


골유도재생을 위한 젤란검과 글리콜 키토산 조성 흡수성 차폐막의 평가

장진운[#] · 김 진^{*#} · 국민석^{**} · 이기영^{***†} 

전남대학교 신화학소재공학과, *헬스케어의공학연구소, **전남대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실,
***전남대학교 화학공학부 & ㈜바이오코스모스

(2018년 4월 24일 접수, 2018년 5월 22일 수정, 2018년 5월 23일 채택)

Evaluation of Gellan Gum/Glycol Chitosan Bioabsorbable Membrane for Guided Bone Regeneration

Jin-Woon Jang[#], Jin Kim^{*#}, Min-Suk Kook^{**}, and Ki-Young Lee^{***†} 

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

*Research Center for Healthcare-Biomedical Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

**Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Chonnam National University School of Dentistry, Gwangju 61186, Korea

***School of Chemical Engineering and Bocosmos Co., Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received April 24, 2018; Revised May 22, 2018; Accepted May 23, 2018)

초록: 골유도재생을 위해 젤란검(GEL)과 글리콜 키토산(GC) 조성막을 완충생리식염수(PBS)로 가교시켜 흡수성 차폐막(GBR)을 제조하였다. GEL/GC 조성막의 특성 분석을 위해 푸리에 변환 적외선 분광학, 분해도, 점착각, 인장강도, 세포생존율을 평가하였다. 결과적으로 GEL 조성막에 GC의 함량이 증가할수록 막의 분해율 및 물리적 특성이 감소하였다. 랫 두개골에 결손부를 형성하여 흡수성 차폐막을 고정시켜 마이크로 CT, 조직학적 평가를 통해 신생골을 관찰하였다. 신생골 재생의 양은 GEL/GC 군이 대조군보다 유의하게 더 컸다. GEL/GC 흡수성 차폐막은 연조직을 차단하고 새로운 골형성에 효과가 있는 것을 확인하였다.

Abstract: Bioabsorbable membrane was prepared using gellan gum (GEL)-glycol chitosan (GC) with phosphate-buffered saline (PBS) as a crosslinker for guided bone regeneration (GBR). The GEL/GC membrane was characterized by Fourier transform infrared (FTIR), degradation, contact angle, tensile strength and cell viability. The result showed that by increasing the GC content in GEL membrane, the degradable and mechanical properties were decreased. New bone was observed through micro-CT and histological evaluation of forming a defect in rat calvarial and fixing the membrane. The amount of newbone regeneration was significantly greater in GEL/GC group than the control. The GEL/GC membrane blocked the soft tissue and has effects on the new bone formation.

Keywords: gellan gum, glycol chitosan, membrane, guided bone regeneration.

서 론

골유도재생(guided bone regeneration, GBR)을 위한 차폐막은 뼈 결손 부위로부터 연조직의 침투를 효과적으로 차단하기 위해 사용된다. 일반적으로 골의 치유 및 신생골 형성의 주요 장애는 결합 조직의 침투에 있다.¹ 조직의 재생속도는 각기 다르며, 일반적으로 단단한 골조직의 재생 속도는 연조직보다 느리다. GBR은 특정 부위의 골 조직만을 위한 재

생 방법으로, 골 결손부위와 인접한 결합 조직에 차폐막을 사용하여 분리시켜 새로운 골조직 축진을 목적으로 한다.² 차폐막은 크게 비흡수성과 흡수성으로 나뉠 수 있다. 비흡수성 차폐막은 생체 내에서 흡수가 되지 않아 제거 수술 전까지 생체 내에서 세포가 증식되는데 필요한 기간 확보가 용이한 장점을 가진다. 그러나 일정기간 경과 후 2차 수술을 통해 비흡수성 차폐막을 제거해야 하며 막이 초기에 노출되었을 경우 조직 감염과 골손실을 초래한다. 흡수성 차폐막은 생분해 물질로 시간이 지남에 따라 체내에 흡수가 이루어진다. 막 제거를 위한 재수술이 필요 없어 생체 내 조직과 세포 친화성 및 생체 적합성을 가진다.³ 흡수성 차폐막 소재로 고원질, polylactic acid(PLA), polyglycolic acid(PGA) 등이 있으며 체

[#]These authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

kilee@jnu.ac.kr, ORCID[®] 0000-0001-9169-2660

©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

내에서 가수분해되어 흡수되고 염증반응을 유발하지 않고 조직친화성과 이물반응으로 거대세포가 관찰되지 않아야 한다. 하지만, 기존 대부분의 흡수성막은 물리적 강도가 낮고 빠른 분해성과 흡수율로 이물반응이 신생조직의 형성 및 성숙에 방해가 된다는 보고가 있다.^{4,5} 이를 위해 차폐막 흡수의 최적 시기와 차폐막 구조의 분해에 대한 연구가 필요하다. 흡수성 고분자의 분해성 및 흡수율을 조절하기 위해 고분자 물질을 혼합한 차폐막의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 이상적인 흡수성 고분자 조성 차폐막은 생분해성, 생체 적합성, 공간 유지력, 세포 폐쇄능, 조작성 용이해야 한다.⁶ 흡수성 소재로 다당류 고분자인 젤라틴, 알길산, 하이알루론산, 키토산 등이 의료용으로 폭넓게 사용되고 있다.⁷ 골재생 수술 시 많이 사용되고 있는 시판용 차폐막으로 교원질 조성에 Geistlich Bio-gide와 lyoplant는 조직 친화성이 우수하고 생체 내에서 완전히 분해 후 흡수되지만, 물성 조절이 어렵고 새로운 골조직이 생성되기 전에 분해가 일어나 제 역할을 못하는 문제점이 있다. 효과적인 골재생을 위해 골이식재를 이식 후 차폐막으로 덮어줌으로써 부작용 없이 안정적으로 성장하고 연조직 유입을 차단하기 위한 막이 필요하다.⁸ 천연 고분자 젤란검(gellan gum, GEL)은 내열성, 내효소성이 우수하며, 골아세포 성장에 혁신적인 소재로 조직공학적으로 다양한 분야에서 응용되고 있다.⁹ 글루콘산, 람노오스, 포도당으로 구성된 복합 다당류로, 엘로테아속 수초로부터 분리된 미생물을 순수 배양 발효시켜 얻은 고분자이다.¹⁰ 산과 열에 우수하고 pH나 이온 첨가를 통한 물성조절이 가능하고 미국식품의약안전청(FDA)의 허가를 받아 임상에 직접 응용되고 있다. GEL은 생체적합성과 물리화학적 특성이 뛰어나며 제조 과정이 쉬워 필름, 하이드로젤, 마이크로캡슐 및 스폰지 등 다양한 형태로 사용이 가능하다.¹¹ GEL과 더불어 사용된 글리콜 키토산(glycol chitosan, GC)은 에틸렌 글리콜 그룹을 갖는 키토산 유도체이며 수용성 천연고분자로 생체적합성과 생분해성이 뛰어나 생체재료로 많은 연구가 되어 왔다.¹² 키토산은 키토닌으로부터 아세틸기(acetyl group)를 제외하여 추출 및 정제 과정을 거쳐 얻어진 것으로 D-글루코사민과 N-아세틸글루코사민으로 이루어진 선형 다당류이다. GEL과 키토산 조성은 생체재료로 약물 담지체 및 스캐폴더와 같은 의료용에 다양하게 활용되고 있다.^{13,14} 본 연구에서는 GEL과 GC를 다양한 조성비로 차폐막을 제조하고 고분자의 특성을 관찰하였다. 또한 *in vivo* 연구를 통해 손상된 골조직 부위에 골이식재를 식립한 후 GEL/GC 조성 차폐막의 골재생능을 관찰하여 의료용 조직재생막으로 사용 가능성을 확인하고자 한다.

실 험

시약 및 재료. 젤란검(GEL; Gelzan™, Mw=1000 KDa)은 Sigma Aldrich(USA), 글리콜 키토산(GC; Mw=250 KDa)은

Wako(Japan)에서 구입하였다. PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)는 Gibco-Invitrogen(Schweiz)에서 구입하였고, 이외의 모든 시약은 정제과정 없이 사용되었으며, 3차 증류수를 사용하였다. 양성 대조군은 소 유래 collagen 조성인 lyoplant (B.Braun Co., Germany)를 사용하였다.

GEL/GC 차폐막 제조. 전체 농도 1%로 고정시켜 각각의 조성비 GEL/GC(1.0:0, 0.9:0.1, 0.7:0.3, 0.5:0.5, 0.3:0.7)로 차폐막을 제조하였다. 일정한 비율의 GEL과 GC를 3차 증류수로 90 °C, 200 rpm 조건에서 맑고 투명한 용액이 될 때까지 용해시키고, petri dish에 casting한 후 50 °C의 열 건조기에서 24시간 건조시켰다. 건조 후 필름 형태의 막에 PBS(×1) 10 mL에 6시간 처리하여 가교시킨 후, 3차 증류수로 세번 세척한 후 실험에 사용하였다.

FTIR 분석. 화학적 구조를 알아보기 위해 GEL, GC, GEL/GC 조성 차폐막을 적외선 분광분석기(8201PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분석하였다. KBr을 혼합하여 펠릿을 제조하고 감압 건조를 통해 수분을 제거한 후 4000~650 cm⁻¹ 영역에서 측정하였다.¹⁵

분해도 평가. GEL/GC 조성 차폐막의 분해도를 버퍼에 침지시켜 37 °C, 40 rpm 조건하에서 측정하였다. 무게를 측정하기 전 whatman filterpaper를 사용하여 막 표면에 묻어 있는 수분을 제거하였다.¹⁶ 시간에 따른 무게 변화를 계산하여 분해율을 구하였다.

$$\text{Degradation rate (\%)} = \frac{W}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

W = 나중 차폐막의 무게, W₀ = 처음 차폐막의 무게

인장강도 측정. 조성이 다른 차폐막의 인장강도를 측정하기 위해 시편을 제작한 뒤, 만능시험기(TO-102D, Testone, Korea)를 사용하였다. Cross-head 속도는 10 mm/min이고, 시편당 3번씩 측정하여 평균값과 편차를 구하였다.

접촉각 측정. 제조한 GEL/GC 조성 차폐막의 친수성을 알아보기 위해 접촉각을 측정하였다. 평평한 면에 차폐막을 위치시키고 증류수를 떨어뜨려 5분 후에 물방울과 차폐막이 이루는 각도를 측정하였다. 접촉각 측정기(Phoenix-Smart, Surface Electro Optics, Korea)를 사용하여 각 3번씩 측정하여 평균값을 구하였다.

세포생존율 평가. 10% FBS와 1% Penicillin이 함유된 DMEM 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에 fibroblast 세포를 배양하였고, 2~3일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. MTT assay 분석을 통해 세포의 생존율을 평가하였다. GEL/GC 조성 차폐막 5 mm×5 mm의 정사각형 크기로 잘라 멸균상태의 양면테이프를 이용하여 24 well plate에 부착하였다. 그 위에 세포를 분주하여 24시간 배양 후, 세포가 배양된 배지에 MTT(3-[4,5-dimethyl-1thiazol-2-yl]-2,5dipheyltera-

zolium bromide) (MTT assay reagent) 용액을 처리하여 37 °C에서 4시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 20분 반응시킨 후, 효소면역판독기(ELISA reader, EL 340 Biokinetics Reader, Bio-Tek Instrument, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 세 번씩 수행하여 세포생존율을 계산하였다.

동물실험. 체중 300~350 g의 Sprague-Dowley 백서 8주령 수컷 18 마리를 오리엔트 바이오(Orient Bio Co., Ltd., Korea)에서 공급받아 1주일간 적응기간을 거쳐 실험을 진행하였다. 사육실의 실내온도는 21±2 °C와 상대습도 55±5%로 유지하였고, 전남대학교 수의대학 사육실에서 관리하였다. 모든 동물실험은 전남대학교 동물실험 윤리위원회의 사전 승인 이후, 표준작업지침을 준수하며 진행하였다(승인번호: CNU IACUC-YB-R-2017-08). 백서를 고정시킨 후 Zoletil 50 (Tiletamine/zolazepam, Virbac, France)과 Rompun(xylazine, Bayer Korea, Korea)을 혼합하여 체중 100 g당 100 µL의 용량으로 대퇴근 부위에 근육 주사하여 마취하였다. 백서의 실험부위인 두부에서 원활한 실험진행과 시야확보를 위해 전기면도기를 이용하여 제모하고, 지혈과 고통경감을 위해 1: 100000 에피네프린이 함유된 2% lidocaine으로 국소마취하였다.

두개골의 봉합선을 따라 정중부에 3 cm 가량 절개를 하고 골막기자를 이용하여 골막을 거상하여 두개골을 노출시켰다. 5 mm 직경의 trephine bur를 이용하여 두개골 중앙에 원형 결손부를 형성하였다. 차폐막의 종류 및 사용 여부에 따라 실험군을 나누었고, 모든 실험군에는 골이식재로 이종골(Bio-Oss®, Geistlich, North America)을 이식하였다. 실험에 사용된 이종골은 소 뼈에서 추출한 무기 천연 뼈 재료로 사람의 뼈와 유사한 구조이며 안정적인 골형성에 도움을 준다.¹⁷

음성대조군은 차폐막을 처리하지 않았고 이종골만 골결손부에 채워 넣고 봉합하였다. 양성대조군은 콜라겐 멤브레인(lyoplant)을 처리하였고, 실험군은 GEL/GC(0.7:0.3) 조성 차폐막을 각각 고정시켰다. 흡수성 봉합사(4-0 Vicryl, Johnson & Johnson Medical GmbH, Germany)를 이용하여 골막을 봉합하고, 비흡수성 봉합사(4-0 Blue nylon, Alee, Korea)를 이용하여 피부를 봉합하였다.

마이크로 CT 분석. 실험 직후 4주, 8주 경과 후 실험동물의 두개골 3D Image 분석을 위해 한국기초과학지원연구원(Korea Basic Science Institute, Gwangju Center, Korea)에 배치된 마이크로 CT(Quantum GX, PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA)로 관전압 90 kV, 관전류 88 µA 조건하에 촬영하였다. 실험동물은 2 L/min 산소 주입하에 2% iso-flurane으로 마취하였다. Quantum GX 내의 기존 소프트웨어인 3D Viewer를 이용하여 CT 사진은 시각화되었다.

마이크로 CT 이미지 처리. 새로운 뼈의 정량 분석을 위해 다음과 같은 절차를 수행하였다. 이미지의 흔들림을 줄이고 3차원 이미지의 선명도를 향상시키기 위해 Analyze software

12.0(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)을 사용하였고 ROI모듈은 각 골 결손 주위의 새로운 뼈의 부피를 계산하는데 사용하였다.

조직학적 평가. 실험 4주, 8주 경과 후 실험동물을 ether 마취로 희생시켜 두개골을 채취하였다. 생리 식염수로 세척하고 10% 포르말린에 고정하고, 10% nitric acid로 탈회시킨 후, 탈수 및 파라핀 포매를 하였다. 5 µm 두께로 조직 절편을 만들고 H&E(Hematoxylin and Eosin)염색한 후 광학 현미경(Olympus Microscope CX21, Olympus Co., Japan)으로 조직을 관찰하였다.

결과 및 토론

차폐막 형태. GEL/GC(0.7:0.3) 조성 용액을 열 건조시킨 막(Figure 1(a))과 열 건조 후 PBS로 가교시킨 막(Figure 1(b))의 형태이다. PBS 처리전 막의 경우 0.01~0.015 mm 두께로 얇고 쉽게 찢어졌으며 PBS로 처리한 막은 0.03~0.035 mm 두께의 막이 제조되었다. GEL의 글루콘산의 음이온 결합부위에 GC의 아민그룹과 PBS 내의 양이온이 결합되어 망상구조가 형성되고 막의 두께에 영향을 주는 것으로 판단된다. 기존 교원질 조성(lyoplant)에 골재생 차폐막의 경우 불투명한 형태(Figure 1(c), (d))로 골 결손부에 분말 형태의 골이식재가 분산 및 유출되는 것을 관찰할 수 없었지만 GEL/GC 조성막의 경우 투명한 형태의 막으로 분말형태에 골이식재의

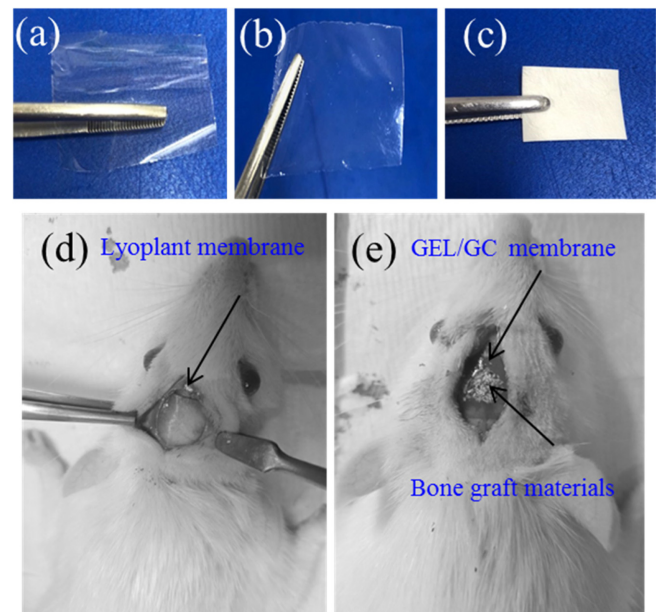


Figure 1. Photographs of noncross-linked (a); cross-linked (b) GEL/GC(0.7:0.3) membrane by PBS; the lyoplant collagen membrane (c). The animal experiment surgery process (d, e). Implanting of the membrane and complete coverage of the defects.

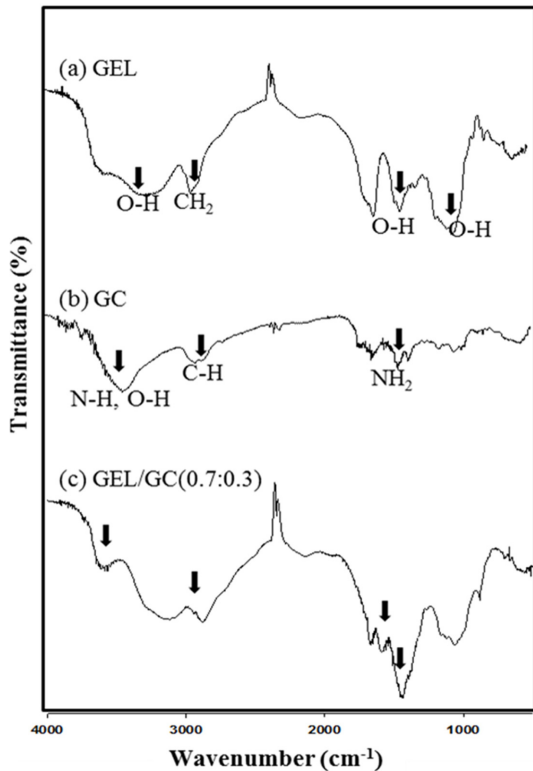


Figure 2. FTIR spectra of GEL (a); GC (b); GEL/GC(0.7:0.3); (c) membrane.

존재 여부를 쉽게 관찰할 수 있었다(Figure 1(e)).

IR 분석. GEL의 주요 피크인 O-H(3200~3600 cm⁻¹), -CH₂ (2900 cm⁻¹) 에스테르기(ester groups)의 C=O는 1550~1650 cm⁻¹ 및 C-O의 1000~1100 cm⁻¹의 특징적 피크를 관찰할 수 있었다. GC의 분자구조 경우 O-H와 N-H의 진동은 3400 cm⁻¹에서 넓게 분포되어 있으며 아민기(amine)의 NH₂(1596 cm⁻¹) 피크를 확인할 수 있었다. PBS의 양성전자 Ca⁺, Mg⁺에 의해 가교 결합된 GEL/GC 조성막은 키토산의 NH₂와 NH로 인해 1516 cm⁻¹에서 강한 결합 밴드를 확인하였다. 또한 1632 및 1560 cm⁻¹에서의 변화에 의해 대부분의 GEL에 증가된 양성화(protonation)로 확인할 수 있다(Figure 2). PBS로 가교시킨 GEL/GC의 막은 정전기적(electrostatic) 및 이온 상호 작용(ionic interactions)에 의해 막이 형성된 것을 확인할 수 있었다.¹⁸

분해도 평가. GEL/GC(1.0:0, 0.9:0.1, 0.7:0.3, 0.5:0.5, 0.3:0.7) 조성 막의 분해도를 나타내었다(Figure 3). 대조군으로 선정된 교원질 조성의 lyoplant의 경우 30일 내에 100% 분해되는 것을 관찰하였다. GEL이 농도의 함유량에 따라 분해율의 차이를 확인하였다. GEL 1.0% 조성막은 50일이 지난 후 전체 질량의 67.3% 가량 남았고, GEL/GC(0.9:0.1) 조성막은 63.5% 정도로 큰 차이를 보이지 않았다. GEL/GC의 비율이 0.7:0.3, 0.5:0.5 조성막은 50일 동안에 각각 48.8%,

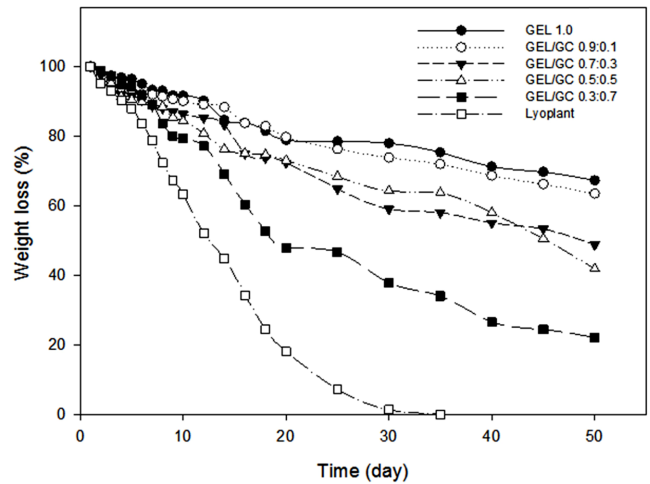


Figure 3. Weight loss of GEL/GC membrane and lyoplant membrane during the soaking time (*n* = 3).

41.8%로 전체 질량의 50% 이상 분해되었다. 가장 적은 양의 GEL이 함유된 막은 80% 가까이 분해가 되었다. GEL의 함량이 높을수록 고분자 사슬 사이에 PBS로 인한 화학적 가교로 가교 밀도가 높아 고분자 사슬의 mobility가 감소되어 수분의 침투 및 분해 작용이 영향을 받는 것으로 판단된다.¹⁹

인장강도 측정. GEL/GC의 다양한 비율로 제조한 막을 열 건조 후 인장강도를 측정된 결과이다(Figure 4). 상대적으로 GEL의 비율이 높을수록 높은 인장강도 값을 보였으며, GEL 1% 조성막은 3.20±0.32 MPa로 가장 높았다. GEL/GC 0.9:0.1 조성막과 0.7:0.3 조성막의 경우 0.7:0.3 조성막이 0.05 MPa 값이 높은 것을 확인하였다. 이는 GEL의 carboxyl group과 GC의 amine group이 0.7:0.3의 조성에서 안정적으로 가교결합되어 물리적 강도가 향상된 것으로 사료된다. GEL과 GC

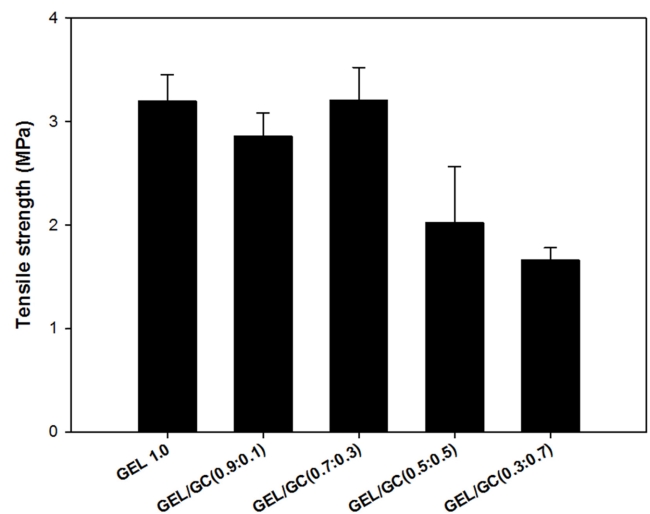


Figure 4. Comparative graph of mechanical strength of GEL and GEL/GC membranes by UTM (*n* = 3).

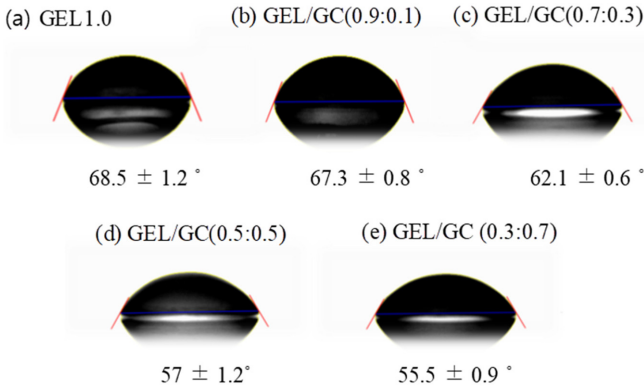


Figure 5. Contact angle images GEL/GC membranes (n = 3).

의 각각의 농도 및 혼합비에 따라 물성을 조절할수 있을 것으로 사료된다. 이 후 GC의 비율이 높아질수록 인장강도 값이 감소하였다. 이는 수산기를 함유한 GC는 수소 결합의 형성을 촉진시켜 GEL-GEL의 고분자 사슬이 수소 결합으로 대체됨으로써 분자간 힘을 감소시켰기 때문이다.²⁰ 두 고분자 물질의 적절한 비율로 혼합하여 차폐막 제조 시, 우수한 물리적 특성을 보여 줄 수 있다. 흡수성 고분자인 PLGA 조성 차폐막의 인장강도는 약 6 MPa 정도이며 치과용 멤브레인으로 사용되고 있다.²¹ 차폐막의 사용 목적에 따라 GEL 조성을 달리하여 의료분야에 다양하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

접촉각 측정. GEL/GC 차폐막 표면에 접촉각을 측정한 결과이다(Figure 5). GEL 1% 조성차폐막이 가장 높은 접촉각을 보였고 GEL 비율이 낮아질수록 접촉각이 감소하는 경향을 보였다. GEL에 처리한 PBS 내에 양이온은 막 형성에 영향을 주며 특히 고농도의 GEL 막의 가교 결합은 내부구조와 물성간에 큰 영향을 준다. GEL 조성막이 PBS 처리 후 고분자 사슬간의 가교가 치밀하여 물에 대한 친화도가 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 GC가 함유된 막의 경우 친수적 성질의 GC 유도체의 분자가 물 분자와 상호작용으로 물에 대한 높은 젖음성으로 높은 표면 에너지를 관찰할 수 있었다.²² 낮은 접촉각은 친수성이 높아, 생체 내에서 삼출물이나 혈액을 흡수하는데 도움을 줄 것으로 판단된다. 친수성을 가지는 GC는 혈액이나 조직액과 접촉하면 팽창하는 효과를 활용하여 임플란트 피복 물질로 사용하는 연구가 진행되고 있다.²³

세포생존을 평가. 의료용으로 사용 가능한 생체 소재의 안전성 평가 실험은 ISO 10993 규격에 따라 세포생존을 연구를 진행하였다. 골재생 차폐막으로 사용되는 GEL/GC 조성막은 생체 내 삽입 후 수 개월에 걸쳐 체내로 흡수 및 생분해되는 고분자 물질로 세포독성을 분석하기 위해 세포 생존율을 MTT 분석을 하였으며 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. GEL/GC 조성 차폐막의 모든 그룹에서 80% 이상의 세포 생존율을 확인하였다.

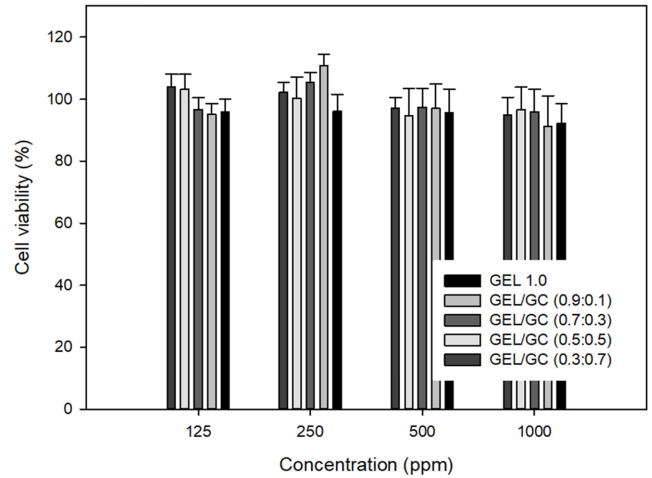


Figure 6. Cell viability of L929 fibroblast cells following 24-hour exposure to GEL/GC membranes at different concentration ratio (n = 3).

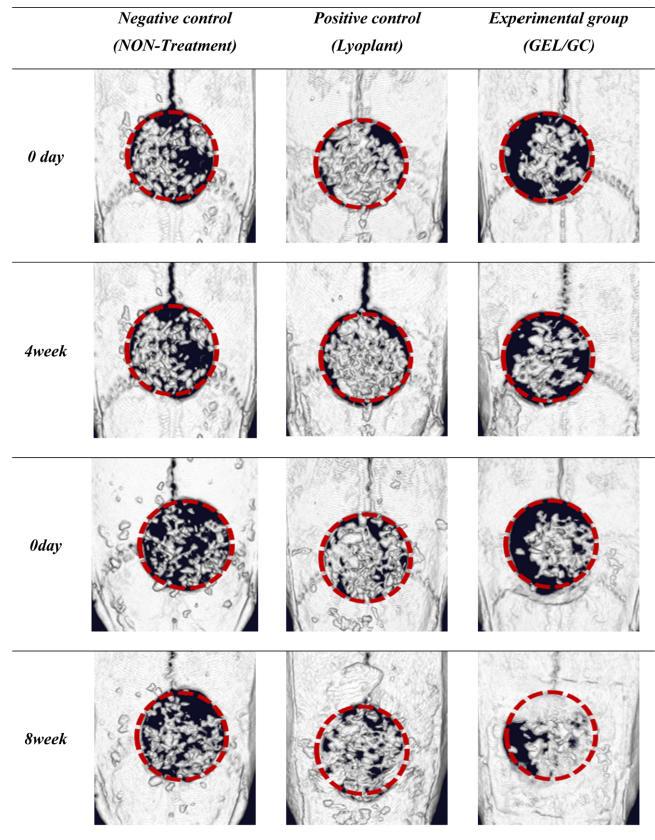


Figure 7. Representative micro-CT images of defects treated with bone grafts materials and membranes (non-treatment group, lyoplant membrane group, GEL/GC membrane group) after 4 and 8 weeks.

마이크로 CT 평가. GEL/GC 조성 차폐막의 새로운 골생성에 대한 효능을 평가하고자 세포 생존율이 가장 높고 친수

적 성질이 높은 GEL/GC(0.7:0.3) 조성 차폐막을 가지고 동물 실험을 진행하였다. 동물실험 직후, 4주, 8주 후에 실험 동물을 호홉 마취 후 마이크로 CT 촬영을 하여 두개골 부위의 이미지를 나타낸 것이다(Figure 7). CT 이미지를 3D로 재건하여 신생골 형성을 육안으로 관찰하였다. 음성대조군은 4주, 8주가 지났음에 불구하고 신생골은 거의 형성되지 않고 흠어진 이종골의 모습을 관찰할 수 있다. 양성대조군 역시 이미 지상 신생골의 형성은 거의 볼 수 없었고 음성대조군에 비해 이종골은 덜 흠어진 것을 관찰하였다. 그에 반해, GEL/GC 차폐막을 처리한 실험군의 4주 후의 이미지를 보면 신생골은 거의 형성되지 않았지만 이종골이 흠어지지 않고 결손부 위치에 잘 고정되어 있는 모습을 확인할 수 있다. 또한 8주 후에는 결손부의 가장자리 쪽에 신생골이 형성되었음을 확인할 수 있었고, 이종골 역시 흠어지지 않고 결손부 위치에 잘 고정되어 있다. GEL/GC 조성 차폐막은 수술 부위에 잘 고정되었고, 신생골 형성에 도움을 주는 역할을 수행한 것으로 판단된다.

마이크로 CT 이미지 정량 평가. 산출해낸 bone volume 값으로 실험군간의 골재생능을 비교하였다. 음성대조군 이종골만 처리한 군에서 4주차에 1 mm³ 미만의 값과 8주차에 1.02±0.3 mm³ 값이 산출되었다. 양성대조군으로 사용한

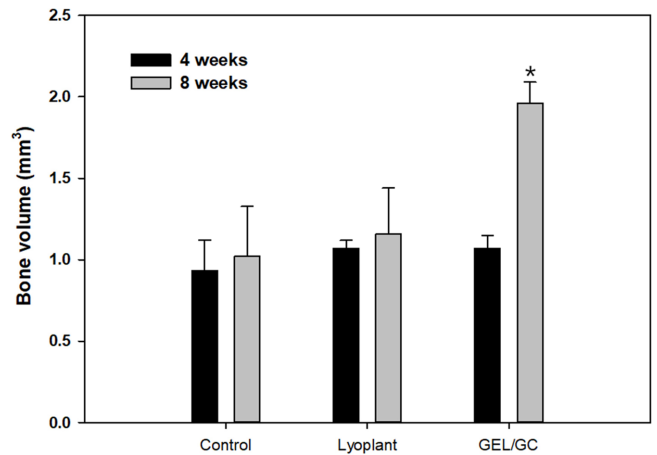


Figure 8. Micro-CT evaluation of the bone volume of defects treated with bone grafts materials and membranes (non-treatment group, lyoplant membrane group, GEL/GC membrane group) after 4 and 8 weeks.

lyoplant 처리군에서는 4주차에 1.07±0.05 mm³ 값이 8주차에 1.36±0.18 mm³ 값이 산출되었다. 이와 다르게 GEL/GC 차폐막을 처리한 실험군의 경우 4주, 8주에서 각각 1.12±0.08 mm³, 2.12±0.13 mm³(*p*<0.05)로 4주 동안 1.8배의 골재생음을 보였

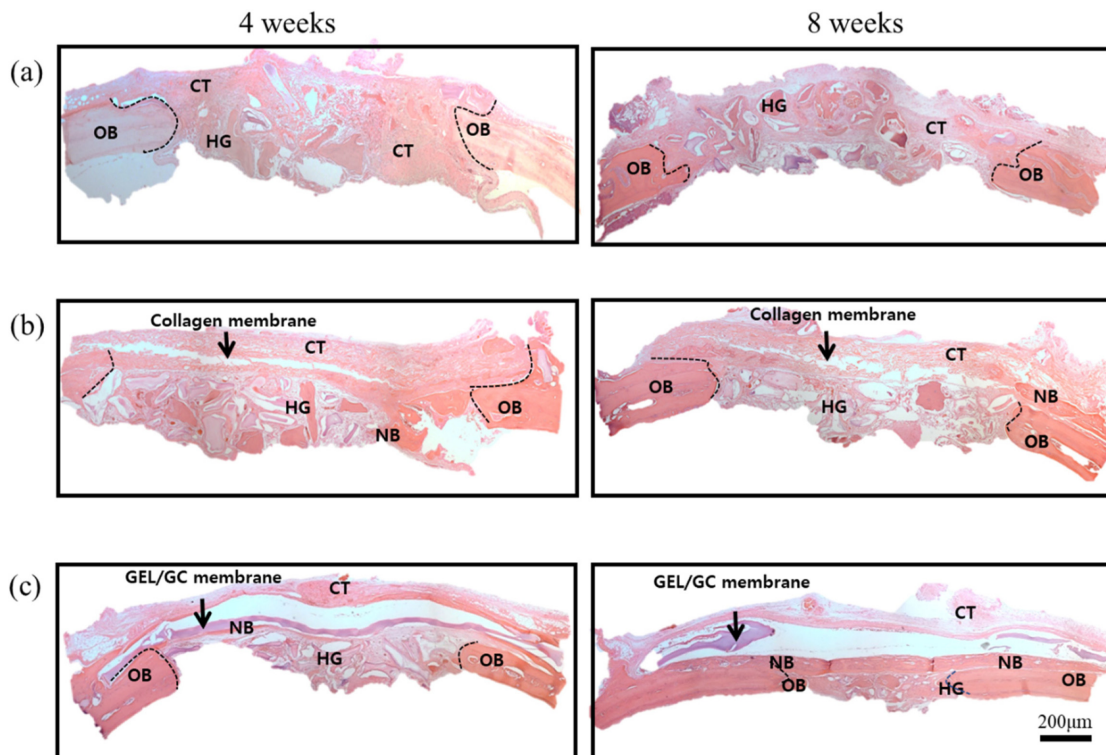


Figure 9. Histological sections of rat cranial defect and surrounding cranial tissue, (a) covered without membrane; (b) covered with lyoplant membrane; (c) covered with GEL/GC membrane with different periods (OB: original bone, CT: connective tissue, HG: heterogeneous bone, NB: newly formed bone).

다(Figure 8). GEL은 섬유아세포의 성장을 막아주는 역할을 하면서 서서히 생분해되면서 신생골 형성에 도움을 주었다.²⁴ 또한 키토산의 경우 혈액응고를 촉진하여 지혈작용을 하고 체내에 항체 생성과정에 관여하여 면역을 증진시키는 등의 역할로 상처치유를 촉진시키는 연구 보고가 있다. 골형성에는 다능성줄기세포(multipotential stem cell)가 골형성세포로 분화 및 골기질 형성과 광물화를 요구하는 복잡한 생물학적 과정이 필요하다.²⁵ Klokkevold 등의 연구에서는 조골세포의 분화와 골형성에서 키토산 유도체가 골 전구세포(osteoprogenitor cell)들의 분화 잠재력을 높이고 골형성을 촉진시킬 수도 있는 것으로 보고하였다. 결손부에 처치한 GEL/GC 막이 시간에 지남에 따라 생분해가 진행되면서 신생골 형성에 도움을 주는 것을 확인하였다.²⁶

조직학적 평가. 광학 현미경을 사용하여 두개골 결손부에서 신생골의 형성 유무를 확인하였다. 결손부에 이종골만 이식하고 아무 처리를 하지 않았다. 수술 4주 후 연조직이 결손부 안쪽까지 차오르면서 신생골 형성에 부정적인 영향을 주었다.²⁷ 이종골 이식만으로는 신생골이 잘 형성될 수 없는 것을 확인하였고, 이종골이 자기 위치에 고정되지 않았다. 8주 역시 연조직이 많이 유입되었고 이종골이 많이 흡수된 모습이다. 양성대조군(lyoplant)은 4주 차에서는 이종골이 잘 유지되었지만 8주에서는 많이 흡수되었고, 음성대조군에 비해 연조직의 유입은 적은 편이다. 이는 수술 8주 전에 lyoplant가 생체 내에서 분해된 것으로 사료된다.²⁸ 콜라겐을 소재로 한 멤브레인은 8주 이내로 분해가 되어 지방 조직에 침투된다는 연구보고가 있다.²⁹ GEL/GC 차폐막은 결손부 위치에 잘 고정되었다. 이로 인해 결손부에 연조직의 유입이 거의 없었고 이종골 역시 흡수되지 않고 잘 유지되는 것을 관찰하였다. 수술 8주 차에는 육안으로도 신생골을 관찰할 수 있었으며, GEL/GC 조성 차폐막이 많이 분해된 모습을 관찰하였다(Figure 9). GEL/GC 차폐막은 수술 부위에 잘 유지되어 연조직의 유입을 차단하고 신생골 형성에 영향을 주는 것으로 판단하였다.

결론

본 연구는 생체고분자 소재인 GEL/GC를 기반으로 차폐막을 제조하여 물리적, 화학적 특성을 알아보고, 의료용 소재로 활용 가능성을 확인하기 위해 동물실험을 통해 평가하였다. GEL/GC 차폐막은 GEL의 비율이 증가할수록 분해율은 낮아졌지만 인장강도는 높아지는 것을 확인하였다. FTIR 구조 분석에서는 GEL/GC 차폐막은 GEL과 GC의 고유 성질을 유지하는 것을 확인하였고, 0.7:0.3 비율의 차폐막에서 가장 높은 인장강도의 값을 보였다. 세포실험에서 모든 차폐막에서는 독성이 없음을 확인하였으며, 세포생존율은 GEL/GC 0.7:0.3 차폐막에서 가장 높아 이를 가지고 동물실험을 진행하였다. 마이크로 CT 촬영을 통한 3D 이미지에서는 양성대조군, 음성

대조군 모두 이종골이 흡수된 상태였으며 골의 변화가 거의 없었다. 8주 후 GEL/GC 막으로 처리한 그룹은 이종골이 잘 유지되었고 골의 생성을 확인하였다. 실제로 조직사진에서도 유사한 결과가 나왔으며 신생골 형성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 이러한 결과 GEL/GC 조성 차폐막은 골재생 의료소재로 활용가능하며 더불어 조직공학적으로 다양한 분야에서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015H1C1A1035894), 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2016R1A6A3A11935439).

참고 문헌

1. U. Yoshiya, I. Kunio, M. Takamitsu, K. Takahiro, N. Jitoshi, S. Kazuomi, and R. Kazuo, *Biomaterials*, **23**, 2027 (2002).
2. S. H. Lee, Y. M. Lim, S. I. Jeong, S. J. An, S. S. Kang, C. M. Jeong, and J. B. Huh, *J. Adv. Prosthodont.*, **7**, 485 (2015).
3. Y. Xie, J. S. Park, and S. K. Kang, *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc.*, **16**, 6403 (2015).
4. J. H. Lee, H. You, Y. K. Kim, H. K. Shin, H. C. Lim, Y. T. Kim, J. S. Lee, U. W. Jung, and S. H. Choi, *Implantology*, **19**, 17 (2015).
5. C. M. Agrawal, G. G. Niederauer, and K. A. Athanasiou, *Tissue Eng.*, **1**, 241 (1995).
6. Y. Zubery, A. Goldlust, A. Alves, and E. Nir, *J. Periodontol.*, **78**, 112 (2007).
7. A. H. Zisch, S. M. Zeisberger, M. Ehrbar, V. Djonov, C. C. Weber, A. Ziemiecki, E. B. Pasquale, and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **25**, 3245 (2004).
8. C. Dahlin, A. Linde, J. Gottlow, and S. Nyman, *Plats. Reconstr. Surg.*, **81**, 672 (1988).
9. D. R. Pereira, R. F. Canadas, J. S. Correia A. P. Marques, R. L. Reis, and J. M. Oliveira, *Key Eng. Mater.*, **587**, 255 (2014).
10. P. Matricardi, C. Cencetti, R. Ria, F. Alhaique, and T. Coviello, *Molecules*, **14**, 3376 (2009).
11. H. W. Park, H. Y. Kim, S. Y. Kwon, G. Khang, and Y. S. Kim, *Polym. Korea*, **39**, 145 (2014).
12. H. S. You, M. O. Cho, I. S. Cho, Z. Li, N. H. Kim, M. K. Jang, S. W. Kang, and K. M. Huh, *Polym. Korea*, **40**, 329 (2016).
13. M. K. Jang and J. W. Nah, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **19**, 457 (2008).
14. R. V. Kulkarni, B. S. Mangond, S. Mutalik, and B. Sa, *Carbohydr. Polym.*, **83**, 1003 (2011).
15. J. Kim, S. Y. Cheon, M. S. Kook, C. M. Lee, and K. Y. Lee, *Polym. Korea*, **42**, 280 (2018).
16. N. A. Ismail, S. F. Mohamad, M. A. Ibrahim, and K. A. M. Amin, *Adv. Biomat.*, **2014**, 1 (2014).
17. R. Singh, L. Mahesh, and S. Shukla, *Int. J. Oral. Implantol. Clin.*

- Res.*, **4**, 68 (2013).
18. X. Li, H. Xie, J. Lin, W. Xie, and X. Ma, *Polym. Degrad. Stab.*, **94**, 1 (2009).
19. S. Bhuvaneshwari, D. Sruthi, V. Sivasubramanian, N. Kalyani, and J. Sugunabai, *IJERA*, **1**, 292 (2007).
20. L. Liu, B. Wang, Y. Gao, and T. C. Bai, *Carbohydr. Polym.*, **97**, 155 (2013).
21. P. D. Fisher, G. Venugopal, T. A. Milbrandt, J. Z. Hilt, and D. A. Puleo, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103**, 2365 (2015).
22. H. A. Ko, J. E. Jang, H. S. Kim, C. H. Park, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. S. Khang, *Polymer*, **38**, 166 (2013).
23. J. K. Park, C. Y. Choi, J. P. Nam, S. C. Park, Y. H. Park, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polymer*, **38**, 85 (2014).
24. S. J. Chang, S. M. Kuo, W. T. Liu, C. C. G. Niu, M. W. Lee, and C. S. Wu, *J. Med. Biol. Eng.*, **30**, 99 (2010).
25. R. You, H. Lv, Y. Xiao, D. Yang, Z. Su, and C. Yan, *Curr. Signal Transduct. Ther.*, **11**, 28 (2016).
26. P. R. Klokkevold, L. Vandemark, E. B. Kenney, and G. W. Bernard, *J. Periodontol.*, **67**, 1170 (1996).
27. K. H. Kim, Y. J. Park, J. W. Park, Y. C. Lee, B. O. Cho, and B. K. Ahn, *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.*, **28**, 284 (2002).
28. X. F. Chen, Y. Liu, L. Y. Miao, Y. Y. Wang, S. S. Ren, X. B. Yang, Y. Hu, and W. B. Sun, *Int. J. Nanomed.*, **11**, 3154 (2016).
29. H. You, E. U. Lee, Y. K. Kim, B. C. Kim, J. Y. Park, H. C. Lim, J. S. Lee, I. S. Noh, U. W. Jung, and S. H. Choi, *Biomaterials*, **18**, 4 (2014).