

2012년 8월

博士學位論文

플라즈마 표면 개질한
polycaprolactone scaffold의
골 융합 증진효과

조선대학교 대학원

치의학과

임 성 수

플라즈마 표면 개질한
polycaprolactone scaffold의
골 융합 증진효과

Plasma surface modification of polycaprolactone scaffolds
for improving the osseointegration

2012年 8月 24日

조선대학교 대학원

치 의 학 과

임 성 수

플라즈마 표면 개질한
polycaprolactone scaffold의
골 융합 증진효과

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012年 4月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

임 성 수

임성수의 박사학위 논문을 인준함

위원장 서울대학교 교수 임 범 순 印

위 원 연세대학교 교수 이 용 근 印

위 원 조선대학교 교수 민 정 범 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2012年 6月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	vi
제 1장 서 론	1
제 2장 이론적 배경	3
제 1절 생분해성 고분자	3
제 2절 의료용 생분해성 고분자 ...	7
제 3절 생분해성 고분자 생체적합성	10
제 4절 다공성 지지체	11
제 5절 생체재료의 플라즈마 표면처리	13
제 3장 실험재료 및 방법	15
제 1절 실험재료	15
제 2절 플라즈마 표면처리 ...	17
제 3절 표면분석 ...	19
제 4절 조골모세포 배양 ...	20
제 5절 생체적합성 평가 ...	21
제 4장 실험결과 및 고찰	22
제 1절 표면분석 ...	26
제 2절 조골모세포 증식 및 분화 ...	29

제 5장 결론	34
참 고 문 헌	35

LIST OF TABLE

Table 1. Biodegradable polymers.....	9
--------------------------------------	---

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Ring opening polymerization of polycaprolactone6
- Fig. 2. 3D-PCL structure and structure parameters16
- Fig. 3. Schematic diagram for plasma device18
- Fig. 4. Photo images of the various treated 3D-PCL.....24
- Fig. 5. FE-SEM images of various treated 3D-PCL
(a-1, 2) untreated 3D-PCL surface, (a-3) cross-section
view
(b-1, 2) COOH coated 3D-PCL (50 W) cross-section view
(c-1) untreated 3D-PCL surface, (c-2) 50 W COOH/PCL...25
- Fig. 6. XPS spectra of PCL and -COOH coated PCL surface (50 W)
(a), C1s narrow spectrum (b), and O1s narrow spectrum
(c) 26
- Fig. 7. The -COOH concentration of the surface and thickness
of polyacrylic acid films according to the RF plasma
powers 27
- Fig. 8. Contact angle values of water droplets measured on the
different modified Ti surfaces. (a) untreated 3D-PCL,
(b) plasma treated 3D-PCL..... 28

Fig. 9. Cell proliferation of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified 3D-PCL surface for 1 day and 4 days	31
Fig. 10. ALP activity of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified 3D-PCL surface for 4 days and 7 days	32
Fig. 11. FE-SEM photographs of MC3T3-E1 cell on the various 3D-PCL surface for 1 day (a) untreated PCL, (b) COOH/PCL (30 W), (c) COOH/PCL (50 W) and COOH/PCL (70 W)	33

ABSTRACT

Plasma surface modification of polycaprolactone scaffolds for
improving the osseointegration

Sung-Soo Lim, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Three-dimensional polycaprolactone (3D-PCL) has been widely adopted for biomaterials and biomedical applications due to its slow degradability and good biocompatibility, as well as its good mechanical and thermoplastic characteristics. Surface properties of scaffolds such as hydrophilicity and the presence of functional groups on the surface of scaffolds play a key role in cell adhesion and proliferation. However, PCL has hydrophobic surface and lacks of functional groups, therefore, it is not a good condition on substrate for cell adhesion. PCL surface modification was performed to increase hydrophilic by introducing functional groups. The fabrication of surface containing carboxyl acid groups by plasma has paid considerable attention due to enhancing osteoblast-like cell (MC3T3-E1) attachment and proliferation. Plasma polymerization is a convenient and versatile technique for the fabrication of thin polymer films ranging in thickness from a few nanometers to a few micrometers.

In this study, 3D-PCL surface was modified using a low temperature RF

discharge plasma with carboxyl group containing monomer such as acrylic acid (AA) and evaluated *in vitro* its cellular response. The change in wettability and surface morphology of 3D-PCL surface by plasma treatment were determined according to contact angle and field emission scanning electron microscopy. The chemical bonding state and chemical structure of acrylic acid plasma polymerized 3D-PCL surfaces were examined by X-ray photoelectron spectroscopy. The untreated surfaces and AA plasma treated with 3D-PCL surfaces were also examined for their *in vitro* pre-osteoblast (MC3T3-E1) cells proliferation and differentiation using MTT assay and ALP test. The results of surface characterization showed that thin films of poly acrylic acid was deposited on 3D-PCL surface after AA plasma treating for 15 min under a power of 30, 50, and 70W. These results suggest that carboxyl group containing polymeric thin films on the 3D-PCL surface has an effect on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells and to be used potentially in osteo-conductive bone implants.

제 1 장 서 론

생체조직공학이란 손상된 생체조직의 복원을 위하여 생체재료를 실제의 장기가 갖는 조직과 유사한 구조와 기능을 가지도록 3차원 다공성 지지체로 제조하고 지지체내에 골조직 세포를 체외배양 함으로써 인공적으로 골세포와 조직이 형성되도록 유도하여 인공조직을 형성하고 이를 체내로 이식했을 때 새로운 실질 조직 형성이 신속하게 재생될 수 있도록 하는 일련의 기법을 의미한다¹⁾. 일반적으로 생체재료의에 대한 정의에 대해서는 많은 논란이 있어 왔으나 1989년 3월 영국에서 열린 유럽생체재료 학회에서 생체재료에 대한 정의에 관하여 회의를 통해 “생체재료란 의약품을 제외한 합성, 천연 또는 그들의 복합재료로서, 일정기간 인체의 조직, 기관, 그 기능의 일부 또는 전부를 대체하거나 조직재생을 촉진하는 재료” 라고 정의하였다. 이처럼 인체 기능의 일부를 대체하거나, 수복하는 것을 목적으로 금속, 고분자 및 세라믹스, 천연재료 등이 이용되고 있다. 이런 생체재료는 체내로 이식 후 발열, 염증, 항원성, 발암성 반응이 일어나지 않는 생체안정성이 높아야하며, 또한 이식체가 기계적, 형태, 생화학적으로 주위조직과 융화를 이루는 생체 적합성이 우수해야 한다. 체내에 이식된 생체재료는 해부학적 크기와 형태가 수복되어야할 부위와 정확하게 일치하여야 하며, 기계적 성질도 본래 조직과 동일하여 물리적인 부하에 의해 유발되는 기계적 스트레스를 최대한 감소시킬 수 있어야 한다. 따라서 현재 많은 연구자들에 의하여 생체적합도가 높고, 가공이 용이한 생체재료인 합성고분자 및 천연고분자를 이용한 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 생물의 신체를 구성하는 주요 고분자 물질인 단백질에는 콜라겐, 케라틴, 피브린, 키틴, 히알루론산, 펙틴, 알부민 등이 있으며 이들은 천연 고분자에 속한다. 이런 천연단백질은 생체적합성이 우수하고 세포독성을 유발시키지 않으나 천연고분자 자체만으로는 기계적 강도가 약하고 가공이 쉽지 않은 단점이 있다. 이에 비해 합성고분자 중 생분해성 고분자는 강도조절이 가능해서 동시에 함께 가공이 용이하여 합성조건에 따라 생분해속도 조절이 가능하므로, 재료를 유용하게 활용할 수 있다²⁾.

본 연구에서는 장기간의 임상실험에서도 생체 무독성으로 생체적합성이 우

수한 재료로 잘 알려진 생분해성 고분자인 PCL(polycaprolactone)을 이용하여 연구를 수행하였다. PCL은 생분해가 장기간 동안 진행되기 때문에 치료에 상당한 기간이 요구되는 상처 봉합용 스테플러 및 약물방출 소재로 유용하게 사용되며, 여타 소재와의 블렌딩을 통해 다양하게 활용할 수 있다. PCL은 결정성이 낮아 강도가 약하고 유연성이 매우 좋아, 3차원 다공성 지지체로 가공하기에 용이하고 생분해 기간이 길어서 골조직과 같이 자기조직화에 상당한 시간이 요구되는 경우에 손상된 부위에 대한 지지대로 활용을 하기에 적합하다³⁾.

그러나, 조직공학에 사용되는 합성 고분자들은 대부분 소수성을 가지며 세포와 상호작용할 수 있는 생물학적 반응기가 없기 때문에 세포와의 친화성 면에서 좋은 결과를 보여주지 못한다. 이러한 문제를 해결하기 위한 표면개질은 합성 고분자 지지체의 초기 세포부착, 증식 및 분화에 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 콜라겐 (collagen), 파이브로넥틴 (fibronectin) 등의 세포외 기질 단백질 등은 초기 세포 부착, 증식, 분화에 관련한 세포 신호전달과정을 매개하여 조직재생 효율을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁸⁾.

합성고분자 지지체에 카르복실기 (carboxylic acid group)나 아민기 (amine group)와 같은 전하를 띤 기능기를 도입하면 소수성을 가진 지지체의 표면에 친수성을 부가하여 세포친화성을 조절할 수 있다. 또한 이러한 기능기들은 가교제 (crosslinker)를 이용하여 단백질이나 펩타이드와 같은 기능성 분자를 쉽게 고정화시킬 수 있는 장점이 있다^{9, 10)}.

플라즈마 표면개질기술은 세포의 분화 및 부착을 증진시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술법으로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다¹¹⁻¹³⁾. 특히 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 재료표면에 존재하면서 생체활성물질 및 단백질과 공유결합에 의한 고정화에 매우 유용한 기술로 알려져 있다.

본 연구에서는 플라즈마 처리를 이용하여 상용의 3D-PCL 지지체표면의 친수성과 생체적합성을 향상하기 위하여 카르복실기가 함유된 고분자박막층을 형성하여 그 표면의 특성과 골아세포를 이용한 세포분화특성을 평가하고자 하였다.

제 2 장 이론적 배경

제 1 절. 생분해성 고분자

ASTM(American Society for Testing and Materials)에서 규정한 분해성 고분자와 생분해성 고분자에 관한 용어의 정의를 보면, 분해성 고분자는 ‘임의의 환경 조건하에서 화학구조가 현저하게 변화하고 표준적인 시험 방법에 의해서 물질의 변화가 측정되는 고분자’이며, 생분해성 고분자는 ‘자연계에 존재하는 미생물의 활동에 의해 분해되는 분해성 고분자’로 되어 있다. 이 정의에서 보면 생분해성에 대한 정의가 다소 모호할 수도 있으나 실제로 ASTM에서 제시하는 표준시험방법은 이산화탄소, 메탄가스의 발생량을 측정하여 생분해 정도를 측정하게 되어 있으므로 결국은 위의 전 과정을 반영하는 것으로 볼 수 있다. 또한 국제표준기구인 ISO(International Standard Organization)에서는 최종 생분해(ultimate biodegradation)를 미생물의 작용으로 유기물의 분해가 발생하고 최종적으로 이산화탄소, 물과 무기염/생체 물질을 생성하는 과정을 생분해로 규정하고 있다. ISO 472에 의한 분해성 고분자에 대한 정의는 분해성 플라스틱을 생분해성 고분자와 분해성 고분자로 분류하고 있다^{14, 15)}. 생분해성 고분자는 제조법에 따라 생분해성이 알려진 천연물을 이용한 천연 고분자계, 화학적 중합 등의 방법에 따라 고분자 수지로 합성한 화학합성계로 크게 구분할 수 있다.

1. 천연 고분자

곡물에서 추출되는 전분, 게나 새우의 껍질에서 얻을 수 있는 키틴, 셀룰로오스 등이 생분해성을 갖는 천연 고분자계라 할 수 있다. 이는 합성하거나 미생물에 의해 생산된 분해성 고분자들에 비해 가공성이 떨어지나, 가격이 저렴한 편으로 공급이 원활하고 인체독성을 유발시키지 않는다. 이들 천연고분자의 가공성을 향상시키기 위한 다양한 변성 기술이 연구되고 있다¹⁶⁾.

2. 합성 고분자

- 폴리카프로락톤(polycaprolactone)

본 연구에서 활용한 폴리카프로락톤(polycaprolactone)(PCL)은 (그림 1)과 같이 ϵ -caprolactone을 개환 중합반응시켜 만든 고분자로서, 생분해성이고 구조상 탄소수가 많이 있기 때문에 소수성이며 분해속도가 느려 인체 내에서 생분해되는 기간은 2년 이상이며, 미생물에 의해 분해되는 합성 고분자이다. 또한 비교적 가격이 저렴하며, 기계적 물성이 우수하며, 유연성이 매우 좋으며 융점이 60도로 상당히 낮은 편이다¹⁷⁾.

따라서 PCL sheet는 임상 현장에서 가열 성형이 가능하므로, 정형외과의 상처 고정대(brace)로 도입되었다. 임상실험을 장시간 한 결과 생체 내에서 독성을 유발시키지 않으며, 조직친화성이 매우 높은 소재로 확인이 되었으며, 장기간이 소요되는 상처 봉합용 스테플러 및 약물 방출소재로 유용하게 사용되고 있다. PCL은 여타 소재와 혼합되어 의료용 재료로서 활용도가 증가될 것으로 기대된다.

- 폴리글리콜산과 폴리락트산

폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)와 폴리락트산(poly(lactic acid, PLA)은 현재 범용적으로 널리 쓰이며 PGA 및 PLA는 poly(α -hydroxy acid)의 일종인 지방족 폴리에스터이다. 지방족 폴리에스터는 대체로 열 및 수분에 약하므로, 가수분해 될 수 있으며 단위구조가 간단할수록 기계적 물성이 높고, 극성이 (=산소/탄소의 비) 클수록 분해가 빠르다. PGA는 지방족 폴리에스터들 중에서 구조가 가장 간단하여 결정성 및 융점이 높으며, 기계적 강도도 제일 크다. 반면에 PGA는 극성이 (친수성) 커서 분해가 빠르므로 체내 강도 유지기간은 1개월이고, 체내 물질잔류기간은 3개월 미만이다. 1970년대 후반 흡수성 봉합사로 개발되어 체내 분해성 의료제품의 효시를 이루었다. PLA는 체내에 존재하는 L-젖산의 중합체로서 메틸치환기의 배열에 따라 L

형, D 형과 meso 형의 광학 이성질체가 있으며 L형과 D형이 고결정성 물질로서 meso 형에 비해 융점이 높고 물성이 우수하다. PLA는 PGA 보다 융점 및 강도는 떨어지고 친수성이 낮아 분해속도가 느리다. PLA는 분자량 및 결정성에 따라 체내 강도유지기간은 약 6개월이고 체내물질잔류 기간은 18-24개월이다. PLA는 적용기간이 긴 정형외과용 의료제품, 흡수성 봉합사, 약물 방출 조절성 재료 등으로 활용되고 있다^{18, 19)}.

- 기타 분해성 고분자

단백질의 구성단위인 아미노산으로 구성된 고분자는 훌륭한 생체재료로 사용될 수 있는 가능성이 크다. 특히 아미노산 측쇄의 다양한 반응성은 약물의 도입이나 물성을 변화시키는데 매우 유용하며, 그 분해물인 아미노산은 생체 내에서 안정하므로 낮은 독성이 거의 없다. 아미노산 고분자는 봉합사, 인조 피부 및 약물전달용 지지체로 사용되고 있으며, 특히 poly(L-lysine)과 poly(glutamic acid)에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 그러나 이 소재들은 용해도가 좋지 않고, 항원성도 보고되는 단점이 있다. 최근에 이와 같은 단점을 극복하기 위해 N-protected trans-4-hydroxy-L-proline등과 같이 측쇄 및 주쇄를 개질하는 유사 아미노산 고분자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{20, 21)}.

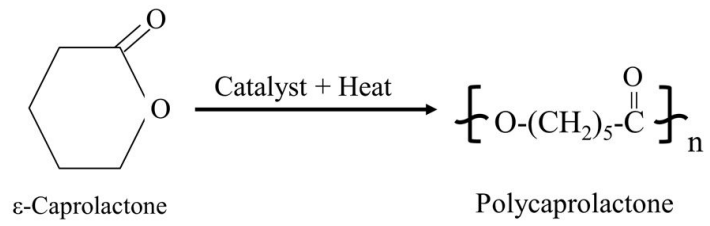


Fig. 1. Ring opening polymerization of polycaprolactone¹⁹⁾.

제 2절 의료용 생분해성 고분자

대부분의 합성고분자는 분해되지 않지만, 일부 지방족 폴리에스터 혹은 폴리카보네이트들은 가수분해에 의하여 서서히 분해된다. 이러한 생분해성 고분자의 특성을 이용한 의료제품들은 생체 내에서 일정한 기능을 다한 후 소멸되므로, 별도의 제거수술이 필요 없으므로 비분해성 고분자의 고질적 문제를 해결할 수 있다. 따라서 이러한 생분해성 고분자를 이용하여 상처 접합에 이용되는 흡수성 봉합사와 조직접착제, 골절된 뼈를 지지하기 위한 골 접합재, 약물전달을 위한 약물전달체 등이 개발되었고, 특히 최근에는 생분해성 고분자 지지체에 세포를 배양하여 인체의 조직과 장기를 재생하는 조직공학 연구가 활발히 전개되고 있다²²⁾.

의료용 생분해성 고분자는 인체 내에서 이물질 반응을 일으키지 않아야 하며, 분해산물이 인체에 해가 없어야 하고 또한 적절한 가공 특성 및 강도를 지녀야 한다. 천연고분자는 합성고분자에 비해 체내 분해성 재료로 적합한 것이 사실이나, 기계적 물성이 일정하지 않고 분해속도의 조절이 어려우므로, 합성고분자계에 대한 응용 개발이 활발하게 진행되고 있다. 표 1에 현재 의료용으로 실용화되고 있는 합성고분자들의 종류와 물성을 요약한 바와 같이 실제로는 소수의 소재들만이 실용화 되고 있다.

체내의 이식된 지방족 폴리에스터 계통의 분해성 합성 고분자는 체액에 의해 가수분해 되거나 혹은 esterase와 같은 효소에 의하여 분해된다. 고분자가 분해되어 분자량과 강도가 감소하며, 최종적으로 흡수된다. 분해 및 흡수 과정에 영향을 미치는 인자들로는 고분자의 화학 조성, 결정화도, 적용 부위 및 상처의 형태, 적용 부위의 pH 등이 있으나, 분해속도는 주로 고분자의 화학적 극성에 (즉 친수성) 따라 상당한 차이를 보인다.

본 연구와 같이 생분해성 고분자를 생체재료로 이용하여 체내에 이식했을 경우, 분해과정으로 인하여 분자량 감소 및 강도 저하를 보이며, 이후 생체 내에 존재하는 다양한 종류의 효소에 의하여 흡수가 진행된다. 따라서 생체 적합성과 적절한 가공 특성 및 강도는 중요한 고려사항이며, 사용되는 특성에 맞게 분해속도 조절을 위하여 다른 합성 고분자들과의 복합체 형태에 관

한 연구가 이루어지고 있다. 물론 기본적으로 합성고분자를 생체 내에서 사용하기 위해서는 생체적합성이 가장 큰 조건이며 경우에 따라서는 표면처리나 다른 물질 첨가 등을 통해 생체적합성이 향상시키는 방법이 있다²³⁾.

Table 1. Biodegradable polymers²²⁾.

Polymers	Structure	Melting point (°C)	Modulus (GPa)	Mass Degradation (m)	Strength retention (m)
Polyglycolide (PGA)	-O-CH ₂ -CO-	225	7.0	3	1
Poly-L-lactide (PLLA)	-O-CHCH ₃ -CO-	175	2.7	18-24	6-12
Poly-D, L-lactide (PDLA)	-O-CHCH ₃ -CO-	none	1.9	12-16	3-10
Poly-caprolactone (PCL)	-O-(CH ₂) ₅ -CO-	60	0.4	>24	>24
Poly-1, 4-dioxane-2-one (POD)	-O-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ -CO-	110	1.5	4-6	1.5

제 3절 생분해성 고분자 생체 적합성

생체재료로서의 고분자 재료는 원래 공업용 목적으로 중합, 성형시킨 것이 의료용으로 전용되어 사용되고 있다. 고분자 재료가 생체재료로 사용되기 위한 필수 조건은 생체적합성(biocompatibility)으로, 이는 혈액과 접촉하는 경우의 혈액적합성(blood compatibility)과 혈액 이외의 생체조직이나 세포와의 세포조직 적합성(cell or tissue compatibility)으로 세분할 수 있다.

제 4절 다공성 지지체

1. 지지체 (scaffold)

생체조직은 여러 종들의 세포와 물질들과 세포들의 상호작용에 의해 그 형태와 기능이 유지된다. 특히, 세포와 물질 중에서도 유기 고분자를 주성분으로 하고 있는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 조직의 구조를 지지하는 역할을 수행함과 동시에 세포들이 부착하여 증식 및 조직을 형성하도록 하는 역할을 한다. 즉, 세포는 ECM에 부착되어야만 기본적인 기능을 수행할 수 있으며, 세포의 여러 가지 생물학적인 역할의 수행이 가능해진다.

이러한 ECM의 성질을 그대로 체외에서 모방한 것이 바로 생체물질로 제조한 다공성 지지체(scaffold)이다. 줄기세포를 이용한 조직공학에서는 이러한 형태의 지지체를 이용하여, 줄기세포가 우리가 원하는 특정화된 세포형태로 분화하고 특정한 조직 및 장기를 형성할 수 있도록 한다²⁴⁾.

그러나 이러한 인공적인 지지체를 제조하는 것은 매우 복잡하고 고도의 기술을 필요로 한다. 결국 ECM을 가장 잘 모방할 수 있는 지지체를 개발하는 것이 줄기세포 조직공학의 핵심이라 할 수 있다. 현재 많은 조직공학 연구자들이 지지체 개발에 주력하고 있으며 이러한 지지체를 기반으로 연구하는 학문을 줄기세포 조직공학 이라고 부른다.

2. 다공성 지지체의 조건

조직공학에 활용되는 지지체의 필수적인 요소들 가운데 가장 중요한 사항 중의 하나가 지지체의 다공성이다. 이는 세포가 성장 및 분화하여 삼차원적인 조직을 복원하는 동안 스스로 분해되는 성질을 갖는다. 생분해성 다공성 지지체는 공극율이 90% 이상, 공극은 세포가 침투할 수 있도록 100 μm 이상, 그리고 공극들이 잘 연결되어 있어야 세포가 균일하게 침투하여 부착, 성장, 분화하여 조직을 생성할 수 있다. 이때 세포와 친화력이 높은 고분자 지지체를 생체조직에 이식함으로써 분해 후 완전 흡수되어 새로운 조직을 형성하게

하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다^{25, 26)}.

지지체의 필수적으로 요구되는 특성들²⁶⁾

- 세포의 이동이 용이하고 부착이 잘 될 수 있는 것
- 세포의 증식과 분화를 촉진시킬 것
- 세포반응을 촉진 할 수 있을 것
- 상처치유가 신속하고 효과적일 것
- 생체적합성이며 생분해성일 것
- 제조과정이 용이하고 원하는 형태의 성형이 용이해야 함
- 표면적 부피의 비가 크고 충분한 다공성을 가질 것
- 기계적 강도와 치수 안정성을 가질 것
- 멸균공정이 용이할 것

이렇게 지지체는 생체적합성, 분해성, 다공성, 세포 및 영양분의 전달, 세포부착 및 증식 그리고 분화 촉진 등의 성질을 고려해 디자인해야 한다. 생분해성은 물리적, 기능적으로 지지체가 흡수되면서 새로운 조직으로 대체되는 것을 말한다. 분해된 산물은 대사작용을 통해 소화되거나 확산되어 체외로 빠져나가며 새롭게 생성된 조직만 남는다. 이때 새로운 조직이 생기는 속도와 지지체가 분해되는 속도가 균형을 이루어야 하는데, 분해속도가 너무 빠르게 되면, 새롭게 생성되는 형태를 가질 수 없으며, 분해가 느리면 새로이 생성되는 기질의 확산을 방해하게 된다. 마지막으로 생물학적 적합성은 지지체의 조건 중 가장 중요한 성질이라 할 수 있다. 이식물 또는 부산물이 생체 내에서 면역반응이나 이물반응을 일으키지 말아야 할 것이다. 다공성은 지지체에 있어서 영양분과 부산물이 안팎의 소통을 통해 세포의 생활력을 유지하기 위해 충분한 크기와 수를 유지해야 한다. 수분함량과 세포유착은 세포의 원래 환경을 만들기 위해 필요하기 때문이다^{27, 28)}.

제 5절 생체재료의 플라즈마 표면처리

1. 플라즈마 중합반응의 원리

플라즈마 중합(plasma polymerization)은 유기 및 유기 금속의 가스 상태 모노머들이 플라즈마 방전 상태에서 기재 표면에 가교밀도가 매우 높은 박막이나 분말형태로 합성(증착)되는 것을 말한다. 탄소, 황, 실리콘 등과 같은 사슬을 형성시키는 원자들을 포함하는 화학물질의 모노머 존재 하에서 발생한다. 플라즈마 상태에 투입되는 모노머 분자들은 대부분의 경우 플라즈마 에너지에 의해 활성화 입자들로 부서져 모노머의 부분적인 화학적 구조만 보존되고 가교화되고 불규칙적인 구조를 가지게 된다. 합성물질의 구조 및 성질은 압력, 가스 투입량, 가스의 종류, 전압, 전압 bias 등의 플라즈마 공정 인자에 의해서 정밀하게 조절될 수 있는데 이런 성질을 이용하여 두께 방향에 대하여 물성을 점차적으로 변화하는 구배층 구조를 제조할 수 있다.

플라즈마 중합은 수십여 년 전에 소개된 이후 재료공학의 중요한 부분이 되어 왔다. 화학분야(특히, 고분자의 플라즈마 화학)의 경계를 넘어 물리학 분야(플라즈마 물리, 박막 및 표면 물리, 진공물리)를 포함하고 있으며, 응용분야로 광학, 전자, 재료 개질 등의 응용분야를 포함하고 있다. 플라즈마 중합은 플라즈마 화학의 한 타입이며 플라즈마 종들 간의 반응이다. 자유라디칼 중합의 관점에서 플라즈마 중합을 본다면 “plasma-induced polymerization” 또는 “plasma-state polymerization” 으로 정의 될 수 있다. 전자는 불포화된 탄소-탄소 결합을 포함하는 전통적인 자유라디칼 유도 결합을 의미한다. 후자에서는 플라즈마 중합으로 이끄는 주요공정은 분자의 결합을 깨기에 충분한 에너지를 갖는 전자나 다른 플라즈마 종들의 존재에 의존한다. 중합공정 인자나 장비의 구조들에 따라서 만들어지는 막의 성질에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다. 플라즈마 중합에 의해 형성된 필름들은 통상적으로 복합재료에 사용되는 섬유의 표면개질을 할 경우처럼 재료의 전체 특성은 변화시키지 않고 표면 성질만을 개질 할 수 있는 장점이 있으며, 일반적으로 플라즈마 합성에 의한 응용분야는 다음과 같은 특성들을 갖는다.

2. 플라즈마 중합의 장점

- 1) 플라즈마 중합에 의해 500 Å-1000 Å 정도의 필름 두께를 형성한다.
- 2) 유리나 금속 등의 기재와의 접착력이 매우 우수하다.
- 3) 플라즈마 중합에 의해 생성된 필름 코팅은 핀홀이 없고 가교도가 높다.
- 4) 다층필름이나 정밀하게 물리적, 화학적 특성의 구배를 갖는 필름제조가 가능하다.
- 5) 플라즈마 폴리머는 보다 높은 탄성률을 보이고 뚜렷한 유리전이온도를 보이지 않는 경우가 많다.

3. 플라즈마 발생원 및 플라즈마 표면개질 기술

플라즈마 표면처리는 생체적합성과 재료의 기계적, 화학적 성질을 향상시킬 수 있다. 일반적으로 플라즈마 기체는 압력과 방전 사이의 두께에 의존한 방전 전위와 기체를 통한 potential 인가에 의해 방전이 된다. 많은 저압 플라즈마 소스인 DC, RF 방전, ECR 플라즈마 소스는 전위 전기장이 낮고 전류를 더욱 더 잘 제어할 수 있는 저압에서 플라즈마 방전을 일으킬 수 있다. 이러한 플라즈마 소스는 적절한 제어로 넓은 영역의 균일한 전자 밀도를 가진 플라즈마를 발생시킬 수 있다. 코로나 방전, 아크 플라즈마와 같은 다른 플라즈마는 생체의료 산업에 많이 이용되고 있다.

RF 방전은 넓은 부피의 균일한 플라즈마를 형성할 수 있기 때문에 플라즈마 표면 개질소스로 넓게 사용하는 것 중에 하나이다. RF 방전은 전기적 부하를 가진 RF power 결합 장치에 따라 Capacitive 결합 장치와 Inductive 결합 장치로 나눌 수 있다. 그 밖에 발생원으로 electron cyclotron resonance (ECR), 코로나 방전, 상압아크, 진공아크, 및 레이저 플라즈마가 있다.

플라즈마 표면처리 기술에는 플라즈마 스퍼터링과 에칭, 플라즈마 이온주입법과 플라즈마 deposition, 플라즈마 중합, 그리고 플라즈마-그래프팅 상호-중합 등과 같은 것이 있다.

제 3 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 실험재료

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 3D-PCL (3D Biotek, USA, Fig. 2)을 사용하였다. 3D PCL 원판 (직경 100 mm, 두께 1.5 mm, fiber 직경 0.1 mm)을 직경 0.7 × 0.7 mm 크기로 가공하여 시료로 사용하였고, 에탄올에 1시간동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하여 건조하여 사용하였다

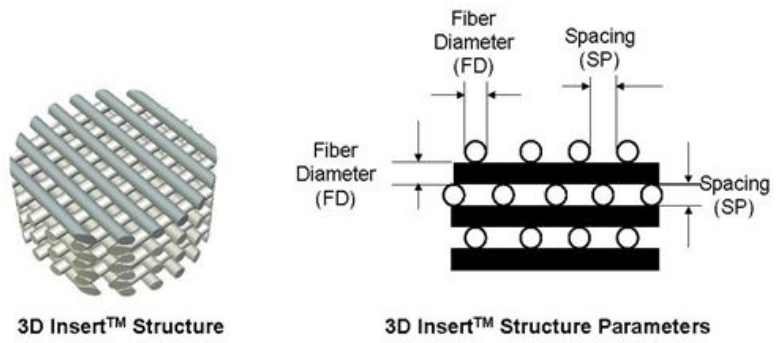


Fig. 2. 3D-PCL structure and structure parameters.

제 2 절. 플라즈마 표면처리

플라즈마 중합반응 시 모노머는 아크릴산 (Acrylic acid; 99.5%, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였고, 플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 3에 나타내었다. 플라즈마 표면개질 처리 전, 3D PCL표면의 유기물제거와 표면의 활성화를 부여하기 위하여 전처리를 실시하였다. 전처리 과정은 아르곤 (Ar) 가스와 산소를 각각 25 sccm 유속으로 흘려주면서 챔버 내의 반응 압력을 200 mtorr로 유지한 후, 플라즈마 방전세기를 50W로 10분 동안 수행하였다. 이어서 중합반응은 모노머의 증기압과 25 sccm의 Ar가스의 유속으로 챔버 내부 반응압력을 200 mtorr로 유지한 후, 30 W, 50 W, 70 W로 각각 15분 동안 반응시킨 후 3차 증류수로 표면을 세정하고, 진공오븐에서 30℃로 24시간동안 건조하였다.

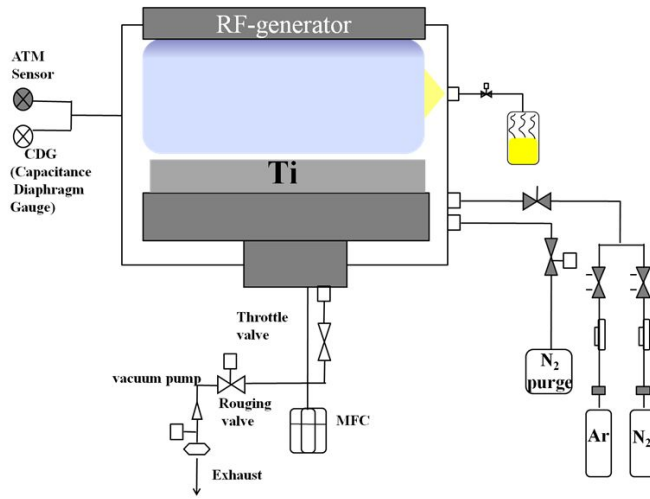


Fig. 3. Schematic diagram for plasma device.

제 3 절. 표면분석

주사전자현미경 (FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 3D-PCL과 플라즈마 처리된 3D-PCL을 관찰하였다. 플라즈마 표면개질 된 3D-PCL표면의 고분자 화학결합을 확인하기 위하여 푸리에 변환 적외선 분광기 (FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy, FT/IR-4100, Jasco, Japan)를 이용하였다.

3D-PCL과 플라즈마 처리된 3D-PCL 시편을 각각 준비하여 30°C에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, Surfactech, Korea)로 5 초 후에 접촉각을 측정하였다.

아크릴산이 코팅된 3D-PCL의 카르복실기의 정량분석은 Toluidine Blue 0 (TBO) 정량법을 이용하였다. 0.5 mM 농도의 TBO 용액에 시료를 침지하여 30°C에서 6시간 동안 TBO 염료와 카르복실기를 반응시켰다. Sodium hydroxide 용액 (pH 9)에서 30초간 50 rpm으로 세척을 한 후 Acetic acid 50% 수용액에서 12시간 동안 1000 rpm으로 TBO를 탈착시킨 다음 이 수용액을 620nm의 흡광도로부터 카르복실기를 정량하였다.

제 4 절. 조골모 세포 배양

세포 배양은 α -MEM(Alpha Minimum Essential Medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum(PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin(Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37°C, CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

제 5 절. 생체적합성 평가

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 파종하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 1일, 2일, 3일 동안 배양한 후 MTT를 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인한 후 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma)을 이용하여 용해하였다. 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200 μ l씩 분주한 후 ELISA reader(Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 4 장 실험결과 및 고찰

제 1 절. 표면분석

Fig. 4는 플라즈마 처리전의 3D PCL과 플라즈마 처리된 표면을 관찰한 것으로 플라즈마 처리 후의 표면의 색깔이 육안으로도 다른 것을 확인할 수 있었다. 이러한 색상의 변화는 3D PCL 고분자 지지체표면에 고분자 박막이 증착되었음을 의미하는 것으로 생각된다.

Fig. 5는 주사전자현미경을 이용하여 무 처리 3D PCL의 표면과 단면, 아크릴산으로 플라즈마 처리한 단면과 표면을 관찰한 결과이다. 3D PCL 고분자 지지체는 격자구조형태로서 기공크기는 $300\ \mu\text{m}$ 으로 3D Biotek사에서 제시한 크기와 동일함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5a-1,a-2, a-3). 50 W의 RF 플라즈마세기를 인가하여 코팅한 3D PCL의 단면을 관찰한 결과, 약 105 nm의 두께를 갖는 폴리아크릴산 고분자박막이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5b-2). 또한 폴리아크릴산이 코팅된 표면은 무 처리 3D PCL과 비교해 볼 때 큰 변화는 관찰 할 수 없었다(Fig. 5c-1,c-2).

Fig. 6는 무 처리 PCL과 70 W의 RF 플라즈마 세기로 폴리아크릴 산이 코팅된 3D-PCL 표면의 XPS 분석결과이다. 전 영역 스펙트럼을 관찰한 결과, 플라즈마 표면 처리된 3D-PCL 표면에서 탄소(C1s)와 산소(O1s)의 함량이 높게 나타났다 (Fig. 6-a). 이것은 표면에 존재하는 카르복실기의 영향으로 생각된다. 이러한 결과들로부터 3D PCL 표면에 플라즈마 증합을 이용하여 카르복실기(-COOH)의 코팅이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

Fig. 7은 RF 플라즈마 세기에 따른 3D-PCL 표면에 존재하는 카르복실기량을 TB0법을 이용하여 정량한 결과와 폴리아크릴산 고분자 박막의 두께를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과를 정리하여 나타내었다. RF 플라즈마 세기가 증가함에 따라 표면에 존재하는 카르복실기량과 고분자 박막 두께가 모두 증가함을 확인할 수 있었다.

Fig. 8은 폴리아크릴산이 코팅된 3D PCL 표면의 접촉각을 측정된 결과이다. 대조군인 3D-PCL의 경우 $78\pm 3^\circ$ 의 높은 접촉각을 나타내었고, 폴리아크

릴산이 코팅된 3D-PCL의 경우, RF 플라즈마 세기와 관계없이 모두 접촉각을 측정할 수 없을 정도의 친수성을 갖는 것을 확인하였다. 적당한 젖음성 (wettability)을 갖는 친수성 표면은 세포부착과 매우 밀접한 관련이 있으며 일반적으로 적당한 친수성을 가지는 생체재료표면은 세포의 부착이 우수하여 임플란트와 같은 생체재료에 유리한 표면을 제공한다고 보고되고 있다²⁹⁾.

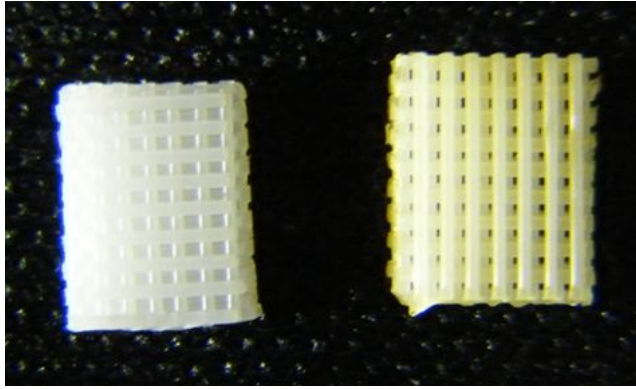


Fig. 4. Photo images of the various treated 3D-PCL.

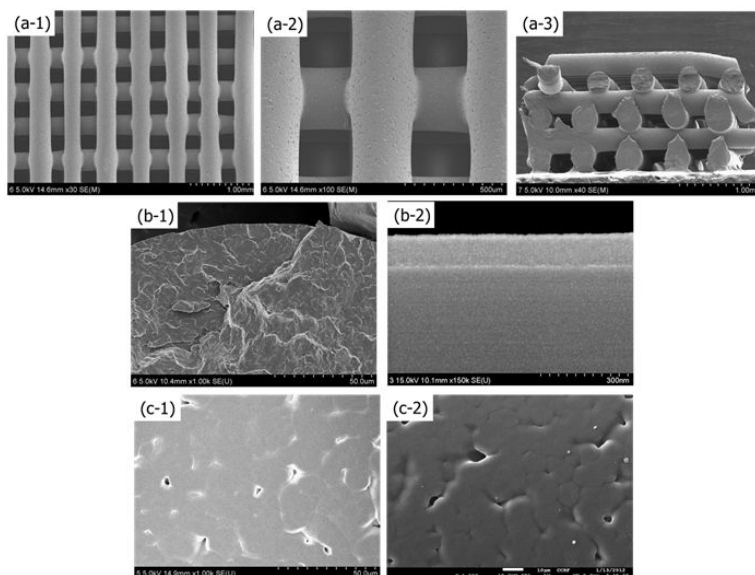


Fig. 5. FE-SEM images of various treated 3D-PCL
 (a-1, 2) untreated 3D-PCL surface, (a-3) cross-section view
 (b-1, 2) COOH coated 3D-PCL (50 W) cross-section view
 (c-1) untreated 3D-PCL surface, (c-2) 50 W COOH/PCL

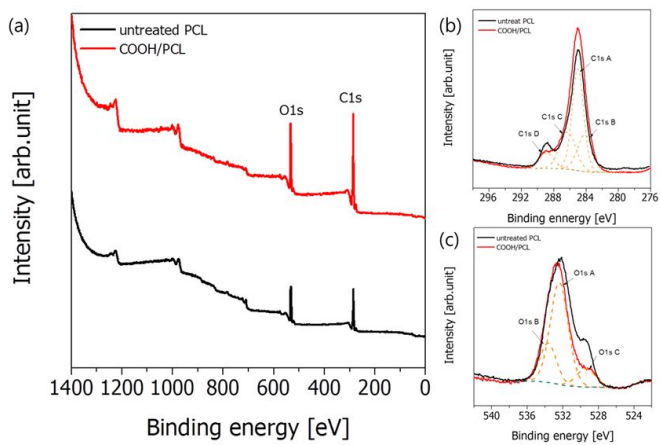


Fig. 6. XPS spectra of PCL and -COOH coated PCL surface (50 W) (a), C1s narrow spectrum (b), and O1s narrow spectrum (c).

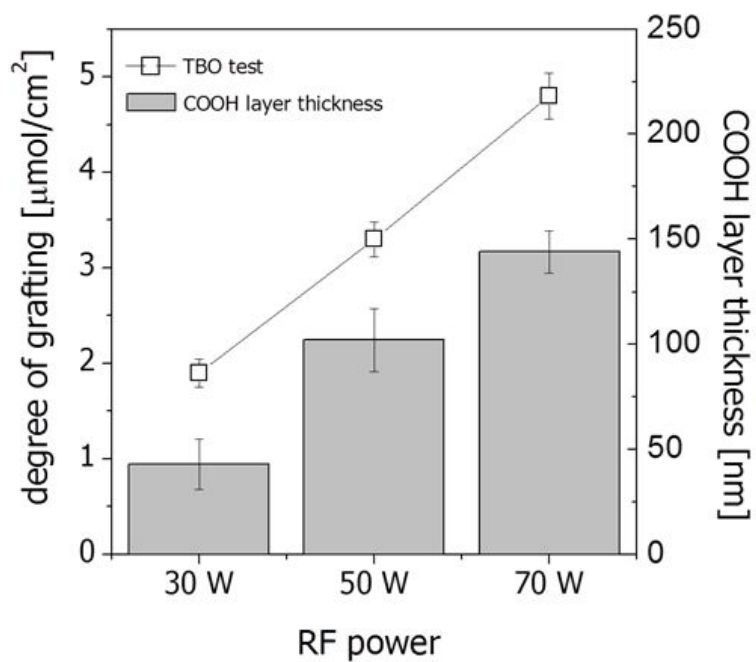


Fig. 7. The -COOH concentration of the surface and thickness of polyacrylic acid films according to the RF plasma powers

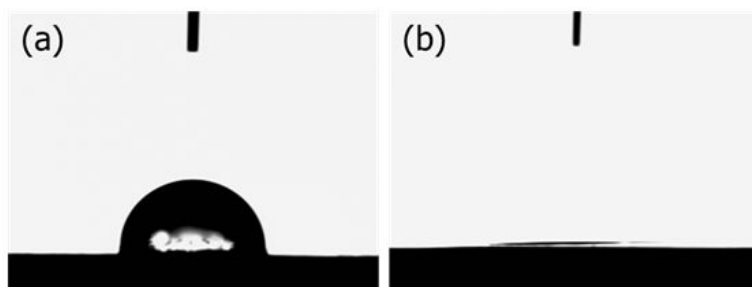


Fig. 8. Contact angle values of water droplets measured on the different modified Ti surfaces. (a) untreated 3D-PCL, (b) plasma treated 3D-PCL.

제 2 절. 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식 및 분화

3D-PCL 표면에 플라즈마 중합반응으로 증착된 아크릴산 박막표면에 존재하는 카르복실기가 MC3T3-E1 세포 증식률에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. MTT 분석법은 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 널리 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군은 무 처리된 3D-PCL 표면을 사용하였고, RF 플라즈마 세기에 따른 아크릴산박막이 형성된 3D-PCL을 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포생존율을 측정하기 위하여 대조군과 실험군 모두 1일, 3일 동안 배양하였고, 생존율(%) 계산은 1일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군의 생세포수를 비율로 나타낸 것이다 (Fig. 9). 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포생존율이 증가함을 알 수 있었다. 1일 배양의 경우에는 30 W 세기를 인가하여 코팅한 3D-PCL 표면이 세포 증식에 가장 큰 영향을 미쳤다. 3일째가 되면서 대조군과 실험군의 세포증식률이 크게 차이가 나기 시작하였고, 아크릴산이 코팅된 3D-PCL은 70 W를 제외한 모든 실험군에서 세포 증식율이 대조군에 비하여 높은 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 실험의 경우, 표면 박막에 존재하는 카르복실기가 MC3T3-E1세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었다.

ALP는 조골세포의 표식자로서 널리 사용된다. 그리고 ALP 활성의 증가는 조골세포의 분화와 관련이 있다. 그러므로 MC3T3-E1 세포와 같은 조골모세포의 ALP활성은 무 처리 PCL인 대조군과 비교하여 RF 플라즈마 세기에 따른 3D-PCL 표면에서 분화에 미치는 영향을 판단하기 위해서 측정되었다 (Fig. 10). 4일의 경우, 30 W RF 플라즈마 세기를 인가한 아크릴산이 코팅된 3D-PCL이 가장 우수한 ALP 활성을 나타내었다. 7일 동안 분화된 ALP활성은 4일 결과에 비해 향상된 경향이 나타났다.

Fig. 11는 대조군과 실험군에서 MC3T3-E1 세포를 24시간 동안 배양하여 초기부착 형태를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 대조군 (Fig. 11-a)에 비하여 아크릴산이 코팅된 실험군 (Fig. 11b-d)이 세포가 표면에 잘 부착된 것을 관찰 할 수 있었다. 아크릴산이 코팅된 실험군에 세포가 부착 초기단계로서

사상위쪽이 뺏어 나가는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 결과와 MTT결과를 종합해 보면, 아크릴산이 코팅된 3D PCL 표면에서 조골모세포의 부착과 증식이 모두 초기에서 높은 것을 확인할 수 있었다.

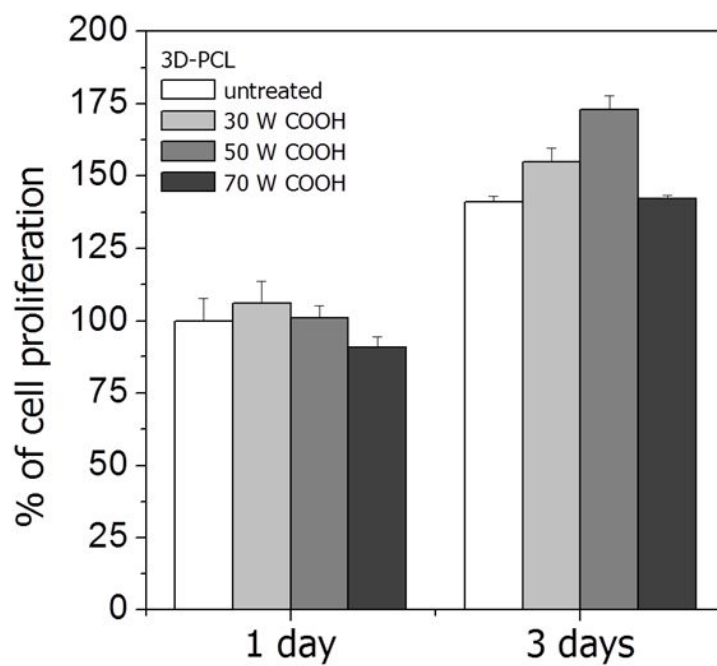


Fig. 9. Cell proliferation of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified 3D-PCL surface for 1 day and 4 days.

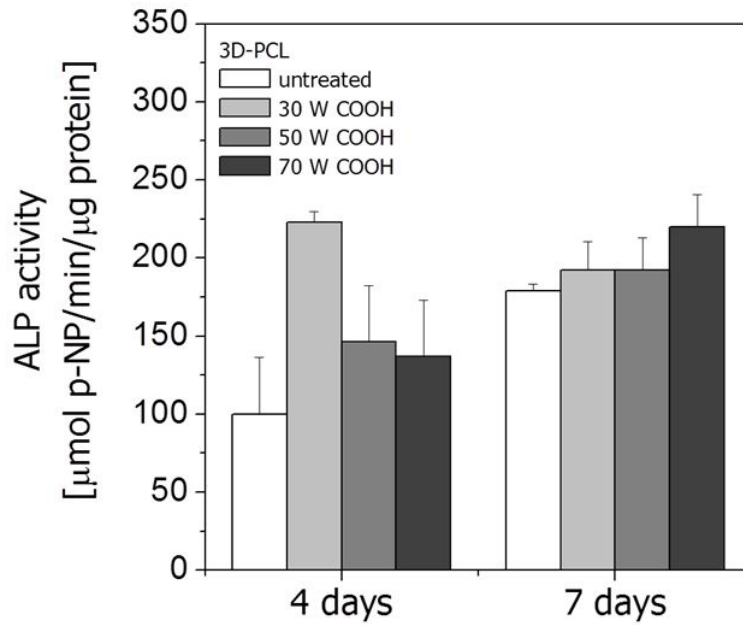


Fig. 10. ALP activity of the MC3T3-E1 cell cultured on the modified 3D-PCL surface for 4 days and 7 days.

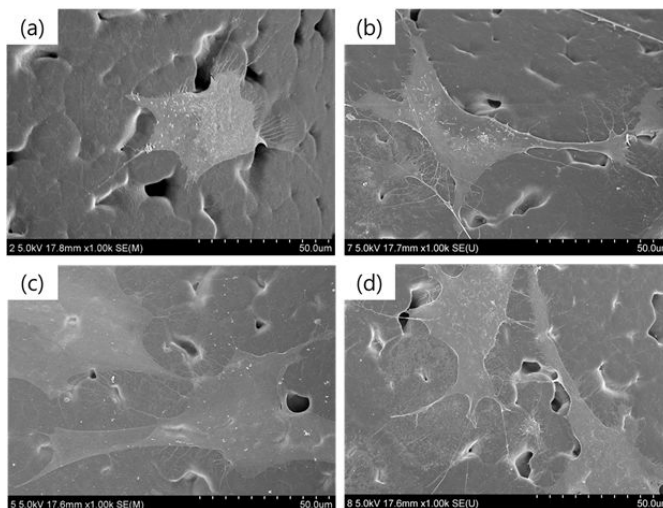


Fig. 11. FE-SEM photographs of MC3T3-E1 cell on the various PCL surface for 1 day (a) untreated PCL, (b) COOH/PCL (30 W), (c) COOH/PCL (50 W) and COOH/PCL (70 W).

제 5 장 결론

플라즈마 표면개질법을 이용하여 3D PCL 표면에 폴리 아크릴산 고분자 박막 코팅을 한 후 표면을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포증식과 분화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 플라즈마 표면개질법은 친수성을 갖는 균일한 카르복실기를 다량 함유한 고분자 박막층을 형성함을 알 수 있었다.
- 2) 아크릴산이 코팅된 표면은 플라즈마 처리조건과 관계없이 우수한 친수성을 갖는 것을 관찰 할 수 있었다.
- 3) MC3T3-E1 세포 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 고분자박막이 코팅된 표면이 무 처리된 표면에 비하여 우수한 생체활성을 나타내었다.

이상과 같은 결과로부터 현재 시판 중인 3D-PCL의 표면에 플라즈마 표면개질기술을 이용하여 고분자박막을 코팅한 임플란트는 임상적으로 골 재생이 우수할 것으로 사료된다. 향후 동물실험을 통하여 실제로 신생골의 재생능이 어느 정도인지 확인하는 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] Fox SP (1998). Tissue Engineering. Alan R. Liss Inc., New York.
- [2] Kim SY (2000). Introduction to Biomaterials. Trends in Materials Information Center for Materials. 1:35-38.
- [3] Kim HY, Yoo MK, Park IK (2003). A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. Biomaterials 24: 801-808.
- [4] Zhang H, Lin CY, Hollister SJ (2009). The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds. Biomaterials 30:4063-4069.
- [5] Lee YJ et al (2003). MG63 Osteoblastic cell adhesion to hydrophobic surface precoated with recombinant osteopontin fragments. Biomaterials 24:1059-1066.
- [6] Li DJ, Niu LF (2002). Cell attachment of polypropylene surface-modified by COOH⁻ ion implantation. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 192:393-401.
- [7] Li B et al (2005). Influence of carboxyl group density on neuron cell attachment and differentiation behavior: Gradient-guided neurite outgrowth. Biomaterials 26:4956-4963.
- [8] An Y et al (2007). Preparation and self-assembly of carboxylic acid-functionalized silica. J Colloid Interface Sci 311:507-513.
- [9] Toworfe GK et al (2006). Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers. Biomaterials 27:631-642.
- [10] Sönmez H et al (1995). Fibronectin and sialic acid levels in human meningiomas and gliomas. Cancer Letters 90:119-122.
- [11] Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006). Coating of titanium implants with collagen, RGD

- peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27: 5561-5571.
- [12] Barber TA, Gamble LJ, Castner DG, Healy KE (2006). In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPNcoated titanium implants. *J Orthop Res* 24: 1366-1376.
- [13] Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM,(2006). Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 27: 4003-4015.
- [14] 환경부 한국환경기술진흥원 (2007). 분해성 플라스틱 최근 동향 및 플라스틱 대체품 기술 현황, (주) 포텍, 서울.
- [15] 이기영, 조중수 (1998). 생분해성 고분자, 전남대학교 출판부.
- [16] Reis RL, Cunha AM, Allan PS, Bevis MJ (1996). Mechanical behavior of injection molded starch-based polymers. *Polym Adv Technol* 7:784-790.
- [17] Gough JE, Christian P, Scotchford CA Jones IA (2003). Craniofacial osteoblast response to polycaprolactone produced using a novel boron polymerisation technique and potassium fluoride post-treatment. *Biomaterials* 24: 4905-4912.
- [18] Simon CB, Gé Raldine R, Jennifer S, Neil RC (2009). The relationship between the mechanical properties and cell behavior on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 30: 1321-1328.
- [19] Wikimedia Commons, <http://commons.wikimedia.org/wiki>
- [20] Nair LS (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 32:762-798
- [21] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT (2007). Design and development of three dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Res &*

Res 85: 1051-1064.

- [22] Seal BL, Otero TC, Pantich A (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater Sci & Eng* 34: 147-230.
- [23] Kenichi T, Hiroyuki S (1998). Diastereoselectiv syntheses of (2R, 3R, 5R) and (2S, 3S, 5S)-3-hydroxy-5-methyl-2-pyrrolidinecarboxylic acid as a componet of actinomycin Z1 *Tetrahedron* 20: 10029-10042.
- [24] 김수영, 조용정, 지하연 (2009). 하이드로젤 지지체를 통해 본 조직공학의 가능성 탐구, KAIST, 서울.
- [25] Choong C, Triffit JT, Cul ZF (2004). Polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering effects of a calcium phosphate coating layer on osteogenic cells. *Instite for Chem Eng* 82: 117-125.
- [26] Cannillo V, Chiellini F, Fabbri P, Sola A (2010). Production of Bioglass 45S5 polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching. *Comp Stru* 92: 1823-1832.
- [27] YoWa SZ, Quek CH, Yim EKF, Leong KW (2009). Collagen-based fibrous scaffold for spatial organization of encapsulated and seeded human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 30: 1133-1142.
- [28] Baek CH, Kim YJ (2006). Characteristics of tissue-engineering cartilage on macroporous biodegradable PLGA scaffold. *Laryngoscope* 116: 1829-1834.
- [29] Tanahashi M and Matsuda T (1997). Surface funtional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res* 34: 305-310.