Biocompatibility of porous hydroxyapatite ceramics prepared from bovine bones

Jong Kook Lee[†], Young Hwa Ko and Nan Hee Lee

Department of Advanced Materials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

BK21 Education Center of Mould Technology for Advanced Materials & Parts, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received April 19, 2012)

(Revised May 14, 2012)

(Accepted May 18, 2012)

Abstract Natural hydroxyapatite powder was obtained from the calcination of bovine bones and its porous compacts were fabricated by pressureless sintering at 1100 and 1200°C for 1h. To evaluate and compare their biocompatibility with porosity, we investigated the support of osteoblast cells growth and cytotoxicity using the MG-63 cell line model in vitro. Sintered hydroxyapatite ceramics have a porous microstructure with a relative density of 65 % at 1100°C and 82 % at 1200°C. Cells adherence to the surface of hydroxyapatite ceramics was observed in a day after the cell culture, and the spreading of cytoplasm around the nucleus was shown after 3 day cell culture. Most of cells were extended to the surface of hydroxyapatite through the wide area. Cell viability was nearly the same till 3 days culturing. But the rate of cell growth is higher in the specimen sintered at 1100°C than that of 1200°C. It indicates that the porosity is an important factor to enhance the cell viability in the porous hydroxyapatite ceramics derived from bovine bones.

Key words Hydroxyapatite, Biocompatibility, Bovine bone, Porosity

소 뼈로부터 제조한 다공형 하이드록시아파타이트 세라믹스의 생체친화 특성

이종국[†], 고영화, 이난희

조선대학교 신소재공학과, 광주, 501-759

BK21 첨단소재부품 금형기술 인력양성사업단, 광주, 501-759

(2012년 4월 19일 접수)

(2012년 5월 14일 심사완료)

(2012년 5월 18일 게재확정)

요 약 소뼈를 하소하여 천연 하이드록시아파타이트 분말을 얻은 다음, 1100°C 및 1200°C로 상압 소결하여 기공율이 각각 35 % 및 18 %인 다공성 하이드록시아파타이트를 제조한 후 이들 시편의 생체친화성을 평가하였다. 골아세포의 성장 속도와 세포독성의 유무에 따라 평가되는 생체친화성은 MG-63 세포의 부착능과 분화되어 증식되는 세포의 수로 측정하였다. in vitro에서 세포 반응을 관찰한 결과 소뼈로부터 제조된 하이드록시아파타이트 시편은 독성이 없고 생체 친화성이 좋은 시편이었다. 세포배양 1일 후부터 하이드록시아파타이트 표면에 세포가 부착되었고, 세포배양 후 3일 후에는 핵 주위로 세포질이 퍼져나갔으며, 5일 후에는 부착된 세포의 수가 크게 증가하였다. 배양 초기에는 밀도에 관계 없이 세포의 부착능이 유사하였지만, 세포 배양 시간이 증가하면서 기공율이 높은 시편에서 세포의 부착 및 성장이 더 활발하게 진행되었다.

1. 서 론

생체재료는 손상된 인체의 일부 장기 또는 신체 일부 분을 대체할 수 있는 재료를 뜻하는데, 이러한 생체재료는 보건의료 분야 중 치료, 재활 및 예방의 수단으로 생

체에 적용되기 때문에 인간의 수명연장 및 사고, 질병의 증가 등에 따라 그 중요성이 점차 증가하고 있으며, 인간의 건강한 삶을 보장하고 삶의 질을 높이는데 직접적으로 기여하고 있다.

생체재료를 의학 또는 치과 분야에 적용하기 위해서는 생체적합성을 가져야 하는데, 이러한 성질은 재료나 장치가 기능을 하는 동안 생리학적으로 부작용이나 독성이 없도록 유지시키는 기능을 말한다[1-3]. 현재까지 개발된 경조직용 생체재료 중 생체적합성이 가장 우수한 임플란

[†]Corresponding author

Tel: +82-62-230-7202

Fax: +82-62-230-7311

E-mail: jklee@chosun.ac.kr

트 소재는 인산칼슘계 재료인데[3-6], 이미 오래 전부터 인간의 뼈나 치아 등 경조직 대체용 생체소재로 널리 연구되어 왔다[7-10]. 인산칼슘계 세라믹 소재의 우수한 생체 친화성은 인체 뼈의 69%가 인산칼슘계 화합물인 하이드록시아파타이트로 구성되어 있기 때문인데[11, 12], 이러한 이유로 인하여 인산칼슘계 세라믹스 중 하이드록시아파타이트는 자연 뼈와 가장 유사한 특성을 가지고 있다. 인공으로 제조된 인산칼슘계 생체소재는 자가골 이식(autograft) 또는 동종골 이식(homograft) 방법이 갖는 공급량의 부족과 감염성 질환의 전염 및 면역 반응 등의 문제점을 극복할 수 있기 때문에 이러한 소재로 제조된 의치학용 임플란트는 각종 사고나 질병에 의해 뼈의 수복이 필요한 경우, 인공 뼈 이식재로 널리 활용되고 있다[13].

인산칼슘계 세라믹스는 화학약품으로부터 인공 합성하는 방법과 동물의 뼈로부터 제조하는 방법이 알려져 있는데[14-17], 지금까지는 인공합성 하이드록시아파타이트 소재나 삼인산칼슘계 소재가 주로 사용되어 왔다[18, 19]. 인공합성한 인산칼슘계 생체재료는 Ca/P 몰비 및 입자크기를 임의로 조절하는 것이 가능하여 특정한 형태의 성형이 쉽고, 값싸게 대량으로 제조할 수 있는 장점이 있으나 생체 내에서 장기간 이식할 경우 표면에서 용해가 진행되어 기계적 물성의 열화가 나타나는 단점이 있다[20-22].

이에 비하여 동물 뼈 등 천연 석회질로부터 추출된 생물학적 인산칼슘계 소재는 조성이 사람의 뼈와 거의 동일하기 때문에 생체적합성 및 생체 내 화학적 안정성이 매우 뛰어나고, 비교적 값싸게 대량으로 만들 수 있는 장점이 있다[23, 24]. 그러나 이러한 인산칼슘계 생체소재는 동물 뼈를 800°C 이상으로 열처리하여 분말로 제조되기 때문에 분말 입자가 커 치밀체로 제조하거나 특정한 형태의 성형이 어려운 단점이 있다[23].

하이드록시아파타이트를 경조직용 임플란트, 뼈 이식재 등 골 재생용 생체 세라믹 재료로 활용하기 위해서는 골전도성이 우수하여야 하는데, 이러한 특성을 보유하기 위해서는 골 조직이 골이식 재료 내로 성장되어 들어올 수 있는 다공체 구조로 제조되어야 한다[24]. 이러한 생체재료의 다공성 구조는 새로운 골 조직이 들어와 성장할 수 있는 공간을 제공하고, 기존 골조직에 흡수되어 새로운 조직으로 대체될 수 있어야 한다.

본 연구에서는 소 뼈로부터 제조한 하이드록시아파타이트의 분말을 이용하여 다공질 소결체를 제조 후, 세포 부착 실험을 통하여 생체 친화성을 평가해보고자 하였다. 이를 위하여 기공율이 다른 두가지 형태의 소결체를 상압으로 제조하고, in vitro에서 소결체 표면에 MG-63 세포를 부착시켜 일정기간 배양한 다음, 세포 반응 및 성장에 대한 분석을 행하여 생체 친화성을 비교하였다.

2. 실험방법

천연 HA 원료 물질로는 소뼈를 수거하여 사용하였는데, 80°C로 가열된 0.1%의 NaOH 수용액에 투입하여 표면 부착 유기물 등을 제거하였다. 열처리 온도에 따른 소뼈의 분해거동을 알아보기 위하여 DTA-TG 분석을 행하였으며, 이를 토대로 수세 후 건조를 거쳐 800°C의 온도에서 1시간 동안 하소하여 소 뼈 내부에 잔류하는 유기물을 완전히 제거하였다. 하소된 분말은 attritor로 분쇄한 다음, 건조 후 일축가압 성형하여 실린더형 성형체를 제조하고, 220 MPa의 압력 하에서 정수압 성형을 행하여 성형체를 제조하였다. 다공성 소결체는 수증기 분위기 하에서 1100, 1200°C로 1시간 동안 열처리하여 제조하였으며, 소결 후 밀도분석, 상분석, 미세구조 분석을 행하였다.

생체 적합성 실험은 human osteoblast-like cell line 인 MG-63 세포를 이용하였다. MG-63 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 내에서 배양되었으며, 37°C 온도에서 CO₂가 5%로 공급되는 배양 환경을 유지하였다. DMEM 배양액에는 10% fetal bovine serum (16000-044, Gibco)와 항생제로서 1%(v/v) antibiotic antimycotic solution(15240-0620, Gibco)을 첨가하였다. 또한 completed media는 2일에 한 번씩 정기적으로 교체되었다. 생체실험을 위해서 소결체의 표면을 다이아몬드정반에 1 µm까지 연마한 다음, Autoclave에서 121°C로 멸균하였다. 세포배양을 위해 모든 시편을 24-well plate에 각각 배치시키고, 37°C로 유지시킨 인큐베이터 내에 5%의 이산화탄소를 포함한 공기 중에서 증식시켰다. 살아있는 세포를 분리하기 위하여 tryptin-EDTA액을 사용하고, hemocytometer를 이용하여 세포 개수를 측정하였다.

MG-63 세포는 단위면적 1 cm²당 약 6 × 10⁴개 정도일 때 거의 포화된다고 보고된바 있다. 위와 같은 단위 면적당 세포 개체 수 및 세포의 doubling time을 고려한 설계에 의해 각각 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행하였다. MG-63 세포는 well당 1 × 10⁴개씩 분주시키고 인큐베이터 내에서 증식시켰다. 시간에 따라 시편 표면에 세포의 증식과 부착을 관찰하기 위해 배양 일정 시간이 지나면 배양액을 제거하고 1X 인산완충용액(Dulbecco's phosphate buffer saline, 21600-010, Gibco)을 첨가 후 다시 제거하는 과정으로 세척하였다. 세척한 시편을 24 well에 옮긴 후 4% paraformaldehyde를 2시간 동안 반응 후 제거하고, 그런 다음 50, 60, 70, 80, 90, 100% 알콜에 10분씩 시편을 침적시켜 4% paraformaldehyde를 세척하였다. 마지막으로 Isoamyl Acetate에 3시간 이상 담근 후 실온에서 건조시켜 주사전 자현미경(SEM, H-4800, HITACHI)으로 미세구조를 관

찰하였다. 조골세포의 증식은 MTS assay로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

표면 유기물을 제거한 소 뼈는 열처리 온도가 증가함에 따라 수분 증발 및 유기물의 탄화에 의해 색상이 갈색으로 변했다가 탄소 성분이 CO_2 로 모두 변해 분해되는 800°C 이상에서는 모두 흰색을 나타내었다. 하소온도에 따른 소 뼈의 열적 특성을 고찰하기 위하여 TG/DTA 분석을 행하였다. 그 결과(Fig. 1), 280°C 부근과 430°C 부근에서 발열피크가 관찰되었는데, 이는 소 뼈에 포함된 유기물의 연소에 의해 나타난 피크로 보인다[25] 한편 중량분석 결과를 보면, 100°C 까지는 수분의 증발에 따른 소량의 중량 감소를 보였고, $250\sim 600^\circ\text{C}$ 사이에서는 유기물의 분해에 의해 급격한 무게 감소를 보이고 있다. 그러나 600°C 이후에는 미세한 무게 감소만 있을 뿐 커다란 무게 감소가 관찰되지 않았다. 따라서 전술한 바와 같이 색상이 흰색으로 변한 800°C 를 유기물이 완전히 제거되는 최종 하소온도로 정하였고, 이러한 하소온도는 이차적인 감염 노출을 방지하는데 충분한 온도로 사료되었다[26].

소 뼈를 800°C 로 1시간 하소하여 제조한 HA 분말의 미세구조 및 X-선 회절 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 소 뼈를 하소하여 제조한 HA 분말은 $0.2\sim 0.5\ \mu\text{m}$ 의 비교적 큰 크기를 나타냈으며, 하소 과정 중 입자와 입자 간에 부분적인 결합이 이루어진 강한 응집입자 특성을 나타내었다. X-선 회절 분석 결과 대부분 HA 특성 피크를 나타냈으며, 중간에 MgO의 작은 피크도 관찰되었다. 일반적으로 동물 뼈에는 하이드록시아파타이트를 구성하는 Ca 및 P 원소 외에도 많은 미량 원소들이 존재하는데, 대표적인 원소로는 Mg, Na, Si, Zn 등이 있

Fig. 1. TG/DTA analysis of bovine bone.

Fig. 2. FE-SEM micrograph (a) and XRD pattern (b) of bovine bone derived-HA after calcination at 800°C for 1 h.

으며, Ca/P 비는 사람의 뼈와 유사한 1.73을 나타내는 것으로 보고되었다[27]. 사람의 뼈에 포함된 하이드록시아파타이트 입자는 길이 $40\ \text{nm}$, 두께 $1.5\sim 3\ \text{nm}$ 의 막대상으로 이루어져 있으며, 나노입자가 일정한 배열을 한 상태에서 이 들 사이를 콜라겐이 채우고 있다[28-30]. 생물학적인 뼈는 이와 같은 복합 나노구조 덕분에 $10\sim 20\ \text{GPa}$ 의 탄성계수 및 $100\ \text{MPa}$ 의 강도를 가지며, 강하면서도 유연성을 나타낼 뿐 만 아니라 화학적으로도 안정하여 몸속에서 기계적 성질의 열화 없이 장기간 유지되고 있다[31, 32].

Fig. 3에는 소 뼈로부터 제조한 하이드록시아파타이트 분말을 이용하여 1100°C 온도에서 1시간 동안 소결한 시편의 미세구조 및 XRD 상분석 결과를 나타내었다. 1100°C 에서 소결한 시편은 약 65 %의 소결 밀도를 갖는 다공질의 하이드록시아파타이트였는데, 대부분의 입자는 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$ 크기의 등면체 입자로 구성되어 있으며, 입자 사이사이에 입자 크기와 유사한 $0.4\sim 0.5\ \mu\text{m}$ 내외의 기공들이 다수 존재하였다. XRD 상분석 결과 분말에서의 상과 유사하였는데, 대부분 하이드록시아파타이트 상

Fig. 3. FE-SEM micrograph (a) and XRD pattern (b) of bovine bone derived-HA after sintering at 1100°C for 1 h.

을 나타냈으며, 미량의 MgO 상이 관찰되었다.

Fig. 4는 소 뼈에서부터 제조한 하이드록시아파타이트 분말 성형체를 1200°C에서 소결한 시편의 미세조직을 나타낸 사진인데, 1100°C에서 소결한 시편에 비하여 하이드록시아파타이트 입자크기가 1~2 μm로 증가하였으며, 소결 밀도는 82 %로 크게 증가하였다. 단면의 미세구조를 관찰한 결과 대부분 입자들이 등면체를 나타냈으며 [33], 소결온도의 증가에 따라 치밀화가 진행되면서 전체적인 기공의 수가 감소한 반면에 기공의 크기는 다소 커진 1~3 μm의 크기를 나타내었다. 1200°C에서 소결한 시편의 X-선 회절 분석 결과 입자크기 증가에 따라 피크 넓이가 좁아졌으며, 분말의 상과 마찬가지로 하이드록시아파타이트 상에 미량의 MgO가 혼재되어 있었다.

Fig. 5와 Fig. 6에는 소결한 HA시편을 연마한 후, 표면에 MG-63 cell을 well 당 1×10^4 개를 분주시키고, 증식을 수행한 시점부터 각각 1, 3, 5일이 지난 후 촬영한 결과를 나타내었다. 소결 온도의 차이에 의해 기공률, 표면 조도, 밀도 등이 다른 두 시편 위에서 MG-63 세포의 고정 및 성장하는 형태학적 변화를 관찰한 결과, 두

Fig. 4. FE-SEM micrograph (a) and XRD pattern (b) of bovine bone derived-HA after sintering at 1200°C for 1 h.

시편 모두에서 세포의 부착과 성장이 잘 관찰되었다. 이러한 결과는 동물 뼈로부터 제조된 시편의 경우 인공으로 합성된 HA와 마찬가지로 소결된 HA에서 독성이 없을 뿐만 아니라 세포에 대한 생체 친화성이 크다는 것을 의미한다. 세포배양 1일이 지난 후의 사진을 살펴보면 MG-63 세포의 부착은 기공이 크기나 밀도 등에 상관없이 다공성 HA 표면에서 비교적 잘 부착되어 성장 및 증식이 이루어졌으며, 배양 시간이 지남에 따라 보다 많은 세포가 증식되어 부착하고 있음을 알 수 있었다. 배양시간이 3일 5일로 지남에 따라 증식된 세포의 수는 1100°C HA 시편에서 보다 많이 관찰되었는데, 이는 1200°C 시편에 비하여 1100°C 시편에서 기공이 많고 기공의 크기가 작기 때문에 세포의 증식과 성장이 빠른 것으로 판단되었다.

HA 시편에서 세포의 부착, 증식, 성장 속도는 표면에 존재하는 기공의 크기나 수, 조도의 크기에 따른 표면적 등에 크게 의존하는데, 기공의 양보다는 기공의 크기가 작고 표면적이 클 경우 세포 증식이 잘 이루어지는 것으로 알려져 있다[34]. 일반적으로 골 조직의 치료 및 재생을 위한 임플란트 소재는 골 세포의 부착, 증식, 분화

Fig. 5. FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA sintered at 1100°C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days, respectively.

활성에 도움을 주어야 하며, 이를 위해 골세포의 증식과 골 조직 형성이 원활한 다공성 구조 및 기공들이 상호 연결된 구조를 가져야만 한다. 또한 주변 골 구조가 넓게 단단히 접촉할수록 신생골 형성이 촉진되므로 골 대체용 임플란트 소재는 입자크기가 작아야만 주변 골 구조물과 접촉 범위가 넓어 보다 양호한 것으로 알려져 있다[35].

Fig. 6. FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA sintered at 1200°C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days, respectively.

Fig. 7과 8은 1100°C 및 1200°C에서 소결한 후 연마한 HA 시편에서 1일과 3일 배양했을 때 세포들이 시편의 표면에 부착되는 형상을 평면과 단면에서 각각 관찰한 결과이다. 배양 1일 후의 사진을 보면 두 시편 모두에서 적은 양의 세포들의 HA 표면에 넓게 퍼져 있지만 단면을 살펴보면 HA 시편과 세포 간에 잘 부착되어 있는 것을 알 수 있다. 배양 3일 후에는 두 시편 모두에서

Fig. 7. Cells attachment for the polished surface and its cross section in the bovine bone derived-HA sintered at 1100°C with cell culture for (a), (b) 1 day and (c), (d) 3 days, respectively.

Fig. 8. Cells attachment for the polished surface and its cross section in the bovine bone derived-HA sintered at 1200°C with cell culture for (a), (b) 1 day and (c), (d) 3 days, respectively.

부착된 세포들이 성장하고 증식되면서 세포들이 시편 표면을 덮어가고 있으며, HA 시편과의 접촉면적이 증대됨에 따라 부착력도 커지는 것으로 판단된다.

배양 시간에 따라 시편 위에 부착되어 성장한 세포 수를 확인하기 위해 MTS 시험을 하였는데 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 1, 3일은 두 시편 모두에서 세포의

Fig. 9. Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on bovine bone derived-HA sintered at 1100°C and 1200°C for 1 h.

증식과 성장 속도가 완만한 반면에 5일이 지난 후에는 세포의 증식과 성장이 급격히 증가하였다. 특히 1200°C로 소결한 시편에서 보다 1100°C로 소결한 시편에서 더욱 증가하였는데, 이는 앞서 설명한대로 이 시편에서는 기공의 크기가 상대적으로 작고, 기공율이 큰 반면에 입자크기가 적어 표면적이 넓기 때문인 것으로 판단되었다.

4. 결 론

소뼈의 열처리를 통하여 제조한 하이드록시아파타이트 (HA) 분말을 제조한 다음, 1100°C 및 1200°C로 소결하여 두 가지의 다공성 HA 소결체를 제조하였으며, 소결 온도 및 기공의 변화에 따른 HA 세라믹스의 생체 친화성을 MG-63 조골세포의 배양을 통하여 비교하였다.

그 결과 소 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트 분말에는 MgO가 미량으로 존재하였고, 하이드록시아파타이트 분말의 입자크기는 약 0.4~0.5 μm 를 나타내었다. 1100°C에서 소결한 시편은 약 65 %의 상대밀도를 갖는 다공질 시편이었는데, 입자들은 0.5~1.0 μm 크기를 나타냈으며, 입자 간에는 0.4~0.5 μm 크기의 기공들이 다수 존재하였다. 1200°C에서 소결한 시편의 경우 입자크기가 1~2 μm 로 증가하였으며, 소결 밀도는 82 %였으며, 입자 간에는 1~3 μm 의 크기의 기공이 존재하였다.

소결 온도에 관계없이 두 시편 모두에서 MG-63 세포가 잘 부착되어 성장이 이루어졌는데, 이것으로 미루어 동물 뼈로부터 제조된 하이드록시아파타이트 시편의 경우 세포에 대한 생체 친화성이 큰 것을 알 수 있었다. 세포의 배양 시간이 지남에 따라 보다 많은 세포가 증식되어 부착되었으나 배양시간이 3일 5일로 지남에 따라 증식되는 세포의 수가 1100°C로 소결한 시편에서 다소

많이 관찰되었는데, 이는 이 시편에서 기공이 많고 기공의 크기가 작기 때문이었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- [1] A.S. Posner, "The mineral of bone", Clin. Orthop. 200 (1985) 87.
- [2] M. Schieker, H. Seitz, I. Drosse, S. Seitz and W. Mutschler, "Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering", Med. Europ. J. Trauma Medicine European Journal of Trauma 32 (2006) 114.
- [3] L.L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic", J. Am. Ceram. Soc. 74 (1991) 1487.
- [4] H. Yuan, Z. Yang, Y. Li, X. Zhang, J.D. De Bruijn and K. De Groot, "Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials", J. Mater. Sci.; Materials in Medicine 9 (1998) 723.
- [5] Y. Fang, D.K. Agrawal and D.W. Roy, "Hydroxyapatite and related compounds", Ed. P.W. Brown (CRC Press. London & Tokyo, 1994) p. 269.
- [6] L. Yubao, Z. Xindong and K. De. Groot, "Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate", Biomaterials 18 (1997) 737.
- [7] H. Oonishi, "Orthopaedic applications of hydroxyapatite", Biomaterials 12 (1991) 171.
- [8] N.O. Engin and A.C. Tas, "Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics", J. Europ. Ceram. Soc. 19 (1999) 2569.
- [9] S.J. Lee, "Characteristics of calcium phosphate fabricated using a natural material", J. Ceram. Proc. Research 11 (2010) 586.
- [10] Y.K. Song, D.H. Kim, T.W. Kim, Y.D. Kim, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Determination of stoichiometric Ca/P ratio in biphasic calcium phosphates using X-ray diffraction analysis", J. Kor. Cryst. Growth Cryst. Tech. 20 (2010) 93.
- [11] J.E. Barralet, L. Grover, T. Gaunt, A.J. Wright and I.R. Gibson, "Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold", Biomaterials 23 (2002) 3063.
- [12] R.Z. LeGeros and J.P. Legeros, "Introduction to bioceramics", Ed., L.L. Hench and J. Wilson (World Scientific, Singapore, 1993) p. 139
- [13] J. Wang, R. Yang, L.C. Gerstenfeld and M.J. Glimcher, "Characterization of demineralized bone matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: III. gene and protein expression", Calcif. Tissue Int. 67 (2000) 314.
- [14] E. Milella, F. Cosentino, A. Licciulli and C. Massaro, "Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process", Biomaterials 22 (2001) 1425.

- [15] C.Y. Ooi, M. Hamdi and S. Ramesh, "Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone", *Ceramics Inter.* 33 (2007) 1171.
- [16] M.J. Mo, S.U. Kim, H.Y. Shin, D.S. Im, I.H. Jung, J.S. Ko and W.K. Lee, "Biological responses of osteoblastic HOS cells to titanium and calcium phosphate-coated films", *J. Ind. Eng. Chem.* 11 (2005) 507.
- [17] P. Ducheyne and Q. Qiu, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function", *Biomaterials* 20 (1999) 2287.
- [18] L. Yubao, Z. Xingdong and K. de Groot, "Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate", *Biomaterials* 18 (1997) 737.
- [19] S.F. Hulbert, J.C. Bokros, L.L. Hench, J. Wilson, G. Heimke and M. Jarcho, "Ceramics in clinical applications, past, present and future", P. Vincenzini Ed., (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 189.
- [20] L.L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705.
- [21] H. Dadarathy, C. Riley, H.D. Coble, W.R. Lacefield and G. Maybee, "Hydroxyapatite/metal composite coatings formed by electrocodeposition", *J. Biomed. Mater. Res.* 31 (1996) 81.
- [22] L. Hong, H.C. Xu and K. de Groot, "Tensile strength of the interface between hydroxyapatite and bone", *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 7.
- [23] M.I. Kay, R.A. Young and A.S. Posner, "Crystal structure of hydroxyapatite", *Nature* 204 (1964) 1050.
- [24] H. Monma, S. Ueno and T. Kanazawa, "Properties of hydroxyapatite prepared by the hydrolysis of tricalcium phosphate", *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 31 (1981) 15.
- [25] J.W. Reid, L.H. Tuck, S. Michael, K. Fargo and J.A. Hendry, "Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted alpha-tricalcium phosphate", *Biomaterials* 27 (2006) 2916.
- [26] A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujijanagul and T. Tunkasiri, "Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone", *Current Applied Physics* 8 (2008) 270.
- [27] C. Rey, C. Combes, C. Drouet and M.J. Glimcher, "Bone mineral: update on chemical composition and structure", *Osteoporos Int.* 20 (2009) 1013.
- [28] F. Chen, Z.C. Wang and C.J. Lin, "Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials", *Materials Letters* 57 (2002) 858.
- [29] S.M. Kuo, S.J. Chang, C.C. Ho, S.F. Chen and L.C. Lin, "Preparation of nano-sized particles of collagen ii by an electrostatic field system", *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2 (2005) 1248.
- [30] D.A. Wahl and J.T. Czernuszka, "Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair", *European Cells & Materials* 11 (2006) 43.
- [31] B.H. Yoon and H.E. Kim, "Development and perspective of biomaterials for spinal fusion", *Korean J. Spine* 7 (2010) 221.
- [32] G. Poumarat and P. Squire, "Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft", *Biomaterials* 14 (1993) 337.
- [33] Y. G. Kim, D.S. Seo and J.K. Lee, "Comparison of dissolution resistance in artificially hydroxyapatite and biologically derived hydroxyapatite ceramics", *J. Phys. Chem. Sol.* 69 (2008) 1556.
- [34] I.K. Lee, I.H. Han, S.W. Hwang and J.J. Ryu, "Analysis of attachment, proliferation and differentiation response of human mesenchymal stem cell to various implant surfaces coated with rhBMP-2", *J. Korean Acad. prosthodontics* 50 (2012) 48.
- [35] H.K. O, K.S. Hong, C.H. Chung and S.B. Yim "The comparative study: the regenerative effect depends on size of bone graft material in bone loss site around dental implant", *J. Korean Acad Periodontol* 38 (2008) 493.