

변성 셀룰로오즈막의 표면물성과 혈액 적합성

이 순 흥* · 허 훈** · 이 영 무 · 김 진 일 · 박 영 훈***

한양대학교 공과대학 공업화학과

생산기술연구원 화학기술실용화센터 · *순천대 고분자공학과
(1992년 10월 12일 접수, 1993년 2월 1일 채택)

Surface Properties and Blood Compatibility of Modified Cellulose Membrane

Soon Hong Lee,* Hoon Huh,** Young Moo Lee, and Jin Il Kim, and Young Hoon Park***

Department of Industrial Chemistry, College of Engineering
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**Center for Chemical Technology, KAITEC, Seoul, Korea

***Dept. of Polymer Eng., Sunchon Univ., Suncheon, Korea

(Received October 12, 1992, Accepted February 11, 1993)

요 약 : 생체의료용 재료로서 응용 가능한 고분자 전해질복합체와 그라프트 공중합체를 수용성 고분자 유도체로부터 제조하였다. 고분자 전해질 복합체들은 카르복시메틸 셀룰로오즈(CMC)와 젤라틴으로부터 제조하였다. 그라프트 공중합체는 메틸셀룰로오즈(MC)에 아크릴산을 그라프트반응시켜 합성하였고, 이 그라프트 공중합체와 젤라틴의 고분자 전해질 복합체도 제조하였다. 그라프트 공중합체와 고분자 전해질 복합체들을 화학가교법과 열처리법으로 제조시 최적조건들을 조사하였다. 예비실험 결과 이들 재료들이 생체의료용 재료로서의 응용 가능성이 있는 것을 알았다.

Abstract: Polyelectrolyte complexes and graft copolymers as biomaterials were synthesized from the water soluble cellulose derivatives. Polyelectrolyte complexes have been prepared from carboxymethyl cellulose (CMC) and gelatin. Graft copolymers (Mc-g-AA) were synthesized by grafting acrylic acid (AA) onto methyl cellulose (MC). (Mc-g-AA) and gelatin polyelectrolyte complexes were also prepared. The optimum conditions of each sample were investigated after chemical crosslinking or heat treatment. The preliminary results show that these materials might be interesting for biomedical applications.

KEY WORDS : Polyelectrolyte Complex/Graft Copolymer/Carboxymethyl Cellulose/Methylcellulose/Crosslinking/
Blood-Compatibility/

1. 서 론

생체계와 적응성이 있는 새로운 인공장기와 생체재

료의 개발에 새로운 합성고분자 재료들이 요구되고 있다. 장기간 신체 내부에 적용 가능한 재료들은 혈 전이나, 주위 세포에 상처, 면역반응, 독성이나 알레

* 현주소 : Dept. of Materials Sci., Penn. State Univ., College Station, PA, U. S. A.

르기반응, 암 등을 일으키지 않아야 한다. 현재 생체재료로서 가장 긴급한 문제는 혈전으로서 이는 혈액이 응고되어 생기는 현상이다. 혈액이 이 물질의 표면과 접촉하면 플라즈마 단백질이 적층하며 이로 인해 트롬빈이 형성되고 성장하여 떨어져나가게 된다[1-2].

표면에너지, 전하, 친수성, 표면의 화학조성, 극성 등과 같은 표면성질 등이 생체재료의 혈액 적합성에 미치는 인자들로 알려져 있다[3-4]. 이러한 이유로 인해 생체계와 접촉하는 표면을 물리, 화학적으로 개질해야 할 필요가 있다. 현재까지 상용고분자들은 생물학적 내성, 독성, 불충분한 기계적 성질 등으로 인해 생체계에 사용되지 못하였다. 이러한 음성적인 효과들은 천연고분자를 사용하면 제거될 수 있다. 천연고분자들은 천연세포나 장기와 유사한 성분으로 되어 있어 좋은 생체적합성을 갖고 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 (CMC-젤라틴)고분자전해질 복합체와, (MC-g-AA)공중합체 및 (MC-g-AA-젤라틴)고분자전해질 복합체를 제조하고 이들을 화학적 방법이나 열적인 방법을 사용하여 여러 조건에서 가교시킨 후 이들 재료들의 혈액 적합성에 대하여 검토하였다.

2. 실험

2.1. 재 료

CMC와 MC(4,000 cp)는 일본 Kisida사와 Kokusan Chemical사 제품을 각각 사용하였다. 젤라틴은 pH 5.5~6.0(1% 용액)인 제약용을 사용하였으며 AA는 일본 Junsei Chemical사 제품을 감압증류하여 사용하였다.

개시제인 potassium persulfate(KPS, Hayashi Pure Chemical Works) 및 aluminum potassium sulfate(APS, Junsei Chemical Co.)는 1급시약을 그대로 사용하였다. 이외의 시약은 특급시약을 그대로 사용하였다.

2.2. (CMC-젤라틴)고분자 전해질 복합체의 제조

CMC와 젤라틴을 50℃의 증류수에 각각 0.5 wt%의 희박용액으로 용해시킨 제막용액을 CMC : 젤라틴의 혼합비율을 1 : 2로 하여 유리판 위에 캐스팅한 후 서서히 겔화시켰다. 이를 pH 3의 초산수용액에 침지시켜 고분자 전해질 복합체를 형성한 후 흐르는 물에 세척 건조하였다. 이와같이 제조한 고분자 전해질 복합체 필름(CG-12로 명명)가교에는 CG-12 1g

당 글루탈알데히드 1.0mol로 조절하여 가교시켰다 (CGC-121로 명명).

2.3. (MC-g-AA)그라프트 공중합체의 제조

삼각플라스크에 증류수를 용매로 MC와 AA의 첨가비를 1 : 3으로 하고 개시제로는 KPS를 $3.7 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 넣어 질소기류하 30℃의 항온조에서 교반하면서 반응시켰다. 3시간 후에 반응액의 온도를 60℃로 올려 반응을 끝내면 그라프트 공중합체가 석출되고 AA호모 폴리머는 수용액에 남게된다. 이것을 여과한 후 뜨거운 물로 수회 세척하여 AA호모폴리머와 미반응의 개시제를 완전히 제거한 후 진공 건조하여 순수한(MC-g-AA)그라프트 공중합체를 얻었다. 적정법에 의한 그라프트율은 15%였다. 이와같이 제조한 그라프트공중합체를 아세톤의 부피분율이 0.1, 0.2, 0.3인 수용액에 용해시켜 제조한 10wt%의 제막용액을 유리판위에 캐스팅하여 겔화시킨 후 건조하였다. 이를 0.8 mol cm^{-3} 의 APS수용액에 침지시켜서 가교하였다. 이때 아세톤의 부피분율이 0.1인 수용액에 용해시켜 제조한 시료는 MAC-A, 0.2일때 MAC-B, 0.3일때 MAC-C로 명명하였다. 또, 열처리법(70℃, 2.5h)으로 열가교시킨 시료를 MAC-BT로 명명하였다.

2.4. [(MC-g-AA)-젤라틴] 고분자 전해질 복합체의 제조

AA의 그라프트율이 15%인 (MC-g-AA)그라프트 공중합체를 20% NaOH수용액에 침지시켜 50분간 반응시켜 카르복시기를 나트륨염 형태로 전환시켰다. 이것과 젤라틴의 혼합비율을 적절히 변화시켜 유리판위에 캐스팅하였다. 이하의 과정은 (CMC-gelatin)고분자전해질 복합체의 제조시와 동일하다. 습윤시의 강도보강을 위해 열경화(60℃, 2.5h)시켰다. (MC-g-AA)공중합체와 젤라틴의 혼합비율이 3 : 1인 시료는 MAG-31, 4 : 1인 시료는 MAG-41로 명명하였다.

2.5. 물 성

시료의 함수율, $Q_w(\%)$ 은 다음식, $Q_w(\%) = (W_s - W_d) / W_s \times 100$ 을 이용하여 계산하였다. 여기서, W_s 와 W_d 는 각각 팽윤시료와 건조시료의 중량이다. 기계적 강도와 연신율은 ASTM D-638법에 의거하여 Instron (INSTRON Co., Model 4201)으로 측정하였다. 구조 확인은 FT-IR(Nicolet, Model 5DX)을 이용하였다.

2. 6. 표면물성

입계 표면장력(γ_c)은 시료를 표면장력이 각기 다른 유기액체 (Table 1)와 접촉시켜 접촉각을 측정하여 결정하였다[5]. 접촉각 측정은 접촉각 측정기 (Goniometer, Erma Optical Co., Model G-1)를 사용하여 측정하였다. Captive bubble법[6-7]을 사용하여 여러 시료 표면에 대한 표면에너지 파라미터를 얻었다. 적어도 5번 각도 측정을 하였다.

2. 7. 컬럼법[8]

시료들은 PVC관(길이 10cm, 내경 3mm)의 내벽에 코팅하고 혈액을 1ml/min의 유속으로 3분동안 흘려보낸다. 통과한 혈액은 항응고제인 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)이 들어 있는 진공용기에 넣어 Coulter counter(Model S-plus)를 이용하여 혈소판수 측정을 행하였다.

2. 8. 적층법[9]

각 시료 필름(1cm²)을 platelet rich plasm(PRP)가 채워진 시험관에 30분 동안 담구어 놓는다. 그 후 이 시료들을 취해 생리식염수로 세척 후 1.25% 글루탈알데히드 용액에 담가서 시료 표면에 흡착된 혈소판을 고정시킨다. 냉동건조 후 주사 전자현미경(SEM, Jeol, JSM-35CF)을 사용하여 시료 표면에 흡착된 혈소판들의 모폴로지를 관찰하였다. 가속 볼트는 15KV이었다.

2. 9. Lee-White법[10]

각 고분자들을 15mm×125mm인 시험관(Corning Ltd.)의 내벽에 코팅한 후 2ml의 혈액을 채운다. 5분 후 부터 혈액을 넣은 시험관을 45° 각도로 30초간격으로 기울여 혈액응고를 확인하였다. 시험관을 거꾸로 하여도 혈액이 흐르지 않을 때까지의 시간을 3회 측정한 평균값을 혈액응고 시간으로 정하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 입체형태

(CMC-젤라틴) 고분자 전해질 복합체의 제조시 Fig. 1과 같이 각 구성물질의 혼합비를 변화시키면서 pH에 따른 상분리 변화로부터 고분자 전해질 복합체의 최적형성조건을 구하였다. [(MC-g-AA)]고분자 전해질 복합체의 제조시에도 위와 동일한 방법으로

확인하였다.

MC에 대한 AA의 그래프트 반응의 FT-IR 확인 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 2940cm⁻¹에서의 MC의 CH₃기의 C-H stretching band의 흡수피크를 확인함으로써 그래프트 공중합되었음을 알 수 있었다. 또 수용성인 (MC-g-AA)공중합막의 수불용화를 위해 APS로 가교시키거나 열처리에 의한 자체가교법을 이용한 후 각각의 가교반응의 IR 확인 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 1721cm⁻¹에서 carboxylate의 흡수피크가 감소하고 1638cm⁻¹에서 미가교된 공중합체에는 없던 carboxylate의 흡수피크를 확인함으로써 가교반응이 진행되었음을 알 수 있었다.

Table 1. Surface Tension of Various Liquids

Liquids	Surface Tension(dyne/cm)
n-Butyl alcohol	24.6
Oleic acid	32.5
Benzyl alcohol	39.0
Aniline	42.9
Ethylene glycol	47.7
Formamide	58.2
Glycerol	63.4
Water	72.5

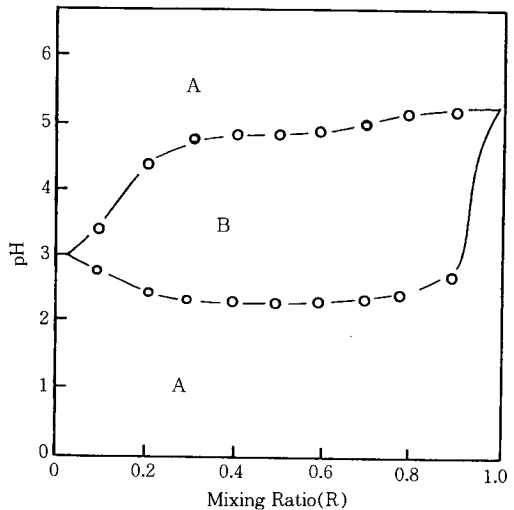


Fig. 1. Complex phase separation influenced by the effect of pH and mixing ratio(R) of gelatin and CMC; A, homogenous phase; B, separation phase.

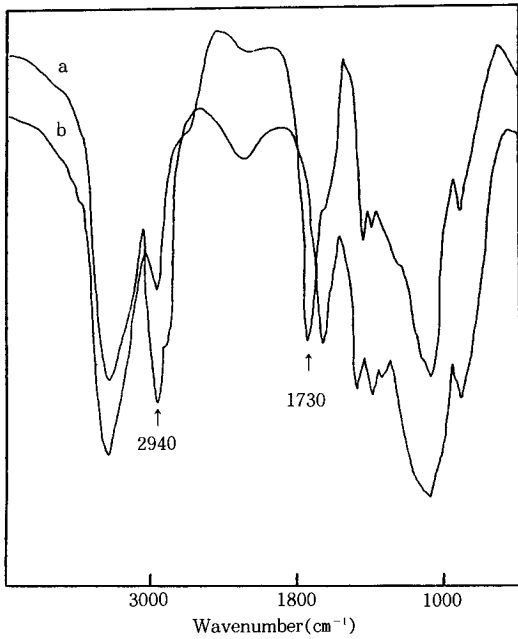


Fig. 2. IR spectra for MC and (MC-g-AA) copolymer : (a) MC, (b) (MC-g-AA) copolymer.

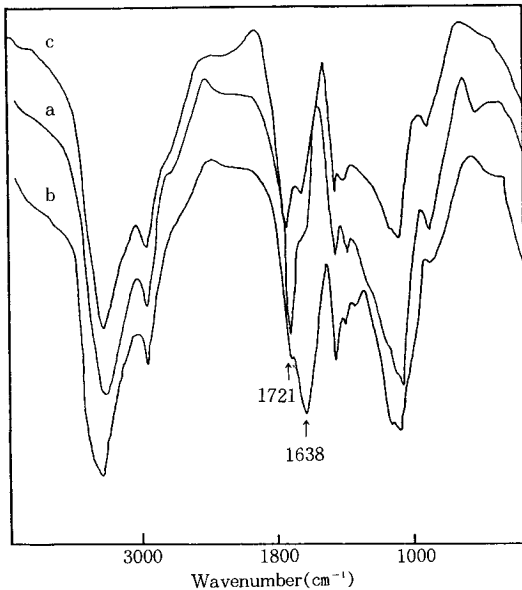


Fig. 3. IR spectra for crosslinked (MC-g-AA) copolymer : (a) (MC-g-AA) (b) crosslinked with APS, (c) thermal cross-linking.

3.2. 물리적 성질

본 실험에서 사용된 각 시료의 습윤상태에서의 물리적 특성을 Table 2에 나타내었다. Table에서 보는 바와 같이 각 시료는 셀룰로오즈계 고분자를 공통적으로 갖고 있어 비슷한 물성을 갖고 있으며 가교공정은 이들의 기계적 강도 및 함수율 조절에 반드시 필요하였다.

3.3. 혈액 접촉과 혈소판 부착

사람의 전혈과 접촉시킨 각 재료표면의 혈소판 부착량을 측정하여 얻어진 결과를 Fig. 4에 나타내었

Table 2. Physical Properties of the Samples in Wet State

Samples	Tensile Strength (kg/mm ²)	Elongation (%)	Water Content (%)
CG-12	0.03	28	67.6
CGC-121	0.35	121	69.0
MAC-A	0.32	36	46.3
MAC-B	0.33	37	52.6
MAC-C	0.31	42	54.1
MAC-BT	0.74	20	21.3
MAC-31	0.17	53	52.0
MAC-41	0.19	37	43.1

Standard deviation : $\pm 10\%$

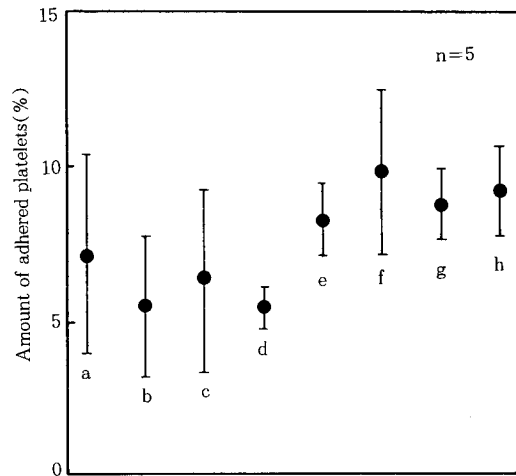


Fig. 4. Percent of platelets adhered on the various sample surfaces by Salzman method : (a) MAC-A, (b) MAC-B, (c) MAC-C, (d) MAC-BT, (e) CG-12, (f) CGC-121, (g) MAG-31, (h) MAG-31.

다. 그라프트 공중합체인 MAC재료들의 혈소판 부착량이 고분자전해질 복합체인 CGC와 MAG 재료들보다 작았다. 그러나 그 차이는 편차를 고려한다면 미미하다고 볼 수 있다. 각 재료 모두 혈소판 부착량이 10% 이내의 값을 가졌다.

각 재료표면에서 혈소판의 부착거동은 시차 주사 전자현미경에 의해 관찰하였다. 각 재료를 전혈과 접촉시켰을 때는 재료표면에서의 혈소판 부착을 확인할 수 없었다. 그러므로 다른 혈액성분의 영향은 배제시키기 위하여 PRP를 각 재료와 접촉시켰을 때의 혈소판 부착거동을 Fig. 5에 나타내었다. 각 재료에 PRP를 접촉시켰을 때 MAC-B표면에서는 부착된 본래의 형태를 그대로 유지하고 있으며 MAC-BT재료 표면에서도 형태변화가 거의 없었고 부착된 혈소판의

수는 극히 적었다. MAC-31재료 표면에서는 형태변화가 없는 혈소판도 관찰되나 혈액응고의 초기단계의 위족(filopodium)이 형성되어 있었으며 CGC-121 재료표면에서는 위족이 많이 형성되었고 혈소판의 변형이 많이 진행된 것을 볼 수 있었다. 그러나 각 재료는 모두 혈액응고의 초기단계를 넘지 않는 혈액 적합성을 나타내었다.

3. 4. 표면물성과 혈액적합성

각 재료표면의 접촉각에 의한 임계표면장력(γ_c)을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 각 재료는 모두(γ_c) 값이 20~30dyn/cm 정도의 값을 가졌다. 일반적으로 임계표면장력이 혈액 적합성 평가에 절대적 인자는 아니지만 20-30dyn/cm일 때 생체 적합성이 좋

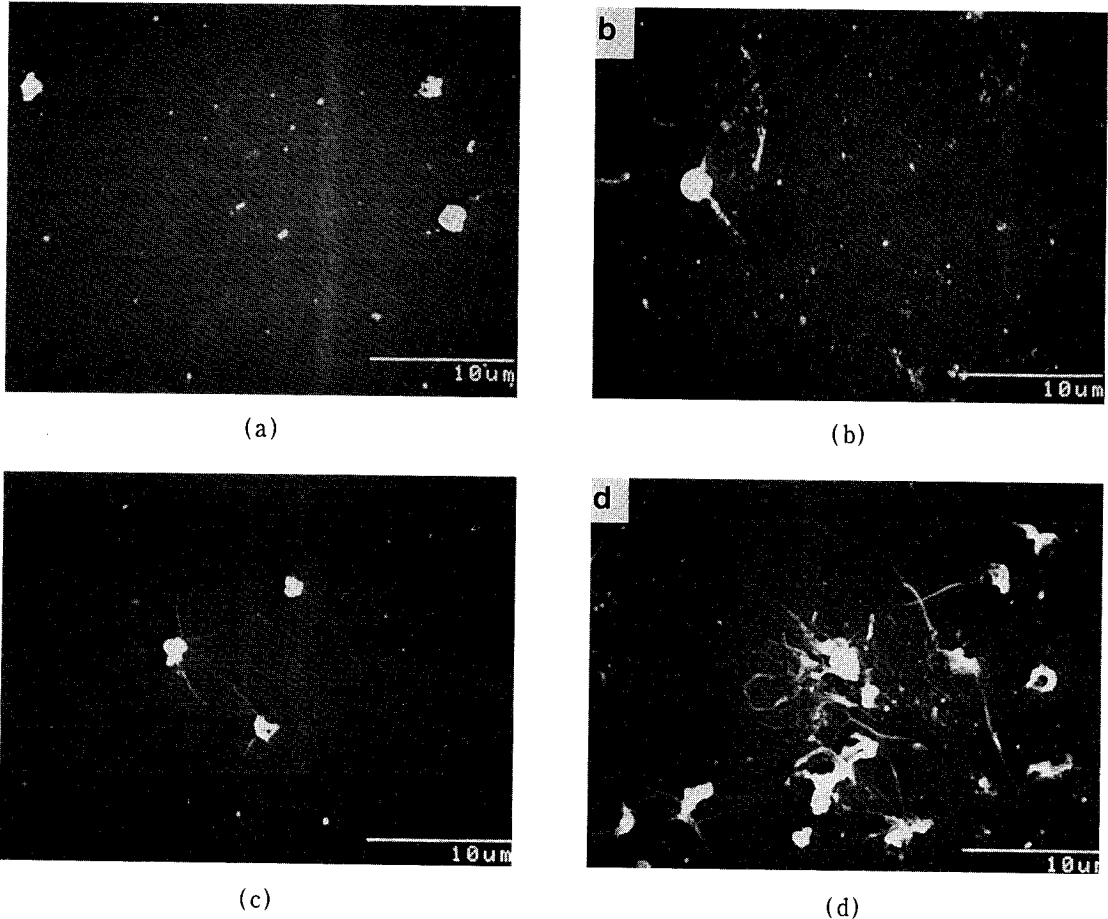


Fig. 5. Scanning electron microscopes of the surfaces in contact with PRP for 30min : (a) MAC-B, (b) MAC-BT, (c) MAG-31, (d) CGC-121.

다고 보고되어 있다[11].

생체내에서의 재료표면은 항상 수화된 상태로 있으므로 옥탄의 접촉각과 공기방울의 접촉각을 측정하여 물과 재료표면과의 상호작용을 검토하였다. Captive bubble technique에 의해 각 재료표면의 접촉각과 표면점착에너지를 측정하여 Table 3에 나타내었다. 의료용 재료가 혈액과 접촉하면 단백질의 흡착이 우선적으로 일어나며 혈소판이 흡착된 단백질과 여러 혈액성분과 함께 연쇄반응을 일으켜 혈전이 형성된다. 모든 단백질 분자는 극성과 비극성 부분을 함유하고

있다. 그러므로 재료표면에서 혈전을 재료와 액체사이의 접촉력의 분산력과 극성력에 관계시키려는 시도가 합리적이라 생각된다. 함수율의 증가에 따른 재료와 물 사이의 극성력과 분산력의 비(I_{sw}^p/W_a^d)의 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 함수율이 증가하면 I_{sw}^p/W_a^d 가 커지는데 이는 재료의 친수성이 증가할수록 I_{sw}^p/W_a^d 가 커지기 때문으로 생각된다.

혈액응고 시간과 I_{sw}^p/W_a^d 와의 관계를 Tabel 4에 나타내었다. 혈액응고시간은 각 재료 모두 유리에 비해 5배 이상의 값을 나타냈으며 특히 I_{sw}^p/W_a^d 가 1.0

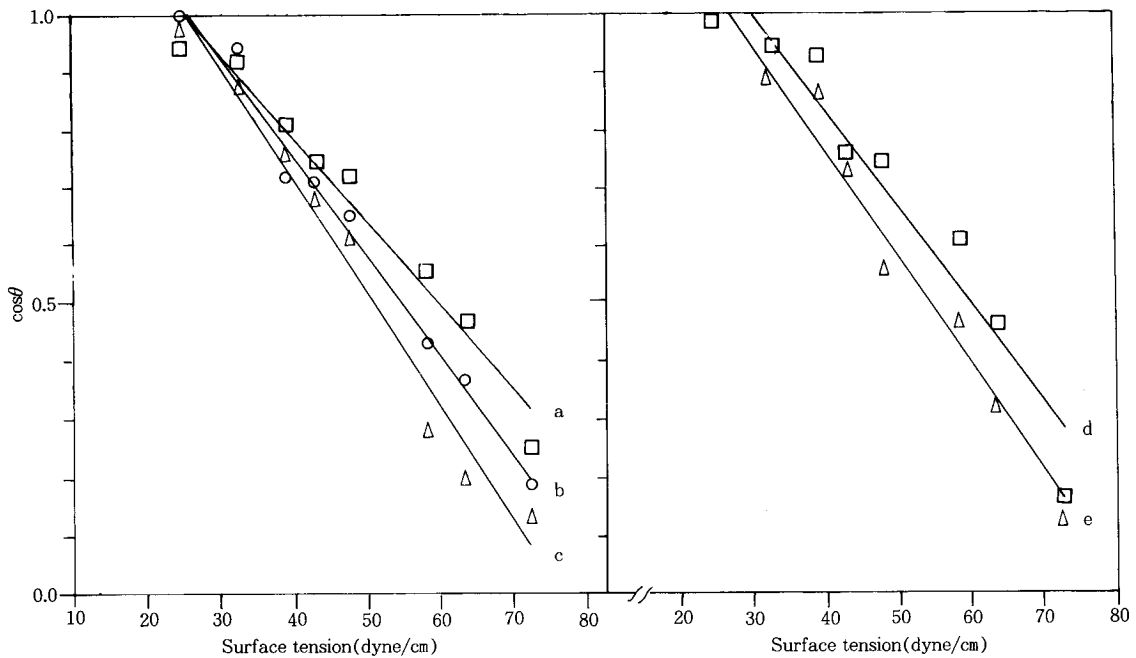


Fig. 6. Zisman plots to determine critical surface tension of various samples (a) CG-12, (b) MAC-B (c) MAG-BT, (d) CGC-121, (e) MAG-31, by linear square method ; (a) $Y = -0.0146X + 1.374128$, (b) $Y = 0.017253X + 1.447002$, (c) $Y = -0.01956X + 1.495797$, (d) $Y = -0.016691X + 1.473001$, (e) $Y = -0.018324X + 1.487358$.

Table 3. Contact Angle(θ°) and Surface Energy Parameters (mN/m) for Various Sample Surfaces

Sample	θ_{air}	θ_{octane}	W_a	I_{sw}^p	W_a^d	I_{sw}^p/W_a^d	Degree of Swelling (%) [*]
CG-12	19.0	123.3	140.3	78.4	61.4	1.27	74.6
CGC-121	26.7	117.3	136.6	73.8	62.8	1.18	67.3
MAC-B	50.0	97.6	118.5	57.3	62.2	0.94	55.1
MAC-BT	42.3	95.1	125.4	55.1	70.3	0.78	24.2
MAG-31	36.2	108.0	130.0	66.2	64.1	1.03	50.1

* In PECF

미만인 MAC-B, MAC-BT재료는 9배 이상의 값을 가졌다.

혈소판의 점착량과 I_{sw}^p/W_a^d 와의 관계를 Fig. 8에 나타내었다. A. Baszkin 등[12]은 재료표면에서의 단백질의 흡착을 방해하는 최적 I_{sw}^p/W_a^d 가 존재한다고 보고했으며 특히 R. Barbucci 등[13]은 I_{sw}^p/W_a^d 가 1.3~1.6 범위일 때 단백질의 흡착이 증진된다고 주장하였다. 본 실험에서는 I_{sw}^p/W_a^d 가 1.18일 때를 경계로 혈소판의 점착량이 감소되는 경향을 보였다. 그러나 I_{sw}^p/W_a^d 가 감소하면 혈액응고시간은 증가되는 일관된 경향을 보였다.

3. 5. 화학구조와 혈액 적합성

재료가 혈액과 접촉시 표면의 화학적 구조는 혈액 적합성에 큰 영향을 주므로 재료의 화학구조에 따른

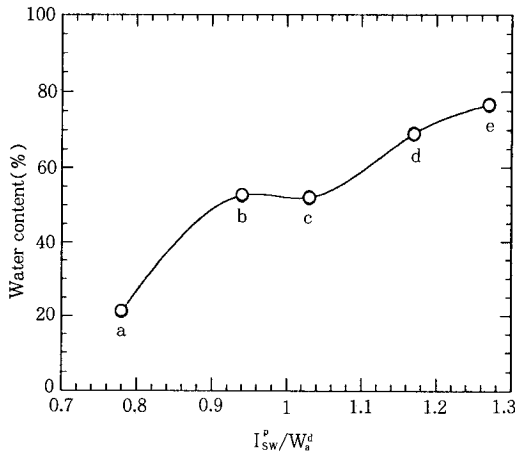


Fig. 7. Relationship between the ratio of polar and dispersive components and water content of various samples ; (a) MAC-BT (b) MAC-B, (c) CGC-121, (e) CG-12.

혈액적합성을 고찰하였다.

(CMC-젤라틴)과 [(MC-g-AA)-젤라틴] 고분자 전해질 복합체는 셀룰로오즈계의 카르복실기와 젤라틴의 아민기 등 친수성기의 영향을 받아 고함수율이므로 혈액성분과의 상호작용이 적을 것이나 반면에 이들 친수성기가 혈액 속의 단백질 분자중 카르복실기나 아미노기와 수소결합, 단백질의 해리기와 이온결합 및 단백질 분자중에 흡착되어 있는 다가금속이온과 조염작용 등을 하게 될 것이다. 이때 우선 결합되는 단백질과 다가금속이온의 종류에 따라 혈액 적합성이 달라질 것이다. 또 젤라틴은 분자쇄에 소수성 영역과 친수성 영역을 교대로 가진 블록적 거동을 나

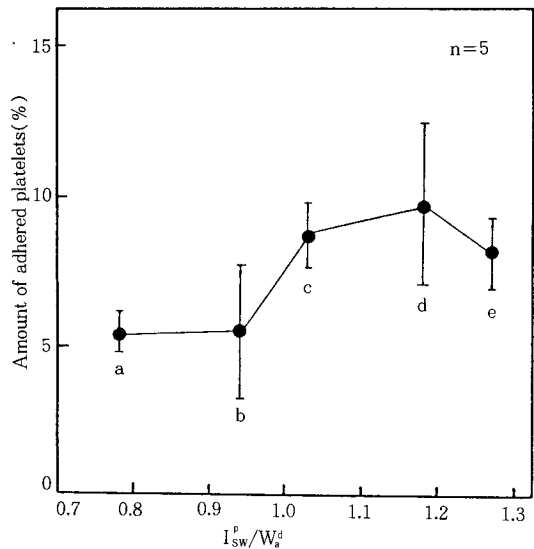


Fig. 8. Effect of the ratio of polar and dispersive components on the amount of platelets adhered on various samples : (a) MAC-BT (b) MAC-B, (c) CGC-121, (e) CG(12).

Table 4. Relationship between Polar and Dispersive Components Ration Clotting Time of Various Samples

Sample	I_{sw}^p/W_a^d	Clotting time (sec)	Clotting Time ratio*	Degree of Swelling(%)**
glass	—	398	1.0	0.0
CG-12	1.27	2109	5.3	74.5
CGC-121	1.18	2331	5.9	67.3
MAC-B	0.94	>3600	>9.0	55.1
MAC-BT	0.78	>3600	>9.0	24.2
MAG-31	1.03	2541	6.4	50.1

* Each sample/glass, ** In PECE.

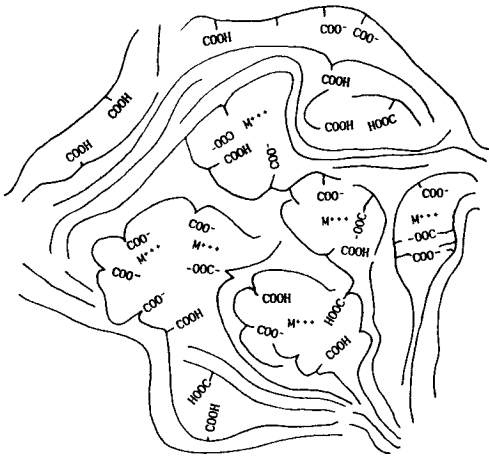


Fig. 9. Proposed model of ionically crosslinked (MC-g-AA) copolymer ; COOH : undissociated carboxyl groups, COO⁻ : ionized carboxylate groups, M³⁺ : trivalent metal ion.

타내므로 혈액 적합성의 향상에 기여하였다고 생각된다. (MC-g-AA)공중결합체는 한 unit당 분자량이 MC중의 메톡시기의 함량 28.5%, 공중합체중의 PAA의 그래프트율 15.1%이므로 공중합체 한 unit당 분자량은 PAA는 37.2, 메톡시기는 70.2이다. 수용액 속에서 공중합체중의 AA는 친수성, 메톡시기는 소수성 경향이 증가되거나 더욱이 APS로 이온가교되거나 열에 의해 자체 가교되면 소수성 경향이 증가되며 전체적으로는 친수성(고함수)이면서 친수성기와 소수성기가 혼재된 구조이다. 이온가교된 공중합체의 예상 모형도는 Fig. 9와 같다. 음이온기인 이온화 carboxylate기중 Al³⁺이온과 결합하고 있지 않는 것이 혈액속의 Ca²⁺이온과 이온가교되거나 음전하인 혈소판을 반발시켜 점착혈소판의 수가 적었다. 또 이온가교결합에 참여한 Ca²⁺이온이 혈액응고인자이고, batch시스템에서 평가가 이루어져 혈액응고시간이 크게 향상된 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서 합성한 개질 셀룰로오스 시료들의 표면특성 및 화학구조가 혈액 적합성에 미치는 영향을 검토하였다. 각 시료표면에서의 혈소판 점착량은 10

% 이내였으며 SEM에 의해 혈소판 점착을 관찰한 결과 혈액응고의 초기단계를 넘지 않았다. 각 시료와 물사이의 극성력과 분산력의 비(I_{sw}^p/W_a^d)가 0.87~1.27범위에서도 단백질의 흡착을 방해하는 최적 I_{sw}^p/W_a^d 가 존재하였다. (CMC-젤라틴) 및 [(MC-g-젤라틴)] 고분자전해질 복합체는 셀룰로오스계의 카르복실기와 젤라틴의 아민기 등의 친수성기의 영향을 받아 고함수율이므로 혈액과의 상호작용이 작았다. 또 (MC-g-AA)공중합체는 친수성인 AA와 소수성인 메톡시기가 혼재된 구조이며 가교반응 후 가교결합안된 carboxylate가 혈액과의 상호작용에 의해 혈액 적합성이 향상된 것으로 사료된다.

참고문헌

1. B. A. Brown, in "Hematology : Principles and Procedures", Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, p. 91.
2. K. Kondo, *Kobunshi*, **24**, 593 (1975).
3. J. D. Andrade, *Trans. Amer. Soc. Artif. Interm. Organs.*, **27**, 659 (1981).
4. M. D. Lelah, J. A. Pierce, L. K. Labrecht, and S. T. Cooper, *J. Colloid and Interface Sci.*, **104**, 422 (1985).
5. H. Y. Fox and W.. A. Zisman, *J. Colloid and Interface Sci.*, **7**, 109 (1962).
6. W. C. Hamilton, *J. Colloid and Interface Sci.*, **40**, 219 (1972).
7. J. D. Andrade, S. M. Ma, R. N. King, and D. E. Gregonis, *ibid.*, **72**, 448 (1979).
8. E. W. Salzman, *J. Lab. Clin. Med.*, **62**, 724 (1963).
9. A. W. Neuman and M. A. Moscarello, *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, **391**, (1979).
10. R. I. Lee and D. D. White, *Am. J. Med. Sci.*, **145**, 495 (1913).
11. R. E. Barrier, *Bull. N. Y. Acad.*, **48**, 257 (1972).
12. A. Baszkin and D. J. Lyman, *J. Biomed. Mater. Res.*, **14**, 393 (1980).
13. R. Barbucci, A. Baszkin, M. Benvenuti, M. L. Costa and P. Ferruti, *ibid.*, **21**, 443 (1987).