

양극산화 표면처리한 티타늄 임플란트를 난소절제한 백서 경골에 매식 후 주위 골형성에 관한 연구

박성환 · 정석영* · 이재열** · 김규천*** · 신상훈**

수부부치과의원, *부산성모병원 구강외과

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, *구강해부학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:306-318)

THE BONE FORMATION AROUND ANODIC OXIDIZED TITANIUM IMPLANTS IN THE TIBIAE OF OVARECTOMIZED RATS

Sung-Hwan Park, Suk-Young Jung*, Jae-Yeol Lee**, Gyoo-Cheon Kim***, Sang-Hun Shin**

*Soo Boo Boo Dental Clinic, *Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Busan St. Mary's Medical Center*

***Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University*

****Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Pusan National University*

Anodic spark deposition method(ASD) surface treated titanium implant possesses a considerable osteoconductive potential that promoting a high level of implant osseointegration in normal bone.

The purpose of this study was to observe the ASD implant's osseointegration in the osteoporosis-induced animal model. Twenty four rats, 10 weeks of age, were ovariectomized and 5 weeks later divided into two groups : ASD implant group and control implant group. Titanium screw implants (diameter; 2.0 mm, length, 3.5 mm; pitch-height, 0.4 mm) were designed for this study. Experimental implants were ASD treated and no treatment on control implants. ASD implants and control implants were placed in to left tibiae of rats. The rats were sacrificed at different time interval(1, 2, 4 and 8 weeks after implantation) for histopathologic observation and immunohisto-chemical observation, with collagen type I, fibronectin, integrin $\alpha_2\beta_1$ and integrin $\alpha_5\beta_1$ antibodies.

The results obtained from this study were as follow:

1. Histopathologic findings, overall tissue response and the pattern of bone formation in both groups were similar. In ASD group, more newly formed bone was seen at 1 week and 2weeks than control group.
2. The levels of type I collagen and fibronectin expression were the most abundant at 2weeks and decreased gradually in both groups. Fibronectin and type I collagen expression in ASD group were stronger than control group but no significance.
3. The levels of integrin $\alpha_2\beta_1$ and Integrin $\alpha_5\beta_1$ expression were most abundant at 2 weeks and decreased gradually in both groups. No significant difference was observed in both groups.

From this results, anodic oxidized titanium implants were more advantages in early stage of bone formation than control group, but have no significance in tissue responses and late bone formations.

It could be stated that although anodic oxidized titanium implant possesses considerable osteoconductive potential but in osteoporotic bone condition dental implant procedure should performed after improving or treating the osteoporotic bone condition.

Key words: Anodic oxidation(anodization), Osteoporosis, Bone healing, Dental implants

I. 서 론

학문의 발전과 사회 경제수준의 향상으로 인해 인간의 평균 수명이 연장되고, 노령 인구가 급격히 증가하고 있다. 따라서 노년기 삶의 질이 중요한 사회 문제로 대두되고 있으며, 노령으로 인한 질병 중 심혈관계 질환과 골다공증에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히, 여성의 경우 50세를 전후하여 폐경이 나타나는데, 이로 인해 에스트로젠 분비가 감소되며 결국 골밀

신상훈

602-739 부산광역시 서구 아미동 1-10

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Sang-Hun Shin

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Pusan National University

1-10 Ami, Seo-Gu, Busan, 602-739, Korea

Tel: +82-51-240-7429 Fax: +82-51-244-8334

E-mail: ssh8080@pusan.ac.kr

도의 감소로 생기는 골다공증은 골격조직에 많은 영향을 미친다¹⁾.

우리나라의 경우 통계청 발표에 따르면, 1995년에 73.5세였던 평균 수명이 2002년 77.0세(남자 73.4세, 여자 80.4세)로 증가했고, 2020년대에는 81.0세(남자 78.2세, 여자 84.4세)로 증가하고, 2050년에는 83.3세(남자 80.7세, 여자 86.6세)가 될 것으로 예측된다고 한다²⁾. 이에 따라 65세 이상 노인인구의 비율도 크게 증가해서 인구 구성비에서 2005년 9.1%(노령화지수 47.4)를 차지하던 것이 2020년에는 15.4%(노령화지수 124.2)가 되고, 2050년에는 37.3%(노령화지수 415.7)를 차지할 것이 예상되며, 2002년 이후 현재 50세 한국 여성의 기대 여명은 32.2년이 되었다³⁾. 그러므로 여성은 일생에서 폐경 후의 생활이 차지하는 비중이 40%이상으로 폐경 후 여성의 삶에서 그 중요성이 강조되고 있는 실정이다. 결국, 골다공증이 향후 노년기 여성들의 건강에 미칠 영향은 지대할 것이며, 더욱이 한국 여성의 경우, 식사를 통한 칼슘 섭취량도 권장량 이하로 낮아⁴⁾ 그 심각성이 더 클 것으로 예상된다.

골조직은 끊임없이 생성과 흡수가 균형 있게 이루어져 재형성 되는데 이러한 균형이 깨어져 형성보다 흡수가 많이 이루어질 때 골다공증이 초래된다. 척추와 치조골은 인체의 다른 골격보다 이러한 뼈의 교체율이 높아 골다공증의 영향을 크게 받는 것으로 알려져 있다. 골다공증은 피질골의 폭경이 감소하고 골소주의 크기와 수가 감소되어 뼈의 형성과 흡수의 대사과정에서 그 조화가 깨어진 상태로, 단위 용적내의 골질량이 감소되는 뼈의 대사성 질환이다. 그 결과 골질의 역치가 낮아져 골절 가능성이 높아지게 된다⁵⁾.

이와 같이 골다공증은 외상 후 골기질의 빠른 유실을 일으키는 병적상태로, 정확한 병리학적 기전은 아직까지도 완전히 밝혀지지 않았다. 구강내 골소주의 소실은 대부분 치주질환, 발치 후 치조골의 흡수 또는 여러 원인들의 복합적인 결과로 나타난다. 최근 전신적인 골다공증과 관련해서 치주질환 등과 같은 복합적인 원인에 의한 악골 흡수에 관심이 모아지기 시작하였다. 실제로 치과 임상에서 의치나 골유착형 임플란트를 필요로 하는 환자 중 젊고 건강한 환자보다는 노인 특히 여성의 경우, 폐경기 이후의 환자들이 더 많은 실정이다. 이러한 환자들 중에는 골다공증을 동반한 경우가 많고, 이 경우 골다공증이 골조직의 재생 능력에 영향을 주므로 치조골 증강술이나 임플란트와 같은 수술 후 창상의 치유과정에 영향을 미치며, 결과적으로 보철물의 장착까지 어려움을 주게 된다⁶⁾.

치과용 임플란트 재료로 사용되는 티타늄과 일부의 티타늄 합금은 티타늄의 우수한 기계적 성질과 표면의 산화피막에서 기인한 우수한 생체적합성으로 인해 널리 이용되고 있다. 그러나 자연적으로 생성된 산화피막은 조성이 불균일하고 다수의 공공(vacancy)과 격자결함 등을 포함하여 공식(pitting)과 같은 부식이 일어나기 쉬울 뿐만 아니라 생체 내에서 불활성의 특성을 보이므로 골유착이 일어나기까지는 수개월의 기간이 소요되며, 이러한 문제점으로 인해 티타늄 임플란트의 생체적합성과 골전도성을 개선할 목적으로 기계적, 화학적 및 전기

화학적 방법을 적용한 티타늄의 표면 처리에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다.

최근, 티타늄 표면을 전기화학적으로 처리하는 방법 중 하나로 인산염과 칼슘 이온을 함유하는 전해질 수용액 중에서 양극산화에 의해 산화 피막을 치밀화하고 절연파괴(dielectric breakdown)에 의한 불꽃 방전(spark discharge)으로 표면에 1-5 μm 범위의 미세기공(micro-pore)을 형성하여 다공질화 한 다음 열수처리(hydrothermal treatment)에 의해 hydroxyapatite (HA) 결정을 표면에 석출하는 피막 형성법이 도입되었으며, 요철구조에 의한 기계적 결합과 HA 층에 의한 화학적 결합을 유도할 수 있는 방법으로 많이 연구되었다⁷⁾. 이렇게 형성된 다공성의 산화 피막은 뼈 성장인자나 뼈의 유전적 형태단백질과 같은 생물학적 성분의 저장고가 되어 뼈와의 결합력을 보다 향상시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다. 또한, 표면 거칠기가 증가되고, 양극 산화된 임플란트 표면은 이식 초기에 높은 계면강도를 갖는다는 점에서 초기 골모세포의 부착이 촉진되고, 생체 내에서 골모세포의 활동도가 높아져, 결과적으로는 골유착성이 증진될 것이라는 문헌들이 보고된 바 있다⁸⁾.

이에 본 연구는 난소 절제 시 에스트로겐 분비 억제로 인해 골다공증이 유발된다는 많은 연구⁹⁾에 따라서 백서에서 난소를 절제하여 골다공증을 유발한 후 양극산화법으로 순 티타늄의 표면을 처리하여 임플란트를 매식한 후 골다공증이 유발된 주위 뼈의 조직반응을 병리조직학적으로 분석하고, 제1형 교원질, fibronectin, integrin $\alpha_2\beta_1$ 과 integrin $\alpha_5\beta_1$ 면역항체를 이용한 면역조직화학적 소견을 관찰하여 지견을 얻고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 실험 동물

일정 기간 동일 조건하에서 사육된 200-250 g 내외의 자성 백서 (Sprague-Dawley) 24마리를 실험군과 대조군으로 나누어 사용하였는데 10주령 군에서 난소절제를 하였고, 난소절제 5주 후 임플란트를 매식하였다. 실험 기간 중 실험동물은 3마리씩 군별로 나누어 각각 분리되고 제한된 우리 내에서 자유로이 활동하게 하였으며, 실온에서 실험동물용 고형사료와 생수를 자유 섭식 하도록 하였다.

2) 시편의 제작

(1) Machined smooth surface fixture (MSS)

대조군의 실험에 사용된 나사형 임플란트는 순 티타늄 (Commercially Pure titanium - Grade 3)으로 외경 2.0 mm, 길이 3.5 mm, pitch-height 0.4 mm를 가지도록 선반 가공하여 평활한 표면 (machined smooth surface)이 되도록 하였다.

(2) Anodic spark deposition fixture (ASD)

실험군의 실험에 사용된 나사형 임플란트는 MSS fixture를 코

웰메디사의 ATLAS System™ (Cowell medi CO., LTD. 부산, 대한민국)이 가지고 있는 양극 불꽃 산화법(anodic spark deposition method)으로 표면 처리하였다. 이 방법으로 처리된 임플란트의 표면은 0.2~2.0 μm 의 미세기공을 가진다. ATLAS Fixture System™의 방식으로 표면처리하면 티타늄 산화막(TiO_2)의 최대 표면 거칠기(Rmax)는 7.5 μm 이고 평균 표면 거칠기(Ra)는 1.0 μm 이 되는데 이는 미세 기공의 깊이를 의미한다. 또한 티타늄 산화막의 두께는 상부에서는 미세나사 부위에 해당하는 1.2~1.6 μm , 중간 부분에서는 본체 나사 부위에 해당하는 2.5~5.2 μm 로 형성된다.

2. 연구방법

1) 난소절제

10주된 백서 24마리의 대퇴부에 2% Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 대한민국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 대한민국) 100 mg/kg을 혼합해 근육 주사하여 전신 마취를 유도한 후 복부 제모를 시행하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다. 수술용 칼을 이용하여 복부에 5 cm의 수평절개를 가하여 복부를 노출시키고, 양측 신장의 하방에 존재하는 난소를 조심스럽게 완전 제거하고 통법에 따라 봉합하였다. 술후 감염방지를 위해 Gentamicin hydrochloride (겐타마이신®, 중외제약, 대한민국) 3 mg/kg을 근육 주사하였다.

2) 임플란트 매식

난소절제 5주후 백서의 좌측 경골부에 주문 제작한 임플란트를 매식하였다. 난소절제시와 동일한 방법으로 전신마취를 유도한 후 슬관절부를 포함하여 좌측 경골부 피부에 제모하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다. 좌측 경골 외측부에 절개를 가한 다음 박리자를 이용하여 골막까지 박리한 후 뼈를 노출시켰다. 노출된 경골 근심측 5 mm 부분의 경골 외측 최대 폭경부 중앙에, 생리식염수를 적하하면서 치과용 회전 엔진으로 지속회전 시켜, 직경 1.6 mm twist drill을 이용하여 직경 1.6 mm의 구멍을 정확히 형성하고, 생리식염수로 충분히 세척하여 골편 등을 제거한 후 실험군은 ASD 임플란트를 대조군은 MSS 임플란트를 피질골에 심고, 골수강에 도달할 때까지 매입하였다. 창상은 통법에 따라 봉합하고 겐타마이신 3 mg/kg을 근육 주사하였다.

3) 실험 기간

실험동물은 임플란트 매식 후 1주, 2주, 4주 및 8주간 사육하여 실험군과 대조군 각각 3마리씩 희생시킨 후 표본을 제작하였다.

4) 표본 제작

상기의 외과적 수술시행 후 1주, 2주, 4주 및 8주 경과한 백서의 대퇴부에 Xylazine hydrochloride 10 mg/kg, Ketamine chloride 100 mg/kg을 혼합해서 근육주사 하여 전신 마취한 후 흉곽부에

Y절개를 가하여 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후 좌심실로 연동성 관류 펌프와 연결된 20게이지 바늘을 삽입하여 지혈 겸자로 고정하고 펌프를 작동한 후 우심방의 벽을 절개하여 체순환된 피를 배출시키고 Phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 20분간 심장관류를 시행하였다. 심장관류 후 pH 7.2인 4% paraformaldehyde 고정액을 30분간 관류 펌프를 통해 주입하여 관류고정 한 후 대퇴골의 슬관절부와 비골을 포함하여 경골을 절단해서, 티타늄 임플란트의 중심축 방향으로 경조직 절단기 (Stuers Minitom, Denmark)를 사용하여 양분하였다. 절단한 표본들은 동일한 고정액에 8시간 동안 고정시킨 후 증류수 1750 ml에 250 g의 EDTA와 25 g의 NaOH를 녹인 탈회액에 7주간 탈회시킨 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 시행하여 paraffin에 포매하고 6 μm 두께의 시상연속 절편을 만들었다.

5) 병리조직학적 관찰

(1) *in situ* 관찰: 관류 고정 후 채득한 경골을 레진을 이용하여 포매를 시행하고 티타늄 임플란트의 중심축 방향으로 경조직 절단기를 사용하여 양분한 후 임플란트와 골조직의 결합면을 광학현미경 (Olympus BH60, Japan)으로 관찰하였다.

(2) Modified Goldner's trichrome stain

교원질의 생성 정도에 따른 광화된 골조직과 비광화된 골조직을 관찰하기 위해 상기 제작된 6 μm 두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 hematoxylin에 5분간 핵 염색을 시행한 후 흐르는 물에 10분간 수세하고 Ponceau-acid fuchin 용액에 5분간 염색하였다. 그런 후 0.2% acetic acid 용액에서 세척하고 Phosphomolybdic acid-orange G 용액에서 3분간 염색한 다음 0.2% acetic acid에 세척하고 Light green 용액에 5분간 염색하여 0.2% acetic acid에 세척하고, 95% 알콜에 탈수한 후 Xylene을 통해 투명하고 Balsam으로 봉입하였다.

6) 면역조직화학염색

상기 제작된 6 μm 두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 graded alcohol을 거쳐 흐르는 물로 수세한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 무수 메칠알콜에 0.3% hydrogen peroxide를 첨가시켜 20분간 처리한 다음 PBS에서 10분간 3회 세척하고 fibronectin의 분포를 알기 위해서 5% normal goat serum을 30분간 적용하였고, collagen type I의 분포를 알기 위해서는 5% normal horse serum을 30분간 적용하였다. 그런 후 조직절편을 세척하지 않고 부드럽게 blotting 한 후 1:400 희석도의 1차 항체인 rabbit anti-human fibronectin (DAKO, Denmark)과 mouse anti-human collagen type I (Santa cruz, California, U.S.A.), mouse anti-human integrin $\alpha_2\beta_1$ (DAKO, Denmark), 그리고 mouse anti-human integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 4°C에서 16시간 적용하였다. 그 후 PBS로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Verotor lab., U.S.A.)와 biotinylated horse anti-mouse IgG

(Verotor lab., U.S.A.)를 각각 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간동안 적용하였다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 수세하고 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액 (A:10 μ l, B:10 μ l in 1 ml PBS, Verotor lab., U.S.A.)에 조직절편을 실온에서 1시간동안 적용시켰다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분간 3회 세척한 후, pH 7.6인 0.05 M Tris-HCl buffer와 0.05% diaminobenzine (DAB) 및 0.01% hydrogen peroxidase 혼합용액에 3분 동안 실온에서 발색시켰다. 그리고 나서 Tris buffer, PBS 그리고 증류수에서 각각 10분 동안 순서대로 세척한 후, Harris hematoxyline으로 대조염색을 하고 Pemount (Polysciences, U.S.A.)로 봉입하였다.

III. 연구결과

1. 병리조직학적 소견

1) *in situ* 조직 소견

(1) 대조군

① 매식후 1주군

임플란트 주위로 골기질이 채워지고 있었으나 골조직은 치밀하지 않았다. 임플란트 계면 부위에 요철상을 보이는 두꺼운 골기질과 골기질 내에 막내성 골형성의 양상을 보이는 많은 골소주를 관찰할 수 있었다.

② 매식후 2주군

치밀골 조직에서는 1주에 비해 홈을 따라 골기질이 조밀하게 채워져 있었으나 해면골 주위에서는 아직까지 골조직이 치밀하게 형성되지 않았다.

③ 매식후 4주군

임플란트 계면을 따라 드문드문 무기질화가 일어난 얇은 골조직의 양상을 관찰할 수 있었으며 1주군과 2주군에서 관찰된 막내성 골형성의 골소주들은 관찰되지 않고 치밀골 조직이 거의 다 형성되었다.

④ 매식후 8주군

뼈의 표층에 위치하는 치밀골 조직은 임플란트 계면을 뺀 채우고 있었으나 해면골 조직은 난소절제로 인해 시간이 경과했음에도 불구하고 완전하게 형성되어 있지 않았다.

(2) 실험군

① 매식후 1주군

골조직이 임플란트 나사선 사이를 채우고 있었으나 계면의 끝부분까지는 다 채워지지 않았다. 대조군의 1주군에 비하면 골조직이 더 많아 보였다.

② 매식후 2주군

상당히 많은 치밀골이 임플란트의 나사선 사이에 형성되어

있었으며, 접촉면에서는 신생골이 드문드문 형성되고 있음을 관찰할 수 있었다. 대조군의 2주군에 비하면 접촉면에 더 많은 골조직이 형성되고 있었다.

③ 매식후 4주군

치밀골이 임플란트 나사선 사이를 다 채우고 있었으며 해면골 조직에서는 신생골이 생성되고 있었다. 대조군과는 큰 차이를 발견할 수 없었다.

④ 매식후 8주군

치밀골 조직이 임플란트 접촉면을 거의 다 채우고 있었으며 해면골 조직도 임플란트 나사선 사이를 채우고 있었고 치밀골 조직과 잘 연결되어 성숙된 뼈 형태를 보였다.

2) Modified Goldner's stain 소견

(1) 대조군

① 매식후 1주군

임플란트 계면 부위에 요철상을 보이는 두꺼운 골기질과 골기질 내에 막내성 골형성의 양상을 보이는 많은 신생 골소주를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

② 매식후 2주군

임플란트 계면 부위에 무기질화가 일어나지 않은 두꺼운 골기질 상태를 관찰할 수 있었으며, 요철상의 재생 부위에 연이어 있는 골수조직 공간에 1주군 보다 더욱 발달한 막내성 골형성의 조직상을 관찰할 수 있었으며 광화된 뼈를 나타내는 염색소견이 많이 관찰되었다.

③ 매식후 4주군

골기질 부위에 비석회화된 뼈를 나타내는 붉은 색의 양이 아직 나타나는 것으로 보아 활발히 골기질을 분비하고 있음을 알 수 있었다.

④ 매식후 8주군

치밀골의 상당 부분이 임플란트 계면 사이로 파고 들어가 있으나 표면에서는 비석회화된 골기질이 발견되는 것으로 보아 계속 신생골이 생기고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

(2) 실험군

① 매식후 1주군

임플란트의 계면에서 신생골의 형태가 나타나며 조금씩 광화된 뼈들이 전체적인 형태를 이루며 나타났다. 대조군에 비해 보다 많은 양의 광화된 골조직이 관찰된다 (Fig. 3).

② 매식후 2주군

치밀골 내에서 빈공간은 다소 관찰되지만 상당량의 광화된 골기질이 채워져 있음이 관찰되었다. 대조군 2주군에 비해 접촉면 부위에 더 많은 양의 골조직을 관찰할 수 있었다.

③ 매식후 4주군

광화된 치밀골이 임플란트 나사선 사이를 다 채우고 있었으나 대조군과의 큰 차이는 관찰되지 않았다.

④ 매식후 8주군

전반적으로 광화가 일어난 것을 관찰할 수 있었고 해면골의 일부에서 비광화된 부위가 나타나는 것은 골다공증으로 인해 골세포가 새로운 골형성을 위해 골기질을 분비하기 때문으로 생각된다. 대조군과의 큰 차이는 발견되지 않았다 (Fig. 4).

2. 면역조직화학 염색소견

1) 제1형 교원질 면역항체를 이용한 면역조직화학염색 소견 (Table 1)

(1) 대조군

① 1주군

신생골에서 제1형 교원질의 강한 염색성을 보이고 있었다. 난소절제로 인해 뼈 전체에 구멍이 많이 보였고 그로 인해 신생 골기질이 계속적으로 생기는 것 같아 보였다 (Fig. 5).

② 2주군

1주군에 비해 새로운 뼈들이 조직을 많이 메우고 있었으며, 이미 광화된 골기질 보다는 매식체에 접하고 있는 표면에서 새로운 골기질이 형성되었고 이곳에서 제1형 교원질의 발현이 왕성하였다.

③ 4주군

2주군에 비해 제1형 교원질의 발현이 떨어지지만 신생골이 자라는 곳에서는 계속적으로 발달이 되고 있었다.

④ 8주군

전반에 걸쳐 제1형 교원질이 고루 분포하고 있었으며 곳곳에서는 강한 염색성을 보이고 있었다 (Fig. 6).

(2) 실험군

① 1주군

흠을 메우고 있는 뼈 조직의 골막에서 강하게 발현되었고, 신생골에서 강하게 염색이 되고 있었다. 대조군 1주군에 비해서는 다소 염색성이 떨어지나 골막을 잘 이루고 있었고 이곳에서 제1형 교원질의 발현이 강하게 나타났다 (Fig. 7).

② 2주군

1주군에 비해 골기질 전반에 걸쳐 풍부하게 제1형 교원질이 발현되었다. 섬유성 세포들이 흠을 채워 골기질을 형성하는 곳에서 교원질이 발현되고 있음을 알 수 있었다. 발현 양상은 대조군 2주군과 비슷하였다.

③ 4주군

2주군에 비해 발현 정도가 전체적으로 떨어지며, 골막 주위와 신생 골기질에서 발현되고 있었다.

④ 8주군

제1형 교원질의 발현은 전체적으로 많이 감소하였고, 골세포의 세포막 근처에서 분비되는 양도 상당히 줄어들어 있었다 (Fig. 8).

2) Fibronectin 면역항체를 이용한 면역조직화학 염색소견 (Table 2)

(1) 대조군

① 1주군

흠을 메우기 위해 많은 섬유성 세포들이 자리를 메우고, 이 때 이 섬유성 조직에서 강한 fibronectin의 발현을 볼 수 있었다 (Fig. 9).

② 2주군

1주군에 비해 상당히 많은 신생골을 만들었고, 신생골 기질에서 강한 fibronectin의 발현과 골세포의 세포막 주변에서도 fibronectin의 발현을 관찰할 수 있었다.

③ 4주군

골기질이 성숙한 뼈의 양상을 보이며 골막과 신생 골기질에서 fibronectin이 약하게 발현되고 있었다.

④ 8주군

치밀골이 상당히 많이 형성되어 있으나, 난소절제로 인해 골기질에서 구멍이 많이 발견되며 골막을 따라 fibronectin의 발현이 약하게 나타났다.

(2) 실험군

① 1주군

골막과 신생골에서 많이 발현되었으며, 골세포 막주위와 canaliculi에서도 발현되는 것으로 보아 골세포 역시 fibronectin을 분비하는 것 같았다. 뼈 표면을 따라 놓여 있는 골모세포 주위로 강한 염색성이 보였다. 대조군에 비해 fibronectin의 발현 정도는 흠의 모양을 더 잘 형성하고 그 경계 부위로 fibronectin이 발현하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 10).

② 2주군

1주군에 비해 fibronectin의 발현이 더 강했다. 많은 골세포의 세포막 근처에서 강한 fibronectin의 염색성이 보였다. 골막과 섬유성 세포들 집단에서 분비되는 fibronectin을 관찰할 수 있었다. 대조군과 비교했을 때 fibronectin의 발현 정도는 조금 더 강하고 신생 뼈에서 많이 발현되는 것을 알 수 있었다.

③ 4주군

골막에서 강한 염색성을 보였으며, 신생된 뼈 조직에서 물결 무늬를 이루며, 강하게 발현되고 있었다. 2주군에 비해서는 발현이 다소 약하였다.

④ 8주군

골세포에서 발현은 약해지고 골막에서 발현은 여전히 강하게 염색되고 있었다. 난소절제에 의해 골기질에 구멍이 많이 생겨 있었고, 이 부분에서 다시 신생골이 형성 되어 fibronectin의 염색이 양성으로 나타나고 있었다.

3) Integrin $\alpha_2\beta_1$ 면역항체를 이용한 면역조직화학 염색조건 (Table 3)

(1) 대조군

① 1주군

뼈의 바깥쪽에 있는 골막으로부터 유래한 것으로 보이는 세포들이 흡을 메우고 있는 골기질 쪽으로 향하고 있어 보였으며, 이 세포들의 표면에서 integrin $\alpha_2\beta_1$ 의 발현이 보였고 신생 골기질에 존재하는 골세포의 표면에서 역시 integrin $\alpha_2\beta_1$ 의 발현이 보였다 (Fig. 11).

② 2주군

1주군에 비해 골막으로부터 더 많은 세포들이 이동했고, 이 세포들과 골세포의 세포막에서 integrin $\alpha_2\beta_1$ 의 발현이 강하게 나타났으며, 2주째는 골기질에 존재하는 모든 골세포의 표면에서 integrin $\alpha_2\beta_1$ 이 발현되고 있었다.

③ 4주군

2주군에 비해 세포의 양이 줄어들고, 골기질의 성숙도가 높으며 흡을 메우고 있는 골조직을 둘러싸고 있는 골모세포와 그로 인해 생긴 골기질 속에 매몰되어 있는 골세포에서는 integrin $\alpha_2\beta_1$ 가 발현되었으나 다른 골세포에서는 integrin $\alpha_2\beta_1$ 이 발현되고 있지 않았다.

④ 8주군

integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 발현하고 있는 세포를 거의 찾아볼 수가 없었다 (Fig. 12).

(2) 실험군

① 1주군

섬유성 조직을 채우고 있는 세포에서 간간히 발현되고 있었으나 발현은 미약하였다 (Fig. 13).

② 2주군

흡을 메운 골조직과 그 직하 조직에서 골세포는 integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 강하게 발현하고 있었다. 신생골을 형성하는 섬유성 조직에서는 integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 분비하는 세포가 매우 많은 것과는 달리 치밀골에서는 integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 발현하는 세포는 적었다.

③ 4주군

골기질은 거의 채워졌고, 흡을 메우고 있는 골막에 존재하는 세포와 골세포에서 여전히 강한 integrin $\alpha_2\beta_1$ 의 발현을 볼 수 있었다.

④ 8주군

골세포의 수도 줄어들었으며, integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 발현하는 세포는 거의 없었다. 몇몇 신생골형성이 진행되는 곳에서 integrin $\alpha_2\beta_1$ 을 발현하는 세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 14).

4) Integrin $\alpha_5\beta_1$ 면역항체를 이용한 면역조직화학 염색조건 (Table 4)

(1) 대조군

① 1주군

신생골기질을 만들기 위해 섬유성 세포들이 많이 모여 있었고, 이 세포들이 약하게 세포막에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하고 있었다.

② 2주군

섬유성 세포들에서 만들어진 신생골 조각 근처에 붙어 있는 세포들의 표면에서 강하게 발현되고 있었으며, 1주군에 비해서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하는 세포들이 많았고 신생골이 생기고 있는 골세포에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현이 강하게 나타났으며, 이미 형성되어 있는 골기질의 골세포는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하고 있지 않았다 (Fig. 15).

③ 4주군

골기질을 채우고 있는 세포에서는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현이 여전히 강했으나, 골세포에서는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현은 사라지고 있었다.

④ 8주군

흡을 메우고 있는 골기질은 거의 다 채워진 듯 보였으며 이 부분에 있는 골세포 역시 integrin $\alpha_5\beta_1$ 를 분비하지 않지만, 해면 뼈를 형성하고 있는 골기질에서 신생되고 있는 골조직에서는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 가 발현되고 있었다 (Fig. 16).

(2) 실험군

① 1주군

신생골기질을 만들기 위해 섬유성 세포들이 많이 모여 있었고, 이 세포들이 약하게 세포막에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하고 있었다. 대조군과 유사한 양상을 보였다.

② 2주군

신생골을 만들고 있는 섬유성조직에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현이 매우 많았고, 골세포의 세포막에서도 강하게 염색되었다. 골세포의 canaliculi 역시 염색되기 때문에 골기질이 염색된 듯 보였다 (Fig. 17).

Table 1. Collagen type I expression on regenerating bone after implantation on the tibia with machined smooth surface (MSS) implants and anodic spark deposition (ASD) implants

periods after implantation	MSS implants	ASD implants
1 week	++/+++	++/+++
2 weeks	+++	+++
4 weeks	++/+++	++/+++
8 weeks	++	++

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

Table 2. Fibronectin expression on regenerating bone after implantation on the tibia with machined smooth surface (MSS) implants and anodic spark deposition (ASD) implants

periods after implantation	MSS implants	ASD implants
1 week	+	++
2 weeks	++	+++
4 weeks	++	++/+++
8 weeks	++	++/+++

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

Table 3. Integrin $\alpha_2\beta_1$ expression on regenerating bone after implantation on the tibia with machined smooth surface (MSS) implants and anodic spark deposition (ASD) implants

periods after implantation	MSS implants	ASD implants
1 week	++	++
2 weeks	++/+++	++/+++
4 weeks	++	++
8 weeks	+	+

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

Table 4. Integrin $\alpha_5\beta_1$ expression on regenerating bone after implantation on the tibia with machined smooth surface (MSS) implants and anodic spark deposition (ASD) implants

periods after implantation	MSS implants	ASD implants
1 week	+	+
2 weeks	++	++
4 weeks	+ / ++	+ / ++
8 weeks	+	+

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

③ 4주군

임플란트와 접촉면에 있는 골막에 존재하는 세포에서는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 이 약하게 발현되었으나 다른 곳의 골세포에서는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현이 관찰되지 않았다.

④ 8주군

integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하는 세포를 거의 찾아볼 수가 없었다. 골 세포 역시 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 발현하지 않았다 (Fig. 18).

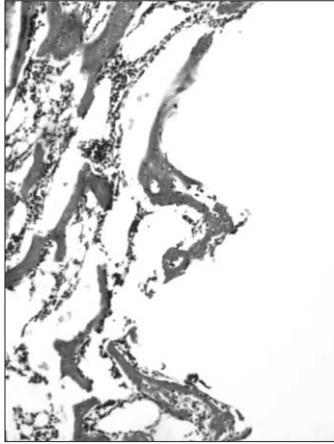


Fig. 1. Histologic findings at 1 weeks after implantation in control rat (Modified Goldner's trichrome stain $\times 200$).

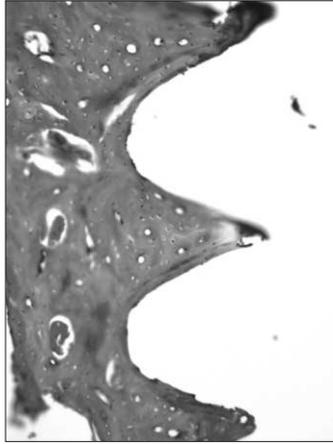


Fig. 2. Histologic findings at 8 weeks after implantation in control rat (Modified Goldner's trichrome stain $\times 200$).

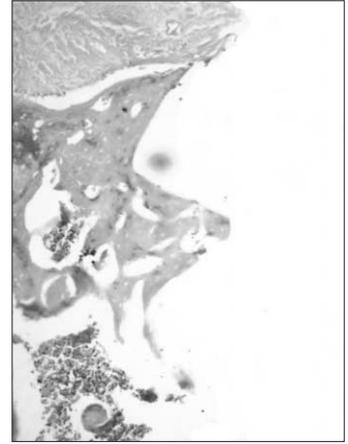


Fig. 3. Histologic findings at 1 weeks after implantation in experimental rat (Modified Goldner's trichrome stain $\times 200$).



Fig. 4. Histologic findings at 8 weeks after implantation in experimental rat (Modified Goldner's trichrome stain $\times 200$).

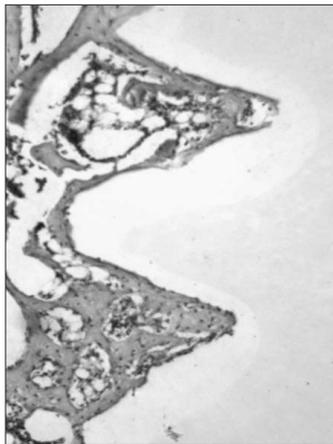


Fig. 5. Type I collagen antibody reaction at 1 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).



Fig. 6. Type I collagen antibody reaction at 8 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

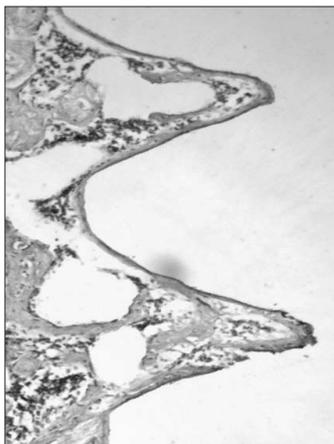


Fig. 7. Type I collagen antibody reaction at 1 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

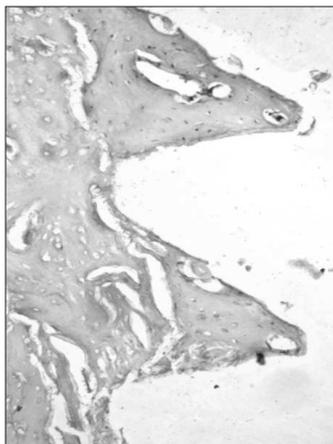


Fig. 8. Type I collagen antibody reaction at 8 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

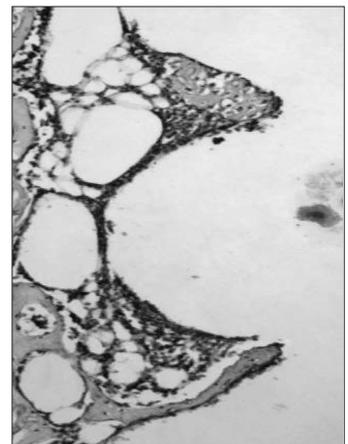


Fig. 9. Fibronectin antibody reaction at 1 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).

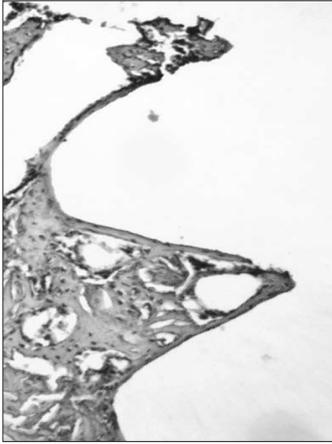


Fig. 10. Fibronectin antibody reaction at 1 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

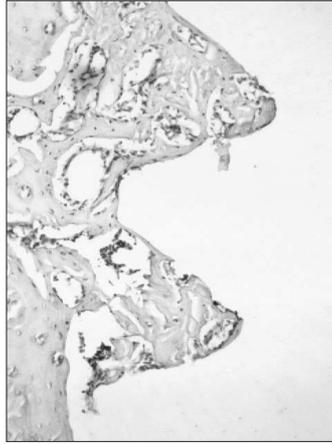


Fig. 11. Integrin $\alpha_2\beta_1$ antibody reaction at 1 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).

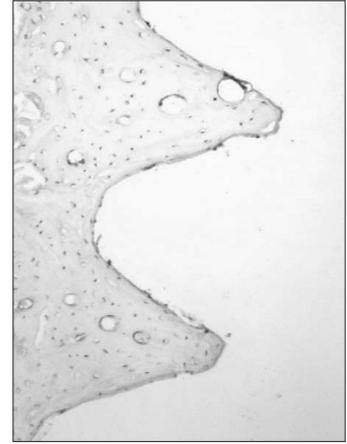


Fig. 12. Integrin $\alpha_2\beta_1$ antibody reaction at 8 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).

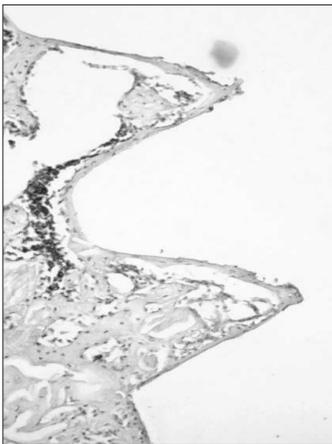


Fig. 13. Integrin $\alpha_2\beta_1$ antibody reaction at 1 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

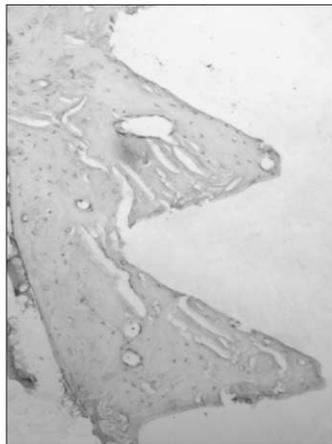


Fig. 14. Integrin $\alpha_2\beta_1$ antibody reaction at 8 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

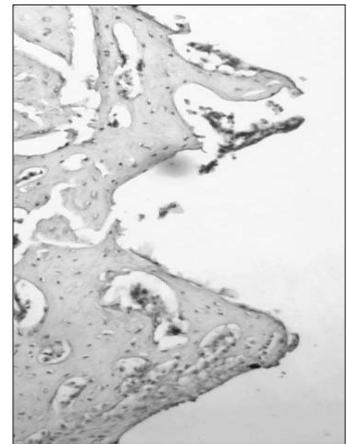


Fig. 15. Integrin $\alpha_5\beta_1$ antibody reaction at 2 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).

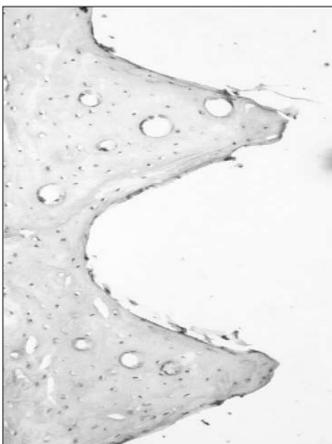


Fig. 16. Integrin $\alpha_5\beta_1$ antibody reaction at 8 weeks after implantation in control rat (original magnification $\times 200$).

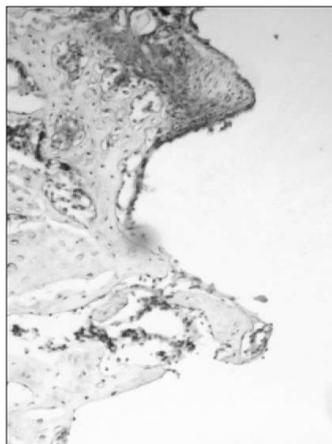


Fig. 17. Integrin $\alpha_5\beta_1$ antibody reaction at 2 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

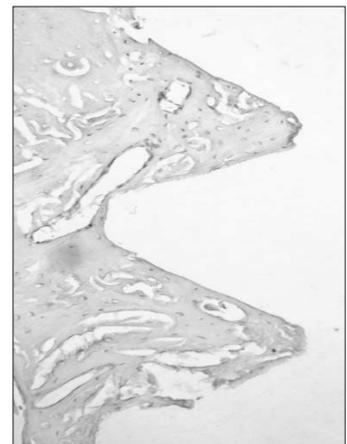


Fig. 18. Integrin $\alpha_5\beta_1$ antibody reaction at 8 weeks after implantation in experimental rat (original magnification $\times 200$).

IV. 총괄 및 고찰

인간의 평균 수명의 증가로, 골다공증에 이환되는 비율도 급격히 증가하고 있으며, 특히 여성의 경우 폐경 이후 골다공증에 이환될 가능성이 높다. 여성에게서 폐경 이후 흔히 나타나는 골다공증은 골흡수와 골형성의 균형이 맞지 않는 골대체 과정의 이상을 특징으로 하는 질환이다. 여성호르몬(estrogen)의 결핍에 의해 골흡수가 증가하고, 골조직으로의 칼슘의 흡수가 감소됨으로써 발생하는데 칼슘의 평형은 체내에서 들어 오고 빠져나가는 양으로 조절되며 칼슘의 저장고인 골격계에 칼슘양이 부족하거나 과도한 양이 빠져나갈(negative balance) 때, 골량은 감소하게 되고 골다공증에 의한 골절이 쉽게 일어나게 된다. 폐경기 이후의 골다공증 발생에 대한 병리 기전에 대해 생물학적으로나 생화학적으로 많은 연구가 진행되고 있는 상태이다¹⁰.

전신적으로 나타나는 골다공증이 치조골의 질과 양에 영향을 미칠 수 있다는 것에도 논쟁의 여지가 많다. 골다공증을 진단 받은 여성을 대상으로 연구한 Kribbs 등¹¹은 척추 및 요골의 골밀도와 하악골의 골밀도 사이에 상관관계가 있다고 하였고, 50세 이상의 여성을 대상으로 한 연구에서도 하악골과 척추 및 요골의 골밀도 사이에 상관관계가 있음을 보고하였다. 이와는 대조적으로 von Worem 등¹²은 신장염을 진단 받은 환자 18명의 척추와 요골에서의 골밀도는 하악골의 골밀도와 관련이 없다고 하였고 Klemetti 등¹³도 무치악의 폐경기 여성을 대상으로 조사하였을 때 척추와 대퇴골의 골밀도가 하악골의 골밀도와 관련이 없음을 보고하였다. 국내의 연구로 한 등¹⁴은 폐경기 골다공증을 진단받은 여성의 상악골 골밀도가 폐경 후 정상으로 진단 받은 여성에 비해 현저하게 감소되는 양상을 보고하였다.

난소절제 백서의 경골을 실험한 Turner 등¹⁵은 생체 내 에스트로겐의 골형성과 유전자 발현에 대한 상관관계를 연구한 결과, 에스트로겐 결핍 시 골 성장이 저하되며, 골막 세포에서 골기질 단백질 유전자의 발현이 차단됨을 관찰하였다. Johnson 등¹⁶은 난소 절제된 양을 대상으로 관찰한 결과, 에스트로겐의 결핍이 치조골 소실에 영향을 주는 전신적 인자가 될 수 있음을 보고하였다.

폐경 이후의 뼈 변화를 연구하기 위해 난소절제한 백서를 많이 이용하고 있는데 Kalu¹⁷는 12개월 정도의 난소절제한 백서(aged rat model)가 폐경 이후의 뼈 변화를 가장 잘 나타내는 동물 모델이기는 하지만 비용문제, 적합성의 제한 그리고 난소절제 후 뼈에 반응이 나타날 때까지는 상당한 기간이 소요되므로 약 3개월 정도 된 백서(mature rat model)를 이용하면 난소절제 후 적어도 1개월 이내에 뼈 소실을 나타내므로 난소 호르몬 결핍에 의한 뼈 변화의 연구에 어린 백서가 많이 이용된다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 10주령에서 난소를 절제하고 난소절제 후 5주가 되는 때 임플란트를 매식하여 그 경과를 관찰하였다.

노인성 골다공증의 경우 피질골이 얇아지는 양상을 보이는

반면 폐경기 여성의 골다공증의 경우 에스트로겐 결핍이 가장 중요한 병인이므로 이에 따른 해면골의 소실이 가장 현저하다. 본 실험에서도 대조군과 실험군 모두에서 피질골보다는 해면골에서 더 많은 변화가 관찰되었으며 실험이 진행됨에 따라서 해면골 골기질에 많은 뼈 흡수 소견이 관찰되었으며, 임플란트의 매식 후 치유과정에서 골모세포의 활성이 2주군에서 강하게 나타난 것과 함께 전 군에 걸쳐 골세포의 활성이 함께 관찰되었고, 실험 후기에도 골세포는 여전히 뼈의 형성에 중요한 역할을 하고 있었다. 이는 난소절제로 인해 골다공증이 나타난 경우 일반적인 뼈에서 새로이 활성화된 골모세포의 역할 못지않게 기존의 골세포들도 임플란트 골유착에 중요한 역할을 할 것이라 추측할 수 있다.

골내 임플란트의 초기 성공은 골유착 정도에 가장 큰 영향을 받는다. 골유착에 영향을 미치는 인자로는 임플란트 재료, 임플란트의 형태 및 표면상태, 외과적 술식, 매식부 골질과 골량, 전신적 건강상태, 구강위생상태 등이 있으며, 임상에서의 성공적인 결과에 영향을 줄 수 있는 이들 모든 인자에 대한 전반적인 지식이 필요하다¹⁸.

임플란트 재료로서 요구되는 성질은 생체적합성, 부식에 대한 저항성, 내구성, 무독성 및 적절한 물성 등이 있으며 이러한 요구조건에 맞는 재료로 가장 많이 사용되는 것이 티타늄이다. 매식체 재료로 주로 사용되는 티타늄은 조직과의 접촉이 두께 50-100Å 정도의 TiO₂ 표면 산화물에서 이루어지며, 다른 금속에 비하여 높은 유전상수(dielectric constant)를 갖고 있어 생체 조직 간의 분자들과 1~10 kcal/mol 정도의 약하지만 긴 범위의 Vander Waals 결합을 갖는다고 한다. 또한 산화 현상, 수산화물 형성, 무기이온의 성장으로 10-100 kcal/mol의 강한 화학적 결합을 하게 된다고 보고되어 있다¹⁹.

임플란트의 형태와 표면처리방식은 임플란트 매식시 초기 안정에 영향을 미치며 기능시의 임플란트-골조직 계면에서의 교합압 분산에 영향을 주어서 임플란트의 성공에 중요한 인자라고 알려져 있다²⁰. 임플란트의 표면을 처리하는 방식은 ceramic이나 티타늄을 사용하여 anodic oxidation, plasma oxidation, plasma cleansing 및 vapor cleansing 등의 방법을 사용한다. 초기 Adell 등과 Brånemark 등은 순 티타늄의 절삭에 의해 표면에 TiO₂ 막이 형성된 나선형 임플란트를 사용하였다. 그러나 근래 임플란트 표면에 티타늄 분말을 소결(sintering)하거나, titanium plasma spray (TPS) 방식, 조밀한 HA 피복, Al₂O₃ 등으로 blast하는 방법 등을 사용하여 골조직과의 접촉 면적을 증가시켜 임플란트의 초기고정과 골유착을 증대시키고, 교합압을 분산시키려는 다각적인 노력이 시도되고 있다²¹⁻²⁵.

TPS 방식으로 표면처리한 티타늄 임플란트는 표면이 거친 임플란트의 대표적인 형태로서 많은 문헌들에서 새로운 표면처리의 비교 대상이 되었다. 1998년 ITI 사에 의해 소개된 SLA (Sand-blasted, Large grit, Acid-etched) surface는 20~40 μm의 표면 거칠기를 지니고 있으며, 더 거친 TPS 방식 보다 높은 골-임플란트 접촉을 보여주었다²⁶. 많은 문헌들이 TPS 방식의 표면처리보다 SLA 방식의 표면처리가 우수한 결과를 보이고 있으며

Cochran DL 등²⁶⁾의 보고에 따르면 초기 3개월간 SLA 표면처리가 TPS 표면보다 높은 빈도의 골-임플란트 접촉을 보이며, 6개월째 차이가 없는 것처럼 관찰되지만 12개월 후에는 훨씬 높은 골-임플란트 접촉을 보인다고 하였다.

양극산화(anodic oxidation) 표면 처리법은 티타늄의 표면을 처리하는 한 방법으로 인산염과 칼슘 이온을 함유하는 전해질 수용액 중에서 양극산화에 의해 산화 피막을 치밀화하고 절연 파괴(dielectric breakdown)에 의한 불꽃 방전(spark discharge)으로 표면에 1~5 μm 범위의 기공(pore)을 형성하여 다공질화 한 다음 열수처리(hydrothermal treatment)에 의해 HA 결정을 표면에 석출하는 피막 형성법이다.

실험적 연구에서 Rocci A 등²⁷⁾은 기계적 표면처리 된 표면보다 양극산화 표면처리 된 임플란트에서 높은 골-임플란트 접촉을 보여주었다. Ivanoff CJ 등²⁸⁾은 TiO_2 의 산화막 두께가 증가할수록 강한 뼈와의 결합을 보인다고 하였고, Glauser R 등²⁹⁾은 상악 구치부에서 짧은 치유기간 만으로도 좋은 뼈 결합이 나타난다고 하였으며, Friberg B 등³⁰⁾에 의한 전향적 연구에서 양극산화 처리한 TiUnite™ (Nobel Biocare® TiUnite™) 임플란트는 early cumulative survival rate (CSR)가 99.7%에 이른다고 하였다. Lim 등³¹⁾에 의한 연구에 따르면, SLA 표면 처리된 티타늄 임플란트와 양극산화 표면 처리된 티타늄 임플란트의 조직학적인 소견을 비교하여 양극산화 표면 처리된 임플란트가 다소 높은 골-임플란트 접촉을 보였으나 통계학적인 유의성은 없다고 하였다.

본 연구에서는 대조군을 순 티타늄 (Commercially Pure titanium - Grade 3)으로 외경 2.0 mm, 길이 3.5 mm, pitch-height 0.4 mm를 가지도록 선반 가공하여 평활한 표면(machined smooth surface)이 되도록 하였는데, 이러한 형태가 일반적으로 임플란트의 기본 형태로 인식되기 때문이다.

실험군으로 사용한 임플란트는 대조군과 같은 재질과 디자인을 가지고 있으며, 양극 불꽃 방전법을 이용하여 안정하고 균일한 산화피막을 형성한 것이다. 양극 산화를 거친 후 산화 피막 내에 존재하는 칼슘과 인의 결정화를 위해서 열수처리 과정을 거치면 HA 결정이 석출된다. 이러한 결정이 석출된 표면은 열수 처리를 하지 않은 표면에서보다 우수한 생체활성을 나타낸다.

실험군의 임플란트 매식체는 ATLAS System™ (Cowell medical CO., LTD. 부산, 대한민국)이 가지고 있는 양극 불꽃 산화법(anodic spark deposition method)으로 동일한 표면처리를 하도록 하였다. ATLAS implant의 표면은 미세나사부위(microthread area)에서 0.2~0.5 μm 의 미세기공(micro-pore)을 갖도록 하고 implant 본체 나사에서 0.2~2 μm , 근단의 절삭날 부위에서 0.2~6 μm 의 기공을 갖도록 처리되며, 티타늄 산화막의 최대 표면 거칠기(R_{max})는 7.5 μm 이고 평균 표면 거칠기는 1.0 μm 이다. 티타늄 산화막의 두께는 미세나사 부위에서 1.2~1.6 μm , 본체 나사 부위에서 2.5~5.2 μm , 근단 절삭날부위에서 0.4~0.8 μm 를 가진다.

백서를 이용하여 골유착의 정도를 관찰하는 방법에 대해 Clokie와 Warshawsky³²⁾는 백서를 실험모델로 이용하는 것을 추천

하면서 6주경 골유착이 일어난다고 하였는데, 본 실험에서도 8주군 모두에서 골유착이 일어난 것을 관찰할 수 있었다. 한편 Baron등³³⁾은 백서의 골회복 능력을 연구하여 12주된 백서의 골회복 능력이 인간의 성인에서의 골회복 능력과 유사하다고 보고하여, 본 연구에서도 10주령에 난소절제를 시행하고 15주령에 임플란트를 매식하였다.

세포는 다양한 세포외기질을 생산하고 세포외영역으로 분비한다. 세포외기질은 세포표면과 결합하는 영역을 가지고 있으며 세포외영역에서 접촉체처럼 작용하여 여러 조직을 서로 지탱시켜준다. 세포외기질에 대한 세포의 부착은 세포의 성장, 분화 그리고 전이과정 중인 종양세포의 침윤과 같은 다양한 생물학적 과정과 관련되어 있다³⁴⁻³⁶⁾.

제1형 교원질은 뼈의 주된 유기질 구성성분이며, 골세포 표현형의 발현에 영향을 미치고 골모세포 표현형의 성장발현 및 광화된 기질의 형성에 기초가 된다고 알려져 있다³⁷⁾. Lynch 등³⁸⁾은 제1형 교원질 배지에서 백서 두개골에서 채취한 골모세포가 대조군에 비해 더욱 빠르고 향상된 분화도를 보이는 표현형이 발현된다고 보고하였으며, 제1형 교원질이 세포외기질의 광화를 촉진한다고 하였다. 따라서 임플란트 매식 후 인접 골형성 조직에서 제1형 교원질의 발현 정도를 보는 것은 골 형성 진행 정도 및 광화 정도를 파악할 수 있는 하나의 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 제1형 교원질의 발현 정도는 실험군이나 대조군에서나 비슷하였으며, 양쪽 모두 2주군에서 많이 발현되는 경향을 보였다. 양극산화 표면처리된 임플란트가 신생골조직에서 제1형 교원질의 발현에는 대조군과 큰 차이를 보이지 않는다.

세포외 기질 중 당단백의 하나인 fibronectin은 440 kDa의 고분자로서 세포외 기질과 기저막 및 혈액 등 여러 부위에 걸쳐 분포하며, 다른 세포외 기질 성분과 상호 작용하거나 세포의 세포 표면 수용기에 부착하여 세포와 세포 사이 혹은 세포와 세포외 기질사이의 상호작용 등 여러 가지 작용을 하며 창상 치유 초기에 많이 발현하는 것으로 알려져 있다. Nordahl 등³⁹⁾은 성장중인 백서의 뼈에서 fibronectin의 분포를 관찰하여 fibronectin이 골형성 초기에 세포외 기질의 무기질화에 중요한 역할을 한다고 하였으며, Moursi 등⁴⁰⁾은 fibronectin이 TGF- β 와 상호 작용하여 골형성에 중요한 역할을 하며, 또한 integrin $\alpha_5\beta_1$ 와 선택적으로 결합하여 골모세포의 생존과 분화를 조절하는 기능을 가지고 있다고 주장하였으며 또한 골모세포의 분화 초기에 fibronectin의 세포부착영역에 골모세포가 부착하여 이로 인해 골모세포의 분화가 촉진된다고 하였다. 따라서, fibronectin은 골형성 초기에 강하게 발현하여 골모세포의 성숙 및 분화에 영향을 주어 골의 형성을 촉진시키는 물질이라고 생각되어지며 임플란트 매식 후 인접 골형성조직에서 fibronectin의 발현 정도를 살펴보는 것도 현재 골형성의 진행 정도를 파악할 수 있는 하나의 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 대조군과 실험군에서 fibronectin의 분포를 관

찰한 결과 대조군에서는 fibronectin의 발현이 2주에서 강하게 발현되다가 4주부터는 발현 정도가 줄어들었다. 실험군에서 fibronectin의 발현은 대조군에 비해 다소 강하게 발현하지만 유의성은 없어 보인다. 두 군에서 큰 차이는 보이지 않았지만, 이들 결과로 제1형 교원질과 fibronectin은 신생골의 생성이 가장 활발한 2주군에서 많이 발현되는 것으로 보아 신생골 형성과 그것의 광화에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

세포외기질에 대한 세포의 부착은 세포의 부착 수용체와 기질의 구성성분과의 복잡한 결합상호작용을 수반한다. 세포들의 부착행동은 그 세포의 표면에서 발현되는 여러 종류의 부착 단백질과 세포를 둘러싸고 있는 세포외기질의 구성성분에 의존한다. 이러한 세포부착단백질로서 integrin은 가장 잘 알려진 단백질이다. Integrin은 이량체로 구성된 세포표면 분자로서 collagen, fibronectin 그리고 vitronectin과 같은 다양한 세포외기질과 상호작용한다. integrin $\alpha_2\beta_1$ 은 collagen에 대한 중요한 수용체로서 혈소판과 다양한 세포에 존재한다. Integrin $\alpha_2\beta_1$ 의 신호전달기능은 아직 잘 알려져 있지 않지만, collagen과 결합하게 되면 세포의 다양한 활성을 띠는 것으로 알려져 있다^{41,42}. 그리고 integrin $\alpha_5\beta_1$ 은 fibronectin을 인지하는 가장 대표적인 세포막 단백질로 알려져 있으며, fibronectin에 있는 Arg-Gly-Asp (RGD) 서열을 인지하여 그곳에 특이적으로 부착한다. 이러한 결합으로 통해 세포는 활성을 갖게 되고 또한 이동이 가능하게 된다⁴³.

본 실험에서는 신생골을 형성하기 위해 이동하는 세포들의 integrin $\alpha_2\beta_1$ 과 $\alpha_5\beta_1$ 의 발현을 살펴보았다. 실험군과 대조군에서 큰 차이점은 관찰되지 않았지만, 이들 세포부착 단백질들의 발현은 골기질에서 생성되는 제1형 교원질과 fibronectin의 양과 일치함을 보이고 있다. 즉 2주군에서 제1형 교원질과 fibronectin의 발현이 증가는 뼈조상세포의 이동을 위한 발판이 되어 이때 이동하는 많은 세포들이 integrin을 세포막에 발현하여 골기질에 부착하고 이동하고 그리고 최종의 위치에 도달한 후 골모세포로 분화할 것으로 생각된다.

본 연구는 순 티타늄 나사형 임플란트와 이것을 양극산화 처리한 후 각각 뼈에 매식하였을 때, 골기질의 발현 정도는 차이점을 보이지 않았지만, 각 기질을 인지하는 세포막부착 단백질의 발현과 일치하는 점이 의미가 있으며, 조골모세포가 이동하여 신생골조직에서 골모세포로 분화하고 그곳에서 새로운 골기질을 생성해 내는 과정에 대해서는 앞으로 더 연구가 진행되어야 할 것이라 생각된다.

V. 결 론

난소를 절제하여 에스트로겐 분비 억제로 인해 골다공증이 유발된 백서에 평활한 표면을 가지는 나사형 임플란트와 양극산화법으로 표면처리한 나사형 임플란트를 식립하고 1주, 2주, 4주 및 8주 경과 후 각각 희생하여 병리조직학적으로 분석하고 제1형 교원질, fibronectin, integrin $\alpha_2\beta_1$ 과 integrin $\alpha_5\beta_1$ 면역항체를 이용한 면역조직화학적 소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 병리조직학적 소견상 실험군과 대조군의 조직반응은 유사하게 나타났으나 실험군의 1주군과 2주군은 초기 대조군에 비해 골기질이 임플란트의 주변에 더 많이 형성된 것을 관찰하였다.
2. 제1교원질과 fibronectin의 발현은 실험군이 대조군에 비해 조금 더 강하였지만 유의성은 없었으며, 두 군 모두 2주군에서 가장 많이 발현되었고, 그 후로는 감소되는 경향을 관찰하였다.
3. 제1교원질과 fibronectin에 대해 각각의 특이적인 세포부착 단백질인 integrin $\alpha_2\beta_1$ 과 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 발현도 실험군과 대조군이 유의한 차이를 보이지 않았다. 이들 역시 2주군에서 발현이 증가하였고, 그 후로는 감소하는 경향을 관찰하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 난소를 절제한 백서의 경골에 식립한 임플란트의 주위골 반응에서 양극산화 표면 처리한 임플란트와 뼈 사이의 접촉은 대조군과 비교했을 때, 전체적으로 유사하였다. Fibronectin과 제1형 교원질, Integrin $\alpha_2\beta_1$, integrin $\alpha_5\beta_1$ 면역항체를 이용한 면역조직화학적 소견에서는 초기 골형성에 양극산화 표면 처리한 임플란트가 다소 유리하게 관찰되었으나 전체적으로 큰 차이는 없었고, 이는 상당히 진행된 골다공증이 있는 경우 우수한 표면 처리만으로는 기대할 만한 좋은 결과를 얻기 어려울 것이라 예상할 수 있다. 따라서 진행된 골다공증이 있는 뼈 상태에서는 전신적인 골다공증의 치료가 선행되거나 병행되어 숙주의 뼈 상태를 개선시킨 후 임플란트를 매식하여야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 윤상호, 김정구: 폐경 후 골다공증의 최신 치료 : 대한산부회지 2005;48(4):844-857.
2. 통계청: 「장래인구추계」: 대한민국 통계청. 서울, 2001.
3. 통계청: 「2005 고령자 통계」: 대한민국 통계청. 대전, 2005.
4. 보건복지부: 「보건복지통계연보」: 대한민국 보건복지부. 과천, 2004.
5. Riggs BL, Melton LJ: The prevention and treatment of osteoporosis. *New Eng J Med* 1992;27:620-627.
6. Kribbs PJ, Chesnut CH III, Ott SM, Kilcoyne RF: Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent* 1989;62:703-7.
7. Fini M, Cigada A, Rondelli G *et al*: *In vitro* and *in vivo* behavior of Ca and P enriched anodized implants. *Biomaterials* 1999;20:1587-1594.
8. Xiaolong Zhu, Jun Chen, Lutz Scheideler *et al*: Effect of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 2004;25:4087-4103.
9. Fini M, Giavaresi G, Rimondini L *et al*: Titanium alloy osseointegration in cancellous and cortical bone of ovariectomized animals; histomorphometric and bone hardness measurements. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:28-37.
10. 민용기: 골흡수의 생화학적 표지자. *대한골대사학회지* 1994;1:240-245.
11. Kribbs PJ, Chestnut CH, Ott SM, Kilcoyne R: Relationship between mandibular and skeletal bone in osteoporotic population. *J Prosthet Dent* 1989;62:703-704.
12. von Wöern N, Kollerup G: Symptomatic osteoporosis : a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J Prosthet Dent*

- 1992;67:656-660.
13. Klemetti E, Vainio P, Lassila V, Alhava E: Trabecular bone mineral density of mandible and alveolar height in postmenopausal women. *Scand J Dent Res* 1993;101:166-170.
 14. 한은영, 류인철, 이용무 등: 골다공증과 악골의 골밀도 및 치주 질환과의 상관관계. *대한치주과학회지* 2001;31(3):565-570.
 15. Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU: Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone* 1995;17(4):421-427.
 16. Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, *et al*: Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *J Periodontol* 1997;68(9):864-871.
 17. Kalu DN: The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* 1991;15:175-192.
 18. Meredith N: Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont* 1998;11:491-501.
 19. Steinemann SG: Titanium- the material of choice? *Periodontology* 2000 1998;17:7-20.
 20. Kohn DH: Overview of factors important in implant design. *J Oral Implantol* 1992;18:204-219.
 21. Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Todescan R: The Endopore implant enhanced osseointegration with a sintered porous-surfaced design. *Oral Health* 1998;88:61-64.
 22. Caulier H, Vercaigne S, Naert I, *et al*: The effect of Ca-P plasma-sprayed coatings on the initial bone healing of oral implants: An experimental study in the goat. *J Biomed Mater Res* 1997;34:121-128.
 23. Biesbrock AR, Edgerton M: Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:712-720.
 24. Cook SD, Thomas KA, Dalton JE *et al*: Hydroxylapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. *J Biomed Mater Res* 1992;26:989-1001.
 25. 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;30:251-260.
 26. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A *et al*: Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998;40:1-11.
 27. Rocci A, Martignoni M, Burgos PM *et al*: Histology of retrieved immediately and early loaded oxidized implants: light microscopic observation after 5 to 9 months of loading in the posterior mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2003;5(Suppl 1):88-98.
 28. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C *et al*: Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:341-348.
 29. Glauser R, Portmann M, Ruhstaller P *et al*: Stability measurements of immediately loaded machined and oxidized implants in the posterior maxilla(A comparative clinical study using resonance frequency analysis). *Applied Osseointegration Research*. 2001;2(1):27-29.
 30. Friberg B, Billstrom C: Preliminary results of a prospective multicenter clinical study on TiUnite implants. *Applied Osseointegration Research* 2002;3(1):29-31.
 31. Svetlana Lim, Seong-Joo Heo, Chong-hyun Han *et al*: Histologic response of anodized titanium implant. *대한치주과학회지* 2005;35(3):525-535.
 32. Clokie CM, Warshawsky H: Development of a rat tibia model for morphological studies of the interface between bone and a titanium implant. *Compendium* 1995;16:56-66.
 33. Baron R, Tross R, Vignery A: Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec* 1984;208:137-145.
 34. Thiery JP, Duband JL and Tucker GC: Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Ann Rev Cell Biol* 1985;1:91-113.
 35. Liotta LA: Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. Rhoads Memorial Award Lecture *Cancer Res* 1986;46:1-7.
 36. Hay ED: Cell biology of extracellular matrix. 2nd eds. Plenum press, New York and London, pp111-124, 1991.
 37. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V *et al*: Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143(3):420-30.
 38. Lynch MP, Stein JL, Stein GS *et al*: The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216(1):35-45.
 39. Nordahl J, Mengarelli-Widholm S, Hultenby K, *et al*: Ultrastructural Immunolocalization of Fibronectin in Epiphyseal and Metaphyseal Bone of Young Rats. *Calcif Tissue Int* 1995;57:442-449.
 40. Moursi AM, Damsky CH, Lull JC, *et al*: Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 1996;109:1369-1380.
 41. Keely PJ and Parise LV: The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem* 1996;271(43):26668-26676.
 42. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y *et al*: Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* 1997;272:63-68.
 43. Pytela R, Pierschbacher MD and Ruoslahti E: Identification and isolation of a 140 kilodalton cell surface glycoprotein with properties of a fibronectin receptor. *Cell* 1985;40:191-198.