

혈관대체체용 Polyurethane 지지체의 Compliance Property 향상을 위한 연구(I) Improved Compliance of Polyurethane Scaffold for Vascular Graft Application: Preliminary Study

서혁진^{1,2} · 신승우^{1,2} · 허도성³ · 박봉주² · 박종철⁴ · 김정구^{1,2,3*}

Hyok Jin Seo^{1,2}, Seung Woo Shin^{1,2}, Do-Sung Huh³, Bong Joo Park², Jong-Chul Park⁴, and Jeong Koo Kim^{1,2,3*}

¹인제대학교 의공학과, ²BK21바이오장기 조직재생 사업팀, ³인제대학교 의생명화학과, ⁴연세대학교 의학공학교실

¹Dept. of Biomedical Engineering, Inje University, 607 Obang-dong, Gimhae, 621-749, Korea

²BK21 Bio-Organ Tissue Regeneration Project Team, Inje University, Gimhae, Korea

³Dept. of Chemistry and Inst. of Functional Material, Inje University, Gimhae, Korea

⁴Dept. of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
(Received May 10, 2010/Accepted May 12, 2010)

In this study, we prepared solvent casting polyurethane films (sPU) and electrospun polyurethane films (ePU) to compare their compliance for providing better mechanical properties for vascular graft replacement. Mechanical properties of the prepared specimens showed that Young's modulus of each specimen was 0.037 N/m² (ePU) and 0.035 N/m² (sPU). Deformation energy of ePU and sPU specimens were 0.00098600 (J) and 0.0020706 (J), respectively, and porcine's aorta was 0.00034845 (J). The ePU specimen showed closer value to that of porcine's aorta than that of sPU specimen's. That means the compliance of the ePU revealed closer value to the compliance of the porcine's aorta than that of the sPU specimen. For surface property of the specimens, the contact angle of the ePU ($57.39^\circ \pm 1.84$) was more hydrophilic than that of sPU ($64.73^\circ \pm 1.56$). However, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) attachment and proliferation tests showed better attachment and proliferation (more than 20%) for the sPU specimen rather than the ePU specimen. Conclusively, the PU film made by nano fiber can provide better compliance property but cytocompatibility was somewhat behind compared to solvent cast PU film.

Key words: Polyurethane, Compliance, Vascular graft, HUVECs

서 론

세계에서 가장 큰 사망 원인 중 하나가 혈관 관련 질환으로 알려져 있다.¹⁾ 이러한 질환은 관상동맥부터 모세혈관에 이르는 혈관 시스템 전체에 걸쳐 나타난다.²⁾ 치료를 위해 동종이식, 자가이식, 이종이식 및 인공 대체물 방법 등이 이용되어왔다. 그 중 가장 흔히 이용되는 자가이식수술은 미국에서만 400,000건 이상이 매년 행해지고 있다.³⁾

인공혈관을 이용한 혈관대체술은 중~대구경 혈관에서 많이 사용되어지고 있다.⁴⁻⁷⁾ 반경 6 mm 이상의 대구경 혈관의 경우, Dacron, ePTFE 등의 재료에서 높은 개통률을 보이며 임상에서 사용되고 있으나, 6 mm 이하의 소구경 혈관에서는 개통률이 좋지 못하여 주로 자가 혈관 이식 방법이 이용되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 하지만 대체 가능한 혈관의 부족, 크기의 차이 등의 한계로 인해 인공 대체물이 필요하다. 소구경 혈관에서의 가장 큰 실패의 원인은 혈관 내에서 혈액이 응고되어 생기는 thrombogenicity, compliance mismatch, poor haemodynamic 등이다. 따라서

이상적인 인공혈관은 혈관 내부에 혈전을 형성하지 않고, 높은 혈압에 적합하고 실제 혈관과 유사한 compliance를 가지는 재료여야 한다.

조직공학은 질병이나 사고로 손실된 조직이나 장기를 생물학적 또는 생리학적 대체물을 이용하여 치료 및 대체하는데 목적이 있다. 이상적으로 제작된 조직공학적 대체물은 생체적합성도 뛰어나며, 구조뿐만 아니라 기능적 역할도 충분히 대체할 것으로 여겨진다. 현재 혈관치료는 혈관 우회술 및 스텐트와 같은 방법을 이용하여 치료하고 있으나 공급의 부족 및 저조한 개통률로 인해 치료 및 재생에 한계가 있다. 이를 해결하기 위해 세포와 지지체를 이용한 조직공학적 방법으로 in vivo/in vitro에서의 혈관 재생 연구가 활발히 이루어지고 있다.

폴리우레탄(PU)은 우수한 생체적합성과 용도에 맞게 물리적 특성을 쉽게 조절할 수 있는 장점 때문에 의료용 재료로 많이 사용되어 지고 있다.^{11,12)} 따라서 compliance mismatch 현상을 해결하기 위한 재료로 각광받고 있다. 그러나, 표면에 혈전이 생기는 문제는 PU를 인공장기 대체물질로 사용하기에 어렵게 만드는 주요한 요인 중 하나이다. 이전연구에서 혈액적합성을 높이기 위해서 표면에 고분자를 코팅하는 방법 등이 사용

*책임연락처: jkkm@inje.ac.kr

되고 있다.¹³⁾

본 연구에서는 인공혈관용 재료로 사용하기 위한 PU의 형태에 따른 차이를 비교하기 위해 solvent casting 과 electro-spinning 2가지 방법으로 필름을 제작한 후, 실제 조직과의 역학적 특성을 비교하고, 또한 혈관내피세포의 배양을 통해 세포 적합성을 비교 분석하여 그 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

주재료인 Polyurethane은 폴리에테르 계열의 Neothane 6193 (thermoplastic polyurethane compound, 호성케멕스(주), Korea) 을 사용하여 compliance 및 혈관 내피 세포 배양을 위한 film 제작에 사용하였다.

폴리우레탄과 실제 조직과의 역학적 특성을 비교 실험하기 위해 돼지 (6개월 미만)의 대동맥 혈관을 준비 하였다. 또한, 세포 점착 및 증식 실험에 대조군(control)으로써 PLGA 75 : 25 (Lakeshore Biomaterials, USA, Mw = 113,000)를 사용하였다.

시편 제작

PU film은 solvent casting 과 electro-spinning 두 가지 방법으로 제작하였다. 먼저 solvent casting 방법으로, PU와 N, N-Dimethylformamide (DMF)를 10 wt% 농도로 섞어 완전히 용해된 PU solution을 만든 후, 직경 10 cm인 유리 살레에 부어 vacuum drying oven 에서 진공 하에 40°C 온도에서 72 시간 동안 건조시켰다 (이하 sPU).

Electro-spinning 방법으로, 용매 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) 를 사용하여 10%(w/v) 농도로 PU solution 을 제작하였다. 전압 10 kV, 온도 24°C, 습도 60%, needle gauge 30G, 거리 10 cm, 주입속도 1 ml/h 조건으로 10시간 방사하여 제작하였다 (이하 ePU).

표면 형태 분석

제작한 지지체의 표면 및 단면의 형태를 확인하기 위해, field emission scanning electron microscope (FE-SEM, JSM-6700F, JEOL, Japan) 사용하여 5 kV 셋팅으로 측정하였다. 샘플은 gold using a sputter-coater (EIKO IB3, Japan)를 사용하여 15 kV로 3분 동안 코팅하였다.

표면 접촉각 측정

PU film의 표면 친수성을 알아보기 위하여 contact angle analyzer (PHOENIX 150, S.E.O. Co., Ltd, Korea)를 이용하여 측정하였다. 그룹별 n 수를 4 로 하여 sessile drop method로 접촉각을 측정한 뒤 평균값으로 그 차이를 비교하였다.

PU와 돼지 혈관의 역학적 특성 비교

PU와 돼지 혈관의 역학적 강도를 통해 간접적으로 compliance 를 비교하기 위해 MTS (Material Test System, LLOYD

Instruments, UK)를 이용하여 tensile test 와 cyclic test를 실시하였다. Tensile test는 크로스헤드 속도 2 mm/min로 셋팅하여 strain이 30% 변화할 때까지 시행하여 Young's modulus 값을 구하였고, cyclic test는 strain이 0-20% strain이 변화할 때까지 10회간 반복 실험한 후 변형에너지 값을 구하였다. 모든 실험의 시편의 size는 10 mm × 50 mm, 두께는 0.2 mm ± 0.02 (n = 4)로 제작하였다.

혈관내피세포의 배양

실험에 사용된 혈관내피세포는 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, Lonza, Walkersville, MD USA)을 사용하였다. 배지는 2% fetal bovine serum (Lonza)와 cell growth supplements (hydrocortisone, hFGF, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, GA-1000 and heparin, Lonza)를 첨가한 endothelial cell basal medium-2 (EBM-2, Lonza)를 사용하여 배양하였다. 세포 배양은 5% CO₂, 37°C 조건하에 air-jacketed incubator에서 배양 시켰다. 배지는 매 2-3일 주기로 교환하여 주었다. 실험에 사용된 세포는 passage 5번의 세포를 사용하였다.

혈관내피세포의 점착 및 증식 테스트

HUVECs의 점착 및 증식 실험을 위해 3 그룹의 시편을 준비하였다. sPU, ePU 그리고 대조군으로 PLGA 75 : 25 film을 직경 11.5 mm 사이즈로 준비하였다.

준비된 시편을 (n = 6) 각각 24-well plates (SPL, Korea)에 넣은 다음, 70% 에탄올에 소독 후, PBS 용액으로 2회 세척하였다. 시편이 well plate의 바닥에 붙어있지 않고 뜨는 것을 방지하기 위해 grease(Dow Corning Corp. USA)를 plate 바닥에 묻혀 시편을 고정시켰다.

점착 테스트에서는 혈관내피세포를 8 × 10⁴ cells/film의 밀도로 지지체에 seeding 하였다.¹³⁾ seeding 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 보관하여 점착을 시켜준 후, 새로운 well plate로 시편을 옮겨서 점착된 세포의 수를 Cell Counting Kit (CCK-8 assay kit, Dogindo Lab, Kumamoto, Japan)를 이용하여 측정하였다.

증식 실험에서는 시편 당 1.2 × 10⁴ cells/film 밀도의 혈관내피세포를 seeding하였다.¹³⁾ 마찬가지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 증식 된 세포는 각각 1, 3, 6일 간격으로 점착 실험과 동일한 방법으로 CCK-8 assay kit를 이용하였다.

CCK 용액 주입 후 2시간 뒤 Multiskan Ex (thermo electron corp., USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 시편에 점착된 세포의 수를 간접적으로 계산하여 구하였다.

통계학적 분석

모든 실험 데이터는 SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA (one-way analysis of variance) 분석을 통하여 신뢰도 95% (p < 0.05) 내에서 모든 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성의 차이를 비교하였다.

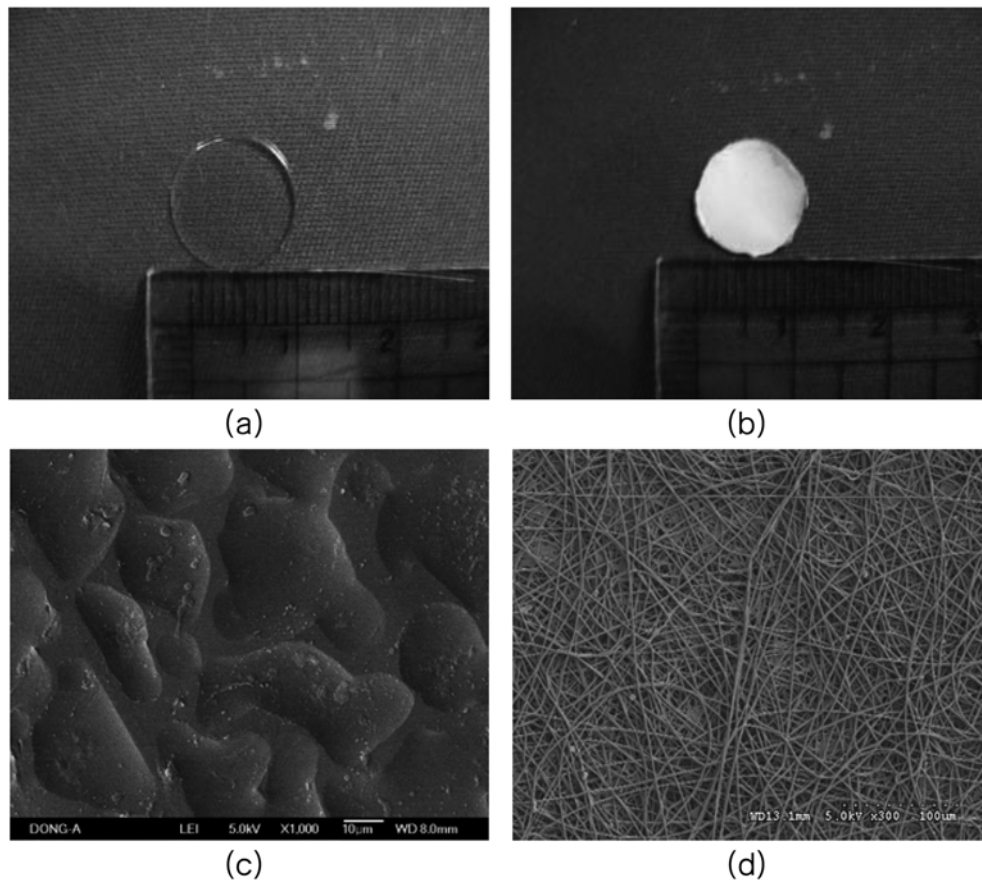


Figure 1. PU film specimens and FE-SEM image of surface of PU film. (a) sPU film, (b) ePU film, (c) SEM of sPU and (d) SEM of ePU.

Table 1. Water contact angle, measured by the sessile drop method

	ePU	sPU	PLGA
contact angle	$57.39^\circ \pm 1.84^\circ$	$64.73^\circ \pm 1.56^\circ$	$67.09^\circ \pm 1.47^\circ$

결과 및 고찰

표면 형태 분석

FE-SEM 촬영을 통해 PU film의 표면을 관찰하였다(Figure 1). sPU 시편을 살펴보면, 육안으로는 편평한 표면을 가지고 있는 것처럼 관찰되나(Figure 1(a)), 실제로는 약간의 굴곡을 가진 표면으로 되어 있음을 확인할 수 있다(Figure 1(c)). ePU 시편도 마찬가지로 육안으로는 매끈한 표면을 가지고 있으나(Figure 1(b)), SEM 사진으로는 nano-fiber 구조를 가지는 것을 확인할 수 있다(Figure 1(d)).

표면 접촉각 분석

PU film의 친수성을 알아보기 위해 준비된 시편의 접촉각을 측정하였다($n = 4$). Table 1에서 나타난 바와 같이, sPU 시편의 접촉각은 $64.73^\circ \pm 1.56^\circ$ 이고, ePU 시편은 $57.39^\circ \pm 1.84^\circ$ 를 나타냈다. 대조군으로 사용된 PLGA film은 $67.09^\circ \pm 1.47^\circ$ 를 나타냈다. ePU 시편이 sPU 시편보다 평균 약 7° 가량 낮은 결

과를 보였고, ePU가 sPU보다 상대적으로 친수성을 나타내었다. sPU 시편의 표면 구조가 미세한 요철 구조를 보이는데 비해, ePU는 fibrous한 구조로써 상대적으로 매끈한 구조를 보이는데 이러한 fiber 간의 미세한 공간이 친수성을 결정짓는 요인으로 작용한 것으로 사료된다.

역학적 특성 분석

Tensile test 및 cyclic test를 통해 PU film의 역학적 강도를 측정하여 compliance를 간접적으로 비교 분석하였다. Tensile test의 stress-strain 그래프에서 보면 sPU와 ePU의 Young's modulus 구간이 거의 유사함을 확인할 수 있다(Figure 2). Young's modulus는 재료 고유의 특성을 나타내는데, 구조를 달리하여 제작하였지만 PU 본연의 물리적 특성이 나타난 결과로 보인다. 이는 돼지 혈관과 비교하면 돼지 혈관의 Young's modulus 값과 매우 차이가 있음을 확인할 수 있다.

Cyclic test의 그래프에서는 10회 cycle 동안 변형된 에너지 값의 변화를 확인할 수 있다(Figure 3). 그래프는 각 그룹별 1회째 cycle과 10회째 cycle의 움직임 변화를 나타내었다. Table 2에 나타난 바와 같이 변형에너지(deformation energy)는 돼지 혈관(0.00034845 J)에서 가장 낮은 수치를 보였으며, ePU(0.00098600 J)가 sPU(0.0020706 J)보다 변형에너지가

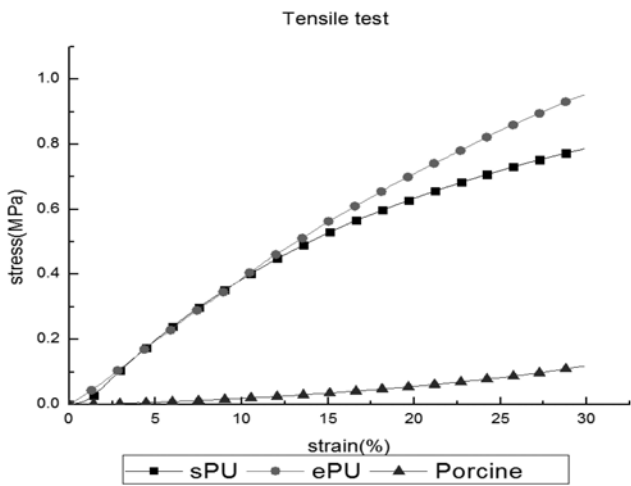


Figure 2. Tensile test graph of sPU, ePU specimens and porcine's aorta (n=4).

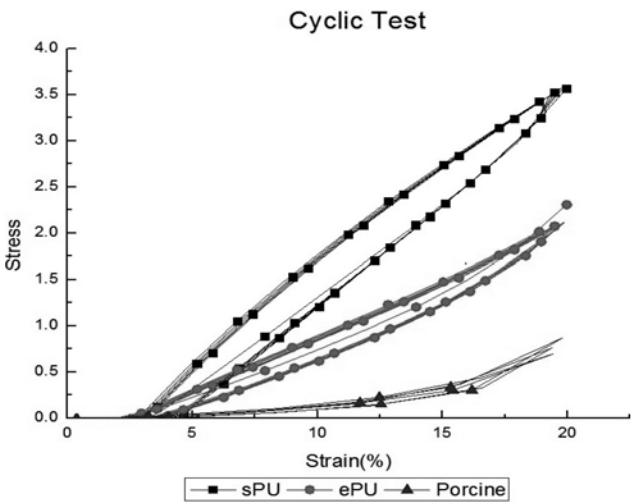


Figure 3. Cyclic test graph of sPU, ePU specimens and porcine's aorta (n=4).

낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. ePU의 변형에너지가 돼지 대동맥에 가깝게 나타난 원인은, ePU의 nano-fiber 구조의 그 물망 형태로 인해 낮은 에너지에서도 쉽게 변형을 가져오는 구조였기 때문이라 사료된다. 이러한 ePU의 구조는 sPU의 solid 한 구조보다 수축과 이완이 보다 자유로운 형태를 가진다. 따라서 sPU의 solid 한 구조는 높은 stiffness를 보이며, 이러한 높은 stiffness로 인해 변형이 일어난 후 원상태로 회복하는 반복적인 loading 과 release 과정에서 상대적으로 더 많은 에너지가 필요함을 나타내었다.

Compliance는 물질의 힘과 변형력의 비로 표시하는 물질 상수로서, 물질이 변형하기 쉬운 정도를 나타내는 양을 말하며, 변형에너지는 외부의 힘이 작용하여 변형된 탄성체에 저장되는 에너지를 말하는데, 탄성변형을 일으키는데 필요한 일과 같다. 즉, 변형에너지가 낮을수록 물질은 변형되기 쉬움을 말하는데, sPU 와 ePU, 내부 구조가 서로 다른 두 물질을 비교 했을 때,

Table 2. Young's modulus and deformation energy measurement of ePU, sPU and porcine's native vessel

	ePU	sPU	porcine
Young's modulus	3.7 N/m ²	3.5 N/m ²	1.0 N/m ²
Deformation energy	0.00098600 J	0.0020706 J	0.00034845 J

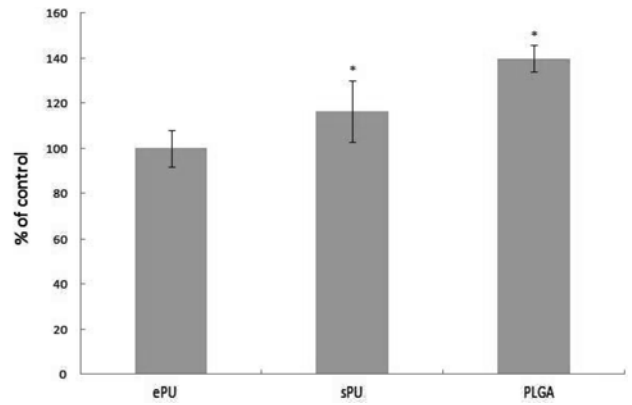


Figure 4. Attachment of HUVECs on ePU, sPU and PLGA with CCK-8 assay. ePU was compared with sPU and PLGA by one-way analysis of variance (n = 6, p < 0.05).

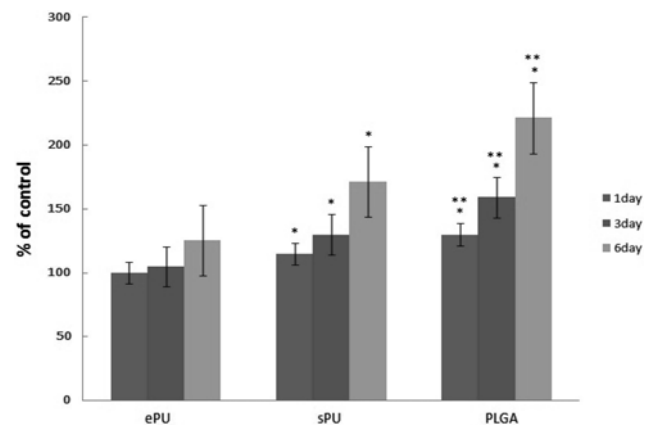


Figure 5. Proliferation of HUVECs on ePU, sPU and PLGA with CCK-8 assay. (n = 6, *p < 0.05 : compare with ePU and other groups, **p < 0.05 : compare with sPU and PLGA).

ePU 시편이 sPU 시편 보다는 돼지 혈관에 더 가까운 compliance를 보이기 때문에 혈관재료로 적용 시 더 유리한 compliance를 가질 수 있을 것으로 사료된다.

HUVECs의 점착 및 증식 실험

PU film의 구조에 따른 세포 성장의 차이를 확인하기 위해 CCK-8 kit를 이용하여 점착 및 증식테스트를 실시하였다. Figure 4와 Figure 5의 결과를 그룹(ePU, sPU, PLGA)간 비교 해 보면, 현재 scaffold로 널리 사용되는 생분해성 고분자인 PLGA 점착이 ePU(100%)와 비교하여 약 40%, 증식은 6일째 배양 후 ePU 보다 약 80% 높은 결과를 보였다. 또한 sPU 에서의 증식률이 ePU 보다 1일차에 약 15%, 3일차에 약 30%,

6일차에 약 45% 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 시간이 지날수록 sPU와 ePU의 세포 증식력은 점점 차이가 나는 것을 알 수 있고, 통계처리 결과 유의성이 있음을 알 수 있다. 그러나 sPU와 PLGA 간 6일차 증식률을 비교해보면 40% 이상 차이가 나는 것을 알 수 있었다. sPU가 ePU보다는 세포 점착 및 증식률이 좋으나, 상대적으로 PLGA 보다는 낮은 결과를 보였다. 친수성 정도를 보더라도, PLGA시편이 상대적으로 친수성이 떨어지는데 반해 세포 점착 및 증식은 더 좋은 결과를 보였다. Chen의 연구에 의하면, PU 표면에 EC의 점착을 위해서는 작용기가 중요한 역할을 하는데, lactide를 그라프트 시킨 PU 표면에 EC의 점착률이 높은 결과를 보였다.¹⁴⁾ 또한, ePU의 fiber 구조가 sPU의 dense 한 구조에 비해 미세한 공간으로 인해 세포의 점착과 증식을 방해하여 제한된 것으로 사료된다.

결 론

폴리우레탄을 제작 방법을 달리하여 구조가 다른 film을 준비한 후, 실제 조직과 역학적 강도를 비교하고, 세포 적합성을 비교, 분석하였다.

nano-fiber 형태로 제작된 PU (ePU)는 시트 형태로 제작된 PU (sPU)보다 실제 혈관에 더 가까운 compliance를 보인다. 혈관대체용으로서 compliance mismatch는 매우 중요한 요소로서, compliance mismatch를 해결하면 혈관 내 압력에 의한 접합부의 파손과 이로 인한 혈관 내부의 혈전 현상을 방지할 수 있으므로, nano-fiber 형태로 제작된 PU 지지체는 혈관용 재료로서 적합한 역학적 환경을 제공할 것으로 사료된다. 그러나 낮은 세포 적합성은 endothelium 형성이 잘 이뤄지지 못하여, 결국 혈전 현상을 일으킬 것이다. 이런 단점을 해결하기 위해서는 여러 가지 방법을 통하여 폴리우레탄의 세포 점착 및 증식률을 향상시킬 필요성이 있다.

이러한 폴리우레탄의 단점을 해결하기 위해 폴리우레탄 필름의 표면에 PLGA를 nano-fiber 형태로 코팅시킨 복합지지체로 실험이 진행 중에 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 인제대학교 학술연구 조성연구비 지원 사업에 의해 연구 되었습니다.

참고문헌

1. L. Albert, C. Arthur, J. Beall, and E. Michael. "The problem of small vessel grafting and flexion crease. A comparison between autogenous vein and Dacron grafts" *Am. J. Sur.*, **106**, 558-565 (1963).
2. American Heart Association: Heart Disease and Stroke Statistics-2003 Update. Dallas, TX, American Heart Association.
3. Baim DS. Percutaneous treatment of saphenous vein graft disease: the ongoing challenge. *J Am Coll Cardiol* **42**, 1370-1372 (2003).
4. Goldman. S, Zadina. K, et al., Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group No. 297 Predictors of graft patency 3 years after coronary artery bypass graft surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **29**(7), 1563-1568 (1997).
5. Plecha. E. J, Freischlag. J. A., et al., Femoropopliteal bypass revisited, an analysis of 138 cases. *Cardiovasc. Surg.* **4**(2), 195-199 (1996).
6. Cooper. G. J., Underwood. M. J., et al., Arterial and venous conduits for coronary artery bypass, a current review. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **10**(2), 129-140 (1996).
7. Benedetti-Valentini. F., Gossetti. B., Irace. I., Martinelli. O., Gattuso. R., Composite grafts for critical ischemia. *Cardiovasc. Surg.* **4**(3), 372-276 (1996).
8. Zippel. R., Wilhelm. L., Marusch. F., Koch. A., Urban. G., Schlosser. M., Antigenicity of polyester (Dacron) vascular prostheses in an animal model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **21**(3), 202-207 (2001).
9. Weinstein. P.R., Reinert. R.L., Brittain. F. Delayed thrombosis of synthetic microvascular bypass grafts. *Neurosurgery*, **9**(3), 268-274 (1981).
10. Madras. P. N., Johnson. W. R., Ward. C. A., Enhancement of thrombus formation by vascular prostheses. *Can. J. Surg.* **23**(6), 544-546 (1980).
11. Korematsu A., Takemoto Y., Nakaya T., and Inoue H. "Synthesis, characterization and platelet adhesion of segmented polyurethanes grafted phospholipid analogous vinyl monomer on surface" *Biomaterials*. Volume 23, Number 1, 263-271(9) (2002).
12. E. H. Cho, Y. I. Yang, C. -W. Mun, and J. K. Kim, Tissue-engineered semi-microporous segmented polyetherurethane vascular prostheses *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 16, No. 6, 775-790 (2005).
13. Hye Ryeon Lim, Hyun Sook Baek, Jong-Chul Park et al., Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films microwave-induced argon plasma, *Surface & Coatings Technology* **202** 5768-5772 (2008).
14. Shan-hui Hsu and Wei-Chih Chen, Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface. *Biomaterials* **21** 359-367 (2000).