

폴리머 적층 시스템과 염 침출법을 결합한 3차원 다공성 인공지지체 제작

심해리*, 사민우*, 김종영*,#

*국립안동대학교 기계공학과

A Study on Fabrication of 3D Porous Scaffold Combined with Polymer Deposition System and a Salt Leaching Method

Hae-Ri Shim*, Min-Woo Sa*, Jong Young Kim*#

*Department of Mechanical Engineering, Andong National Univ.

(Received 22 December 2015; received in revised form 29 February 2016; accepted 2 March 2016)

ABSTRACT

In this study, we used a polymer deposition system, based on fused deposition modeling, to fabricate the 3D scaffold and then fabricated micro-pores on a 3D scaffold using a salt leaching method. Materials included polycaprolactone (PCL) and sodium chloride (NaCl). The 3D porous scaffolds were fabricated according to blending ratio such as PCL (70 wt%)/NaCl (30 wt%) and PCL (50 wt%)/NaCl (50 wt%). The 3D porous scaffolds were observed by scanning electron microscopy. The results showed that 3D porous scaffolds had a deposition width of 500 μm , contained a pore size of 500 μm and below 100 μm . To evaluate the 3D porous scaffolds for bone tissue engineering, we carried out the cell proliferation experiment using a CCK-8 and a mechanical strength test using a universal testing machine. In summary, the 3D porous scaffold was found to be suitable for cancellous bone of human in accordance with the result of *in-vitro* cell proliferation and mechanical strength. Thus, a 3D porous scaffold could be a promising approach for effective bone regeneration.

Key Words : Bone Tissue Engineering(골 조직 공학), Fused Deposition Modeling(열 용해 적층법), Salt Leaching Method(염 침출법), 3D Porous Scaffold(3차원 다공성 인공지지체)

1. 서 론

손상된 골 조직(bone tissue)을 재생하기 위해 3차원 인공지지체(3D scaffold) 제작에 관한 연구가 많이 수행되고 있다.^[1,2] 우리 몸의 조직 기관 중에 하나인 뼈(bone)는 크게 해면골(cancellous bone)과 피질골(cortical bone)로 이루어져 있다. 해면골은 뼈

안쪽의 골수를 지지하고 조직을 제공하는 역할을 하고, 50~90%의 공극률을 가지며 그 크기는 수 mm를 가진다. 피질골은 골 조직을 형성하고 영양분을 공급하는 혈관을 포함하고, 공극률은 30% 미만이며 공극의 직경은 1 mm 보다 작은 공극들로 이루어져 있다.^[3,4] 공극 크기와 공극률에 따라 기계적 강도가 나뉘며, 해면골은 4~12 MPa, 피질골은 130~180 MPa의 강도를 가진다고 보고되고 있다.^[5] 이러한 뼈의 구조로 인해 다공성 인공지지체를 제작하여 손상된 골 조직 재생을 돕는 연구가 활발히 이루어

Corresponding Author : jykim@anu.ac.kr

Tel: +82-54-820-5669, Fax: +82-54-820-6127

지고 있다.^[6] 이때 인공지지체는 독성이나 이물반응이 없는 생체적합성(biocompatibility) 재료를 사용해야 하고, 조직이 형성되어 자라면서 몸속에서 분해되어야 하기 때문에 생분해성(biodegradability)의 조건을 만족하는 생체재료를 이용하여야 한다. 특히 골 조직 재생을 돕기 위해 이식될 인공지지체는 적절한 기계적 강도 또한 갖추어야 한다.^[7~9]

이러한 인공지지체 제작방법에는 염 침출법(salt leaching), 가스 발포법(gas foaming), 스폰지 복제법(sponge replica), 그리고 동결건조법(freeze drying) 등이 있다.^[10~12] 이러한 제작 방법들은 높은 공극률과 다양한 공극크기를 갖는 인공지지체를 제작할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 공극이나 형상의 정밀한 설계가 어렵다는 단점이 있다. 또한 인공지지체 내부에 생성된 공극들이 3차원적인 상호연결성이 약해 세포 증식에 어려움이 따른다.^[13,14]

최근 자유 형상 제작(solid freeform fabrication, SFF)기술 기반의 3D 프린팅 기술을 적용하여 인공지지체를 제작하는 기술이 많이 개발되는 추세이다.^[15,16] 대표적인 예로 열 용해 적층법(fused deposition modeling, FDM), 선택적 레이저 소결법(selective laser sintering, SLS), 그리고 광 조형법(stereolithography, SLA) 등이 있다.^[17~19] 이러한 인공지지체 제작 기술들은 아래층 단면부터 순차적으로 적층함으로써 3차원 형태의 인공지지체를 보다 쉽고 빠르게 제작할 수 있다는 장점이 있다.^[18]

본 연구에서는 골 조직 재생을 위해 다공성 인공지지체를 제작할 수 있는 염 침출법과 그 단점을 보완하여 공극끼리의 상호연결성을 높여 줄 수 있는 3D 프린팅 기술을 접목시켜 3차원 다공성 인공지지체를 제작하고자 한다. FDM 기반의 폴리머 적층 시스템(polymer deposition system, PDS)^[20]을 사용하여 규칙적인 공극 패턴을 가지는 3차원 형상을 제작하고, 그 후에 염 침출법으로 다양한 공극 크기를 가질 수 있도록 제작한다. 이러한 다공성 구조로 인해 주변으로부터 산소와 영양분 전달이 용이해질 것으로 판단된다.^[21] 제작된 3차원 다공성 인공지지체의 형상을 관찰하기 위해 주사 전자 현미경(scanning electron microscopy (SEM), Tescan VEGA II LMU, Czech)이 이용되었다. 또한, 골 조직 재생에 적합한 지를 평가하기 위해 기계적 강도

평가와 in-vitro 세포 부착 및 증식 평가를 수행하였다.

2. 3차원 다공성 인공지지체 제작

2.1 폴리머 적층 시스템(PDS)

손상된 골 조직을 대체하기 위한 3차원 다공성 인공지지체 제작을 위해 열 용해 적층법 기반으로 개발된 PDS를 사용하였다. Fig. 1과 Table 1에 PDS의 모습과 사양을 나타내었다. 본 시스템은 X, Y, 그리고 Z축(head axis)에 정밀모션 제어 시스템이 적용되어 있으며, Z축에 디스펜서(Super ΣEX-V7, Musashi, Japan)와 서모 마스터(TCU-02, Musashi, Japan)가 연결되어 있어 압력과 온도의 제어가 가능하다. 콤프레샤(S50-50-5.5, Airssen, Korea)에서 나온 압축된 공기를 디스펜서를 통해 최대 700 kPa까지 분사할 수 있고, 온도는 서모마스터를 사용하여 최대 250°C까지 조절이 가능하다.

Table 1 Specification of PDS^[20]

	X-axis	Y-axis	Z-axis
Motor	Linear motor		AC servo motor
Encoder	Linear encoder		Rotary encoder
Resolution	1.9 nm	1.9 nm	15 nm
Accuracy	± 2 μm	± 2 μm	± 6 μm
Repeatability	± 1 μm	± 1 μm	± 5 μm

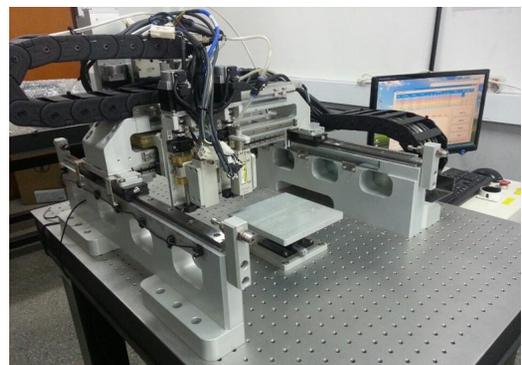


Fig. 1 The actual image of PDS

2.2 재료

3차원 다공성 인공지지체를 제작하기 위해 폴리 카프로락톤(polycaprolactone(PCL), M_n 43,000-50,000, polysciences, Inc., UK)과 염화나트륨(sodium chloride (NaCl), Sigma-aldrich Co., USA) 두 가지 재료를 혼합하여 사용하였다. 합성고분자 생체재료인 PCL은 조직 공학 분야에서 가장 널리 사용되는 생체 재료로써 생체 적합성과 생분해성을 띄고 있다.^[22] 또 녹는점이 60°C로 가공이 용이하다는 장점이 있다. 흰색 파우더 형태의 NaCl은 염 침출법을 이용한 인공지지체 제작에 가장 널리 사용되는 재료로써 독성이 없고 세포 증식 실험에 적합하다.^[23] 인공지지체를 제작함에 있어 적합한 필요조건을 갖춘 두 재료를 혼합하여 3차원 다공성 인공지지체를 제작하였다.

본 연구에서 사용된 노즐의 내경은 500 μm 로서, 평균 500 μm 입자크기를 갖는 NaCl의 혼합물을 분사하기에는 어려움이 있었다. 노즐의 막힘을 최소화하기 위해 100 μm 크기의 체(sieve)로 거른 후 제작에 임하였다.

2.3 제작 방법

3차원 다공성 인공지지체의 재료 혼합 방법 및 제작 과정을 Fig. 2에 나타내었다. 우선 pellet 형태의 PCL과 체에 걸러진 NaCl을 100°C의 hot plate위에서 혼합한 후, syringe에 넣어 PDS를 이용하여 3차원 형상의 인공지지체를 제작하였다. 이때 X, Y축의 이송 속도는 평균 200 mm/min, Z축의 재료분사 압력은 평균 500 kPa를 주어 제작하였다.

PDS에 의해 제작된 인공지지체를 45°C의 증류수가 들어있는 초음파 세척기에 3시간 동안 염 침출법 공정을 수행한 후, 24 시간 동안 30°C의 오븐(OF-12, JEIO Tech., Korea)에서 건조 시켰다(Table 2). 재료 혼합 비율에 있어서 NaCl의 함유량이 30 wt%보다 적으면 다공성 구조로 제작이 어렵고, 50 wt%보다 많을 경우 재료의 분사가 잘 이루어지지 않아 적층하는데 어려움이 있다. 재료 혼합비율은 PCL(70 wt%)/NaCl(30 wt%)과 PCL(50 wt%)/NaCl(50 wt%)로 설정하여 인공지지체를 제작하였다. 또한 다공성 구조의 효과를 관찰하기 위해 PCL로만 제작된 인공지지체와 비교하였다.

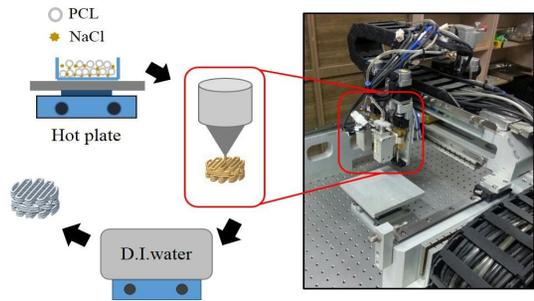


Fig. 2 A fabrication process of 3D porous scaffold

Table 2 The process condition of 3D porous scaffold by PDS and salt leaching

	PCL	Blended PCL/NaCl
Nozzle size	500 μm	
Pressure	Avg. 500 kPa	
Feed rate	Avg. 200 mm/min	
Temp.(syringe)	100 °C	120 °C
Leaching time	-	3 h
Temp.(water)	-	45 °C
Dry time	-	24 h

3. 3차원 다공성 인공지지체 평가

3.1 주사 전자 현미경 관찰

제작된 3차원 다공성 인공지지체의 형상과 공극의 형태를 관찰하기 위해 주사 전자 현미경을 이용하였다. 폴리머 재료인 인공지지체를 50 s동안 Au코팅 후에 20 kV의 가속 전압을 주어 관찰하였다. Fig. 3은 PCL, PCL(70 wt%)/NaCl(30 wt%) 그리고 PCL(50 wt%)/NaCl(50 wt%) 인공지지체의 SEM 사진을 보여 주고 있다. 3차원 형상으로 잘 제작된 것을 확인할 수 있었고, 그 선향을 확대하여 관찰해보면 염 침출법에 의해 작은 공극들이 생성된 것을 관찰할 수 있었다. 또, 인공지지체의 단면을 잘라 관찰했을 때 공극이 생성된 것을 확인할 수 있었다.

제작된 3차원 다공성 인공지지체의 공극률을 계산하여 비교해보았다.^[25] 그 계산식은 Eq. 1에 나타내었

다. V_0 는 3차원 형상의 인공지지체 부피를, ρ 는 PCL의 밀도를, m 은 NaCl이 제거된 인공지지체의 무게를 나타낸다.

$$Porosity = \frac{V_0 - \left(\frac{m}{\rho}\right)}{V_0} \times 100(\%) \quad (1)$$

PCL 인공지지체의 공극률은 약 36.9%, PCL(70 wt%)/NaCl(30 wt%)인공지지체는 약 66.9 %, PCL(50 wt%)/NaCl(50 wt%) 인공지지체는 약 82.9 %의 공극률로 계산을 통해 얻을 수 있었다. 인공지지체 내에 NaCl의 함유량이 많을수록 공극률이 높게 나타났다. NaCl이 무게비율로 혼합되어 있기 때문에 인공지지체 내에 포함되어 있는 NaCl이 많이 빠져 나가면서 높은 공극률을 나타낸 것으로 판단된다.

3.2 기계적 강도 평가

본 연구에서 제작된 3차원 다공성 인공지지체가 골과 유사한 강도를 지니는지 확인하기 위해 기계적 강도 평가를 실시하였다.

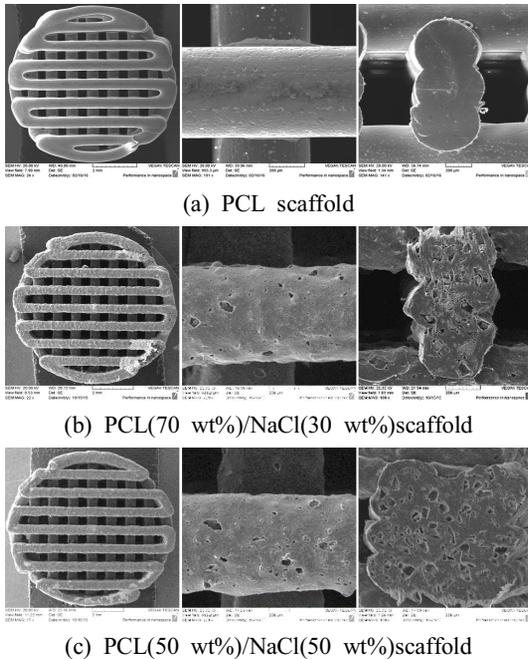


Fig. 3 The SEM images of 3D porous scaffold(left: top view, middle: line width, right: a cross section)

각각의 비율로 혼합된 인공지지체를 각각 3개씩 준비하여 압축 시험기(JSV H1000, JISC, Japan)로 하중 속도를 1 mm/min을 주어 실험을 수행하였다. 얻어진 값으로 평균값을 계산하여 응력-변형률 곡선을 그린 후 압축 강도와 압축 탄성계수를 계산하였다(Fig. 4). PCL 인공지지체의 기계적 강도가 7.2 MPa로 우수하게 나타났고, 그 다음으로 PCL(70 wt%)/NaCl(30 wt%)인공지지체가 4.8 MPa, PCL(50 wt%)/NaCl(50 wt%)인공지지체가 4.3 MPa로 나타났다(Table 3). 제작된 인공지지체는 NaCl의 함유량이 많을수록 강도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 인공지지체 내에 NaCl이 염 침출법 공정으로 제거되어 다공성 구조로 형성되면서 강도가 약해졌다. 하지만 모든 인공지지체의 강도는 인체의 해면골의 강도와 유사하게 나타나고 있어 손상된 골 조직의 대체품으로써 적합하다고 판단된다.^[25]

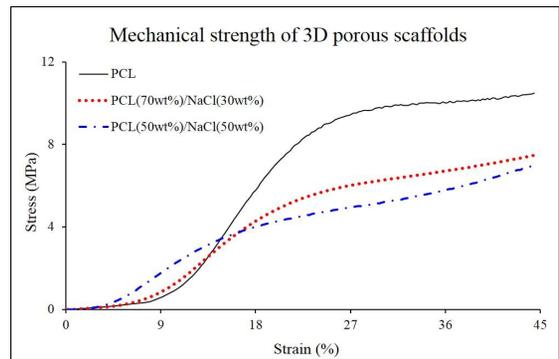


Fig. 4 Stress-strain curves for the comparison of 3D porous scaffolds

Table 3 Mechanical strength of 3D porous scaffolds

	Compressive strength	Compressive modulus
PCL	7.2 MPa	16.1 MPa
PCL(70 wt%)/NaCl(30 wt%)	4.8 MPa	8.2 MPa
PCL(50 wt%)/NaCl(50 wt%)	4.32 MPa	7.8 MPa

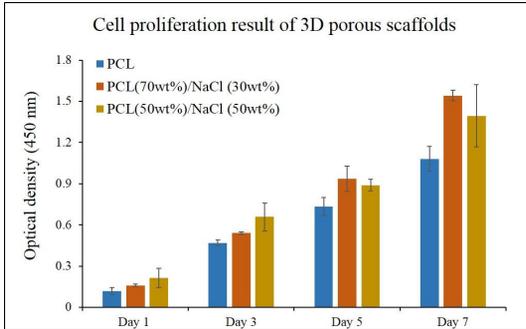


Fig. 5 The cell proliferation result of 3D porous scaffolds

3.3 세포 증식 평가 결과

손상된 골 조직에 효과적인지 평가하기 위하여 human osteosarcoma(MG-63) cell을 이용하였다. 제작된 3차원 다공성 인공지지체는 70%의 에탄올에 넣어 클린벤치에서 자외선 소독하였고, PBS(phosphate buffered saline, HyClone®, Thermo scientific, USA)를 이용하여 세척하였다. 세포 배양액으로는 450 ml DMEM(D-minimum essential medium/high glucose, HyClone, Logan, UT, USA)에 50 ml FBS(fetal bovine serum, Gibco, Rockville, MD, USA) 그리고 5 ml 페니실린(penicillin streptomycin, Sigma, St. Louis, USA)을 혼합하여 사용하였다.^[24] 배양된 세포를 세척이 끝난 인공지지체에 1×10^5 cells씩 골고루 파종한 후 1, 3, 5 그리고 7일 동안 세포 증식을 관찰하였다. CCK-8(cell counting kit-8, Dojindo, Japan)용액과 세포 배양액을 1:10의 비율로 혼합하여 배양액 대신 세포가 파종되어 있는 인공지지체에 넣어 4시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 Microreader (UVM340, Elisa, USA)를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 Fig. 5에 표기하였다. 1일 차에서 O.D(optical density) 값은 PCL 인공지지체보다 거의 유사하거나 조금 더 높은 값을 보였다. 기존의 유사한 연구 결과와 같이^[21,25] 제작된 인공지지체가 다공성 구조를 형성하면서 세포의 부착율을 크게 증가 시킬 것으로 예상했지만, 본 연구에서는 큰 차이를 나타내지는 않았다. 하지만 5일차, 7일차로 진행될수록 3차원 다공성 인공지지체들의 O.D값이 높게 나타났다. 이러한 결과는 PCL 인공지지체보다 더 높은 공극률을 가지게 되면서 주변으로

부터 산소와 영양분의 공급이 원활하게 이루어진 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 손상된 골 조직을 재생하기 위하여 열 용해 적층법 기반의 PDS와 염 침출법을 결합하여 3차원 다공성 인공지지체를 제작하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제작된 3차원 다공성 인공지지체는 SEM 분석 결과 PDS에 의해 상호연결성이 좋은 공극을 갖는 것을 확인할 수 있었고, 염 침출법에 의해 그 섹션 위에 크고 작은 공극들이 생겨 다공성 구조를 이루는 것을 관찰할 수 있었다.
2. 골 조직을 대체하기에 적합한지 확인하기 위해 기계적 강도 평가와 세포 증식 평가를 수행하였다. 그 결과 제작된 인공지지체는 인체의 해면골의 강도인 4~12 MPa에 포함되는 강도를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또, 세포 증식 평가를 통해 다공성 구조를 갖는 인공지지체가 세포 증식에 더 좋은 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

향후 3차원 다공성 인공지지체의 제작 공정을 보완하여 더 많은 공극을 갖는 인공지지체를 제작하는 연구를 수행할 계획이다. 기계적 특성은 지금의 강도를 유지하는 선에서 세포 부착율을 높일 수 있는 방안으로 인공지지체를 제작하여 기존의 방법으로 제작된 인공지지체와 비교하는 연구를 수행하고자 한다.

후 기

“이 논문은 2013년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업지원에 의하여 연구되었음.” (NRF-2013R1A1A4A01010936)

REFERENCES

1. Ohgushi, H., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I.,

- “Heterotopic Osteogenesis in Porous Ceramics Induced by Marrow Cells,” *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 7, No. 4, pp. 568-578, 1989.
2. Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P. and Quarto, R., “Tissue Engineering and Cell Therapy of Cartilage and Bone,” *Matrix Biology*, Vol. 22, No. 1, pp. 81-91, 2003.
 3. Bao, C. L. M., Teo, E. Y., Chong, M. S., Liu, Y., Choolani, M. and Chan, J. K., “Advances in Bone Tissue Engineering,” *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, pp. 599-614, 2013.
 4. Karageorgiou, V. and Kaplan, D., “Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis,” *Biomaterials*, Vol. 26, No. 27, pp. 5474-5491, 2005.
 5. Whang, K., Healy, K. E., Elenz, D. R., Nam, E. K., Tsai, D. C., Thomas, C. H., Nuber, G. W., Glorieux, F. H., Travers, R. and Sprague, S. M., “Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture,” *Tissue engineering*, Vol. 5, No. 1, pp. 35-51, 1999.
 6. Jamalpoor, Z., Mirzadeh, H., Joghataei, M. T., Zeini, D., Bagheri-Khoulenjani, S. and Nourani, M. R., “Fabrication of Cancellous Biomimetic Chitosan-based Nanocomposite Scaffolds Applying a Combinational Method for Bone Tissue Engineering,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 103, No. 5, pp. 1882-1892, 2015.
 7. Sheridan, M. H., Shea, L. D., Peters, M. C. and Mooney, D. J., “Bioabsorbable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Capable of Sustained Growth Factor Delivery,” *Journal of Controlled Release*, Vol. 64, No. 1-3, pp. 91-102, 2000.
 8. Yang, S., Leong, K. F., Du, A. and Chua, C. K., “The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors,” *Tissue engineering*, Vol. 7, No. 6, pp. 679-689, 2001.
 9. Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M. and Gough, J. E., “Scaffolds and Biomaterials for Tissue Engineering: a Review of Clinical Applications,” *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, Vol. 28, No. 3, pp. 165-172, 2003.
 10. Lee, S. B., Kim, Y. H., Chong, M. S., Hong, S. H. and Lee, Y. M., “Study of Gelatin-containing Artificial Skin V: Fabrication of Gelatin Scaffolds using a Salt-leaching Method,” *Biomaterials*, Vol. 26, No. 14, pp. 1961-1968, 2005.
 11. Kim, H. J., Park, I. K., Kim, J. H., Cho, C. S. and Kim, M. S., “Gas Foaming Fabrication of Porous Biphasic Calcium Phosphate for Bone Regeneration,” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 9, No. 2, pp. 63-68, 2012.
 12. Ho, M. H., Kuo, P. Y., Hsieh, H. J., Hsien, T. Y., Hou, L. T., Lai, J. Y. and Wang, D. M., “Preparation of Porous Scaffolds by using Freeze-extraction and Freeze-gelation Methods,” *Biomaterials*, Vol. 25, No. 1, pp. 129-138, 2004.
 13. Mikos, A. G. and Temenoff, J. S., “Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering,” *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 3, No. 2, pp. 23-24, 2000.
 14. Park, S. A., Lee, J. H. and Kim, W. D., “Development of Biomimetic Scaffold for Tissue Engineering,” *Elastomers and Composites*, Vol. 44, No. 2, pp. 106-111, 2009.
 15. Jeong, H. J., Jee, M. H., Kim, S. Y. and Lee, S. J., “Measurement of the Compressive Force on the Knee Joint Model fabricated by 3D Printing,” *Journal of the Korean Society of Manufacturing Process Engineers*, Vol. 13, No.2, pp. 1-7, 2014.
 16. Park, J. H., Jang, J. and Cho, D. W., “Three-Dimensional Printed 3D Structure for Tissue Engineering,” *Trans. Korean Soc. Mech. Eng. B*, Vol. 38, No. 10, pp. 817-829, 2014.
 17. Pati, F., Song, T. H., Rijal, G., Jang, J., Kim, S. W., and Cho, D. W., “Ornamenting 3D Printed Scaffolds with Cell-laid Extracellular

- Matrix for Bone Tissue Regeneration,” *Biomaterials*, Vol. 37, pp. 230-241, 2015.
18. Lee, J. W., Kim, J. Y. and Cho, D. W., “Solid Free-form Fabrication Technology and Its Application to Bone Tissue Engineering,” *International Journal of Stem Cells*, Vol. 3, No. 2, pp. 85-95, 2010.
19. Sa, M. W. and Kim, J. Y., “Design of Multi-scaffold Fabrication System for Various 3D Scaffolds,” *Journal of Mechanical Science and Technology*, Vol. 27, No. 10, pp. 2961-2966, 2013.
20. Sa, M. W. and Kim, J. Y., “Effect of Various Blending Ratios on the Cell Characteristics of PCL and PLGA Scaffolds Fabricated by Polymer Deposition System,” *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, Vol. 14, No. 4, pp. 649-655, 2013.
21. Jeon, H. A., Lee, S. W. and Kwon, O. H., “Fabrication of Poly(γ -glutamic acid) Porous Scaffold for Tissue Engineering Applications,” *Journal of the Korean Society of Manufacturing Process Engineers*, Vol. 13, No. 3, pp. 35-41, 2014.
22. Martina, M. and Hutmacher, D. W., “Biodegradable Polymers Applied in Tissue Engineering Research: a review,” *Polymer International*, Vol. 56, No. 2, pp. 145-157, 2007.
23. Hou, Q., Grijpma, D. W. and Feijen, J. “Porous Polymeric Structures for Tissue Engineering Prepared by a Coagulation, Compression Moulding and Salt Leaching Technique,” *Biomaterials*, Vol. 24, No. 11, pp. 1937-1947, 2003.
24. Shim, J. H., Lee, J. S. and Kim, J. Y. “Fabrication of Solid Freeform Fabrication based 3D Scaffold and Its In-vitro Characteristic Evaluation for Bone Tissue Engineering,” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 9, No. 1, pp. 16-23, 2012.
25. Cho, Y. S., Hong, M. W., Kim, Y. Y. and Cho, Y. S., “Assessment of Cell Proliferation in Salt-leaching using Powder(SLUP) Scaffolds with Penetrated Macro-pores,” *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 131, No. 9, 2014.