양극 산화에 의해 티타늄 표면에 형성된 산화 피막이 세포 부착 및 성장에 미치는 영향

노세라 · 이용렬 · 송호준 · 박영준[†]

전남대학교 치의학전문대학원 치과재료학과실 및 치과재료연구소

Influence of Anodic Oxidation Film Formed on Titanium onto Cell Attachment and Proliferation

Se-Ra Noh, Yong-Ryeol Lee, Ho-Jun Song and Yeong-Joon Park[†]

Dept. of Dental Materials and Dental Materials Research Institute, School of Dentistry,
Chonnam National University, Gwangju 500-757

(2006년 6월 30일 받음, 2006년 10월 9일 최종수정본 받음)

Abstract This study was purposed to evaluate the influence of anodically oxidized film on titanium (Ti) onto MG-63 osteoblast-like cell attachment and activity. Only scratch lines created by polishing were seen in AS-R and ANO-1 groups. About 1.5 μ m-thick homogeneous oxide film which has pores of about 0.5 μ m diameter were formed in ANO-12. The crystalline structure of the oxide films formed by anodization in phosphoric acid electrolyte was TiP_2O_7 . The total protein amounts of ANO-1 and ANO-12 groups showed higher values of maximum protein amount than that of AS-R group. At 3 days of incubation, total protein amount showed higher value in ANO-2 when comparing to that of AS-R ($p < 0.05$). Based on the results of ALPase activity test, the degree of MG-63 cell differentiation for initial mineralization matrix formation was similar. For all the test groups after 1 day of incubation, MG-63 cells grew healthily in mono-layer with dendritic extensions. After incubation for 3 days, the specimen surfaces were covered more densely by cells, and numerous micro filaments were extruding to the extracellular matrix.

Key words anodization, titanium oxide, implant, osteoblast-like cell, ALPase activity.

1. 서 론

티타늄 금속은 임플란트 재료로서 치과임상과 의학임상에 널리 사용되고 있으나, 생체활성 재료에 비하여 초기 골 생성을 적극적으로 유도하지 못하여 골 생성 속도가 낮은 단점을 가지고 있어서, 이러한 단점을 보완하고자 티타늄 표면의 다양한 표면 처리 방법들이 도입되어져 왔다.

대표적인 방법으로서 티타늄 표면에 적당한 거칠기를 부여하거나, 티타늄 표면의 산화방법에 따른 산화물의 결정 구조 및 형상을 변화시키는 방법,¹⁾ 자연 산화 박막보다 생체활성이 뛰어난 Ca-P층을 티타늄 표면에 코팅하는 방법,²⁾ anodic plasma-chemical(APC)처리 방법³⁾ 등이 있다.

최근 티타늄 상에 양극 산화에 의해 높은 전압을 인가함으로써 산화피막의 절연 파괴를 일으켜 티타늄 표면에 다공성의 두꺼운 산화피막이 분포하도록 시편들을 제

조하는 방법이 이용되고 있다. 이렇게 형성된 다공성의 산화피막은 골 성장인자나 골 유전적 형태 단백질과 같은 생체활성 성분의 저장고가 되어 골과의 결합력을 보다 향상시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다.⁴⁾ 또한, 양극 산화된 임플란트 표면은 표면 거칠기가 증가되고, 초기 골아세포의 부착이 촉진되고 골아세포의 활동도가 높아져서 결과적으로는 골유착성이 증진될 것이라는 보고가 있다.^{5,6)}

본 연구에서는 사체 제작된 양극산화제조 상비물 이용하여 양극산화박막을 제조하였다. 전해액은 1 M의 인산(H_3PO_4)용액을 사용하였다.^{9,10)} 양극산화에 의해 형성되는 산화피막은 두께가 증가할수록 티타늄 금속과 전해액 사이의 저항을 점점 증가시키게 되어, 정전압(potentiostatic) 방식에 의하여 양극산화를 할 경우 전압이 인가된 초기에는 많은 양의 산화피막이 형성되지만, 시간이 지나면서 전류량이 작아지면 형성되는 산화막의 두께도 얇게 형성된다. 본 연구에서는 일정한 속도로 산화막이 성장하도록 하기 위하여 시간에 따라 일정한 전류가 인가되어 산화막의 생성량이 시간에 따라 큰 차이가 없는 정전류

[†]E-Mail : yjpark@chonnam.ac.kr

방식(galvanostatic anodizing) 처리를 하였다. 산화막의 두께가 증가되면 전압이 점점 증가하게 되며, 일정 전압 이상이 인가되면 절연효과가 일어나게 된다.

본 연구에서는 티타늄 금속 상에 양극산화 처리하여 산화 피막을 형성시킨 다음, 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM)을 사용하여 표면의 미세 형상 변화를 관찰하고, 티타늄 금속상의 산화 피막이 MG-63 골아세포의 부착 및 성장에 미치는 영향을 평가함으로써 치과용 임플란트 재료로서 적합한 티타늄 금속의 산화 처리 조건에 대하여 살펴보고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 산화막 생성

직경이 10 mm인 티타늄 봉(c.p. Ti Grade II, NKK Co., Japan)을 저속절단기(Buehler Ltd, U.S.A.)를 사용하여 1 mm의 두께로 절단하였다. 절단한 티타늄 디스크의 기름 성분을 아세톤으로 제거(degreasing)하고, 시편 표면은 #240, 600, 800, 1500 및 2000 SiC 연마지로 연마기(Buehler Ltd, U.S.A.)를 이용하여 연마하였다. 증류수와 에탄올로 각각 5분간 초음파 세척하고, 이 시편들을 다시 에탄올로 세척한 후, 최종적으로 3차 증류수를 사용하여 세척하고 건조시켜, 자연산화 시편군인 AS-R군을 제작하였다. 자체 제작된 양극산화장치 상비를 이용하여 티타늄 금속 상에 양극산화박막을 제조하였다.¹¹⁾ 전해액은 1 M의 인산(H_3PO_4)을 사용하였다. 전해액의 온도를 20°C로 일정하게 유지하기 위하여 외벽에 수냉이 가능하도록 반응조를 제작하고, 온도조절이 가능한 water circulator를 사용하였다. 또한 양극 산화 과정 시 발생하는 기포를 제거하기 위하여 stirrer를 사용하였으며, 음극 전극으로는 30×30 mm²의 백금판을 설치하였다.

양극산화는 정전류 방식(galvanostatic anodizing)에 의해 시간에 따라 일정한 전류가 인가되도록 하였다. 산화막의 생성량이 시간에 따라 큰 차이가 없다. 그러나 산화막의 두께가 증가하면서 전압이 점점 증가하게 되며, 일정 전압 이상이 인가되게 되면 절연효과가 일어나면서 티타늄 금속 표면에서 spark가 일어나게 된다. 본 연구에서는 절연효과가 일어나는 전압을 기준으로 양극산화 박막 시편을 제작하였다. 먼저 120초 동안 절연효과가 전혀 일어나지 않는 1 mA/cm²의 저전류 조건에서 제조된 ANO-1 시편군, 120초 후 절연효과가 일어나기 직전의 전압까지 상승하는 2 mA/cm²의 전류 조건에서 제조된 ANO-2 시편군과, 120초 동안 충분한 절연효과가 일어나는 12 mA/cm²의 전류조건에서 ANO-12 시편군을 각각 제조하였다. Table 1에 본 연구를 위하여 제조된 시편군의 산화처리 조건에 대하여 간략히 나타내었다.

자연산화 및 양극 산화 방법에 의해 제조된 티타늄 표

Table 1. Method of treatment for each group

Groups	Methods of Treatment
AS-R	CP-Ti polished with #2000 SiC paper
ANO-1	Anodization, applied current 1mA/cm ²
ANO-2	Anodization, applied current 2mA/cm ²
ANO-12	Anodization, applied current 12mA/cm ²

면상 산화막의 미세 형상을 각 시편군을 PL로 코팅한 후 전계방사형 주사 전자현미경(FE-SEM, Hitachi S-4700, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2.2 골아세포 활성도 시험

골아세포 활성도를 평가하기 위하여 총 단백질량을 평가하였다. 이를 위해 MG-63 human osteosarcoma cell (human osteoblast-like cell) 공인 세포주(한국세포주은행 제공)를 10% FBS(Gibco, USA)를 포함한 DMEM(Gibco, USA) 용액에서 배양한 후, 무균 처리한 AS-R, ANO-1, ANO-2 및 ANO-12 시편군 상에 1×10^5 cell/ml 농도로 세포를 첨가하였다. 4시간 후 1 ml의 배양액을 추가하여 각 실험군의 시편 상에서 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 동안 세포를 배양하였다.^{12,13)} 각 시간동안 배양한 후 분석일이 되면 배양액을 제거하고, 0.2% triton X-100 (1 ml)으로 세포층을 용해시켰다. Triton lysate (25 μ l)에 200 μ l의 BCA working solution (BCA reagent A : BCA reagent B=1:50)을 첨가한 후 30초간 가볍게 흔들어 혼합하였다. 37°C에서 30분간 incubate한 후 실온에서 서서히 냉각시킨 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 농도는 BSA(bovine serum albumin) stock을 사용하여 검정곡선을 얻었으며, 이로부터 얻어진 $Y=111.14367X^2 + 635.60947X - 6.30191$ 식에 각 실험군의 흡광도 X를 대입하여 단백질의 농도 Y를 계산하였다.

시편 표면에 접촉하는 MG-63 cell의 알칼리성 인산분해효소 활성을 평가하였다. 이를 위해 MG-63 cell을 총 단백질량 평가방법과 같이 각 실험군 표면상에서 배양한 후, 분석일이 되면 배양액을 제거하고, 0.2% triton X-100 (1 ml)으로 세포층을 용해시켰다. 용해된 세포용액 (50 μ l)에 1.5 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer 용액, 20 mM p-nitrophenyl phosphate substrate, 1 mM magnesium chloride가 1:1:1의 비율로 동량 혼합된 working reagent (50 μ l)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 1 N sodium hydroxide (100 μ l)를 첨가하여 반응을 정지시킨 후,¹⁴⁾ ELISA reader로 410 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ALPase의 활성도는 p-nitrophenol stock을 사용하여 얻어진 검정곡선을 이용하여 측정하였고, 얻어진 검정곡선(calibration curve)의 흡광도에 따른 ALPase의 농도 계산식 $Y=358.93871X^2$

+4.30123 X+0.49317'에 각 실험군의 흡광도를 대입하여 ALPase의 농도를 계산하였다. 각 실험군 간의 유의성은 Student-Newman-Keuls multiple comparison test를 통해 비교하였다.

2.3 시편 표면에서 배양된 MG-63세포의 부착 및 성장에 관한 평가

각 시편 상에 1×10^5 cell/ml 농도로 조절된 MG-63 세포 부유액을 100 μ l씩 첨가한 후, 37°C의 5% CO₂ 환경하에서 각각 1일, 3일 동안 배양하였다. 1일, 3일 동안 배양한 세포에는 각 시편상에 배양한지 4시간 후에 1 ml의 배양액을 더 첨가하여 배양했다.

각각의 시편상에 배양된 세포는 0.1 M phosphate buffer(PB)를 사용하여 제조한 3% glutaraldehyde 용액으로 2시간 동안 전고정을 하였다. 전고정을 한 후 0.1 M PB로 각 10분씩 2회에 걸쳐 세척하고 4°C에서 overnight 하였다. 그 후 0.1 M PB에 녹아있는 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 2시간 동안 후고정을 하였고, 후고정을 거친 후 0.1 M PB로 각 10분씩 2회에 걸쳐 세척했다. 이러한 과정을 거쳐 고정된 세포를 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 100% 농도의 에탄올 용액을 순차적으로 사용하여 탈수시켰다. 이때 30~90%까지의 용액은 각각 15분씩 1회 시행하였고, 100% 용액은 10분씩 3회 반복하여 시행하였다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 임계점건조(critical point drying; CPD)를 하기 위하여, CO₂ 가스와 잘 치환되는 isoamyl acetate 용액을 사용하였다. 먼저 100% 에탄올

과 isoamyl acetate가 1:1의 비율로 동량 혼합된 용액에 30분 동안 처리한 후, 다음으로 100% 에탄올과 isoamyl acetate가 1:3의 비율로 혼합된 용액에 3시간 동안 처리하였다. 그 후 CPD를 시행하기 전까지 isoamyl acetate 용액에 넣어 보관하였다. 이상의 처리가 끝난 시편을 임계점건조기(critical point dryer, CPD; Hitachi HCP-2, Japan)에 넣고 CPD를 시행하였다.^{18,19)} CPD가 끝난 시편은 platinum coating한 후 FE-SEM을 이용하여 시편 표면상 세포의 부착 정도를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 표면 산화물의 미세 형상

제작된 각 실험군 표면의 미세 형상을 FE-SEM을 이용하여 관찰한 결과, AS-R 시편군의 경우, 최종 연마한 스크래치 형상만이 관찰되었으며, ANO-1 시편군의 경우 시편 표면의 색상은 노란색을 띄고 있으나 산화막의 두께가 얇아 역시 스크래치 형상만이 관찰되었다. ANO-2 시편군의 경우 절연파괴 직전의 시편으로서 마이크로미터 이하의 미세한 기공들이 시편 표면에서 관찰되었고, 절연파괴가 명확하게 일어난 ANO-12 시편의 경우 약 0.5 μ m 정도의 크기를 갖는 기공들이 균일하게 분포하는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 시편 절단면을 FE-SEM으로 관찰한 결과, AS-R 및 ANO-1군의 경우는 산화막 두께를 판정하기 힘들었으나, ANO-2 시편의 산화막은 두께 약 0.5 μ m, ANO-12 시편의 산화막 두께는 약 1.5 μ m로 형

Fig. 1. FE-SEM photographs of AS-R, ANO-1, ANO-2, and ANO-12 group specimens.

Fig. 2. FE-SEM photographs of cross-cut ANO-2 and ANO-12 group specimens which were embedded in epoxy resin.

성됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

Fig. 3은 실험군 시편의 XRD 패턴을 나타낸 것이다. AS-R 시편군의 경우 기저금속인 티타늄의 피크들만이 관찰되었으며, 양극산화시킨 시편군들에서는 28.4° (2θ) 에서 새로운 피크가 관찰되었다. 일반적으로 양극산화방법에 의해 티타늄 금속표면에 형성되는 산화막은 TiO_2 로서 anatase구조나 rutile구조 또는 이들의 혼합구조를 갖는다. 그러나 본 연구의 실험군 시편들에서는 TiO_2 의 anatase에 해당하는 25.3° (2θ) 위치의 피크는 관찰되지 않았으며, rutile 피크가 나타나는 27.4° (2θ)와도 관찰되는 피크의 위치가 달랐다. JCPDS 카드에 의하면 티타

늄 포스페이트(titanium phosphate) 화합물 중 TiP_2O_7 산화물의 주 피크는 28.6° (2θ)로서, 인산 용액을 사용하여 양극산화 시킨 본 실험 시편표면에서는 28.4° (2θ) 위치에서 피크가 관찰됨에 따라 TiO_2 산화막이 아닌 TiP_2O_7 산화물이 생성된 것으로 사료된다.

3.2 골아세포 활성도 평가

AS-R군, ANO-1군, ANO-2군 및 ANO-12군의 시편 상에서 각각 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 동안 배양한 후 세포의 증식(proliferation)의 척도로서 총 단백질 양(total protein concentration)을 측정된 결과, AS-R군, ANO-2군 및 ANO-12군의 경우는 배양 14일에 최대값을 보이다가 점차 감소하는 양상을 보였으나, ANO-1군은 21일에 최대값을 보였다. ANO-1군과 ANO-12군의 경우 AS-R군에 비해 총단백질 양의 최고치가 더 높게 나타났다. 3일간 배양했을 경우의 총단백질 양은 ANO-2군의 경우 AS-R군에 비해 크게 높은 값을 보여($p < 0.05$), 초기에 활발한 증식이 일어났음을 예측할 수 있었다(Fig. 4).

알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALPase)의 활성도 평가는 골아세포의 광화(mineralization)을 위한 분화(differentiation) 정도를 알 수 있는 초기 척도로서 중요하게 이용된다. 알칼리성 인산분해효소는 알칼리

Fig. 3. XRD patterns of AS-R, ANO-1, ANO-2, and ANO-12 group specimens.

Fig. 4. The result of protein assay with MG-63 osteoblast-like cells. The absorbances are converted to total protein concentrations based on the calibration curve obtained.

성 산도에서 유기기로부터 인산 이온을 가수분해하여 광화 부위에 인산 이온을 공급하는 역할을 하며, 또한 세포막에서 이온 수송에 관여한다.²⁰⁾ ALPase는 골아세포(osteoblast)의 바깥쪽에 붙어 있으면서 뼈 활성도가 증가함에 따라 ALPase 농도도 증가한다. 이때 ALPase의 활성도를 나타내는 흡광도의 수치가 높을수록 골아세포가 활발하게 분화되며, 광화기질이 생성되었음을 의미한다.²⁰⁻²²⁾ 본 연구에서는 미리 얻어진 검정곡선에서 얻어진 식에 단백질과 ALPase의 흡광도 수치를 대입하여 각각 농도 값으로 환산하였고, 단위 단백질량에 대한 ALPase의 농도를 평가하기 위하여 nmol Pi/hour/ μ g protein 단위로 환산하여 normalized ALPase의 농도를 구하였다. ANO-1 군을 제외한 모든 군에서 ALPase의 활성은 배양 21일째 실험군에서 가장 높은 값을 보였다. 3일간 배양했을 경우의 총 단백질 양이 가장 높았던 ANO-2군의 경우 단위 단백질 양에 대한 ALPase의 농도(normalized ALPase concentration)은 다른 실험군의 동일 배양기간의 경우에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$, Fig. 5). 이는 세포 성장은 활발하여 단백질 농도가 높더라도 단위 단백질 당 ALPase의 농도가 비슷했기 때문으로 사료되며, MG-63 세포의 초기 광화기질 형성을 위한 분화(differentiation) 정도는 비슷한 것으로 판단된다.

3.3 시편 표면에서 배양된 MG-63세포의 부착 및 성장에 관한 평가

생체재료에서 골아세포의 부착과 증식은 골기질 형성과 함께 골세포와 재료간의 상호작용 과정에서 매우 중

Fig. 5. The result of alkaline phosphatase activity test with MG-63 osteoblast-like cells. The absorbances are converted to ALPase concentrations based on the calibration curve obtained. The total protein amount was used to normalize the ALPase activity.

요한 부분이다.^{13,23)} 각 실험군의 시편 상에 MG-63 세포를 1일 및 3일 동안 배양하여 그 부착 양상을 FE-SEM을 사용하여 관찰한 결과, 1일간 배양한 경우 모든 실험군 시편 표면에 MG-63 세포들이 모두 flat하게 자리를 뚫어 잘 부착되어 있었고, 단층으로 건강한 상태를 유지하고 있었다. ANO-12군의 경우는 하방으로 다공성의 산화막이 관찰되었다(Fig. 6,7). MG-63 세포를 3일 동안 배양한 후 관찰한 결과, 1일간 배양군들에 비해 더 치밀하게 세포들이 덮고 있었으며, 활발한 유사분열(mitosis)을 하는 구상(spherical)의 세포들이 관찰되었으며, 부착된 세포 표면에서는 수많은 미세융모(microfilament)들이 관찰되었다(Fig. 8,9).

많은 문헌들에서 티타늄의 양극 산화 처리는 표면 거

Fig. 6. SEM images of MG-63 cells on each sample; 1day of incubation ($\times 250$).

Fig. 7. SEM images of MG-63 cells on each sample; 1day of incubation ($\times 1000$).

Fig. 8. SEM images of MG-63 cells on each sample; 3days of incubation ($\times 250$).

칠기를 증가시키고, 절연과괴된 양극 산화층에 다층의 미세한 기공들이 분포하여 세포의 부착과 증식에 유리한 영향을 준다는 보고가 있다.^{1,8,24)} 반면, 이러한 보고와는 대조적으로 양극 산화의 표면 거칠기 증가와 양극 산화층

의 기공들이 골아세포의 부착이나 증식에 영향이 없을지도 모른다는 결과들이 보고되고 있다.^{6,23,25)} Fini 등²⁾은 양극산화 처리한 티타늄의 골전도성을 평가한 결과, 시편의 내식성은 우수하지만 골전도성 면에서는 떨어진다는 보고

Fig. 9. SEM images of MG-63 cells on each sample; 3days of incubation ($\times 1000$).

를 하였다. 본 연구의 FE-SEM을 통한 세포부착 양상을 보면 모든 시편군들이 생체적합성이 우수함을 알 수 있었다. 세포의 초기 부착형태는 양극 산화피막의 경우 다른 실험군과 유의한 차이를 보이지는 않았다. 반면, 각 배양 시기 별로 총 단백질 량과 알칼리성 인산분해효소의 활성은 실험군에 따라 다소 달라 광화기질 형성능력에 차이가 있음을 예상할 수 있었다. 양극 산화에 의한 티타늄 표면 개질이 골유착성에 유리하게 작용한다는 보고들이 있다. 이는 표면특성이 세포부착 및 성장에 미치는 영향보다는 절연파괴의 단계까지 양극 산화된 시편의 경우 기공이 형성되어 그 속으로 세포가 성장하여 광화되어 기계적 유지력이 향상됨으로써 동요도가 감소하고, 결과적으로 골유착성이 향상된 것으로 생각한다. 양극 산화에 의한 산화피막이 티타늄 임플란트의 세포부착 및 성장에 미치는 영향에 대해서 더욱 다양한 접근방법에 의한 완전한 규명이 이루어져야 한다고 본다.

4. 결 론

본 연구는 티타늄 금속 상에 양극 산화 방법을 이용하여 형성시킨 산화 피막이 티타늄 임플란트 표면의 세포 부착 및 성장에 미치는 영향과 골아세포 활동도에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 시편군 표면의 미세형상을 측정한 결과, AS-R와 ANO-1군의 경우 산화막의 두께가 얇아 연마에 의한 스크래치 형상만이 관찰되었다. ANO-2군의 경우 마이크로

이하의 미세한 기공들이 약 $0.5 \mu\text{m}$ 두께의 산화막 표면에서 관찰되었고, 절연파괴가 명확하게 일어난 ANO-12군의 경우 산화막 두께는 약 $1.5 \mu\text{m}$ 이었으며 $0.5 \mu\text{m}$ 정도의 크기를 갖는 기공들이 균일하게 분포하였다. 인산 용액을 사용하여 양극산화시킨 본 실험군들 표면에는 TiO_2 산화막이 아닌 TiP_2O_7 산화물이 생성되었다.

2. 시편 표면 상에서 MG-63 cell을 배양한 결과, ANO-1군과 ANO-12군의 경우 AS-R군에 비해 총단백질 양의 최고치가 더 높게 나타났으며, 3일간 배양했을 경우의 총단백질 양은 ANO-2군의 경우 AS-R군에 비해 크게 높은 값을 보여, 초기에 활발한 증식이 일어났음을 예측할 수 있었다. 각 실험군에 대해 ALPase 농도를 평가한 결과 MG-63세포의 초기 광화기질 형성을 위한 분화정도는 비슷한 것으로 판단된다.

3. MG-63 세포를 시편 표면상에서 1일간 배양한 경우 모든 실험군 시편 표면에 MG-63 세포들이 모두 평편하게 자리를 뚫어 잘 부착되어 있었고, 단층으로 건강한 상태를 유지하고 있었다. MG-63 세포를 3일 동안 배양한 후 관찰한 결과, 모든 실험군에서 1일간 배양군들에 비해 더 치밀하게 세포들이 덮고 있었으며, 활발한 유사분열을 하는 구상의 세포들이 관찰되었고, 부착된 세포 표면에서는 수많은 미세융모들이 관찰되었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하

여 연구되었음 (KRF-2003-041-E20218)

참 고 문 헌

1. Y. T. Sul, C. B. Johansson, S. Petronis, A. Krozer, Y. S. Jeong, A. Wennerberg and T. Albrektsson, *Biomaterials*, **23**, 491-501 (2002).
2. M. Fini, A. Cigada, G. Rondelli, R. Chiesa, R. Giardino, G. Giavaresi, N. N. Aldini, P. Torricelli and B. Vicentini, *Biomaterials*, **20**, 1587 (1999).
3. V. M. Frauchiger, F. Schlottig, B. Gasser and M. Textor, *Biomaterials*, **25**, 593 (2004).
4. J. P. Schreckenbach, G. Marx, F. Schlottig, M. Textor and N. D. Spencer, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **10**, 453 (1999).
5. L. Montanaro, C. R. Arciola, D. Campoccia and M. Cervellati, *Biomaterials*, **23**, 3651 (2002).
6. R. Rodriguez, K. H. Kim and J. L. Ong, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 352 (2003).
7. W. W. Son, X. Zhu, H. I. Shin, J. L. Ong and K. H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **66B**, 520 (2003).
8. X. Zhu, J. L. Ong, S. Y. Kim and K. H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 333 (2002).
9. W. W. Son, K. H. Kim, H. I. Kim, T. Hanawa and Y. S. Jeong, *Biomater. Res.*, **4**, 66 (2000).
10. T. Hanawa and M. Ota, *Biomaterials*, **12**, 767 (1991).
11. Y. T. Sul, C. B. Johansson, Y. S. Jeong and T. Albrektsson, *Medical Engineering & Physics*, **23**, 329 (2001).
12. M. Wiedmann-Al-Ahmad, R. Gutwald, G. Lauer, U. H?bner and R. Schmelzeisen, *Biomaterials*, **23**, 3319 (2002).
13. J. Y. Martin, Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. M. Schraub, J. Lankford, J. D. Dean, D. L. Cochran and B. D. Boyan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 389 (1995).
14. J. L. Ong, C. A. Hoppe, H. L. Cardenas, R. Cavin, D. L. Carnes, A. Sogal and G.N. Raikar, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 176 (1998).
15. M. Amaral, M. A. Costa, M. A. Lopes, R. F. Silva, J. D. Santos and M. H. Fernandes, *Biomaterials*, **23**, 4897 (2002).
16. P. Eyridiki, K. Mitsini, V. B. Irene, K. Christos and M. Evangelos, *Biol. Cell*, **94**, 117 (2002).
17. W. J. Krizmanich and R. M. K. W. Lee, *Exp. Mol. Pathol.*, **64**, 157 (1997).
18. J. D. Clinton, *Biological techniques for transmission and scanning electron microscopy*, p.231, Ladd research industries, Florida, (1971).
19. I. G. Joseph, E. N. Dale, E. Partick, C. J. David, J. A. D. Romig, E. L. Charles, F. Charles and L. Erie, *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*, p.582, Plenum press, New York, (1992).
20. A. Ten Cate, *Oral histology*, 4th ed., p.111, Mosby-year book, St. Louis, (1994).
21. K. Okazaki, *Ceramic engineering for dielectrics*, p.171, Gakken-sha publishing Co., Tokyo, (1992).
22. G. G. Reinholz, B. Getz, L. Pederson, E. S. Sanders, M. Subramaniam, J. N. Ingle and T. C. Spelsberg, *Cancer Res.*, **60**, 6001 (2000).
23. J. Y. Suh, B. C. Jang, X. Zhu, J. L. Ong and K. H. Kim, *Biomaterials*, **24**, 347 (2003).
24. C. Larsson, P. Thomsen, B. O. Aronsson, M. Rondahl, J. Lausmaa, B. Kasemo and L. E. Ericson, *Biomaterials*, **17**, 605 (1996).
25. L. F. Cooper, T. Masuda, S. W. Whitson, P. Ylielikkil and A. David, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, **14**, 37 (1999).