creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

치의과학박사 학위논문

염기성 pH 제어형 mineral trioxide aggregates(MTA)의 조직적합성 연구

2022년 8월

서울대학교 대학원

치의과학과 치과생체재료과학 전공

박 현 제

염기성 pH 제어형 mineral trioxide aggregates(MTA)의 조직적합성 연구

지도교수 양 형 철

이 논문을 치의과학 박사 학위논문으로 제출함

2022년 6월

서울대학교 대학원

치의과학과 치과생체재료과학 전공

박 현 제

박현제의 박사 학위논문을 인준함

2022년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

본 연구에서는 칼슘실리케이트 (calcium silicate)계 치과용 충전재인 mineral trioxide aggregate (MTA)에 bone cement의 주요 구성 성분인 dicalcium phosphate dihydrate (DCPD)를 첨가하여 강염기 pH의 제어 능력을 확인하고 해당 재료의 생체적합성을 평가하고자 하였다.

OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA의 경화과정에서 시간에 따른 pH 변화를 측정한 결과 용출 7일 차부터 DCPD-OrthoMTA의 pH가 11.0 이하로 떨어지는 것을 확인할 수 있었고, 19일 차에는 OrthoMTA의 pH가 11.6±0.4, DCPD-OrthoMTA의 pH가 8.8±0.6을 나타내 OrthoMTA와 비교하여 DCPD-OrthoMTA의 염기성 pH 억제 능력이 개선된 것을 확인하였다. 염기성 pH 제어 능력이 세포활성도에 미치는 영향을 평가하기 위해 섬유아세포 (NIH3T3)를 이용한 세포독성 시험을 진행한 결과 DCPD-OrthoMTA를 희석하지 않은 100% 용출액으로 처리한 세포는 23.5%의 세포활성을 보였고, 50% 용출액은 80.1%의 세포활성을 보여 OrthoMTA 용출액보다 낮은 세포독성을 유도한 것으로 나타났다. 세포독성이 경조직 적합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 랫드(Rat)의 두개골을 이용한 골조직 이식 시험을 진행한 결과 양성대조군인 Bio-Oss는 신생골을 형성하여 결손 부위의 경조직 부피가 이식 후 4주, 8주 및 12주에 점차적으로 증가하였으나, Bio-Oss와 DCPD-OrthoMTA를 함께 적용한 경우 결손 부위의 경조직 부피가 변화 없이 그대로 유지되었으며, 신생골 형성도 관찰되지 않았다. 이식 거부 반응 등의 부작용 없이 12주 동안 이식부위에

DCPD-OrthoMTA 입자가 안정적으로 유지되어 골시멘트 등의 생체불활성 (bio-inert) 재료로서의 가능성을 보여주었다. 연조직 적합성 평가를 위하여 마우스 등 부위의 피하조직 이식 시험을 통해 이식 부위의 염증 반응 세포, 연조직 반응 등을 전반적으로 평가한 상대 자극 지수를 산출하였으며, DCPD-OrthoMTA의 자극 지수가 OrthoMTA 보다 미세하게 높았으나, irritation grade 에서는 차이가 없어 유의한 차이는 확인되지 않았다.

비록 DCPD-OrthoMTA가 경조직과 연조직에 대한 적합성을 크게 향상시키지는 않았으나 국소적으로 pH 상승을 제어하여 OrthoMTA의 생체적합성을 개선시키고, 골이식 부위에 거부 반응 없이 안정적으로 잔존하는 것이 확인되어 다양한 임상에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

주요어: Mineral trioxide aggregates, Dicalcium phosphate dihydrate, 골이식, 피하이식, 생체적합성

학 번: 2013-31213

목 차

I. 서론 ····· 1
1) MTA의 개발과 적용 ····· 1
2) MTA의 생물학적 영향 ····· 2
3) DCPD의 pH 조절 기전 ····· 5

II. 재료 및 방법 ····· 7
1) MTA 디스크 제조 및 용출 ····· 7
2) MTA 용출액 pH 측정 ····· 8
3) 세포독성 측정 ····· 9
4) 골조직이식시험 ····· 9
5) 피하이식시험 ····· 11
6) 통계분석 ····· 13

III. 결과 ····· 14
1) OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA 용출액의 pH 변화 ····· 14
2) DCPD-OrthoMTA의 세포독성 측정 ····· 16
3) DCPD-OrthoMTA를 적용한 경조직 반응 ····· 18
4) DCPD-OrthoMTA를 적용한 연조직 반응 ····· 22

IV. 고찰 ····· 25

V. 결론 ····· 28

참고문헌 ····· 30

Abstract ····· 35

표 목 차

[Table 1] Composition of MTA ····· 7

[Table 2] Histological evaluation criteria ····· 12

[Table 3] Inflammation scores ····· 24

그 림 목 차

[Figure 1] In-vivo experimental images ····· 10

[Figure 2] pH changes of DCPD-OrthoMTA ····· 15

[Figure 3] Cytotoxicity of DCPD-OrthoMTA ····· 17

[Figure 4] Images of Micro CT ····· 19

[Figure 5] Measurement of hard tissue volume ····· 20

[Figure 6] Images of H&E stained hard tissue ····· 21

[Figure 7] Images of H&E stained soft tissue ····· 23

I. 서론

1) MTA의 개발과 적용

Mineral Trioxide Aggregate (MTA)는 칼슘실리케이트계 (Calcium silicate) 시멘트로 치과 임상에 널리 사용되고 있으며, 초기에는 치근단 충전을 위하여 개발된 재료였다. MTA는 건축용 시멘트 (Portland cement)에서 유래된 것으로 알려져 있으나, Portland cement와는 달리 중금속 함량이 낮고 온도 습도의 변화에 물리적 형태가 안정적이기에 임상의 적용에 더 적합하다[1]. 또한, 기존 치근단 역충전 재료인 IRM, Super-EBA 및 아말감 등에 비해 우수한 밀폐 효과와 생체적합성을 지닌것으로 알려져 있다. MTA의 구성성분은 calcium silicate ($CaSiO_4$), bismuth oxide (Bi_2O_3), calcium carbonate ($CaCO_3$), calcium sulfate ($CaSO_4$) 및 calcium aluminate ($CaAl_2O_4$)이며 수화 시 콜로이드 겔 상태가 된다. 최초로 개발된 MTA는 ProRootMTA (Dentsply, Tuka, OK, USA)로 알려져 있으며, 현재까지도 임상에 널리 활용되며 많이 연구된 MTA 중 하나이다.

초기 MTA 제품의 경우 재료를 혼합하는 과정의 번거로움과 긴 경화 시간으로 인하여 사용 편의성이 떨어졌다. 이후 calcium sulfate의 함량을 줄여 경화시간이 단축된 MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil)가 개발되었고[2], ProRootMTA와 성분이 유사하지만 중금속 함량이 더 낮은 OrthoMTA (BioMTA, Seoul, Korea)도 개발되었다[3]. MTA를 다방면으로 개선시키기 위한 연구는 계속적으로 이루어지고 있으며, MTA에 1%의 methylcellulose와 2%의 calcium chloride를 첨가하였을 때 사용 편의성이 개선되고 경화시간이 줄어든다는 것이 보고된 바 있다

[4]. 최근에는 생체적합성이 부족한 치과재료를 이용한 치료를 진행할 때 조직을 보호하는 이장재로 사용되기도 한다. 실제로 치수 복조 과정에서 기존에 널리 활용되고 있는 calcium hydroxide보다 MTA를 활용하였을 때 치료 성공율이 더 높다는 것이 보고된 바 있다[5]. 치료 용도에 맞춘 프리 믹스 형태의 제품, 물리적 특성이 개선된 제품 등도 다양하게 출시되었으며, 근관 충전재료의 하나인 가타퍼쳐를 활용하여 MTA가 경화되기 전에 진동을 가하면 밀폐 효과가 더욱 증진되는 것이 보고된 바 있다[6]. 이처럼 MTA의 활용 범위는 점점 다양해지고 있으며, 가타퍼쳐 충전 대신 MTA를 이용해 근관 충전 치료를 진행하는 사례도 늘고 있다.

하지만 MTA의 재료적 특성으로 인해 근관장까지의 충전 길이 조절이 어렵고, 부득이한 상황에서 MTA 재료 제거가 어렵기 때문에 근관 충전 재료를 대체하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. 또한, 개발단계에서 추가되는 물질들로 인하여 MTA 구성성분의 조성이 달라질 경우 생체적합성에 미치는 영향에 대해서도 다양한 연구가 필요하다.

2) MTA의 생물학적 영향

MTA는 생체적합성이 우수한 재료로 알려져 있으며, 일부 연구자의 보고를 제외하고는 기존 재료들과 유사하거나 상대적으로 더 낮은 세포독성을 나타내는 것으로 확인되고 있다. 사람의 골육종에서 유래된 MG-63 세포를 이용하여 역충전 재료로 널리 활용되던 GIC (glass inomer cement), IRM (reinforced zinc oxide-eugenol cement)와 ProRootMTA 및 OrthoMTA의 세포활성도와 세포 형상을 관찰하여 세포독성을 평가한 결과 ProRootMTA를 처리한 세포에서 가장 높은 세포활성도가 관찰되었고, IRM을 처리한 세포는 형상이 변화되었으며, 부착도도 감소되는 것이 확인되었다[7]. 치주인대 섬유아세포 (Periodontal

ligament fibroblast)에서 치근단 역충전재로 활용되고 있는 Super-EBA, 아말감 및 MTA의 세포독성을 비교한 결과 재료 혼합 즉시 측정한 세포독성과 경화 24시간 후 측정한 세포독성 모두 MTA에서 가장 낮은 독성이 관찰되었다[8]. 사람의 치수세포 (human dental pulp cell)에서 Bioaggregate, MicromegaMTA, ProRootMTA 및 IRM (intermediate restorative material)의 세포독성을 1, 7 및 14일 조건에서 관찰한 결과 IRM의 세포독성이 관찰되었으나, Bioaggregate와 두 종류의 MTA는 유사한 수준의 세포활성도를 보이는 것이 관찰되었다[9].

하지만 MTA의 경화 과정에서 약 pH 9 - pH 12.5 수준의 알칼리성이 유지되며 이는 세포 활성의 잠재적인 위험 요소가 될 수 있다. 모든 세포가 가지고 있는 단백질이나 핵산은 강염기의 환경에서 변성이 일어나 고유의 구조를 상실하게 되며 세포 활성의 저해 및 세포 자살을 초래할 수 있다. MTA는 경화 과정 중 생성되는 calcium hydroxide로 인하여 pH가 상승한다고 알려져 있으며, 이로 인하여 항균 효과를 가진다고 알려져 있기도 하다. 하지만 이러한 항균 작용은 pH 상승으로 인한 미생물의 활성 저해를 유발한 것이며, 이는 균에 특이적인 기작이 아니기 때문에 구강 내 존재하는 세포에도 영향을 줄 수 있다. Amini 등의 연구에서 MTA를 합성한 후 37℃, 습도 90% 이상의 다습한 환경에 1시간, 3시간, 24시간, 48시간, 7일 및 28일 조건으로 pH를 측정한 결과 합성 후 28일이 경과한 뒤에도 pH가 10.8로 유지되는 것이 확인되었다[10]. 이러한 강알칼리 환경은 세포가 MTA에 직접적으로 노출되었을 때 더욱 큰 영향을 미칠 수 있다. MTA에 보다 직접적으로 세포를 노출시키기 위하여 24-well plate 바닥에 MTA를 코팅 후 커버 글래스를 이용하여 SHEDs (Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous Teeth) 세포를 직·간접적으로 MTA에 노출하여 배양시켰다. 1일, 2일 및 3일 조건으로 세포활성도와 세포 형상을 관찰한 결과 직접적으로 MTA에 노출된 그룹은 세포활성도와 세포 형상이 유의하게 저하되는 것을 확인할 수 있었다[11]. 또한 MTA의 재료적 특성 중 하나인 미세 누출을 막는

능력에도 영향을 미칠 가능성을 연구하기 위하여 단근치인 상악중절치를 이용하여 CEM (calcium-enriched mixture) 시멘트와 MTA를 비교하였다. 해당 연구에서 3 mm 두께로 치근단에 적용된 재료를 pH 7.4와 pH 13 조건에서 1일, 7일, 14일 및 30일 간격으로 미세 누출 정도를 평가하였을 때, 강알칼리 조건에서 MTA의 근관 폐쇄능이 감소하는 것을 확인하였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다[12].

이러한 강염기의 환경은 세포 활성을 감소시키는 것에서 나아가 다양한 세포로 이루어진 조직의 괴사 및 염증 반응 등 조직적합성을 저해하는 요인으로도 작용할 수 있다. MTA의 생체적합성을 *in vivo* 조건에서 평가한 연구에 따르면 MTA로 채워진 사람의 상아세관을 마우스의 등-부위 피하 조직에 이식 후 12시간, 1일, 3일, 7일, 15일, 30일 및 60일 간격으로 관찰한 결과 초기 3일 동안 인터루킨-10 사이토카인 분비에 의해 염증 반응이 유래되는 것을 확인할 수 있었다[13]. 동일하게 마우스 모델을 이용하여 등-부위 피하 조직에 MTA로 채워진 폴리에틸렌 튜브를 이식한 후 7일, 15일, 30일 및 60일 간격으로 염증 세포의 반응과 인터루킨-6 사이토카인 분비를 관찰한 결과 이식 7일 후에 염증 세포와 인터루킨-6 분비가 높아지는 것을 확인할 수 있었다[14]. 하지만 이러한 사이토카인들은 오히려 세포의 분화를 촉진시켜 경조직의 형성에 긍정적인 영향을 준다는 연구도 보고된 바 있다[15].

실제 임상에서 MTA가 적용되는 환경은 주로 우식 또는 감염 부위이며, 감염 부위는 박테리아와 염증 세포의 반응으로 인하여 산성 환경이 형성되는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 MTA 경화 과정에서 발생하는 강알칼리성은 이러한 산성 환경과 만나며 일정 수준 중화되어 실제 임상에 적용될 때 강염기로 인한 부작용은 크지 않은 것으로 알려져 있다. 하지만 MTA는 적용 과정에서 구강 내 여러 세포에 영향을 미칠 수 있기 때문에 보다 다양한 조건에서의 연구가 필요하며, 강염기에 의한 세포독성이 구강에 존재하는 경조직 또는 연조직에 미칠 수 있는 영향에 대한 추가 연구가 필요하다.

3) DCPD의 pH 조절 기전

Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD; $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)는 calcium-phosphate 물질 중 하나로 bone cement의 구성성분으로 널리 사용되고 있다. 일반적으로 CPC (calcium phosphate cement)는 tetracalcium phosphate [$Ca_4(PO_4)_2O$]와 dicalcium phosphate anhydrous (DCPA: $CaHPO_4$)로 구성되어 있다고 알려져 있다[17]. CPC는 경화 과정에서 상아질의 재생을 촉진시켜주는 hydroxyapatite [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]와 유사한 구조와 성분을 가진 물질을 생성한다고 보고된 바 있다[17, 18].

$$2Ca_4(PO_4)_2O + 2CaHPO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$$

상대적으로 수용성이 높은 DCPD는 DCPA를 대체하여 hydroxyapatite와 유사한 물질을 생성할 수 있다는 것도 확인되었다[18, 19].

$$2Ca_4(PO_4)_2O + 2CaHPO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4\ H_2O$$

또한, DCPD를 첨가할 경우 적용하고자 하는 부위에 주입이 용이해지고 빠르게 경화되어 시멘트로의 재료적 특성이 개선되는 것이 확인되었다[20]. 또한, calcium phosphate계 시멘트는 조성성분에 따라 pH가 달라지며, DCPD가 존재할 경우 초기 pH가 저하되는 것이 확인되었다[21]. MTA는 물과 혼합되는 과정에서 칼슘실리케이트수화물 (calcium silicate hydrate), 수산화칼슘 (calcium hydroxide) 등이 형성되며 calcium hydroxide로 인하여 pH가 상승한다고 알려져 있다[22]. MTA의 경화 과정 중 발생되는 calcium hydroxide가 DCPD와 반응하여 강염기 환경을 조성하는 hydroxyl기 방출을 억제할 수 있을 것으로 추측한 바 있다[23]. DCPD를 첨가하여 MTA가 조성하는 강염기 pH를 제어함으로써 생체에 미칠 수 있는 잠재적 위험요소를 제거할 수 있을 것이라 예상되지만 실제 세포와 조직에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요하다.

MTA는 경화시간 단축, 미적 영향을 고려한 재료의 색조 개선 등을 위하여 미세하게 조성을 달리한 제품들이 많이 개발되었다. 이러한 조성의 차이는 재료의 성질을 다르게 하는 것에서 나아가 세포 독성 및 생체적합성에 대한 결과가 달라지기 때문에 MTA의 경우 다른 제조사의 제품들을 비교 평가하는 연구가 다수 보고되고 있다[24, 25, 26]. Kim 등의 연구에서는 Dycal (Dentsply Caulk,Milford, DE), ProRootMTA 및 EndocemMTA (Maruchi, Wonju, South Korea)를 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 평가하였으며, Sprague-Dawley 랫드의 상악 대구치 치수를 노출한 후 MTA를 도포한 후 비교 평가한 결과 1주 차에는 Dycal 이식군의 염증 반응이 가장 심하였으나, 4주차에는 3개 실험군 모두 염증 수치는 줄고 mineralization이 진행된 것을 확인할 수 있었다[27]. 따라서 다양한 MTA의 미세한 조성차이가 세포독성 및 생체적합성 등에 미칠 수 있는 영향에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

본 연구에서는 MTA의 경화 과정에서 야기되는 강염기성을 제어하기 위하여 제조된 DCPD-MTA의 세포독성과 조직적합성을 평가하고자 하였다. 또한, 이미 임상에 적용 중인 다른 MTA 물질도 양성대조군으로 설정하여 그 차이를 비교 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1) MTA 디스크 제조 및 용출

본 연구에서는 OrthoMTA (BioMTA, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 동일한 제조사에서 DCPD가 첨가된 OrthoMTA (DCPD-OrthoMTA)를 제공받았다. 실험에 사용된 MTA 조성은 Table 1과 같다. 분말 상태의 MTA를 ethylene oxide 가스로 멸균 후 사용하였다. 혼합 조건은 MTA 분말과 멸균증류수를 2:1 (무게/부피) 비율로 혼합 후, 디스크 형태의 테프론 몰드 (직경 5 mm, 두께 1 mm)를 이용하여 고정 후 생체와 유사한 환경을 재현하기 위하여 다습한 환경에서 경화시켰다. MTA 디스크를 6시간 경화 후 ISO 10993-12[28]에 따라 용출액을 준비하여 세포독성을 측정하였다. MTA 디스크 1 g 당 5 mL의 세포배양 배지에 3일 동안 상온 25±1℃ 조건으로 용출하였다. 용출액을 배지로 2배 연속 희석하여 100, 50, 25, 12.5 및 6.25%의 용출 희석액을 준비한 후 각 희석 농도별 세포독성 측정을 진행하였다.

Table 1. Composition of OrthoMTA and DCPD-OrthoMTA.

Material	Composition	Content (wt%)
OrthoMTA	Calcium Carbonate ($CaCO_3$)	53
	Silicon Dioxide (SiO_2)	21
	Aluminium Oxide (Al_2O_3)	6
	Bismuth Oxide (Bi_2O_3)	20
DCPD-OrthoMTA	Calcium Carbonate ($CaCO_3$)	53
	Silicon Dioxide (SiO_2)	21
	Aluminium Oxide (Al_2O_3)	6
	Bismuth Oxide (Bi_2O_3)	10
	DCPD ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)	10

2) MTA 용출액 pH 측정

MTA 디스크를 6시간 경화 후, 0.2 g/0.25 mL 비율로 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) (pH 7.2-7.4)를 넣고 19일 동안 pH meter (730P, Istek, Seoul, Korea)를 이용하여 pH 변화를 측정하였다. 시료 측정 전 매번 pH meter의 calibration을 시행하였다. 처음 3일은 24시간 간격, 이후에는 2일 간격으로 pH를 측정하였으며, pH 측정 후 매번 새로운 DPBS로 교환하였다.

3) 세포독성 측정

ISO 10993-5에 따라 MTA의 세포독성을 측정하였다[29]. 섬유아세포 (NIH3T3) (ATCC, Rockville,MD, USA)를 사용하였으며, 세포를 10% 우태혈청 (fetal bovine serum; FBS) (Gibco BRL)과 항생제 (penicillin-streptomycin) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 Dolbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) (Gibco BRL) 배지에서 배양하였다. 96-well plate에 1×10^4개의 세포를 각 well에 접종하여 24시간 배양 후, 세포 배지를 MTA 용출액이 희석된 배지로 교환하고 추가로 24시간을 배양하였다. 용출 희석액에 24시간 노출된 세포는 WST법을 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, DoGenBio, Suwon, Korea) 이용하여 세포활성도를 측정하였으며, 그 결과로 MTA 용출액의 세포독성을 평가하였다. 세포가 있는 각 well에 EZ-Cytox 용액을 10 μL씩 분주 후 37℃에서 1시간 배양 후, plate reader를 (Sunrize, TECAN, Salzburg, Austria) 이용하여 450 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. 용출 희석액이 첨가되지 않은 배지에서 배양된 세포를 음성대조군으로 활용하였다.

4) 골조직 이식시험

SPF (specific-pathogen-free; 특정 병원체 부재) 8주령 Sprague Dawley 수컷 랫드 (OrientBio Inc. Seongnam, Korea)를 공급 받아 사용하였다. 서울대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 동물실험을 진행하였다 (SNU-201217-4). 케타민 (Yuhan Co., Kunpo, Korea)과 자일랜 (Rumpun, Bayer HealthCare, Leverkusen, German)을 1:1 (v/v) 비율로 혼합한 뒤 복강내 주사로 마취하여 이식시험을 진행하였다. Figure 1과 같이 외부 직경이 4 mm인 트레핀 버를 사용하여 두정골 양측에 평행하게 구멍을

형성하여 골결손을 유발하였다. 27마리의 랫드에 각각 2개의 결손부위를 형성하여 Bio-Oss (Geistlich Pharmaceutical, Wolfhausen, Switzerland), DCPD-OrthoMTA, OrthoMTA를 결손 부위에 채워주었다 (n=6). Bio-Oss 1 g 당 DCPD-OrthoMTA 0.25 g의 비율로 혼합하였으며, DCPD-OrthoMTA와 OrthoMTA는 제조사의 지침에 따라 멸균수와 혼합하여 이식하였다. OrthoMTA는 DCPD-OrthoMTA와 동일한 양을 이식하였다. 이식 후, 1, 2 및 3 개월에 랫드를 이산화탄소로 질식사시킨 후 두피를 거상하고 이식 부위를 포함하는 두개골 조직시편을 채득하였다.

두개골 결손 부위의 경조직 부피 변화 관찰을 위하여 *in vivo* micro-CT scanner (Quantum GX, PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA)를 이용하였다. X-ray 광원은 90 keV, 88 μA, 45 × 45 mm^2 FOV 조건으로 설정하여 4분 동안 스캐닝하였다. 90-μm voxel size의 고해상도 스캐닝 모드를 사용하였다. Caliper Micro-CT 분석 소프트웨어를 이용하여 경조직 부피를 측정하였다.

두개골 결손 부위를 4% 파라포름알데하이드 (para-formaldehyde)에 상온 15분 조건으로 고정하였다. 고정된 시편은 파라핀으로 포매하고, 조직 절편을 만든 후, 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 염색된 시편은 광학현미경 (DM 5000B, Leica, Berlin, Germany)으로 관찰하였다.

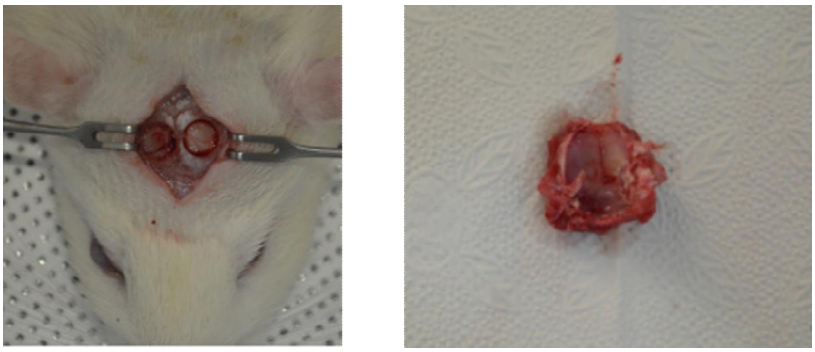

Figure 1. Experimental images of calvarial defects.

5) 피하이식시험

ISO 10993-6에 따라 마우스를 이용한 피하 이식시험을 수행하여 MTA에 의한 염증 발현 정도를 평가하고자 하였다[30]. 제조사의 지침에 따라 OrthoMTA, DCPD-OrthoMTA 및 ProRoot MTA (Dentsply, Tuka, OK, USA)를 멸균수와 혼합하여 직경 2 mm, 길이 5 mm의 polytetrafluorethylene (PTFE) tube에 넣고, 마우스 등-부위에 위치한 피하조직에 이식하였다. 이식은 케타민 마취 하에 진행되었다. 내부가 막혀있는 PTFE rod를 대조군으로 활용하였고, 각 군당 6마리 반복실험을 진행하였다. 서울대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 동물실험을 진행하였다 (SNU-160718-8-3).

이식 2주 후, 마우스를 안락사시키고, 이식된 PTFE와 주변조직을 분리하여 4% 파라포름알데하이드에 상온 15분 조건으로 고정하였다. 고정된 시편은 파라핀으로 포매하고, 조직 절편을 만든 후, 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 염색된 시편은 광학현미경 (DM 5000B, Leica, Berlin, Germany)으로 관찰하여 조직학적 평가를 진행하였다. 일정 면적 당 다핵형 세포, 림프구, 형질세포 등의 세포를 계수하여 염증발현 정도를 평가하고, 신생혈관 형성, 섬유화 및 지방의 침윤 정도를 정량 평가하였다 (Table 2).

Table 2. Histological evaluation criteria.

	Cell type/ Tissue response	Score				
		0	1	2	3	4
Inflammation cells and response	Polymorphonuclear cell	0	1-5/phf[1]	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
	Lymphocyte	0	1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
	Plasma cell	0	1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
	Macrophage	0	1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
	Giant cell	0	1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
	Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Packed
Tissue response	Neo-vascularization	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1 to 3 buds	Group of 4 to 7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting fibroblastic structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
	Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
	Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

* Irritation score: (Sum scores of inflammation cells and response x 2 + Sum scores of tissue response) / Number of test animals
* Relative irritation scores (RIS): Irritation score of test group – Irritation score of control group
* Irritation grade: non-irritant (RIS: 0.0-2.9), slight irritant (RIS: 3.0-8.9), moderate irritant (RIS: 9.0-15), severe irritant (RIS: > 15)

[1]phf=per high magnification image (400x)

6) 통계분석

조직적합성을 연구한 결과는 비교대상이 3개 이상인 경우 일원배치분산분석 (oneway Analysis Of Variance : ANOVA)을 사용하였고, 2개인 경우 *t-test*로 진행하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

III. 결과

1) OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA 용출액의 pH 변화

Figure 2는 OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA의 용출액 pH를 측정한 결과이다. 디스크 형태로 6시간 경화 후, 24, 48, 72시간부터 이후 2일 간격으로 19일까지 측정하였다. 초기 24시간의 pH는 12.5±0.1이었고 72시간 후까지 강염기 pH가 유지되었다. DCPD-OrthoMTA의 경우 초기 24시간에 pH는 12.0±0.1 이었으며, 72시간 후부터 pH 11.5±0.1로 떨어지고 19일에는 pH 8.8±0.6 수준까지 떨어지는 것을 확인하였다. 또한 OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA의 용출액 pH를 비교한 결과 초기 24시간부터 OrthoMTA pH 12.5±0.1, DCPD-OrthoMTA pH 12.0±0.1로 유의적 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 시간이 지날수록 OrthoMTA와 DCPD-OrthoMTA간의 pH 차이는 더욱 커졌으며, 최종적으로 19일에는 OrthoMTA pH 11.6±0.4, DCPD-OrthoMTA pH 8.8±0.6으로 2.8의 차이를 보였다. 결과적으로 DCPD-OrthoMTA가 경화과정 중 유발되는 강염기성의 환경을 성공적으로 제어할 수 있는 것을 확인하였다.

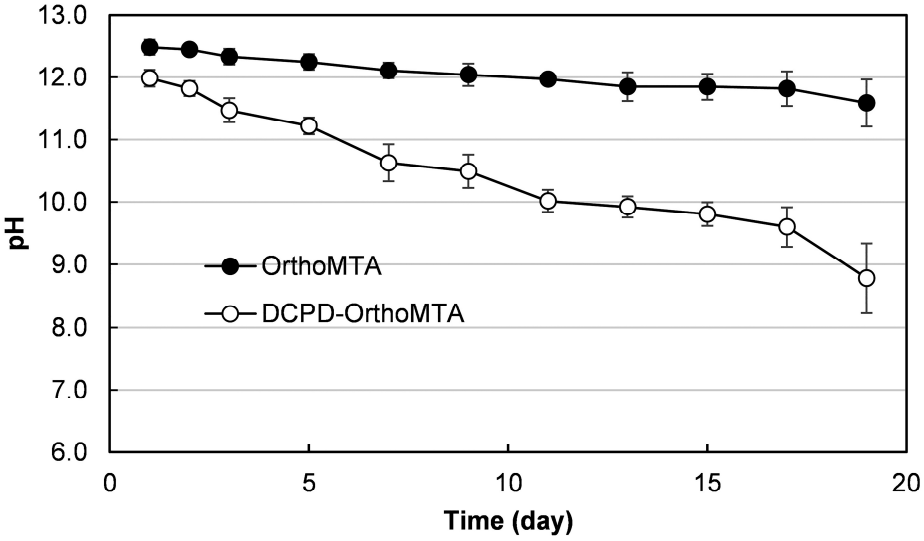

Figure 2. pH changes of MTA in DPBS, MTA was set for 6 h in a disc form, and then added into DPBS. The pH of MTA-containing DPBS was measured at intervals. DPBS was changes with fresh DPBS after each measurement. Each value is an average of three independent experiments.

2) DCPD-OrthoMTA의 세포독성 측정

DCPD-OrthoMTA의 세포독성을 측정하기 위하여 디스크 형태로 6시간 경화 후 준비한 용출액을 농도별로 세포에 처리하였다. 음성대조군으로 OrthoMTA 용출액을 처리하였다. 6.25%~25%로 낮은 농도의 DCPD-OrthoMTA가 처리된 세포는 세포활성도가 저하되지 않았으며, OrthoMTA와도 유의한 차이를 확인할 수 없었다 (Figure 3). 50% 용출액이 처리된 세포는 DCPD-OrthoMTA의 경우 80.1% 세포활성도가 나타났으나, OrthoMTA는 10% 이하의 활성도를 보여 OrthoMTA가 강한 세포독성을 유발한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 용출액을 100% 처리한 결과에서는 DCPD-OrthoMTA와 OrthoMTA 모두 강한 세포독성을 확인할 수 있었으나, DCPD-OrthoMTA는 23.5%의 세포활성도가 측정되어 OrthoMTA와 비교하였을 때는 상대적으로 높은 세포활성도가 측정되었다. 즉, DCPD-OrthoMTA가 처리된 세포는 OrthoMTA보다 높은 세포활성도가 측정되어 OrthoMTA로 인해 야기되는 세포독성을 낮춘 것을 확인할 수 있었다.

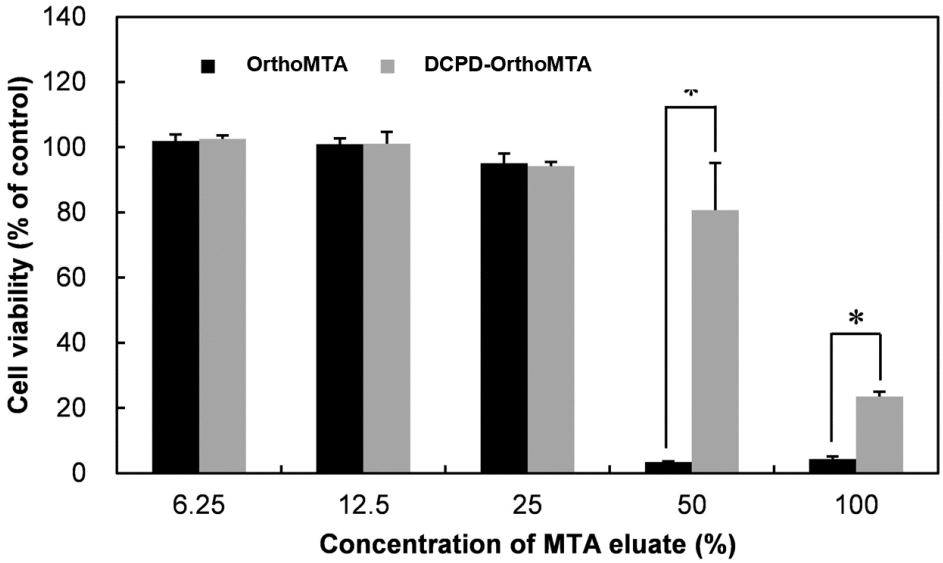

Figure 3. Cytotoxicity of MTA. NIH3T3 cells were exposed to serially diluted MTA elutes for 24 h, and cell viability was measured. Cell viability was expressed as % of untreated control cell viability. Each value is an average of three independent experiments.

* indicate a statistically significant differences at $P<0.05$.

3) DCPD-OrthoMTA를 적용한 경조직 반응

랫드 두개골 결손 모델을 이용하여 DCPD-OrthoMTA를 적용한 후 경조직 반응을 관찰하였다. MicroCT를 이용하여 육안 관찰하였을 때, Bio-Oss만 적용한 모델보다 Bio-Oss와 DCPD-OrthoMTA가 함께 적용된 모델이 결손부위를 더 조밀하게 채워 경조직을 대체한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4). 특히 12주에도 상대적으로 Bio-Oss보다 입자가 작은 OrthoMTA가 계속적으로 남아 있어 결손 부위를 촘촘히 메우고 있는 것이 관찰되었다. Micro CT 결과를 그래프로 도출한 Figure 5에서도 DCPD-OrthoMTA가 함께 적용된 모델이 양성대조군인 Bio-Oss만 적용한 모델보다 경조직 부피의 변화 없이 일정하게 결손부위에 경조직을 대체한 것을 확인할 수 있었다. 음성대조군으로는 OrthoMTA만 적용한 모델을 이용하였다. 따라서 DCPD-OrthoMTA와 Bio-Oss가 함께 적용할 경우 결손부위의 경조직 부피 변화 없이 안정적으로 경조직을 대체할 수 있음을 확인하였다.

결손부위를 헤마톡실린과 에오신으로 염색한 결과 4주, 8주, 12주로 이식 기간이 길어질수록 Bio-Oss만 이식된 모델은 Bio-Oss 자체의 입자 크기는 줄어들고 신생골이 형성되는 것이 관찰되었으나, DCPD-OrthoMTA 모델에서는 신생골 형성이 관찰되지 않았다 (Figure 6). 즉, Bio-Oss는 신생골을 형성하며 결손 부위에 경조직 부피 증가를 유도하였으나, DCPD-OrthoMTA와 Bio-Oss가 함께 적용된 모델은 적용된 재료만으로 생체의 변화를 유도하지 않고 결손부위를 대체하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, DCPD-OrthoMTA가 이식된 모델은 12주차까지 MTA 입자가 육안으로 관찰되었다. 이는 DCPD-OrthoMTA가 경조직과 직접 결합하지는 않으면서 결손 부위 내에서 염증반응 등의 거부 반응 없이 생체친화성도 높게 공존할 수 있음을 보여준다.

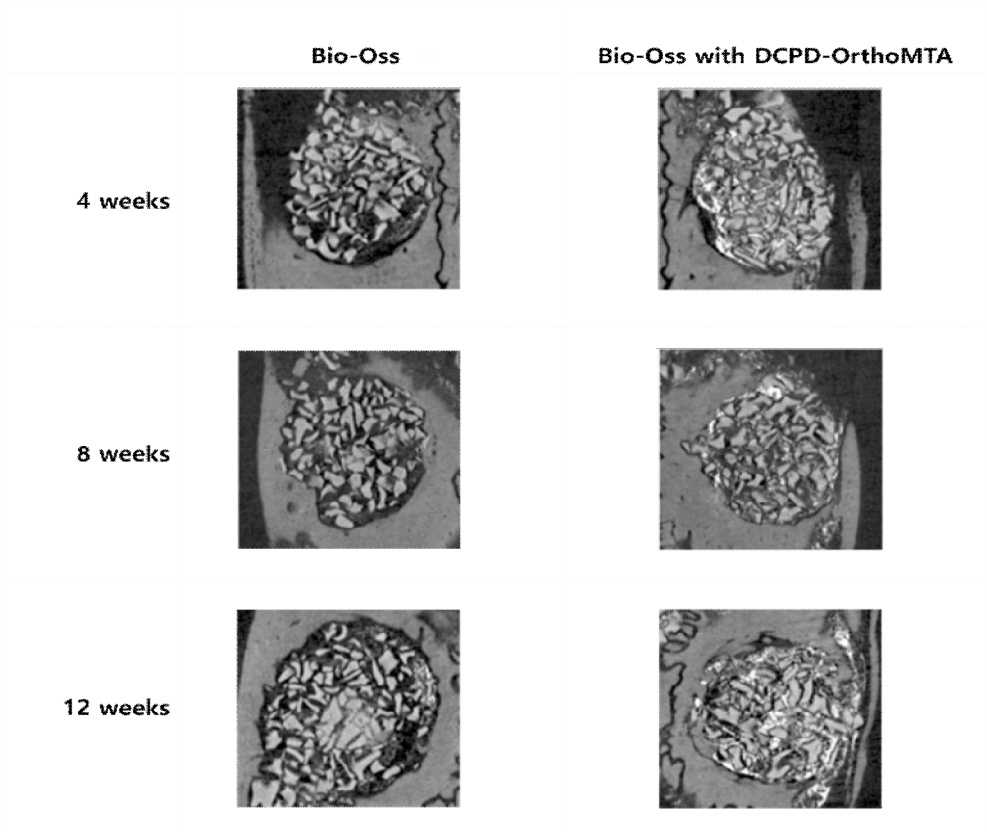

Figure 4. Representative images of Micro CT.

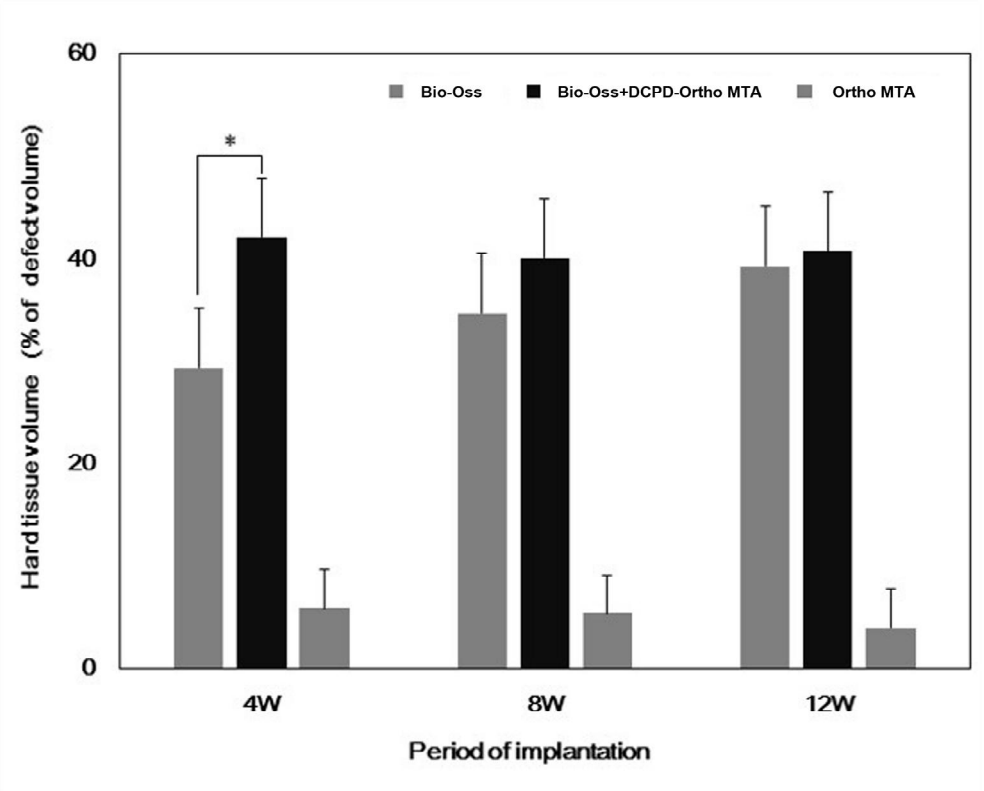

Figure 5. Measurement of hard tissue volume by MicroCT. Changes of hard tissue volume in calvarial defects was expressed as % of defected volume.

* indicate a statistically significant differences at $P<0.05$.

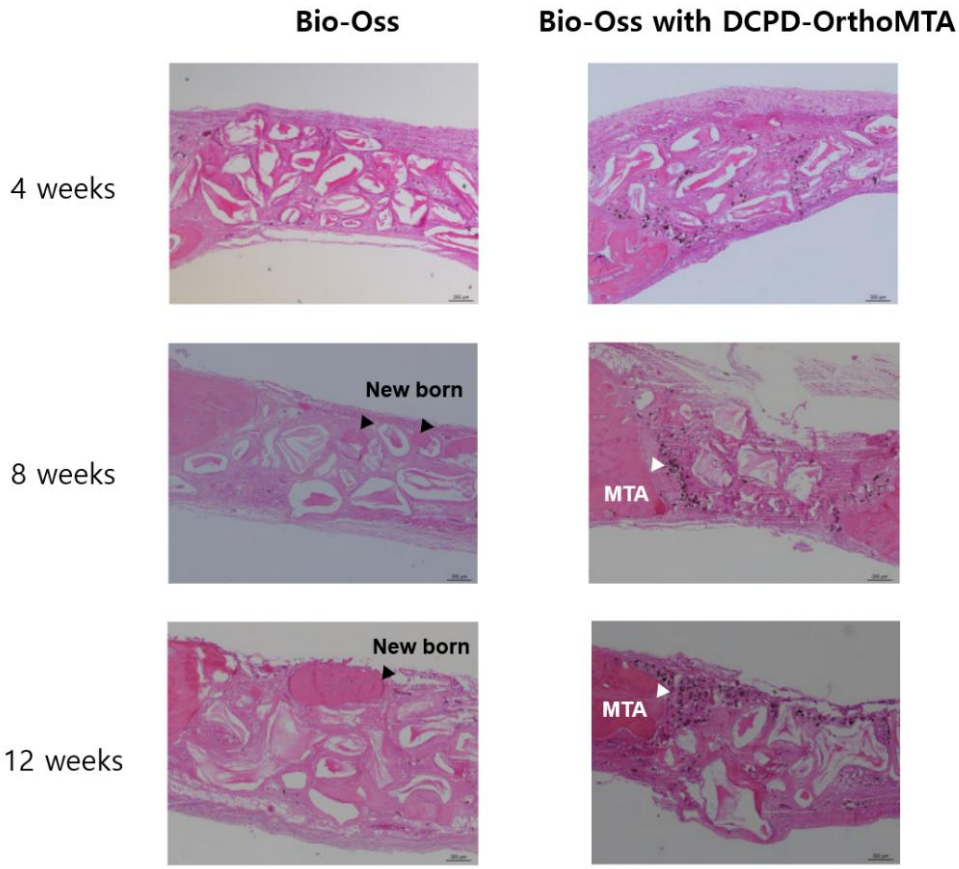

Figure 6. Representative images of H&E stained hard tissue sections.

4) DCPD-OrthoMTA를 적용한 연조직 반응

마우스 피하 이식 시험을 통하여 DCPD-OrthoMTA를 적용하였을 때 연조직 반응을 관찰하였다. 이식 2주 후, 헤마톡실린과 에오신 염색이 된 조직 슬라이드를 육안으로 관찰한 결과 음성대조군인 PTFE를 제외한 모든 MTA 실험군에서 신생혈관과 macrophage 및 giant cell이 관찰되었다 (Figure 7).

Table 2에 명시된 기준에 따라 MTA에 의한 연조직 염증반응을 평가하였다 (Table 3). ProRoot MTA의 경우 염증반응과 관련된 세포들이 관찰되어 정량 결과 'slight irritant'로 평가되었다. OrthoMTA와 DCPD-Ortho MTA의 경우에도 염증반응과 관련된 세포들이 관찰되었으며, 미세하게 조직반응도 관찰되었으나 결과적으로는 'slight irritant'로 평가되었다. 즉, 3가지 MTA 모두 미세한 염증반응을 유발하였으나 MTA 종류에 따라 연조직 반응이 달라지는 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

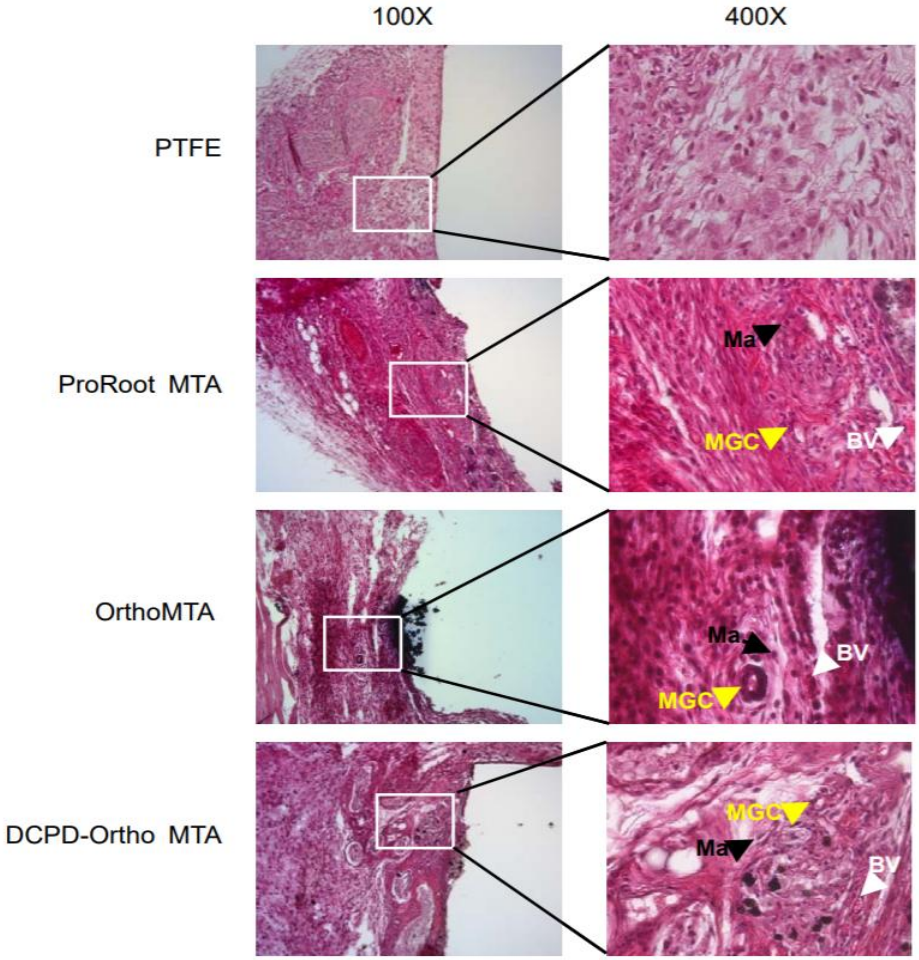

Figure 7. Representative images of H&E stained soft tissue sections.

Table 3. Inflammation scores.

	Negative control (PTFE)	ProRootMTA	OrthoMTA	DCPD-OrthoMTA
Sum scores of inflammation cells and response	4	24	21	23
Sum scores of tissue response	8	9	13	15
Irritation score	2.7	9.5	9.2	10.2
Relative irritation score	0	6.8	6.5	7.5
Irritation grade	-	Slight irritant	Slight irritant	Slight irritant

IV. 고찰

MTA는 이미 임상에 널리 적용되고 있는 치과 재료 중 하나로 계속적으로 그 적용 범위가 다양해지고 사용량이 늘어날 것으로 예측되고 있다. 기존에 출시된 MTA와 원료의 성분 비율을 달리하거나 새로운 기능을 가진 성분을 추가하여 MTA의 성능과 사용자 편의성이 개선된 제품들이 출시되고 있다.

본 연구에서도 기존 OrthoMTA에 DCPD를 추가하여 OrthoMTA가 가진 단점을 개선하고자 하였다. OrthoMTA 경화 초기에 생성되는 강염기의 환경은 항균작용을 하는 것으로 알려져 있으나[31], 강염기로 인한 항균작용은 박테리아 특이적으로 작용하는 기전이 아니며 인체를 구성하는 세포에도 영향을 미칠 수 있다. 실제로 DCPD-OrthoMTA가 경화 24시간 후부터 기존 OrthoMTA와 비교하여 염기성을 제어하고 50% 희석 용출액 조건에서 세포활성도도 더욱 높게 나타나는 것을 확인하였다 (Figure 2 and 3). 기존 OrthoMTA의 경우 이미 임상에 널리 적용되며 세포독성이 없다고 알려져 있으나, 실제 경화 과정에서 유발되는 강염기의 환경에 인체 내 세포가 직접적으로 노출되었을 때 미칠 수 있는 영향은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 위의 결과로 pH와 세포독성의 상관성을 충분히 입증하였다고 볼 수는 없으나, DCPD-OrthoMTA가 세포의 잠재적인 위험 요소가 될 수 있는 강염기의 환경을 제어할 수 있다는 것은 기존 OrthoMTA보다 생체적합성이 개선된 재료라는 것은 명백하다.

생체적합성을 보다 면밀히 관찰하기 위하여 세포에서 나아가 실제 치과 임상 환경과 유사한 조건에서 평가하기 위하여 경조직 이식 시험을 진행하였다. 최근 구강외과적 수술에서의 bone cement 적용이 늘어나고 있으며 과도한 출혈이 발생할 경우 상처부위를 밀폐시켜 지혈시키는 용도로 활용되고 있다. 본 연구에서 Bio-Oss와 DCPD-OrthoMTA를

함께 적용한 모델의 MicroCT분석 결과 육안으로도 Bio-Oss만 적용된 모델보다 손실 부위를 더욱 밀도 있게 밀폐하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이식 초기인 4주차에는 경조직의 부피도 유의적으로 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 소뼈 유래 물질인 Bio-Oss의 경우 이식 기간이 증가될수록 그 자체의 입자는 생체에 흡수되어 입자의 크기가 줄어드는 것과 동시에 그 자리에 신생골이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Bio-Oss가 가진 여러 유효물질들이 신생골 형성을 촉진시킨 것으로 예상되며, Bio-Oss의 높은 골전도성은 이미 다양한 연구에서 보고된 바 있다[32-34]. 하지만 DCPD-OrthoMTA가 함께 적용된 모델의 경우 이식 초기인 4주차부터 12주차까지 부피변화 없이 결손부위의 부피만 대체하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, OrthoMTA 입자도 12주차까지 남아 있는 것이 관찰되었다 (Figure 6). 이는 Bio-Oss의 높은 골재생 효과조차 발휘될 수 없도록 MTA 입자들이 생체뼈와 재료의 직접적인 결합을 막는 생체불활성 재료로서의 가능성이 있음을 보여준다. 또한, 음성대조군으로 OrthoMTA만 적용한 모델에서도 전혀 부피변화가 없음을 확인할 수 있었고, 결손부위에 적용된 MTA의 양에 따라 발생할 수 있는 변수를 배제하기 위하여 DCPD-OrthoMTA와 OrthoMTA 시험군에 적용된 OrthoMTA의 양은 동일하게 설정하였다. 12주까지의 경향을 관찰하였을 때, 12주 이후에는 Bio-Oss가 DCPD-OrthoMTA와 함께 적용된 시험군보다 경조직 부피가 더 늘어날 것으로 예상된다. 이는 Bio-Oss는 모든 입자가 용해되어 사라질 때까지 골재생 유효물질이 계속적으로 배출되어 신생골 형성이 지속적으로 일어날 것이라 예측되지만, DCPD-OrthoMTA의 경우 부피가 일정할 것으로 예상된다. 신생골 형성은 외부 물질이 줄어들고 결손부위를 생체 고유의 물질로 채워갈 수 있기에 긍정적인 기작이라 할 수 있으나, 외부 물질이 생체의 거부반응을 일으키지 않는 생체적합성이 우수한 물질이라면 임상 적용에 있어 경조직 부피 증가가 일어나는 것이 반드시 필요한 재료적 특성이라고는 할 수 없다. 실제로 생체에 원하는 부위까지 특정 물질을 전달하기

위한 캐리어로 생체불활성 재료의 필요성이 대두되고 있다[35]. 실제 DCPD-OrthoMTA가 Bio-Oss보다 밀폐 능력 등의 재료적 특성이 개선되었는지 평가하기 위한 추가 연구가 필요하지만 위의 결과를 통하여 DCPD-OrthoMTA가 생체 내에서 천천히 흡수되거나 혹은 전혀 흡수되면 안되는 조건으로 식립이 필요한 재료로 활용될 수 있음을 확인하였다. 예를 들어 심미적으로 중요한 전치부의 브릿지 보철 수복 시 파낙 부위의 골소실을 재건할 때, 즉 신생 치조골의 재생을 필요로 하지는 않지만 정확히 원하는 부피와 모양으로 결손 부위의 재건이 필요할 경우 적용 가능할 것으로 생각된다.

또한, 세포독성이 유발할 수 있는 염증 및 조직 괴사 등의 반응을 관찰하기 위하여 연조직 이식 시험을 진행하였다. DCPD-OrthoMTA가 기존 OrthoMTA보다 세포독성이 완화된 것을 확인하였기에 연조직에서도 염증 반응이 완화될 것을 기대하였으나, OrthoMTA보다 오히려 상대 자극 지수가 높은 것으로 나타났다. 연조직에서 DCPD-OrthoMTA가 어떤 기전으로 염증 반응을 유발하였는지에 대한 후속 연구가 필요하다. 하지만 기존에 임상에 널리 활용되고 있는 ProRootMTA, OrthoMTA와 유사한 수준인 'slight irritant'로 분류되었기에 임상에서도 유사한 조직 적합성을 보일 것으로 예측된다.

강염기의 pH를 제어할 수 있는 DCPD-OrthoMTA가 세포독성을 완화한 것에서 나아가 동물모델을 활용하여 경조직, 연조직에서의 조직적합성을 평가하였으나, 본 연구에서는 기존의 재료들보다 개선된 조직적합성 결과는 확인하기 어려웠다. 하지만 강염기라는 잠재적 위험요소를 제어할 수 있는 재료라는 사실은 큰 의미를 가지며, 실제 임상에서 활용될 구강 내 환경은 본 연구에서 사용한 랫드의 두개골, 마우스의 등-부위보다 폐쇄적인 환경에서 국소적으로 재료가 적용될 가능성이 높아서 pH 변화에 더 민감하게 반응할 수 있으므로 추가 연구가 필요하다.

V. 결론

본 연구에서는 MTA의 잠재적 위험 요소인 염기성 pH 제어 기능이 추가된 DCPD-OrthoMTA를 이용하여 용출액의 pH 변화, 세포독성, 경조직 적합성 및 연조직 적합성을 평가하였다.

OrhoMTA와 DCPD-OrthoMTA의 용출액 pH 변화를 관찰하였을 때, DCPD-OrthoMTA의 경우 용출 19일차에는 pH 8.8±0.6으로 떨어져 약염기성을 나타내었으나, OrthoMTA의 경우는 pH 11.6±0.4로 강염기성이 유지되는 것을 확인하였다. 이러한 강염기가 제어된 DCPD-OrthoMTA에서 세포독성이 완화될 것으로 기대하였으며, 세포독성을 평가한 결과 DCPD-OrthoMTA 용출액 50% 농도에서 세포활성도가 80.1%로 동일한 조건에서 OrthoMTA의 세포활성도가 10% 이하로 관찰된 것과 비교하여 세포독성이 크게 완화된 것을 확인할 수 있었다. 세포독성이 완화된 것에서 나아가 경조직 반응도 개선될 것을 기대하였으나, 랫드의 두개골 이식 평가 결과 골 대체물질로 널리 사용되고 있는 Bio-Oss와 비교하여 전혀 다른 양상이 관찰되었다. Bio-Oss의 경우 신생골 형성을 유도하며 결손부위의 경조직 부피가 계속적으로 증가하는 것이 관찰되었으나, Bio-Oss와 DCPD-OrthoMTA가 함께 적용된 경우 Bio-Oss의 골전도성이 저해되고 이식 12주차까지 결손부위의 경조직 부피변화 없이 MTA 입자가 남아있는 것이 확인되어 생체불활성 재료로서의 가능성이 관찰되었다. 생체 이식 거부반응 가능성도 있어 마우스 피하이식을 통해 연조직 적합성도 평가하였으나, 임상에 널리 활용되고 있는 ProRootMTA, OrthoMTA와 비교하였을 때 유사한 정도의 염증반응을 일으켜 연조직 적합성의 유의미한 차이는 확인할 수 없었다.

하지만 생체의 잠재적 위험요소인 강염기 환경을 제어할 수 있는 DCPD-OrthoMTA가 세포독성을 완화할 수 있다는 것을 확인하였으며, 동물 모델보다 밀폐되고 국소적으로 재료가 적용되는 실제 임상조건에서

조직적합성 평가에 대한 추가 연구가 필요하다. 또한 DCPD-OrthoMTA가 생체불활성 재료로 활용 가능할지를 알아보기 위해 재료적 특성에 대한 추가 연구도 필요하다.

참 고 문 헌

(1) Chang, S. W., Shon, W. J., Lee, W., Kum, K. Y., Baek, S. H., Bae, K. S. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 109(4) (2010) 642-646.

(2) Tawil, P. Z., Duggan, D. J., Galicia, J. C. Mineral trioxide aggregate (MTA): its history, composition, and clinical applications. Compendium of Continuing Education in Dentistry 36(4) (2015) 247-252.

(3) Chang, S. W., Baek, S. H., Yang, H. C., Seo, D. G., Hong, S. T., Han, S. H., Kum, K. Y. Heavy metal analysis of ortho MTA and ProRoot MTA. Journal of Endodontics 37(12) (2011) 1673-1676.

(4) Zhu, C., Ju, B., Ni, R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 8(10) (2015) 17055.

(5) Ber, B. S., Hatton, J. F., Stewart, G. P. Stewart. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. Journal of Endodontics 33(10) (2007) 1231-1234.

(6) Kim, J. A., Hwang, Y. C., Rosa, V., Yu, M. K., Lee, K. W., Min, K. S. Root canal filling quality of a premixed calcium silicate endodontic sealer applied using gutta-percha cone-mediated ultrasonic activation. Journal of Endodontics 44(1) (2018) 133-138.

(7) Lee, B. N., Son, H. J., Noh, H. J., Koh, J. T., Chang, H. S.,

Hwang, I. N., Oh, W. M. Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. Journal of Endodontics 38(12) (2012) 1627-1630.

(8) Keiser, K., Johnson, C. C., Tipton, D. A. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. Journal of Endodontics 26(5) (2000) 288-291.

(9) Chang, S. W., Lee, S. Y., Kum, K. Y., Kim, E. C. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odonto-blastic differentiation in human dental pulp cells. Journal of Endodontics 40(1) (2014) 113-118.

(10) Ghazvini, S. A., Tabrizi, M. A., Kobarfard, F., Baghban, A. A., Asgary, S. Ion release and pH of a new endodontic cement, MTA and Portland cement. Iranian Endodontic Journal 4(2) (2009) 74-78.

(11) Tsai, C. L., Ke, M. C., Chen, Y. H., Kuo, H. K., Yu, H. J., Chen, C. T., Wu, P. C. Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. BMC Pharmacology and Toxicology 19(1) (2018) 1-10.

(12) Mirhadi, H., Moazzami, F., Jahromi, S. R., Safarzade, S. The effects of alkaline pH on microleakage of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture apical plugs. Journal of Dentistry (Shiraz, Iran) 17(1) (2016) 16-20.

(13) Reyes-Carmona, J. F., Santos, A. R., Figueiredo, C. P., Felippe, M. S., Felippe, W. T., Cordeiro, M. M. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. Journal of Endodontics 37(9) (2011) 1225-1235.

(14) Da Fonseca, T. S., Da Silva, G. F., Tanomaru Filho, M., Sasso

Cerri, E., Guerreiro Tanomaru, J. M., Cerri, P. S. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL 6 immuno-expression promoted by Biodentine and MTA Angelus. International Endodontic Journal 49(2) (2016) 145-153.

(15) Parirokh, M., Torabinejad, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review－part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. Journal of Endodontics 36(3) (2010) 400-413.

(16) Cherng, A. M., Takagi, S., Chow, L. C. Acid neutralization capacity of a tricalcium silicate-containing calcium phosphate cement as an endodontic material. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology 115(6) (2010) 471.

(17) Brown, W. E. A new calcium phosphate, water-setting cement. Cements Research Progress (1987) 351-379.

(18) Burguera, E. F., Guitian, F., Chow, L. C. A water setting tetracalcium phosphate - dicalcium phosphate dihydrate cement. Journal of Biomedical Materials Research Part A 71(2) (2004) 275-282.

(19) Burguera, E. F., Xu, H. H., Takagi, S., Chow, L. C. High early strength calcium phosphate bone cement: effects of dicalcium phosphate dihydrate and absorbable fibers. Journal of Biomedical Materials Research Part A 75(4) (2005) 966-975.

(20) Burguera, E. F., Xu, H. H., Weir, M. D. Injectable and rapid setting calcium phosphate bone cement with dicalcium phosphate dihydrate. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 77(1) (2006) 126-134.

(21) Bohner, M., Van Landuyt, P., Merkle, H. P., Lemaitre, J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate

cement. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 8(11) (1997) 675-681.

(22) Camilleri, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. International Endodontic Journal 40(6) (2007) 462-470

(23) El Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Vert, M., Boudeville, P. Wet or dry mechanochemical synthesis of calcium phosphates? Influence of the water content on DCPD - CaO reaction kinetics. Acta Biomaterialia 4(2) (2008) 378-386.

(24) Kang, C. M., Kim, S. H., Shin, Y., Lee, H. S., Lee, J. H., Kim, G. T., Song, J. S. A randomized controlled trial of ProRoot MTA, Ortho MTA and Retro MTA for pulpotomy in primary molars. Oral Diseases 21(6) (2015) 785-791.

(25) Kim, M., Yang, W., Kim, H., Ko, H. Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and Endocem MTA cements. Journal of Endodontics 40(10) (2014) 1649-1653.

(26) Mousavi, S. A., Khademi, A., Soltani, P., Shahnaseri, S., Poorghorban, M. Comparison of sealing ability of ProRoot mineral trioxide aggregate, biodentine, and ortho mineral trioxide aggregate for canal obturation by the fluid infiltration technique. Dental Research Journal 15(5) (2018) 307.

(27) Kim, D. H., Jang, J. H., Lee, B. N., Chang, H. S., Hwang, I. N., Oh, W. M., Hwang, Y. C. Anti-inflammatory and mineralization effects of proroot MTA and endocem MTA in studies of human and rat dental pulps in vitro and in vivo. Journal of Endodontics 44(10) (2018) 1534-1541.

(28) Wallin, R. F. A practical guide to ISO 10993-12: Sample preparation and reference materials. MDDI: Los Angeles, CA, USA (1998).

(29) ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices - Part

5: Tests for in vitro cytotoxicity.

(30) ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation.

(31) Estrela, C., Bammann, L. L., Estrela, C. R. D. A., Silva, R. S. D., Pecora, J. D. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Brazil Dental Journal 11(1) (2000) 3-9.

(32) Hislop, W. S., Finlay, P. M., Moos, K. F. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 31(3) (1993) 149-153.

(33) Kim, Y. J., Saiki, C. E. T., Silva, K., Massuda, C. K. M., de Souza Faloni, A. P., Braz-Silva, P. H., Sendyk, W. R. Bone formation in grafts with Bio-Oss and autogenous bone at different proportions in rabbit calvaria. International Journal of Dentistry 2020 (2020).

(34) Pinholt, E. M., Bang, G., Haanaes, H. R. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. European Journal of Oral Sciences 99(2) (1991) 154-161.

(35) Willmann, G. Coating of implants with hydroxyapatite - material connections between bone and metal. Advanced Engineering Materials 1(2) (1999) 95-105.

Abstract

A study on the tissue compatibility of alkaline pH controlled mineral trioxide aggregates

Hyun Jae Park

Dept. of Dental Biomaterials Science

The Graduate School

Seoul National University

Alkalic pH caused by the process of setting MTA (mineral trioxide aggregates). DCPD (dicalciumphosphate dihydrate), a component of bone cement, can reduce pH of CPC (calcium phospahte cement). In this study, to evaluate the effect of pH control and cytotoxicity, DCPD-OrthoMTA was prepared, and their biocompatibility on tissue was investigated. DCPD-OrthoMTA significantly controlled alkaline pH of OrthoMTA in 24 hrs set states and reduced to pH 8.8±0.6 in 19 days after. The extract of DCPD-OrthoMTA also decreased cytotoxicity of OrthoMTA at high concentration ($p<0.05$).

Cell viability of DCPD-OrthoMTA was 80.1% with 2-fold diluted extract but OrthoMTA was under 10%. In a calvarial defect model, a significant increase hard tissue volume in Bio-Oss but no change in DCPD-OrthoMTA was observed. In addition, there were the particles of DCPD-OrthoMTA up to 12 weeks compared with the effects of Bio-Oss. In subcutaneous inflammatory reactions, there were no significant differences among ProRootMTA, OrthoMTA and DCPD-OrthoMTA. Thus, these results suggest that alkaline pH controlled DCPD-OrthoMTA reduce cytotoxicity and keep good biocompatibility on soft tissue as OrthoMTA. Moreover, it shows the possibility of bio-inert material to be applied on diverse clinical cases.

keywords : Mineral trioxide aggregates, Dicalcium phosphate dihydrate, Bone graft, Subcutaneous transplant, Biocompatibility

Student Number : 2013-31213