

## A-6. The Effect of Hydrothermally treated and Untreated Anodic Oxide film on Attachment and Proliferation of Osteoblast-like cell

장봉철\*, 이재목, 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

### 서론 및 목적

Titanium은 양호한 생물학적 적합성으로 인해 치과용 임플란트에서 가장 많이 사용되는 재료이다. Titanium의 높은 생물학적 적합성은 공기 또는 물에 노출시  $TiO_2$ 의 형태로 존재하는 산화층에 기인하는 것으로 사료된다. 임플란트 식립 초기에 생체내에서 조직과의 반응은 임플란트의 표면상에서 일어나게 되며, 임플란트와 골조직간의 결합력을 강화시키기 위하여 titanium의 표면처리에 관한 연구들이 활발히 진행되어 왔다. 이 방법들에는 sandblasting method, acid etching method, plasma spraying method, electrochemical deposition method등이 있다. 한편, 골 무기질의 기본 구성요소인 hydroxyapatite(HA) 층의 형성 또는 calcium phosphate coating에 의해서 표면의 화학적 변화를 일으키려는 시도가 있어 왔다. Plasma-spraying method에 의한 HA coating방법은 HA와 titanium의 결합력 부족으로 인한 장기적인 예후가 충분히 보장되지 않고, 최근에는 titanium 표면에 HA외에  $\alpha$  and  $\beta$  tricalcium phosphate, tetracalcium phosphate, oxyhydroxyapatite등이 형성된다는 문제점이 보고되고 있다. 이런 문제점들을 극복하기 위하여 plasma-spraying외에 다른 방법들이 활발히 연구되어져 왔다. 이들중 한 방법인 양극산화법은 전기화학적 방법으로 titanium의 표면에 양극산화용액내의 Ca, P등이 포함된 두꺼운 산화피막을 형성할 수 있고, 열처리에 의해 HA crystal을 형성시킬 수 있는 방법이다. Ishizawa등은  $\beta$ -glycerophosphate와 calcium acetate용액으로 양극산화를 시행하여 titanium표면에 HA와 유사한 Ca/P ratio를 보이는 Ca과 P를 포함하는 산화층이 형성되고, 열처리에 의해서 HA crystal이 형성됨을 보고하였다. 또, 최근에는 calcium glycerophosphate(Ca-GP)와 calcium acetate(CA)를 이용한 양극산화법이 보고되었다. 그러나, 지금까지 양극산화법에 의해 형성된 titanium 산화층이 조골세포 또는 유사조골세포의 부착 및 성장에 미치는 영향을 평가하는 연구는 거의 행해지지 않았다. 이에 본 연구에서는 ROS 세포를 이용하여  $H_3PO_4$ 용액, calcium glycerophosphate와 calcium acetate용액으로 양극산화를 시행한 titanium 표면과 양극산화후 열처리한 titanium 표면의 표면특성과 유사조골세포의 부착 및 성장에 미치는 영향을 평가하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시편의 준비

commercially pure titanium(grade 2)을 SiC sandpaper #1200번까지 연마한 후, 다양한 조건으로 양극산화 및 열처리를 시행하였다.

각군의 실험 조건은 아래와 같다.

대조군 : commercially pure titanium (grade 2)

실험1군 : commercially pure titanium을 0.15M  $H_3PO_4$ 용액에서 70A/m<sup>2</sup>의 전류로 30분간 양극산화

실험2군 : commercially pure titanium을 0.02M Ca-GP와 0.15M CA가 포함된 용액에서 70A/m<sup>2</sup>의 전류로 30분간 양극산화

실험3군 : commercially pure titanium을 0.04M Ca-GP와 0.1M CA가 포함된 용액에서 70A/m<sup>2</sup>의 전류로 30분간 양극산화

실험4군 : 실험2군과 동일 조건하에서 양극산화하고 300℃에서 2시간동안 열처리

실험5군 : 실험2군과 동일 조건하에서 양극산화하고 300℃에서 4시간동안 열처리

## 2. 표면특성

대조군 및 실험 각 군의 시편을 표면조도 측정, SEM 관찰, XRD 측정, 구성성분 분석을 하였다.

## 3. MIT assay를 이용한 세포의 활성도 평가

각 군의 세포활성을 알아보기 위하여 대조군과 실험 각 군당 3개씩의 원형 시편 (diameter; 6mm)을 96well plate에 시적하고 각 well당  $1.5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>의 ROS세포를 접종하여 4일간 배양한 후 MIT 용액을 분주하고 3시간동안 배양한 후, 용액을 시편이 포함되지 않은 well로 옮겨 570nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

## 4. 유사조골세포의 부착 및 성장에 미치는 영향

24well plate에  $10 \times 10 \times 1$  mm<sup>3</sup> 크기의 각 군의 시편을 시적하고 각 well당  $1.5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>의 ROS세포를 접종한 후 6시간, 24시간, 4일째의 부착 및 성장 양상을 scanning electron microscope(SEM)로 관찰하였다.

## 결론

1. 양극산화를 시행한 시편은 대조군에 비해 거친 표면조도를 나타냈고 실험2군의 표면조도 가 가장 높았다. Titanium표면의 SEM 관찰결과, 양극산화를 시행한 모든 실험군의 시편 에서 micropore를 가지는 중첩된 구조가 관찰되었으며, 실험 3군의 시편 표면에서는 미세 균열이 관찰되었다. 양극산화 후 열처리한 실험4, 5군의 시편에서는 HA crystal의 성장이 관찰되었다.
2. 산화층의 구성 성분 평가에서는 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>용액으로 양극산화한 실험1군 시편의 산화층은 Ti, O외에 P를 포함하고 있었으며, Ca-GP와 CA 용액으로 양극산화한 실험2, 3, 4, 5군에서 P와 함께 Ca이 나타났다.
3. MIT assay를 이용한 세포활성도 평가에서는 각 군간 유의성있는 차이가 존재하지 않았다.
4. 6시간 배양 후의 SEM 소견은 모든 군에서 세포의 부착이 진행되고 있었으며, 양극산화 후 열처리를 한 실험 4, 5군의 시편에서 세포의 전개가 빠르게 진행되고 있었다. 배양 4 일째의 SEM 소견에서는 각 군간의 현저한 차이는 관찰되지 않았으며, 모든 군의 시 편에서 세포의 밀생이 관찰되었다.

이상의 실험결과로 보아 양극산화 titanium 표면과 양극산화 후 열처리한 titanium 표면은 commercially pure titanium에 비교할만한 세포적합성을 보이며, 양극산화와 열처리에 의해 titanium 표면에 형성된 HA crystal은 임플란트 식립 후 초기 세포의 부착에 긍정적 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.