Polymer(Korea), Vol. 38, No. 2, pp. 220-224
http://dx.doi.org/10.7317/pk.2014.38.2.220

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

콘택트렌즈용 하이드로젤로의 단백질 흡착 반응속도 이해

김현재 · 김미라* · 노혜란*,†

연세대학교 화공생명공학과, *서울과학기술대학교 안경광학과

(2013년 10월 28일 접수, 2013년 11월 14일 수정, 2013년 11월 18일 채택)

Understanding of Protein Adsorption Kinetics to Contact Lens Hydrogels

Hyun-Jae Kim, Mira Kim*, and Hyeran Noh*,†

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, 134 Shinchon, Seodaemon-gu, Seoul 120-749, Korea
**Department of Optometry, Seoul National University, 138 Gongneung gil, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea*

(Received October 28, 2013; Revised November 14, 2013; Accepted November 18, 2013)

초록: 콘택트렌즈용 하이드로젤로의 단백질 흡착량을 시간에 따라 분석하여 계면으로 확산되는 단백질 흡착 반응속도를 연구하였다. HEMA(hydroxyethylmethacrylate)계열 하이드로젤과 silicone계열 하이드로젤을 단백질(알부민 또는 IgG)용액에 침지시킨 후 단백질 흡착량을 시간에 따라 측정하였다. 모든 하이드로젤로의 단백질 흡착량은 단시간(10분)에 급격히 증가한 후 90분 동안 변화 없이 일정하였다. 빠른 단백질 분자의 확산에도 불구하고 계면에너지 감소는 한 시간 이상 진행되는데 이는 계면 탈수 현상이 한 시간 이상 진행되기 때문으로 이해된다. 계면에너지와 단백질 흡착량의 상관관계를 이해하여 콘택트렌즈 재질로의 단백질 흡착 반응 속도의 메커니즘을 분석하였다.

Abstract: Protein adsorption kinetics was studied with the amount of proteins adsorbed to contact lens hydrogels over time scales. Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and silicone hydrogels were dipped in protein solutions (albumin or IgG) and adsorption amounts were measured over time scales. The amount of protein adsorbed to both hydrogel types increased rapidly in 10 min, and remained consistently in 90 min. Decreasing interfacial energetics was taken slowly up to an hour in spite of rapid diffusion of protein molecules. This is due to the fact that water deprivation from three dimensional interphase initially formed by protein diffusion took over an hour. Interpretation of adsorption kinetics on contact lens hydrogels was discussed with understanding of relationship between surface energy and protein adsorption capacity.

Keywords: protein adsorption kinetics, hydrogels, tear proteins, contact lens, surface energy.

서 론

인공 재료가 이식 또는 접촉될 경우 인체에서 일어나는 첫 번째 반응은 재료 표면으로의 단백질 흡착현상으로 알려져 있다.[1-3] 두 번째로 세포 흡착 그리고 혈액 응고 등의 단기간 반응을 거쳐 장기적으로 재료의 부식, 변성 등의 부작용으로 나타나게 된다. 즉 계면에 흡착된 단백질과 재료 표면의 상호작용은 일련의 생화학 반응을 촉진 또는 완화시키며, 결국 인공 재료의 생체 적합성을 결정짓는 궁극적 역할을 하게 된다.[4,5]

콘택트렌즈 역시 인체 내에서 각막과 접촉하게 되면 각막을 덮고 있는 눈물 속의 알부민, 라이소자임, 락토페린, 면역글로불린 등의 눈물 단백질이 렌즈 계면에 흡착되고, 이러한 단백질 흡착이 장기화되면 렌즈의 변성이 일어나 충혈감, 건조감, 이물감, 각막염 등의 증상을 유발할 수 있다.[6-8] 전세계의 콘택트렌즈의 착용자 인구는 지난 10여년 동안 꾸준히 증가하였는데 우리나라의 경우 현재 착용 비율이 전 인구의 20% 정도로 알려져 있어[9] 콘택트렌즈를 비롯한 하이드로젤 재질에 따른 생체 적합성 이해의 중요성은 더욱 커지고 있다.

단백질 흡착속도(protein-adsorption kinetics)에 관한 연구는 1900년부터 꾸준히 발표되었는데 최근 Tensiometer로 측정한 liquid-vapor 계면으로의 단백질 흡착에 의한 계면에너지는 약 1시간 동안 꾸준히 감소하며 이후 일정하게 유지됨을 밝혀졌다. 반면에 계면에 흡착하는 물질의 질량의 변화 즉, 흡착량은 계면의 에너지 변화 속도보다 더 빠르게 이뤄진다는 이론이 제시되었다.[1,10]

1986년 Varoqui와 Pefferkorn는 Fick의 용질 확산현상에 에너지 장벽을 제시하며 물질의 흡착 속도를 이론적으로 해석했다.[11] 그 후 단백질 흡착속도현상의 이해에 있어 계면에 물

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hrnoh@seoultech.ac.kr

리적 막(physical barrier) 개념을 도입한 이론들이 단백질 흡착속도의 새로운 해석으로 평가 받고 있다.[12-14] 이는 resonant microbalance 방법, mass depletion 방법 등 여러 실험적인 방법으로 이론에 부합하는 결과 즉 단백질의 정량 변화가 계면 에너지 변화보다 빠르게 이루어짐이 보고되고 있다.[10,15,16]

본 연구는 친수성 정도가 다른 콘택트렌즈 재질로의 크기가 다른 눈물 단백질 흡착량을 침착 시간에 따라 연속적으로 측정하여 하이드로젤 재질로의 단백질 정량 변화를 이해하고 이론적으로 고찰하고자 하였다.

실 험

실험재료. 본 연구에 사용된 콘택트렌즈는 methacrylate가 공중합된 hydroxyethylmethacrylate(HEMA/MA)와 dimethacrylate(DMA)가 공중합된 실리콘 하이드로젤 렌즈(PDMS/DMA)이다. Sigma사(U.S.A)의 알부민(Albumin, from bovine serum)과 IgG(Immunoglobulin G, from bovine serum) 2종류를 사용하였으며, Bradford Reagent는 Sigma사의 제품을, phosphate buffered saline(PBS)은 AMRESCO사(U.S.A)의 1 X PBS tablet(1000 mL)을 사용하였다.

콘택트렌즈 파티클. 순수한 콘택트렌즈 재질 자체가 갖고 있는 단백질 침착능력을 효과적으로 측정하기 위해 문구용 칼날을 이용하여 재질을 작고 균일하게 잘라 표면적을 넓혔다(가로×세로, 1 mm×1 mm).

단백질 용액. 96% 이상의 lyophilized powder BSA (66.4 kDa; Sigma)와 95% 이상의 lyophilized powder IgG (160.3 kDa, Sigma) 각 3 mg을 PBS(137 mM sodium chloride, 2 mM potassium chloride, 10 mM phosphate buffer) 1 mL에 각각 용해시켰다. BSA 및 IgG의 초기 농도는 0~3 mg/mL의 범위에서 단백질 용액과 PBS를 각각 7:3의 비율로 희석시켜 만든 10개의 초기 농도 중에서 5개의 농도를 선택하여 각각 렌즈에 침착시켰다.

단백질 침착. 렌즈는 1 mm×1 mm의 크기로 잘라 32개씩 1 mL 튜브에 넣고 PBS 용액으로 채워 건조에 의한 재질의 변성을 최소화하였다(PBS 용액은 단백질 침착 전에 피펫으로 제거하였다). 즉, 재질의 표면적은 1 mm×1 mm×32 = 32 mm^2 정도로 하였다. 단백질 용액은 3 mg/mL 부터 단백질 용액과 PBS 비율을 7:3으로 희석시켰다. 침착시킬 렌즈가 담긴 각 튜브에 단백질 용액 20 μL 넣어 10분에서 90분까지 10분 간격으로 농도 별로 침착시켰다.

단백질 정량. 단백질 정량은 Bradford protein assay를 이용하였다. 마이크로 피펫을 사용하여 10분에서 90분까지 10분 간격으로 렌즈가 담겨져 있던 단백질 용액을 조심스럽게 5 μL 추출한 후, 96 well plate에 도포하였다. 그 다음, 각각의 well마다 Bradford Reagent(Sigma사)를 250 μL 씩 첨가하여 잘 섞어준 뒤, protein solution과 Bradford Reagent가 안정화되면(5분) plate reader를 이용하여 595 nm에서 단백질 용액의 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값을 바탕으로 Figure 3과 같이 protein solution의 표준 정량 곡선을 나타내었다.

결과 및 토론

재질의 습윤성에 따른 흡착 등온선의 특성. Figure 1은 HEMA/MA 재질과 PDMS/DMA 재질의 계면에 흡착한 알부민의 양(mg/mL)을 나타낸 그래프이다. 습윤성이 다른 두 재질에 흡착하는 알부민의 양은 흡착 전 단백질의 양(bulk concentration)이 증가함에 따라 선형으로 일정하게 증가하는 양상을 보였다. IgG도 흡착 전 IgG 농도가 증가할수록 계면 내 흡착량이 증가하였다. 각 재질의 SEM image에 나타난 하이드로젤 가교결합에 의한 기공의 크기 차이는 나타나지 않았다(자료 없음). 이러한 흡착 등온선(adsorption isotherm)은 단백질 흡착량은 계면이 포화 흡착될 때까지는 흡착 전 단백질 농도에 일정하게 비례하는 것으로 Henry 등온선(Henry isotherm)을 따르는 것으로 나타났다.[17-19]

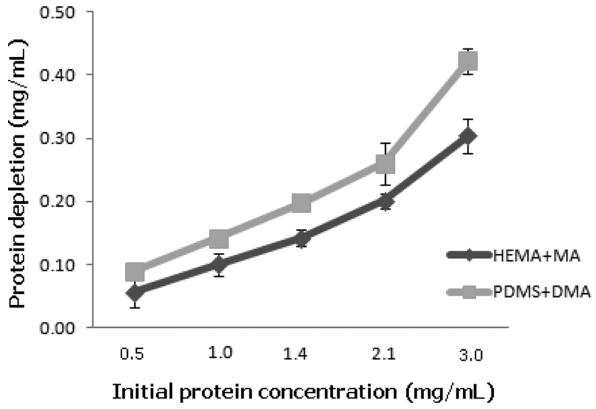

Figure 1. Solution depleted amount of albumin to HEMA/MA or PDMS/DMA surface.

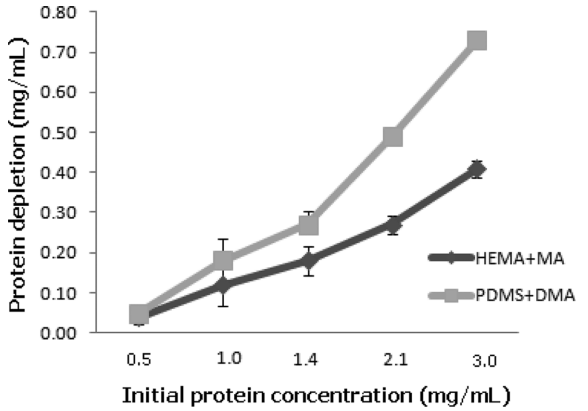

Figure 2. Solution depleted amount of immunoglobulin G (IgG) to HEMA/MA or PDMS/DMA surface.

재질의 계면에너지는 Young-Dupre의 식 (1)과 같이 재질의 습윤성으로 이해될 수 있다.[20]

$$\tau^{o} = \gamma_{lv} \cos\theta \,(\mathrm{mN/m}) \quad (1)$$

여기서, τ^{o}는 계면의 습윤성이고 γ_{lv}은 물의 액체-기체 표면장력으로 상온에서 72 mN/m이며, θ는 고체-액체의 접촉각을 나타낸다. 콘택트렌즈 재질 중 HEMA/MA는 advancing 접촉각이 51°이고 PDMS/DMA의 접촉각은 109°로 알려져 있어[6,21,22] 각 재질의 습윤성은 43, -23 mN/m(HEMA/MA, PDMS/DMA)로 실리콘 소재의 습윤성이 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다. 이에 따라 알부민과 IgG 모두 소수성인 PDMS/DMA 재질에 HEMA 재질보다 더 많이 흡착한 것을 알 수 있다(Figures 1 & 2).

단백질 흡착 반응속도. 단백질 용액에 침지시킨 후 하이드로젤의 계면에 흡착된 각 단백질의 정량을 시간 별로 알아보았다. Figures 3과 4는 알부민의 두 재질의 하이드로젤로 흡착한 양을 나타낸 그래프이며 Figures 5와 6은 IgG의 흡착량을 나타낸 그래프이다. 단백질 흡착량이 두 재질에서 모두 단백질 농도에 비례하여 선형으로 증가하였다. 재질에 따른 흡착량을 비교해 보면, 두 단백질 모두 HEMA 재질보다 siloxane 재질에 단백질 평균 흡착량이 더 많은 것으로 나타났다.

단백질 용액에 하이드로젤 재질을 침지시킨 후 10분에서 100분까지 흡착량을 비교한 결과 실험에 사용된 두 가지 재질에서 모두 같은 농도의 용액에 침지된 하이드로젤로의 침착 시간에 따른 단백질 흡착량에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 이는 단백질의 종류에 따른 차이가 없이 알부민과 IgG 모두 동일한 추세를 보였다. IgG의 경우 알부민보다 약 2.5배 분자량이 큰데 단백질의 크기와 흡착된 단백질의 총량

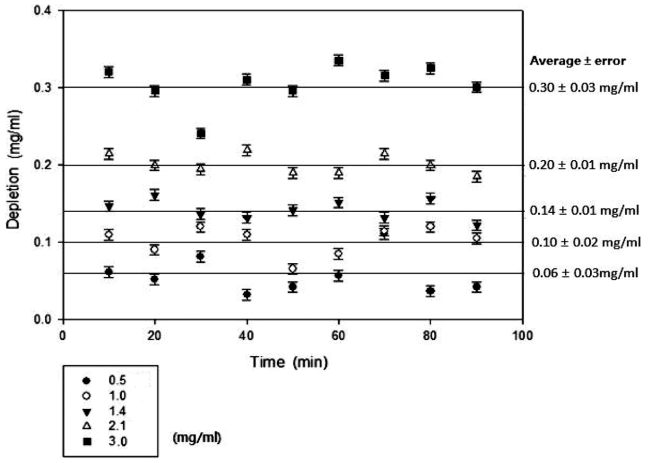

Figure 3. Time-dependent albumin depletion amount to HEMA/MA surface.

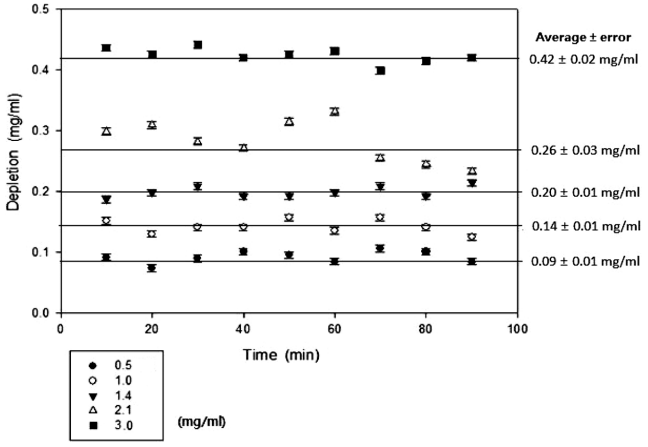

Figure 4. Time-dependent albumin depletion amount to PDMS/DMA surface.

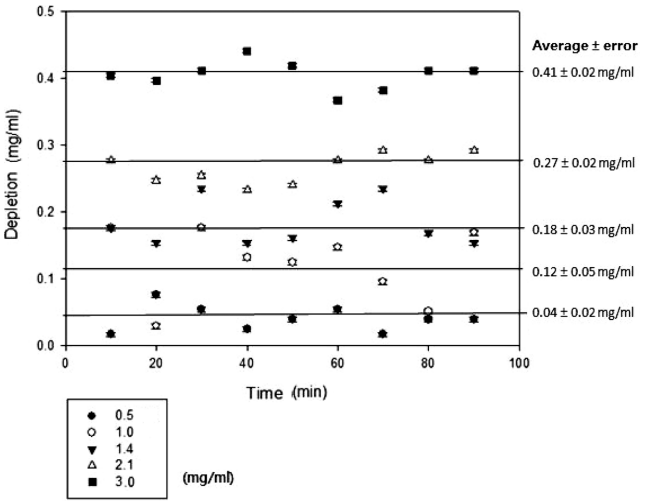

Figure 5. Time-dependent IgG depletion amount to HEMA/MA surface.

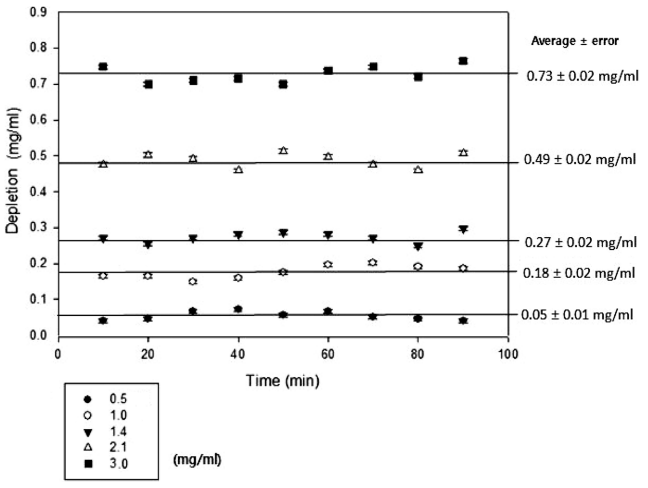

Figure 6. Time-dependent IgG depletion amount to PDMS/DMA surface.

에는 차이가 있었으나 흡착시간의 증가에 따른 흡착량 변화에는 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 따라서 단백질 흡착량의 반응속도는 10분 이상 1시간 이내에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과는 기존의 quartz crystal microbalance 방법을 이용하여 단백질 흡착 kinetics를 설명한 결과와 일치한다.[23]

단백질 흡착 Kinetics 이론적 고찰. Fick 확산법에 의하면 단백질 용액과 재질 표면이 접촉하게 되면, 식 (2)와 같이 초기 단백질 농도와 시간에 비례하여 계면의 단백질 농도가 증가하게 된다.[24]

$$\Gamma_2(t) = 2C_B^o\left(\frac{Dt}{\pi}\right)^{1/2} \quad (2)$$

$\Gamma_2(t) = n_{1,2}/A$ (계면에서의 단위 면적당 용질의 몰수, 1: 용질, 2: 용매)이며, C_B^o는 초기 단백질 용액의 농도, D는 용매 내 용질의 확산 계수, 그리고 t는 시간이다.

만약 단백질 흡착이 Fick의 단순 확산에 의해서만 일어날 경우, 흡착이 평형에 도달하는데 걸리는 이론적 시간은 1000분의 수 초에 불과하다. 그러나 단백질이 계면으로 흡착될 때 시간에 따른 계면에너지 값을 분석한 논문에 의하면, 계면에너지는 확산 속도에 비하여 아주 서서히 최대 1시간 이상 걸려 감소하는 것을 볼 수 있다.[15,25]

이와 같이 단백질 흡착 시 용질의 확산 속도와 계면에너지 감소 속도가 상이한 것을 Varoqui & Pefferkorn은 Fick의 확산 이론에 에너지 장벽(반사면) 이론을 도입하여 용매의 계면으로의 흡착 현상을 설명하였다.[11,26] 에너지 장벽 이론에 따르면, 확산에 의해 subsurface에 도달한 단백질 분자가 계면(planar interface)에 흡착되기 위해서는 에너지 장벽을 넘어야 하며, 이 장벽이 높을수록 흡착 속도가 느리다.

Gibbs나 Guggenheim은 계면을 2D 계면과 subsurface 영역이 함께 존재하는 공간인 interphase로 정의하고 있다.[27,28] 이에 따라 2D 흡착 모델에 interphase(3D 계면) 개념을 도입함으로써 계면에서의 단백질 확산 및 계면 에너지의 변화를 합리적으로 설명할 수 있게 되었다.

이러한 단백질 흡착에 따른 계면에너지 변화와의 상관 관계를 적용하면 콘택트렌즈 계면에서의 단백질 흡착 반응속도의 메커니즘은 다음과 같이 이해된다.

단백질 흡착 평형에 도달했을 때의 계면의 농도는 분배계수에 의해 결정되는데 계면에너지를 측정한 연구에 의하면 초기 계면의 단백질 농도보다 흡착 평형에 도달했을 때의 계면의 농도가 훨씬 높다. 즉 시간이 지날수록 계면의 농도가 점점 높아져 계면에너지가 감소하는데, 계면으로 확산되는 단백질의 질량은 짧은 시간(5분 이내)에 증가한 후 1시간여 동안 일정하다. 이는 결국 일정한 양의 단백질 양으로 흡착평형에 도달했을 때 계면의 농도가 높아진다는 것이 계면의 부피가 작아진다는 것으로 해석된다. 이는 Gibbs와 Guggenheim의 이론과 같이 계면 부피의 감소는 계면의 물이 단백질 용액 쪽으로 이동하는 계면 탈수에 의해 설명될 수 있는데, 특히 하이드로젤에서 이 계면 탈수 현상은 계면에너지 평형에 이를 때까지 계속 진행되며, 이는 단백질 확산 속도보다 느리게 진행된다고 이해된다.[20,29]

단백질별 흡착량 비교 분석. 같은 농도에서 각 재질의 알부민과 IgG의 흡착량을 비교해 보면, 두 재질 모두에서 IgG가 알부민보다 흡착량이 더 많은 것을 볼 수 있다. 본 논문에서 단백질 흡착량을 측정하는 방법으로 solution depletion method를 이용하였는데, 이 방법은 단백질이 재질에 침착되기 전과 후의 단백질 용액의 w/v 농도(mg/mL)의 차이를 측정하는 것으로, 이 두 농도의 차이로 흡착량을 유추할 수 있다.[3]

$$D \equiv C_B^o - C_B \quad (3)$$

D는 단백질 흡착량이고 C_B^o는 흡착 전 단백질 용액의 농도(mg/mL)이며 C_B는 흡착 후 단백질 용액의 농도(mg/mL)이다.

초기 농도가 동일하고 재질과의 상호작용이 비슷한 두 단백질(알부민과 IgG)을 같은 표면적의 동일 재질로 침착시킬 때, 알부민(MW: 72 kDa)보다 IgG(MW: 160 kDa)가 분자량이 2배 이상 큰 결과로 분자량이 상대적으로 큰 IgG의 흡착량이 알부민 흡착량보다 많다(Figures 3~6). 또한 알부민과 같이 단백질 크기(분자량)가 작은 단백질은 재질 표면으로 흡착될 때 1개의 층으로 흡착되지만, 일반적으로 분자량이 MW>100 kDa인 단백질은 다층으로 흡착될 수 있기 때문에 분자량이 160 kDa인 IgG가 알부민보다 더 많은 흡착량을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.[3,4,16]

결 론

단백질 흡착 kinetics에 관한 최근 연구에 의하면 단백질 흡착속도가 흡착에 의한 계면에너지 변화보다 매우 빠르다고 알려져 있다. 본 연구는 콘택트렌즈용 하이드로젤로의 단백질 흡착 반응 속도를 알아보았다. 그 결과 계면으로의 단백질 확산 속도는 빠르게 이루어지나, 계면 내 용질의 농도의 증가로 인한 계면에너지 감소는 상대적으로 서서히 진행된다는 사실을 바탕으로 계면에서의 단백질 흡착 메커니즘을 적용했다. Gibbs와 Guggenheim의 3D 계면에너지 장벽을 통해 계면에너지 감소가 단순히 계면으로 단백질이 확산되기 때문이 아니라 계면에서 단백질 용액 쪽으로 물이 이동됨으로써 계면 부피가 감소하여 계면에너지가 서서히 감소됨을 알 수 있었다. 또한 단백질의 상대적 크기에 따라 흡착량이 결정될 수 있음을 보였다. 본 연구 결과는 단백질 흡착 반응 속도 이론의 콘택트렌즈용 하이드로젤로의 눈물 단백질 흡착 현상으로의 응용이 가능함을 밝혔으며 향후 다양한 눈물 단백질의

경쟁적 흡착 속도 현상에 관한 연구로 임상에 가까운 조건에서의 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 과제 2012002809의 연구 결과물입니다.

참 고 문 헌

1. P. Parhi, A. Golas, N. Barnthip, H. Noh, and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **30**, 6814 (2009).
2. H. Noh and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **28**, 405 (2007).
3. H. Noh, S. Yohe, and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **29**, 2033 (2006).
4. A. Krishnan, J. Sturgeon, C. Siedlecki, and E. A. Vogler, *Langmuir*, **19**, 10342 (2003).
5. J. Brash and D. Lyman, *J. Biomed. Mater. Res.*, **3**, 175 (1969).
6. K. L. Menzies and L. Jones, *Optom. Vis. Sci.*, **88**, 493 (2011).
7. K. L. Menzies, *In vitro Analysis of Wettability and Physical Properties of Blister Pack Solutions of Hydrogel Contact Lenses*, University of Waterloo, pp. 1-251 (2010).
8. B. Holden, D. Sweeney, A. Vannas, K. Nilsson, and N. Efron, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**, 1489 (1985).
9. P. C. Nicolson and J. Vogt, *Biomaterials*, **22**, 3273 (2001).
10. N. Barnthip, H. Noh, E. Leibner, and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **29**, 3062 (2008).
11. R. Varoqui and E. Pefferkorn, *J. Colloid Interface Sci.*, **109**, 520 (1986).
12. J. Feder and I. Giaever, *J. Colloid Interface Sci.*, **78**, 144 (1980).
13. G. Sagvolden, I. Glaever, and J. Feder, *Langmuir*, **14,** 5984 (1998).
14. S. Slomkowski, S. Sosnowski, and E. Przerwa, *CR Chim.*, **6**, 1393 (2003).
15. A. Krishnan, Y. Liu, P. Cha, D. L. Allara, and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **27**, 3187 (2006).
16. A. Krishnan, J. Sturgeon, C. A. Siedlecki, and E. A. Vogler, *J. Biomed. Mater. Res.*, **68A**, 544 (2004).
17. A. Krishnan, Y.-H. Liu, P. Cha, D. Allara, and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **27**, 3187 (2006).
18. R. Miller, *Colloid Polym. Sci.*, **259**, 375 (1981).
19. S. Jeon and H. Noh, *Polymer(Korea)*, **36**, 338 (2012).
20. H. Noh and E. A. Vogler, *Biomaterials*, **27**, 5801 (2006).
21. M. C. Lensen, V. A. Schulte, J. Salber, M. Diez, F. Menges, and M. Moller, *Pure. Appl. Chem.*, **80**, 2479 (2008).
22. J. M. Gonzalez-Meijome, A. Lopez-Alemany, J. B. Almeida, M. A. Parafita, and M. F. Refojo, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **83**, 512 (2007).
23. A. Krishnan, Y.-H. Liu, P. Cha, D. Allara, and E. A. Vogler, *J. R. Soc. Interface*, **3**, 283 (2006).
24. A. Fick, *London Edinburgh Dublin Philos Mag., J. Sci.*, **10**, 30 (1855).
25. E. Vogler, *Biomaterials*, **33**, 1202 (2012).
26. E. Pefferkorn, A. Carroy, and R. Varoqui, *Macromolecules*, **18**, 2252 (1985).
27. E. Guggenheim, *Thermodynamics: An Advanced Treatment for Chemists and Physicists*, Wiley, New York, 1967.
28. E. A. Volger, “Interfacial chemistry in biomaterials science”, in *Wettability*, J. Berg, Editor, Marcel Dekker, New York, USA, Vol **5**, p 183 (1993).
29. E. A. Vogler, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **74**, 69 (1999).