

폴리우레탄과 알부민 결합을 이용한 항혈전성향상에 관한 연구

유규하, 이윤신, 이규백, 한동근*, 김영하*, 민병구
서울의대 의공학과, 의공학연구소
한국 과학 기술 연구원*

A study on the enhancement of antithrombogenicity of polyurethane cross-linked with human serum albumin

Gyu Ha Ryu, Yoon Sin Lee, Kyu Back Lee, Dong Geun Han*, Young Ha Kim*,
Byoung Goo Min
Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, Seoul National University
Institute of Biomedical Engineering
KIST*

1. 서론

의료용 특히 체내이식용 재료의 기본적인 요건은 생체 또는 그 구성요소에 대해서 적합한 기능을 갖는 것이다. 즉, 우수한 물리적 및 기계적 물성, 물성의 체내 안정성, 소독 가능성과 생체 적합성이다. 현재까지 상품화된 의료용 고분자 중에서 위의 요건을 가장 잘 갖추고 있는 것이 폴리우레탄계이며, 기계적 물성과 생체 적합성면에서 우수한 것으로 평가되고 있다. 본 연구에서는 혈액이 이물질 표면과 접촉시에 흡착되는 혈장 단백질 중에서 Fibrinogen 이나 gamma-globulin 등 혈전 형성을 유발하는 단백질의 흡착을 최소화하기 위하여 알부민을 폴리우레탄에 고정화시키는 방법을 채택하였다.

알부민은 일반적으로 혈소판의 점착 및 활성화를 억제한다고 알려져 있으며, 이를 폴리우레탄에 HMDI (Hydroxymethyl-diisocyanate) 를 매개체로 하여 결합시켜 폴리우레탄의 우수한 기계적 물성은 유지시키고, 재료의 항혈전성만을 향상시켰다.

반응은 Bulk 반응과 표면 반응으로 나누어 테스트하였으며, 각각의 물성과 고정화된 알부민의 양을 결정하였다. 알부민의 정량 방법은 Bulk 반응의 경우 Modified Lowry Method 를 표면반응에서는 Modified Coomassie Brilliant Blue G Method 를 각각 사용하였다.

2. 재료 및 방법

(1) Bulk 반응

폴리우레탄 (Pellathane 2363 - 80 AE, 5 % w/v, 이하 PU)과 HMDI (Aldrich)를 DMAc (Dimethylacetamide, Aldrich)에 녹이고 40°C 에서 5일간 반

응시킨다. 무수에테르로 PU-HMDI 를 침전시키고 여러번 세척한 후 진공 오븐(상온)에서 하루 동안 건조시킨다. 폴리우레탄과 반응한 HMDI의 정량은 먼저 Dibutylamine (DBA, Aldrich) 과 PU-HMDI의 말단기 (-NCO)를 반응시키고 반응하지 않은 DBA 를 염산으로 적정하는 방법을 사용하였다.

PU-HMDI (1% w/v) 를 각각 농도를 달리한 알부민 (Human serum albumin, Sigma) 과 함께 DMAc 에 녹이고 상온에서 1-6 일간 반응시킨다. 반응물을 증류수로 침전시키고 여액의 알부민을 Modified Lowry Method 로 정량한다.

(2) 표면 반응

메틸알콜로 세척한 PU sheet (1cm x 2cm x 1mm) 를 톨루엔, HMDI, stannous octoate 와 섞고 40°C에서 1 시간동안 질소가스를 충전시키며 반응시킨다. 톨루엔, 무수에테르의 순서로 PU-HMDI sheet 를 세척한 후 진공 오븐(상온)에서 건조시킨다. 알부민을 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.4) 에 0.2% (w/v) 로 녹이고 PU-HMDI sheet를 넣은 후 4°C에서 24시간동안 잘 저어주며 반응시킨다. PBS 로 sheet 를 세척하고 진공 오븐(상온)에서 건조시킨다. 반응한 알부민의 정량은 Modified Coomassie Brilliant Blue G Method 를 사용하였다.

(3) 혈소판 점착 실험

1) Platelet rich plasma (PRP) 준비

건강한 사람의 혈액을 3.8% sodium citrate 용액을 포함하는 주사기로 채취한 후 (최종희석비 1:9), 4°C에서 10분간 200 g로 원심분리하여 PRP 를 얻는다. Tyrode's buffer에 혈소판을 1 ul 당

350,000 개로 맞추어 넣는다.

2) Glass beads 와 Tubings 준비

Glass beads (평균 직경 200 um, Cataphote Corp.)를 chromic acid 에서 24시간동안 담가둔뒤 에틸알콜과 증류수로 세척하고 50 °C 진공 오븐 에서 건조시킨다. Glass beads 를 각각 PU, PU-HMDI, PU-Albumin 용액 (Bulk 반응, 0.5% w/v in DMAc)으로 코팅하고 40 °C 진공오븐으로 건조시킨다. 상품화된 PU tubing (4.5 mm O.D x 4.0 mm I.D) 을 각각 HMDI, 알부민으로 표면 반응을 시키고 진공 오븐(상온) 에 건조시킨다.

3) 혈소판 점착

코팅된 beads (140 mg) 를 3 ml 일회용 주사기에 넣고 2 ml 의 PBS buffer(PH 7.4) 에 하루동안 담가놓는다. buffer 를 제거하고 PRP 0.5 ml 을 주사기에 넣고 상온에서 반응시킨다. 점착 시간별로 점착인한 혈소판의 수를 Coulter counter 로 측정한다. control 로는 각 점착 시간별로 beads 없이 PRP 만을 넣은 주사기를 사용하였다. 이와 유사한 방법으로 알부민이 결합한 PU tubing 에 대해서도 PRP 와 반응시킨 후 점착하지않은 혈소판의 수를 측정한다.

3. 결과

(1) Bulk 반응

PU 과 HMDI 를 반응시켰을 때 40 °C에서 5일 간의 반응에서는 2×10^{14} mol/g 의 HMDI가 각각 반응하였다. 1 g의 PU-HMDI(4.15×10^{14} mol/g)에 알부민 500mg을 반응시킨 결과는 Modified Lowry Method를 통하여 얻었으며 그림1의 표준화 곡선에서 볼 수 있듯이 파장 500nm 와 640nm에서 알부민의 농도를 결정하였다. 반응 결과는 반응한지 1- 2일 째에서 90% 이상의 반응 수율을 보였다.

(2) 표면 반응

표면반응에서의 HMDI정량은 불가능하므로 FT - IR분석을 통하여 2250 cm^{-1} 에서 HMDI의 NCO peak를 관찰하여 폴리우레탄과 HMDI가 반응하였음을 확인 하였으며, 폴리우레탄이 최대한으로 HMDI와 반응했다고 가정하고, 알부민을 반응시켰다. Modified coomassie brilliant blue G method로 폴리우레탄과 결합한 알부민을 그림2의 표준화곡선을 바탕으로 정량했을 때 2.54 ug Albumin / cm^2 PU의 정도로 관찰되어 반응이 잘

진행되었음을 확인할 수 있었다. 그림3은 각각 PU-HMDI, PU-Albumin의 반응표면을 주사전 자현미경으로 관찰해본 것이다. 그림에서 볼 수 있듯이 PU-HMDI표면에 비하여 PU-Albumin에서는 알부민에 의하여 표면의 평활도가 향상되었다.

4. 고찰

PU-HMDI반응에서 -NH기의 치환도는 4-20% 정도가 가능하였다. DMAc에 녹는 PU-HMDI의 적절한 NCO함량은 약 2.65×10^{14} mol/g 으로 NH기 10개당 1개가 반응하였다. PU-HMDI에 대한 알부민의 도입은 혈장단백질 및 혈소판의 흡착을 억제시켜 우수한 나타냄이 확인되었다. 또한 본 연구는 PU-Albumin을 생체 재료로 적용하는데 있어서 성형재료 및 코팅용 재료로 이용하기 위하여 용액상태의 bulk반응을 행하였으며 알부민등의 결합으로 용해도가 개선되어 inner coating용 재료로 가능할 것으로 믿는다. 차후에 실험 계획으로는 결합된 알부민과 일련의 섬유용해효소(t-PA, lumbrikinase, etc)를 가교제를 사용하여 결합시킴으로써 알부민과 함께 항혈전성 효과의 상승 작용을 기대해 볼 수 있을 것이다.

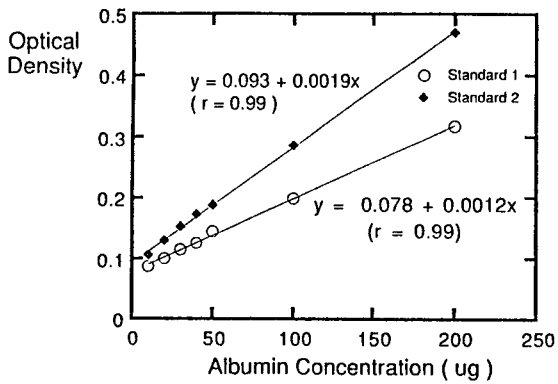


그림 1. 알부민 농도의 표준화 곡선 (Bulk 반응)
Standard 1 : 500 nm , Standard 2 : 640 nm

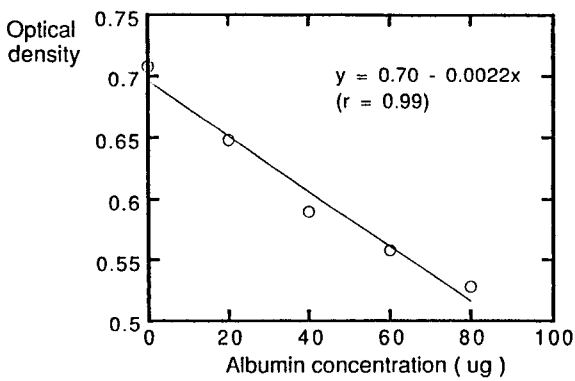
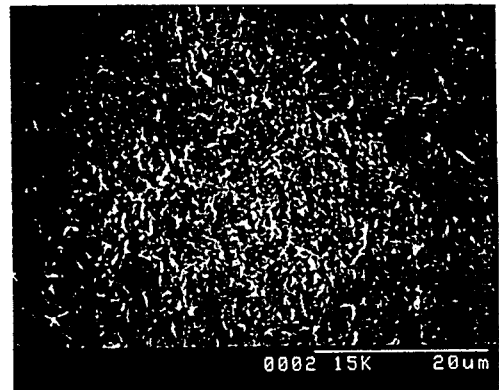
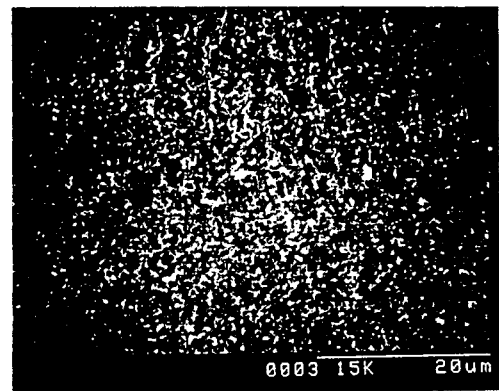


그림 2. 알부민 농도의 표준화 곡선 (표면반응)



(a)



(b)

그림 3. 표면 반응의 주사전자현미경 사진 (2000x)

- (a) PU-HMDI 반응 표면
- (b) PU-Albumin 반응 표면