurate measurement of cell attachment to demineralized and non - demineralized dentin in vitro. "*J Periodont Res* ***19*:**40 - 50, 1984.
41. 이상엽 · 최상묵." 정상 및 이환백악질에 대한 치은 조섬유세포의 부착에 관한 전자현미경

적 연 구 . ” 『 대 한 치 주 과 학 회 지 』
14(1):109 - 122, 1984.

- Abstract -

Effect of Root Surface Treatment Using EDTA on the Initial Attachment of Human Gingival Fibroblasts

Seong - Bong Kim, Ki - Jung Lim, Sang - Mok Kim, Byung - Ock Kim, Kyung - Yoon Han

Department of Periodontology, College of Dentistry, Chosun University

Cytotoxic substances in dental calculus and root cementum of periodontally dis - eased teeth inhibit new attachment and regeneration. The purpose of scaling and root planing is to remove pathologic struc - tures harboring these cytotoxic substances in order to create a biologically acceptable root surface. However, these procedures inevitably leave a non - biocompatible smear layer. Conventionally, the smear layer has been removed with low pH etching agents such as citric acid, phosphoric acid and tetracycline hydrochloride(TC). Lately, a supersaturated neutral pH etching solution of ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) has been found to be as effective as low pH etchants with respect to smear removal and to be superior in exposing root surface - associated collagen.

The aim of the present study was to determine the effect of root surface treat - ment using EDTA on the initial attachment of human gingival fibroblasts. 27 human

teeth, extracted due to severe periodontitis, were cut into dentin slices after root planing. The specimens were divided into TC group(treated with 50 ㎎/㎖ tetracycline-HCl, pH 1.52), EDTA group(treated with 17 % EDTA, pH 7.4), and non-treated control group.

After sterilization, 5th subcultured human gingival fibroblasts were seeded in each culture well containing a prepared root slice and incubated for 15 min., 60 min., and 4 hours in 5% CO_2 incubator at 37℃. At each incubation time, the number of attached fibroblasts were counted on the microphotographs taken at a magnification of x100. The difference of the number of attached cells between groups was statistically analyzed by the ANOVA followed by Duncan test in SPSS/PC+ programs.

The results were as follows :

1. After incubation for 15 min, the attached cells were significantly more in EDTA group and TC group than non-treated control group($p<0.05$), but there was no significance in the difference between EDTA group and TC group($p>0.1$).
2. After incubation for 60 min and 4 hours, there was no significant difference in the number of attached cells between all groups($p>0.1$).
3. In both EDTA group and TC group, there was no significant difference in the number of attached cells between different incubation($p>0.1$).
   But in control group, the number of attached cells was significantly increased after incubation for 60 min, compared with incubation for 15 min($p<0.05$).

The above results suggest that root surface treatment using EDTA could enhance the initial attachment of gingival fibroblasts to root surface as effective as tetracycline-HCl.