

생체 의료용 고분자 개발

Development of Biomedical Polymer

생체적합성이 개선된 인공심장용 재료의 개발

Development of Biocompatible Material for Artificial Heart

연구 기관

서울대학교 의과대학

의공학연구소

과 학 기 술 처



제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "생체 의료용 고분자 개발" 과제의 (세부과제 "생체 적합성이 개선된 인공심장용 재료의 개발" 과제의) 최종 보고서로 제출합니다.

1993년 8월 31일

주관연구기관명:	서울의대 의공학연구소
총괄연구책임자:	민 병 구
연 구 원:	이 윤 신 김 철 생 신 인 선 김 종 원 최 진 욱 유 규 하 이 규 백 김 기 준 정 찬 일
협동연구기관명:	(주) 녹십자의공
협동연구책임자:	고 영 환

요 약 문

I. 제 목

생체적합성이 개선된 인공심장용 재료의 개발

II. 연구개발의 목적및 중요성

본 연구는 완전히 이식 가능한 이식형 인공 심장을 개발하기 위하여 생체적합성이 우수한 재료의 개발을 최종 목표로 하며, 연구의 1 단계중 1 차년도에서는 인공 심장의 재료로서 기계적 물성이 뛰어나고, 혈액적합성이 상대적으로 우수한 폴리우레탄 표면에 대하여 혈관 내피 세포의 배양 및 혈전 분해 효소를 고정화하기 위한 최적의 방법을 확립하는 것을 목표로 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

당해년도에는 지렁이의 일종인 *lumbricus rubellus*로부터 추출해낸 강력한 혈전 분해효소이며 높은 역가와 안정성을 지니는 롬부로키나제를 기계적 물성이 뛰어나고, 혈액적합성이 상대적으로 우수한 폴리우레탄 표면에 도입하는 방법을 개발하여 1차적으로는 인공심장의 재료로 사용할 수 있게하고 더 나아가서 다른 순환계 인공장기

용 생체재료에 응용할 수 있도록 하였으며 또한 혈관내피세포를 폴리우레탄 표면위에 적합하게 배양하는 방법을 개발하여 고분자 표면의 혈관내피세포화에 필요한 기초 연구를 시행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

당해년도 연구 결과를 바탕으로 동물 실험용 인공 심장을 처리하여 처리한 표면의 내구성 및 In vivo 혈액 적합성을 시험할 예정이다. 본 연구는 기본적으로 비교적 혈류속도가 빠른 상황에서 혈액 적합성의 향상을 목표로 하기 때문에, 각종 순환계 인공 장기 중에서 혈류 전단 응력이 높은 경우에 효과적으로 활용될 수 있으리라 예상된다. 따라서, 동맥용 인공 혈관이나 인공 심장 판막 등에도 적용 가능하리라 예상된다. 본 연구 결과는 협력 연구기관인 (주)녹십자의공에서 각종 고분자 재료로 제작된 의료용 장기에 적용 가능하도록 상품화가 추진 중이다.

목 차

제 1 장 서 론	6
제 1 절 연구 개발의 필요성	6
제 2 절 현재까지의 연구 개발의 현황	8
제 3 절 연구 개발의 목적과 범위	11
제 2 장 연구 추진 방법 (실험방법)	12
제 1 절 혈전분해효소의 고정화	12
1. 서 설	12
2. 림부로키나제의 고정화	13
3. 효소가 고정된 표면의 특성 분석	15
4. 고정화된 효소의 정량적 분석 및 활성화도 측정	15
5. 혈액적합성 시험	17
제 2 절 혈관내피세포의 배양 및 부착능 평가	22
1. 서 설	22
2. 세포외 기질을 이용한 혈관내피세포의 배양	23
3. 높은 전단응력하에서의 혈관내피세포의 부착능 평가	26
제 3 장 연구 결과 및 고찰	35
제 1 절 림부로키나제가 고정화된 폴리우레탄 표면	35
1. 표면 특성	35
2. 고정화된 효소의 정량 및 활성화도	36

3. 혈액적합성	39
제 2 절 혈관내피세포가 부착된 폴리우레탄 표면	70
1. 섬유아세포 제거 방법에 따른 혈관내피세포의 성장 차이	70
2. 혈관내피세포의 부착능	71
제 4 장 결론	84
제 5 장 참고 문헌	86
제 6 장 국제 협력 과제	90
(과제명: 인공심장의 국부 혈전 형성 방지를 위한 항혈전제 방출 고분자의 합성 및 조절)	
제 1 절 국제협력사업의 필요성	90
제 2 절 추진방법	91
제 3 절 성과 및 기대 효과	92
제 4 절 결론	95
제 5 절 수집된 정보 및 참고문헌	96

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 필요성

인공심장이 실용화되면 많은 환자들의 생명을 유지시키는데 큰 기여를 하게되어 그 가치는 무엇으로도 판단할 수 없이 크다할 것이다. 한편 우리나라의 경우에도 서울대학병원의 경우 연간 550명의 개심수술환자가 수술을 받았으며 전국적으로는 1500여명이 이 수술을 받은 것으로 보고되고 있으나 실제로 이러한 심장질환 환자는 연간 약 10,000여명에 달하고 있으며 이중 약 10%이상이 인공삼장이 완성될 경우 우선 그 혜택을 받을 수 있는 것으로 믿어지고 있다. 특히 우리나라의 경우 서구에 비해 심장질환에 대한 관심이 적어 조기 진단이 거의 이루어지지 않고 있으며 질병이 발견되는 환자들 중 많은 사람들에서 이미 심장상태가 많이 악화되어 있기 때문에 인공심장의 필요성이나 그 수요는 외국보다 더욱 절실하다고 할 수 있다.

생체 재료란 각종 의료용 기구 및 체내이식용 인공 장기로 사용하기위하여 개발된 인공 재료들을 포함하는 포괄적인 개념을 가진 용어이다. 현재까지 개발된 생체 재료에는 고분자 재료, 금속, 세라믹, 탄소, 재조합된 천연 조직과 고분자 복합체 등이 있으며, 생체와 접촉하게 되는 생체 재료의 특성상 우수한 생체적합성 및 체내안정성이 필수적으로 요구된다.

생체 재료는 혈액과 반응하여 혈액 응고 기전을 활성화시켜 트롬빈을 형성시키며, 이는 다시 혈소판 응집과 방출 작용을 유발한다. 최종적으로 트롬빈은 피브리노젠을 피브린으로 활성화하여 피브린 응괴를 형성시킨다. 이러한 혈액 응고 기전은 혈관

내피 세포로부터 분비되는 prostacyclin 이나 protein C 의 활성화같은 많은 응고 억제 기전에 의하여 조절될 수 있다. 또한 생성된 혈전은 혈관 내피 세포에 의해 분비되는 tissue-plasminogen activator (t-PA) 에 의해 분해된다. 혈장 단백질 중에서 C1-inhibitor, alpha 1-antitrypsin, alpha 2-macroglobulin, heparin cofactor II, antithrombin III (AT III) 등은 혈전 형성에 대한 억제 인자로 작용한다. 생체 재료와 혈액의 접촉에 따라 유발되는 염증 반응은 재료와 생체의 면역 보체 체계사이의 상호 작용에 따라 결정된다. 면역 보체는 혈장내에 19 종류의 단백질들로 구성되어 있으며, 생체를 다른 개체의 세포나 감염 인자, 여러 이 물질들의 침입으로부터 보호하는 역할을 하고 있다. 면역 보체는 이들 외부 침입 항원들을 monocyte, lymphocyte, polynuclear leucocyte 등의 면역 세포들로 하여금 제거하게 한다. 생체 재료가 혈액에 노출되면 면역 보체의 활성화 기전이 시작되며, 일련의 연속적인 반응을 거쳐 C3a 와 C5a 같은 염증 반응의 중간자들이 형성된다. 이때 재료의 특성에 따라 보체 활성화의 초기 반응은 classical 혹은 alternative pathway 로 진행된다. 두 가지 pathway 모두 효소 복합체인 C3 amplification convertase 를 생성하며, 계속해서 common effector pathway 로 반응이 진행된다.

인공 심장이나 인조 혈관등과 같은 순환 장기용 재료들은 우수한 혈액적합성이 부가적으로 필요하다. 이들 순환 장기용 재료들이 갖추어야 할 특성으로는 혈액과 접촉시에 혈전의 형성을 최대한 억제해야 하며, 면역 반응이나 각종 염증 반응들을 유발하지 않아야 한다 (1). 폴리우레탄은 기존의 의료용 인공 재료들에 비하여 우수한 기계적 물성과 생체적합성을 갖고 있어 인조 혈관, 혈액 필터, 카테타 (catheter), 심장 판막, 인공 심장등과같은 순환 장기용 재료로 널리 사용되고 있는 재료중의 하나이다 (2). 현재까지 많은 고분자 재료들이 의료용으로 개발되어 있으나 어떤 재료도 완전한 생체적합성을 나타내고 있지는 못하다. 따라서, 인공 심장을 개발하기 위하여서는 필수적으로 혈액 적합성이 우수한 고분자 재료를 개발해야 한다. 본 과제에서는 기계적 물성이 우수한 폴리우레탄 표면을 적절히 개질함으로써 혈액 적합성이 우수한 고분자 재료를 개발하고자 한다.

제 2 절 현재까지의 연구개발 현황

일반적으로 생체 재료는 표면의 친수성 정도에 비례하여 혈전의 형성 정도가 감소된다고 알려져 있다. 따라서 재료 표면에 친수성 기의 도입을 통한 혈액적합성의 향상에 관한 많은 연구가 현재 수행되고 있다. 친수성 기로는 hydroxyethyl methacrylate 와 acrylamide 나 hydrogel 등을 폴리우레탄 재료 표면에 결합시키거나 (3,4), poly (ethylene oxide) (PEO) 기를 도입함으로써 재료 표면의 친수성을 향상시킨다 (5-7). PEO 사슬이 표면에 도입된 경우 혈액 성분들은 PEO로 인한 입체 장애 및 삼투압에 대한 반발 효과에 의하여 표면에 접근하기가 어렵다고 알려져 있다.

Nojiri (5) 등은 2-hydroxyethyl methacrylate (A)와 styrene (B) 을 포함하는 ABA-타입 공중합체를 합성하여 폴리우레탄 (Biomer) 인조 혈관에 응용하였다. 공중합체에는 친수성 및 소수성 부위가 표면에 일정하게 배열되는 미세 상분리 구조를 나타내며, 개의 복부 대동맥에 이식하여 본 결과 혈전의 형성을 유발하는 혈장 단백질의 흡착이 현저하게 감소되었다.

혈액은 체내의 건강한 혈관 내면을 통과할 때, 응고 현상없이 정상적인 기능을 유지하는 사실로 보아, 혈관 내피 세포는 가장 완벽한 혈액적합성을 나타낸다고 볼 수 있다. 따라서 혈관 내피 세포를 생체 재료 표면에 도입함으로써 혈액적합성을 향상시키고자하는 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 인조 혈관의 경우 혈관 내피 세포의 도입은 혈관의 혈액적합성을 향상시키기 위하여 흔히 사용되는 방법이다. 이러한 관점에서 볼 때, 연구의 대부분은 인조 혈관의 내면에 대한 혈관 내피 세포의 부착에 초점이 모아지고 있다. 혈관 내피 세포의 부착을 위해서는 크게 두가지 접근 방법이 있는데, 첫째는 혈관 내피 세포에 대한 친화력이 있는 재료를 합성하는 것이고, 둘째는 혈관 내피 세포가 잘 점착되도록 생체 재료의 표면을 처리하는 방법이다. Herring (8) 등은 현재 임상적으로 사용되고 있는 인조 혈관용 재료인 poly (ethylene terephthalate) (Dacron) 와 extended poly (tetrafluorethylene) (e-PTFE) 내면에 혈관 내피 세포가 섞인 전혈로 인

조 혈관을 처리하여 세포의 부착을 유도하였다. Van Wachem (9) 등은 methacrylate 고분자를 처리하여 표면의 친수화 정도 및 표면 전하를 조절하고, 이에 대한 혈관 내피 세포의 부착능을 평가하였다. 실험 결과 중간 정도의 친수성을 띠는 재료에 혈관 내피 세포가 가장 많이 부착되었다. 또다른 방법으로는 혈관 내피 세포의 점착을 유도하는 물질을 생체 재료 표면에 전처리하여 세포의 점착을 향상시킨다. 세포의 점착을 유도하는 물질들로는 fibronectin (10, 11), fibrinogen (11), collagen 과 laminin (12) 등이 있으며, 이들 물질을 처리한 후의 혈관은 처리 전에 비하여 혈관 내피 세포에 대한 친화력이 향상되어 많은 세포들이 점착되어 있음을 알 수 있다. 최근의 연구 결과 (13)에 따르면 혈관 내피 세포막의 체외 기질 (extracellular matrix) 단백질이나 세포막 항원에 대한 항체를 이용하여 혈관 내피 세포를 도입할 수 있다고 보고되어 있다. 생체 재료 표면에 도입된 항체가 최대한 세포의 부착을 유도하기 위해서는 항체의 Fc-fragment가 재료 표면에 흡착되게하여 Fab-fragment가 세포막과 결합될 수 있도록 해야 한다. 이때 재료 표면의 항체와 혈소판 사이의 반응은 최소화하여야 한다.

생체 재료에 알부민을 전처리하게 되면 혈소판의 점착이 현저하게 감소되어 혈전의 형성이 억제된다고 보고되어 있으며, 이는 "albumin passivation" 이라 알려져 있다 (14, 15). 흡착된 알부민이 혈류에 따른 전단 응력을 받아 탈착되는 단점을 보완하기 위하여 Ryu (16) 등은 폴리우레탄 표면에 알부민을 공유 결합 하였다. 공유 결합된 알부민은 전단 응력에 대하여 안정하였으며, 효과적으로 혈전 유발 혈장 단백질의 흡착 및 혈소판의 점착을 억제함으로써 혈전의 형성을 최소화하였다. Munro (17) 등은 생체 재료와 혈액의 계면에서 역학적으로 흡착되는 단백질의 교환이 일어나 신선한 알부민 층이 형성되면 혈전의 형성을 억제할 수 있다고 가정하고, 폴리우레탄을 포함하는 다양한 생체 재료 표면에 알킬기 (alkyl chain) 를 도입하였다. 단백질 흡착 실험 결과 알킬기가 도입된 생체 재료 표면에서 알부민의 흡착이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다. 적혈구의 외막은 혈액적합성이 있다고 알려져 있으며, 세포 외막의 주 성분은 표면의 극성기로서 phosphorylcholine 을 포함하는 lecithin 과 sphingomyelin 같은 지질들로 구성

되어 있다. 이러한 사실로부터 Chapman (18-21) 등은 phosphorylcholine 을 포함하는 생체 재료는 혈액적합성이 있다고 판단하고, phosphorylcholine 의 반응기인 히드록시기 혹은 카르복시기를 재료 표면에 고정화하는 방법을 고안하였다. 이와 유사한 연구가 Ishihara 등에 의해 이루어 졌으며, 이들은 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) 와 n-butyl methacrylate 를 사용하여 MPC 양을 변화시켜가며, 공중합체를 합성하였다 (22). 혈소판 점착 실험 결과 MPC 의 양이 커질수록 혈소판의 점착량이 감소하는 사실로부터 이들은 혈전 형성의 억제에 phosphorylcholine 이 기여한다고 판단하였다.

생체 재료의 혈액적합성은 혈액과 재료사이의 반응을 억제하는 물질을 재료 표면에 고정화함으로써 향상될 수 있다. 유로키나제나 스트렙토키나제같은 섬유소 용해 효소들을 생체 재료에 고정화시키면 고정화된 효소의 섬유소 용해 활성으로 인해 혈전의 형성이 방지 된다 (23, 24). 프로스타글란딘은 세포막과 연관된 adenylyl cyclase 를 자극하여 혈소판의 점착과 응집을 방지한다고 알려져 있으며, 프로스타글란딘 I₂ 를 생체 재료에 고정화함으로써 혈소판의 점착 정도가 크게 감소하였다 (25). 혈전 형성의 억제를 위하여 항응고제인 헤파린을 생체 재료에 결합시키는 연구도 현재 많은 연구 그룹에서 수행되고 있다. 헤파린에는 항응고 활성이 있을 뿐만아니라 면역 보체 (complement) 의 활성을 억제하는 성질도 있다. 헤파린 처리에는 헤파린을 결합시키는 방법에 따라 물리적 혹은 화학적 처리로 나눌 수 있으며, 화학적 처리는 다시 이온 결합과 공유 결합으로 분류된다. 헤파린 처리 후 혈액에 노출되면 갑자기 많은 양의 헤파린이 방출되는 현상 ("burst effect") 을 방지하기 위하여 화학적 처리중에서 공유 결합 방법에 관하여 많은 연구가 되고 있다 (26, 27). Okano (28, 29) 등은 폴리우레탄 표면에 친수성기인 PEO 를 매개체로하여 헤파린을 고정화하였다. PEO 와 헤파린을 동시에 결합시킨 경우 헤파린의 활성과 PEO 의 상승 작용으로 인하여 PEO 나 헤파린만을 처리한 경우에 비하여 혈액 응고 시간이 크게 연장됨이 관찰되었다. Hennink (30, 31) 등은 알부민과 헤파린의 결합체를 생체 재료 표면에 도포하는 기술을 개발하여 혈액과 반응

제 2장 연구 추진 방법 (실험 방법)

제 1절 혈전 분해 효소의 고정화

1. 서설

혈전 분해효소는 피브린 clot을 용해시켜서 생체내의 혈액 흐름을 정상적으로 유지한다. 기존에 쓰이고 있는 항혈전제의 경우는 plasminogen 활성제로 작용해서 plasminogen 을 plasmin 으로 전환시킴으로써 혈전을 용해한다. 이들 효소는 비특이적으로 plasminogen 을 plasmin 으로 활성화시키며, 이 plasmin 이 피브리노젠과 다른 혈액응고 요인을 분해해서 출혈을 유도한다. 기존에 사용되는 효소가 거의 plasminogen 을 활성화시키기 때문에 이런 부작용을 줄이는 것은 어렵다. 그러므로 혈전을 직접적으로 용해시키고 plasminogen 을 활성화시키기 때문에 이런 부작용을 줄이는 것은 어렵다. 그러므로 혈전을 직접적으로 용해시키고 plasminogen 활성제로 작용하지 않는 효소를 개발할 필요가 있다. 오랫동안, 지렁이가 동양에서는 여러가지 질병의 약으로 사용되어 왔다. 지렁이의 식도에서 분비되는 효소가 혈전을 용해할 수 있다는 사실은 Frederico (32) 그리고 Willem 과 Minne (33) 등에 의해 발표된 바 있다. 1983년 Miharra (34)는 Lumbricus rubellus 라는 지렁이에서 강하고 매우 안정된 혈전 분해 효소를 추출하였다. 이 효소를 분획하여 6가지의 효소로 분리하였는데 이를 통성하여 룬부로키나제 (Lumbrokinase) 라 한다. 이 효소의 분자량과 등전위점은 각각 20,000 그리고 3.4 였다. 6가지 효소에 대한 분자량과 등전위점은 표 2.1에 잘 나타나있다. 이 효소는 열에 안정하고, 넓은 pH 범위에서도 안정하다. 이 효소를 정제하면 3가지로 나뉘지고, 첫번째 fraction (F-I) 을 다시 정제하면 3가지 (F-I-0, F-I-1, F-I-2) 로 세

분된다. 두번째 fraction (F-II) 는 더 이상 분리되지 않는다. 또 세번째 fraction (F-III) 의 경우는, 다시 2개의 fraction 으로 나뉜다. F-I 효소는 chymotrypsin 과 비슷하며, F-III 는 trypsin 과 유사하다. 그러나 F-II 의 경우는 trypsin 이나 chymotrypsin, elastase와 전혀 다른 양상을 보인다. 이들 효소의 amino acid 조성은 표 2.2 에 나타나 있다. 롬부로키나제는 다른 senine 단백질 분해제에 비해 Asp 나 Asn 을 많이 포함하고 있다. 롬부로키나제가 혈액응고 기전상의 작용하는 위치는 그림 2.1에 잘 나타나 있다.

2. 롬부로키나아제 고정화

가. 롬부로키나아제 정제

롬부로키나아제는 지렁이의 일종인 *Lumbricus rubellus*의 분말을 ammonium sulfate precipitation 과 DEAE (diethylaminoethyl) anion exchange column chromatography 의 방법을 이용해 추출한다. 롬부로키나제의 섬유소 용해 활성도는 fibrin plate method 에 의해 예측할 수 있으며 이 fraction이 가장 유력한 섬유소 분해 활성을 갖는다고 볼 수 있다.

나. 롬부로키나아제 고정화

폴리우레탄에 롬부로키나아제를 고정하는 방법에는 세가지가 있다.

<방법 I>

폴리우레탄 sheet와 폴리우레탄 tubing은 저분자 성분들을 제거하기 위해 3일 동안 메탄올로 처리한다. 메탄올 처리 후 폴리우레탄 sheet는 잔여 용매 제거를 위해 48시간 동안 섭씨 50도, 진공 상태에서 건조시킨 다음 tetrahydrofuran (THF) / 3% (w/

v) maleic anhydride methylvinyl ether copolymer (MAMEC)에 담근다. 폴리우레탄 tubing은 관 내부 표면 위에 3% (w/v) MAMEC용액을 가지고 균일하게 코팅될 때까지 반복적으로 행하되 20초 동안 peristatic pump를 통해 용액을 관 내로 pumping함을 기준으로 한다. 코팅후 N₂ gas에서 3시간 동안, 상온에서 24시간 동안 건조시킨다. MAMEC용액으로 코팅한 폴리우레탄 sheet와 tubing은 THF 용액으로 세척한다. PU-MAMEC(I) sheet는 섭씨 4도에서 10시간 동안 1.35 mg/ml 롬부로키나제 / PBS buffer solution (pH7.4) 용액에 더 반응시킨다. 롬부로키나제는 MAMEC의 anhydride기와 효소의 반응기(-NH₂, -OH) 사이의 제한 반응을 통해 PU 표면에 결합하게 된다. 반응시킨 sheet는 느슨하게 붙은 롬부로키나제를 제거하기 위해 철저히 PBS (pH 7.4)를 가지고 세척한 후, PU-MAMEC(I)-LK를 얻기 위해 섭씨 20 도, 진공에서 건조시킨다. PU-tubing은 PU sheet와 유사한 과정을 통해 PBS (7.4) / 롬부로키나제 용액에 10시간 동안 섭씨 4도에서 peristatic pump에 의해 순환시킨 후 결합력이 좋지 못한 롬부로키나제를 제거하기 위해 철저히 세척한다.

소의 혈청 알부민을 폴리우레탄 표면에 고정화시켜 롬부로키나제를 폴리우레탄에 고정화시킨 것과 고정화된 알부민의 양을 비교하였다. PU에 알부민의 고정화는 다음과 같다. MAMEC용액을 가지고 처리된 폴리우레탄 sheet는 PBS buffer 용액을 가지고 세척한 후 10 시간 동안 섭씨 4도에서 1.35mg/ml Albumin / PBS buffer 용액(pH 7.4) 에 incubation한다.

<방법 II >

폴리우레탄 sheet는, MAMEC입자를 THF와 아세톤 혼합액에 용해시킨 다음 얻은 3%(w/v) MAMEC / THF / acetone 용액에 담근다. 폴리우레탄 tubing은 방법I과 동일한 실험 조건하에서 luminal surface 위에 THF / acetone + 3% (w/v) MAMEC 용액을 가지고 코팅한다. 롬부로키나제와 알부민은 PU-MAMEC(II)-LK 와 PU-MAMEC(II)를 얻기 위해 방법과 동일한 과정으로 폴리우레탄 표면에 처리한다.

<방법 III>

폴리우레탄 sheet와 폴리우레탄 tubing은 HMDI (hexamethylene diisocyanate)를 가지고 고정화한 후 롬부로키나제나 알부민 용액을 가지고 결합시킨다. 롬부로키나제나 알부민 용액의 농도는 PBS 완충 용액 (pH7.4) 에서 1.35mg/ml 였고, 폴리우레탄 sheet와 tubing은 방법 I 과 동일한 조건인 섭씨 4도에서 10 시간 동안 각 용매내에서 incubation 시킨다.

3. 효소가 고정된 표면의 특성 분석

MAMEC를 이용하여 롬부로키나제를 고정화시킨 폴리우레탄 표면의 특성을 관찰하기 위하여 ATR-FTIR spectroscopy를 수행하였다. sample sheet를 1 X 10 X 20 mm로 만들고, 스펙트럼 자료는 2cm^{-1} 해상도로 질소하에서 얻었다. 개질된 폴리우레탄 표면의 기본적 구성 원소를 관찰하기 위하여 ESCA 스펙트럼을 얻었다. MAMEC가 코팅된 표면과 폴리우레탄, 그리고 롬부로키나제가 고정화된 표면에 대하여 각각 ESCA 스펙트럼을 관찰하였다. 또한, 개질된 표면의 친수성을 측정하기 위하여 Wilhelmy 판 방법에 의하여 표면 접촉각을 측정하였다. 이 때에 증류수를 표면 장력의 기준으로 삼았다.

4. 고정화된 효소의 정량적 분석 및 활성화 측정

가. 고정화된 롬부로키나제의 표면 농도

고정화된 롬부로키나제를 정량하기 위하여 염색법을 이용하였다. Commassie Brilliant Blue G-50을 95%의 에탄올 12.5ml에 용해하고, 85%(w/v)의 phosphoric acid 25ml에 섞었다. 혼합한 용액을 필터로 여과한 증류수를 더하여 250ml의 반응제를 만

들었다. sample sheet를 1 X 2 cm로 제작하여 5ml의 단백질 반응제와 0.1ml의 PBS (pH 7.4)로 섞었다. 이 혼합물을 5분간 반응한 후, 반응액의 595nm 파장에 대한 광 흡수율을 측정하였다. 개질하지 않은 폴리우레탄에 대하여 같은 방법으로 실험하여 비특이적으로 흡착하는 단백질 반응제를 측정하였다. 고정화된 효소의 안정성을 시험하기 위하여, PBS sample sheet를 담가 놓고 적절히 저어주면서 시간에 따라 고정화된 효소의 활성도가 변화하는 지를 살펴보았다.

나. 고정화된 효소의 활성도 측정

<피브린 판 측정법>

0.15g의 Bovine 피브리노젠을 100ml 0.2M borate buffer에 용해시킨다. 필터로 정제한 피브리노젠 용액을 petri 용기에 담고, 0.5ml thrombin 용액을 첨가한다. 천천히 저어주면 약 1시간 후 피브린 판이 형성된다. 유로키나제의 활성도와 비교하기 위하여, 농도를 알고 있는 유로키나제 용액을 이용하여 혈전 분해능에 대한, 표준 곡선을 찾는다. 3가지 방법을 이용하여 롬부로키나제가 고정화된 폴리우레탄 샘플을 피브린 판 위에 올려 놓으면, 혈전 분해로 인하여 피브린 판이 녹아서 투명하게 된다. 섭씨 37도에서 약 18-20 시간 동안 반응시킨 후 혈전 분해 면적으로 부터 효소의 활성도를 측정한다.

<카세인을 이용한 측정법>

알파카세인 5% suspension을 67mM phosphate 버퍼용액에 녹인다. NaOH 2ml을 첨가하여, 상온에서 1 시간 동안 녹인다. Sodium azide 를 넣어 0.01%로 맞춘다. 녹지 않는 잔유물은 원심분리로 제거한다. 표준 곡선을 얻기 위하여 여러 농도의 롬부로키나제 용액과 카세인 용액을 혼합한 후, 280nm 광 흡수율을 이용한다. 폴리우레탄, HMDI 혹은 MAMEC을 도포한 폴리우레탄 표면에 비특이적으로 녹는 카세인 용액 또

한 정량한다. 용액 상태의 롬부로키나제와 고정화된 롬부로키나제의 활성도에 미치는 pH의 영향을 살펴보았으며, 온도 변화에 따른 롬부로키나제 활성도 변화 또한 관찰하였다. plasmingen, 알부민, 피브리노젠 등의 기질이 효소 활성도에 미치는 영향도 살펴보았다. 여러가지 기질에 따른 단백질 분해 과정은 SDS-PAGE를 통하여 관찰하였다. 4가지 종류의 단백질 분해 억제 효소에 대한 영향 또한 살펴보았다. aprotinin, leupeptin, phenylmethy-sulfonyl fluoride, soybean trypsin inhibitor 등에 대한 단백질 분해 억제 영향을 살펴보았다.

5. 혈액적합성 시험

가. 피브리노젠 흡착 시험

동위원소 I-125를 붙인 피브리노젠을 이용하여, 피브리노젠 흡착 실험을 수행하였다. I-125를 붙인 피브리노젠을 준비하기 위해서는 chloramine-T 방법을 사용하였다. 1 : 100 으로 I-125 를 붙인 피브리노젠과 붙이지 않은 용액을 섞어서 5ml의 사람 혈액에 첨가한다. 각 샘플 쉬트를 위 용액 5ml에 담가서 섭씨 37도에서 15분간 반응시킨다. 샘플을 꺼내어 PBS를 닦은 후, 감마 카운터를 이용하여 방사능을 측정하여, 흡착된 피브리노젠의 양을 정량한다. 방사능이 붙은 피브리노젠의 표면에 흡착된 분포를 구하기 위해 autoradiography 를 구하였다. 암실에서 건조한 위의 반응 샘플을 X-ray 필름 위에 올려 놓고 섭씨 -70도에서 2 시간 동안 반응한다. 필름을 현상하여, 흡착 분포를 살펴본다.

나. 혈소판 점착 시험

혈소판에 동위원소 테크니슘 (Tc^{99m})을 HMPAO (hexamethyl propylene amine

oxine)를 이용하여 부착하여 샘플 쉬트에 점착시켜 본다. 건강한 성인으로부터 42ml의 혈액을 채취하여 8ml의 ACD 용액에 첨가한다. 5 ml의 Hespon 용액을 첨가한 후, 원심 분리하여 PRP를 만든다. 각 샘플 쉬트를 9 ml의 PRP용액에서 섭씨 37도에서 각 시간대 별로 반응시킨다. 반응 후, PBS로 샘플을 닦은 후, 감마 카운터로 방사능을 측정한다. 앞절에서 언급한 바와 같이 각 샘플에 대한 Autoradiography를 얻음으로써, 침착된 혈소판의 분포를 구한다.

다. Ex vivo A-A Shunt 동물 실험

효소를 폴리우레탄 튜브 내면에 고정화시킨 후, 토끼를 대상으로 한 A-A shunt 동물실험을 수행하여, 처리하지 않은 튜브와 림부로키나제가 고정화된 튜브 간의 occlusion 시간을 비교하였다.

표 2.1 여러가지 롬부로키나제의 물리적 특성

	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2
Molecular weight*	23,500	27,400	27,000	28,500	34,000	34,200
Isoelectric point**	4.12	4.00	3.90	3.80	3.70	3.52
E 1% (280 nm)	12.5	14.2	12.8	16.6	13.1	12.7

표 2.2 정제된 롬부로키나제의 아미노산 구성

Residue	I-0	I-1	I-2	II	III-1	III-2	Urokinase*	L-Plasmin**	Trypsin***
Asx	12.26	15.65	16.06	14.81	15.25	14.99	19	15	21
Thr	12.22	8.25	8.46	8.40	6.09	6.24	19	14	10
Ser	9.38	11.30	10.85	12.05	10.08	10.39	22	18	24
Glx	3.97	6.05	6.13	6.04	7.04	7.63	28	22	21
Pro	0.40	0.37	0.41	0.44	0.55	0.57	16	15	8
Gly	13.48	15.39	15.41	14.48	12.66	12.89	22	21	20
Ala	12.95	9.49	9.45	10.27	6.90	6.57	10	12	13
Half-Cys	1.44	1.09	1.67	0.80	1.36	1.40	10	9	8
Val	7.03	5.46	5.51	7.77	10.33	10.67	11	22	6
Met	0.55	0.97	0.82	0.98	1.36	1.34	5	2	1
Tle	5.38	6.54	6.64	5.96	7.89	7.62	16	8	12
Leu	7.47	7.95	8.01	7.46	3.73	3.41	21	20	12
Tyr	3.91	3.69	3.79	3.24	4.63	4.86	13	6	7
Phe	2.00	1.11	1.11	0.58	3.09	2.67	9	8	4
Trp	0.64	0.98	ND	1.63	0.83	1.09	5	5	3
Lys	0.04	0.50	0.53	0.45	1.65	1.67	17	14	11
His	2.45	2.75	2.73	2.30	2.37	2.12	10	8	3
Arg	3.98	2.46	2.42	2.34	4.19	3.90	14	14	6

Values are given as % amino acid residues per molecule. ND, not detected.

* White et al. [81]. ** Groskopf et al. [82]. ***Travis and Roberts [83]

*,**,*** Values are given in number of residues per molecule.

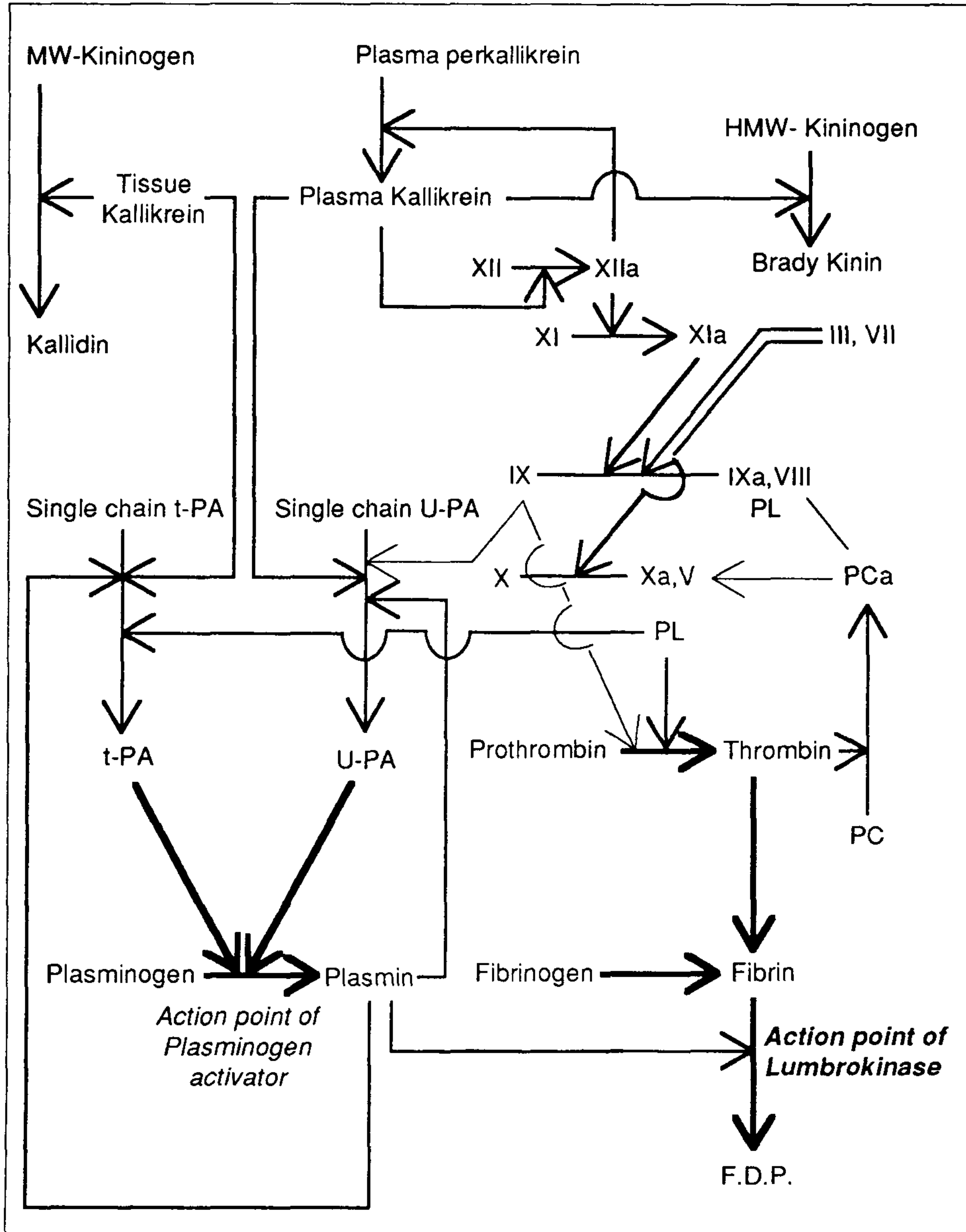


그림 2.1 룬부로키나제 작용점에 관한 모식도

제 2 절 혈관내피세포의 배양및 부착능 평가

1. 서 설

혈액적합성 고분자 인공생체재료의 표면에서는 대체적으로 혈관내피세포의 배양이 어려운 것으로 알려져 있으며 세포가 배양되었더라도 세포의 생장이 느리고 혈류에 노출되었을 때 배양된 내피세포가 쉽게 탈락되는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상을 해결하기 위하여 인공혈관등에 혈액성분의 일종인 albumin, fibrin같은 단백질이나 세포외기질의 성분인 collagen, fibronectin등으로 표면을 미리 처리하여 내피세포의 부착을 증가시켜려는 시도가 있었다 (35-38). 그러나 Schneider (39)에 의하면 collagen이나 fibronectin 으로 처리하여 혈관 내피 세포를 이식한 경우도 혈류에 노출되었을 때는 세포탈락이 여전히 높은 비율로 일어나 혈관 내피 세포의 부착을 강하게 하여 줄 수 있는 새로운 기질이 필요하게 되었다.

생체내에서는 혈액 성분을 제외한 모든 세포들이 세포외기질위에 유지되어 있고 이 세포외기질은 세포들이 이동, 성장, 분화를 할 수 있게 해주는 자연적인 기질이다. 이 세포외기질은 여러가지 형태의 collagen과 glycosaminoglycans, proteoglycans, glycoprotein 등으로 구성되어 있으며 세포외기질의 주된 성분중 특히 collagen과 fibronectin은 세포의 부착, 이동, 성장, 분화에 매우 중요하다. 각 세포들은 자신이 부착되어 있는 표면쪽으로 세포외기질을 합성, 분비하고 또 이 기질들은 각 세포의 형태와 기능을 유지해 주고 성장을 촉진시킨다 (40-44). 배양한 내피세포들도 세포외기질을 분비하는데 주로 collagen, proteoglycans, lamin, nidogen, fibronectin, elastin 등이다. 그 외에도 소량의 thrombos-pondin 도 분비한다. Fibronectin은 생체내에서 collage과 세포에 결합할 수 있는 수용체를 갖고 있는 아주 중요한 결합분자이며 세포와 세포, 세포와 기질들의 결합을 도와주는 작용을 한다 (45, 46). 큰 접착성 당단백질인 von Willebrand factor는 내피세포내의 특별한 소립자인 Weibel-Palade소체에 있으며 혈관이 손상을 받

으면 혈소판이 혈관의 내피세포아래의 조직과 결합하는 것을 도와준다 (47). Laminin 은 기저막의 구성 성분중의 하나이며, type IV collagen, heparan sulfate, 세포표면등에 결합한다. 여러 다른 형태의 collagen의 정확한 기능은 아직 잘 모르지만 생체내에서는 대부분의 세포들이 collagen을 포함하는 기저막에 위치하고 있으며 collagen은 세포의 유착뿐 아니라 세포의 성장과 분화및 이동에도 영향을 미친다 (48). 본 연구에서는 인공심장의 재료로 사용되고 있는 폴리우레탄위에서 비교적 잘 자라는 섬유아세포로부터 분비되는 세포외기질을 내피세포의 초기부착과 성장을 증진시키고 혈류에 대한 저항을 향상시킬 수 있는 새로운 기질로 사용하여 혈관내피세포의 부착및 성장속도를 향상시키고자 하였다.

인공재료위에 배양한 내피세포들이 생체내에 이식되어 혈류에 노출되었을 때 혈류에 의한 세포탈락이 있으며 이 내피세포의 탈락정도가 혈액접촉성 인공재료의 기능에 영향을 미친다. 정상성인의 동맥에서의 전단력은 보통 2 dynes/cm^2 정도로 알려져 있으며 대부분 $2\text{-}20 \text{ dynes/cm}^2$ 이내이나 국소적으로 장소에 따라 100 dynes/cm^2 까지 되는 경우도 있다고 하며 정맥에서의 전단력은 보통 동맥의 $1/4$ 정도이다 (0.5 dynes/cm^2) (49). 인공심장내에서의 전단력은 인공심장의 모양과 구동방식에 따라 차이가 있을 것으로 추정되고 있으며 국소적으로 120 dynes/cm^2 이상 되는 곳도 있으리라 추정된다. 본 연구에서는 laminar flow chamber method를 사용하여 층류하에서 세포외기질을 이용하여 배양한 혈관 내피 세포부착력을 측정하였다.

2. 세포의 기질을 이용한 혈관내피세포의 배양

가. 섬유아세포의 분리와 배양

15주에 소파수술을 시행한 태아의 흉부전면 및 대퇴부의 피부를 박리하여 0.2% collagenase로 반응시킨 후 250 um mesh로 여과하여 섬유아세포 (fibroblast) 만 분

리하여 10% Fetal Bovine Serum, 100u/ml penicillin streptomycin, 2mM glutamine이 함유된 Iscove's Medium (IMDM) 에 넣어 세포배양 용기에서 배양한다. 섬유아세포가 배양 용기에 완전히 자라면 Trypsin과 EDTA를 사용하여 세포를 분리하여 폴리우레탄 표면 위에 배양시킨다.

나. 혈관 내피 세포의 분리와 배양

혈관 내피 세포를 사람의 탯줄로 부터 분리하였다. Umbilical Vein의 혈액을 Cord Buffer (PBS, 20mg/ml glucose) 로 씻어낸 후 0.2% collagenase(CLSI Worthington) 를 채운 후 양 끝을 cord clamp로 막은 후 37도에서 10분간 반응시킨다. 10분 후 50ml 정도의 Cord Buffer 를 vein에 흘려서 tube에 모은 후 1400 rpm에서 7분간 원심분리를 한 후 상등액을 버리고 남은 cell pellet 에 배지액을 넣어서 세포배양 용기에 옮겨 배양한다. 혈관 내피 세포가 배양 용기에서 완전히 자라면 Trypsin과 EDTA를 사용하여 세포를 분리한다.

다. PU surface의 제작

Polyurethane을 dimethylacetamid (DMAC) 용액에 녹여 16% (w/v) 용액으로 제조한 후 PU용액을 깨끗한 유리판에 부어 약 0.3mm의 두께로 제작한 후 섭씨 40도에서 건조한다. 건조된PU sheet 를 methanol에 담가 독성을 제거한 후 ethylene oxide (EO) gas로 멸균하여 직경이 1.8cm ring에 고정하여 사용하였으며 모든 재료의 처리는 ring에 고정된 PU면에서 행하였다.

라. ECM을 처리한 PU surface의 제작

PU 표면에 세포외기질을 처리하여 혈관내피세포를 배양하는데 있어서 세포의 기질 형성을 하기 위한 방법으로 hypotonic shock과 irradiation 방법을 사용하였다. 7-10 번 계대 배양된 섬유아세포를 0.125% trypsin / 0.01% EDTA 용액을 사용하여 세포배양용기로 부터 분리한 후 PU 표면에 단위 면적당 5×10^4 cells의 농도로 접종한 후 섬유아세포가 바닥을 완전히 덮도록(confluence) 배양한다. Hypotonic shock에 의한 방법으로 세포외기질을 형성하기 위하여 세포가 배양된 표면을 먼저 생리염용액(phosphate buffer saline, PBS)로 씻어낸 후 0.02M NH_4OH 용액을 0.5ml씩 분주하여 5분간 방치한다. 5분 후 NH_4OH 용액을 제거하고 다시 PBS로 8번 정도 씻어 낸다. 세포의 기질을 형성하기 위한 다른 방법으로는 irradiation을 사용하였다. 세포가 confluence하게 배양된 표면을 ^{60}Co 를 10000 rad로 85분간 조사한 후 생성된 세포의 기질 표면을 PBS로 씻어 낸다.

마. Fibronectin을 처리한 PU surface의 제작

Human fibronectin 용액을 20 ug/ml의 농도로 하여 PU가 고정된 각 well에 0.5ml씩 분주하여 실온에서 2시간 방치한 후, PBS로 두번 정도 씻어낸 후 실험에 사용하였다.

바. 혈관내피세포의 접종

Fibronectin이 처리된 PU와 Hypotonic shock 또는 Irradiation 방법에 의해 생성된 ECM을 처리한 PU면 각각에 단위 면적 당 1×10^4 의 농도로 접종하여 배양한다. 혈관내피 세포의 증식은 이틀 간격으로 14일 간 각각의 PU면에서 세포를 분리하여

Coulter Counter로 측정하였으며 morphology는 현미경으로 관찰하였다(그림 2.2).

3. 높은 전단 응력하에서의 혈관 내피 세포의 부착능 평가

가. 혈관내피세포가 부착된 폴리우레탄의 준비

인공심장이나 인조혈관등의 생체적합성과 혈액적합성을 높이기 위하여 혈관내피세포를 폴리우레탄위에 부착하였다. 인조혈관이나 인공심장용 혈액주머니등으로 이용되는 폴리우레탄은 친수성을 가진 부분과 소수성을 가진 부분이 공존하는 표면특징을 가지고 있어 그 표면에 세포를 균일하게 자라게 하는 것이 매우 어렵다. 아울러, 인조혈관등의 인공순환장기를 개발할 때, 생체내에서 혈관내피세포를 고정하고 있는 평활근, 섬유아세포, 세포외기질층이 이루는 혈관의 3차원적인 구조를 그대로 재연하기가 매우 어렵기 때문에 본 연구에서는 세포외기질만을 폴리우레탄표면에 도포한 후에 혈관내피세포를 부착하는 방법을 취하였다. 따라서, 세포외기질상에 부착된 혈관내피세포가 생체내에 이식된 후에도 계속 폴리우레탄표면에 부착되어 혈전형성을 방지하는 작용을 하는지에 대한 검증이 필요하게 된다.

본 연구에서는 혈관내피세포의 부착능을 증가시키기위하여 사람의 섬유아세포로부터 분리한 세포외기질을 폴리우레탄표면에 도포하였다. 실험에는 2가지의 표면처리를 비교분석하여 혈관내피세포부착능의 평가를 행하였다. 아무런 처리도 하지 않은 폴리우레탄 표면을 기준으로 삼았고, 세포외기질을 균일하게 도포한 폴리우레탄표면과 세포외기질의 성분중에서 세포의 점착에 관여하는 대표적인 단백질로 알려진 파이브로넥틴만이 도포된 폴리우레탄표면의 세포부착능을 비교하였다. 파이브로넥틴과 세포외기질의 도포방법은 제 2절에서 전술한 방법에 따른다.

실험에는 약 2.5 cm²의 면적을 가지는 폴리우레탄표면에 5 x 10⁴ cell/cm²의 농도로 혈관내피세포를 심어서 배양하였다. 폴리우레탄은 테프론으로 만들어진 원형의 고

정틀위에 고정하였으며, 배양용액을 가두어두는 링을 테프론으로 제작하여 고정틀위에 끼운후 세포를 배양하였다. 테프론링은 실험시에는 제거하여 혈관내피세포표면에 전단응력이 작용하도록 한다.

나. 층류발생실험기의 설계와 제작

혈관내피세포에 균일한 크기의 전단응력을 부가하여 혈관내피세포의 거동을 분석하기위하여 층류발생실험기를 설계, 제작하였다. 유동경로의 폭대 높이의 비를 크게 하여 유동경로내에서 안정된 층류가 발생되도록하여 폴리우레탄위에 배양된 혈관내피세포의 세포막표면에 원하는 크기의 전단응력을 발생하도록 설계하였다. 유동경로는 300 um의 두께를 가지는 의료용 실리콘 고무재질을 이용하였으며, 폴리우레탄을 고정한 테프론링을 상하로 움직이도록 제작하여, 폴리우레탄의 두께가 변하더라도 혈관내피세포의 윗쪽 세포막이 항상 유동경로의 바닥면에 올 수 있도록 하였다. 층류발생실험기는 황동으로 만들었으며, 현미경을 통한 관찰을 위해서 혈관내피세포가 위치하는 곳에는 유리로 된 창을 내었다 (그림 2.3). 층류실험기내의 유동경로의 속도분포는 유동경로의 길이를 L, 폭을 2B, 높이를 2h라 할때 Integral Weighted Residual Method를 이용하여 다음과 같이 구할 수 있다.

$$u(\xi, \eta) = -\frac{3}{8} \frac{1}{\mu} \frac{B^2 h^2}{B^2 + h^2} \frac{dp}{dx} (1 - \xi^2)(1 - \eta^2)$$

구해진 속도분포와 유동경로에 유입되는 유량으로부터 혈관내피세포막에 작용하는 전단응력의 크기와 유동의 특성등을 간단하게 계산할 수 있다.

$$\text{최대전단응력} = (\text{점성계수} * \text{최대유량}) / (B * h * h)$$

그림 2.4 는 단순화한 층류발생실험기의 형상으로, 검사유체가 혈관내피세포위를 왼쪽에서 오른쪽으로 흐르면서 전단응력을 발생하는 것을 보여주며, 그림 2.5 는 수치적으로 계산한 혈관내피세포주위의 유동현상을 보여주고 있다. 이때, 유속이 빨라지거나, 유동의 특성이 층류에서 난류쪽으로 변해갈 수록 혈관내피세포위 뒤에서 심한 소용돌이현상을 관찰 할 수 있다.

다. 실험 장치의 구성

실험의 유체경로는 층류발생실험기와 상부플라스크, 하부플라스크, 그리고 공기방울제거기로 이루어져 있다. 층류발생실험기를 통과하면서 혈관내피세포에 전단응력을 가한 검사유체는 하부 플라스크에 고여지며, 롤러펌프를 이용하여 상부플라스크로 보내어진다. 상부플라스크에서 검사유체는 유동경로상의 압력차에 의해서 공기방울제거기를 통과해서 다시 층류발생실험기로 유입된다. (그림 2.6) 실험유체로는 인산 Buffer solution을 이용하였다. 층류발생실험기는 현미경 (Olympus, CK2, Japan)위에 설치되어 모든 실험과정을 현미경에 부착된 CCD 카메라 (Toshiba, LK-636, Japan)를 통해서 비디오레코더에 기록할 수 있도록하였다. 아울러 텔레비전모니터와 자가제작한 영상분석장치를 부가하여 일정한 시간에 세포의 사진을 저장함으로써 실험도중에 생기는 세포의 형태변화를 관찰 할 수 있도록 하였다.

라. 부착능 평가 실험 방법

실험은 폴리우레탄에 혈관내피세포를 직접부착한 콘트롤군과 폴리우레탄 표면에 파이브로넥틴을 도포한 후 혈관내피세포를 부착한 군과 섬유아세포가 생성한 세포외기질을 도포한후 혈관내피세포를 부착한 군등의 세가지 군으로 나누어서 행하였다. 실험은 각각의 표면에 혈관내피세포를 배양액과 함께 심은후 1일, 2일, 4일, 7일, 11일

후에 각각 행하였다. 혈관내피세포막에 형성되는 전단응력의 크기는 2가지의 대표값으로 하였다. 본실험이 부착된 혈관내피세포의 부착능과 높은 전단응력이 발생하는 인공심장용 혈액주머니에 혈관내피세포를 부착한 후 이식후의 부착능평가가 목적이므로 인공심장용 혈액주머니에서 발생하는 최대의 전단응력을 본 실험의 고전단응력값으로 삼았다. 고전단응력값은 롤러펌프로 분당 350 ml의 검사유체를 총류발생실험기에 도입하여 얻어지는데, 이때의 최대전단응력은 131 dyne/cm^2 이며, 유동의 Reynolds 수는 597이다. 부가한 고전단응력값의 약 절반에 해당하는 전단응력을 저전단응력값으로 혈관내피세포에 부가하여 전단응력의 크기에 따른 혈관내피세포의 부착능변화를 고찰하였다. 저전단응력실험때의 전단응력은 66 dyne/cm^2 이며, 유동의 Reynolds 수는 298이다.

혈관내피세포에 전단응력을 가하는 시간은 10분으로 제한하였으며, 전단응력의 부가로 떨어져나온 혈관내피세포를 세기위하여 실험 시작후 1분, 5분 10분 후에 하부플라스크에서 10ml의 검사유체를 샘플링하여 쿨터카운터 (Coulter Electronics, Industrial Grade, England) 로 측정하였다. 아울러, 실험이 끝난후에도 폴리우레탄표면에 부착되어 있는 혈관내피세포는 트립신으로 분리한후 역시 쿨터카운터로 측정하였다.

실험의 전과정은 CCD 카메라를 통해서 비디오레코더에 기록하였으며, 영상분석기를 이용하여 실험개시 0초, 10초, 30초, 1분, 2분, 4분, 7분, 10분후에 자동적으로 혈관내피세포의 사진을 기록하여 혈관내피세포의 형태분석에 이용하였다.

실험을 진행하는 동안 검사유체는 상부플라스크를 중탕 가열하여 섭씨 37도로 유지하였으며, 이를 바늘형식의 마이크로 Thermometer를 이용하여 기록하였다. 이상의 실험을 동일조건으로 3회 반복하여 그 평균을 구하였다.

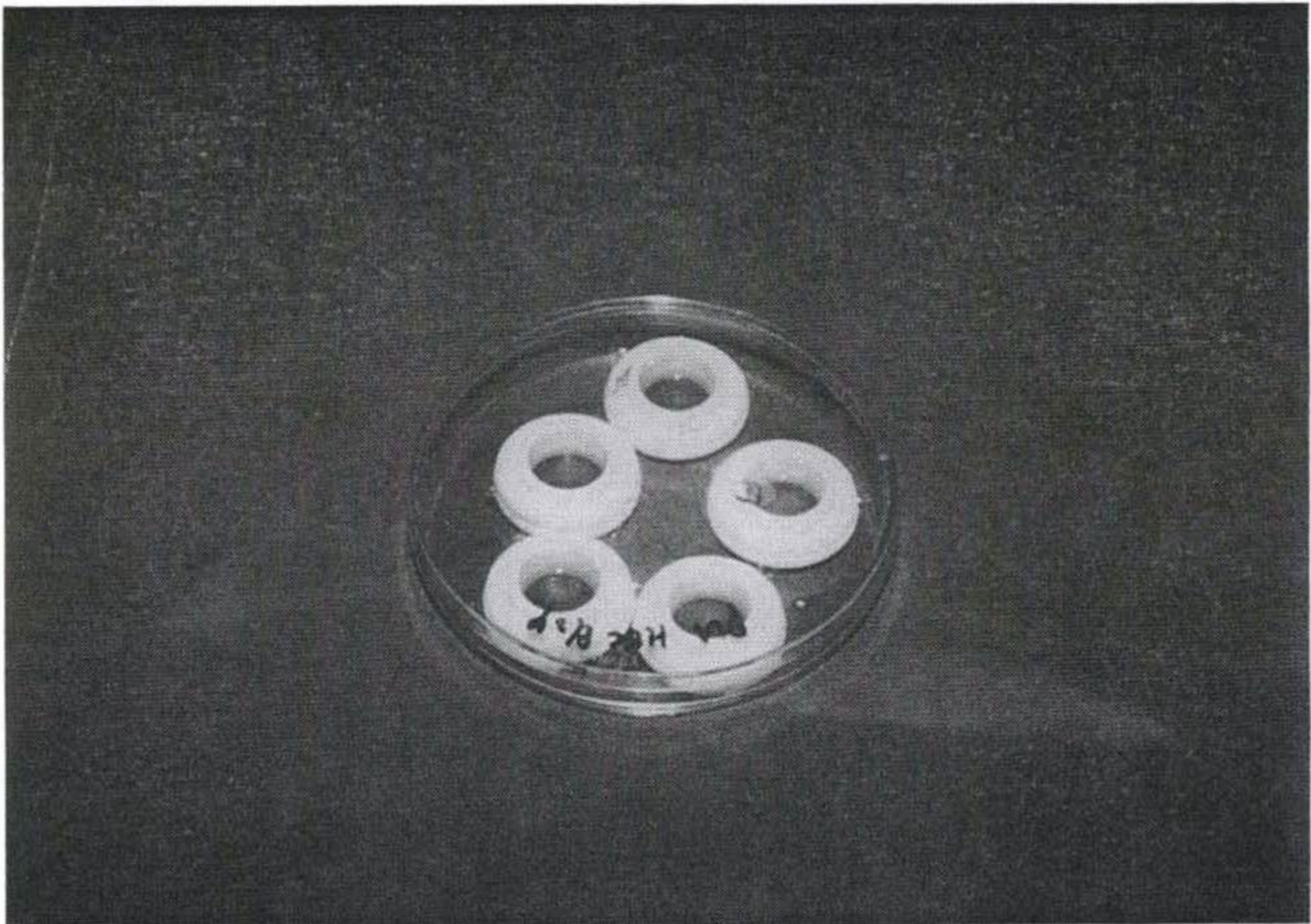


그림 2.2 혈관내피세포가 접종된 실험용 ring의 모습

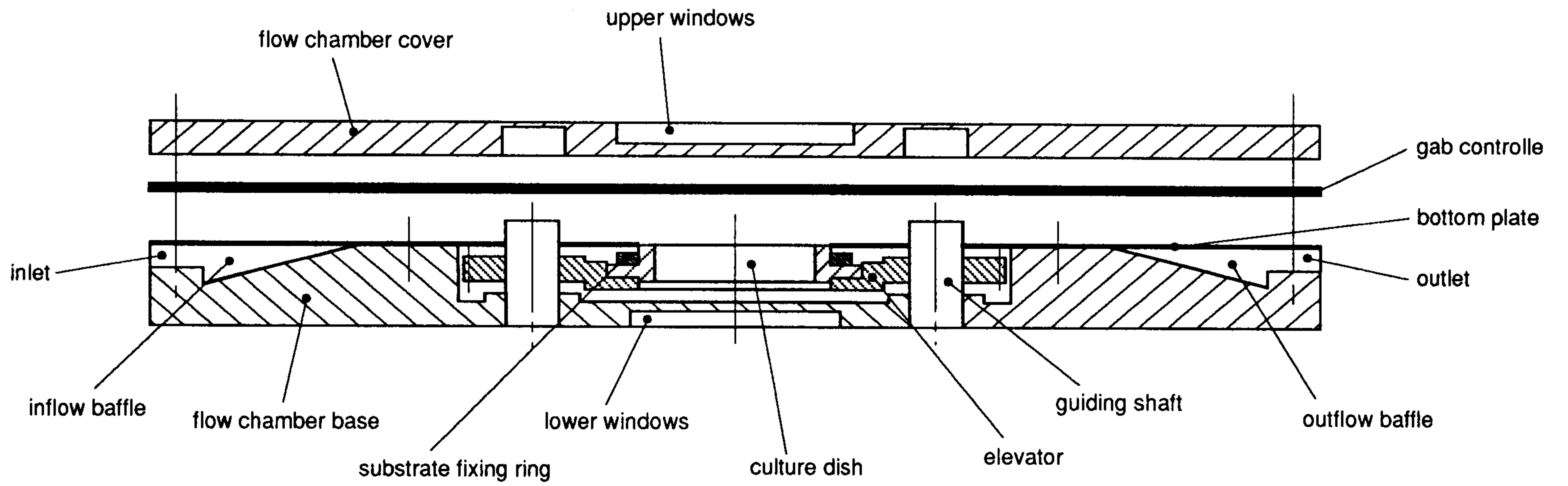


그림 2.3 층류발생실험기의 단면도

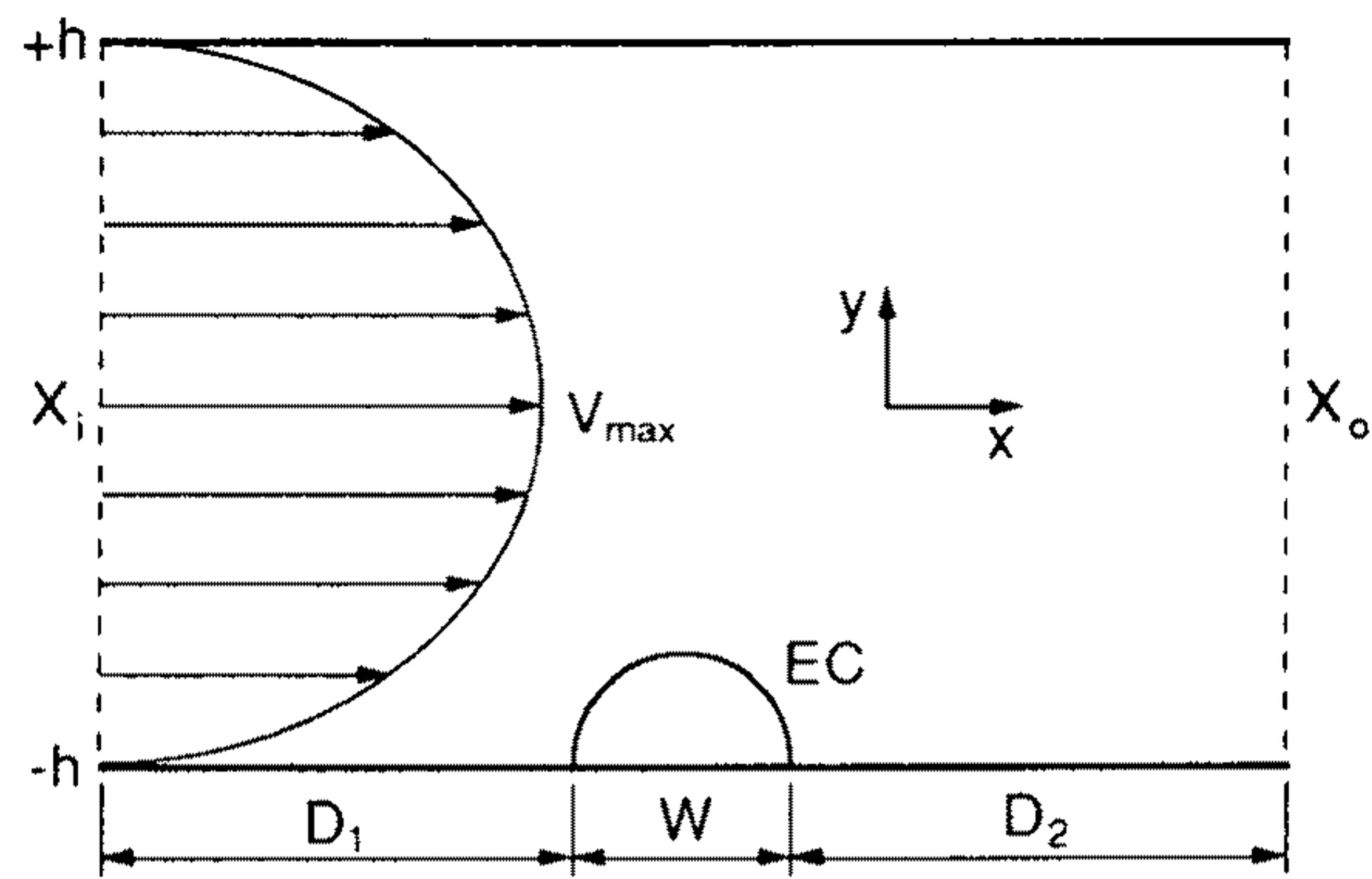


그림 2.4 총류발생실험기의 유체경로와 혈관내피세포의 모델

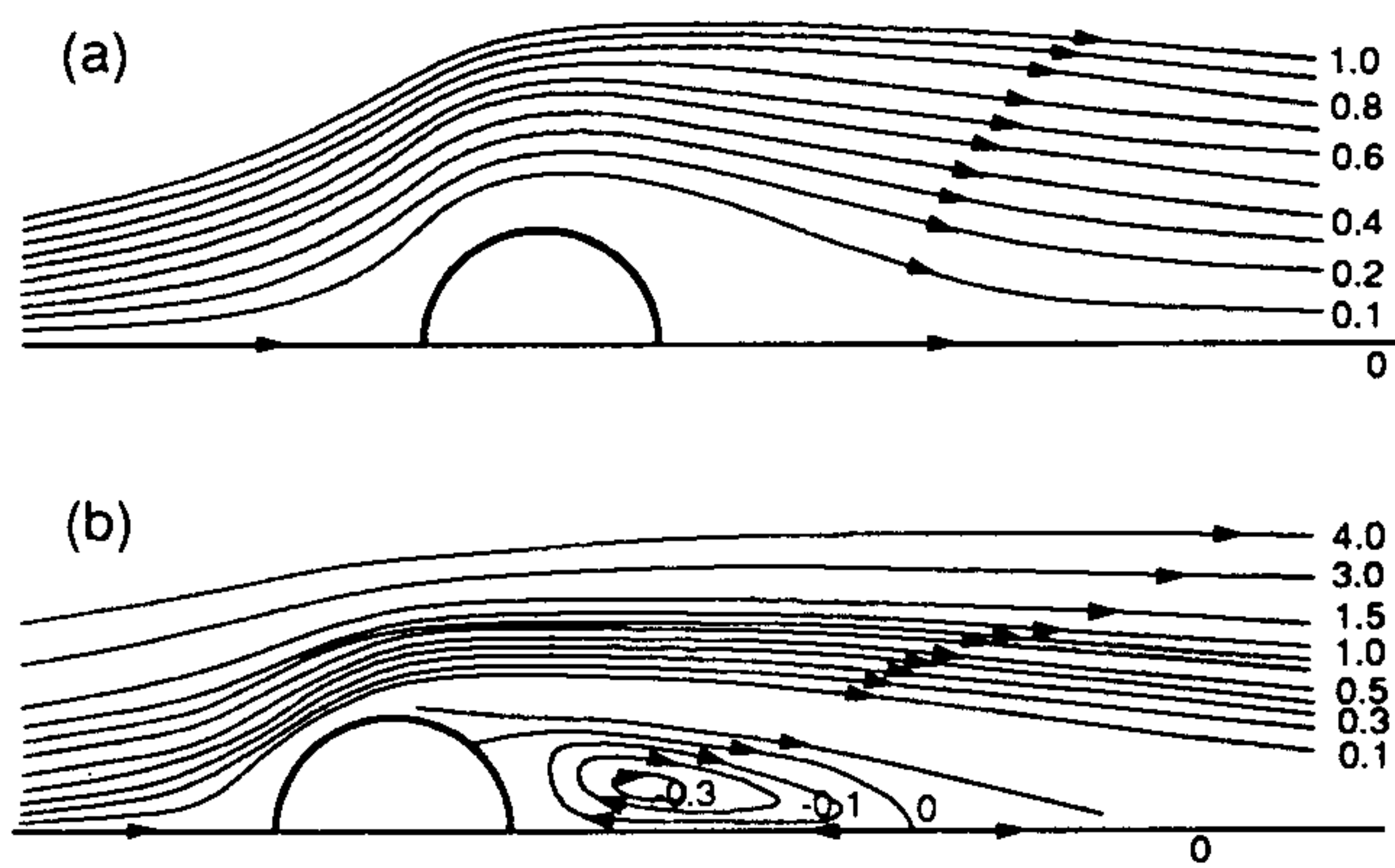
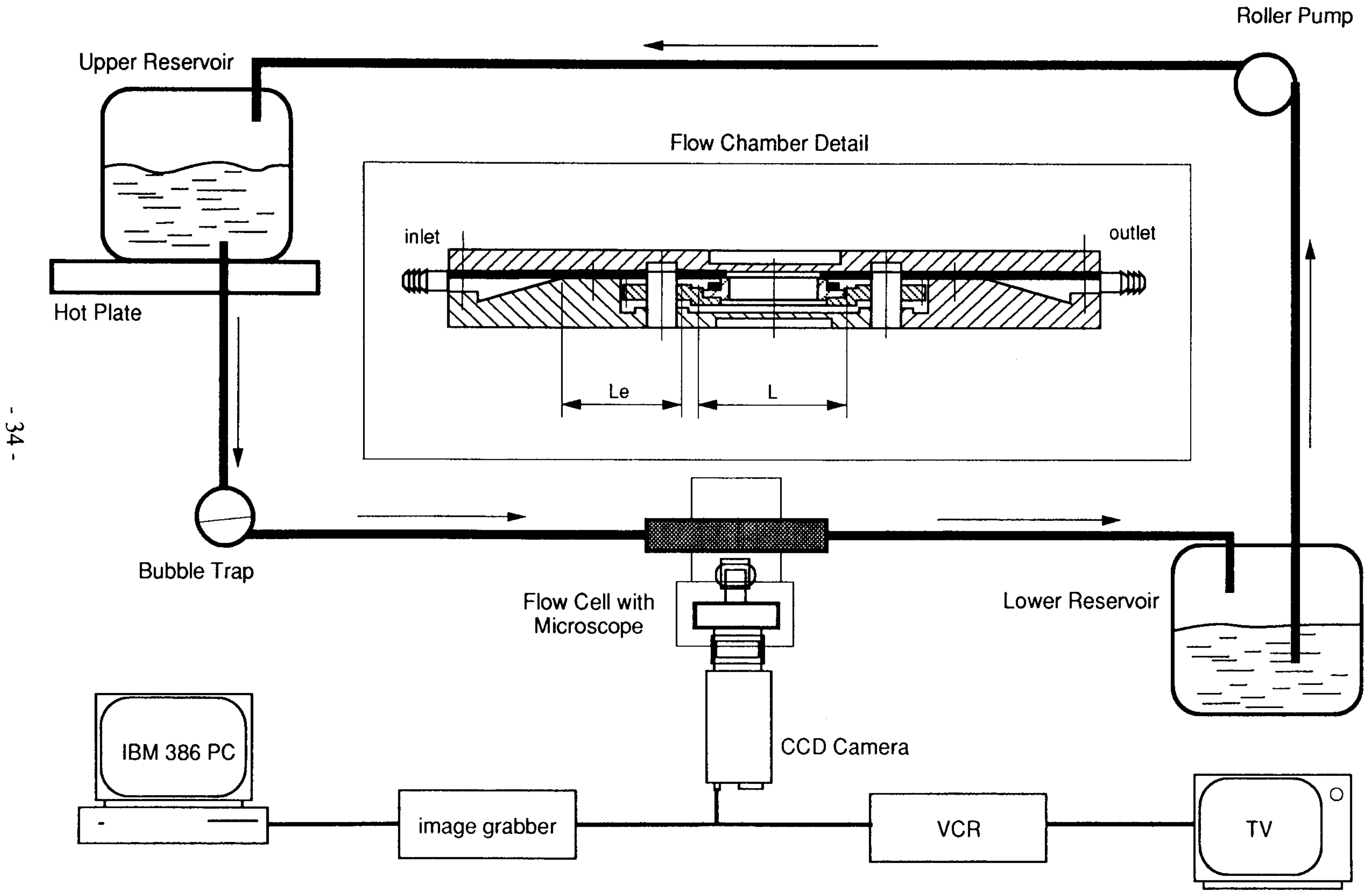


그림 2.5 혈관내피세포주위의 유동에 대한 수치해석결과



- 34 -

그림 2.6 혈관내피세포의 부착능평가를 위한 실험장치의 모식도

제 3 장 연구 결과 및 고찰

제 1절 림부로키나제가 고정화된 폴리우레탄 표면

1. 표면 특성

가. ATR-FTIR

그림 3.1 은 개질 폴리우레탄의 ATR-FTIR 스펙트럼으로서 MAMEC 가 처리된 표면의 경우 폴리우레탄의 N-H 특성 밴드 ($3,300\text{ cm}^{-1}$) 가 사라진 대신 MAMEC 가 나타내는 비대칭성 C=O 및 대칭성 C=O 특성 밴드가 각각 $1,850\text{ cm}^{-1}$ 와 $1,773\text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰되었다. MAMEC 가 처리된 표면에 림부로키나제를 고정시키면 MAMEC 의 특성 밴드들이 사라지는 반면에 MAMEC 의 무수기가 개환 반응을 일으킴으로써 생성되는 카르복실기의 특성 밴드가 $1,720\text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰되었다.

나. ESCA

림부로키나제가 고정화된 폴리우레탄의 widescan 스펙트럼으로 부터 285 eV 에서 C_{1s} , 532 eV 에서 O_{1s} , 399 eV 에서 N_{1s} 의 피크를 각각 확인할 수 있었다 (그림 3.2 - 그림 3.5). 표 3.1 은 개질 폴리우레탄의 표면 원소 조성을 ESCA 로 분석한 결과이다. PU-

MAMEC 에서는 PU 에 비하여 산소 %의 증가와 질소 %의 급격한 감소로 부터 무수기의 도입이 이루어졌음을 확인하였으며, 이는 MAMEC 가 PU 의 전면에 고르게 분포함을 암시하고 있다. PU-MAMEC-LK 표면에서는 PU-MAMEC 에 비하여 상대적으로 질소 %가 크게 증가한 것으로 보아 림부로키나제가 성공적으로 고정화되었음을 알 수 있었다. 림부로키나제의 고정화에 대한 객관성을 입증하기 위하여 PU-MAMEC 에 대하여 표준 단백질인 알부민을 도입 (PU-MAMEC-Albumin) 하고, 이를 분석한 결과 림부로키나제와 비슷한 수준의 질소 %를 나타내는 사실로 부터 MAMEC 는 효소의 고정화에 대한 가교제로서 성공적으로 작용함이 입증되었다.

다. 접촉각 측정

표 3.2 는 표면 개질한 PU 의 물에 대한 접촉각 측정 결과를 나타 낸다. 메탄을 추출된 미처리 폴리우레탄은 전형적인 소수성 표면을 나타내었으며, PU-MAMEC 의 경우는 MAMEC 의 도입에 따라 접촉각의 변화를 크게 보이지 않았으나, PU-MAMEC 를 효소의 도입과 같은 반응 조건으로 PBS (pH 7.4) 로 전처리하면, 크게 친수성이 향상되었다. 이것은 MAMEC 의 무수기가 물과의 개환 반응을 통하여 카르복실기가 생성되어 나타난 현상이다. PU-MAMEC-LK 표면은 0°C 의 매우 낮은 후퇴각을 보이며, 이는 림부로키나제의 고정화를 통하여 월등히 친수화가 진행되었음을 확인할 수 있었다.

2. 고정화된 효소의 정량적 분석 및 활성도 측정

가. 효소의 정량

그림 3.6에서 나타난 것과 같이 표준곡선에서 림부로키나제 양이 증가함에 따

라 광흡수율이 줄어듦을 알 수 있다. 폴리우레탄에 고정화된 롬부로키나제의 양은 약 24 ug/cm^2 이었으며 (표3.3), 롬부로키나제 대신에 알부민을 고정시켰을 경우에도 비슷한 정도의 농도를 유지하는 것으로 보아 분석 방법의 선택이 타당했다는 사실이 입증되었다. 또한 이는 ESCA 분석 결과와도 일치하는 경향을 나타내었다.

나. 섬유소 분해 활성도 (Fibrinolytic Activity)

그림 3.7 에서 보이는 것과 같이 고정화된 롬부로키나제의 활성도가 시간에 따라 변하지 않고 일정함을 알 수 있다. 그림 3.8은 피브린 판법에 의한 유로키나제와 롬부로키나제의 농도 따른 혈전 분해능을 보여주는 실험이다. 그림 3.9 는 PU-MAMEC-LK 슈트를 PU 및 PU-MAMEC 콘트롤 슈트와 함께 피브린 평판위에서 반응시킨 결과이다. 콘트롤 슈트 주위의 피브린은 분해가 되지 않은 반면에, 롬부로키나제가 고정화된 슈트주위에서는 피브린이 용해되어 clear zone 이 형성됨을 알 수 있었다.

다. 단백질 분해 활성도 (Proteolytic Activity)

그림 3.10과 그림 3.11은 단백질 분해에 관한 롬부로키나제 활성도 표준 곡선으로 카세인을 이용한 방법으로 구한 것이다. 세가지 방법으로 폴리우레탄 표면에 고정화한 롬부로키나제의 단백질 분해 활성도 및 활성 효율이 표 3.4 와 표 3.5 에 잘 나타나 있다. 고정화된 롬부로키나제의 단위 활성도 및 특이 활성도는 각각 18 IU/cm^2 , 0.8 IU/ug 이었다. 또한 고정화된 롬부로키나제의 활성 효율 (efficiency) 은 같은 양의 롬부로키나제 용액의 활성의 약 34 %를 차지하고 있어 본 연구에서 시행한 방법으로 효소를 고정시켰을 때 고정화된 효소의 활성 소실도가 크게 감소됨을 확인할 수 있었다.

라. 톨부로키나제의 활성에 대한 pH 및 온도의 영향

그림 3.12 은 pH 및 온도에 대한 톨부로키나제 용액의 안정도를 나타낸다. 일반적으로 톨부로키나제는 매우 넓은 pH 및 온도 영역에 대하여 높은 활성을 유지하고 있음을 알 수 있다. 그러나, 80 °C 에서 톨부로키나제 용액은 전 pH 영역에서 활성이 소실되는 양상을 보였다. 고정화된 톨부로키나제의 경우 톨부로키나제 용액에 비하여 다양한 pH 및 온도 조건하에서 더욱 안정된 활성도를 나타내었으며, 특히 80 °C 의 고온에서 1 시간까지 유지시켰을 때에도 최대 활성도의 약 20 % 수준까지 넓은 pH 영역에서 활성을 갖는 것으로 보아 톨부로키나제를 고정화시킴으로써 효소의 활성이 더욱 안정하게 유지됨을 확인하였다. 용액 상태 및 고정화된 톨부로키나제의 활성도에 대한 pH 및 온도의 영향은 그림 3.13 부터 그림 3.17에 잘 나타나 있다. 각 온도별 최대의 활성도를 나타내는 최적 pH가 표 3.6에 정리되었다.

마. 효소 활성에 대한 기질의 영향

피브리노젠의 경우 톨부로키나제/피브리노젠의 농도비가 0.5 ug/mg 일때 분해되었으며, 플라스미노젠은 톨부로키나제/플라스미노젠의 농도비가 200 ug/mg 이상에서 분해되었다. 또한 알부민의 경우는 그 이상의 톨부로키나제를 넣어 주어도 거의 분해되지 않았다. 이상의 결과로부터 톨부로키나제는 피브리노젠/피브린에 거의 특이적으로 작용하며, 플라스미노젠이나 알부민과 같은 다른 혈장 단백질에는 거의 영향을 미치지 않는 강력한 섬유소 용해 효소라고 생각된다. 톨부로키나제를 폴리우레탄에 고정시켰을 경우에도 용액 상태의 효소와 같은 경향을 나타내었다 (그림 3.18).

바. 효소 활성화에 대한 단백질 분해 효소 억제 인자의 영향

용액 상태 및 고정화된 롬부로키나제에 대한 억제 인자의 효과는 카제인 분해 활성도를 측정함으로써 관찰되었다. 롬부로키나제 용액 0.2 ug 을 80 ug 의 억제 인자가 포함된 카제인 용액과 반응시킨 후 잔존하는 효소의 활성을 억제 인자없이 반응시켰을 때의 활성화에 대한 백분율 (%) 로 표시하였다. 고정화된 롬부로키나제의 경우도 위와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다. 실험 결과 PMSF, leupeptin, aprotinin 은 용액 상태의 효소의 활성을 100 % 억제하였으며, EDTA 와 e-ACA 는 활성을 억제하지 않거나 부분적으로 억제하였다. 이와 같은 사실로부터 롬부로키나제는 세린계 단백질 분해 효소 (serine protease) 라는 사실이 입증되었다. 용액 상태의 롬부로키나제가 세린계 효소 억제 인자에 의하여 활성이 소실되는 반면에, 고정화된 롬부로키나제는 활성이 거의 억제되지 않고, 60 - 93 % 까지의 활성을 유지하고 있었다 (표 3.7). 이것은 효소가 고정화됨으로써 효소의 활성화에는 영향을 주지 않으면서 3 차 구조의 변화를 일으켜 억제 인자의 접근을 방해하기 때문인 것으로 사료된다.

3. 혈액 적합성

가. ¹²⁵I- 피브리노젠 흡착 실험

PU, PU-MAMEC, PU-MAMEC-LK 에 대한 피브리노젠 흡착량은 각각 217 + 12, 86 + 12, 28 + 2 ug/cm² (mean + S.D.) 였다 (그림 3.19). 또한 흡착된 피브리노젠의 농도 및 분포를 Autoradiography 로 확인한 결과 그림 3.19의 결과와 같이 롬부로키나제가 고정화된 쉬트에서 가장 적은 양의 피브리노젠이 흡착되어 있었다 (그림 3.20). 이때 PU-MAMEC-LK 쉬트 (II 번줄) 의 상단 끝 부분은 롬부로키나제가 고정되지 않은 PU 로서

많은 양의 피브리노젠이 흡착되어 있는 것을 볼 수 있다.

나. ^{99m}Tc -혈소판 점착 실험

각 반응 시간대에서의 혈소판의 점착 양상을 Autoradiography 로 확인해 본 결과 PU-MAMEC 콘트롤 쉬트에 비하여 류부로키나제가 고정된 PU-MAMEC-LK 쉬트에서는 반응 시간이 지남에 따라 점착된 혈소판의 수가 점차 감소되는 양상을 보였다 (그림 3.21, 그림 3.22). 이것은 고정화된 류부로키나제가 혈액 응고 유발 단백질인 피브리노젠의 흡착 및 혈소판의 점착을 억제하여 혈전의 형성을 방지한다는 사실을 입증하고 있다.

표 3.1 ESCA로 분석한 림부로키나제가 고정화된 표면의 기본 원소

Material	ESCA (atomic %)		
	C	O	N
PU Control (MeOH extracted)	76.90	21.50	1.50
PU-MAMEC(I)	72.97	26.70	0.30
PU-MAMEC(I)-LK	66.96	28.87	4.17
PU-MAMEC(I)-Albumin	67.88	25.52	6.60
PU-HMDI-LK	66.89	23.17	9.94

표 3.2 Wilhelmy plate 법으로 측정한 접촉각

Material	θ_{adv}	θ_{rec}
PU Control (MeOH extracted)	86.3	40.6
PU-MAMEC(I)	99.1	42.2
PU-MAMEC(I)*	77.3	19.0
PU-MAMEC(I)-LK	98.2	wetting

* Pre-swelled in PBS (pH 7.4) at 4 °C for 8 hrs

표 3.3 고정화된 롬부로키나제의 정량 데이터

Material	Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PU-MAMEC(I)-LK	7.6
PU-MAMEC(II)-LK	23.7
PU-HMDI-LK	8.4
PU-MAMEC(I)-Albumin	8.0
PU-MAMEC(II)-Albumin	24.5
PU-HMDI-Albumin	10.2

표 3.4 고정화된 림부로키나제의 활성도 데이터

Material	Unit Activity (U/cm ²)*
PU-MAMEC(I)-LK	4.04
PU-MAMEC(II)-LK	17.70
PU-HMDI-LK	0.74

* Incubation with alpha-casein at 37°C for 30 min

표 3.5 고정화된 림부로키나제의 활성 효율

Material	Specific activity (U/ μ g)	Efficiency (%)
PU-MAMEC(I)-LK	0.53	23
PU-MAMEC(II)-LK	0.75	33
PU-HMDI-LK	0.09	4

표 3.6 룬부로키나제의 활성도에 대한 각 온도에서의 최적 pH

Temperature (°C)	Soluble Lumbrokinase			Immobilized Lumbrokinase		
	37	60	80	37	60	80
pH of stability	5 ~ 12	5 ~ 9	-	4 ~ 12	4 ~ 12	4 ~ 12
Optimal pH	8.0	8.0	-	9.0	9.0	-

표 3.7 롬부로키나제의 활성에 대한 억제 인자의 영향

Inhibitors	Residual activity (%)	
	Soluble LK	Immobilized LK
Control	100	100
Aprotinin	0	93
Leupeptin	0	63
PMSF	0	60
SBTI	ND	68
t-AMCHA	ND	73
EDTA	100	ND
ϵ -ACA	71	ND

ND : Not Determined

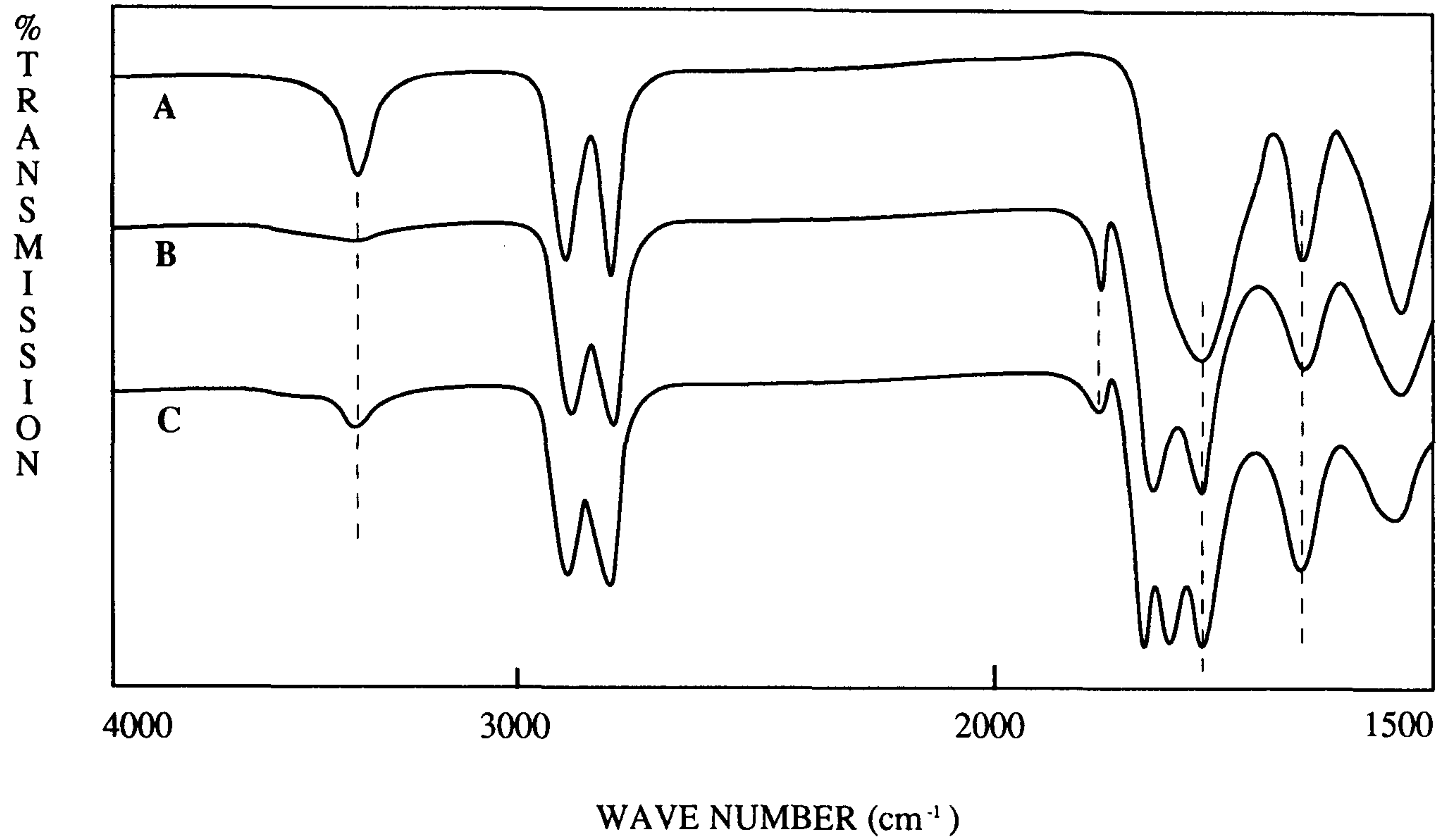


그림 3.1. 개질 폴리우레탄의 ATR-FTIR 스펙트럼

(A) untreated PU, (B) PU-MAMEC, and (C) PU-MAMEC-LK

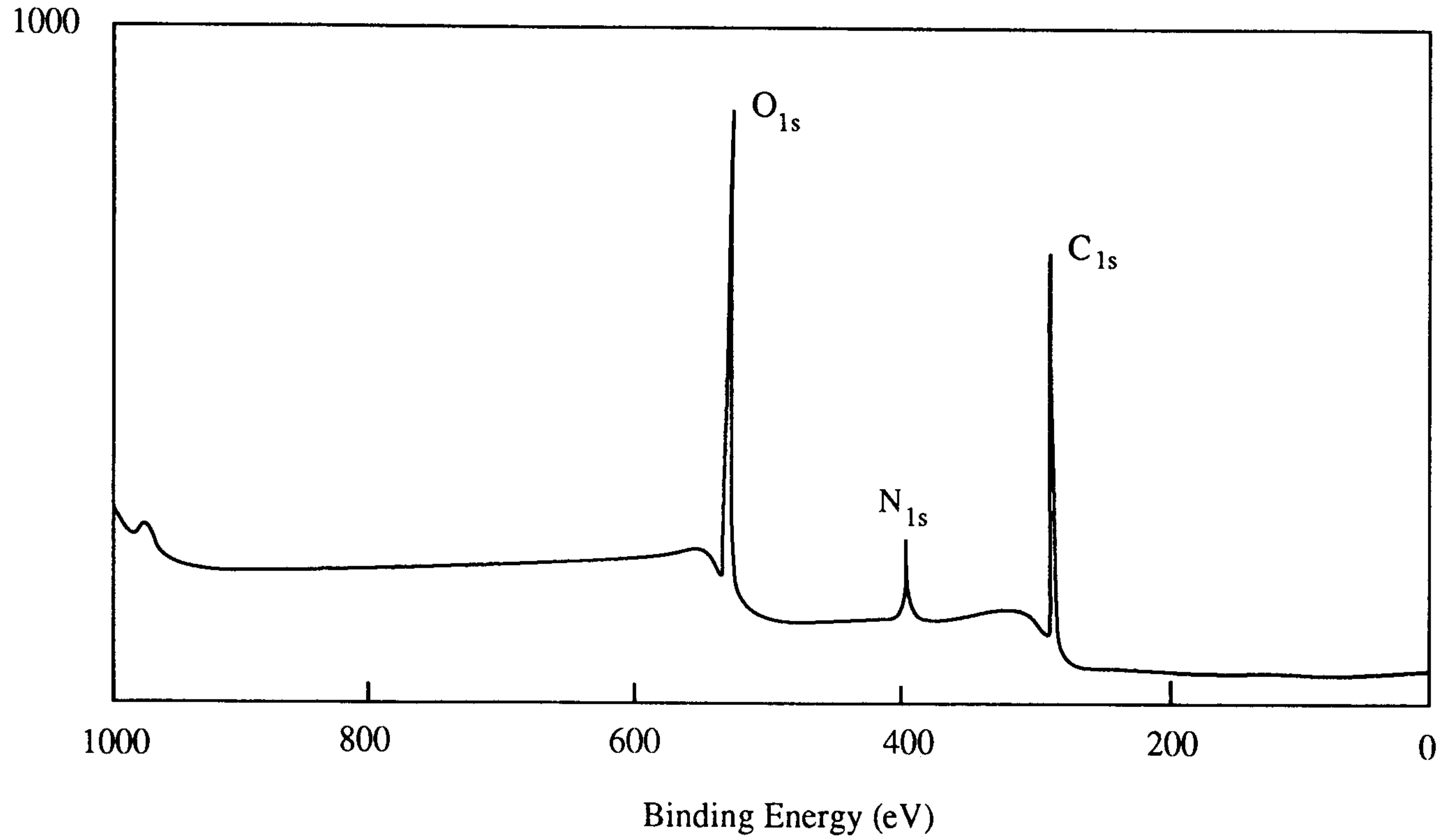


그림 3.2 PU-MAMEC(I)-LK 표면에 대한 ESCA 스펙트럼

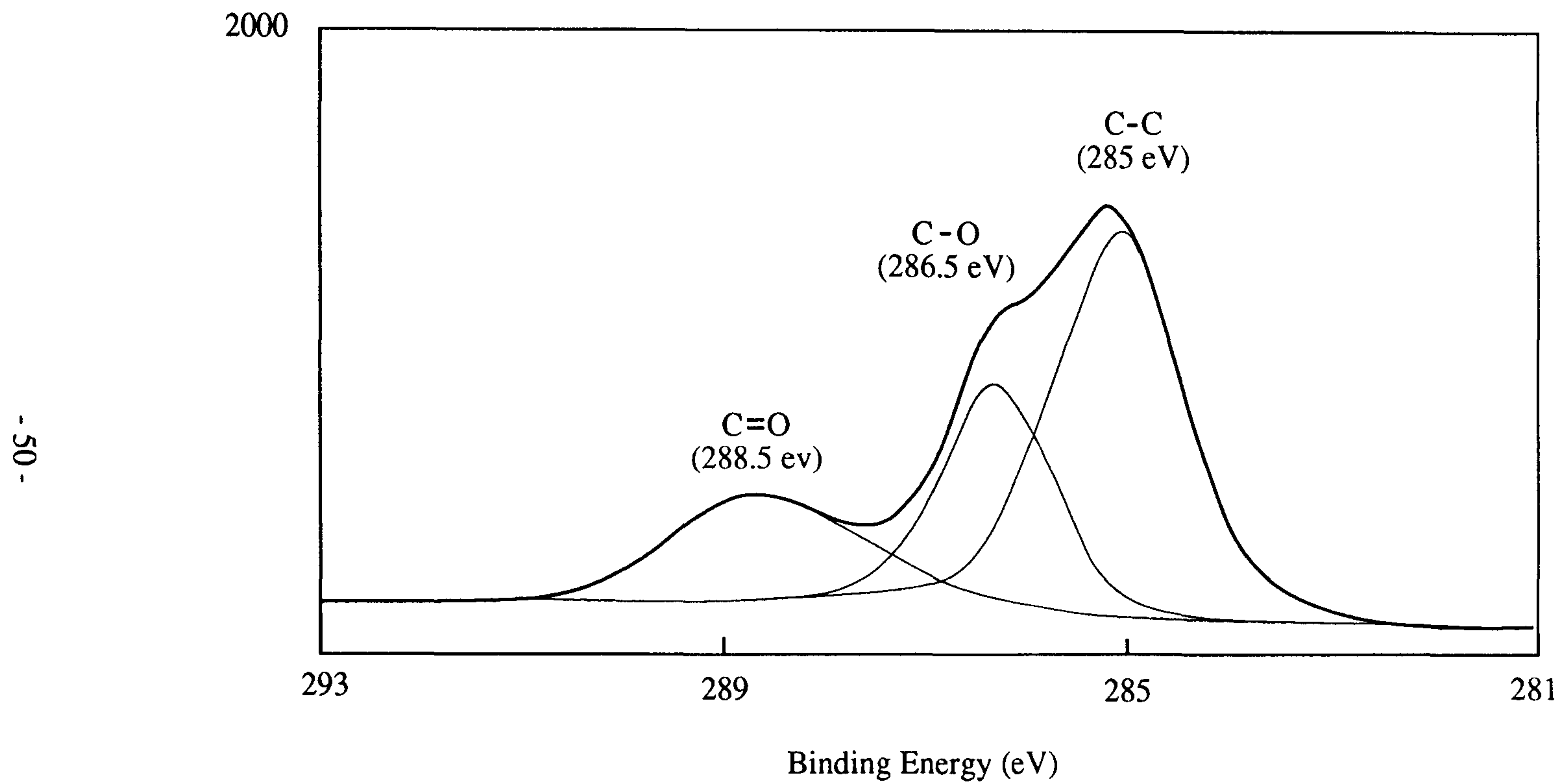


그림 3.3 PU-MAMEC(I)-LK에 대한 ESCA C1s 고해상도 스펙트럼

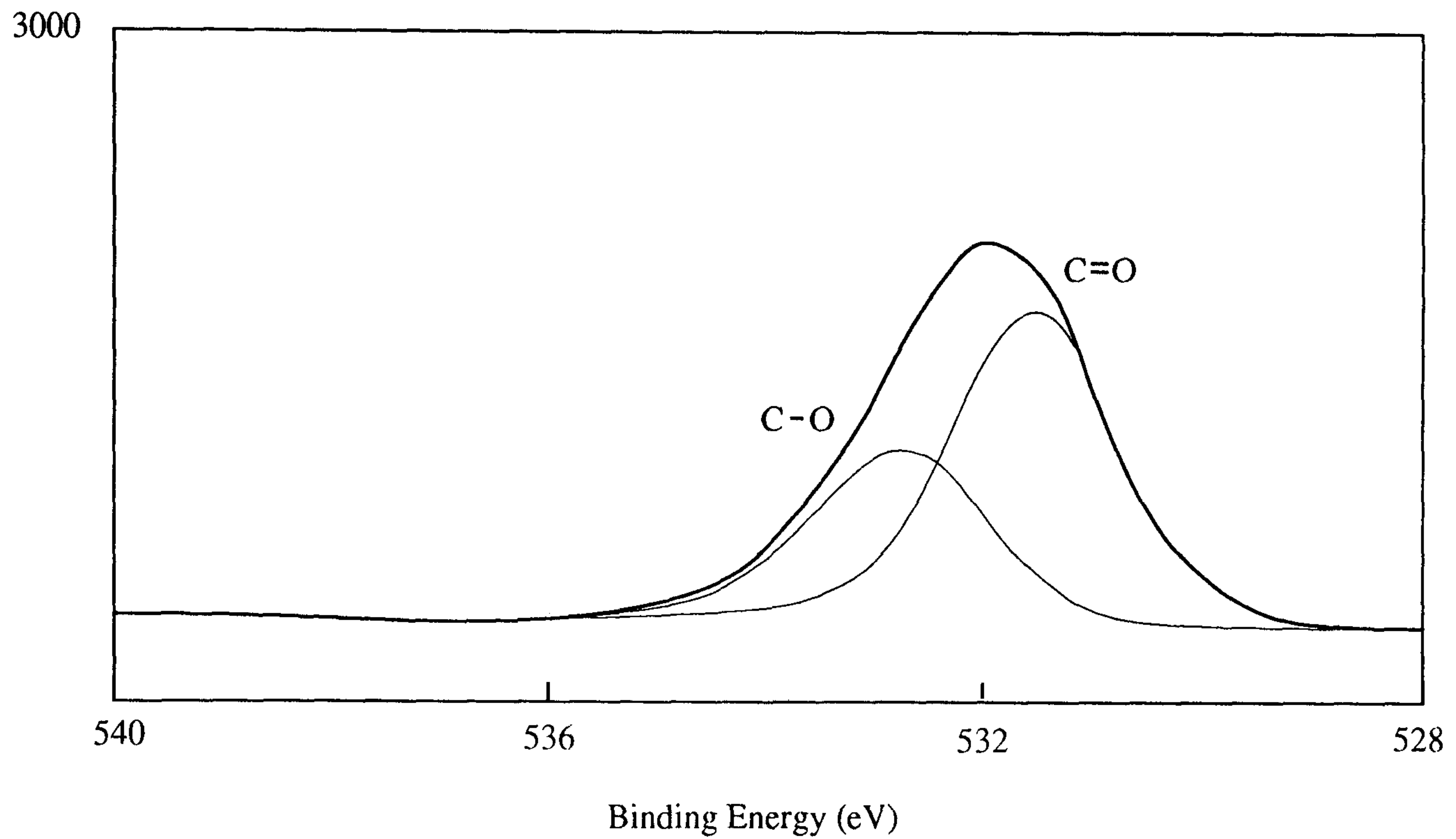


그림 3.4 PU-MAMEC(I)-LK에 대한 ESCA O1s 고해상도 스펙트럼

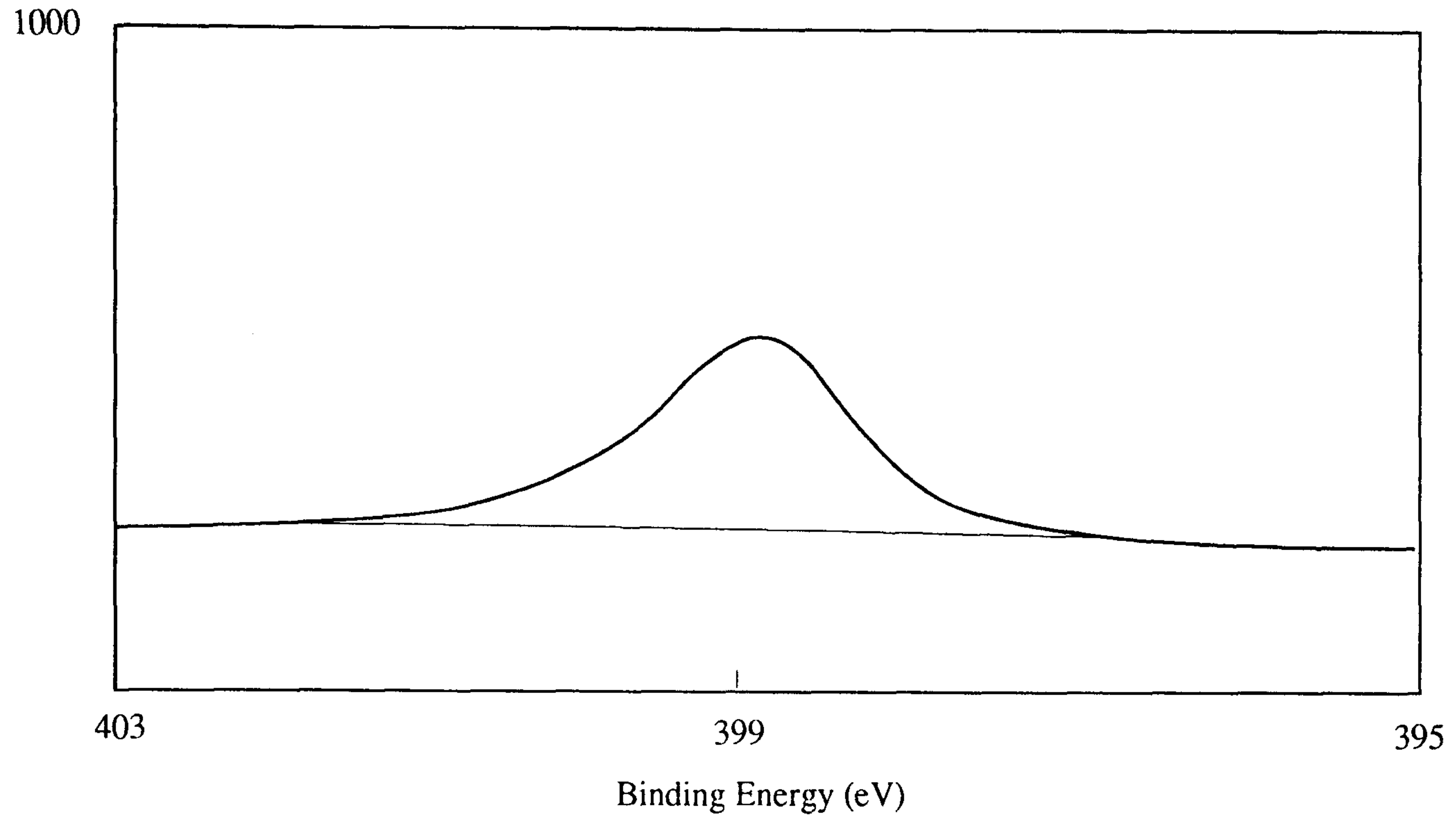


그림 3.5 PU-MAMEC(I)-LK 표면에 대한 ESCA N1s 고해상도 스펙트럼

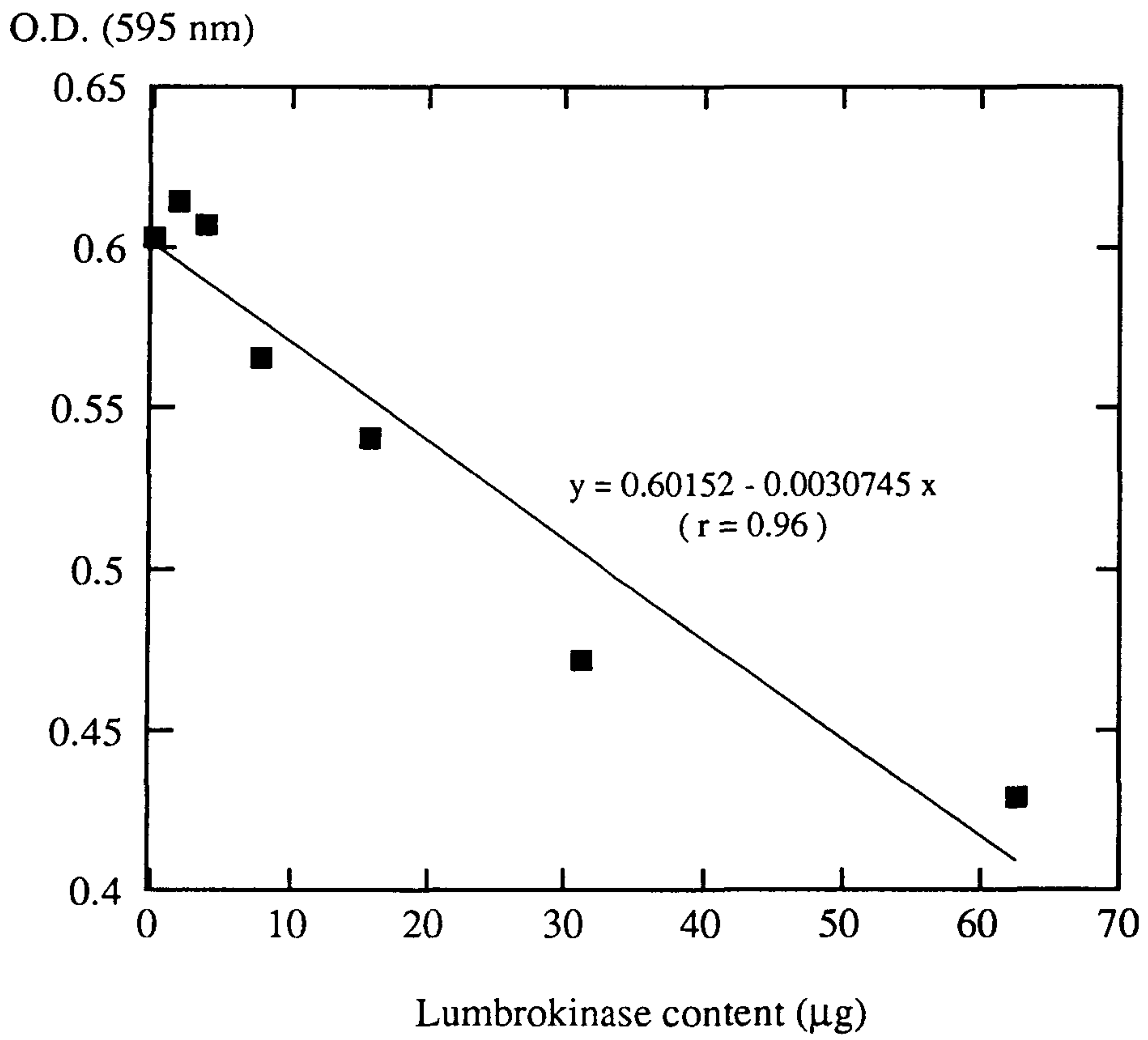


그림 3.6 고정화된 룬부로키나제의 표준곡선

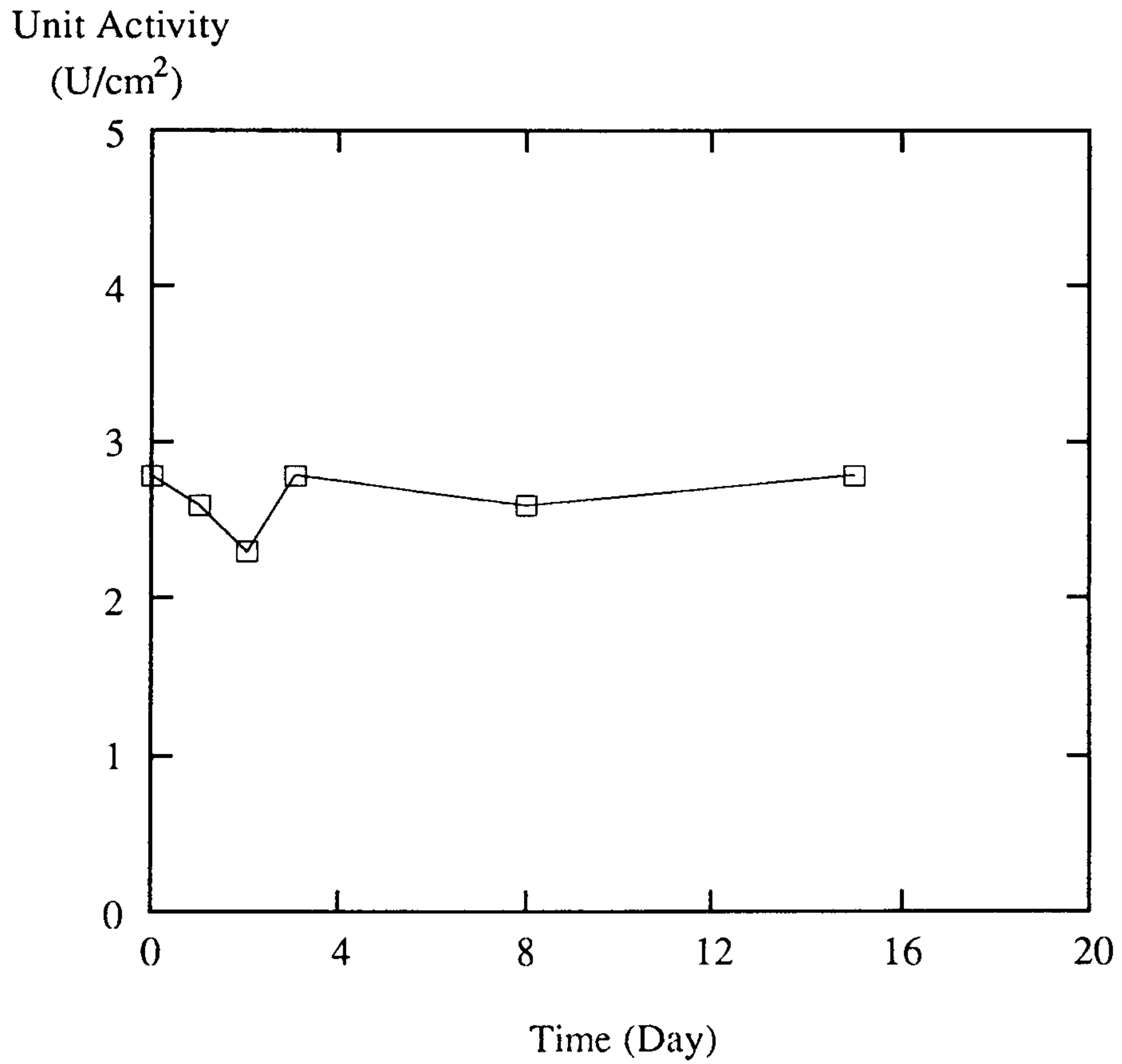


그림 3.7 고정화된 림부로키나제의 시간 따른 활성도

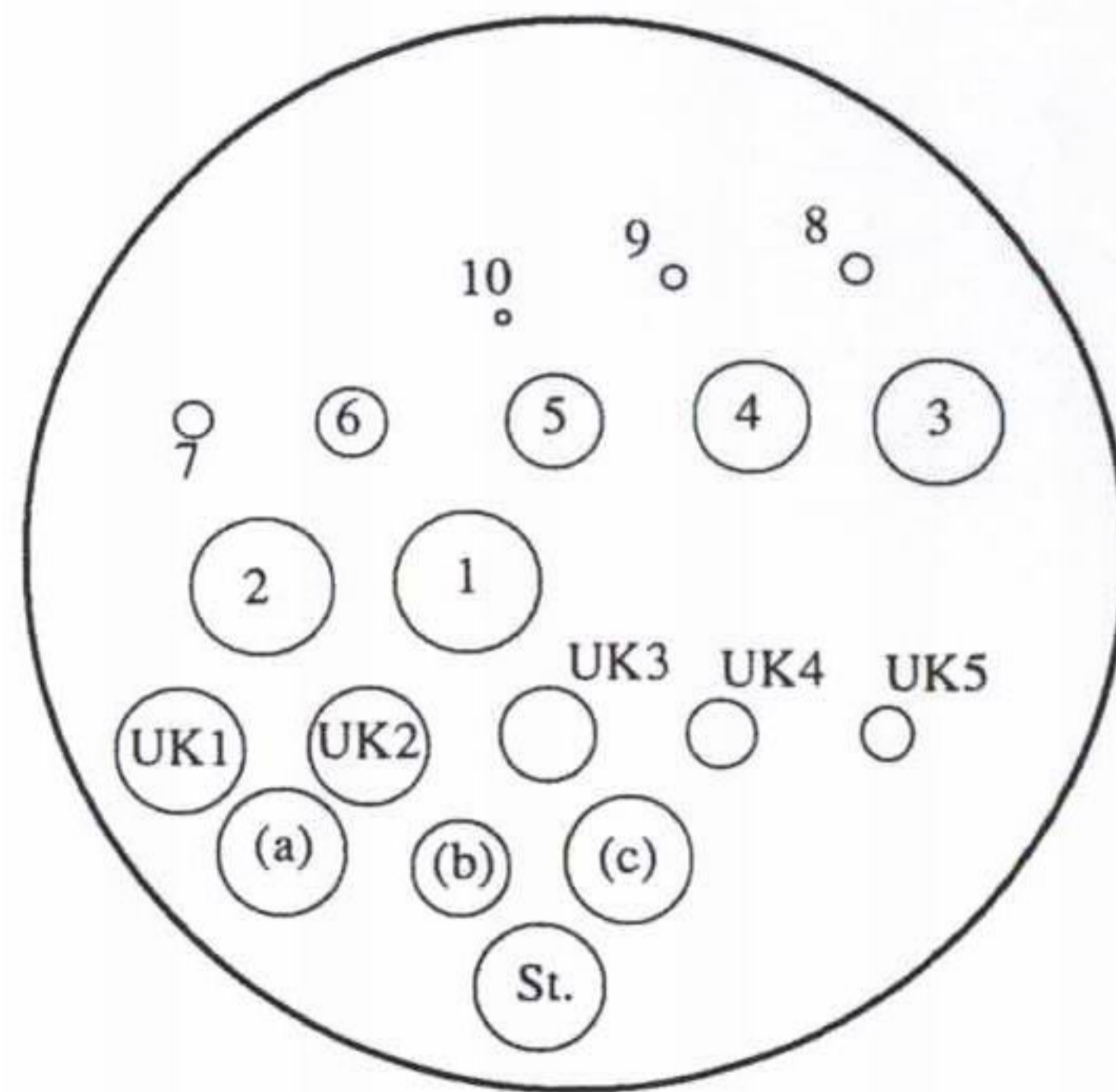
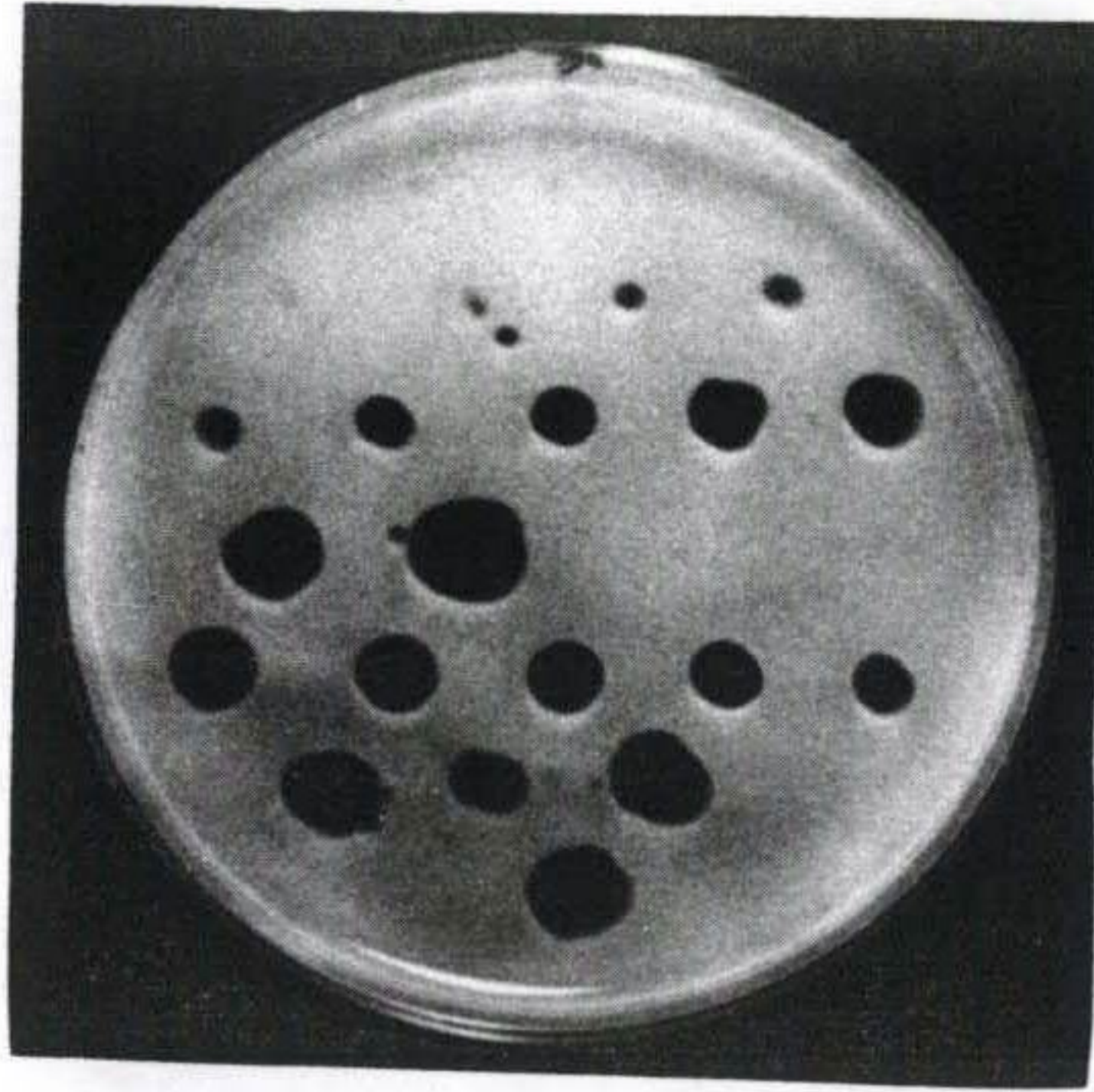


그림 3.8 유로키나제와 롬부로키나제의 혈전분해능 비교실험
 1~10 : 롬부로키나제 희석 용액
 UK1~UK5 : 유로키나제 표준 농도
 (a), (b), (c) : 방법 I, 방법 II, 방법 III의 롬부로키나제 고정화 폴리우레탄 표면
 St. : 미반응 롬부로키나제 표준

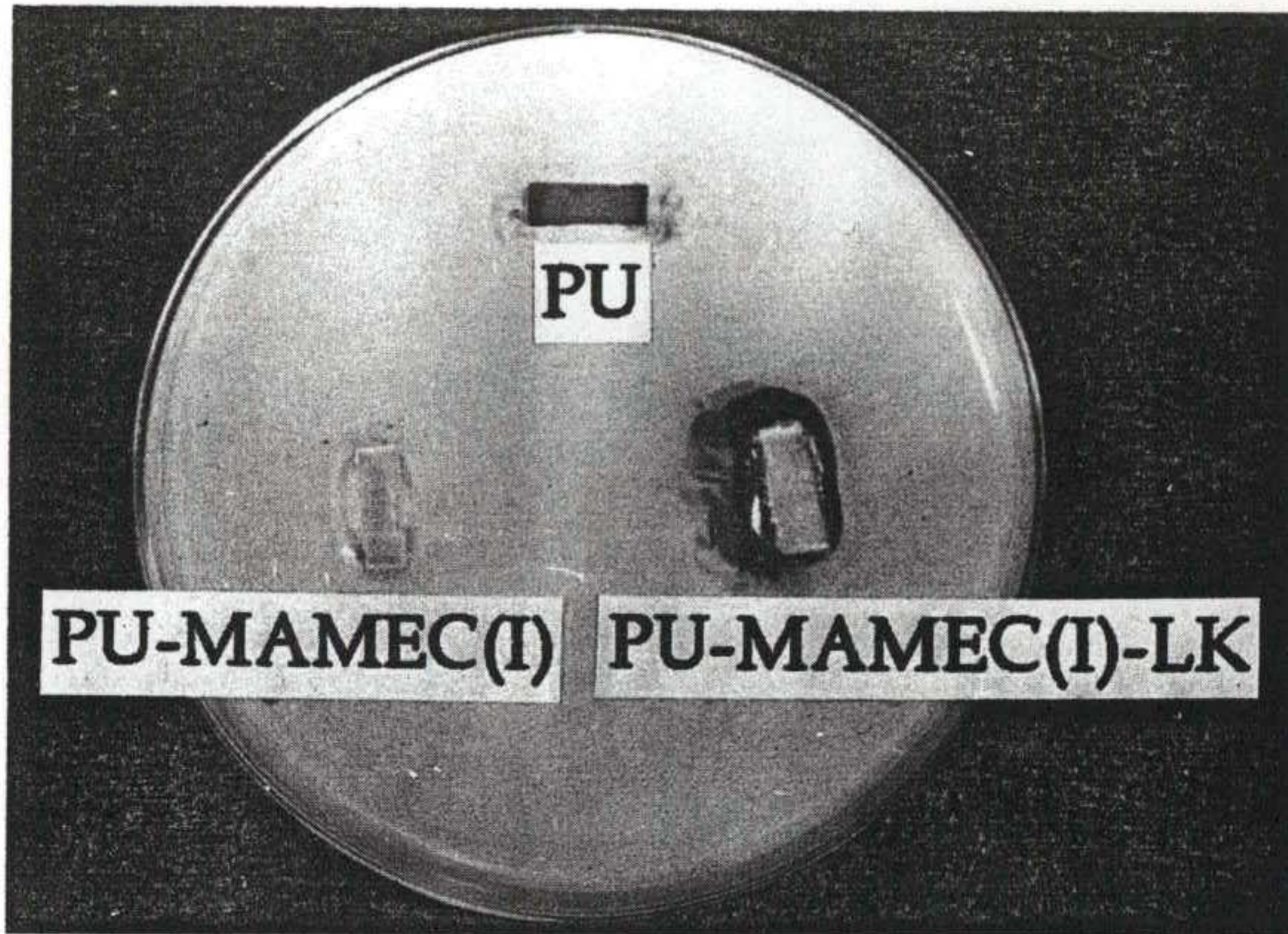


그림 3.9 고정화된 림부로키나제의 섬유소 분해 활성도

O.D. (280 nm)

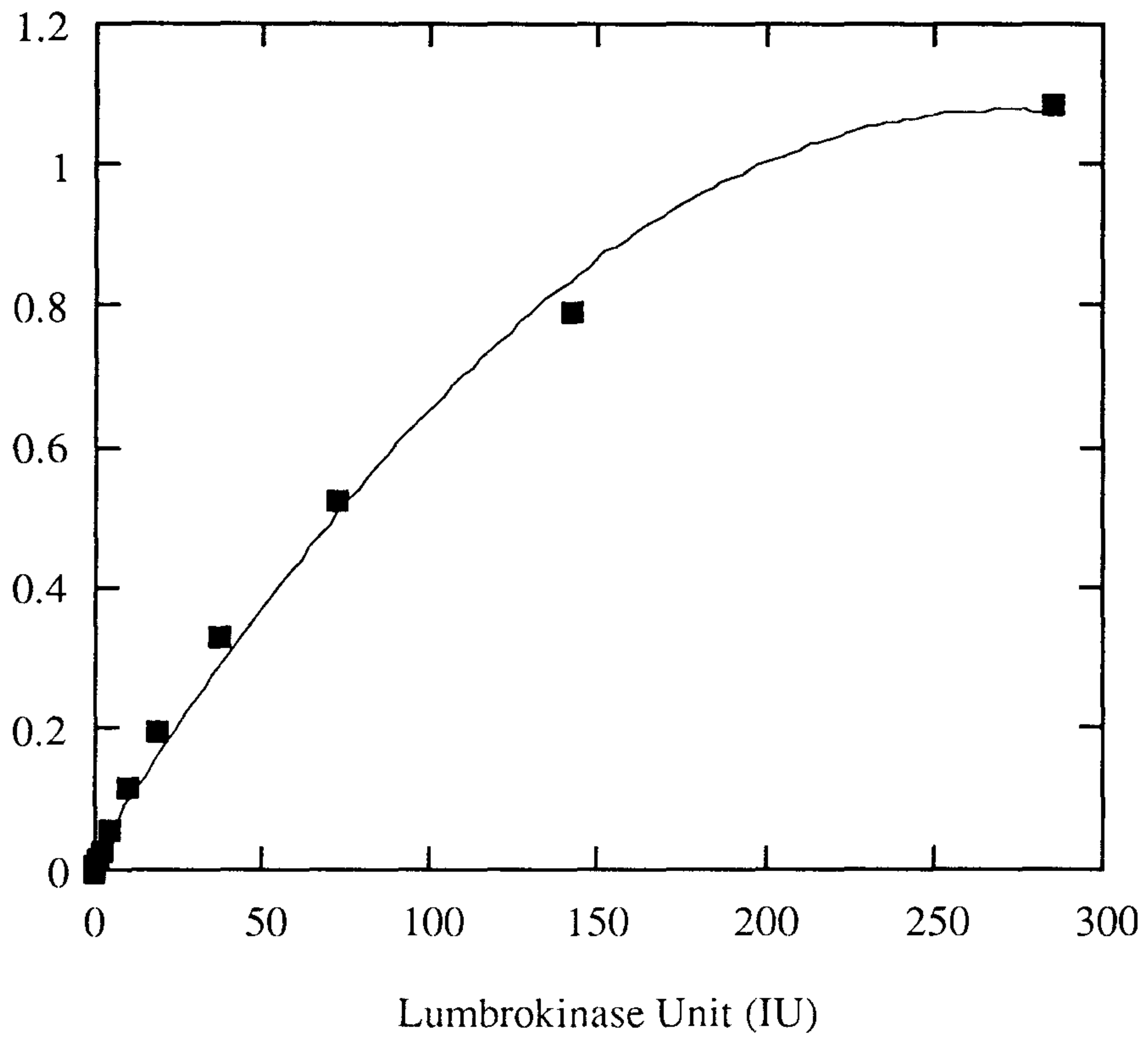


그림 3.10 카세인을 이용한 단백질 분해능에 관한
룸부로키나제 활성도 표준 곡선

O.D. (280 nm)

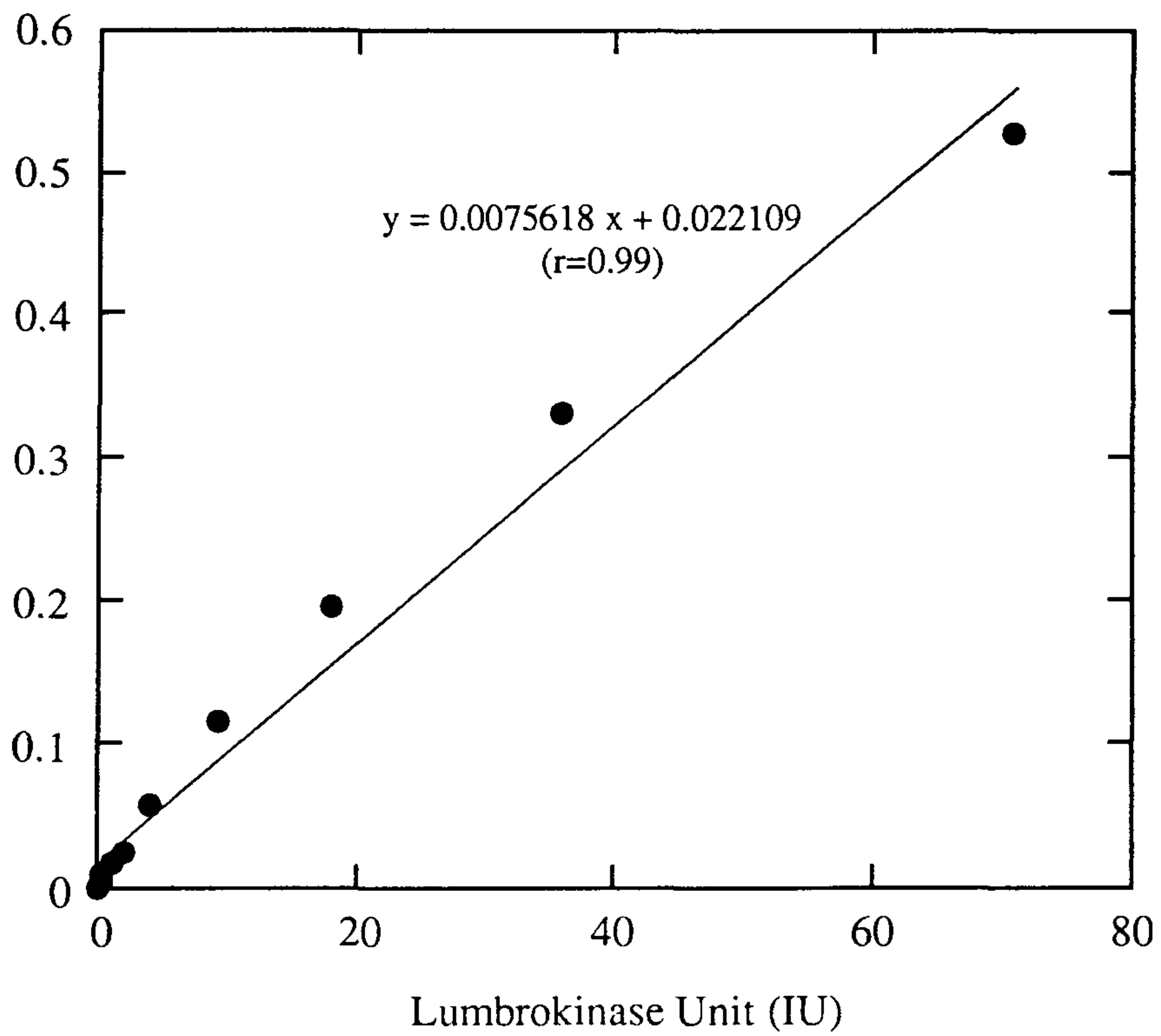


그림 3.11 롬부로키나제의 활성도 표준곡선 : 1차 관계

Lumbrokinase Activity (%)

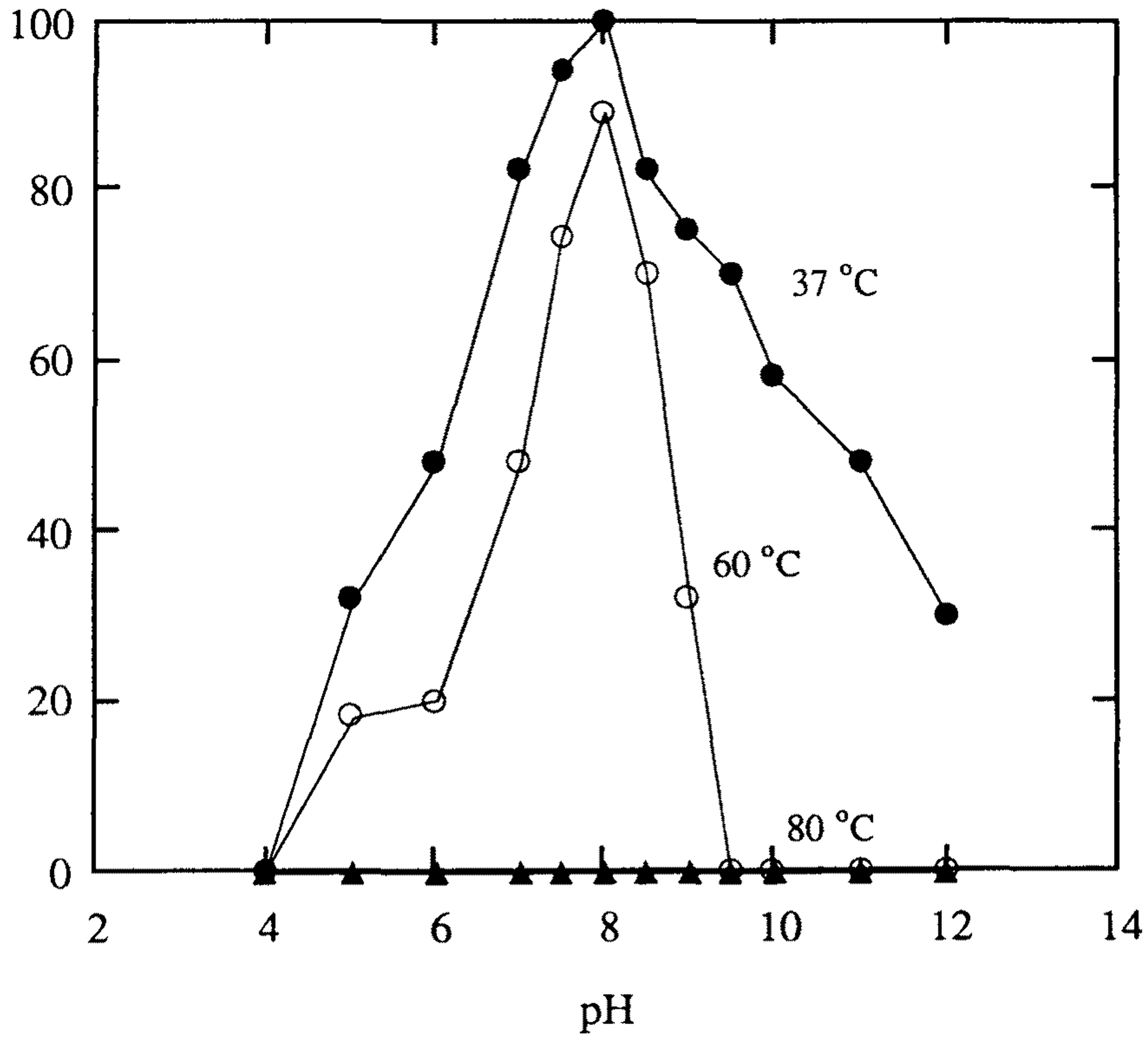


그림 3.12 pH 및 온도에 따른 롬부로키나제 용액의 활성도

Lumbrokinase Activity (%)

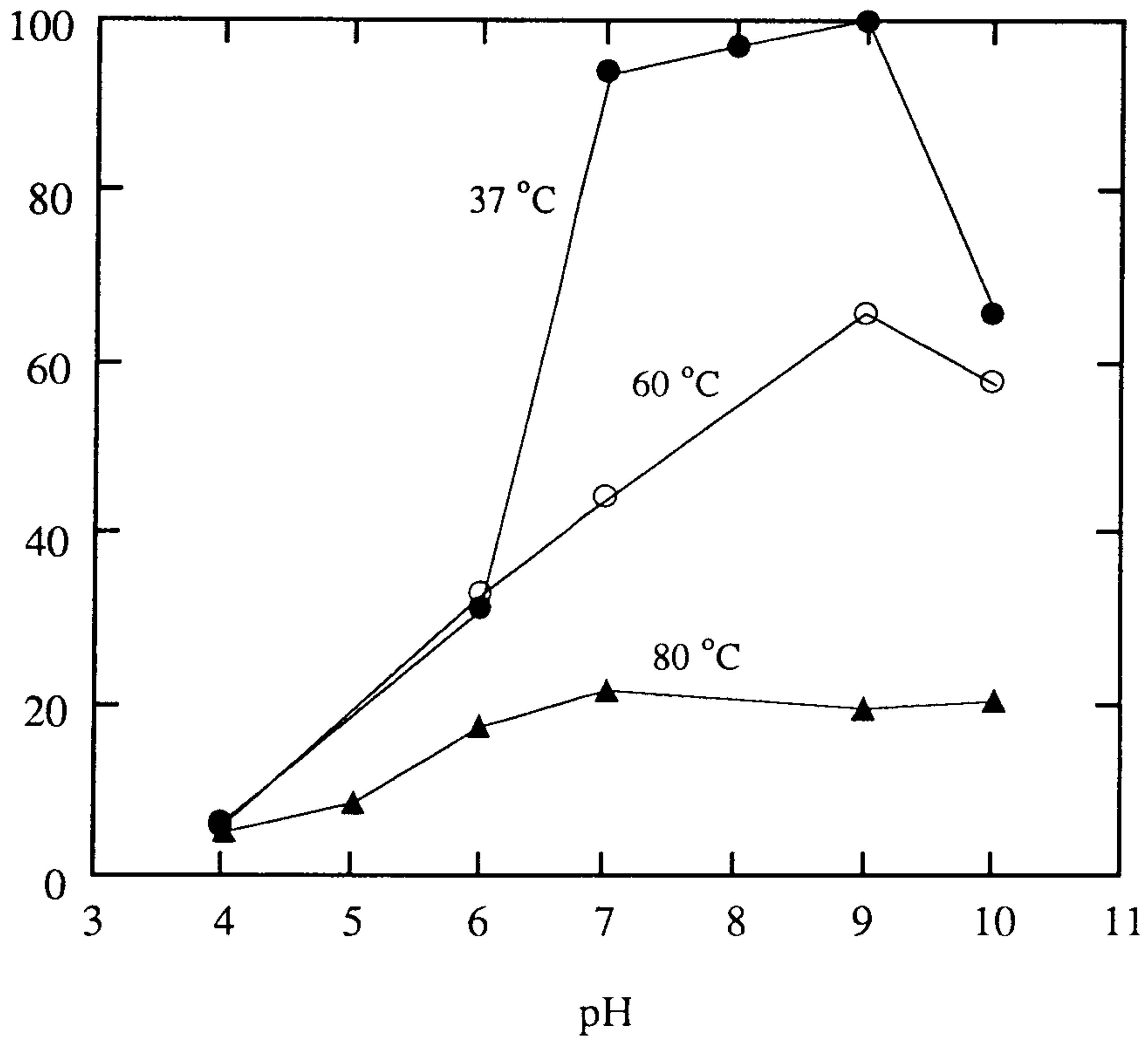


그림 3.13 고정화된 룬부로키나제의 활성에 대한 pH 및 온도의 영향

Lumbrokinase Activity (%)

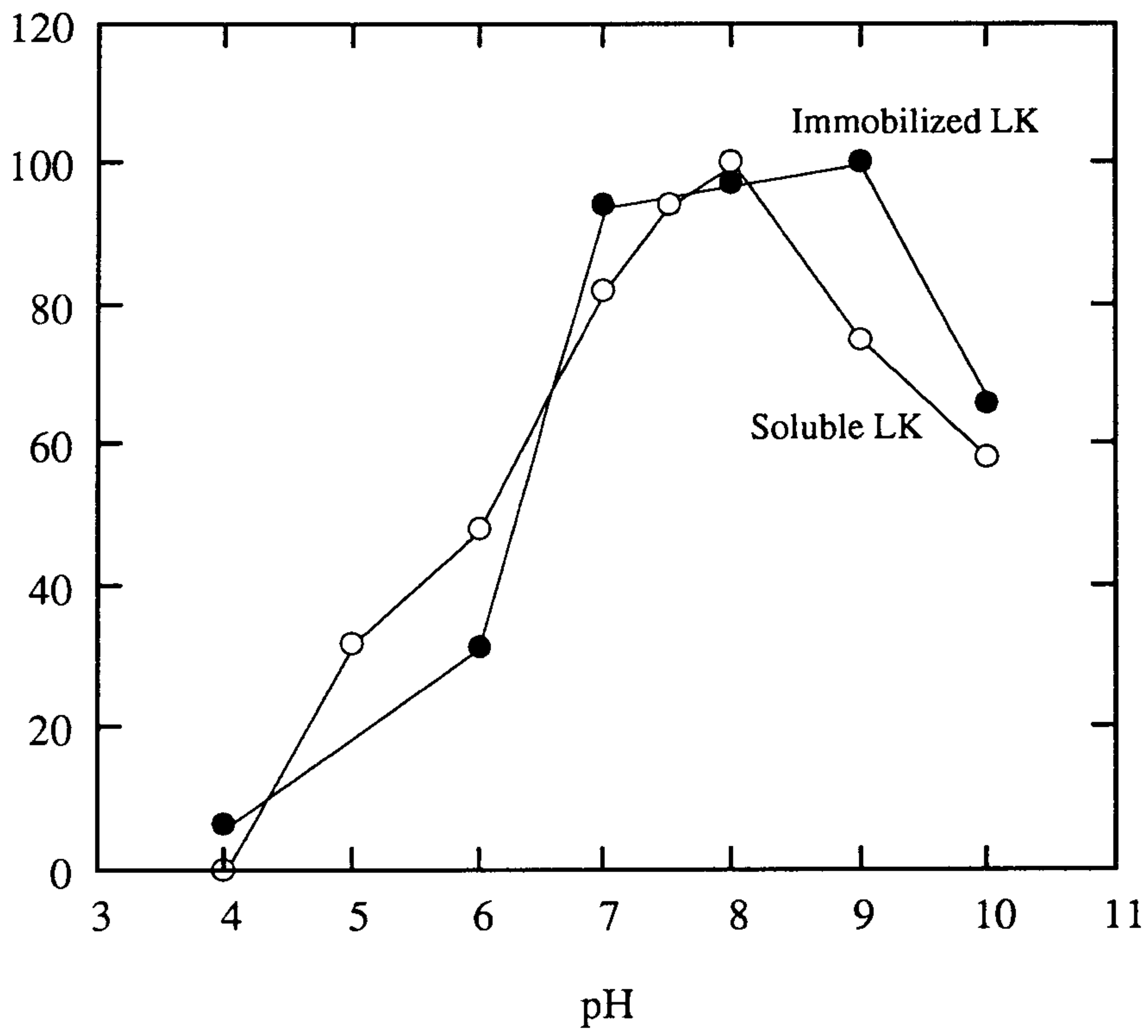


그림 3.14 룬부로키나제 활성도에 대한 pH의 영향 (온도 섭씨 37도)

Lumbrokinase Activity (%)

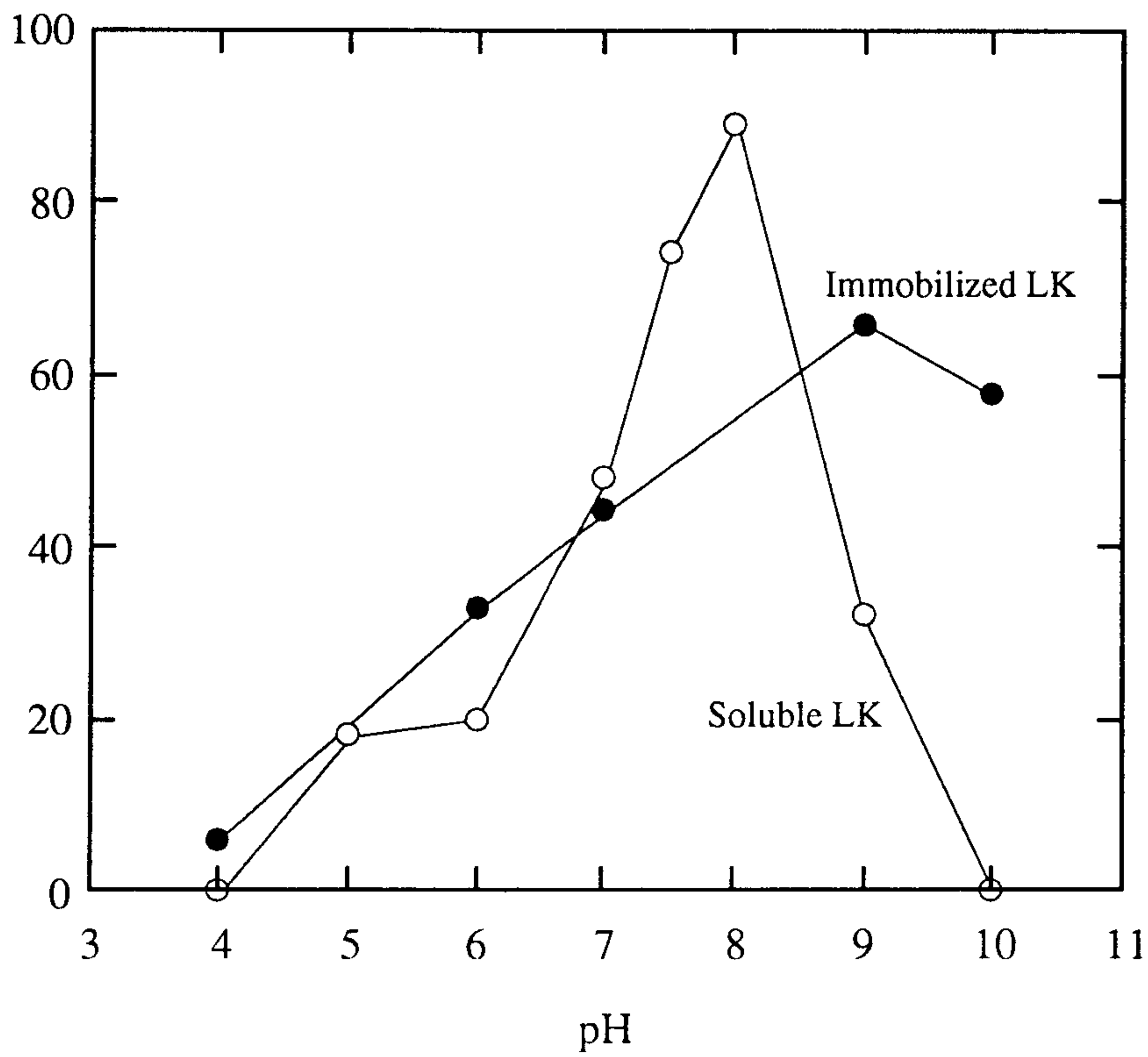


그림 3.15 룬부로키나제 활성도에 대한 pH의 영향
(온도 섭씨 60도)

Lumbrokinase Activity (%)

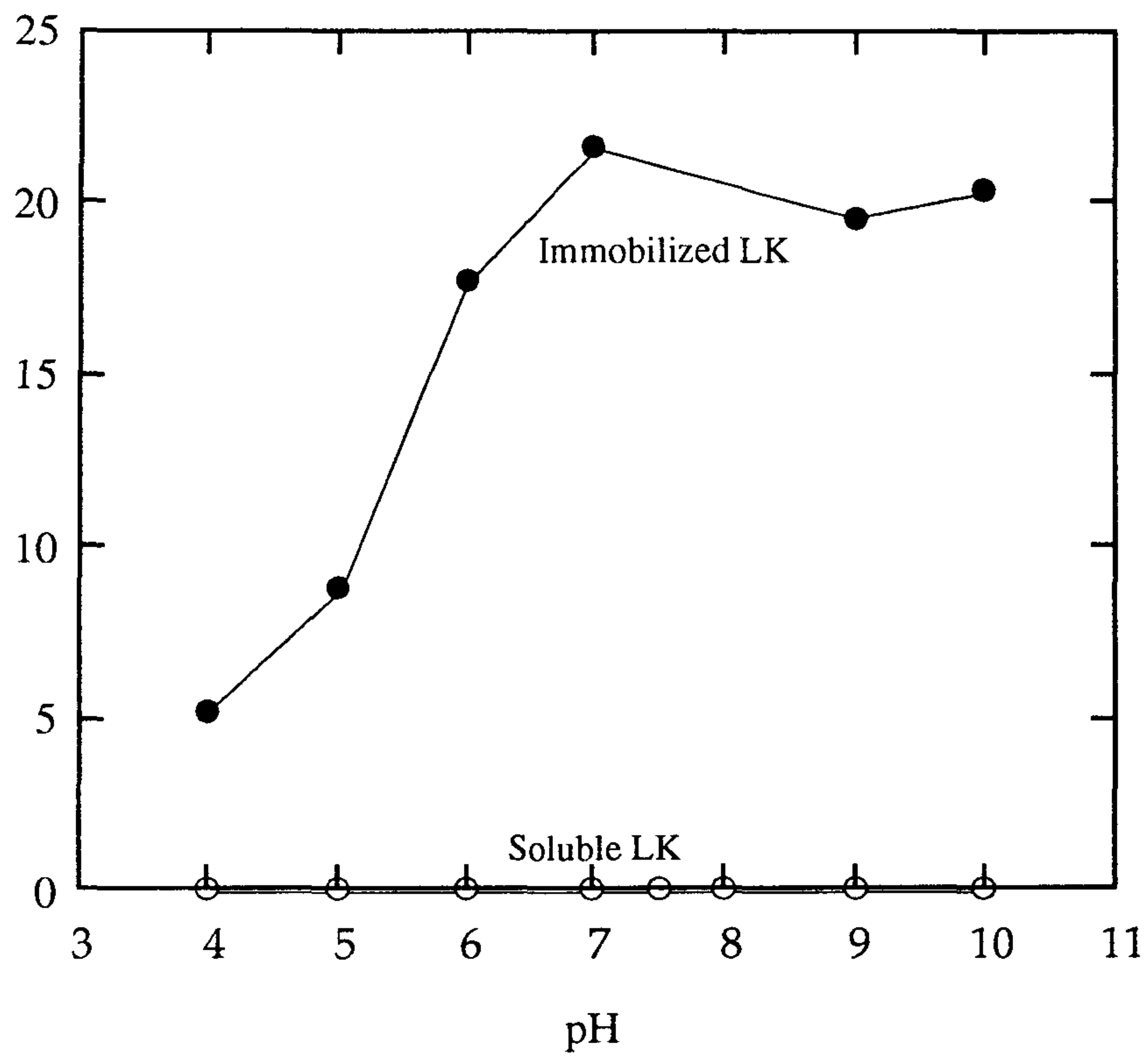


그림 3.16 룬부로키나제 활성도에 대한 pH의 영향
(온도 섭씨 80도)

Lumbrokinase Activity (%)

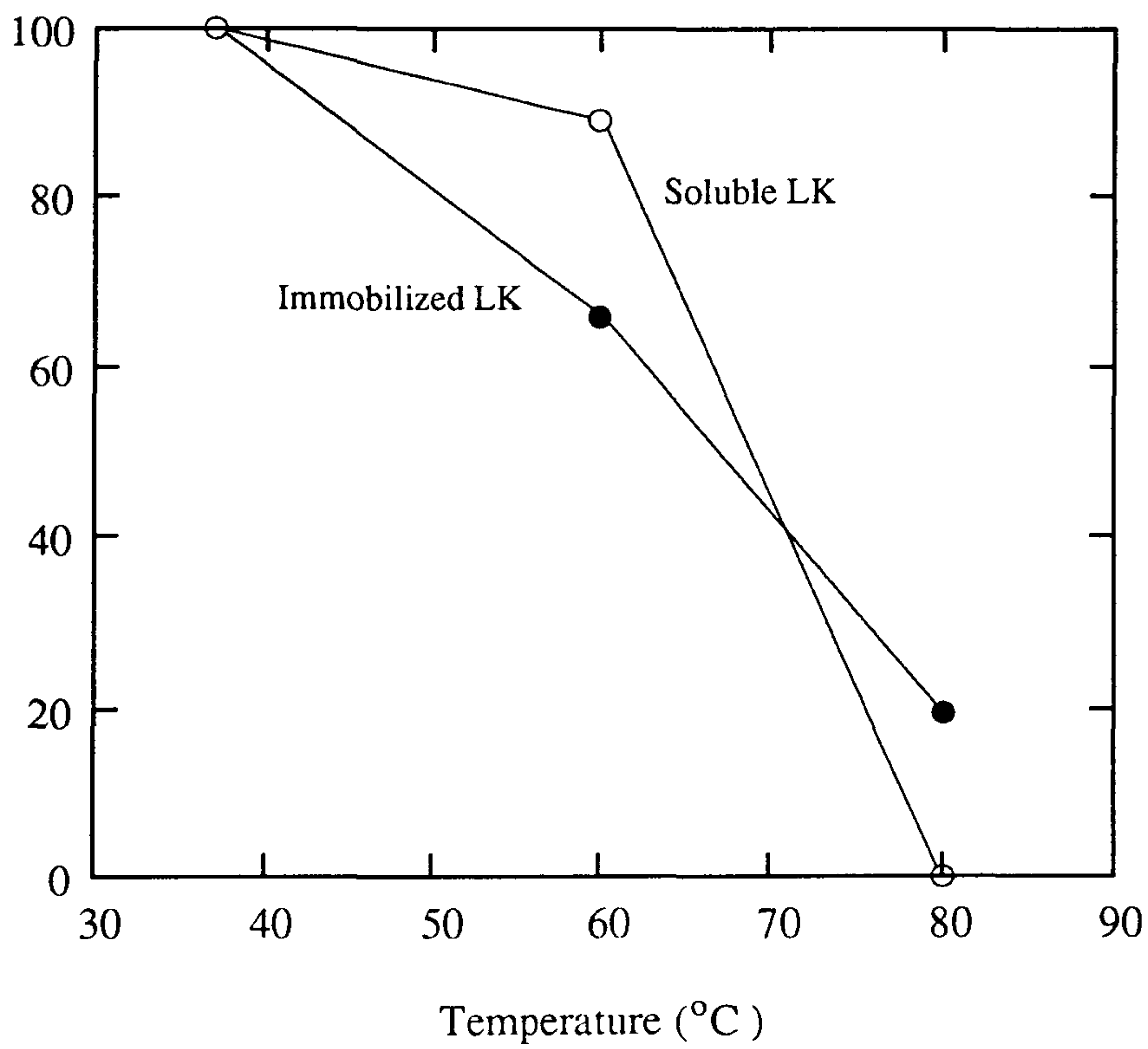


그림 3.17 룬부로키나제 활성도에 대한 온도의 영향

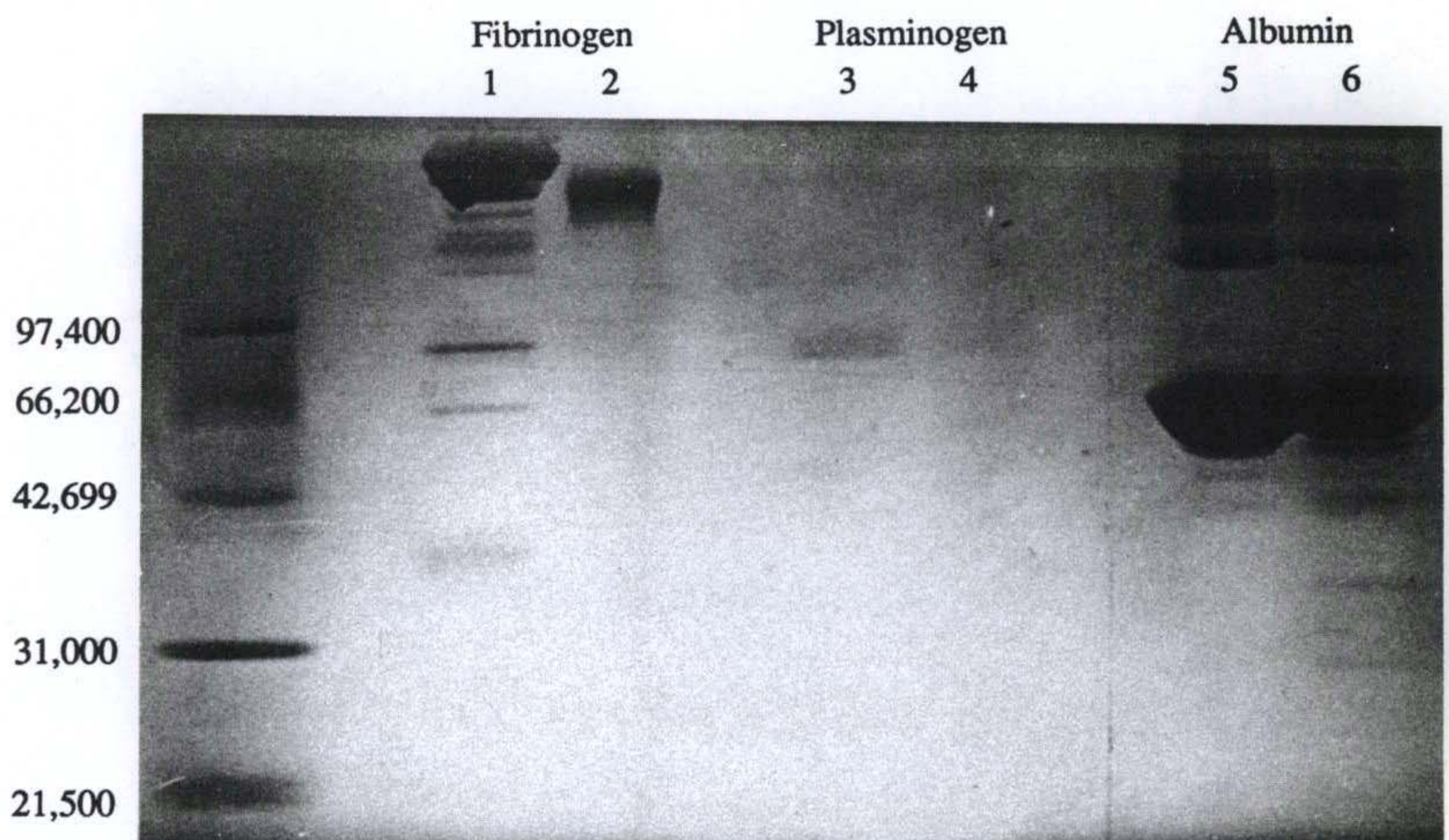


그림 3.18. 고정화된 톱부로키나제에 의한 혈장 단백질들의 분해 양상
 (1, 3, and 5 : 컨트롤)
 (2, 4, and 6 : 톱부로키나제와 반응한 후의 기질)

Fibrinogen Concentration
($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

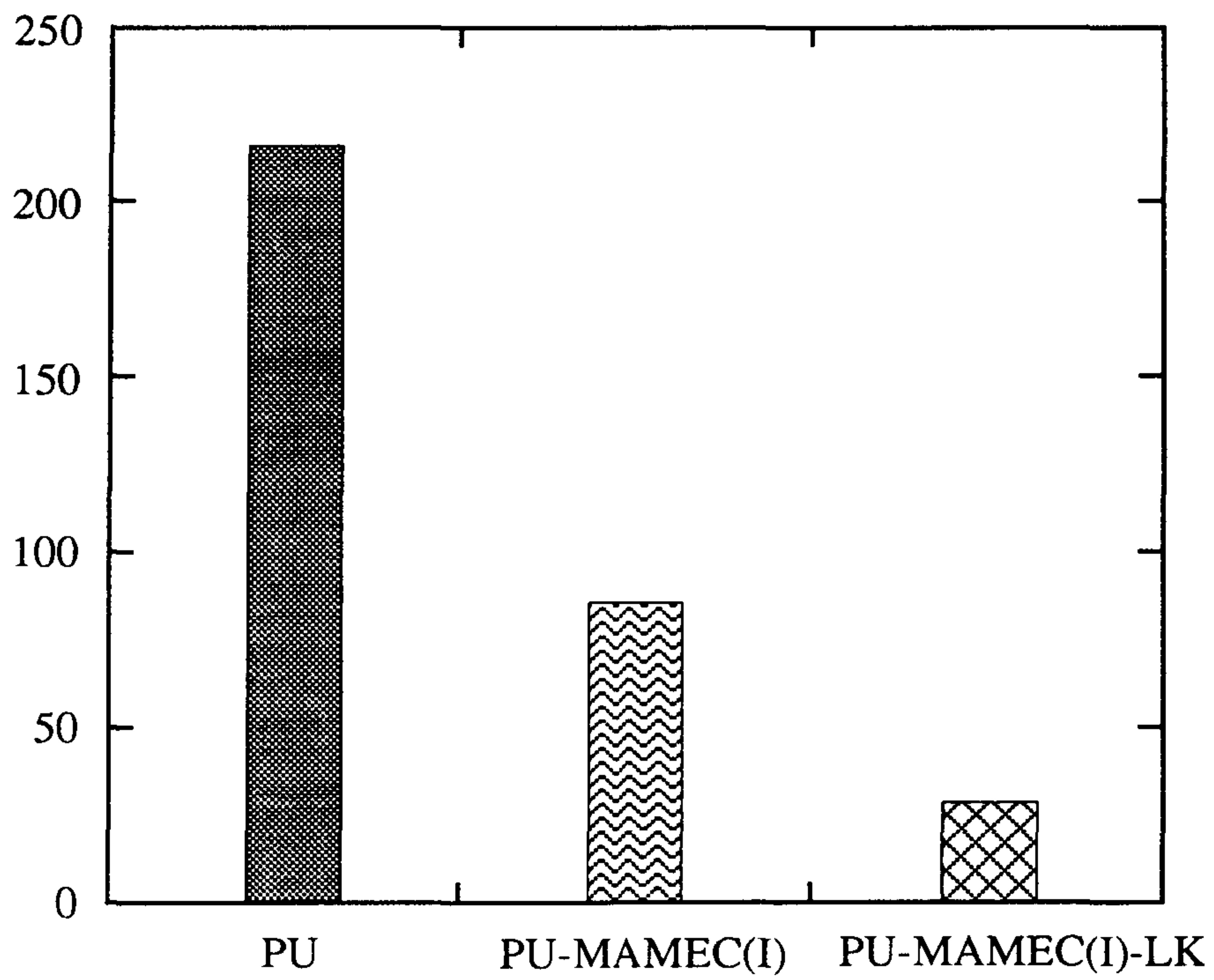


그림 3.19 개질 폴리우레탄에 대한 피브리노젠 흡착량의 분석

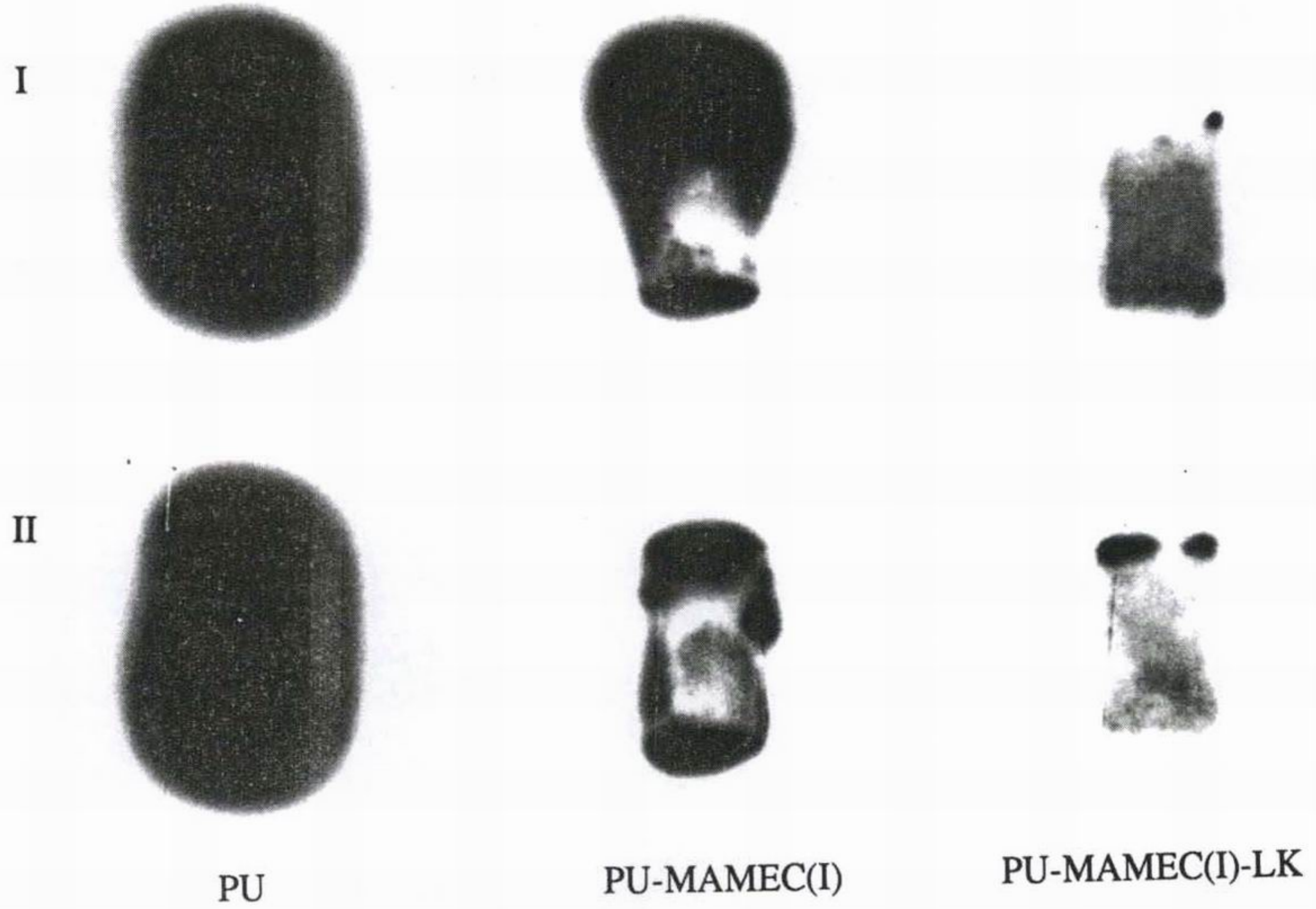


그림 3.20 개질 폴리우레탄에 흡착된 피브리노젠의 분포

PU-MAMEC(I)

PU-MAMEC(I) -LK

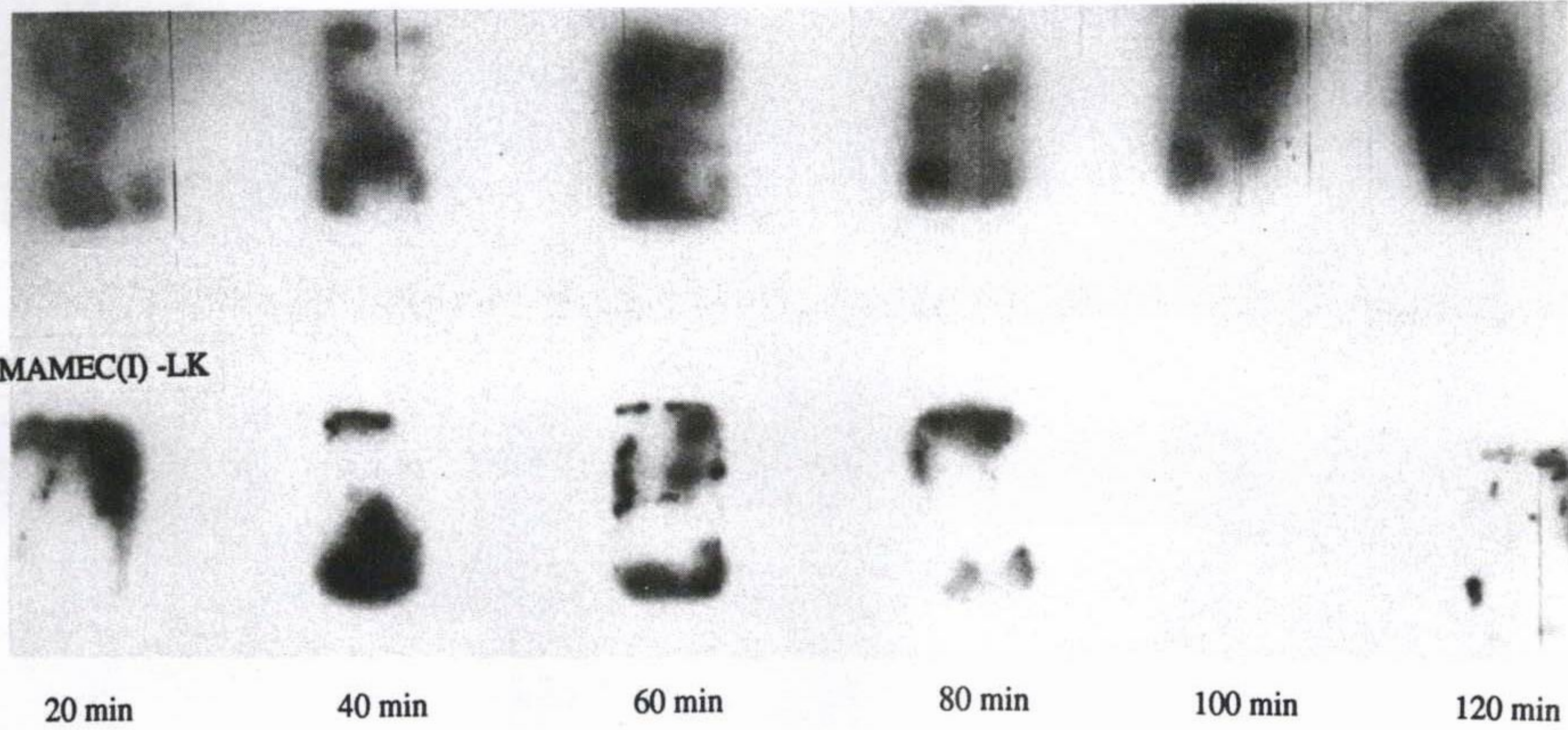


그림 3.21 개질 폴리우레탄에 점착된 혈소판의 분포 양상

No. of Adhered Platelet
(x 10⁵/cm²)

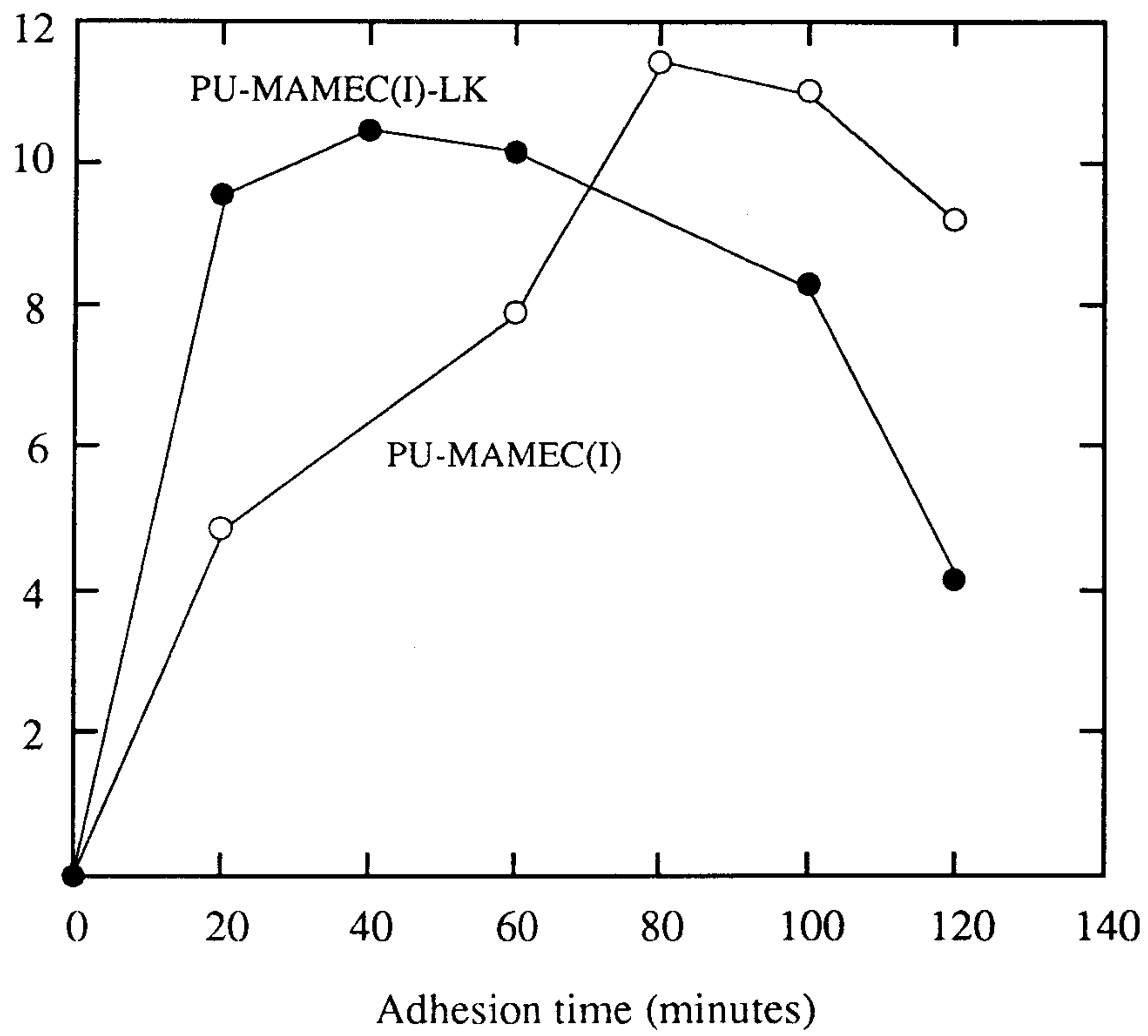


그림 3.22 개질 폴리우레탄의 혈소판 흡착양 분석

제 2 절 혈관내피세포가 도포된 폴리우레탄 표면

1. 섬유아 세포 제거 방법에 따른 혈관 내피 세포의 성장 차이

Hypotonic shock 과 Irradiation 에 의해 생성된 세포외 기질 성분을 처리한 폴리우레탄 위에서의 혈관 내피 세포와 fibronectin 을 처리한 폴리우레탄 위에서의 혈관 내피 세포와 아무런 처리를 하지 않은 폴리우레탄 위에서의 혈관 내피 세포의 증식을 Coulter counter를 사용하여 측정한 결과는 그림 3.23 와 같다. 그림 3.23 에서 본 결과와 같이 Hypotonic shock에 의한 생성된 세포외 기질 성분에 혈관 내피 세포의 증식이 fibronectin 이나, 아무런 처리를 하지 않은 경우 보다 높음을 알 수 있다. Irradiation의 해 생성된 세포외 기질 성분이 처리된 폴리우레탄 면에서는 혈관 내피 세포의 증식에 많은 편차를 보여 주고 있다. 이는 Irradiation 방법에 의해 섬유아 세포가 부분적으로 완전히 사멸되지 않아 혈관 내피 세포와 함께 증식되어, 측정되거나 다른 섬유아 세포의 debris와 함께 측정되어진 결과라고 예상된다. 또한 fibronectin을 처리한 폴리우레탄 위에서의 혈관 내피 세포의 증식이 10일 이후 부터는 감소되는 것을 나타내는데 이는 fibronectin이 초기에는 폴리우레탄 위에서 혈관 내피 세포의 부착을 도와 증식이 향상되나 혈관 내피 세포의 분화에는 큰 도움을 주지 못하는 현상때문인 것으로 보여진다. Irradiation으로 생성된 세포외기질 성분의 현미경 관찰이 그림 3.24 에 나타나 있다. Irradiation에 의해 폴리우레탄위에 생성된 세포외 기질에서 섬유아세포가 남아 있음을 알 수 있다. 그림 3.23에서 나타난 혈관 내세포의 증식 양상을 통계 처리하여 doubling time을 유추한 결과가, 표 3.8 에 나타나 있다. 이 결과 Irradiation 에 의해 생성된 세포외기질 성분에서 자란 혈관 내피 세포의 doubling time이 섬유아 세포의 doubling time과 일치하므로 섬유아세포의 잔존을 확인할 수 있었다. 따라서, 비교적 간단한 Hypotonic shock 방법으로 섬유아 세포를 제거하여 세포외 기질을 남기고, 그위에 혈관 내피 세포를 증식하는 방법이 좋을 것으로 보인다.

2. 혈관 내피 세포의 부착능

가. 표면처리에 따른 혈관내피세포의 부착능평가

층류발생실험기를 이용하여 혈관내피세포의 부착능을 평가하였다. 혈관내피 세포는 폴리우레탄 표면에 고정된 세포외기질이나, 파이브로넥틴등의 단백질과 세포막내의 리셉터간에 기계적인 결합을 하는 것으로 알려져있으므로, 콘트롤로 제안된 폴리우레탄표면에 아무런 처리를 하지 않은 실험군에 비해서 세포외기질이나 파이브로넥틴을 도포한 표면에 부착된 혈관내피세포의 부착능이 향상될 것으로 예상된다. 실제 실험을 통하여 검증한 결과를 분석하여 보면, 혈관내피세포의 부착능은 폴리우레탄 콘트롤에 비해서 세포외기질과 파이브로넥틴을 도포한 경우에 증가한 것으로 나타났다.

그림 3.25 은 혈관내피세포를 이식한지 2일 후에 실험을 행한 결과를 보여준다. 그래프는 저전단응력에 대한 결과를 표시하며, 고전단응력의 경우도 유사한 결과를 보여준다. 세포의 부착능은 최초 1분간의 전단응력에 노출되는 것으로 폴리우레탄콘트롤의 경우는 약 70%, 파이브로넥틴의 경우는 약 60%, 세포외기질인 경우는 55%정도가 폴리우레탄으로 부터 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 세포의 분리현상은 실험시간이 지속될 수록 증가하여, 전단응력부가 10분 후에는 폴리우레탄 콘트롤인 경우는 약 98%의 혈관내피세포가 분리되었다. 세포외기질과 파이브로넥틴을 도포한 경우도 약 95%정도의 혈관내피세포가 분리되어 인공심장등의 큰 전단응력을 발생시키는 순환장기의 혈액접촉부분에 혈관내피세포를 이식하려면 혈관내피세포의 부착능을 증가시키기위한 많은 연구가 이루어져야한다.

세포외기질과 파이브로넥틴을 도포한 폴리우레탄표면의 세포부착능의 증가가 4일째의 결과까지는 유의하게 나타나지만 (그림 3.26), 혈관내피세포의 이식후 7일부터는 그 차이가 현격하게 줄어들어서 큰차이를 보이지 않았다(그림 3.26). 이는 세포

외기질이나 파이브로넥틴의 세포부착능의 기능이 혈관내피세포이식 7일정도를 전후로 떨어지는 것을 의미하며, 이러한 경향은 파이브로넥틴의 경우가 더욱 크게 나타나는데, 이는 파이브로넥틴등의 단백질이 혈관의 초기부착에 관여하는 부착단백질이므로, 7일정도 지난후의 혈관내피세포의 증식이나 이동등에는 좋지않은 결과를 주어 결과적으로는 혈관내피세포의 부착능을 떨어뜨리는 것으로 보인다.

특히, 파이브로넥틴이 도포된 폴리우레탄의 경우는 세포의 부착능력이 혈관내피세포이식후 2일에서 4일사이에 최대가 됨을 알수 있으며, 7일부터는 현격하게 떨어지는 것을 그림 3.27 의 전단응력부가 5분후의 결과로부터 알수 있다. 이때, 1일, 7일, 11일때에는 전단응력부가 5분후에 약 96%의 혈관내피세포가 분리되었으나, 2일과 4일째에는 약 78%정도만이 분리되어 향상된 세포부착능을 보였다. 그러나, 혈관내피세포에 10분간의 전단응력을 부가하고나면 초기1일째나 7일, 11일째에는 약 96%정도의 혈관내피세포가 분리되었으며, 2일째나 4일째에도 약 93%정도가 분리되어 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 경향은 세포외기질을 도포한 경우에도 유사하게 나타나지만, 파이브로넥틴처럼 현저한 차이를 보이지는 않았다. (그림 3.28) 이는 세포외기질에는 파이브로넥틴 뿐 아니라 다른 종류의 단백질들도 다수 포함되어 있으므로, 이들 단백질들이 혈관내피세포의 증식이나 이동에 관여하고 있는 것으로 생각이 된다.

나. 전단응력의 크기에 따른 혈관내피세포의 부착능평가

전단응력의 크기는 혈관내피세포의 부착능과 직접적인 관계를 가지는 변수로 전단응력의 증가는 혈관내피세포의 부착능을 현격하게 감소시키는 것으로 나타났다. 그림 3.29 은 혈관내피세포이식 후 4일째의 실험결과로 속이 빈 다각형으로 표시된 저전단응력의 경우가 속이 찬 다각형으로 표시된 고전단응력의 경우보다 부착능이 높게 나타나고 있다. 전단응력부가 10분후의 결과를 비교해보면 저전단응력의 경우는 약 7%의 혈관내피세포가 부착되어 있었으나, 고전단응력의 경우는 2~3%의 혈관내피세

포만이 부착되어 있었다.

다. 폴리우레탄 표면에 부착된 단백질의 부착능 평가

전단응력을 10분동안 작용시킨후 검사유체에 분리되어 나온 혈관내피세포의 수와 실험후에 폴리우레탄 표면에 남아있는 혈관내피세포의 수를 합하면 실험시간에 따르는 혈관내피세포의 증식을 유추할 수 있다. 이때, 혈관내피세포 이식 후의 1일째의 결과를 검토하여보면, 폴리우레탄에 이식한 혈관내피세포의 수와 파이브로넥틴에 이식한 혈관내피세포의 수 (대략 15×10^5 cells/well) 는 거의 비슷하게 나타나지만, 세포외기질을 도포한 경우는 이보다 약 2배정도 많은 갯수 (대략 32×10^5 cells/well) 의 세포가 존재하는 것으로 측정되었다. 이는 쿨터 카운터가 세포의 크기에 해당하는 모든 입자들을 세므로 폴리우레탄으로부터 떨어진 단백질의 조각들까지도 혈관내피세포로 인식한것으로 보인다.

실험중에 유추한 혈관내피세포의 증식은 그림 3.30에 나타나 있다. 아랫쪽의 3개의 선들은 다른 실험에서 얻은 혈관내피세포의 증식그래프인데, 혈관내피세포를 세포외기질에서 배양하였을때 가장 좋은 증식력을 얻을 수 있었다. 윗쪽에 존재하는 3개의 그래프는 부착능평가실험에서 간접적으로 얻은 증식곡선이다. 이는 초기의 혈관내피세포의 이식농도가 다르기때문이다. 폴리우레탄이나 파이브로넥틴의 증식곡선이 4일내지 7일정도까지는 증가하다가 감소하는 양상을 보이는 것은 자연스러운 것으로 기준으로 삼은 혈관내피세포의 증식곡선과 유사한 양상을 보인다. 이는 혈관내피세포의 부착력과 증식력이 모두 4~7일정도에서 최대가 되는 것을 의미하는데, 혈관내피세포의 증식력이 감소하는 시점부터 혈관내피세포의 부착력도 감소하는 양상을 보여준다.

특이할만한점은 세포외기질을 도포한 폴리우레탄표면의 혈관내피세포의 증식력인데, 기준실험에서는 세포외기질을 도포한 경우가 기타의 경우보다 그 증식력이

높게 나타나 있으며 이는 시간이 지날 수록 더욱 큰 차이가 나고 있다. 그러나, 부착능 실험에서는 세포외기질을 도포한 경우의 증식력이 다른 표면에 대한 경우보다 높지 않게 나타나고 있다 (그림 3.30). 이는 세포외기질을 만든 섬유아세포의 세대에 따른 영향으로 보이는데, 기준실험에 이용된 섬유아세포의 세대는 약 5~10세대였으나, 부착능 평가를 위한 섬유아세포의 세대는 25세대의 것을 이용한 때문으로 보인다. 즉, 섬유아세포의 세대가 높아지면서, 섬유아세포가 형성하는 세포외기질의 조성이 다소간 변하는 것으로 생각이 되며, 이는 세포외기질과 혈관내피세포 간의 결합력뿐 아니라 세포외기질과 폴리우레탄표면의 결합력도 저해하는 결과를 가져온 것으로 보인다.

표 3.8 혈관내피세포의 성장곡선식 및 doubling time

Surfaces	Analysis of Growth Curves		
	Fitted equation	Correlation Coefficient	Doubling time
PU control	$Y=12734*Exp(0.06558*t)$	0.67	254 hrs
Fibronectin coated PU	$Y=14373*Exp(0.09741*t)$	0.83	171 hrs
ECM coated by Irradiation	$Y=29609*Exp(0.24052*t)$	0.84	67 hrs
ECM coated by Hypotonic shock	$Y=13865*Exp(0.16781*t)$	0.97	99 hrs

Cell Growth
 ($\times 10^5 / \text{cm}^2$)

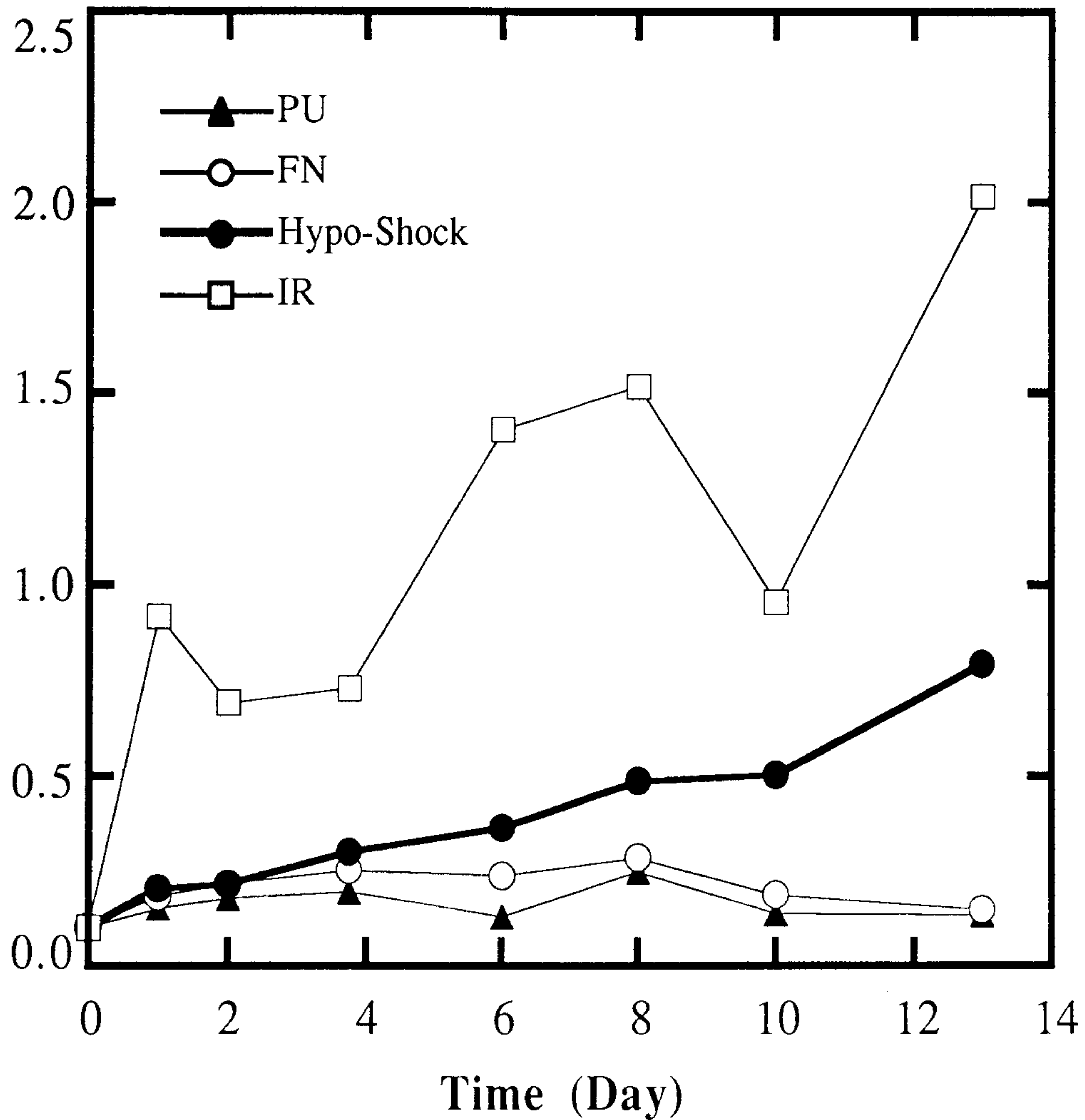


그림 3.23 4가지 표면위에서의 혈관내피세포 성장 곡선
 (PU: polyurethane, FN: Fibronectin-coated Polyurethane)
 (Hypo-Shock: hypotonic shock method, IR: irradiation method)



그림 3.24 Irradiation으로 만든 세포외기질 위에 혈관내피세포를 배양한 표면의 광학현미경 사진(200X)

Attached Cells (%)

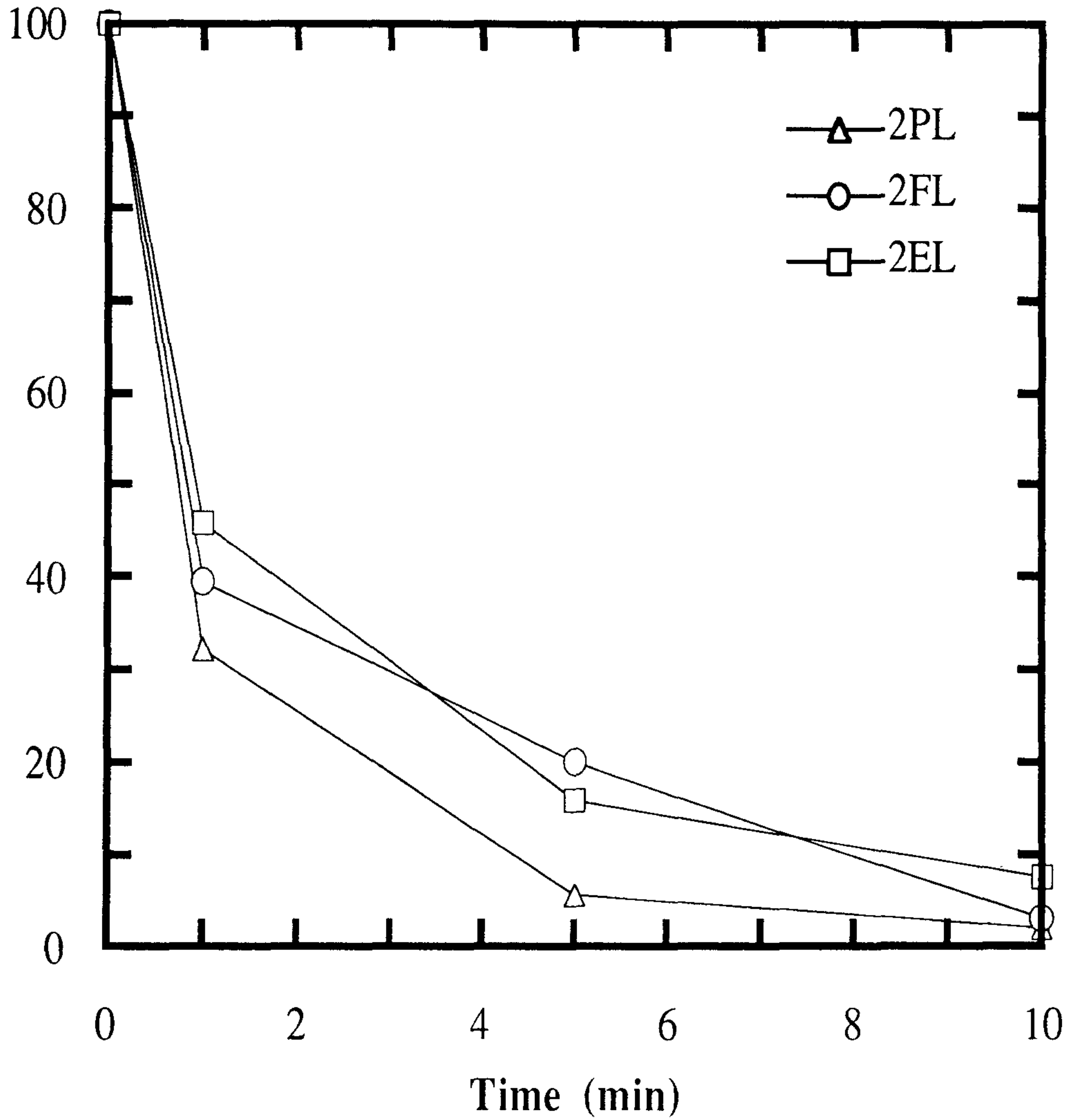


그림 325 폴리우레탄표면에 따른 혈관내피세포의 부착능
 (2: 배양 2일째, P: 폴리우레탄, F: 파이브로넥틴이 도포된 폴리우레탄,
 E: 세포외기질이 도포된 폴리우레탄, L: 낮은 전단응력)

Attached Cells (%)

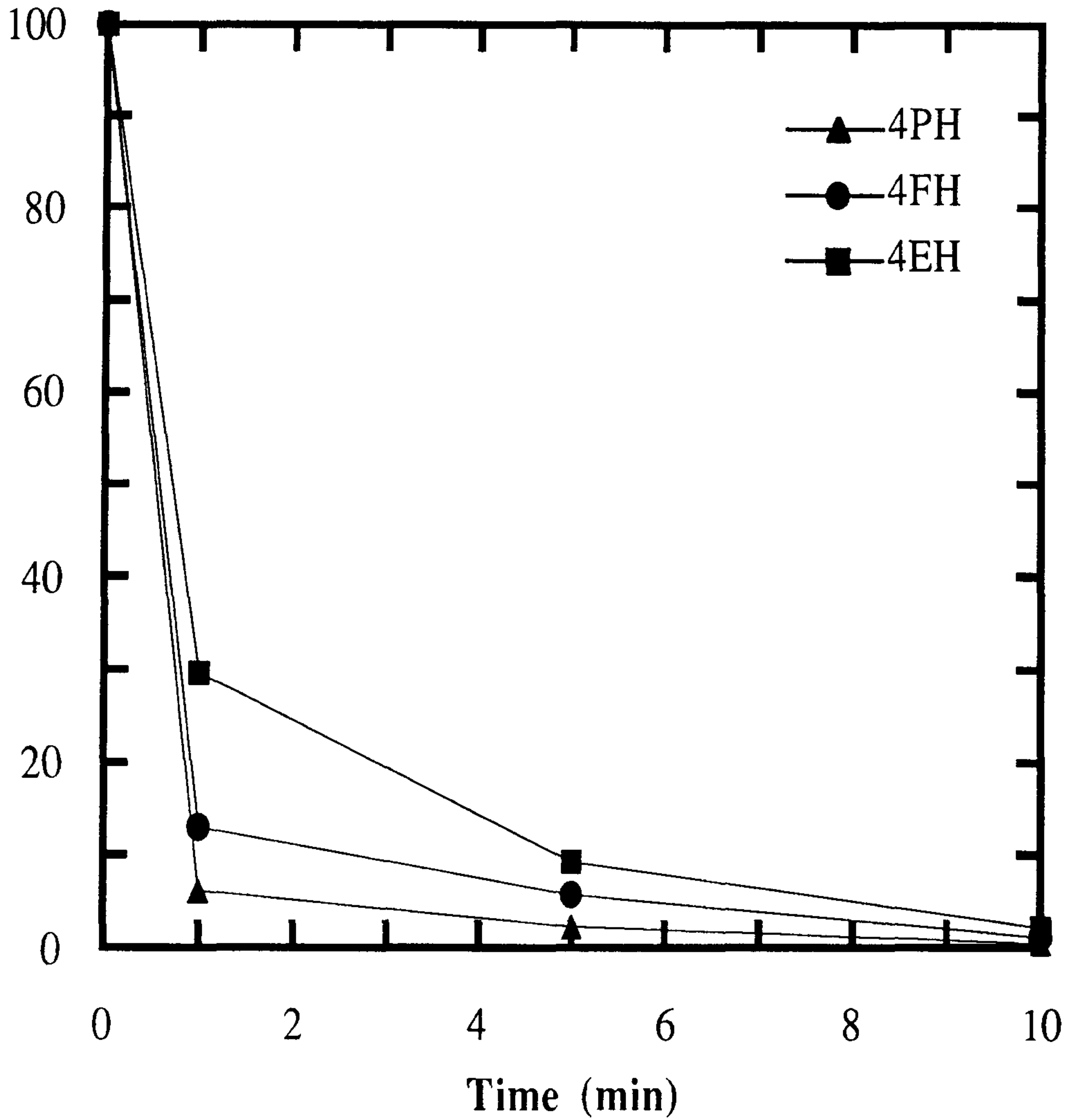


그림 326 폴리우레탄표면에 따른 혈관내피세포의 부착능
 (4: 배양 4일째, P: 폴리우레탄, F: 파이브로넥틴이 도포된 폴리우레탄,
 E: 세포외기질이 도포된 폴리우레탄, H: 높은 전단응력)

Attached Cells (%)

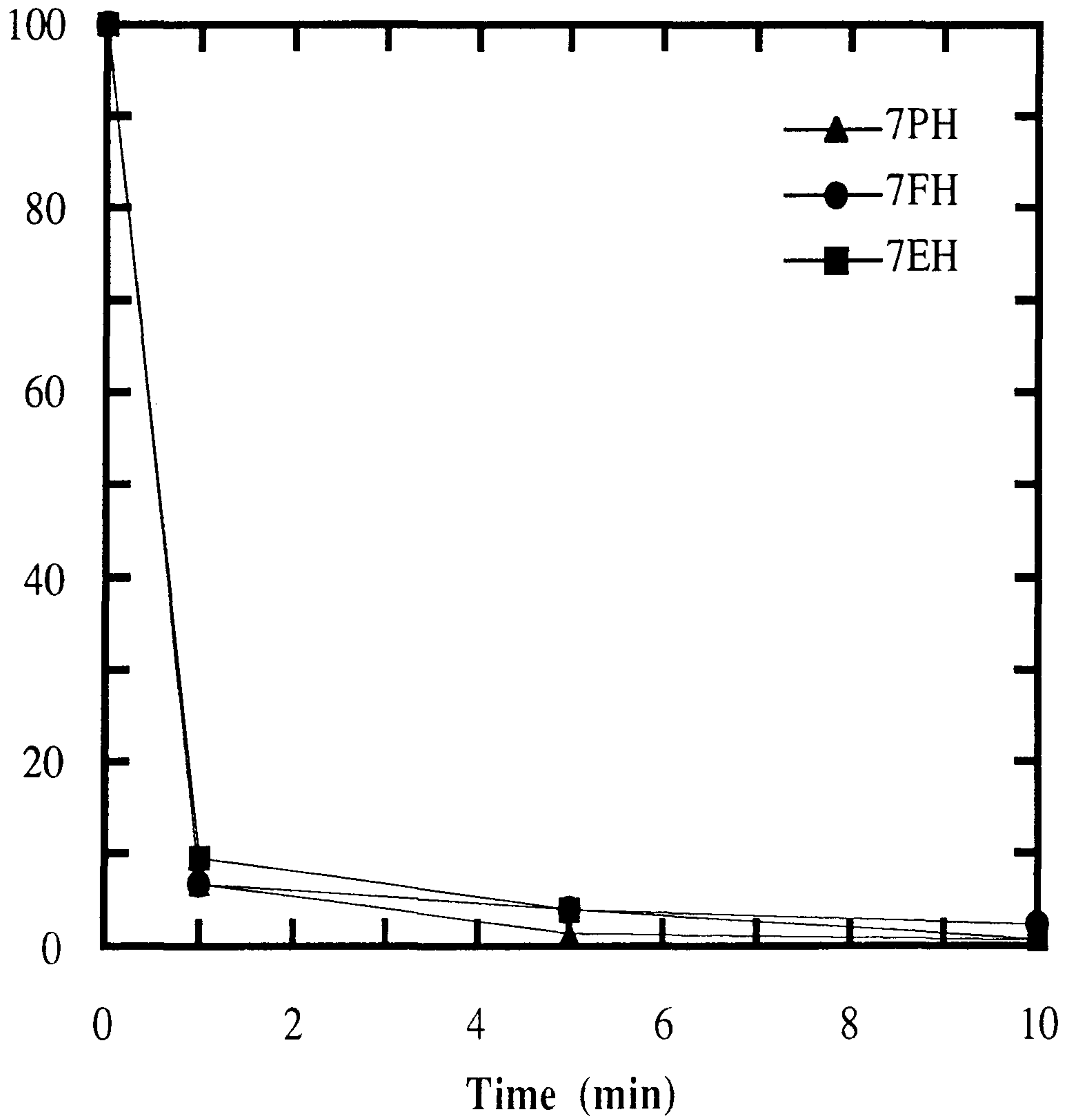


그림 327 폴리우레탄표면에 따른 혈관내피세포의 부착능
(7: 배양 7일째, P: 폴리우레탄, F: 파이브로넥틴이 도포된 폴리우레탄,
E: 세포외기질이 도포된 폴리우레탄, H: 높은 전단응력)

Attached Cells (%)

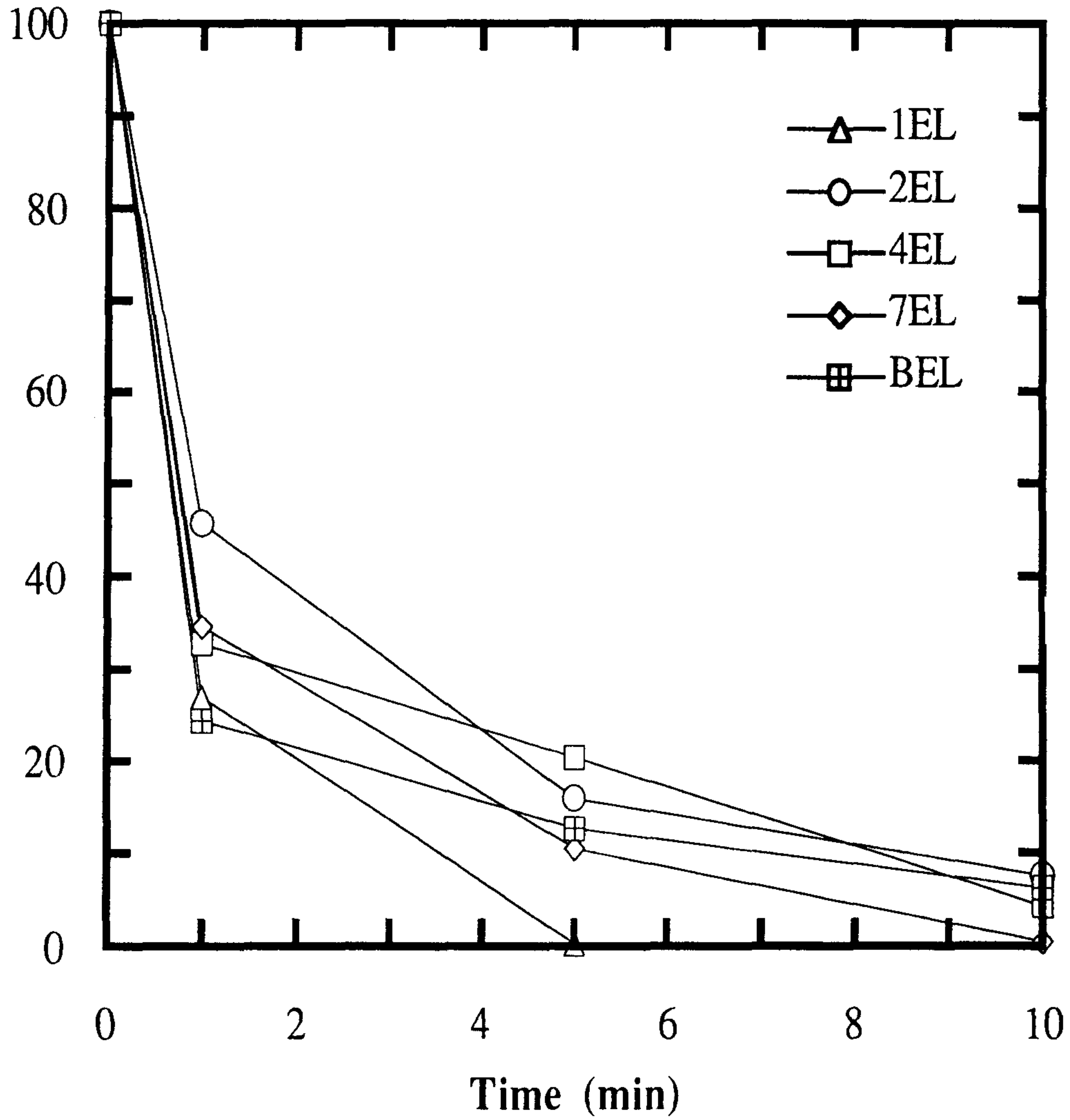


그림 3.28 세포외기질로 도포된 폴리우레탄 표면 위에
배양된 혈관내피세포 부착능
(1,2,4,7,11일 배양, 낮은 전단응력에 10분간노출)

Attached Cells (%)

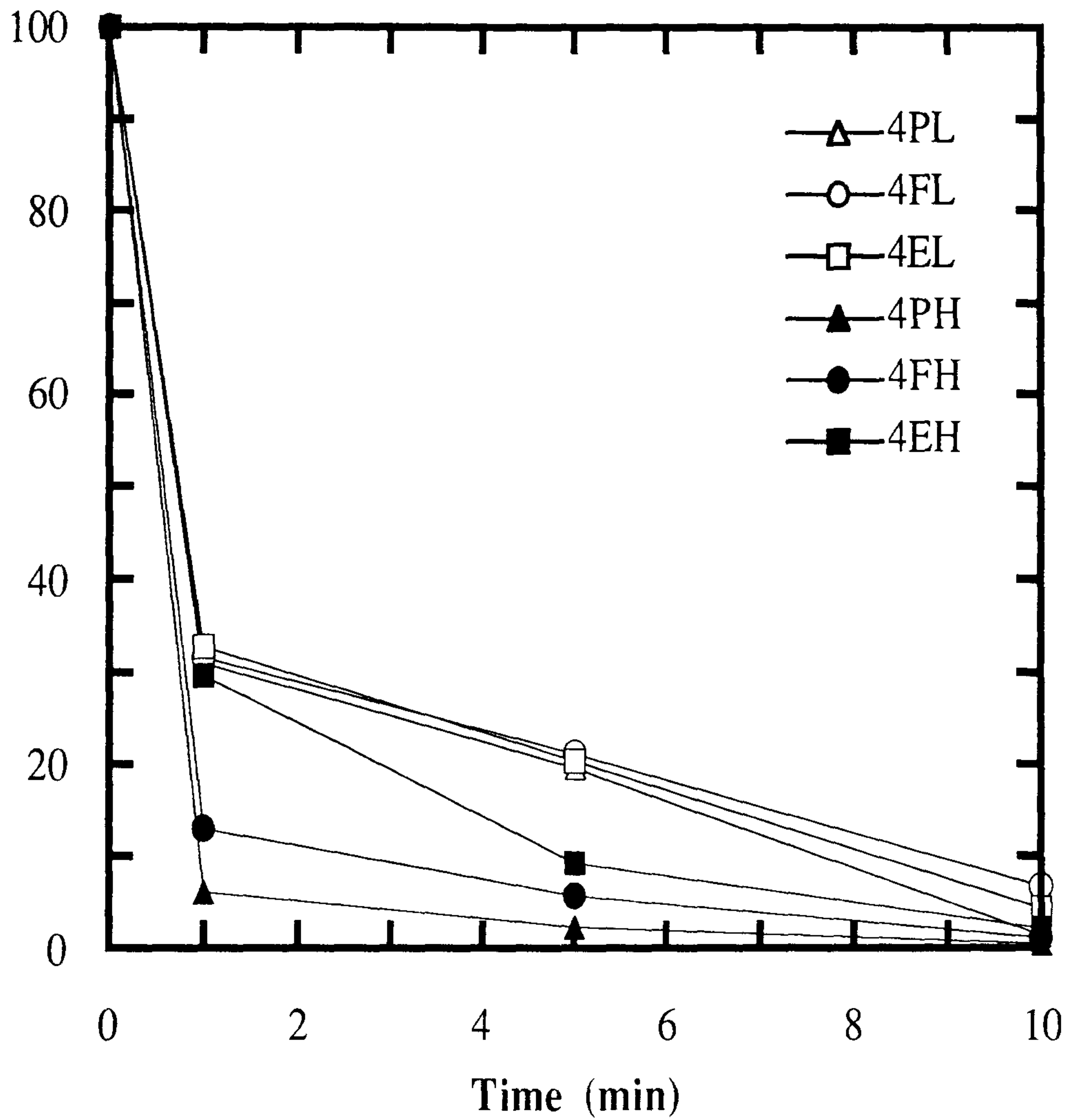


그림 3.29 세포외기질로 도포된 폴리우레탄 표면위에
 배양된 혈관내피세포의 부착능
 (4;4일 배양, L;낮은 전단응력, H;높은 전단응력)

of Cells/Well (*10⁵ Cells)

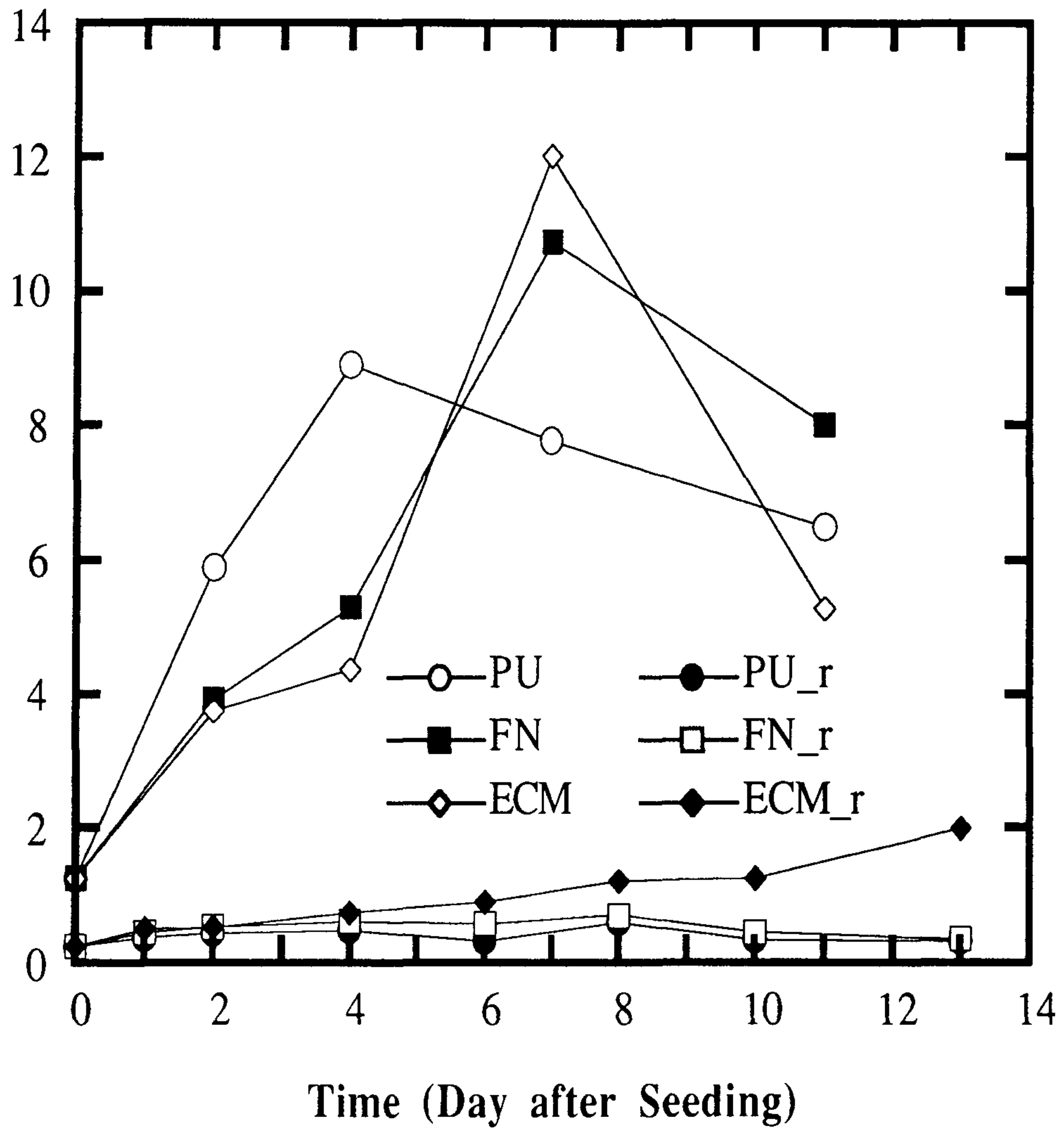


그림 330혈관내피세포의 성장곡선

제 4 장 결 론

본 연구는 완전 이식형 인공심장에 사용하기 위하여 생체적합성이 우수한 생체 재료의 개발을 최종 목표로 한다. 1단계의 제 1차년도 연구 과제로서 인공심장의 재료인 폴리우레탄 표면에 혈관내피세포를 배양하는 방법과 혈전분해효소를 고정화하는 방법을 확립하였다. 강력한 혈전 분해 효소인 롬부로키나제는 폴리우레탄 표면에 공유 결합으로 강력히 부착되었음에도 그 활성이 30% 이상 남아있었으며, 피브리노젠/피브린에 여전히 특이적으로 작용하였다. 고정화된 롬부로키나제의 단위 활성도 및 특이 활성도는 18 IU/cm^2 , 0.8 IU/cm^2 이었다. 효소의 안정성 면에서는 pH와 온도에 대하여 고정화 전 보다 오히려 더욱 증가된 양상을 보여 주었고, 단백질 분해효소 억제 인자의 하여 거의 억제되지 않는 바람직한 양상을 보여 주었다. 또한 고정화된 표면에 피브리노젠과 혈소판의 점착을 억제함으로써 재질 표면 자체의 혈액 적합성도 증가됨을 보여 주었다. 혈관 내피세포가 잘 자라지 않는 것으로 알려진 폴리우레탄 표면 위에 혈관 내피세포를 배양하기 위하여 섬유아 세포의 세포외기질을 이용하였으며 혈관내피세포가 성장인자의 도움없이도 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 섬유아 세포를 제거하기 위한 방법으로 Hypotonic shock법이 적절한 것으로 평가되었다. 전단응력 하에서 혈관 내피세포의 부착능을 평가한 결과, 현재의 방법으로는 세포의 부착능이 부족한 것으로 나타났으며 부착능을 높이기 위한 개선이 필요하리라 생각된다.

일반적으로 혈액과 접하게 되는 인공 순환 장기의 개발에 있어서 가장 커다란 장애 요인들은 혈전의 형성, 감염 및 면역 반응등이라 할 수 있다. 이는 생체 재료의 특성과 혈류 특성에 따라 달라지며, 이들 문제점들을 해결하기 위하여 화학적인 방법을 통한 재료 자체의 특성을 개질하는 방법과 기존의 재료를 사용하여 생물학적인 처리를 하여 생체적합성을 향상시키고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이는 다시 인공 장기의 종류와 사용 기간에 따라 가장 적합한 방법의 채택이 요구되고 있다. 인공 장기 재료의

개발과 아울러 개발된 재료의 생체적합성에 대한 총체적인 평가의 필요성이 대두되고 있다. 과거에는 대부분의 연구들이 생체 재료와 혈액 계면사이의 국부 반응에 초점이 모아 졌으나, 이러한 연구만으로는 포괄적인 재료의 특성을 파악하기에는 충분치가 않았다. 다시말해서 재료와 혈액사이의 국부 반응은 다시 전신 반응을 유발하게 되고, 이러한 전신 반응이 생체에 미치는 영향의 정도를 변화시킬 수도 있기때문에 국부 반응의 관점에서 생체적합성을 평가할 수는 없다. 따라서 생체 재료의 국부 반응과 전신 반응사이의 관계를 이해하고, 생체 반응의 각 반응 시기에 따른 정보를 바탕으로하여 전신 반응이 국부 반응에 미치는 영향을 정확히 규명할 필요가 있다. 또한 각종 인공 장기의 종류에 따른 혈류 특성의 차이를 고려하여 적절한 평가 방법을 적용해야 할 것이다. 생체 재료에 대한 개체의 생물학적인 반응 기전은 매우 복잡하여 명확한 평가를 내리기는 쉽지 않지만 위에서 언급한 총체적인 연구를 통하여 개선될 수 있으리라 사료된다. 이러한 노력을 바탕으로하여 인공 장기를 필요로하는 환자에게 우수한 생체 적합성을 지닌 재료를 개발하여 공급할 수 있으며, 또한 생체 방어 기전 자체에 대한 기본적인 정보를 제공할 수 있을 것이다.

향후 2차년도에는 1차년도 결과를 토대로 재료와 혈액 사이의 국부적 반응을 포함하는 전신적 반응을 관찰할 수 있는 Ex vivo 와 In vivo 실험을, 인공심장의 혈류 특성에 따른 전단응력의 해석, 전단응력에 따른 혈관 내피세포의, 세포 골격 변화 그리고, 혈전 형성과 더불어 크게 문제가 되고 있는 감염에 관한 연구를 수행할 예정이다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. SD Bruck, Blood Compatible Synthetic Polymers, Charles C Thomas, Springfield, IL, 1974
2. MD Lelah, TG Grasel, JA Pierce, and SL Cooper, J. of Biomed. Mater. Res., 20 : 433-468, 1986
3. B Jansen, A Ludwicka, and LM Storz, Radiation induced modification of polyetherurethane films and tubes : platelet adhesion and in vivo experiments, Radiat. Phys. Chem., 25 : 529-35, 1985
4. CH Bamford and IP Middleton, Studies on functionalizing and grafting to poy (etherurethanes), Eur. Polym. J., 19 : 1027-35, 1983
5. C Nojiri, T Okano, HA Jacobs, et al., Blood compatibility of PEO grafted polyurethane and HEMA/styrene block copolymer surfaces, J. Biomed. Mater. Res., 24 : 1151-71, 1990
6. JH Lee, J Kopececk, and JD Andrade, Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants, J. Biomed. Mater. Res., 23 : 351-68, 1989
7. E Brinkman, A Poot, T Beugeling, L Van der Does, and A Bantjes, Surface modification of copolyether-urethane catheters with poly (ethylene oxide), Int. J. Artif. Organs, 12 : 390-4, 1989
8. MB Herring, S Baughman, J Glover et al., Endothelial seeding of Dacron and Polytetrafluorethylene grafts : the cellular events of healing, Surg., 96 : 745-54, 1984
9. PB Van Wachem, AH Hogt, T Beugeling, et al., Adhesion of cultured endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge, Biomater., 8 : 323-8, 1987
10. KA Kesler, MB Herring, Arnold MP, et al., Enhanced strength of endothelial attachment on polyester elastomer and polytetrafluorethylene graft surfaces with fibronectin substrate, Vasc. Surg., 3 : 58-64, 1986
11. PB Van Wachem, CN Vreriks, T Beugeling, et al., The influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers, J. Biomed. Mater.

Res., 21 : 701-18, 1987

12. C Mittermayer, D Klee, and H Richter, Verfahren zur Besiedlung einer Polymeroberfläche mit menschlichen Gefässinnenhautzellen, Eur. Pat. Appl. 0 290 642 A1 (in German)
13. A Dekker, Adhesion and proliferation of human endothelial cells on polymeric surfaces. Optimization studies, Enschede, The Netherlands : University of Twente, Dissertation p119, 1990
14. MA Packham, G Evans, MF Glynn, and JF Mustard, The effects of plasma proteins on the interaction of platelet with glass surfaces, J. Lab. Clin. Med., 73 : 686-97, 1969
15. JD Andrade and V Hlady, Protein adsorption and materials biocompatibility : A tutorial review and suggested hypotheses, Adv. Pol. Sci., 79 : 1-63, 1986
16. GH Ryu, DK Han, YH Kim, and BG Min, Albumin immobilized polyurethane and its blood compatibility, Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs, 38 : 644-648, 1992
17. MS Munro, AJ Quattrone, SR Ellsworth, P Kulkari, and RC Eberhart, Alkyl substituted polymers with enhanced albumin affinity, Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs, 27 : 499-503, 1981
18. AA Durrani and D Chapman, Modification of polymer surfaces for biomedical applications. In : WJ Feast, HS Munro, eds. Polymer surfaces and interfaces. John Wiley & Sons : New York, 189-200, 1987
19. JA Hayward and D Chapman, Biomembrane surfaces as models for polymer design : the potential for hemocompatibility, Biomater., 5 : 135-42, 1984
20. AA Durrani, JA Hayward, and D Chapman, Biomembranes as models for polymer surfaces. II. The synthesis of reactive species for covalent coupling of phosphorylcholine to polymer surfaces, Biomater., 7 : 121-5, 1986
21. JA Hayward, AA Durrani, CJ Shelton, DC Lee, and D Chapman, Biomembranes as models for polymer surfaces. III. Characterization of a phosphorylcholine surface covalently bound to glass, Biomater., 7 : 126-31, 1986
22. K Ishihara, T Ueda, and N Nakabayashi, Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes, Pol. J., 22 : 355-60, 1990
23. T Ohshiro and G Kosaki, Urokinase immobilized on medical polymeric materials : fundamental and clinical studies, Art. Organs, 4 : 58-64, 1980
24. S Watanabe, Y Shimizu, T Teramatsu, T Murachi, and T Hino, The in vitro and in vivo behavior of urokinase immobilized onto collagen-synthetic polymer composite

- material, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15 : 553-63, 1981
25. CD Eber, ES Lee, and SW Kim, The antiplatelet activity of immobilized prostacyclin, *J. Biomed. Mater. Res.*, 16 : 629-38, 1982
 26. PW Heyman, CS Cho, JC McRea, DB Olsen, and SW Kim, Heparinized polyurethanes : in vitro and in vivo studies, *J. Biomed. Mater. Res.*, 19 : 419-36, 1985
 27. J Feijen and GHM Engbers, Covalent attachment of anticoagulants and the like onto biomaterials, European patent application 0. 294. 905 A1
 28. T Okano, D Grainger, KD Park, C Nojiri, J Feijen, and SW Kim, Improved blood compatibility of heparin immobilization and PEO-PDMS-heparin triblock copolymer coating on surfaces of segmented polyurethaneurea. In : T Akutsu, ed. *Proceedings 2nd Int. Symp. Art. Heart Ass. Dev.* Tokyo : Springer-Verlag, 45-53, 1988
 29. KD Park, T Okano, C Nojiri, and SW Kim, Heparin immobilization onto segmented polyurethaneurea surfaces-effect of hydrophilic spacers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 22 : 977-92, 1988
 30. J Feijen and WE Hennink, Conjugates of anticoagulant and protein, European patent application 0. 081. 853 A1
 31. WE Hennink, J Feijen, CD Ebert, and SW Kim, Covalently bound conjugates of albumin and heparin : synthesis fractionization and characterization, *Throm. Res.*, 29 : 1-13, 1983
 32. L Frederico, *Arch. Zool. Exper.*, 7, 391-400, 1878
 33. V Willem and A Minne, Recherches sur la digestion et l'absorption intestinale chez le lombric. In : *Livre Jubilaire Dedie a Chares van Bambeke, Henri Lamertin, Bruxelles*, pp 201-222, 1899
 34. H Mihara et al., *Thromb. Haemost.*, 50, 258, 1983
 35. KR Sobinsky, P Flanigan, A Widra, JP Meyer, JJ Castronuovo, Clucosamino-glycan-keratin coating enhances endothelial cell growth rate on seeded vascular prostheses, *Surg Forum* 35: 435, 1984
 36. JM Seeger, Improved endothelial cell seeding with cultured cells and fibronectin-coated grafts, *J Surg Res* 38:641-647, 1985
 37. TL Foxall, KR Auger, AD callow, P Libby, adult human endothelial cell coverage of small-caliber Dacron and polytetrafluorethylene vascular prostheses in vitro, *J Surg Res* 41:158-172, 1986
 38. GA Turskey, JS Pirone, The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to

- fibronectin-treated surfaces, *JBMR* 24:1333-1353, 1990
39. A Schneider, R Melmed, H Schwalb, M Karck I Vlodaysky, G Uretzky, An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts, *J Vasc Surg* 15:649-656, 1992
 40. D Gospodarowicz, I Vlodaysky, N Savion, The extracellular matrix and the control of proliferation of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells, *J Supramolec Struc* 13: 339-372, 1980
 41. HK Kleinman, RJ Klebe, GR martin, Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, *J Cell Biol* 88: 473, 1981
 42. JA Madri, SK William, Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components, *J Cell Biol*,97:153-167, 1983
 43. ED Hay, Cell and extracellular matrix: their organization and mutual dependence, *Modern Cell Biol* 2:509-548, 1983
 44. PG de goot, interaction of platelets with cultured endothelial cells and subendothelial matrix, in Zilla, Fasol, Deutch (eds) *Endothelialization of vascular grafts*, pp47-56, Karger, Basel, 1987
 45. E Ruoslahti, EG hayman, E engvall, WC Cothran, WT Butler, Alignment of biologically active domains in the fibronectin molecule, *J Biol Chem* 256: 7277, 1981
 46. R Carlsson, E Engvall, A Freeman, E Ruosalhti, Laminin and fibronectin in cell adhesion: Enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin, *Proc Natl Acad Sci, (USA)* 78:2403, 1981
 47. H Sage, Characterization and modulation of extracellular glycoproteins secreted by endothelial cells in culture, in MA Gimbrone Jr: *vascular endothelium in hemostasis and thrombosis*, Churchill Livingstone, pp 187-208, 1986
 48. HK Kleinman, RJ Klebe, GR martin, Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, *J Cell Biol* 88: 473, 1981
 49. CF Dewey, SR Bussolari, MA Gimbrone Jr, PF Davies, The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *J Biomec Eng.*, 103: 177-185, 1981

제 6 장 국제 협력 과제

제 1 절 국제 협력의 필요성

인공심장 재료로서 사용되는 고분자 재료는 폴리우레탄으로 기계적 물성이 매우 우수할 뿐더러, 다른 고분자 재료에 비하여 비교적 생체 적합성이 우수하다. 따라서 본 연구는 기본적으로 인공 심장 재료의 표현을 개질함으로써 생체 적합성, 특히 혈액 적합성을 향상시키려는 시도이다. 본 연구팀에서 시도하려는 방법은 표면 개질 방법 중에서도 생물학적인 부류에 속하는 방법이다. 따라서 본 연구절은 고분자 재료에 관하여 연구가 충분하지 않음을 보강하기 위하여 세계적으로 인공 심장 재료 연구에 선두 그룹이라고 할 수 있는 미국 유타 대학과 지난 수년간 많은 공동 연구를 수행하여 왔다. 특히 본 과제에서 다루고 있는 혈전 방지에 관하여서는, 혈전 형성이 재료 특성 뿐 아니라, 혈류 양상에도 의존된다는 점을 고려해 볼 때 단순한 재료의 항혈전 효과 향상으로만 극복하기 힘든 현실이다. 이에 관한 대처 방안으로서 현재까지는 인공 심장의 이식시에 헤파린과 아울러 항생제를 정맥 주사를 통하여 투여하고 있으나, 이들 제제가 인공 심장에 까지 직접적으로 영향을 미치기란 기대하기 어렵다. 따라서 본 과제를 성공적으로 수행하기 위해서 인공 심장의 국부 혈전 형성을 방지하기 위한 항혈전제 방출 고분자의 합성 및 조절이 필요하게 되었다. 이 분야는 미국 유타대 약물전달 연구소(CCCD, Univ. of Utah)가 수년간 집중적인 연구를 해온 분야임을 감안하여, 본 연구팀의 연구원을 파견하여 관련 연구를 수행하고, 이 연구소의 책임자이자 이 분야의 전문가를 국내로 초청, 공동 연구를 수행하게 되었다. 본 국제 협력 과제를 수행함으로써, 국부적으로 항혈전제를 방출할 수 있는 고분자 재료를 합성하여 도입

함으로써 인공 심장의 내구성 및 항혈전성을 크게 향상시킬 수 있는 가능성을 모색하였다.

제 2 절 추진 방법

열 감수성 하이드로 젤 (thermosensitive hydrogel) 은 온도의 변화에 따라 고분자-고분자 및 고분자-물 간의 상호작용에 영향을 받아 물 속에서 팽창율이 변화하는 것을 말한다. N-isopropylacrylamide (NiPAAm)를 주성분으로 하는 하이드로젤의 경우는 온도에 반비례하는 열감수성을 나타내는데, 다시 말해서 온도가 상승함에 따라 수축하게 되며, 낮은 온도에서 팽창하는 성질을 말한다(1). 보통 NiPAAm 고분자의 경우는 섭씨 32도 부근에서 갑작스런 팽창율의 변화를 보이게 하는데 이것이 NiPAAm의 lower critical solution temperature (LCST)에 해당된다(2). 이러한 현상은 온도가 LCST에 이르러 소수성 isopropyl side(2) chain 주위의 물분자들이 엔트로피의 영향으로 빠져나가 젤이 수축됨으로써 발생된다. 최근들어 열변성이 가능한 고분자 및 하이드로젤 등은 각종 치료약 및 진단 시약의 개발 등에 응용된 바 있으며, 점차 그 응용 범위가 확대되고 있다 (3-11).

헤파린은 알려진 바와 같이 Anti-thrombin III 로 하여금 트롬빈의 활성을 저지케하여 피브린의 형성을 방지한다. 그러나, 헤파린을 전신에 투여하게 되면 혈소판 감소증 및 출혈의 부작용이 따를 뿐더러 효과적으로 인공 심장에서의 혈전을 방지하기가 힘들다. 따라서 본 연구에서 제작한 고분자 젤 내면에 헤파린을 넣어 서서히 방출시키게 되면 부작용 없이 심장 이식 초기의 혈전을 방지할 수 있을 것이라 사료된다.

본 국제 협력 과제는 미국 유타대학의 약물 전달 연구소에서 개발 완성 또는 진

행중인 헤파린을 포함하는 thermosensitive hydrogel에 관한 연구를 인공심장 내면에서 혈전 형성 가능성이 매우 높은 부위에 도입하려 하고 있으며 이에 필요한 관련 기술을 이전 받기 위하여 본 연구팀의 연구원을 현지에 파견하고, 연구소 책임자를 국내로 초청하고, 공동 연구를 수행하고자 했다. 또한, 본 과제에서는 장기적으로 볼 때 헤파린을 포함하는 혈전제 및 항생제등을 효과적으로 안전하게 투여하기 위하여 복용이 가능토록 고분자 젤의 산도에 민감한 성질, 즉 낮은 산도에서는 수축되지 않게 하는 성질을 부여하였다.

제 3 절 성과 및 기대 효과

협력 연구를 통하여 아래와 같은 관련 기술을 확보할 수 있었으며, 이를 바탕으로 향후, 인공 심장 재료 표면의 개질에 적용을 시도할 예정이다.

1. 고분자 합성

산도 및 온도 감수성 고분자는 NiPAAm, Butylmethacrylate (BMA), Acrylic acid (AA) 를 이용하여 합성하였으며, 이들 각각의 단량체들의 비율을 달리하여 약의 방출 속도를 조절하였다. NiPAAm/BMA/AA (mole ratio = 90/10/0, 85/10/5, 83/10/7, 80/10/10) 합성 방법은 2, 2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN)을 개시제로 한 라디칼 중합법을 사용하였다. 합성후 정제는 n-헥산 및 에테르에 각각 침전 및 재침전을 통하여 이루어졌으며, 건조 후 반응 수율은 70-90% 정도를 유지하였다.

2. 분자량 및 LCST 측정

UV 측정기가 장착된 Gel permeation chromatography (GPC) 시스템을 이용하여 합성된 고분자의 분자량을 측정하였다. 먼저 고분자를 tetrahydrofuran (THF)에 1% (w/v)로 녹인 후 ultrasyrage IR column (Waters Chromatography Division, Milford, MA)에 THF를 0.5ml/min의 속도로 흘려 표준 분자량의 polystyrene과 비교하여 분자량 분포를 구하였다. 측정 결과 acrylic acid의 비율을 달리하여 합성된 고분자들은 평균 45,000 - 57,000 정도의 분자량 분포를 보였다. 또한, cloud point 측정을 통하여 LCST 를 결정하였다. 먼저 phosphatebuffered saline (PBS, pH 7.4) 및 glycine/Hcl buffer (pH 2.0) 용액에 합성된 고분자를 1%(w/v) 의 농도로 녹인 후 일정한 비율 (0.2 degree/min) 은 용액의 온도를 올려 그때의 흡광도를 450nm에서 측정하였다. 이 때 LCST는 최대의 흡광도의 1/2이 되는 지점의 온도로 정의하였다. pH 2.0 조건하에서의 AA양의 변화에 따른 흡광도의 변화는 그림 1-4 에 나타나 있으며, pH 7.4 조건하에서의 흡광도의 변화는 그림 5-8에 나타나 있다. 또한 이를 바탕으로 하여 LCST를 계산한 결과는 표1에 요약되어 있다. pH 2의 조건 하에서는 LCST 값들이 고분자 조성에 관계 없이 평균 섭씨 2도 정도의 값을 유지하고 있었다. 그러나, 중성 pH에서는 LCST가 AA의 양을 증가시킴에 따라 올라가는 현상을 보였다 (그림 9).

3. 고분자 Bead 제작

합성된 고분자를 glycine/Hcl buffer (pH 2.0)에 10% (w/v)의 농도로 녹이고 각 고분자 용액의 LCST 이상의 온도를 유지하고 있는 기름으로 주사기(25G)를 사용하여 적정한다. 이때 기름(50-75ml)은 decane(5ml) 막으로 덮어 표면 장력을 감소시키고, 공기/기름 계면으로의 적정된 용액의 침투를 방지한다. 형성된 bead는 즉시 필터하여 헥산으로 세척 후 건조 보관한다. 그림 10은 bead가 형성되는 과정을 도식적으로 나타낸

그림이다. 고분자 용액이 decane층을 지나 기름층으로 떨어지면 계면에서의 고분자 침전으로 인한 얇은 박막이 형성되고 수축이 일어난다. 이러한 필터 후 hexane으로 잔여 기름을 제거하고, 건조하면 bead가 완성된다. 완성된 bead에 대하여 주사 전자 현미경 (SEM)으로 모양을 관찰해 본 결과 지름이 약 1.15mm 정도의 구(sphere) 모양을 띠고 있었다.

4. 헤파린 Loading

고분자를 glycine/HCl buffer (pH 2.0)에 섭씨 4도에서 10% (w/v) 의 농도로 녹인 후, 이에 헤파린을 다시 5% (w/v)의 농도로 녹여 bead를 제작한다. 이 때 용액의 ionic strength는NaCl의 농도를 조절하여 0.25로 고정하였다. 건조된 bead를 PBS (pH 7.4) 혹은 glycine/HCl buffer(pH 2.0) 용액에 넣고 온도를 섭씨 4도에서 섭씨 50도 까지 올려가며 헤파린의 양을 결정한다. 정량은 Azure II (dye)를 사용하여 수행 할 예정이다.

5. 헤파린의 in vivo 흡수 실험

저분자량의 헤파린 (HEPARR Industries, Inc., Franklin, Ohio)을 구입하여 쥐 (-35 g) 의 십이지장 내로 헤파린을 각각 pH 7.4 및 pH 2.0의 완충 용액에 녹여 투여하고, 헤파린이 흡수되는 정도를 측정하였다. 이 때 헤파린의 분자량은 약 6,000정도였으며, 활성은 95 units/mg, 176 Anti-Xa units/mg이었다. 헤파린의 흡수량은 헤파린 투여 후 일정한시간이 경과한 후에 쥐의 경동맥으로부터 0.7 ml의 혈액을 채취하여 혈장을 분리해 낸 후 혈장의 anti-Xa 활성을 측정함으로써 판단하였다. 20 ul 혈장, 20 ul anti-thrombin (1 uIU /ml)와 160 ul Tris buffer(pH 8.4)와 100 ul Factor Xa를 섞고, 섭씨 37도에서 30 초간 반응시킨다. 기질로서 S-2222(1mM; 200 ul)를 넣고 섭씨 37도에서 3

분간 반응시킨 후 300 ul acetic acid (20%)를 넣어 반응을 끝내고 405nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 이때 표준 헤파린을 사용하여 표준 감량 곡선을 구하여 흡수된 헤파린을 정량한다. 헤파린의 표준 감량 곡선은 그림 11에 나타나 있다. 쥐의 혈장에 흡수된 헤파린의 분포는 0.02 - 0.06 % 수준으로 나타났다(그림 12).

제 4 절 결론

본 과제에서 수행된 연구 결과를 바로 인공 심장에 응용하기에는 아직 해결해야 할 문제점들이 많이 남아 있다. 그중 하나가 어떤 형태로 인공 심장 내면에 도포 혹은 고정화를 할 것인가에 대한 문제이다. 룬부로키나제와 유사하게 처리할 경우, 룬부로키나제와 크게 다르지 않을 수도 있기 때문이다. 그러나 전술한 바와 같이 염 산기 감지 고분자에 헤파린과 같은 항혈전제를 loading함으로써 국부적으로 형성되는 혈전에 대비할 수 있음은 충분히 확인 할 수 있었다. 또한 이 방법은 만약 고정화된 룬부로키나제의 내구성이 문제가 될 때 좋은 대안으로 사용이 가능하다. 물론 본 과제에서 사용되었던, 모든 관련 기술은 룬부로키나제를 이용할 경우, 쉽게 적용 가능함은 물론이다. 따라서, 본 연구를 바탕으로 헤파린과 룬부로키나제 상호간의 항혈전능을 상호 비교할 예정이며, 이를 위하여 인공 심장에의 적용 방법을 빠른 시일내에 확립할 예정이다. 실제로 동물에 이식되었을 경우, 효소 또는 약제의 안정성 및 내구성을 비교 평가할 예정이다. 향후 연구에 있어서 기본적으로 유사한 개념을 지닌 과제에 대하여 동물 실험 및 In vitro 실험을 비교하여 보다 효과적인 방법을 선택할 예정이다.

제 5 절 수립된 정보 및 참고 문헌

1. 수립된 정보

본 협력연구를 통하여 얻어진 기술 및 각종 데이터

- 1) 열, 산도 감지성 고분자 합성 기술
- 2) 합성된 고분자의 분자량 및 LCST 측정기술
- 3) 합성된 고분자에 헤파린 부가에 관한 기술
- 4) 헤파린 흡수에 관한 in vivo 동물 실험에 관한 정보

2. 참고 문헌

- 1) L.D. Taylor and L.D. Cerankowski, Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions: a study of lower consolute behavior
- 2) M. Heskins and J.E. Guillet. Solution properties of poly(N-isopropyl acrylamide), J. Macromol. Sci. Chem. A 28 (1968) 1441-1455
- 3) A. S. Hoffman, Application of thermally reversible polymers and hydrogels in therapeutics and diagnostics. J. Controlled Release 6 (1987) 297-305
- 4) T. Okano, Y.H. Bae and S.W.Kim, Temperature responsive controlled drug delivery in: J. Kost(Ed.). Pulsed and Regulated Drug Delivery, CRC Press. Boca Raton, 1990, pp.17-46
- 5) R.F.S. Freitas and E.L.Cussler. Temperature sensitive gels as extraction solvents. Chem. Eng. Sci. 42 (1987) 97-103
- 6) H. Fell, Y.H. Bae, J. Feijen and S.W. Kim, Molecular Separation by Sensitive hydrogel membranes. J. Membr. Sci. 64 (1991) 283-294

- 7) T.G. Park and Hoffman. Immobilization of b-galactosidase in thermally reversible hydrogel beads. *J Biomed Mater. Res.* 24 (1990) 21-38
- 8) T. Takezawa, Y. Mori and K. Yoshizato. Cell culture on a thermoresponsive polymer surface. *Biotechnology* 8 (1990) 854-857
- 9) T.Okano, Y.H. Bae, H. Jacobs and S.W. Kim. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *J. Controlled Release* 11 (1990) 255-265
- 10) Y.H. Bae, T.Okano and S.W. Kim, "On-off" Control of solute transport. I. Temperature dependence of swelling of N-isopropylacrylamide networks modified with hydrophobic components in water. *Pharm. Res.* 8 (1991) 531-537
- 11) Y.H. Bae, T.Okano and S.W.Kim, "On-off" Control of solute transport. II. Solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharmaceutical Research* 8 (1991) 624-628

표 6.1 산 및 열 감지 고분자 용액의 LCST

Feed Composition NiPAAm/BMA/AA (mole ratio)	LCST (°C)	
	pH 7.4	pH 2.0
90/10/0	13.3	13.5
85/10/5	32.8	11.7
83/10/7	48.2	11.5
80/10/10	61.3	11.3

* Determined by transmittance at 450 nm

표 6.2 흡수된 헤파린의 Anti-Xa 활성도

Rat No.	Heparin Dose/Plasma Vol. (Anti-Xa Units/ml)	Absorbed Heparin Content in Plasma (Anti-Xa Units/ml)	Absorbed Amount (%)
1	408	0.24	0.06
2	772	0.14	0.02
3	1,224	0.26	0.02
4	1,598	0.11	0.007

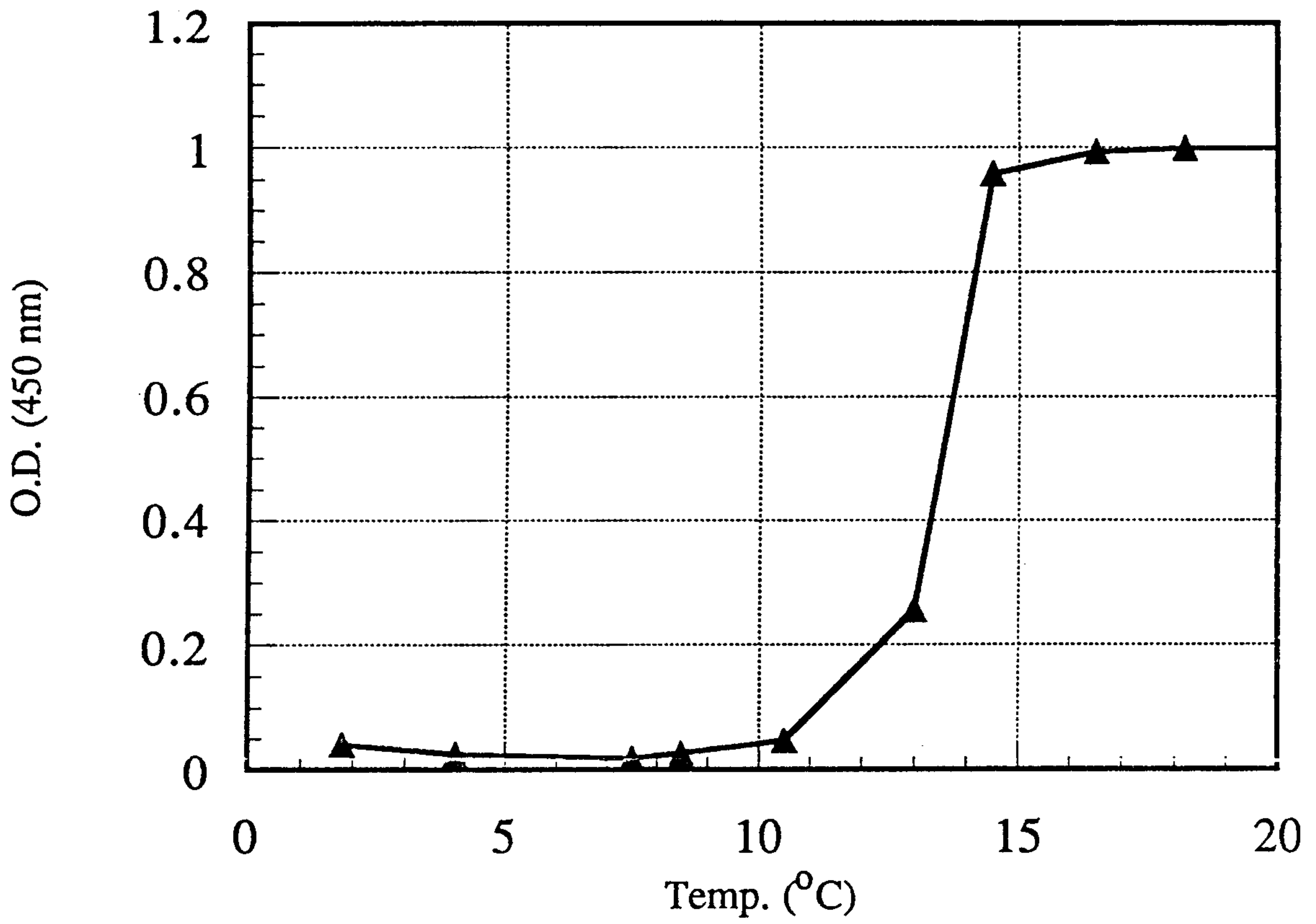


그림 6.1 NiPAAm/BMA/AAA (90/10/0)의 LCST 곡선 (pH =2.0)

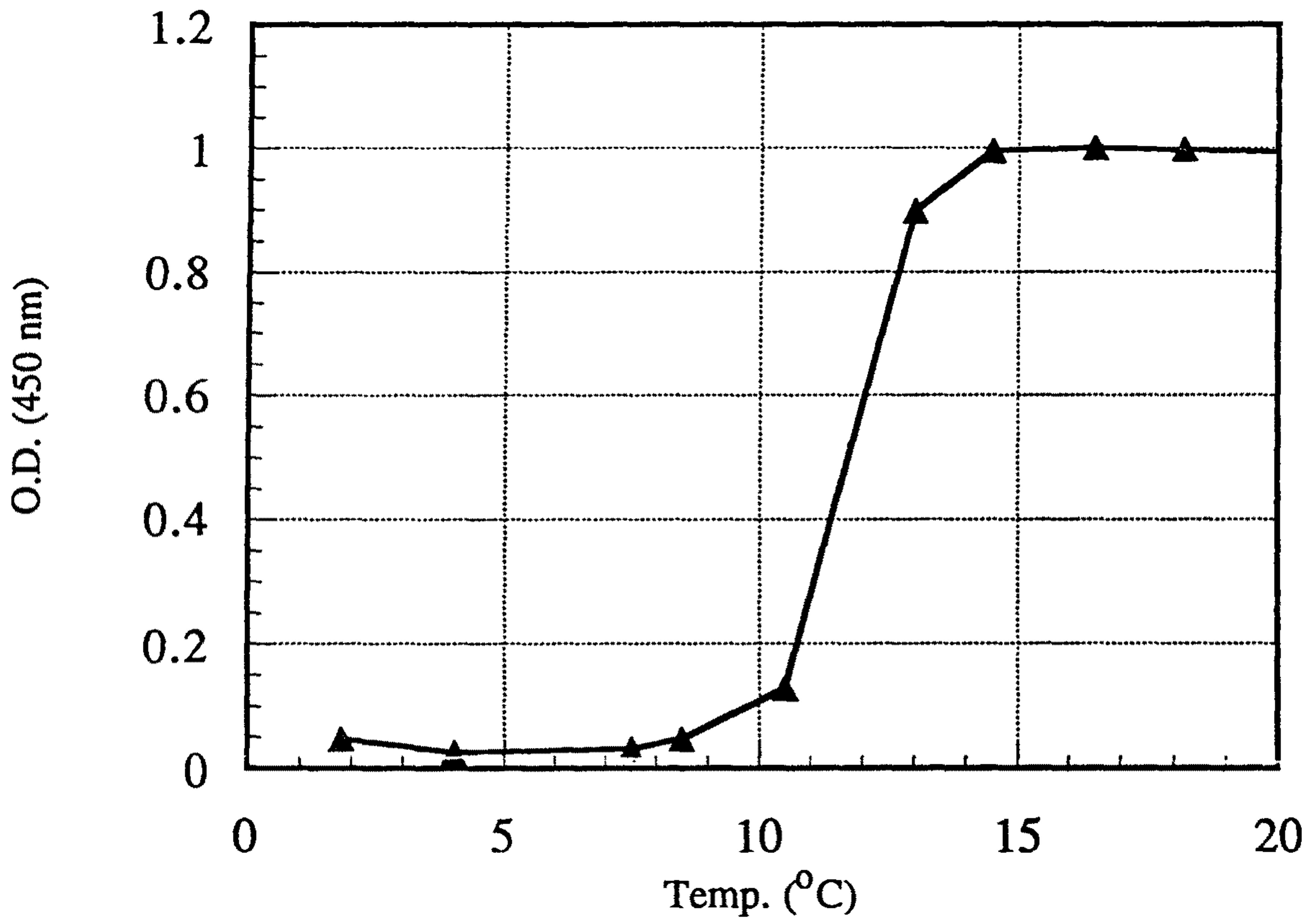


그림 6.2 NiPAAm/BMA/AAA (85/10/5) 의 LCST 곡선 (pH =2.0)

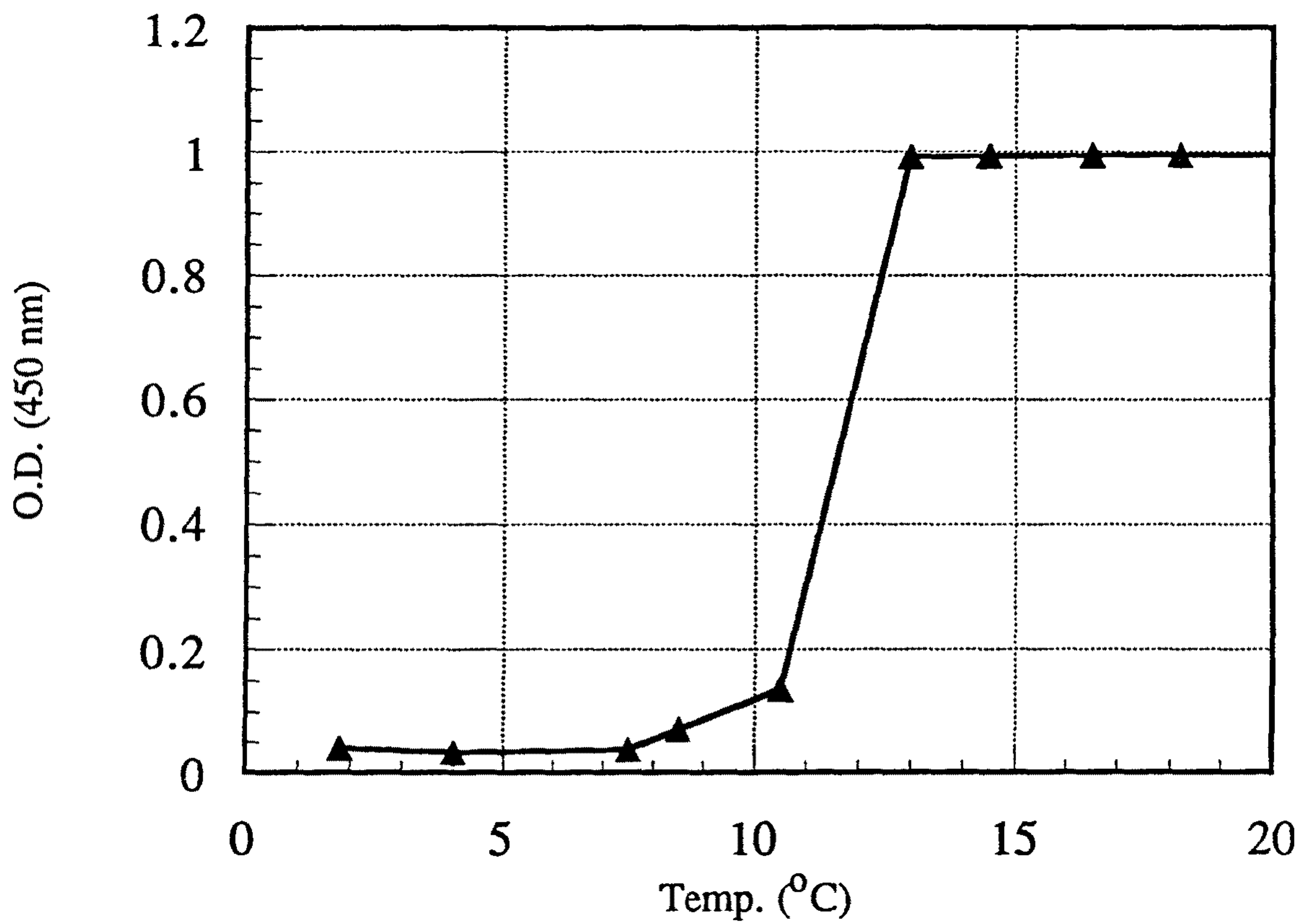


그림 6.3 NiPAAm/BMA/AAA (83/10/7) 의 LCST 곡선 (pH =2.0)

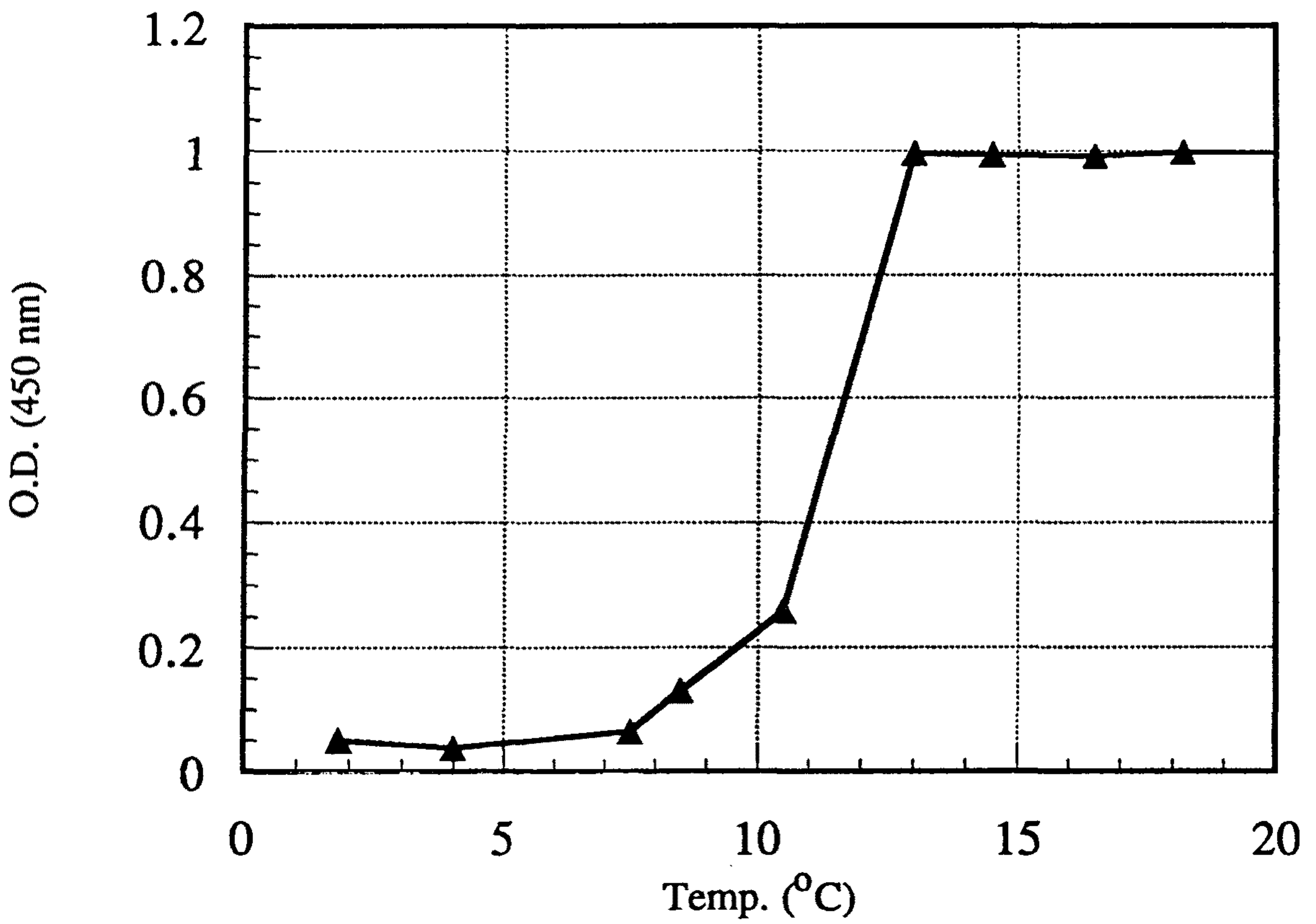


그림 6.4 NiPAAm/BMA/AAA (80/10/10) 의 LCST 곡선 (pH =2.0)

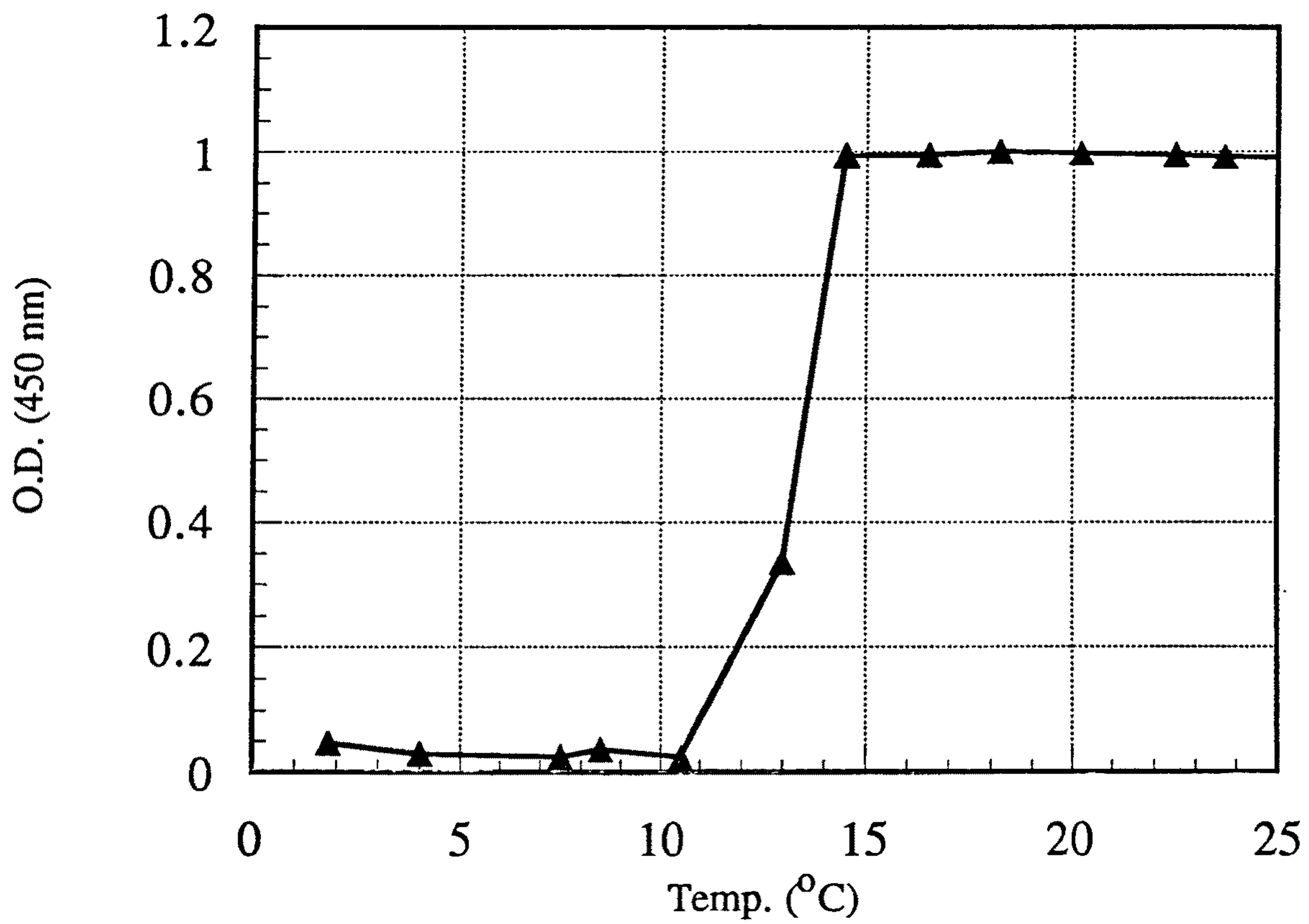


그림 6.5 NiPAAm/BMA/AAA (90/10/0)의 LCST 곡선 (pH =7.4)

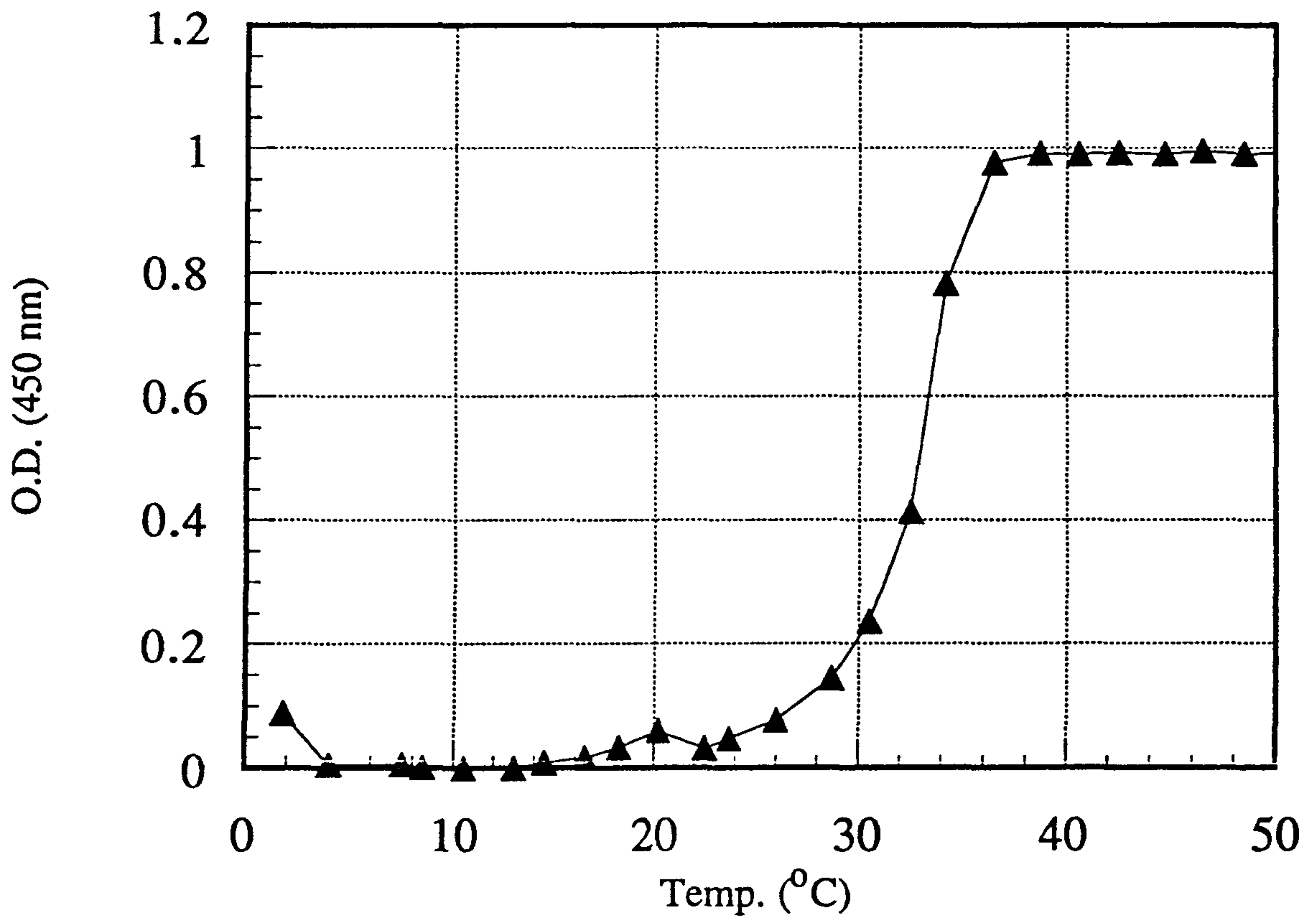


그림 6.6 NiPAAm/BMA/AAA (85/10/5) 의 LCST 곡선 (pH =7.4)

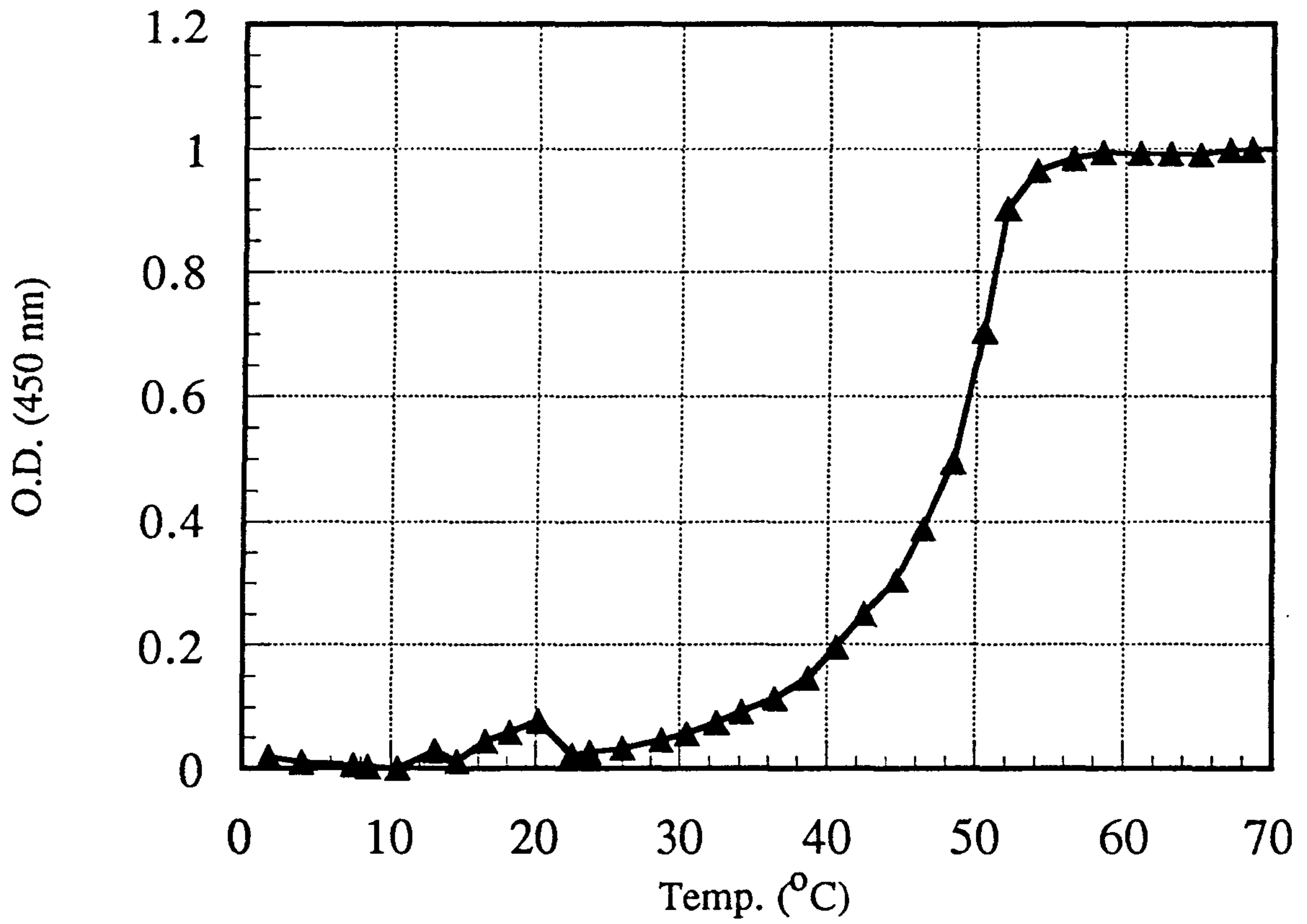


그림 6.7 NiPAAm/BMA/AAA (83/10/7) 의 LCST 곡선 (pH =7.4)

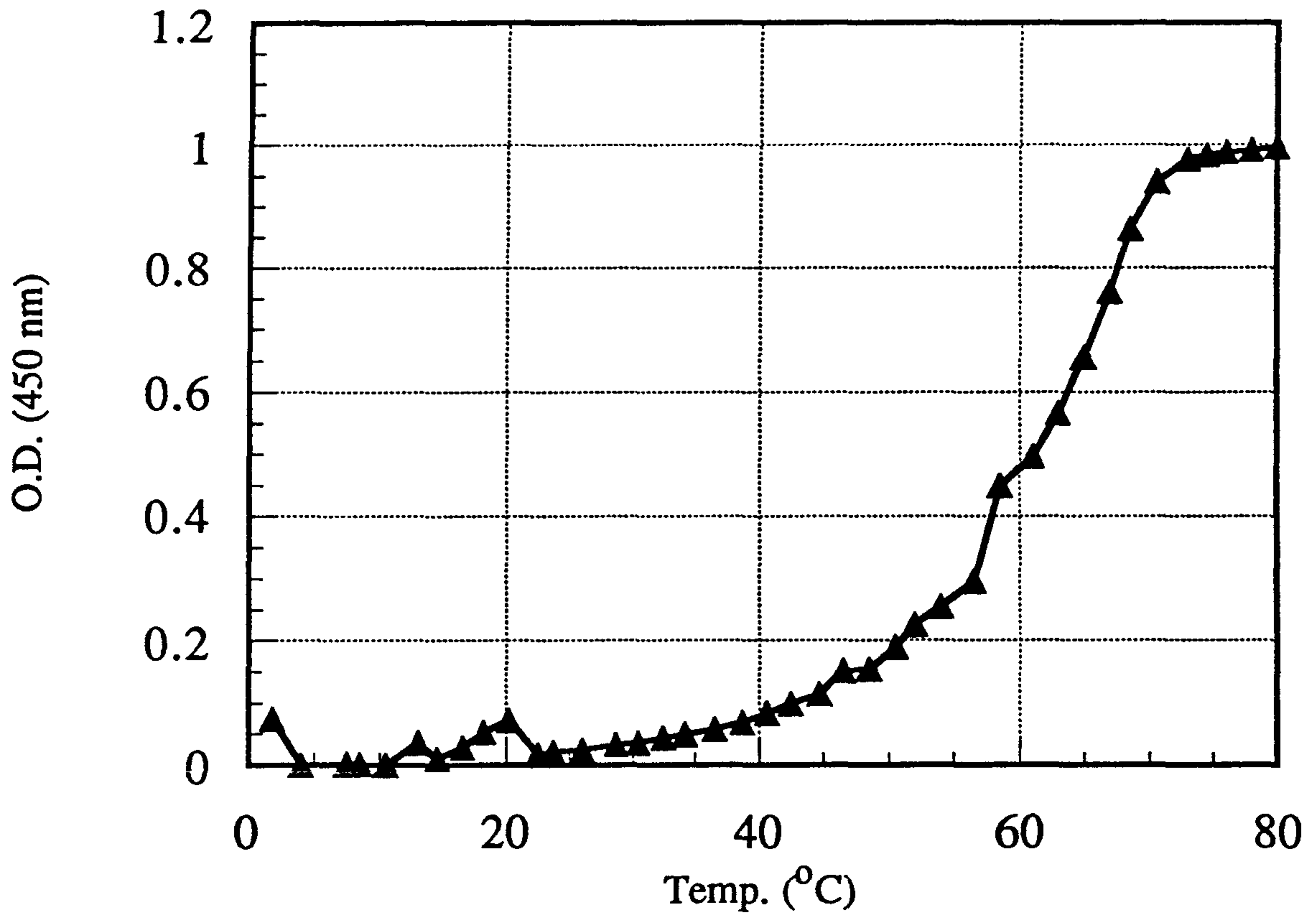


그림 6.8 NiPAAm/BMA/AAA (80/10/10) 의 LCST 곡선 (pH =7.4)

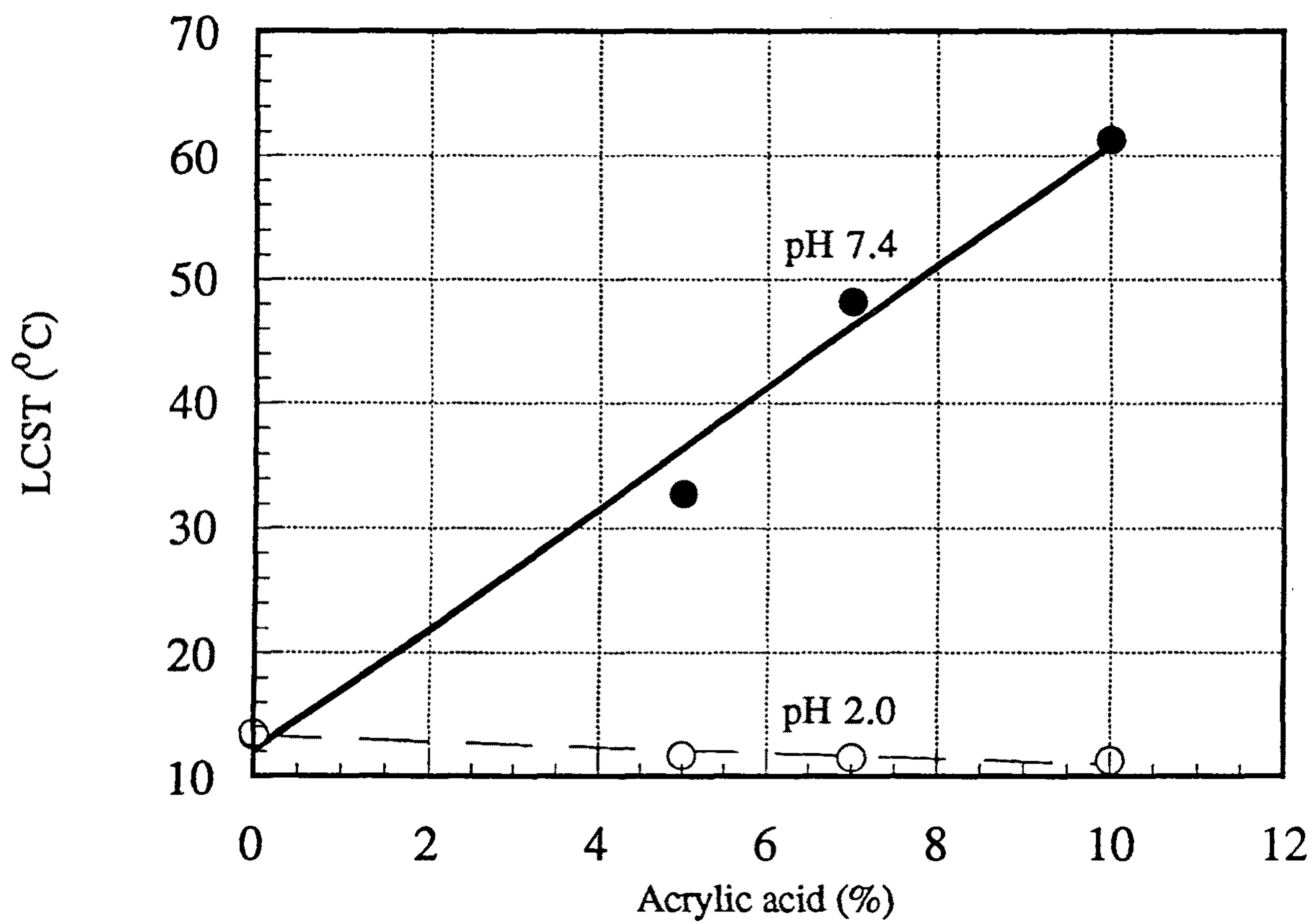


그림 6.9 여러가지 아크릴 산에 NiPAAm/BMA/AAA (80/10/10) 의 LCST 곡선

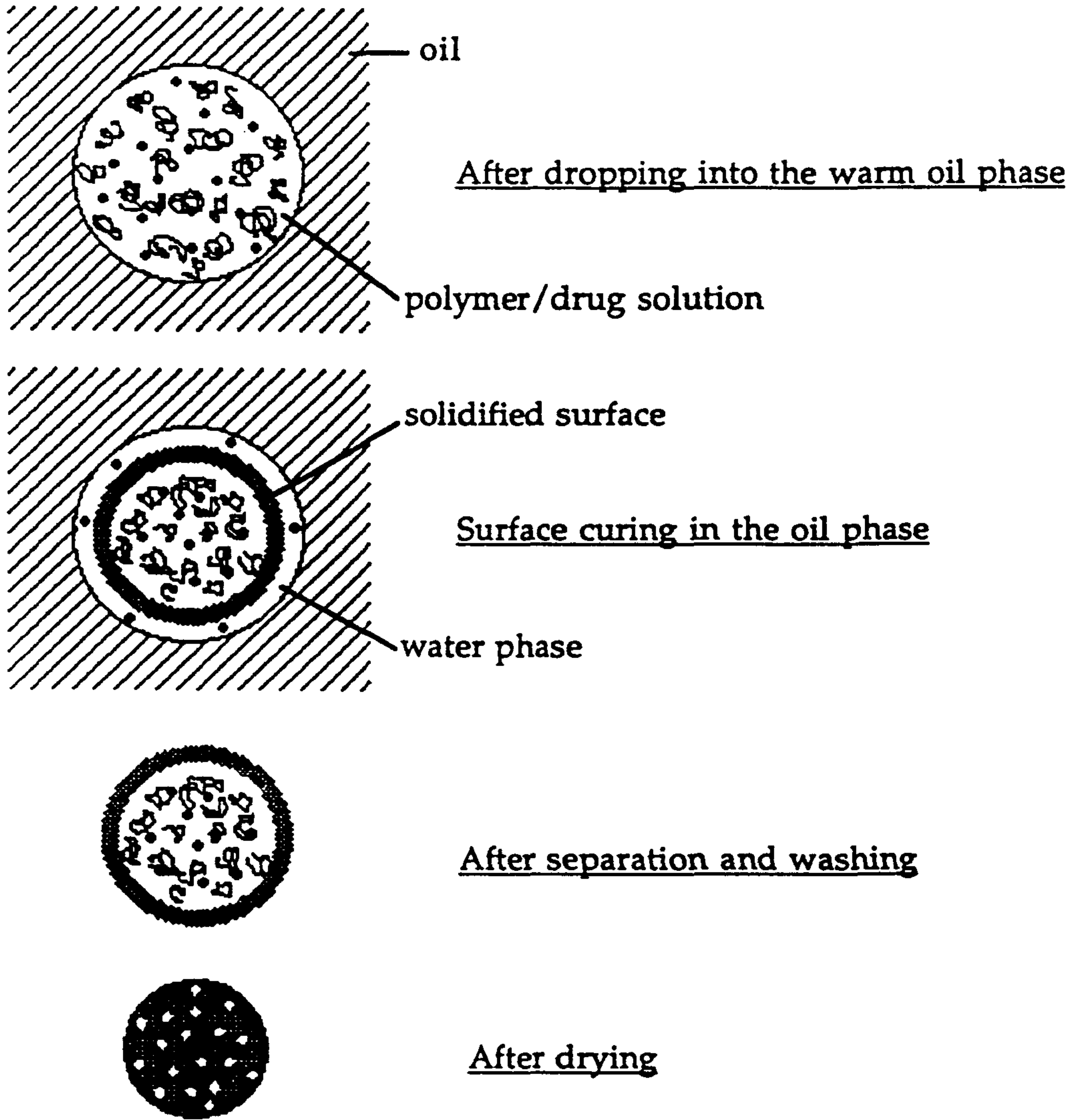


그림 6.10 산 및 열 감지 고분자 bead제작의 모식도

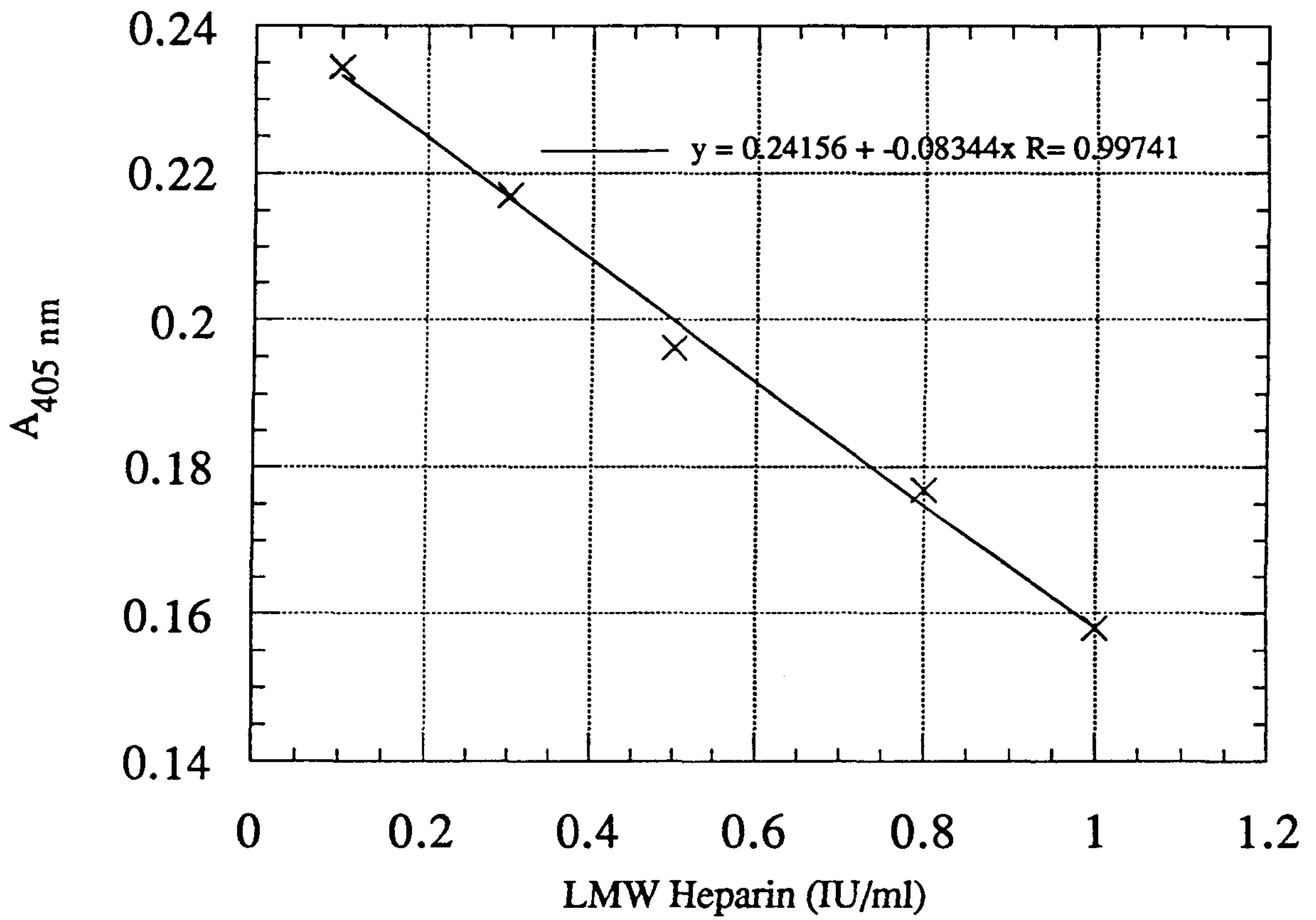


그림 6.11 저분자량 헤파린의 정량 표준곡선

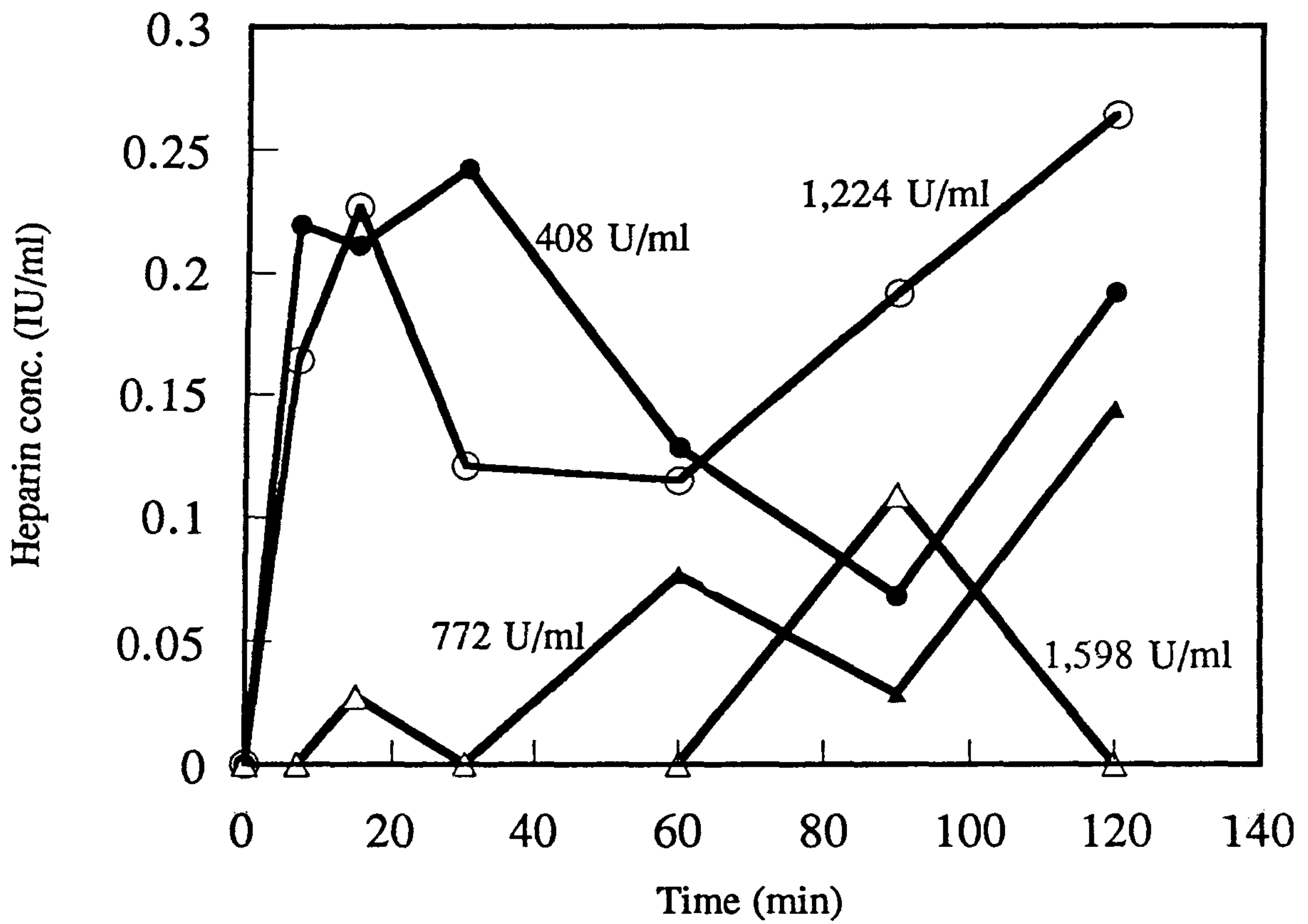


그림 6.12 쥐의 plasma에 흡수된 헤파린의 농도