



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

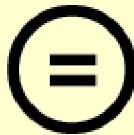
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

산화아연 나노 입자를 첨가한
규산칼슘 기반 시멘트의
물리·기계적 특성, 세포독성 및 항균성 평가

연세대학교 대학원

치 의 학 과

유 재 용

산화아연 나노 입자를 첨가한
규산칼슘 기반 시멘트의
물리·기계적 특성, 세포독성 및 항균성 평가

지도교수 권재성

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2023년 12월

연세대학교 대학원

치 의 학 과

유 재 용

유재용의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 권재성 인

심사위원 김광환 인

심사위원 이은정 인

연세대학교 대학원

2023년 12월

감사의 글

내용

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문 요약	v
I. 서론	1
1. 규산칼슘 기반 시멘트	1
2. 산화아연 나노 입자	3
3. 연구목적	4
II. 재료 및 방법	5
1. 연구재료	5
2. 연구방법	7
2.1. 경화시간	7
2.2. 압축강도	8
2.3. X-ray diffraction (XRD) 분석	9
2.4. 아연 이온 방출	9
2.5. 용해도	10
2.6. 세포독성 평가	11
2.6.1. 세포 배양	11
2.6.2. 시료 준비	11
2.6.3. Water soluble tetrazolium (WST) – 1 assay	11

2.7. 항균성 평가.....	12
2.7.1. 세균 배양.....	12
2.7.2. 항균성 평가.....	12
3. 통계분석.....	14
 III. 결과	15
1. 경화시간	15
2. 압축강도	16
3. X-ray diffraction (XRD) 분석.....	17
4. 아연 이온 방출	18
5. 용해도	19
6. 세포독성 평가.....	20
7. 항균성 평가.....	21
 IV. 고찰	22
 V. 결론	26
 VI. 참고문헌	28
 ABSTRACT (in English)	32

그림 차례

Figure 1. Comparison of setting time between CSC and CSZ groups	15
Figure 2. Comparison of compressive strength between CSC and CSZ groups ..	16
Figure 3. XRD analysis between CSC and CSZ. Yellow dot line is magnified between 34.0° to 36.0° in the XRD analysis	17
Figure 4. The comparison of solubility between CSC and CSZ groups	19
Figure 5. Cell Viability evaluated by the WST-1 assay after 24 h exposure of L-929 cells to the extracts and to the negative and positive controls ..	20
Figure 6. Comparison of colony forming units between CSC and CSZ groups	21

표 차례

Table 1. Composition of materials in the control and experimental groups ····	6
Table 2. The comparison of zinc ion release for 24 h between CSC and CSZ groups ·····	18

국 문 요 약

산화아연 나노 입자를 첨가한 규산칼슘 기반 시멘트의 물리·기계적 특성, 세포독성 및 항균성 평가

<지도교수 권재성>

연세대학교 대학원 치의학과

유 재 용

규산칼슘 기반 시멘트(calcium silicate-based cement; CSC)는 일반적으로 치수복조(pulp capping), 치근단 형성술(apexification), 치근단 충전(root-end fillings), 천공 폐쇄(perforation closure)와 같은 근관 치료에 사용되고 있다. CSC는 밀폐 효과가 뛰어나고 pH 증가에 따른 항균 특성으로 세균의 성장을 억제하는 장점이 있지만 항균 효과는 제한적이다.

산화아연 나노 입자(zinc oxide nanoparticles; ZnO-NPs)는 항균 효과를 가지고 있어서 의학 분야에 응용될 수 있는 유망한 생체 재료이다.

본 연구의 목적은 CSC에 다양한 비율의 ZnO-NPs를 첨가하여 물리적 특성과 세포독성 및 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)에 대한 항균 효과를 평가하는 것이다.

규산칼슘 기반 시멘트(CSC)에 산화아연 나노 입자(ZnO-NPs)를 0 wt%(대조군), 1 wt%(CSZ1), 3 wt%(CSZ3), 5 wt%(CSZ5)로 첨가하였다. 물리적 특성으로 경화시간, 압축강도, X-ray diffraction (XRD) 분석, 아연 이온 방출 및 용해도를 측정하였다. L-929 섬유아세포를 이용한 water soluble tetrazolium-1 (WST-1) 분석으로 세포독성을 평가하였고 *E. faecalis*에 대한 항균성은 colony forming unit (CFU)으로 평가하였다.

CSC에 ZnO-NPs 함량이 증가함에 따라 CSZ 그룹들의 경화시간은 CSC에 비교하여 증가하였고 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 또한, 압축강도는 CSC와 CSZ1 그룹과 비교하여 CSZ3과 CSZ5 그룹의 강도가 크게 감소하였고 유의한 차이를 보였으며($p < 0.05$), 모든 CSZ 그룹의 용해도는 3% 이하였다. XRD 분석에서는 CSC와 비교하여 CSZ 그룹에서는 ZnO의 상(phase)이 검출한 것을 확인하였고, 24시간 동안 용출된 CSC와 CSZ 그룹의 아연 이온 방출을 관찰한 결과 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 세포독성 평가에서는 대조군 CSC와 비교하여 CSZ 그룹은 세포 배양 배지로 배양한 Blank와 양성대조군(positive control; PC)과 비교하였을 때 유의한 차이를 보였지만($p < 0.05$), CSZ 그룹은 CSC와 비교하였을 때 세포 생존율에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$). 그러나 CSZ1 그룹의 *E. faecalis*에 대한 항균 효과는 다른 실험군에 비해 더 효과적이며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

따라서, 본 연구를 통해 1 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC는 항균 효과가 증가하고 물리적 특성과 세포 생존율이 유지되어 근관 치료용 재료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 규산칼슘 기반 시멘트, 산화아연 나노 입자, 물리·기계적 특성, 세포독성, 항균성

산화아연 나노 입자를 첨가한 규산칼슘 기반 시멘트의 물리·기계적 특성, 세포독성 및 항균성 평가

<지도교수 권재성>

연세대학교 대학원 치의학과

유 재 용

I. 서론

1. 규산칼슘 기반 시멘트

Mineral trioxide aggregate (MTA)로 알려진 규산칼슘 기반 시멘트(calcium silicate-based cement; CSC)는 자가 경화성 수경 시멘트이다(Darvell and Wu, 2011). CSC는 1990년 중반에 도입되었으며 근관 치료용 재료로 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다(Lee et al., 1993; Torabinejad et al., 1995). 현재까지 CSC는 치수복조(pulp capping), 치근단 형성술(apexification), 치근단 충전(root-end fillings), 천공(perforation)된 치수강의 수복 등 임상적 근관 치료의 여러 영역에서 사용되고 있다(Parirokh

et al., 2018; Torabinejad et al., 2018). CSC의 장점으로서는 밀폐 효과가 뛰어나고 pH 증가에 따른 항균 효과가 있으며, 인체 줄기세포에서 상아질 모세포 또는 전조골세포로 분화 능력을 가지고 있다(Saghiri et al., 2008; Yan et al., 2014). 특히, CSC는 치수 염증을 줄이고 체내에서 지속적인 용해로 장기간 Ca^{2+} 을 방출하여 dentin bridge 형성을 크게 유도하고 생리학적 환경에서 인회석(apatite)과 같은 침전물들이 형성된다고 알려져 있다(Gandolfi et al., 2010; Han et al., 2015; Tran et al., 2012). 반면, 다른 연구에서는 CSC는 치수 또는 치수와 관련된 조직에서 염증 반응이 일어난다고 보고되었고 (Hung et al., 2014), 근관 치료 후 초기 박테리아 감염으로 인해 근관 치료의 실패로 이어질 수 있다는 단점을 가지고 있다(Yang et al., 2014). 근관 치료 실패의 원인은 치료를 받은 근관에서 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) 박테리아가 난치성 감염을 일으킨다고 알려져 있다(Stuart et al., 2006). McHugh et al.은 pH 10.5 - 11.0 에서 *E. faecalis*의 성장을 지연하는 반면, pH가 11.5보다 크면 박테리아가 생존할 수 없다고 보고하였다(McHugh et al., 2004). 하지만, Kim et al.은 CSC가 높은 알칼리성 환경에서 *E. faecalis*의 성장을 억제하지 못한다고 보고하였고, 이러한 원인으로 임상적 환경에서 높은 pH는 상아질의 완충 능력으로 유지되지 않고, *E. faecalis* 내에서 양성자 펌프(proton pump)가 pH를 낮춘다고 하였다(Kim et al., 2015). 따라서, 항균 효과가 다소 제한적이라는 단점이 보완된 이상적인 근관 치료에 대한 물리적 특성이 우수하고 생물학적으로 안전하며 박테리아 감염을 예방하기 위한 항균 효과가 증가된 CSC에 대한 연구가 필요하다.

2. 산화아연 나노 입자

아연(zinc; Zn)은 인체 필수 미량 원소인 무기질로서 체내의 여러 가지 작용에 필수적이고 건강을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 특히, Zn의 중요한 특성은 박테리아의 성장을 막고 염증을 완화시키는 효과를 가지고 있어 의료분야 재료로 널리 사용되었다(Zhu et al., 2017).

산화아연 나노 입자(zinc oxide nano particles; ZnO-NPs)는 나노 규모의 금속 산화물 입자로 육각형 구조이며(Miri et al., 2019), 고무 복합재의 내마모성을 제공하고 인성 및 강도 등 고분자의 성능을 향상시켜 고무 산업에 처음으로 적용되었다고 알려져 있다(Sahoo et al., 2007). 또한, ZnO-NPs는 콘크리트 생산, 광촉매, 전자, 전기기술 산업 등을 포함한 다른 산업 분야에서도 응용될 수 있다(Kołodziejczak-Radzimska and Jesionowski, 2014). ZnO-NPs는 미국 식품의약국(FDA)에서 의약품, 화장품, 그리고 의료분야에서 일반적으로 사용하는 안전한 물질이라고 명시하였고(Baek et al., 2012), 생체적합성이 뛰어나고 비용이 저렴하며 항균성이 효과적이라고 알려져 있다(Sirelkhatim et al., 2015). 이러한 ZnO-NPs의 장점으로 인해 다양한 연구가 진행되었고 치과용 근관 치료 재료로 응용되었다. Javidi 등은 ZnO-NPs가 우수한 밀폐 효과를 가지고 있어서 치근단 미세 누출을 감소시킨다고 하였고(Javidi et al., 2014), 치아를 강화하기 위해 상아질의 재광화에 효과적이라고 하였으며(Toledano et al., 2019), 근관 치료 실패를 유발하는 *E. faecalis*에 대해 항균성을 증진시켰다고 보고하였다(Aguiar et al., 2015).

3. 연구 목적

산화아연 나노입자(ZnO-NPs)를 첨가한 규산 칼슘 기반 시멘트(CSC)는 물리적 특성을 유지하고 항균력을 향상하는 연구가 많이 이루어지고 있지만 최근 연구에서 CSC에 5 wt% ZnO-NPs를 첨가 시 기계적 특성에 부정적인 영향을 미치는 결과가 보고되었다(Bolhari et al., 2020; Eskandarinezhad et al., 2020). 다른 선행 연구에서는 CSC의 항균 활성도를 높이기 위해 5 wt% ZnO-NPs를 첨가하였으나 항균 활성도가 CSC와 비교하여 효과적이지 않았고 기계적 물성을 감소시켰다고 보고하였다(Guerreiro-Tanomaru et al., 2014). 따라서, CSC에 ZnO-NPs를 첨가한 연구가 부족하기 때문에 ZnO-NPs의 첨가량을 조절하여 물리적 특성 및 항균 활성에 대한 영향을 평가하는 연구가 필요하다.

본 연구의 목적은 ZnO-NPs를 첨가한 CSC (CSZ)의 물리적 특성, 세포독성 및 *E. faecalis*에 대한 항균 효과를 평가하여 근관 치료에서 ZnO-NPs의 적용 가능성에 대하여 평가하고자 한다. 본 연구의 귀무가설은 “CSC와 CSC에 ZnO-NPs를 첨가(CSZ)한 그룹 간의 물리적 특성, 세포독성, 그리고 항균성에 차이가 없을 것이다” 이다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서는 ZnO-NPs (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 100 nm particle size)와 CSC (Endocem MTA, Maurchi, Wonju-si, Korea)를 사용하였다. 세포독성 평가는 쥐의 섬유아세포(L-929; American Type Culture Collection, Manassas, VA; USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Cytiva, Marlborough, MA, USA), 소태아혈청 (fetal bovine serum; FBS; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 페니실린-스트렙토마이신 (penicillin-streptomycin; Cytiva; Marlborough MA, USA), 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich), Water soluble tetrazolium-1 (EZ-Cytox, Dogen Bio, Seoul, Republic of Korea)을 사용하였다. 항균성 평가에는 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*; ATCC 29212)와 뇌심장침출액 (Brain Heart Infusion; BHI; Difco, Sparks, MD, USA)을 배지로 사용하였다.

대조군 및 실험군의 재료 조성은 Table 1에 기술하였으며 시편은 300 mg CSC에 120 μ L 생리 식염수를 첨가하여 제조사의 지침에 따라 혼합하였고 모든 측정은 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(50 \pm 5)\%$ 상대습도 조건의 실험실에서 실시하였다.

Table 1. Composition of materials in the control and experimental groups

	Calcium silicate based cement (wt%)	Zinc oxide nanoparticle powder (wt%)
CSC (Control)	100	0
CSZ1	99	1
CSZ3	97	3
CSZ5	95	5

2. 연구방법

대조군과 실험군의 경화시간, 용해도는 ISO 6876:2012 (Dentistry – Root canal sealing materials), 압축강도는 ISO 9917-1:2007 (Dentistry – Water based cements – Part 1: Powder/liquid acid base cements) 국제 표준의 제시 방법에 따라 평가되었다. XRD 분석을 통하여 ZnO의 검출 여부를 확인하였고 아연 방출량(Silva et al., 2015), 세포독성 평가(Queiroz et al., 2021), 항균성 평가(Kwon et al., 2019)는 선행연구에 따라 진행하였다.

2.1. 경화시간

경화시간을 평가하기 위해 실험 전 8 mm × 20 mm × 10 mm의 금속블록과 직경 2 mm, 100 g 질량의 끝이 편평한 길모어 형 압입자를 37 °C, 상대 습도 95%의 항온수조에 보관하였다. 두께 1 mm 유리판 위에 내경 10 mm, 높이 2 mm의 원형의 스테인리스 스틸 몰드를 놓고 혼합한 재료를 채운 뒤 혼합 종료 시점으로부터 120초 후에 항온수조 내의 금속블록 위에 놓았다

제조사가 명시한 경화시간(195초)에 도달했을 때 혼합된 시료의 수평면 위에 조심스럽게 길모어 형 압입자를 수직으로 내리고 압흔이 보이면, 압입자를 들어 압입침 침단을 닦고 시료의 새로운 위치에 압입자를 반복적으로 내렸다. 혼합이 끝난 시점부터 압흔이 보이지 않을 때까지의 시간을 기록하였고, 동일한 실험을 6회 반복 시행하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

2.2. 압축강도

내경 4 mm, 높이 6 mm 분할형 스테인리스 스틸 몰드와 슬라이드 글라스 및 나사형 클램프를 23 °C로 유지하였다. 슬라이드 글라스 위에 몰드를 올려놓고 혼합 종료 60초 이내에 제조사 지시에 따라 혼합한 시료를 약간의 압력을 가하면서 과량으로 채웠다.

몰드 위에 슬라이드 글라스를 놓은 후 클램프에 위치시키고 단단히 고정한 후 혼합 종료 120초가 경과하기 전에 클램프를 37 °C, 상대 습도 95%의 항온수조로 옮기고 혼합이 완료된 후 1시간이 경과하면 몰드에서 조심스럽게 시편을 제거하고 37 °C의 3차 증류수에 침수시켜 23시간 동안 보관하였다.

혼합 종료 24시간이 지난 후 각 시편을 만능시험기(Instron 5942, Instron, MA, USA)에 놓고 장축 하방으로 1 mm/min의 crosshead speed로 압축 하중을 가하였다. 각 시편이 파절되는 최대 하중(N)을 측정하고 다음의 식을 적용하여 압축강도를 MPa 단위로 계산하였고 동일한 실험을 10회 반복 시행하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

$$\sigma = \frac{4P}{\pi d^2}$$

σ = 압축강도(MPa), P = 가해진 최대 하중(N), d = 시편의 평균 직경(mm)

2.3. X-ray diffraction (XRD) 분석

CSC와 CSZ 그룹에서 ZnO가 검출되는지 확인하기 위해 내경 4 mm, 높이 6 mm 분할형 스테인리스 스틸 몰드에서 24시간 동안 보관한 시편을 막자사발에 넣어 실험군 그룹별로 분쇄하였다. 회절장치 홀더에 분쇄된 시편을 놓은 후 슬라이드 글라스를 이용하여 평평하게 만들었다. XRD (Ultima IV, Rigaku, Tokyo, Japan)를 사용하여 분당 2°의 스캐닝 속도에서 20°에서 60°까지 2-theta 범위의 패턴을 기록 후 ZnO가 검출되었는지 확인하였다.

2.4. 아연 이온 방출

CSC와 CSZ 그룹에서 24시간 동안의 아연 이온의 방출량을 확인하기 위해 내경 10 mm, 높이 2 mm의 스테인리스 스틸 몰드에 시편을 제작하였다. 대조군과 실험군 시편을 15 mL Conical tube에 각각 넣은 후 12 mL 증류수를 첨가하여 37 °C에서 24시간 동안 보관하였다.

시편을 제거한 용출물 10 mL을 추출 후 이온의 안정화를 위해서 70% 질산 10 μ L을 첨가하여 전처리를 진행하였다. 전처리를 진행한 용출물을 ICP-MS (NexION 2000, PerkinElmer, USA)를 사용하여 아연 방출량을 측정하였다.

2.5. 용해도

혼합한 시료를 내경 20 mm, 높이 1.5 mm 스테인리스 스틸 몰드에 약간 넘치도록 채웠다. 시료 위에 유리판을 편평하고 균일한 표면을 유지하도록 누르고 몰드를 항온수조 안에 제조사가 명시한 경화시간(195초)보다 50% 이상 보관 후 몰드로부터 시편을 제거하고 무게를 전기식 지시저울(ME104, Mettler Toledo, USA; 정밀도 0.001g)을 사용하여 0.001 g 정밀도로 측정하였다.

2개의 시편을 서로 접촉되지 않고 움직이지 않게 유리 비커(A)에 넣고 50 mL 증류수를 첨가하여 유리 비커(A)의 덮개를 닫은 후 37 °C, 24시간 동안 항온수조에서 보관하였다. 세로로 홈이 파진 종이 필터를 깔때기에 넣어 시편을 보관한 증류수를 필터에 붓고 유리 비커(A)를 5 mL의 증류수로 3번 세척한 증류수도 필터에 여과하였다. 걸러진 증류수가 든 유리 비커(B)를 110 °C의 건조기(C-DOC, Chang Shin Science co., Seoul, Republic of Korea)에서 일정한 질량이 될 때까지 물을 증발시키고, 각각의 질량을 측정하기 전에 유리 비커(B)의 온도가 상온에 도달할 때까지 냉각하였다.

0.001 g의 정밀도의 저울로 측정한 유리 비커의 초기 질량과 최종 질량 차이의 차를 시편으로부터 용해된 시편의 양으로 기록하고 이 질량의 차이를 두 개의 시편의 원래 질량의 합에 대한 백분율로 계산하였고 동일한 실험을 6회 반복 시행하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

2.6. 세포독성 평가

2.6.1. 세포 배양

쥐(mouse)의 섬유아세포인 L-929 세포를 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) 및 1% penicillin과 streptomycin (P/S; Thermo Fisher Scientific)이 첨가된 DMEM (Cytiva)을 배지로 사용하여 37 °C, 5% CO₂, 95% 습도를 유지하는 배양기 내에서 세포를 24시간 동안 배양하였다.

2.6.2. 시료 준비

각각 대조군과 실험군은 10% FBS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 세포배양 배지에서 100 mg/mL의 비율로 37 °C에서 24시간 동안 용출하였다. 그 후, 상층액을 채취하여 0.2 μm 필터를 사용하여 용출물을 얻었다. 원액에서 독성이 나올 것으로 고려하여 12.5%로 희석하였다. 세포독성 실험에서는 세포 배양 배지를 Blank로 설정하였고, 양성 대조군(positive control; PC)은 20%(v/v) 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide)를 첨가한 배양배지로 설정하였다.

2.6.3. WST-1 Assay

L-929 세포 배양액 100 μL를 96-well plate (SPL Life Sciences Co., Pocheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea)에 1×10^4 세포를 시딩하고 37 °C, 5% CO₂, 95% 습도를 유지하는 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후, 100 μL 용출물을 세포에 적용하여 배양기에서 보관하였다. 24 시간 후 용출물을 모두 제거하고 배양 배지를 기반으로 10%(v/v) 농도의 WST-1 시약 100 μL로

교체하고 대조군과 실험군을 다시 37 °C에서 1시간 동안 배양기에 보관하였다. Microplate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도(optical density; OD)를 측정하였다. OD를 기록하고 다음 수식에 따라 세포 생존율을 계산하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{실험군의 OD}_{450} / \text{Blank의 OD}_{450}) \times 100$$

2.7. 항균성 평가

2.7.1. 세균 배양

세균 배양은 BHI (Difco, Sparks, MD, USA)에서 배양된 *E. faecalis* (ATCC 29212)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂, 95% 상대 습도를 유지하는 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양된 *E. faecalis*는 집락형성단위(colony forming unit; CFU) 측정 실험에 사용하였다.

2.7.2. 항균성 평가

24-well plate에 지름 10 mm, 높이 2 mm의 대조군 CSC와 실험군 CSZ 원형 시편 위로 세균 현탁액(1×10^6 CFU/mL) 1 mL를 각각 넣은 후 37 °C에서 24시간 배양하였다. 이후, BHI 1 mL에서 sonication (SH-2100; Saehan Ultrasonic, Seoul, Republic of Korea)으로 5분 동안 초음파 처리하여 세균을 획득하였다. 획득한 세균 현탁액을 10^{-6} 배로 희석한 후 희석한 세균 현탁액 100 μ L를 BHI 한천 플레이트에 균일하게 평판

도말하여 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후 총 colony 수를 기록하였다.

3. 통계분석

본 연구의 모든 데이터는 평균과 표준편차로 제시하였고 일원 분산 분석과 Tukey 방법을 사용하였다. 통계 분석은 SPSS (ver.23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였고 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

III. 결과

1. 경화시간

Figure 1에서 CSC에 ZnO-NPs 함량을 다르게 첨가한 시편의 경화시간을 비교한 결과, CSC와 비교하여 CSZ에 각각 1, 3, 5 wt%의 ZnO-NPs를 첨가할수록 경화시간이 각각 7%, 12.8%, 17.4%가 증가하였다. 또한, 모든 실험군은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

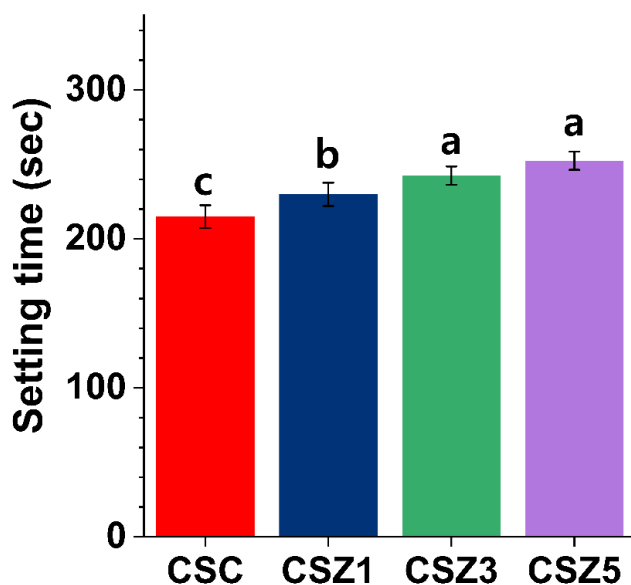


Figure 1. Comparison of setting time between CSC and CSZ groups ($n = 6$). The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). CSC; calcium silicate-based cement; CSZ x ; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

2. 압축강도

Figure 2에서 제시한 압축강도 결과, CSZ1 그룹은 대조군 CSC와 비교하여 강도는 5.9% 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다($p > 0.05$). 하지만, CSZ3과 CSZ5 그룹에서 대조군 CSC에 비교하여 각각 38.5%, 40.4% 감소하였고 통계적으로 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

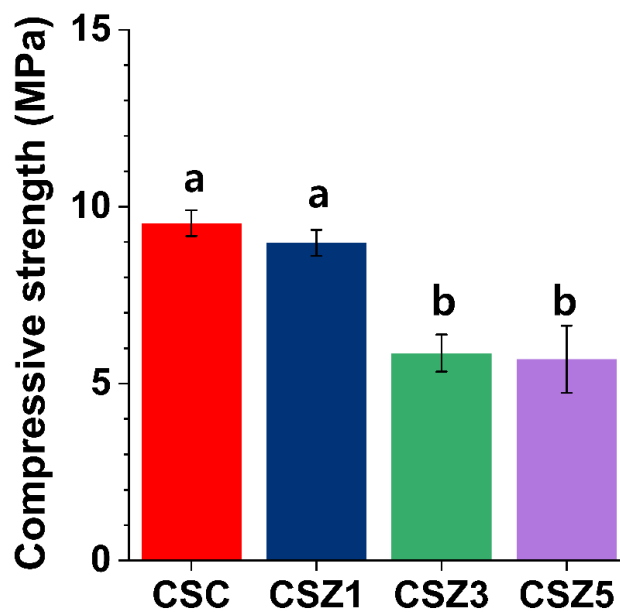


Figure 2. Comparison of compressive strength between CSC and CSZ groups ($n = 10$). The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). CSC; calcium silicate-based cement; CSZx; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

3. X-ray diffraction (XRD) 분석

Figure 3에서 X-ray diffraction (XRD)을 측정하여 ZnO 검출 여부를 확인하였고 그 결과, ZnO 검출할 수 있는 2theta는 31.8°, 34.4°, 36.2°이었다. 대조군 CSC와 비교하여 31.8°와 36.2°에서 모든 실험군에서 ZnO가 관찰이 되었지만 34.4°에서는 뚜렷한 상(phase)이 발견되지 않아 이 부분의 범위를 확대하여 관찰한 결과 ZnO 상이 미약하게 나타난 것을 확인하였다.

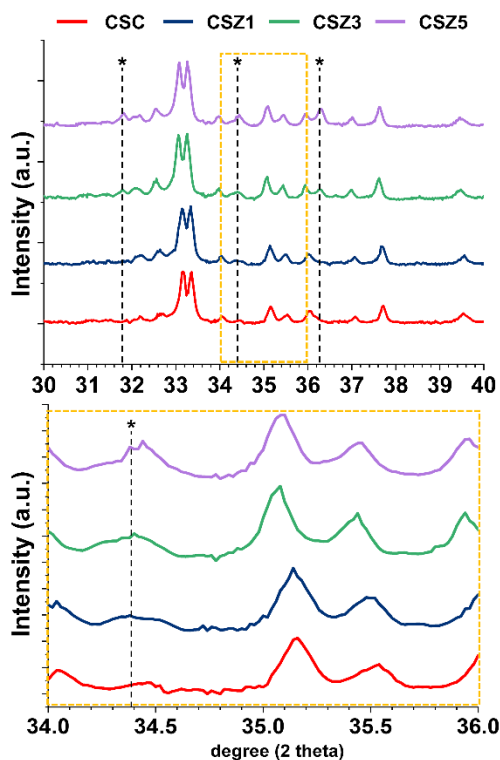


Figure 3. XRD analysis between CSC and CSZ. Yellow dot line is magnified between 34.0° to 36.0° in the XRD analysis. *; zinc oxide phase, CSC; calcium silicate-based cement, CSZ_x; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

4. 아연 이온 방출

Table 2와 같이 대조군 CSC와 실험군 CSZ 그룹에서 24시간 동안 아연 이온을 방출하였다. 그 결과, 실험군 CSZ3와 CSZ5 그룹은 CSZ1 그룹과 비교하여 각각 약 45.8%, 34.7% 아연 이온 방출량이 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다 ($p > 0.05$).

Table 2. The comparison of zinc ion release for 24 h between CSC and CSZ groups

Unit: ng/mL	
Group	Zinc Ion Release (24 h) Mean $\pm$ SD
CSC	0.00 ^b
CSZ1	43.64 $\pm$ 11.53 ^a
CSZ3	63.64 $\pm$ 18.30 ^a
CSZ5	58.78 $\pm$ 20.03 ^a
<i>p</i> -value	0.003

The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). CSC: calcium silicate-based cement; CSZ x ; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

5. 용해도

Figure 4에서 제시한 용해도 실험 결과, 실험군 CSZ1 그룹은 대조군 CSC와 비교하여 5.3% 용해도가 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다. 하지만, 실험군 CSZ3와 CSZ5 그룹은 대조군 CSC와 비교 비교하였을 때 용해도가 각각 14.7%, 19.9% 증가하였고 통계적으로 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 대조군 CSC와 실험군 CSZ 그룹의 용해도는 모두 3% 이하로 ISO 6876에서 명시한 기준에 부합하였다.

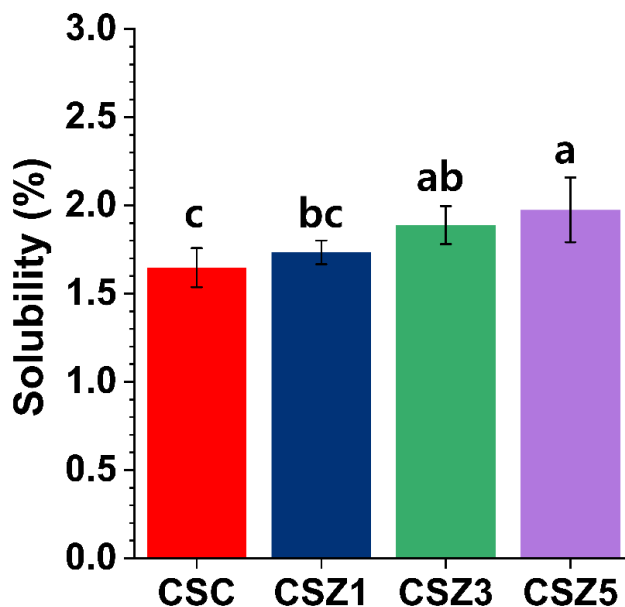


Figure 4. The comparison of solubility between CSC and CSZ groups ($n = 6$). The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). CSC: calcium silicate-based cement; CSZ x ; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

6. 세포독성 평가

생물학적 관점에서 대조군과 실험군에 대하여 세포독성을 평가하였다(Figure 5). 그 결과, 세포 배양 배지로 배양한 blank와 비교하여 CSC와 실험군 CSZ 그룹에서 세포 생존율이 높았고 통계적으로 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 또한, 양성대조군 (positive control; PC)은 CSC와 실험군 CSZ 그룹과 비교하여 세포 생존율이 높았고 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 하지만, 실험군 CSZ 그룹은 CSC와 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다($p > 0.05$).

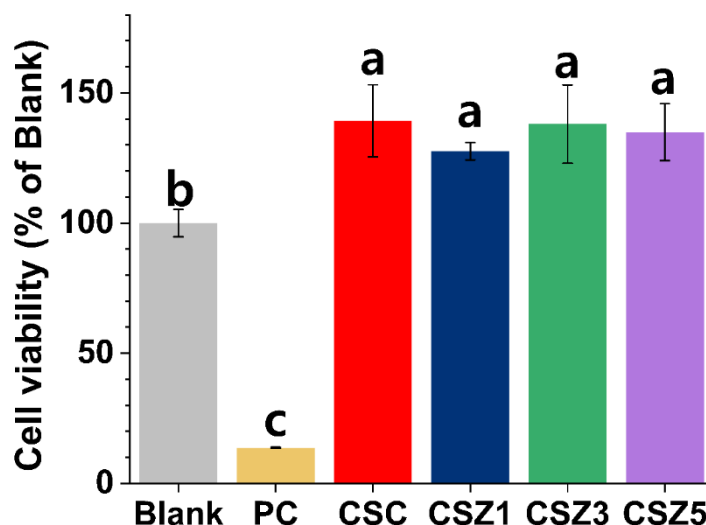


Figure 5. Cell Viability evaluated by the WST-1 assay after 24 h exposure of L-929 cells to the extracts and to the negative and positive controls ($n = 6$). The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). WST-1; water soluble tetrazolium salts, Blank; Growth medium, PC; positive control, CSC; calcium silicate-based cement, CSZ x ; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

7. 항균성 평가

Figure 6에서 제시한 *E. faecalis*의 CFU 실험 결과, 실험군 CSZ1와 CSZ3 그룹은 대조군 CSC 그룹과 비교하여 각각 95.5%, 56.8% CFU가 감소하였고 통계적으로 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 하지만, CSZ5 그룹은 대조군 CSC 그룹과 비교하였을 때 CFU가 16.5% 감소하였으나 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다($p > 0.05$).

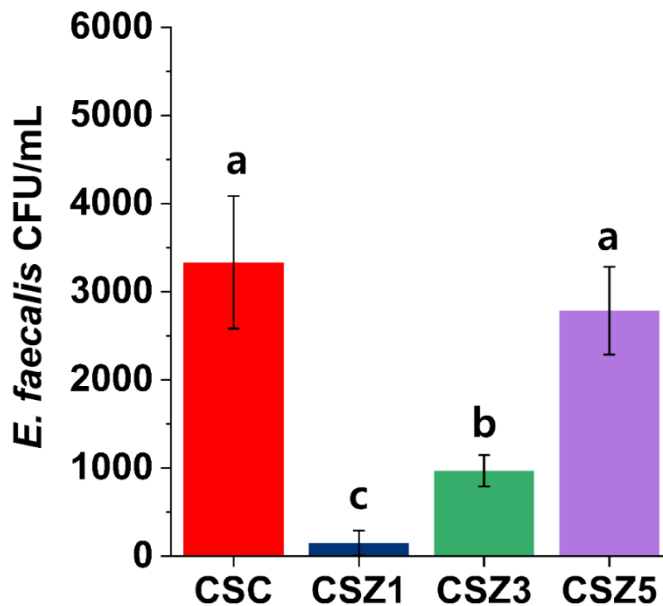


Figure 6. Comparison of colony forming units between CSC and CSZ groups ($n = 5$). The different lowercase letter indicates significant difference ($p < 0.05$). CSC; calcium silicate-based cement, CSZx; calcium silicate-based cement in addition to the zinc oxide nanoparticle with x wt% ($x = 1, 3, 5$).

IV. 고찰

규산칼슘 기반 시멘트(CSC)는 경조직 형성을 유도하고 우수한 특성으로 인해 근관 치료 재료로 널리 사용되고 있으며 30년 동안 대표적으로 사용하는 재료로 입증되었다. 그러나 다수의 연구에서 CSC는 근관 치료 후 세균 감염 예방이 필요하다고 보고하였다(Nirupama et al., 2014). 이러한 CSC의 한계를 극복하기 위해 많은 연구자가 금속산화물에 항균성을 향상하기 위한 연구를 진행하였다. ZnO-NPs는 항균 특성을 가지고 있어 다양한 치과용 재료에 적용하여 연구가 진행되었지만 CSC에 ZnO-NPs를 추가하여 치아 변색을 방지하는 연구에 중점을 두었다(Marciano et al., 2017). 하지만, ZnO-NPs를 첨가한 CSC에 대한 항균성 평가는 미비하였다. 본 연구는 CSC의 항균성을 향상해 세균 침입을 예방하기 위한 ZnO-NPs 첨가량을 최적화하여 임상에서 사용될 수 있는 가능성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서는 Proroot MTA(Dentsply Sirina, Tulsa, OK, USA)의 장점과 유사하고 생체적합성을 가지며 경화시간을 단축한 CSC (Endocem MTA, Maurchi, wonju-si, Republic of Korea)를 사용하였다 (Choi et al., 2013). 대조군인 CSC (Endocem MTA)는 제조사가 명시한 시간은 195초로 짧은 경화시간을 가지고 있지만 CSC에 ZnO-NPs를 첨가할수록 유의한 차이로 경화시간이 증가하는 것을 확인하였다. Macriano 등의 보고에 의하면 ZnO-NPs 양이 증가할수록 CSC의 경화시간에 영향을 미치지 않았다고 하였다 (Tan et al., 2023). 이에 반하여, Tan 등은 CSC와 혼합한 ZnO-

NPs의 첨가량이 증가할수록 알칼리 환경에서 용해된 ZnO의 아연 이온이 수산화 이온과 상호작용하여 수산화 칼슘의 형성을 방해하고 규산 칼슘 수화물의 생성을 억제함으로써 경화시간이 지연되었다고 보고하였다(Tan et al., 2023). 이러한 원인은 CSC가 수화 과정에서 칼슘과 수산화 이온이 방출되며, ZnO-NPs에서 방출하는 아연 이온이 칼슘 이온을 대신하여 수산화 이온과 결합함으로써 수산화아연이 형성되는 것으로 사료된다. 이와 마찬가지로, Garg and White 등과 Wang 등에 따르면 규산 칼슘 기반의 시멘트가 수화되는 동안 알칼리 환경에서 ZnO-NPs에서 방출하는 아연 이온이 수산화 이온과 결합하여 수산화아연이 형성되며 경화시간이 지연된다고 보고하였다(Garg and White, 2017; Wang et al., 2020). ZnO-NPs 함량이 높을수록 경화시간이 증가하며, 이는 임상적 상황을 고려하였을 때 물성의 변화가 생길 수 있고 밀폐 능력이 감소하여 박테리아를 침투하여 감염을 유발할 수 있다(Kwon et al., 2019).

압축강도는 교합력에 대한 근관 치료용 재료의 저항력을 의미하며 이는 CSC의 수화 과정과 상관관계가 높다고 알려져 있다(Samiei et al., 2017). 1 wt% ZnO-NPs의 함량을 첨가한 CSZ1 실험군은 대조군 CSC와 유의한 차이가 없었으나 3 wt%와 5 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSZ3, CSZ5 실험군은 유의한 차이로 압축강도가 감소하는 것을 확인하였고 이와 동일하게, Guerreiro-Tanomaru 등과 Eskandarinezhad 등은 5 wt% ZnO-NPs를 첨가한 실험군에서 대조군 CSC에 비해 압축강도가 유의한 차이로 감소한다고 하였다(Eskandarinezhad et al., 2020; Guerreiro-Tanomaru et al., 2014). 경화시간에서 언급한 것과 같이 ZnO-NPs와 CSC가 함께 수화하는 과정에서 무정형 구조를 가진 수산화아연이 생성되며, 이는 CSC 구조에 불침투성 층을 형성하여

균열을 일으켜서 압축강도를 감소시킨 것으로 보고되었다(Bolhari et al., 2020; Gawlicki and Czamarska, 1992). 또한, XRD의 결과로부터 CSC에 ZnO-NPs의 첨가량이 증가할수록 ZnO의 구조상(phase)이 검출되는 것을 확인하였지만 수산화아연은 무정형 구조를 가지고 있으므로 XRD로 분석 결과 peak에서 상이 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

세포독성 평가 결과를 통한 생물학적 특성은 CSC와 CSZ 실험군들 모두 일반 배지에서 배양한 대조군보다 높은 세포 생존율을 보였고, 세포에 대한 독성이 없는 것을 확인하였다. CSC에서 방출하는 칼슘 이온은 독성이 없을 뿐만 아니라 세포의 활성도를 높이고 세포 부착이 활발히 일어난다고 하였다(Antonijević et al., 2021). 또한, Parirokh과 Torabinejad와 Zhang 등에 따르면 CSC에서 방출된 칼슘 이온은 세포독성을 나타내지 않으며 세포의 활성도를 증가시켰다고 보고하였다(Parirokh and Torabinejad, 2014; Zhang et al., 2020). 반면, Cierech 등과 Patrón-Romero 등은 ZnO-NPs는 함량이 높을수록 인체에 독성을 가지고 있지만 함량이 낮을수록 세포에 대한 독성이 없다고 보고하였다(Cierech et al., 2019; Patrón-Romero et al., 2020).

항균성 측면에서 근관 질환과 가장 관련성이 높은 *E. faecalis*를 사용했으며 예상과 다르게 1 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSZ1 그룹에서 대조군 CSC와 CSZ3, CSZ5 실험군들에 비해 항균력이 증가하였다. ZnO-NPs는 수화 되는 동안 아연 이온이 방출하고 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)를 형성하여 박테리아의 세포막을 파괴한다고 알려져 있다(Sirelkhatim et al., 2015). 1 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC의 항균 효과가 있는 것을 확인하였지만

3 wt% ZnO-NPs 이상 첨가한 CSC는 수화반응으로 수산화아연이 생성되고 ZnO-NPs의 장점인 항균성의 효과가 미비한 것을 확인하였다. Guerreiro-Tanomaru 등은 항균성 측면에서 5 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC는 대조군 CSC와 유의한 차이가 없었고 이는 CSC와 ZnO의 수화 반응과 연관될 수 있다고 보고되었다 (Guerreiro-Tanomaru et al., 2014). Tan et al은 이러한 원인으로 2 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC가 수화 반응 시 CSC에서 칼슘이온 방출로 알칼리성 환경이 만들어지고, 알칼리성 환경의 ZnO에서는 아연산염(Zincate; $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$)이 생성된다고 하였다. 이후, CSC에서 방출된 Ca^{2+} 이 아연산염과 결합하여 칼슘아연산염($\text{CaZn}_2(\text{OH})_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)이 형성된다고 보고되었다(Tan et al., 2023). 따라서, 2 wt% 이상 ZnO-NPs를 첨가한 CSC에서는 항균 효과가 감소하는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 1 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC는 대조군 CSC와 비교하여 경화시간 및 압축강도를 유지하며 세포독성이 없으며 항균 효과가 나타난 것을 확인하였다. 하지만, 물리적 특성을 고려하였을 때 ZnO-NPs의 함량이 증가할수록 칼슘아연산염이 형성되어 ZnO-NPs의 장점인 항균력을 감소시키는 것으로 사료된다. 본 연구의 한계점으로는 장시간이 지남에 따라 ZnO-NPs와 CSC의 수화 시 발생하는 물질들의 기전과 지속적인 항균 효과에 대한 평가 및 임상에서 적용하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

V. 결론

본 연구는 CSC에 ZnO-NPs 함량을 다양하게 첨가하여 물리적 특성과 세포 생존 여부를 확인하기 위한 세포독성 평가를 진행하였다. 또한, *E. faecalis*에 대한 항균성 평가를 통해 CSC에 적합한 ZnO-NPs의 함량을 확인하고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CSC에 ZnO-NPs의 함량이 증가할수록 경화시간은 CSZ 그룹이 대조군 CSC보다 증가하였고 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 또한, 압축강도는 CSC와 CSZ1 그룹과 비교하여 CSZ3과 CSZ5 그룹은 강도가 감소하였고 유의한 차이를 보였으며 모든 CSZ 그룹의 용해도는 3% 이하였다($p < 0.05$).

2. XRD 분석에서 CSC와 비교하여 CSZ 그룹에서는 ZnO의 상(phase)이 검출한 것을 확인하였고 24시간 용출된 CSC와 CSZ 그룹의 아연 이온 방출량 결과, CSZ3 그룹에서 높은 아연 이온을 방출한 것을 확인하였지만 실험군 CSZ1과 CSZ5 그룹과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다($p > 0.05$). 따라서 CSC와 CSZ 그룹의 물리·기계적 특성에 차이가 없을 것이라는 귀무가설을 부분적으로 기각하였다.

3. 세포독성 평가는 세포 배양 배지로 배양한 Blank와 양성대조군 (positive control; PC)를 비교하였을 때 대조군과 실험군들의 세포생존율에서 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 하지만, 대조군 CSC와 비교하여 실험군 CSZ 그룹에서 세포 생존율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 따라서 본 연구에서 CSC와 CSZ의 세포독성에 차이가 없을 것이라는 귀무가설을 채택하였다.

4. *E. faecalis*에 대해 직접 접촉하여 CFU를 도출한 결과, 실험군 CSZ1은 대조군 CSC와 비교하여 약 95.5%로 CFU의 감소율이 높았고 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 따라서 대조군 CSC와 실험군 CSZ 그룹의 항균성에 차이가 없을 것이라는 귀무가설을 부분적으로 기각하였다.

본 연구에 대한 결과를 종합하면, 1 wt% ZnO-NPs를 첨가한 CSC는 임상적 환경을 고려 시 근관 치료에 효과적으로 사용할 수 있다. 또한, CSC에 ZnO-NPs를 첨가할 때 ZnO-NPs의 함량을 고려하여 근관 치료에 적용할 필요가 있다. 하지만, ZnO-NPs와 CSC의 수화 시 발생하는 화학적 반응에 대한 기전과 장기간으로 지속적인 항균성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

- Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M (2015). Antimicrobial activity and ph of calcium hydroxide and zinc oxide nanoparticles intracanal medication and association with chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract* 16(8): 624-629.
- Antonijević D, Despotović A, Biočanin V, Milošević M, Trišić D, Lazović V, et al. (2021). Influence of the addition of different radiopacifiers and bioactive nano-hydroxyapatite on physicochemical and biological properties of calcium silicate based endodontic ceramic. *Ceramics International* 47(20): 28913-28923.
- Baek M, Chung H-E, Yu J, Lee J-A, Kim T-H, Oh J-M, et al. (2012). Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*: 3081-3097.
- Bolhari B, Meraji N, Sefideh MR, Pedram P (2020). Evaluation of the properties of Mineral Trioxide Aggregate mixed with Zinc Oxide exposed to different environmental conditions. *Bioactive materials* 5(3): 516-521.
- Choi Y, Park S-J, Lee S-H, Hwang Y-C, Yu M-K, Min K-S (2013). Biological effects and washout resistance of a newly developed fast-setting pozzolan cement. *Journal of endodontics* 39(4): 467-472.
- Cierech M, Wojnarowicz J, Kolenda A, Krawczyk-Balska A, Prochwicz E, Woźniak B, et al. (2019). Zinc oxide nanoparticles cytotoxicity and release from newly formed PMMA–ZnO nanocomposites designed for denture bases. *Nanomaterials* 9(9): 1318.
- Darvell B, Wu R (2011). “MTA”—an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dental Materials* 27(5): 407-422.
- Eskandarinezhad M, Ghodrati M, Azar FP, Jafari F, Pakchin PS, Abdollahi AA, et al. (2020). Effect of incorporating hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles on the compressive strength of white mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry* 21(4): 300.
- Gandolfi M, Taddei P, Tinti A, Prati C (2010). Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *International endodontic journal* 43(10): 917-929.
- Garg N, White CE (2017). Mechanism of zinc oxide retardation in alkali-activated materials: an in situ X-ray pair distribution function investigation. *Journal of Materials Chemistry A* 5(23): 11794-11804.

Gawlicki M, Czamarska D (1992). Effect of ZnO on the hydration of Portland cement. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 38(9): 2157-2161.

Guerreiro-Tanomaru JM, Trindade-Junior A, Cesar Costa B, da Silva GF, Drullis Cifali L, Basso Bernardi MI, et al. (2014). Effect of zirconium oxide and zinc oxide nanoparticles on physicochemical properties and antibiofilm activity of a calcium silicate-based material. *The Scientific World Journal* 2014.

Han L, Kodama S, Okiji T (2015). Evaluation of calcium-releasing and apatite-forming abilities of fast-setting calcium silicate-based endodontic materials. *International Endodontic Journal* 48(2): 124-130.

Hung C-J, Kao C-T, Shie M-Y, Huang T-H (2014). Comparison of host inflammatory responses between calcium-silicate base material and IRM. *Journal of Dental Sciences* 9(2): 158-164.

Javidi M, Zarei M, Naghavi N, Mortazavi M, Nejat AH (2014). Zinc oxide nano-particles as sealer in endodontics and its sealing ability. *Contemporary clinical dentistry* 5(1): 20.

Kim RJ-Y, Kim M-O, Lee K-S, Lee D-Y, Shin J-H (2015). An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 60(10): 1497-1502.

Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T (2014). Zinc oxide—from synthesis to application: a review. *Materials* 7(4): 2833-2881.

Kwon J-S, Lee M-J, Kim J-Y, Kim D, Ryu J-H, Jang S, et al. (2019). Novel anti-biofouling bioactive calcium silicate-based cement containing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *PLoS One* 14(1): e0211007.

Lee S-J, Monsef M, Torabinejad M (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of endodontics* 19(11): 541-544.

Marciano MA, Camilleri J, Costa RM, Matsumoto MA, Guimarães BM, Duarte MAH (2017). Zinc oxide inhibits dental discoloration caused by white mineral trioxide aggregate angelus. *Journal of endodontics* 43(6): 1001-1007.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD (2004). pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *Journal of endodontics* 30(4): 218-219.

Miri A, Mahdinejad N, Ebrahimi O, Khatami M, Sarani M (2019). Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. *Materials Science and Engineering: C* 104: 109981.

Nirupama DN, Nainan MT, Ramaswamy R, Muralidharan S, Usha HHL, Sharma R, et al. (2014). In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of four endodontic biomaterials against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. International journal of biomaterials 2014.

Parirokh M, Torabinejad M, Dummer P (2018). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part I: vital pulp therapy. International endodontic journal 51(2): 177-205.

Patrón-Romero L, Luque P, Soto-Robles C, Nava O, Vilchis-Nestor A, Barajas-Carrillo V, et al. (2020). Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles by green synthesis method. Journal of Drug Delivery Science and Technology 60: 101925.

Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. (2021). Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. Dental Materials 37(2): 311-320.

Sahoo S, Maiti M, Ganguly A, Jacob George J, Bhowmick AK (2007). Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber. Journal of applied polymer science 105(4): 2407-2415.

Samiei M, Ghasemi N, Asl-Aminabadi N, Divband B, Golparvar-Dashti Y, Shirazi S (2017). Zeolite-silver-zinc nanoparticles: Biocompatibility and their effect on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. Journal of clinical and experimental dentistry 9(3): e356.

Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS (2015). Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. Clinical oral investigations 19: 2015-2025.

Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. Nano-micro letters 7: 219-242.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. Journal of endodontics 32(2): 93-98.

Tan J, Sierens Z, Vandevyvere B, Dan H, Li J (2023). Zinc oxide in alkali-activated slag (AAS): retardation mechanism, reaction kinetics and immobilization. Construction and Building Materials 371: 130739.

Toledano M, Cabello I, Osorio E, Aguilera FS, Medina-Castillo AL, Toledano-Osorio M, et al. (2019). Zn-containing polymer nanogels promote cervical dentin remineralization. *Clinical Oral Investigations* 23: 1197-1208.

Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Ford TP (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics* 21(7): 349-353.

Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PM (2018). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part II: other clinical applications and complications. *International endodontic journal* 51(3): 284-317.

Tran X, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. (2012). Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *Journal of dental research* 91(12): 1166-1171.

Wang L, Geddes DA, Walkley B, Provis JL, Mechtcherine V, Tsang DC (2020). The role of zinc in metakaolin-based geopolymers. *Cement and Concrete Research* 136: 106194.

Yang Y, Huang L, Dong Y, Zhang H, Zhou W, Ban J, et al. (2014). In vitro antibacterial activity of a novel resin-based pulp capping material containing the quaternary ammonium salt MAE-DB and Portland cement. *PloS one* 9(11): e112549.

Zhu J, Liang R, Sun C, Xie L, Wang J, Leng D, et al. (2017). Effects of nanosilver and nanozinc incorporated mesoporous calcium-silicate nanoparticles on the mechanical properties of dentin. *PLoS One* 12(8): e0182583.

ABSTRACT (IN English)

**Evaluation of physico mechanical properties, cytotoxicity and
antibacterial properties of calcium silicate-based cement
incorporated with zinc oxide nanoparticles**

Jae -Yong Yoo

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jae-Sung Kwon, M.D., Ph.D.)

Calcium silicate-based cement (CSC) is commonly used in root canal treatments such as pulp capping, apexification, root-end fillings, and perforation closure. CSC has been used as root canal sealer due to its excellent sealing capabilities and antibacterial properties related to increased pH. Still, antibacterial properties were indicated to be somewhat limited. Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) have been widely used as biomaterials for their antibacterial effects. The purpose of this study was to evaluate the physical properties, cytotoxicity, and antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) by adding various ratios of ZnO-NPs to CSC.

Different proportions of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) were added to calcium silicate-based cement (CSC); 0 wt% (control), 1 wt% (CSZ1), 3 wt% (CSZ3), and 5 wt% (CSZ5). Physico mechanical, setting time, compressive strength, X-ray diffraction (XRD), zinc ion release, and solubility were measured. Also, cytotoxicity was evaluated by water soluble tetrazolium-1 (WST-1) assay using L-929 fibroblasts, and antibacterial activity was evaluated by colony forming unit (CFU) against *E. faecalis*.

As the content of ZnO-NPs in CSC increased, the setting time in the CSZ group significantly increased compared to the control CSC ($p < 0.05$). In addition, compared to the CSC and CSZ1 groups, the compressive strength of the CSZ3 and CSZ5 groups showed significantly decreased values ($p < 0.05$) while the solubility of all CSZ groups were 3% or less. In XRD analysis, compared to CSC, the CSZ group confirmed that ZnO phase was detected, and as a result of zinc ion emission in the CSC and CSZ groups eluted for 24 hours, it was confirmed that the CSZ3 group released high zinc ions, but there was no statistically significant difference compared to the experimental groups CSZ1 and CSZ5 groups ($p > 0.05$). cytotoxicity evaluation, compared to the control CSC, the CSZ group showed a significant difference when compared to Blank and positive control (PC) cultured with cell culture medium ($p < 0.05$), but the CSZ group showed a significant difference compared to CSC. There appeared to be no significant difference in cell viability ($p > 0.05$). However, the antibacterial effect of the CSZ1 group was more effective than the other experimental groups, showing a statistically significant difference ($p < 0.05$).

In conclusion, the addition of 1 wt% ZnO-NPs to CSC increases the antibacterial effect and maintained the physical properties and cell viability as compared with CSC, with the potential for the endodontics materials.

Key words: Calcium silicate-based cement (CSC), Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), Physico mechanical properties, Cytotoxicity, Antibacterial