



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 2월

박사학위논문

3D 프린팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이
토끼 두개골 결손부의 골재생에 끼치는
영향

조선대학교 대학원

치의학과

이 기 원

3D 프린팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이
토끼 두개골 결손부의 골재생에 끼치는
영향

The effect of 3D printed
polycaprolactone membrane on
bone regeneration in rabbit
calvarial defects

2022년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 기 원

플라즈마 처리된 3D 프린팅된
폴리카프로락톤 멤브레인이 토끼 두개골
결손부의 골재생에 끼치는 영향

지도교수 유 상 준

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 기 원

이기원의 박사학위논문을 인준함

위원장 전남대학교 교수 김영준 (인)

위원 조선대학교 교수 김병욱 (인)

위원 조선대학교 교수 김병훈 (인)

위원 조선대학교 교수 유상준 (인)

위원 조선대학교 교수 이원표 (인)

2022년 1월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

| | |
|-----------------------------|----|
| I. 서 론 | 1 |
| II. 실험 재료 및 방법 | 3 |
| 1. 실험디자인 | 3 |
| 2. 3차원 프린팅된 차폐막의 제작 | 4 |
| 3. 3차원 프린팅된 차폐막의 특성평가 | 5 |
| 4. 실험동물 | 5 |
| 5. 수술과정 | 6 |
| 6. 방사선학적 평가 | 8 |
| 7. 조직학적 평가 | 8 |
| 8. 통계학적 분석 | 8 |
| III. 실험 결과 | 9 |
| IV. 고찰 | 20 |
| V. 결론 | 24 |
| VI. 참고문헌 | 25 |

도 목 차

| | |
|---|----|
| Figure 1. Schematic diagram of experimental groups. | 3 |
| Figure 2. Surgical procedure. | 7 |
| Figure 3 Field emission scanning electron microscope (FE-SEM) of 3D printed membrane and Scaffold | 10 |
| Figure 4. Energy Dispersive X-ray Spectrometer Analysis | 11 |
| Figure 5. High Resolution X-ray Diffraction Analysis | 11 |
| Figure 6. Micro-CT images in 2 weeks | 13 |
| Figure 7. Micro-CT images in 6 weeks | 15 |
| Figure 8. Histologic observation in 2 weeks experimental groups using H&E and MT staining | 18 |
| Figure 9. Histologic observation in 6 weeks experimental groups using H&E and MT staining | 19 |

표 목 차

| | |
|---|----|
| Table 1. Micro-CT analysis in 2 weeks | 14 |
| Table 2. Micro-CT analysis in 6 weeks | 16 |

ABSTRACT

The effect of 3D printed polycaprolactone membrane on bone regeneration in rabbit calvarial defects

Lee Ki-Won

Advisor: Prof. Yu Sang-Joun, D.D.S., P.h.D.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

I. Purpose

The purpose of this study is to radiologically and histologically compare and evaluate the bone regeneration effects of 3D printed membranes in rabbit skull defects.

II. Materials and Methods

A total of four circular bone defects were formed in the rabbit's skull with a diameter of 8 mm, and each material was applied into the defects. In this study, the three-dimensional (3D) membrane and scaffold were fabricated by 3D printing using PCL polymer. In the control group, a resorbable membrane (Collagen membrane®, Dentium, Seoul, Korea) was used below the defect, and in Experiment 1 group, deprotenized bovine bone mineral (DBBMC, Bio-Oss collagen®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) was used as a scaffold. In Experiment 2, the 3D membrane was applied above the defect, and the manufactured 3D scaffold was used in the defect. In Experiment 3, the 3D membrane was only used upwards. After 2 and 6 weeks, the rabbits were sacrificed, and bone tissue specimens containing bone defects were collected from the rabbit's calvarials for radiographic and histologic evaluation.

III. Results

In radiographic evaluation of 2 weeks, the hard tissue formation amount was $24.66 \pm 12.32 \text{ mm}^3$ in experimental group 3, which was more than twice that of the control group, and the hard tissue formation amount was $19.97 \pm 3.9 \text{ mm}^3$ in Experimental Group 2. The amount of hard tissue formation in all experimental groups showed statistical significance to that of the control group ($p=0.008$). In radiographic evaluation of 6 weeks, the amount of hard tissue formation was $46.69 \pm 11.59 \text{ mm}^3$ in experimental group 3, which was more than 1.7 times higher than that of the control group. The amount of hard tissue formation in experimental groups 1 and 2 showed statistical significance to that of the control group ($p=0.029$).

In histological evaluation of 2 weeks, new bone was formed in the marginal part of the bone defect, and granulation tissue with consistent thickness was observed in Experimental Group 2. In histological evaluation of 6 weeks, an increase in new bone formation was observed under the 3D membrane and between the 3D scaffolds in experimental group 2.

IV. Conclusion

The membranes fabricated with a 3D printer using PCL polymer were radiographically promoted new bone formation over 2 to 6 weeks, and when the bone graft material and scaffold were used together with the 3D membrane, more new bone formation can be achieved.

I. 서 론

골유도재생술에 사용한 차폐막은 두개-악안면 손상, 치주 질환 또는 저작 기능, 언어 및 미적 회복을 위한 임플란트 시술을 받는 환자에서 널리 사용된다[1]. 이 차폐막은 연조직이 골결손부위로 이동하는 것을 방지하는 차단작용을 하여 골결손 부위의 골재생을 유도하기 위해 적용된다. 상업적으로 사용되는 골유도재생용 차폐막은 일반적으로 폴리락타이드 및 폴리글리콜라이드 및 콜라겐으로 만들어진다[1]. 그러나 이러한 차폐막은 기계적 공간 유지가 좋지 않고 콜라겐 차폐막은 4~6개월의 치유 기간을 충족하지 못할 수 있는 예측할 수 없는 분해가능성이 있으며 폴리락타이드 차폐막은 산성 분해 산물이 있어 골재생을 감소시키는 등의 여러 가지 단점이 있다. 또한 추가적으로 수술이 더 필요하거나 더 긴 치료 시간이 소요될 있는 단점을 갖는다 [2-5]. 하지만, 지금까지 다양한 비흡수성 및 흡수성막을 적용하여 다양한 정도의 골재생의 성공이 보고되었으며, 그 중 입자골 이식재와 콜라겐 막의 조합이 가장 많이 사용되고 있다[6]. 콜라겐 막은 우수한 생체 적합성을 나타내고 생분해성이기 때문에 많이 사용된다. 또한 차폐막 제거를 위해 추가 수술이 필요하지 않는 장점을 가진다[7].

다양한 크기의 골결손 형태중에 큰 부위의 골결손을 재건하기 위해서는 다양한 옵션이 고려된다. 특히, 콜라겐 막 및 입자형 골이식재와 함께 많은 고정핀을 사용하는 것이 이를 해결하기 위해 제안되었다[8]. 자가, 동종 및 이종을 포함한 다양한 종류의 블록골 이식편도 활용되었다[9,10]. 골조직 공학을 위한 다양한 지지체 재료는 골형성 줄기세포 또는 성장인자의 운반체로 연구되었다[11,12]. e-PTFE(expanded-polytetrafluoroethylene), d-PTFE(dense-PTFE) 및 티타늄 메시로 만들어진 비흡수성 차폐막은 모두 우수한 구조적 안정성과 공간 유지성으로 인해 사용되었다[13,14]. 그러나 이들 모두는 빈번한 막 노출, 창상열개로 인해 수술 부위의 감염과 같은 합병증을 갖는다[15]. 따라서, 이러한 임상 상황에서 콜라겐 막과 같은 생분해성 및 생체 적합성뿐만 아니라 비흡수성 막으로서 우수한 구조적 안정성 및 수명을 나타내는 새로운 막에 대한 요구가 있다.

최근 Cone Beam Computed Tomography(CBCT), 구강 내 및 구강 외 스캐닝, 임플란트 식립을 위한 디지털 계획을 위한 소프트웨어, 컴퓨터 유도 임플란트 식립을 위한 수술 가이드 제조의 인기가 높아짐에 따라 디지털 워크플로에 대한 관심이 높아지고 있다. 임플란트 식립을 위한 치조골 재생술과 관련하여 수술 전 블록 이식재를 보다 정밀하게 조정할 수 있게 되었다. 이식재료를 골결손부에 맞게 맞춤화하는 것은 임플란트 치

과 디지털 워크플로와 통합되어 일상적인 임상 시술의 일부가 될 수 있다. 골결손부의 재생을 위한 3차원 프린팅 기술이 현재 합성골 재료에 적용되고 있다. 골재생을 위한 생체 재료 특성의 중요한 측면에는 생체 적합성, 흡수율, 취급 용이성 및 비용이 고려된다. 특히 거대 및 미세 다공성이 혈관 신생 및 세포 접착을 결정하는 요소이며 최적의 구조를 재현하기 위한 연구가 진행 중입니다.

폴리카프로락톤(PCL)은 3차원 프린팅 응용 분야에서 많이 사용하는 폴리머 중 하나이다. 특히, 생체적합성 및 생분해성 합성고분자로 폴리락트산 및 락트산-코-글리콜릭(lactic-co-glycolic)을 포함한 다른 합성수지체에 비해 기계적 강도와 내구성이 우수하다. 이 재료는 천천히 분해되는 물질이며, 분자무게와 결정도에 따라 2~4년에 걸쳐 분해된다. 또한, PCL은 우수한 유연학적 및 점탄성 특성을 가져서 가공성이 우수하며, 미국 FDA 승인 생체 재료[16]이다. 하지만 여전히 치과계에서는 3차원 프린팅된 PCL을 사용하여 제조된 차폐막을 이용한 골결손부의 재생효과를 평가하는 연구들이 충분하지 않은 실정이다.

이 연구에서는 3차원 프린팅된 PCL 차폐막을 토끼의 두개골 결손부에 적용한 후 골재생 효과를 방사선학적 그리고 조직학적으로 비교 평가하는 것이 목적이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 디자인(Experimental design)

토끼의 두개골에 총 4개의 원형의 골결손부를 직경 8mm 크기로 형성하여 결손부 내로 각각의 재료들을 적용하였다. 이 연구에서 3차원 프린팅된 차폐막과 스캐폴드는 PCL을 사용하여 제작하였다. 모든 대조군과 실험군의 결손부 하방으로 resorbable membrane (Collagen membrane®, Dentium, Seoul, Korea)을 사용하여, 하방에서 생성되는 골재생을 차단하고 골결손부의 경계만 발생하는 골재생효과를 관찰하였다. 또한 실험군 1, 2, 3군 상방에는 3차원 프린팅된 차폐막을 적용하였다. 음성대조군에는 골결손부에 어떤 재료도 사용하지 않았고, 실험 1군에는 결손부 내에 deprotenized bovine bone mineral(DBBMC, Bio-Oss collagen®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)을 스캐폴드로 사용하였다. 실험 2군에서는 PCL로 제작된 3차원 프린팅된 스캐폴드를 결손부 내에 사용하였고 실험 3군에서는 결손부 상방으로 PCL로 제작된 3차원 프린팅된 차폐막만을 사용하였다 (Fig. 1).

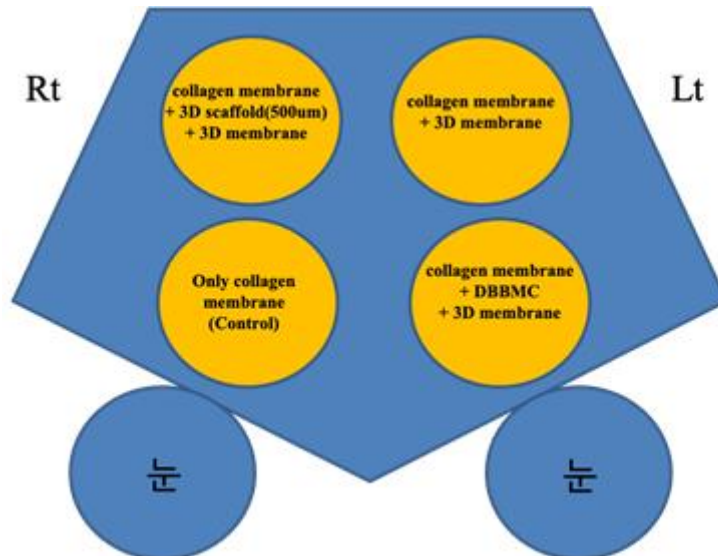


Figure 1. Schematic diagram of experimental groups.

2. 3차원 프린팅된 차폐막의 제작(Fabrication of 3D printed membrane and scaffold)

PCL (average molecular weight: 45,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 차폐막을 제작할 때 사용하였다. 이 PCL 차폐막은 Bio-Extruder 장비(3D Bio Printer, M4T-100, M4T, 대구, 한국)를 사용하여 90%의 PCL과 10wt.% β -TCP 필라멘트로 제작 되었으며, 3차원 프린팅 기술 방식 중에 하나인 열용융적층모델링(Fused Deposition Modeling)을 사용하여 제작하였다. 이 차폐막은 CAD(Computer-Aided Design) 시스템을 사용하여 설계되었으며, 이 시스템은 세포 내부 성장을 위해 다양한 기공 크기로 잘 정의된 내부 및 외부 모양을 생성할 수 있다. 차폐막은 가로 12mm 및 세로 12mm의 정사각형 크기로 제작하였으며, 0.8mm 두께로 제작되었다. 온도 80℃, 분당 100mm 속도의 조건에서 200 μ m 노즐을 사용하여 4층으로 적층하여 제작하였다. 필라멘트 두께는 200 μ m로 0/90° lay-down pattern과 stagger-type이 적용하였고, Pore 크기는 300 μ m로 벌집구조 모양을 만들었다. 이 연구에 사용하는 스캐폴드도 차폐막의 제작과 같은 방법으로 제작하였다. 스캐폴드는 직경 8mm의 원형의 크기와 2mm 두께로 제작되었으며, 온도 80℃, 분당 100mm 속도의 조건에서 500 μ m 노즐을 사용하여 4층으로 적층하여 제작하였다. 필라멘트 두께는 500 μ m로 0/90° lay-down pattern과 stagger-type이 적용하였고, 300 μ m 크기의 pore 크기로 벌집구조 모양을 만들었다. 제작된 PCL 차폐막과 스캐폴드는 phosphate buffer saline(137mM NaCl, 2.7mM KCL, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 2시간 동안 담그고 37℃에서 각각 48시간 동안 수산화나트륨에 담근 후 차폐막과 스캐폴드를 PBS 용액으로 3번 세척하였다. 제작된 차폐막과 스캐폴드는 산소(O₂) 플라즈마로 에칭되었다. 나노 및 마이크로 표면 거칠기의 개선을 위해 이방성 에칭 조건에서 O₂ 플라즈마 에칭은 무선 주파수(RF, 13.56MHz) 용량 결합 플라즈마 (Miniplasma Station, Daejeon, Korea)로 시행되었으며, 반응성 이온 에칭(reactive ion etching, RIE)을 RF 방전 전력을 하부 전극에 전달하는 이방성 프로파일을 달성하기 위해 적용했다. 샘플을 진공 챔버의 상단에 장착하였고, 그 과정은 다음과 같다. RF 방전 전력은 100W, 20scm에서 산소 가스 유량, 100mTorr 이하의 작동압력하에서 적용되었다. 3차원 프린팅된 스캐폴드와 차폐막의 다른 표면을 만들기 위해 표면을 1분과 24분동안 에칭하였다. O₂ 플라즈마 에칭 공정동안에 에칭은 3분 동안 수행되었고, 열을 최소화하기 위해 교대로 3분 동안 그 과정을 정지하였다. 이 과정을 8회 반복하였고, 3차원 프린팅된 스캐폴드와 차폐막의 내부구조에 균일한 O₂ 플라즈마 에칭 표면을 수행하기 위해 3차원 프린팅된 스캐폴드와 차폐막의 상부 표면에 에칭을 하고 다시 뒤집어 하부 표면에 플라즈마 에칭을 시행하였다.

3. 3차원적 프린팅된 차폐막의 특성(Characterization of 3D membrane)

제작된 3차원 프린팅된 차폐막을 전자주사현미경(Field emission scanning electron microscopy, FE-SEM, SU-70®, Hitachi, Japan)으로 분석하여 개별 필라멘트의 크기 및 형태와 같은 물리적 정보를 평가하였고, 에너지 분산형 X선 분석(Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDS)을 시행하여 개별입자의 화학적 조성을 분석하였다. 또한 샘플의 X-선 회절(X-ray diffraction, XRD)패턴을 측정하기 위해 X-선회절 분석기(X-ray diffractometer, D8-ADVANCE®, Bruker AXS, German)을 이용하였고, Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) 방사선원소를 사용하여 0-40°(2 θ)범위로 조사하였다.

4. 실험동물(Animals)

동물 실험의 선택, 수술방법, 술후 처치 등은 조선대학교 동물실험윤리심의위원회의 심의를 거쳐 진행하였다(CIACUC2018-A0007). 총 12마리의 뉴질랜드 수컷 토끼 (2.5~3.0 kg)를 이 실험에서 사용하였다. 실험 동물들은 무작위로 선택되었으며 각 군당 6마리씩 2주군과 6주군으로 나누었다. 이중에 3마리의 토끼가 실험 중 폐사하였다.

5. 수술과정(Surgical procedure)

5 mg/kg의 xylazine hydrochloride (Rompun[®], Bayer Korea, Seoul, Korea)과 15 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar[®], Yuhan, Seoul, Korea)을 대퇴부 근육에 주입하여 토끼의 전신마취를 유도하였다. 마취 후 수술 부위를 제모하고 포비돈 요오드로 소독하였다. 2% 리도카인 HCl(Huons, Seoul, Korea)을 사용하여 침윤마취를 시행하였고, 전두골 절개 후 calvaria의 상부 표면을 노출시켰다. 외경 8 mm의 trephine bur를 이용하여 4개의 골결손부들을 calvaria에 형성하였다. 그 후 원형 골결손부를 4개로 나누어 대조군과 실험군에 따라 각각의 실험 재료를 적용하였다. 모든 대조군과 실험군의 결손부 하방으로 resorbable membrane을 사용하였다. 그후 실험 1군에는 결손부 내에 DBBMC를 적용하였고, 실험 2군에서는 PCL로 제작된 3차원 프린팅된 스캐폴드를 결손부 내에 적용하였고 실험 3군에서는 골결손부 내부에 어떤 재료가 사용하지 않았다. 실험군 1, 2, 3군 상방에는 3차원 프린팅된 차폐막을 적용하였다. 그후 골막을 5-0 Vicryl[®](Ethicon, Somerville, USA)로 고정하기 위해 골막을 재배치하고 4-0 Blue Nylon(AILEE, 부산, 한국)으로 두피를 봉합했습니다(Fig. 2A-D). 수술 후 3일 동안 감염 예방을 위해 Gentamycin(Dong-wha pharm, Seoul, Korea) 1 mg/kg을 근육주사하고 2주와 6주 후에 희생시켰다.

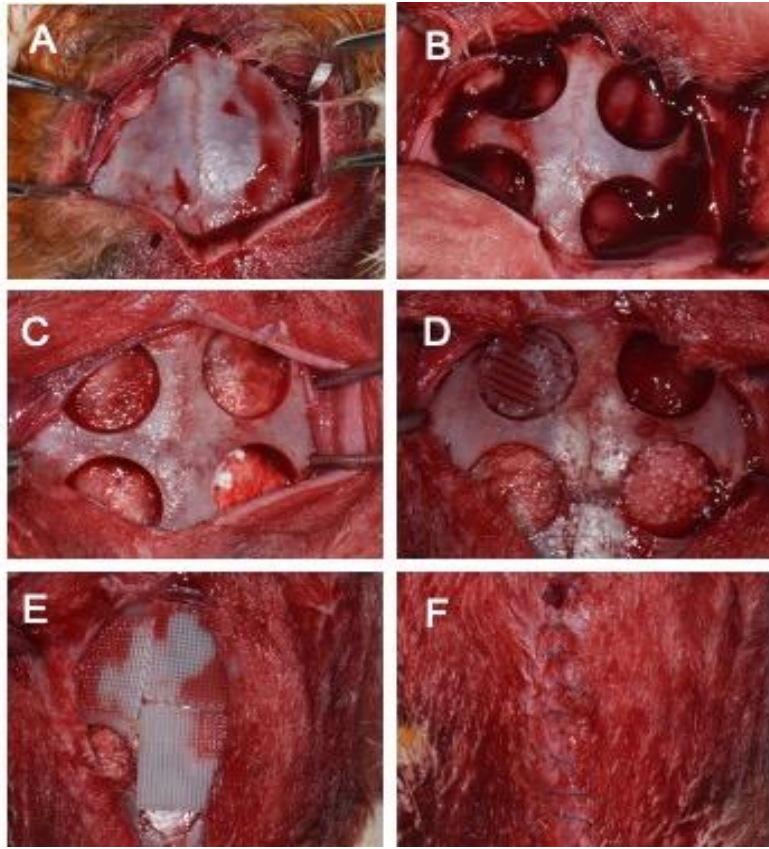


Figure 2. Surgical procedure. (A),(B) Four sites of bone defects were formed on the rabbit calvaria. (C) Collagen membrane[®] was applied under each defects. (D) Each materials were applied to the calvarial defect. (E) 3D printed membranes were placed on the defects except negative control site. (F) Primary suture was performed

6. 방사선학적 평가(Radiographic evaluation)

2주 및 6주 후에, 토끼를 희생시키고, 토끼의 두개부에서 골결손을 포함하는 골조직편을 채취하였다. 조직표본을 10% 포르말데히드에 고정하고 Micro-CT (Micro-Computed Tomography) 스캔으로 분석했습니다. Micro-CT 스캐닝은 한국기초과학연구원(KBSI, 광주, 한국)의 Quantum GX μ CT 이미징 시스템(PerkinElmer, Hopkinton, USA)을 사용하여 관전압 90 kV, 관전류 88 kA 및 복셀 크기 90 μ m의 조건에서 수행하였다. 스캔된 이미지는 Analyze 소프트웨어 12.0(AnalyzeDirect, Overland Park, USA)을 사용하여 3차원으로 재구성되었으며 모든 방향과 모든 너비의 결손부 내에서 광물화된 새로운 골조직의 부피를 평가하였다.

7. 조직학적 평가(Histological evaluation)

조직 표본을 10% 포르말데히드에 고정하고 15% 포르산을 사용하여 14일 동안 탈회하였다. 에탄올을 사용하여 탈수를 수행한 후 샘플을 파라핀에 포매하였다. 5 μ m 두께의 조직 파라핀 절편을 hematoxylin and eosin(H&E) 염색과 Masson's trichrome(MT) 염색으로 염색하였다. 절편은 광학현미경(Leica DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 조직학적으로 관찰하였고, 디지털 이미지는 디지털 현미경 카메라(Leica ICC50®, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 획득하였다.

8. 통계적 분석방법(Statistical analysis)

각 그룹의 실험값은 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었다. 데이터는 SPSS 18.0 Statistical analysis system(SPSS, Chicago, USA)으로 분석하였다. 실험군 간 차이의 통계적 유의성을 평가하기 위해 Kruskal-Williams 검정을 수행하였고, Mann-Whitney 검정을 통해 각 쌍의 집단 간의 통계적 유의성을 확인하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었으며, 신뢰 수준은 95%에서 검증하였다.

III. 실험 결과

1. 3차원적 프린팅된 차폐막과 스캐폴드의 특성평가 결과(Characterization evaluation)

Figure 3은 PCL/ β -TCP 스캐폴드의 SEM 이미지(상단 및 횡단면)를 보여줍니다. 이 결과는 제작된 스캐폴드가 균일한 기공 구조를 가진 형태를 나타냄을 보여준다. PCL/ β -TCP 스캐폴드의 기공 크기는 상단면에서 가로 및 세로에서 약 300 μ m 너비로 설계된 스캐폴드이며(Fig. 3B, 3E), 필라멘트의 직경에 따라 약 200 μ m 너비로 설계된 스캐폴드(Fig. 3A)와 약 500 μ m 너비로 설계된 스캐폴드(Fig. 3B)로 구분할 수 있다. 3차원 프린팅된 차폐막은 직경 약 200 μ m 너비로 설계된 스캐폴드로 제작되었고, 3차원 프린팅된 스캐폴드는 직경 약 500 μ m 너비로 설계된 스캐폴드로 제작되었다. 또한 PCL/ β -TCP 스캐폴드는 거친 표면을 나타낸다. 3차원 프린팅된 차폐막과 스캐폴드는 낮은 배율에서 보이는 큰 기공으로 구성되었다(Fig. 5a). 각 필라멘트의 전체 표면은 매끄럽고 그 위 표면에 칼슘(TCP)의 존재는 EDX를 사용하여 확인하였다. 이 이미지에서 Ca^{2+} 입자의 균일한 분포를 확인할 수 있었다(Fig. 4A, B). 또한 200 μ m 와 500 μ m 직경의 PCL 필라멘트에 존재하는 β -TCP의 결정구조는 XRD로 분석하였다(Fig. 5). β -TCP의 특징적인 주요 피크는 3차원 프린팅된 차폐막과 3차원 프린팅된 스캐폴드의 스펙트럼에서 확인 할 수 있었고, 이 결과는 PCL 고분자에 β -TCP 입자가 잘 혼입되었음을 증명해 주었다.

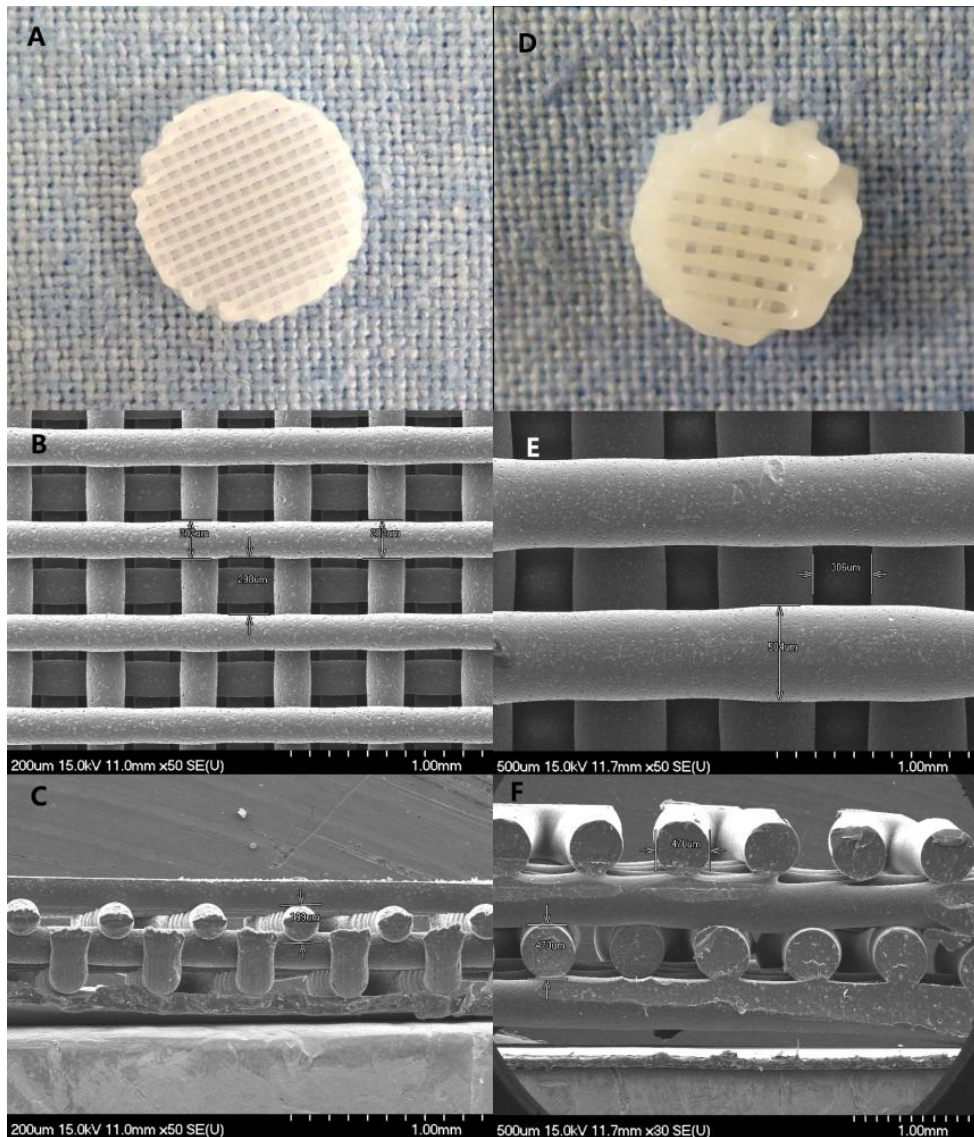


Figure 3. Field emission scanning electron microscope (FE-SEM) images of 3D printed membrane and scaffold. The surface morphology of 3D printed membrane and scaffold were observed using FE-SEM ($\times 50$, $\times 30$). A, 3D membranes were layed by $200\mu\text{m}$ of filaments; B, Upper view of 3D membrane using $200\mu\text{m}$ filaments; C, Side view of 3D membrane using $200\mu\text{m}$ filaments ; D, 3D scaffolds were layed by $500\mu\text{m}$ of filaments; E, Upper view of 3D scaffold using $500\mu\text{m}$ filaments; F, Side view of 3D scaffold using $500\mu\text{m}$ filaments.

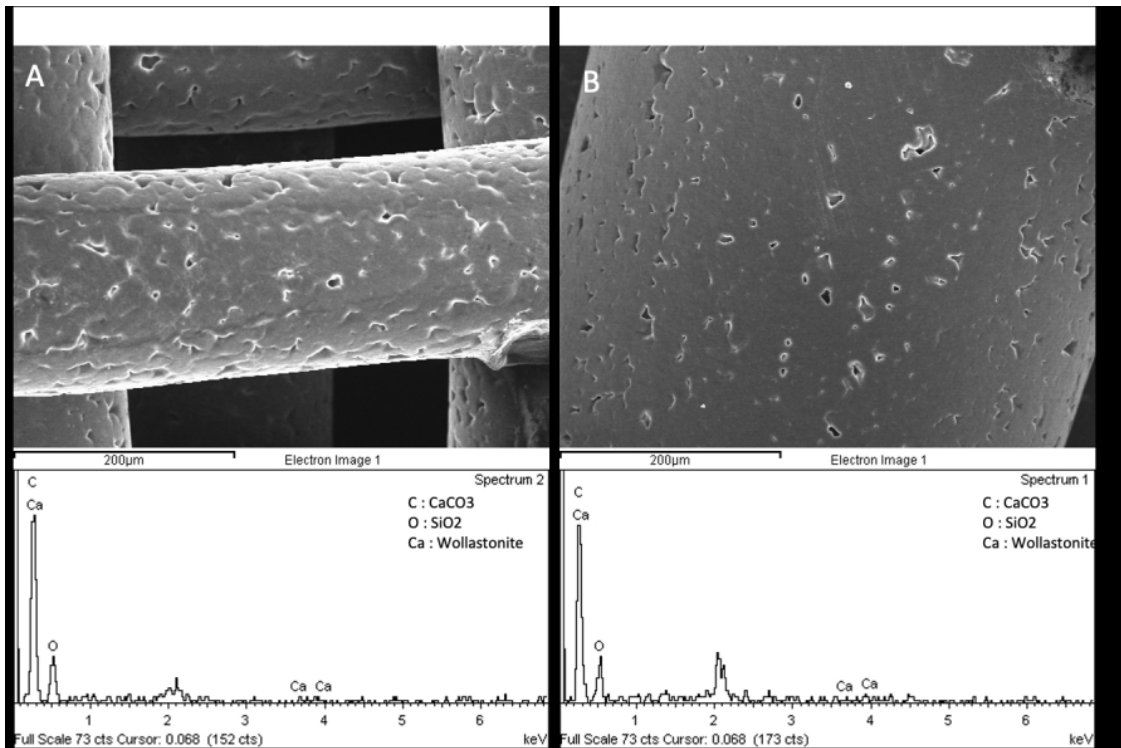


Figure 4. Energy Dispersive X-ray Spectrometer Analysis (EDX analysis). A, SEM micrograph and EDX spectrum of 3D membranes layed by 200µm of filaments; B, SEM micrograph and EDX spectrum of 3D scaffolds layed by 500µm of filaments. Bar=200µm

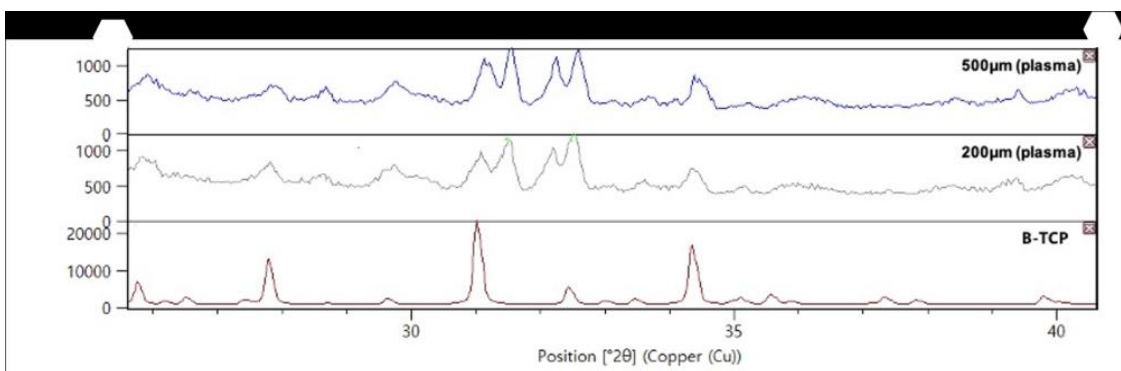


Figure 5. High Resolution X-ray Diffraction Analysis (XRD analysis). XRD patterns of the 200µm PCL filament (blue), 500µm PCL filament (green), β-TCP (brown).

2. 방사선학적 평가결과(Radiographic evaluation)

1) 2주후 결과(2 weeks)

2주 후의 골 결손부에 골이식재나 3차원 프린팅된 스캐폴드를 사용하지 않은 대조군에서 경조직이 가장 적게 형성되었고 DBBMC와 함께 3차원 프린팅된 차폐막을 사용한 실험군 1에서 신생골이 가장 많이 형성되었다(Fig. 6).

DBBMC과 3차원 프린팅된 차폐막을 이용한 실험군 1의 경조직 형성량은 $63.62 \pm 11.81 \text{ mm}^3$ 으로 나타났으며, 이는 대조군의 경조직 형성량 $12.53 \pm 0.87 \text{ mm}^3$ 과 비교하여 5배가량 높은 것으로 관찰되었다. 또한 3차원 프린팅된 차폐막만을 사용한 경우 경조직 형성량이 $24.66 \pm 12.32 \text{ mm}^3$ 로 대조군보다 2배 이상 많았고, 3차원 프린팅된 차폐막과 3차원 프린팅된 스캐폴드를 동시에 사용한 실험군 2는 경조직 형성량이 $19.97 \pm 3.9 \text{ mm}^3$ 인 것으로 나타났다(Table 1). 대조군과의 모든 실험군의 경조직 형성량은 서로 통계학적 유의성을 보이며($p=0.008$), 실험 1군에서 통계적으로 유의하게 가장 많은 양의 경조직이 형성되었으며($p=0.008$), 실험 2군과 실험 3군사이에는 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p=0.841$).

2) 6주후 결과(6 weeks)

6주 후의 골 결손부에 골이식재나 3차원 프린팅된 스캐폴드를 사용하지 않은 대조군에서 경조직이 가장 적게 형성되었고 DBBMC와 함께 3차원 프린팅된 차폐막을 사용한 실험군 1에서 신생골이 가장 많이 형성되었다(Fig. 7).

DBBMC과 3차원 프린팅된 차폐막을 이용한 실험군 1의 경조직 형성량은 $52.67 \pm 4.49 \text{ mm}^3$ 으로 나타났으며, 이는 대조군의 경조직 형성량 $27.25 \pm 5.35 \text{ mm}^3$ 과 비교하여 유의하게 5배가량 높은 것으로 관찰된다. 또한 3차원 프린팅된 차폐막만을 사용한 경우 경조직 형성량이 $46.69 \pm 11.59 \text{ mm}^3$ 로 대조군보다 1.7배 이상 많았고, 3차원 프린팅된 차폐막과 3차원 프린팅된 스캐폴드를 동시에 사용한 실험군 2는 경조직 형성량이 $44.25 \pm 6.61 \text{ mm}^3$ 인 것으로 나타났다(Table 2). 대조군과의 실험군 1, 2의 경조직 형성량은 서로 통계학적 유의성을 보이며($p=0.029$), 실험 1군에서 통계적으로 유의하게 가장 많은 양의 경조직이 형성되었으나 실험군 2, 3과 서로 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p=0.200$, $p=0.486$) 또한 실험 2군과 실험 3군사이에도 통계학적으로 유의한 차이는 측정되지 않았다($p=0.886$).

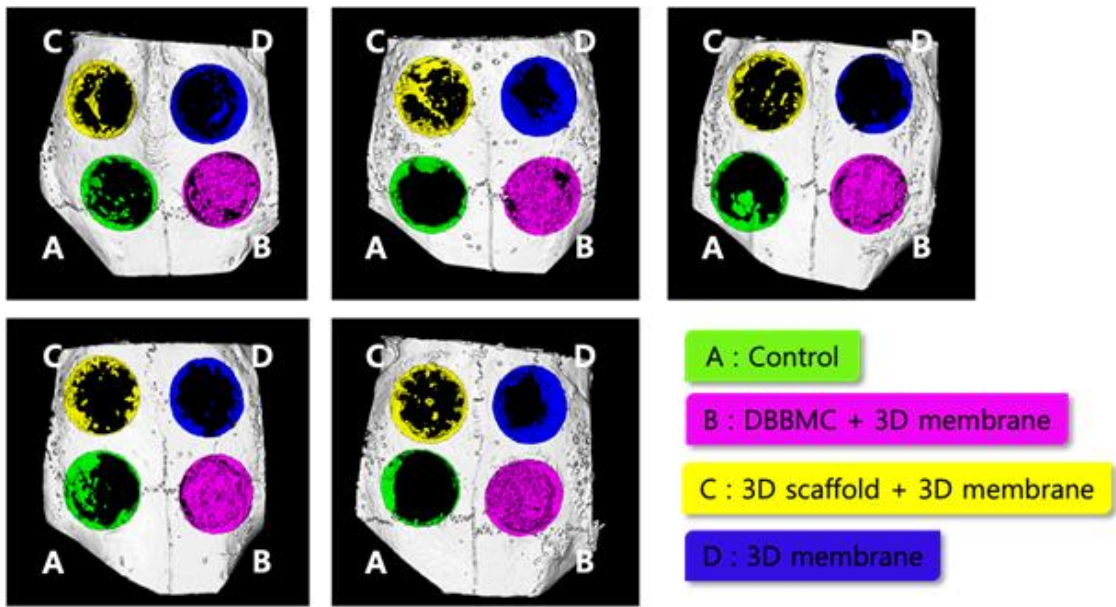


Figure 6. Micro-CT images in 2 weeks. After 2 weeks, the bone tissues were harvested and immediately fixed using 10% formaldehyde. After fixation, the bone tissues were subjected to Micro-CT analysis to evaluate bone regeneration at the clavicular defects. A, control group (No membrane and scaffold); B, experimental group 1 (DBBMC and 3D printed membrane); C, experimental group 2 (3D printed scaffold and 3D printed membrane); D, experimental group 3 (No scaffold and 3D printed membrane). DBBMC: deprotenized bovine bone mineral.

Table 1. Micro-CT analysis after 2 weeks

| Group (n=4) | Mean ± SD | Volume (mm ³) | | | |
|----------------|---------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | P value | | | |
| | | Control | Experimental 1 | Experimental 2 | Experimental 3 |
| Control | 12.53 ± 0.87 | - | - | - | - |
| Experimental 1 | 63.62 ± 11.81 | 0.008* | - | - | - |
| Experimental 2 | 19.97 ± 3.90 | 0.008* | 0.008* | - | - |
| Experimental 3 | 24.66 ± 12.32 | 0.008* | 0.008* | 0.841 | - |

Values are presented as mean±standard deviation.

Control group (No membrane and scaffold) ; Experimental group 1 (DBBMC and 3D printed membrane); Experimental group 2 (3D printed scaffold and 3D printed membrane); Experimental group 3 (No scaffold and 3D printed membrane). DBBMC: deprotenized bovine bone mineral.

* Statistically significant difference ($p < 0.05$) (Mann-Whitney U test)

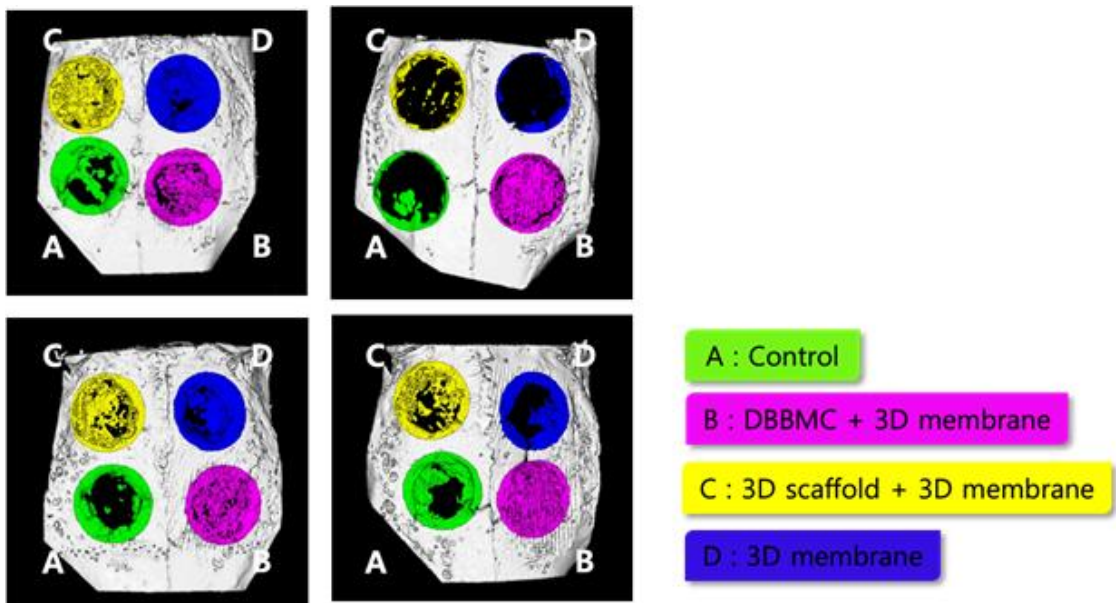


Figure 7. Micro-CT images in 6 weeks. After 6 weeks, the bone tissues were harvested and immediately fixed using 10% formaldehyde. After fixation, the bone tissues were subjected to Micro-CT analysis to evaluate bone regeneration at the clavicular defects. A, control group (No membrane and scaffold); B, experimental group 1 (DBBMC and 3D printed membrane); C, experimental group 2 (3D printed scaffold and 3D printed membrane); D, experimental group 3 (No scaffold and 3D printed membrane). DBBMC, deproteinized bovine bone mineral.

Table 2. Micro-CT analysis after 6 weeks

| Group (n=5) | Mean ± SD | Volume (mm ³) | | | |
|----------------|---------------|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | P value | | | |
| | | Control | Experimental 1 | Experimenta 1 2 | Experimental 3 |
| Control | 27.25 ± 5.35 | - | - | - | - |
| Experimental 1 | 52.67 ± 4.49 | 0.029* | - | - | - |
| Experimental 2 | 44.25 ± 6.61 | 0.029* | 0.200 | - | - |
| Experimental 3 | 46.69 ± 11.59 | 0.057 | 0.486 | 0.886 | - |

Values are presented as mean±standard deviation.

Control group (No membrane and scaffold) ; Experimental group 1 (DBBMC and 3D printed membrane); Experimental group 2 (3D printed scaffold and 3D printed membrane); Experimental group 3 (No scaffold and 3D printed membrane). DBBMC: deprotenized bovine bone mineral.

* Statistically significant difference ($p < 0.05$) (Mann-Whitney U test)

3. 조직학적 평가결과(Histological evaluations)

1) 2주후 결과(2 weeks)

2주군의 경우, 대조군의 골결손 부위에서 수직적인 두께가 현저히 감소된 불규칙한 결합 조직이 형성되었다. 실험 1군에서는 골이식재와 함께 결손부의 변연부에서부터 연속되는 신생골의 형성이 관찰되며 수직적인 두께는 주변의 기존골의 두께와 유사함을 확인하였으며, 결손부의 중앙으로 육아조직과 함께 신생골의 형성도 관찰된다. 실험 2군의 골결손부의 변연부에서는 신생골이 형성되었고, 3차원 프린팅된 차폐막 하방의 3차원 프린팅된 스캐폴드 사이에서는 신생골이 일부 형성되었고, 수직적으로 일정한 두께의 육아조직을 포함한 신생조직이 결손부 내에 관찰되었다. 실험 3군의 골결손부의 변연에서는 신생골이 형성되었고, 3차원 프린팅된 차폐막 하방에는 두께가 일정한 육아조직이 관찰되었다(Fig. 8).

2) 6주후 결과(6 weeks)

6주군의 경우, 대조군의 골결손부 내에서는 불완전하게 수복된 신생조직이 관찰되었다. 실험1군의 골결손부에서는 3차원 프린팅된 차폐막 하방과 골이식재 사이에서 지속적인 신생골형성이 관찰되며, 실험 2군의 골결손부에서는 3차원 프린팅된 차폐막 하방과 3차원 프린팅된 스캐폴드 사이에서 신생골 형성이 증가되는 것이 관찰되었다. 또한 실험 1군과 같이 균일한 두께의 신생골층을 형성하는 것으로 관찰되었다. 또한 실험 3군의 골결손부에서는 3차원 프린팅된 차폐막 하방에 신생골 형성이 관찰되나 신생조직의 두께는 기존의 골보다 수직적으로 얇았다(Fig. 9).

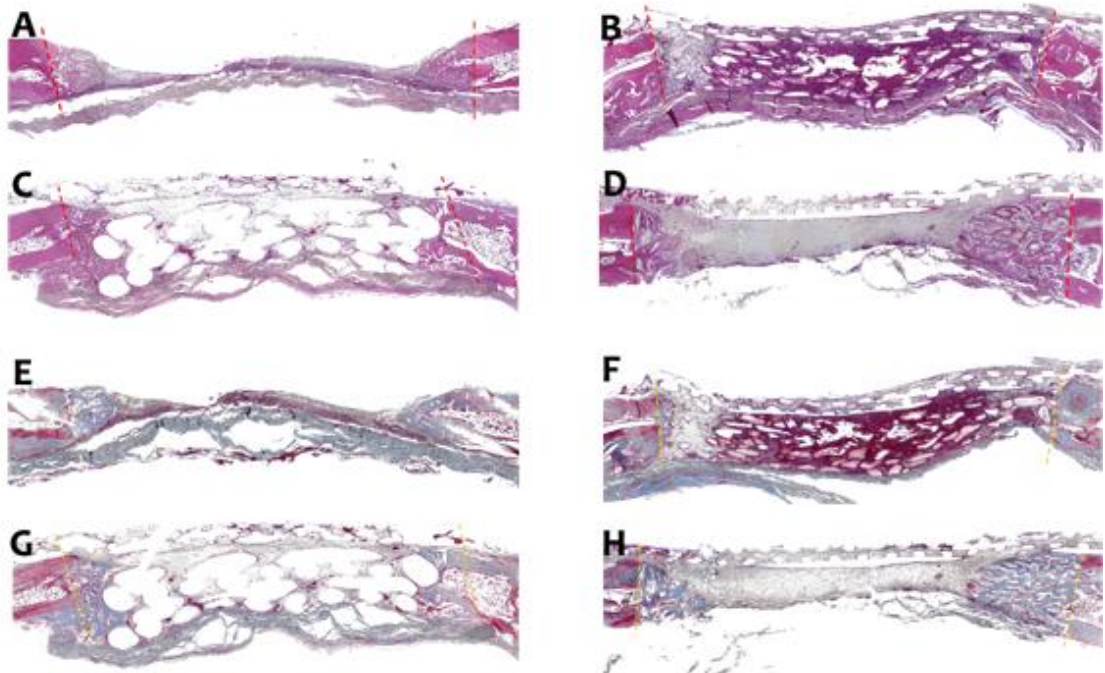


Figure 8. Histologic observation in 2 weeks experimental groups using H&E and MT staining. The bone paraffin sections were observed by histological evaluation using the H&E (A, B, C, D) and MT (E, F, G, H) staining (40 \times). A and E, In control group, a small amount of new bone was observed at the margin of bone defect (40 \times); B and F, In experimental group 1, a large amount of new bone was formed at the margin of bone defect compared to the control group (40 \times); C and G, The experimental group 2 confirmed that the thickness of new bone was formed similar to normal bone thickness under the membrane (40 \times); D and H, In the experimental group 3, new bone and connective tissue was formed at the margin of bone defect (40 \times). Black arrow heads, margin of bone defect; OB, original bone; NB, new bone; CT, connective tissue; G, bone graft.

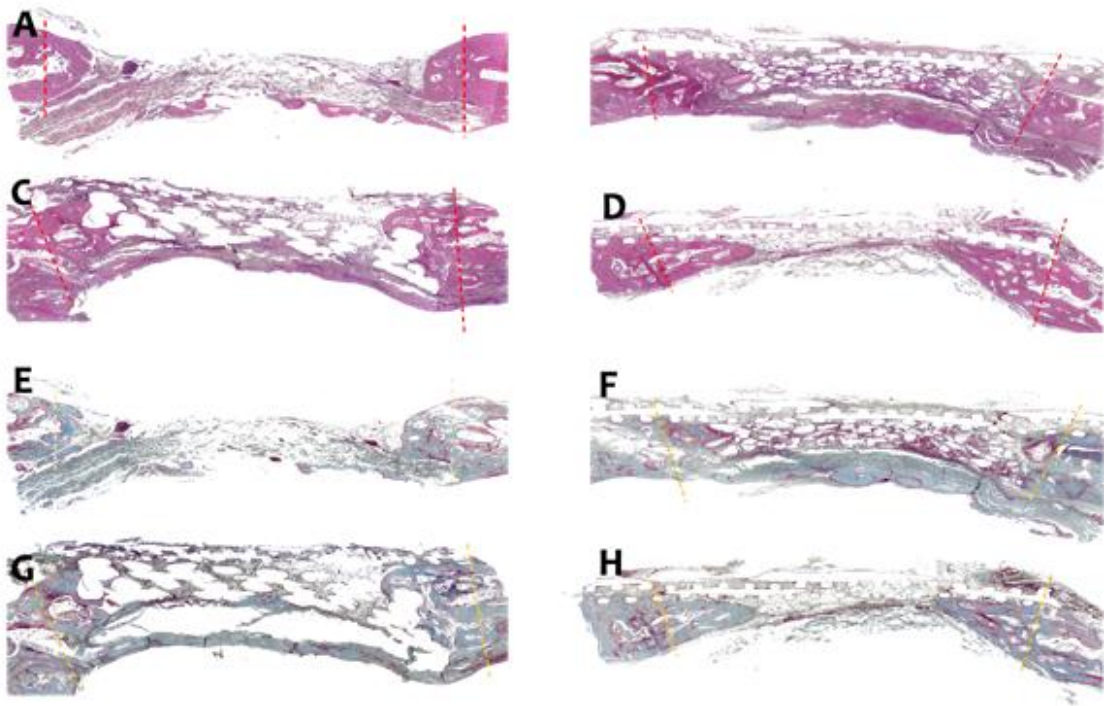


Figure 9. Histologic observation in 6 weeks experimental groups using H&E and MT staining. The bone paraffin sections were observed by histological evaluation using the H&E (A, B, C ,D) and MT (E, F, G, H) staining (40×). A and E, In control group, the formation of new bone was limited to the margin of bone defect and mostly filled with connective tissue (40×); B and F, In experimental group 1, a large amount of new bone was formed around bone graft material (40×); C and G, The experimental group 2 confirmed that the new bone was formed at the margin and center with more ossified bone than the 2 weeks group. (40×); D and H, In the experimental group 3 , the new bone with continuity was formed at the margin of bone defect, but the thickness of newly formed tissue was narrow(40×). Black arrow heads, margin of bone defect; OB, original bone; NB, new bone; CT, connective tissue; G, bone graft.

IV. 고찰

폴리머, 세라믹 및 복합 재료와 같은 많은 재료가 재생의학에서 3차원 스캐폴드를 제작하는 데 사용되지만[17], 치아 및 지지 조직 구성에 사용하는 재료는 그중 일부만을 사용한다. 합성 고분자는 생물학 분야에서 3차원 프린팅에 가장 일반적으로 사용하는 재료이며[16], 특히 PCL 및 그 변형된 복합 재료(천연 또는 합성 폴리머 및 세라믹 재료와 혼합된 PCL)는 3차원 프린팅된 치과 생체 구조에 가장 일반적인 사용되는 폴리머이다.

PCL은 식품의약국(FDA)에서 승인한 생체합성고분자로 생체적합성, 기계적 특성, 다양한 다른 중합체와의 혼화성 및 생분해성이 우수한 중요한 생체소재이지만[18], 조직 공학과 관련하여 느린 분해 속도, 열악한 기계적 특성 및 낮은 세포 접착력과 같은 몇 가지 단점을 지니고 있다. 인산칼슘 기반 세라믹과 생리활성 유리를 PCL에 결합하면서 기계적 특성이 현저히 개선되고, 생분해 속도도 조절할 수 있으며, 생체 활성을 향상시킬 수 있어서 골조직 공학에 적합한 하이브리드 생체 재료를 만들 수 있다[19].

Vaquette 등 [20]에 의해 의하면, PCL에 β -tricalcium phosphate(β -TCP, 20 wt.%)를 첨가하였을 때 PCL의 물성이 개선된다고 하였고, 스캐폴드는 인산칼슘 코팅을 통해서도 물성을 개선시킬 수 있다고 하였다[21]. Park 등은 25 wt/v의 PCL 용액을 솔리드스케이프(solidscape)에 용해하여 3D Rapid-prototyping 왁스 프린터를 통해 배양된 섬유 유도 지지체를 주조한바 있으며[22,23], 2014년 Lee 등은 120°C에서 용합된 PCL-하이드록시아파타이트(PCL:HA_p=90:10 wt%)를 28 게이지 금속 바늘을 통해 방사하여 치주 복합체 재생을 위한 인터레이드 가닥과 상호 연결된 마이크로채널을 생성한바 있다[24]. 또한 다른 연구는 맞춤형 3D 프린팅된 PCL 스캐폴드를 사용하여 후속 치주 결손을 치료한 보고가 있다[25]. 또한 치주 재생에서 직경 200 μ m의 상호 연결된 마이크로기공을 가진 PCL과 HA의 복합재료를 사용하여 인간 어금니 스캐폴드와 쥐 앞니 스캐폴드도 성공적으로 제작한 보고도 있다[26]. 이처럼 PCL을 이용하여 다양한 방법으로 치조골을 포함한 치주조직을 재생하려는 시도가 이루어지고 있는 실정이다.

이 연구에서 사용된 PCL 차폐막과 스캐폴드는 O₂ 플라즈마 에칭 방법을 통해 그 물성을 개선시켰다. Kook 등의 연구에 의하면, O₂ 플라즈마의 에칭시간이 증가함에 따라 PCL 지지체 표면의 거칠기와 친수성이 증가했고, 플라즈마 에칭된 샘플의 세포 증식 및 분화는 처리되지 않은 샘플보다 유의하게 증가했음을 보고하였다[27]. 또한 O₂ 플라즈마

에칭된 PCL 스캐폴드에서 초기 신생골 형성은 처리되지 않은 scaffolds보다 높았음을 보고하였다. 이러한 결과는 플라즈마 에칭을 통해 PCL 내부에 묻혀 있던 TCP 입자들이 외부로 노출되어 거칠기와 친수성이 증가했을 것으로 고려되며, 이러한 표면 특성이 세포의 증식이나 분화를 촉진시키며, 향후 골조직의 형성에 긍정적인 영향을 주었을 것으로 사료된다. 이 연구에서도 실험 2군에서 사용한 O₂ 플라즈마 처리된 PCL 스캐폴드의 내부에 골형성이 6주후에 관찰되며, 방사선학적 평가 결과 2주군에 비해 6주군에서 현저하게 증가된 골형성량을 관찰할 수 있는 것과 연관지어 생각해 볼 수 있다.

Kim 등은 Polyhydroxyethylmethacrylate (PHEMA)-polymethylmethacrylate (PMMA) 차폐막을 사용하여 토끼의 골결손부에 적용하였을 때, 2주후에 16.4±13.9%의 골형성량을 보였고, 8주후에는 50.3 ± 13.7%의 골형성량을 보였다고 보고하였다[28]. 이 연구에서 사용한 골결손부 크기가 직경 8mm, 높이 약 2mm로 전체 부피 총량을 약 100mm³로 생각해 볼 때, 그 2주후 및 6주후의 골형성량이 각각 평균 약 24.7%, 46.7%에 해당된다. 또한, Hong 등은 교차결합되지 않은 콜라겐 스폰지와 화학적으로 교차결합된 콜라겐막 그리고 ultraviolet으로 처리된 biphasic calcium phosphate (BCP)-교차 결합 콜라겐막의 골형성량을 비교한 연구에서 2주후 각각 평균 14.42mm³, 11.75mm³, 13.20mm³의 골형성량이 관찰되었고, 8주후에 각각 평균 29.52mm³, 29.88mm³, 31.47mm³의 골형성량을 보고하였다[29]. 이 연구에서는 3차원 프린팅된 PCL 차폐막을 사용하였고, 2주와 6주후에 콜라겐 막보다 더 많은 양의 골형성량을 보였다. 이에 대한 연구결과를 살펴보면 PCL 차폐막만을 사용하였을 때 2주후에 대조군에 비해 유의하게 증가된 골형성이 관찰되었지만, 6주후에는 통계적으로 유의하지 않지만, 대조군에 비해 더 많은 양의 신생골 형성량을 보였다. 이는 3차원적으로 제작된 PCL 차폐막이 상방에서 들어오는 연조직을 효과적으로 차단하고 주변 잔존골 변연에서부터 나오는 골세포들을 보호하여 신생골 형성을 할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 또한 PCL 차폐막과 함께 PCL 스캐폴드를 사용한 실험군에서는 DBBMC를 사용한 군에 비해 2주후에는 통계적으로 유의하게 적은 신생골 형성량을 보였지만, 6주후에는 2주군에 비해 골형성량이 증가하여, 골형성량을 비교하였을 때 DBBMC군과 통계적으로 유의하지 않는 정도의 수준까지 골형성이 이루어졌음을 관찰할 수 있었다. 또한 이 6주후 골형성량은 PCL 차폐막만을 사용한 군과 비교해 볼 때, 대조군에 비해 통계적으로 유의할 만한 정도까지 증가하였음을 관찰할 수 있었다. 하지만, 6주후 골형성량은 PCL 차폐막 단독으로 사용한 경우와 비교하였을 때 서로 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이러한 이유는 PCL 차폐막에 PCL 스캐폴드를 한꺼 사용된 군에서 표준편차가 PCL 차폐막만을 사용한 경우에 비해 적었기 때문일 것이다.

이 연구의 결과에서 DBBMC를 적용한 군에서 골형성량이 2주군에 비해 6주군에서 더 감소된 골형성량을 보였다. 이에 대해서는 2주후 방사선학적 평가에서 DBBMC를 사용하고 상방에 PCL 차폐막을 적용한 경우가 가장 많은 양의 골형성량을 보였으나, 이는 DBBMC가 지니고 있는 방사선불과성의 골이식재의 하이드록시아파타이트 성분에 의한 것으로 생각되며, 6주후에 그 골형성량이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이 점은 조직의 치유가 이루어짐에 따라 DBBMC의 골이식재의 일부가 흡수가 일어나면서 신생골이 형성되면서 나타나는 현상으로 사료된다. 이에 반해, PCL 차폐막과 스캐폴드는 PCL에 포함된 10%의 β -TCP에 의한 일부 방사선 불투과성을 제외하고 대부분 방사선 투과상을 나타내기 때문에 치유 초기에 골이식재를 사용한 경우보다 더 적은 골형성량을 나타낼 수밖에 없다. 이러한 점에서 DBBMC를 이용한 방사선학적 평가는 과대평가될 수 있고, 반면에 3차원적 PCL 차폐막과 스캐폴드의 방사선학적 평가는 과소 평가 될수 있는 가능성을 갖는다. 하지만, 2주후 치유와 비교하여 6주후의 골형성량의 연구 결과는 과소평가 될 수 있는 PCL 차폐막과 스캐폴드에서 DBBMC와 비교하여 더 많은 양의 골형성증가량을 나타냄을 보여준다. 이는 플라즈마 처리된 3차원적 차폐막과 스캐폴드가 골형성에 있어서 긍정적인 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

이 연구에서는 실험 2군에서 3차원 프린팅된 스캐폴드를 사용하였는데, Tamimi 등[30]의 동물실험에서 이식 8주 후 뉴질랜드 토끼의 종아리에 수직골 증대를 위한 자가 온레이 블록 이식편과 3D 인쇄된 모놀리식 모네타이트(무수 인산칼슘) 블록 이식편을 비교한 실험을 살펴보면, 수직 골 높이 증가에 대해서는 재료 간 유의한 차이가 관찰되지 않았음을 알 수 있다. 하지만 평균 골 부피 증가는 블록 이식편 그룹에서 유의하게 높았고 평균 잔류 이식편 부피는 3D 스캐폴드 그룹에서 유의하게 더 높았다고 보고하였다. 이러한 결과는 3D 프린팅된 모놀리식 모네타이트 블록 이식편이 자가 블록 이식편의 대안으로 사용될 가능성이 있지만, 다른 치유 및 흡수 패턴을 고려해야 함을 나타낸다. 이후 동물 연구[16]에서 유사한 방법을 사용하고 4mm와 3mm의 3D 인쇄 모놀리식 모네타이트 블록 이식편의 두 가지 다른 높이를 비교한 결과, 최대 높이 4mm의 골증대가 골형성 측면에서 가능하다고 하였다. 일반적으로 블록 이식편은 측면, 내측 및 하부 표면에서 더 많은 신생골 형성을 촉진시키고, 형성된 신생골은 기존의 골에서 가장 먼 중앙-상부 표면에서 가장 적게 형성되었다. 이 연구에서도 높이 2mm의 PCL 스캐폴드를 사용하였고, 조직학적 평가에서 인접 골결손부 및 중앙에서도 신생골이 형성됨을 관찰할수 있었다. 또한 다른 연구에서는 조직형태학적 분석에서 3mm 및 4mm 그룹에 대해 각각 40% 및 37%의 평균 신생골 형성 및 50% 및 55%의 평균 잔여 이식편 비율을 나타냈다고 보고하였으나[30] 이 연구에서는 잔여 이식편의 비율은 평가하지 않았으며, 신생골 형성량은 6주후에 44%의 평균 신생골형성을 나타냈다.

Mangano 등[32]은 동물 연구에서 양쪽 상악동 모델을 사용하여 45일 및 90일에 3차원 프린팅된 2상 인산칼슘복합체(70% β -TCP, 30% HA) 블록형태의 스캐폴드의 치유를 평가했다. 연구 결과, 이 3차원 프린팅된 스캐폴드는 상악동 내에서 스캐폴드의 완전한 결합이 있었고, 시간이 지남에 따라 신생골의 양이 증가하고, 스캐폴드 주변부가 결합 조직으로 주로 구성된 코어에 비해 다른 신생골이 형성되었으며, 높은 골 성숙도를 나타냈다. 현재 골재생을 위한 3차원 프린팅된 합성골 스캐폴드에 대한 근거가 동물 연구로 제한적인 결과이지만 이 가능성은 매우 높다. 이식편 제조를 위한 이러한 방법은 합성골 재료의 장점과 연관될 수 있다. 질병을 전파할 위험이 없고, 3차원 프린팅 기술을 이용할 수 있고, 높은 환자 수용도가 예상되며, 생체 재료 낭비를 줄일 수 있다. 또한 표면 형태 및 거대 다공성 구조를 최적화하는 기술과 수술 중 수술시간을 단축할 수 있고, 기존 재료 및 수술법과 유사한 골재생 및 임플란트 성공 결과를 갖는 3차원 프린팅된 스캐폴드를 제조할 수 있다.

이 연구의 한계점은 치유기간이 최대 6주로 장기간의 치유과정을 관찰하지 않았다는 점, 조직계측학적 평가를 통한 신생골양과 잔존 이식재의 비율을 평가하지 못했다는 점, 3차원 프린팅된 차폐막의 세포 적합성 실험을 하지 못했다는 점 등을 들 수 있다. 향후 3차원 프린팅된 차폐막의 구조적 특성에 따른 치유양상의 차이점을 평가하고 성장인자와 같은 단백질의 결합을 통해 제작된 차폐막의 효율을 높일 수 있는지에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

PCL을 이용하여 FDM 3D 프린터로 제작한 차폐막을 사용하여 골결손부에 적용하고 방사선학적으로, 조직학적으로 2주에서 6주에 평가하였다. 그 결과, 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다.

1. 방사선학적으로 3차원 프린팅된 차폐막을 사용한 군에서 2주와 6주후에 대조군에 비해 더 많은 양의 골형성을 나타낸다.
2. 방사선학적으로 3차원 프린팅된 차폐막하방에 3차원 스캐폴드를 사용한 군에서 2주와 6주후에 대조군에 비해 더 많은 양의 골형성을 나타낸다.
3. 조직학적으로 3차원 프린팅된 차폐막을 사용한 군과 3차원 스캐폴드를 함께 사용한 군에서 2주와 6주후에 골결손부 내부에서 활발한 신생골 형성이 나타난다.

이런 결론을 통해 3D 프린팅 기술을 활용하여 제작한 합성 이식재료가 향후 신생골 형성을 위한 치과용 생체소재로 유망할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—a materials perspective. *Dent Mater* 2012;28(7):703-21.
2. Levingstone TJ, Matsiko A, Dickson GR, O'Brien FJ, Gleeson JP. A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomater* 2014;10(5):1996-2004.
3. Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T, Takakura Y, et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials* 2005;26(20):4273-9.
4. Karfeld-Sulzer LS, Weber FE. Biomaterial development for oral and maxillofacial bone regeneration. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2012;38(5):264-70.
5. Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008;79(5):905-11.
6. Sanz-Sanchez I, Ortiz-Vigon A, Sanz-Martin I, Figuero E, Sanz M. Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Dent. Res.* 2015;94:128S-142S.
7. Jung RE, Fenner N, Hammerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin. Oral Implants Res.* 2013;24:1065-1073.
8. Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: A prospective case series in 25 patients. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 2013;33:299-307.

9. Moest T, Frabschka J, Kesting MR, Schmitt CM, Frohwitter G, Lutz R, Schlegel KA. Osseous ingrowth in allogeneic bone blocks applied for vertical bone augmentation: A preclinical randomised controlled study. *Clin. Oral Investig.* 2020;24:2867-2879.

10. Sanchez-Labrador L, Molinero-Mourelle P, Perez-Gonzalez F, Saez-Alcaide LM, Brinkmann JC, Martinez JL, Martinez-Gonzalez JM. Clinical performance of alveolar ridge augmentation with xenogeneic bone block grafts versus autogenous bone block grafts. A systematic review. *J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.* 2021;122:293-302.

11. Ye G, Bao F, Zhang X, Song Z, Liao Y, Fei Y, Bunpetch V, Heng BC, Shen W, Liu H, et al. Nanomaterial-based scaffolds for bone tissue engineering and regeneration. *Nanomedicine(Lond.)* 2020;15:1995-2017.

12. Park JY, Yang C, Jung IH, Lim HC, Lee JS, Jung UW, Seo YK, Park JK, Choi SH. Regeneration of rabbit calvarial defects using cells-implanted nano-hydroxyapatite coated silk scaffolds. *Biomater. Res.* 2015;19:7.

13. Xie Y, Li S, Zhang T, Wang C, Cai X. Titanium mesh for bone augmentation in oral implantology: Current application and progress. *Int. J. Oral Sci.* 2020;12:37.

14. Barber HD, Lignelli J, Smith BM, Bartee BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;65:748-752.

15. Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 2017;48:131-147.

16. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 2010;35:1217-1256.

17. Obregon F, Vaquette C, Ivanovski S, Hutmacher DW, Bertassoni LE. Three-dimensional bioprinting for regenerative dentistry and craniofacial tissue engineering. *J Dent Res.* 2015; 94: 143S-152S.

18.Labet M, Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chem Soc Rev.* 2009;38(12): 3484-3504.

19.Hajiali F, Tajbakhsh S, Shojaei A. Fabrication and properties of polycaprolactone composites containing calcium phosphate-based ceramics and bioactive glasses in bone tissue engineering: A review. *Polymer Reviews.* 2018; 58: 164-207.

20.Vaquette C, Fan W, Xiao Y, Hamlet S, Hutmacher DW, Ivanovski S. A biphasic scaffold design combined with cell sheet technology for simultaneous regeneration of alveolar bone/periodontal ligament complex. *Biomaterials.* 2012; 33: 5560-5573.

21.Costa PF, Vaquette C, Fan W, Xiao Y, Hamlet S, Hutmacher DW, Ivanovski S. Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the periodontal complex hierarchical structure. *J Clin Periodontol.* 2014;41: 283-294.

22.Park CH, Rios HF, Jin Q, Bland ME, Flanagan CL, Hollister SJ, Giannobile WV. Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces. *Biomaterials.* 2010;31: 5945-5952.

23.Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, Giannobile WV. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials.* 2012; 33: 137-145.

24.Lee CH, Hajibandeh J, Suzuki T, Fan A, Shang P, Mao JJ. Three-dimensional printed multiphase scaffolds for regeneration of periodontium complex. *Tissue Engineering. Part A* 2014;20: 1342-1351.

25.Rasperini G, Pilipchuk SP, Flanagan CL, Park CH, Pagni G, Hollister SJ, Giannobile WV. 3D-printed bioresorbable scaffold for periodontal repair. *J Dent Res.* 2015;94: 153S-157S.

26. Kim K, Lee CH, Kim BK, Mao JJ. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J Dent Res.* 2010;89:842-847.
27. Kook MS, Roh HS, Kim BH. Effect of oxygen plasma etching on pore size-controlled 3D polycaprolactone scaffolds for enhancing the early new bone formation in rabbit calvaria. *Dental Materials Journal* 2018; 37(4): 599-610.
28. Kim SM, Hwang YW, Kashif M, Jeong DS, Kim GH. Evaluation of Bone Regeneration on Polyhydroxyethyl-polymethyl Methacrylate Membrane in a Rabbit Calvarial Defect Model. *In Vivo.* 2016; 30 (5): 587-591.
29. Hong IP, Khalid AW, Pae HC, Song YW, Cha JK, Lee JS, Paik JW, Choi SH. Diverse patterns of bone regeneration in rabbit calvarial defects depending on the type of collagen membrane. *J Periodontal Implant Sci.* 2021;51(1):40-52.
30. Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Alkhraisat MH, Barraleta JE. Craniofacial vertical bone augmentation: a comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit. *Biomaterials.* 2009; 30:6318-26.
31. Tamimi F, Torres J, Al-Abedalla K, Lopez-Cabarcos E, Alkhraisat MH, Bassett DC, et al. Osseointegration of dental implants in 3D-printed synthetic onlay grafts customized according to bone metabolic activity in recipient site. *Biomaterials.* 2014;35:5436-45.
32. Mangano C, Barboni B, Valbonetti L, Berardinelli P, Martelli A, Muttini A, et al. In Vivo Behavior of a Custom-Made 3D Synthetic Bone Substitute in Sinus Augmentation Procedures in Sheep. *J Oral Implantol* 2015; 41:240-50.