

치주조직재생에 있어 키토산의 효과

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직 재생 연구소¹⁾

연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소²⁾

양진혁¹⁾, 정의원¹⁾, 이용근²⁾, 김종관¹⁾, 최성호¹⁾

I. 서론

최근 치과계의 화두 중 하나는 심미성이다. 삶의 질적 수준이 높아지면서, 치과질환으로 상실된 치아와 치주조직을 단순히 생리적, 기능적으로 회복할 뿐만 아니라 심미적으로 회복하는 것에 대한 환자의 관심과 기대치가 높아지고 있다. 이에 부합하여 치과의사들이 치료의 중점을 심미성에도 두고 있는 것이 치과계의 경향이다. 무치악 부위에 대한 회복을 위해 임플란트 시술이 많이 행하여 지는데, 기능성 회복뿐 아니라 심미성을 위해서는 골유도재생술 등의 술식도 함께 시행해야 한다. 따라서 이러한 술식들에 대한 관심이 높아지면서 치주조직재생에 대한 활발한 연구와 실험들이 진행되고 있다.

치주조직의 재생이란 치주질환 등에 의해 상실된 부착 기구들이 치주조직 재생능력을 가지고 있는 치주인대 조직의 분화에 의해 신생 골, 신생 백악질을

형성하고 새로운 치주인대 섬유가 수직으로 매입되어 구조적, 기능적으로 재형성된 치유 형태이다. 현재 치주조직의 재생을 위해 여러 가지 골 이식술, 차단막과 성장 인자 등을 이용한 치주 조직 유도 재생술이 행해지고 있으며, 이 술식의 효과를 극대화하기 위해 많은 연구와 실험이 행해지고 있다.

골 이식술은 많은 임상적인 시도와 동물실험에서 좋은 결과를 나타내었다. 골 이식술은 종류에 따라 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식, 골 대체물과 합성골 이식으로 나눌 수 있다. 이 중 골대체 물질 및 합성골 이식재가 다른 이식술에 비해 부작용이 적고 공간 형성 능력이 좋기 때문에 골재생을 위해 주목적으로 개발되었다. 이러한 이식재들은 골 형성, 백악질 형성, 섬유소 형성 능력이 의문시되고 있으며 이러한 재료 사이로 결합조직이 증식할 수 있는 충전재료만 주로 작용하기 때문에 이를 극복하기 위한 재료의 개발이 필요하게 되었다.

또 다른 재생 술식인 치주 조직 유도 재생술은, 1976년 Melcher가 치주조직의 재생과 새로운 부착은 건강한 치주인대로부터의 미분화 간엽세포에 의한다는 개념을 발표한 후¹⁾, 이 개념에 의거하여 여러 종류의 차단막이 사용되어왔다. 이러한 차단막은 치은 상피세포의 치근단 방향으로의 이주를 막아 선택적 세포들만 치근면에 모일 수 있도록 함으로써, 이전의 전통적인 치주 치료의 많은 한계를 극복할 수 있는 가능성을 제시해주고 있지만 이는 재생에 필요한 세포 과정을 촉진시키지는 않았다. 또한 이 술식의 성공에는 환자의 전신 건강 상태, 구강 위생 상태, 흡연 여부, 골 결손부의 형태, 차단막의 종류, 판막의 위치, 치은 퇴축, 술자의 기술 및 치유기간 등 여러 요소들이 영향을 미친다^{9, 10)}.

그 이외에도 많은 물질들이 치주 조직 재생을 위해 사용되어 왔다. 골 재생능력을 증진시키기 위해 최근에는 천연 고분자물질로부터 채취된 다양한 약재나 재료가 개발되어 사용되어 왔다. 그 중에서도 최근 키틴으로부터 추출된 탄수화물 생중합 체인 키틴산(poly N-acetyl glycosaminoglycan)에 대한 관심이 증가하고 있다. 키틴은 생중합체 중 셀룰로스 다음으로 풍부한 물질로서, 갑각류(예 : 새우, 게, 가재 등)의 외골격, 진균의 세포벽, 곤충의 큐티클을 이루는 구조 성분이다. 키틴의 화학적 구조를 보면, 안정된 다당류로서 1,4- β glucosamine 단위의 선형 중합체이다. 키틴산은 이런 키틴의 유도체로서 키틴 분자를 N-acetylation시킴으로써 형성된다. 가장 이상적인 키틴산은 키틴을 100% acetylation시킨 glucosamine기만으로 이루어진 것을 말하나 60%이상을 가진 것이면 일반적으로 키틴산으로 불린다. 키틴과 키틴산은 효소에 의해 가수분해되어 단량체 형태로 흡수되는데, 주로 라이소자임(lysozyme)에 의해서 분해된다⁶⁻⁸⁾.

키틴산의 생물학적 기능을 살펴보면, 지방을 흡수하고 결합하여 체중 감소에 도움이 되며, 콜레스테롤 조절, 결합조직 치유 향상, 항생, 항진균, 항암

효과, 지혈 효과 등이 있다²⁹⁻³⁵⁾. 이러한 효과 외에도 최근 연구를 보면 창상 치유 및 골재생 유도 능력이 있음이 입증되고 있다. 1960년에 Reynold는 창상 치유 증진에 있어서 monomer sugar N-acetylglucosamine의 이용에 대한 과학적 기초를 마련하였다²⁾. 1978년에 Balassa 등은 여러 동물 실험을 통해 N-acetylglucosamine이 창상 치유 속도를 증진시킨다고 보고하였다³⁾. 또한 구강창상 증진에 있어서도 Sapelli 등이 키틴산 분말이 치주낭, 구개창상, 발치와의 치유에 도움이 된다는 임상결과를 발표하였고⁴⁾, Muzzarelli 등도 키틴산 겔을 치주 병소에 작용하였을 때 조직화가 증진되면서 섬유화가 감소되어 치아동요 및 치주낭이 현저히 감소하였다고 보고하였다⁵⁾. 따라서 키틴산 및 키틴산을 이용한 차단막을 조직유도 재생술에 적용함으로써 치주조직 재생을 기대하고 환자에게 부작용을 최소화하고 경제적 부담을 경감시킬 수 있는 장점이 있다. 따라서 이에 대해 관심을 가지고 임상적으로 범용될 수 있도록 키틴산 자체에 대한 연구들뿐만 아니라 치주조직 재생에 효과가 있는 다른 재료들과의 혼용 등을 통한 상승효과에 대한 활발한 연구들이 이루어져야 할 것이다.

본 연구의 목적은 연세대학교 치과대학 치주과 학 교실에서 2000년부터 2005년까지 키틴산 및 키틴산을 이용한 차단막을 이용한 in vitro¹²⁾ 및 in vivo study^{16, 17, 19, 23, 24, 26)} 등을 통해 검증된 키틴산의 골조직 재생 유도 능력을 분석하여 보고 하는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1) In Vitro : 치주인대 섬유아세포

① 실험재료

a. 키틴산/PBS

수용성 키토산(poly N-acetyl glycosaminoglycan)을 탈아세틸화 후 연산과 물을 첨가한 수용액에 키토산 분해 효소(Chitosanase)를 이용하여 분해시켜 정제 과정을 거쳐 건조한 분말 형태로 만들었다.

이 분말을PBS(Phosphate buffered saline)에 100mg/ml에 녹인 후 물로 희석하여 0.01%, 0.1%, 1%, 2% 농도의 수용액을 만들었다.

b. 치주인대 섬유아세포

교정 치료를 목적으로 발거한 건강한 제1소구치에서 채취하여 계대 배양하였다.

② 치주인대 섬유아세포의 분리 및 배양

건강한 제1소구치의 발거 후 치근 중앙 1/3 부위에서 치주인대 조직을 채취하여 20% fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, amphotericin-B가 포함된 α -MEM을 넣고 배양하였다. 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 계대 배양한 세포 중 5-7세대를 사용하였다.

③ 세포 독성 검사

MTT assay는 살아있는 세포에서의 세포 증식이나 세포 독성을 측정하는데 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 세포의 mitochondria에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용한 것이다. 치주인대 세포를 10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액을 첨가하여 배양한 후 ELISA reader로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하여 치주인대 세포에 독성을 나타내지 않는 키토산의 최고 농도를 결정하였다.

④ RT-PCR

a. RNA 분리 및 농도 확인

Plate에 치주인대 세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액을 첨가하여 배양한 후, 0.1 mg/ml의 키토산 용액을 첨가하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 0.1% diethyl pyrocarbonate-

treated distilled water(DEPC-treated H₂O)에 녹여 농도를 확인하였다.

b. cDNA 합성

RNA 12.5 μ l에 oligo(dT)18 primer를 첨가하고 변성시킨 후 reverse transcription mixture를 첨가하여 cDNA를 합성하였다.

c. Polymerase chain reaction(PCR)

합성된 cDNA를 predenaturation시켰다. PCR은 DNA thermal cycler에서 30cycle 반응시켰고, 각 cycle은 denaturation, annealing, polymerization시키는 과정으로 이루어지며, 반응 후 방치하였다. 증폭된 PCR product에 loading buffer를 첨가하여 1.5% agarose ethidium bromide gel에 running시킨 결과를 분석하였다.

⑤ ALP 활성도 검사

Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 검사는 p-nitrophenyl phosphate(pNPP)의 가수 분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수 분해의 산물인 p-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다.

치주인대 세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액, β -glycerophosphate와 ascorbic acid를 첨가하여 배양한 후, 효소 용액(0.2% collagenase, 0.1% dispase)을 첨가한 후 반응시켜 세포 간 교원질을 분리하였다. 세포를 tube에 수집하여 세포 부유액을 원심 분리하였다. 원심 분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도 측정에 사용하였다. 세포액을 ALP-10⁶ 용액과 혼합하여 반응시킨 후 생성되는 p-nitrophenol의 양을 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Coomassie blue를 각 well에 넣고 즉시 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 읽었다. BSA standard의 흡광도를 이용하여 단백질 농도와 흡광도 간 관계식을 작성하고 이를 이용하여 각 군 별 세포액의 단백질 농도를 계산하였다. ALP 농도를 단백질 농도로 나누어

ALP 활성도를 계산하였다.

2) In Vivo study : Rat에서 실험

체중 250-300g의 수컷 백서(Sprague Dawley rat)를 사용하였으며, 실험 부위는 두개골을 이용하였다. 실험동물은 연세 임상의학연구소의 지침에 따랐다.

① 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 것도 이식하지 않은 군을 대조군으로, 키토산, 또는 키토산을 함유한 차단막을 실험군으로 설정하였다. 각 군은 수술 후 2주, 8주의 치유기간을 두고 희생하여 관찰하였다

a. 키토산을 직접 적용한 경우

- 키토산에서 추출된 무미, 무취의 수용성 올리고당 키토산*(poly N-acetyl glycosaminoglycan 88.3% deacetylation)

b. 키토산을 흡수성 콜라겐 전달체에 흡수하여 적용한 경우

- 키토산 0.2g에 안토론 시액 5ml 및 물 1ml를 가하여 수용상에서 가열하여 얻어진 키토산용액, 흡수성 콜라겐 스폰지(ACS, collatape®)[†] 멸균된 ACS를 직경 8mm로 잘라 0.1ml 키토산 용액에 5분간 적셔서 사용

c. 항생제를 함유한 키토산 차단막을 적용한 경우

- 키토산 섬유를 5cm 길이로 자른 뒤 carding기를 이용하여 단층웹을 만든 후 이 단층웹을 여러 층으로 하여 needle punching, calendering을 거치면서 부직포를 제조하였다. 이렇게 제조된 키토산 부직포를 1wt% 테트라사이클린 항생

제 수용액에 10분 동안 침지시켜 제조한 부직포 형태의 차단막을 제조한다.

또는 제조된 키토산 부직포를 5wt% 키토산 용액과 1wt% 테트라사이클린의 혼합액에 10분 동안 침지시켜 제조한 부직포 형태의 차단막을 제조한다.

- d. PLGA로 코팅한 키토산 부직포를 적용한 경우 - 키토산 부직포를 PLGA[‡] (poly(lactide-co-glycolide), 25:75.)로 코팅한다.

② 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

통상적인 전신 마취하에, 수술 부위를 소량의 2% lidocain[§]으로 침윤 마취한 후 백서의 전두골 전방에서 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 8mm 직경의 trephine bur^{**}를 이용하여 경뇌막(dura mater)에 손상을 주지 않도록 하면서 지름 8mm의 원형 결손부를 형성하였다.

③ 조직학적 관찰

실험동물을 술 후 각 군당 2주와 8주 후에 희생시키고, 실험부위를 적출하였다. 포르말린에 10일간 고정시킨 후, 7일간 EDTA-HCl로 탈회시킨 후 통법에 따라 paraffin에 포매하였다. 포매된 표본을 결손부의 중앙부에서 관상면으로 절단하여 슬라이드를 제작하였다. 이를 Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

④ 조직 계측학적 관찰

확대된 조직 표본 상을 컴퓨터 모니터 상에 재현하고 Image-Pro Plus^{††}를 이용하여 두개골 결손부에서 채취한 절편의 신생골 면적을 계측하였다.

* 키토산100 hanwha Co., Seoul, Korea
순수 키토산 용액 : Elchitosnakorea Co., LTD, Chonbuk, Korea
† CollaTape(r), Hankuk BIO-TECH Co., Seoul., Korea
‡ PLGA, Sigma, Co., U.S.A
§ 1:100,000 epi., Yuhan Co., Seoul, Korea
** 8mm trephine bur, 3i, FL, USA

3) In Vivo study : Dog에서 실험

18-24 개월된 약 15kg되는 beagle dogs를 대상으로 하였으며, 상,하악 악골을 이용하였다. 실험 동물 연세 동물 실험 연구센터의 지침에 따랐다.

① 실험군 설정

a. 키토산을 직접 적용한 경우

- 키틴에서 추출된 무미, 무취의 수용성 올리고당 키토산 (poly N-acetyl glycosaminoglycan 88.3% deacetylation)

b. 키토산/PBS을 적용한 경우

- 수용성 올리고당 키토산(poly N-acetyl glycosaminoglycan)을 phosphate buffer saline^{††}(PBS)에 녹인 후 100mg/ml의 수용액을 만든 후 물로 희석하여 20mg/ml 농도로 만든다.

c. 키토산 차단막(Nonwoven membrane)

- 키토산 섬유를 단층웹을 만든 후 이 단층웹을 여러 층으로 하여 needle punching, calendering을 거치면서 부직포를 제조하였다. 이 부직포를 기계적 힘을 이용하여 일정한 두께로 차단막을 만들었다.

② 결손부 형성 및 외과적 처치

통상적인 전신마취 하에 술부에 국소마취(2% 리도케인 1:80,000epi.)를 시행한다. 각 성견들의 치아들을 발거하고 8주 동안의 치유기간을 가진다. 발치한지 8주 뒤 발치한 부위에 협, 설부로 판막을 거상한 후 4×4×4mm의 크기의 1면 골 결손부를 발거한 인접치 근, 원심면에 형성한다. 형성된 치조골 결손부의 치근면에 대해 치근활택술을 시행 후에

참고점(reference notch)를 1/4 round bur로 형성한다. 각 부위에 3 군으로 나누어 실험재료를 이식하였다.

판막을 재위치 시킨 다음 3-0 봉합사로 봉합한 후, 7일 뒤 발사하였다. 술 후 항생제[§]를 근육주사로 투여하였으며 유동식을 먹이게 하였으며 매일 0.12% 클로르헥시딘 용액^{§§§}으로 구강 청결을 유지하였다. 8주 후에 희생시켜 실험부위를 적출 하였다.

③ 조직학적 관찰

조직을 적출하여 formalin에 10일간 고정시키고 nitric acid로 1주간 탈회시킨 후, 통법에 따라 paraffin 포매하고, 근원심 방향의 연속절편을 만들어 Hematoxyline-Eosin으로 염색한 후 광학 현미경으로 검경한다.

④ 조직 계측학적 분석

백악법랑경계(CEJ)와 reference notch(N)를 참고점으로 삼고, 조직 절편에서 다음 수치들을 측정하였다.

- a. 결손부 높이(DH) : 백악법랑경계(CEJ)에서 reference notch까지의 거리
- b. 접합상피 부착길이(JE) : 치근면을 따라 부착된 접합상피의 최하단(aJE)에서 백악법랑경계(CEJ)까지의 거리
- c. 결합조직 유착량(CT) : 접합상피와 신생 백악질 사이의 결합조직으로 부착된 부위의 거리
- d. 신생백악질 형성량(NC) : reference notch 기저부(bN)에서 신생백악질 최상단(cNC)까지의 거리
- e. 신생골 형성량(NB) : reference notch 기저부(bN)에서 신생골 최상단(cNB)까지의 거리

† † Image-Pro Plus® Media Cybernetics, Silver Spring, M.D., USA

† † † PBS, Sigma, Co., U.S.A

§§ Tetracyclin HCl, Chongkundang Pharmaceutical Co., Seoul, Korea

§§§ Haxamedin, Bukwang Pharmaceuticals co., Seoul, Korea

Ⅲ. 결 과

1) In Vitro : 치주인대 섬유아세포

① 세포 독성 검사

대조군과 농도별로 키토산을 처리한 각 실험군을 배양 2일, 3일 후에 MTT assay를 이용하여 대사적 활성을 평가하였다. 2일 째에는 2mg/ml의 농도에서, 3일 째에는 1, 2mg/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 활성 감소가 유의하게 나타났다(Table 1).

Table 1. Effect of chitosan on proliferation of hPDLFs

Chitosan conc (mg/ml)	Absorbance (Mean ± S.D)	
	after 2 day	after 3 day
Control	1.814 ± 0.205	2.576 ± 0.200
0.01	2.143 ± 0.149	2.612 ± 0.127
0.1	2.205 ± 0.085	2.491 ± 0.230
1	1.993 ± 0.137	2.037 ± 0.143*
2	1.600 ± 0.141*	1.518 ± 0.148*

* : Statistically significant difference compared to control group(p<0.05)

이상의 결과에 근거하여 치주인대 섬유아세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 최고의 키토산 농도를 0.1mg/ml로 결정하였다.

② RT-PCR에 의한 제I형 교원질의 발현

0.1mg/ml의 키토산이 함유된 배지에서 치주인대 섬유아세포를 배양한 후 RNA를 분리하여 제 I형 교원질의 발현 정도를 대조군과 비교 분석하였다. 0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포는 대조군에 비하여 제 I형 교원질의 mRNA 발현이 증가하였다(Table 2).

Table 2. Relative densitometric analysis of RT-PCR experiment

	Chitosan stimulation	
	(-)	(+)
Type I collagen/GAPDH	2.09	2.82

③ ALP 활성도 검사

0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포의 분화능을 알아보기 위해 10일간 배양한 후 세포막을 파괴시켜 세포 내 ALP의 양을 측정하였다. 0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포는 대조군과 비교하여 ALP 활성이 유의하게 증가되었다(Table 3).

Table 3. Effect of chitosan on ALP activity of hPDLFs

Chitosan conc(mg/ml)	ALP activity (Mean ± S.D) (U/g)
Control	138.2 ± 59.9
0.1	188.8 ± 65.8*

* : Statistically significant difference compared to control group(p<0.05)

2) In Vivo study : Rat

1. 조직학적 관찰

① 대조군

a. 2주 소견

결손부 변연과 하방의 경뇌막 주위에 국한되어 신생골이 삼각형 형태로 형성되어 있는 것이 관찰되었다. 신생골 주위는 조골세포로 둘러싸여 있었으며 얇고 성긴 섬유성 결합조직으로 둘러싸여 있었다. 신생골 상방의 골막은 불연속적이어서 치유가 아직 진행되고 있는 소견을 보이며 염증세포가 관찰되었다.

b. 8주 소견

2주 소견과 대체로 비슷한 소견을 보이고 있는데 결손부의 결합조직과 골막부위 및 경뇌막 부위에서 신생골은 성숙된 양상을 나타내고 있다. 골성조직은 2주에서보다 감소한 소견을 보이고 있으며 섬유조직이 성숙되고 잘 배열된 섬유조직과 섬유아세포가 관찰 되었다.

② 키토산을 적용한 경우

a. 2주 소견

같은 시기의 대조군에 비해 많은 혈관 증식, 조골세포의 침윤이 관찰된다. 더 광범위한 범위의 결손부 변연에서 신생골 형성이 진행되고 있는 것이 관찰되었다.

b. 8주 소견

2주 소견에 비하여 결손부위가 더 치밀하고 잘 정돈된 결합조직에 의하여 둘러싸여 있었으며, 조골세포가 2주에 비해 결손부 변연에서부터 더 먼 곳까지 퍼져나간 것을 볼 수 있으며 결손부 변연에서는 골 성숙과 골 개조가 이루어지면서 기존골과 혼화되는 양상을 보였고 골성조직 층을 이루며 신생골 형성이 이루어지고 있었다

2. 조직 계층학적 관찰

① 키토산을 적용한 경우

두개골 결손부 내 신생골 형성량

2주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군의 신생골 형성량 평균이 높게 나타났고 2주와 8주에서 통계학적으로 유의적 차이(p<0.05)를 보였다(Table 4).

Table 4. Histomorphometric analysis of newly formed bone area (means ± SD ; n=5; mm²)

	2 weeks	8 weeks
Sham surgery control	0.40±0.14	0.42±0.09
ACS control	6.01±1.16*	0.92±0.49
Chitosan	0.72±0.32	0.68±0.31
Chitosan/ACS	6.19±2.03*	4.84±0.88 [§]

* : Statistically significant difference compared to control group(p<0.01)
[§] : Statistically significant difference compared to ACS control group(p<0.01)
 ACS : Absorbable collagen sponge
 정의원 외 2000년, 김수경 외 2003년,방은경 외 2005년

② 키토산/흡수성 콜라겐 전달체

술 후 2주에 신생골 형성량은 실험군과 양성대조군에서 음성대조군에 비해 높게 나타났다(p<0.01, Table 4).

술 후 8주에 신생골 형성량은 실험군에서 양성대조군과 음성대조군에 비해 현저하게 높게 나타났다 (p<0.01, Table 4).

③ PLGA로 코팅한 키토산 부직포(Table 5)

Table 5. Histomorphometric analysis of newly formed bone area (means ± SD ; n=5; mm²)

	2 weeks	8 weeks
Control	1.2±0.2 [§]	1.3±0.2 [§]
Chitosan only	3.1±0.6*	3.0±0.8*†
Chitosan(PLGA 0.5%)	4.1±1.2*	3.3±0.8*†
Chitosan(PLGA 1%)	4.0±1.5*	3.4±1.2*†
Chitosan(PLGA 3%)	3.0±0.7*	3.1±1.2*†

* : Statistically significant difference compared to control group(p<0.05) ** (p<0.01)
 † : Statistically significant difference compared to collagen group(p<0.05) †† (p<0.01)
[§] : Statistically significant difference compared to chitosan group(p<0.05) §§ (p<0.01)

3) In Vivo study : Dog

1. 조직학적 관찰

① 대조군

접합상피가 근단 방향으로 이동되어 있으며, 접합 상피 하방으로 치아 장축과 평행하게 배열된 결합조직 부착이 관찰되었고, 치은 열구 하방 결합조직 내 염증 세포의 침윤이 관찰되었다. 소량의 신생골이 형성되어 있었고, 신생골 내에는 lacunae 내에 혈관도 형성되어 있으며, 신생골과 신생백악질 사이의 치주인대 섬유는 불규칙하게 주행하는 양상을 보였다. 치근면은 흡수에 의해 치근 표면이 거칠게 관찰되었고, 골유착을 보이는 부위는 없었다.

② 키토산을 적용한 경우

접합상피의 증식은 대조군보다는 억제된 소견을 보였으며, 결합조직내 염증세포의 침윤이 전반적으로 미약하게 관찰된다. 신생백악질 형성이 긴 접합

임상가를 위한 특집 4

상피를 따라 형성되어 있는데, 신생골과 신생백악질 모두 치관쪽으로 갈수록 얇아지는 양상이 나타난다. 조골세포와 골성조직(Osteoids)이 골수 주위에서 관찰되며, 결합조직 내로 염증세포의 침투를 볼 수 있다.

③ 키토산 차단막을 적용한 경우

미약한 염증반응을 보이며, 접합 상피는 더 치근단쪽, 측방쪽으로 이동해 간 것을 관찰할 수 있다. 신생골이 형성되어 있으며 기존골과의 경계는 불분명하다. 백악모세포가 가깝게 골내낭 백악질에 가까이 배열되어 있으며 골외낭부위 백악질에서는 거의 발견되어지지 않는다. 규칙적이고 치밀하게 치주인대섬유세포가 배열되어 신생 백악질이 형성되어 있다.

2. 조직계측학적 분석

키토산/PBS (Table 6, 7)

Table 6. Histometric analysis(mm)

	Surgical control group		Buffer control group		Chitosan group	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DH	4.20	0.13	4.04	0.10	4.13	0.12
JE	2.30	1.24	1.49	1.25	0.26*	0.59
CT	0.68	0.60	1.07	0.91	0.41	0.42
NC	1.42	0.49	1.60	0.41	3.46**	0.78
IBC	1.27	0.43	1.41	0.41	2.57*	0.57
SBC	0.14	0.14	0.20	0.13	0.89*	0.55
NB	1.00	0.77	1.52	0.37	2.43*	.44

* : Statistically significant difference compared to surgical control group(p<0.05)
 ** : Statistically significant difference compared to surgical control group(p<0.01)
 *** : Statistically significant difference compared to buffer control group(p<0.01)
 **** : Statistically significant difference compared to buffer control group(p<0.05)
 SD : standard deviation; DH: defect height; JE: junctional epithelium migration; CT: connective tissue adhesion; NC: new cementum regeneration; IBC: infrabony cementum regeneration; SBC : suprabony cementum regeneration; NB : new bone regeneration

Table 7. Histometric analysis(mm)

	Control group		RM group		CNWM group	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DH	4.48	0.56	4.88	1.11	4.86	0.24
JE	2.32	0.33	2.04	0.57	1.77	0.70
CT	0.86	0.29	1.20	0.44	1.12	0.18
NC	1.39	0.21	1.72	0.55	2.26*	0.23
IBC	1.08	0.24	1.48	0.52	1.68*	0.15
SBC	0.31	0.05	0.24	0.09	0.58*	0.10
NB	1.17	0.31	1.54	0.71	1.81*	0.16

Control :surgical control ; RM :resorbable membrane ; CNWM :chitosan nonwoven membrane ; DH: defect height; JE: junctional epithelium migration; CT: connective tissue adhesion; NC: new cementum regeneration; IBC: infrabony cementum regeneration; SBC : suprabony cementum regeneration; NB : new bone regeneration
 *: Statistically significant difference compared to surgical control group(p<0.05)

IV. 총괄 및 고찰

치주질환으로 상실된 치아 및 치주조직의 회복을 위해 최근 치주조직재생에 관한 연구와 실험이 활발히 이루어 지면서 술식 자체 뿐만 아니라 재생능력의 최대화를 위한 재료의 개발과 응용에 대한 관심이 매우 높다. 치주 조직의 재생을 위해 다양한 종류의 이식재와 차단막이 연구되고 또한 실제 임상에 응용되고 있으나, 아직까지 각각의 한계점을 가지고 있다. 최근 생체 적합성과 항균작용, 창상 치유 촉진 등의 생물학적 작용, 우수한 기계적 특성으로 관심이 증가하고 있는 키토산은 키틴을 강알칼리로 처리하여 탈 아세틸화 시킨 유도체로서 구조적으로 하이알유론산과 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1500kd 인 생체분해성 물질이다.

일반적으로 다당류의 경우에는 효소에 의해 가수분해가 일어나며, 키틴과 키토산의 경우에도 이러한 기전으로 분해되는 것으로 보고되고 있는데 lysozyme이 가장 효과적인 효소로 알려져 있다. Lysozyme의 경우 외부 자극이 없는 경우에도 대식세포에 의해 지속적으로 분비되는데, 체내에 매

식된 키토산은 대식세포를 자극하게 되어 lysozyme의 분비를 증진시키게 된다.

Klokkevold 등은 in vitro 실험에서 키토산이 백서 두개골 세포의 석회화 결정 형성에 영향을 미친다고 하였다⁷⁾. 또한 키토산이 조골세포와 같은 골전구세포의 이동과 분화를 촉진시키는 기질의 역할을 하는 반면에 골 형성을 방해하는 세포의 기능을 억제하여 간접적으로 골형성을 증진시킬 수 있다고 하였다. Malette나 Muzzarelli등은 동물실험을 통해 키토산이 골형성을 증진시킨다는 사실을 보고하였다^{5,11,14,15)}.

본 연구에서 살펴본 연구들 중 치주인대 섬유아세포를 채취하여 키토산을 적용시킨 in vitro study¹²⁾ 결과 키토산이 치주인대 섬유아세포의 교원질 생성을 증가시키고, 조골 세포로의 분화를 유도한다고 보고하였다. MTT assay를 이용하여 치주인대 섬유아세포에 대한 영향을 분석한 결과 키토산의 농도가 증가할수록 치주인대 섬유아세포의 성장이 증가하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 정점(plateau)이 되는 농도는 0.1mg/ml 이었고, 1mg/ml 이상의 농도에서는 오히려 세포의 성장이 유의한 차이로 감소하였다. 따라서 0.1 mg/ml를 치주인대 섬유아세포에 대한 적정 농도로 결정하였다.

키토산을 함유한 배지에서 치주인대 섬유아세포를 배양하였을 때 제 I형 교원질의 mRNA발현이 증가함을 RT-PCR을 이용해 분석하였다. 제 I형 교원질은 치주 조직에 가장 많은 세포의 기질로 석회화 결정 형성에 필수적인 요소라 볼 때, 적정 농도의 키토산은 치주인대 섬유아세포의 성장과 교원질 생성을 촉진할 뿐 아니라 치주인대 섬유아세포가 골원 세포(osteogenic cell)로 분화하는 것 또한 촉진한다고 할 수 있다. 또한 키토산 배지에서 ALP 활성도가 유의하게 증가하였다. ALP의 활성은 조골 세포의 초기 분화기에 증가하는 분화의 표지자로 치주인대 세포에서 ALP의 증가는 석회화

가 촉진됨을 반영하는 것이다.

본 연구에서 다루어진 in vivo study:rat^{16, 17, 23, 26)}에서 키토산의 골재생 유도 능력을 평가하였다. 호르몬 변화나 치유능 등의 변수로 인해 완전히 성숙한 수컷 백서를 실험에 사용하였다. 결손부의 크기를 지름 8mm 원형으로 하였는데, 이는 10% 이하의 골 재생을 이루는 가장 작은 크기의 결손부인 임계 크기 결손(Critical size defect)에 근거한 것이다. 이 연구의 분석을 위하여 조직학적 조건 관찰과 조직 계측학적 비교가 시행되었다. 키토산을 적용시킨 경우의 조직학적 특징을 보면, 키토산이 도포된 경뇌막과 절단면뿐만 아니라 상부 골막 안쪽까지 잔존골 주변으로 골부와 같은 양상으로 골성장이 이루어지는 것을 볼 수 있다. 골성조직(Osteoid)는 골재생이 활발하게 진행되고 있는 상태임을 알려준다. 골재생 유도 능력을 평가하는 방법으로 사용된 조직 계측학적 비교에서는 신생골 단면적을 계측함으로써 양적 비교를 할 수 있었다. 신생골 형성량이 대조군에 비해 현저히 높게 나타났고 통계학적으로 유의한 차이를 보임으로 키토산은 골재생을 증진시킴을 알 수 있다.

마지막으로 in vivo study:dog^{19, 24)}에서 키토산의 치주 재생능력을 평가하기 위해 성견에서 1면 결손부에 키토산을 적용하였다. 1면 결손부에서는 자연적 골재생이 힘든 경우이므로 실험재료의 골재생 능력을 평가하기에는 적당한 실험모형으로 볼 수 있겠다. 신생백악질이 긴 접합상피를 따라 길게 형성되어 있으며, 신생골과 신생백악질이 대조군에서 보다 많이 형성되어 있으며 치관쪽으로 갈수록 얇게 형성되어 있다. 조직계측학적 관찰을 통한 수치들을 비교하였을 때, 키토산을 적용한 실험에서는 접합상피의 이동량이 유의있는 차이로 적었으며, 키토산 차단막을 적용한 경우에는 유의성 있는 차이는 없었다. 키토산이나 키토산 차단막을 적용한 실험 모두에서 신생골이나 신생백악질의 형성이 유의성 있는 차이를 보였다.

이상의 결과에서 살펴보면, 키토산 및 키토산 차 단막은 신생골 형성 및 신생백악질을 유도할 수 있는 효과적인 치주조직 재생력을 가진 재료임을 알 수 있다.

이로써 키토산은 골조직 재생을 위한 골대체제의 하나로서 이용가능하며, 임상적으로 효과적으로 범용될 수 있는 천연고분자 물질이다.

또한 조골 세포를 분화시키는 다른 재료들과의 혼용이나 성장인자의 첨가를 통해 키토산의 골재생 유도 능력을 최대한 시키는 추가적인 연구와 실험

이 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

키토산의 치주재생 능력을 알아보는 실험들을 통해 키토산은 골조직을 포함한 치주조직 재생에 효과가 있는 것으로 보이며, 따라서 치주질환에 이환된 치주조직의 골조직 유도 재생을 위한 대체재료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Melcher AH: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47:256-260, 1976.
- Reynolds BL: Wound healing III; Artificial maturation of arrested regenerate with an acetylated amino sugar *Am Surgeon* 26:113-117, 1960.
- Balassa L.L., Prudden J.F.: Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration, In: Muzzarelli R.A., Pariser E.R., eds. *Proceedings of the 1st International Conference on Chitin and Chitosan*. Cambridge, MA: MIT Press, 1978.
- Sapelli PL, Baldassare V, Muzzarelli RA, Emanuelli M.: Chitosan in dentistry. *Chitin in Nature and Technology*, 507-512, 1986.
- Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnaroni A, Filippini O, Baldassarre V.: Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10:598-603, 1989.
- Amno K., Ito E.: The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. *Eur. J. Biochem.*, 85:97-104, 1978.
- Pangburn S.H., Trescony P.V., Hekker J.: Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3:105-108, 1982.
- Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, Saimoto H.: Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16:43-49, 1994.
- Machtei E., Cho M., Dunford R., Norderyd J., Zambon J., Genco R.: Clinical, microbiological and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy. *J. Periodontol.*, 65:154-161, 1994.
- Tonetti M., Pini Prato G., Cortellini P.: Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery. *J. Clin. Periodontol.*, 23:548-556, 1996a.
- Ui Won Jung, Soo Kyoung Kim, Chang Sung Kim, Kyoo Sung Cho, Chong Kwan Kim, Seong Ho Choi: Effect of chitosan with absorbable collagen sponge carrier on bone regeneration in rat calvarial defect model. *Current Applied physics* 7S 68-70, 2007
- 백정원, 이현정, 유윤정, 조규성, 김종관, 최성호: 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지*, 31(4):823-832, 2001.
- Klokkevold PR, Vandermark L, Kenney EB, Bernard GW.: Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro. *J. Periodontol*, 67:1170-1175, 1996.
- Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED.: Chitin in nature and technology. In; Muzzarelli RA, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. *Chitosan Effect in Nature and Technology*. New York: Pleum press, 435-442, 1986.
- Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G.: Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15:1075-1081, 1994.

참 고 문 헌

16. 정의원, 서종진, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관.:백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생유도 효과. 대한 치주과학회지, 30(4):851-870. 2000.
17. 김수경, 석헌주, 김창성, 조규성, 채중규, 김종관, 최성호.:백서두개골 결손부에서 키토산/흡수성 콜라겐 전달체의 골재생. 대한 치주과학회지, 33(3):457-574, 2003.
18. Pang EK, Paik JW, Kim SK, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Kim CK, Choi SH.:Effect of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts In vitro and on bone formation in rat calvarial defects. J. Periodontol. 76(9):1526-1533, 2005.
19. Yeo YJ, Jeon DW, Kim CS, Choi SH, Cho KS, Lee YK, Kim CK.:Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. J. Biomed. Mater. Res. 72(B):86-93, 2005.
20. 계승범, 손성희, 최상묵.:Chitosan과 chitosan-cellose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구. 대한 치주과학회지. 28(4):611-625, 1998.
21. 임기형, 김경남, 김광만, 최성호, 민우기, 이수복, 정용식, 이용근.:항생제를 함유한 키토산 차단막의 물리적 특성 및 약물 방출 거동. 대한 치과기재학회지, 43(2):67-74, 2005.
22. 장기성, 이수복, 이범훈, 민우기, 김원근, 정용식, 최성호, 이용근.:테트라사이클린을 함유한 기능성 키토산 차단막의 제조. 한국 섬유공학회지, 42(3):155-160, 2005.
23. 채경준, 김태균, 정의원, 김창성, 최성호, 이수복, 정용식, 이용근, 조규성, 채중규, 김종관. :백서 두개골 결손부에서 항생제를 함유한 키토산 차단막의 골재생 유도 효과. 대한 치주과학회지, 35(4):1019-1037. 2005.
24. Ji-Sook Park, Seong-Ho Choi, Ik-Sang Moon, Kyoo-Sung Cho, Jung-Kiu Chai and Chong-Kwan Kim:Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs J. Clin. Periodontol., 30:443-453. 2003.
25. 김민경, 최성호, 신승윤, 류인철, 허익, 박준봉, 조규성:키토산 함유 치약의 임상적 효과-Multicenter study 대한치주과학회지 33(2):167-178
26. 송건영, 김종관. The effect of Collagen and Chitosan membrane coated with PLGA on Bone regeneration in Rat Calvarial defects 연세치대논문. 2005;1-37
27. Gottlow J.:Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices; Initial healing and long-term results. J. Periodontol., 64:1157-1167, 1993 (supplement).
28. Greenstein G, Caton JG.:Biodegradable barred and guided tissue regeneration. Periodontology 2000, 1:36-45, 1993.
29. Brandenburg G., Leibroach L. G., Shuman R., Malette W.G., Qiuglely H.:Chitosan:A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue, Neurosurg., 15:9-13, 1984
30. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Tempeton AJ, Economou SG.:Chitosan:Evaluation of a new hemostatic agent. Curr. Surg., 47:37-39, 1990.
31. Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C., Bertolami C.N.:The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits, J. Oral Maxillofac. Surg., 57:49-52, 1999
32. Klokkevold P.R., Lew D.S., Ellis D.G., Bertolami C.N.:Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits, J. Oral Maxillofac. Surg., 49:858-863, 1991.
33. Muzzarelli RA, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini B.:Biological activity of chitosan:Ultrastructural study. Biomaterials, 9:247-252, 1988.
34. Muzzarelli R.A.:In vivo biochemical significance of chitin-based medical items, Polymeric Materials for Biomedical Applications(Eds S. Dumitriu and M. Szycher), Marcel Dekker, New York, USA, 1992.
35. Sandford P.A.:Chitosan:Commercial uses and potential applications, Im:SKjak-Braek G., Anthonen T., Sandford P., eds. Chitin and Chitosan. London:Elsevier Applied Science, 51-70, 1989.
36. Minami S, Okamoto A, Matsushashi A, et al.:Applications of chitin and chitosan in animals. In:Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, eds.:Advances in chitin and chitosan. London:Elsevier Applied Science, 61-69, 1992.
37. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN.:Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. J. Oral. Maxillofac. Surg., 49:858-863, 1991.