[UCI]I804:24011-200000256991

2012년 2월

碩士學位論文

플라즈마 표면 개질된 키토산-젤라틴 고분자지지체 제조 및 생체적합성 평가

조선대학교 대학원

치의학과

이 우 근

플라즈마 표면 개질된 키토산-젤라틴 고분자지지체 제조 및 생체적합성 평가

Evaluation of biocompatibility and preparation of plasma surface modified chitosan-gelatin scaffolds

2012年 2月 24日

조선대학교 대학원

치의학과

이 우 근

플라즈마 표면 개질된 키토산-젤라틴 고분자지지체 제조 및 생체적합성 평가

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2011年 10月

조선대학교 대학원

치의학과

이 우 근

이우근의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 최 한 철 印

위 원 조선대학교 조교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교 수 고 영 무 印

2011年 11月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT v

제 1장 서 론 1

제 2장 실험재료 및 방법 3

제 1절 실험재료 3

제 2절 젤라틴-키토산 고분자지지체 제조 4

제 3절 플라즈마 표면개질 4

제 4절 고분자지지체 표면분석 7

제 5절 팽윤도 및 생분해도 7

제 6절 조골모세포 배양 8

제 7절 MTT 분석 8

제 3장 실험결과 9

제 1절 고분자지지체의 표면특성 9

제 2절 고분자지지체의 물성특성 13

제 3절 고분자지지체의 조골모세포 증식 17

제 4장 고찰 19

제 5장 결론 21

참 고 문 헌 22

LIST OF Tables

Table 1. Monomers used plasma polymerization and polymeric thin layers polymerized on porous gelatin-chitosan scaffold 6

Table 2. The conditions of plasma polymerization reaction.. 6

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Structure of natural polymers. (a) Chitosan (DD = 75 85%),(b)Gelatin. 3

Fig. 2. Schematic diagram of RF plasma deposition system.. 5

Fig. 3. FE-SEM photomicrographs of the GA-CH scaffold (a) GA-CH scaffold, (b) cross linked GA-CH scaffold, (c) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (d) AAm plasma treated GA-CH scaffold. 11

Fig. 4. ATR-FTIR spectra of GA-CH scaffold, cross-linked GA-CH scaffold, AAc and AAm plasma treated GA-CH scaffold. 12

Fig. 5. Swelling ratio of (a) GA-CH scaffold, (b) cross linked GA-CH scaffold, (c) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (d) AAm plasma treated GA-CH scaffold. 15

Fig. 6. Biodegradation ratio of GA-CH scaffold, cross-linked GA-CH scaffold, AAc and AAm plasma treated GA-CH scaffold. 16

Fig. 7. Cell proliferation of control, (a) cross linked GA-CH scaffold, (b) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (c) AAm plasma treated GA-CH scaffold. 18

ABSTRACT

Evaluation of biocompatibility and preparation of plasma surface modified chitosan-gelatin scaffolds

Woo-Geun Lee, D.D.S, M.S.D
Advisor : Prof. Yeong-Mu Ko, Ph.D., DDS
Department of Dental Science
Graduate School of Chosun University

Chitosan-gelatin formulations to be useful for tissue regeneration and clinical applications they must be biocompatible and possess favorable mechanical properties. Plasma surface modification can be used to improve the surface properties by creating functional groups to produce bioactive materials with different surface topography. In this study, chitosan-gelatin scaffolds were prepared via the freeze-drying technique. To improve cell proliferation, the scaffolds were then hydrophilized through plasma polymerization of acrylic acid (AAc) and allylamine (AAm). The chemical structure and morphology of chitosan-gelatin scaffold were investigated by ESCA, FTIR and SEM. Osteoblast like cell (MC3T3-E1) was seeded onto the prepared scaffolds *in vitro* to assess their biocompatibility. The AAc and AAm treated porous scaffolds were effective for cell proliferation, making them a suitable platform for tissue engineered applications.

제 1 장 서 론

고분자 다공성 지지체는 창상치유, 화상치유, 약물전달 및 손상조직 재생을 위한 지지체로서 널리 이용되고 있다[1]. 특히 손상된 조직의 재생을 위한 지지체는 소량의 조직편으로부터 추출, 분리한 세포를 충분한 양으로 배양하는데 적합한 구조와 물리적 안정성이 요구되며 체내이식후 부작용이 나타내지 않는 생체 적합성과 생분해성을 가지고 있어야 한다[2]. 따라서 세포의 재생과 성장을 효과적으로 실현하기 위한 생분해성 지지체는 조직세포가 지지체의 표면에 점착하여 3차원 구조의 조직을 형성할 수 있는 다공성 구조를 가져야 하며 이상적인 다공성 지지체는 100-200 μm 크기의 공극이 서로 연결된 구조를 형성함으로서 수분과 세포성장인자 등의 이동이 용이하고 세포의 부착과 성장에 적합하여야 한다[3]. 현재 조직 재생용 다공성 지지체의 제조에 이용되고 있는 고분자 재료로는 콜라겐, 젤라틴, 알지네이트 및 키토산 등의 천연고분자 재료와 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리 ε-카프로락톤, 폴리오르쏘에스테르, 폴리글리콜산, 폴리락트산 및 이들의 공중합체 등의 합성고분자 재료가 사용되고 있다[4-8].

고분자 다공성 지지체를 제조하기 위하여 동결건조법[9-14], 염 침출법[15] 등이 일반적으로 널리 사용되고 있다. 이 방법을 이용하면 90-95% 다공도가 있는 잘 발달된 다공성구조의 지지체를 제조할 수 있다.

키토산은 게나 가재, 새우 껍데기에 들어있는 키틴을 탈아세틸화하여 얻어진 선형 다당류이고, 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose가 β(1→4)결합으로 이루어진 구조를 가지고 있으며, D-Glucosamine(2-amino-2-deoxy-D-glucose)의 β-(1→ 4)중합체이다. 또한 생체적합성, 생분해성, 비항원성 및 흡착 특성 때문에 의용재료로 널리 사용되고 있다[16-20].

젤라틴은 콜라겐의 가수분해에 의하여 얻어진 수용성 단백질이며, 저렴한 가격, 우수한 생체적합성, 생분해성, 낮은 면역원성, 세포부착, 이동, 증식, 분화가 우수한 장점들로 인하여 조직공학에서 생체재료로서 널리 이용되고 있다. 또한 젤라틴은 세포부착 및 이동을 증진시키는 Arg-Gly-Asp (RGD)와 같은 아미노산 서열을 가지고 있어서 생물학적 활성을 향상시키기 위하여 키

토산과 혼합되어 사용되고 있다 [21,22]. 젤라틴의 뼈대는 자유 카르복실기로 이루어져있으며, 이것은 수소결합에 의해 네트워크 형태로 양이온 키토산과 혼합되게 만든다.

다공성 고분자 지지체 표면의 젖음 성질을 향상시키기 위하여 기계적인 처리, 습식 화학적 처리, 코로나 방전, 상압 및 저압 플라즈마법과 같은 여러 가지 표면처리법이 개발되어 왔다[23-25]. 이러한 표면처리법은 표면의 오염물을 제거하고, 고분자표면을 거칠게 한다. 또한 재료표면의 전하와 표면에너지를 변화시켜 표면활성을 증가시킨다. 그러나 고분자표면화학의 개질에 대한 많은 연구가 발표되었음에도 불구하고, 복잡한 3D 조직공학 고분자 지지체에 적용할 수 있는지는 항상 관심이 많은 주제로 남아있다[26].

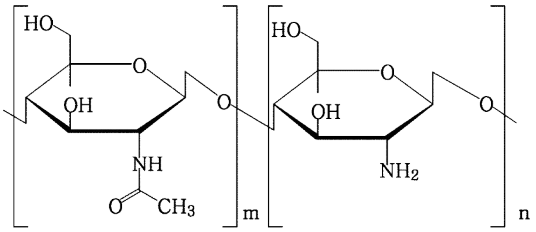
플라즈마 표면처리 기술은 다양한 재료들의 표면특성을 변화시키는데 편리한 방법이다[27-29]. 재료표면에 고분자사슬의 그래프팅과 기능성의 도입으로 고분자표면의 투과성과 접착특성을 향상 시킨다[30,31]. 엄밀히 말하면 플라즈마 표면처리는 고분자 지지체의 세포 친화성을 향상시키는 유용한 방법이다. 저압 플라즈마는 고분자막의 표면처리를 하는데 가장 일반적인 방법이다[32]. 이 방법은 고분자의 균일한 표면개질을 하는 건식 표면처리법이다. 또한 이 방법은 자유 라디칼 형성, 에칭 및 고분자 분해, 가교결합을 포함한 물리적, 화학적 변화를 일으킨다[33,34]. 게다가, 처리된 고분자표면의 수명도 고려되어야 한다. 고분자 표면처리의 단점은 무정형 지역에서 고분자 사슬의 이동성 때문에 시간이 진행됨에 따라 표면 재구축이 개질된 표면에서 일어난다는 점이다[35,36]. 플라즈마 처리 후 고 결정성은 표면 근처의 고분자 분자들의 회전 및 병진운동이 제한될 때 고분자 사슬의 표면 재배열이 감소되고, 그 결과 처리된 표면의 노화속도를 감소시킨다[35,36].

따라서 본 연구에서는 동결건조법을 이용하여 다공성 젤라틴-키토산 고분자 지지체를 제조하여, RF 상온 플라즈마 표면처리법을 이용하여 지지체의 표면에 반응기를 코팅하여 고분자 지지체의 물성 및 세포 적합성을 향상시키고자 하였다. 또한 고분자 표면에 코팅한 폴리 아릴아민과 폴리 아크릴산 고분자막이 조골모 세포(MC3T3-E1)의 증식에 미치는 영향을 평가 하였다.

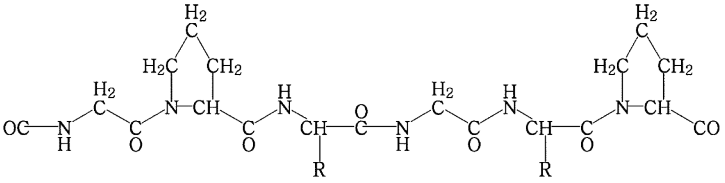
제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 실험재료

다공성 지지체를 제조하기 위한 기본 천연고분자 소재로서 키토산(75~85% 탈아세틸화, 점도; 5-20 cps), 젤라틴을 각각 Showa Chem. Inc. (Kyoto, Japan), Sigma-Aldrich Co. (Mo, USA),Japan)에서 구입하여 사용하였고 본 실험에서 사용한 천연고분자의 화학구조를 Fig. 1에 나타내었다. 가교제로 사용된 EDC는 Sigma-Aldrich Co. (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 시약 및 용매는 일급 또는 특급시약을 그대로 사용하였다.



(a)



R=glycin-X-Y triplet

X and Y are frequently proline and hydroxy proline

(b)

Fig. 1. Structure of natural polymers. (a) Chitosan (DD=75-85%), (b) Gelatin.

제 2 절. 젤라틴-키토산 고분자지지체 제조

키토산 및 젤라틴으로 구성된 다공성 고분자지지체를 제조하기 위하여 2% (w/v) 키토산 수용액과 2% (w/v) 젤라틴 수용액을 각각 제조하였다. 이때 키토산은 3% (v/v) 아세트산 수용액에 용해하였다. 2% (w/v) 의 농도로 제조한 키토산 수용액과 젤라틴 수용액은 2:1의 부피 비율로 총량이 5 ml가 되도록 혼합하고 고속교반기를 사용하여 10,000 rpm에서 10분간 교반 후 기포를 제거하기 위하여 4 ℃에서 12 시간동안 숙성하였다. 고분자 가교결합을 위하여 혼합 용액 5 ml에 0.3% (W/v) EDC 수용액에 혼합하고 1시간 동안 교반하였다. 최종적으로 제조된 혼합용액을 12 well 배양용기의 각각의 well에 붓고 -20 ℃에서 냉동시킨 후 동결건조기를 사용하여 3일간 건조하였다. 동결 건조된 고분자지지체에 남아있는 아세트산을 제거하기 위하여 에탄올 (100%, 70%, 50%)를 사용하여 순차적으로 중화시키고 건조하였다. 다시 phosphate-buffered saline (PBS)로 세 번 세척한 후 동결 건조하였다.

제 3 절. 플라즈마 표면개질

Fig. 2는 플라즈마마트(UM1000134-001A Mini plasma station, PLASMART, Korea)에서 구입한 감압 RF플라즈마 증착장비의 구성도를 나타내었다. 다공성 고분자지지체 표면을 증착하기위한 단량체는 아크릴산(Acrylic acid; 98% Sigma-Aldrich, USA)과 아릴아민(Allyl amine; 98% Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였고, Table 1.에 정리하여 나타내었다. 시료표면의 클리닝이나 활성화를 부여하기 위한 시료표면의 전처리는 산소(O_2)가스를 유속 50sccm, 플라즈마 방전세기는 150W 로 200sec 동안 시행하였다. 플라즈마중합반응은 각각의 단량체를 3.5sccm 유속으로 플라즈마 반응기 안에 도입하고 50W에서 5분간 반응시킨 후 3차 증류수로 세척한 후 진공오븐에서 건조 시켰다. 플라즈마중합 반응조건을 Table. 2에 정리하여 나타내었다.

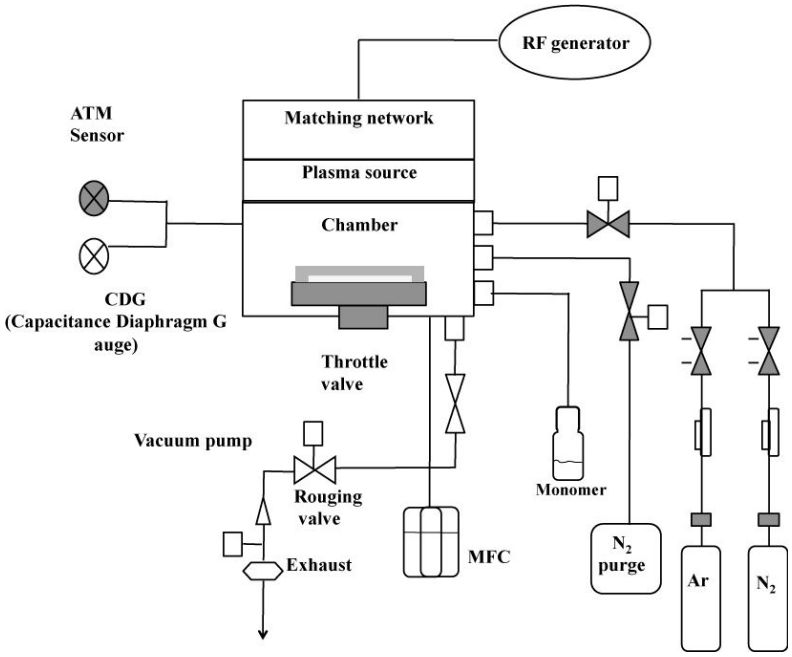


Fig. 2. Schematic diagram of RF plasma deposition system.

Table 1. Monomers used plasma polymerization and polymeric thin layers polymerized on porous gelatin-chitosan scaffold

Monomers	Polymeric thin layers
Acrylic acid	Poly acrylic acid (PAA)
Allyl amine	Poly allyl amine (PAAm)

Table 2. The conditions of plasma polymerization reaction.

Process factors	Reaction conditions
Discharge power	50W
System pressure	100mtorr
Deposition time	5 min

제 4 절. 고분자지지체 표면분석

다공성 고분자지지체의 스펀지 마이크로구조와 고분자 박막표면의 형상을 관찰하기 위하여 전계방출주사전자현미경 (FE-SEM; S-4800, Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 가속전압 5-25 kV의 조건으로 관찰하였다.

고분자지지체의 고분자 사슬간의 결합형성 여부를 관찰하기 위하여 전반사 퓨리에 변환 적외선분광기(ATR-FTIR; IFS66V/S & HYPERION 3000, Bruker Optiks, Germany)를 이용하여 분석하였다.

제 5 절. 팽윤도 및 생분해도

고분자지지체의 수분흡수도는 pH 7.4, 37℃에서 PBS용액에 담근 후 무게 변화로 평가하였다. 지지체의 초기무게 (W_0)를 측정한 후 24시간 동안 담근 후 꺼내어 필터종이로 표면에 묻어있는 수분을 제거 한 후 다시 무게를 측정하였다.

수분흡수도 (swelling ratio; 팽윤도)는 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{Swelling ratio } (W_{sw}) = (W_{24h} - W_0) / W_0 \times 100 \ (\%)$$

Swelling ratio was expressed as mean ±S.D. (n = 3).

이때 W_0: 초기 건조한 고분자지지체 시료의 무게이고, W24h는 24시간 후 젖은 고분자지지체 시료의 무게이다.

제 6 절. 조골모세포 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% CO_2가 공급되는 37℃ CO_2 incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

제 7 절. MTT 분석

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS를 이용하여 세척하였으며 trpsin/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℃, 5% CO_2 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 μL씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 3 장 실험결과

제 1 절. 고분자지지체의 표면특성

Fig. 3은 대조군 다공성 지지체, 가교처리 다공성 지지체, 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체 각각의 표면 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다. Fig. 3(a)에 나타난 대조군 다공성 지지체의 표면은 막으로 둘러싸인 매끄러운 표면위에 타원형의 기공을 갖는 구조를 보이고, Fig. 3(b)에 나타낸 EDC 가교처리 다공성 지지체의 표면은 100-200 μm 크기의 기공이 형성된 구조를 보였다. Fig. 3(c)에 나타낸 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체의 표면은 표면의 일부가 폴리 아크릴산 막에 덮여져 있는 형태로 기공이 아주 작아지거나 거의 발견되지 않았다. Fig. 3(d)는 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체의 표면으로 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체의 표면(fig. 3(c))보다는 미세기공이 표면에 잘 발달되어 분포된 것을 관찰 할 수 있다.

Fig. 4는 대조군 다공성 지지체, 가교처리 다공성 지지체, 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체 각각을 ATR-FTIR 분광 분석한 결과를 나타낸 것이다. 키토산과 젤라틴의 2성분으로 제조된 다공성 고분자 지지체의 스펙트럼에서 1654 cm-1의 아미드 I피크, 1549 cm-1의 아미드 II, 1406 cm-1의 카르복실기의 신축진동 피크, 1100 cm-1의 에스터 결합 피크를 확인하였다. EDC 가교처리 다공성 지지체, 아크릴산 플라즈마 처리 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체의 스펙트럼을 대조군 다공성 고분자 지지체의 스펙트럼과 비교하였을 때 새롭게 생성되거나 사라진 피크는 발견되지 않았다. EDC 가교처리 다공성 고분자 지지체에서 에스테르 결합에 의한 피크가 증가하고 카르복실기에 의한 피크의 크기가 감소하는 것은 젤라틴의 카르복실기와 키토산의 아민기 사이에 EDC를 이용한 가교반응에 의해 아미드 결합이 생성되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 플라즈마 표면개질된 다공성 고분자 지지체의 고분자 사슬 결합 피크는 EDC

가교처리 다공성 고분자 지지체의 피크와 거의 유사함을 알 수 있었다. 결과적으로 EDC 가교처리 다공성 지지체의 분자구조는 가교제의 화학결합에 의하여 변화된 것을 알 수 있었고, 아크릴산, 아릴아민 플라즈마 표면처리에 의한 부분적인 아미드 결합 또는 카르복실 이중결합으로 피크를 확인 할 수 있었다.

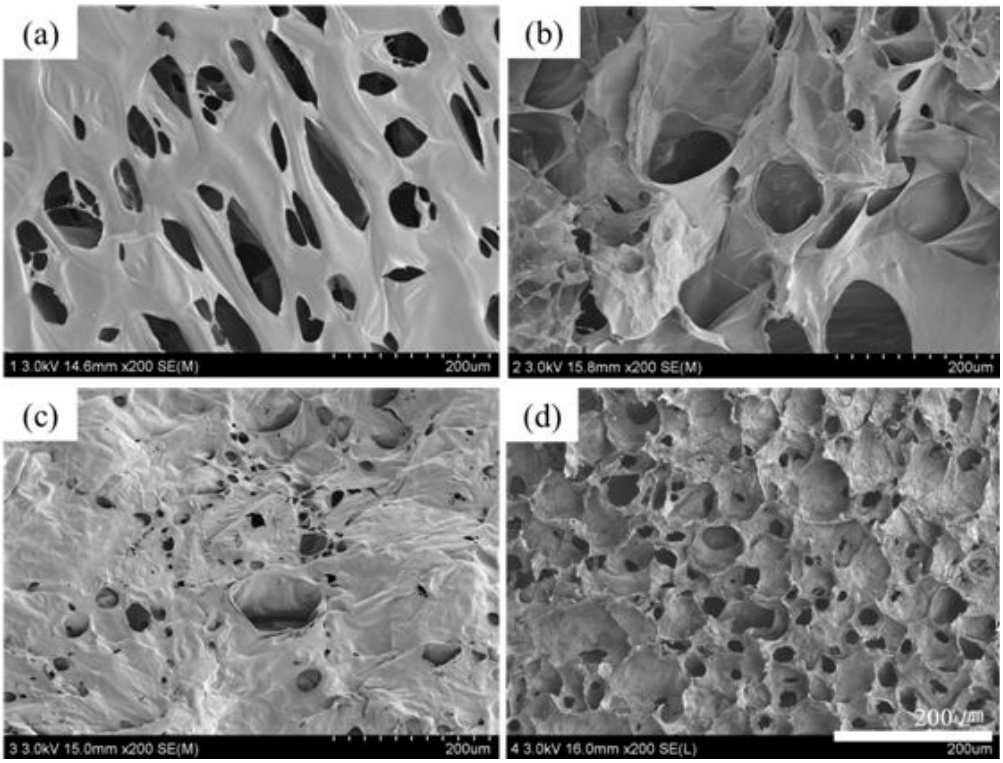


Fig. 3. SEM photomicrographs of the GA-CH scaffold (a) GA-CH scaffold, (b) cross linked GA-CH scaffold, (c) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (d) AAm plasma treated GA-CH scaffold.

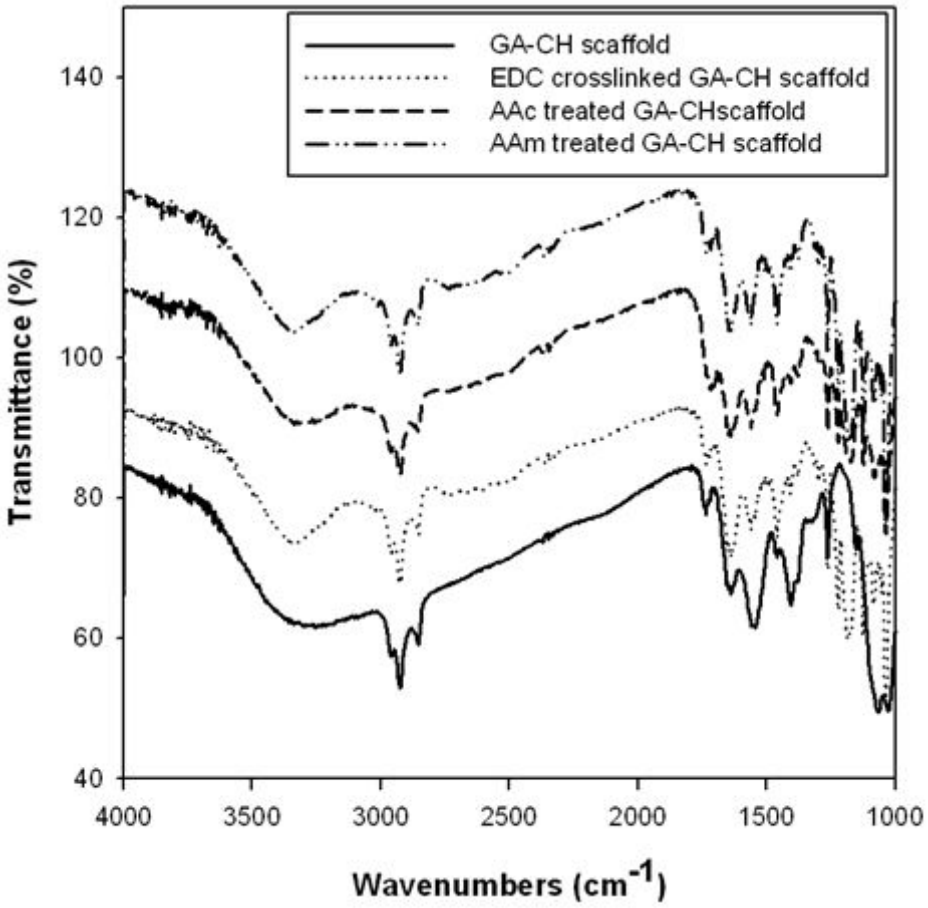


Fig. 4. ATR-FTIR spectra of GA-CH scaffold, cross-linked GA-CH scaffold, AAc and AAm plasma treated GA-CH scaffold.

제 2 절. 고분자지지체의 물성특성

다공성 지지체의 수분흡수력 (팽윤도)은 생체 내에 이식된 다공성 지지체가 주변세포를 수용할 수 있는 능력을 결정하는 중요한 지표로 이용된다. 본 연구에서는 각각의 다공성 지지체를 37 ℃에서 PBS용액에 침지하여 24시간 후의 무게를 측정하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5는 대조군 다공성 지지체, 가교처리 다공성 지지체, 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체 각각의 수분흡수도를 나타내었으며 대조군의 수분흡수도는 EDC 가교처리와 플라즈마 표면처리 된 다공성 지지체의 수분흡수도에 비하여 거의 약 2배 이상의 수분흡수력을 나타내었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 EDC 가교결합으로 인하여 지지체의 친수화도가 감소되었기 때문으로 사료된다. 한편 아크릴산 및 아릴아민 플라즈마 표면 처리된 다공성 지지체는 지지체 표면을 고분자막으로 막아버려서 지지체 내부로 수분의 이동을 방해하며 지지체의 수분흡수가 용이하지 않아 수분흡수도가 감소된 것으로 사료된다. 특히 아크릴산 플라즈마 처리한 다공성 지지체의 수분흡수도가 가장 낮게 나타났는데, 이것은 fig 3(c)에서 관찰 된 것처럼 지지체 표면의 기공이 거의 없어서 수분의 이동이 거의 없었던 것으로 생각된다.

다공성 고분자 지지체의 수분에 대한 생분해도를 조사하기 위하여 각각의 다공성 지지체를 37 ℃에서 PBS용액에 14일 동안 침지하여 4일 간격으로 시료를 채취하여 무게를 측정하였고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 대조군 다공성 지지체는 PBS용액 내에서 생분해도가 가장 높게 나타났다. 이것은 고분자 사슬 간에 가교결합이 없어서 가장 빨리 용해된 것으로 사료된다. 14일째에는 다공성 지지체 형태를 관찰할 수 없었다. 그러나 아크릴산 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체는 14일째에도 어느 정도 지지체의 형태를 유자하고 있음이 관찰 되었다. 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체는 생분해도가 가장 낮게 나타났는데, 이것은 표면구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 비록 친수성 고분자인 아크릴산이 표면에 코팅되어 친수성의 특성을 보이지만 기공이 거의 없어서 지지체 내부까지 PBS용액이 이동되지

않은 것으로 사료된다. 한편 EDC 가교처리 다공성 지지체는 EDC에 의해 활성화된 키토산과 젤라틴이 카르복실 공유결합을 형성하면서 고분자 사슬간의 가교결합을 형성하여 수분에 의해 덜 용해되지 않은 것으로 생각된다. 조골세포는 다공성 지지체의 내부벽면에 부착한 후 증식하여 일정한 형태와 기능을 갖춘 조직으로 형성된다. 따라서 다공성 지지체는 조직이 형성되면서 생분해될 수 있어야 하나 세포가 부착하고 증식하는 동안 혈액이나 수분에 의해 급격히 분해되지 않고 형태를 유지하여야 한다. 따라서 EDC 가교처리 또는 플라즈마 표면 처리는 PBS용액에 의해 급격히 분해되지 않고 조골세포가 부착되고 증식하는 동안 안정한 형태를 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

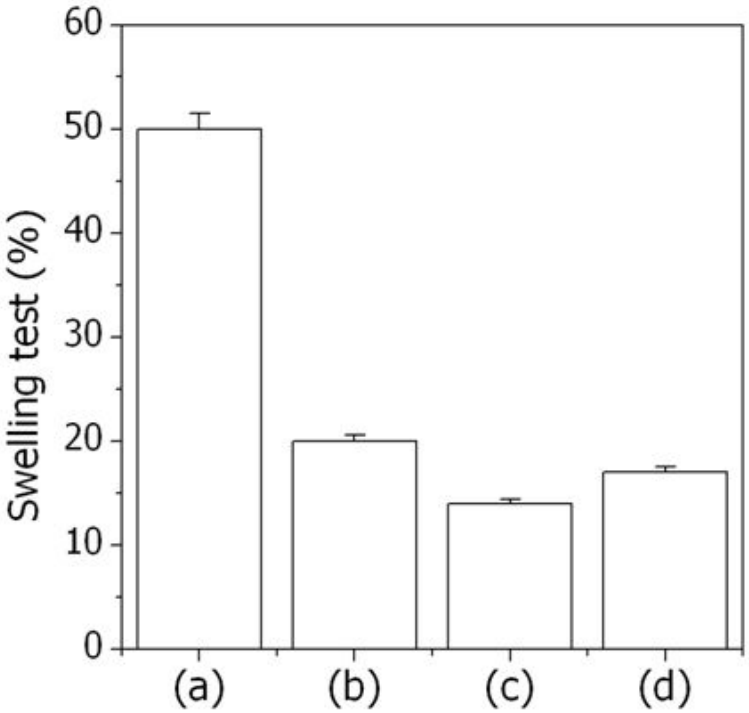


Fig. 5. Swelling ratio of (a) GA-CH scaffold, (b) cross linked GA-CH scaffold, (c) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (d) AAm plasma treated GA-CH scaffold.

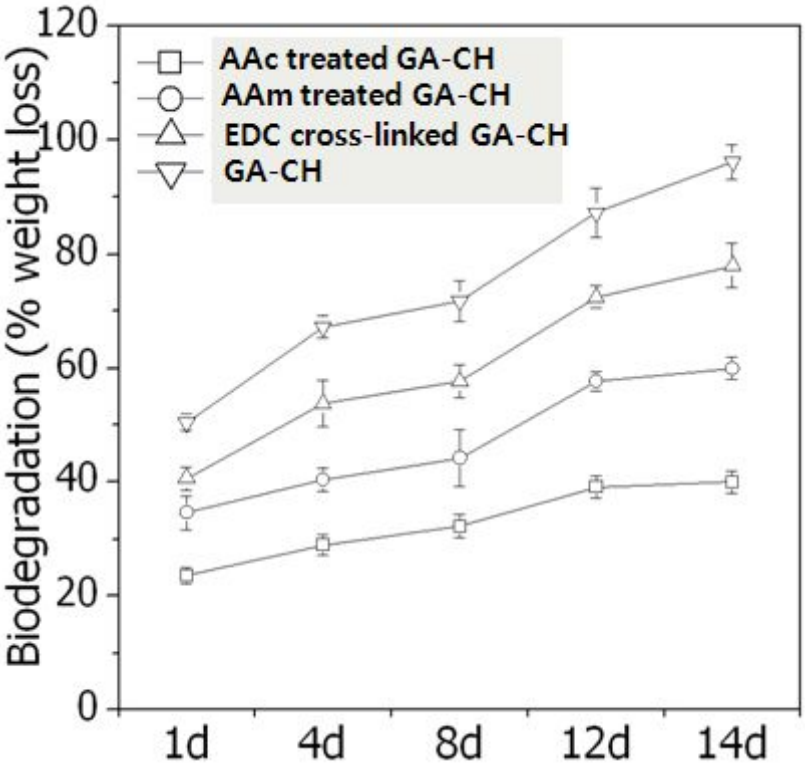


Fig. 6. Biodegradation ratio of GA-CH scaffold, cross-linked GA-CH scaffold, AAc and AAm plasma treated GA-CH scaffold.

제 3 절. 고분자지지체의 조골모세포 증식

Fig. 7은 세포배양용기 (대조군), EDC 가교처리 다공성 지지체 (a), 아크릴산 플라즈마 처리 다공성 지지체 (b) 및 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 지지체 (c) 각각에 조골모세포 (MC3T3-E1)세포를 1일, 2일, 3일 동안 배양하여 세포증식률을 MTT법으로 분석하여 나타낸 결과이다. 세포증식율 (세포생존율)은 대조군에 대한 비율로 나타내었고, 여기서 대조군은 세포배양용기에서 배양한 조골모세포의 생존율이다. 초기 1일째 세포부착단계는 아릴아민 플라즈마 표면 처리된 다공성 지지체의 세포 증식율에 가장 높게 나타났다. 이것은 아민기가 초기 세포부착에 큰 영향을 미친다는 기존의 영구보고와 일치하는 결과이다. 하지만 배양 2일째에서는 아크릴산 플라즈마 표면 처리된 다공성 지지체의 세포 증식율에 가장 높게 나타났는데, 이는 아크릴산 고분자 막이 친수성이 높고 다공성 지지체 표면에 기공이 잘 발달한 표면구조 때문에 세포증식 속도가 빨라졌을 것으로 생각된다. 결과적으로 EDC 가교처리 다공성지지체보다는 지지체표면에 플라즈마를 이용하여 반응기를 코팅한 실험군에서 조골세포의 증식이 잘 이루어지고 있음을 확인하였다.

향후 조직공학용 다공성 고분자 지지체 혹은 생체막 등에 본 연구에서 사용된 플라즈마 표면처리법을 응용하면 세포부착 및 증식에 유리한 표면을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

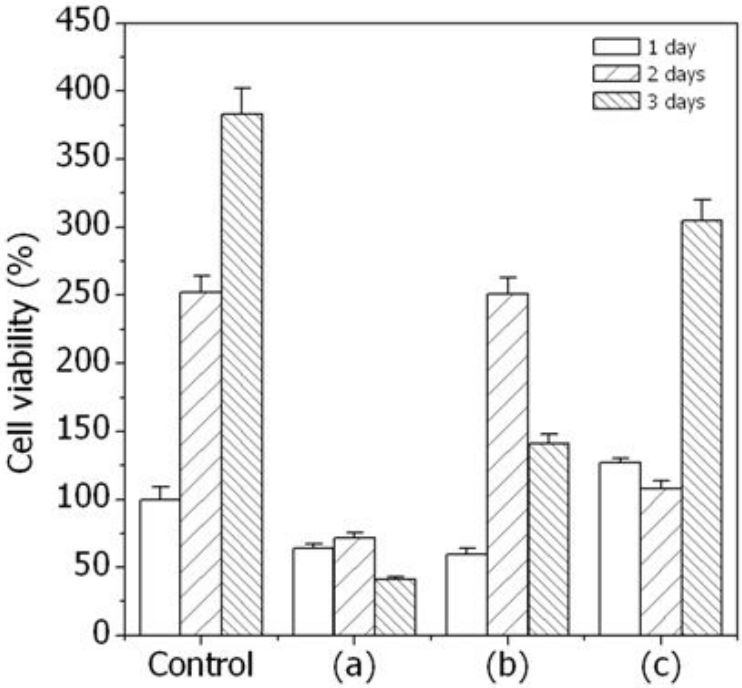


Fig. 7. Cell proliferation of control, (a) cross linked GA-CH scaffold, (b) AAc plasma treated GA-CH scaffold, (c) AAm plasma treated GA-CH scaffold.

제 4 장 고찰

동결건조는 지지체에 존재하는 용매를 승화시킴으로써 지지체의 형태를 유지한 상태에서 건조시키는 방법으로서, 지지체 용액을 동결시키는 과정에서 형성된 지지체 표면 막에 기공을 형성시킨다. 지지체에 형성된 기공은 지지체 내부로 필요한 세포와 영양분을 이동시키는 이동로 역할을 한다. 따라서 다공성 지지체 표면에 기공이 없을 경우에는 세포와 영양분의 이동이 용이하지 않아 세포증식이 원활하지 못한 문제점이 야기 된다[37]. 그러므로 다공성 지지체 내부로 세포와 영양분의 이동이 원활하게 해주기 위해서는 다공성 지지체 표면에 많은 기공을 형성시켜야 한다.

플라즈마 중합은 인공 장기들의 생체적합성 향상에 응용될 수 있는데, 두 가지 측면으로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 생체적합성이 우수한 poly(ethylene oxide)나 헤파린 등을 그래프팅 할 수 있도록 화학적으로 반응성이 강한 박막을 코팅시키는 것으로서, 높은 밀도의 아민기를 포함하고 있는 플라즈마 고분자가 이 목적에 적합한 것으로 알려져 있다[38,39]. 두 번째는 그 자체가 생체적합성이 좋은 박막을 코팅하는 것이다. 혈액성분들의 흡착은 피 흡착체의 표면에너지가 Baier's window로 알려진 20-30 mJ/m^2내에 있을 때 가장 약한 접착력을 가지며, 접착력이 약하면 흡착된 단백질들이 변성되기 전에 새로운 단백질들로 교체됨으로써 platelet의 성장이 둔화된다고 알려져 있다[40]. 하지만 플라즈마 고분자의 생체적합성은 화학 조성보다는 잘 발달된 3차원 구조로 가교되어 있는 구조적 안정성에 기인하다는 견해도 있다[41].

생체재료의 표면 젖음성은 세포부착 거동을 결정하는데 가장 중요한 요소 중에 하나이다. Tamada 등은 70° 정도의 접촉각을 갖는 고분자표면이 세포부착에 가장 적합하다고 하였으나, 이 표면은 상업적으로 이용 가능한 고분자를 사용하여 제조되었을 뿐, 표면의 거칠기, 전하 등의 요인들은 전혀 고려되지 않았던 상황이었다[42]. Lee 등은 코로나방전으로 제조된 젖음성 표면을 갖는 폴리에틸렌표면에 대한 세포부착을 조사하였는데, 55° 접촉각에서 가장 세포부착이 우수한 것으로 나타났다[43]. 본 연구에서는 RF 플라즈마 중

합반응을 이용하여 다공성 고분자 지지체 표면에 -COOH, $-NH_2$를 갖는 고분자 박막을 성공적으로 코팅하였고, 카르복실그룹이 있는 표면은 조골세포의 우수한 증식능력을 보여주었다. 아민그룹 표면이 MC3T3-E1 조골모 세포주의 초기증식에 효과가 있는 이유로는 접촉각의 영향과 아민기가 세포외기질의 integrin과의 반응성 때문이라고 사료된다. 향후 다양한 반응기를 갖는 고분자박막을 다공성 고분자 지지체에 코팅하여 조골모세포의 Focal adhesion 또는 세포분화에 미치는 영향을 분자생물학적으로 조사하여 초기증식에 미치는 조골모 세포반응 메카니즘과 발현단백질을 규명하여 골세포로 가는 메카니즘 어떤 영향을 미치는가를 조사해 나가야 할 것으로 사료된다.

제 5 장 결론

다공성 젤라틴-키토산 고분자 지지체를 동결건조법을 이용하여 성공적으로 제조하였고, 다공성 고분자 지지체의 물성과 세포적합성을 평가하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. EDC 가교처리 다공성 지지체의 공극의 크기는 세포가 조직을 형성하기 위해 적당한 100~200 μm인 연속적인 열린 구조를 나타내는 것을 확인하였다.
2. EDC 가교처리는 고분자 사슬 간에 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 형성하였다.
3. EDC 가교처리, 아크릴산, 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 고분자 지지체는 생분해도가 무 처리 다공성 지지체에 비하여 월등히 우수하였다.
4. 아크릴산, 아릴아민 플라즈마 처리 다공성 고분자 지지체표면은 조골모세포의 증식에 좋은 표면을 제공하였다.

이상과 같은 결과로부터 본 연구에서 제조된 플라즈마 표면 개질된 젤라틴-키토산 고분자 지지체는 조골세포의 부착 및 증식에 우수한 다공성 지지체라고 사료된다. 향후 플라즈마 표면개질 기술을 의료용 소재 및 조직공학용 고분자 지지체 표면처리에 응용이 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

[1] Lee SB, Joen HW, Lee YW, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam S, Ahn HC, Biomaterials 24 (2003)2503.

[2] Pierre S, Xavier R, Basil DF, Biomaterials 25 (2004) 5965.

[3] Shin HW, Kim SH, Jang JW, Kim MS, Cho SH, Lee HB, Khang KS, Polymer (Korea) 28 (2004)194.

[4] Jeon EK, Whang HJ, Kang GG, Lee I, Rhee JM, Lee HB, Polymer (Korea) 25 (2001) 893.

[5] Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS, Int. J. Bioed. Mater. Res. 23 (1999) 631.

[6] Yilmaz G, Jongboom ROJ, Feil H, Hennink WE, Carbohyd. Polym. 45 (2001) 403.

[7] Choi MS, Han HD, Kim TW, Song CK, Park ES, Shin BC, J. Kor. Pharm. Sci. 35 (2005) 25.

[8] Caren C, Bernd WM, Int. J. Pharm. 194 (2000) 229.

[9] Mooney DJ, Karfmann PM, Sano K, Mcnamara KM, Vacanti JP, Langer R, Transplant proc. 26 (1994)3425.

[10] Kaufmann PM, Heimarath S, Kim BS, Mooney DJ, Cell transplant 6 (1997) 463.

[11] Qiang LV, Feng QL, Hu K, Cui FZ, Polymer 46 (2005) 12662.

[12] Madihally SV, Matthew HWT, Biomaterials 20 (2004)1133.

[13] Khanna HJ, Klein MD, Matthew HWT, Annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology-proceedings 2 (2000)1259.

[14] Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, Kalpan DL, Biomaterials 26 (2005) 2775.

[15] Hutmacher DW. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12 (2001) 107.

[16] Hirano S, In: El-Gowely MR, editor. Biotechnology annual review, 2 Amsterdam: Elsevier Science; (1996) 237.

[17] Muzzarelli RAA, Mattioli-Belmonte M, Pugnaloni A, Biagini G, Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing. EXS 87 (1999) 251.

[18] Thein-Han WW, Sathirakul K, Nosoongnoen W, Chandrkrachang S, Ng C.-H, Stevens WF, Chitosan as matrix for nasal delivery of peptide drug (insulin). In: Suchiva K, Chandrkrachang S, Methacanon P, Peter MG, editors. Advances in chitin science, vol. V.Bangkok: National Metal and Materials Technology Center; (2002) 674.

[19] Thein-Han WW, Drug Dev. Ind. Pharm. 30 (2004)397.

[20] Muzzarelli RAA, Baldassare V, Conti F, Ferrara P, Biagini G,Gazanelli G, Biomaterials 9 (1988) 247.

[21] Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, Yao KD, Biomaterials 24 (2003)1067.

[22] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Mahidally SV. Biomaterials 26 (2005) 7616.

[23] Mutel B, Grimblot J, Dessaux O, Goudmand P, Surf. Interface Anal. 30 (2000) 401.

[24] Chen-Yang YW, Liao JD, Kau JY, Huang J, Chang WT, Chen CW, Macromol. 33 (2000) 5638.

[25] Gupta B, HilbornJ, HollensteinC, Plummer CJG, Houriet R, Xanthopoulos NJ, Appl. Polym. Sci. 78 (2000) 1083.

[26] Croll TI, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ, Biomacromolecules 5 (2004) 463.

[27] Webb K, Hlady V, Tresco PA, J. Biomed. Mater. Res. 41 (1998) 422.

[28] Shelton RM, RasmussenAC, Davies JE, Biomaterials 9 (1988) 24.

[29] Tahara M, Cvong NK, Nakashima Y, Surf. Coat. Technol. 174 (2003) 826.

[30] Greene G, Yao G, Tannenbaum R, Langmuir 19 (2003) 5869.

[31] Grace JM, Gerenser LJ, J. Disper. Sci. Technol. 24 (2003) 305.

[32] Cioffi MOH, Voorwald HJC, Mota RP, Mater. Character. 50 (2003) 209.

[33] Gavrilov N, Yakusheva D, Kondyurin A, J. Appl. Polym. Sci. 69 (1998)1071.

[34] Bag DS, Kumar VP, Maiti S, J. Appl. Polym. Sc.i 71 (1999) 1041.

[35] Murakami T, Kuroda S-I, Osawa Z, J. Colloid Interface Sci. 202 (1998) 37.

[36] Kim KS, Ryu CM, Park CS, Sur GS, Park CE, Polymer 44 (2003) 6287.

[37] Choi, Y. S.; Lee, S. B,; Hong S. R.; Lee, Y. M.; Song, K. W.; Park M. H. J, Mater. Sci. 12 (2001) 67.

[38] Gancarz I, Bryjak J, Pozniak G, Tylus W, European Polymer J. 39 (2003) 22174.

[39] López-Santos C, Francisco Y, José C, Agustín R G, Sur. & Coat. Technol. 205 (2011) 3356.

[40] Zhou J, Yuan J, Zang X, Shen J, Lin S, Colloids & Surf. B: Biointerfaces 41 (2005) 55.

[41] Lakshmi GBVS, Dhillon A, Avasthi DK, Siddiqui AM, Zulfequar M, Mater. Lett. 64 (2010) 1672.

[42] Tamada Y, Ikada Y, J. Colloid. Interface Sci. 155 (1993) 334.

[43] Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB, J. Colloid. Interface Sci. 205 (1998) 323.