

생체재료의 선택에 따른 조골세포의 형상, 증식 및 분화

김학관 · 장주웅[†] · 정희석 · 이득용*

(주) 우리동명 치과재료연구소

*대림대학 재료정보공학과

(2003년 4월 18일 접수; 2003년 5월 26일 승인)

Osteoblast Cell Morphology, Proliferation, and Differentiation in Variation with Biomaterials

Hak-Kwan Kim, Ju-Woong Jang,[†] Hee-Seok Chung, and Deuk-Yong Lee*

Woori Dong Myung Dental Material Research Center, Kwang Myung 423-754, Korea

*Department Materials Engineering, Daelim College of Technology, Anyang 431-715, Korea

(Received April 18, 2003; Accepted May 26, 2003)

초 록

재료의 선택에 따른 생체친화성을 고찰하기 위해서 조골세포의 세포배양실험을 실시하였으며, 이로부터 세포의 부착형상, 증식, 분화의 정도를 살펴보았다. 본 실험에서 세포배양모제는 체내식립재료로 주목을 받고 있는 TiO₂, 3Y-TZP, HA (Hydroxyapatite) 그리고 Ti를 사용하였으며 대조군으로 Thermanox를 선택하였다. 일반적으로 모든 시편들은 같은 세포배양시간일때 거의 유사한 세포부착형상을 보였다. 그러나, HA위의 세포들은 나머지 시편들보다 좀 더 두꺼운 형상을 보였으며 빠른 세포의 부착 및 퍼짐으로 인한 overlapping이 자주 관찰되었다. 세포의 증식 및 분화의 경우에도 생체활성의 특성을 지니는 HA가 가장 높은 값을 보였으며 생체불활성재료인 경우에는 Ti, TiO₂, 3Y-TZP 모두 유의한 차이를 보이지 않고 비슷한 경향을 나타내었다.

ABSTRACT

Osteoblast-like cell morphology, proliferation, and differentiation were examined in variation with biomaterials. Cells were cultured on TiO₂, Ti, 3Y-TZP, HA (Hydroxyapatite) and Thermanox was used as a control specimen. Generally, all specimens have similar cell morphology within the same time interval. However, cells on HA seem to be more thicker than those on TiO₂, Ti, 3Y-TZP and cell overlapping was detected very frequently on HA. In case of cell proliferation and differentiation, bioactive material such as HA could help osteoblast-like cell proliferate and provoke a sharp increase of ALP. On the other hand, whether the substrate material is a bioinert ceramics or metal, it does not so strongly affect the cell attachment, proliferation, and differentiation.

Key words : Osteoblast, Morphology, Proliferation, Differentiation, Bioactive, Bioinert

1. 서 론

임플란트 표면에서의 골의 형성은 전구조골세포의 부착, 지속적인 조골세포로의 분화, 비석회화된 세포의 매트릭스(extracellular matrix)의 생산, 세포의 매트릭스의 석회화 등이 일련의 과정을 통하여 이루어진다.^{1,2)} 그러므로 생체재료의 생체친화성은 그들 표면에 접하고 있는 세포의 거동과 아주 밀접한 관련이 있으며 특히 초기에 표면의 세포부착이 많은 영향을 준다고 할 수 있다. 이러한 재료중에서 지금까지 티타늄은 금속중에서 가장 적은 생체내의 조직반응을 보여서 정형 및 치과 임플란트 분

야에서 성공적으로 사용되고 왔고 지금까지도 많이 사용되고 있다. 많은 임상실험결과도 티타늄 임플란트가 상대적으로 적은 조직반응 및 초기 석회화로 인하여 성공적이었다고 보고하고 있다.^{3,5)} 그와 같은 골내에서의 생물학적인 반응이외에 순수 티타늄(commercially pure titanium, cp Ti)은 높은 내부식성, 고강도 및 가공의 용이성 등의 다른 장점도 가지고 있다.⁶⁾ 그러나, 보철물 주위의 연조직에서 잠재적으로 큰 독성이온은 아니지만 이러한 금속이온들이 누적되면서 변색이나 다른 이상증상을 보인다는 임상보고가 다른 연구자들에 의해서 제기되기도 했다.⁷⁾ 그러한 티타늄이온의 체내로의 유출은 임플란트의 탈락과 연관된 파골세포 및 사이토킨의 증가를 유도할 수 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 골과 임플란트 간의 단단한 결합, 즉 고정 안정성의 증가를 위한 새로운 표면처리방법의 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다. 아노다이징, 열

[†]Corresponding author : Ju-Woong Jang
E-mail : orientae@empal.com
Tel : +82-2-891-2809 Fax : +82-2-891-2846

산화, 용사코팅 같은 많은 표면처리방법들은 만족할 만한 표면특성을 얻기 위해서 그리고 표면처리과정중의 메카니즘을 명확히 하기 위해서 많이 연구되어 왔다.⁸⁻¹⁰⁾ 이때 표면에 형성되는 재료는 주로 HA 같은 생체활성세라믹이나 ZrO_2 , TiO_2 같은 생체비활성세라믹인 경우가 대부분이다. 최근 연구에 의하면 티타늄이나 티타늄 합금 표면의 산화막 두께가 증가할수록 생체용액내에서의 부식전류밀도를 효과적으로 줄여서 금속이온의 유출을 상당히 억제할 수 있었다고 보고하였다.¹¹⁾ 게다가 산화막 두께 및 구조도 금속이온 유출에 중요한 역할을 한다는 보고도 있었다.¹²⁾ 이러한 이온유출정도에 따라서 생체주위환경의 변화를 가져오고 더 나아가 세포와 임플란트간의 반응에 영향을 미칠 수 있다. 다시 말하면 티타늄의 생체친화성은 표면화학적조성과 부착되는 분자 및 구성원자들에 의해서 결정될 수 있다. 다른 관점에서 보면, HA 같은 생체활성세라믹은 큰 강도를 필요로 하지 않은 생물학적인 임플란트로써 많은 관심을 끌고 있는 잠재적인 능력이 있는 세라믹 재료이다. 이런 HA의 특성을 살리기 위해서 플라즈마 용사된 HA-Ti 합금 임플란트가 개발되어 외과 시술용으로 현재 많이 사용되고 있다. 여러 임상시험 결과가 있지만 HA의 유무에 따라서 골의 성장 및 유도에 있어서의 차이는 명확하였으며 식립초기에 그 효과는 더욱 두드러졌다고 보고하였다.¹³⁻¹⁵⁾ 따라서 본 연구에서는 체내식립재료로 각광을 받고 있는 3Y-TZP, Ti, HA 그리고 TiO_2 표면에서의 조골세포들의 형상, 증식 및 분화 등을 관찰하여 비교하는데 목적이 있다.

2. 실험방법

2.1. 시편준비

HA(SCI Engineered materials), TiO_2 , 3Y-TZP(Tosoh Inc.) 세라믹 분말을 볼밀을 사용하여 각각 혼합한 후, $1100^{\circ}C$ 에서 4시간 동안 하소한 다음, 어트리션 밀로 500 rpm으로 2시간 동안 분쇄하고 제조립하여 컴팩트를 만든 후 최종적으로 $1500^{\circ}C$ 에서 4시간 동안 소결하여 시편을 제조하였다. 단, HA의 경우는 최종 소결온도를 $1400^{\circ}C$ 로 하였다. TiO_2 시편의 경우 지름 10 mm에 높이 3 mm의 디스크 시편으로 나머지 재료들은 지름 9 mm에 높이 2.8 mm의 디스크 시편으로 제조하였다. 최종적으로 모든 시편들은 아세톤에서 30분간, 에탄올에서 15분간 초음파 세척을 실시하였다.

2.2. 세포배양 및 부착형상관찰

세포의 부착형상 및 양상을 관찰하기 위해서 MG-63 조골세포를 사용하였으며, 세포배양은 12-well 세포배양 플레이트에서 시행하였다. 각 시편 당 1.0×10^4 개의 세포를 접종(seeding)하였으며 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's

Medium(DMEM)+10% Fetal Bovine Serum(FBS)를 사용하였다. 일반 세포 배양 때 보다 접촉한 세포수가 적은 이유는 초기 세포의 부착 시 단일 세포의 형상을 좀 더 보기 쉽게 관찰하기 위해서이다. 세포배양기간동안 시편 위에서의 세포들의 부착, 군집성향 정도를 현미경으로 파악할 수 없으므로 세포배양 플라스틱 표면에서 성장하는 세포들의 거동을 통하여 이를 확인하였다. 세포배양은 $37^{\circ}C$ 의 온도에 5%의 CO_2 를 포함한 100% 습한 대기환경을 유지하는 배양기내에서 유지되었다. 3일 후 PBS(Phosphate Buffer Solution)로 세척한 후 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, 1% saccharose, pH 7.3의 고정액으로 고정시켰다. 고정 후 시편들은 PBS로 다시 세척한 다음, 연속적으로 70, 90, 100% 에탄올에 침적시켜 탈수시킨 후, 최종적으로 CPD030(Baltec, Germany)으로 완전탈수를 시켰고, SEM 관찰을 위해서 Au로 마무리 코팅을 실시했다.

2.3. 세포증식측정

MG-63 조골세포배양은 24-well 세포배양 플레이트에서 실시하였으며 시편당 3.0×10^4 개의 세포를 접종하였다. 배양후의 세포의 분리는 0.25% trypsin과 1 mM EDTA를 첨가한 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)를 첨가하여 실시하였으며 완전한 분리를 위해 2회 반복하여 실시하였다. 트립신 처리를 하여 분리된 부유세포들을 모아서 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 PBS로 세척한 다음 배양액에 넣어서 최종적으로 direct cell counting을 통하여 세포의 증식정도를 평가하였다. 모든 counting은 3번 실시하였다.

2.4. 세포분화측정

HOS 조골세포의 배양도 24-well 세포배양 플레이트에서 실시하였으며 시편 당 3.0×10^4 개의 세포를 접종하였다. Lowry 등이 개발한 방법¹⁶⁾으로 단백질을 추출하고 그 양을 측정하였으며 세포의 분화는 alkaline phosphatase activity(ALP)를 통하여 평가하였다. 1차 원심분리로 모은 세포들은 1% Triton X-100을 첨가하여 세포를 파괴함으로써 단백질을 추출하였고 ALP 수치는 상용화된 측정 키트(Sigma Chemical)를 시편의 총 단백질 양에 맞춰 계산함으로써 얻을 수 있었다.¹⁷⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포의 부착 및 성장형상

각각의 시편들에 대하여 몇몇 조골세포들의 특징적인 형상을 SEM을 통하여 관찰하였다. 각각의 조골세포들은 똑같은 속도로 모재에 부착하고 퍼지는 것이 아니기 때문에 위치에 따라서 약간의 차이가 있을 수 있으므로, 같은 시간 간격에서 가장 대표적이고 전형적인 형태를 띤

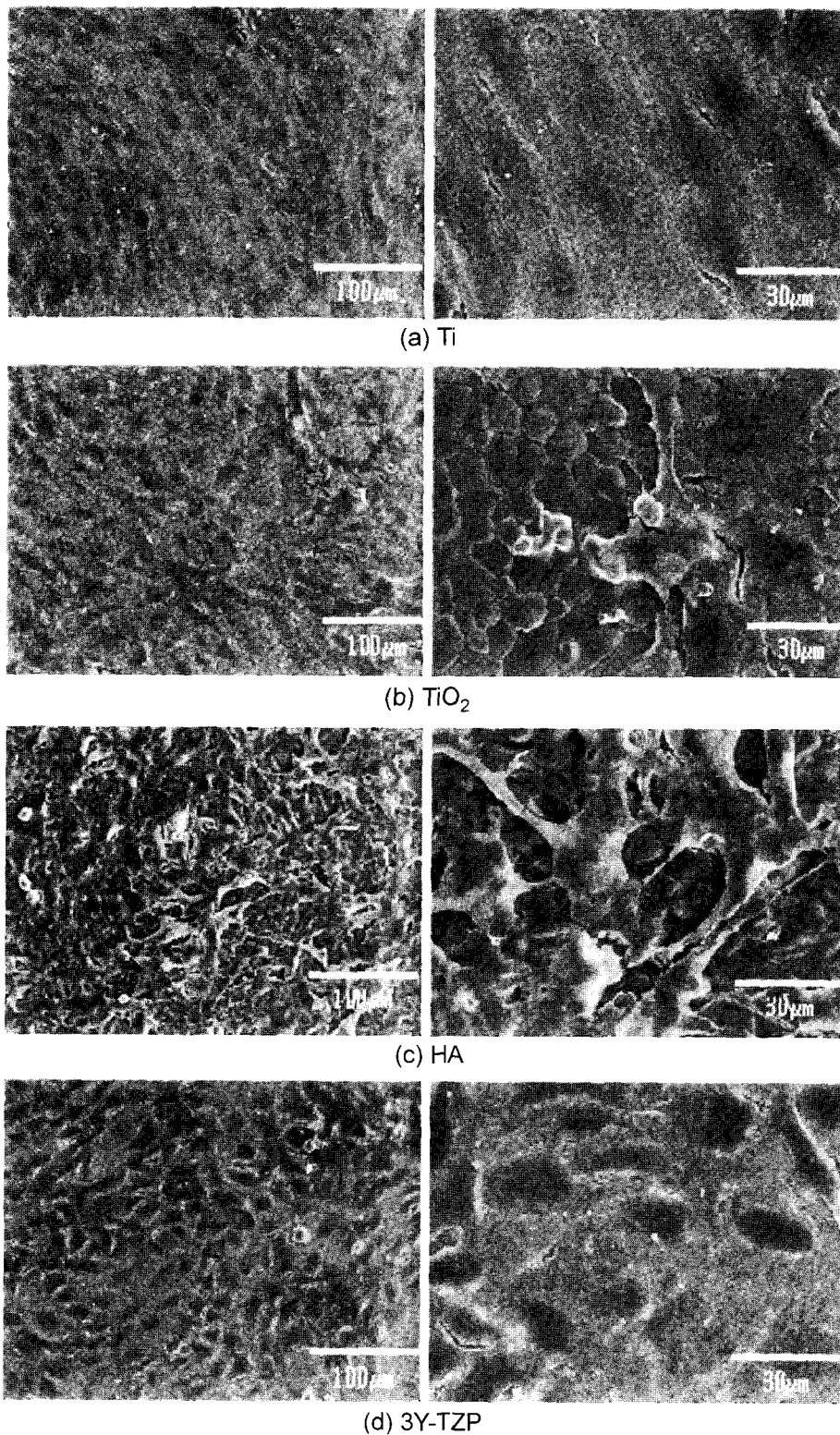


Fig. 1. SEM morphology in variation with substrate materials after 3 day.

다고 생각되는 세포의 형상만을 선택하여 제시하였다. 그 결과 Thermanox, TiO_2 , Ti, 3Y-TZP 위의 모든 세포는 세포 부착형태와 퍼진 정도가 매우 유사하게 나타났다. Fig.

1에 나타난 바와 같이, 배양한 지 3일째 되는 날, 부착된 조골세포들은 퍼져서 성장해 나가는 형태를 보였으며 세포의 기저경계부위에서 시편 표면을 따라서 얇은 잔가지

형태로 뺏어나가는 filopodia가 관찰되었다. 부착된 지 얼마 안 된 구형의 초기세포형상은 Ti와 TiO_2 표면에서 관찰되었으며 특히 Ti 표면에서 더 자주 관찰되었다. 하지

만, 대체적으로 비활성세라믹이나 금속위에서의 조골세포의 부착형태나 성장거동은 거의 유의한 차이를 보이지 않았다. 단, 비교군인 Thermanox와는 달리 세포들이 한쪽으

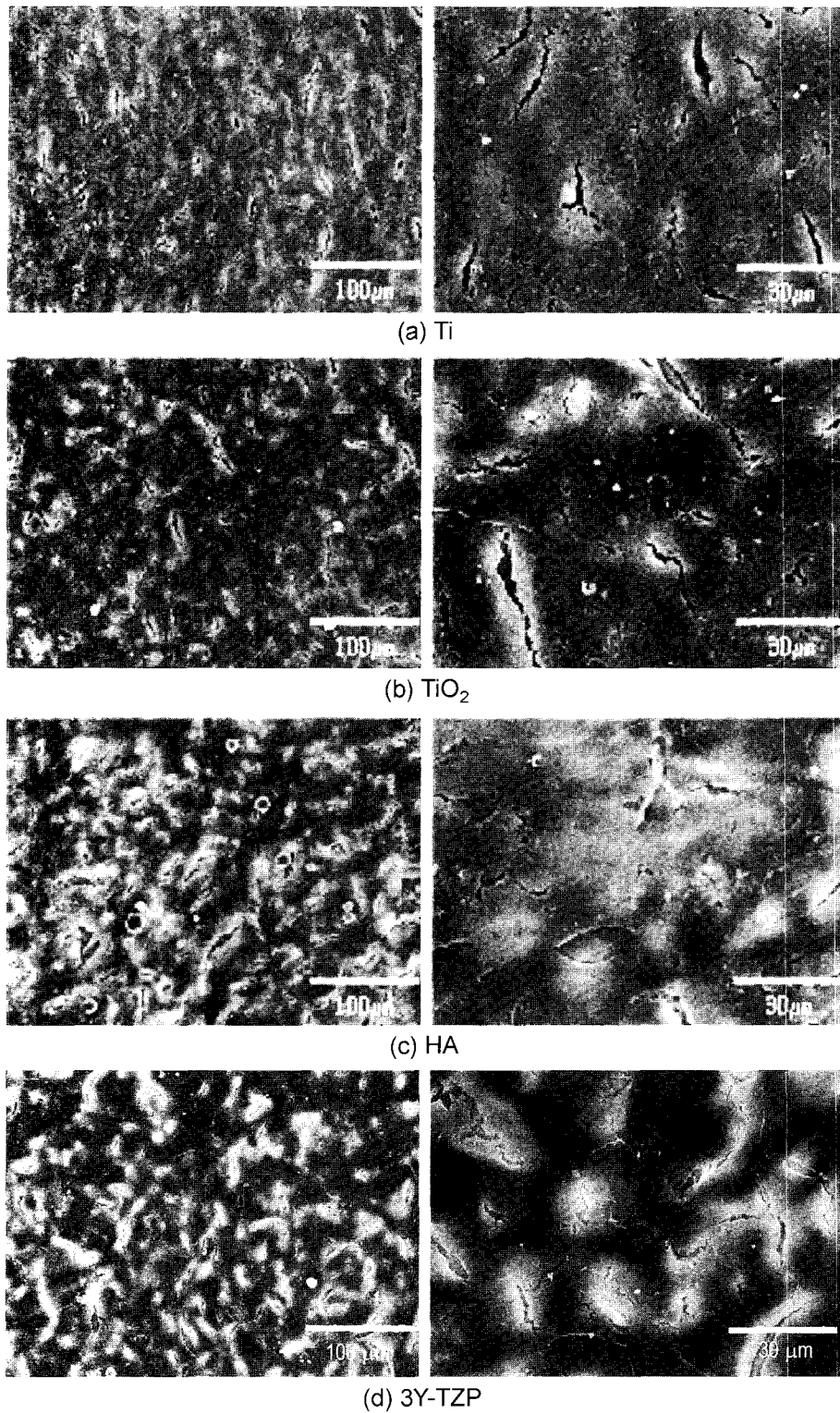


Fig. 2. SEM morphology in variation with substrate materials after 7 days.

로 길게 성장하는 형태를 보였으며 성장하는 세포들끼리 서로 겹치는 형태가 더 자주 관찰되었다. 그러나, HA의 경우는 3Y-TZP, TiO₂와 같은 비활성세라믹이나 Ti와는 다른 양상을 보였다. HA위에서 성장하는 조골세포들은 나머지 시편들에 비해서 상대적으로 더 두꺼운 형태를 띠었으며 성장한 세포위에 다시 세포가 부착하여 퍼지는 형태의 overlapping 정도가 훨씬 더 심하였다. 일반적으로 마이크로미터 단위에서 유전자의 표현양상, 세포의 이동 및 형상, 부착, 방향성 등의 여러 가지 성질은 재료표면의 3차원적인 형상 및 표면에너지에 의해서 영향을 많이 받는다고 알려져 있다.^{18,19)} 즉, 본 실험에서 모든 시편들은 거의 같은 표면조도 및 형상을 가지고 있으므로 차이가 거의 없을 것 같았으나 HA의 경우에는 세포의 overlapping이나 방향성에 있어서 나머지 시편들과 차이를 보였다. 이는 활성세라믹인 HA에서의 Ca이나 P 이온들의 유출이 주위 환경의 변화를 초래하여 일어난 것으로 이러한 환경의 변화가 세포의 부착 및 성장거동에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 다른 연구자들의 결과에 의하면^{20,21)} 생체비활성 세라믹재료의 표면조도는 세포의 부착형상에 큰 영향을 미치지 않고 bioglass ceramic 같은 활성세라믹재료에서 독특한 부착양상을 띠었다고 보고하고 있으며 이는 본 실험 결과와도 잘 일치한다. 즉, 생체활성재료에서 유출된 이온들이 골성장을 촉진시키며 이에 따라 세포의 초기 부착형상이 결정되는 것으로 생각된다. 그러나 Fig. 2에 나타난 바와 같이 세포배양한지 7일이 지난 경우에는 활성재료와 비활성재료에 관계없이 세포부착 형상의 차이가 거의 나지 않는데 이는 세포들이 반복적으로 overlapping됨에 따라 재료와는 무관한 증식을 반복한 결과다. 따라서 초기 조골세포의 부착에 활성세라믹이 큰 잇점이 있으나 임계부착시간이 지나게 되면 재료의 조성변화에 따른 세포부착형상의 차이는 거의 없는 것을 알 수 있다.

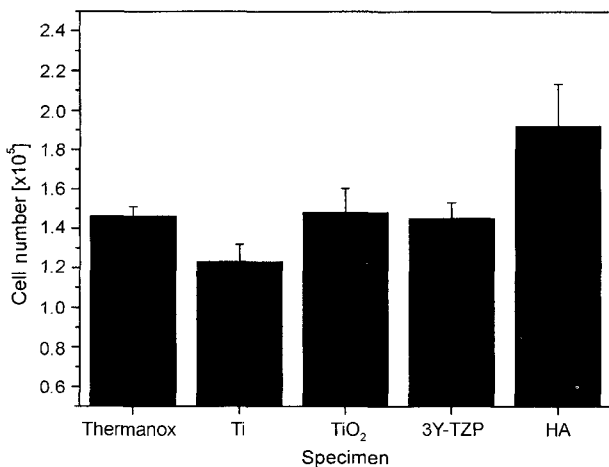


Fig. 3. Effects of various substrates on the number of MG-63 cell layer at 7 days of culture.

3.2. 조골세포의 증식

세포배양실험에 사용된 시편의 변화가 MG-63 조골세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 지를 나타낸 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. 모든 데이터들은 세 번의 반복실험을 통하여 얻은 평균값을 의미한다. HA에서 분리해낸 조골세포의 수는 $1.92 \pm 0.212 \times 10^5$ 로 Ti이나 비활성세라믹의 조골세포수에 비하여 더 높았으며 TiO₂($1.48 \pm 0.122 \times 10^5$), 3Y-TZP($1.45 \pm 0.0801 \times 10^5$) 같은 비활성세라믹 시편들과 Ti 금속시편($1.23 \pm 0.0882 \times 10^5$)간의 증식된 조골세포 수는 큰 차이를 보이지 않았다. 특히, HA의 조골세포 수는 Ti 금속의 조골세포수 보다 약 60% 정도 더 많은 것으로 나타났다. 세포부착형상 결과에서 언급한 바와 같이 재료들의 표면거칠기는 본 실험에서 MG-63 조골세포의 활성화 증식에 크게 영향을 미치지 못한 것으로 보인다. 따라서 이러한 세포증식결과와 세포부착형상 결과로부터 활성세라믹재료의 경우 조골세포의 증식에 상당히 유리한 영향을 미침을 알 수 있다. 기존의 다른 연구자들에 의하면, HA 코팅의 활성화 특성 때문에 주위 환경에 골형성에 필요한 이온을 제공하고, 필요한 단백질을 형성시키고, 골형성에 관계된 여러 가지 인자들의 활성화를 촉진시킨다는 메카니즘을 제안하였고^{22,23)} 이 실험에서와 비슷한 결과가 본 실험에서도 나타났다. 따라서, 금속표면을 활성세라믹과 같은 형태로 변형시키거나 표면거칠기를 할 경우, 초기에 골형성에 관계하는 단백질의 흡착을 급속히 진행하고, 골을 형성시키는 조골세포의 부착을 촉진시키므로 임플란트의 골과의 결합이 조기에 이루어질 수 있다. 그러나, 다른 연구자들의 경우 초기 활성세라믹재료의 용해도 조절의 난해함을 이유로 골과의 결합에 있어서 표면거칠기 같은 형태학적인 변화가 재료가 활성이나 비활성이나 같은 성분의 변화보다 훨씬 더 중요한 요소라고 강조하였다.^{24,25)} 그러나 본 실험에서와 같이 7일간의 세포배양실험을 통하여 얻어진 결과로 평가해보면 비활성재료인 경우에는 후자의 경우처럼 재료의 조성에 크게 상관없이(물론 여기에는 금속도 포함된다), 세포의 부착형태나 증식에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만, HA 같이 활성재료인 경우에는 전자의 주장처럼 활성재료를 구성하는 이온들의 주위 조직환경으로의 유출로 인해서 골의 생성이 촉진 될 수 있음을 보여준다. 결론적으로, 임플란트 재료의 골결합능력에 있어서 표면거칠기나 기공같은 형태학적인 측면과 활성인지 비활성인지의 성분의 차이 모두 중요한 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있으며, 특히, 본 실험에서와 같이 초기 골 결합에 있어서는 활성세라믹의 이온유출에 의한 조골세포의 부착 및 증식효과가 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

3.3. 조골세포의 분화

세포배양실험에 사용된 시편들의 조성변화가 HOS 조

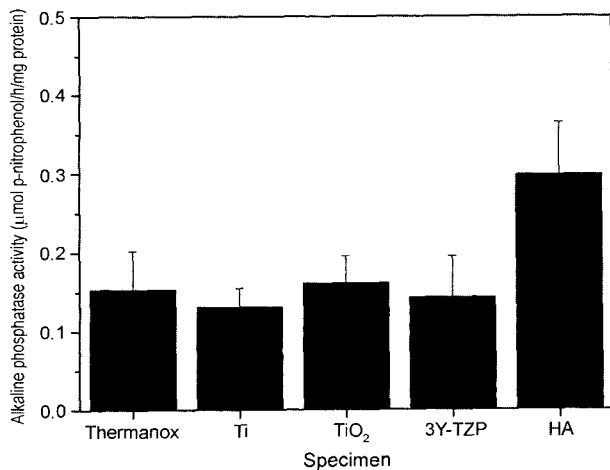


Fig. 4. Effects of various substrates on ALP activity of HOS cell layer at 10 days of culture.

골세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는 지를 나타낸 결과가 Fig. 4에 나타나 있다. 모든 데이터들은 세 번의 반복실험을 통하여 얻은 평균값을 의미한다. ALP(alkaline phosphatase activity) 방법은 조골세포의 분화를 표현하는데 있어서 가장 많이 이용되고 있는 방법 중에 하나이며 ALP의 레벨은 조골세포의 분화단계를 의미한다.²⁶⁾ Fig. 4에 나타난 바와 같이, HA 위에서 부착, 증식, 분화된 HOS 세포의 ALP(0.2983±0.06631)는 Ti 금속이나 비활성세라믹 조골세포의 ALP에 비하여 더 높았으며, TiO₂(0.1611±0.03444), 3Y-TZP(0.1433±0.05175) 같은 비활성세라믹 시편들과 Ti 금속시편(0.1311±0.02386)간의 분화된 조골세포의 ALP 차이는 거의 차이를 보이지 않았다. 특히, HA의 ALP는 Ti에 비하여 거의 3배 가깝게 높은 수치가 나왔으며 조골세포의 증식결과와 비교해 보았을 때, HA의 ALP는 훨씬 더 두드러진 증감 효과를 나타냈다. 다시 말하면, HA 같은 활성세라믹은 ALP와 초기 조골세포의 석회화를 증진시키는 효과를 두드러지게 보여준다. 이는 골의 생성에 관여하는 단백질과 Ca, P 이온의 결합 및 이동이 ALP의 증가와 맞물려 일어나고 있으며 ALP는 조골세포의 바깥쪽에 붙어 있으면서²⁹⁾ 골의 활성도의 증가와 함께 그 농도가 증가함으로 이로부터 석회화된 골조직의 형성과 빠른 골결합이 부수적으로 따라서 일어나게 됨을 의미한다. 이러한 조골세포의 분화에 의한 빠른 골결합은 생체활성세라믹의 독특한 특성임을 볼 때 더욱 두드러진다. 다른 연구자들에 의하면, 세라믹의 용해도가 증가할수록 골조직성장의 향상이 두드러지게 나타남을 임상적으로 증명하였으며 이는 본 실험의 결과와도 잘 일치한다.²⁷⁾ 한편, 생체재료가 비활성세라믹이나 금속일 경우, 조성의 변화에 따른 세포분화정도의 차이는 그리 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나, 금속의 경우에는 부식 저항성이 아무리 뛰어나다고 할지라도 생체내에서와 같

은 극심한 환경에서는 생체에 그리 이롭지 못한 금속이온의 유출이 항시 문제가 될 수 있고, 만약 고관절과 같은 마모환경일 경우에는 마찰과정에서 발생할 수 있는 파편에 의해서 파골세포가 형성되고 골흡수과정이 촉진될 가능성이 있다고 보고된 바 있다.²⁸⁾ 즉, 금속의 경우는 세라믹에 비해서 항시 부식 및 마모저항성에 대한 문제를 가지고 있기 때문에 세라믹코팅이나 대체 세라믹의 개발에 대한 필요성이 제기되어 왔다. 그러나, 본 실험에서는 이러한 내용들과는 달리 비활성세라믹 및 금속간에 세포분화특성에 큰 차이가 없었다. 즉, 부식에 따른 환경의 변화나 마모 문제의 경우는 본 실험에서와 같은 초기 조골세포의 특성변화에는 큰 영향을 미치지 못할 것으로 생각된다. 결국, 비활성세라믹과 금속은 생체내에서 활성세라믹에 비해서 매우 낮은 용해도를 가지는 공통점이 있다는 측면에서 표면거칠기와 같은 형태학적인 측면이 세포분화에 주된 영향을 미칠 것으로 보인다.

4. 결 론

재료의 선택에 따른 세포의 부착 형상, 증식 및 분화 등을 평가한 결과 대체적으로 세포의 부착형상은 큰 차이를 보이지 않았으나, HA의 경우는 나머지 시편들에 비해서 상대적으로 overlapping이 더 크게 일어났다. 조골세포의 증식 및 분화의 경우에도 생체활성의 특성을 지니는 HA가 가장 높은 값을 보였으며 생체불활성재료인 경우에는 Ti 금속과 세라믹 간에 거의 차이를 보이지 않고 유사한 경향을 나타냈다. 결론적으로 임플란트 재료의 골결합능력에 있어서 표면거칠기나 기공 같은 형태학적인 측면과 활성인지 비활성인지의 성분차이 모두 중요한 영향을 미칠 수 있으나, 본 실험에서와 같이 초기 골결합에 있어서는 활성세라믹의 이온유출에 의한 조골세포의 부착 및 증식효과가 더 큰 영향을 미치고, 비활성재료의 경우에는 성분의 변화가 생체적합성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. E. Schepers, M. Declercq, P. Ducheyne, and R. Kempenneers, "Bioactive Glass Particulate Material as a Filler for Bone Lesions," *J. Oral Rehab.*, **18** 439-52 (1991).
2. A. El-Ghannam, P. Ducheyne, and I. M. Shapiro, "Bioactive Material Template for *in vitro* Synthesis of Bone," *J. Biomed. Mater. Res.*, **29** 359-70 (1995).
3. O. E. Beder and G. Eade, "An Investigation of Tissue Tolerance to Titanium Metal Implants in Dogs," *Surgery*, **39** 470-73 (1956).
4. T. Albrektsson, P. I. Branemark, H. A. Hansson, and J. Lindstrom, "Osseointegrated Titanium Implants," *Acta Orthop. Scand.*, **52** 155-70 (1981).

5. T. G. Donley and W. B. Gillette, "Titanium Endosseous Implant-soft Tissue Interface," *J. Periodontol.*, **62** 153-60 (1991).
6. J. B. Park and R. S. Lakes, *Biomaterials, An Introduction*, 2nd ed. (Plenum Press, New York, 1992), Ch.5, pp.79-115.
7. J. Black, "Systemic Effects of Biomaterials," *Biomaterials*, **5** 11-8 (1984).
8. O. R. Camara, C. P. De Pauli, and M. C. Giordano, "Potentiodynamic Behaviour of Mechanically Polished Titanium Electrodes," *Electrochimica Acta*, **29** 1111-17 (1984).
9. K. Leiner, J. W. Schultze, and U. Stimming, "Photoelectrochemical Investigations of Passive Films on Titanium Electrodes," *J. Electrochem. Soc.*, **133** 1561-65 (1986).
10. J. D. de Brunjin, C. A. van Blitterswijk, and J. E. Davies, "Initial Bone Matrix Formation at the Hydroxyapatite Interface *in vivo*," *J. Biomed. Mater. Res.*, **29** 89-99 (1995).
11. A. Wisbey, P. J. Gregson, L. M. Peter, and M. Tuke, "Effect of Surface Treatment on the Dissolution of Titanium-based Implant Materials," *Biomaterials*, **12** 470-73 (1991).
12. J. L. Ong, L. C. Lucas, G. N. Raiker, and J. C. Gregory, "Electrochemical Corrosion Analyses and Characterization of Surface-modified Titanium," *Appl. Surf. Sci.*, **72** 7-13 (1993).
13. P. Ducheyne, J. Beight, J. Cuckler, B. Evans, and S. Radin, "Effect of Calcium Phosphate Coating Characteristics on Early Post-operative Bone Tissue Ingrowth," *Biomaterials*, **11** 531-40 (1990).
14. J. D. de Bruijn, Y. P. Bovell, and C. A. van Blitterswijk, "Structural Arrangements at the Interface between Plasma Sprayed Calcium Phosphates and Bone," *Biomaterials*, **15** 543-50 (1994).
15. S. H. Maxian, J. P. Zawadski, and M. G. Dunn, "In vitro Evaluation of Amorphous Calcium Phosphate and Poorly Crystallized Hydroxyapatite Coating on Titanium Implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **27** 111-17 (1993).
16. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *J. Biol. Chem.*, **193** 265-75 (1951).
17. M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding," *Anal. Biochem.*, **22** 248-54 (1976).
18. B. Chehroudi, T. R. L. Gould, and D. M. Brunette, "Effects of a Grooved Titanium Coated Implant Surface on Epithelial Cell Behaviour, *in vitro* and *in vivo*," *J. Biomed. Mater. Res.*, **23** 1067-85 (1989).
19. B. Chehroudi, T. R. L. Gould, and D. M. Brunette, "Titanium-coated Micromachined Grooves of Different Dimensions Affect Epithelial and Connective Tissue Cells Differently *in vivo*," *J. Biomed. Mater. Res.*, **24** 1203-19 (1990).
20. P. Ducheyne, L. L. Hench, A. Kagan, M. Martens, A. Bursens, and J. C. Mulier, "Effect of Hydroxyapatite Impregnation on Skeletal Bonding of Porous Coated Implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **14** 225-37 (1980).
21. J. L. Berry, J. M. Geiger, J. M. Moran, J. S. Skraba, and A. S. Greenwald, "Use of Tricalcium Phosphate or Electrical Stimulation to Enhance the Bone-porous Implant Interface," *J. Biomed. Mater. Res.*, **20** 65-77 (1986).
22. P. Ducheyne, S. Radin, and L. King, "The Effect of Calcium Phosphate Ceramic Composition and Structure on *in vitro* Behaviour. I. Dissolution," *J. Biomed. Mater. Res.*, **27** 25-34 (1993).
23. G. Daculsi, R. Z. LeGeros, E. Nery, K. Lynch, and B. Kerbel, "Transformation of Biphasic Calcium Phosphate Ceramics *in vivo*: Ultrastructural and Physicochemical Characterization," *J. Biomed. Mater. Res.*, **23** 883-94 (1989).
24. K. Kieswetter, Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. L. Cochran, J. Simpson, D. D. Dean, and B. D. Boyan, "Surface Roughness Modulates the Local Production of Growth Factors and Cytokines by Osteoblast-like MG63 Cells," *J. Biomed. Mater. Res.*, **32** 55-63 (1996).
25. B. D. Boyan, R. Batzer, K. Kieswetter, Y. Liu, D. L. Cochran, S. Szmuckler-Moncler, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Titanium Surface Roughness Alters Responsiveness to $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$," *J. Biomed. Mater. Res.*, **39** 77-85 (1998).
26. S. Ozawa and S. Kasugai, "Evaluation of Implant Materials (Hydroxyapatite, Glass-ceramics, Titanium) in Rat Bone Marrow Stomal Cell Culture," *Biomaterials*, **17** 23-9 (1996).
27. H. Oonishi, M. Yamamoto, H. Ishimaru, E. Tsuji, S. Kushitani, M. Aono, and Y. Ukon, "The Effect of Hydroxyapatite Coating on Bone Growth into Porous Titanium Alloy Implants," *J. Bone Jt. Surg.*, **71** 213-16 (1989).
28. A. Sabokbar, R. Pandey, J. Diaz, J. M. W. Quinn, D. W. Murray, and N. A. Athanasou, "Hydroxyapatite Particles are Capable of Inducing Osteoclast Formation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12** 659-64 (2001).
29. J. Lukacs, "Substance Checked in Routine Blood Test may Forecast Bone Loss and Osteoporosis," University of Michigan Researcher Reports, February 12 (2001).