

폴리우레탄필름의 표면개질 및 그들의 항혈전성

°강 인 규, 서관호, 김우식, 김교한*

경북대학교 고분자공학과, *경북대학교 치과재료학교실

Surface Modification of Polyurethaneurea Films and Their Antithrombogenicity

Inn-Kyu Kang, Kwan-Ho Seo, Woo-Sik Kim, Kyo-Han Kim*

Dept. of Polymer Sci. and Dept. of*Dental Material, Kyungpook Natl. Univ.

1. 서론

의료용 고분자재료로서 기계적강도와 생체적합성이 비교 적은 polyurethane (PU)이 상용화되고 있다. 예를 들면 Biomer, Pellethane 등의 불균일 구조를 갖는 에테르형, Avocathane과 같은 실리온 공중합체, IPN (interpenetrating polymer network)구조인 Rimplast 등이 있다. PU는 유연하고 강하며 soft segment와 hard segment(구조가 공존하는 불균일한 성분리구조를 나타내어 다른 합성고분자보다 우수한 항혈전성을 가지고 있다. PU는 macroglycol, diisocyanate, chain extender인 지분자량의 diol 또는 diamine의 세가지 성분으로 구성된다. Macroglycol류에는 polyester형 diol과 polyether형 diol, polycarbonate형 diol 등 다양하다. Macroglycol은 PU의 soft segment 구조를 야기시키며 유연한 성질을 나타내게 한다. Isocyanate류에는 methylene diisocyanate가 주로 쓰이는데, 이 부분은 PU의 hard segment 구조를 이루며 우레탄기 사이의 수소결합과 같은 상호작용에 의해 NH기가 diol의 산소와 수소결합을 할 수 있어 일부 hard segment가 soft segment로 끼어 들어가 가교역할을 하여 고무적인 성질을 나타낸다. Chain extender에는 diol인 경우와 diamine인 경우가 있는데 이들은 서로 다른 성질의 PU를 이루며 diamine이 diol보다 상 분리 정도를 증가시킨다. PU가 인공장기용재료로써 사용되기 위해서는 생체적합성을 갖어야 하는데, 생체적합성은 혈액적합성과 조직적합성으로 나누어 생각할 수 있다. 혈액이 외부 물질과 접촉하면 혈액중의 혈소판이나 혈장중의 여러 응고인자가 복잡한 경로를 거쳐서 응혈을 일으킨다. 이러한 응혈을 억제하는 성질을 혈액적합성 또는 항혈전성이라 한다. 고분자가 혈액적합성을 가지기 위해서는 실리온과 같은 소수성을 가지거나 게로표면이 고도의 친수성을 갖어야 한다는 보고가 있다. 그리고 혈액은 일반적으로 약한 음전하를 띠며 따라서 음전하를 고분자표면에 도입하여 혈액적합성을 가지게 하는 연구도 보고되고, 소수성과 친수성의 균형이 혈액적합성에 중요

하다는 보고도 있다. PU 표면과 같이 불균질구조를 가지거나 표면에너지가 작은 구조를 가지면 약한 음전하를 띠며 따라서 음전하를 고분자표면에 도입하여 혈액적합성을 가지게 하는 연구도 보고 되고 있고, 소수성과 친수성의 균형이 혈액적합성에 중요하다는 보고도 있다. PU 표면과 같이 불균질구조를 가지거나 표면에너지가 작은 구조를 가지면 항혈전성이 높아진다는 연구도 있다.

PU의 생체적합성을 향상시키기 위해 생리활성물질을 도입하는 여러가지 연구가 행해지고 있다. 특히 혈액의 응고를 막기 위해서 생리적 항응혈성 물질로서 알려진 heparin, urokinase, prostaglandin, antithrombin, albumin 등을 고정화시키는 연구가 주목되고 있다. 예를 들면 heparin을 고정화한 고분자막은 우수한 항혈전성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. heparin의 항응혈효과는 heparin이 혈장단백질인 antithrombin III (ATIII)와 결합함으로써 혈액응고인자들 및 표면에 대한 ATIII의 비활성화를 증가시킴으로써 표면에 의한 피브리노겐으로부터 피브린의 생성을 억제하여 응혈을 막을 수 있다. 본 연구에서는 radio frequency glow discharge (RFGD)를 형성시키고 이들을 개시점으로하여 아크릴산을 그라프트중합 시켰다. 그라프트된 아크릴산의 카복시기를 이용하여 알부민 및 heparin을 고정화 하였으며, 이들 생리활성물질을 고정화한 폴리우레탄 필름의 in vitro 항혈전성을 조사하였다.

2. 실험

PU필름의 산소플라즈마 처리 및 아크릴산 그라프트화

Polytetramethylene glycol (PTMG, M.W:100), 4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI) 그리고 케인산염으로서 ethylene diamine을 사용하여 Polyetherurethaneurea (PU)를 합성 하였다. PU 10g을 DMF 100ml에 녹여 6.5 x 6.5cm의 유리 판에 유전시킨 후 적외선 램프하 (60-70°C)에서 대부분의 용매

를 중발시켰다. 유리판을 증류수에 담근 후 필름을 분리하여 60°C 이하의 진공건조기에서 24시간 건조시켜 실험에 사용하였다. 필름의 표면개질을 위해 Fig. 1에 나타내는 바와 같이 한 쌍의 방전전극이 부착된 chamber, 상충부의 전극이 Impedance matching circuit와 13.56MHz RF 발생기에 연결된 상충부의 전극 그리고 접지된 하충부의 전극으로 구성된 플라즈마반응 장치를 이용하였다. PU 필름을 chamber에 넣고 0.2 Torr, 120 Watt 에서 30 sec 동안 O₂ plasma 처리한 후 꺼내어 공기 중에 1시간 이상 방치하였다. 이것을 10Wt % 아크릴산 수용액에 넣어 60°C에서 90분간 반응하여 PU필름 표면에 아크릴산을 그라프트시켰다. 이것을 1% Triton X-100 수용액에 넣어 30분간 초음파 세척하고, 다시 증류수로 30분간 세척하였다. PU표면에 그라프트된 아크릴산의 농도는 rhodamine 6GX를 사용하는 dye-interaction 법으로 하였다.

Albumin 및 Heparin 고정화

AA-grafted PU의 카르복시기를 water soluble carbodiimide (WSC)로 활성화한 후 알부민 및 heparin을 고정화하였다. AA-grafted PU (6.5 x 6.5cm)를 pH3의 0.1wt % WSC 수용액에 담구어 30분 동안 4°C에서 방치하여 표면의 카르복시기를 활성화하였다. 그 후 알부민 3mg을 PU 필름이 들어 있는 용액에 넣어 4°C에서 24시간 동안 방치하였다. 반응후필름을 꺼내 0.1% triton X-100 수용액에 넣어 10분간 초음파처리를 하였다. 필름을 다시 증류에 담구어 5분간 초음파 처리를 하여 진공데시케이터에서 24시간 건조하였다. 헤파린의 고정화 반응은 pH 4.7에서 반응을 행한 것 이외는 알부민과 같은 조건에서 하였다. PU필름 표면에 고정화된 알부민의 정량은 색소결합법을 이용하였다. 즉 기저농도의 알부민을 coomassie brilliant blue와 반응시켜 원심한 후 상층액의 486nm에서의 흡광도와 알부민농도의 관계를 검정곡선으로 사용하였다. Albumin-immobilized PU를 C.B.B 액에 침적시켜 반응시킨 후 C.B.B 액의 흡광도 감소로부터 단백질의 농도를 산출하였다. PU표면에 고정화된 헤파린을 정량하기 위해 0.01N HCl용액 500ml에 toluidine blue 25mg과 NaCl 0.2% (1g)을 넣어서 0.005% toluidine blue용액을 제조하였다. Heparin 2mg을 0.2% NaCl수용액 50ml에 녹였다. Toluidine blue 용액 3ml에 헤파린액을 적절히 섞어 반응하였다. 30분 후 n-hexane 3ml를 상기 용액에 섞었다. 핵산층을 분리하고 나머지 여액 (0.8ml)을 메탄올 2ml와 섞어서 631nm에서 UV흡수를 측정하여 검정곡선을 작성하였다. 필름표면에 고정화된 헤파린을 정량하기 위해 헤파린을 고정화한 PU필름을 직경 1cm의 원형으로 잘라 toluidine blue 용액 3ml와 0.2% NaCl수용액 2ml를 섞은 용액에 30분 동안 담구어 두었다. 그후 여액 8ml를 취하여 무수메탄올 2ml와 혼합하여 631nm에서의 흡광도를 측정하고 검정곡선으로부터 고정화된 heparin의 양을 결정하였다.

표면 분석

표면개질한 필름의 분석은 FT-ATR-IR (Midac FT-IR, ZnSe crystal), ESCA (ESCALAB MKII, VG Scientific Co. UK) 및 Contact angle goniometer (model 100-1, Ramo-Hart, Inc., USA)을 이용하여 행하였다.

Thrombus formation

건강한 청년의 정맥에서 채취한 혈액 (30ml)에 항응고제인 ACD (citric acid + sodium citrate + dextrose) 용액을 3ml 넣고 평가하고자 하는 표면처리된 PU필름 (3 x 3cm)를 만듯이 붙인 시계침시에 혈액 (200ml)를 주입하고 0.1M CaCl₂ 50ml를 첨가하여 혈액응고 반응을 정지시키고 응고된 혈전을 스포츠타를 사용하여 분리하고, 분리된 혈전을 포르말린 수용액에 10분간 담구어 혈전의 고정화 (가교반응)를 행하였다. 이렇게 얻어진 혈전을 진공데시케이터에서 건조하여 그 무게를 측정하였다. 생성된 혈전의 무게가 작을수록 항혈전성이 강함을 의미한다.

Plasma recalcification time (PRT)

0.025M CaCl₂ 수용액을 10% 함유하는 human blood을 4°C에서 2000rpm으로 20분간 원심분리하여 platelet-rich-plasma (PRP)를 얻었다. 내경 4cm 높이 1.5 cm 의 시계침시에 샘플필름 (3 x 3cm)을 부착하고, 증류수 2ml를 넣어 1시간동안 표면을 팽윤시켰다. 그 후 팽윤된 필름이 부착된 시계침시를 37°C의 항온조에 넣었다. 혈장단백질 300ml를 필름위에 접촉시키고, 0.025M 칼슘 용액 300ml를 첨가한 후 곧 초시계를 작동하였다. 필름위의 혈장을 실리온이 코팅된 가는 침사로 3초마다 한번씩 밑에서 위로 들어올려 피브린이 석출된 때까지의 시간을 측정하였다. 위의 실험을 3회 반복하여 행하고 그들의 평균값을 PRT로 하였다.

Activated partial thromboplastin time (APTT)

2000 rpm에서 10분간 원심하여 PRP를 얻고 이것을 다시 5000rpm으로 10분간 원심하여 혈장을 얻었다. 혈장은 4°C에서 보관하여 30분 이내에 실험에 사용하였다. 30분간 증류수에 담구어 preswelling시킨 필름 (3 x 3cm)을 유리반구에 접촉시키고, 그위에 혈장 100ml 및 APTT시약 0.1ml를 가하여 섞고 5분간 방치하였다. 0.025M 염화칼슘 수용액 0.1ml를 다시 첨가한 후 초시계를 작동하여 혈장의 응고시간을 측정하였다. 실리온 코팅된 침사로 1초에 2회씩 위아래로 움직여 혈장의 응고를 관찰하였다. 단백질의 응고기 생기는 동시에 초시계를 멈추고 그때 까지의 시간을 측정하여 APTT으로 사용하였다.

Platelet adhesion

37°C의 항온조에 preswelling시킨 PU film을 유리반고 PRP 100ml를 접촉시켰다. 30분이 경과한 후 PBS 6.7ml를 도입하여

1분간 정치하였다. 0.1% glutaraldehyde 완충용액에 필름을 침지시켜 침착 혈소판을 고정시켰다. 그리고 50, 60, 70, 100% 에탄올 증류수 혼합액에 1분씩 담구어 탈수를 한 후 상온에서 24시간 건조하였다. 시료 표면을 gold coating하여 주사형전자현미경 (SEM)으로 각 시료 표면에 침착된 혈소판의 형태를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

폴리우레탄막에의 생리활성물질의 고정화

Poly(tetramethylene glycol) (M_n : 1000, PTMG)과 4,4'-diphenyl methanediisocyanate (MDI)를 반응시켜 prepolymer를 합성하고 에틸렌디아민을 해연장제로 하여 폴리 에테르우레탄우레아 (PU)를 합성하였다. MDI/PTMG를 1.3으로 하여 반응한 PU가 가장 큰 수평균분자량 (8만)과 가장 높은 Mw/Mn (1.7)을 나타내었다. 최적조건 (120 Watt, 0.2 torr)에서 PU 필름에 대한 O_2 plasma의 조사시간을 바꾸면서 표면처리를 행하고 공기 중에 10분간 방치한 후 표면의 과산화물을 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 정량한 결과 30초 조사했을 때 가장 많은 과산화물 (2.4 nmol/cm^2)이 형성되었다. 또한 상기에서 처리된 PU 표면에 아크릴산 (AA)을 그래프트결합 했을 때 $1.7 \mu\text{mol/cm}^2$ 의 농도로 AA가 그래프트되었다. AA가 그래프트된 PU (PU-COOH)를 WSC로 활성화한 후 헤파린 및 알부민을 반응시켰다. 헤파린이 고정화된 PU (PU-Heparin)의 FT-ATR-IR은 PU의 스펙트럼과 매우 유사하였고, PU-Albumin은 Amide I 피크가 새롭게 나타났다. ESCA survey scan spectra에서 PU-Albumin은 N-1S peak가 크게 증가하였으나 PU-Heparin은 큰 차이를 나타내지 않았다. ESCA carbon 1S core level scan spectra에서도 PU-Albumin은 NHC0에 기인하는 288 eV의 피크가 크게 나타났다. 생리활성물질을 고정화하고 세척할 때 증류수만으로 하는 경우와 계면활성제인 triton x-100을 사용하여 행한 경우 고정화량이 서로 다르게 나타났다. 이것은 증류수만으로는 물리적으로 흡착된 생체 고분자가 충분히 제거되지 않음을 의미한다. 헤파린의 최대 고정화량은 $1.5 \mu\text{g/cm}^2$ 이었고, 알부민의 최대량은 $1.8 \mu\text{g/cm}^2$ 이었다.

표면개질한 PU의 혈액저합성

표면개질된 PU를 혈액과 접촉시켰을 때 형성하는 혈전양을 조사한 결과, 접촉 후 15분까지는 혈전형성속도가 빨랐고, 그 후는 증가속도가 완만하였다. 또한 혈전양의 절대치를 비교하면 glass를 100으로 잡았을 때 PU는 80, PU-COOH는 90, PU-Albumin은 50, PU-Heparin은 30이었다. 혈정단백질에 의한

응고속도 (plasma recalcification time, PRT)를 조사한 결과에서는 PU-Heparin이 가장 긴 PRT를 나타내었다. 헤파린의 활성을 가늠할 수 있는 부분 활성 단백질 플라스틴 시기를 조사한 결과에서는 PU-Heparin (33 sec)가 PU-Albumin (24) 및 PU (26)보다 긴 시간을 나타내었다. 혈소판이 많이 들어 있는 혈장 (PRP)를 표면개질된 PU와 접촉시켰을 때 10분, 30분, 60분으로 접촉시간이 길어짐에 따라서 부착된 혈소판의 형태가 위쪽을 나타내기 시작하였다. 한편 30분간의 접촉시간에서 비교했을 때 PU-COOH 상에서 혈소판 정착수가 가장 많았고, 그 다음 PU가 많고 PU-Albumin 및 PU-Heparin에서는 비교적 정착된 혈소판수가 적었다. 탐식세포의 재료표면에 의한 활성화를 살펴보기 위해 표면개질한 PU 필름을 탐식세포액과 5시간 접촉시키고, 그 때 탐식세포로부터 방출된 cytokine (proteins)을 reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)법으로 행한 결과 interleukin-1 β (IL-1 β)의 생산은 PU-Heparin에서 가장 작았고, Tumor necrosis factor (TNF)도 PU-Heparin에서 가장 작았다. 그러나 interleukin-6 (IL-6)은 5시간의 접촉으로는 어느 거점에서도 방출되지 않았다.

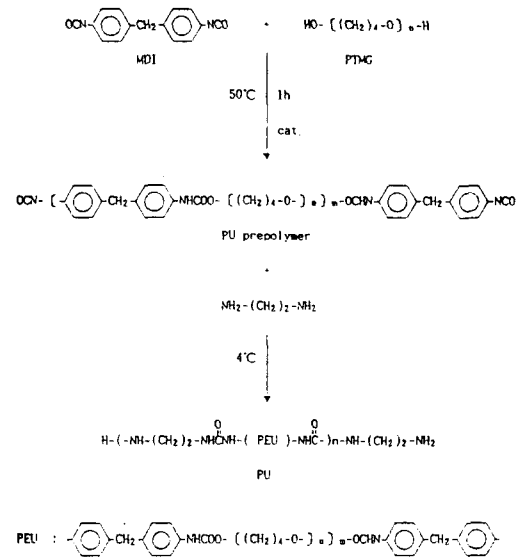


Fig. 1. Synthesis of polyetherurethaneurea (PU).

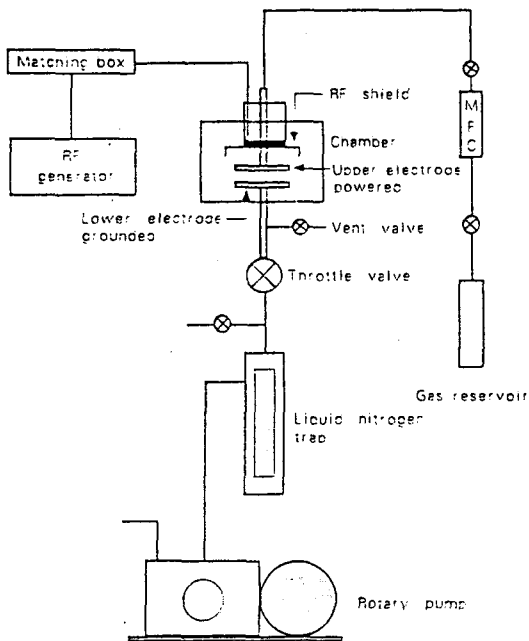


Fig. 2. Schematic diagram of oxygen plasma discharge apparatus.

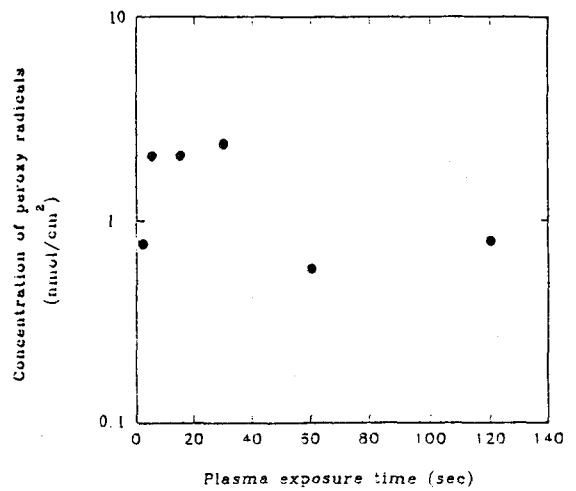


Fig. 3 Concentration of peroxide generated on the film surface as a function of exposure time of oxygen plasma. Plasma discharge condition : power = 120W, pressure = 0.2torr, flow rate of oxygen = 30scca.

Table 1 Concentration of carboxyl group immobilized on PU film with different pressure of reactor.

pressure (torr)	Peroxide generated on the surface of PU film (nmol/cm ²)	Acrylic acid grafted on the surface of PU film (μmol/cm ²)
0.1	0.9 ± 0.05	1.3 ± 0.05
0.2	2.4 ± 0.05	1.7 ± 0.05
0.5	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.05
1.0	0.1 ± 0.05	0.3 ± 0.05

exposure time : 30 sec, electric power : 120 Watt