

타이타늄 상에 코팅된 소혈청 알부민 함유 골유사형 아파타이트의 특성

심서윤¹, 한옥성², 박영준², 송호준^{2*}

전남대학교 소아치과학교실¹, 전남대학교 치의학전문대학원 치과재료학교실 및 치과재료연구소²

〈Abstract〉

Characteristics of Bone-Like Apatite Containing Bovine Serum Albumin Coated on Titanium

Seo-Youn Shim¹, Ok-Sung Har², Yeong-Joon Park², Ho-Jun Song^{2*}

Department of Pediatric Dentistry¹,

Department of Dental Materials and Dental Materials Research Institute, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju 500-757, South Korea²

In this study, the characteristics of the bovine serum albumin (BSA)-containing bone-like apatite (BLAp) coated on titanium by immersion in simulated body fluid (SBF) were investigated. Titanium disks used as substrates were treated using anodic oxidation and hydrothermal treatments. A mSBF (modified-SBF) which contains twice of the concentration of Ca and P ions compared with that of standard SBF was used for coating BLAp layer. BSAs were premixed with a CaCl₂ and a KH₂PO₄ solutions, respectively, in order to prepare Ca-mSBF and P-mSBF. The S-BLAp, Ca-BLAp, and P-BLAp groups were fabricated by soaking titanium specimens in mSBF, Ca-mSBF, and P-mSBF, respectively. The morphology of the crystallites observed in the Ca-BLAp and P-BLAp groups was more rounded compared with that of the S-BLAp group. In the cross-sectional images of BLAp layers, the S-BLAp and Ca-BLAp groups showed the well-aligned crystallites, while the P-BLAp group showed the randomly aligned crystallites. The Hydroxyapatite (HAp) crystalline structure was dominant for all groups. The XRD patterns of the Ca-BLAp group showed that HAp crystals were aligned along the c-axis. The crystallinity of P-BLAp group was lower than that of the Ca-BLAp group. The amide peaks related to BSA were identified on FT-IR spectra for the BSA-containing BLAp groups. The amount of dissolution of Ca and P ions was high in the S-BLAp group, while that was low in the Ca-BLAp group. After the dissolution experiment, amide peaks were still observed in the Ca-BLAp and P-BLAp groups, which inferred that BSAs were released slowly in BSA-containing BLAp groups.

Key words : Titanium, Bone like apatite, Simulated body fluid, Bovine serum albumin, Coprecipitation

I. INTRODUCTION

타이타늄 임플란트의 재료에서 생체활성을 증가시키기 위

하여 타이타늄 임플란트 표면에 골과 치아의 주성분인 수산화 인회석(hydroxyapatite; HAp)를 코팅하는 방법이 사용되고 있다(Moradian-Oldak 등 2000; Holmes과 Hagler 1987). 그러나 타이타늄 표면에 HAp를 코팅하기 위하여 플라즈마 용사법과 같이 고온 처리가 이루어지면 임플란트가 골에 이식된 후 코팅된 박막이 기저금속으로부터 박리되는 단점이 알려져 있다(Hayash 등 1993). 또한 처리 환경이 생리환경과는 크게 차이가 있기 때문에 골성장 인자와 같은 생물학적 인자들을

* Correspondence: 송호준 (ORCID ID: 0000-0002-0489-6364)
(61186) 광주광역시 북구 용봉로 77(용봉동) 전남대학교 치의학전문대학원 치과재료학교실
Tel: +82-62-530-4872, Fax: +82-62-530-0470
E-mail: songhj@jnu.ac.kr

Received: May, 23, 2016; Revised: Jun, 24, 2016; Accepted: Jun, 24, 2016

* 본 연구는 한국연구재단 일반연구지원사업(No. 2013-2173)의 지원으로 수행되었음.

함유시키는 것이 어렵다(de Groot 등 1987; Freeman 1992).

따라서 생리환경과 유사한 온도와 pH를 갖는 생체유사용액(simulated body fluid; SBF)내에 재료들을 침적함으로써 골유사형 미네랄(bone-like apatite; BLAp)을 코팅하는 공침법(coprecipitation)이 개발되었다(Luong 등 2006; Liu 등 2001). 이 방법은 BLAp가 타이타늄 표면에 형성되는 과정에서 생물학적 인자들을 아파타이트에 함유시킬 수 있으므로 이식되는 부위에서 골의 생성을 직접적으로 유도할 수 있으며, 또한 생체 내에서 생분해되는 흡수성이기 때문에 박리에 의한 위험성을 줄일 수 있다(Leeuwenburgh 등 2001). 또한 성장인자들이 생리 환경에서 기질에 코팅되므로 안전하게 생물학적 특성을 유지시킬 수 있는 장점이 있다.

또한 성장인자들이 표면에 단순 흡착(adsorption)되면 생체 내에서 빠르게 용출되어 버리지만 공침법을 이용하면 성장인자들이 BLAp의 결정격자에 3차원적으로 화학적 결합하여 용출속도를 늦출 수 있다. BLAp으로부터 성장인자가 용출되는 시간은 in vivo와 in vitro에서 BLAp의 용해율과 성장인자와 BLAp 사이의 화학적 결합정도에 따르게 된다(Luong 등 2006; Yu 등 2009; Agrawal 1995. Combes와 Rey 등 2002). BLAp는 결정성이 높을수록 생체 내에서 그 용해도가 낮아지기 때문에 코팅되는 BLAp의 결정성을 조절한다면 성장인자의 용출 속도도 조절할 수 있을 것이다.

소혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)은 공침 연구에서 모델 단백질로 사용되어왔으며, 이 단백질은 BLAp 형성을 억제하고 그 결정성을 감소시키는 것으로 보고되었다(Xie 등 2001, Dorozhkin 등 2003; Feng 등 2002; Kandori 등 2007; Wu 등 2007). 그러나 Wen등은 BSA 공침이 BLAp의 형태, 조성, 결정성을 유의하게 변화시켰고 공침된 BLAp은 BSA를 포함하지 않은 BLAp와 비교하여 더 뚜렷한 HAp 결정구조를 갖는다고 보고하였다(Wen 등 1999). SBF 용액을 이용하여 고분자 스펙폴드로 사용되고 있는 PLGA에 코팅할 때 SBF 용액을 제조하는 과정에서 BSA의 혼합 방법을 다르게 하면 코팅된 BLAp의 결정구조에 변화가 있다는 것을 보고하였다(Song 등 2012).

본 연구에서는 SBF와 BSA를 혼합한 용액을 이용하여 공침법으로 타이타늄 금속 상에 BSA가 함유된 BLAp를 코팅하였다. SBF를 제조하는 과정에서 BSA를 혼합하는 방법에 따라

BLAp의 표면 형상과 결정성의 변화가 관찰되었으며, 각 시편들을 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 침적하여 무기물 이온들의 용출 특성을 규명하였다.

II. MATERIALS AND METHODS

1. 타이타늄 금속의 전처리

순수한 타이타늄 금속(CP-Ti; ASTM Grade 2) 봉을 직경 10 mm, 두께 1 mm의 디스크 형태로 절단하였다. SiC 연마지를 사용하여 시편 표면을 #240부터 #2000까지 순차적으로 연마한 후, 에탄올과 증류수로 각각 5분간 초음파 세척하였다. 이 시편들을 다시 에탄올로 세척한 후 3차 증류수를 사용하여 최종적으로 세척하고 건조시켰다.

연마된 타이타늄 디스크 시편을 0.02M β -glycerophosphoric acid disodium salt pentahydrate (β -GP)와 0.2M calcium acetate monohydrate(CA)가 혼합된 전해질 내에서 양극산화(anodic oxidation) 처리하였다. 양극에 타이타늄 시편을 장착하고 음극에는 백금 전극을 사용하였으며, 타이타늄 시편에 20mA의 전류가 일정하게 흐르도록 설정하여 90초 동안 양극산화 처리를 하여 다공성 타이타늄 산화막을 형성시켰다.

양극산화 처리된 시편들은 NaOH를 이용하여 pH 11로 적정한 1 L의 알카리 수용액에 침적시킨 다음 고온고압 열수처리 장비를 이용하여 180°C에서 6시간 동안 열수처리(hydrothermal treatment)를 수행하였다. 열수처리된 시편들은 증류수로 세척한 후 건조시켰다.

2. SBF 용액 제조 및 골유사아파타이트 코팅

BLAp 코팅은 SBF에 전처리된 시편들을 침적시키는 방법을 이용하여 수행하였다. SBF는 코팅 속도를 높이기 위하여 표준 SBF 용액에 비하여 칼슘과 인 이온의 농도를 2배로 높인 개조된 생체유사용액(modified-SBF; mSBF; 141 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 0.5 mM MgSO₄, 1.0 mM MgCl₂, 4.2 mM NaHCO₃, 5.0 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2.0 mM KH₂PO₄)를 이용하였다(Song 등 2012). mSBF의 경우 시편 침적과정에서 쉽게

침전물이 생성되기 때문에 pH를 6.8로 낮추어 적정하였다.

mSBF를 이용한 침적 실험은 제조된 시편들을 12 well plate에 각각 넣은 후 mSBF를 13 mL씩 채워서 37°C의 전기로에 보관하였다. mSBF 내의 칼슘과 인 이온들은 시편 표면에 아파타이트 형성을 위하여 소모가 되기 때문에 mSBF를 2일 후에 새 용액으로 교환하였으며, 총 침적시간은 4일 동안 수행하였다.

본 연구에서는 유기물인 BSA가 공침된 BLAp 박막을 코팅하기 위하여 mSBF에 BSA를 첨가하였다. 이 때 BSA를 mSBF에 희석하는 방법에 따라 코팅되는 BLAp 박막의 특성을 규명하기 위하여 다음과 같이 다른 과정을 거쳐 각각 500 mL의 mSBF를 제조하였다.

- o. mSBF : BSA 없이 제조된 mSBF 용액.
- o. Ca-mSBF : 250 mL의 증류수에 200 mg의 BSA와 0.736 g의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 먼저 희석하여 37°C 항온챔버에 하루 동안 보관한 후에 최종적으로 SBF를 만들 때 CaCl_2 대신 BSA가 미리 함께 혼합된 CaCl_2 를 사용하여 제조한 mSBF 용액.
- o. P-mSBF : 250 mL의 200 mg의 BSA와 0.272g의 KH_2PO_4 를 먼저 희석하여 37°C 항온챔버에 하루 동안 보관한 후에 최종적으로 SBF를 만들 때 KH_2PO_4 대신 BSA가 미리 함께 혼합된 KH_2PO_4 를 사용하여 제조한 SBF 용액.

이와 같이 제조된 mSBF, Ca-mSBF, P-mSBF에 타이타늄 시편을 침적하여 코팅한 시편군을 각각 S-BLAp, Ca-BLAp, P-BLAp라고 명명하였다.

3. 표면 특성 분석

제조된 각 실험군의 표면형상은 Au-Pd로 코팅하여 주사전자현미경(field-emission scanning electron microscopy; FE-SEM, Hitachi S-4700, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 시편의 단면 분석을 위하여 시편을 에폭시 레진에 포매한 다음 정밀절단기(Buehler, US/ISOMET 1000)를 이용하여 단면을 절단하고 거울면 연마를 수행하여 FE-SEM을 이용하여 관찰하였다.

BLAp의 결정구조는 X-선 회절분석기(X-ray diffractometer; XRD; PANalytical, X'Pert PRO, Netherlands)를 이용하여 분

석하였다. X-선은 Cu-K α 선(30 mA, 40kV)을 사용하였으며, 10-90° 범위에서 0.067°/s의 속도로 측정하였다. BLAp 내에 BSA의 존재 유무와 화학적 특성은 푸리에변환 적외선분광분석기(Fourier transformation-infrared spectrophotometer; FT-IR, PerkinElmer, Spectrum 400, UK)의 ATR (attenuated total reflectance) 약세사리를 이용하여 측정하였다.

4. Ca과 P의 용출 특성

본 연구를 통하여 제조한 시편들의 용해 특성을 평가는 다음과 같은 과정을 통하여 수행하였다. 먼저 각 시편들의 BSA 용출 특성을 평가하기 위하여 2 mL의 PBS(phosphate buffered solution)에 각 시편들을 총 157시간 동안 침적하였다. 무기물 이온들이 침적 초기에 빠르게 용출되는 특성이 있기 때문에 침적 용액을 초기에는 매 2시간마다 그리고 나중에는 5, 12, 24, 48, 72 시간동안 각각 침적후 교환하였으며, 각각의 시간에 침적했던 용액들을 보관하였다. 이렇게 얻어진 용액을 유도결합플라즈마 원자방출분광기 (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ICP-AES, Perkin Elmer, Optima 4300 DV)를 이용하여 칼슘과 인 이온의 농도를 분석한 후 용출된 총량을 계산하였다. 용출실험 후 각 시편들은 다시 SEM과 FT-IR을 통하여 표면 미세형상과 BSA의 존재 유무를 확인하였다.

III. RESULTS AND DISCUSSION

1. 제조된 시편의 표면 및 단면 형상 분석

Fig. 1은 mSBF, Ca-mSBF, P-mSBF 용액을 이용하여 코팅한 S-BLAp, Ca-BLAp, P-BLAp 군들의 표면 형상을 나타낸 것이다. 저배율의 SEM 이미지들(a, b, c)은 약 10 μm 의 직경을 갖는 BLAp cluster 들이 코팅되어 있는 모습을 보여주고 있으며, 시편 모두 유사한 형상을 보여주고 있다. 그러나 고배율로 확대된 이미지(d, e, f)를 보면 시편에 따라 상당한 차이가 있었다. S-mSBF 시편의 경우 BLAp 결정입자들의 경계면이 각이 지거나 뾰족한 형태를 보여주고 있는 반면 BSA가 함유

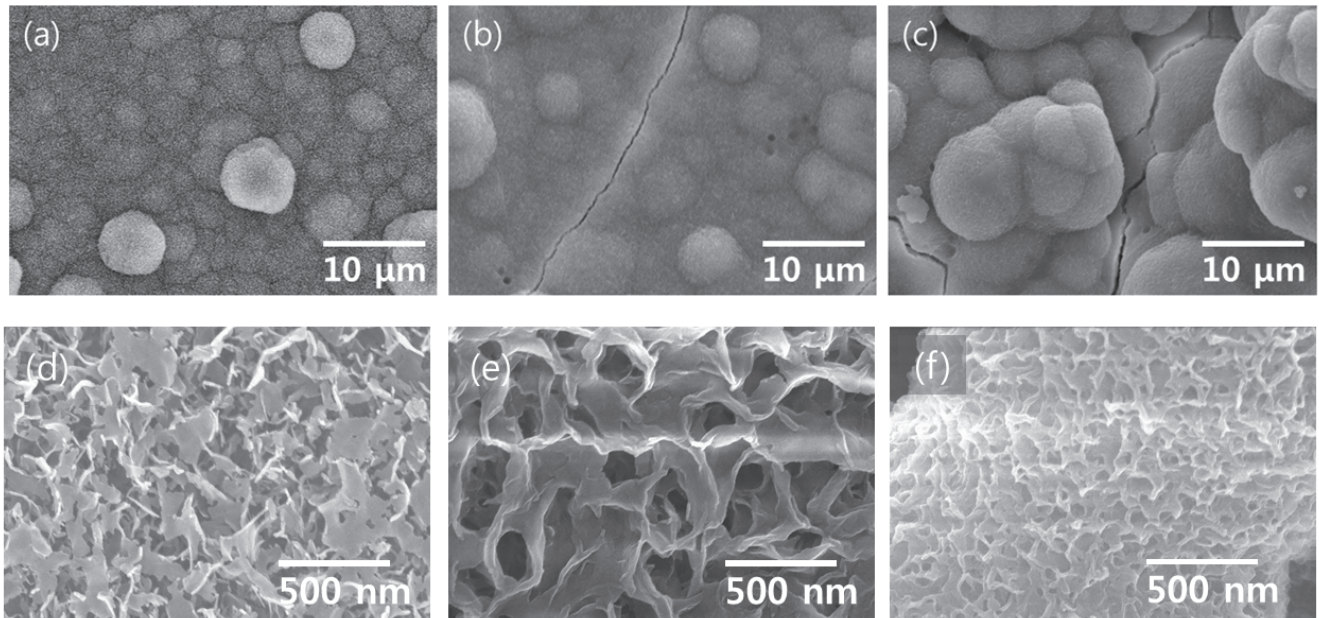


Figure 1. SEM images of the BLAp layer coated using coprecipitation method for (a) S-BLAp, (b) Ca-BLAp, and (c) P-BLAp groups. (d), (e) and (f) are magnified SEM images for (a), (b), and (c), respectively.

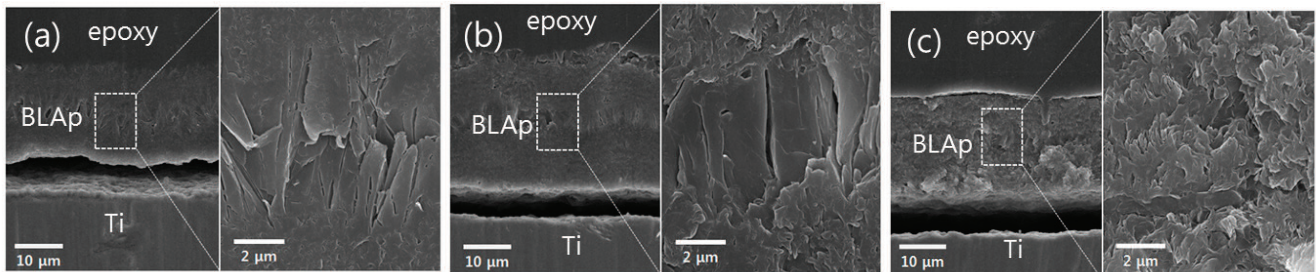


Figure 2. Cross-sectional SEM images of (a) S-BLAp, (b) Ca-BLAp, and (c) P-BLAp groups.

된 Ca-BLAp와 P-BLAp 균들의 경우 부드러운 곡면 형태를 갖는다. 또한 입자의 크기와 기공의 형태에서도 각 시편들에서 차이를 보여주고 있다. 이것은 SBF 제조 과정과 BSA의 함유에 따라 BLAp의 결정성이 서로 달라질 수 있다는 것을 말해주고 있다.

Fig. 2의 단면사진은 S-BLAp, Ca-BLAp 및 P-BLAp 균들의 BLAp 막의 두께가 각각 약 20, 35, 25 μm 로 측정되었다. 이 결과는 SBF 용액에 첨가된 BSA가 BLAp의 성장을 방해하지 않는 것을 보여주고 있으며, Ca-BLAp의 시편의 경우 오히려 더 두꺼운 막이 형성되었다. 특히 확대된 이미지를 보면

S-BLAp와 Ca-BLAp 시편의 경우 중심부분에 정렬된 결정질 형태의 상이 관찰되고 있으나, P-BLAp 시편의 경우 무정형으로 성장된 결정형태를 보여주었다. 따라서 P-BLAp 균은 BLAp의 성장 기전이 다른 시편들과는 다르다는 것을 예측할 수 있다. 단면 사진에서 중심부에 나타난 층은 mSBF 교환에 의하여 형성된 것이다.

2. 제조된 시편의 결정구조 분석

Fig. 3은 각 시편들의 XRD 회절 패턴을 나타낸 것이다.

각 시편 모두에서 Ti 피크와 아나타제(anatase) TiO_2 및 HAp 피크들이 함께 관찰되고 있다. Ti과 TiO_2 피크들은 각각 기저 금속과 MAO 처리에 의하여 형성된 다공성 산화막에 기인한 피크들이며, HAp 피크들은 BLAp 박막에 의한 피크들로 해석된다. BLAp 박막들은 기본적으로 HAp 결정구조를 가지고 있지만, Fig.3에 나타난 바와 같이 HAp 피크들의 세기는 각 시편별로 달랐으며, 특히 (002) 결정면에 해당하는 XRD 피크의 세기가 큰 차이를 보여주었다. (002) 피크는 Ca-BLAp 군의 경우 가장 크게 나타났으며, P-BLAp 시편의 경우 상대적으로 아주 낮은 값을 보여주었다. 이것은 Ca-BLAp 군의 경우 BSA의 공침에 의하여 HAp 결정들이 c-축 방향으로 더 정렬된 형태를 갖지만, P-BLAp 시편의 경우 더 낮은 c-방향으로의 정렬을 보여주며, 또한 결정성이 더 낮다는 것을 말해준다. 이러한 결정성의 차이가 Fig. 2의 단면 형상의 차이를 나타낸 것으로 보인다.

3. 제조된 시편의 화학적 특성 분석

Fig. 4는 각 시편들의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다. BSA가 공침되지 않은 S-BLAp 시편의 경우 HAp에 기인한 PO_4^{3-} 피크들이 관찰되고 있다. 또한 CO_3^{2-} 피크들이 관찰되는 것으로 보아 코팅된 BLAp는 carbonate-apatite인 것을 알 수 있다. BSA가 공침된 Ca-BLAp와 P-BLAp 시편의 경우 BSA가 공침되지 않은 시편에 비하여 명확하게 BSA에 기인한 amide peak가 관찰되었다.

4. 제조된 시편의 용출 특성 분석

Fig. 5는 각 시편들을 PBS 용액에 157 시간 동안 침적했을 때 용출된 총 칼슘과 인의 농도를 나타낸 것이다. S-BLAp, Ca-BLAp, P-BLAp 시편들에 대하여 칼슘 이온의 경우 각각 55.4, 37.6, 49.5 ppm으로 측정되었으며, P 이온의 경우 각각 111, 48, 103 ppm으로 측정되었다. 용출된 양으로부터 Ca/P 비를 계산하여 보면 각각 0.38, 0.60, 0.37 으로 계산되었는데, 이 값은 화학양론비를 만족하는 HAp의 Ca/P 비가 1.67인 것을 고려하여 볼 때 아주 낮은 값이다. 따라서 Ca에 비하여 P 이온이 상대적으로 더 많은 양이 용출된 것으로 확인되었다.

용출된 총 칼슘과 인의 양은 BSA를 함유하고 있지 않은

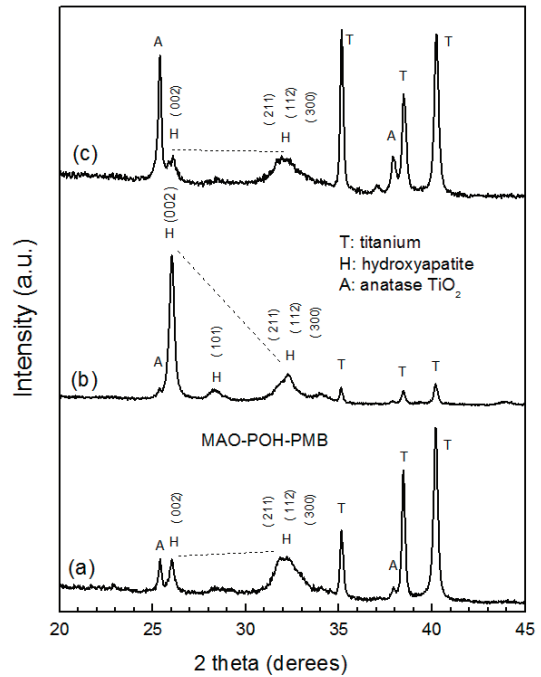


Figure 3. X-ray diffraction patterns for (a) S-BLAp, (b) Ca-BLAp, and (c) P-BLAp groups.

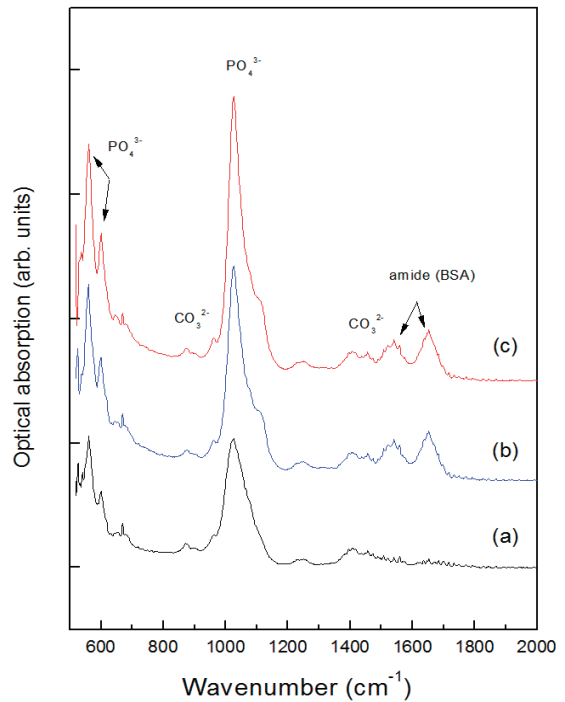


Figure 4. FT-IR spectra of (a) S-BLAp, (b) Ca-BLAp, and (c) P-BLAp groups.

S-BLAp 시편의 경우 가장 높았고, Ca-BLAp 시편이 가장 낮은 값을 보여주었다. 이 결과는 BSA가 공침된 BLAp 박막이 BSA를 함유하고 있지 않은 박막에 비하여 무기물의 용해가 더 천천히 일어난다는 것을 말해준다. 이것은 공침법으로 제조된 BLAp 박막은 아파타이트와 BSA 사이의 무기-유기물의 결합으로 무기물의 용해가 서서히 이루어지기 때문으로 해석된다(Luong 등 2006, Song 등 2012). 특히 Ca-BLAp의 무기물 용출 양이 가장 낮은 것은 XRD 결과에서 보았듯이 결정들이 c-축 방향으로 잘 정렬되어 있어서 용출이 쉽게 이루어지지 않은 것으로 해석된다.

Fig. 6은 용출 실험 후 측정된 FT-IR 스펙트럼이다. Ca-BLAp와 P-BLAp 시편의 경우 용출실험 후에도 여전히 amide 피크들이 관찰되고 있어서, BSA가 빠른 시간 내에 모두 용출되는 것이 아니라 결정의 용해와 함께 서서히 이루어지는 것을 알 수 있다. 용출 후 P-O 피크들의 세기에 큰 차이를 보이는 것은 시편들의 결정성과 관련이 있는 것으로 해석되며, 가장 높은 결정성을 보여준 Ca-BLAp 시편이 가장 높은 피크의 세기를 보여주었다.

이상의 결과를 통하여, 공침법을 이용하여 BSA가 함유된 BLAp 박막을 타이타늄 상에 코팅할 때 BSA를 mSBF 용액에 희석시키는 방법에 따라 결정성과 용해도에 차이가 있는 것을 알 수 있었다. BSA를 CaCl₂ 용액과 먼저 희석한 Ca-mSBF에 침적하여 제조한 Ca-BLAp 박막이 BSA를 KH₂PO₄ 용액과 먼저 희석한 P-mSBF에 침적하여 제조한 P-BLAp 박막이 결정성이 더 높으며, c-축 방향으로 정렬된 결정구조를 보여주었다. 이것은 mSBF 내에서 아파타이트가 형성되는 과정에서 BSA가 초기 결합된 이온에 의하여 결정성장 방향이 영향을 받는 것으로 해석된다.

HAp 구조가 c-축 방향으로의 정렬되는 정도는 HAp의 용해도와 관련이 있는 것으로 보고되고 있는데, c-축 방향으로 정렬된 HAp 결정일수록 HAp의 용해도 낮다 (Baig 등 1999; Bayraktar와 Tas 1999). 따라서 XRD 측정에서 c-축 방향으로 정렬된 형태를 보여준 Ca-BLAp 군의 용해도가 가장 낮은 가능성이 높을 것으로 예측되었으며, Fig. 5에서 보여준 바와 같이 Ca와 P의 용출 실험에서 확인되었다. 또한 총 157시간 동안의 용출실험 후에도 여전히 BSA가 FT-IR 스펙트럼에서 관찰되는 것을 볼 때 BSA가 단순히 표면에 흡착되어 있는

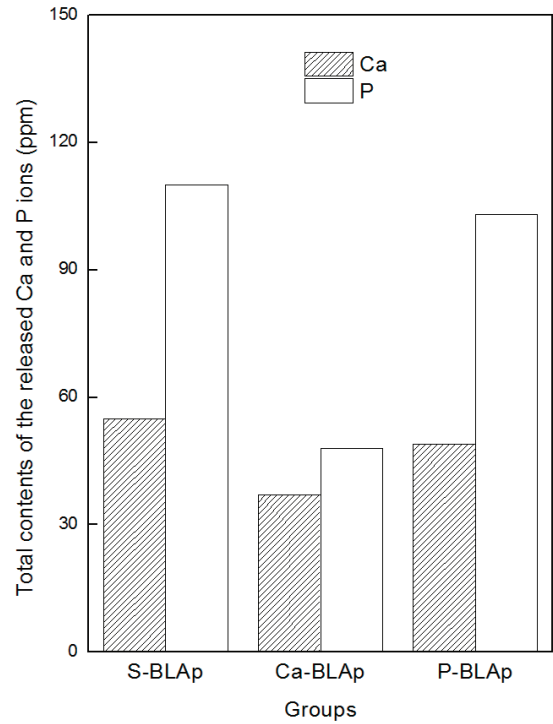


Figure 5. Total contents of the released Ca and P ions in PBS.

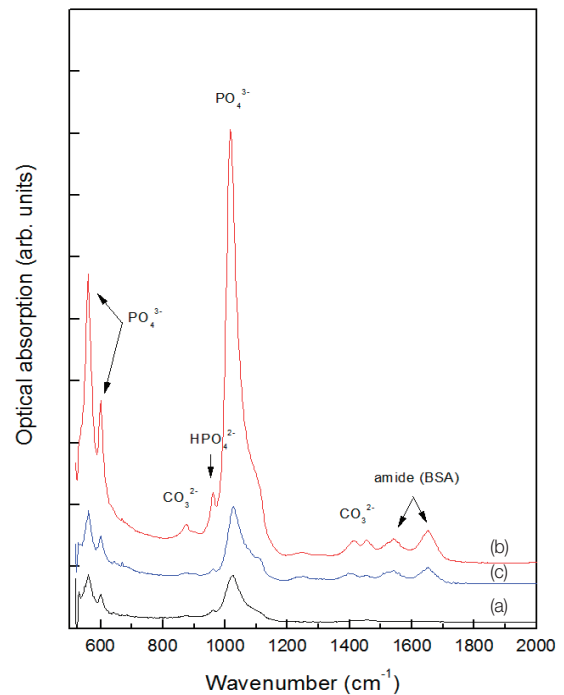


Figure 6. FT-IR spectra for (a) S-BLAp, (b) Ca-BLAp, and (c) P-BLAp groups after soaking in PBS.

것이 아니라 BLAp 전체에 존재하며, 아파타이트와 화학적으로 결합되어 있는 것을 알 수 있었다.

따라서 향후 다양한 골성장인자들을 함유한 BLAp를 코팅하고자 할 때 공침법은 유용한 방법이 될 수 있으며, 골성장인자의 희석 방법에 따라 아파타이트의 결정성과 골성장인자의 용출속도를 제어할 수 있는 방법으로도 사용이 가능할 것으로 판단된다.

IV. CONCLUSION

본 연구는 타이타늄 금속을 BSA를 함께 함유시킨 mSBF에 침적하는 공침법을 이용하여 유기물이 함유된 BLAp 박막을 코팅하였다. 이 때 mSBF 용액 제조시 BSA를 혼합하는 방법을 다르게 하여 Ca-BLAp와 P-BLAp 실험군을 제조하고 대조군으로는 BSA를 함유하고 있지 않은 S-BLAp 군을 제조하였다. 각 제조된 시편들의 표면 형상, 결정구조, 화학적 특성 및 Ca와 P 이온의 용출 정도를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각 시편들의 표면 형상을 관찰한 결과 BSA를 함유한 BLAp 결정들의 경계면들이 S-BLAp에 비하여 더 부드러운 곡면 형태를 보여주었다. 단면형상은 S-BLAp와 Ca-BLAp 시편의 경우 정렬된 결정들이 관찰된 반면, P-BLAp 시편의 경우 무정형 형태로 결정이 성장하였다.
2. 결정구조를 분석한 결과, 모든 BLAp 박막은 HAp 구조를 가졌으며, Ca-BLAp 시편의 경우 HAp 결정들이 c-축 방향으로 정렬된 형태를 보여주었다. P-BLAp 시편은 BSA가 함유되었지만 Ca-BLAp 시편에 비하여 결정성이 더 낮았다. FT-IR 스펙트럼은 BLAp가 함유된 시편들에서 BSA에 기인한 amide 피크가 확인되었다.
3. Ca와 P 이온의 용출 특성을 평가한 결과, S-BLAp 시편에서 가장 높았으며, Ca-BLAp 시편이 가장 낮은 용출 값을 보였다. 모든 시편에서 용출된 Ca/P 비 값이 HAp의 Ca/P 비 값보다 훨씬 더 낮았다. 용출 실험 후 FT-IR 측정 결과 BSA가 공침된 시편에서는 amide 피크가 관찰되어 BSA가 여전히 BLAp 내에 존재하는 것을 알 수 있었다.

VI. REFERENCES

- Agrawal CM, Best J, Heckman JD, Boyan BD (1995). Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. *Biomaterials* 16:1255-1260.
- Baig AA, Fox JL, Young RA, Wang Z, Hsu J, Higuchi WI, Chhetry A, Zhuang H, Otsuka M (1999). Relationships Among Carbonated Apatite Solubility, Crystallite Size, and Microstrain Parameters. *Calcif Tissue Int* 64:437-449.
- Bayraktar D, Tas AC (1999). Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-containing Synthetic Body Fluids. *J Eur Ceramic Society* 19:2573-2579.
- Combes C, Rey C (2002). Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. *Biomaterials* 23:2817-2823.
- Dorozhkin SV, Dorozhkina EI (2003). The influence of bovine serum albumin on the crystallization of calcium phosphates from a revised simulated body fluid. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 215:191-199.
- Feng B, Chen J, Zhang X (2002). Interaction of calcium and phosphate in apatite coating on titanium with serum albumin. *Biomaterials* 23:2499-2507.
- Freeman MAR (1992). Hydroxyapatite coating of prostheses. *J Bone joint surg* 74B:933-934.
- de Groot K, Geesink R, Klein CP, Seredian P (1987). Plasma-sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 21:1375-1381.
- Hayashi K, Inadome T, Mashima T, Sugioka Y (1993). Comparison of bone-implant interface shear strength of solid hydroxyapatite and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 27:557-563.
- Holmes RE, Hagler HK (1987). Porous hydroxylapatite as a bone grafts substitute in mandibular contour augmentation: a histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 45:421-424.

- Kandori K, Tsuyama S, Tanaka H, Ishikawa T (2007). Protein adsorption characteristics of calcium hydroxyapatites modified with pyrophosphoric acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58: 98-104.
- Leeuwenburgh S, Layrolle P, Barrere F, Schoonman J, van Blitterswijk CA, de Groot K (2001). Osteoclastic Resorption of Biomimetic Calcium Phosphate Coatings In Vitro. *J Biomed Mater Res* 56:208-215.
- Liu Y, Layrolle P, de Bruijn J, van Blitterswijk C, de Groot K (2001). Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy. *J Biomed Mater Res* 57:327-335.
- Luong LN, Hong SI, Patel RJ, Outslay ME, Kohn DH (2006). Spatial control of protein within biomimetically nucleated mineral. *Biomaterials* 27: 1175-1186.
- Moradian-oldak J, Wen HB, Schneider GB, Stanford CM. Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants. *Periodontology* 2000 41:157-176.
- Rhee SH, Lee JD, Tanaka J (2000). Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen. *J Am Ceram Soc* 83:2890-2892.
- Song HJ, Park YJ, Moon WJ, Luong LN, Kohn DH (2012). Effects of protein-simulated body fluid mixing methods on characteristics of bone-like mineral. *Mater Sci Eng C* 32:2501-2507.
- Wen HB, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K (1999). Incorporation of bovine serum albumin in calcium phosphate coating on titanium. *J Biomed Mater Res* 46:245-252.
- Wu Y, Yang B, Lu J, Gu Z, Zhang X (2007). The Influence of Bovine Serum Albumin on the Biomimetic Calcium Phosphate Coating of Bioactivated Titanium. *Key Engineering Materials* 330-332:581-584.
- Xie J, Riley C, Chittur K (2001). Effect of albumin on brushite transformation to hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 57:357-365.
- Yu X, Qu H, Knecht DA, Wei M (2009). Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *J Mater Sci Mater Med* 20:287-294.