

## 타이타늄 표면에 항생제를 함유한 생분해성 고분자 물질의 코팅에 따른 약물방출 및 항균효과

김우현<sup>1,2</sup>, 이상배<sup>1</sup>, 이용근<sup>1,2</sup>, 김경남<sup>1,2</sup>, 김광만<sup>1,2\*</sup>

연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소<sup>1</sup>, 두뇌21 연세치과의학 사업단<sup>2</sup>

### The Drug Release and Antibacterial Effects on Titanium Surface According to Biodegradable Polymer Coating with Antibiotics

Woo-Hyun Kim<sup>1,2</sup>, Sang-Bae Lee<sup>1</sup>, Yong-Keun Lee<sup>1,2</sup>, Kyoung-Nam Kim<sup>1,2</sup>, Kwang-Mahn Kim<sup>1,2\*</sup>

*Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering, College of Dentistry, Yonsei University<sup>1</sup>, Seoul, Republic of Korea, Brain Korea 21 Project, Yon-sei University College of Dentistry<sup>2</sup>, Seoul, Korea.*

(Received: Dec. 11, 2009; Revised: Feb. 8, 2010; Accepted: Mar. 9, 2010)

#### ABSTRACT

Titanium and titanium alloys are the most common materials used for dental and biomedical implants, owing to their biocompatibility and favorable mechanical properties. However infection of the region surrounding a implant by pathogenic microorganisms is a significant factor in implant failure. Currently, a number of studies to create antibacterial surfaces of dental implants and biomaterials are being reported and commercially applied. Prevention and control of microbial colonization of implant surfaces is therefore of considerable interest to the biomedical community. One of the solutions, various biodegradable polymeric drug delivery devices have been developed for the sustained release of a variety of drugs. Among them, films as implantable drug delivery systems have gained growing interest in various applications. The purpose of this study was to confirm the release of antibiotics and antibiotic effects of titanium surface which coated with biodegradable polymer and different concentrations of tetracycline. Anodized titanium specimen (diameter 8 mm, height 2 mm) were coated with poly(lactide) acid solution (1%) containing different concentrations of tetracycline (0.0%: Group I, 0.1%:Group II, 0.5%:Group III, 1.0%: Group IV). The coated specimen's surface were observed by scanning electron microscope. For the analysis of drug release, the specimens were inserted in distilled water and then the solution was measured for 3 hours, 6 hours, 12 hours, 1 days, 3 days, 7 days, 14 days using the ultraviolet spectrometer. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* was tested with the agar diffusion method. Scanning electron microscope image showed that polymer coating layers fulfilled the titanium surface. The most of tetracycline released within 6 hours and then continued until 2 weeks. Regarding the antibacterial effect for *Staphylococcus aureus*, the specimens showed inhibitions of the strain with larger zones for the higher tetracycline concentration (Group I < Group II < Group III < Group IV). Conclusions: The results of this in vitro investigation demonstrated that tetracycline and poly(lactide) acid solution coated titanium specimens exhibited antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*.

**KEY WORDS:** Anodic oxidation, Drug delivery system, Biodegradable polymer, Antibiotics

#### 서론

치과용 임플란트는 치아 손실에 대한 적절한 치료방법 중 한 방법으로 다양한 타이타늄 표면처리를 통하여 10년 이상

\* 교신저자: 서울특별시 서대문구 성산로 250 연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 505호, 김광만

Tel. 02-2228-3082, E-mail: kmkim@yuhs.ac

\* 본 연구는 2008년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(08142 의로기 356)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

의 장기간 이식 성공률(89% 이상)을 보고하였다(Lekholm 등, 1999; Snauwaert 등, 2000; Esposito 등, 1998; Rosenberg 등, 2004). 하지만 높은 성공률에도 불구하고 5~11%가 골과 결합하지 못하고 구강 내에서 제거된다고 보고하였다(Klinge 등, 2005). 이러한 실패의 원인은 크게 생역학적, 생물학적 실패 2가지로 분류할 수 있다.

생역학적 실패는 임플란트와 골과의 결합력보다 더 큰 기능적인 힘(예 이갈이/이악물기 등)이 작용하거나 임플란트 자체적 결합에 따른 파절에 의해서 나타난다(O' Mahony 등, 1999; Tonetti 등, 1999). 생물학적 실패는 세균성 치태의 축적에 따른 감염, 감각이상, 임플란트 주변의 섬유화로서 나타난다(Quirynen 등, 2002; Teughels 등, 2006). 생물학적 실패는 실패기간에 따라 초기 실패와 후기 실패로 분류할 수 있다. 초기 실패는 술 후 1년 이내에 일반적으로 발생하며 수술기구의 오염 또는 불완전한 치료과정에 따른 치과용 임플란트의 감염이 주원인이다(Snauwaert 등, 2000). 후기 실패는 일반적으로 1년 이후에 나타나며 세균에 의한 만성 염증반응(plaque-induced peri-implantitis)이 주원인으로 알려져 있다(Mombelli, 1999; Quirynen 등, 2003).

치과용 임플란트의 세균 감염은 지속적인 염증반응을 야기시켜 임플란트와 골과의 결합을 파괴시킨다. 이러한 세균 감염은 구강 내 자연치나 보철 수복물 표면에 존재하는 bio-film의 한 종류인 치태(dental plaque)에 의해서 유발되는 것으로 알려져 있다. 치태 내에는 1000여 종 이상의 다양한 세균들이 세포외 기질(extracellular polysaccharide matrix, EPS matrix)로 둘러싸여 서식하고 있다(Cate, 2006). 평상시에는 이러한 세균들은 염증을 유발시키지 않으며 항상성을 유지하다가 어떠한 특정조건(산을 생산하는 세균 및 혐기성 세균 수의 증가)하에 놓이게 되면 치아우식 및 치주질환을 유발하게 된다. 일단 질환이 발생하면 EPS matrix가 보호벽을 형성하여 세균을 보호하기 때문에 감염을 치유하는 것이 매우 어려워진다. 이러한 요인 중 세균 감염에 따른 부

작용을 해결하기 위하여 최근 항생제를 함유하는 생분해성 고분자물질을 임플란트 표면에 코팅하는 다양한 연구가 진행되고 있다(Gursel 등, 2001; Rabih 등, 2007). 세균에 따른 감염 치료를 위해서는 효과적인 약물농도와 지속적인 약물방출이 중요한데 이들을 조절하기 위하여 다양한 매개체가 사용되고 있다. 대표적인 매개체로는 poly(lactide) acid(PLA), silica sol-gel, chitosan 등이 있으며 이들은 생체 내에서 분해되기 때문에 추가적인 제거가 필요없는 장점을 가지고 있다(Zhao 등, 2009). 이러한 매개체에 다양한 항생제를 주입시켜 연구가 진행되고 있으며 대표적인 항생제에는 tetracycline(TC), doxycycline, minocycline, chlorhexidine, metronidazole 등이 사용되고 있다. 이러한 국소적인 약물 치료는 전신적인 약물치료에 비해서 항생제의 투여량이 상대적으로 작기 때문에 항생제 내성을 일으킬 가능성이 적고, 치료부위에 직접 약물을 투여함으로써 효과적인 약물 방출의 장점을 갖는다(Duran, 2000).

따라서 본 연구에서는 항균 효과를 갖는 임플란트를 개발하기 위하여 생분해성 고분자 물질인 poly(lactide) acid 용액에 tetracycline을 함유시킨 후, 혼합용액을 양극산화된 타이타늄 표면에 코팅하여 항균효과 및 약물의 방출거동을 평가하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

지름 8 mm, 두께 2 mm의 디스크형 cp-Ti를 실리콘 카바이드 연마지(silicon carbide paper)로 100번 거칠기에서 600번 거칠기까지 연마한 후 아세톤 및 에틸 알코올로 초음파 세척하였다. 0.04 M의  $\beta$ -glycerophosphate disodium salt pentahydrate(Fluka, Germany)용액과 0.4 M의 calcium



**Figure 1.** The process of specimen preparation (a) anodized Ti, (b) spray coating method, (c) specimen coated with polymer and antibiotics.

acetate(DUKSAN PURE CHEMICAL CO., Korea) 용액을 혼합하여 전해액으로 사용하였고, DC Power Supply(Genesys 600-2.6, Densi-Lambda, Japan)를 이용하여 산화전극에는 시편을 환원 전극에는 백금판을 놓고 250 V의 전위를 3분간 가하여 양극산화를 시행하였다(문승균 외, 2008). 양극산화 처리된 시편은 증류수에 세척하고 상온에서 건조하였다. 항생제 코팅을 시행하기 위하여 생분해성 고분자 poly(lactide) acid(PLA100, Mw 85,000~160,000, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany)분말을 methylene chloride(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany)에 용해시켜 1% 농도의 PLA 용액을 제조하였다. 테트라사이클린(Chong Kun Dang, Korea)과 PLA 용액을 상온에서 72시간 혼합하여 테트라사이클린 0%, 0.1%, 0.5%, 1.0% 함유된 혼합용액을 제조하였다(Group I, Group II, Group III, Group IV). 항생제가 함유된 고분자 용액을 spray coating method를 사용하여 양극 산화를 시행한 타이타늄 표면에 코팅하였다. 코팅 후 진공에서 24시간 건조하여 표면의 methylene chloride를 제거하였다(Fig. 1). 코팅 전, 후의 시편의 무게를 측정 후 코팅층의 무게를 계산하였다.

2. 연구 방법

1) 표면관찰

시편 표면의 코팅 양상을 관찰하기 위하여 Group IV의 코팅 전, 후의 표면을 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2) 약물 방출량 측정

먼저 표준농도의 테트라사이클린 용액을 UV/VIS spectrometer를 이용하여 362 nm에서 흡광도를 측정하여 표준보

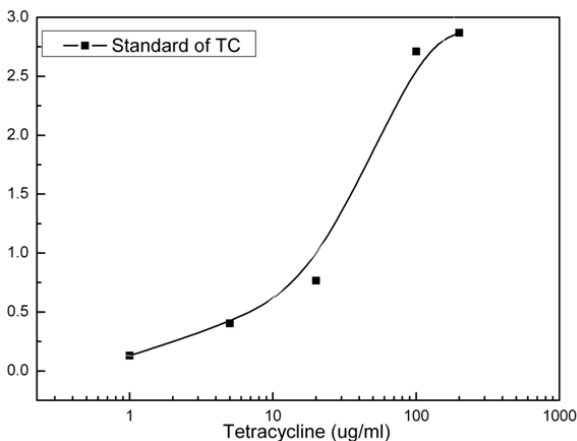


Figure 2 Standard curve of TC's concentrations vs absorbance.

정곡선을 구하였다(Fig. 2). 각 시편의 코팅 전, 후의 무게를 측정하여 코팅층의 무게를 계산하고 결과 값에 테트라사이클린의 함유 비율을 곱하여 코팅층에 존재하는 테트라사이클린의 함유량(A)을 계산하였다. 그 후 코팅된 시편을 유리병에 넣고 코팅층 무게의  $5 \times 10^6$ 배의 증류수를 넣었다. 37 °C incubator에서 3시간, 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일 보관 후 각각의 측정시간에 용출액을 꺼내어 UV/VIS spectrometer를 이용하여 362 nm에서 흡광도를 측정하였다(Shen EC 등, 2008). 각 시간에 따라 측정된 흡광도를 표준보정곡선을 이용하여 테트라사이클린의 약물방출량을 분석하였다(B). 다음의 식을 이용하여 약물의 방출비율을 측정하였다.

$$\text{releasing ratio}(\%) = \frac{B}{A} \times 100$$

3) 항균시험

시험군으로 테트라사이클린과 PLA가 코팅된 시편을 각 3 개씩 사용하였다(Group I, Group II, Group III, Group IV). 대조군으로 양극산화 처리만 시행한 시편을 3개를 사용하였다. *S. aureus*(SA, ATCC 6538, FDA 209)를 Trypticase soy 배지에 24시간 배양한 후, *S. aureus* 부유액의 세균수를 측정하여  $1 \times 10^5$  CFU/ml로 세균농도를 희석한 후 고체 아가 배지에 100  $\mu$ l씩 접종한 후 균의 성장을 위하여 37 °C incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 E.O. 가스로 멸균한 약물 코팅 시편을 배지 위에 올리고, 37 °C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 실험군과 대조군 배지에서 *S. aureus* colony의 저해된 크기를 측정하여 항균 능력을 평가하였다(Kozlovsky A 등, 2006).

4) 통계

항균시험 평가에서 시편별 유의성을 검증하기 위해 One way analysis of variance test를 하였다. One way analysis of variance test는 유의수준 95% 범위에서 사후 검정하였다(Duncan test).

결과

1. 표면관찰

양극산화 시행 후 코팅 전, 후의 표면을 SEM으로 관찰한 결과 코팅 전에는 타이타늄의 표면에 다공성의 산화막이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 코팅 후에는 다공성의 산화막

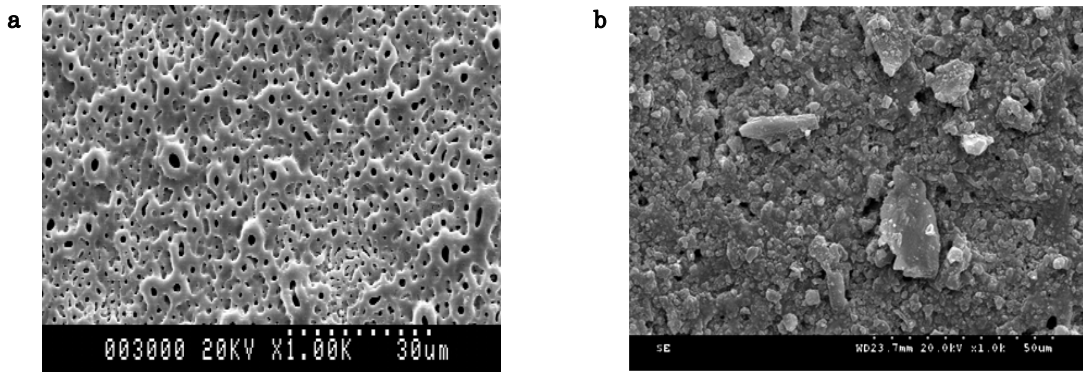


Figure 3. SEM image of the test specimen's surface (a) anodized titanium surface (control), (b) surface after spray coating (Group IV).

Table 1. The release ratio of TC after soaking specimens in the distilled water.

	3 h (%)	6 h (%)	24 h (%)	72 h (%)	1 w (%)	2 w (%)
Group I	0	0	0	0	0	0
Group II	5.5 ± 0.6	5.0 ± 2.0	6.8 ± 0.8	8.1 ± 1.3	8.6 ± 8.8	8.8 ± 0.6
Group III	48.1 ± 7.6	54.4 ± 8.2	59.9 ± 7.9	65.6 ± 6.6	65.8 ± 7.1	69.9 ± 4.4
Group IV	53.2 ± 11	62.9 ± 17	72.9 ± 14	81.6 ± 13	82.3 ± 14	92.2 ± 6.9

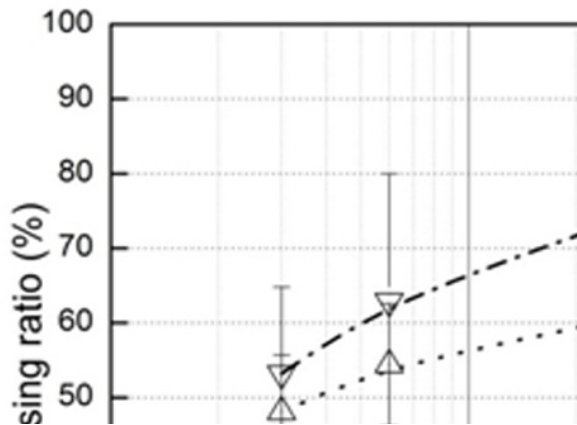


Figure 4. The releasing ratio of TC according to the immersion time.

Table 2. Antibiotic effect of coated specimens

Control group	Samples	Antibiotic zone(mm)
	Anodized Titanium	None
Experimental group	Group I	19.33 ± 5.51 <sup>1*</sup>
	Group II	34.00 ± 1.00 <sup>2*</sup>
	Group III	49.33 ± 1.53 <sup>3*</sup>
	Group IV	56.33 ± 1.53 <sup>4*</sup>

\* Each group showed the significance difference.

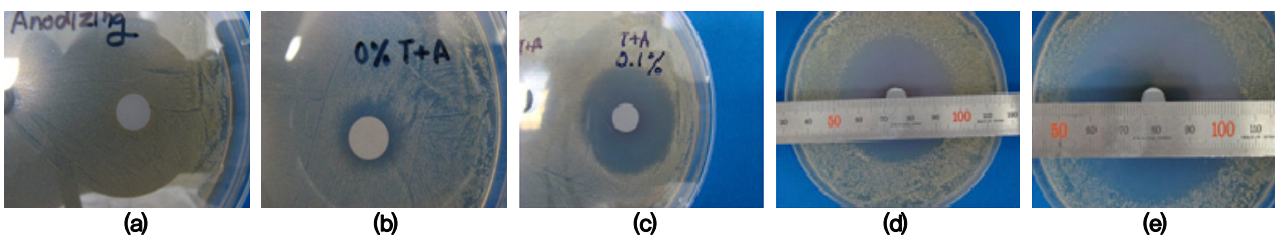


Figure 5. Antibiotic effect of control and experimental specimens. (a) Control, (b) Group I, (c) Group II, (d) Group III, (e) Group IV.

표면을 분사된 용액으로 완전히 덮여있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 코팅 표면에 1~2  $\mu\text{m}$  크기의 기공이 전체적으로 불규칙하게 형성됨을 관찰하였다(Fig. 3).

## 2. 약물 방출량 측정

약물 방출량의 실험결과 Group III, Group IV의 경우 증류수에 용출을 시작한 후 6시간 이내에 50% 이상의 테트라사이클린이 방출되었으며 이 후 시간이 경과함에 따라 2주 기간 동안 지속적으로 방출됨을 관찰할 수 있었다(Table 1, Fig. 4).

## 3. 항균시험

TC이 함유된 생분해성 고분자 코팅 시편의 항균특성을 Table 2와 Fig. 5에 나타내었다. 배양 1일 후 *S. aureus*에 대한 항균력은 TC의 농도가 높을수록 높게 측정되었다(Group I < Group II < Group III < Group IV). 대조군인 양극산화 표면처리된 시편에서는 항균력을 전혀 나타나지 않았다. TC를 함유하지 않고 PLA로만 코팅한 Group I에서는 다른 실험군보다 작은 범위이긴 하지만 항균력을 나타내었다. 각 그룹 간의 항균범위는 통계적인 유의차를 나타내었다( $P < 0.05$ ).

## 고찰

골형성을 촉진시킬 수 있는 새로운 임플란트가 지속적으로 개발되고 있지만 세균의 감염에 따른 치료 실패는 치과용 임플란트의 주된 문제점의 하나로 남아있다. 최근 골형성을 극대화시키기 위하여 임플란트 표면에 여러 단백질과 성장인자, 효소, 세포들을 다양한 매커니즘으로 부착시키는 연구가 활발히 진행되고 있는데(Zhang F 등, 2008; Harris LG 등, 2008) 이러한 세포 부착을 증진시키는 임플란트 표면일수록 세균에 대한 부착 또한 증가할 수 있다는 것을 고려해야 한다.

본 실험에서는 항생제의 농도를 다르게 하여 이를 생분해성 고분자인 PLA와 혼합하여 코팅 전, 후의 표면을 SEM으로 관찰하고, 시간에 따라 방출되는 항생제의 약물방출량 및 항균효과를 측정하였다.

SEM 관찰결과 코팅 전 양극산화 표면에는 일반적인 1~2  $\mu\text{m}$  크기의 다공성의 산화층을 관찰할 수 있었다. 코팅 후에는 이러한 다공성 구조 표면에 항생제가 함유된 고분자 물질이 완전히 덮여있는 것이 관찰되었다. 고분자 물질로 코팅된

표면에 코팅 표면에 1~2  $\mu\text{m}$  크기의 기공이 나타나는데 이는 코팅 후 건조과정에서 용매로 사용한 methylene chloride가 빠져나가면서 생성된 것으로 사료된다.

약물 방출량의 실험결과 Group III, Group IV의 경우 증류수에 용출을 시작한 후 6시간 이내에 50% 이상의 테트라사이클린이 방출되었으며 이 후 시간이 경과함에 따라 2주 기간 동안 지속적으로 방출됨을 관찰할 수 있었다. 이는 Harris 등(2006)의 연구결과 대부분의 생분해성 고분자로 약물을 코팅한 경우 24시간 안에 약물의 대부분이 방출되는 현상(intial burst)과 일치하였다. 하지만 본 실험에서는 Group II의 경우 24시간 동안 7%의 약물이 방출되었으며, 그 이후에도 2주 동안 약 9%의 방출밖에 나타나지 않았는데 이는 상대적으로 약물을 둘러싸는 매개체인 PLA의 상대량이 많기 때문에 PLA가 약물을 둘러싸는 비율이 높게 유지되어 약물이 보다 천천히 방출되는 것으로 사료된다.

항균시험의 결과 배양 1일 후 *S. aureus*에 대한 항균력은 Group IV, Group III, Group II, Group I 순으로 높게 측정되었다. 특이한 점은 테트라사이클린을 함유하지 않는 PLA만 코팅한 시편(Group I)에서 일정부분의 세균 감소가 나타났다. 이는 PLA 용액 제조과정에서 PLA 분말을 용해시키기 위한 용매로 methylene chloride를 사용하였는데 코팅 후 건조과정에서 일부 용매가 잔존하여 이에 따른 독성을 나타낸 것으로 사료된다. 대조군으로 사용한 양극산화 처리된 시행한 시편에서는 세균의 감소가 전혀 나타나지 않았으며, 이를 통해 양극산화 표면처리에 따른 항균효과는 배제할 수 있었다.

## 결론

본 시험에서 생분해성 고분자인 PLA 용액에 테트라사이클린 항생제를 첨가하여 타이타늄 표면에 코팅하여 SEM 표면분석, 약물방출거동, 항균시험, 코팅층과 타이타늄의 결합강도를 시험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SEM 표면 분석결과 양극산화 표면층을 코팅된 용액으로 완전히 뒤덮여지는 것이 관찰되었으며 이는 spray-ing method를 사용하여 분사시간을 조절함으로써 코팅층의 두께를 조절이 가능함을 확인하였다.
2. 약물의 방출은 Group III, Group IV에서는 24시간 이내에 50% 이상 방출되었으며, 이 후 2주 동안 지속적으로 방출되는 양상을 나타내었다. 하지만 Group II에서는 24시간 이내에 약 7% 정도의 약물 방출이 나타났으며, 그 이후에도 2주 동안 약 9%의 방출밖에 나타나지 않았다.

3. 시험군에서의 항균력은 Group IV, Group III, Group II 순으로 높게 측정되었다. 대조군에서는 양극산화만 시행한 타이타늄 시편에서는 항균력이 관찰되지 않았으나 PLA 용액으로만 코팅을 시행한 타이타늄 시편(Group I)에서는 약 2 mm의 범위의 항균력을 나타냈다.

이상의 연구결과로 타이타늄의 표면에 약물이 함유된 생분해성 고분자물질로 코팅할 경우 우수한 항균력을 일정기간 지속할 수 있는 것으로 나타났기 때문에 발치 후 즉시 임플란트 또는 치주질환에 따른 치아상실과 같이 이식 부위에 세균의 잔존이 의심되는 부위에 임플란트 이식 시 우수한 항균성을 가진 생체재료로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Lekholm U (1999). Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: A 10-years prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1:639-645.
- Snauwaert K (2000). Time dependent failure rate and marginal bone loss of implant supported protheses: A 15ears follow-up study. *Clin Oral Investig* 4:13-20.
- Esposito M (1998). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. *Eur J Oral Sci* 106:527-551.
- Rosenberg ES (2004). A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: A clinical reports. *Int J Oral Sci* 19:873-879.
- Klinge B, Hultin M, Berglundh T (2005). Peri- implantitis. *Dent Clin North Am* 49:661-676.
- O'Mahony A, Spencer P (1999). Osseointegrated implant failures. *J Ir Dent Assoc* 45: 44-51.
- Tonetti MS (1999). Determination of the success and failure of root-form osseointegrated dental implants. *Adv Dent Res* 13:173-180.
- Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D (2002). Infectious risks for oral implants: A review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 13:1-19.
- Teughels W, Van Assche N, Slieden I, Quirynen M (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17(Suppl 2):68-81.
- Mombelli A (1999). Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J, editors. *Proceedings of the 3rd European Workshop on periodontology*. Berlin: Quintessence Books:281-303.
- Quirynen M, Teughels W (2003). Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol* 2000;33:119-128.
- Cate JM (2006). Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 94:1-9.
- Gursel I, Korkusuz F, Turesin F (2001). In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* 22:73-80.
- Rabih O, Darouiche, Mohammad D, Mansouri, Devin Zakarevicz (2007). In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg* 89:792-797
- Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z (2009). Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Matter Res A* 91B:470-480.
- Duran LW (2000). Preventing medical device related infections. *Med Device Technol* 11:14-17.
- 문승균, 탁창우, 주옥현, 오근택, 이용근, 김광만, 김경남 (2008). Streptococcus mutans에 대한 티타늄 합금 산화막의 광촉매 항균효과. *대한치과기재학회지* 35(4): 329-338.
- Shen EC, Wang C, Chiang CY, Chen TT, Nieh S (2008). Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study. *J of Periodontal Res* 43(6):642-648.
- Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RB (2006). Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *J Periodontol* 77(7):1194-1200.
- Zhang F, Zhang Z, Zhu X, Kang ET, Neoh KG (2008). Silk-functionalized titanium surface for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion. *Biomaterials* 29:4751-4759.
- Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG (2004). *Staphylococcus aureus* adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized

and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymer. *Biomaterials* 25: 4135-4148.

Harris LG, Mead L, Muller-Oberlander E, Richards RG

(2006). Bacteria and cell cyto-compatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. *J Biomed Mater Res* 78(A):50-58.

