



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](#)

의학석사 학위논문

쥐의 임계 크기 두개골 결손에 있어서 3차원  
프린팅을 이용한 PCL/PCL+BGS-7 대체물의  
효과에 대한 연구

The effect of 3D (three-dimensional) printing PCL  
(polycaprolactone)/PCL+ BGS-7 (CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
glass-ceramics) scaffold in critical sized calvarial bone  
defect of rat model

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

강 민 규

취의 임계 크기 두개골 결손에 있어서 3차원  
프린팅을 이용한 PCL/PCL+BGS-7 대체물의  
효과에 대한 연구

지도교수 최종우

이 논문을 의학석사 학위 논문으로 제출함

2021년 2월

울산대학교 대학원

의학과

강민규

강민규의 의학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 고 경 석 (인)

심사위원 최 종 우 (인)

심사위원 오 태 석 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 2 월

## 차 례

국문요약.....	iii
서론.....	1
재료 및 방법.....	3
결과.....	5
고찰.....	7
결론.....	10
참고문헌.....	11
그림.....	12
영문요약.....	26

## 그림차례

Figure 1. 두개골 결손부 수술의 디자인.....	12
Figure 2. 두개골 결손부 수술 (두피 절개) .....	13
Figure 3. 두개골 결손부 수술 (골막 절개) .....	14
Figure 4. 두개골 결손부 수술 (8mm 원형 결손 생성 중) .....	15
Figure 5. 두개골 결손부 수술 (8mm 원형 결손 완성) .....	16
Figure 6. 두개골 결손부 수술 (8mm 뼈 대체물 삽입) .....	17
Figure 7. 두개골 결손부 수술 (골막 봉합) .....	18
Figure 8. 두개골 결손부 수술 (두피 봉합) .....	19
Figure 9. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(1 군) .....	20
Figure 10. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(1 군) .....	21
Figure 11. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(2 군) .....	22
Figure 12. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(2 군) .....	23
Figure 13. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(3 군) .....	24
Figure 14. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(3 군) .....	25

## 국 문 요 약

### 연구 목적

인체의 골 결손에 대한 치료로서 자가 골 이식, 동종 골 이식, 골 대체물 이식을 고려할 수 있다. 자가 조직 이식의 경우 채취 가능한 공여부의 선택과 채취 가능한 뼈의 양은 극히 제한적이며, 공여부의 후유증이 우려된다. 동종 골의 경우, 감염과 거부 반응이 매우 흔하다. 따라서 골 결손부 수복에 이용할 수 있는 합성 물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, PCL(polycaprolactone)과 BGS-7(CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glass-ceramics)는 많이 사용되고, 많이 연구되고 있는 물질이다. 이에 최근 각광받는 3D printing 기술을 이용하여 특성이 다른 이 두 물질을 합성, 이상적인 골 대체물을 만들고자 한다. 본 연구의 목적은 쥐의 두개골에 자연적으로 치료될 수 없는 임계 골 결손을 발생시키고 여기에 PCL과 BGS-7을 서로 다른 비율로 합성하여 골 결손부에 삽입한 뒤, 골 재생 정도를 추적 관찰하여 골 재생을 촉진시키는 가장 이상적인 비율의 골 대체물을 발견하고자 한다.

### 연구 방법

총 18마리의 SD 쥐(8주령)를 3군으로 나누었다.

1군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부(8mm)에 100% PCL scaffold 삽입

2군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부 (8mm)에 80% PCL+ 20% BGS-7 삽입

3군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부 (8mm)에 60% PCL+ 40% BGS-7 삽입

#### 1. 쥐의 두개골에 임계 골 결손부 생성 및 보형물 삽입

Isoflurane 2-3%를 흡입하여 마취를 시작 및 유지한다. 두피를 절개하여 두개골을 노출시킨 후 기구를 이용하여 두개골에 직경 8mm의 원형 결손부를 생성한다. 군별로 다른 비율의 3D printed PCL/BGS-7 합성물을 삽입한 후 두피를 봉합한다.

#### 2. 영상 촬영

수술 후 8개월에 마취 후 micro-CT를 촬영한다.

#### 3. 조직 화학 염색

18마리 중 각 군당 3마리 씩, 총 9마리에 대하여 안락사 시행하여 두개골의 검체를 채취하여 H&E stain, Masson's trichrome stain을 실시한다.

#### 4. 골 재생의 결과 비교

Micro CT 를 이용하여 촬영한 영상을 통하여 골화의 진행 정도를 가시적으로 평가한다. 또한 조직 화학 염색을 시행하여 현미경을 통해 실제 osteocyte와 신생 뼈를 확인한다.

## 결과

### 1. Micro CT를 이용한 영상 비교

1군에서는 신생 뼈의 재생이 거의 이루어 지지 않았고, 2군과 3군에서는 PCL/BGS-7 합성물의 pore 구조를 따라서 뼈의 재생이 관찰됨. 또한 2군에 비하여 3군에서 재생 정도가 더 높았다.

### 2. 조직 화학 염색을 통한 슬라이드 사진 비교

1군에서는 신생 뼈의 구조를 거의 확인할 수 없었다. 2군과 3군에서는 합성물의 pore 구조를 따라 신생 뼈의 재생을 관찰할 수 있었다.

## 결론

본 연구는 쥐 두개골의 임계 골 결손부에 대한 PCL/BGS-7 합성물의 효과를 입증하기 위한 동물실험 연구로, 본 실험을 통해 PCL과 BGS-7의 합성물이 뼈와 결합 능력이 뛰어나고, 신생 뼈 재생을 촉진할 수 있다는 사실을 확인하였다. 향후 인체를 대상으로 한 추가적인 연구가 필요하다.

## I. 서론

불의의 사고, 악성 종양 등으로 인하여 다양한 종류와 다양한 크기의 뼈 결손이 발생할 수 있다. 뼈의 결손은 인체의 다른 연부 조직 결손과 달리 대체할 만한 자가 조직이 매우 한정적이라는 점에서 치료가 매우 어렵다. 특히 뼈 결손의 양이 일생 동안에 자연적으로 치유되지 않는 정도의 크기가 되면 이를 임계 골 결손이라고 정의하며, 임계 골 결손은 자가 골 이식, 대체 골 이식 등의 치치가 반드시 필요하다.<sup>1</sup>

자가 골 이식의 경우 가장 이상적인 치료이고, 가능하다면 가장 우선적으로 선택되어야 할 치료법이지만 채취 가능한 공여부의 선택과 채취 가능한 뼈의 양은 극히 제한적이며, 공여부의 후유증이 우려된다. 자가 골 이식을 대체할 수 있는 동종 골 이식의 경우, 자가 골 이식의 단점인 공여부 문제와 통증 등이 없다.<sup>2</sup> 하지만 감염과 거부 반응이 매우 흔하다. 그래서 최근 골 대체 합성물에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 적절한 뼈 대체물은 osteoinductive, osteoconductive, osteogenic 한 특성을 지니면서 감염에 대한 우려가 적어야 하고, biocompatible 하고 bioresorbable 해야 한다. 게다가 뼈와 유사한 정도의 강도를 지녀야 하고, 또한 경제적이어야 한다.<sup>3</sup> Xenograft, demineralized bone matrix, calcium phosphate, calcium sulfate와 bioactive glass 등이 골 대체 합성물로 연구되고 있다.<sup>4</sup>

Polyester, polycaprolactone (PCL)은 biocompatible 하고, 비용이 저렴하며, 독성이 없고, 유연한 성질을 가지고 있다. PCL은 넓은 표면적과 상호 연결된 기공을 가진 3D 구조의 제작을 위해 소금 침출 공정 방법으로 제조되는 aliphatic polymer로서 약물 전달 및 조직 공학용 scaffold와 같은 의학 분야에서 많이 사용되고 있다.<sup>5</sup> 하지만 PCL은 hydrophobic 하고 세포 접착력이 약하며 강도와 내구성이 약해서 임상적인 적용에 한계가 있다.<sup>6</sup> 반면에 Bioglass라고도 알려진 생체 활성 유리(bioactive glass)는 합성 규산염 기반 세라믹 그룹을 말하며 1970년대에 처음 개발되었을 때, 이산화 규소(SiO<sub>2</sub>), 산화 나트륨(Na<sub>2</sub>O), 산화 칼슘(CaO) 및 오산화 인(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)으로 구성되었다.<sup>7</sup> 이 후에 이 조합은 산화 칼륨(K<sub>2</sub>O), 산화 마그네슘(MgO) 및 산화 붕소(B<sub>2</sub>O)를 첨가하여 보다 안정된 조성으로 발전되었다. 핵심 성분 인 규산염은 총 무게의

45~52 %를 차지한다.<sup>8</sup> 이는 약 40%의 칼슘과 60%의 인으로 구성된 인체의 뼈와 구조성이 매우 유사하다. 이렇게 최적화 된 조합은 bioglass와 뼈 사이에 강한 물리적 결합으로 이어진다. Bioactivity 라고 일컫는 이 현상은 bone graft and substitute(BGS)에서 처음 발견되었다.<sup>9</sup> 이러한 뼈와 결합하는 특성은 체내 이식 시, 체액에 노출 될 때 실리콘 이온이 침출 및 축적되고 bioglass 표면에 수산화 인회석 코팅이 형성되어 발생하는 것으로 생각된다.<sup>10</sup> 이 얇은 hydroxyapatite 코팅은 단백질을 흡수하고 골 전구 세포를 끌어들이는다. 또한 이 인회석 층은 이식 후 장기적으로 일부 뼈로 대체된다.<sup>11</sup> 또 한 연구에 따르면 bioglass scaffold는 염증 반응이 거의 없이 생체 내에서 6개월 만에 완전히 흡수될 수 있다.<sup>12</sup> 기존에 선행된 연구에 따르면 본 연구에서 사용된 BGS-7은 인체 독성이 없고, 높은 osteoblastic differentiation 을 유도한다.<sup>13</sup> 하지만 다른 세라믹과 마찬가지로 bioglass의 기계적 특성은 깨지기 쉬운 것으로 보고되고 있다. 이는 가장 큰 단점으로 꼽히는데, 외부에서 가해지는 압축에 의한 힘이나 구부리는 힘에 대해 빈번한 골절이나 균열이 발생한다는 것이다. 또한 이러한 단단하고 유연하지 못한 특성으로 인하여 골 대체로 실제 수술에서 활용 시, 플레이트 및 나사를 이용한 고정이 어렵고, 보형물의 모양을 다듬거나 곡면에 활용하기 위한 미세한 조작도 불가능하다. 또한 궁극적으로 3D-printing 기술을 활용한 환자 맞춤형 보형물의 제작이 어렵다.

본 연구는 이러한 bioglass의 단점을 극복하고자 유연하고 탄력을 지닌 PCL을 BGS-7 과 혼합하여 3D-printing 이 가능하며, 보형물의 부분적인 조작, 고정, 변형이 가능한 porous mesh 구조의 뼈 대체제를 발견하고자 한다. 이를 위해 랫드의 두개골에 자연적으로 치료될 수 없는 critical bone defect를 발생시키고 이에 PCL과 BGS-7을 서로 다른 비율로 합성하여 3D-printing 한 합성물을 골 결손부에 삽입한 뒤 골 융합 및 재생 정도를 추적 관찰하여 유연하면서도 혼합물의 bioactivity를 유지하는 가장 이상적인 비율의 골 대체물을 발견하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

총 18마리의 SD 랫드(8주령)를 3군으로 나누었다.

1군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부 (8mm)에 100% PCL scaffold 삽입

2군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부 (8mm)에 80% PCL+ 20% BGS-7 삽입

3군 (n=6) : 두개골 임계 골 결손부 (8mm)에 60% PCL+ 40% BGS-7 삽입

### 사육환경

실험 기간 동안 동일한 군에 속한 쥐 3마리 씩 한 케이지에서 생활하였고, 물과 음식은 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다. 상온( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ )과 적절한 습도( $60\pm 5\%$ )를 제공하였고, 12:12 시간의 비율로 낮, 밤의 주기를 유지하였다. 모든 연구는 아산 생명과학 연구소의 동물 실험 윤리 위원회의 승인 하에 시행하였고, 윤리 규정을 준수하였다.

### 마취방법

마취는 호흡마취를 시행하였으며, 호흡 마취는 isoflurane 을 3% 농도로 유지하였다. 수술은 쥐가 진정되어 심장 박동수가 안정화된 후 진행하였다.

#### 1. 쥐의 두개골에 임계 골 결손부 생성 및 보형물 삽입

15번 수술용 칼을 이용하여 두피를 절개한다. 피하 연부 조직을 박리한 뒤, 두개골을 싸고 있는 골막에도 절개선을 가하여 두개골이 노출되도록 박리한다. 두개골의 정중앙 부위에 8mm 직경의 원형 구멍을 만들 수 있는 LINVATEC bur를 이용하여 지름 8mm 크기의 원형 골 결손부를 만든다. 각 군에 따라 미리 제작된 3가지 서로 다른 배합의 골 대체물을 삽입한다. Vicryl 4-0 를 이용하여 골막을 봉합한다. Vicryl 3-0 를 이용하여 두피를 봉합한다.

## 2. Micro CT를 이용한 두개골 영상 촬영

수술 후 8개월에 호흡 마취를 이용하여 유지 농도 3%로 micro-CT를 촬영한다. 쥐는 옆드린 자세로 촬영되었으며, 골 결손부를 포함하여 충분히 넓은 범위의 두개골이 포함되도록 촬영하였다. 촬영을 통하여 얻어진 영상은 뼈 밀도에 해당되는 Hounsfield unit 에 해당되는 조직에 대하여 삼차원 재건을 시행하여 평가하였다.

## 3. 조직 화학 염색

18마리 중 각 군당 3마리 씩, 총 9마리에 대하여 안락사를 시행하여 두개골 결손부에 삽입된 골 대체물이 모두 포함되도록 일부 주변의 두개골을 포함하여 직경 약 12mm 크기의 검체를 채취하였다. 석회화 제거 중성탈회를 거쳐 H&E stain, Masson's trichrome stain을 시행하였다. 슬라이드로 제작하여 현미경을 통해 관찰 및 평가하였다.

## 4. 골 재생의 결과 비교

골 결손부에 삽입된 골 대체물을 통하여 새로 자라 들어간 신생 뼈를 육안적으로 관찰하여 재생 정도를 평가하였다. Micro CT 를 이용하여 촬영한 영상은 뼈에 해당되는 Hounsfield unit에 해당되는 조직만 삼차원적으로 재건하여 신생 골의 생성 정도 및 생성 패턴을 육안적으로 평가하였다. 또한 조직 화학 염색을 시행하여 현미경을 통해 실제 다공성 구조의 골 대체물 안으로 새로 자라 들어간 신생 뼈를 직접 확인하고 평가한다.

### III. 결과

#### 1. Micro CT를 이용한 CT 영상 비교

Micro CT는 세 군에서 각각 6마리씩, 총 18마리에 대하여 수술 후 8개월에 촬영하였다. 1군은 PCL 100% 골 대체물이 삽입되었고, 8개월 CT에서 골 절단면에서 아주 소량의 부분적인 골 재생이 관찰되었으나, 그 정도가 매우 미미하였다. 2군은 PCL 80%+BGS-7 20% 골 대체물이 삽입되었고, 다공성 구조를 통해 자라 들어간 신생 뼈가 삽입물의 구조를 따라 관찰되었고, 부분적으로 삽입물 표면을 따라 다량의 골 재생이 관찰되었다. 3군은 PCL 60%+BGS-7 40% 골 대체물이 삽입되었고, 마찬가지로 다공성 구조를 통해 자라 들어간 신생 뼈가 삽입물의 구조를 따라 관찰되었고, 부분적으로 삽입물 표면을 따라 다량의 골 재생이 관찰되었으며, 그 정도는 2군에 비하여 더 많은 정도임을 관찰할 수 있었다.

#### 2. 조직 화학 염색을 통한 슬라이드 사진 비교

세 군에서 각 군당 3마리씩 총 9마리에 대하여 안락사 후 검체를 채취하여 H&E stain 과 Masson's trichrome stain을 시행하였다. 1군은 PCL 100% 골 대체물이 삽입되었고, H&E stain 에서 골 절단면을 기준으로 신생 골은 매우 미미한 양이 관찰되었고, PCL은 생분해 되어 거의 남아 있지 않았다. PCL 보형물 내부로 자라 들어온 신생 뼈는 관찰할 수 없었으며 보형물 주변부로 육아 조직만 관찰할 수 있었다. Masson's trichrome stain 에서도 동일한 구조만 관찰할 수 있었으며, 결손부위에 뼈 조직은 관찰되지 않았다. 2군은 PCL 80%+BGS-7 20% 골 대체물이 삽입되었고, H&E stain 에서 PCL, BGS-7은 생분해 되어 잔류량이 거의 없음을 확인할 수 있었고, 1군과 비교하여 염증 반응에 의한 육아 조직이 더 적게 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 다공성 구조를 따라 PCL과 BGS-7이 있었던 자리가 뼈로 대체된 현상은 관찰할 수 없었으나, 다공성 구조 사이의 공간을 따라 신생 뼈가 자라들어갔음을 확인할 수 있었다. Masson's trichrome stain 에서도 동일한 구조를 관찰할 수 있었으며, 붉은 색으로 염색 된 신생 뼈를 더 확실하게 확인할 수 있었다. 3군은 PCL 60%+BGS-7 40% 골 대체물이 삽입되었고, H&E stain

에서 아직 남아있는 BGS-7이 일부 관찰되었다. 2군에서와 마찬가지로 1군에 비하여 염증 반응에 의한 육아 조직이 더 적게 형성된 것을 관찰할 수 있었고, 다공성 구조를 따라 신생 뼈의 성장을 관찰할 수 있었다. 또한 2군에 비하여 결손부에 자라 들어간 신생 뼈가 더 크고 넓게 자리하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Masson's trichrome stain 에서도 붉은 색으로 염색된 뼈를 통해서 재차 확인할 수 있었다.

## IV. 고찰

뼈 조직 공학 연구는 뼈 결손 부위를 대체하기 위한 적절한 생체 재료를 제공하는 것을 목표로 한다. 이러한 물질은 생분해성, 무독성 및 세포 적합성이 있어야 한다. 현재 다양한 종류의 뼈 대체물들이 활발하게 연구되고 있다. 하지만 각각의 장점과 단점들 또한 분명하여 많은 연구자들은 서로 다른 대체물의 장점을 극대화하기 위하여 여러 대체물을 혼합한 혼합물의 효과에 관심을 기울이고 있다. PCL은 biocompatible 하고, 비용이 저렴하며, 독성이 없고, 유연한 성질을 가지고 있다. 이러한 특성으로 인해 3D-printing 기술을 이용한 환자 맞춤형 보형물 제작이 가능하다. 하지만 세포 친화력이 낮고 신생 골 재생을 촉진하지 못 하여 남아 있는 뼈와 결합하지 못 하고, 신생 뼈의 재생도 관찰되지 않는다. 반면에 Bioglass라고도 알려진 생체 활성 유리(bioactive glass)는 bioactivity 라는 특성을 통해 남아있는 뼈와의 접착력이 강하고 osteoconductive한 특성이 있어서 신생 뼈 재생을 촉진한다. 본 연구에서는 이러한 두 가지 뼈 대체물의 장점을 모두 활용하기 위하여 두 물질의 혼합물을 사용하였다. 우선 뼈 대체제 본연의 목적에 따라 다양한 모양의 뼈 결손부에 적용할 수 있도록 자유자재로 3D-printing 이 가능하여야 한다. BGS-7은 높은 강도와 낮은 유연성으로 인해 3D-printing 의 정교함이 매우 떨어지고, PCL 의 함량을 높일수록 유연성이 확보된다. 기존의 연구에 의하면 60% 이상의 PCL이 포함되어야 정교한 3D-printing 이 가능하기 때문에 본 연구에서의 세 군을 설정하였다.<sup>14</sup> 그리고 2군, 3군에서 1군에 비하여 주변의 뼈와 더 강하게 결합되어 있고, 신생 뼈의 재생도 많이 일어났음을 정성적으로 확인할 수 있었다.

본 연구에서 사용된 PCL/BGS-7 보형물은 약 400 $\mu$ m의 구멍을 지닌 다공성 구조를 가지고 있다.<sup>14</sup> 조직 화학 염색 결과를 보면 PCL/BGS-7 이 생분해 되어 대부분 사라졌지만 신생 뼈로 대체되지는 않았다. 하지만 구멍을 통해 신생 뼈의 생성을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 합성물은 구멍의 크기가 작고 간격이 넓다. 생분해가

되지만 시간이 오래 소요되는 합성물을 신생 뼈가 대체되어 자라 들어가지 않는 것으로 관찰되었다. 하지만 빈 공간인 다공성 구조를 따라 신생 뼈가 자라 들어가는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 구멍의 크기를 더 크게 하고, 간격을 더 좁게 하면 더 많은 양의 신생 뼈 생성을 기대할 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 하지만 이 경우, 합성물 자체의 강도와 내구성이 낮아지게 된다. 그러므로 적절한 다공성 구조의 크기와 간격에 대해 추가적인 더 큰 규모의 연구가 필요하다.

본 연구에서는 CT 촬영 시기와 조직 화학 염색 시기가 추적 관찰 8개월이었다. 기존의 유사한 연구에서 대부분의 연구들은 수술 후 4-8주 사이에 CT 및 조직 화학 염색을 시행하였다. 수술 후 1-2개월 이내에 평가가 시행되었던 기존의 연구들에서는 PCL, BGS, BCP 등의 골 대체물들이 생분해 되지 않고 거의 대부분 그대로 남아 있다. 따라서 다공성 구조를 따라 자라 들어가는 신생 뼈 외에 합성물이 존재하는 위치로 신생 뼈가 대체되는지 여부를 알기 어려웠다. 본 연구에서 평가 시기를 수술 후 8개월로 설정한 이유는 PCL이 생분해 되어 대부분 없어졌을 것으로 예상되는 시기에 평가를 시행하여 다공성 구조로 자라 들어가는 신생 뼈 외에 합성물이 분해, 흡수 되어 사라지면서 신생 뼈로 대체되는지 여부도 확인하고자 하였다. 3군에서는 남아있는 BGS-7 이 관찰 되었지만 1,2군에서는 분해, 흡수 되어 합성물이 거의 남아있지 않음을 관찰할 수 있었다. 하지만 그 자리를 신생 뼈가 대체하여 재생되지 않았다는 결과도 동시에 확인하였다. 추적 관찰 기간이 8개월로 길어서 발생하는 단점으로는 osteoblast의 활성을 조직 화학 염색에서 확인하기 어렵다는 점이다. Osteoblast의 신생 뼈 생성 활성은 초기로 갈수록 활발하게 관찰할 수 있으며, 8개월이 지난 시점에서는 결과적으로 만들어진 뼈의 구조와 osteocyte는 관찰할 수 있지만 osteoblast는 확인할 수 없었다. 하지만 생성된 신생 뼈를 충분히 관찰하였으므로 이 결과로 osteoblast가 2,3군에서 활발하게 작용하였음을 확인할 수 있다. 향후 더 대규모의 연구가 진행된다면, 초기의 osteoblast의 활성 또한 관찰하기 위하여 실험 초기의 검체를 채취하여 평가를 추가로 시행해 볼 수 있다.

만약 향후에 대규모의 연구가 진행된다면, PCR, immunohistochemistry 등 더 다양한 분석 방법을 통해 결과를 평가할 수 있을 것이다. 또한 이번 연구에서는 세 군에서 각각 3마리 씩, 총 9마리의 검체를 통해 결과를 분석하였다. 이 숫자는 통계적인 분석이

어려운 숫자이므로, 향후 더 많은 수의 실험을 통해 정량적인 통계적 평가도 해볼 수 있다.

## V. 결론

본 연구는 쥐 두개골의 임계 골 결손부에 대한 PCL/BGS-7 합성물의 효과를 입증하기 위한 동물실험 연구로, 본 실험을 통해 PCL과 BGS-7의 합성물이 뼈와 결합 능력이 뛰어나고, 신생 뼈 재생을 촉진할 수 있다는 사실을 확인하였다. 향후 인체를 대상으로 한 추가적인 연구가 필요하다.

## VI. 참고문헌

1. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:299–308
2. Laino L, Iezzi G, Piattelli A, et al. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with sandwich technique: Bone block from the chin area versus corticocancellous bone block allograft—clinical and histological prospective randomized controlled study. *Biomed Res Int* 2014;2014:982104
3. Van Der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, et al. Bone substitutes in the Netherlands—a systematic literature review. *Acta Biomater* 2011;7:739–750
4. Calori GM, Mazza E, Colombo M, et al. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury* 2011;42(suppl 2):56–63
5. Zhu Y, Gao C and Shen J. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials* 2002; 23: 4889–4895
6. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, et al. Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2010; 30: 1129–1136.
7. L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee Bonding mechanism at interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 5 (1971), pp. 117-141
8. R.A. Bhatt, T.D. Rozental Bone graft substitutes. *Hand Clin.*, 28 (2012), pp. 457-468
9. L.L. Hench, H.A. Paschall Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed. Mater. Res.*, 7 (1973), pp. 25-42
10. V.V. Välimäki, H. Aro Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand. J. Surg.*, 95 (2006), pp. 95-102
11. M. Neo, T. Nakamura, C. Ohtsuki, R. Kasai, T. Kokubo, T. Yamamuro Ultrastructural study of the A-W GC-bone interface after long-term implantation in rat and human bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 (1994), pp. 365-372
12. L. Moimas, M. Biasotto, R.D. Lenarda, A. Olivo, C. Schmid Rabbit pilot study on the resorbability of three-dimensional bioactive glass fibre scaffolds. *Acta Biomater.*, 2 (2006), pp. 191-199
13. J.H. Lee, H.-S. Ryu, J.-H. Seo, B.-S. Chang, C.-K. Lee, Drug Chem. Optimized synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Toxicol.* 33 (2010) 38.
14. Y.B. Kim, J. Y. Lim, G. H. Yang, J. H. Seo, H. S. Ryu, G. H. Kim 3D-printed PCL/bioglass (BGS-7) composite scaffolds with high toughness and cell-responses for bone tissue regeneration. *J. Industrial Engineering Chemistry* 79 (2019) 163–171

## 그래프 및 그림

Figure1. 두개골 결손부 수술의 디자인. 두개골 결손부 수술을 위하여 랫드의 정중앙 부 두피에 2cm 길이의 절개선을 디자인하였다.



Figure 2. 두개골 결손부 수술 (두피 절개). 두개골 결손부 수술을 위하여 두피에 디자인 된 2cm 길이의 절개선을 따라 절개를 시행하였다.



Figure 3. 두개골 결손부 수술 (골막 절개). 두개골 정중앙 부위에 두피 절개 후 두개골을 싸고 있는 골막을 절개하여 두개골을 노출하였다.



Figure 4. 두개골 결손부 수술 (8mm 원형 결손 생성 중). 노출 된 두개골 정중앙 부위에 8mm 원형 결손을 만드는 LINVATEC burring을 시행하고 있다.



Figure 5. 두개골 결손부 수술 (8mm 원형 결손 완성). 두개골 정중앙 부위에 8mm 원형 결손이 생성되었고, 적출된 뼈와 삽입할 PCL/BGS-7 보형물.

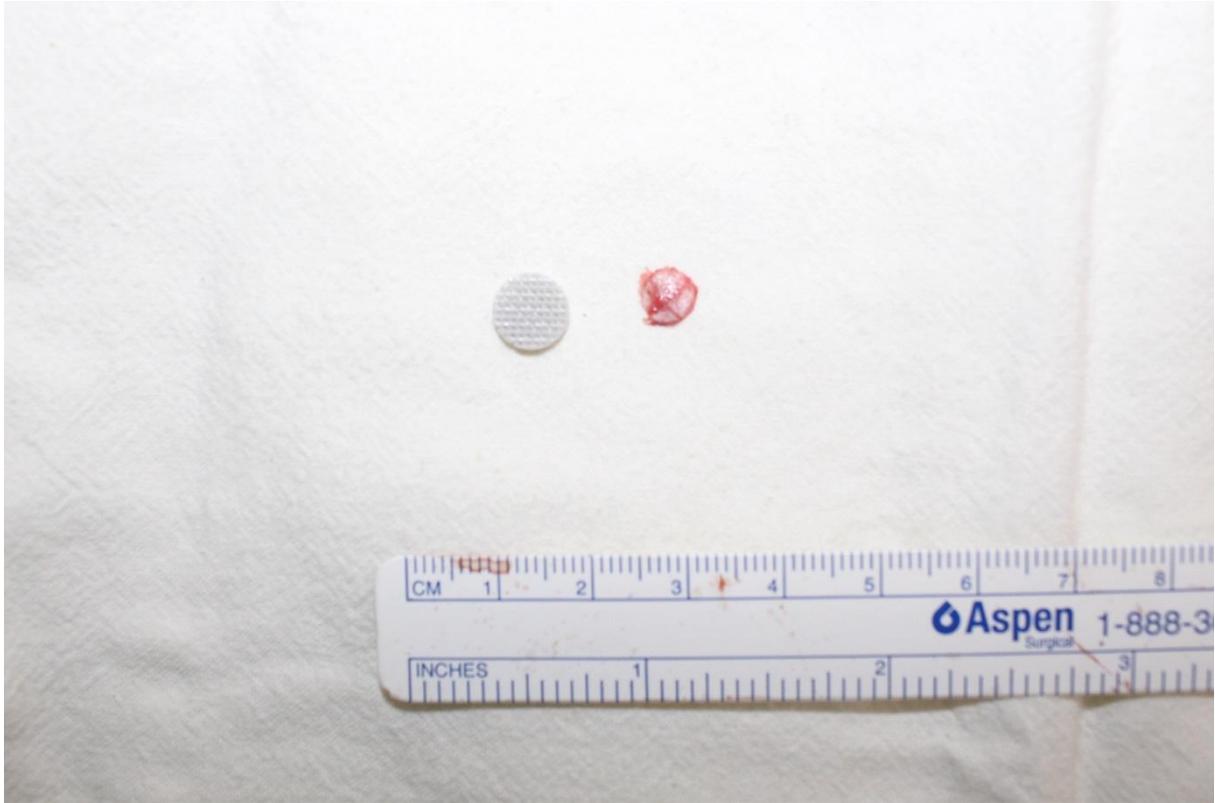


Figure 6. 두개골 결손부 수술 (8mm 뼈 대체물 삽입). 두개골 중앙부에 만들어진 뼈 결손부에 8mm PCL/BGS-7 scaffold 를 삽입하였다.



Figure 7. 두개골 결손부 수술 (골막 봉합). 뼈 대체물 삽입 후 Vicryl 4-0를 이용하여 골막을 봉합하였다.



Figure 8. 두개골 결손부 수술 (두피 봉합). Vicryl 3-0를 이용하여 두피를 봉합하였다.

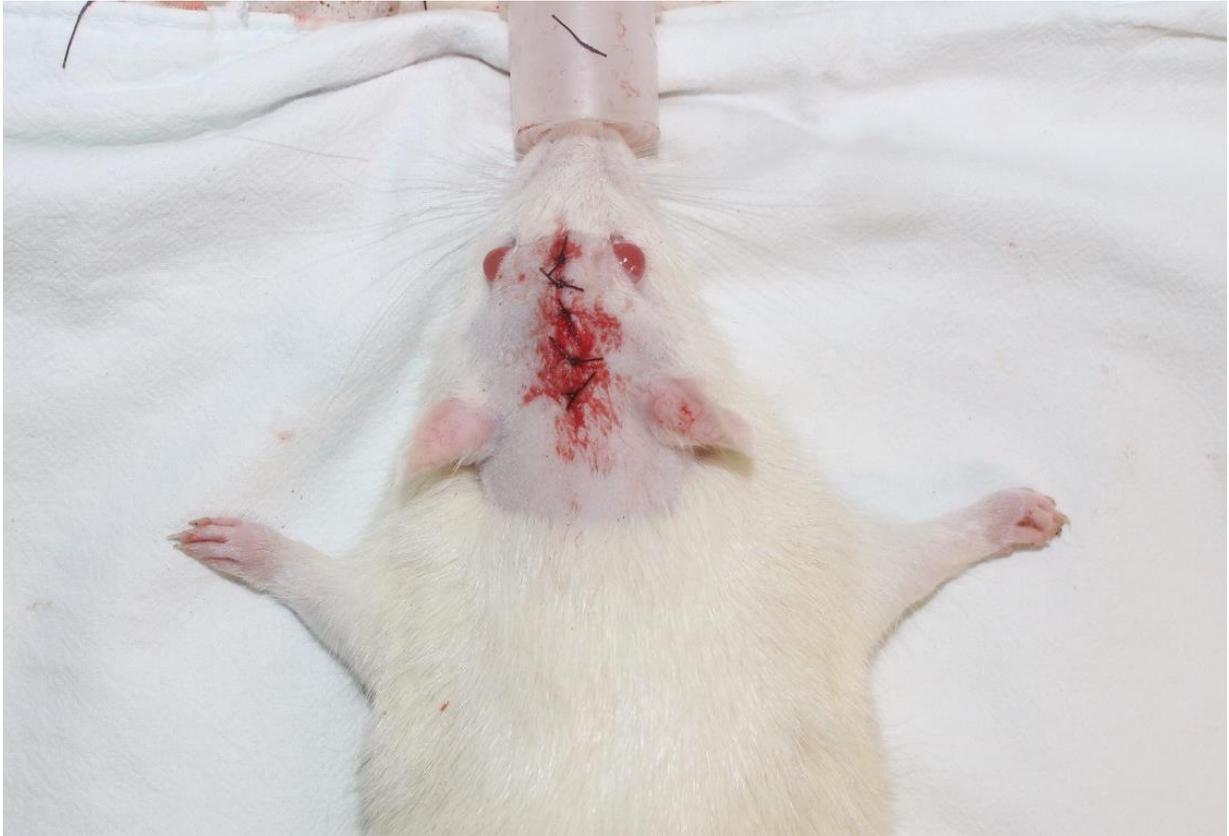


Figure 9. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(1군). PCL 100% 뼈 대체물을 삽입한 1군에서 수술 후 8개월 째, micro CT를 촬영하여 3D 재건을 하였다. 신생 골 재생이 거의 없음을 확인할 수 있다.

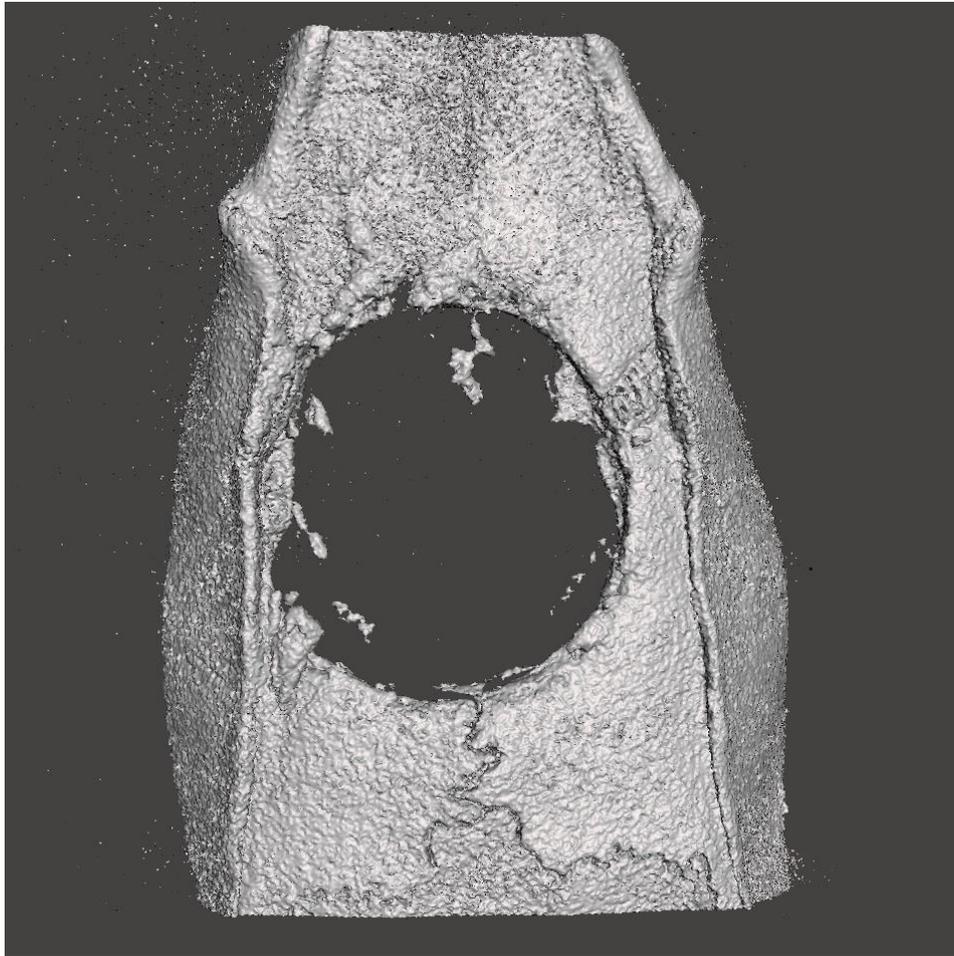


Figure 10. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(1군). PCL 100% 뼈 대체물을 삽입한 1군에서 수술 후 8개월 째, 검체를 채취하여 H&E stain (위), Masson's trichrome stain (아래) 를 시행하였다. 신생 골 재생이 거의 없음을 확인할 수 있다.

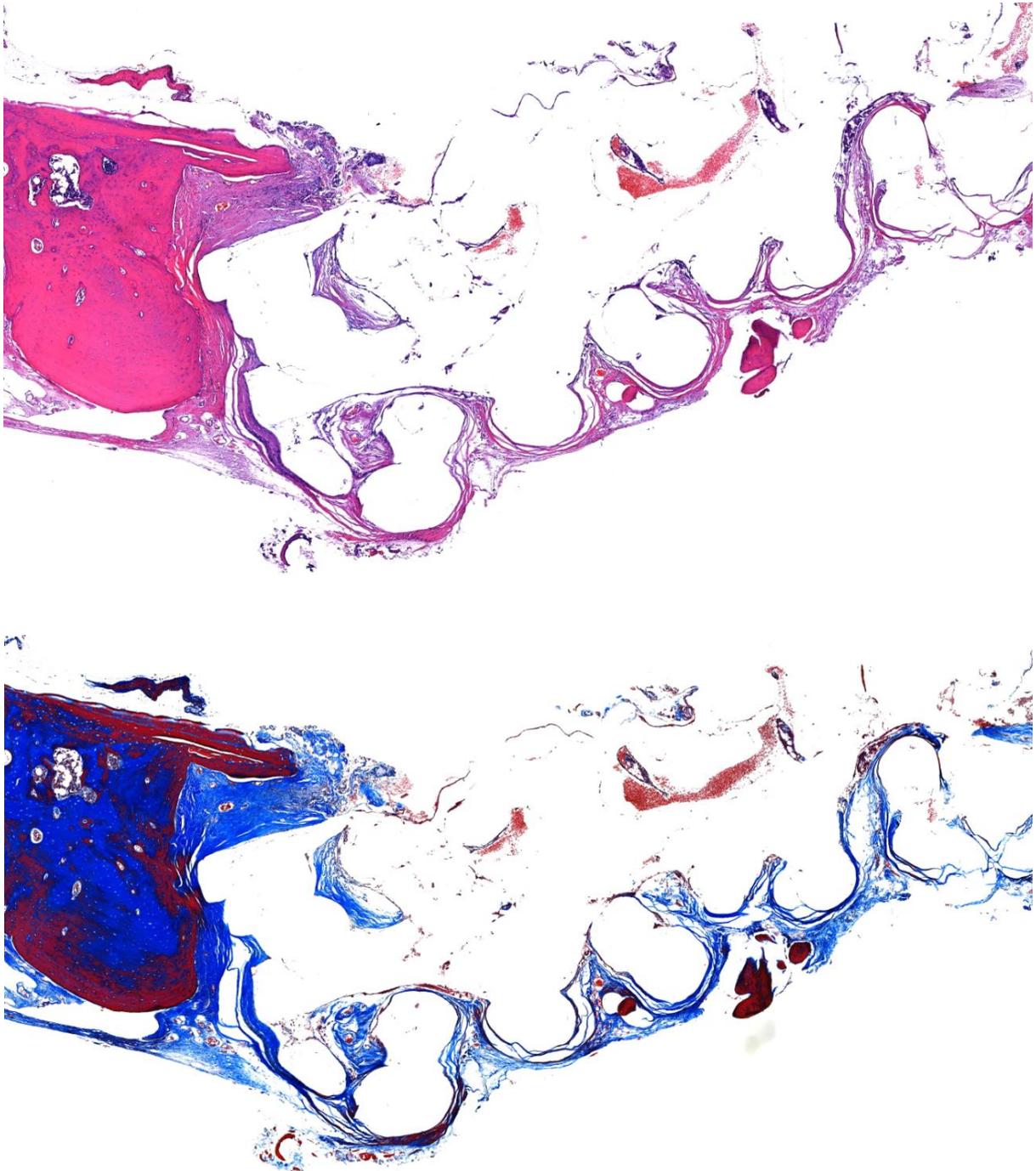


Figure 11. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(2군). PCL 80% + BGS-7 20% 뼈 대체물을 삽입한 2군에서 수술 후 8개월 째, micro CT를 촬영하여 3D 재건을 하였다. Porous 구조를 따라 신생 뼈 재생이 결손부 전반에 걸쳐 진행되었고, 일부분에서는 삽입물 표면으로 다량의 신생 뼈 조각이 재생된 것이 관찰되었다.

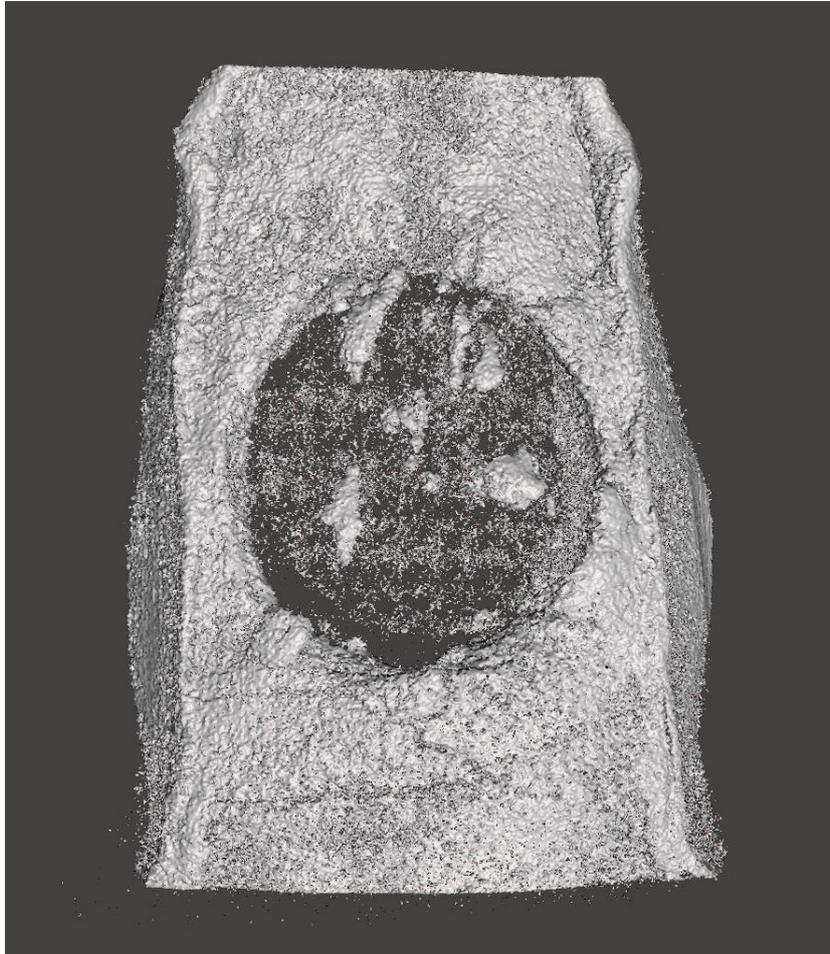


Figure 12. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(2군). PCL 80% + BGS-7 20% 뼈 대체물을 삽입한 2군에서 수술 후 8개월 째, 검체를 채취하여 H&E stain (위), Masson's trichrome stain (아래) 를 시행하였다. Porous 구조를 따라 신생 뼈 재생이 관찰되었다.

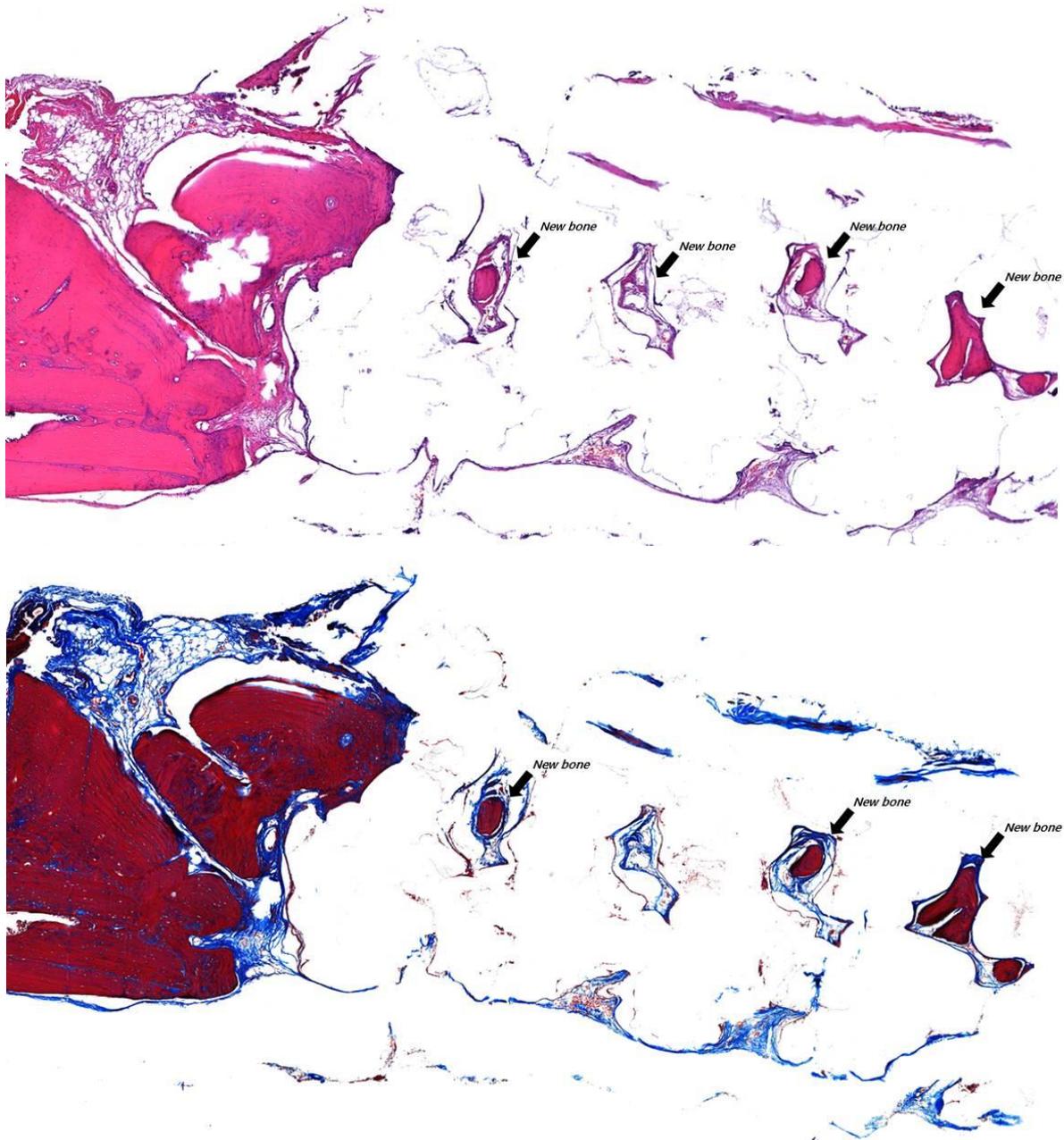


Figure 13. 두개골 결손부 micro CT 3D 재건 사진(3군). PCL 60% + BGS-7 40% 뼈 대체물을 삽입한 3군에서 수술 후 8개월 째, micro CT를 촬영하여 3D 재건을 하였다. Porous 구조를 따라 신생 뼈 재생이 결손부 전반에 걸쳐 진행되었고, 일부분에서는 삽입물 표면으로 다량의 신생 뼈 조각이 재생된 것이 관찰되었다.

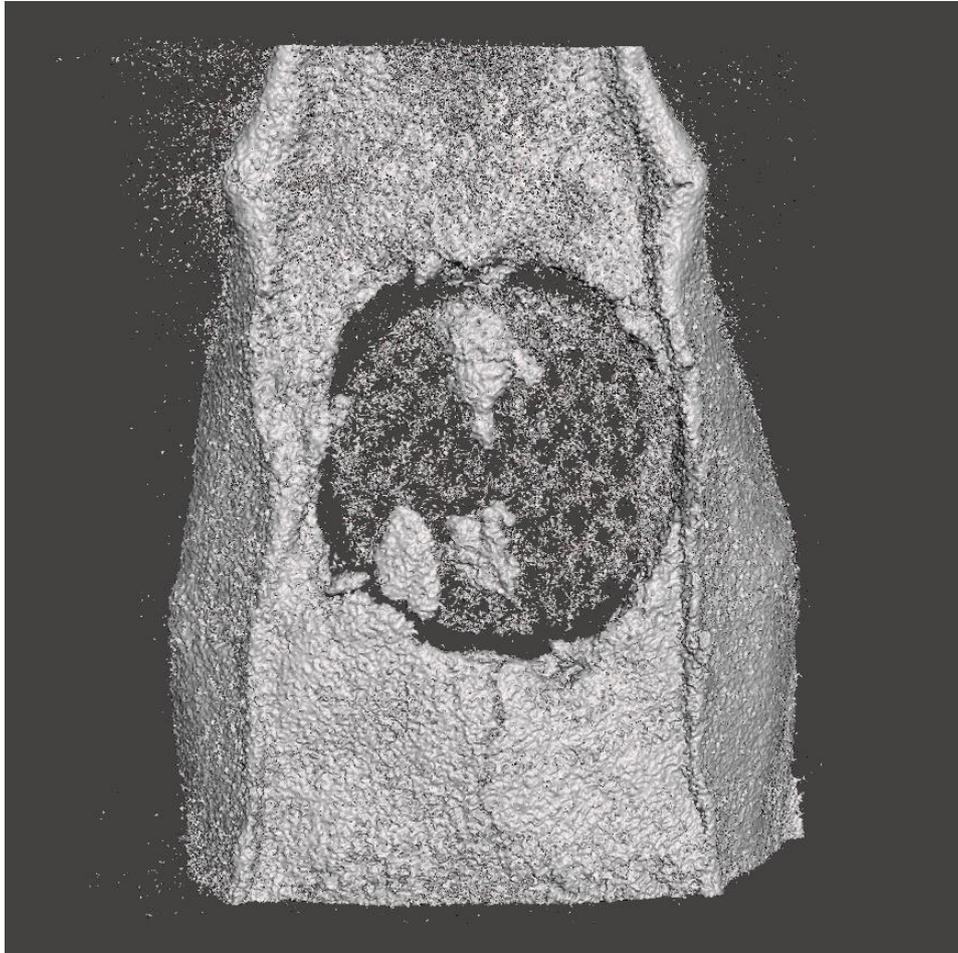
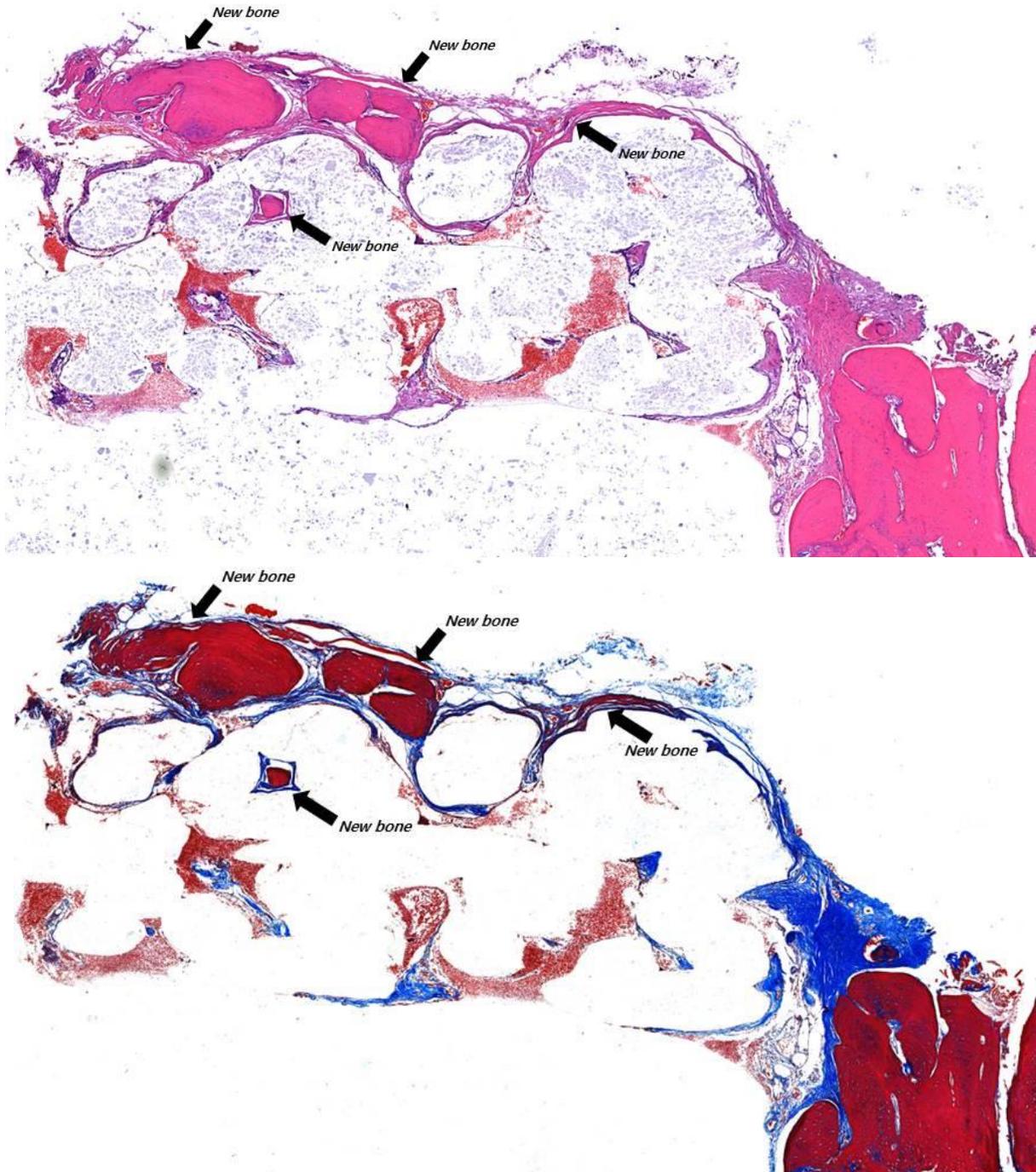


Figure 14. 두개골 결손부 검체 조직 화학 염색 사진(3군). PCL 60% + BGS-7 40% 뼈 대체물을 삽입한 3군에서 수술 후 8개월 째, 검체를 채취하여 H&E stain (위), Masson's trichrome stain (아래) 를 시행하였다. Porous 구조를 따라 신생 뼈 재생이 관찰되었고, 일부에서 다량의 신생 뼈 조각이 재생된 것을 확인하였다.



## 영문 요약

### Introduction

Autologous bone grafts, allogeneic bone grafts, and bone substitute grafts can be considered as treatments for bone defects. In the case of autologous tissue graft, the selection of a donor that can be collected and the amount of bone that can be collected are extremely limited, and the donor site morbidity is concerned. In the case of allogeneic bone grafts, infection and rejection are very common. Therefore, research on synthetic materials that can be used for bone defects is actively underway, and PCL (polycaprolactone) and BGS-7 (CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glass-ceramics) are one of the most widely used and most studied materials. We intend to develop an ideal bone substitute by synthesizing these two materials with different characteristics using 3D printing technology, which is recently popular. The purpose of this study is to generate critical bone defects that cannot be treated naturally in the skull of rats, and PCL/BGS-7 scaffold are synthesized in different ratios and inserted into the bone defects, followed by observing the degree of bone regeneration to find the ideal proportion of bone substitutes that promote.

### Methods

A total of 18 SD rats (8 weeks old) were divided into 3 groups.

Group1 (n=6) : critical sized calvarial bone defect (8mm) with 100% PCL scaffold

Group2 (n=6) : critical sized calvarial bone defect (8mm) with 80% PCL+ 20% BGS-7

Group3 (n=6) : critical sized calvarial bone defect (8mm)에 60% PCL+ 40% BGS-7

1. Creates critical bone defects and inserts implants into the rat's defect

Start and maintain anesthesia by inhalation with 2-3% Isoflurane. After exposing the skull by incising the scalp, a circular defect with a diameter of 8 mm is created in the skull using an instrument. After inserting the 3D printed PCL/BGS-7 composite scaffold in different ratios for each group, the scalp is sutured.

2. Micro CT imaging

At 8 months after surgery, micro-CT is taken after inhalation anesthesia.

### 3. Histochemical staining

Sacrifice was performed on a total of 9 rats, 3 rats per group, and samples of the skull were collected and subjected to H&E stain and Masson's trichrome stain.

### 4. Comparison of results of bone regeneration

Visually evaluate the progression of ossification through images taken using Micro CT. In addition, histochemical staining is performed to confirm the actual osteocyte and new bone structure through a microscope.

## **Results**

### 1. Image comparison using Micro CT

In group 1, regeneration of new bones was hardly achieved, and in groups 2 and 3, bone regeneration was observed along the pore structure of the PCL/BGS-7 scaffold. In addition, the degree of regeneration was higher in group 3 than in group 2.

### 2. Comparison of tissue slide by histochemical staining

Almost no new bone structure was found in group 1. In groups 2 and 3, regeneration of new bones was observed along the pore structure of the scaffold.

## **Conclusion**

This study is an animal study to prove the effect of the PCL/BGS-7 composite on the critical bone defects of the rat skull. Through this experiment, the composite of PCL and BGS-7 has excellent bone-binding ability and It has been confirmed that it can promote new bone regeneration. Further research on the human body is needed in the future.