

# 세포친화성 향상을 위한 3차원 다공성 지지체 제작과 히알루론산을 이용한 표면개질

## Fabrication of Three Dimensional Porous Scaffold and Surface Modification by Hyaluronic Acid for Promoting Cytocompatibility

\*박석희<sup>1</sup>, #양동열<sup>1</sup>, 김택경<sup>2</sup>, 박태관<sup>2</sup>

\*S. H. Park<sup>1</sup>, #D. Y. Yang(dyayang@kaist.ac.kr)<sup>1</sup>, T. G. Kim<sup>2</sup>, T. G. Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 한국과학기술원 기계항공시스템학부, <sup>2</sup> 한국과학기술원 생명과학과

Key words : scaffold, PCL, hyaluronic acid, cytocompatibility

### 1. 서론

조직공학 (Tissue Engineering)은 해부학적 또는 조직학적으로 인공조직 또는 장기를 제작하는 것을 시작으로 연구되어 왔다. 지속적인 연구 결과로 인공피부 및 여러 분야에서 조직공학을 이용하여 임상에 적용하려는 노력이 이어져 왔으며, 최근에는 파손된 신체 조직이나 기관 등을 복구, 재생하는 기술로서 생분해성 인공지지체를 이용한 연구가 중점적으로 이루어지고 있다. 조직공학에 사용되는 생분해성 고분자 지지체는 손상된 조직 및 기관에 적용될 세포가 지지체의 내부 또는 표면에 부착, 배양되어 왕성하게 활성화시킬 수 있어야 하며, 체내에 이식된 후에도 적용된 주변조직과 면역학적 거부반응이 없어야 한다. 또한 일정 기간이 지난 후 체내에 안전하게 흡수, 분해되어 이 물질이 남지 않아야 하며 손상된 조직을 대체할 충분한 기계적 물성을 갖추어야 한다.\*

이와 같은 고분자 지지체를 제작하는 데에 있어 사용되는 재료는 생체와 상호작용 시 앞서 기술된 조건을 갖춘 생체 적합성 재료이어야 한다. 생체적합성 (biocompatibility)은 재료의 표면 특성 측면에서 혈액과 접촉시 혈전을 최소화할 수 있는 혈액적합성(blood compatibility)과 생체 조직과 접촉하여 주변 조직을 괴사시키지 않고 친화성을 이루는 조직적합성 (tissue compatibility)으로 나눌 수 있다. 이러한 조건을 만족하는 생체적합성 고분자로는 체내에서 분해되는 특성에 따라 분해성 고분자와 비분해성 고분자가 있으며 지지체의 재료로 사용되는 분해성 고분자로는 폴리카프로락톤 (polycaprolactone, PCL)과 지방족 폴리에스테르 계열의 폴리락틱산 (polylactic acid, PLA), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid, PGA) 및 이들의 공중합체 [poly(lactid-co-glycolid), PLGA] 등이 있다. 폴리카프로락톤은 결정성을 띠는 생분해성 고분자로서, 다른 분해성 고분자에 비해 월등히 낮은 Tg (-60°C), Tm (55-60°C) 값을 가지며 다른 고분자 재료와 혼합이 수월하고 가공성이 뛰어나 조직공학용 지지체 등의 생체재료로서 많은 응용 연구가 진행되고 있다. 폴리카프로락톤의 경우 분자 구조상 에스테르 그룹 (-COO-)을 다량 포함하고 있기 때문에 아미노 그룹 (-CONH-)의 형성이 용이하다. 아미노 그룹은 조직공학적으로 독성이 없고 세포적합성이 우수하며 표면의 친수성을 향상시킬 수 있다. 또한 콜라겐, 젤라틴, RGD 펩타이드 등의 생체 적합성이 우수한 물질을 용이하게 표면에 고정화할 수 있는 특성을 지니고 있다. 히알루론산 (Hyaluronic acid, HA)은 동물의 생체 조직에서 발견되는 점액 다당류로서 세포외기질을 구성하는 주요 물질이다. 히알루론산의 점탄성 및 우수한 수분 보유 능력과 생분해성을 활용하여 의공학 및 조직공학에 널리 연구되어 사용되고 있다. 그러나 조직공학용 지지체로 이용하기에는 취약한 기계적 성질과 제조 공정상 손실률이 높아 다른 고분자와의 결합을 통하여 활용하려는 노력이 이루어지고 있다.<sup>2</sup>

현재까지 활용되고 있는 고분자 지지체의 제조방법으로는 염 추출법(particulate leaching), 상분리법(Phase separation), 이산화탄소를 이용한 고압기체 팽창법(High pressure gas

saturation), 유화동결 건조법(Emulsion freeze drying), 섬유 압착법(fiber bonding) 등이 있다. 최근에는 3차원 형상 조형 기술인 쾌속조형 (Rapid Prototyping, RP) 기술이 발전함에 따라 원하는 자유 형상이나 지지체의 공극 크기, 모양, 내부 연결성 등을 조절 할 수 있는 방법으로서 새로운 지지체 제조 방법들이 연구되고 있다. 앞서 언급된 방식과는 달리 CAD/CAM 기반의 쾌속조형 기술을 응용한 사례로서 Giordano 등은 가루 형태의 PLA 와 PLGA 에 원하는 단면으로 유기 용매를 분사하여 적층하는 방식인 3DP(three dimensional printing) 방법으로 제작하였다. Giovanni 등은 PDMS 몰드를 리소그래피 방식으로 제작한 후 PLGA 용액을 몰드에 주조하여 다공성 지지체를 제작하였으며 또한 생체폴리머 용액을 공기압으로 가는 노즐에 분사하는 방식으로 제작하였다. Landers 등은 실리콘 계열의 반응성있는 올리고머를 공기압을 이용하여 분사하고 가교하는 방식으로 제작하였다. Hutmacher 등은 FDM 방식을 이용하여 PCL 필라멘트를 고온으로 녹인 후 노즐에 분사하여 지지체를 제작하였다. Gianluca 등은 선택적으로 레이저를 조사하여 소결하는 방식으로 제작한 바 있다.<sup>3</sup>

본 연구에서는 쾌속 조형 기술 기반의 고분자 용융 용착 방법을 통하여 높은 공극률과 공극의 완전한 내부 연결성이 보장되는 3차원 지지체를 제작하였다. 또한 세포 배양시 세포친화성 및 증식 특성을 향상시킬 수 있도록 히알루론산을 표면에 고정화하고 광가교를 통해 하이드로젤을 형성하였다.

### 2. 고분자 용융 용착 공정

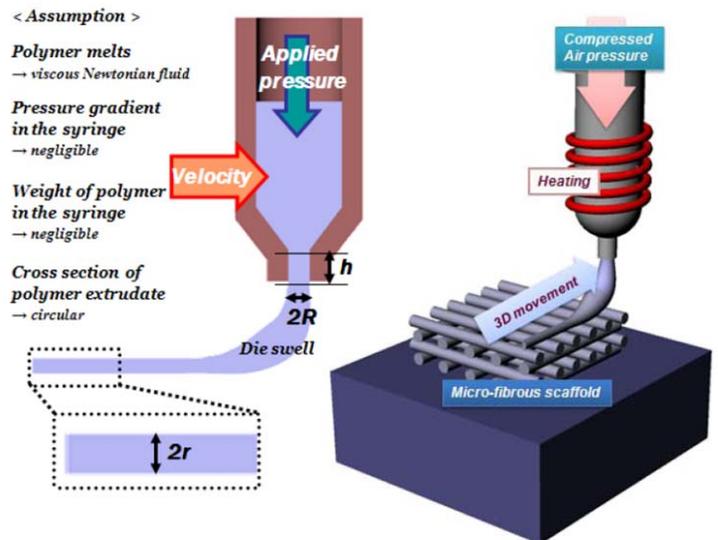


Fig. 1 Schematic diagram of the setup for the proposed process, referred to as Polymer Melts deposition. The system has controllable parameters of nozzle diameter, processing temperature, applied air pressure, and movement velocity of nozzle.

PCL 은 앞서 기술된 바와 같이 낮은 유리전이 온도 및 용융점을 가지며 온도 및 전단응력에 대해 점도 변화가 적으므로 용융을 통한 압출 가공에 유리하다. 또한 열분해가 일어나는 온도(350℃)가 높으므로 넓은 범위의 온도에서 가공이 가능하며 안정된 구조적 특징을 보인다. 이 재료를 통한 용융 용착 공정의 개념도는 Fig. 1 과 같다. 제작공정의 주요 요소로는 고분자 재료를 용융시켜 압출할 수 있는 열적용 시린지 유닛과 마이크로 노즐, 이를 3 축으로 제어 이송할 수 있는 인택싱 테이블, 그리고 재료를 정량으로 압출 할 수 있는 압력 디스펜서와 압축 공기 컴프레셔로 이루어져 있다. 마이크로 스케일의 직경을 갖는 노즐을 포함하는 열적용 시린지 내부에 생분해성 고분자를 넣어 용융시킨 후 일정 압력의 공압을 가하여 압출하고 이를 3 축 이송을 통해 원하는 형상을 제작한다. 3 차원 지지체 구조물 제작에 영향을 줄 수 있는 변수로는 Fig. 1 에서와 같이 재료를 포함한 시린지 온도와 시린지 내부에 가해지는 압력, 그리고 시린지의 이송 속도가 있다.

### 3. 지지체 표면의 하이드로젤 고정화

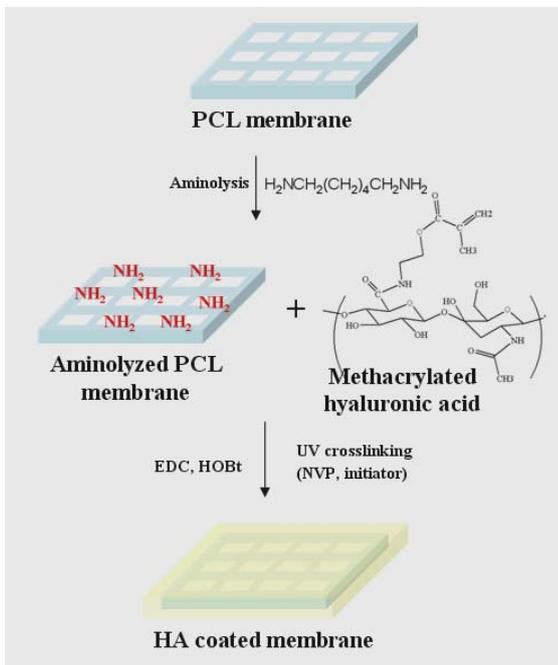


Fig. 2 Schematic diagram for immobilizing HA gel on the PCL membrane

PCL 고분자 지지체의 세포 활성화를 개선하기 위해 히알루론산 (hyaluronic acid)에 의한 표면개질화 방법을 제안하였다. 히알루론산의 도입 과정은 Fig. 2 와 같다.<sup>9</sup> 먼저 광가교를 위한 비닐기의 도입을 위해 히알루론산에 aminoethyl methacrylate (AEMA)를 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)와 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)를 사용하여 아마이드 결합을 형성시키고 이 반응을 통한 생성물인 methacrylated HA 는 1H-NMR 로 확인하였다. 1,6-diaminohexane 을 isopropanol 에 10 wt%로 녹이고 PCL 고분자 막을 용액에 침지시켜 1,6-diaminohexane 과 PCL 의 ester 기 간의 반응을 통하여 표면에 아민기를 도입하였다. 상기 aminolysis 과정에 의해 도입된 아민기를 fluorescamine 을 사용하여 정량 하고 표면에 최대의 아민기를 가지도록 반응 시간을 최적화 하였다. Aminolyzed PCL 고분자 막에 비닐 기가 도입된 히알루론산 (methacrylated HA)을 EDC 와 HOBt 를 사용하여 표면에

수식하였다. 히알루론산이 표면 고정화된 고분자 막을 다시 methacrylated HA 를 녹인 용액에 담근 후 여기에 단량체인 1-Vinyl-2-pyrrolidone 과 광개시제 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one 를 첨가하였다. 충분히 균일하게 섞어 준 후 고분자 막을 꺼내어 30 분 동안 양면에 365nm 파장의 UV 를 조사하여 광가교 시켰다.

상기 개발된 용융 용착 공정과 히알루론산 고정화를 통하여 Fig. 3 과 같은 하이브리드 생분해성 지지체를 제작하였다.

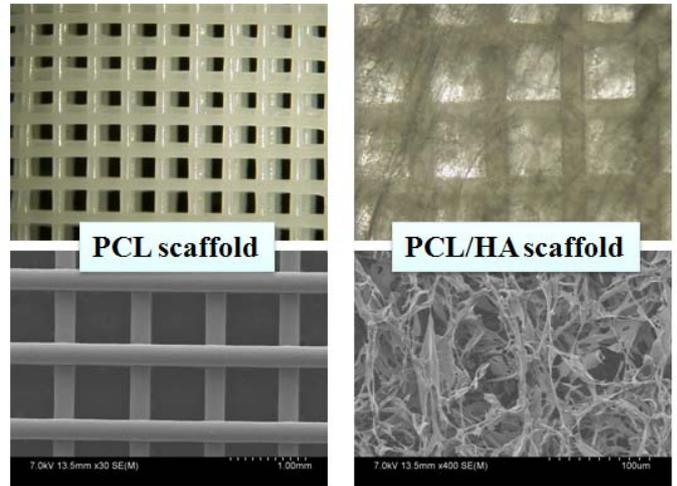


Fig. 3 PCL scaffold and PCL/Hyaluronic acid hybrid scaffold

### 4. 결론

쾌속조형의 개념을 기반으로 생분해성 고분자 용융 용착 방식의 시스템을 구현하였고, 이를 토대로 폴리카프로락톤을 활용하여 생분해성 지지체를 제작하였다. 여기에 세포 활성화 특성을 향상시키기 위해 아민기를 도입하고 히알루론산을 적용시켜 하이브리드형 지지체를 제작하였다. 향후에는 제작된 구조물의 특성 평가를 위하여 MTT 분석 및 세포 배양실험을 수행할 예정이다.

### 참고문헌

1. Thomson, R.C., Wake, M.C., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv Polym Sci*, 1995, 122, 245-274.
2. Zhu, Y., Gao, C., Liu, X. and Shen, J., "Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells," *Biomacromolecules*, Vol. 3, No. 6, pp. 1312-1319, 2002.
3. Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K.: Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissue and organs. *Biomaterials*, 2003, 24, 2363-2378.