

히알루론산을 함유한 PLGA 지지체의 제조 및 특성결정

고연경 · 김순희 · 정재수 · 박정수 · 임지예 · 김문석* · 이해방* · 강길선†
전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀
(2007년 7월 12일 접수, 2007년 8월 28일 채택)

Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Loaded PLGA Scaffold by Emulsion Freeze-Drying Method

Youn Kyung Ko, Soon Hee Kim, Jae Soo Jeong, Jung Soo Park,
Ji Ye Lim, Moon Suk Kim*, Hae Bang Lee*, and Gilson Khang†
BK-21 Polymer BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin dong 1Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea
*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea
(Received July 12, 2007; Accepted August 28, 2007)

초록 : 조직의 재생을 위한 지지체재료의 개발은 조직공학 분야의 연구에 있어서 매우 중요한 요인이다. 히알루론산은 조직을 수복하기 위한 체내이식용 구조물로서 널리 사용되고 있는 천연고분자이며, 이를 이용하여 본 연구에서는 히알루론산을 함유한 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA) 다공성 지지체를 유포동결 건조법으로 제조하였다. HA-PLGA 지지체는 수은다공도계, 전자현미경 및 물흡수성을 측정하여 특성을 결정하였다. 제조된 HA-PLGA 지지체의 다공도는 약 96.5%, 전체다공면적은 261 m²/g 이었으며, 세포가 성장하기에 적합한 환경인 다공사이의 상호연결이 전자주사현미경을 통해 관찰되었다. 또한 세포의 생존율과 성장률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) 방법을 이용하여 분석하였고, 사이토카인 및 수용성 약물의 방출경향을 확인하기 위하여 과립구-대식세포 집락자극인자(GM-CSF)를 지지체에 담지시킨 후 효소결합 면역 흡착검사(ELISA)를 이용하여 이들의 방출경향을 확인하였다. 천연/합성 하이브리드 담체로서의 HA/PLGA 담체가 PLGA 단독으로 사용하였을 때와 비교하여 볼 때 세포의 증식이 우수하였고, 이는 히알루론산의 우수한 생체적합성 및 수분 보유능력에 기인된 것으로 사료된다.

Abstract : Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and hyaluronic acid (HA) has been widely used as biocompatible scaffold materials to regenerate tissue. In this present study, we fabricated microporous PLGA and HA loaded PLGA scaffolds by a emulsion freeze-drying method. In order to confirm that the release profile of cytokine or water-soluble drugs, we manufactured the granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) loaded PLGA and HA-PLGA scaffold. All scaffolds were characterized using scanning electron microscope(SEM), mercury porosimeter and wettability measurement. Cell proliferation and viability were assessed by a 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) test. The porosity of HA-PLGA scaffold was greater than 95% with the total pore area of 261 m²/g. The HA-PLGA scaffold exhibited well interconnected pores to allow greater cell adhesion and prolifxeration. It was proven by higher cell viability in the HA-PLGA scaffold than PLGA alone. This may be due to the enhanced natural properties and higher water retention capacity of HA.

Keywords : hyaluronic acid, PLGA, scaffold, emulsion freeze-drying method.

서 론

조직공학은 세포와 적절한 자극요소가 결합된 생체재료담체를 이용하여 손상된 조직의 수복과 재생을 추구하는 통합과학기술이

다.¹ 조직공학에 사용되는 고분자 담체의 역할은 분리된 세포를 집적화하여 생체내에서 세포가 왕성하게 활성화되어 새로운 기질을 분비할 수 있도록 지지체의 역할을 충분히 해내야 하고,²⁻⁵ 체내에 이식된 후에도 주변 조직과 용화가 잘 되어야 하며 일정 기간이 지난 후 안전하게 흡수, 분해하여 이물질로 남지 않는 우수한 생체적합성을 가져야 한다.^{6,7} 이와 같은 조건을 갖춘 재료로서 락타이드와

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

글리콜라이드의 공중합체인 PLGA는 생체 내에서 가수분해에 의해 젖산과 글리콜산으로 전환되어 결국에는 이산화탄소와 물로서 체외로 배출되는 생분해성 고분자로서 현재 조직공학과 약물전달 시스템 분야에서 많이 사용되고 있으며,⁸⁻¹⁰ 이러한 PLGA를 이용하여 상분리,¹¹ 용매증발,¹² 용매 캐스팅/염 추출법,¹³ 열음입자추출법¹⁴ 및 CO₂ 팽창법 등의¹⁵ 여러 방법을 통해 다공성 지지체를 제조하는 방법이 꾸준히 연구되어 왔다. 하지만 상기의 방법은 담체 내에 항생제, 성장인자 등의 수용성 약물을 첨가시킬 수 없는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고자 본 연구팀은 이전 연구에서 유희동결건조법을 통하여 히알루론산을 함유한 다공성 PLGA 지지체를 제조하여 이들의 특성을 분석하였으며 수용성 약물, 성장인자 및 단백질을 담지할 수 있는 지지체로의 적용가능성을 확인하였다.¹⁶⁻¹⁸

히알루론산(HA)은 다양한 조직에서 발견되는 점액다당류로서 세포외기질을 구성하는 중요한 구성물질이며, 히알루론산이 가지는 점탄성, 우수한 수분 보유 능력 및 생분해성 때문에 의학, 미용 및 조직공학 분야에서 널리 사용되고 있는 생체재료이다.¹⁹⁻²¹ 하지만 앞서 언급한 담체의 제조방법의 과정 중에서 수용성인 히알루론산은 손실되기 쉬워 히알루론산을 함유하는 지지체를 제조하는데 어려움이 있다. 이러한 이유로 일련의 과학자들에 의해 히알루론산과 합성고분자를 화학반응을 통해 결합시키는 일련의 연구가 진행되고 있으며,^{22,23} 이들이 제시하는 화학반응과정은 여러 단계를 거쳐야 하는 번거로움이 따른다. 따라서 본 연구에서는 이러한 단점을 보완하고 손쉽게 수용성의 특성을 갖는 히알루론산을 포함한 PLGA 담체를 제조하고자 유희동결건조법을 사용하여 지지체를 제조하였으며, 전자주사현미경, 수은다공도계 및 물 흡수율의 측정을 통해 특성결정을 하였으며, MTT 분석법으로 제조된 지지체의 생체적합성을 평가하고자 하였다.

과립구-대식세포 접착자극인자(GM-CSF)는 과립구와 대식세포 전구세포의 성장과 분화를 유도하는 강력한 자극인자이며, 조혈작용과 면역반응에 있어서 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 알

려져 있다.²⁴ 또한 최근에는 중추신경 재생에 있어 GM-CSF의 효과 및 이의 작용기전에 대한 연구결과가 꾸준히 보고되고 있다.²⁵⁻²⁷ 이에 따라 본 연구에서는 모델 사이토카인으로서 GM-CSF를 담지하여 이의 방출거동을 확인함으로써 HA-PLGA 다공성 지지체의 생체활성물질 전달 디바이스로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 히알루론산(Fluka Co., USA)은 연쇄상구균으로부터 분리된 것을 사용하였으며, PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 또한 메틸렌클로라이드(Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 방출확인을 위해 ELISA 키트(R&D system, Inc., USA)를 사용하였으며, 방출을 위한 용출액으로 인산염완충용액(PBS, pH 7.4)을 사용하였다.

유희동결건조법을 이용한 지지체의 제조 및 GM-CSF를 함유한 지지체 제조. 유희동결건조법에 의한 지지체의 제조 모식도를 Figure 1에 나타내었다. 먼저 1 g의 PLGA를 10 mL의 메틸렌클로라이드에 용해한 후 증류수 또는 1%의 히알루론산 용액을 첨가하였다. 이때 PLGA 용액과 수용액의 부피비율은 7대 3이 되도록 하였다. 이때 GM-CSF를 함유한 지지체를 제조하기 위하여 지지체당 50 및 200 ng의 농도로 GM-CSF를 수층에 첨가하였다. 유기층과 수층으로 상분리가 일어난 용액을 유희화시키기 위하여 초고주파 분쇄기(Ultrasonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific, USA)를 사용하였으며, 30%의 출력으로 50초 동안 혼합을 실시하였다. 이 유희액을 미리 -198 °C의 액체질소에 의해 냉각된 테플론 몰드에 부어 충분히 급냉시킨 후 5 mTorr, -70 °C의 조건에서 동결건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 이상 4 °C에서 건조시켰다.¹⁶⁻¹⁸

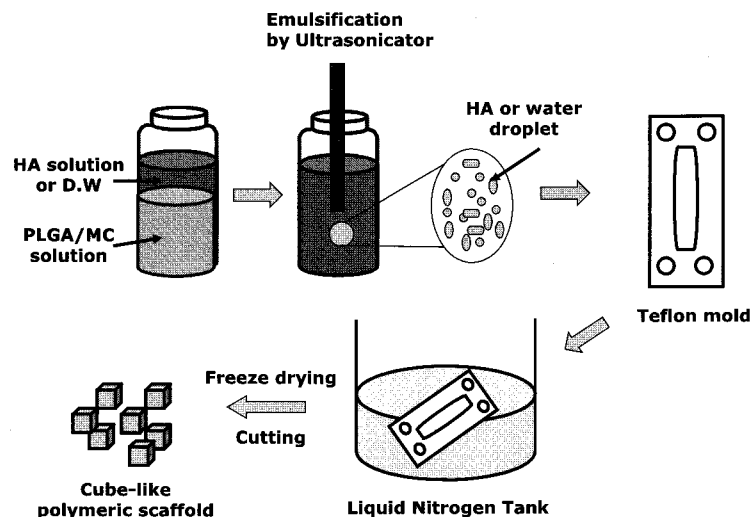


Figure 1. The Schematic diagram illustrating of the fabrication process of hyaluronic acid loaded PLGA scaffold by emulsion freeze-drying method.

히알루론산을 함유한 PLGA 지지체의 특성. 상기의 방법들을 사용하여 제조한 다공성 지지체의 내부, 표면 및 바닥면의 다공형태를 주사전자현미경(SEM, JSM-6400, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm의 크기로 절단하고 플라즈마 스퍼터를 이용하여 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태를 확인하였다. 또한, 수은 다공도계(Micromeritics Co., Model AutoPore II 9220, USA)를 이용하여 제조된 다공성 지지체의 다공 크기 분포, 비다공면적, 평균 다공직경 및 다공도를 측정하였다.²⁴

물 흡수율 측정. 제조된 지지체의 물 흡수능력을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 먼저 지지체의 초기 무게(W_{dry})를 측정하고 10 mL의 물에서 3, 5, 7 및 10일 동안 상온에서 방치하였다. 물을 흡수한 지지체의 표면의 수분을 제거한 후 무게(W_{wet})를 측정하여 식 (1)에 대입함으로써 물 흡수율을 측정하였다.²⁸

모든 실험은 동일 조건에서 세 번씩 수행하였다.

$$W(\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100 \quad (1)$$

NIH-3T3 세포의 배양. 섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658, Korea Cell Line Bank, Korea)는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 10%의 우태아혈청(FBS, Gibco, USA)과 1%의 안티바이오틱-안티마이코틱(Gibco)이 함유된 Rosswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배양액(Gibco)으로, 37 °C, 5%의 이산화탄소 인큐베이터에서 배양하였다. 플라스크에 단층을 형성한 세포에 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco)을 처리하여, 1×10^5 cells/지지체의 농도로 세포수를 세어 지지체에 파종하였다.²⁹

MTT 분석. 세포의 부착도 및 증식률은 MTT 분석법을 이용하여

확인하였다. 세포가 파종된 지지체에 7, 14, 21 및 28일째에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co.) 용액(50 mg/mL)을 100 μ L씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 헹구고 디메틸설폭사이드(Sigma Co.) 용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 sonicator로 1시간 동안 결정을 용해하였다. 그 후, 96 well 플레이트에 샘플을 100 μ L씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.³⁰

PLGA 및 HA-PLGA 지지체로부터 GM-CSF의 생체 외 방출실험. 제조된 각 지지체로부터 GM-CSF의 방출거동을 조사하기 위하여 생체 외에서 방출실험을 실시하였다. 각각의 지지체에 5mL의 PBS를 넣은 후, 37 °C의 인큐베이터에서 70 rpm의 속도로 교반시켜주면서 정해진 시간간격마다 전량의 PBS를 회수하고 동일한 양의 용출액을 보충해 주었다. 채취한 시료는 분석시까지 4 °C에서 보관하였으며 분석방법으로는 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 사용하였으며 이는, 고정화된 GM-CSF 수용체에 GM-CSF를 결합시킨 후 HRP로 발색시켜 450 nm의 파장을 조사하여 흡광도를 측정하였다.³¹

방출 후 지지체의 모폴로지 확인. 방출 전후의 내부 형태 변화를 SEM을 통해 관찰하였다. SEM 분석을 위하여 방출 실험 전의 담체는 냉동 보관하고 시료를 동결건조하여 잔류 수분을 제거하였고, 방출 실험 후의 담체 또한 동결건조시킨 후 샘플을 샘플폴더에 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터를 이용하여 백금으로 진공 증착하였다.³²

결과 및 토론

유화동결건조법을 이용한 다공성 지지체의 제조. 유화동결건조법을 이용하여 히알루론산을 함유한 다공성 지지체를 제조하였다. 히알

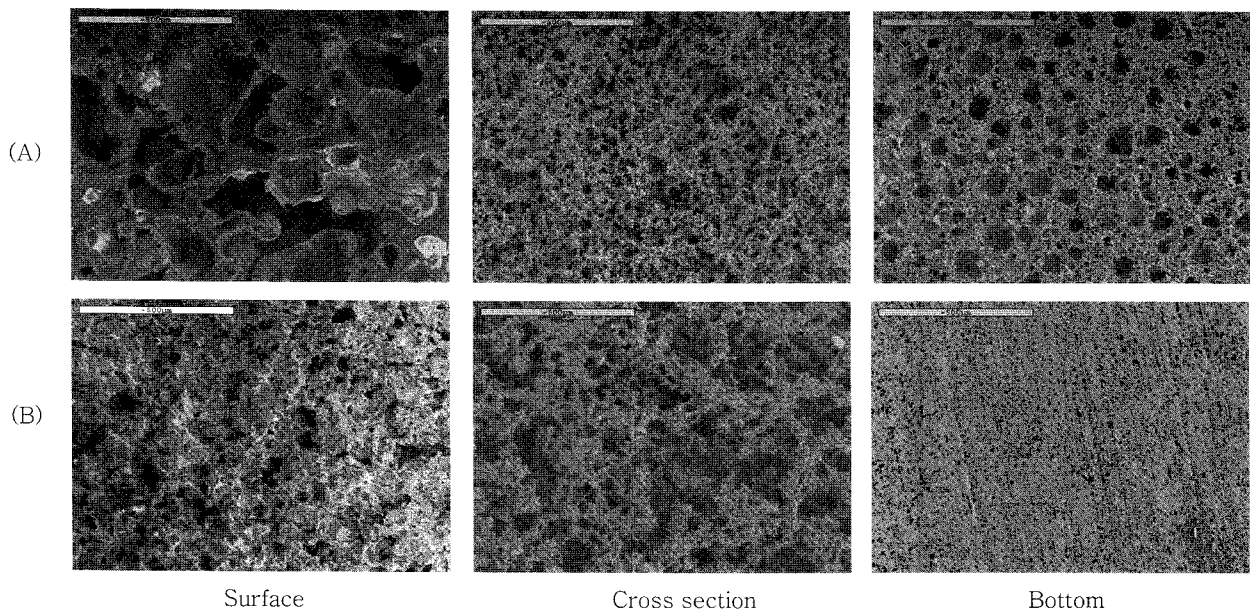


Figure 2. SEM micrographs of hyaluronic acid loaded PLGA scaffold by means of emulsion freeze-drying method. (A) PLGA scaffold and (B) HA-PLGA scaffold (magnification; 100, scale bar; 500 μ m).

루론산을 혼합하여 다공성 지지체를 제조하여도 물성의 변화가 크지 않고, 물드의 형태와 같은 일정한 크기의 다공성 지지체를 제조할 수 있었다.^{16,33}

히알루론산을 함유한 PLGA 지지체의 특성. 유화동결건조법으로 제조한 PLGA, HA-PLGA 다공성 지지체의 내부 및 바닥면의 SEM 사진은 Figure 2에 나타내었다. 외형적 형태는 테플론 몰드의 빈 공간과 똑같은 형태로 얻어졌으며, 수축, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 지지체의 내부 및 표면의 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났으며, 히알루론산을 첨가하더라도 내부의 다공 구조에는 변화가 없음을 확인할 수 있었다.^{16,31} 하지만, 실리콘과의 접촉부분인 지지체의 바닥면은 거의 모든 샘플에서 대부분 닫힌 셀 구조를 나타내었으며, 히알루론산을 첨가한 지지체의 경우 더 확연한 결과를 확인할 수 있었다. 내부의 다공형태에 비하여 몰드 접촉면과 표면에서는 다공의 형태가 약간 눌린 듯한 모양이 얻어졌지만, 세포 배양시 조직세포가 성장하여 내부로 이행하는 데는 문제가 없을 것으로 예측되었다.¹⁶

수은다공도계로 다공도 및 다공 크기를 분석한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 유화동결건조법으로 제조된 지지체는 높은 다공도와 여러 가지 크기의 다공을 갖음을 확인하였고, 제조된 지지체의 평균다공도는 PLGA 지지체가 약 91%, 히알루론산을 함유한 지지체의 경우에 약 97%이었으며, 히알루론산을 함유한 지지체가 더 높은 다공도를 보였으나 두 지지체 모두 높은 다공도를 가짐을 확인하였다. 평균 다공의 크기는 PLGA 지지체의 경우에는 12.18 μm , HA-PLGA 지지체는 21.48 μm 로 HA-PLGA 지지체에서 더 큰 다공의 크기를 확인하였다. 이는 PLGA에 고루 분산되어 있는 히알루론산 가운데 극소량이 상온에서 약간의 분해가 일어나면서 다공도 및 다공크기가 증가한 것으로 예상되나 두 지지체가 확연한 차

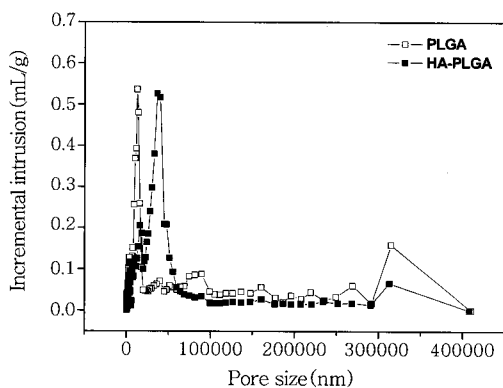


Figure 3. Pore size distributions of PLGA and HA-PLGA scaffold.

Table 1. Result of Average Porosities and Median Pore Sizes of PLGA and HA-PLGA Scaffold

Type of scaffold	Content of hyaluronic acid (V/V%)	Porosity (%)	Median pore diameter (μm)
PLGA	0	90.7	12.18
HA-PLGA	30	96.5	21.48

이를 보이지 않았다.

물 흡수성 측정. 히알루론산의 첨가에 따른 친수성 효과를 Figure 4에 나타내었다. 히알루론산을 함유한 PLGA 지지체가 PLGA 지지체보다 4~6배 높은 흡수율을 나타내었으며, 히알루론산을 함유한 PLGA 지지체는 약 670%의 흡수율을 나타내었다. 히알루론산은 대표적인 프로테오글라이칸의 한 종류로서 코어 단백질을 중심으로 많은 수의 글루코스아미노글라이칸들이 결합되어 있는 구조를 가지고 있는데, 이러한 구조적인 특징으로 인해 친수성이 증가하여 수분을 함유하는 능력이 뛰어나 이와 같은 결과를 보이는 것으로 사료된다.^{19,20}

MTT 분석. 히알루론산의 첨가에 따른 지지체에서의 세포독성을 MTT 분석법을 통하여 비교하였다(Figure 5). PLGA 지지체와는 달리 HA-PLGA 지지체는 실험을 진행하는 동안 계속적으로 세포가 성장하였으며, 28일째에는 흡광도가 무려 4배의 차이를 보였다. 이는 히알루론산이 가지는 높은 수분 보유 능력과 생체적합성 때문이라 사료된다.²⁰ 히알루론산은 모든 연결조직을 구성하는 주된 성분으로 태아의 피부 발달과정에서 높은 농도로 존재하고 창상치유 과정에 있어 세포외기질에서 가장 먼저 발현하는 거대분자이며,^{34,35} 세포의 부착과 이동에 관련이 있고 특히 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다고 보고되고 있다.³⁶

PLGA 및 HA-PLGA 지지체로부터 GM-CSF의 생체 외 방출거동 확인. 유화동결건조법으로 제조된 PLGA 및 HA-PLGA 지지체를 단백

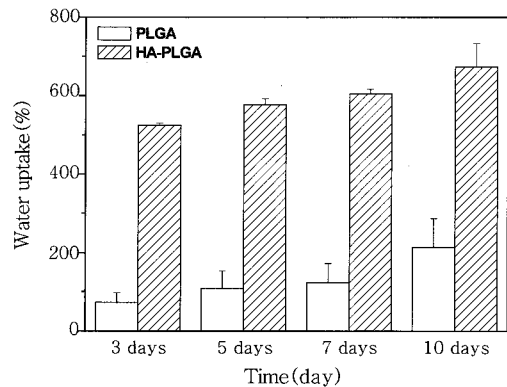


Figure 4. Water-uptake ability of PLGA and HA-PLGA scaffold by means of emulsion freeze-drying method.

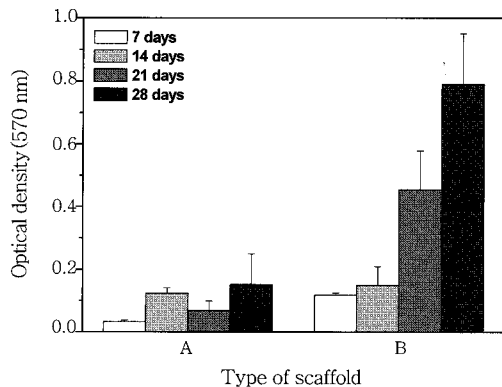


Figure 5. Cell attachment and cytotoxicity evaluation by MTT assay. (A) PLGA scaffold and (B) HA-PLGA scaffold.

질 약물 및 사이토카인의 전달체로서의 가능성을 확인하고자 모델 성장인자로 GM-CSF를 담체당 50 및 200 ng씩 로딩하여 지지체에서의 방출경향을 확인하였다. GM-CSF가 함유된 지지체의 방출 확인은 56일 동안 수행하였으며 ELISA를 통해 관찰한 누적방출량(%) 측정 결과를 Figures 6 및 7에 나타내었는데, 방출기간 동안 지속적인 GM-CSF의 방출 경향을 확인할 수 있었다. 지지체에 포함된 히알루론산이 용출액과 접촉하면서 용해가 일어나게 되고 팽윤되어 지지체내에 외부와 접촉할 수 있는 채널을 형성하기 쉬워진다. 이러한 미세 채널은 매트릭스 내부로 침투하는 물의 양을 증가시켜 히알루론산의 용해와 PLGA의 분해를 촉진시키고 따라서 히알루론산과 결합하고 있던 GM-CSF가 히알루론산의 용해와 동시에 지지체 밖으로 빠져나오기 용이하여 히알루론산을 함유한 지지체에

서 더 높은 방출 거동을 보인 것으로 사료된다. 56일 이후의 GM-CSF의 방출량은 50 ng의 GM-CSF를 담지시킨 경우 각각 PLGA 지지체가 약 67%, HA-PLGA 지지체는 약 87%였고, 200 ng의 GM-CSF를 담지시킨 경우는 PLGA 지지체가 약 33%, HA-PLGA 지지체가 약 67%의 방출을 보였다. 각각의 실험군에 대한 누적방출 백분율을 계산할 때 50 ng의 GM-CSF를 함유한 담체가 200 ng의 GM-CSF를 함유한 담체보다 더 높은 백분율을 나타내나, 누적방출량을 환산하여 볼 때 200 ng의 GM-CSF를 함유한 담체가 50 ng의 GM-CSF를 함유하는 담체보다 더 많은 양의 GM-CSF를 방출함을 확인할 수 있었다.

방출 후 지지체의 모폴로지 변화 확인. 방출 실험 후의 지지체의 모폴로지 변화를 Figure 8에 나타내었다. 방출 후에는 지지체의 다공

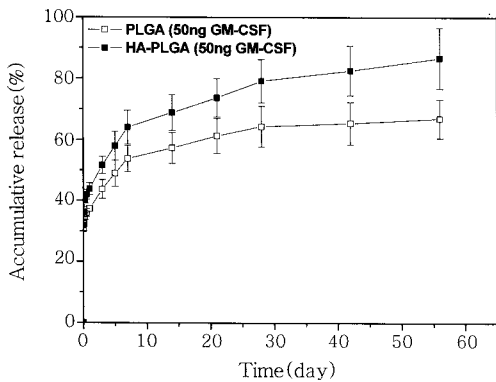


Figure 6. Release behavior of GM-CSF from 50 ng GM-CSF loaded PLGA and HA-PLGA scaffold at 37 °C for 56 days.

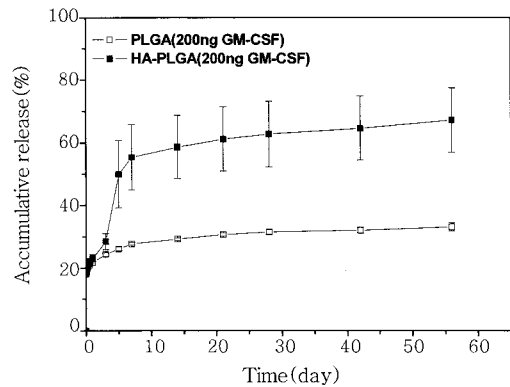


Figure 7. Release behavior of GM-CSF from 200 ng GM-CSF loaded PLGA and HA-PLGA scaffold at 37 °C for 56 days.

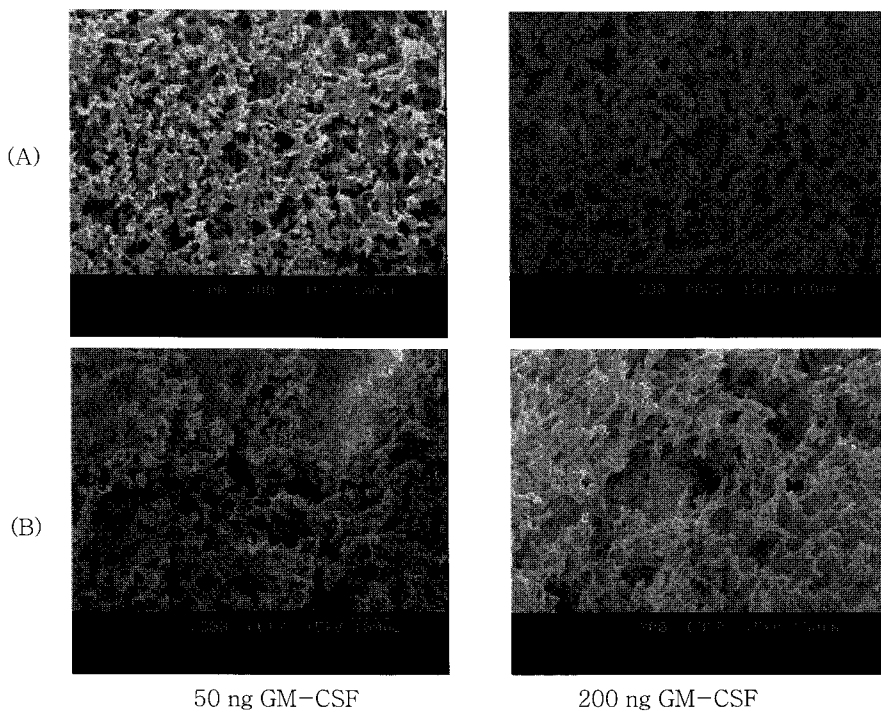


Figure 8. SEM microphotographs of GM-CSF loaded PLGA and HA-PLGA scaffold after 56 days. (A) PLGA and (B) HA-PLGA scaffold (magnification; 300, scale bar; 100 μm).

형태가 상당부분 일그러짐을 확인하였고 PLGA 지지체보다 히알루론산을 함유한 PLGA에서 다공의 일그러짐이 더 확연함을 관찰하였다. 히알루론산의 물과 쉽게 결합하는 특성으로 인해 HA-PLGA 지지체의 내부의 형태변화에 있어서 히알루론산은 내부의 균열 증가와 용출액과 접촉하는 표면적을 증가시킨다. 이러한 붕괴현상이 물의 침투속도를 가속화시키고 빠른 팽윤작용에 의해 약물의 방출과 지지체의 분해를 촉진시킨 것으로 사료된다.

조직공학적 담체의 재료로서 생분해성 고분자인 PLGA의 장점중 하나는 글리콜라이드와 락타이드의 조성에 따라 분해기간을 조절할 수 있다는 것인데, 이들의 조성에 따라 물성이 변하게 된다. 분자량이 90000 g/mole의 PLGA의 생체외에서 분해기간은 약 여섯 달 정도이며, 이는 세포가 부착하고 성장하는 물성을 제공하여 준다. 상기의 결과들에서 설명해주는 것과 같이 PLGA 지지체에 히알루론산을 첨가하게 되면 분해속도가 빨라지게 되는데 이는 물성이 변하지 않고도 세포가 성장하는 환경을 제공하는 역할을 할 것으로 예상된다. 또한 손쉽게 PLGA의 분해속도를 조절할 수 있는 장점이 있어 차후 조직공학 및 약물전달시스템 분야에 있어서 여러 용도로 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

결 론

세포의 부착과 조직형성을 위한 3차원적 지지체로서 다공성 지지체는 조직공학의 구성 요소 중 하나이다. 본 연구에서는 유화동결건조법을 이용하여 생체적합성과 수분 보유 능력이 뛰어난 수용성의 히알루론산을 함유하는 HA-PLGA 하이브리드 담체를 제조하고자 하였다. 본 연구에서 사용된 유화동결건조법은 여타의 화학적 결합을 통한 HA-PLGA 담체의 제조방법보다 더욱 경제적이며 손쉽게 지지체를 제조할 수 있었다. SEM을 통하여 제조된 지지체 내부에는 상호연결된 다공구조를 가짐을 확인하였으며, 급속도로 동결하므로 두상이 골고루 분산을 이루게 되어 담체의 모폴로지의 변화는 확인할 수 없었다. 수는 다공도계 분석을 통해 히알루론산을 함유한 PLGA 지지체가 단일한 PLGA 지지체보다 다공도가 높고 다공의 크기가 큰 것을 관찰하였다. 이는 함유된 히알루론산의 약간의 손실에 의한 것으로 예상되나 세포의 부착과 성장에 큰 영향을 주지 않는 범위 내인 것으로 사료된다. 물의 흡수정도를 확인한 실험에서는 히알루론산을 함유한 지지체에서 약 670%의 높은 흡수율을 보였는데 이는 히알루론산 자체가 가지는 고유한 특성 때문으로 사료된다. MTT 분석법을 통하여 히알루론산이 세포의 성장과 증식에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였고 이는 히알루론산이 가지는 생체적합성과 친수성 때문으로 사료된다. 수용성의 생리활성물질의 전달체로서의 가능성을 확인하기 위하여 GM-CSF가 담지된 지지체를 제조하고 이의 방출을 확인한 결과 GM-CSF는 56일 동안 지속적으로 방출되었고, 히알루론산을 함유한 지지체에서 높은 방출 결과를 확인하였다. 또한, 방출실험과 SEM을 통한 방출 후 담체의 모폴로지 변화의 결과로부터 PLGA의 조성을 조절하지 않고도 히알루론산의 혼합만으로도 분해속도를 조절할 수 있는 가능성을 보여주었다.

이로써 유화동결건조법으로 제조된 히알루론산을 함유한 PLGA 지지체는 세포의 부착 및 성장에 도움을 주며 생리활성물질의 서방

형 담체로서의 가능성을 보여주었고, 또한 신경재생에 긍정적인 영향을 주는 인자로 보고되고 있는 GM-CSF를 함유한 HA-PLGA 담체는 손상된 중추신경 및 말초신경의 재생에 있어 기능성 담체로서의 충분한 역할을 수행할 것으로 사료된다. 현재 조직공학적 장기 재생에서의 다공성 담체로서 히알루론산을 이용한 다양한 형태의 천연/합성 하이브리드 담체 개발과 이들의 실용화에 대하여 연구 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 세포융용사업단(SC3100)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Langer and D. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
2. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
3. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **12**, 527 (2001).
4. G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **13**, 4 (2002).
5. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **13**, 226 (2002).
6. I. G. Park, S. H. Oh, and J. H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 164 (2004).
7. W. Y. Jang, S. H. Kim, I. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 100 (2005).
8. G. Khang, J. W. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **7**, 357 (1997).
9. G. Khang, E. K. Jeon, J. M. Rhee, I. W. Lee, S. J. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
10. J. S. Lee, C. S. Kong, S. H. Cho, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 95 (2002).
11. J. H. Aubert and R. L. Clough, *Polymer*, **26**, 2047 (1985).
12. S. Gogleswski and A. J. Pennings, *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **4**, 675 (1983).
13. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 27 (1993).
14. K. D. Hong, K. S. Seo, S. H. Kim, S. K. Kim, G. Khang, H. S. Shin, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 282 (2005).
15. D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Sub, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **17**, 1417 (1996).
16. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **23**, 471 (1999).
17. E. K. Jeon, H. J. Whang, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
18. M. G. Choi, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 318 (2001).
19. G. Prestwich, D. Marecak, J. Marecek, K. Vercruyssen, and M. Ziebell, *J. Controlled Rel.*, **53**, 93 (1998).
20. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Seo, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).

21. S. J. Kim, C. K. Lee, Y. M. Lee, I. Y. Kim, and S. I. Kim, *React. Funct. Polym.*, **55**, 291 (2003).
22. S. Cai, Y. Liu, X. Z. Shu, and G. D. Prestwich, *Biomaterials*, **26**, 6054 (2005).
23. H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, and T. G. Park, *Biomaterials*, **26**, 1925 (2005).
24. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2004).
25. J. K. Kim, B. H. Choi, H. C. Park, S. R. Park, Y. S. Kim, S. H. Yoon, H. S. Park, E. Y. Kim, and Y. Ha, *Neuroreport*, **15**, 2161 (2004).
26. Y. Ha, Y. S. Kim, J. M. Cho, S. H. Yoon, S. R. Park, D. H. Yoon, E. Y. Kim, and H. C. Park, *J. Neurosurg. Spine*, **2**, 55 (2005).
27. H. C. Park, Y. S. Shim, Y. Ha, S. H. Yoon, S. R. Park, B. H. Choi, and H. S. Park, *Tissue Eng.*, **11**, 913 (2005).
28. H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 194 (2004).
29. M. S. Lee, J. C. Yang, S. H. Kim, I. B. Song, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 259 (2006).
30. G. Khang, P. K. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
31. M. H. Cho, S. K. Kim, H. Hoon, Y. N. Shin, M. S. Kim, B. Lee, J. S. Lee, G. Khang, H. B. Lee, and I. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 46 (2006).
32. G. D. Hong, G. S. Seo, S. H. Kim, S. K. Kim, G. Khang, H. S. Shin, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 282 (2005).
33. K. Whang, C. H. Thomas, and K. E. Healy, *Polymer*, **36**, 837 (1995).
34. L. Ruiz-Cardona, Y. D. Sanzgiri, L. M. Benedetti, V. J. Stella, and E. M. Topp, *Biomaterials*, **17**, 1639 (1997).
35. S. A. Alexander and R. B. Donoff, *J. Surg. Res.*, **29**, 422 (1980).
36. J. Entwistle, C. L. Hall, and E. A. Turley, *J. Cell Biochem.*, **61**, 569 (1996).