

이온빔조사에 의한 생분해성 차폐막의 세포부착력 증진에 관한 연구

이용무¹ · 박윤정² · 이승진² · 구 영¹ · 류인철¹ · 한수부¹ · 최상묵¹ · 정종평¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²이화여자대학교 약학대학 물리약학교실

I. 서론

1976년 Melcher가 치주조직의 치유양상은 치근면에 유주하는 세포의 성격에 달려 있으며, 치주인대세포가 치주조직의 재생을 유도할 수 있을 것이라는 가설¹⁾을 제시한 이래, 차폐막을 이용하여 치은결합조직 및 치은 상피세포의 유입을 차단하고, 치주인대세포의 선택적 증식을 도모함으로써 신생백악질의 형성과 결합조직의 재부착을 확인한 동물실험들²⁻⁴⁾이 보고되었고 이를 토대로, Nyman 등⁵⁾이 사람에서 이러한 차폐막의 이용으로 백악질의 재생과 결합조직의 재부착을 확인하였다. 이후 Gottlow 등⁶⁾에 의해서 ‘조직유도재생술(Guided Tissue Regeneration: GTR)’이라는 명명과 함께 기본적인 술식이 제시되어 임상에 이용되기 시작하면서, 여러 연구자들에 의해서 차폐막을 이용한 조직유도재생술의 임상결과가 발표되어, 현재로서는 가장 예측 가능한 치주조직 재생술식의 방법으로 인정되고 있다. 초기에는 expanded polytetrafluoroethylene 등의 비분해성 차폐막이 일반적으로 이용되었으나, 최근에는 폴리락트산 및 폴리글리콜릭산 등을 기본재료로 한 생분해성 차폐막의 이용이 보편화되고 있다.

이들 비분해성 및 생분해성 차폐막들은 여러 연구

를 통하여 조직에 대한 차폐효과가 뛰어나고 생체내 안정성과 생체친화성이 좋은 것으로 인정되고 있다. 그러나 이들은 임상에 적용시 회복기간 동안 치은퇴축과 이에 따른 차폐막의 노출이 문제로 지적되고 있는데 이것은 이들 제제의 세포 및 조직접착력이 낮은 것이 큰 원인으로 생각된다. 즉 차폐막이 노출되지 않고 효과적으로 골결손부위를 격리시키기 위해서는, 차폐막을 피개한 판막조직으로부터 차폐막 외표면으로의 치은결합조직 세포의 이동 및 부착에 의해 차폐막과의 견고한 융합이 필요하며, 또한 내측으로는 골조직과 단단히 밀착 융합함으로써 혈병을 보호하고 고정시켜야 치유과정을 도울 수 있다. 이는 또한 차폐막의 노출시에도 창상부위의 세균의 침입에 대한 방어능력의 측면에서도 중요한 조건이다.

차폐막물질인 polylactide류의 고분자는 치주조직 재생에 있어서 적절한 기계적 강도와 다공성 구조 그리고 조직 차폐효과가 우수한 반면 그 자체가 소수성이기 때문에 세포와의 친화력이 부족한 단점을 안고 있다. 이에 폴리락트산과 같은 소수성 고분자 제제에 대한 표면개질을 통하여 세포친화력의 증진을 도모하는 방법이 있다. 소수성 고분자에 대해서 표면개질은 세포친화성을 가지는 화학관능기를 표

면에 이식하는 화학적인 방법과 세포친화성물질을 고분자제제에 함유하여 이의 조절방출을 통한 세포친화성의 증진법, 표면에 대해 물리적으로 구조를 다공성으로 하는 방법 및 이온 및 가스를 주입하여 표면의 구조를 물리, 화학적으로 변화시켜 고분자의 소수성정도를 변화하여 세포친화도를 증진하고자 하는 방법 등이 알려져 있다. 이중 이온빔조사(ion beam irradiation)에 의한 고분자의 표면개질은 고분자의 표면을 화학적, 물리화적으로 변화시키는데 있어서 화학적인 합성법에 비해 간편하고 표면개질의 조건설정이 용이하여 효과적인 방법으로 제시되고 있다⁷⁻⁹⁾. 이온조사는 조사되는 이온의 종류, 양, 에너지에 의해 조건 설정이 자유로운 장점을 가지고 있다. 조사되는 이온은 주로 나트륨, 산소, 질소, 아르곤, 헬륨 등의 일가 양이온을 일정전압하에서 일정에너지로 가하게 된다. 최근의 연구들에서 몇몇의 고분자에 대해 이러한 이온들을 그 표면에 조사하였을 때 조사된 고분자의 세포친화력이 증가되었음을 보고된 바 있다¹⁰⁻¹⁶⁾.

이 연구는 차폐막의 조직접합성 증진시킬 수 있는 방법으로서 이온빔조사에 의한 표면개질방법의 유용성을 평가하고자, 다공성 폴리락트산 차폐막에 아르곤(Ar^+)이온을 조사하고 이에 따른 차폐막의 친수도와 세포친화성의 변화양상을 알아보는데 그 목적이 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 폴리락트산(Poly L-lactic acid, PLLA)의 차폐막의 제조

초기강도 5.2g/d, 20%의 신도로 편직된 polyglycolic acid(PGA, 삼양사, 한국) mesh에 분자량 376,000인 polylactide(PLLA)용액을 피복시킨 후 상온에서 24시간 건조하고 다시 진공 건조시켰다. 제작된 PLLA차폐막은 두께가 $150\mu m$ 이고 다공성 구조상의 막내의 미세공의 크기는 약 $8\mu m$ 정도였다 (Figure 1).

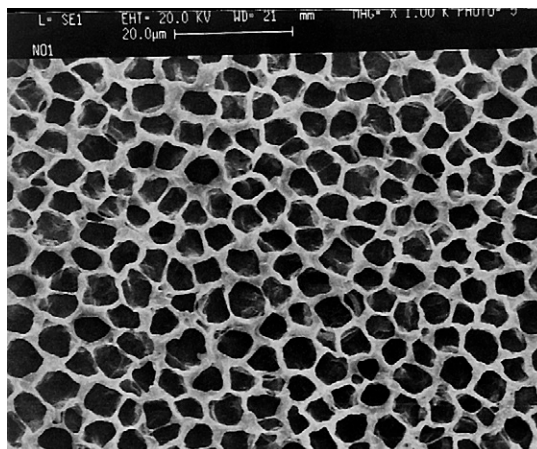


Figure 1. Scanning electron micrograph of PLLA membrane

2. PLLA 차폐막에 대한 이온빔 조사

30-400 KeV 전위작동범위를 가진 이온주입기(ion implanter, High Voltage Inc, USA)를 이용하여 PLLA 차폐막표면에 35 KeV의 에너지로 아르곤이온(Ar^+)을 5×10^{13} , 5×10^{14} , 5×10^{15} ions/cm²의 용량으로 PLLA 차폐막 표면에 대해 주입하였다.

3. 이온빔이 조사된 PLLA 차폐막의 표면 접촉각 측정

이온빔 조사 시료는 접촉각 측정을 통하여 표면성질분석을 시행하였다. 접촉각 측정을 위해서는 10 μl 의 순수 증류수의 액적을 상온에서 이온빔이 조사된 PLLA 차폐막 및 조사되지 않은 PLLA 차폐막에 떨어뜨려 접촉각측정기(Kernco Ins. Co., TX, USA)를 이용하여 실시하였다.

4. 골아세포의 배양 및 PLLA 차폐막에의 정착

골아세포는 임신한지 18-19일째 경과한 Sprague-Dawley 백서로부터 적출한 백서태자로부터 두개골을 얻어 Bellows 등¹⁷⁾이 제안한 순차소화효소기법으로 분리, 배양하여 사용하였다. 배양된 골아세포를

heamocytometer로 수를 측정하여 10% FBS(Gibco, NY, USA), 1% antibiotic-antimycotic solution(Gibco)가 함유된 α -MEM(Gibco)에 5×10^6 cell/ml의 농도로 분산시켜 세포부유액을 만들었다. 24-well plate(Nunc, NY, USA)바닥에 vacuum grease를 이용하여 PLLA차폐막, Ar^+ 이온이 주입된 PLLA차폐막을 장착하고, 50 μ l의 상기 배양액으로 미리 wetting시킨 후 분비된 세포부유액을 20 μ l 씩 차폐막에 가하여 가한 cell의 밀도가 각 1cm \times 1cm의 차폐막당 10^5 cells/cm²가 되도록 하였다. 세포액을 접종한 상태에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 3시간동안 전배양하여 cell이 정착하도록 하였다. 전배양후 1ml 씩의 배양액을 추가로 가하고, 24시간 동안 배양하였다.

5. 폴리락트산 차폐막 표면에 부착한 세포 관찰

차폐막에 부착된 세포의 상태 및 분화된 정도를 주사전자현미경(Stereoscan 360, Cambridge Ins., Cambridge, UK)하에서 관찰하였다. 골아세포가 부착된 차폐막을 HBSS(Gibco)로 3-4회 세척하여 부착되지 않은 세포는 제거하고, 0.1M PBS(pH 7.4)에 녹인 2.5% glutaraldehyde 용액에 4 $^{\circ}$ C 에서 40 분간 전고정하였다. 고정후 0.1M PBS으로 세척하고 다시 0.1M PBS에 1% 농도로 녹인 osmium tetroxide로 0 $^{\circ}$ C 에서 40분간 후고정하였다. 후고정 후 -70 $^{\circ}$ C 에서 24시간 보관하였으며 이를 동결건조하여 gold-palladium coating 하여 주사전자현미경으로 관찰하였다.

6. 이온빔이 조사된 차폐막에 대한 세포 접촉력 실험

배양 24시간후 PLLA차폐막에 부착된 세포의 생활력 및 세포수를 측정하였다. 골아세포가 부착된 차폐막을 HBSS(Gibco)로 3-4회 세척하여 부착되지 않은 세포는 제거하고, 0.25% trypsin-EDTA(Gibco)로 처리하여 세포를 탈리시킨 후 원침하여 세포를 수집하였다. 수집된 골아세포응집물에 일정액의 배지를

가하여 세포의 부유액을 만들고 heamocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였으며, flow cytometer(FACS Caliber, Becton Co., CA, USA)를 이용하여 세포의 생활력을 측정하였다.

7. Alkaline phosphatase(ALPase) 활성 측정

PLLA차폐막에 부착, 증식된 골아세포의 ALPase 활성을 흡광도법으로 측정하였다. 전술한 바의 방법으로 각 차폐막에 부착된 세포를 배양 1일 후에 수집하여 0.5 ml의 증류수를 가한 수 1 분간 얼음 위에서 초음파 분쇄하였다. 0.1 ml 의 세포 분쇄액을 0.1ml 의 0.1 M glycine-NaOH buffer, 0.1 ml 의 15 mM para-nitrophenol phosphate(PNPP), 생리식염수에 용해한 0.1%의 Triton X-100 및 0.1 ml 의 증류수와 혼합하고 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응 후에 2.5 ml 의 0.1 N NaOH를 첨가하고 얼음 위에서 방치하여 반응을 중지시키고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 용액 내의 생산된 para-nitrophenol의 양을 정량하였다.

8. 통계분석

이온빔이 조사되지 않은 차폐막과 각용량별로 조사된 차폐막에 대한 접촉각측정, 세포부착도측정 및 ALPase 활성측정 결과에 대한 각군별 비교는 unpaired t-test를 이용하여 P<0.01에서 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 이온빔이 조사된 차폐막의 표면 접촉각

대조군 차폐막 및 이온빔조사량에 따른 차폐막의 표면 접촉각의 측정결과, 실험에 사용한 모든 용량의 이온빔조사에 의해 표면 접촉각이 유의하게 낮아지는 것으로 나타났는데, 그중 5×10^{14} ions/cm²에서 가장 낮은 접촉각이 관찰되었다. 대조군에서는

Table 1. Contact angles in each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

	Control	5×10^{13}	5×10^{14} (ions/cm ²)	5×10^{15}
contact angle ^a (°)	133.0±1.0	81.0±5.6*	68.3±2.9*	82.0±3.0*

^amean±s.d., N=4; *P<0.01, as compared with control,

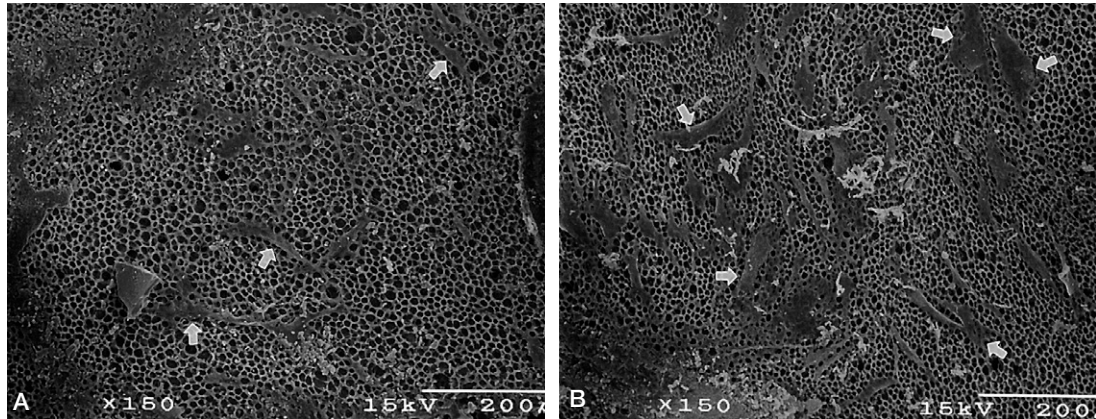


Figure 2. Scanning electron micrograph of osteoblasts attached on the PLLA membrane. Arrows indicate osteoblasts. A: control PLLA membrane, B: ion beam(5×10^{15} ions/cm²) irradiated PLLA membrane

133.0±1.0°의 접촉각을 보였는데 반해, 5×10^{13} ions/cm²의 용량의 이온빔조사에 의해 81.0±5.6°를 보였으며, 5×10^{14} ions/cm²의 용량에서는 68.3±2.9°까지 감소하였다. 한편 5×10^{15} ions/cm²의 용량에서는 오히려 다시 반등하여, 82.0±3.0°의 접촉각을 보였다(Table 1, Figure 2).

2. 차폐막 표면에 부착한 세포관찰

이온빔이 조사되지 않은 대조군의 차폐막에 부착된 세포는 방추형 혹은 다각형의 모양으로 차폐막표면에 잘 부착하여 있는 것으로 관찰되었다(Figure 3A). 이온빔의 조사에 의한 차폐막의 구조적 변화는 뚜렷이 관찰되지 않았으며, 본래의 다공성 구조가 잘 유지되고 있었다. 이온빔이 조사된 차폐막의 표면에 부착한 세포의 모양 역시 골아세포의 전형적인 모양을 보이며 방추형 혹은 성상으로 차폐막표면에 잘 부착하여 있었으며 전체적으로 대조군에 비해 부착

한 세포들이 조사되지 않은 대조군에 비해 보다 조밀하게 보였다(Figure 3B).

3. 이온빔이 조사된 차폐막에 대한 세포접착력

Flowcytometer 상에서 각 차폐막에서 탈리된 세포들은 생활력이 잘 유지되고 있음이 확인되었다(Figure 4). 각 차폐막에 부착한 세포수 산정결과, 대조군에서는 $5.53 \pm 0.51 (10^4 \text{ cell/cm}^2)$ 으로 나타났고 5×10^{13} , 5×10^{14} , 5×10^{15} ions/cm²에서 각각 7.25 ± 0.65 , 8.48 ± 0.46 , 7.75 ± 0.73 으로 나타나 이온빔조사에 의해 세포부착도가 유의하게 높아지는 것으로 관찰되었으며 5×10^{14} ions/cm²에서 가장 높은 세포부착도를 보였다(Table 2, Figure 4).

4. 차폐막에 부착된 골아세포의 ALPase 활성

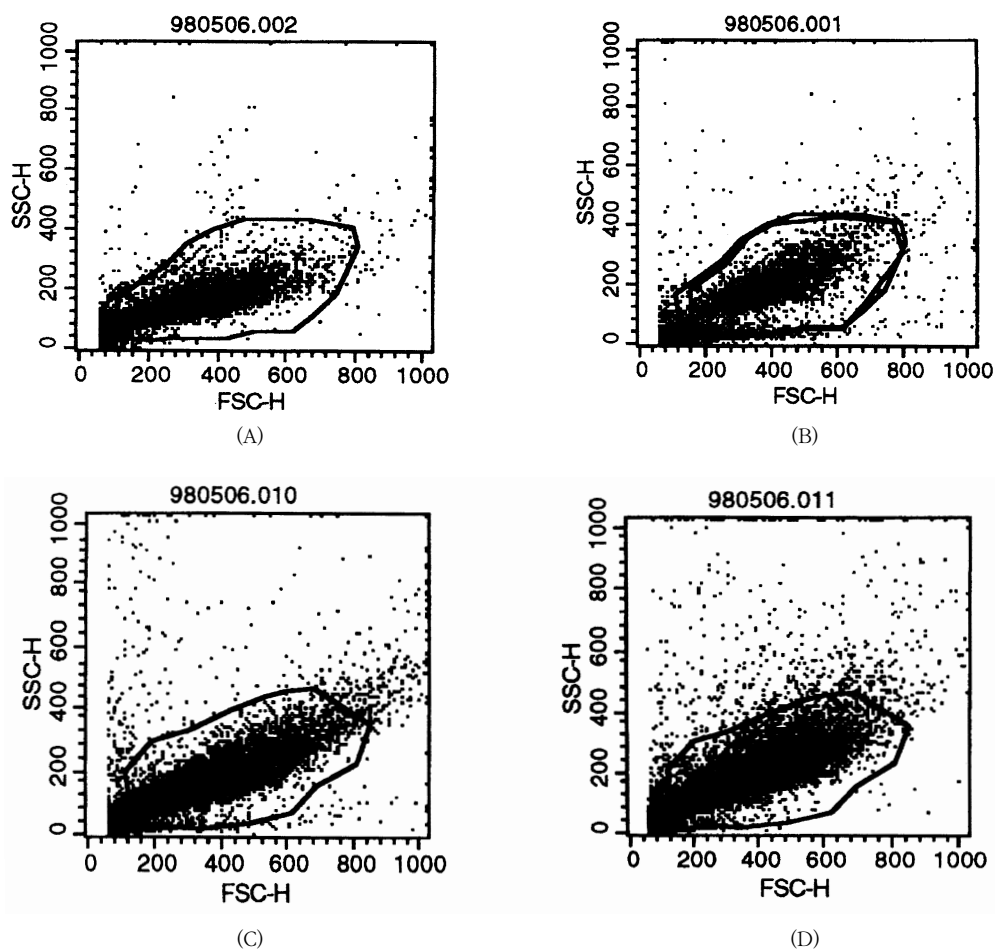


Figure 3. Viability of adhered osteoblasts onto ion beam irradiated PLLA membranes(findings by flow cytometer). A: control PLLA membrane, B: 5×10^{13} ions/cm² irradiated PLLA membrane, C: 5×10^{14} ions/cm² irradiated PLLA membrane, D: 5×10^{15} ions/cm² irradiated PLLA membrane.

Table 2. Cellular attachment in each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

	Control	5×10^{13}	5×10^{14} (ions/cm ²)	5×10^{15}
Number of attached Osteoblasts ^a (10 ⁴ cell/cm ²)	5.53 ± 0.51	$7.25 \pm 0.65^*$	$8.48 \pm 0.46^*$	$7.75 \pm 0.73^*$

^amean \pm s.d., N=4; *P < 0.01, as compared with control

각 차폐막에 부착한 골아세포의 ALPase 활성 측정 결과는 Table 3과 같다. 이온빔조사에 의한 골아세

포의 ALPase 활성은 큰 변화를 보이지는 않았는데, 대조군에서는 5.52 ± 1.17 (nM of PNP/30 min/10⁴

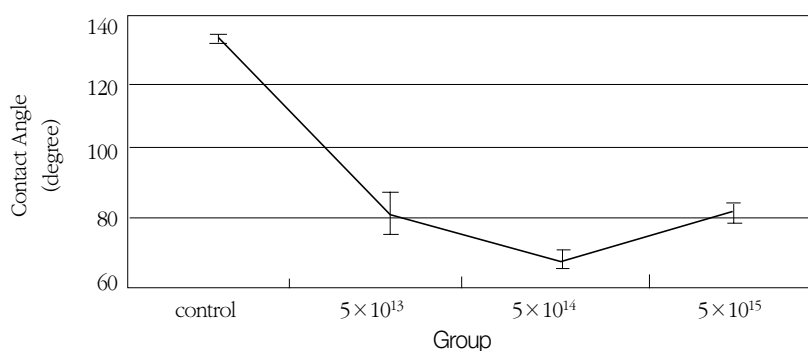


Figure 4. Contact angles in each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

Table 3. ALPase activities of osteoblasts attached on each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

	Control	5×10^{13}	5×10^{14} (ions/cm ²)	5×10^{15}
ALPase activity ^a (nM of PNP/30 min/10 ⁴ cells)	5,52±1,17	5,56±0,84	6,50±0,62	6,06±0,27

^amean±s.d., N=4; all test groups were not significantly different from control group.

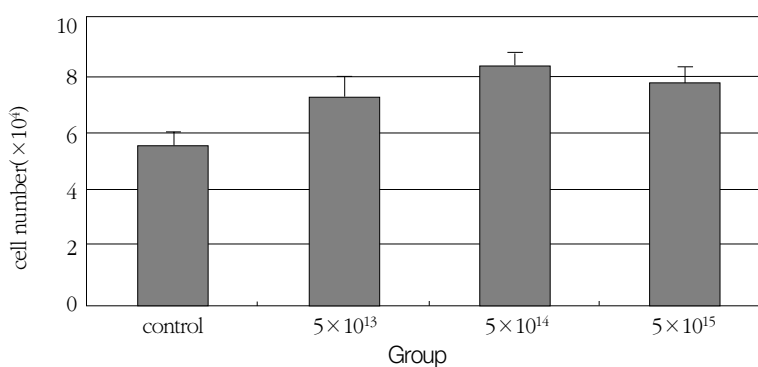


Figure 5. Cellular attachment in each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

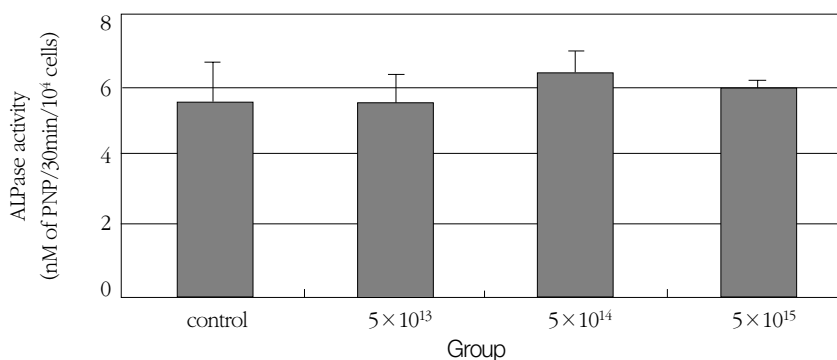


Figure 6. ALPase activities of osteoblasts attached on each dose of ion beam irradiated PLLA membranes

cells)으로 나타났고 5×10^{13} , 5×10^{14} , 5×10^{15} ions/cm²에서 각각 5.56 ± 0.84 , 6.50 ± 0.62 , 6.06 ± 0.27 으로 나타나, 5×10^{14} 및 5×10^{15} ions/cm²에서 약간 증가하는 경향이 보이고 있으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다(Table 3, Figure 5).

IV. 고찰

Hardwick 등¹⁹⁾은 차폐막의 요구조건으로서 생적 합성, 밀폐기능, 공간확보능, 사용상의 편리성과 함께 인접조직과의 융화능을 강조한 바 있다. 즉 차폐막은 인접조직에 접합성을 가져야 하는데, 이는 골 결손부위에서 인접조직과 융화되어 단단한 밀봉을 형성하여야 창상부위를 안정화시킬 수 있고 섬유성 결체조직과 세균의 침투를 막기에 유리한 조건이 되어 골조직 재생에 최적의 조건이 될 수 있다는 것이다. 또한 표면구조나 소공이 없이 매끈한 물질이 연조직 내로 매식되었을 때는 조직이 부착되지 못하고 콜라겐섬유가 매식물질표면에 평행하에 주행하면서 섬유성 결체조직막으로 둘러싸이게 되는데, 특히 외부의 압력에 의해 매식물과 조직의 계면에 움직임이 나타나게 되면 이 막이 더욱 두꺼워지면서 만성염증 반응을 일으키게 된다고 하였다. 따라서 이들은 차폐막에 어느 정도 조직의 유입을 허용하는 공간 (porosity)이 필요하며, 조직세포들이 차폐막표면에 단단히 부착하여 융합할 수 있도록 하는 것이 중요하다고 제시한 바 있다.

본 연구에서 제조된 PLLA 차폐막은 다공성 구조상의 막내의 미세공의 크기는 약 8 μ m 정도였는데, 이것은 포도당, 아미노산류와 유사한 분자량 및 크기를 영양분들의 통과는 가능하며 고분자의 단백질, 세포 등의 침윤은 차단할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이온빔조사에 의한 표면 및 내부구조의 변화는 관찰되지 않았으며 다공성 구조가 잘 유지되고 있음을 알 수 있었다.

세포친화도를 예측하는 데 있어서 친수성 정도를 측정할 수 있는 방법으로는 표면에 대한 액적의 접촉각을 측정하는 것이 열역학적 방법으로서 가장 많이 제시되고 있다. 이 연구의 결과에서 이온빔이 조

사되지 않은 차폐막에 대해서는 접촉각이 평균 132°인 반면 조사된 차폐막군에서는 대략 70°로 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 표면의 원소의 배열의 변화에 기인하는 것으로서 이러한 변화가 소수성인 차폐막 표면을 친수화하였음을 알 수 있었다. Suzuki등은 소수성인 폴리우레탄 필름의 표면에 대해 이온빔 조사하였을 때 표면의 설폰닐기의 구조가 변화하여 친수화하는 것을 보고한 바 있으며 이로써 표면의 친수화에 의해 세포친화력이 증가한다고 하였다^{10, 11)}.

생체재료에 대해서 세포친화성이나 조직친화성을 높이도록 표면성질들을 개조하는 여러 가지 방법들 중에서 이온조사방법은 가장 간단하면서 그 효율이 높은 표면성질 개조법으로 최근 생체재료 분야에서 각광받고 있다. 특히 고분자 표면의 화학적 조성이 조절 가능할 뿐만 아니라 이에 연관된 물리적인 성질까지도 조절이 용이하도록 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 최근의 연구에서 Suzuki등^{10, 11)}, Nakao 등¹²⁾ 및 Pignataro등¹⁶⁾의 연구자들은 폴리우레탄, 폴리스티렌 그리고 실리콘고무에 대해 이온빔을 조사하여 현저히 증가된 세포친화도를 보고한 바 있다. 이온조사에 의한 표면성질 개조는 일정 전위하에서 일정 용량의 나트륨, 산소, 질소 혹은 아르곤, 헬륨의 양이온입자를 물질표면에 조사하거나 더 많은 에너지에 의해 주입(implantation)하게 되면 그 에너지에 의해 표면의 형태, 표면의 화학적 구조 및 물리화학적 성질이 바뀌면서 이것이 세포 및 조직친화성을 바꾸어 준다는 것에 그 원리를 두고 있다. 본 연구의 결과에서도 이온빔의 조사에 의해 세포의 부착율이 증가한 것을 관찰할 수 있었는데, 특기할 것은 5×10^{14} 의 Ar⁺을 가한 경우 세포부착이 가장 큰 반면 5×10^{15} 의 용량을 가한 경우는 더 이상의 증가를 보이지 않고 오히려 약간 감소하였다. 이러한 경향은 소수성인 PLLA에 대해 5×10^{13} 및 5×10^{14} 의 Ar⁺을 가하게 되면 친수성이 어느정도 부여되어 부착에 적절한 친수-소수성의 표면으로 전환이 되나 더 이상의 이온용량에 대해서는 친수성이 더 이상 증가하지 않아 세포부착이 더 이상 증가하지 않는 것으로 생각된다. 1×10^{16} 이상의 높은 용량의 이온 조사를 통하여

표면 처리를 시도한 이전의 연구들에서는, 세포 부착성의 증가요인으로 아직까지는 구조적으로 완전히 규명되어 있지 않은 '탄성상(carbonized phase)'의 형성에 기인한 것으로 설명하고 있으며¹⁰⁻¹²⁾, 일부 다른 보고에서는 고분자표면의 표면자유에너지(surface free energy)의 변화나 고분자 기질의 화학적 성질의 변화에 기인하는 것으로 해석하고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 그러나 Pignataro 등은 이보다 낮은 조사량(10^{15} ions/cm²)으로도 상당히 증가된 세포적합성을 관찰할 수 있었다고 보고하였는데¹⁶⁾, 본 연구에서 나타난 결과와 유사한 자료를 제시하고 있다.

이 연구의 결과, Ar⁺ 이온이 각각 조사된 PLLA 차폐막에 부착된 골아세포의 생존성이 잘 유지되고 있음을 flow cytometry에 의해 관찰할 수 있었으며, 또한 ALPase 활성 측정결과 높은 활성을 보임이 관찰되고 있다. 이것은 PLLA 차폐막표면에 대해 이온빔 조사를 시행하여 세포의 생존성 및 형질에 영향을 미치지 않고 세포의 부착율을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것으로, 이온빔조사방법이 소수성 고분자 제제 차폐막의 친수화를 유도하고 세포부착을 촉진함으로써 조직접합성을 증대할 수 있는 유용한 방법으로 기대된다.

V. 결론

이 연구는 차폐막의 조직접합성 증진시킬 수 있는 방법으로서 이온빔조사에 의한 표면개질방법의 유용성을 평가하고자, 다공성 폴리락트산 차폐막에 아르곤이온(Ar⁺)을 조사하고 이에 따른 차폐막의 친수도와 세포친화성의 변화양상을 알아본 결과,

1. 이온빔조사량에 따른 차폐막의 표면 접촉각의 변화는, 실험에 사용한 모든 용량의 이온 빔조사에 의해 표면 접촉각이 유의하게 낮아지는 것으로 나타났는데, 그중 5×10^{14} Ar⁺ ions/cm²의 용량에서 가장 낮은 접촉각이 관찰되었다.
2. 이온빔의 조사에 의한 차폐막의 구조적 변화는 뚜렷이 관찰되지 않았으며, 차폐막의 표면에 부착한 골아세포는 본래의 전형적인 모양을 보이며 방추형 혹은 성상으로 차폐막표면에 잘 부착

하여 있었다.

3. 이온빔이 조사된 차폐막에 부착한 골아세포들은 생활력이 잘 유지되고 있었으며 차폐막에 부착한 세포수는 이온빔조사에 의해 유의하게 증가함이 확인되었고, 5×10^{14} Ar⁺ ions/cm²의 용량에서 가장 높은 세포부착도를 보였다
4. 이온빔조사에 의한 골아세포의 ALPase 활성은 5×10^{14} , 5×10^{15} Ar⁺ ions/cm²의 용량에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

본 연구의 결과 이온빔조사방법이 소수성 고분자 제제 차폐막의 친수화를 유도하고 세포부착을 촉진함으로써 조직접합성을 증대할 수 있는 유용한 방법으로 기대된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher AH : On the repair potential of periodontal tissue, J Periodontol 1976;47:256-260.
2. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J: The regenerative potential of the periodontal ligament, An experimental study in the monkey, J Clin Periodontol 1982;9:257-265.
3. Aukhil I, Simpson DM, Schaberg TV: An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs, J Periodont Res 1983;18:643-654.
4. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration, J Clin Periodontol 1984;11:494-503.
5. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, J Clin Periodontol 1982;9:290-296.
6. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wenstrom J: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration, Case reports J Clin Periodontol

- 1986;16:604-616.
7. Marletta G: Chemical reactions and physical property modifications induced by keV ion beam in polymers. *Nucl Instrum Methods B* 1990;46:295-305.
8. Marletta G, Iacona F: Chemical and physical property modifications induced by ion irradiation in polymers. In *Materials and Processes for Surface and Interface Engineering*. Vol. 290, ed. Y. Pauleau, NATO-ASI Series, Serie E, Applied Sciences, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1995, pp597-640.
9. Venkatesan T, Calcagno L, Elaman BS, Forte G: Ion beam effects in organic molecular solids and polymers. In *Ion Beam Modification of Insulators*, ed. P. Mazzoldi and GW Arnold, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp301-379.
10. Suzuki Y, Kusakabe M, Akiba H, Kusakabe K, Iwaki M: In vivo evaluation of antithrombogenicity for ion implanted silicone rubber using indium-111-tropolone platelets. *Nucl Instrum Methods B* 1991;59/60:698-704.
11. Suzuki Y, Kusakabe M, Iwaki M, Akiba H, Kusakabe K: In vivo evaluation of antithrombogenicity and surface analysis of ion-implanted silicone rubber. *Radiat Phys Chem* 1992;39:553-560.
12. Nakao A, Kaibara M, Iwaki M, Suzuki Y, Kusakabe M: XPS and SERS studies of cell adhesion controlled polymer modified by ion implantation. *Surf Interf Anal* 1996;24:252-256.
13. Dejun L, Zhao J: The structure and biomedical behaviour of ion bombarded and plasma polymerized segmented polyurethane. *Appl Surf Sci* 1994, 78,195-200
14. Lhoest JB, Dewez JL, Bertrand P: PMMA surface modification under keV and MeV ion bombardment in relation to mammalian cell adhesion. *Nucl Instrum Methods B* 1995;105:322-327.
15. Svorcik V, Rybka V, Hantowicz V, Bacakova L, Lisa V, Kocourek F: Surface properties and biocompatibility of ion-implanted polymers. *J Mater Chem* 1995;5:27-31
16. Pignataro B, Conte E, Scandurra A, Marletta G: Improved cell adhesion to ion beam irradiated polymer surfaces. *Biomaterials* 1997;18:1461-1470.
17. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME: Mineralization bone nodules formed in vitro enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986;38:143-154.
18. Hardwick R, Scantlebury TV, Sanchez R, Whitely R, Ambruster J: Membrane design criteria for guided bone regeneration of alveolar ridge. In Buser S, Dahlin C, Schenk RK ed. *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Quintessence Publishing Co, MO, 1994, pp101-136.

Improved cell adhesion to ion beam-irradiated biodegradable membranes

Yong-Moo Lee¹, Yoon-Jeong Park², Seung-Jin Lee², Young Ku¹, In-Chul Rhyu¹, Soo-Boo Han¹,
Sang-Mook Choi¹ and Chong-Pyoung Chung¹

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

²Department of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University

Ion irradiation is a very promising tool to modify the chemical structure and physical properties of polymers. This study was aimed to evaluate the cellular adhesion to ion beam-irradiated surface of biodegradable poly-L-lactide(PLLA) membrane. The PLLA membrane samples were irradiated by using 35 KeV Ar⁺ to fluence of 5×10^{13} , 5×10^{14} and 5×10^{15} ion/cm². Water contact angles to control and each dose of ion beam-irradiated PLLA membranes were measured. Cultured fetal rat calvarial osteoblasts were seeded onto control and each dose of ion beam-irradiated PLLA membranes and cultured. After 24 hours, each PLLA membranes onto which osteoblasts attached were examined by scanning electron microscopy(SEM). Osteoblasts were removed from each PLLA membrane and then, the vitality and the number of cells were calibrated. Alkaline phosphatase of detached cells from each PLLA membranes were measured. Ion beam-irradiated PLLA membranes showed no significantly morphological change from control PLLA membranes. In the measurement of water contact angle to each membrane, the dose range of ion beam employed in this study reduced significantly contact angles. Among them, 5×10^{14} ion/cm² showed the least contact angle. The vitalities of osteoblasts detached from each membranes were confirmed by flow cytometer and well attached cells with their own morphology onto each membranes were observed by SEM. A very strong improvement of the cell adhesion and proliferation was observed for ion beam-irradiated surfaces of PLLA membranes. 5×10^{14} ions/cm² exhibited the most strong effect also in cellular adherence. ALPase activities also tended to increase in ion beam-irradiated membranes but statistical differences were not found. These results suggested that ion beam irradiation is an effective tool to improve the adhesion and spreading behaviour of the cells onto the biodegradable PLLA membranes for the promotion of membrane-tissue integration.

Key Words: ion beam irradiation, cell adhesion, biodegradable poly-L-lactide(PLLA) membranes, tissue integration