



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2011년

2011년 8월
박사학위논문

8월

박사학위논문

티타늄 표면의 반응기가 조골모세포 증식에 미치는 영향

티타늄 표면의 반응기가 조골모세포 증식에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치 의 학 과

권 순 성

권 순 성

티타늄 표면의 반응기가 조골모세포 증식에 미치는 영향

Effect on functional group of titanium surface for
proliferation of osteoblast like cell

2011년 8월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

권 순 성

티타늄 표면의 반응기가 조골모세포
증식에 미치는 영향

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2011년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

권 순 성

권순성의 박사학위 논문을 인준함

위원장 경희대학교 교수 김 은 철 인

위 원 단국대학교 교수 김 해 원 인

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 인

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 인

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 인

2011년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	v
제 1장 서 론	1
제 2장 연구배경	2
제 3장 실험재료 및 방법	5
제 1절 티타늄 시편	5
제 2절 플라즈마 중합반응	5
제 3절 표면분석	9
제 4절 생물학적 평가	10
제 4장 실험결과	12
제 1절 표면분석	12
제 2절 조골모세포 증식	20
제 5장 고찰	22
제 6장 결론	24
참 고 문 헌	25

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Comparison of conventional polymer and plasma polymerized polymer.	4
Fig. 2. Schematic diagram of RF plasma deposition system.	7
Fig. 3. Schematic diagram of the experimental process.	8
Fig. 4. The morphology of plasma polymerized titanium surface observed FE-SEM; (A) Untreated Ti surface, (B) PAA polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAM polymeric layer coated Ti surface, (D) PAAa polymeric layer coated Ti surface.	14
Fig. 5. The cross-sectional coating layers of plasma polymerized titanium surface observed FE-SEM; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAM polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAa polymeric layer coated Ti surface.	15
Fig. 6. ATR-FTIR spectrum of plasma polymerized titanium surface; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAa polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAM polymeric layer coated Ti surface.	16
Fig. 7. XPS spectrum of plasma polymerized titanium surface; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAa polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAM polymeric layer coated Ti surface.	17

Fig. 8. Surface concentration of (a) COOH, (b) NH₂ group versus Plasma RF powers. 18

Fig. 9. Contact angle values of water droplets measured on the different modified Ti surface. 19

Fig. 10. MC3T3-E1 cell proliferation seeded on the different modified Ti surface for 1 day, 2 days and 4 days. 21

LIST OF TABLES

Table. 1. Monomers used plasma polymerization and polymeric thin layers polymerized on titanium surface	6
Table. 2. The conditions of plasma polymerization process	6

ABSTRACT

Effect on functional group of titanium surface for proliferation of osteoblast like cell

Sun Sung Kwon, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, Ph.D., DDS

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Titanium (Ti) have been widely used as biomaterials due to electrical and thermal conductivity and mechanical properties. To improve the biocompatibility, several surface treatment methods were suggested. Among the surface treatment, plasma surface modification can be used to improve the surface properties of commercial pure titanium. The purpose of this study was to investigate of optimum conditions of plasma polymerization process and evaluate the proliferation of osteoblast like cell (MC3T3-E1). Titanium surface modification was carried out by depositing an thin polymeric layer containing carboxyl, amine and hydroxyl groups through plasma polymerization using an acrylic acid (AA), allyl amine and allyl alcohol monomer. The chemical structure and morphology of polymeric thin films were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), fourier transform infrared (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). Hydrophilic property was measured by contact angle. The content of carboxyl and amine group were measured by TBO and MO

assay. The plasma polymerized polymeric thin films were identified by FTIR and XPS. Surface modified Ti surface showed good proliferation of MC3T3-E1 than that of untreated Ti surface.

제 1 장 서 론

티타늄(Ti)금속은 우수한 기계적 특성, 내 부식성 및 생체친화성 때문에 치과 및 정형외과 임플란트 재료로 널리 이용되어져 왔다.¹⁻⁴⁾ 티타늄 임플란트의 골 융합은 임플란트 표면과 직접 접촉하는 임플란트 주변의 새로운 골 형성에 의해서 발생하는 생물학적 과정으로 알려져 있다.^{5,6)} 일반적으로, 이 과정은 골 유도라고 볼 수 있으며, 수많은 실험연구결과는 표면처리는 골/임플란트 융합반응을 향상시킬 수 있다고 보고하였다⁷⁾. 또한 생체재료 표면에 물리적 또는 화학적인 특성을 변화시킴으로써 생체적합성이 우수하도록 특별한 기능을 부여하는 연구가 활발히 진행되어 왔다^{8,9)}. 치과용 임플란트 시술 실패의 일부는 임플란트 표면특성과 관련이 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 그러므로 적절한 임플란트 표면처리는 성공적인 치과용 임플란트 시스템에서 중요한 역할을 한다.

또한 하이드록시아파타이트 코팅과 같은 표면처리는 임플란트 표면에 접촉하는 골 생성 증가, 가속된다는 것과 연관성이 있다고 보고되었다¹⁵⁾. 이러한 효과의 일부분은 표면에너지의 증가와 제타포텐셜의 변화, 그리고 접촉각의 변화로 설명 할 수 있다. 이러한 사실 때문에 단백질이 재료표면에 부착 시 초기 퍼짐의 증대와 세포유도의 증진이 발생한 것으로 추측 된다. 게다가 이러한 물리적, 화학적 효과, 시그널전달에 바탕을 둔 세포적 반응은 생체재료 표면에 세포의 장기간부착, 단기간부착에 관여하고 있음을 보여주었다¹⁶⁾.

이러한 표면처리기술 중에서 플라즈마를 이용한 표면개질기술은 세포의 분화 및 부착을 증진시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술이므로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다¹⁷⁻²¹⁾. 특히 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 재료표면에 존재하면서 세포의 초기부착 향상, 생체활성물질 및 단백질과 공유결합에 의한 고정화에 매우 유용한 기술로 응용된다.

따라서 본 연구에서는 플라즈마 표면처리법을 이용하여 티타늄표면에 다양한 반응기를 함유한 고분자 박막을 코팅하고, 표면에 존재하는 반응기가 조골모 세포(MC3T3-E1)의 증식에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

제 2 장 연구배경

플라즈마 표면처리는 생체적합성과 재료의 기계적, 화학적 성질을 향상시킬 수 있다. 일반적으로 플라즈마 기체는 압력과 방전 사이의 두께에 의존한 방전 전위와 기체를 통한 potential 인가에 의해 방전이 된다. 많은 저압 플라즈마 소스인 DC, RF 방전, ECR 플라즈마 소스는 전위 전기장이 낮고 전류를 더욱 더 잘 제어할 수 있는 저압에서 플라즈마 방전을 일으킬 수 있다. 이러한 플라즈마 소스는 적절한 제어로 넓은 영역의 균일한 전자 밀도를 가진 플라즈마를 발생시킬 수 있다. 코로나 방전, 아크 플라즈마와 같은 다른 플라즈마는 생체의료 산업에 많이 이용되고 있다^{22,23}).

RF 방전은 넓은 부피의 균일한 플라즈마를 형성할 수 있기 때문에 플라즈마 표면 개질소스로 넓게 사용하는 것 중에 하나이다. RF 방전은 전기적 부하를 가진 RF power 결합 장치에 따라 Capacitive 결합 장치와 Inductive 결합 장치로 나눌 수 있다. 그 밖에 발생원으로 electron cyclotron resonance (ECR), 코로나 방전, 상압아크, 진공아크, 및 레이저 플라즈마가 있다.

플라즈마 표면처리 기술에는 플라즈마 스퍼터링과 에칭, 플라즈마 이온주입 법과 플라즈마 deposition, 플라즈마 중합, 그리고 플라즈마-그래프팅 상호-중합 등과 같은 것이 있다.

플라즈마 중합(plasma polymerization, plasma enhanced chemical vapor deposition)은 유기 및 유기 금속의 가스 상태 모노머들이 플라즈마 방전 상태에서 기재 표면에 가교밀도가 매우 높은 박막이나 분말형태로 합성(증착)되는 것을 말한다. 탄소, 황, 실리콘 등과 같은 사슬을 형성시키는 원자들을 포함하는 화학물질의 모노머 존재 하에서 발생한다. 플라즈마 상태에 투입되는 모노머 분자들은 대부분의 경우 플라즈마 에너지에 의해 활성화 입자들로 부서져 투입 모노머의 부분적인 화학적 구조만 보존되고 가교화되고 불규칙적인 구조를 가지게 된다 (Fig. 1. 참조). 합성물질의 구조 및 성질은 압력, 가스 투입량, 가스의 종류, 전압, 전압 bias 등의 플라즈마 공정 인자에 의해서 정밀하게 조절될 수 있는데 이런 성질을 이용하여 두께 방향에 대하

여 물성을 점차적으로 변화하는 구배층 구조를 제조할 수 있다. 플라즈마 중합은 수십여년 전에 소개된 이후 재료공학의 중요한 부분이 되어 왔다. 화학분야(특히, 고분자의 플라즈마 화학)의 경계를 넘어 물리학분야(플라즈마 물리, 박막 및 표면 물리, 진공물리)를 포함하고 있으며, 응용분야로 광학, 전자, 재료 개질 등의 응용분야를 포함하고 있다. 플라즈마 중합은 플라즈마 화학의 한 타입이며 플라즈마 종들 간의 반응이다. 자유라디칼 중합의 관점에서 플라즈마 중합을 본다면 “plasma-induced polymerization” 또는 “plasma-state polymerization”으로 정의 될 수 있다. 전자는 불포화된 탄소-탄소 결합을 포함하는 전통적인 자유라디칼 유도 결합을 의미한다. 후자에서는 플라즈마 중합으로 이끄는 주요공정은 분자의 결합을 깨기에 충분한 에너지를 갖는 전자나 다른 플라즈마 종들의 존재에 의존한다. 중합공정 인자나 장비의 구조들에 따라서 만들어지는 막의 성질에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다. 플라즈마 중합에 의해 형성된 필름들은 통상적으로 복합재료에 사용되는 섬유의 표면개질을 할 경우처럼 재료의 전체 특성은 변화시키지 않고 표면 성질만을 개질 할 수 있다는 장점이 있으며, 일반적으로 플라즈마 합성에 의한 응용분야는 다음과 같은 특성들을 갖는다.

플라즈마 중합의 장점은 다음과 같다.

- 1) 플라즈마 중합에 의해 500Å-1000Å 정도의 필름 두께를 형성한다.
- 2) 유리나 금속 등의 기재와의 접착력이 매우 우수하다.
- 3) 플라즈마 중합에 의해 생성된 필름 코팅은 핀홀이 없고 가교도가 높다.
- 4) 다층필름이나 정밀하게 물리적, 화학적 특성의 구배를 갖는 필름제조가 가능하다.
- 5) 플라즈마 폴리머는 보다 높은 탄성율을 보이고 뚜렷한 유리전이온도를 보이지 않는 경우가 많다.

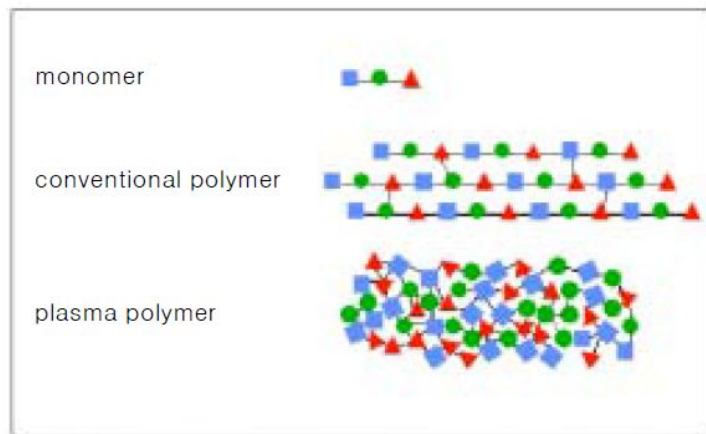


Fig. 1. Comparison of conventional polymer and plasma polymerized polymer

제 3 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 티타늄 시편

본 연구에서는 상업적으로 사용되는 순수 티타늄 판 (NSC CP-Ti, grade 2, Japan)을 직경 20 mm, 두께 2 mm 디스크 형태로 가공하여 시료로 사용하였고, 기계적 연마는 #100, #600, #800, #1200 그리고 #2000 grit SiC 연마지로 단계적으로 습식 연마하였다. 연마한 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액에 1시간 동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하고 건조하여 다음 실험에 사용하기 전까지 데시케이터에 보관하였다.

제 2 절. 플라즈마 중합반응

Fig. 2는 플라즈마마트(UM1000134-001A Mini plasma station, PLASMART, Korea)에서 구입한 감압 RF플라즈마 증착장비의 구성도를 나타내었다. Fig. 3은 플라즈마 중합반응을 이용한 고분자박막 증착실험 공정도를 나타내었다. 고분자박막을 증착하기위한 단량체는 아크릴산(Acrylic acid; 98% Sigma-Aldrich, USA), 아릴아민(Allyl amine; 98% Sigma-Aldrich, USA) 그리고 아릴알콜(Allyl alcohol; Junsei chemical Co., Ltd, Japan)를 사용하였고, Table 1.에 정리하여 나타내었다. 시료표면의 클리닝이나 활성화를 부여하기 위한 시료표면의 전처리는 산소(O₂)가스를 유속 50sccm, 플라즈마 방전세기는 150W 로 200sec 동안 시행하였다. 플라즈마중합반응은 각각의 단량체를 3.2sccm 유속으로 플라즈마 반응기 안에 도입하고 30, 50, 70W에서 5분간 반응시킨 후 3차 증류수로 세척한 후 진공오븐에서 건조 시켰다. 플라즈마중합 반응조건을 Table. 2에 정리하여 나타내었다.

Table 1. Monomers used plasma polymerization and polymeric thin layers polymerized on titanium surface

Monomers	Polymeric thin layers
Acrylic acid	Poly acrylic acid (PAA)
Allyl amine	Poly allyl amine (PAAm)
Allyl alcohol	Poly allyl alcohol (PAAa)

Table 2. The conditions of plasma polymerization reaction.

Process factors	Reaction conditions
Discharge power	30W - 70W
System pressure	100mtorr
Deposition time	3 min

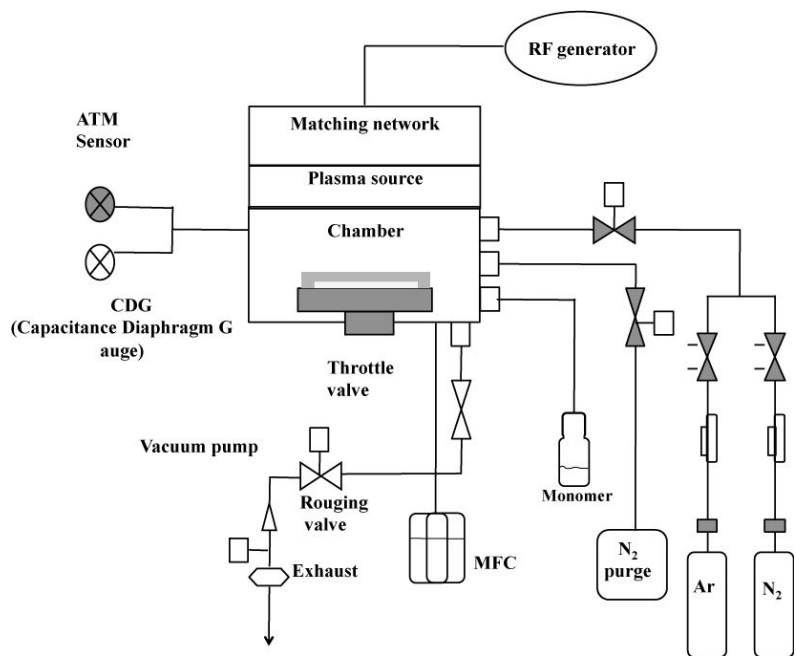


Fig. 2. Schematic diagram of RF plasma deposition system.

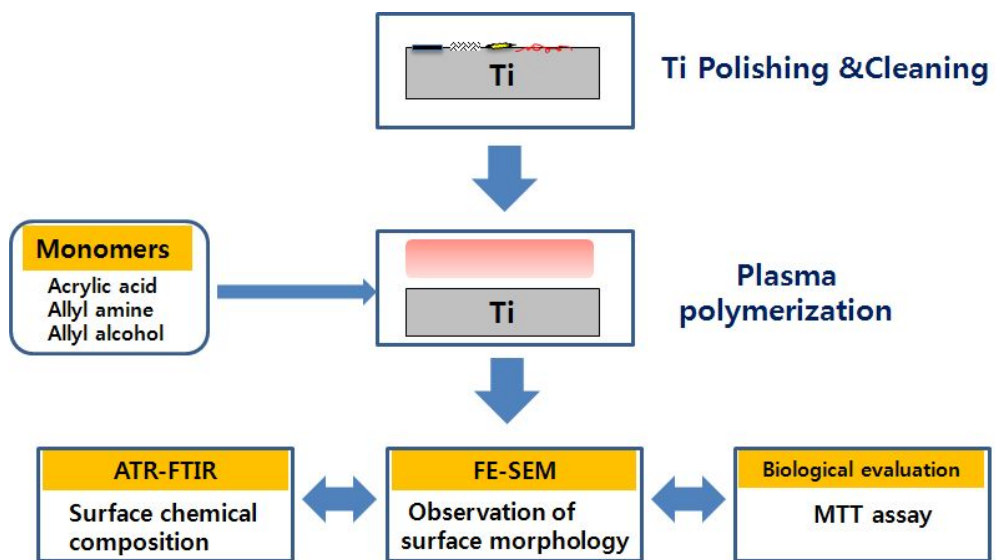


Fig. 3. Schematic diagram of the experimental process.

제 3 절. 표면분석

고분자 박막 표면의 형상 및 단면을 관찰하기 위하여 전계방출주사전자현미경 (FE-SEM; S-4800, Hitachi, Japan)을 사용하여 가속전압 5-25 kV의 조건으로 관찰하였다.

표면의 화학결합상태는 전반사 푸리에 변환 적외선분광기(ATR-FTIR; IFS66V/S & HYPERION 3000, Bruker Optiks, Germany)를 이용하여 분석하였다.

표면의 구성원소 및 화학적 결합상태 그리고 에너지준위는 X-선 광전자 분광법(XPS; MULTILAB 2000 SYSTEM, SSK, USA)을 이용하여 분석하였다. 표면 젖음성을 관찰하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 접촉각의 변화를 관찰하기 위하여 증류수 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정장치 (contact angle measurement; GSX, Surfactech, Korea)를 이용하여 5초 후에 관찰하였다.

시료표면에 존재하는 카르복실기와 아민기는 다음과 같은 방법으로 정량분석 하였다.

카르복실기 정량분석

- 1) Toluidine Blue O (0.5 mM, pH 10)의 용액에 티타늄 시료를 침지하여 30 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 Toluidine Blue O 염료와 카르복실기를 반응시켰다.
- 2) Toluidine Blue O 염료와 카르복실산은 1:1로 반응한다.
- 3) Sodium hydroxide 용액 (pH 9)에서 30초간 50 rpm으로 세척을 한 후 Acetic acid 50% 수용액에서 12시간 동안 1000 rpm으로 Toluidine Blue O를 탈착시킨 다음 이 수용액을 620nm의 흡광도로부터 카르복실기를 정량하였다.

아민기 정량분석

- 1) Sodium dihydrogen phosphate (0.1 M)와 Methyl orange (0.05 %) 의 수용액에 시료를 침지시킨 후 1:1 로 상온에서 1시간동안 반응시켰다. (pH 4.7)
- 2) 염색된 시료를 3차 증류수로 여러번 세척 후 tissue paper 로 표면에 물은 수분을 제거한다.
- 3) 반응시킨 메틸 오렌지 (5 mL) 용액을 Potassium carbonate solution (0.1 mL) 용액에 탈착시켰다.
- 4) 탈착시킨 수용액을 465 nm 흡광도로 측정하였다.

제 4 절. 생물학적 평가

MC3T3-E1 세포배양

본 연구에 사용된 MC3T3-E1 조골모세포는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2594)에서 구입하였다. 세포 배양은 α -MEM(Alpha Minimum Essential Medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum(PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin(Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

MTT assay

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 파종하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 1일, 3일, 7일 동안 배양한 후 MTT를 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인한 후 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma)을 이용하여 용해하였다. 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200 µL씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(세포배양용기)에서 1일 동안 배양한 생세포수를 100%로 했을 때 실험군(무처리 티타늄표면, 표면처리 된 Ti 표면)에서 생존한 세포의 비율로 계산하였다.

제 4 장 실험결과

제 1 절. 표면분석

Fig. 4는 전계방출주사전자현미경을 이용하여 연마된 CP-Ti 표면과 50 W, 3분 동안 플라즈마 중합조건으로 고분자박막이 코팅된 표면을 관찰한 것이다. 코팅된 물질에 따른 큰 차이는 나타나지 않았지만 표면에 전체적으로 코팅됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 5는 고분자박막의 단면을 측정하기 위하여 Si 웨이퍼에 50 W, 3분 동안 플라즈마 중합조건으로 고분자박막을 형성한 후 절단한 단면을 관찰한 것이다. 카르복실기와 하이드록실기가 코팅된 표면은 43, 55 nm의 두께로 각각 코팅되었고 (Fig. 5 A, B), 아민기가 코팅이 된 표면의 경우 102 nm의 두께로 관찰되었다 (Fig. 5 B). 이러한 차이는 모노머로 쓰이는 아크릴산, 아릴아민 그리고 아릴알콜이 갖는 기화점의 인하여 발생하며, 특히 아릴아민의 경우 다른 모노머에 비하여 2배 정도 낮은 기화점을 가지고 있어 챔버 내에서 더 많은 양이 플라즈마에 의해 중합되는 것으로 사료된다.

Fig. 6은 전반사 푸리에 변환 적외선분광기를 이용하여 50 W, 3분 동안 플라즈마 중합조건으로 형성된 고분자박막의 표면의 화학적 결합상태를 관찰한 결과이다. 카르복실기의 경우 C-O 결합 피크인 1710 cm^{-1} , 하이드록실기의 경우에는 O-H 결합피크인 $1040\sim 1060\text{ cm}^{-1}$ 그리고 아민기의 경우 N-H 결합피크인 $1560\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 과 $3400\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 에서 각각 관찰할 수 있었다.

Fig. 7은 X-선 광전자 분광법을 이용하여 고분자박막표면의 화학적결합상태 및 표면의 구성원소를 관찰한 결과이다. 적외선분광기를 이용한 표면분석결과와 마찬가지로 카르복실기가 코팅된 표면에서는 탄소의 피크가 관찰되었고, 하이드록실이 코팅된 표면에서는 다른 표면에 비하여 높은 산소피크를 나타내었다. 그리고 아민이 코팅된 표면의 경우에는 다른 표면에서 나타나지 않은 질소의 피크가 높게 나타났다.

코팅조건에 따라 카르복실기와 아민기가 코팅된 표면의 정량분석을 한 결

과를 Fig. 8에 나타내었다. 카르복실기와 아민기 모두 플라즈마 파워가 증가함에 따라 단위면적당 몰량이 증가함을 관찰 할 수 있었고, 아민기의 경우 카르복실기에 비하여 50 W까지는 2배의 양을 나타내었다. 이는 Fig. 5에서와 보는 것과 같이 모노머의 영향으로 사료된다.

Fig. 9은 고분자박막표면의 접촉각을 각각 측정한 결과이다. 카르복실기가 코팅된 표면은 CP-Ti에 비하여 접촉각이 감소하는 것을 관찰 하였고, 이는 카르복실기가 친수성이라는 이론과 일치하며, 아민기가 코팅된 경우에는 접촉각이 CP-Ti에 비하여 증가하는 것으로 관찰되었다. 하이드록실기가 코팅된 표면의 경우에는 다른 조건들에 비하여 현저하게 낮은 접촉각을 나타내었고, 이는 하이드록실기가 초 친수성임을 갖는 확인할 수 있었다.

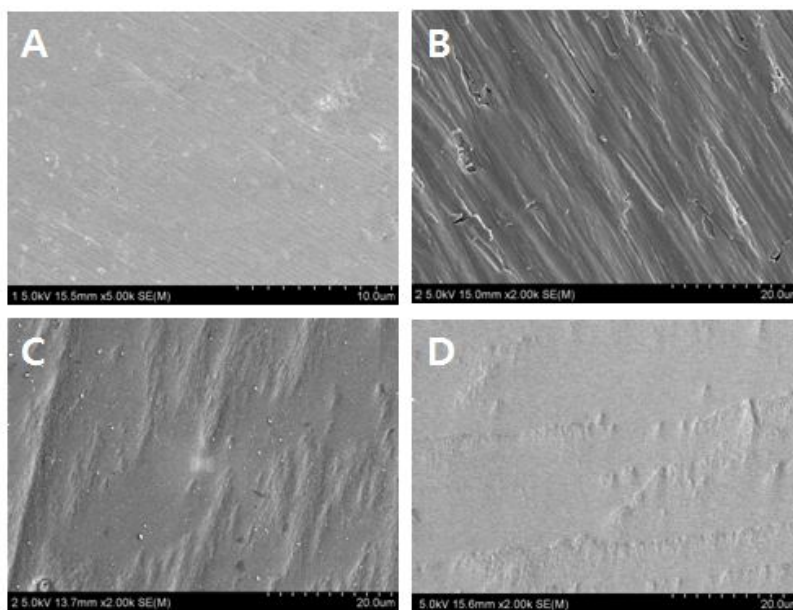


Fig. 4. The morphology of plasma polymerized titanium surface observed FE-SEM; (A) Untreated Ti surface, (B) PAA polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAm polymeric layer coated Ti surface, (D) PAAa polymeric layer coated Ti surface.

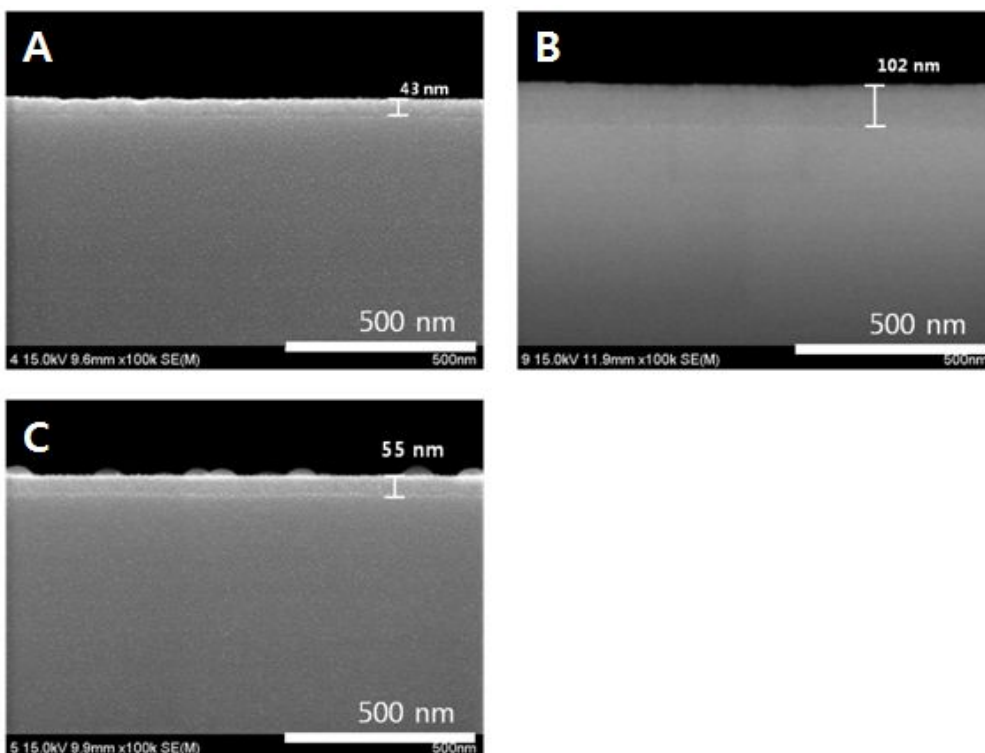


Fig. 5. The cross-sectional coating layers of plasma polymerized titanium surface observed FE-SEM; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAM polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAa polymeric layer coated Ti surface.

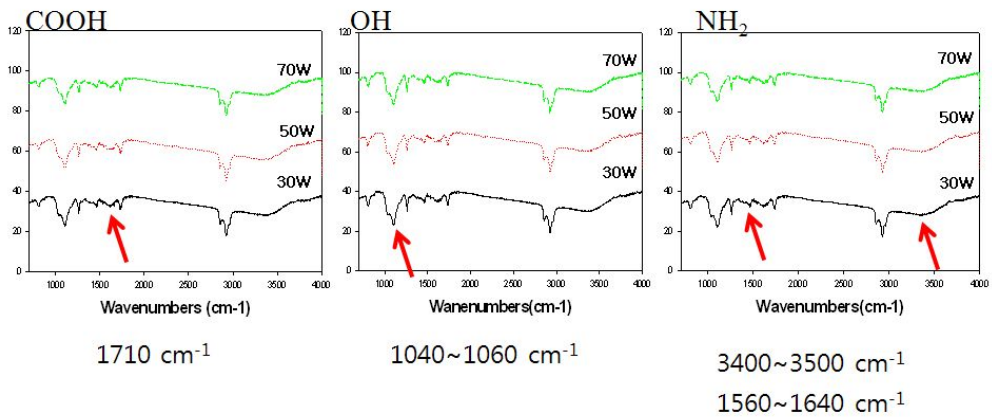


Fig. 6. ATR-FTIR spectrum of plasma polymerized titanium surface; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAa polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAM polymeric layer coated Ti surface.

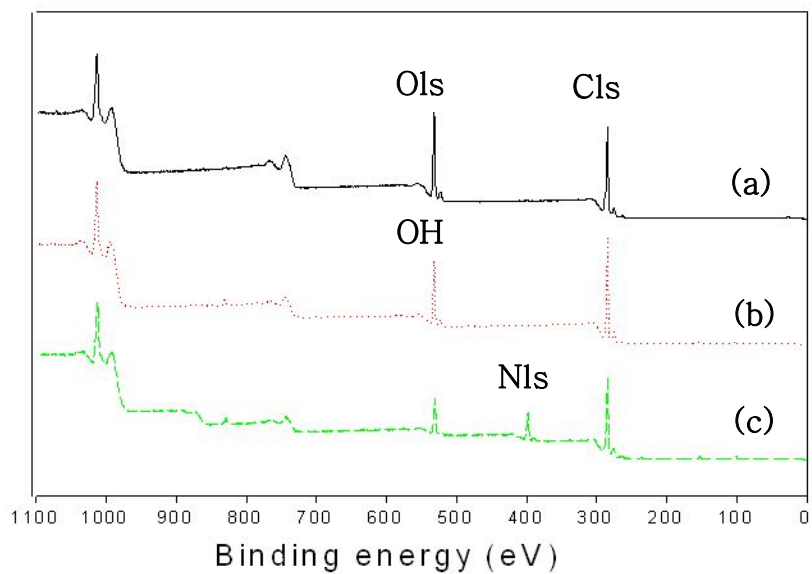
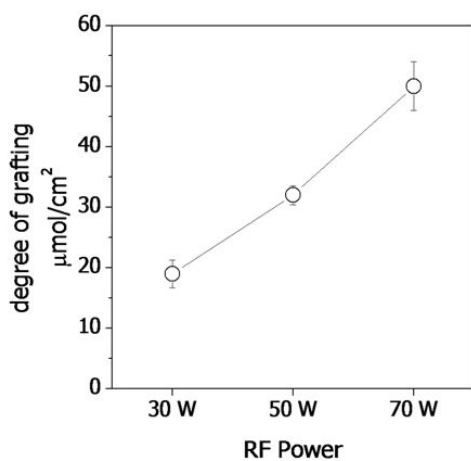


Fig. 7. XPS spectrum of plasma polymerized titanium surface; (A) PAA polymeric layer coated Ti surface, (B) PAAa polymeric layer coated Ti surface, (C) PAAm polymeric layer coated Ti surface.

(a) Acrylic Acid (AA) Toluidine blue O



(b) Allyl amine (AA) Methyl Orange

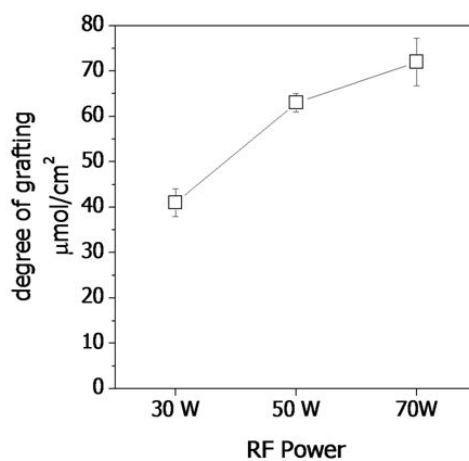


Fig. 8. Surface concentration of (a) COOH, (b) NH₂ group versus Plasma RF powers.

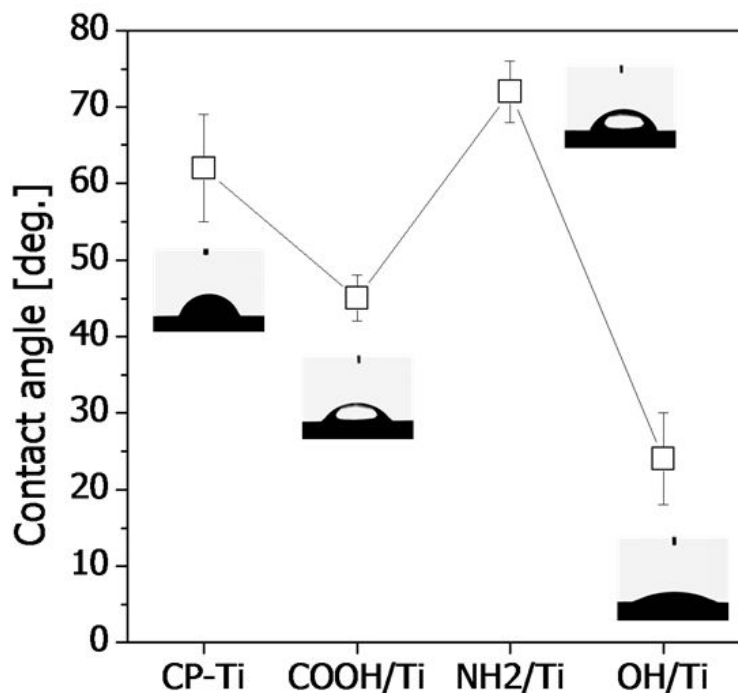


Fig. 9. Contact angle values of water droplets measured on the different modified Ti surface.

제 2 절. 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식

티타늄표면에 플라즈마 중합반응으로 증착된 고분자박막표면에 존재하는 반응기가 MC3T3-E1 세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. MTT분석법은 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 널리 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군은 무처리 Ti 표면을 사용하였고, 카르복실기, 아민기, 하이드록실기 표면을 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포생존율은 대조군과 실험군 모두 1일, 2일, 4일 동안 배양하였고, 생존율 (%)계산은 1일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군에 생세포수를 비율로 나타낸 것이다 (Fig. 10). 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포생존율이 증가함을 알 수 있었다. 1일 배양의 경우에는 아민기가 존재하는 표면이 생포증식에 가장 큰 영향을 미쳤으며, 하이드록실기 표면은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 2일째부터는 하이드록실기 표면도 대조군보다 높은 세포증식율을 보이기 시작하였다. 4일째가 되면서 대조군과 실험군의 세포증식률이 크게 차이가 나기 시작하였고, 카르복실기, 아민기, 하이드록실기 표면의 세포증식율은 거의 유사함을 알 수 있었다. 결론적으로 표면이 존재하는 아민기가 MC3T3-E1세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었다.

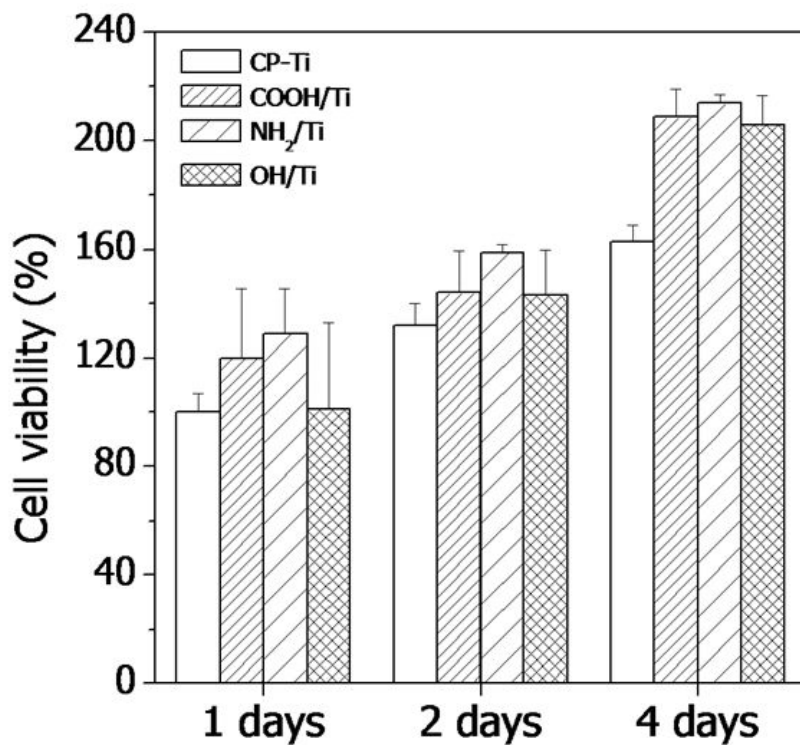


Fig. 10. MC3T3-E1 cell proliferation seeded on the different modified Ti surface for 1 day, 2 days and 4 days.

제 5 장 고 찰

플라즈마 중합은 인공 장기들의 생체적합성 향상에 응용될 수 있는데, 두 가지 측면으로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 생체적합성이 우수한 poly(ethylene oxide)나 헤파린 등을 그래프팅 할 수 있도록 화학적으로 반응성이 강한 박막을 코팅시키는 것으로서, 높은 밀도의 아민기를 포함하고 있는 플라즈마 고분자가 이 목적에 적합한 것으로 알려져 있다^{24,25}. 두 번째는 그 자체가 생체적합성이 좋은 박막을 코팅하는 것이다. 혈액성분들의 흡착은 피 흡착체의 표면에너지가 Baier's window로 알려진 20-30 mJ/m² 내에 있을 때 가장 약한 접착력을 가지며, 접착력이 약하면 흡착된 단백질들이 변성되기 전에 새로운 단백질들로 교체됨으로써 platelet의 성장이 둔화된다고 알려져 있다²⁶. 하지만 플라즈마 고분자의 생체적합성은 화학 조성보다는 잘 발달된 3차원 구조로 가교되어 있는 구조적 안정성에 기인하다는 견해도 있다²⁷. 플라즈마 중합은 또한 콘택트렌즈들의 표면 개질에 응용되고 있는데, 주로 눈물이 잘 적시도록 친수성 박막을 코팅하는 것이 일반적이다. 콘택트렌즈들의 표면을 친수성으로 개질하는 방법에는 여러 가지가 있으나, 플라즈마 중합을 이용하면 ageing 효과를 줄일 수 있다. 플라즈마 중합은 또한 소프트 렌즈의 소재인 실리콘 고무가 가지고 있는 문제점인 이물질의 흡착에 의한 오염을 방지하는데 효과적인 것으로 알려져 있다²⁸.

생체재료의 표면 젖음성은 세포부착 거동을 결정하는데 가장 중요한 요소 중에 하나이다. Tamada 등은 70° 정도의 접촉각을 갖는 고분자표면이 세포부착에 가장 적합하다고 하였으나, 이 표면은 상업적으로 이용 가능한 고분자를 사용하여 제조되었을 뿐, 표면의 거칠기, 전하 등의 요인들은 전혀 고려되지 않았던 상황이었다²⁹. Lee 등은 코로나방전으로 제조된 젖음성 표면을 갖는 폴리에틸렌표면에 대한 세포부착을 조사하였는데, 55° 접촉각에서 가장 세포부착이 우수한 것으로 나타났다³⁰. 본 연구에서는 RF 플라즈마 중합반응을 이용하여 티타늄표면에 -COOH, -NH₂, -OH를 갖는 고분자 박막을 성공적으로 코팅하였고, 카르복실그룹이 있는 표면은 약 45° 정도의 접촉각을 보여주었다. 하이드록실그룹 표면은 25° 정도의 접촉각을 보여준 반면에 아민

그룹 표면은 약 73° 부근의 접촉각을 보였다. 아민그룹 표면이 MC3T3-E1 조골모 세포주의 초기증식에 효과가 있는 이유로는 접촉각의 영향과 아민기가 세포외기질의 integrin과의 반응성 때문이라고 사료된다. 향후 다양한 반응기를 갖는 고분자박막을 코팅한 티타늄표면에서 조골모세포의 Focal adhesion의 경향을 조사하여 초기증식에 미치는 조골모 세포반응 메커니즘을 규명해 나가야 할 것으로 사료된다.

제 6 장 결 론

1. 티타늄표면에 플라즈마 표면개질법을 이용하여 다양한 반응기를 함유한 고분자박막이 코팅된 티타늄표면은 무처리 티타늄표면에 비하여 MC3T3-E1세포증식에 우수한 활성을 보여주었다.
2. 아민기가 코팅된 티타늄박막은 다른 반응기가 코팅된 티타늄표면에 비하여 초기 세포증식에 우수한 활성을 보였으나, 배양시간이 증가할수록 활성의 차이가 유사해짐을 알 수 있었다.

플라즈마 표면개질 한 티타늄표면에 대한 계면특성의 이해 및 조골모세포 반응에 대한 연구가 향후 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J (2001) Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:323-332.
- [2] Olmedo D, Fernandez MM, Guglielmotti MB, Cabrini RL (2003) Macrophages related to dental implant failure. *Implant Dent* 12:75-80.
- [3] Rosa AL, Beloti MM (2003) Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 14:43-48.
- [4] Chiapasco M, Gatti C (2003) Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a 3- to 8-year prospective study on 328 implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 5:29-38.
- [5] Albrektsson T (1983) Direct bone anchorage of dental implants. *J Pros Dent* 50:255-261.
- [6] Brånemark PI (1983) Osseointegration and its experimental background. *J Pros Dent* 50:399-410.
- [7] Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S (1998) A histomorphometric evaluation of screwshaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin. Oral Implants Res* 9:11-19.
- [8] Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D (1998) Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acidetched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mat Res* 40:1-11.
- [9] Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP (1998) Removal torque of titanium implants in the maxilla of miniature

- pigs. *Int J Oral Maxil Implants* 13:611-619.
- [10] Groessner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF (2004) Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *Eur J Oral Sci* 112:516-522.
- [11] Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S (2005) Oxidized titanium implants (Nobel Biocare® TiUnite™) compared with turned titanium implants (Nobel Biocare® mark IIITM) with respect to implant failure in a group of consecutive patients treated with early functional loading and two-stage protocol. *Clin Oral Implants Res* 16:308-312.
- [12] Ganeles J, Zollner A, Jackowski J, Ten Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F (2008) Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clin Oral Implants Res* 19:1119-1128.
- [13] Yamamichi N, Itose T, Neiva R, Wang HL (2008) Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 28:163-169.
- [14] Bugea C, Luongo R, Di Iorio D, Cocchetto R, Celletti R (2008) Bone contact around osseointegrated implants: Histologic analysis of a dual-acid-etched surface implant in a diabetic patient. *Int J Periodontics Restorative Dent* 28:145-151.
- [15] Becker J, Meissner T, Neukam FW, Knöfler W, Graf HL, Reichart P (1991) Tierexperimentelle Untersuchung zur Einheilung von ANOF-beschichteten Titanimplantaten. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 7:162-169.
- [16] Weinländer M (1996) Surface preparation of endosseous implants.

- In: Watzek, G., ed. *Endosseous Implants:Scientific and Clinical Aspects*, 101–129.
- [17] Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006) Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27:5561–5571.
- [18] Barber TA, Gamble LJ, Castner DG, Healy KE (2006) In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPNcoated titanium implants. *J Orthop Res* 24:1366–1376.
- [19] Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM (2006) Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 27:4003–4015.
- [20] Petrie TA, Capadona JR, Reyes CD, Garcia AJ (2006) Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* 27:5459–5470.
- [21] Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2005) In vivo effects of RGDcoated titanium implants inserted in two bone-gap models. *J Biomed Mater Res A* 75:249–255.
- [22] Michal B, Andrzej H, Hubert L (2005) Arc plasma route to carbon-encapsulated magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Sensors & Actuators B* 109:81–85
- [23] McKenzie DR, Newton-McGee K, Ruch P, Bilek MM, Gan BK (2004) Modification of polymers by plasma-based ion implantation for biomedical applications. *Sur & coat Technol* 186:239–244.
- [24] Gancarz I, Bryjak J, Pozniak G, Tylus W (2003) Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma. *European Polymer J* 39:2217–2224.

- [25] López-Santos C, Francisco Y, José C, Agustín R G (2011) Nitrogen plasma functionalization of low density polyethylene. *Sur & Coat Technol* 205:3356-3364.
- [26] Zhou J, Yuan J, Zang X, Shen J, Lin S (2005) Platelet adhesion and protein adsorption on silicone rubber surface by ozone-induced grafted polymerization with carboxybetaine monomer. *Colloids & Surf B:Biointerfaces* 41:55-62.
- [27] Lakshmi GBVS, Dhillon A, Avasthi DK, Siddiqui AM, Zulfequar M (2010) Synthesis and characterization of thin films of poly(3-methyl thiophene) by rf-plasma polymerization. *Mater Lett* 64:1672-1673.
- [28] Lee SD, Hsiue GH, Kao CY, Chang PC (1996) Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. *Biomaterials* 17:587-595.
- [29] Tamada Y, Ikada Y (1993) Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces. *J Colloid Interface Sci* 155:334-339.
- [30] Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB (1998) Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci* 205:323-330.