

매식체 표면처리에 따른 생물학적 특성에 대한 연구

김재혁, 정진형*, 임성빈, 홍기석

단국대학교 치과대학 치주과학교실

A study on the biological characteristics of modified titanium surface

Jae-Hyuk Kim, Chin-Hyung Chung*, Sung-Bin Lim, Ki-Seok Hong

Department of Periodontology, School of Dentistry, Dan Kook University

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this research is to study about initial adhesion, proliferation and activation of osteoblast to titanium surface treated with machined, hydroxyapatite coating, resorbable blast material blasting and anodizing method.

Material and Methods: After treating the titanium surface of each block with machined, impurities were removed and sterilized. The number of cells attached from cultured osteoblast of respective experimental groups were measured at 1, 4, 7, and 14 day and alkaline phosphatase, calcium, and inorganic phosphate concentration of cultured solution was measured.

Result: Anodizing group showed the highest rate of cell attachment and proliferation activity. RBM treated group showed the highest increasing on their alkaline phosphatase activity, on the calcium apposition, on inorganic phosphate apposition of 1 and 4 days in cultured osteoblast to compare with other groups.

Conclusion: On the basis of these findings, we conclude that surface modification of titanium was profoundly effected on the attachment, proliferation and activation of osteoblast in initial stage osseointegration.

(*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:453-466)

KEY WORDS: titanium surface; resorbable blast material blasting; hydroxyapatite coating; anodized coating; machined; osteoblast.

서론

티타늄과 티타늄 합금은 우수한 기계적 성질, 부식 저항성을 지닌 생체 친화적 물질로 정형외과와 치과 수술에서 지난 30년 동안 널리 사용되었다. 티타늄 표면은 자발적으로 얇은 산화막이 형성되어 티타늄 이온 누출이 적고 부식 저항성이 좋아 우수한 생물학적 성질을 지닌다¹⁻³⁾.

따라서 초기 임플란트는 기계절삭한 면을 이용하였는데 골질이 나쁜 경우에 성공률이 상대적으로 낮아서, 티타늄 표면을 화학적 또는 물리적으로 변형하는 방법이 고안되었다. 이에 대한 초기 연구로서 골형성과 골개조 또는 임플란트의 골유착 동안에 간엽줄기세포가 조골세포로 분화하는

과정을 거쳐서 무기질이 형성된다⁴⁾는 점에 착안하여 표면의 거칠기를 증가시킨 결과 거친 표면 구조가 세포 부착에 더 효과적이라는 사실이 확인되었다⁵⁻⁸⁾. 따라서 몇몇 저자들은 적합한 범위의 표면 거칠기를 제시⁹⁾하기도 하였으며 보다 심층적인 연구결과, 표면 거칠기의 증가는 조골세포의 부착을 향상시키며¹⁰⁾, 골세포가 성장하였을 때보다 성숙한 표현형을 나타낼 수 있도록 해주고¹¹⁾, 표면 거칠기가 조골세포의 증식과 분화, 그리고 골 형성에 관여하는 국소인자들의 생산에 영향을 준다고 하였다¹²⁾. 동물실험에서도 표면 거칠기를 증가시켰을 경우 더 우수한 골 반응을 나타낸다는 것이 조직학적으로 입증되었고¹²⁻¹⁴⁾, 다양한 임플란트 표면에서 조골세포 부착과 증식이 평가되었다¹⁵⁻¹⁷⁾.

초기 기계가공표면으로부터 진화된 양상을 살펴보면 2세대 표면처리 방법으로서 수산화인회석 피막처리법(hydroxyapatite coating, HA)과 티타늄 분사 피막처리법(titanium plasma spray, TPS)으로 나누어 볼 수 있다. 수산화인회석 피막은

Correspondence: Dr. Chin-Hyung Chung
Department of Periodontology, School of Dentistry, Dan Kook University, San 8, Sinbu-dong, Cheonan-si, Choongnam, 330-716, Korea,
E-mail: periodk@dankook.ac.kr, Tel: 041-550-1983, Fax: 041-550-1983
Received: Jun 4, 2008; Accepted: Jul 15, 2008

골조직의 구성 성분인 수산화인회석을 피복시켜 빠른 골유착을 유도하는 방법으로 생체 내에서의 장단점이 보고되었는데¹⁸⁻²²⁾, 가장 주목되는 단점으로 매식 초기에는 수산화인회석을 피복한 임플란트는 골유착이 높게 나타나지만 장시간이 경과하면 수산화인회석이 용해되거나 떨어져 나가거나 노출 시 임플란트 주위의 염증을 야기하여 골소실을 일으킨다는 단점이 있다¹⁸⁻²²⁾. 이에 단점을 보완하기 위해 고안된 방법으로써 초박막 피복법이 개발되었고, 졸-겔 피복법 등 다수의 피복법이 고안되었다^{23,24)}. 또 다른 2세대 표면처리법인 티타늄 분말 피복(plasma spray coating)법은 골과의 직접적인 접촉면적을 넓히기 위하여 임플란트 표면에 티타늄 분말을 분사시키는 표면처리 방법으로서^{25,26)}, Schroeder 등²⁵⁾은 응력이 집중되는 표면에 티타늄 분사 피복(titanium plasma-sprayed) 표면이 힘의 분산에 유리하다고 보고하였다. 그럼에도 불구하고 임상적으로는 기계가공처리표면 매식체와 커다란 차이점을 나타내지 않음으로써 표면의 거칠기를 보다 미세하고 균일하게 형성할 수 있는 3세대의 표면처리 방법이 고안되었다. 3세대로는 티타늄의 표면에 산화알루미늄이나 산화티타늄으로 구성된 모래를 분사만 하거나 모래 분사 후 산으로 부식하는 방법으로서 이에 따른 골유착에 대한 연구 결과¹⁹⁾, 일부 학자들은 SLA 표면(Sand-blasted with Large grit and Acid etched surface)으로 표면처리를 강화하여 세포의 활성을 촉진시켜 골과 임플란트의 접촉을 더욱 빠르게 일으켜 치료기간을 단축할 수 있으며, 임상적으로 높은 성공률을 보고한 바 있다²⁰⁾. 그러나 이와 같은 처리 과정에서 잔존 분사파괴물질의 비흡성과 산처리 시 다공질에 잔존되는 산물질에 의해 드물지만 예기치 않은 부작용을 유발함으로써 이에 대한 단점을 보완하고자 분사파괴물질을 흡수성으로 대체한 Resorbable Blasted Media를 사용하였으며 수많은 선행들에 의해 기존의 단점을 해결함은 물론 골유착을 증대시킨다는 연구 결과가 있다^{27,28)}.

최근에는 표면의 거칠기 외에도 표층에 존재하는 산화층 두께, 산화물 결정도와 이온들의 존재와 같은 다른 특성들이 골유착에 영향을 줄 수 있다²⁹⁾는 사실이 밝혀짐으로써 4세대 표면처리 방법으로써 전기화학적 산화(Anodizing, Electrochemical oxidation) 처리를 한 임플란트가 고안되었으며 이러한 전기화학적 산화에 의해 획득된 두꺼운 산화막이 골유착 과정을 가속화시킨다는 연구 결과가 보고되었

다³⁰⁾. 이러한 표면처리 방법의 개선은 초기 매식체 식립 시에 결정적인 역할을 하며 임상적으로도 초기의 골반응이 매식체의 유지에 관건이 되는 바, 이에 저자는 이러한 다양한 방법으로 처리한 매식체 표면에서 조골세포를 단기 배양하여 세포의 초기 부착 정도와 활성도를 평가함으로써 매식체 표면 변화에 따른 유용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

1) 시편 제작

조골세포를 부착 배양시키기 위하여 지름 5 mm, 높이 5 mm인 Titanium 원통형 블록을 제작하였다. Ti 원통형 블록은 ASTM international 분류로 commercially pure titanium grade4(Fort Wayne, USA)를 사용하였고, Ti 순도는 99%를 넘는다. 각 원통형 블록에 기계가공, 수산화인회석 피복(hydroxy apatite coating), 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리(resorbable blast material blasting), 양극산화처리(anodizing)를 이용하여 티타늄 표면을 가공처리한 후 불순물을 제거하고 멸균처리하였다. 수산화인회석 피복 표면은 Pressurized Hydrothermal Postplasma-spray process(Plasma-spray 처리 후, 일정 기압이 유지된 상태에서의 열수 처리 방식)로 처리하였고, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리 표면은 HA: >70%, beta-TCP: <25%, alpha-TCP: <5%, TTCP: <5%, Other CaP: <5%인 Hydroxyapatite계 분말(HIMED, Korea)을 blasting media로 사용하여 표면 거칠기가 1.2~1.5 Ra의 고른 값을 보이도록 하였다(Dio Co, Korea).

2. 연구방법

1) 정상인 조골세포(NHOST) 배양(Normal Human Osteoblast)

정상인 조골세포(NHOST, Cambrex Bioscience Walkersville, USA)를 OGTM Bullet kit를 이용하여 각 시편에서 200 microliter당 5×10^3 개의 세포가 존재하도록 조골세포를 희석한 후 원통형 티타늄 매식체 표면에 올려놓은 후 T-25세포배양 플라스크(Nunc, Denmark)에 배양액(OBM, Clonetics, USA)을 첨가시킨 후 CO₂배양기에서 단일층으로 배양하였다.

2) 세포의 고정과 세포수 측정

각각의 표면처리군당 12개의 시료를 준비하여 세포를 1일, 4일, 7일, 14일간 배양하여 각 매식체당 3개의 결과를 DPBS(Hyclone, USA)로 수세한 후 2.5% buffered neutral formalin으로 고정한 후 Kossa's method와 Naphthol AS phosphate-fast blue BB method를 이용하여 염색하고 관찰하여 세포 수를 측정하였다. 세포 수의 측정은 IPTK(im-age processing tool kit) version 5.0(reindeer company, USA) 프로그램과 확대한 사진 상에서 육안적 계수를 병행하였다.

3) Alkaline phosphatase, calcium, inorganic phosphate의 농도측정

모든 시편의 배양액을 1일 간격으로 교환하였으며 1일, 4일, 7일, 14일간 배양한 시편배양액을 수거하여 calcium 농도는 OCP(O-cresolphthalein Complex)를 이용하여 측정하였으며 inorganic phosphate는 Fiske-subbarow 측정방법으로 측정하였고 alkaline phosphatase의 측정은 IFCC(International federation of clinical chemistry)법으로 측정하였다.

4) 통계 분석

각 군 간의 통계적 분석을 위해 t-test, 분산분석 및 선행회귀분석을 이용하였다.

결 과

1. 세포 부착 및 세포 증식

배양 1일, 4일, 7일, 14일에 각 표면처리군 당 3개의 결과를 염색하고 관찰하여 세포수를 측정하였다.

배양 1일에 부착한 평균 세포 수는 기계가공처리한 군에서 평균 78.67 ± 4.44 개, 수산화인회석의 피복처리한 군에서 평균 383.66 ± 18.22 개, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 평균 401.33 ± 8.22 개, 양극산화처리한 군에서 평균 471.00 ± 12.66 개로 나타났다. 세포가 안착한 비율은 네 가지 실험 군 중 양극산화 처리한 표면에서 가장 높았으며 그 다음으로 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면이 우세했고, 기계가공처리한 표면에서 가장 적은 세포의 안착이 일어났다(Fig. 1, 5).

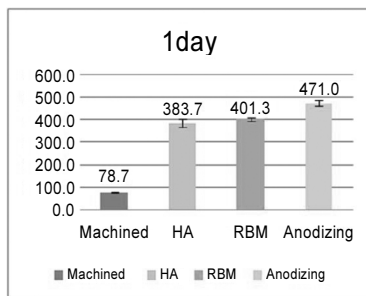


Figure 1. Attached cell number at 1 day (Mean±SD)

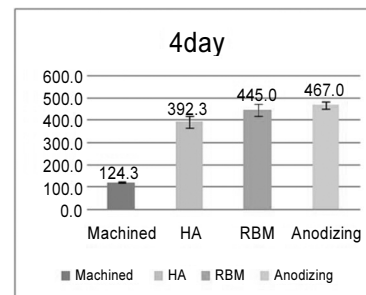


Figure 2. Attached cell number at 4 day (Mean±SD)

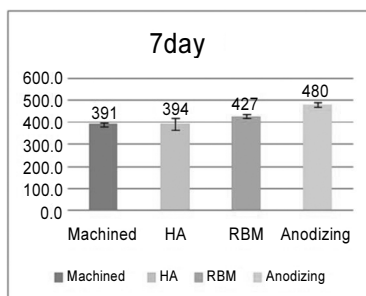


Figure 3. Attached cell number at 7 day (Mean±SD)

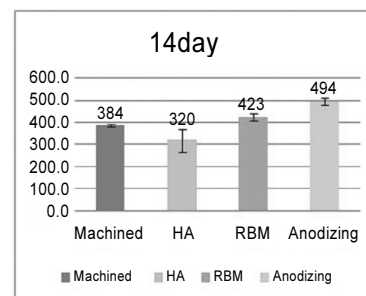
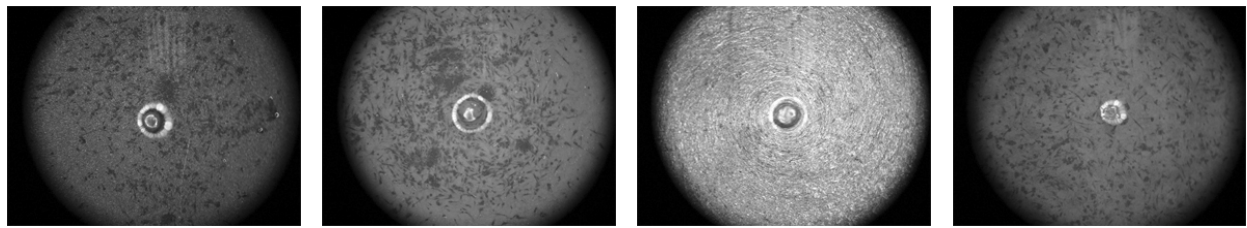


Figure 4. Attached cell number at 14 day (Mean±SD)



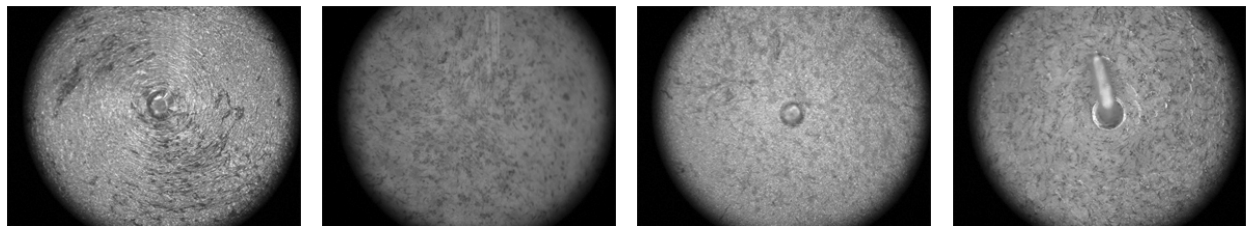
(a) Machined

(b) HA

(c) RBM

(d) Anodizing

Figure 5. Photographs of attached cells to Machined(a), Hydroxy apatite coating(b), Resorbable Blast Media blasting(c), and Anodizing(d) titanium surface at 1day



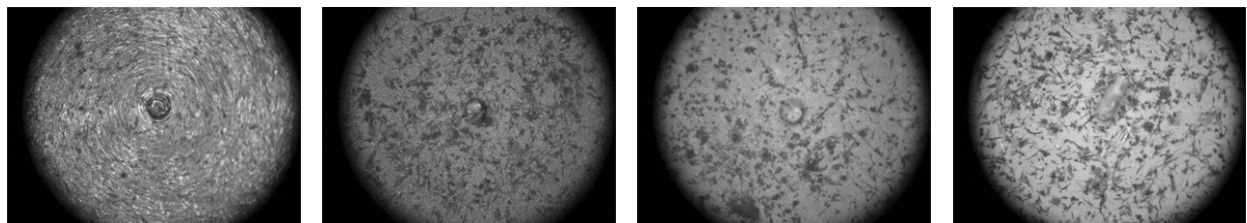
(a) Machined

(b) HA

(c) RBM

(d) Anodizing

Figure 6. Photographs of attached cells to Machined(a), Hydroxy apatite coating(b), Resorbable Blast Media blasting(c), and Anodizing(d) titanium surface at 4day



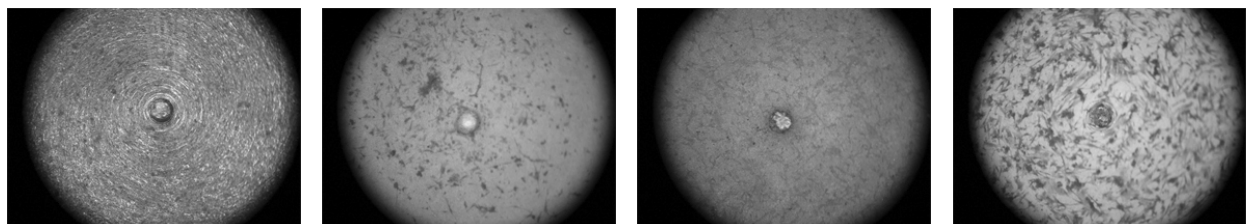
(a) Machined

(b) HA

(c) RBM

(d) Anodizing

Figure 7. Photographs of attached cells to Machined(a), Hydroxy apatite coating(b), Resorbable Blast Media blasting(c), and Anodizing(d) titanium surface at 7day



(a) Machined

(b) HA

(c) RBM

(d) Anodizing

Figure 8. Photographs of attached cells to Machined(a), Hydroxy apatite coating(b), Resorbable Blast Media blasting(c), and Anodizing(d) titanium surface at 14day

배양 4일에 부착한 평균 세포 수는 기계가공처리한 군에서 평균 124.33 ± 3.55 개, 수산화인회석의 피복처리한 군에서 평균 392.33 ± 25.11 개, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 평균 445.00 ± 28.00 개, 양극산화처리한 군에서 평균 467.00 ± 15.33 개로 나타났다. 배양 4일에는 안착된 세포가 증식하는데 기계가공한 표면에서도 계속되는 증식이 일어나지만 수산화인회석 피복한 표면에서의 세포 증식 정도가 더 컸다. 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면과 양극산화 처리한 표면에서는 표준편차를 고려해 볼 때 거의 증식을 나타내지 않았다(Fig. 2, 6).

배양 7일에 부착한 평균 세포 수는 기계가공처리한 군에서 평균 391.00 ± 8.66 개, 수산화인회석의 피복처리한 군에서 평균 394.33 ± 27.77 개, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴

괴처리한 군에서 평균 427.33 ± 7.11 개, 양극산화 처리한 군에서 평균 480.00 ± 11.33 개를 나타내었다(Fig. 3, 7).

배양 14일에 부착한 평균 세포 수는 기계가공처리한 군에서 평균 384.33 ± 7.11 개, 수산화인회석의 피복처리한 군에서 평균 320.33 ± 51.11 개, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 평균 422.66 ± 16.44 개, 양극산화처리한 군에서 평균 493.66 ± 17.78 개로 나타났다. 배양 7일에 기계가공한 표면과 수산화인회석 피복한 표면에서 비슷한 세포 수를 보이지만, 14일째에는 수산화인회석 피복한 표면에서 세포 수가 상당량 감소되는 소견을 보였으며, 전반적으로 기계가공처리한 군과 수산화인회석의 피복처리한 군 둘 다에서 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면과 양극산화 처리한 표면에서보다는 적은 세포 수를 유지하였다(Fig. 4, 8).

Table 1. Alkaline phosphatase assay at 24hour ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.253	0.233	0.150	0.212	0.055
HA	0.229	0.253	0.100	0.194	0.082
RBM	0.245	0.331	0.335	0.304*	0.051
Anodizing	0.224	0.229	0.227	0.227	0.003
Control	0.018	0.018	0.018	0.018	0.000

Table 2. Alkaline phosphatase assay at 4day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.203	0.221	0.110	0.178	0.060
HA	0.207	0.233	0.140	0.193	0.048
RBM	0.393	0.452	0.361	0.402*	0.046
Anodizing	0.231	0.212	0.100	0.181	0.071
Control	0.180	0.180	0.180	0.180	0.000

Table 3. Alkaline phosphatase assay at 7day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.201	0.184	0.186	0.190	0.009
HA	0.187	0.198	0.192	0.192	0.006
RBM	0.169	0.202	0.201	0.191	0.019
Anodizing	0.223	0.192	0.165	0.193	0.029
Control	0.180	0.180	0.180	0.180	0.000

Table 4. Alkaline phosphatase assay at 14day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.188	0.195	0.196	0.193	0.004
HA	0.199	0.199	0.193	0.197	0.003
RBM	0.189	0.199	0.200	0.196	0.006
Anodizing	0.193	0.192	0.197	0.194	0.003
Control	0.180	0.180	0.180	0.180	0.000

Table 5. Calcium assay at 24hour ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	5.4	5.1	4.8	5.1	0.3
HA	5.1	5.3	5.8	5.4	0.4
RBM	4.1	3.6	4.0	3.9*	0.3
Anodizing	4.2	4.4	5.5	4.7	0.7
Control	4.5	4.5	4.5	4.5	0.0

Table 6. Calcium assay at 4day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	4.7	4.1	4.4	4.4	0.3
HA	5.1	5.0	5.4	5.3	0.2
RBM	4.2	3.7	4.1	4.0*	0.3
Anodizing	3.9	4.1	5.2	4.4	0.7
Control	4.5	4.5	4.5	4.5	0.0

* Statistically significant difference ($p < 0.05$)**Table 7.** Calcium assay at 7day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	4.2	4.8	4.5	4.5	0.3
HA	4.7	4.3	4.5	4.5	0.2
RBM	4.1	4.4	5.0	4.5	0.5
Anodizing	4.4	4.7	4.7	4.6	0.2
Control	4.5	4.5	4.5	4.5	0.0

Table 8. Calcium assay at 14day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	4.6	4.8	4.1	4.5	0.4
HA	4.4	4.1	4.7	4.4	0.3
RBM	4.1	4.2	4.9	4.4	0.4
Anodizing	4.8	4.8	3.9	4.5	0.5
Control	4.5	4.5	4.5	4.5	0.0

Table 9. Phosphate assay at 24hour ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.126	0.101	0.280	0.169	0.097
HA	0.125	0.107	0.250	0.161	0.078
RBM	0.077	0.075	0.210	0.121*	0.077
Anodizing	0.113	0.215	0.230	0.186	0.064
Control	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000

Table 10. Phosphate assay at 4day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.180	0.210	0.190	0.193	0.015
HA	0.261	0.250	0.180	0.230	0.044
RBM	0.130	0.120	0.110	0.120*	0.010
Anodizing	0.160	0.193	0.270	0.208	0.056
Control	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000

Table 11. Phosphate assay at 7day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.148	0.207	0.180	0.178	0.030
HA	0.160	0.180	0.190	0.177	0.015
RBM	0.190	0.130	0.170	0.163	0.031
Anodizing	0.162	0.285	0.170	0.206	0.069
Control	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000

Table 12. Phosphate assay at 14day ($\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	Avg	SD
Machined	0.151	0.153	0.152	0.152	0.001
HA	0.139	0.147	0.161	0.149	0.006
RBM	0.152	0.153	0.133	0.146	0.011
Anodizing	0.140	0.145	0.137	0.141	0.004
Control	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000

* Statistically significant difference ($p < 0.05$)

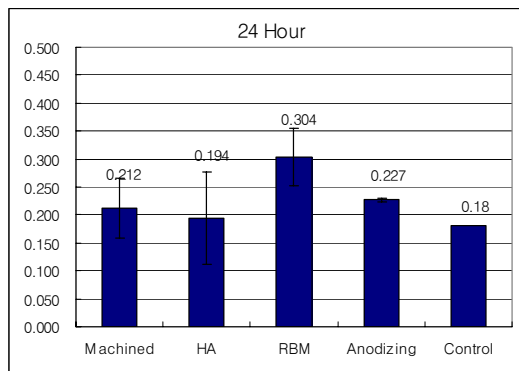


Figure 9. Alkaline phosphatase assay at 24hour (Mean \pm SD)

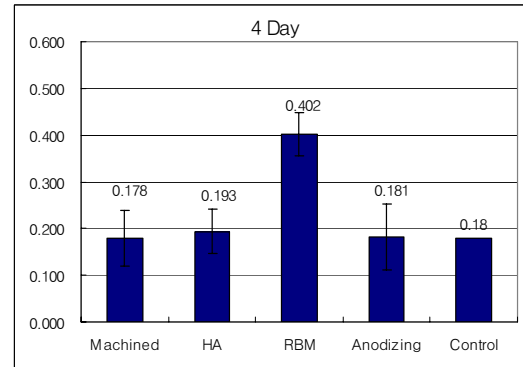


Figure 10. Alkaline phosphatase assay at 4day (Mean \pm SD)

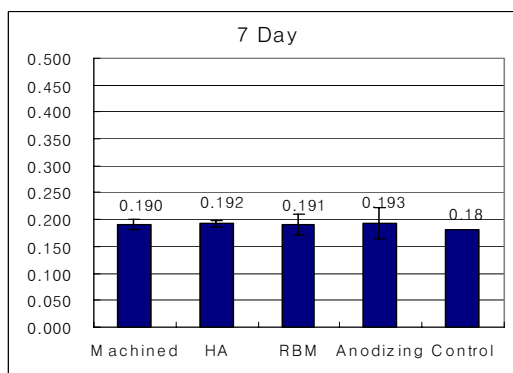


Figure 11. Alkaline phosphatase assay at 7day (Mean \pm SD)

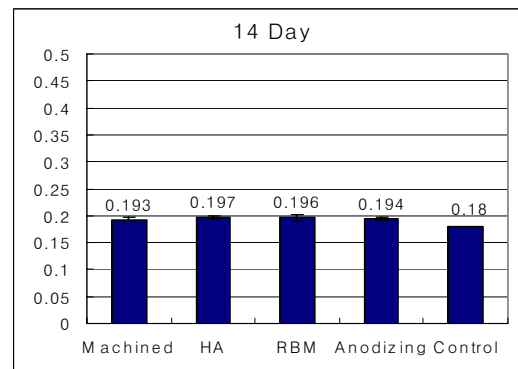


Figure 12. Alkaline phosphatase assay at 14day (Mean \pm SD)

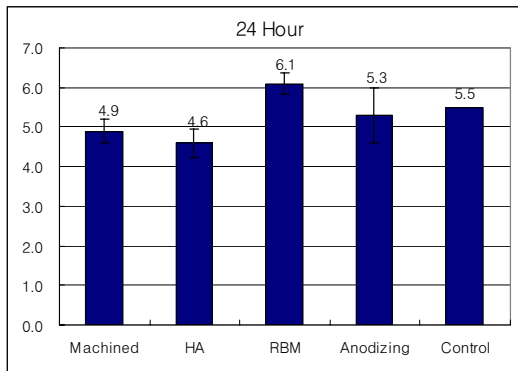


Figure 13. Relative calcium deposition assay at 24hour

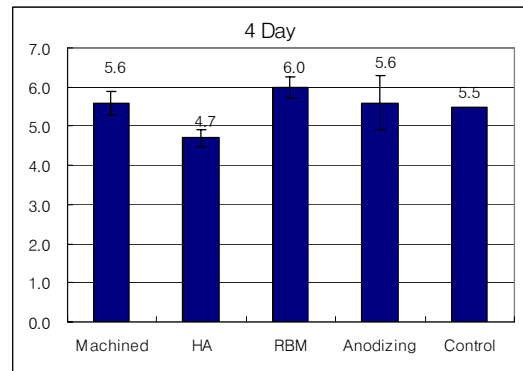


Figure 14. Relative calcium deposition assay at 4day

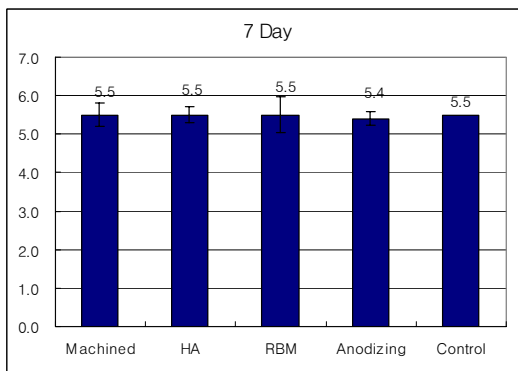


Figure 15. Relative calcium deposition assay at 7day

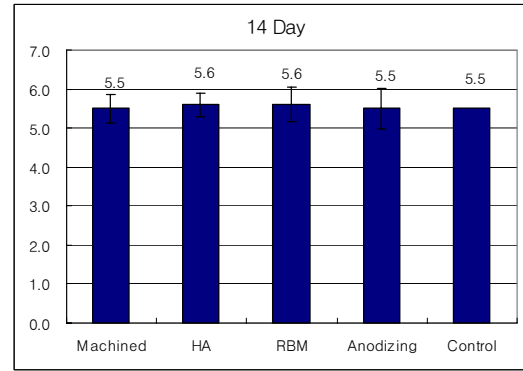


Figure 16. Relative calcium deposition at 14day

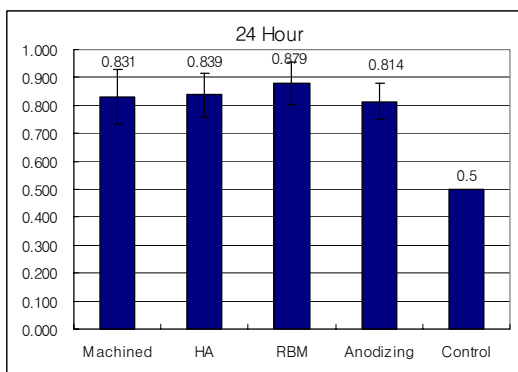


Figure 17. Relative phosphate deposition assay at 24hour

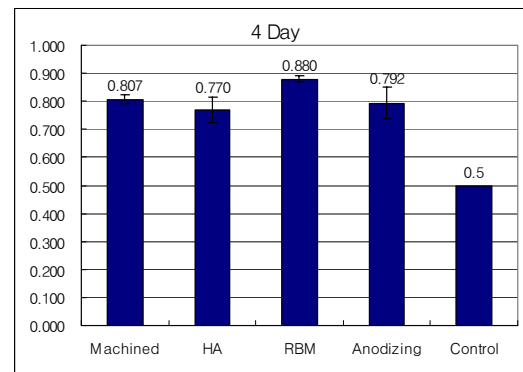


Figure 18. Relative phosphate deposition assay at 4day

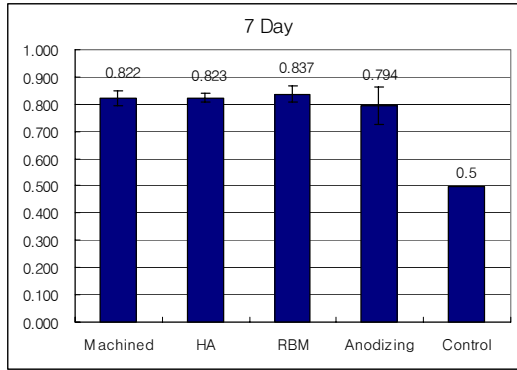


Figure 19. Relative phosphate deposition assay at 7day

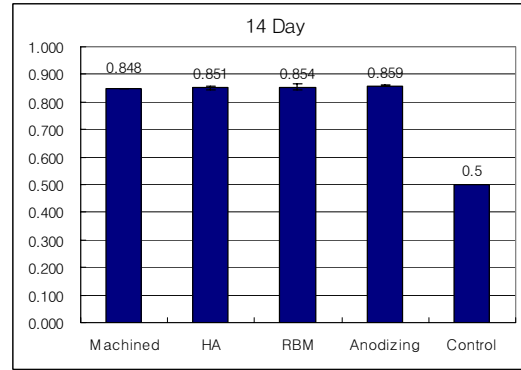


Figure 20. Relative phosphate deposition assay at 14day

2. Alkaline phosphatase, calcium, inorganic phosphate의 농도 측정

1) Alkaline phosphatase 농도 측정

ALP 분석에서는 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 1일과 4일 배양한 결과 ALP의 농도가 다른 재료에 비해 통계학적으로 의미있는 증가가 발생하였다(Table 1, 2, Fig. 9, 10). 그 후에는 ALP의 농도가 모든 군에서 유사하게 나타났다(Table 3, 4, Fig. 11, 12).

2) Calcium 농도 측정

칼슘 분석에서는 1일과 4일 배양한 결과, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 칼슘 농도가 통계학적으로 의미있게 낮은 수치를 나타내었다(Table 5, 6). 이는 역으로 칼슘의 침착이 보다 높게 일어난 것을 의미하며 이를 10을 기준으로 그래프로 표시하였다(Fig. 13, 14). 7일과 14일에는 모든 재료에서 비슷한 칼슘 농도를 보이며 통계학적으로도 차이가 없었다(Table 7, 8, Fig. 15, 16).

1일에 기계가공처리한 군과 수산화인회석 피복한 군에서 칼슘 농도가 배양액의 원래 칼슘 농도보다 증가하였고, 7일과 14일에서는 칼슘 농도가 원래 배양액의 농도와 비슷한 수치를 보였다.

3) Inorganic phosphate의 농도 측정

인의 농도도 칼슘의 농도와 마찬가지로 1일과 4일에 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 통계학적으로 의미있는 낮은 수치를 나타내었다(Table 9, 10). 이는 상대적으로 인의 침착이 더 많이 발생한 것을 의미하며 이 자료

를 1을 기준으로 환산하여 그래프로 표시하였다(Fig. 17, 18). 그 후에는 인의 농도가 각 실험군의 배양액에서 비슷한 농도를 보였다(Table 11, 12, Fig. 19, 20). 전체적으로는 실험한 모든 군에서 원래 세포배양액의 인의 농도보다 낮은 수치를 보였다.

고찰

임플란트의 성공은 사용되는 생체재료와 조골세포 사이에 능률적이고 안정적인 상호작용에 달려있다. 이에 대한 가장 중요한 요소로써 임플란트에 세포 부착과 임플란트 표면에 침전된 세포외기질의 질이 조직 유합을 결정한다. 이러한 골유착은 골조직의 상태 및 임플란트의 종류, 표면 성상, 표면 거칠기와 수술 방법의 변화 등 주어진 환경에 따라 매우 다양한 결과로 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²²⁾. 그 중 표면 거칠기는 직접적으로 조골 세포의 부착, 증식, 분화에 영향을 줄 수 있고, 골유착 과정을 조절할 수 있다고 하였다. 따라서, 표면 형태는 초기 세포 활성을 결정하는 단백질 침착을 조절하여 세포 반응을 변화시킬 수 있어, 골유착 과정에 가장 큰 영향을 미치는 중요한 요소로 생각되었다¹⁸⁻²²⁾.

본 연구에서는 기계가공처리, 수산화인회석의 피복처리, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리, 및 표면의 양극산화처리를 시행한 티타늄 매식체에 대한 조골세포배양에 관해 연구하였다.

배양 1일에서 세포가 안착한 비율은 네 가지 실험군 중 양극산화 처리한 표면에서 가장 높았으며 그 다음으로 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면이 우세했고, 기

기계가공처리한 표면에서 가장 적은 세포의 부착이 일어났다. 이는 표면의 거칠기와 표면처리에 따라 세포의 초기 부착이 서로 다르다는 것을 알 수 있었다. 수산화인회석 피복한 표면의 경우는 다른 표면처리군보다는 초기 부착률이 다소 떨어지지만(Fig. 1, 5), 기계가공 표면처리군보다 의미있는 초기 세포 부착률을 보이는 것은 특별한 작용에 의해서라기보다는 표면의 거칠기가 세포의 부착에 대한 용이성을 제공하는 것으로 보였다. 본 연구에서 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리 군에서 초기 세포부착의 비율이 높은 것은 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리로 인하여 미세표면 거칠기를 형성함은 물론, 표면에 잔존되는 파괴물질로 인하여 극미세표면을 형성함으로써 이루어진 결과라고 사료되며 이러한 사실은 2007년 Ma 등의 연구에서 미세표면 거칠기보다는 극미세표면 거칠기가 보다 더 좋은 세포 적합성을 보인다는 연구와도 일맥상통한다. 양극산화 처리는 매식체 표면에 산화피막을 형성함으로써 표면에너지가 증가하게 되고 이에 따라 세포막의 단백질이나 세포로부터 형성되는 glycosaminoglycan 같은 물질이 쉽게 부착함으로써 세포의 부착을 용이하게 한다고 보고되었는데, 본 연구에서도 이러한 표면에너지 증가와 함께 산화피막을 형성할 때에 야기되는 표면의 거칠기도 세포 부착에 기여하는 것으로 사료되었다.

배양 4일에는 부착된 세포가 증식하는데 기계가공한 표면에서도 계속되는 증식이 일어나지만 수산화인회석 피복한 표면에서의 세포 증식 정도가 더 큰 것을 알 수 있으며 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면과 양극산화 처리한 표면에서는 의미있는 세포의 증식은 나타나지 않았는데 이는 세포의 밀도가 초기에 한계점에 이룸으로써 상호간에 접촉억제(contact inhibition) 작용으로 인하여 상대적으로 증식의 소강상태를 초래한 것으로 사료되었다.

배양 7일에 기계가공한 표면과 수산화인회석 피복한 표면에서 1일에 비해 세포가 증식되었음을 보이지만(Fig. 3, 7), 흡수성 물질에 의한 미세표면 파괴처리한 표면과 양극산화 처리한 표면에서보다는 적은 수를 유지하였는데 이는 초기의 세포부착에 미치는 세포 표면의 요소가 세포의 증식 능력에도 영향을 미친다는 Ma 등의 연구 결과를 반영하는 것으로 사료되었다. 특이한 점은 수산화인회석 피복한 표면에서 14일째에 세포 수가 감소되는 소견을 보이는데 통계학적으로 매우 큰 표준편차($SD=51.11$)를 나타냄으로써 통계학적으로 유의성은 없었으나 추가적 연구가 필요할 것이라고 사료되었다(Fig. 4).

이번 연구에서 각 표면 성질에 따른 초기 골모 세포 부착률을 조사하면서 시편의 배양액을 수거하여 alkaline phosphatase(ALP), calcium, inorganic phosphate 농도를 분석하여 세포의 활성도를 조사하고자 하였다.

조골세포의 초기분화단계에서 collagen type I 이 최대 발현되고 기질 성숙단계에서 염기성 인산분해효소(ALP)가 최대 발현되는데, ALP는 조골세포의 성숙도를 나타내는 지표로 이용된다. 본 연구에서, ALP 분석에서는 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 1일과 4일 배양한 결과 염기성 인산분해효소의 농도가 다른 재료에 비해 상당히 증가하였는데, 이러한 결과는 Kim 등과 Zapata 등이 생분해 물질은 매식체 표면에 존재할 때 세포의 성장능력의 증대와 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시킴으로써 골형성능을 증가시킨다고 보고한 것과 일치하였다. 이와 같이 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 매식체 표면에서 짧은 기간 동안 잔여 물질의 생분해가 이루어짐으로써 조골세포의 분화 초기에 활성화되는 염기성 인산분해효소가 증가한 것이라고 사료되었다. 이는 미세 표면파괴처리한 군에서 조골세포의 활동성이 배양 초기에 증가하였음을 의미한다. 그 후에는 ALP의 농도가 모든 군에서 유사하게 나타났는데 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 7일과 14일 간의 배양에는 효과를 발휘하지 못하는 것으로 보인다. 이것은 칼슘-인의 blast material이 초기(1~4일)에 분해되어 조골세포에 더 이상 영향을 미치지 않음으로써 ALP의 농도에 효과가 없었을 것으로 사료되었다.

칼슘 분석에서는 1일과 4일 배양한 결과 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 칼슘 농도가 낮게 나타났다. 이것은 media의 칼슘을 더 많이 이용하는 것으로 생각되며 이는 ALP의 농도와도 연관성이 있다고 사료되었다. 즉 조골세포 활성 결과 조골세포 주위에 무기질을 침착하는데 이용하는 것으로 생각되었다. 이를 사용한 양을 역으로 추산하여 칼슘의 침착된 양을 비례적으로 표현하였다(Fig. 13, 14). 7일과 14일에는 모든 재료에서 비슷한 칼슘 농도를 보이며 통계학적으로도 차이가 없었다. 1일에서 media의 원래 칼슘 농도보다 증가한 군은 기계가공처리한 군과 수산화인회석 피복한 군이었는데 이는 세포 내의 칼슘이 조골세포의 물리적인 처리 과정에서 손상된 세포와 부착되지 못해 사망한 세포로부터 유리된 것으로 여겨지며 7일과 14일에서는 농도가 원래 media의 농도와 비슷한 수치를 보임으로써 세포들의 활동성이 모든 재료에서 비슷하게 평형상태를 유

지하는 것으로 사료되었다.

인의 농도도 칼슘의 농도와 마찬가지로 1일과 4일에서 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 군에서 낮은 수치를 보였는데, 이 역시 조골세포의 초기 활성을 의미한다고 사료된다. 이를 사용한 양을 역으로 추산하여 인의 침착된 양을 비례적으로 표현하였다(Fig. 17, 18). 그 후에는 인의 농도가 각 재료의 media에서 비슷한 농도를 보임으로써 세포의 활성이 비슷해진 것으로 생각되며, 원래 세포배양액의 인의 농도보다 모든 군에서 인의 농도가 낮은 수치를 보이는 것은 세포 대사 및 구성 물질로 인이 다량 사용된 것으로 보였다.

여러 표면처리 방법에 의해 형성된 매식체 표면에서 조골세포를 배양한 결과, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면이 조골세포의 기능을 증가시키는 작용이 있으며 이러한 작용은 초기에 나타난다는 것을 알 수 있었다.

임플란트의 표면 특성이 골유착 과정에 가장 큰 영향을 미치는 중요한 요소이다. 표면 특성은 조골세포의 증식과 분화, 그리고 골 형성에 관여하는 국소인자들의 생산에 영향을 주며, 골 반응을 조절한다. 이에 기계가공처리, 수산화인회석의 피복처리, 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리 및 표면의 양극산화 처리를 시행한 티타늄 매식체에 대한 조골세포 배양에 관해 연구하여 매식체의 표면처리 방법이 세포의 안착과 증식 그리고 활성도에 커다란 영향을 줌을 확인하였다. 흡수성 물질에 의한 미세 표면파괴처리한 표면이 임상적으로 우수한 표면처리 방법이라고 생각되며 임상 적용 시 유리하다고 생각된다.

참고문헌

1. Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 1996;81:343-361.
2. Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomolecular Engineering* 2002;19:243-249.
3. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials* 2003;24:3893-3907.
4. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17 (Supl.) 1995;77-83.
5. Albrektsson T, Bränemark PI, Hansson HA and Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-170.
6. Jaffin RA and Berman CL. The excessive loss of figure fixtures in type IV bone : a 5-year analysis. *J Periodontol* 1991;62:2-4.
7. Jemt T. Implant treatment in resorbed edentulous upper jaw. A three-year follow-up study in 70 patients. *Clin Oral Impl Res* 1993;4:187-194.
8. Jemt T, Chai J, Harnett J et al. A 5-year prospective multi-center follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:291-298.
9. Wennerberg A. The importance of surface roughness for implant incorporation. *International Journal of Machine Tools and Manufacturing* 1998;38:657-662.
10. Testori T, Wiseman L, Woolfe S, Porter SS. A prospective multicenter clinical study of the osseotite implant: four-year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:193-200.
11. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast response in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7(3):302-310.
12. Lohmann CH, Sagun R Jr, Sylvia VL et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)2D3 through regulation of phospholipase A2 activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res* 1999;47:139-151.
13. Ericsson I, Johansson CB, Bystedt H, Norton MR. 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;5:202-206.
14. Larsson C, Thomsen P, Lausmaa J et al. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials* 1994;15:1062-1074.
15. Schneider G, Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Experimental Cell Research* 1994;214:264-269.
16. Stanford CM, Keller JC, Solursh M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *Journal of Dental Research* 1994;73:1061-1071.

17. Stanford CM, Brand RA. Toward an understanding of implant occlusion and strain adaptive bone modeling and remodeling. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1999;81:553-561.
18. Bränemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue integrated prosthesis. Osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence Publishing Co. Inc. 1985.
19. Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of hydroxyapatite coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6:399-404.
20. Gottlander M, Albrektsson T. A Histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite coated and titanium coated implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:485-490.
21. Denissen HW, Kalk W, Nieuport HM, Maltha JC, Hoofe A. Mandibular bone response to plasma-sprayed coatings of hydroxyapatite. *Int J Prosthodont* 1990;3:53-58.
22. Oonishi H, Yamamoto M, Ishimura H et al. The Effect of Hydroxyapatite coating on Bone Growth into porous titanium alloy implants. *J Bone Joint Surg* 1989;71:213-216.
23. Hulshoff JEG, Hayakawa T, van Dijk K et al. Mechanical and histological evaluation of Ca-P plasma-spray and magnetron sputter-coated implants in trabecular bone of the goats. *J Biomed Mater Res* 1997;36:75-83.
24. Cheng Yang, Wuhan. The effect of calcium phosphate implant coating on osteoconduction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:606-609.
25. Schroeder A, Pohler O, Sutter F. Gewebereaktion auf ein Titan-Hohlzylinder-derim-plat mit Titan-Spritzschichtoberfläche. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1976;86:713-727.
26. Babbush CA, Kent JN, Misiek DJ. Titanium plasma-sprayed(TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 1986;44:274-282.
27. Chang YL, Lew D, Park JB, Keller JC. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *J Oral Maxillofac Surgery* 1999;57:1096-1108.
28. Vercaigne S, Wolke JGC, Naert I, Jansen JA. A histological evaluation of TiO₂ grit blasted and Ca-P magnetron sputtered coated implants placed in the trabecular bone of the goat: part 2. *Clinical Oral Implants Research* 2000;11:314-324.
29. Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports* 2001;42:75-205.
30. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behavior on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering and Physics* 2001;23:329-346.

