

2012년 8월

碩士學位論文

골형성능 향상을 위한 SLA 처리된
티타늄표면의 아크릴산 플라즈마 처리

조선대학교 대학원

치의학과

박진홍

골형성능 향상을 위한 SLA 처리된
티타늄표면의 아크릴산 플라즈마 처리

Acrylic acid plasma treatment of SLA surface treated
titanium for improving the bone formation

2012年 8月 24日

조선대학교 대학원

치의학과

박진홍

곧형성능 향상을 위한 SLA 처리된
티타늄표면의 아크릴산 플라즈마 처리

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2012年 4月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 진 홍

박진홍의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 안 종 모 印

위 원 조선대학교 조교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교 수 고 영 무 印

2012年 5月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	v
제 1장 서론	1
제 2장 실험재료 및 방법	3
제 1절 티타늄 시편	3
제 2절 SLA-Ti 표면제조	3
제 3절 아크릴산 표면처리	6
제 4절 표면분석	8
제 5절 생체유사용액을 이용한 골형성능 평가	9
제 6절 조골모세포 배양	11
제 7절 생체적합성 평가	12
제 3장 실험결과 및 고찰	13
제 1절 표면분석	13
제 2절 골형성능 평가	21
제 3절 조골모세포 증식 및 분화	25
제 4장 결론	28
참 고 문 헌	29

LIST OF TABLES

Table 1. Ion concentrations of human body fluid and simulated body fluid (SBF).....	10
--	----

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Preparation using SLA treatment process5
- Fig. 2. Schematic diagram for plasma device7
- Fig. 3. Photo images of the various treated Ti surface.....15
- Fig. 4. FE-SEM images of (a) polished Ti, (b) blasted Ti, (c) SLA-Ti, and (d) plasma treated SLA-Ti.....16
- Fig. 5. FTIR spectrum of plasma polymerized SLA-Ti surfaces (a) 30 W, (b) 50 W, and (c) 70 W.....17
- Fig. 6. XPS spectra of -COOH coated SLA-Ti surface (70 W)....18
- Fig. 7. The -COOH concentration of the surface and thickness of polyacrylic acid films According to the RF plasma powers.....19
- Fig. 8. Contact angle values of water droplets measured on the different modified Ti surfaces.....20

Fig. 9. FE-SEM images of the precipitated deposited on the surface (a) CP-Ti, (b) SLA-Ti, (c) COOH/SLA-Ti (30 W), (d) COOH/SLA-Ti (50 W), and (e) COOH/SLA-Ti (70 W)·····22

Fig. 10. Thin film XRD patterns of different Ti surface immersed in SBF for 7 days. (a) untreated Ti, (b) CP-Ti, (c) SLA-Ti, (d) COOH/SLA-Ti(30 W),(e) COOH/SLA-Ti(50 W), and (f) COOH/SLA-Ti(70 W)·······23

Fig. 11. ATR-FTIR spectrum of (a) COOH/SLA-Ti(70 W) and (b) COOH/SLA-Ti immersed 7 days in SBF··········24

Fig. 12. Cell proliferation of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified Ti surface for 1 day and 4 days·······26

Fig. 13. ALP activity of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified Ti surface for 4 days and 7 days·········27

ABSTRACT

Acrylic acid plasma treatment of SLA surface treated titanium
for improving the bone formation

Jin-Hong Park, D.D.S, M.S.D

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

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Titanium (Ti) and Ti alloys are used widely as a dental implant materials and an orthopedic in clinical dentistry. Plasma surface modification can be used to improve the surface properties of commercial pure Ti by coating functional groups to produce bioactive films with different surface topography.

In this study, Ti surface treated with sandblast large grit acid etching(SLA) was modified with acrylic acid(AA) using a low temperature RF discharge plasma treatment and then investigated bone formation and pre-osteoblast cell proliferation and differentiation of the specimens.

SLA treated Ti and AA plasma polymerized SLA-Ti surface were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy(XPS), Fourier transform infrared(FTIR), contact angle, X-ray diffraction(XRD) and field emission scanning electron microscopy(FE-SEM). The surface of untreated Ti, SLA treated Ti, and AA plasma polymerized SLA/Ti were also examined for their proliferation and differentiation of pre-osteoblast (MC3T3-E1) cells using MTT assay *in vitro* and ALP test and bone formation test was performed immersion in simulated body fluid

(SBF) for 7 days.

The results of the various conditioned surface characteristics showed that polyacrylic acid thin films was deposited on the SLA-Ti surface after AA plasma working for 15 min at a power of 30, 50, and 70W. The changes of surface chemistry and surface topography of Ti with AA plasma surface modification played main roles in improving the bone formation and MC3T3E1 cell proliferation and differentiation of them.

These results suggest that polymeric thin films on the SLA treated Ti surface has an effect on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells and potential to be useful for the osteo-conductive bone implants.

제 1 장 서 론

최근 치과용 임플란트에 대한 연구는 다양한 표면처리에 초점을 두고 있으며, 골유착과 안정성이 증진된 유리한 임플란트 표면을 개발하여 임상적인 성공률을 높이려는 노력이 계속되고 있다. 예를 들면, 임플란트 표면의 거칠기 증가¹⁻³⁾, 코팅^{4, 5)}, 또는 화학적 처리^{6, 7)} 등을 통하여 치근형 임플란트의 골유착 안정성을 증가시키며 미세 형태학을 포함하는 임플란트 표면 형태가 임플란트의 골 유착에 상당한 영향을 준다⁸⁾.

표면 처리 방법에는 티타늄 플라즈마 분사(titanium plasma spray, TPS) 또는 산부식(acid treatment), 샌드블라스트(sandblast)법과 같이, 임플란트 표면적을 증가시키는 방법이 있다⁹⁾. 인산칼슘 계통인 수산화인회석($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)은 임상적으로 많이 사용되어 왔으며¹⁰⁾, 자연골 이식과 유사하게 생체친화성이 높고, 입자로된 치조골 재형성을 유도하여 치조골의 회복에 효과적인 것으로 인식되어 왔다¹¹⁾. 이러한 효과는 표면에너지의 증가와 제타포텐셜(Zeta potential)의 변화, 그리고 접촉각의 변화로 일어난다. 이러한 사실 때문에 단백질이 재료표면에 부착 시 초기 퍼짐의 증대와 세포유도의 증진이 발생한 것으로 추측 된다¹²⁾. 게다가 이러한 물리적, 화학적 효과, 시그널전달에 바탕을 둔 세포적 반응은 생체재료표면에 세포의 장기간부착, 단기간부착에 관여하고 있음을 보여주었다.

최근 임상적으로 가장 많이 사용되는 표면처리 방법은 SLA(sandblasted large grit and acid etching), RBM(resorbable blast media) 등이다. SLA 표면처리방식은 산화알루미늄(Al_2O_3) 또는 산화티타늄(TiO_2)으로 일차적으로 분사처리한 후 이차적으로 염산/황산($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$)와 같은 산을 이용하여 임플란트의 표면을 거칠게 하는 방법을 말한다.

이러한 표면개질기술 중에서 플라즈마를 이용한 표면개질기술은 세포의 분화 및 부착을 증진시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술법으로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 특히 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 재료표면에 존재하면서 생체활성물질 및 단백질과 공유결합에 의한 고정화에

매우 유용한 기술로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 임상에 가장 많이 사용되는 SLA 처리 후 플라즈마 중합반응을 이용하여 아크릴산(Poly Acrylic Acid: PAA)과 같이 친수성 카르복실기(-COOH)를 다량 함유하는 물질로 코팅하고, 그 표면에 골형성과 조골세포 부착에 미치는 영향을 연구하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 티타늄 시편

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 순수 티타늄 원판 (NSC CP-Ti, grade 2, Japan)을 직경 20 mm로 가공하여 시료로 사용하였고, 기계적 연마는 #100, #600, #800, #1200, #2000 grit SiC 연마지로 단계적으로 습식 연마하였다. 연마한 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액에 1시간동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하여 건조하여 사용하였다.

제 2 절. SLA-Ti 표면 제조

SLA 표면을 형성하기 위하여 연마와 세척이 끝난 티타늄 원판을 펜타입의 블라스터 장비 (Pencil Blaster-III, JAEMYUNG INC., Korea)내에서 평균입도 50 μm 크기를 갖는 알루미나 (Al_2O_3 , Renfert, Swiss) 분말를 시편과의 거리 3 cm 내에서 0.6 MPa의 압력으로 분사하였다(Fig. 1). 블라스트 처리된 티타늄 시편은 증류수와 알콜 그리고 아세톤을 이용하여 초음파 세척을 실시한 후에, 황산 (H_2SO_4 , Samchon chem., Korea)과 염산(HCl , Samchon Chem. Korea)의 비율이 5:5인 용액에 불산 (HF , Samchon chem., Korea) 용액을 소량 첨가하여 제조한 산처리용액에 블라스트 처리된 티타늄을 60 $^{\circ}\text{C}$ 온도로 5분동안 침지하여 산처리를 실시하였다. 산처리된 시편을 3차 탈이온수로 세정한 다음 표면의 남아 있는 산을 제거하기 위하여 80 $^{\circ}\text{C}$ 의 3차 탈이온수에 48시간 동안 침지한 후, 40 $^{\circ}\text{C}$ 의 진공오븐에서 건조를 실시하였다.

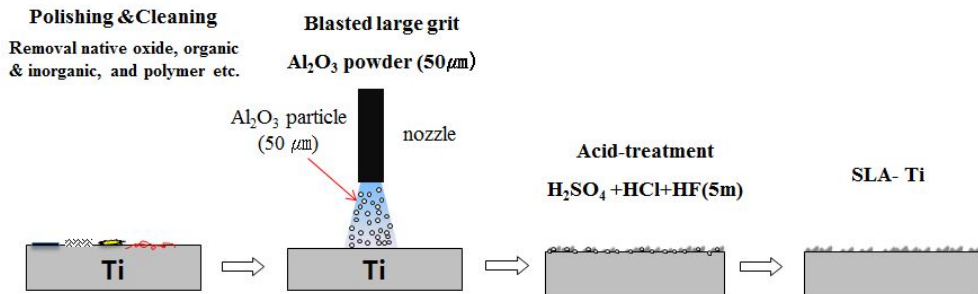


Fig. 1. Preparation using SLA treatment process.

제 3 절. 아크릴산 표면처리

플라즈마 중합반응 시 모노머는 아크릴산 (Acrylic acid; 99.5%, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였고, 플라즈마 반응장치의 구성도를 Fig. 2에 나타내었다. 플라즈마 표면개질 처리 전, SLA 처리된 티타늄표면의 유기물제거와 표면의 활성화를 부여하기 위하여 전처리를 실시하였다. 전처리 과정은 아르곤 (Ar)가스와 산소를 각각 25 sccm 유속으로 챔버 내의 반응 압력을 200 mtorr로 유지한 후, 플라즈마 방전세기를 200W로 10분 동안 수행하였다. 이어서 중합반응은 모노머의 증기압과 25 sccm의 Ar가스의 유속으로 챔버 내부 반응압력을 200 mtorr로 유지한 후, 30 W, 50 W, 70 W를 각각 15분 동안 반응시킨 후 3차 증류수로 표면을 세정하고, 진공오븐에서 60℃로 24시간동안 건조하였다.

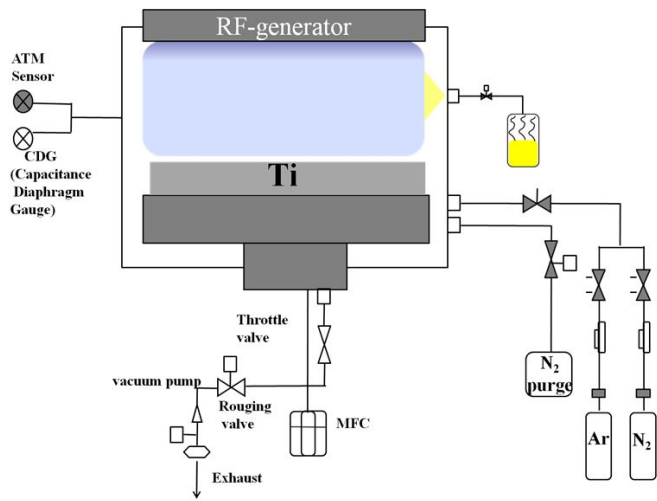


Fig. 2. Schematic diagram for plasma device.

제 4 절. 표면분석

주사전자현미경 (FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 SLA처리된 티타늄표면과 SLA처리 후 플라즈마 처리된 티타늄의 표면을 관찰하다. SLA처리된 티타늄표면과 SLA처리 후 플라즈마 표면개질 된 티타늄표면의 고분자 화학결합을 확인하기 위하여 퓨리에 변환 적외선 분광기 (FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy, FT/IR-4100, Jasco, Japan)를 이용하였다. 표면의 결정구조를 관찰하기 위하여 X-선 회절분석장치 (X-ray diffractometer, X' pert, Philips, Netherlands)를 이용하였다.

#2000번까지 티타늄, SLA처리된 티타늄표면과 SLA처리 후 플라즈마 처리된 티타늄 시편을 각각 준비하여 60℃에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, Surfacetech, Korea)로 5 초 후에 접촉각을 측정하였다.

아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 표면의 카르복실기의 정량분석은 Toluidine Blue 0 (TBO) 정량법을 이용하였다. 0.5 mM 농도의 TBO 용액에 시료를 침지하여 30℃에서 6시간 동안 TBO 염료와 카르복실기를 반응시켰다. Sodium hydroxide 용액 (pH 9)에서 30초간 50 rpm으로 세척을 한 후 Acetic acid 50% 수용액에서 12시간 동안 1000 rpm으로 TBO를 탈착시킨 다음 이 수용액을 620nm의 흡광도로부터 카르복실기를 정량하였다.

제 5절. 생체유사용액을 이용한 골 형성능 평가

본 실험에서 사용된 생체유사용액 (simulated body fluid, SBF)은 인간의 혈장무기이온 농도와 같은 농도를 갖게 하기 위해 다음과 같이 제조하였다 (Table 1).

우선 생체유사용액 제조에 사용되는 모든 용기는 1N-HCl용액으로 세척한 뒤, 중성 세제로 닦아내고 다시 증류수로 세척하여 건조한 후 사용하였다. 항온조(water bath)를 36.5°C 로 유지시키면서 800ml의 증류수를 1ℓ 용기의 폴비이커에 넣은 후, SBF의 제조에 NaCl(ER, Junsei, Japan), NaHCO₃(ER, Junsei, Japan), KCl(ER, Junsei, Japan), K₂HPO₄·3H₂O(ER, Junsei, Japan), MgCl₂·6H₂O(ER, Junsei, Japan), (ER, Junsei, Japan), CaCl₂(ER, Junsei, Japan), Na₂SO₄(ER, Junsei, Japan)의 시약 순서대로 넣으면서 magnetic stirrer로 교반하였다. 최종적으로 비이커 속의 용액의 pH가 36.5°C에서 7.4가 되도록 tris-buffer Solution (Tris(hydroxymethyl) aminomethane, (CH₂OH)₃CNH₂, ER, Junsei, Japan)과 1N-HCl용액을 첨가하여 조절하였다.

대조군인 연마된 티타늄과, SLA처리된 티타늄, 그리고 실험군인 SLA처리 후 플라즈마 처리된 티타늄 시편이 담긴 비이커로 옮겨 넣은 후, 각각 4일과 7일 후에 표면에 형성된 수산화인회석을 주사전자현미경과 X-선 회절분석장치를 이용하여 분석을 통하여 골 형성능을 평가하였다.

Table 1. Ion concentrations of human body fluid and simulated body fluid(SBF) (unit: mM)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Human body fluid	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.0	4.2	1.0	0.5

제 6 절. 조골모 세포 배양

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.

제 7 절. 생체적합성 평가

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, 2일, 3일 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 μ l씩 분주한 후 ELISA reader(Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 3 장 실험결과 및 고찰

제 1 절. 표면분석

Fig. 3은 SLA 처리전의 연마된 Ti와 SLA 처리, 플라즈마 처리된 표면과 미세구조를 관찰한 것으로, SLA 처리전과 SLA 처리 후 플라즈마 세기에 따라 티타늄 시편표면의 색깔이 다른 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 4는 주사전자현미경을 이용하여 연마된 Ti과 평균입도가 50 μm 인 알루미늄을 이용하여 블라스트 처리된 Ti, 블라스트 처리된 Ti을 산 처리한 표면, 그리고 SLA 처리된 Ti 표면에 아크릴산으로 플라즈마 처리한 표면을 관찰한 결과이다. 블라스트 처리된 표면은 마이크로 크기의 거친 형태가 관찰되며 (Fig. 4-b), 산 처리 후에는 평균 5 μm 정도의 분화구 형태로 변화하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4-c). 아크릴산이 코팅된 표면은 SLA 처리된 Ti과 비교해 볼 때 큰 변화는 관찰 할 수 없었다.

Fig. 5는 RF 플라즈마 세기에 따른 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti의 wide scan($400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$) FTIR 스펙트럼이다. 1700cm^{-1} 부근에서 카르복실기의 존재를 확인 할 수 있는 강한 C=O결합 피크를 관찰 할 수 있었고, 플라즈마 세기가 증가할수록 피크의 강도가 더욱 뚜렷하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이것은 아크릴산이 플라즈마 중합반응으로 인해 일반적인 고분자 축중합 보다는 중합도가 높은 네트워킹 중합 형태로 일어나기 때문에 강한 피크가 나타난 것으로 사료된다. 플라즈마중합의 일반적인 특징은 중합이 선상 사슬형태로 이루어지는 것이 아니라 복잡한 3차원 네트워킹 형태로 일어난다.

Fig. 6는 70 W의 플라즈마 세기로 아크릴 산이 코팅된 SLA-Ti 표면의 XPS 분석 스펙트럼으로 C1s와 O1s 피크만 나타났고, 이 결과는 FTIR결과와도 일치하였다. 이러한 결과들로부터 SLA-Ti 표면에 플라즈마 중합을 이용하여 카르복실기(-COOH)의 코팅이 성공적으로 이루어졌음을 확인 할 수 있었다.

Fig. 7은 RF 플라즈마 파워에 따른 티타늄표면에 존재하는 카르복실기량을 TBO를 이용하여 정량한 결과와 폴리아크릴산 박막의 두께를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과이며, 이를 그래프로 표시 하였다. RF 플라즈마 세

기가 증가함에 따라 카르복실기량과 막 두께가 모두 증가하였다.

Fig. 8은 연마된 Ti와 SLA-Ti, 그리고 RF 플라즈마 세기에 따른 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 표면의 접촉각을 측정한 결과이다. 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti은 대조군인 연마된 Ti, SLA-Ti 보다 낮은 접촉각을 나타내었고, RF 플라즈마 세기가 증가할수록 접촉각이 낮아짐을 확인할 수 있었다. 낮은 접촉각이 형성된 표면이 cell과의 접촉 시 세포부착과 매우 밀접한 관련이 있으며 일반적으로 친수성을 가지는 재료표면은 세포의 부착이 우수하여 임플란트와 같은 생체재료로써 사용하는데 유리하다고 보고되었다¹⁶⁾.

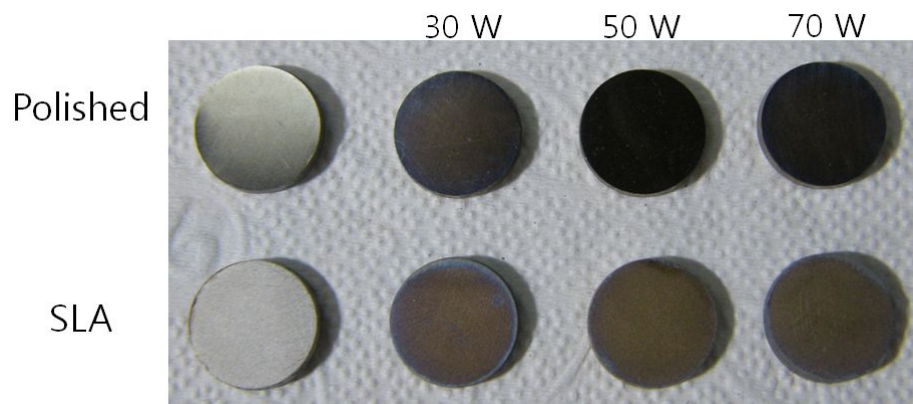


Fig. 3. Photo images of the various treated Ti surface.

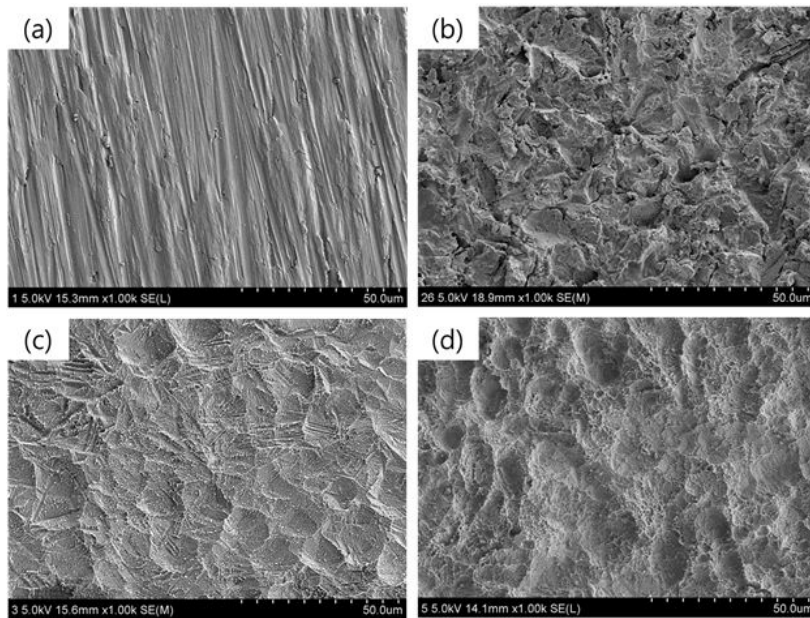


Fig. 4. FE-SEM images of (a) polished Ti, (b) blasted Ti, (c) SLA-Ti, and (d) plasma treated SLA-Ti.

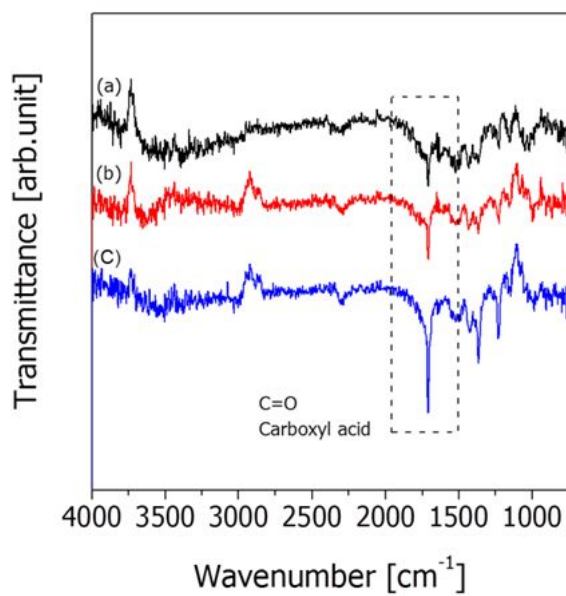


Fig. 5. FTIR spectrum of plasma polymerized SLA-Ti surfaces (a) 30 W, (b) 50 W, and (c) 70 W.

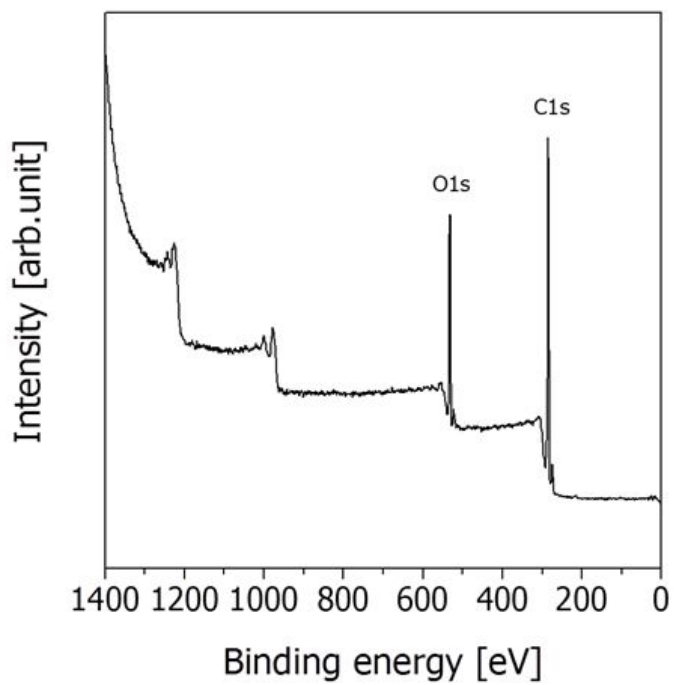


Fig. 6. XPS spectra of -COOH coated SLA-Ti surface (70 W).

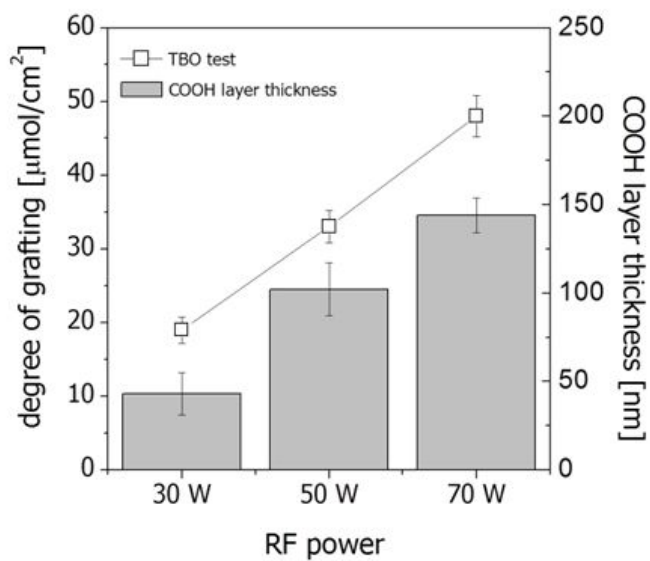


Fig. 7. The -COOH concentration of the surface and thickness of polyacrylic acid films According to the RF plasma powers

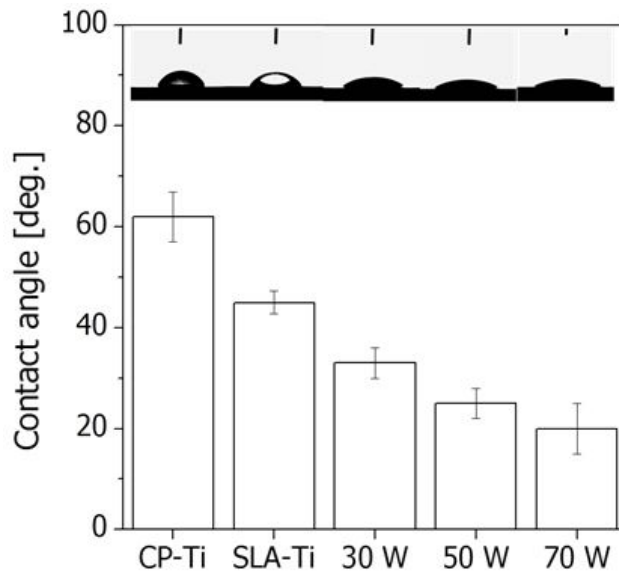


Fig. 8. Contact angle values of water droplets measured on the different modified Ti surfaces.

제 2 절. 골 형성능 평가

Fig. 9는 생체유사용액에 표면처리 된 시료를 4일간 침지 후, 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과이다. 대조군인 연마된 Ti과 SLA-Ti 표면은 알맹이 형태의 입자들이 부분적으로 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었고 (Fig. 9-a, b), 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 모두 표면에 두꺼운 피막이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9-c~e).

Fig. 10은 생체유사용액에 표면처리 된 시료를 7일간 침지 후, X-선 회절 분석법을 통하여 시료의 결정상을 관찰한 결과이다. 연마된 Ti를 제외하고 모두 수산화인회석의 결정상이 관찰되었다. 이를 통하여 Fig. 9-c~e에서 관찰된 두꺼운 막이 수산화인회석임을 확인할 수 있었으며, 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 표면이 우수한 골 형성능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 11은 FTIR를 이용하여 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 표면 (Fig. 11-a)과 생체유사용액에 7일 동안 침지시킨 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 표면 (Fig. 11-b)을 관찰한 결과이다. 1060cm^{-1} 부근에서 강한 P-O 결합 피크를 관찰할 수 있었고, 1700cm^{-1} 부근에서 C=O 결합 피크의 감소를 관찰할 수 있었다. 이는 시료표면에서 수산화인회석이 형성되면서 수산화인회석 내의 PO_4^{3-} 에서의 결합의 의미이며, C=O 결합 피크의 감소는 수산화인회석내의 양이온이 아크릴산의 카르복실기와의 결합에 의한 결과이다. 카르복실산의 경우 생체유사용액 내에서 해리되어 수소가 분리되고 그 빈자리를 양이온의 결합이 쉽게 이루어진다고 보고되었다¹⁷⁾.

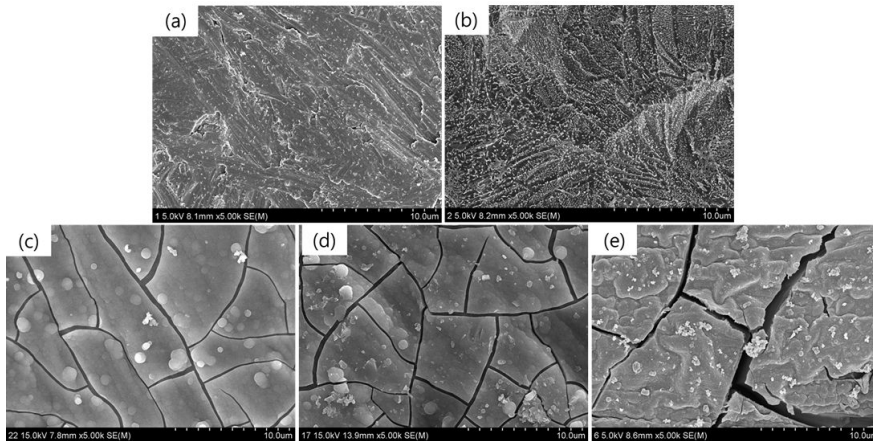


Fig. 9. FE-SEM images of the precipitated deposited on the surface (a) CP-Ti, (b) SLA-Ti, (c) COOH/SLA-Ti (30 W), (d) COOH/SLA-Ti (50 W), and (e) COOH/SLA-Ti (70 W).

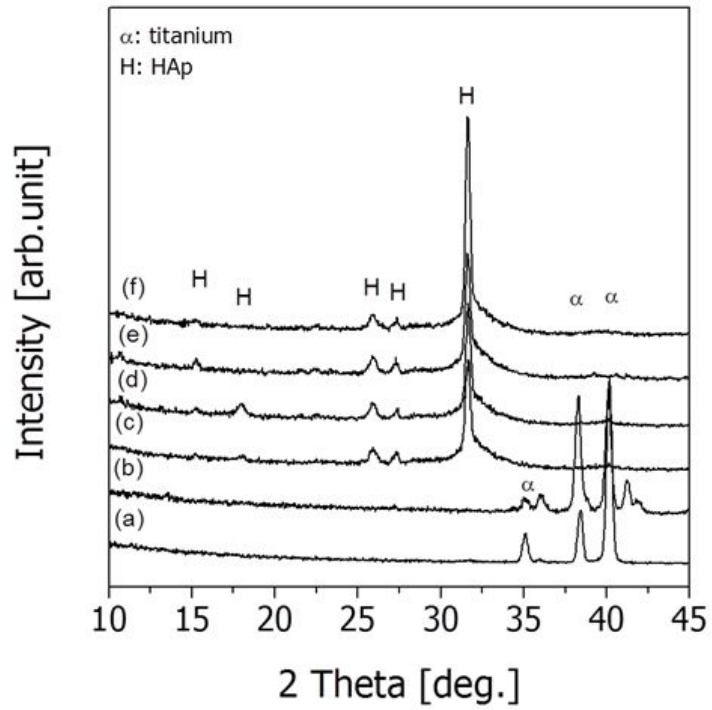


Fig. 10. Thin film XRD patterns of different Ti surface immersed in SBF for 7days. (a) untreated Ti, (b) CP-Ti, (c) SLA-Ti, (d) COOH/SLA-Ti (30 W), (e) COOH/SLA-Ti (50 W), and (f) COOH/SLA-Ti (70 W).

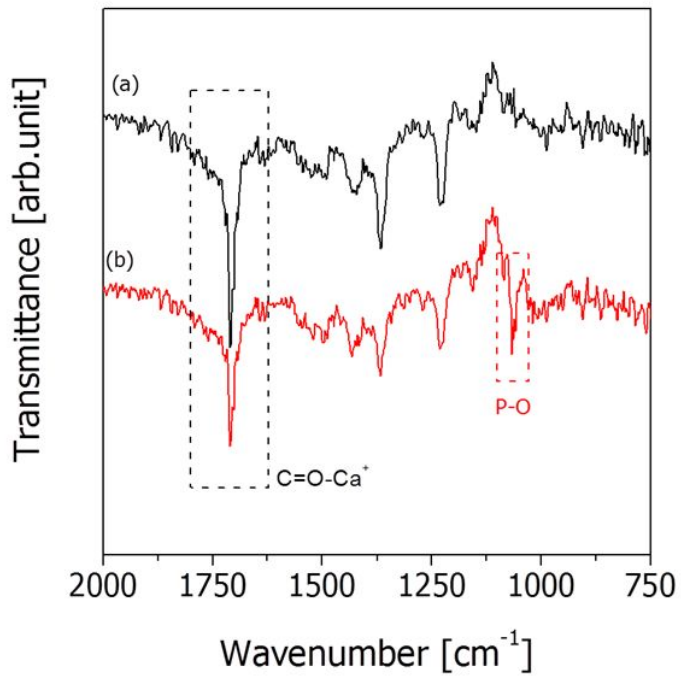


Fig. 11. ATR-FTIR spectrum of (a) COOH/SLA-Ti (70 W) and (b) COOH/SLA-Ti immersed 7 days in SBF.

제 3 절. 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식 및 분화

SLA-Ti 표면에 플라즈마 중합반응으로 증착된 아크릴산 박막표면에 존재하는 카르복실기가 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 Ti과 SLA-Ti 표면을 사용하였고, RF 플라즈마 세기에 따른 아크릴산박막이 형성된 SLA-Ti을 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포생존율을 측정하기 위하여는 대조군과 실험군 모두 1일, 4일 동안 배양하였고, 생존율(%)계산은 1일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군의 생세포수를 비율로 나타낸 것이다 (Fig. 12). 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포생존율이 증가함을 알 수 있었다. 1일 배양의 경우에는 50 W 세기를 인가하여 코팅한 SLA-Ti 표면이 세포증식에 가장 큰 영향을 미쳤다. 4일째가 되면서 대조군과 실험군의 세포증식률이 크게 차이가 나기 시작하였고, 아크릴산이 코팅된 SLA-Ti 모두 세포 증식율이 대조군에 비하여 높은 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 실험의 경우, 표면 박막에 존재하는 카르복실기가 MC3T3-E1세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 13은 SLA-Ti 표면에 플라즈마 중합반응으로 증착된 아크릴산 박막이 코팅된 표면에 MC3T3-E1 세포를 이용하여 ALP활성도를 관찰한 결과이다. 관찰결과 4일에 비해 7일에서 더 뚜렷한 ALP활성도를 관찰 할 수 있었고, 아크릴산이 코팅된 표면이 연마된 Ti 표면과 SLA-Ti 표면보다 월등히 높은 ALP활성도를 갖는 것을 관찰할 수 있었다.

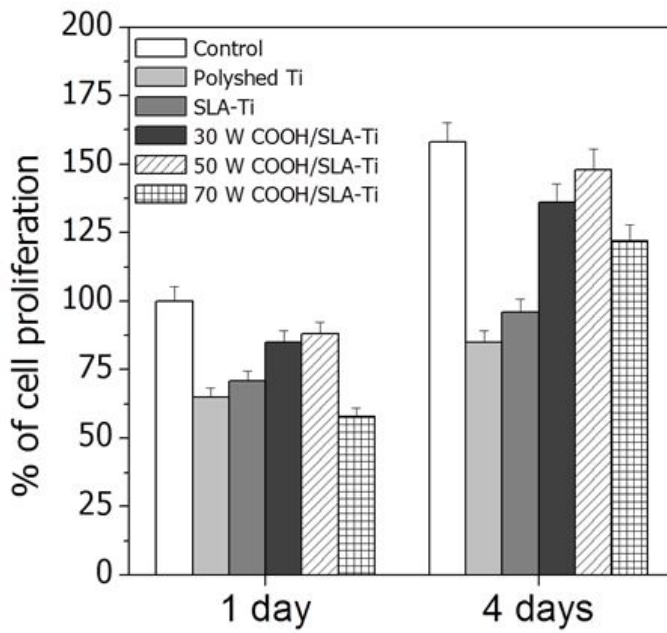


Fig. 12. Cell proliferation of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified Ti surface for 1 day and 4 days.

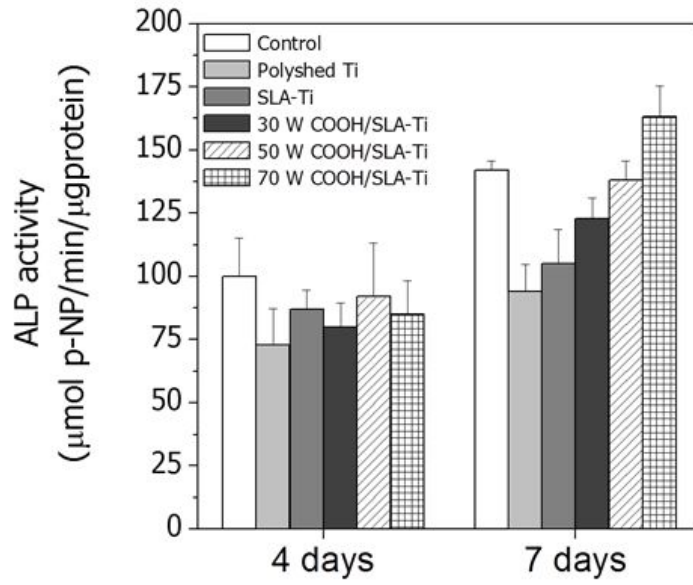


Fig. 13. ALP activity of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified Ti surface for 4 days and 7 days.

제 4 장 결론

SLA처리된 티타늄표면에 플라즈마 표면개질법을 이용하여 폴리 아크릴산 고분자 박막 코팅을 한 후 표면을 관찰하였고, 제조된 시편을 생체유사용액에 침지하여 골 형성능을 관찰하였으며, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포증식과 분화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 친수성을 갖는 균일한 카르복실기를 다량 함유한 고분자 박막층이 형성됨을 확인 할 수 있었다.
- 2) SBF를 이용한 골 형성능 평가 결과, 고분자박막이 코팅된 표면은 4일 만에 수산화인회석이 형성됨을 관찰하였고, 7일 후에는 결정성 수산화인회석이 형성됨을 관찰할 수 있었다.
- 3) MC3T3-E1 세포 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 고분자박막이 코팅된 표면이 무 처리된 표면에 비하여 우수한 생체활성을 나타내었다.

이상과 같은 결과로부터 현재 시판 중인 SLA처리 임플란트의 표면에 플라즈마 표면개질기술을 이용하여 고분자박막을 코팅한 임플란트는 임상적으로 골 재생이 우수할 것으로 사료된다. 향후 동물실험을 통하여 실제로 신생골의 재생능이 어느 정도인지 확인하는 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Carsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T (1998). Removal torque for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3:21-24.
- [2] Cook SD, Baffes GC, Palafox AJ, Wolfe MW, Burgess A (1992). Torsional stability of HAcoated and grit-blasted titanium dental implants. *J Oral Implantol* 18:354-358.
- [3] Godfredsen K, Nimb L, Hjørting-Hansen E, Jensen JS, Holmén A (1992). Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res* 3:77-84.
- [4] Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M (1987). Interface mechanics and histology of titanium and hydroxyapatite-coated titanium for dental implant applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2:15-22.
- [5] Gottlander M, Albrektsson T (1992). Histomorphometric analyses of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium implants. The importance of the implants design. *Clin Oral Implants Res* 3:71-76.
- [6] Baker D, London RM, O' Neal R (1999). Rate of pullout strength gain of dual-etched titanium implants: A comparative study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:722-728.
- [7] De Leonardis D, Garg AK, Pecora GE, Andreana S (1997). Osseointegration of rough acidetched titanium implants: One-year followup of placement of 100 minimatic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:65-73.
- [8] Klokkevold P, Nishmura RD, Adachi M, Caputo A (1997). Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in rabbit. *Clin Oral Implant Res* 8:442-447.
- [9] Anderson JM, Miller KM (1984). Biomaterials biocompatibility and

- the macrophage. *Biomaterial* 5:5-10.
- [10] Kennt JJN, Quinn JM (1983). Alveolar ridge augmentation using non resorbable HA with or without autogenous cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41:629-642.
- [11] Kirsch A (1986). Plasma-sprayed titanium-I.M.Z. implant. *J Oral Implantol* 12(3):494-497.
- [12] Weinländer, M. (1996). Surface preparation of endosseous implants. In: Watzek, G., ed. *Endosseous Implants:Scientific and Clinical Aspects*, 101-129.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Lim YJ, Oshida Y, Anders CJ, Barco MT (2001). Surface treatment characterization of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implant* 16: 333-338.
- [17] Tanahashi M and Matsuda T (1997). Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res* 34: 305-310.