

백서에서 Millipore filter membrane의 임계유지기간에 대한 연구

김미숙 · 여환호 · 김수관 · 임성철*

조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 조선대학교 치과대학 구강생물학연구소,
조선대학교 의과대학 병리학교실*

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:274-279)

STUDY ON THE CRITICAL MAINTENANCE PERIOD OF MILLIPORE FILTER MEMBRANE IN RATS

Mi-Suk Kim, Hwan-Ho Yeo, Su-Gwan Kim, Sung-Chul Lim*
*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Oral Biology Research Institute,
College of Dentistry, Department of Pathology*, Medical Research Institute,
College of Medicine, Chosun University*

The purpose of this study is to evaluate the critical maintenance period of absorbable membrane for guided bone regeneration.

Fortynine Sprague-Dawley rats weighing about 300g were divided into seven groups. An 8 mm circular full-thickness defect in calvarial bone was made and then cellular acetate porous filter (Millipore filter®) was placed on the calvarial bone defect. The filter was removed at 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 11 weeks after placement. Rats were sacrificed at 12 weeks the placement of cellular acetate porous filter. The specimens were stained with Hematoxylin-Eosin and observed under light microscope. The amount of regenerated bone was measured from both margin of calvarial bone defect (unit : mm).

The results were as follows. Bone regeneration of each experimental group was increased gradually and the bond defect was almost completely filled with new bone in 5-, 6-, 8-, and 11-week experimental group. Histologic findings showed mild inflammatory response and granulation tissue formation without apparent adverse effects on the healing process. In 11-week experimental group, the bone defect was completely filled with new bone containing abundant osteoid which was oriented to the dural side and contribute to bony thickening.

We suggest that non-absorbable membrane and bioabsorbable membrane presumably should remain intact for longer than 5 weeks to be effective.

Key words : Critical maintenance period, Absorbable membrane, Guided bone regeneration

I. 서 론

선천적 또는 후천적으로 발생하는 골결손은 기능 및 심미적으로 장애가 되므로 자가골, 동종골, 또는 이종골 등을 이용하여 결손부를 재건해 주어야 한다. 자가골의 경우 이식골편의 채취를 위한 부가적인 수술의 필요성과 이식골의 흡수 등이 문제되며 동종의 경우 공급자로부터 이식 항원의 완전한 소멸을 장담할 수 없다.

Melcher¹⁾는 이러한 골결손부의 치유양상에 대하여 상실된 골

조직 고유의 구조적 그리고 기능적 성질을 갖는 조직으로 채워지는 것이 아니라 다른 조직에 의해 채워지는 치유형태를 골회복 (bone repair)이라 정의하였고, 상실된 골의 고유한 형태와 기능으로 완벽하게 치유되는 형태를 골재생 (bone regeneration)이라 정의하였다.

골결손부 치유기간 동안에 결합조직이 골결손부로 들어오는 것을 차단하여 보호된 내부에서는 원하는 세포 증식만이 일어나 골결손부가 골재생 형태로 치유되도록 하는 술식을 골유도재생술 (guided bone regeneration)이라 한다^{2,4)}. 이 개념은 Murray 등⁵⁾이 1957년 plastic fenestrated cage를 연조직의 침투를 막는 차폐막으로 이용하여 개의 대퇴골과 장골, 척추 골결손부에서 새로운 골 성장을 유도함으로써 발전하게 되었다.

조직유도재생술에 사용되는 차폐막은 초기에 1982년 Nyman 등^{6,7)}이 millipore filter을 이용하였고 최근에는 expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 차폐막을 많이 사용하고 있다^{8,12)}. 이러한 millipore filter와 ePTFE와 같은 비흡수성 차폐막이 조직재생에 성

김 미 숙
501-825, 광주광역시 동구 서석동 421
조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강생물학연구소
Mi-Suk Kim
Dept. of OMFS, Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun Univ.
421, Seosuk-dong, Dong-ku, Gwangju, 501-825, Korea
Tel: 82-62-220-3810, Fax: 82-62-224-9172
E-mail : SGCKIM@mail.chosun.ac.kr

공적이라는 것이 연구를 통해 증명되었지만, 이차적인 수술로 차폐막을 제거해야 하고 외부로 노출되어 미생물이 침투함으로써 조직유도재생이 어려워질 수 있다는 단점이 있다¹³⁾.

이러한 비흡수성 차폐막의 단점 때문에 collagen^{14,15)}, polylactic acid^{16,17)}, polyglactin^{9,10,18,19)}, glycolide과 lactin copolymer²⁰⁾ 등의 흡수성 차폐막을 이용한 조직유도재생술이 활발히 연구되어 왔으며, 그 결과 흡수성 차폐막이 조직유도재생술에서 비흡수성 차폐막을 사용했을 때와 비슷한 효과를 보였다^{21,23)}. 그러나 흡수성 차폐막을 사용하는 경우 조직재생을 위해 차폐막이 얼마 동안 흡수되지 않고 유지되어야 하는지에 대해서는 아직 결론이 나지 않았다.

이에 저자 등은 골유도재생을 위해 차폐막이 골결손부에 유지되어야 하는 기간을 밝히기 위해 비흡수성 차폐막 millipore filter[®]를 이용하여 흡수성 차폐막의 임계유지기간 (critical maintenance period)을 추정하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

A. 실험동물

체중 300g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계 백서 49마리를 각 군당 7마리씩 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 11주군으로 나누었다. 수술 후 실험동물들은 동일 조건하에서 희생될 때까지 사육하였다.

B. 실험재료

Micro Filtration System 사에서 제작된 0.45 μm pore size을 갖는 비흡수성 차폐막 millipore filter[®] (cellular acetate porous filter)를 사용하였다.

C. 실험방법

1. 마취방법

실험동물들은 Ketamin Hydrochloride (10mg/kg ketalar[®], 유한양행)와 2% Xylazine Hydrochloride (0.3mg/kg Rumpun[®], 한국 바이엘 주식회사)를 근주하여 전신마취하였다.

2. 수술방법

2% lidocaine HCL (1:10만 epinephrine)를 지혈목적으로 술부에 주사한 후 백서 두개부를 제모하고 베타딘을 이용하여 소독하였다. 두부 정중부의 피부와 골막에 2cm 가량의 절개선을 가한 후 피하로 박리하고 골막을 거상하여 두개골을 노출시켰다. 뇌경막에 손상을 주지 않도록 주의하면서 저속 드릴 round bur을 사용하여 직경 8mm 크기의 두개골 전층 골결손부를 만들었다. 결손부는 매식재로 채우지 않고 비흡수성 차폐막인 millipore filter만으로 덮은 후, 골막을 40 흡수성 봉합사로 봉합하고 피부는 3-0 silk로 단순봉합하였다.

수술후 감염방지를 위하여 Gentamicin (대성주식회사) 0.05 ml/kg를 하루 1회 술후 3일간 근육주사하였다.

Millipor filter 매식후 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 11주후 차폐막을 제거하였다.

3. 실험동물의 희생

Millipor filter 매식후 12주째 과용량의 ether를 흡입시켜 실험동물을 희생시키고, 두개골 정중부 두피를 제거하여 두개골막을 노출시켰다. Bur로 차폐막 매식시 형성된 두개부 원형 골결손부 8mm 보다 크게 조직편을 채취하였다.

4. 조직학적 관찰 및 조직형태측정학적 관찰

채취된 조직편을 통상적인 방법에 따라 10% neutral buffered formalin으로 고정한 후 nitric acid에 4시간 담궈 탈회하였다. 골결손의 정중부와 정중부 양측을 지나도록 조직을 2mm 두께로 연속 절편을 제작하여 수세후 자동 조직가공기 (Hypercenter-XP[®], Shandon)를 이용하여 파라핀 포매하였다. 파라핀 포매된 블록을 각각 4-5 μm 의 박절편으로 제작하여 Hematoxylin-Eosin 이중염색을 시행하였고, 광학 현미경하에서 실험군별 골결손부의 골재생 정도 및 양상, 염증유무 등의 치유과정을 분석하였으며, 골재생의 정도는 결손부의 정중부 박절편중 가장 전형적인 소견을 나타내는 조직편을 선택하여 양측 골결손 변연에서 중앙으로 새롭게 형성된 신생골 길이 (단위:mm)로 평가하였다.

5. 골형성 정도의 통계학적 비교

측정치들은 각 군별로 골이 재형성된 길이가 유의한 차이가 있는지 확인하기 위해 SPSSWIN (SPSS INC. Release 6.0)을 이용하여 일원 분산분석 (one way ANOVA)을 사용하였고 사후비교검정법으로는 Sheffe test을 사용하였다.

III. 실험 결과

A. 조직학적 소견 및 조직형태측정학적 소견 (Fig. 1, Table 1)

2주군 (Fig. 2A)에서는 골결손부 변연부상에서 기존의 골로부터 자라나는 새로 형성된 골이 변연부에서 명확했으나, 1.23 \pm 0.40mm로 아주 소량이었고, 나머지 결손부는 소성결합조직으로 채워져 있었으며, 3주군 (Fig. 2B)에서는 1.56 \pm 0.47mm로 2주군과 비슷하였다. 4주군 (Fig. 2C)에서는 2.82 \pm 1.55mm로 부채꼴 변연을 형성하면서 신생골이 형성되고 있었고, 5주군 (Fig. 2D)에서는 7.0 \pm 0.93mm로 4주군보다 현저하게 많은 양이 형성되었다. 6주군 (Fig. 2E)에서는 7.25 \pm 0.21mm였고 신생골은 변연골과 완전히 융합되어 있었다. 8주군 (Fig. 2F)에서는 신생골이 골결손부의 중앙에서 융합되어 있는 것을 볼 수 있었으며 그 길이는 7.75 \pm 0.50mm였고, 11주군 (Fig. 2G)에서는 골결손부가 신생골로 채워져 그 길이가 7.9 \pm 0.10mm였으며 다른 군과는 다르게 신생골 하방에 새로운 비광화골이 형성되고 있었다.

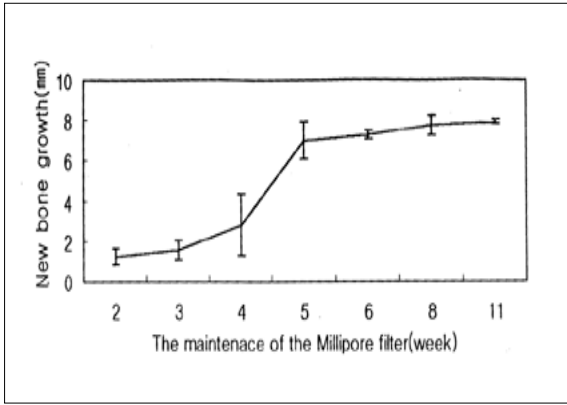


Fig. 1. Mean value of bone regeneration (unit : mm)

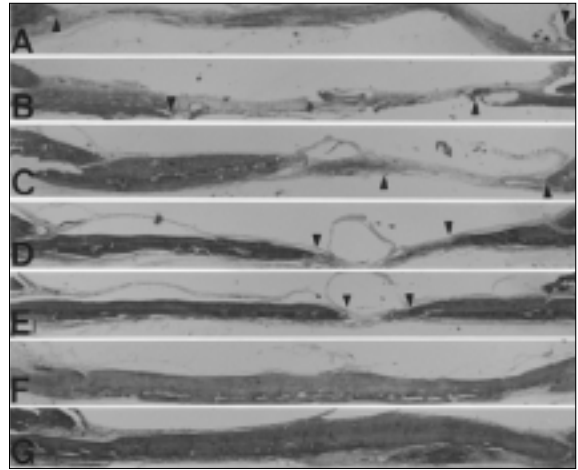


Fig. 2. Photomicrograph at 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 8-, and 11-weeks after experiment
A. 2-weeks, B. 3-week, C. 4-week, D. 5-week, E. 6-week, F. 8-week, G. 11-week.
New bone formation (arrowheads) was observed adjacent to the defect margin.

Table 1. Result of Sheffe test (unit : mm)

Weeks	2	3	4	5	6	8	11
2	-	-	-	-	-	-	-
3	1.56 ± 0.47	-	-	-	-	-	-
4	2.82 ± 1.55	-	-	-	-	-	-
5	7.00* ± 0.93	*	*	-	-	-	-
6	7.25* ± 0.21	*	*	-	-	-	-
8	7.75* ± 0.50	*	*	-	-	-	-
11	7.90* ± 0.10	*	*	-	-	-	-

(*) T < 0.05, - : T > 0.05, P < 0.001

차폐막에 대한 조직반응으로는 2주군에서 약간의 염증반응과 육아조직 형성과 3주군에서 다형핵거대세포 침윤을 볼 수 있었고, 다른 실험군들에서는 특별한 반응이 없었다.

B. 골형성 정도의 통계학적 비교 (Fig. 1, Table 1)

ANOVA test상에서 P값이 0.001이하로 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11주군 각 실험주군의 평균달간에 유의한 차이가 있었고, Sheffe test의 사후 비교검정법에 의한 실험주군 평균들의 유의한 차이분석에서는 2, 3, 4주군들과 5, 6, 8, 11주군들간에는 유의한 차이가 있었으나, 5, 6, 8, 11주군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

악안면영역의 골결손은 전신적 질환, 선천적 장애, 국소적 질환 또는 외상 등에 의해 발생되며, 이러한 골결손은 골성장을 방해하는 연조직으로 채워져 기능적, 심미적, 정신적인 장애를 야

기한다. 연조직이 골결손부로 들어오는 것을 차단하여 이에 의해 보호된 내부에서는 골형성 세포만 증식되도록 골유도 재생술^{2,3)}을 사용한다. 이 때 사용되는 차폐막의 요구조건으로는 혈병을 보호할 수 있는 단단함, 임상적으로 위치시키고 적합시킬 수 있는 신축성, 생체 적합성이 있어야 하고, 염증반응이 없어야 한다. 또한 흡수성막은 골치유를 방해하지 않으면서 일정 기간동안 유지된 후 흡수되어야 하며, 비흡수성막은 쪼개짐 없이 쉽게 제거되어야 한다^{21,24,25)}.

차폐막을 이용한 골유도재생 효과를 연구하는데 두개골 결손부를 많이 사용하게 되는데, 이 때 자연적인 골의 성장이 골결손부를 완전히 치유해서는 안되므로 큰 결손부를 만들어 자연적 골치유가 불가능하게 하여야 하며, 동물의 생존기간 중 골재생이 되지 않는 최소의 골결손을 임계치수결손 (critical size defect)이라 한다²⁶⁾.

임계치수결손은 골결손부의 위치, 실험동물의 종에 따라 다르며²⁷⁾, 백서의 두개골 결손부를 악안면영역에서 골재생을 평가하기 위한 적절한 실험 모델로써, Freeman과 Turnbull^{28,29)}은 Wistar

albino rat의 직경 2mm 결손부를, Mulliken 등³⁰⁾과 Glowacki 등³¹⁾은 28일된 Charles River rat의 직경 4mm 결손부를, Tagaki와 Urist³²⁾는 6개월된 Sprague-Dawley rat에서 직경 8mm 두개골 결손부를 임계치수결손이라 하였다. 그러므로 본 연구에서는 300g 내외의 Sprague-Dawley rat의 두개골 전층에 8mm 골결손부를 형성하여 실험하였다.

형성된 두개골 결손부에서 비흡수성막을 이용한 골유도재생술은 많은 연구들에 의해 효과가 증명되었지만³³⁾, 이차적 수술로 제거되어야 하는 점과 차폐막이 노출되어 미생물의 침투에 의해 조직재생이 어렵게 되는 단점 때문에 근래에는 흡수성 차폐막에 대한 연구가 많이 시행되고 있다^{34,35)}.

이러한 흡수성 차폐막과 비흡수성 차폐막의 비교 연구들에서 Hurzeler 등³⁶⁾은 원숭이의 하악 절치부에 형성된 골결손 부위에 glycolide과 lactide polymer을 위치시킨 후 5개월 뒤 조직학적 검사결과 흡수성막은 치유에 아무런 영향없이 완전히 흡수되었고 치주조직재생을 촉진한다는 것을 증명하였으며, Vergara 등³⁷⁾은 개에서 인위적으로 형성된 협측 치주골 결손부에 glycolide과 lactide polymer와 ePTFE를 3-49일간 유지시킨 치주조직유도재생술 시 두가지 모두 유사한 조직재생반응을 보였고, 혈관반응에 대한 비교에서는 흡수성막에서 치은 판막과 재형성되는 혈관들 사이 재문합이 빠르지만 49일후에는 두가지 차폐막 모두에서 혈관 재문합 반응이 유사하다고 보고하였다.

본 실험에서 사용한 millipore filter는 2주군에서 약간의 염증반응과 육아조직 형성 및 적혈구의 침윤을 보였다. 3주군에서는 일부 차폐막에 대한 반응으로 여겨지는 다형핵거대세포 침윤과 소량의 염증반응을 보였을 뿐 다른 군들에서는 특이 반응없이 골유도재생을 촉진하여, 5주군부터는 골결손부의 대부분이 신생골로 채워지고 있었다.

흡수성 차폐막이 비흡수성 차폐막과 마찬가지로 조직유도재생에 효과적이라는 것이 증명되고 있지만, 흡수성 차폐막이 조직유도재생을 위해 어느 일정기간 동안 신체내에서 흡수되지 않고 유지되어야 하는지에 대해서는 아직 결론이 나지 않았다. 흡수성 차폐막에 대한 흡수정도에 대하여 Brunel 등¹⁴⁾은 콜라젠막의 교차연결 정도에 따른 효과를 비교하는 연구에서 콜라젠막의 흡수속도는 교차연결이 많을수록 흡수속도가 느리고 골재생량은 많다고 보고하였고, Pfeifer 등³⁸⁾은 개의 치주골 결손부의 치주조직 유도재생술에서 교차연결이 없는 콜라젠막은 3주경에 완전히 흡수되기 때문에 조직유도재생에 효과가 없는 반면 교차연결된 콜라젠막은 조직재생을 촉진하고 8주경에 흡수되었고 차폐막이 6주전에 흡수되지 않아야 하는 것이 중요하다고 발표하였으며, Blumenthal³⁹⁾은 인위적으로 형성된 개의 치주골 결손부에서 콜라젠막을 사용했을 때 차폐막은 6-8주경에 흡수되었고, 8주와 12주 사이의 조직계측학적 차이는 없었다고 보고하였다.

반면에 poly-lactic acid는 3-4개월내 흡수되도록 설계되었으나, Magnusson 등⁴⁰⁾은 외과적으로 형성한 협측 치은이개에 대한 개 실험에서 poly-lactic acid를 위치시킨 후 2개월내 성공적인 결과를 얻어 1-2개월간의 유지기간이면 충분하므로 균일하고 비교적 적은 분자량을 갖거나 얇은 차폐막을 사용하고서도 치주조직유도

재생을 얻을 수 있다고 하였다.

Simion 등²⁰⁾은 임프란트 매식시 발생한 골결손부를 치료하기 위하여 PLA/PGA (polylactic acid/ polyglycolic acid)을 이용한 골유도재생에서 이 차폐막은 4-6주경부터 흡수되기 시작하여 8개월 후에는 완전히 흡수되었다고 보고하였다. Fleisher 등¹⁸⁾은 백서 두개골 결손부의 골재생을 위해 77일 동안, 그리고 Naaman 등¹⁹⁾은 임프란트 매식시 발생한 골결손부 치료를 위해 28일 동안 polyglactin 910 mesh를 위치시켰을 때 차폐막이 1-2달내 흡수되었다고 보고하였다.

본 연구에서는 실험군을 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11주군으로 나누어, 이 기간을 흡수성 차폐막의 유지기간으로 가정하였으며, 5주군부터는 두개골 골결손부의 대부분이 신생골로 채워져 흡수성막은 최소한 약 5주 정도는 유지되어야 하는 것으로 사료되며, 11주군에서는 골결손부를 채우는 신생골들의 두께는 약간 얇은 반면 뇌경막쪽으로 새로운 골들이 형성되는 조직학적 소견을 보여 일단 얇은 골재생 완료 후 두께의 보강이 뒤따르는 것으로 사료된다.

흡수성 차폐막의 조직내 치유반응 및 흡수에 영향을 미치는 것으로는 조직내에 위치한 차폐막의 화학적 구성, 차폐막의 물리적인 표면 특징, 조직내에 위치한 막의 깊이와 위치, 소독 및 저장 방법, 가수분해 방법, 차폐막의 다공도 등이 있으며, 치유기간 동안 공간유지능력을 가져야 하고 흡수성 차폐막이 조직내에서 흡수분해되면서 조직재생을 방해해서는 안된다^{41,42)}.

본 연구에서 사용한 millipore filter는 ethylene oxide gas로 소독하였으며, 치유기간 동안 조직학적으로 약간의 염증반응과 육아조직 형성외에는 특별한 반응을 유도하지 않았다.

차폐막의 유지기간에 따른 조직유도재생 효과에 대해 Lekholm 등⁴³⁾이 연구한 개 실험에서는 차폐막을 일찍 제거하면 골재생량이 감소되고, 치주조직유도재생과 골조직유도재생을 위한 차폐막 유지기간 사이에는 약간의 차이가 있어서 치주조직유도재생을 위한 임계기간은 3-4주인 반면 골유도재생에서는 더 긴 기간이 골결손부를 완전히 치유하는데 필요하다고 하였다.

본 실험에서는 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주군에서 재형성된 골의 두께는 서로 거의 비슷하였으나, 11주군에서는 골결손부를 채우는 재형성된 골의 두께는 다른 군보다 약간 얇은 반면 뇌경막 쪽으로 새로운 골들이 형성되었다. 이러한 차이는 차폐막의 유지기간과 제거후 치유기간의 길이에 따른 차이로 사료되며 차폐막 제거후 치유기간에 따라 형성된 골두께 정도에 대한 연구가 필요하다.

V. 결 론

흡수성막의 임계유지기간을 추정하기 위하여 본 연구에서는 300g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계 백서 두개골에 8mm 전층골 결손을 만들어 비흡수성막인 Millipore filter[®]로 덮은후 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11주뒤에 Millipore filter[®]를 제거하였고, 12주째 백서를 희생시켰다.

채취된 표본을 Hematoxylin-Eosin 이중염색을 실시한 후 광학현미경으로 골재생 정도를 관찰하고 조직학적 및 조직형태계측

학적 연구를 통하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 각 군당 골형성 정도는 실험군에 따라 증가되었으며, 5주군부터는 골결손부의 대부분이 신생골로 채워졌다.
2. 치유기간 동안 조직학적 소견상 약간의 염증반응과 육아조직 형성외에는 특이한 소견이 없어 차폐막이 골조직 치유과정에 영향을 주지 않았다.
3. 11주군에서는 다른군들과는 다르게 골결손부 전체에 새로 재생된 성숙골 하방 뇌경막 쪽으로 새로운 비광화골이 형성되는 소견이 관찰되었다.

이상의 소견으로 골결손부 대부분이 새로운 골로 채워지기 위해서는 흡수성막의 최소 유지기간은 5주 이상이 되어야 할 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Melcher AH: Role of the periosteum in repair of wounds of parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol* 1969;14:1101-1109.
2. Bosch C, Melsen B, Vargervik K: Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *J Cleft Palate-Craniofac* 1995;32:311-317.
3. Dahlin C, Lindhe J, Gottlow J, Nyman S: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *J Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-676.
4. Quinones CR, Caffesse RG: Current status of guided periodontal tissue regeneration. *Periodontol* 2000 1995;9:55-68.
5. Murray G, Holden R, Roschau W: Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* 1957;95:385-387.
6. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982;9:257-265.
7. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290-296.
8. Caton J, Wagener C, Polson A, Nyman S, Franz B, Bouwsma O, Blieden T: Guided tissue regeneration in interproximal defects in the monkeys. *Int J Periodont Restorative Dent* 1992;12:266-277.
9. Cortellini P, Pini Prato GP, Tonetti MS: Periodontal regeneration of human I infrabony defects I clinical measure. *J Periodontol* 1993;64:254-260.
10. Cortellini P, Pini Prato GP, Tonetti MS: Periodontal regeneration of human infrabony defects II reentry procedures and bone measures. *J Periodontol* 1993;64:261-268.
11. Cortellini P, Bowers G: Periodontal regeneration of infrabony defects : An evidence-based treatment approach. *Int J Periodont Restorative Dent* 1995;15:129-145.
12. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. case report. *J Clin Periodontol* 1986;13:604-616.
13. Miller N, Penuad J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M: Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol* 1996;23:1051-1059.
14. Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Marin P, Zahedi S: Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique : influence of collagen cross-linking. *J Periodontol* 1996;67:1342-1348.
15. 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.
16. Waterman CA: Guided tissue regeneration using a bioabsorbable membrane in the treatment of human buccal recession. A re-entry study. *J Periodontol* 1997;68:982-989.
17. Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B: Guided

- bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers : an experimental pilot study in the rabbit. *J Cranio-Maxillo-Fac Surg* 1992;20:257-260.
18. Fleisher N, Waal HD, Bloom A: Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910). *Int J Periodont Restorative Dent* 1988;8:45-54.
19. Naaman NB, Ouhayoun JP: Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: histologic evaluation in rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:115-120.
20. Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A: Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:735-742.
21. McGinnis M, Larsen P, Miloro M, Beck FM: Comparison of resorbable and nonabsorbable guided bone regeneration materials : A preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:30-35.
22. Zitzmann NU, Naef R, Scharer P: Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:844-852.
23. Weltman R, Trejo PM, Morrison E, Caffesse R: Assessment of guided tissue regeneration procedures in intrabony defects with bioabsorbable and non-resorbable barriers. *J Periodontol* 1997;68:582-590.
24. Caffesse RG, Mot LF, Quinones CR, Morrison EC: Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1997;24:747-752.
25. Busch O, Solheim E, Bang G, Tornes K: Guided tissue regeneration and local delivery of insulin growth factor I by bioresorbable polyorthoester membranes in rat calvarial defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:498-505.
26. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defects as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 1986; 205:299-308.
27. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD: Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat* 1990;138:185-192.
28. Freeman E, Turnbull RS: The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont Res* 1973;8:229-236.
29. Turnbull RS, Freeman E: Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J Periodont Res* 1973;9:39-43.
30. Mulliken JB, Glowacki J: Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 1980;65:553-560.
31. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int* 1981;33:71-76.
32. Takagi K, Urist MR: The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982;196:100-109.
33. Dahlin C, Alberius P, Linde A: Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg* 1991;74:487-491.
34. Solheim E, Pinholt E, Bang G, Sudmann E: Regeneration of calvarial defects by a composite of bioresorbable polyorthoester and demineralized bone in rats. *J Neurosurg* 1992;76:275-279.
35. Pajarola GF, Sailer HF, Haers PE, Meyenberg K: Guided bone regeneration around titanium screw implants using resorbable membrane. *Oral Maxillofac Surg Clinics North Am* 1994;6:699-706.
36. Hurzeler MB, Quinones CR, Caffesse RG, Schupbach P, Morrison EC: Guided periodontal tissue regeneration in interproximal intrabony defects following treatment with a synthetic bioabsorbable barrier. *J Periodontol* 1997;68:489-497.
37. Vergara JA, Quinones CR, Nasjleti CE, Caffesse RG: Vascular response to guided tissue regeneration procedures using nonresorbable and bioabsorbable membranes in dogs. *J Periodontol* 1997;68:217-224.
38. Pfeifer J, Van Swol RL, Ellinger R: Epithelial exclusion and tissue regeneration using a collagen membrane barrier in chronic periodontal defects. A histologic study. *Int J Periodont Restorative Dent*

- 1989;9:263-274.
39. Blumenthal NM: The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodontol* 1988;59:830-836.
 40. Magnusson I, Batich C, Collins BR: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J Periodontol* 1988;57:1-7.
 41. Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake H: A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1996;11:667-678.
 42. Galgut P, Pitrola R, Waite I, Doyle C, Smith R: Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol* 1991;18:581-586.
 43. Lekholm U, Gecker W, Dahlin C, Becker B: The role of early versus late removal of GTAM membranes on bone formation at oral implants into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *J Clin Implants Res* 1993;4:121-129.