

양극산화 타이타늄 표면처리가 골모세포 증식에 미치는 영향

허인식 · 박준봉 · 권영혁 · 허 의 · 김형선* · 조병원* · 조원일*

경희대학교 치과대학 치주과학교실, 한국과학기술연구원 나노 환경연구센터*

I. 서론

타이타늄은 표면에 불용성의 산화막이 존재하므로 타이타늄 이온의 누출이 적고 그로 인해 부식의 가능성이 매우 낮기 때문에 생체적합성이 우수하여 초기에 이용된 임플란트들은 대부분 기계적으로 절삭한 면을 그대로 이용하였다. 그러나 상악구치부처럼 골질이 좋지 못한 곳에선 기계적으로 절삭한 면을 갖는 임플란트의 성공율이 상대적으로 낮았고, 표면처리에 의해 형성된 거친면이 골반응을 향상시킨다는 연구보고가 지속적으로 발표되면서 표면처리의 중요성이 부각되기 시작하였다. Bower등(1992)¹⁾은 표면조도를 증가시키는 것이 골양세포의 부착을 크게 향상시킨다고 하였고, Kieswetter등(1996)²⁾은 표면조도가 높은 표면에서 골세포가 성장하였을 때 보다 성숙한 표현형을 나타낸다고 보고하였다. Lohmann등(1999)³⁾은 표면조도가 골모세포의 증식과 분화, 그리고 골형성에 관여하는 국소인자들의 생산에 영향을 준다고 하였고, Brugge와 Jansen(2002)⁴⁾, Orsini등(2000)⁵⁾은 백서 골수세포의 확산양식과 세포외형이 표면특성에 따라 차이를 나타내었다고 하였다. 동물실험에서도 표면조도를 높이는 것

이 더 우수한 골반응을 나타낸다는 것이 조직학적으로 입증되었다⁶⁻¹³⁾. 임플란트와 골과의 결합정도를 측정하는 회전제거력검사에서 표면이 거칠수록 골과의 결합력이 증가함을 보여주고 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. 따라서 타이타늄 임플란트의 표면을 기계적으로 절삭한 면 그대로 사용하였던 초기와는 달리 현재는 임플란트의 표면조도를 증가시키는 방향으로 임플란트의 개발을 진행하고 있다.

표면조도를 증가시키는 방법으로는 표면에 특정 재료를 첨가하는 수산화인회석 피복¹⁸⁻²⁵⁾, 타이타늄 분사피복²⁶⁻²⁸⁾, beading²⁹⁻³¹⁾ 등의 방법이 있고, 타이타늄 표면으로부터 타이타늄을 제거하는 방법으로 표면조도를 증가시켜주는 방법으로는 산화타이타늄 분사법^{8,15,32,33)}, 산화알루미늄분사법^{11,15,16)}, 칼슘인산 분사법^{34,35)}과 산부식법^{36,37,38)}, 산화알루미늄분사 후 산처리법^{17,39,40)} 등이 이용되고 있다. 최근 양극산화법을 이용하여 임플란트를 표면처리하는 방법이 개발되어 주목받고 있다⁴¹⁻⁵⁷⁾. 양극산화법은 타이타늄 표면에 존재하는 산화막을 보다 균일하고, 두껍고, 치밀하게 만들어 주며, 높은 전압을 가했을 경우에는 표면에 분화구 형태의 다공성 구조를 형성해 준다. 양극산화에 의해 형성된 다공성 구조는 임플란트 식

교신저자: 박준봉, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 130-702,

E-mail : jbpark@kbu.ac.kr

립시 골과의 접촉면적을 증가시켜줄 뿐 아니라 골단 백질과 같은 골재생에 관여하는 인자들을 골 내에 장기간 전달할 수 전송수단으로도 이용할 수 있다. 타이타늄에 대한 양극산화는 전해질의 종류, 전해질의 농도, 전해질의 온도, 상대 음극의 종류, 전류의 양 등 여러 가지 요소들에 의하여 다른 결과를 나타냈다.^{41-44, 58-62)}

이번 실험은 4 종류의 서로 다른 조건에서 양극산화 한 타이타늄 표면에 대한 분석과 더불어, 이들 표면에 백서 골모세포를 시작하였을 때 어떤 반응을 보이는지를 비교평가하고자 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

연구재료로는 순수타이타늄(ASTM Grade 4)과 Titanium-6Aluminum-4Vanadium(Ti-6Al-4V, ASTM Grade 5)을 가로 5mm, 세로 5mm, 두께 1mm 크기로 절단하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시편의 분류와 양극산화를 위한 시편의 제작

순수타이타늄 시편의 경우, 대조군(PE)으로는 양극산화없이 화학적 처리만을 시행한 것을 선정하였고, 실험군으로는 화학적처리 후 200V에서 양극산화한 것을 P1, 250V에서 양극산화한 것을 P2, 300V에서 양극산화한 것을 P3로 하여 비교 평가하였다. Ti-6Al-4V 시편의 경우에도 양극산화 없이 화학적처리만을 시행한 것을 대조군(EB)으로 하였고, 실험군으로는 200V에서 양극산화한 것을 E1, 250V에서 양극산화한 것을 E2, 300V에서 양극산화한 것을 E3로 하여 비교 평가하였다.

2) 양극산화를 위한 화학적 전처리과정

준비한 타이타늄 시편을 아세톤으로 세척한 후 유기물의 제거를 위해 80℃의 NaOH 용액에 15분간 담아 세척하였다. 기존에 존재하던 산화막층을 제거하

기 위해 63% HNO₃ 용액 15ml와 55% HF 용액 3ml에 증류수 82ml를 첨가하여 총 100ml의 혼합 산용액을 만든 후 25℃에서 5분간 산처리하였고, 증류수를 이용하여 5분간 초음파세척(Cole Parmer Co. USA)한 다음 50℃에서 10분간 공기 중 건조하였다.

3) 양극산화과정

전해액으로는 0.06M β -glycerophosphate와 0.03M sodium acetate를 사용하였다. 전해조의 양극에는 타이타늄시편을, 음극에는 니켈을 연결하였고, 실온에서 50mA/cm²의 전류를 이용하였다.

4) 양극산화후 주사전자현미경관찰

시편을 ion sputting coater (Eiko Engineering Co. IB-3, Japan)를 이용하여 0.1 Torr 진공상태에서 4분간 금으로 피복시킨 후 주사전자현미경(Hitachi Co. S-4200, Japan)을 이용하여 20kV 상태에서 관찰하였다.

5) 산화막두께 및 표면조도측정

양극산화 후 표면조도의 변화를 측정하기 위해 Long Scan Profiler (Tencor P-1, Tencor Instruments, USA)를 사용하였고, 양극산화 전후의 산화막두께 변화를 측정하기 위해서 Scanning Auger Electron Spectroscopy(Perkin-Elmer PHI Model 670, PerkinElmer, USA)와 Rutherford Backscattering Spectroscopy(Model 6SDH-2, National Electrostatics, USA)를 이용하였다.

6) 세포실험

평균체중 100g의 Sprague Dawley계 웅성백서를 줄레틸로 복강주사하여 전신마취한 후 70% 에탄올로 두피를 소독하고 경추탈락법을 이용하여 희생시켰다. 외과용 가위로 하악골을 상악골에서 분리시킨 후 두피를 박리하고 두개관을 분리하고 연조직을 완전히 제거하였다. 순수 두개관을 1x1mm 정도로 얇게 세절한 후 20% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco, USA)이 섞인 Dullbeco's Modified Eagle' Medium(DMEM, Gibco, USA)에 넣고, 온도 37℃, 습도 100%, 5% CO₂공기가 혼합된 배양기(Vision Science Co.,

Korea)에서 일차배양하였고 2세대부터는 10% FBS가 섞인 DMEM에서 배양하였다. 24 Well의 배양접시(Corning Co., USA)에 타이타늄 시편을 각각 하나씩 넣고 백서 두개관 세포 배양 5-8세대의 세포를 각각 1×10^4 /ml씩 넣은 후 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포가 타이타늄 시편에 완전히 부착된 후 상층액을 제거하고 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 ascorbic acid와 10mM sodium β -glycerophosphate, 10^{-8}M dexamethasone (Sigma Chemical Co. USA)이 섞인 DMEM으로 교환해주었다.

배양 1, 2, 4, 7일 후에 0.05% trypsin/ 0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 세포를 타이타늄 시편으로부터 완전히 박리한 다음 trypan blue로 염색하였고 도립현미경 (Olympus Co., Japan)하에서 혈구세포측정판을 이용하여 세포 수를 측정하였다.

7) 양극산화후 주사전자현미경관찰

세포배양 후 0.1M 인산완충식염수로 세척하였고, 2.5% glutaraldehyde (0.1M 인산완충식염수, pH 7.4)로 고정한 다음 인산완충식염수로 2-3회 세척하였다. 그리고 1% OsO_4 로 2시간 동안 고정한 다음, PBS로 1시간 동안 세척한 후 2% tannic acid로 24시간 동안 처리하였다.

그 후 1% OsO_4 으로 2시간 동안 처리한 다음 일련의 에탄올을 이용하여 탈수하고 hexamethyldisilazane (Polyscience Co., USA)을 이용하여 건조시킨 다음 silver paste를 부착시켰고 ion sputting coater를 이용하여 금을 피복한 후 주사전자현미경(Hitachi S-4200, Japan)으로 촬영하였다

III. 실험성적

1. 양극산화후 주사전자현미경관찰

주사전자현미경 사진을 살펴보면 양극산화 전에는 순수타이타늄과 Ti-6Al-4V 모두 표면에서 미세공을 볼 수 없었지만 (Figure 1, Figure 5), 200V를 지나면서 확연히 다공성 구조로 표면이 변하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 2, Figure 6). 전압이 250V로

증가하면 미세공의 숫자는 200V에서보다 감소하지만 미세공의 직경이 커졌고(Figure 3, Figure 7), 300V로 증가하면 미세공의 숫자는 250V 보다 감소하고 미세공의 직경은 증가하였다(Figure 4, Figure 8). 다공성 구조는 200V에서 가장 균일한 양상을 보였고, 이후 전압이 상승할수록 방전이 일어났던 부위에 재방전이 일어나는 흔적과 함께 금속이 녹아서 겹쳐진 흔적들을 관찰할 수 있었다. 동일한 전압에서 양극 산화한 순수타이타늄과 Ti-6Al-4V의 다공성 표면구조를 주사전자현미경 상에서 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지 않았다 (Figure 2와 Figure 6, Figure 3과 Figure 7, Figure 4와 Figure 8). 양극산화에 소요된 시간은 200V는 약 1분, 250V는 1분 30초, 300V는 2분 30초였다.

2. 산화막두께와 표면조도

표면조도는 양극산화 전후에 약간의 증가를 나타내었다. long scan profiler로 측정한 결과 양극산화전 시편의 표면조도는 $0.8291 \mu\text{m}$ 였으나 200V에서 양극 산화를 시행한 후 $1.2560 \mu\text{m}$ 로 증가하였고, 300V에서는 $1.7450 \mu\text{m}$ 로 증가하였다. 산화막의 두께는 양극 산화를 한 이후 수백배의 증가를 나타내었다. Scanning Auger Electron Spectroscopy와 Rutherford Backscattering Spectroscopy를 이용하여 산화막의 두께를 측정한 결과, 양극산화 전에는 $0.01\text{-}0.05 \mu\text{m}$ 였으나, 200V 양극산화한 후 약 $2 \mu\text{m}$, 250V에서 양극 산화한 후 약 $3 \mu\text{m}$, 300V에서 양극하였을 때 약 $4 \mu\text{m}$ 로 증가하였다(Table 1, Figure 9, 10, 11).

Table1. Surface roughness and thickness of titanium oxide layer after anodizing.

	Surface Roughness (Ra, μm)	Thickness of oxide layer(μm)
Control	0.8291	0.01-0.05
200 V	1.2560	2
250 V		3
300 V	1.7450	4

Table 2. Cell proliferation rate on the anodized pure titanium surface. PE : unanodized pure titanium, P1 : 200V anodizing, P2 : 250V anodizing, P3 : 300V anodizing

	Day (nx104/ml)			
	1	2	4	7
PE	1.17	1.33	1.85	2.16
P1	1.21	1.33	2.12	3.00
P2	1.21	1.67	2.37	3.71
P3	1.54	1.79	2.96	4.21

3. 세포증식

골모세포증식에 관한 실험에서 순수타이타늄은 양극산화를 한 모든 실험군이 대조군보다 높은 세포 증식을 나타내었고, 전압이 증가할수록 세포의 증식은 증가하였다(Table 2, Figure 12).

Ti-6Al-4V의 경우에도 양극산화를 한 모든 실험군이 대조군보다 높은 세포증식을 나타내었고, 전압이 증가할수록 세포의 증식은 증가하였다(Table 3, Figure 13).

양극산화한 순수타이타늄과 Ti-6Al-4V에 대한 골모세포성장율을 비교한 결과, 동일한 전압을 이용하였을 때 골모세포증식율에 차이가 없었다(Figure 14-17).

IV. 총괄 및 고찰

양극산화를 이용하는 타이타늄 표면처리방법이 다공성의 표면구조를 야기하며, 타이타늄 표면에 존재하는 산화막의 두께를 매우 두껍게 만들고, 이러한 표면 변화가 골모세포의 증식을 높인다는 사실을 확인할 수 있었다. 그리고 양극산화한 Ti-6Al-4V이 순수타이타늄과 유사한 골모세포 증식율을 보여준 이번 실험의 결과는 Ti-6Al-4V도 순수타이타늄과 마찬가지로 골내 임플란트로 이용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 자연상태에서 타이타늄의 표면에는 약 1.5-10nm 정도의 산화막이 존재하며, 생체적합성을 증가시킨다. 그런데 이런 산화막은 여러가지 원

Table 3. Cell proliferation rate on the anodized Ti-6Al-4V surface. EB : unanodized Ti-6Al-4V, E1 : 200V anodizing, E2 : 250V anodizing, E3 : 300V anodizing

	Day (nx104/ml)			
	1	2	4	7
EB	1.17	1.37	1.92	2.25
E1	1.17	1.29	2.46	3.33
E2	1.37	1.54	2.58	4.25
E3	1.29	1.92	3.33	4.71

인에 의해서 손상 혹은 변형될 가능성이 높다. 순수 타이타늄과 타이타늄 합금의 산화막으로부터 타이타늄 이온을 비롯한 금속이온들이 누출될 수 있으며⁽⁶³⁻⁷¹⁾, 이런 금속입자나 이온의 누출이 세포의 증식과 분화에 관여하는 기전들의 발현을 늦추게하고, 염증과 연관이 있는 기전들의 발현을 촉진할 수 있다는 실험결과가 발표되었다⁽⁷¹⁻⁷⁸⁾. 그리고 다양한 원인에 의해 임플란트 표면으로부터 떨어져 나온 금속입자들이 대식세포의 활성을 촉진시키고 이로 인해 골흡수가 촉진될 수 있다는 보고가 있었다⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. 따라서 타이타늄 표면에 존재하는 산화막의 두께를 증가시키고, 산화막의 내부 구조를 보다 견고하게 만들어 줄 필요성이 대두되었다^(64,67,69,83). 현재까지 상용화되어 있는 표면처리 방법 중 산화막의 특성에 변화를 줄 수 있는 방법으로는 양극산화법이 있다.

양극산화법은 전기분해의 원리인 유사한 표면처리방법이다. 특정 전해질이 담겨져 있는 전해조 속에 타이타늄을 양극으로 니켈이나 스테인레스 스틸과 같은 금속을 음극으로 설정하고 전류를 가하게 되면 양극에서 발생하는 산소에 의해 타이타늄이 이들 산소와 결합하면서 산화막의 두께는 증가하게 된다. 양극산화법은 처리조건에 따라 산화막의 두께를 수십 배에서 수백 배까지 증가시켜주며^(44-46,84), 산화막의 결정구조를 무정형에서 anatase내지는 rutile 구조로 변화시키므로^(48,49) 금속이온 및 금속 입자의 유출을 최소화 시킬 수 있다. 이번실험에서도 양극산화를 하기 전에는 산화막의 두께가 0.01-0.05 μm 었

으나 200V에서 양극산화한 후에는 $2\mu\text{m}$, 250V에서 양극산화한 후에는 $3\mu\text{m}$, 300V에서 양극산화한 후에는 $4\mu\text{m}$ 로 매우 큰 증가를 나타내었다. 그러나 산화막의 증가에는 전압을 올리는데 소요된 처리시간의 증가가 더욱 중요한 요소로 작용한다. 이번 실험에서 200V까지 전압이 상승하는데 소요된 시간은 1분, 250V까지 상승하는 데는 1분 30초, 300V까지 상승하는 데에는 2분 30초가량의 시간이 소요되었다. 산화막의 두께가 골반응에 미치는 영향에 대해, Larsson등(1996)은⁴⁹⁾ 양극산화를 했다고 하더라도 산화막의 두께가 200nm 이하일 경우에는 3-5nm의 자연 산화막을 갖는 대조군에 비해 골반응에 있어서 큰 차이를 나타내지 않았다고 하였고, Sul등(2002)^{45,47)}은 골반응에 영향을 주기 위해서는 최소 200-600nm의 산화막을 가져야 한다고 하였으며, 산화막의 두께증가는 표면의 형태변화와 동반해서 나타난다고 하였다. 이번 실험에서도 산화막의 두께증가가 골모세포의 증식에 영향을 준다는 사실이 확인되었다. 세포 증식 7일째를 비교해보았을 때, 산화막이 $0.01\text{--}0.05\mu\text{m}$ 인 양극산화하지 않은 순수타이타늄은 세포수가 $2.16 \times 10^4/\text{ml}$ 로 증가하였지만, 200V에서 양극산화한 산화막이 $2\mu\text{m}$ 인 시편에서는 $3.00 \times 10^4/\text{ml}$, 250V에서 양극산화한 산화막이 $3\mu\text{m}$ 인 시편에서는 $3.71 \times 10^4/\text{ml}$, 300V에서 양극산화한 산화막이 $4\mu\text{m}$ 인 시편에서는 $4.21 \times 10^4/\text{ml}$ 로 증가하였다. 이런 결과는 Ti-6Al-4V에서도 유사하게 나타났다. 그러나 산화막의 증가는 표면조도의 변화와 동반하는 경우가 많으므로 산화막의 증가와 표면조도의 변화가 골모세포의 반응에 함께 영향을 미쳤다고 생각하는 것이 바람직하다.

표면의 화학적인 특성과 더불어 골과의 반응에서 중요한 것이 표면의 물리적 특성, 즉 표면조도이다. 여러가지 방법을 이용하여 표면조도에 변화를 주는 이유는 골과 임프란트 사이의 기계적인 상호조정 효과를 증진시키고, 임프란트 표면에서 골이 형성되는 과정에 표면조도가 크게 영향을 주기 때문이다. 임프란트는 식립 후 가장 먼저 단백질, 지질, 당 등과 각종 혈액 구성원들에 의해 뒤덮히게 된다⁸⁵⁾. 이런 세포의 기질층은 임프란트를 둘러싸고 있는 체액을

통해 흡착될 수도 있지만 세포들에 의해 합성될 수도 있다⁸⁶⁻⁸⁹⁾. 이런 세포외기질 단백질에 간접세포의 integrin이 흡착하므로 세포의 증식과 이주, 세포의 기질의 합성, 세포분화, 세포자살(apoptosis)와 같은 세포반응들이 일어난다⁹⁰⁾. 그런데 표면특성에 따라 integrin의 표현양식이 변할 수 있고^{91,92)}. 부착하는 단백질의 양과 유형, 그리고 부착하는 양상에도 변화가 올 수 있다⁹³⁾. 또한 각종 단백질 분자들이 표면에 부착하는 방식은 향후 부착하게 되는 세포의 종류와 부착양식에도 큰 영향을 나타낸다^{87,88,94-96)}. 그리고 표면조도의 변화는 PGE_2 , $\text{TGF-}\beta_1$ 과 같이 골생성에 관여하는 각종 국소인자들의 생산과 $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 에 대한 골양세포의 반응에 영향을 준다⁹⁷⁻⁹⁹⁾. 그리고 alkaline phosphatase의 활성도 거친표면에서 배양된 조골세포나 연골세포에서 훨씬 크게 나타났으며¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾, apatite crystal의 성장을 조율하는 세포외기질 단백질인 osteocalcin의 생산도 표면조도가 높은 표면에서 훨씬 증가하였다^{97,105)}. 이처럼 표면조도는 단백질이 부착되는 과정에서부터 시작하여 골생성이 완성되는 시점까지 골생성 전 과정에 걸쳐서 영향을 나타낸다.

현재까지 표면조도에 변화를 주기위해 수산화인회석피복법, 타이타늄피복법, 타이타늄분사법, 산부식법, 분사-산부식법, 양극산화법 등의 방법들이 이용되고 있다. 그러나 피복법의 경우에는 피복된 입자들이 임프란트를 식립하는 도중 골과의 밀착에 의해 마모되어 떨어져 나가거나 시간경과에 따라 임프란트 표면으로부터 분리되는 현상이 발생하였고¹⁰⁶⁻¹¹⁵⁾, 분사법의 경우에는 분사에 사용한 금속입자가 표면에 잔류하거나 임프란트 표면성질에 변화를 야기하므로 골반응에 문제를 야기할 수 있었다^{73,74,79-82)}. 양극산화법은 산화막의 두께 증가, 산화막의 구조변화, 표면조도의 증가를 동시에 얻을 수 있고, 양극산화후 표면에 금속잔사가 남지 않는 장점이 있다. 오히려 전해용액 속에 칼슘이나 인과 같은 요소들을 첨가하여 산화막에 이들 원소를 포함시키므로 임프란트 식립 후 임프란트 표면에 칼슘-인의 침착을 유도할 수 있으며, 양극산화 후 수열처리를 하므로 수산화인회석의 피복을 유도하거나¹¹⁶⁻¹²¹⁾, 양극산

화 후 알칼리 용액에 처리하므로 수산화인회석의 침전을 유도하는 방법¹²²⁾으로 수산화인회석 피복 임프란트가 가지고 있던 장점들을 취할 수도 있다.

산화막은 타이타늄을 전기적인 부도체로 만든다. 따라서 양극산화가 진행될수록 산화막의 두께는 증가하고 타이타늄의 부도체적인 성격은 더욱 강해진다. 그리고 동일한 양의 전류를 흐르게하기 위해 전압이 상승하면서 방전현상이 발생한다. 방전현상에 의해 타이타늄 금속이 외부로 터져나오므로 다공성 구조가 만들어지고 새로운 산화막이 형성된다. 이번 실험에서는 200V에서 양극산화하였을 경우에는 직경 1 μm 이하의 미세공이 주를 이루었다. 300V에서는 직경 2-3 μm 의 미세공이 많이 발견되었지만 상대적으로 미세공의 숫자와 균일성은 감소하는 경향을 보였다. 양극산화시 발생하는 방전양상은 양극산화에 사용하는 전해질의 종류와 농도, 전압 등에 의해 크게 영향을 받는다^{41,42,62)}. Kim등(2002)은⁴¹⁾ β -glycerophosphate와 sodium acetate로 이루어진 전해액 속에서는 200V 근처에서 방전현상이 일어났지만, 이온전도성이 낮은 calcium phosphate로 이루어진 전해액 속에서는 350V 근처에서 방전현상이 일어난다고 하였다. 미세공의 크기는 200V에서는 1 μm 이하였지만 300V에서는 2-3 μm 로 증가한다고 하였고, 전압이 상승할수록 표면조도는 증가하는 경향을 보였지만 미세공 분포의 균일성은 저하된다고 하였다. 그리고 Ishizawa와 Ogino(1995)¹¹⁶⁾는 β -glycerophosphate와 calcium acetate를 전해액으로 사용했을 때 200V 근처에서 방전현상이 나타나기 시작하며, 전압이 상승할수록 보다 격렬하게 방전현상이 진행되고, 350V에 도달하면 직경 1-3 μm 의 미세공과 5-10 μm 높이의 메세돌출을 나타낸다고 하였다. 이번 실험에서 표면조도(Ra)는 양극산화 전에는 0.8291 μm 였지만 200V에서 양극산화한 후에는 1.2560 μm 로 증가하였고, 300V에서 양극산화한 다음에는 1.7450 μm 로 증가하였다. 표면조도의 증가와 골모세포의 증식 사이에 상호연관성이 존재함을 확인하였으며 골모세포의 증식은 표면조도가 1.7450 μm 인 실험군에서 가장 높게 나타났다. 골전도성을 증가시키기에 적절한 표면조도에 대해 Wennerberg^{12,15,16,123-125)}는

Sa 1.0-1.5 μm 정도의 표면조도가 가장 좋은 골반응을 나타내며, 그 이하 혹은 그 이상의 표면조도에서는 골반응이 저하된다고 하였다. 따라서 이번 실험의 결과는 Wennerberg의 실험결과와 약간의 차이를 나타내었다. 그러나 표면조도에 대한 골모세포의 반응에 대한 현재까지의 연구결과는 매우 다양하다. 표면조도가 간엽세포의 평균 길이인 5-12 μm 보다 클 경우 세포는 이 면을 거칠지 않다고 인식한다는 연구결과¹²⁶⁾와 골모세포는 Ra 0.2 μm 인 매끈한 면보다는 Ra 6-7 μm 인 거친 타이타늄 면에 더 강하게 부착한다는 연구결과가 있다⁹⁷⁾. 그리고 표면조도가 조골세포 크기 이내에서 표현될 정도로 미세하면 조골세포의 부착과 증식은 저하되고, 조골세포의 크기 이상이면 조골세포의 부착과 증식이 증가한다는 보고^{127,128)}와, 표면조도가 세포의 부착에 영향을 주지 않는다는 보고도 있다⁴⁾. Brugge와 Jansen(2002)⁴¹⁾은 실험에 사용한 세포유형, 표면조도의 정도, 표면조도에 대한 정의 및 측정방법의 차이, 사용한 기구와 방법의 차이가 표면조도와 관련된 실험결과에 상당한 차이를 야기한다고 하였다^{4,97,98,129-131)}.

이번 실험에서는 양극산화한 순수타이타늄과 Ti-6Al-4V 사이에 골모세포의 성장에 차이가 없음을 확인하였다. 200V에서 양극산화한 시편, 250V에서 양극산화한 시편, 300V에서 양극산화한 시편 모두에서 순수타이타늄과 Ti-6Al-4V 사이에는 골모세포의 증식에 차이가 없었다. 순수타이타늄이 골내에 삽입되는 임프란트로 주로 사용되는데 반하여 Ti-6Al-4V이 임프란트가 아닌 다른 용도로 사용되고 있는 이유는 인체에 유해한 알루미늄 이온이나 바나듐 이온이 누출될 가능성이 있기 때문이다^{69-71,75,132)}. 따라서 현재 대부분의 치과용 임프란트는 골에 매식되는 부분은 순수타이타늄으로, 보철지대주와 나사는 기계적인 물성이 우수한 Ti-6Al-4V으로 제조되고 있다. 따라서 Ti-6Al-4V이 가지고 있는 이온누출의 문제만 해결할 수 있다면 기계적인 강도가 우수하다는 면에서 임프란트를 상부 보철지대주 및 나사와 동일한 금속인 Ti-6Al-4V으로 만들어주는 것이 바람직하다. 양극산화법은 산화막을 수백배 증가시키면서 구조를 보다 치밀하게 만들어주므로 유해한 금속 이온들이 유

출되는 것을 줄여줄 수 있다. 이번 실험에서 Ti-6Al-4V이 순수타이타늄과 유사하거나 혹은 더 좋은 골모세포 증식을 나타낸 것은 산화막의 두께 증가 및 구조 변화와 큰 연관이 있다고 생각한다. 그러나 양극산화가 이온의 누출을 얼마나 감소시키는지에 대한 보다 깊이 있는 연구가 필요하다고 생각한다. 그리고 양극산화로 인한 골모세포의 증식이 주로 표면조도의 변화로 인해 야기된 것인지 산화막 두께 및 구조의 변화로 인해 야기된 것인지를 구분하기 위한 실험이 향후 필요하다고 생각한다.

V. 결론

타이타늄의 표면특성은 치과용 임플란트 주변에서 일어나는 접촉성골생성에 중요한 역할을 한다. 양극산화는 타이타늄표면에 다공성구조를 만들 뿐만 아니라 산화막의 두께를 증가시킨다. 양극산화를 통해 변화된 표면구조를 주사전자현미경으로 관찰하였고, 산화막의 두께변화 및 표면조도의 변화를 측정하였으며, 변화된 표면구조에 대한 세포반응을 평가하기 위해 시험관적 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 표면조도는 200V에서 $1.256\mu\text{m}$ 였고 300V에서는 $1.745\mu\text{m}$ 로 증가하였다.
2. 산화피막의 두께는 200V에서 양극산화한 시편의 경우 $2\mu\text{m}$ 를 나타냈고, 이후 50V씩 증가함에 따라 $1\mu\text{m}$ 씩 두께가 증가하였다.
3. 표면조도 및 산화막의 두께 증가에 따라 골모세포의 증식이 증가하였다.
4. 동일한 조건에서 양극산화한 순수타이타늄 시편과 Ti-6Al-4V 시편 사이에 골모세포의 증식 차이를 나타내지 않았다.

상기 결과를 종합하면 양극산화법은 임플란트 표면처리에 효과적인 방법임을 확인하였다. 앞으로 양극산화를 이용한 표면처리가 임플란트 표면과 골과의 상호작용에 미치는 영향을 동물실험 등을 통해 검증할 필요가 있다고 생각한다.

VI. 참고문헌

1. Bowers, K.T., Keller, J.C., Randolph, B.A., Wick, D.G., Michaels, C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7(3): 302-310
2. Kieswetter, K, Schwartz, Z, Dean, D.D., Boyan, B.D. : The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1996; 7(4): 329-345
3. Lohmann, C.H., Sagun, R. Jr., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)(2)D(3) through regulation of phospholipase A(2) activity and activation of protein kinase A. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999; 47(2): 139-151
4. ter Brugge, P.J. and Jansen, J.A. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. *Biomaterials* 2002; 23: 3269-3277.
5. Orsini, G., Assenza, B., Scarano, A., Piattelli, M., Piattelli, A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2000; 15: 779-784
6. Lijian, Z., Ti-Sheng, C., Wei, W., Lei, C. Study of commercially pure titanium implants bone integration mechanism. *Eur. J. Plast. Surg.*, 2000; 23: 301-304
7. Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H., Stich, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25(7): 889-902
8. Ericsson, I., Johansson, C.B., Bystedt, H.,

- Norton, M.R. A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine- prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.* 1994; 5(4): 202-206
9. Larsson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Rodahl, M., Kasemo, B., Ericson, L.E. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials* 1994; 15(13):1062- 1074
 10. Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B., Ericson, L.E. Bone response to surface- modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996; 17(6): 605-616
 11. Wennerberg, A., Ektessabi, A., Albrektsson, T., Johansson, C., Andersson, B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1997; 12(4): 486-494
 12. Wennerberg, A., Hallgren, C., Johansson, C., Danelli, S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin. Oral Implants Res.* 1998; 9(1): 11-19
 13. Trisi, P., Rao, W., Rebaudi, A. A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1999; 14(5): 689-698
 14. Gotfredsen, K., Wennerberg, A., Johansson, C., Skovgaard, L.T., Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29(10): 1223-1231
 15. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B., Krol, J.J. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin. Oral Implants Res.* 1995; 6(1): 24-30
 16. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Lausmaa, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al₂O₃. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30(2): 251-260
 17. Buser, D., Nydegger, T., Hirt, H.P., Cochran, D.L., Nolte, L.P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1998; 13(5): 611-619
 18. Kent, J.N., Block, M.S., Finger, I.M., Guerra, L., Larsen, H., Misiek, D.J. Biointegrated hydroxyapatite-coated dental implants: 5 year clinical observations. *Journal of the American Dental Association* 1990; 121: 138-144
 19. Hahn, J.A. A preliminary clinical evaluation of the Steri-Oss implant system. *Int. J. Oral Implants* 1990; 75: 31-36
 20. Saadoun, A.P. and LeGall, M.L. Clinical results and guidelines on Steri-Oss endosseous implants. *Int. J. Periodontics & Restorative Dent.* 1992; 12: 487-499
 21. Babbush, Ch.A. and Shimura, M. Five- year statistical and clinical observations with the IMZ two-stage osseointegrated implant system. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1993; 8: 245-253
 22. Block, M.S. and Kent, J.N. Long-term follow-up on hydroxyapatite-coated cylindrical dental implants: a comparison between development and recent periods. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994; 52: 937-943
 23. Wheeler, S.L. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite coated cylinder implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1996; 3: 340-350
 24. Watson, C.J., Ogden, A.R., Tinsley, D., Russel,

- J.L., Davidson, E.M. A 3-to 6-year study of overdentures supported by hydroxyapatite-coated endosseous dental implants. *Int. J. Prosthodont.* 1998; 11: 610-619
25. Mouzin, O., Søballe, K., Bechtold, J.E. Loading improves anchorage of hydroxyapatite implants more than titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001: 58: 61-68
26. Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J.P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H.P., Belser, U.C., Lang, N.P. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part I: An 8-year life table analysis of a prospective multi center study with 2359 implants. *Clin. Oral. Implants. Res.* 1997; 8: 161-172
27. Buser, D., Mericske-Stern, R., Dula, K., Lang, N.P. Clinical experience with one-stage, non-submerged dental implants. *Advances in Dental Research* 1999; 13: 153-161
28. Weber, H.P., Crohin, C.C., Fiorellini, J.P. A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants. *Clin. Oral. Implants. Res.* 2000; 11(2) 144-153
29. Deporter, D., Pilliar, R.M., Todescan, R., Watson, P., Pharoah, M. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2001; 16(5): 653-658
30. Deporter, D.A., Todescan, R., Watson, P.A., Pharoah, M., Pilliar, R.M., Tomlinson, G. A prospective human clinical trial of Endopore dental implants in restoring the partially edentulous maxilla using fixed prostheses. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2001; 16(4): 527-536
31. Deporter, D., Todescan, R., Caudry, S. Simplifying management of the posterior maxilla using short, porous-surfaced dental implants and simultaneous indirect sinus elevation. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20(5): 476-485
32. Gotfredsen, K., Wennerberg, A., Johansson, C., Skovgaard, L.T., Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995: 29(10): 1223-1231
33. Mustafa, K., Wroblewski, J., Hultenby, K., Silva Lopez, B., Arvidson, K. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. *Clin. Oral Implants Res.* 2000; 11: 116-128
34. Mano, T., Ueyama, Y., Ishikawa, K., Matsumura, T., Suzuki, K. Initial tissue response to a titanium implant coated with apatite at room temperature using a blast coating method. *Biomaterials* 2002; 23: 1931-1936
35. Sanz, A., Oyarzun, A., Farias, D., Diaz, I. Experimental study of bone response to a new surface treatment of endosseous titanium implants. *Implant. Dent.* 2001;10(2):126-131
36. Klokkevold, P.R., Johnson, P., Dadgostari, S., Caputo, A., Davies, J.E., Nishimura, R.D. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin. Oral Impl. Res.* 2001; 12: 350-357
37. Cordioli, G., Majzoub, Z., Piattelli, A., Scarano, A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces : An experimental study in the rabbit tibia. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2000; 15: 668-674
38. Lazzara, R.J., Testori, T., Trisi, P., Porter, S.S., Weinstein, R.L. A human histologic analysis of Osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 1999; 19: 117-129
39. Wilke, H.J., Claes, L., Steinemann, S. The influ-

- ence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. *Advances of Biomaterials* 1990: 9: 309-311
40. Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochran, D.L., Schenk, R.K., Hirt, H.P., Snetivy, D., Nolte, L.P. Influence of surface characteristics on the interface shear strength between titanium implants and bone. A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999: 45 :75-83
 41. Kim, H.S., Cho, W.I., Cho, B.W., Park, J.B., Hur, Y.S. Characterization of titanium implant anodized in various electrolytes. *J. Korean Electrochem. Soc.* 2002: 5(2): 43-46
 42. Byeon, K.J., Kim, C.S., Zhu, X., Kim, K.H. Electrochemical behavior and morphology of anodic titanium oxide films. *J. Biomed. Eng. Res.* 2000: 21(3): 273-277
 43. Sul, Y.T., Johansson, C.B., Jeong, Y.S., Albrektsson, T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes, *Medical Engineering & Physics*, 2001: 23: 329-346
 44. Sul, Y.T., Johansson, C.B., Kang, Y., Jeon, D.G., Albrektsson, T. Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and phosphoric acid incorporation. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2002: 4(2): 78-87
 45. Sul, Y.T., Johansson, C.B., Jeong, Y., Wennerberg, A., Albrektsson, T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clin. Oral Implants Res.* 2002: 13(3): 252-259
 46. Sul, Y.T., Johansson, C.B., Petronis, S., Krozer, A., Jeong, Y., Wennerberg, A., Albrektsson, T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002: 23(2): 491-501
 47. Sul, Y.T., Johansson, C.B., Petronis, S., Roser, K., Albrektsson, T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodized implants *Biomaterials* 2002: 23: 1809-1817
 48. Larsson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Rodahl, M., Kasemo, B., Ericson, L.E. Bone response to surface modified titanium implants : studies on electropolished implants with different oxide thickness and morphology. *Biomaterials* 1994: 15(13): 1062-1074
 49. Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B., Ericson, L.E. Bone response to surface- modified titanium implants : studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thickness. *Biomaterials* 1996: 17(6): 605-616
 50. Hall J. and Lausmaa J. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 5-8
 51. Larsson C. The interface between bone and implants with different surface oxide properties. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 5-14
 52. Henry, P.J., Tan, A.E.S., Allan, B.P., Hall, J., Johansson, C. Removal torque comparison of TiUnite and turned implants in the greyhound dog mandible. *Applied Osseointegration Research*, 2000: (1): 15-17
 53. Rompen, E., DaSilva, D., Lundgren, A.K., Gottlow, J., Sennerby, L. Stability measurement of a double-threaded titanium implant design with turned or oxide surface. An experimental resonance frequency analysis study in the dog

- mandible, *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 18-20
54. Albrektsson, T., Johansson, C., Lundgren, A.K., Sul, Y.T., Gottlow, J. Experimental studies on oxidized implants. A histomorphometrical and biomechanical analysis. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 21-24
 55. Gottlow, J., Johansson, C., Albrektsson, T., Lundgren, A. K. Biomechanical and histologic evaluation of the TiUnite and Osseotite implant surfaces in rabbits after 6 weeks of healing. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 25-27
 56. Gottlow, J., Henry, P.J., Tan, A.E.S., Allan, B. P., Johansson, C., Hall, J. Biomechanical and histologic evaluation of the TiUnite and Osseotite implant surfaces in dogs. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 28-30
 57. Sennerby, L. and Miyamoto, I. Insertion torque and RFA analysis of TiUnite and SLA implants. A study in the rabbit. *Applied Osseointegration Research*, 2000: 1(1): 31-33
 58. Kennedy, A.C., Kohler, R. and Poole, P. A sodium hydroxide anodize surface pretreatment for the adhesive bonding of titanium alloys. *Int. J. Adhesion and Adhesives*, 1983: 3(2) : 133-139
 59. Jennifer, A., Filbey, and Wightman J.P. Factors affecting the durability of Ti-6Al- 4V/ epoxy bonds. *J. Adhesion*, 1989: 28: 1-22
 60. Azumi, K., Yasui, N. and Seo, M. : Changes in the properties of anodic oxide films formed on titanium during long- term immersion in deaerated neutral solutions. *Corrosion Science*, 2000: 42: 885-896
 61. Zhu, X., Kim, K.H., Jeong, Y. Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. *Biomaterials* 2001: 22(16): 2199-2206
 62. Zhu, X., Ong, J.L., Kim, S.Y., Kim, K.H. Surface characteristics and structure of anodic oxide films Ca and P on a titanium implant material. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002: 60: 333-338
 63. Woodman, J.L., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Urban, R.M. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons : A long-term study. *J. Orthop. Res.* 1984: 1: 421-430
 64. Wisbey, A., Gregson, P.J., Peter, L.M., Tuke, M. Effect of surface treatment on the dissolution of titanium-based implant materials. *Biomaterials* 1991: 12(5): 470-473
 65. Healy, K.E. and Ducheyne, P. The mechanisms of passive dissolution of titanium in a model physiological environment. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992: 26: 319-338
 66. Bessho, K., Fujimura, K. and Iizuka, T. Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995: 29: 901-904
 67. Chen, G., Wen, X., Zhang, N. Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness. *Biomed. Mater. Eng.* 1998:8(2): 61-74
 68. Hanawa, T., Asami, K. and Asaoka, K. : Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 40, 530-538
 69. Browne, M. and Gregson, P.J. Effect of mechanical surface pretreatment on metal ion release. *Biomaterials* 2000: 21(4): 385-392
 70. Anselme, K., Linez, P., Bigerelle, M., Le Maguer, D., Le Maguer, A., Hardouin, P., Hildebrand, H. F., Iost, A., Leroy, J.M. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 2000: 21: 1567-1577
 71. Ku, C.H., Pioletti, D.P., Browne, M., Gregson, P.J. Effect of different Ti-6Al- 4V surface treat-

- ments on osteoblasts behaviour, *Biomaterials* 2002: 23(6): 1447-54
72. Pioletti, D.P., Takei, H., Lin, T., Van Landuyt, P., Ma, Q.J., Kwon, S.Y., Sung, K.L. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions, *Biomaterials* 2000: 21(11): 1103-1114
73. Pioletti, D.P., Takei, H., Kwon, S.Y., Wood, D., Sung, K.L. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* 1999: 46(3): 399-407
74. Kwon, S.Y., Takei, H., Pioletti, D.P., Lin, T., Ma, Q.J., Akesson, W.H., Wood, D.J., Sung, K.L. Titanium particles inhibit osteoblast adhesion to fibronectin-coated substrates, *J. Orthop. Res.* 2000: 18(2): 203-211
75. Thompson, G.J., Puleo, D.A. Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation time-course in vitro, *Biomaterials* 1996: 17: 1949-1954
76. Ku, C.-H., Browne, M., Gregson, P.J., Corbeil, J., Pioletti, D. P. Large-scale gene expression analysis of osteoblasts cultured on three different Ti-6Al-4V surface treatments, *Biomaterials* 2002: 23: 4193-4202
77. Pioletti, D.P., Leoni, L., Genini, D., Takei, H., Du, P., Corbeil, J. Gene expression analysis of osteoblastic cells contacted by orthopedic implant particles, *J. Biomed. Mater. Res.* 2002: 61(3): 408-420
78. Takei, H., Pioletti, D.P., Kwon, S.Y., Sung, K.L. Combined effect of titanium particles and TNF-alpha on the production of IL-6 by osteoblast-like cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 2000: 52(2): 382-7
79. Glant, T.T., Jacobs, J.J., Molnar, G., Shanbhag, A.S., Valyon, M., Galante, J.O. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages, *J. Bone Miner. Res.* 1993: 8(9): 1071-1079
80. Glant, T.T. and Jacobs, J.J. Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures, *J. Orthop. Res.* 1994: 12(5): 720-731
81. Shanbhag, A.S., Jacobs, J.J., Black, J., Galante, J.O., Glant, T.T. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area, *J. Biomed. Mater. Res.* 1994: 28(1): 81-90
82. Lee, S.H., Brennan, F.R., Jacobs, J.J., Urban, R.M., Ragasa, D.R., Glant, T.T. Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements, *J. Orthop. Res.* 1997: 15(1): 40-49
83. Lee, T.M., Chang, E. and Yang, C.Y. A comparison of the surface characteristics and ion release of Ti-6Al-4V and heat-treated Ti-6Al-4V, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000: 50: 499-511
84. Lausmaa, J., Kasemo, B., Mattsson, H., Odelius, H. Multitechnique surface characterization of oxide films on electropolished and anodically oxidized titanium, *Appl. Surface Sci.* 1990: 45: 189-200
85. Park, J.Y. and Davies, J.E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces, *Clin. Oral Impl. Res.* 2000: 11: 530-539
86. Sammons, R.L., Sharpe, J., Marquis, P.M. Use of enhanced chemiluminescence to quantify protein adsorption to calcium phosphate materials and microcarrier beads, *Biomaterials* 1994: 15: 842-847
87. El-Ghannam, A., Ducheyne, P., Shapiro, M. Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface modified bioactive glass and hydroxyapatite, *J. Orthop. Res.* 1999: 17: 340-345
88. Matsuura, T., Hosokawa, R., Okamoto, K., Kimoto, T., Akagawa, Y. Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium, *Biomaterials* 2000: 21: 1121-1127

89. Yang, Y., Tian, J., Deng, L., Ong, J.L. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials* 2002; 23: 1383-1389
90. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
91. Gronowicz, G. and McCarthy, M.B. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J. Orthop. Res.* 1996; 14: 878-887
92. Sinha, R.K. and Tuan, R.S. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 1996; 18: 451-457
93. Villareal, D.R., Sogal, A., Ong, J.L. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J. Oral. Impl.* 1998; 24: 67-73
94. Cowles, E.A., Brailey, L.L., Gronowicz, G.A. Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52(4): 725-737
95. El-Ghannam, A., Starr, L., Jones, J. Laminin-5 coating enhances epithelial cell attachment, spreading, and hemidesmosome assembly on Ti-6Al-4V implant material in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 41: 30-40
96. Garcia, A.J., Vega, M.D., Boettiger, D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol. Biol. Cell* 1999; 10: 785-798
97. Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, Jr. J., Dean, D.D., Cochran, D.L., Boyan, B.D. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells(MG63). *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 389-401
98. Mustafa, K., Wroblewski, J., Hultenby, K., Silvia Lopez, B., Arvidson, K. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. *Clin. Oral Impl. Res.* 2000; 11: 116-128
99. Boyan, B.D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D., Schwartz, Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α 25- (OH)2D3. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 29: 389-401
100. Schwartz, Z., Martin, J.Y., Dean, D.D., Simpson, J., Cochran, D.L. Boyan, D.D. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30: 145-155
101. Piattelli, A., Scarano, A., Piattelli, M. Detection of alkaline and acid phosphatases around titanium implants : A light microscopical and histochemical study in rabbits. *Biomaterials* 1995; 16: 1333-1338
102. Piattelli, A., Piattelli, M., Scarano, A. Simultaneous demonstration of alkaline and acid phosphatase activities in bone, at bone implant interface and at the epiphyseal growth plate in plastic embedded undemineralized tissue. *Biomaterials* 1997; 18: 545-549
103. Lincks, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D., Schwartz, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998; 19: 2219-2232
104. Lincks, J., Boyan, B.D., Cochran, D.L., Liu, Y., Blanchard, C.R., Dean, D.D., Schwartz, Z. Cell type and maturation state determine cell response to surface roughness and composi-

- tion, *J. Dent. Res.* 77: 966
105. Mustafa, K., Wennerberg, A., Wroblewski, J., Hultenby, K., Silva Lopez, B., Arvidson, K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin. Oral Impl. Res.* 2001: 515-525
 106. Gottlander, M., Albrektsson, T., Carlsson, L.V. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1992: 7: 485-490
 107. Bauer, T.W., Geesink, R.C., Zimmerman, R., McMahon J.T., Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histologic analysis of components retrieved at autopsy. *J. Bone. Joint. Surg.* 1991: 73: 1439-1452
 108. Jansen, J.A., van der Waerden, J.P.C.M., Wolke, J.G.C. Histologic investigation of the biologic behavior of different hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in rabbit. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993: 27: 603-610
 109. Dhert, W.J.A., Klein, C.P.A.T., Jansen, J.A. van der Velde, E.A., Vriesde, R.C., Rosing P.M., De Groot K. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993: 27: 127-138
 110. Wang, B.C., Chang, E., Yang, C.Y. A histomorphometric study on osteoconduction and osseointegration of titanium alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating using back-scattered electron images. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993: 4: 394-403
 111. Ducheyne, L.F., Radin, S., King, L. The effect of calcium phosphate ceramics composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993: 27(1) :25-34
 112. Klein, C.P.A.T., Patka, P., Wolke, J.G.C., Ce Blick-Hogervorst, J.M.A., De Groot, K. Long-term in vivo study of plasma-sprayed coatings on titanium alloys of tetracalcium phosphate, hydroxyapatite and α -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 1994: 15: 146-150
 113. Piattelli, A., Cordioli, G.P., Trisi, P., Passi, P., Favero, G.A. Meffert, R.M. Light and confocal laser scanning microscopic evaluation of hydroxyapatite resorption patterns in medullary and cortical bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1993: 8: 309-315
 114. Cheang, P., and Khor, K.A. Addressing processing problems associated with plasma spraying of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 1996: 17(5): 537-544
 115. MacDonald, D.E., Betts, F., Stranick, M., Doty, S., Boskey, A.L. Physicochemical study of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implants in humans. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001: 54 : 480-490
 116. Ishizawa, H. and Ogino, M.: Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995: 29: 65-72
 117. Ishizawa, H. and Ogino, M. : Characterization of thin hydroxyapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995: 29: 1071-1079
 118. Ishizawa, H., Fujino, M., and Ogino, M. Mechanical and histological investigation of hydrothermally treated and untreated anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995: 29(11): 1459-1468
 119. Ishizawa, H. and Ogino, M. : Hydrothermal precipitation of Hydroxyapatite on anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J. Materials*

- Science, 1999: 34: 5893-5898
120. Fini, M., Cigada, A., Rondelli, G., Chiesa, R., Giardino, R., Giavaresi, G., Nicoli Aldini, N., Torricelli, P., Vicentini, B. In vitro and in vivo behaviour of Ca-and P-enriched anodized titanium. *Biomaterials* 1999: 20(17): 1587-1594
 121. Takebe, J., Itoh, S., Okada, J., Ishibashi, K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000: 51(3): 398-407
 122. Han, Y., Fu, T., Lu, J., Xu, K. Characterization and stability of hydroxyapatite coatings prepared by an electrodeposition and alkaline-treatment process. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001: 54: 96-101
 123. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B. An animal study of c.p. titanium screws with different surface topographies. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1995: 6: 302-309
 124. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Johansson C., Andersson, B. An experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* 1996: 17: 15-22
 125. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1996: 11: 38-45
 126. Schwartz Z., Lohmann C.H., Cochran D.L., Sylvia V.L., Dean D.D., Boyan B.D. Bone regulating mechanisms on implant surfaces. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology. Implant Dentistry.* 1999;41-54
 127. Anselme, K., Biggerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A., Hardouin, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000: 49: 155-166
 128. Biggerelle, M., Anselme, K., Noel, B., Ruderman, I., Hardouin, P., Iost, A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterial* 2002: 23: 1563-1577
 129. Zreiqat, H., Standard, O.C., Gengenbach, T., Steele, J.G., Howlett, C.R. The role of surface characteristics in the initial adhesion of human bone derived cells on ceramics. *Cells Mater.* 1996: 6: 45-56
 130. Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., Missirlis, Y. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 2001: 22: 87-96
 131. Deligianni, D.D., Katsala, N., Ladas, S., Sotiropoulou, D., Amedee, J., Missirlis, Y.F. Effect of surface of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001: 22: 1241-1251
 132. Browne, M. and Gregson, P.J. Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials* 1994: 15(11): 894-898

사진부도 설명

- Figure 1. Scanning electron micrographs(SEM) of commercially pure titanium surface with chemical treatment only without anodizing treatment.
- Figure 2. SEM of commercially pure titanium surface anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 200 V.
- Figure 3. SEM of commercially pure titanium surface anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 250 V.
- Figure 4. SEM of commercially pure titanium surface anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 300 V.
- Figure 5. SEM of Ti-6Al-4V titanium alloy with chemical pretreatment only without anodizing.
- Figure 6. SEM of Ti-6Al-4V titanium alloy anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 200 V.
- Figure 7. SEM of Ti-6Al-4V titanium alloy anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 250 V.
- Figure 8. SEM of Ti-6Al-4V titanium alloy anodized in 0.06 mol/L glycerophosphate and 0.3 mol/L sodium acetate electrolyte at 300 V.
- Figure 9. Scanning Auger Electron Spectroscopy(AES) of 300V anodizing commercially pure titanium specimen. AES shows the increase of titanium molecules and the decrease of oxides by proceeding of sputtering.
- Figure 10. AES of 300V anodizing commercially pure titanium specimen. AES shows the increase of titanium molecules and the decrease of oxides by proceeding of sputtering.
- Figure 11. AES of 300V anodizing commercially pure titanium specimen. AES shows the oxides layer still remains after the sputtering time of 350 minutes.
- Figure 12. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells on anodized commercially pure titanium was increased with the increase of voltage.
- Figure 13. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells on anodized Ti-6Al-4V was increased with the increase of voltage.
- Figure 14. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells was not different between unanodized commercially pure titanium and Ti-6Al-4V.
- Figure 15. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells was not different between 200V anodized commercially pure titanium and Ti-6Al-4V.
- Figure 16. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells was not different between 250V anodized commercially pure titanium and Ti-6Al-4V.
- Figure 17. The proliferation rate of rat calvarial osteoblastic cells was not different between 300V anodized commercially pure titanium and Ti-6Al-4V.

사진부도 (I)

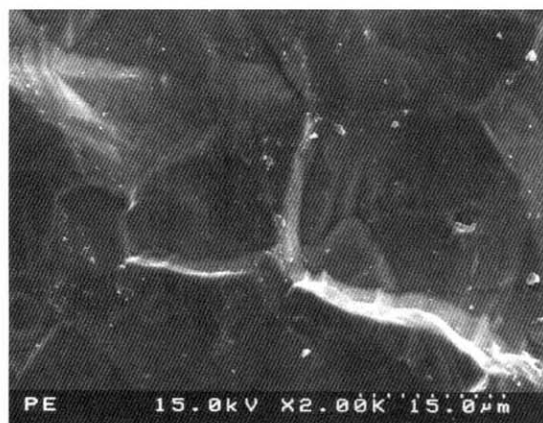


Figure 1

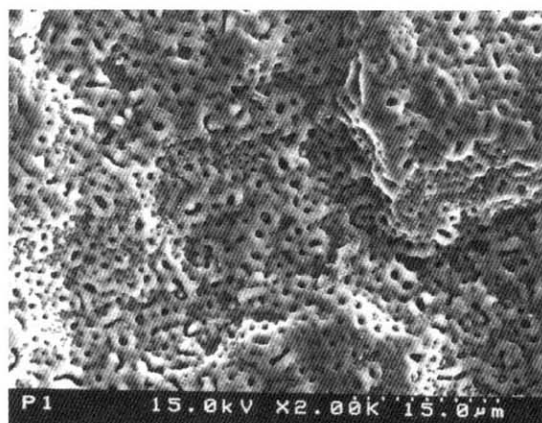


Figure 2

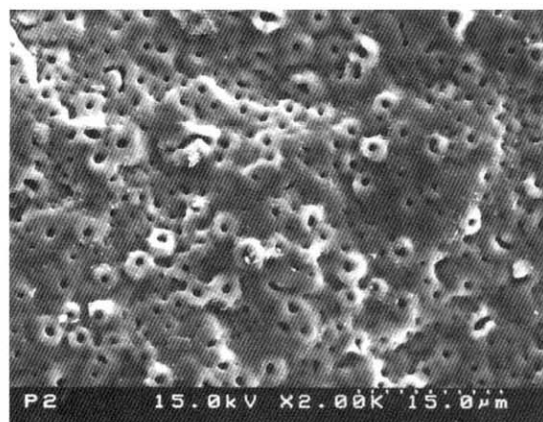


Figure 3

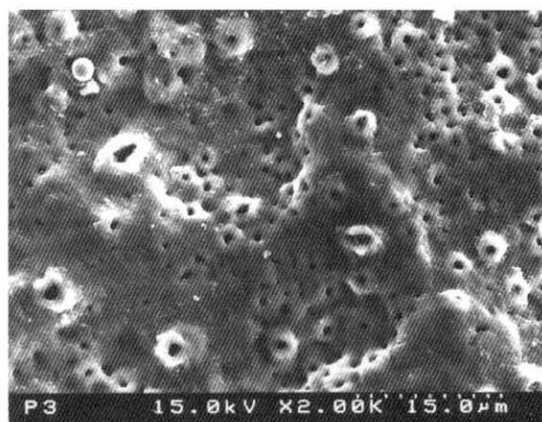


Figure 4

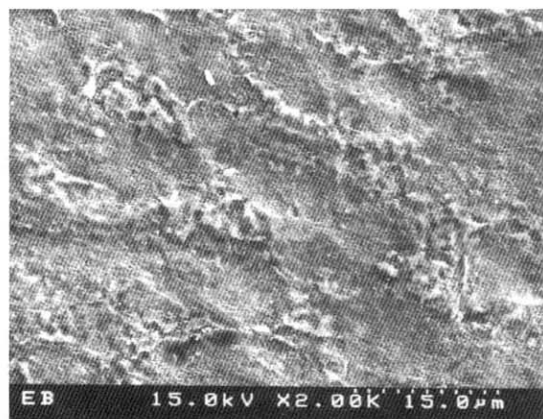


Figure 5

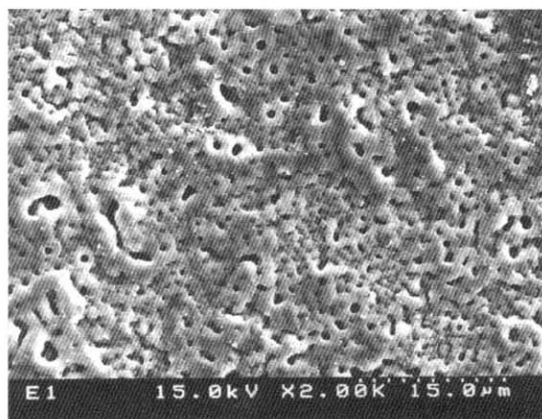


Figure 6

사진부도 (II)

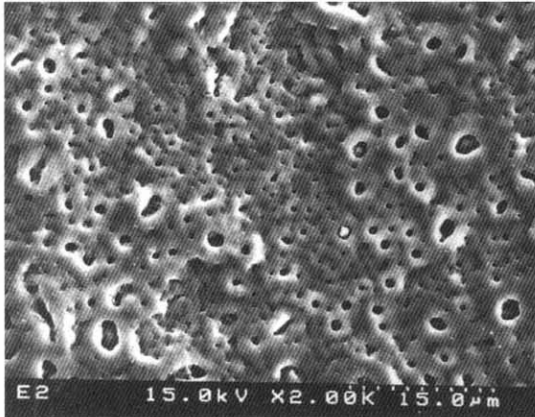


Figure 7

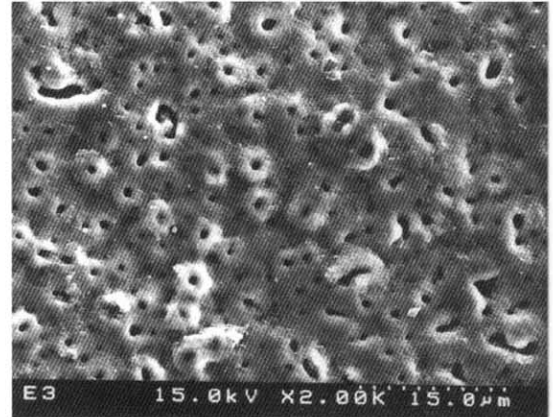


Figure 8

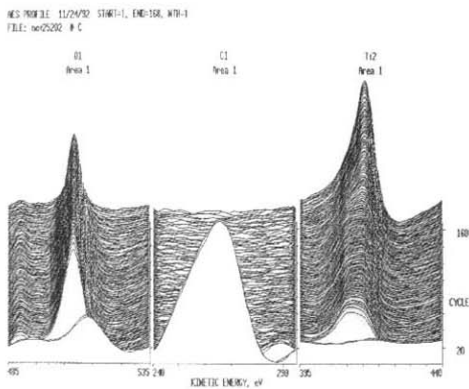


Figure 9

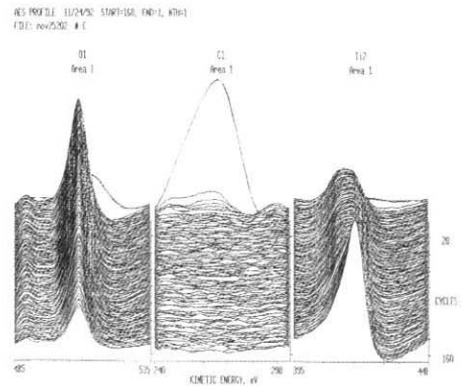


Figure 10

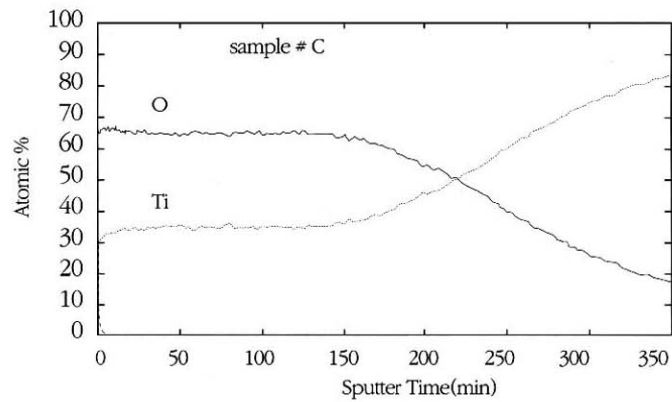


Figure 11

사진부도 (Ⅲ)

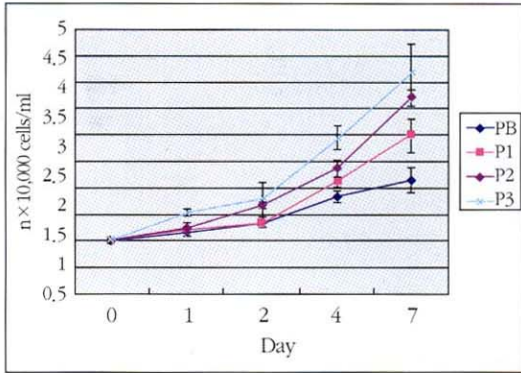


Figure 12

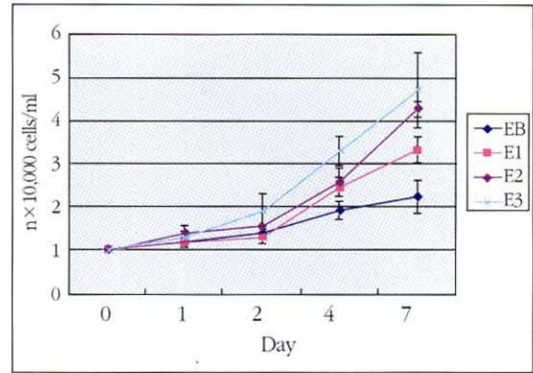


Figure 13

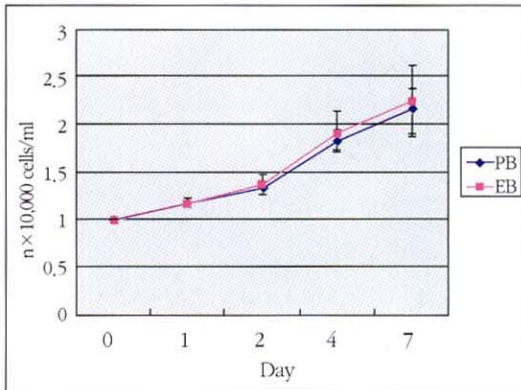


Figure 14

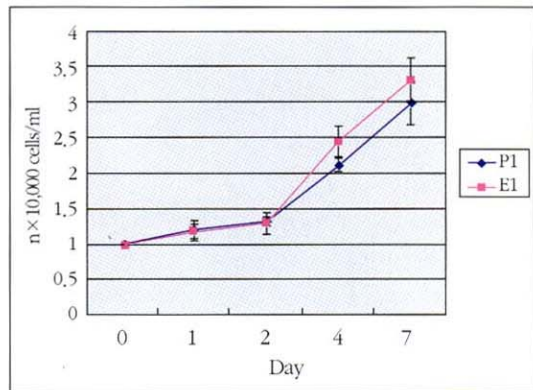


Figure 15

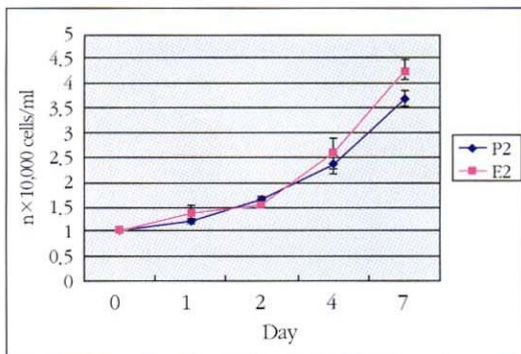


Figure 16

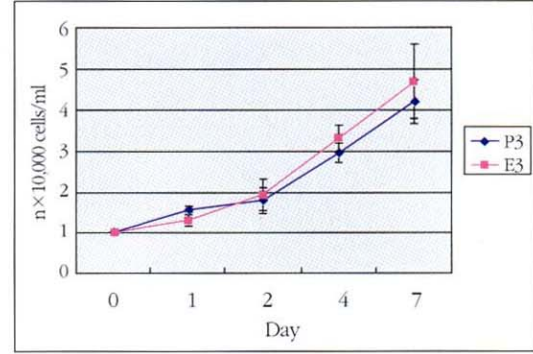


Figure 17

The effect of implant surface treated by anodizing on proliferation of the rat osteoblast

Yin-Shik Hur, Joon-Bong Park, Young-Hyuk Kwon, Yeek Herr

Hyung-Sun Kim*, Byung-Won Cho*, Won Il Cho*

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University
Eco-Nano Research Center*, KIST(Korea Institute of Science and Technology)

The surface characteristics of titanium have been shown to have an important role in contact osseointegration around the implant. Anodizing at high voltage produces microporous structure and increases thickness of surface titanium dioxide layer. The aim of present study was to analyse the response of rat calvarial osteoblast cell to commercially pure titanium and Ti-6Al-4V anodized in 0.06 mol/l β -glycerophosphate and 0.03 mol/l sodium acetate. In this study, rat calvarial osteoblasts were used to assay for cell viability and cell proliferation on the implant surface at 1, 2, 4, 7 days.

1. Surface roughness was 1,256 μm at 200V, and 1,745 μm at 300V.
2. The thickness of titanium oxide layer was increased 1 μm with the increase of 50V.
3. The proliferation rate of osteoblastic cells was increased with the increase of the surface roughness and the thickness of titanium oxide layer.
4. There was no difference in cell viability and cell proliferation between commercially pure titanium and Ti-6Al-4V anodized at the same condition.

In conclusion, the titanium surface modified by anodizing was biocompatible, produced enhanced osteoblastic response. The reasons of enhanced osteoblast response might be due to reduced metal ion release by thickened and stabilized titanium dioxide layer and microporous rough structures.