creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2022년 8월

박사학위논문

토끼 두개골 결손부에서 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격의 골재생 효과

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

강 경 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

토끼 두개골 결손부에서 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격의 골재생 효과

Effect of Oxygen Plasma-treated PCL/β-TCP 3D Scaffolds on Bone Regeneration in Rabbit Calvarial Defects

2022년 8월 26일

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

강 경 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

토끼 두개골 결손부에서 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격의 골재생 효과

지도교수 유 상 준

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2022년 4월

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

강 경 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

강경민의 박사학위논문을 인준함

위원장 전남대학교 교 수 김 옥 수 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 병 옥 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 경 제 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 원 표 (인)

위 원 조선대학교 교 수 유 상 준 (인)

2022년 6월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT

I. 서론 ····· 1

II. 실험재료 및 방법 ····· 3

A. PCL/β-TCP 3차원 골격 제작 ····· 3

B. 산소 플라즈마 처리 ····· 3

C. 3차원 골격의 특성분석 ····· 4

D. 실험동물 ····· 4

E. 연구디자인 ····· 5

F. 수술절차 ····· 6

G. 방사선평가 ····· 7

H. 조직평가 ····· 8

I. 통계분석 ····· 8

III. 연구결과 ····· 9

A. 3차원 골격의 특성분석 결과 ····· 9

B. 임상적 관찰 결과 ····· 11

C. 방사선평가 결과 ····· 11

C. 조직평가 결과 ····· 18

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

IV. 토의 및 고찰 ····· 26

V. 결론 ····· 30

참고문헌 ····· 31

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. Photograph of 3D pirinting system and 3D scaffolds. ····· 4

Figure 2. Schematic diagram of rabbit calvarial defects. ····· 5

Figure 3. Surgical procedures. ····· 7

Figure 4. FE-SEM images of oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffolds. ····· 10

Figure 5. HR-XRD spectra. ····· 10

Figure 6. Micro-CT images of calvarial defects at 2 weeks. ····· 13

Figure 7. Micro-CT images of calvarial defects at 6 weeks. ····· 13

Figure 8. Comparison of total augmented volume at 2 weeks. ····· 15

Figure 9. Comparison of total augmented volume at 6 weeks. ····· 17

Figure 10. Histologic images at 2 weeks; H&E and MT staining (magnification of x4). ····· 20

Figure 11. Histologic images at 2 weeks; H&E staining (magnifications of x40 and 100). ····· 21

Figure 12. Histologic images at 2 weeks; MT staining (magnifications of x40 and 100). ····· 22

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 13. Histologic images at 6 weeks; H&E and MT staining (magnification of x4). ····· 23

Figure 14. Histologic images at 6 weeks; H&E staining (magnifications of x40 and 100). ····· 24

Figure 15. Histologic images at 6 weeks; MT staining (magnifications of x40 and 100). ····· 25

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Control and experimental group. ····· 5

Table 2. Micro-CT analysis at 2 weeks. ····· 14

Table 3. Micro-CT analysis at 6 weeks. ····· 16

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Effect of Oxygen Plasma-treated PCL/β-TCP 3D Scaffolds on Bone Regeneration in Rabbit Calvarial Defects

Kang Kyung-Min
Advisor: Prof. Yu Sang-Joun, D.D.S., Ph.D.
Department of Dentistry
Graduate School of Chosun University

I. Introduction

To place implants in a prosthetically driven position for patients with severe alveolar bone defects, it is necessary to perform additional bone augmentation procedures. A variety of studies regarding bone regeneration using scaffolds fabricated by 3D (Three-dimensional) printing technique have been done actively. PCL (Polycaprolactone) is widely used to as biocompatible and biodegradable scaffold materials for bone tissue engineering. Bone regeneration capacity of PCL scaffolds can be improved by plasma treatment or the addition of bioceramics such as β-TCP (β-Tricalcium phosphate). Meanwhile, it has been reported that the architectural properties of 3D scaffolds influence osteogenesis *in vivo*. The purpose of this study is to evaluate the effect of two types of oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffolds on bone regeneration in rabbit calvarial defects.

II. Materials and Methods

The PCL/β-TCP 3D scaffolds were fabricated using 3D printer. The 3D scaffolds were prepared with strut size of about 200 μm and 500 μm, respectively. Then surfaces of 3D scaffolds were etched with oxygen plasma. Characterization of 3D scaffolds was examined by FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy) and XRD (X-ray diffraction). Ten New Zealand White rabbits were used in this

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

study. Four circular defects with a diameter of 8 mm were created in rabbit calvarium. Resorbable membranes were applied under the bone defects. The groups were as follows: (1) Negative control, (2) Positive control: DBBMC (Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen), (3) 200 μm Scaffold: Oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffold with strut size of about 200 μm, (4) 500 μm Scaffold: Oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffold with strut size of about 500 μm. Animals were sacrificed at 2 weeks and 6 weeks. The specimens were analyzed using micro-CT imaging and histological processing.

III. Results

The FE-SEM results showed porous scaffold architecture and the XRD results indicated that β-TCP particles were well-embedded into the scaffolds. Micro-CT views showed significantly more total augmented volume in 500 μm scaffold group compared to negative control group and 200 μm scaffold group at 2 weeks and 6 weeks. Also, total augmented volume in 500 μm scaffold group was less at 2 weeks and similar at 6 weeks compared to that in DBBMC group, but there was no significant difference. In histologic evaluation, the following results were obtained in DBBMC group, 200 μm scaffold group, and 500 μm scaffold group at 2 weeks and 6 weeks. Osteoid formation and bone regeneration was observed at the margin of bone defect toward the center of graft materials or scaffolds. In DBBMC group, new bone tissue was regenerated to forms of surrounding DBBM particles. In 200 μm scaffold group, new bone tissue was observed primarily along the upper part and lower part of scaffolds, but slightly between layer and layer. In 500 μm scaffold group, new bone tissue was observed between layer and layer as well as along the upper part and lower part of scaffolds.

IV. Conclusion

These results demonstrate that oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffold with strut size of about 500 μm seems to have enhanced bone regeneration capacity in rabbit calvarial defects. Further studies concerned with optimization of scaffold architecture for improving bone regeneration are needed.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

I. 서론

심미적이고 기능적인 임플란트의 수복을 위해서는 보철물 중심의 위치에 임플란트를 식립하는 것이 중요하다 [1]. 하지만 치주질환, 외상, 병소 제거, 선천적 이상, 의치의 오랜 사용 등으로 인하여 심한 골결손이 발생한 경우 이러한 이상적인 위치에 임플란트를 식립하는 것이 어려워지게 된다. 이를 해결하기 위해 골증대술을 시행하게 되는데, 그 중 입자형 골이식재와 차폐막을 사용하는 골유도재생술(Guided bone regeneration; GBR)은 오늘날 가장 널리 이용되고 예지성 있는 방법이다 [2]. Wang 등이 보고한 "PASS" 원리에 따르면 일차창상폐쇄, 혈관신생, 공간유지, 창상과 임플란트의 안정화는 GBR의 성공에 있어 중요한 4가지 생물학적 원칙이다 [3]. 하지만 입자형 골이식재의 경우 자체 특성으로 인하여 공간유지와 안정화에 대한 한계점이 존재하게 된다. 특히 심한 골결손부에서는 이러한 점 때문에 골재생에 어려움이 있어 이를 극복하기 위한 다양한 방법과 재료가 고안되기도 하였다 [4]. 이와 관련하여 최근 조직공학 기술을 활용한 3차원 골격으로 골이식재를 대체하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

골격은 흔히 3차원 프린팅이라 알려진 기술을 통해 제작될 수 있는데, 이는 3차원 모델 데이터를 이용해 CAD (Computer-aided design) 도면에 따라 재료를 연속적으로 적층하는 방식으로 3차원 물체를 제조하는 프로세스를 말한다 [5]. 쾌속조형(Rapid prototyping; RP)에서 유래한 이 기술의 공식 명칭은 2009년 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials; ASTM)에서 적층가공(Additive manufacturing; AM)으로 정의하였으며, 재료를 자르거나 깎는 방식의 절삭가공과는 대비되는 개념이라 할 수 있다. ASTM은 적층 방식에 따라 AM 기술을 7가지로 분류하였다 [6]. 그 중 재료압출 방법은 필라멘트나 펠릿 형태의 열가소성 재료를 고온으로 녹여 압력을 가해 노즐로 압출하는 방식으로 FDM (Fused deposition modeling)이 여기에 해당된다. 이것은 가장 보편적인 3차원 프린팅 기술이며, 조작과 처리가 쉽고 기계적 특성, 다공성, 포어 모양에 대한 조절이 가능하다는 특징이 있다 [7].

골격을 조직재생에 이용하기 위해서는 몇 가지 생물학적, 기계적 요구사항을 만족해야 한다. 골격은 생체적합성이 있어야 하며, 조직이 재생되면서 대체될 수 있도록 생분해가 가능해야 한다. 또한 적절한 크기와 모양의 포어가 상호연결되어 세포의 성장에

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

유리한 환경을 조성해야 하며, 조직이 재생될 수 있는 공간을 제공하면서 세포친화적인 표면과 충분한 기계적 지지를 가져야 한다 [8-10].

PCL (Polycaprolactone)은 골격의 재료로 널리 사용되는 합성 고분자로, 생체적합성과 생분해성이 우수한 특성이 있다. 하지만 소수성으로 인하여 생체 내에서 분해되는데 2-3년이 걸릴 정도로 분해속도가 느리며 세포친화성이 떨어지기 때문에 단독 사용보다는 세라믹과 혼합하여 사용하는 경우가 많다 [11]. 바이오 세라믹 재료인 β-TCP (β-Tricalcium phosphate)는 실제 골의 조성과 유사하여 구조적 안정성이 있으며, PCL과 같은 고분자에 첨가하였을 경우 친수성과 골전도능을 향상시키고 분해속도의 개선에도 기여하기 때문에 골형성을 촉진시킬 수 있다 [12, 13]. 또한 산소 플라즈마 처리와 같은 표면개질은 골격 표면에 산소 기능기의 숫자를 증가시키고, 표면 거칠기도 향상시켜 친수성과 세포친화성을 높이는 역할을 할 수 있다 [14].

골재생과 관련하여 3차원 골격의 다공성, 상호연결, 포어 크기, 포어 모양, 투과성과 같은 구조적 성질들이 골형성에 영향을 미친다는 것이 널리 알려져 있다 [15]. 골재생에 최적인 골격을 제작하기 위해 이러한 요소들이 어떻게 영향을 미치는지에 대해 이해하고, 그것을 제어하는 방법을 아는 것은 중요하다. 하지만 이러한 사항들이 아직 완전히 밝혀지지 않았으며, 더욱이 *in vitro* 연구에 비해 *in vivo* 연구는 충분하지 않은 실정이다.

이 연구의 목적은 토끼의 두개골 결손부에서 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격의 골재생 효과에 대해 방사선 및 조직평가를 시행하고 두 가지 스트럿 크기를 갖는 3차원 골격에 대해 평가하고자 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

II. 실험재료 및 방법

A. PCL/β-TCP 3차원 골격 제작

PCL/β-TCP 3차원 골격은 재료압출 방식의 3차원 프린터 (3D Bio Printer™, M4T-100, M4T, Daegu, Korea)를 이용하여 제작되었다 (Fig. 1A). PCL 펠릿을 가열 실린더 내에서 80 ℃로 녹이고, 10 wt%의 β-TCP를 첨가한다. 용융된 PCL/β-TCP 혼합물은 분당 100 mm의 속도로 노즐을 통해 압출되며, 이때 노즐 사이즈는 200 μm와 500 μm로 각각 설정하였다. 압출되는 스트럿을 0 또는 90° 방향으로 적층하여 stagger-type이 되도록 하고, 각 층에서 스트럿 간의 간격을 300 μm로 하여 총 4층으로 구성된 골격을 제작하였다. 이 3차원 골격은 스트럿 크기에 따라 다음과 같이 두 가지로 구분된다.

· 200 μm 골격: 스트럿 크기가 약 200 μm이고, 포어 크기는 300 μm인 disk 형태 (직경 8 mm, 높이 약 0.8 mm)
· 500 μm 골격: 스트럿 크기가 약 500 μm이고, 포어 크기는 300 μm인 disk 형태 (직경 8 mm, 높이 약 2.0 mm)

B. 산소 플라즈마 처리

제작된 PCL/β-TCP 3차원 골격은 표면에칭을 위하여 비등방성 식각 조건 하에서 산소 플라즈마로 처리되었다. 산소 플라즈마 처리를 위해 RF (Radio frequency) 13.56 MHz의 CCP (Capacitively coupled plasma) 타입의 장비 (Miniplasma Station, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, RIE (Reactive ion etching) 방식이 적용되었다. 산소 플라즈마 처리 조건은 다음과 같다; RF 방전 출력 = 100 W, 산소가스 유량 = 20 sccm, 작동압력 = 100 mTorr, 처리시간 = 3분.

Fig. 1B, 1C는 이번 연구에 사용될 두 가지 3차원 골격 사진을 나타낸 것이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

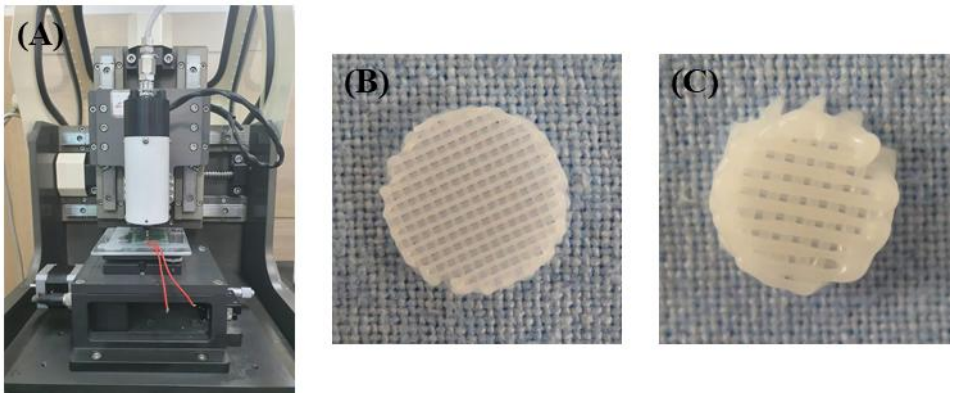

Figure 1. Photograph of 3D pirinting system and 3D scaffolds. (A) 3D Bio Printer™. (B) 200 μm scaffold. (C) 500 μm scaffold.

C. 3차원 골격의 특성분석

구조적인 형태분석을 위해 FE-SEM (Field emission scanning electron microscope, S-4800 Hitachi, Japan)을 이용하여 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격을 가속전압 15.0 kV에서 30X, 50X의 확대율로 관찰하였다. 또한 PCL 골격에서 β-TCP의 존재를 확인하기 위하여 XRD (X-ray diffraction, D8 Advance, Bruker, Germany)을 이용하여 Cu-kα 선 (λ = 1.542 Å)으로 26-40°의 2Θ 범위에서 X-선 회절패턴을 측정하였다.

D. 실험동물

이 연구에서는 총 10마리의 New Zealand White 토끼 (체중 2.5~3.5 kg)가 사용되었다. 모든 토끼는 각각 서로 다른 우리에서 자유롭게 활동하도록 하였으며, 표준적인 환경 조건과 식이 조건 하에서 사육되었다. 실험동물의 선택, 관리, 마취와 수술 전후 처치, 수술 과정, 안락사 등의 모든 절차는 조선대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (승인번호: CIACUC2019-S0009) 하에 진행되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

E. 연구디자인

토끼 두개골에 직경 8 mm의 원형 결손부를 4개 형성하고, 결손부 하방에 흡수성 차폐막 (Collagen Membrane®, GENOSS, Suwon, Korea)을 적용하였다. 실험은 다음과 같이 4개의 군을 형성하여 진행하였고, 각 결손부에 해당되는 재료를 위치시켰다 (Table 1, Fig. 2).

Table 1. Control and experimental group.

Group	Materials
Negative control	Nothing
DBBMC (Positive control)	DBBMC (Bio-Oss® Collagen, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)
200 μm Scaffold	Oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffold with strut size of about 200 μm
500 μm Scaffold	Oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffold with strut size of about 500 μm

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen;
PCL: Polycaprolactone; β-TCP: β-Tricalcium phosphate.

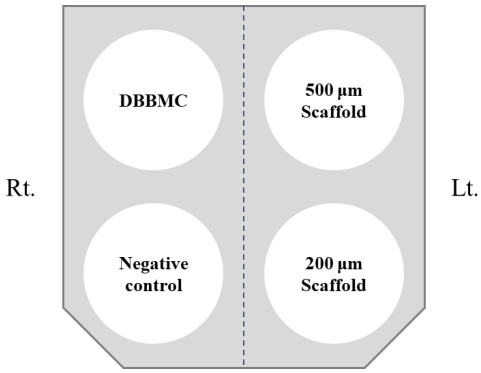

Figure 2. Schematic diagram of rabbit calvarial defects.
DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5마리의 토끼는 술 후 2주째에 희생시키고, 다른 5마리의 토끼는 술 후 6주째에 희생시켜 분석에 사용될 표본을 얻었다.

F. 수술절차

토끼의 전신마취를 위하여 5 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar®, Yuhan, Seoul, Korea)와 15 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer Korea, Seoul, Korea)의 혼합물을 근육주사하였다. 수술 부위를 제모한 뒤 povidone iodine으로 소독하고, 2% lidocaine (lidocaine HCl, Huons, Seoul, Korea)을 사용해 국소마취를 시행하였다. 충분히 마취가 된 이후에 시상 정중선 부위의 절개를 시행하고, 전층판막을 거상하여 토끼의 두개골을 노출시켰다. 4개의 원형 결손부를 형성하기 위하여 직경 8 mm의 trephine bur (3i, USA)를 주수 하에 사용하였고, 두개골 하방의 조직손상이 최소화되도록 하였다. 모든 결손부 하방에 흡수성 차폐막을 적용시켜 경막과 분리되도록 하고, 결손부 내에는 계획된 네 가지 군에 해당되는 재료를 위치시켰다. Negative control 군에는 다른 재료 없이 혈병만 차오르게 하였고, DBBMC 군에서는 DBBMC를 수술용 칼날로 자르고 수화시킨 뒤 몰트큐렛으로 누르고 다듬어 disk 형태의 이식재가 결손부에 위치되도록 하였다. 200 μm Scaffold와 500 μm scaffold 군에는 제작된 두 가지 3차원 골격을 위치시켰다. 이후 흡수성 봉합사 (5-0 Vicryl, Ethicon, Somerville, USA)로 골막이 재위치되도록 수평누상봉합을 시행하고, 비흡수성 봉합사 (4-0 Blue Nylon, AILEE, Busan, Korea)로 두피에 연속봉합을 시행하였다 (Fig. 3). 술 후 3일간 감염을 막기 위해 1 mg/kg Gentamicin (Dongwha Pharm, Seoul, Korea)을 근육주사하였다. 술 후 2주와 6주째에 1 mg/kg potassium chloride (KCL-40 inj., Daihan Pharm, Seoul, Korea)을 토끼의 심장에 주사하여 희생시켰다. 토끼 머리에 전층판막을 거상하여 두개골을 노출시키고, cutting disc bur (Komet dental, Lemgo, Germany)를 사용하여 전체 골결손부의 조직편을 채취하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

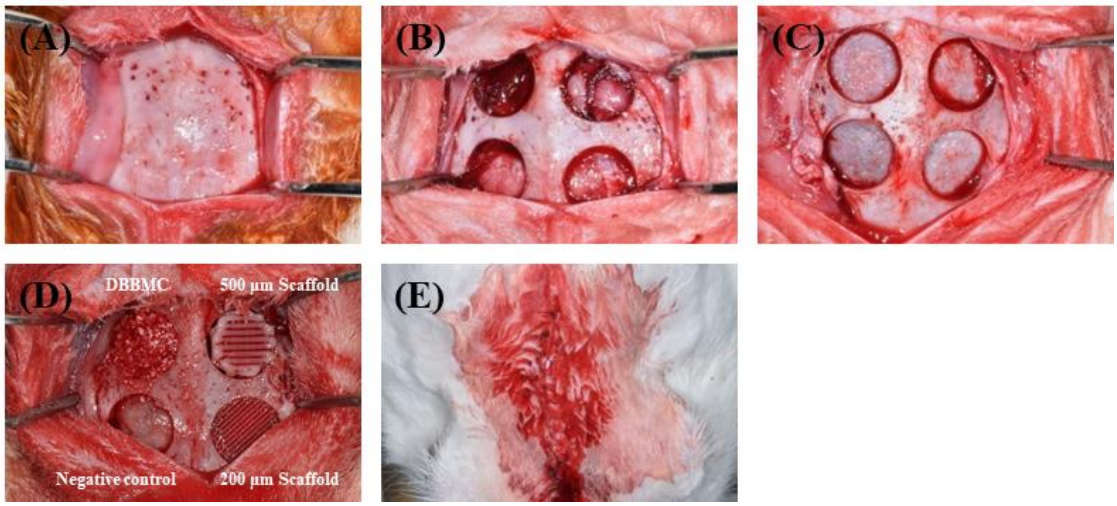

Figure 3. Surgical procedures. (A) A full-thickness flap was elevated and cranial bone was exposed. (B) Four circular defects with a diameter of 8 mm were created in rabbit calvarium. (C) Resorbable membranes were applied under the bone defects. (D) Each experimental materials were placed into the bone defects. (E) The flaps were repositoned and sutured to accomplish primary closure.
DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

G. 방사선평가

채취한 골조직편을 10% formaldehyde에 고정하고, micro-CT (Micro-computed tomography)을 이용해 분석하였다. 한국기초과학지원연구원 (Korea Basic Science Institute; KBSI)의 Quantum GX μCT imaging system (PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA)이 micro-CT 촬영을 위해 사용되었다. 이때 x-ray 광원은 90 kV의 관전압과 88 μA의 관전류, 그리고 90 μm의 voxel 크기로 설정하였다. 스캐닝 후 이미지는 Analyze software 12.0 (AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)을 이용해 3차원적으로 재구성되었고, 이를 활용해 모든 방향과 폭으로 결손부 내의 광화된 신생골조직의 부피를 평가하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

H. 조직평가

10% formaldehyde에 고정된 골조직편은 14일간 15% formic acid에서 탈회되었다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거친 뒤 각 원형 결손부의 중앙에서 절단하여 5 μm 두께의 조직절편을 제작하였다. 조직염색으로는 H&E (Hematoxylin and eosin) 염색 및 MT (Masson's trichrome) 염색을 시행하였다. 제작된 표본은 디지털카메라 (Leica ICC50, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)가 장착된 광학현미경 (Leica DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 통해 관찰되었고, 조직사진을 촬영하여 조직평가를 시행하였다.

I. 통계분석

통계분석은 SPSS software (IBM SPSS statistics 28, IBM Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 수행되었다. Micro-CT volume의 결과값은 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시점에서 4개 군의 비교를 위해 비모수 검정인 Kruskal-Wallis 검정을 사용하였으며, $p<0.05$ 일 때를 통계적 유의성이 있다고 설정하였다. 사후검정으로는 Mann-Whitney U 검정과 함께 Bonferroni correction ($\alpha=0.05/6=0.0083$)을 시행하여 각 군들 간의 비교를 시행하였다 ($p<0.0083$).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

III. 연구결과

A. 3차원 골격의 특성분석 결과

Fig. 4는 두 가지 3차원 골격의 FE-SEM 이미지를 나타낸 것이다. FE-SEM 상단면 이미지로부터 스트럿의 직경을 나타내는 스트럿 크기와 스트럿 간의 거리를 나타내는 포어 크기를 확인할 수 있는데, 200 μm 골격에서 각각의 크기는 약 200 μm와 약 300 μm 였고, 500 μm 골격에서 각각의 크기는 약 500 μm와 약 300 μm 였다 (Fig. 4A, 4C). FE-SEM 횡단면 상에서는 같은 방향으로 배열된 층 (1, 3층 / 2, 4층) 사이의 수직적 거리를 통해 z-방향의 포어 높이를 확인할 수 있었다. 적층시 스트럿 간에 일정 부분 겹쳐지는 것을 고려하여 200 μm 골격의 경우 200 μm보다 약간 작게, 500 μm 골격도 500 μm보다 약간 작게 포어 높이가 관찰되었다 (Fig. 4B, 4D). 전체적으로 3차원 골격은 0/90° lay-down pattern과 stagger-type의 형태로 제작된 네 층의 구조를 보여주며, 상호연결된 포어와 함께 규칙적인 배열을 보였다.

Fig. 5는 500 μm 골격과 200 μm 골격, 그리고 β-TCP의 XRD 패턴을 보여준다. β-TCP의 XRD 패턴에서 나타난 특징적인 피크는 500 μm 골격과 200 μm 골격의 XRD 패턴에서도 관찰되었다. 이를 통해 PCL 골격 내에 β-TCP가 잘 도입되어 존재함을 확인할 수 있었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

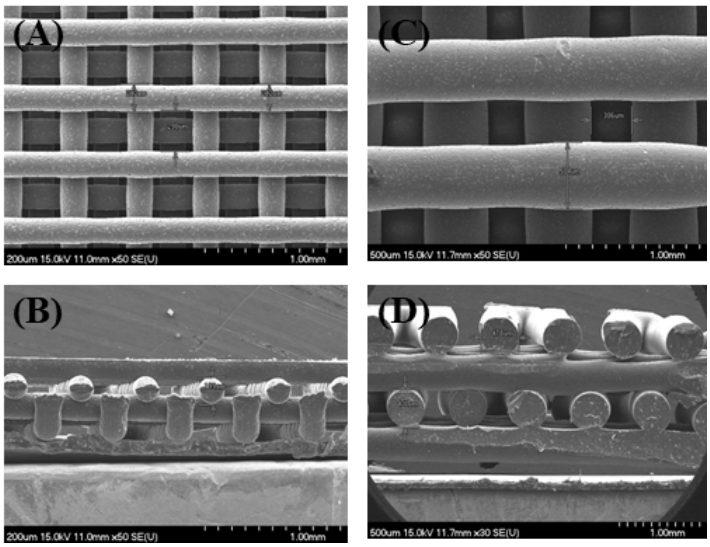

Figure 4. FE-SEM images of oxygen plasma-treated PCL/β-TCP 3D scaffolds. Top view of 200 μm scaffold (A) and 500 μm scaffold (C). Cross-sectional view of 200 μm scaffold (B) and 500 μm scaffold (D).

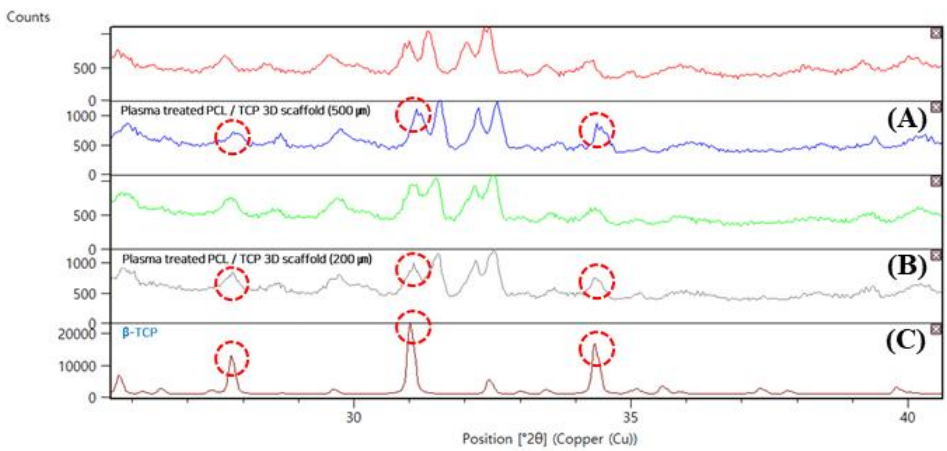

Figure 5. HR-XRD spectra. (A) 500 μm scaffold. (B) 200 μm scaffold. (C) β-TCP.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 임상적 관찰 결과

수술 후 2주와 6주의 치유기간 동안 실험동물에서 특기할 합병증 발생하지 않았으며, 수술 부위의 치유도 양호하게 이루어졌다. 또한 희생 전까지의 전체기간 동안 건강 상태에 이상 없이 잘 사육되었다. 희생 후 채취한 골조직편에서 신생조직의 형성이 관찰되었으며, 잔존한 DBBMC 입자 및 3차원 골격이 신생조직과 혼재되어 보였다. 또한 자연골과 신생조직이 만나는 경계부가 구별되어 보였으며, 2주에 비해 6주에서 경계부가 좀 더 불명확하게 보였다.

C. 방사선평가 결과

2주와 6주째에 각 개체에서 채취한 골조직편의 micro-CT 이미지를 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내었다. 모든 군에서 광화된 신생골조직의 형성이 관찰되며, 신생골형성의 전반적인 양상은 원형 결손부의 변연측에 존재하는 기존 골로부터 중심부를 향해 이루어지는 것으로 나타났다.

Micro-CT volume 값에 대한 통계분석 결과를 Table 2와 Table 3에 정리하여 나타내었다. 2주 실험과 6주 실험에서 유사한 결과가 나타났다.

2주 실험에서 신생골형성을 포함한 총 증대량의 평균 부피 값은 크기순으로 다음과 같다; DBBMC 군 = 67.016±11.867 mm^3, 500 μm scaffold 군 = 36.222±12.935 mm^3, 200 μm scaffold 군 = 18.196±3.883 mm^3, negative control 군 = 16.486±3.054 mm^3. Positive control 군인 DBBMC 군에서 가장 많은 골증대량이 관찰되었으며, negative control 군에서 가장 적은 골증대량이 관찰되었다. 4개 군 간에는 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (p=0.001). 각 군들 간의 비교를 시행한 결과 negative control 군은 DBBMC 군 (p=0.008), 500 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였으며, DBBMC 군은 200 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였고, 200 μm scaffold 군은 500 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였다. 이외의 관계에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 8).

6주 실험에서 신생골형성을 포함한 총 증대량의 평균 부피 값은 크기순으로 다음과 같다; DBBMC 군 = 62.522±7.624 mm^3, 500 μm scaffold 군 = 60.712±22.347 mm^3,

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

200 μm scaffold 군 = 28.922±5.501 mm^3, negative control 군 = 22.558±5.918 mm^3. 2주 실험에서와 유사하게 DBBMC 군에서 가장 많은 골증대량이 관찰되었으며, negative control 군에서 가장 적은 골증대량이 관찰되었다. 특징적인 것은 500 μm scaffold 군의 증대량이 DBBMC 군과 비슷한 수치를 보였다는 점이다. 4개 군 간에는 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (p=0.002). 각 군들 간의 비교를 시행한 결과 negative control 군은 DBBMC 군 (p=0.008), 500 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였으며, DBBMC 군은 200 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였고, 200 μm scaffold 군은 500 μm scaffold 군 (p=0.008)과 유의한 통계적 차이를 보였다. 이외의 관계에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 9).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

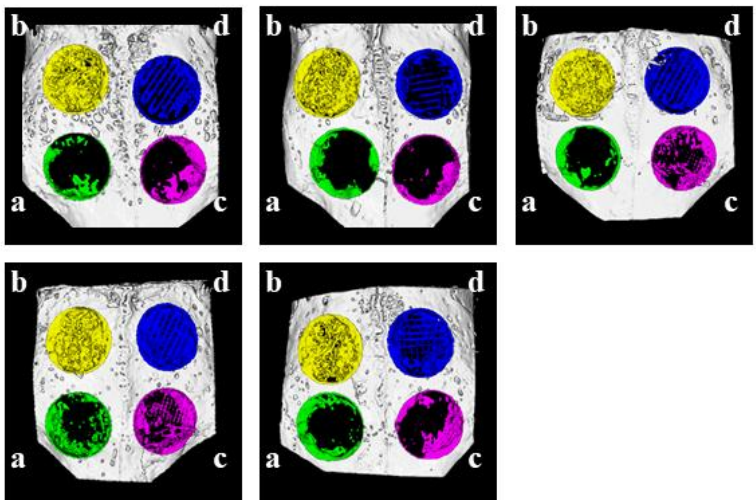

Figure 6. Micro-CT images of calvarial defects at 2 weeks.
a: Negative control; b: DBBMC (Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen); c: 200 μm Scaffold; d: 500 μm Scaffold.

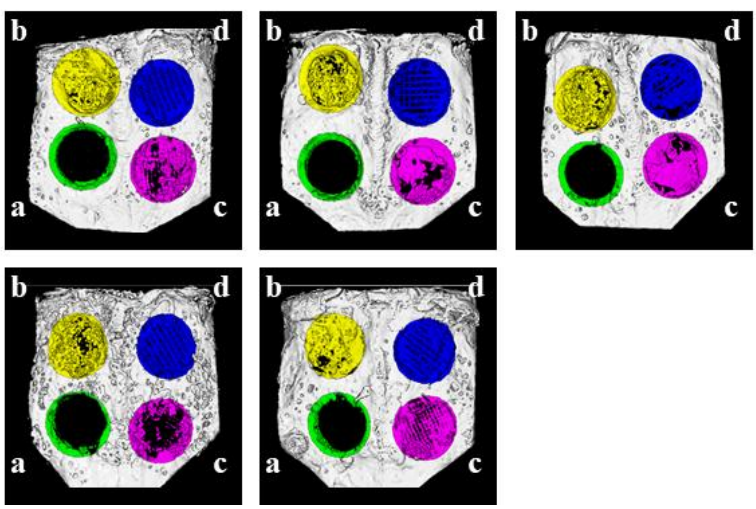

Figure 7. Micro-CT images of calvarial defects at 6 weeks.
a: Negative control; b: DBBMC (Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen); c: 200 μm Scaffold; d: 500 μm Scaffold.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Micro-CT analysis at 2 weeks.

Group - 2 weeks (n=5)	Volume (mm^3)	P value				
		Kruskal-Wallis test	Mann-Whitney U test			
			Negative control	DBBMC	200 μm Scaffold	500 μm Scaffold
Negative control	16.486±3.054	0.001*	-	-	-	-
DBBMC	67.016±11.867		0.008**	-	-	-
200 μm Scaffold	18.196±3.883		0.310	0.008**	-	-
500 μm Scaffold	36.222±12.935		0.008**	0.016	0.008**	-

Values are presented as mean±standard deviation.

* Statistically significance difference ($p<0.05$)

** Statistically significance difference ($p<0.0083$, an adjusted significance level using Bonferroni correction)

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

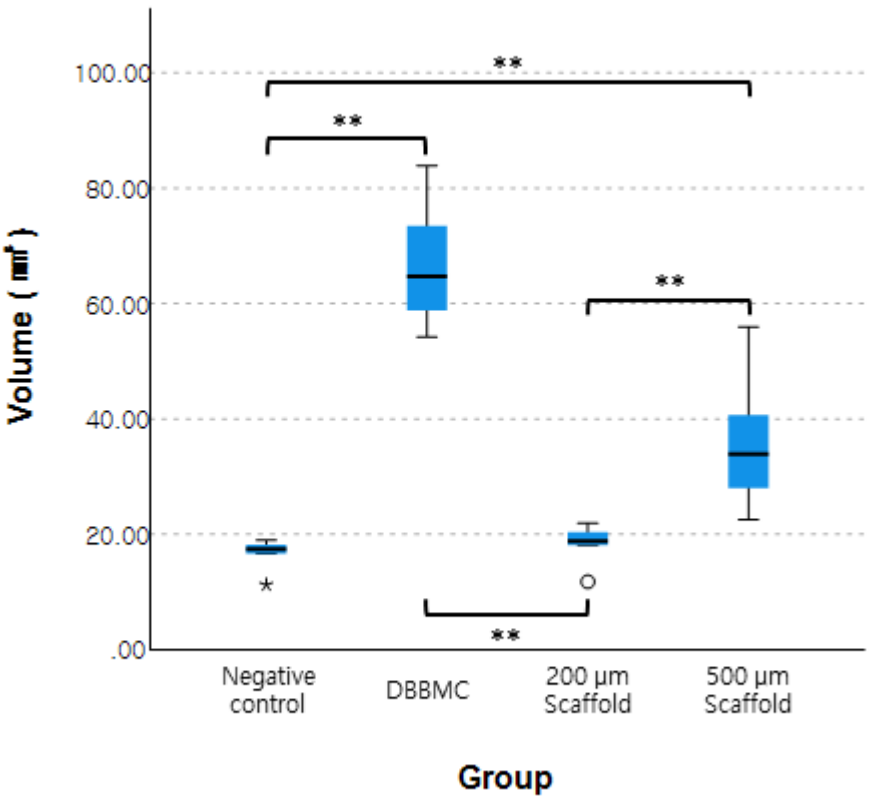

Figure 8. Comparison of total augmented volume at 2 weeks. Statistically significance difference was observed between 4 groups (p<0.05, Kruskal-Wallis test). Six sets of pairs were compared using Mann-Whitney U test (** p<0.0083, an adjusted significance level using Bonferroni correction).
DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Micro-CT analysis at 6 weeks.

Group - 6 weeks (n=5)	Volume (mm^3)	P value				
		Kruskal-Wallis test	Mann-Whitney U test			
			Negative control	DBBMC	200 μm Scaffold	500 μm Scaffold
Negative control	22.558±5.918	0.002*	-	-	-	-
DBBMC	62.522±7.624		0.008**	-	-	-
200 μm Scaffold	28.922±5.501		0.151	0.008**	-	-
500 μm Scaffold	60.712±22.347		0.008**	1.000	0.008**	-

Values are presented as mean±standard deviation.

* Statistically significance difference ($p<0.05$)

** Statistically significance difference ($p<0.0083$, an adjusted significance level using Bonferroni correction)

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

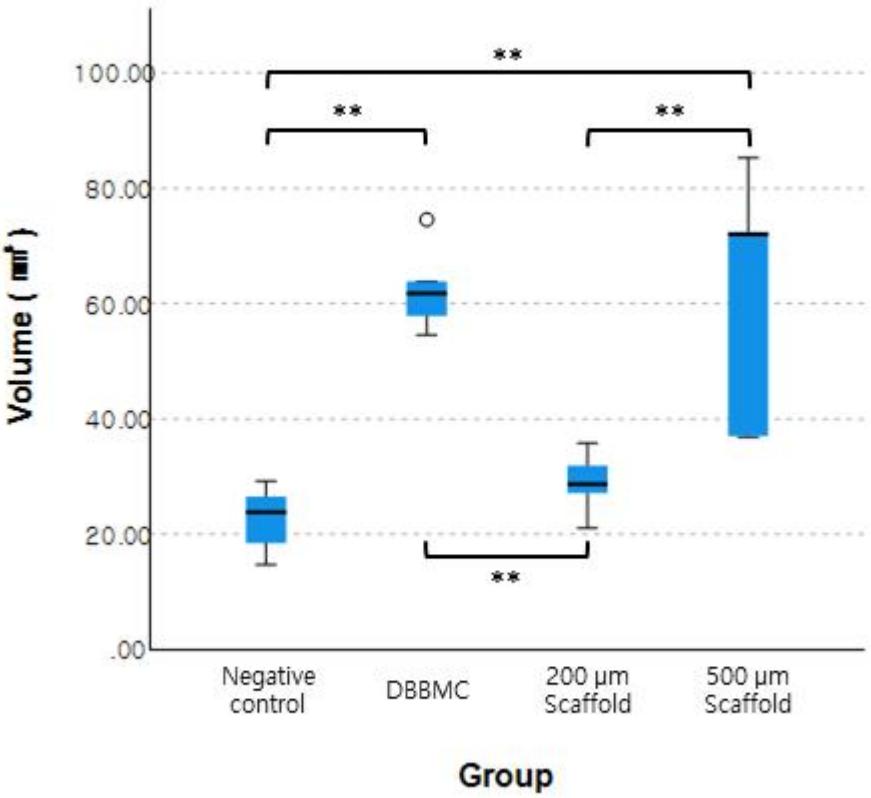

Figure 9. Comparison of total augmented volume at 6 weeks. Statistically significance difference was observed between 4 groups ($p<0.05$, Kruskal-Wallis test). Six sets of pairs were compared using Mann-Whitney U test (** $p<0.0083$, an adjusted significance level using Bonferroni correction).
DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. 조직평가 결과

Negative control 군 (Fig. 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A)

2주 실험에서 미성숙한 교직골의 형성이 결손부의 가장자리에서 관찰되었다. 결손부의 중앙으로 갈수록 연조직 함입과 수직적인 붕괴로 인해 매우 얇은 두께의 불규칙한 결합조직이 형성된 것이 관찰되었다. 6주 실험에서도 결손부의 가장자리에 국한된 신생골형성이 관찰되나 그 양은 미약하였고, 일부 성숙된 형태의 골이 관찰되었다. 또한 연속된 결합조직이 결손부 하방에 관찰되었다.

DBBMC 군 (Fig. 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 15B)

2주 실험에서 결손부는 골이식재에 의해 전체적인 부피가 비교적 잘 유지되었으나, 이식재 일부는 흩어져 결손부 상방에 불규칙한 경계면을 형성하였다. 신생골형성은 결손부 가장자리에서부터 관찰되었고, 중앙부에서도 잔존한 골이식재를 신생골이 둘러싸는 양상으로 나타났다. 또한 이식재 사이의 결합조직형성도 관찰되었다. 6주 실험에서는 더 중앙부로 진행된 신생골형성과 골성숙이 관찰되나, 중앙 부위에서는 수직적인 두께 감소가 관찰되었다. 신생골형성 및 성숙은 골결손부의 가장자리에서 더욱 활발하게 나타났다.

200 μm Scaffold 군 (Fig. 10C, 11C, 12C, 13C, 14C, 15C)

2주 실험에서 결손부는 3차원 골격에 의해 공간유지가 잘 되었으며, 결손부의 가장자리에서 신생골형성이 관찰되었다. 중앙부에서는 내부 포어 사이에 결합조직형성이 관찰되며, 3차원 골격의 상부에도 결합조직형성이 관찰된다. 6주 실험에서는 골격의 상방과 하방을 따라 중앙부로 진행된 신생골형성과 함께 내부 포어를 따라 형성되는 신생골형성도 일부 관찰되었다. 중앙부에서는 결합조직형성이 관찰된다. 이때도 역시 공간유지는 처음과 동일하게 이루어졌다.

500 μm Scaffold 군 (Fig. 10D, 11D, 12D, 13D, 14D, 15D)

공간유지 측면에서는 200 μm scaffold 군과 동일하게 2주와 6주에서 모두 처음과 동일한 수직적 두께를 유지하였으며, 3차원 골격의 분해는 관찰되지 않았다. 신생골형성 또한 200 μm scaffold 군과 유사하지만 층 사이의 포어를 따라 진행되는 양상이 좀 더

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

두드러지게 나타났다. 2주 실험에서는 골결손부의 가장자리에서의 신생골형성이 관찰되며, 중앙부에서는 포어를 따라 결합조직형성이 관찰되었다. 특히 6주 실험에서는 결손부 중앙에 위치한 골격의 내부 포어에서도 상당량의 신생골형성이 관찰되었고, 2주 실험에서보다 성숙된 형태의 골이 관찰되었다. 일부 중앙부에서는 결합조직형성도 관찰된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

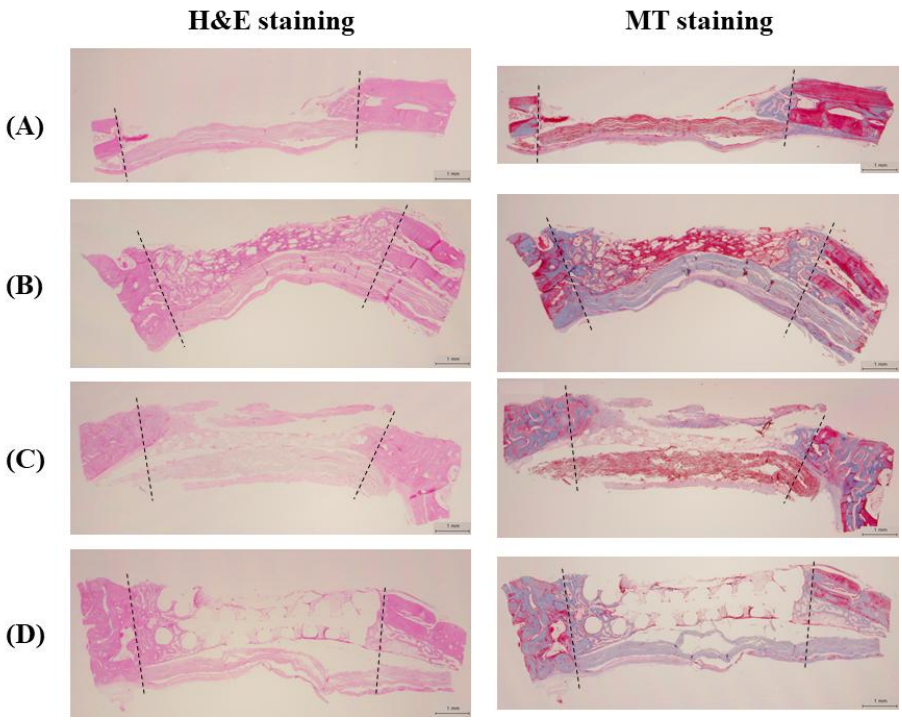

Figure 10. Histologic images at 2 weeks; H&E and MT staining (magnification of x4). (A) Negative control. (B) DBBMC. (C) 200 μm Scaffold. (D) 500 μm Scaffold. DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; Black dotted line: margin of bone defect.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

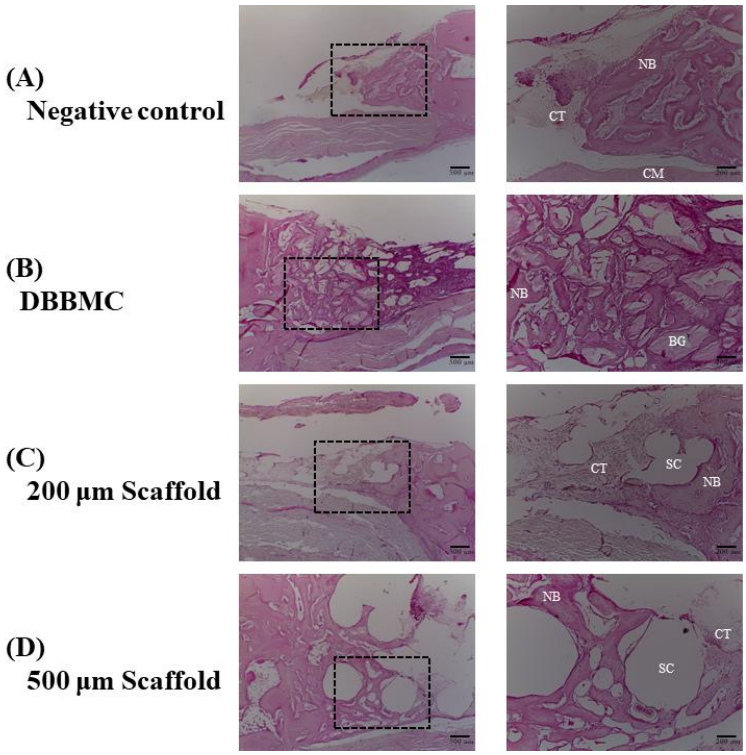

Figure 11. Histologic images at 2 weeks; H&E staining (magnifications of x40 and 100). (A) In negative control group, the formation of immature woven bone was observed at the margin of bone defect. (B) In DBBMC group, new bone formation was observed at the margin of bone defect, and appeared to surround the remaining DBBM particles. (C) In 200 μm scaffold group, the space of the defect was well maintained by the 3D scaffold, and new bone tissue was observed mainly at the margin of bone defect. (D) In 500 μm scaffold group, new bone formation was similar to that of the 200 μm scaffold group, but observed more noticeable along the pores between layer and layer.

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; NB: new bone; BG: bone graft; CT: connective tissue; CM: collagen membrane; SC: scaffold.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

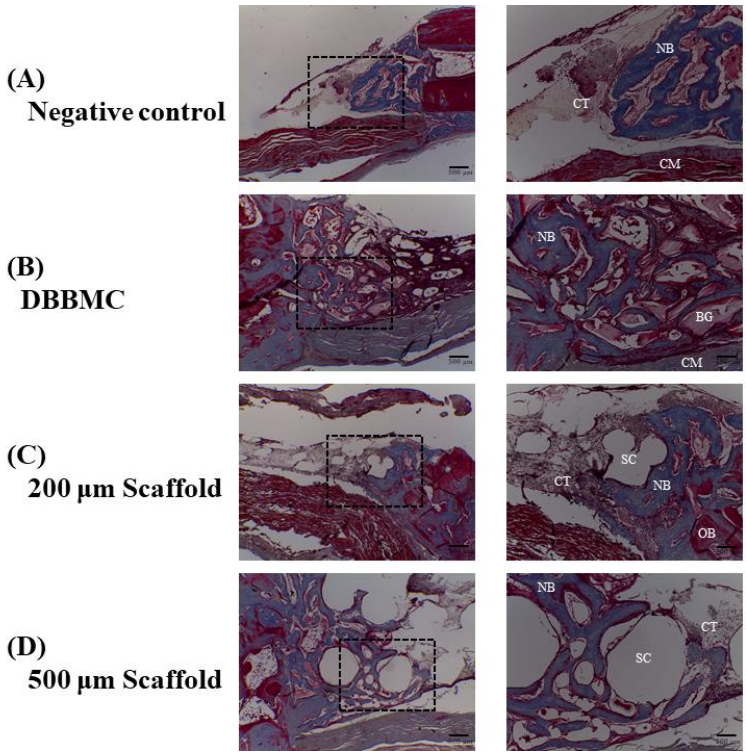

Figure 12. Histologic images at 2 weeks; MT staining (magnifications of x40 and 100). (A) In negative control group, the formation of immature woven bone (blue color) was observed at the margin of bone defect. (B) In DBBMC group, new bone formation (blue color) was observed at the margin of bone defect, and appeared to surround the remaining DBBM particles. (C) In 200 μm scaffold group, the space of the defect was well maintained by the 3D scaffold, and new bone tissue (blue color) was observed mainly at the margin of bone defect. (D) In 500 μm scaffold group, new bone formation (blue color) was similar to that of the 200 μm scaffold group, but observed more noticeable along the pores between layer and layer.
DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; NB: new bone; OB: original bone; BG: bone graft; CT: connective tissue; CM: collagen membrane; SC: scaffold.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

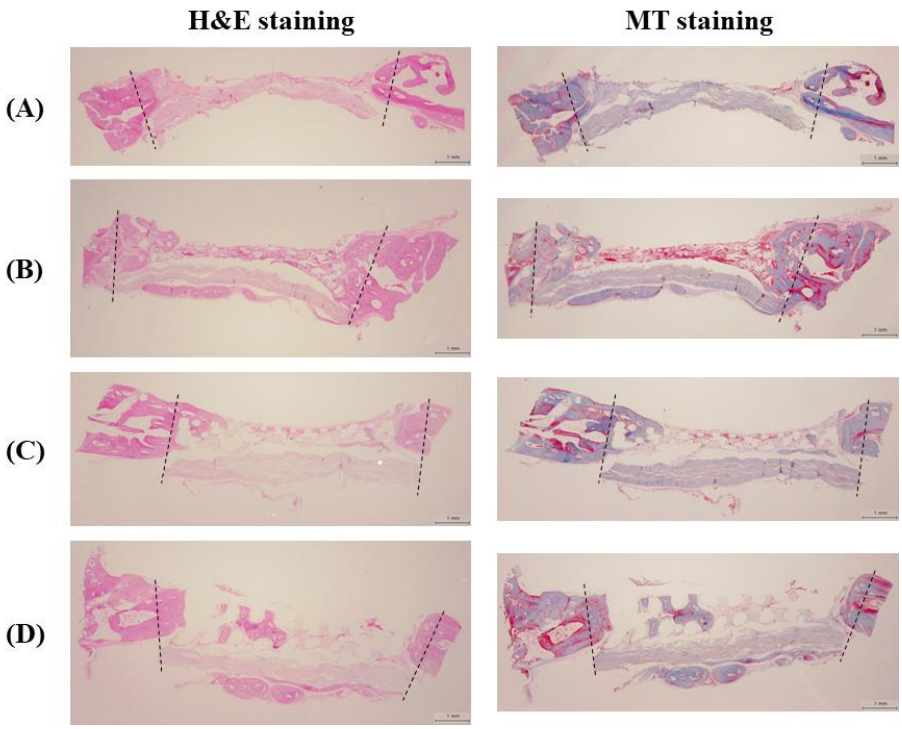

Figure 13. Histologic images at 6 weeks; H&E and MT staining (magnification of x4). (A) Negative control. (B) DBBMC. (C) 200 μm Scaffold. (D) 500 μm Scaffold. DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; Black dotted line: margin of bone defect.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

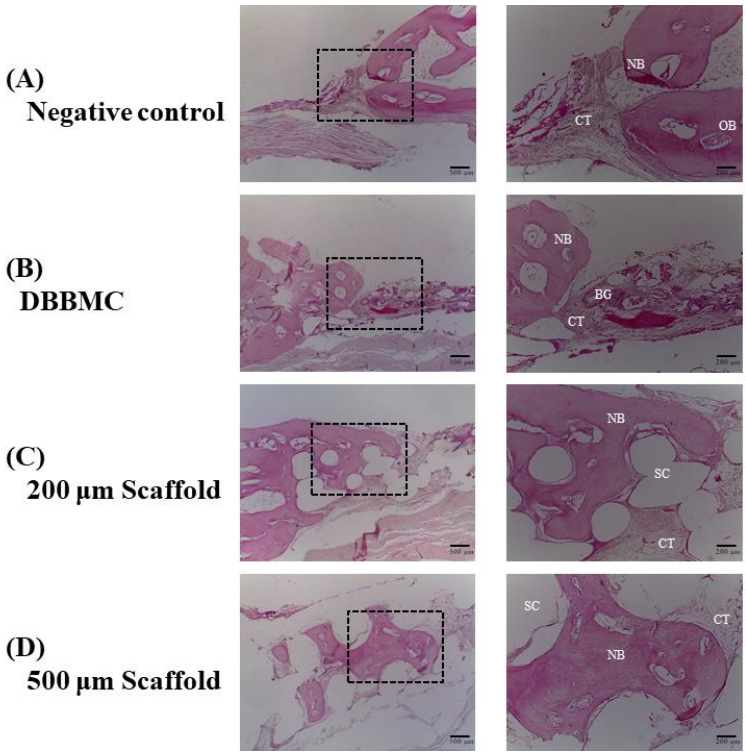

Figure 14. Histologic images at 6 weeks; H&E staining (magnifications of x40 and 100). (A) In negative control group, new bone formation was observed at the margin of bone defect, and some mature bone was observed. (B) In DBBMC group, new bone formation was accomplished to the more central part, and bone maturation was observed. A decrease in vertical thickness was observed in the central part where only the bone graft material was present. (C) In 200 μm scaffold group, new bone tissue was observed primarily along the upper part and lower part of scaffolds, but slightly between layer and layer. (D) In 500 μm scaffold group, more new bone was observed compared to the negative control group. A significant amount of new bone formation was observed in the internal pores of 3D scaffolds located in the central part, and more mature bone was observed.

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; NB: new bone; OB: original bone; BG: bone graft; CT: connective tissue; SC: scaffold.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

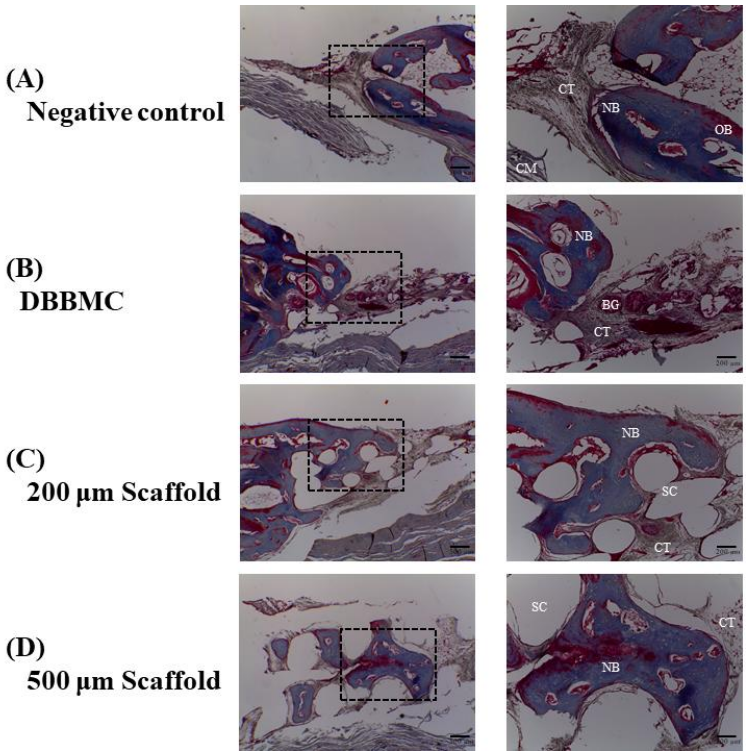

Figure 15. Histologic images at 6 weeks; MT staining (magnifications of x40 and 100). (A) In negative control group, new bone formation was observed at the margin of bone defect, and some mature bone (red color) was observed. (B) In DBBMC group, new bone formation was accomplished to the more central part, and bone maturation (red color) was observed. A decrease in vertical thickness was observed in the central part where only the bone graft material was present. (C) In 200 μm scaffold group, new bone tissue was observed primarily along the upper part and lower part of scaffolds, but slightly between layer and layer. (D) In 500 μm scaffold group, more new bone was observed compared to the negative control group. A significant amount of new bone formation was observed in the internal pores of 3D scaffolds located in the central part, and more mature bone (red color) was observed.

DBBMC: Deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen; NB: new bone; OB: original bone; BG: bone graft; CT: connective tissue; CM: collagen membrane; SC: scaffold.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

IV. 토의 및 고찰

골조직재생에 사용되는 골격은 골형성세포와 신생조직의 성장에 유리한 환경을 조성하기 위해 다공성의 복잡한 3차원적 구조를 갖추고 있어야 한다 [7]. 포어는 혈관신생 및 영양분의 수송과 노폐물의 제거를 위해 완전히 상호연결되어야 하며, 신생골조직이 내부까지 잘 자라 들어올 수 있도록 표면에 충분한 크기로 열려있어야 한다 [16]. 3차원 프린팅 기술은 이러한 상호연결된 다공성의 골격 구조를 정교하게 제어할 수 있으며, 조작 편의성이 뛰어나기 때문에 다양한 재료를 사용하여 환자 특이적인 3차원 골격을 제작하는 데에 많이 사용되고 있다 [17].

현재 이 연구에서는 골격 재료로 PCL과 β-TCP를 혼합하여 사용하였다. PCL 골격에 β-TCP를 첨가하는 것에 대한 효과는 이미 여러 문헌에서 밝혀져 있다. Park 등은 LA/PCL fiber에 β-TCP를 첨가한 *in vitro* 실험에서 생체적합성의 향상과 분해속도의 증가를 보고하였다 [18]. 유사한 결과가 *in vivo* 실험에서도 확인되었는데, Pae 등은 PCL 골격의 토끼 두개골 결손부 모델 연구에서 β-TCP의 첨가가 친수성과 골전도능을 향상시키는 결과를 나타냈다고 하였다 [13]. 현재 연구에서 β-TCP의 도입은 Fig. 5의 XRD 패턴 비교를 통해 확인할 수 있다. 한편, PCL 골격의 표면처리는 소수성 표면을 친수성으로 변화시켜 세포친화성과 골형성능을 향상시킨다고 알려져 있다 [11]. 표면처리 방법 중 하나인 산소 플라즈마 처리는 앞선 연구들을 통해 그 효과가 입증된 방법이다. Roh 등은 PLGA/n-HAp/β-TCP 골격을 이용한 실험에서 산소 플라즈마 처리가 표면의 친수성과 거칠기를 향상시켜 세포 부착, 증식, 분화에 긍정적인 영향을 미쳤다고 하였다 [19]. Kook 등의 연구에서도 산소 플라즈마 처리는 PCL 골격의 표면 거칠기와 친수성을 증가시켜 신생골형성을 향상시킨다고 하였다 [20]. 또한 Lee 등의 Chitosan/Gelatin/Hydroxyapatite 골격 실험에서는 골격의 생체적합성을 향상시키기 위해 산소 플라즈마 처리를 사용할 수 있다고 보고하였다 [14]. 현재 연구에서도 골격의 최적화를 위해 산소 플라즈마 처리를 시행하였다.

이번 연구에서 사용된 3차원 골격은 0/90° lay-down pattern과 stagger-type으로 적층된 형태를 갖추고 있다. Lay-down pattern과 관련하여 이것이 중요한 변수가 아니라는 연구도 있었지만 [21], Berner 등은 0/90° orientation이 0/60° orientation보다 골재생에 더 유리함을 보고하기도 하였다 [22]. 골격의 구조를 결정하는 또 다른 변수인

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

offset에 대해서도 상반된 연구 결과가 존재한다. offset을 적용한 stagger-type의 경우 offset이 없는 구조에 비해 압축강도나 탄성계수와 같은 기계적 성질이 불리하게 나타난다고 보고한 연구가 있었으나 [23], 골형성과 관련된 물리적, 생물학적 특성을 향상시킨다는 보고도 다수 존재하였다 [24, 25]. 한편, 현재 연구에서 포어 크기는 300 μm, 포어 높이를 결정하는 스트럿 크기는 200 μm와 500 μm로 설정하였는데 이는 골형성에 있어 효과적인 포어 크기가 100~500 μm라는 여러 보고들에 근거하여 선택하였다 [16, 26, 27]. 상기의 구조적 형태는 Fig. 4의 FE-SEM 이미지에서 확인할 수 있다.

3차원 골격의 골재생 능력과 관련하여 스트럿 크기의 영향에 대해서는 아직 많이 밝혀지지 않았다. 스트럿 크기를 다르게 조절하면 기계적 강도, 표면적 대 부피비, 다공성, 투과성 등을 변화시켜 혈관화나 골형성에 직간접적인 영향을 미칠 수 있다. Habib 등이 보고한 조직공학 골격의 설계 및 개발 연구에 의하면, 스트럿 크기가 증가할수록 다공성과 표면적 대 부피비는 감소하는 경향을 보였다 [28]. 적절한 다공성은 세포의 내성장, 혈관화, 그리고 대사물 수송이 잘 이루어지도록 해주며, 높은 표면적 대 부피비는 세포 부착이 잘 이루어지도록 해준다. 스트럿 크기는 포어 높이를 직접적으로 결정하는 요소이기도 하다. 재료압출 방식의 경우 x,y 방향으로는 스트럿 간의 간격과 배열 방향을 변화시켜 포어 크기를 정교하게 조절할 수 있지만, z 방향으로는 적층되는 양상만 조절할 수 있기 때문에 측면 포어 크기(즉, 포어 높이)는 스트럿 크기에 의해 주로 결정되게 된다 [7, 23]. 따라서 현재 연구에서는 재료압출 방식의 3차원 프린터를 이용하여 동일한 적층 방식과 서로 다른 노즐 크기 조절을 통해 200 μm, 500 μm의 스트럿 크기를 갖는 두 가지 골격을 제작하여 골재생 효과를 알아보고자 하였다.

두개골 결손부 모델은 이식재의 골재생 능력을 평가하기 위해 흔히 사용되는 동물실험 모델이다 [29]. 두개골은 부하를 받지 않는 골이며, 인간의 하악골과 유사하다는 특징이 있다 [30]. 비교적 작은 실험동물에 속하는 토끼의 경우 다루기 쉽고 높은 골교체율을 보인다는 장점이 있어 동물실험에 많이 사용되고 있다 [31]. 일반적으로 토끼의 CSD (Critical size defect)는 15 mm라 알려져 있는데 [29], 초기 단계의 치유 평가와 함께 여러 재료의 비교를 목적으로 할 때는 한 개체에 4개의 8 mm 결손부를 형성하여 CSD로 사용하기도 한다 [32]. 한편, 이번 연구에서는 실험 재료를 위치시키기 전에 두개골 결손부 하방에 흡수성 차폐막을 적용하였다. 두개골의 치유에 있어 골막, 경막, 인접 골은 모두 중요한 역할을 하지만, 골형성에 주로 기여하는 것은 경막이다 [33, 34]. 그런데 경막은 골결손부 형성 과정에서 쉽게 손상될 가능성이 있으므로 부정확하고 일정하지 않은 결과를 초래할 위험이 있다 [32]. 그리고 경막이 온전한 경우에도 경

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

막의 뛰어난 골형성 능력 때문에 실험군과 대조군의 비교가 어려워질 수 있다. 또한 경막이라는 해부학적 구조물은 치조골결손부에 존재하지 않는다. 이러한 이유로 이 실험에서는 경막의 영향을 최소화하고자 흡수성 차폐막을 사용하였다.

이번 연구에서는 3차원 프린팅 기술로 제작된 PCL/β-TCP 3차원 골격의 골재생 능력에 대해 알아보고자 토끼의 두개골 결손부 모델을 활용하여 방사선 및 조직평가를 시행하였다.

Micro-CT 분석과 조직분석을 통해 각 군별로 초기 골형성 과정의 전체적인 양상을 파악하고 신생골형성량의 상대적 비교를 시행하였다. Micro-CT 분석 결과 2주와 6주째에서 모두 500 μm 골격을 사용한 것이 신생골형성에 효과적인 것으로 나타났다. 이는 조직분석 결과 500 μm 골격에서 자연골과 인접한 가장자리뿐만 아니라, 내부의 포어를 따라 결손부 중앙 부위까지 골형성이 잘 이루어졌기 때문인 것으로 보인다. 6주째에 이러한 양상이 더 두드러지게 나타났는데 이때의 골형성량은 positive control인 DBBMC 군과도 유사한 정도의 결과를 보였다. 적절한 혈관화는 성공적인 골재생 과정에 중요한 역할을 한다 [35, 36]. 확산에 의한 영양분의 이동은 매우 제한된 거리에서만 가능하기 때문에 결손부의 중앙에 있는 골형성세포는 생존을 위해 신생혈관으로부터 영양분과 산소를 공급받아야 한다. 혈관화의 범위와 속도를 결정하는 구조적 요소로는 포어 크기, 다공성, 상호연결성, 표면적 대 부피비 등이 있다 [37]. 이와 관련하여 Feng 등은 다양한 포어 크기를 갖는 β-TCP 골격을 이용한 *in vivo* 연구를 진행하였다 [38]. 연구 결과 큰 포어 크기는 혈관신생에 있어 훨씬 더 유리하였으나, 400 μm 보다 작은 포어의 경우 신생혈관형성이 제한되어 작은 직경의 혈관이 생성되게 되고 결합조직형성은 증가되었다. Sicchieri 등의 연구에서도 유사한 결과가 확인되었는데, 약 500 μm의 포어 크기를 갖는 골격이 적절한 혈관화를 제공하여 골형성을 증가시킨다고 보고하였다 [39]. 이번 연구에서 모든 경우 골재생은 결손부의 가장자리에서부터 시작되었다. 이것을 고려할 때 자연골과 3차원 골격이 만나는 경계부에 형성된 포어 구조는 초기 골재생에 있어 매우 중요한 요소라 생각된다. Shao 등의 연구에서도 이러한 점을 주목하였다. 반복된 스트럿 층을 사용하여 골격의 측면 포어 크기를 증가시킨 경우 초기(4주)에는 골형성이 지연되었으나 후기(8-12주)에는 다시 향상되었다고 하였다 [40]. 앞서 언급한 것처럼 스트럿 크기는 포어 높이를 결정한다. 혈관신생은 기존에 존재하는 혈관으로부터 시작되므로 결손부 가장자리와 접해있는 포어 크기, 즉 포어 높이가 클수록 혈관화 과정에 유리할 것이다. 따라서 500 μm 골격은 스트럿이 일정 부분 겹쳐지는 것을 고려하더라도 400-500 μm 정도의 큰 포어 높이를 갖게 되어 더

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

중앙부까지 원활하게 혈액 공급을 할 수 있게 된다. 이 때문에 스트럿 크기 증가로 인해 발생하는 단점(다공성과 표면적 대 부피비의 감소)에도 불구하고 500 μm 골격이 우수한 골재생 능력을 보일 수 있었던 것으로 파악된다.

이 연구의 한계점으로는 우선 골형성에 영향을 미치는 모든 변수를 통제시키지 못한 점이 있다. 골결손부의 높이가 일정하지 않았으며, 두 가지 3차원 골격의 높이 차이로 인하여 공간유지량에 차이가 있었다. 또한 DBBMC의 경우 술자 및 기구의 한계로 인해 전체적인 양과 형태를 동일하게 하지 못하였다. 짧은 치유기간으로 인해 초기 골형성에 대해서만 평가할 수 있었다는 한계점도 존재한다. 추후 긴 치유기간에 대한 연구가 필요할 것이며, 이때 골격의 분해속도가 적절한지 그리고 최종적으로 형성된 신생골의 양과 질은 어떠한지에 대해 평가가 이루어져야 할 것이다. Micro-CT 분석에서는 회색조 범위 설정에 있어 어려움이 있었다. 이 때문에 재료와 신생골을 명확히 구분하기 어려웠다는 한계점이 존재한다. 또한 이 연구에서는 비교적 단순한 형태의 골결손부를 사용하였는데, 실제 임상에서는 결손부의 형태가 복잡한 경우가 많고 골외결손부 형태인 경우도 있으므로 이에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 결론

이 연구에서는 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격을 두 가지 스트럿 크기로 다르게 제작하여 기존의 이종골 이식재와 비교하였다. 골재생 효과에 대해 방사선 및 조직평가를 시행하여 다음과 같은 결과를 도출할 수 있었다.

1. 제작된 3차원 골격에서 전체 높이의 차이가 존재하였지만 방사선평가 결과 6주 후 200 μm 스트럿으로 제작된 골격은 제한된 신생골형성을 나타내었고, 500 μm 스트럿으로 제작된 골격은 증가된 신생골형성을 나타내었다.

2. 조직평가 결과 두 가지 스트럿으로 제작된 3차원 골격에 인접한 결합조직형성은 골결손부 전반에 걸쳐 잘 이루어졌으며, 골재생은 주로 결손부의 가장자리에서 골격의 상방과 하방을 따라 진행되었다. 특히 500 μm 스트럿으로 제작된 골격의 경우는 가장자리뿐만 아니라 내부의 포어를 따라 결손부의 중앙 부위까지 진행된 신생골형성을 보였다.

3. 두 가지 스트럿으로 제작된 3차원 골격은 콜라겐을 포함한 이종골 이식재와 달리 6주 동안 붕괴되지 않고 골형성을 위한 우수한 공간유지 능력을 보였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 산소 플라즈마 처리된 PCL/β-TCP 3차원 골격은 초기 결합조직형성을 방해하지 않고, 우수한 공간유지를 통해 신생골형성 및 성숙을 위한 환경을 제공하므로 기존의 GBR 방식을 대체하는 골재생 재료로써 유망한 잠재력을 가지고 있다고 생각된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Garber DA, Belser UC. Restoration-driven implant placement with restoration-generated site development. Compend Contin Educ Dent 1995;16:796-804.

2. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. Open Dent J 2014;8:56-65.

3. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. Implant Dent 2006;15:8-17.

4. McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. J Periodontol 2007;78:377-96.

5. Touri M, Kabirian F, Saadati M, Ramakrishna S, Mozafari M. Additive Manufacturing of Biomaterials-The Evolution of Rapid Prototyping. Adv Eng Mater 2019;21:1800511.

6. ASTM International. Standard terminology for additive manufacturing technologies. 2012.

7. Hoque ME, Chuan YL, Pashby I. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. Biopolymers 2012;97:83-93.

8. Bártolo PJ, Almeida HA, Rezende RA, Laoui T, Bidanda B. Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. In: Bidanda B BP, editor. Virtual

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

prototyping & bio manufacturing in medical applications. New York: Springer; 2008. p.149-70.

9. Castilho M, Pires I, Gouveia B, Rodrigues J. Structural evaluation of scaffolds prototypes produced by three-dimensional printing. Int J Adv Manuf Technol 2011;56:561-569.

10. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. Biomaterials 2002;23:4095-103.

11. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. J Oral Biol Craniofac Res 2020;10:381-388.

12. Doyle H, Lohfeld S, McHugh P. Evaluating the effect of increasing ceramic content on the mechanical properties, material microstructure and degradation of selective laser sintered polycaprolactone/β-tricalcium phosphate materials. Med Eng Phys 2015;37:767-76.

13. Pae HC, Kang JH, Cha JK, Lee JS, Paik JW, Jung UW, et al. 3D-printed polycaprolactone scaffold mixed with β-tricalcium phosphate as a bone regenerative material in rabbit calvarial defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2019;107:1254-1263.

14. Lee CM, Yang SW, Jung SC, Kim BH. Oxygen Plasma Treatment on 3D-Printed Chitosan/Gelatin/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. J Nanosci Nanotechnol 2017;17:2747-750.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

15. Entezari A, Roohani I, Li G, Dunstan CR, Rognon P, Li Q, et al. Architectural Design of 3D Printed Scaffolds Controls the Volume and Functionality of Newly Formed Bone. Adv Healthc Mater 2019;8:e1801353.

16. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. Mater Today 2013;16:496-504.

17. Hassan MN, Yassin MA, Suliman S, Lie SA, Gjengedal H, Mustafa K. The bone regeneration capacity of 3D-printed templates in calvarial defect models: A systematic review and meta-analysis. Acta Biomater 2019;91:1-23.

18. Park CH, Kim EK, Tijing LD, Amarjargal A, Pant HR, Kim CS, et al. Preparation and characterization of LA/PCL composite fibers containing beta tricalcium phosphate (β-TCP) particles. Ceram Int 2014;40:5049-5054.

19. Roh HS, Jung SC, Kook MS, Kim BH. *In vitro* study of 3D PLGA/n-HAp/β-TCP composite scaffolds with etched oxygen plasma surface modification in bone tissue engineering. Appl Surf Sci 2016;388:321-330.

20. 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. Dent Mater J 2018;37:599-610.

21. Viana T, Biscaia S, Almeida HA, Bártolo PJ. Permeability evaluation of lay-down patterns and pore size of PCL scaffolds. Procedia Eng 2013;59:255-262.

22. Berner A, Woodruff MA, Lam CX, Arafat MT, Saifzadeh S, Steck R, et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. Int J Oral Maxillofac Surg 2014;43:506-13.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

23. Gleadall A, Visscher D, Yang J, Thomas D, Segal J. Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. Burns Trauma 2018;6:19.

24. Yeo M, Simon CG, Kim G. Effects of offset values of solid freeform fabricated PCL - β-TCP scaffolds on mechanical properties and cellular activities in bone tissue regeneration. J Mater Chem 2012;22:21636-21646.

25. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. J Sci Adv Mater Devices 2020;5:1-9.

26. Boccaccini AR, Kneser U, Arkudas A. Scaffolds for vascularized bone regeneration: advances and challenges. Expert Rev Med Devices 2012;9:457-60.

27. Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2016;61:922-39.

28. Habib FN, Nikzad M, Masood SH, Saifullah ABM. Design and development of scaffolds for tissue engineering using three-dimensional printing for bio-based applications. 3D Print Addit Manuf 2016;3:119-127.

29. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. Clin Oral Implants Res 2015;26:915-930.

30. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. J Oral Surg 1980;38:176-80.

31. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. Am J Physiol 1988;255:E416-21.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

32. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. J Periodontal Implant Sci 2010;40:180-7.

33. Ozerdem OR, Anlatici R, Bahar T, Kayaselçuk F, Barutçu O, Tuncer I, et al. Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. J Craniofac Surg 2003;14:371-9.

34. Gosain AK, Gosain SA, Sweeney WM, Song LS, Amarante MTJ. Regulation of osteogenesis and survival within bone grafts to the calvaria: the effect of the dura versus the pericranium. Plast Reconstr Surg 2011;128:85-94.

35. Scheufler O, Schaefer DJ, Jaquiery C, Braccini A, Wendt DJ, Gasser JA, et al. Spatial and temporal patterns of bone formation in ectopically pre-fabricated, autologous cell-based engineered bone flaps in rabbits. J Cell Mol Med 2008;12:1238-49.

36. Correia C, Grayson WL, Park M, Hutton D, Zhou B, Guo XE, et al. *In vitro* model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. PLoS One 2011;6:e28352.

37. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng 2001;7:679-89.

38. Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, et al. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture *in vivo*. Biomed Mater 2011;6:015007.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

39. Sicchieri LG, Crippa GE, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. J Tissue Eng Regen Med 2012;6:155-62.

40. Shao H, Ke X, Liu A, Sun M, He Y, Yang X, et al. Bone regeneration in 3D printing bioactive ceramic scaffolds with improved tissue/material interface pore architecture in thin-wall bone defect. Biofabrication 2017;9:025003.