

# Type I Atelocollagen의 가교형성비 분석

안수진\*·김요숙\*\*·서 활\*\*\*

= Abstract =

## Crosslinking Ratio Analysis of Type I Atelocollagen

Soo-Jin Ahn\*, Yo-Sook Kim\*\*, Hwal Suh\*\*\*

To utilize collagen as an implantable biomaterials, the most widely used bovine skin origin Type I collagen was investigated. Pepsin treated, Type I atelocollagen was extracted and crosslinked by the ultraviolet(UV) ray with wavelength of 254nm or by various concentrations of glutaraldehyde to produce collagen membranes. The crosslink rates of the specimens were observed by a polarized light microscope, a scanning electron microscope, and a Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer. The followings are concluded.

1. The collagen membranes produced by both 2.5% glutaraldehyde solution and 254nm UV ray irradiation demonstrated similar morphologies on polarized light microscopic and scanning electron microscopic views.
2. The chemical structures of the crosslinked membranes by glutaraldehyde over 2.5% in concentrations revealed similar intensities to that of the UV ray irradiated one in FT-IR investigation.
3. To obtain optimal crosslink in bovine skin origin Type I atelocollagen, 2.5% glutaraldehyde solution or UV ray irradiation with 254nm wavelength is acceptable.

**Key words :** Crosslink, Ultraviolet ray, Glutaraldehyde

## 서 론

교원섬유 (collagen)는 배발생 초기부터 나타나는 동물 몸 전체 단백질의 1/4이상을 차지하는 단백질이다. 교원섬유는 생물학적인 특성과 물리화학적 특성을 띠는 물질로써, 고도로 분화되어 다양한 몸의 구조를 형성하며, 척추동물의 뼈, 피부, 연골과 같은 대부분의 결합조직들을 형성하게 된다. 이들 각각의 조직들은 교원섬유의 주된 역할인 지지기능에 의해 대부분의 물리적인, 구조적인 형태를 형성 유지하게 된다. 또한 교원섬유는 세포외기질로써, 세포 접착성 기능을 가진 RGD(-Arg-Gly- Asp-)펩타이드 서열이 존재하고 있으므로, 세포들이 교원섬유에 부착한 상태로 성장하여 앞에서 말한 조직과 기관들의 형

태를 유지하는 기능을 하게 된다[1,2].

1950년대 이후 교원섬유에 대한 생물학적, 물리화학적, 생화학적인 연구가 시작되어 지금까지 다양한 조직들로부터 Type I에서 Type XI까지 10종류 이상 분리되었다. 이들 중 섬유의 형태를 하고 있는 Type I, II, III collagen은 조직들에 형태를 부여할 뿐만 아니라 적용된 힘등에 반응하여 조직들의 변형을 제한한다. 교원섬유는 섬유성 단백질로서 3개의 폴리펩타이드사슬( $\alpha$ -사슬)들이 결합하여 교원섬유 분자 형성에 관여한다. 유전적으로 다른 특징이 있는 각각의 사슬들은 아미노산의 구성과 서열은 다르나, 1차서열들은 연관성이 매우 높다. 여기에 더해 collagen의 낮은 항원성 때문에 Type I collagen은 많은 생체고분자에 의해 형성되어진 인공장기들의 구조 요소로

\*한국과학기술연구원 의과학연구소센터,

\*Department of Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology,

\*\*가톨릭대학교 자연과학대학 생물학과,

\*\*Department of Biology, College of Natural Science, Catholic University of Korea,

\*\*\*연세대학교 의과대학 의용공학 교실

\*\*\*Department of Medical Engineering, Yonsei University, College of Medicine

통신저자 : 서 활, (120-140) 연세대학교 의과대학 의용공학교실 Tel. 361-5406, Fax. 363-9923

이용되어진다. 각각의  $\alpha$ -사슬은 아미노산이 나선형으로 배열되어진 형태이다. 사슬 길이의 96%가 나선형이며, 비나선형인 텔로펩타이드들은 N말단과 C말단에 존재한다.

교원섬유는 주로 섬유아세포 내에서 합성되어 세포 외로 분비되어, 4D-stagger 라고 불리는 규칙적인 배열을 이루면서 섬유화과정을 거쳐 세포외기질로서 역할을 하게 된다. 이때 나선을 형성하지 못한, 교원섬유분자 양쪽 말단부위에 가교가 형성되어 안정화 되어지며, 이 섬유들의 가교형성 정도가 조직이나 기관의 장력과 안정성을 좌우하게 된다[3]. *In vivo*에서는 동물의 성장에 따라, 교원섬유 분자들이 조직이나 기관들 구성시에 요구되는 높은 인장강도(tensile strength)나 단백질분해에 저항성과 같은 기능의 유지와 안정성을 높여주기 위해 가교형성 과정이 뒤따르게 되어[2,4,5,6,7], 기관이나 장기의 구조적 안정성을 이루게 된다.

*In vitro*에서는 생체 조직으로부터 교원섬유를 추출하여 체내이식용 인공장기를 구성하는 생체재료로서 사용하기 위해, 재생되는 조직에 대하여 알맞는 인장강도와 단백질 분해에 저항성의 조절이 요구되어져 왔으며, 이를 위해, *in vivo* 에서의 교원섬유의 지지기능을 강화시켜주는 가교형성 과정을 응용한 가교형성 방법인 이온결합, 공유결합, 수소결합 형성, 그리고, 다른 재료들과 혼합등 많은 연구가 진행되어왔다.

*In vitro*에서의 가교는 다음과 같은 화학시료나 빛 에너지 등에 의해 형성되어진다. 화학물질인 formaldehyde, glutaraldehyde, carbodiimide, acyl azide, isocyanate, borohydride, epoxy, polyanions[8,9,10,11,12,13,14] 등이나 빛에너지인 자외선, 감마선[15,16,17] 등을 처리하여, 가교를 형성하여 필요한 정도에 따라 인장강도와 생분해 비율을 조절 할 때 이용되는 것을 볼 수 있다. 화학물질로서는 가교형성력이 우수한 glutaraldehyde를 사용하나, 체내에 이식한 경우 발생되어지는 세포독성(cytotoxicity), 석회화(calcification), 생체적합성(biocompatibility)면에서 문제점이 제기되어, 이런 점들을 개선하기 위해 다른 화학물질들이나 물리적인 방법들에 관한 연구가 한창 진행 중이다[18,19]. 지금까지 알려진 물리적 방법중 인장강도 측정, 팽창도, 세포독성실험 등에 의해 증명되어진 자외선 조사방법은 가교형성시 가장 효과적이고, 생체적합성이 뛰어난 방법이며, 이에 대해 여러 분야에서 연구가 한창 진행 중이다 [20,21,22,23,24].

본 실험은 telopeptide를 제거하여 일단 분자단위로 분해시킨 교원섬유를 재가교화하여 생체조직으로 사용하기 위한 체내 이식 전단계 실험으로 장기들의 요구조건에 맞는 물리적인 조건을 시험하기 위한 단계이고, Type I collagen의 동일성 등을 고려하여 bovine skin 으로부터

추출한 Type I collagen을 사용하여 막의 형태로 재구성하여 사용하기 위해 *in vitro*에서 광조사 방법인 254nm의 자외선을 조사하여 가교를 형성하고, 화학적인 방법으로는 glutaraldehyde를 처리하여 가교를 형성하여, 가교형성정도를 막의 표면형상과 화학구조의 변화로 비교, 분석하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 광조사방법에 의한 가교형성 및 인장강도와 교원섬유 분해정도 측정 및 분석

Bovine skin에서 추출한 Type I collagen(Sigma Chemicals Co.,MO U.S.A)을 단백질분해효소인 pepsin이 첨가된 0.001N HCl(Deuksan Co., Korea)용액에 용해시켜 1% atelocollagen (telopeptide 제거된 교원섬유) 용액을 만들고, 0.05N NaOH(Shinyopure Chemicals Co., Ltd, Osaka, Japan)용액으로 pH 7.4로 적정된 이 용액을 80(가로)×50(세로)×5(높이)mm인 아크릴 주형에 넣어 25℃의 BOD-인큐베이터(Changshin Scientific Co., Korea)에서 건조하여 막을 형성하였다(Fig. 1). 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간동안 4℃조건에서 파장 길이 254nm의 자외선을 사방 15cm 거리에서 조사하여 가교를 형성하였다. 각각의 시간별로 가교가 형성된 교원섬유막의 인장강도들을 인장강도 측정기(Instron Model 8511, Instron Corp., U.S.A.)로 측정하여 ANOVA방법을 이용하여 통계처리하였다. 가교가 형성된 교원섬유막의 분해정도를 Neuman-Logan의 히드록시프롤린 분석법을 응용, 측정하여 가교형성정도를 비교하였다. 각 시간별 실험군은 4개의 시편을 사용하였다. 2ml의 용액 표본을 10, 20, 30, 40, 50unit/ml의 교원섬유분해효소(collagenase)를 포함하는 10ml의 0.05 N Trizma용액에 넣고 5, 10, 15, 30, 60분동안 37℃에서 인큐베이션한 후에 1ml의 에탄올을 넣어 교원섬유분해작용을 정지 시켰다. 상층액 1ml를 실험대상용액으로 사용하여 6N 염산 용액 0.2ml를 첨가한 후 24시간동안 110℃에서 가수분해하였다. 실험대상 용액에는 교원섬유분해효소에 의해 용해된 교원섬유로부터 용출된 hydroxyproline을 포함하고 있어, 그 양을 자외선 분광기 (UV-150-02, Shimadzu, Co, Koyto, Japan)에서 560nm의 파장을 사용하여 분석하였다. 표준시약으로 20 $\mu$ g/ml의 hydroxyproline을 이용하였다.

### 2. 화학적인 방법에 의해 가교형성

광조사방법에서 사용한 아크릴 주형 대신에 유리 페트리디쉬(직경 200mm)를 사용하여 광조사방법과 유사한

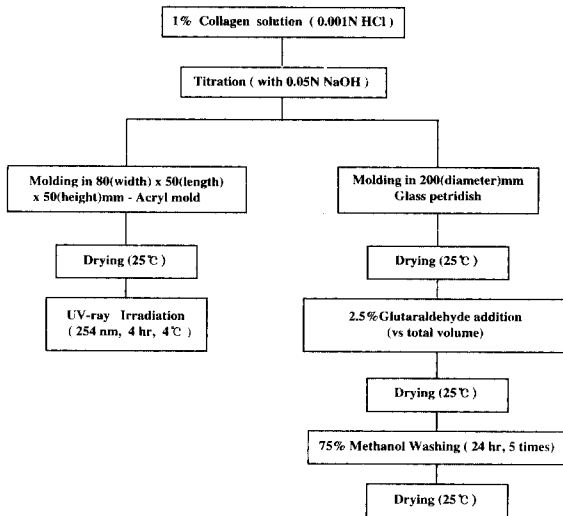


그림 1. 자외선과 글루타르알데하이드 처리 및 가교 형성  
Fig. 1. Crosslinking with UV-ray and glutaraldehyde

조건으로 막을 제조하였다. 제조한 막은 각각의 주형에 넣었던 교원섬유 용액 부피의 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10% 농도에 해당하는 glutaraldehyde(Junsei Chemical Co., Ltd, Japan)을 첨가하여 2시간동안 가교를 형성시킨 후, 25°C의 BOD-인큐베이터 (Changshin Scientific Co., Korea)에서 건조시켰다. 화학적 가교를 한 이들 시편으로부터 glutaraldehyde 잔여기들을 제거하기 위해 75% 메탄올로 24시간 동안 5회 씻어 준 다음, 다시 25°C의 BOD-인큐베이터에서 건조시켰다. 시편들의 평균 두께는 25 $\mu$ m였다(Fig. 1).

### 3. 막의 가교 형성정도에 대한 편광현미경과 주사현미경 관찰

254nm의 자외선을 4시간 조사시켜 가교를 형성한 막과 화학적인 방법인 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10% 농도에 해당하는 glutaraldehyde를 첨가하여 가교를 형성한 막들을 편광현미경(Nikon, Japan) 및 주사현미경(S-2460 Hitachi Co., Japan) 상을 통해 이 막들의 밀도를 관찰함으로써 가교형성정도를 비교, 분석하였다. 대조군으로는 25°C에서 건조만 시킨 막을 사용하였다.

### 4. 적외선 분광기를 이용한 막의 화학구조의 관찰 및 분석

적외선분광기(FT/IR FTS-60, BIO-RAD, U.S.A.)을 이용하여, 각각 자외선과 glutaraldehyde를 첨가하여 가교를 형성한 막들 및 대조군들의 투과도를 파장수가 3330cm<sup>-1</sup>인 아민기(N-H), 2880cm<sup>-1</sup>인 알라히드기(C-H) 및 1600cm<sup>-1</sup>인 카르복실기(CO)에서 측정하여, 재가교

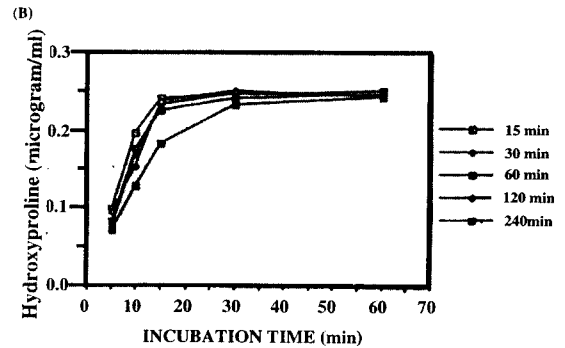
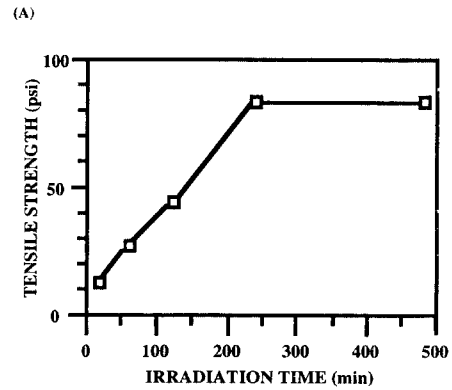


그림 2. 교원섬유의 인장강도와 교원섬유 분해도: \*UV:자외선:(A)자외선을 조사한 교원섬유의 인장강도, (B)자외선을 조사한 교원섬유 분해 후 hydroxyproline의 양  
Fig. 2. Tensile strength and collagenolysis of collagen membrane: \*UV:ultraviolet:(A)Tensile strength of the UV-ray irradiated collagens, (B)Derived hydroxyproline amount after collagenolysisof the UV-ray irradiated collagens

화한 막의 화학구조를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 광조사방법에 의한 가교형성 및 인장강도와 교원섬유 분해정도 측정 및 분석

각 시간별 자외선 조사에 의해 가교형성된 막의 가교형성정도를 분석하기 위해 인장강도와 교원섬유분해 정도를 측정 비교하였다(Fig. 2).

Fig. 2-(A)는 조사시간에 따른 인장강도의 변화를 통계처리한 그래프이다. 4시간동안 조사한 경우 가장 높은 인장강도를 나타내며, 4시간이상 조사한 경우 인장강도의 변화가 없었다.

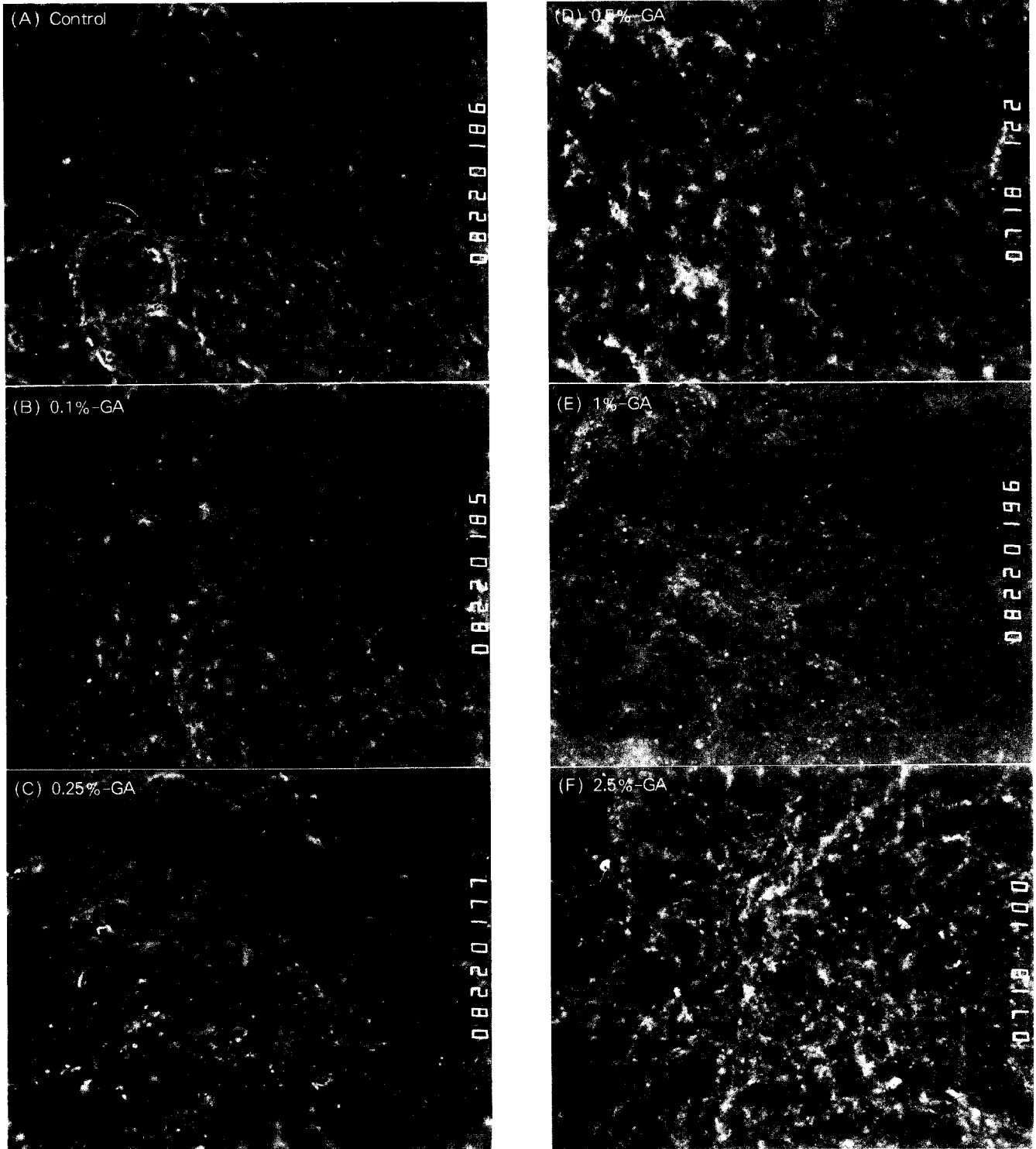
Fig. 2-(B)는 조사시간에 따른 교원섬유분해정도를 Neuman-Logan의 분석법에 의해 측정된 결과로써, 4시간동안 조사한 경우가 교원섬유로부터 교원섬유분해효소에 의해 용출되어진 hydroxyproline의 양이 가장 작은 변

화를 제시하고 있다.

## 2. 막의 가교 형성정도에 대한 편광현미경 관찰

각각의 방법으로 가교화한 교원섬유막을 편광현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다(Fig. 3).

Fig. 3에서 (A) CONTROL, (B) 0.1%, (C) 0.25%, (D) 0.5%, (E) 1%, (F) 2.5%, (G) 5%, (H) 10%의 glutaraldehyde을 농도별로 교원섬유로 형성된 인공막에 2일동안 처리하여 가교를 형성시킨 정도를, 그리고 (I)는 254nm 자외선을 4시간동안 조사하여 가교를 형성 시킨



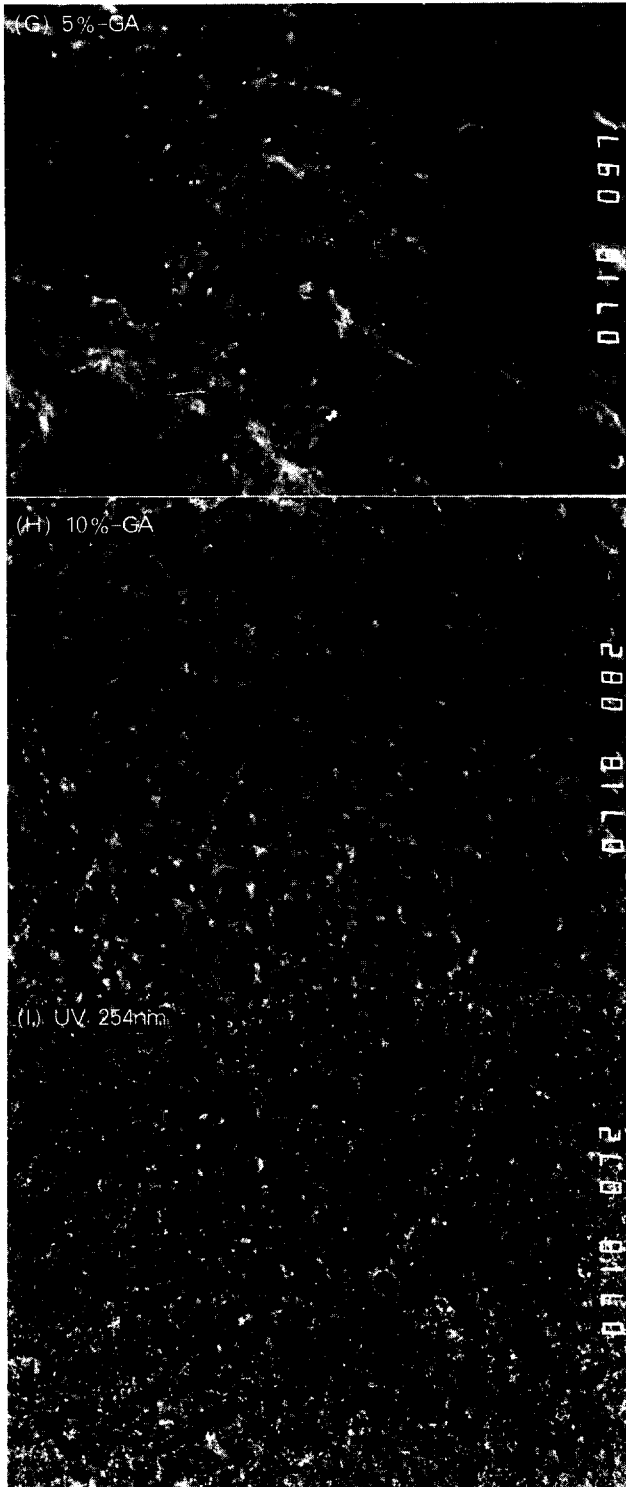


그림 3. 광조사방법과 화학적 방법으로 가교형성한 교원섬유막의 표면상을 편광현미경으로 관찰  $\times 400$  \*GA:글루타르알데하이드, UV:자외선;(A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10%-GA, (I)UV254nm

Fig. 1. Observation of crosslinked membrane surface morphology by light irradiation and chemical method with pola-

rized light microscope  $\times 400$  \*GA:글루타르알데하이드, UV: 자외선;(A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10%-GA, (I) UV254nm

정도를 관찰한 것이다.

Fig. 3의 (B)에서 (H)까지 glutaraldehyde의 농도가 점차 증가함에 따라 가교형성의 정도도 점차적으로 증가 되어 막이 치밀해지는 정도를 구분해서 관찰할 수 있다. Fig. 3에서 (B)와 (C)의 관찰상은 대조군인 (A)와 거의 비슷하며, 농도가 2.5%인 glutaraldehyde 용액으로 가교를 형성시킨 (F)와 자외선으로 가교를 형성시킨 (I)의 막의 치밀정도가 유사한 정도로 보아 가교정도가 비슷함을 알 수 있다.

### 3. 막의 가교 형성정도에 대한 주사현미경 관찰

Fig. 4는 [2]와 같은 시편들을 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 사진이다.

각각 막들의 구조적 변화를 표면형상을 비교해 보면 대조군인 (A)는 표면이 매우 정글며 (B) 0.1%, (C) 0.25%, (D) 0.5%, (E) 1%, (F) 2.5%, (G) 5%, (H)10% 등은 glutaraldehyde을 농도별로 교원섬유로 형성된 인공막에 처리하여 가교를 형성시킨 정도를, (I)는 254nm 자외선을 4시간동안 조사하여 가교를 형성시킨 정도를 관찰한 것이다. (B)에서 (H)까지 가교형성 물질인 glutaraldehyde의 농도가 증가하면 막의 표면형상도 치밀해지는 것을 볼 수 있다. 0.1% glutaraldehyde을 처리한 (B)에서 부터 가교가 형성 초기를 나타내어 대조군에 비해 현저한 차이를 보이며, (C)에서 부터 막의 표면이 가교가 형성되면서 수축(shrinkage)되기 시작한다. (D)에서는 좀더 수축되고, 가교가 많이 형성되어 막이 치밀하다. (E)는 (D)보다 가교가 많이 형성되어지고, 결정화되어지고, (F) 2.5%의 glutaraldehyde 농도에서 형성된 막의 가교들은 안정화된 상태이다. (G)는 (F)에서 다시 가교형성이 진행된 상태이고, (H)는 가교가 과잉 형성된 상태이다. 한편, 광조사 방법으로 가교를 형성시킨 (I)에서는 2.5% glutaraldehyde로 가교 형성한 막의 형상인 (F)와 유사함을 나타냈다.

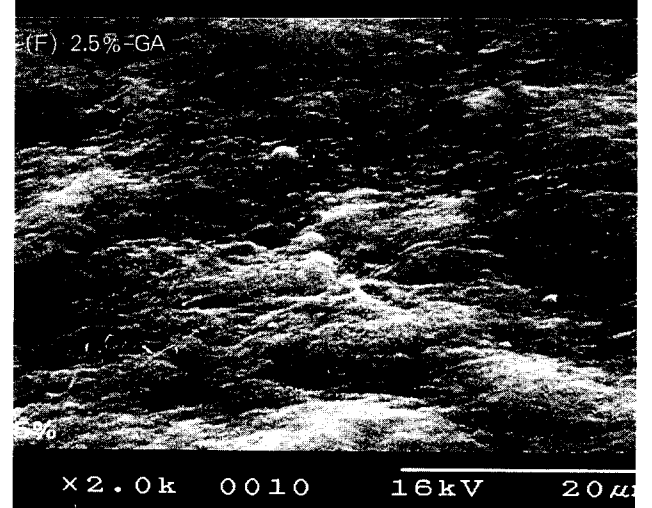
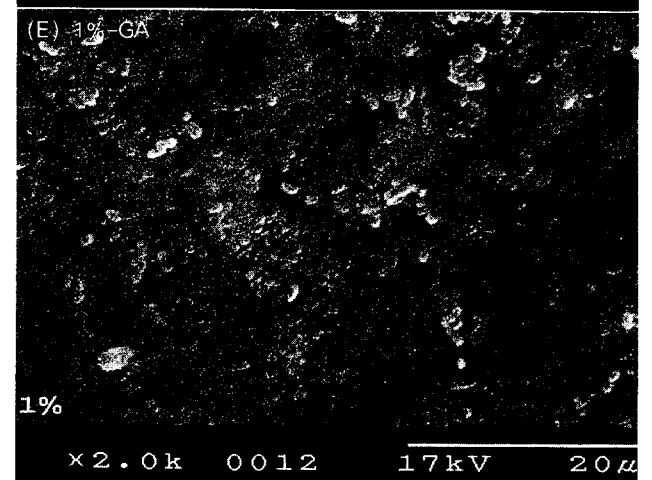
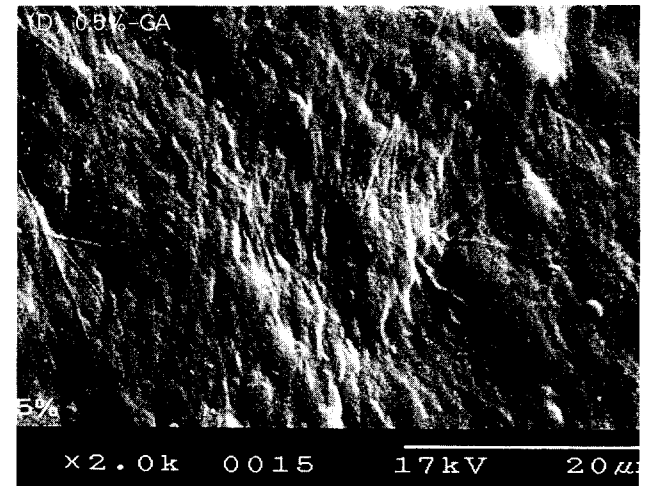
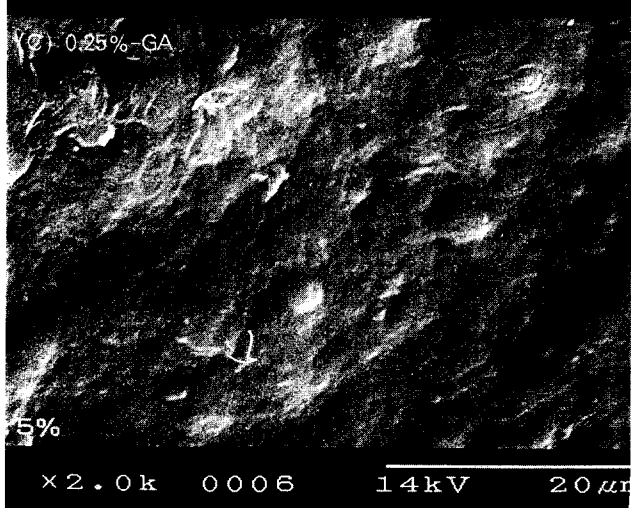
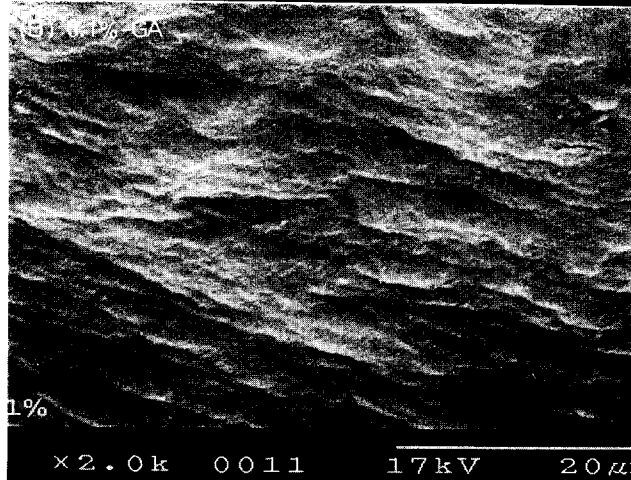
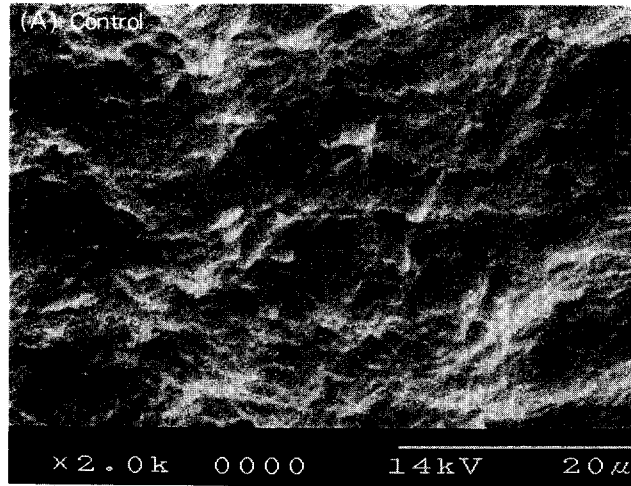
### 4. 적외선 분광기를 이용한 막의 화학구조의 관찰 및 분석

각 농도별로 glutaraldehyde 처리하여 가교를 형성시킨 막들과 물리적인 방법인 254nm의 자외선을 4시간 조사시켜 가교를 형성시킨 막과 25 에서 건조만 시킨 대조군들 막표면의 화학구조를 조사하기 위해, ATR-FT-IR을 이용하여 파장수가  $3330\text{cm}^{-1}$ 인 아민기(N-H),  $2880\text{cm}^{-1}$ 인 알데히드기(C-H) 및  $1600\text{cm}^{-1}$ 인 카르복실기(CO)

에서 투과도의 백분율을 조사하였다(Fig. 5).

Fig. 5는 (A) CONTROL, (B) 0.1%, (C) 0.25%, (D) 0.5%, (E) 1%, (F) 2.5%, (G) 5%, (H) 10%의 glutaraldehyde를 농도별로 교원섬유로 형성된 인공막, (I)는 254nm 자외선을 4시간동안 조사하여 가교를 형성

막의 적외선 분광스펙트럼법을 이용해 얻은 결과이다. 모든 시편의 적외선 분광스펙트럼 투과도 정도는 그 양상이 유사하였다. glutaraldehyde로 가교형성시킨 시편에서는 glutaraldehyde의 농도가 증가될수록, 관찰되어진 모든 반응기의 투과도가 증가됨을 알 수가 있다. 그러나, 화학



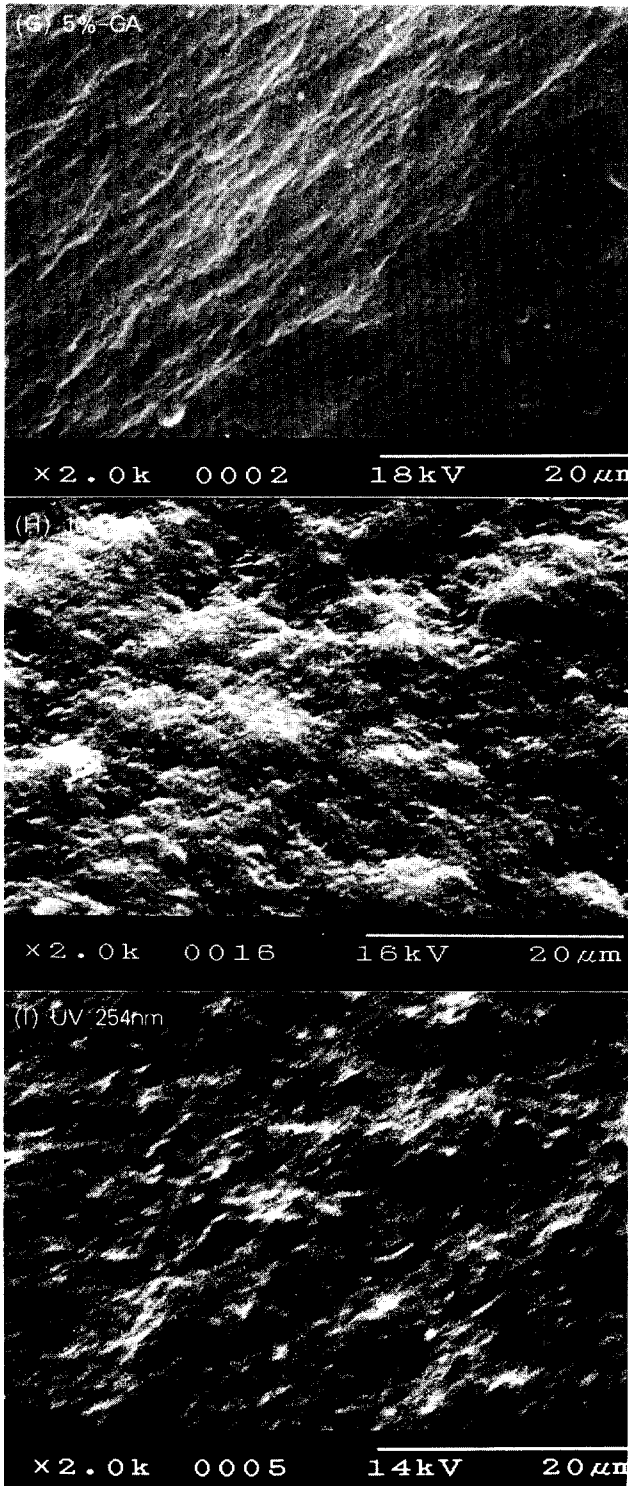


그림 4. 광조사방법과 화학적 방법으로 가교형성한 교원섬유막의 표면상을 주사전자현미경으로 관찰; \*GA:글루타르알데하이드, UV:ultraviolet ray, (A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10%-GA, (I)UV254nm

Fig. 1. Observation of crosslinked membrane surface morphology by light irradiation and chemical method with

scanning electron microscope; \*GA:glutaraldehyde, UV:ultraviolet ray, (A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10%-GA, (I)UV254nm

적 가교형성제의 농도가 0.25% 이상이 될 때 농도 변화에 따른 가교 형성비를 비교할 수가 없다.

2.5% 이상의 glutaraldehyde로 가교를 형성시킨 시편의 투과도와 (I) 자외선을 조사시켜 가교를 형성시킨 시편의 투과도를 비교해 본 결과 유사하다는 것을 알 수 있다.

## 고 찰

*In vitro*에서 생체 조직으로부터 추출된 교원섬유를 체내이식용 생체재료로서 사용하기 위해, 교원섬유의 인장강도와 단백질 분해에 대한 저항성이 요구되어져 왔으며, 그 중의 하나로 *in vivo* 과정에서의 가교형성 방법을 응용한 방법이 고안 이용되고 있고, 교원섬유를 이온결합, 공유결합, 수소결합 형성에 의해, 그리고, 다른 재료들과 혼합함으로써 인장강도와 생분해비율을 조절하고 있다.

Bovine skin 으로부터 추출한 Type I collagen은 인공 조직의 형태유지와 세포증식기질의 역할을 하는 막을 형성하기 위해 사용되고 있으며, 이를 위해 요구되는 인장강도와 단백질 분해 저항성을 조절하기 위해 가교를 형성할 필요가 있다. 생체 내에서 합성되어지는 collagen의 경우에 주로 가교가 형성되는 부위인 비나선형의 telopeptide가 체내 이식한 경우, 발생되어지는 면역반응의 원인 중에 하나로 문제시 되어 이 부위를 제거하여야 할 필요가 있는 것으로 사료되어, 본 실험에서는 우선 telopeptide를 제거하여 type I atelocollagen을 형성한 후에 자외선과, 화학적인 방법중의 하나인 glutaraldehyde을 처리하여 가교를 형성하고 이들을 비교, 분석하였다.

화학적 방법으로 가교 형성하는 시약들은 풍부한 장력과 재흡수율의 감소를 교원섬유들에 제공하나, 생체적 합성의 면에서 크게 떨어지며, 혈액 등과 반응하여 세포독성을 띠는 2차산물을 형성하거나, 가교가 형성된 조직의 석회화로 인해 유연성이 감소되어 주위 조직들이나 장기들 기능면에서 크게 문제시 되어 왔다. 가교를 형성하는 화학 물질들 중에서 가교형성율이 매우 높기 때문에 높은 수준의 가교 안정성을 교원섬유에 부여하는 알데하이드류 중에서 glutaraldehyde가 가장 흔히 쓰인다(6,8, 25,26). Glutaraldehyde 또한 다른 화학 물질들과 마찬가지로 많은 문제점들이 제시되어 왔다. Glutaraldehyde로 가교를 형성하여 체내 이식한 경우 생체 조직 내에서 혈액과 반응하여 생성되고, 유출되는 2차 생성물인 알데하이드기 잔여기들에 의한 세포 독성은 *in vitro*에서의 세포

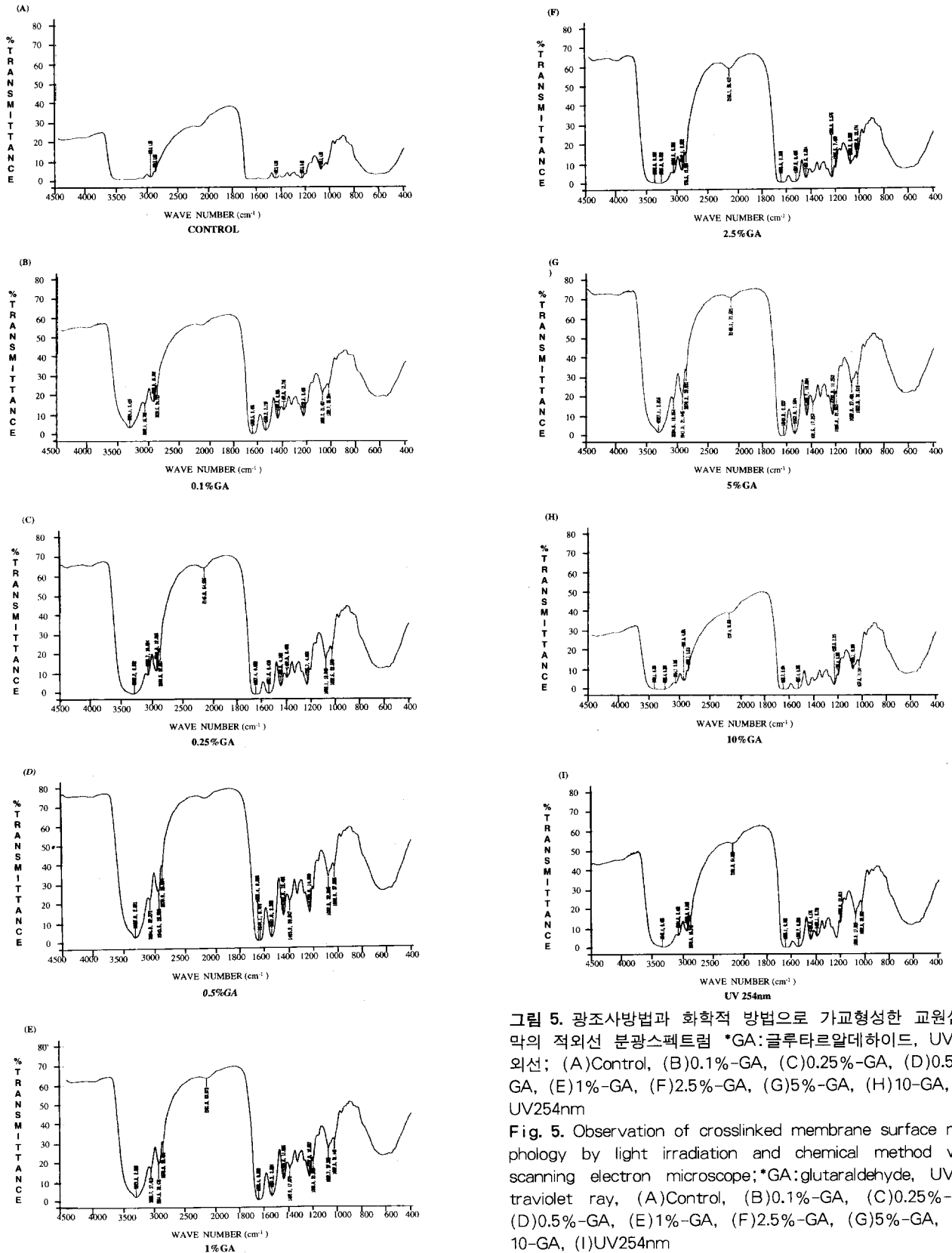


그림 5. 광조사방법과 화학적 방법으로 가교형성된 교원섬유막의 적외선 분광스펙트럼 \*GA:글루타르알데하이드, UV:자외선; (A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10-GA, (I) UV254nm

Fig. 5. Observation of crosslinked membrane surface morphology by light irradiation and chemical method with scanning electron microscope; \*GA:glutaraldehyde, UV:ultraviolet ray, (A)Control, (B)0.1%-GA, (C)0.25%-GA, (D)0.5%-GA, (E)1%-GA, (F)2.5%-GA, (G)5%-GA, (H)10-GA, (I)UV254nm



배양에 의해서도 가교를 형성하는 여러 방법 중 가장 높다는 것이 증명되었다. 가교형성에 관여하지 않은 glutaraldehyde는 세정하더라도 잘 제거되지 않고 교원섬유 내에 잔존하여 체내 이식 후 서서히 배출되어 부작용이 발생한다는 보고가 있다(27,28). 이 외에 가장 큰 문제점은 glutaraldehyde을 처리한 경우 석회화가 빨리 일어나, 조직을 단단하게 하며, 취성(brittleness)을 높여, 많은 주위 조직들에 손상을 입히게 된다는 점이다. Glutaraldehyde 사용시 석회화가 특히 문제가 되는 것은 그 자체의 구조적인 특성 때문이다. Glutaraldehyde는 칼슘이온( $Ca^{2+}$ )이 결합하기 쉽고, 가교형성과정에 필요한 알데하이드 잔기를 두 개를 가지고 있는 디피리딘 구조(dipyridine structure)를 가지고 있어 석회화의 원인이 되고, 이로 인해 내구성이 떨어진다고 보고 되었다(18,25,26,29,30). 한편 물리적으로 가교 형성하는 방법은 장력이 낮고, 재흡수 비율이 높아 제외 되어왔으나, 최근 화학적인 방법들이 세포 독성의 문제를 발생시키는 원인인 2차 생성물을 생성하는 문제점을 해결하기 위해 비교적 안전하는 점이 주목되어 물리적 가교형성 방법들의 단점들을 개선하는 방향으로 연구가 진행되어 왔으나, 여러 물리적인 과정 중에 열건조 방법(dehydrothermal treatment; 31), 자외선 조사방법(20,21,22,23,24,32) 및 감마선 조사방법(15, 16,17)이 교원섬유의 가교형성 효과가 높아 많은 연구가 진행되어 왔다. 열건조 방법은 열에 의한 변성문제, 감마선의 경우는 교원섬유의 형태가 파괴되거나 변형되는 등의 문제가 제시되어, 본 실험에서는 가장 안전하고 가교형성 효과가 뛰어난 254nm의 자외선을 이용하였다.

교원섬유 분자는 240~260 nm의 자외선을 흡수하는데, 254 nm의 자외선 흡수시 가교형성율이 높아 가장 최적의 파장길이라고 보고 되어 이용하였다(2,20,21,22,23, 24). 이 254nm의 자외선으로 가교를 형성하기 위해, 일정 시간별로 조사하여, 가교가 형성된 막들의 인장강도와 교원섬유분해 정도를 측정하여 조사시간의 적정 범위를 정하였다(Fig. 2). 본 실험의 결과 인장강도와 교원섬유 분해도를 고려하면, 254nm로 4시간동안 조사하는 것이 4시간 미만동안 자외선을 조사하여 가교를 형성한 경우에 비해 높은 인장강도와 낮은 교원섬유 분해도를 나타내었으며 4시간이상 조사할 경우 4시간 조사한 경우와 별다른 차이가 없었다. 여러 다른 물리적인 방법에 의해 가교 형성시 낮은 인장강도와 높은 단백질분해도를 나타내는 단점을 254nm의 자외선을 4시간동안 조사하여 가교형성하면 비교적 안정화될 수 있다고 사료된다.

본 실험에서는 자외선 조사방법에 의한 가교 형성정도를 화학적인 방법과 비교,분석하여 가교형성시 효과적인 방법임을 증명하기위해 가교 형성제로 가장 많이 쓰이는 glutaraldehyde를 이용하였다.

가교 형성의 정도에 따른 막의 구조적인 변화를 표면형상으로 분석하기위해 편광현미경을 이용하여 관찰하였다. 0.1%에서 10% 각각의 glutaraldehyde의 농도에 의해 가교가 형성되어진 교원섬유 막의 치밀도의 변화로 인해 가교형성정도를 알 수 있었으며, glutaraldehyde의 농도가 증가될수록 막의 치밀도가 증가되어 생성된 섬유의 형태적 차이로 막의 가교형성비율이 증가되는 것을 구분할 수가 있었다. 광조사방법인 자외선에 의한 막의 섬유의 형태는 2.5% glutaraldehyde이 처리된 막의 섬유의 형태와 치밀도가 매우 유사하였다(Fig. 3).

다른 방법인 주사전자현미경을 이용하여 분석하고 관찰한 경우 Fig. 4에서는, (B) 0.1%의 glutaraldehyde을 처리한 막의 표면형상이 대조군과 현저한 차이를 보이기 시작하는 데, 막에 glutaraldehyde을 처리한 결과 분자간 및 분자내 가교가 형성되어 섬유들이 치밀해지고, 섬유들이 일정한 방향성을 띤 결과로 사료된다. (F) 2.5% glutaraldehyde을 처리한 경우는 가교의 형성 정도가 안정되었고, (G) 5% glutaraldehyde을 처리한 경우는 다시 가교의 형성이 진행되어, (H) 10% glutaraldehyde의 경우에는 (F)의 경우보다 과잉적으로 가교가 형성되어 막의 치밀도가 높아진 형태를 나타내고 있다. 자외선을 조사하여 가교를 형성시킨 (I)의 막의 표면 형상은 (F)의 경우와 유사한 형태를 나타내고 있다. 이 결과는 편광현미경을 이용하여 관찰한 경우 같은 결과를 나타냈으며, 자외선을 이용하여 가교를 형성하는 방법은 화학처리방법에 비교할 때 매우 유용한 방법이라고 사료된다.

막표면의 화학구조의 변화는 적외선 분광스펙트럼법을 이용하여 관찰한 아민기(N-H), 알데히드기(C-H) 및 카르복실기(CO)의 투과도 백분율을 조사하였다(Fig. 5). 이 FT-IR분석시 알데히드기의 경우 파장의 길이가  $1725-1695cm^{-1}$ 의 범위에서 주피크가 나타나, 본 실험 결과에서는 거의 유사한 투과도를 나타내고 있다. 이는 가교형성에 관여하는 알데히드기(CHO)의 양이 변화가 없기 때문인 것으로 사료되며, 잔류 CHO는 알데히드기의 CH 피크를 나타내는  $2880cm^{-1}$ 부위에 나타나 그 변화량을 비교하였다. (A)-(I)의 투과도의 변화 양상이 유사한 것은, 같은 화학 구조를 가지고 있기 때문이고, 투과도가 증가될수록 반응기들이 감소되는 것을 의미하며, 가교를 형성할 수 있는 반응기들이 감소함을 나타내므로, 자외선 조사 또는 glutaraldehyde의 농도가 증가에 의해 가교 형성의 비가 증가됨을 설명할 수 있다. 그러나, 막의 치밀도가 증가 될수록 적외선의 투과도가 감소되어지기 때문에 화학적 가교형성제의 농도가 0.25%이상일 때에는 가교 형성비를 비교할 수가 없었다.

편광현미경(Fig. 3)과 주사전자현미경(Fig. 4)을 이용하여 자외선 조사 및 glutaraldehyde 처리에 의해 가교가

형성된 정도를 막의 표면형상 변화에 따라 관찰한 결과, 254nm의 자외선을 4시간 동안 조사한 막의 표면형상의 밀도 및 방향성이 2.5% 이상의 glutaraldehyde과 매우 유사한 결과를 나타내었으므로 자외선에 의한 가교형성방법도 효과적인 방법으로 사료된다. 또한 2.5% 이상 glutaraldehyde을 처리한 경우의 가교형성과 254nm의 자외선을 조사한 경우의 가교형성을 적외선 투과도로 비교, 분석한 결과가 일치하므로, 광조사방법은 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 또한, telopeptide를 제거하지 않은 경우와 별다른 차이가 없는 것으로 보아 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

## 결 론

254nm의 자외선 조사 또는 glutaraldehyde을 처리하여 가교를 형성하여, 가교정도를 막의 표면형상과 화학구조를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 254nm의 자외선을 시간별로 조사하여 가교형성을 막의 인장강도와 교원섬유분해정도로 비교한 결과 4시간이상 조사하여 막의 안정성이 높다는 것을 알 수 있다.
2. 2.5% glutaraldehyde 용액을 이용하여, 가교형성한 교원섬유막은 254nm 자외선 조사를 통하여 가교형성한 교원섬유막과 편광현미경상, 주사전자현미경상에서 유사한 형태를 보였다.
3. FT-IR의 ATR을 이용한 화학 구조상에서는 2.5% 이상의 glutaraldehyde를 이용하여 가교형성할 경우, 자외선조사로 가교형성한 경우와 유사한 형태로 나타났다.
4. Type I atelocollagen를 가교형성할 경우, glutaraldehyde 용액의 농도는 2.5%, 254nm의 자외선의 경우는 4시간이상 조사한 것의 가교형성정도가 유사하다는 것을 알았다.

## 참 고 문 헌

1. Miller, E.J., "Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagens.", Mol. and Cell. Biochem., vol. 13, no. 3, pp 165-92, 1976.
2. Nimni, M.E., COLLAGEN. CRC Press. Inc., 1988.
3. Gelman, R.A., Poppke D.C. and K.A. Piez, "Collagen fibril formation in vitro.:The role of the non-helical terminal regions.", Conn. Tiss. Res. vol. 7, pp 11741-45, 1979.
4. Eyre, D.R., Paz, M.A. and P.M. Gallop, "Cross-linking in collagen and elastin.", Ann. Rev. Biochem., vol. 53, pp 717-48, 1984.
5. Robins, S.P., "Crosslinking in fibrous proteins [collagen and elastin].", Biochem. J., vol. 215, pp 167-173, 1983.
6. DeVore, D.T., "Collagen xenografts for bone replacement: The effects of aldehyde induced crosslinking on degradation rate." Oral. Surg., vol. 43, no. 5, pp 677-86, 1977.
7. Gonzalez, E., Hamabata, A. and M. Rojkind, "Some properties of the reactive hydroxylsyl residues in collagen: Their possible role in nucleation during fibril formation.", Coll. Rel. Res. vol. 12, pp 339-50, 1984.
8. Oliver, R.F., Barker H., Cooke, A. and L. Stephen, "<sup>3</sup>H-collagen turnover in non-cross-linked and aldehyde-cross-linked dermal collagen grafts.", Br. J. exp. Path. vol. 63, pp 13-17, 1982
9. Lohre, J., "Evaluation of two diepoxy ether compounds for biocompatible potential.", Artif. Organs. vol. 15, pp 303, 1991.
10. Patite, H., "Use of acyl azide method for cross-linking collagen rich tissues such as pericardium.", J. Biomed. Mater. Res. vol. 24, pp 179-87, 1990.
11. Smith, G.N., JR. Williams, J.M. and K.D. Brandt, "Effect of polyanions on fibrillogenesis by type XI collagen.", Coll. Rel. Res., vol. 7, pp 17-25, 1987.
12. Tu, R., "Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds.", J. Biomed. Mater. Res. vol. 28, no. 6, pp 677-84, 1995.
13. Wang, E., "Evaluation of collagen modification and surface properties of a bovine artery via polyepoxy compound fixation.", Int. J. Artif. Organs. vol. 16, no.7, pp 530-6, 1993.
14. Xi, T., "Effect of pretreatment with epoxy compounds on the mechanical properties of bovine pericardial bioprosthetic materials.", J. Biomater. Appl., vol. 7, no. 1, pp 61-75, 1992.
15. Cheung, D.T., Perelman, N., Tong, D., and M.E. Nimni, "The effect of  $\gamma$ -irradiation on collagen molecules, isolated  $\alpha$ -chains and cross-linked native fibers", J. Biomed. Mater. Res., vol. 24, pp 581-589 1990.
16. Davidson, R.J. and D.R. Cooper, "The effect of  $\gamma$ -irradiation on soluble collagen.", Biochem. J. vol. 107, pp 29-33, 1968.
17. Liu, B., Harrell, R., Davis, R. H., Dresden, M. H.

- and M. Spira, "The effect of gamma irradiation on injectable human amnion collagen.", J. Biomed. Mat. Reas. vol. 23, pp 833-844, 1989
18. Speer, D.P., Chavapil, M., Ulreich, J., and C.D. Eskelson, "Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials.", J. Biomed. Mater. Res., vol. 14, pp 753-64, 1980.
  19. Tang, Z. and Yue, Y., "Cross-linkage of collagen by polyglycidyl ethers.", ASAIO J. vol. 41, pp 72-8, 1995.
  20. Suh, H., Suh, S. and B. Min, "Antiinfection treatment of a transcutaneous device by a collagen composite.", ASAIO J., vol. 40, no. 3, pp 406-11, 1994.
  21. Suh, H., "Biodegradable inorganic-organic composite artificial bone substitute-Part 2. Collagen purification and its physical and biological properties.", J. KOSOMBE vol. 15, no. 3, pp 341-46, 1994.
  22. Suh, H., Lee, J.E., Ahn, S. J. and C.K. Lee, "Biodegradable inorganic-organic composite artificial bone substitute-Part 3. In vitro properties of the composite substitute.", J. KOSOMBE., vol. 16, no. 1, pp 57-60, 1995.
  23. Weadock, K, Olsen, R.M. and F.H. Silver, "Evaluation of collagen crosslinking techniques.", Biomat. Med. Dev. Art. Org., vol. 11, no. 4, pp 293-318, 1984.
  24. Weadock K.S., Bellincampi L.D., Zawadsky, J.P. and M.G. Dunn, "Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment.", The Society for Biomaterials, pp 27-28, 1995.
  25. Cheung, D.T., and M.E. Nimni, "Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: Reaction with model compounds.", Conn. Tiss. Res. vol. 10, pp 187-189, 1981
  26. Cheung, D.T. and M.E. Nimni, "Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II: Reaction with model compounds.", Conn. Tiss. Res. vol. 10, pp 201-216, 1981
  27. Eybl, E., Griesmacher, M., Grimm, M. and E. Wolner, "Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells." J. Biomed. Mater. Res. vol. 23, pp 1355-65, 1989.
  28. Morykwas, M.J., "In vitro properties of crosslinked, reconstituted collagen sheets.", J. Biomed. Mater. Res., vol. 24, pp 1105-10, 1990.
  29. Nimni, M.E., Cheung, B.S., Kodama, M., K. Sheikh, "Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement." J. Biomed. Mater. Res. vol. 21, pp 741-71 1987
  30. Golomb, G., "The role of glutaraldehyde induced crosslinks in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses.", Am. J. Pathol. vol. 127, pp 122-30, 1987.
  31. Yannas, I.V. and A.V. Tobolsky, "Crosslinking of gelatine by dehydration.", Nature. vol. 215, pp 509-510, 1967.
  32. Ahn, S.J., Lee H.K. and H. Suh, "Cross-link effects on the physical of the collagen purified from human umbilical cords.", J. KOSOMBE., vol. 16, no. 2, pp 65-66, 1994.

=국문초록=

교원섬유를 체내 이식용 생체 재료로서 사용하기 위해 bovine skin 교원섬유를 막의 형태로 재구성하여 사용하기 위해 in vitro에서 광조사 방법인 254nm의 자외선을 조사하여 가교를 형성하고, 화학적인 방법으로는 glutaraldehyde를 농도별로 처리하여 가교를 형성하여, 가교형성정도를 알아보기 위해 막의 인장강도와 분해정도 그리고, 표면형상과 화학구조를 비교 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

1. 2.5% glutaraldehyde 용액을 이용하여 가교형성한 교원섬유막은 4시간이상 254nm 자외선 조사를 통하여 가교 형성한 교원섬유막과 편광현미경상, 주사전자현미경상에서 유사한 형태를 보였다.

2. FT-IR을 이용한 화학 구조상에서는 2.5%이상의 glutaraldehyde를 이용하여 가교형성할 경우, 자외선 조사로 가교 형성한 경우와 유사한 형태로 나타났다.

3. 2.5% glutaraldehyde 용액과 254nm의 자외선을 4시간이상 조사하는 것이 Type I atelocollagen의 가교형성에 적당하다는 것을 알 수 있다.