

인슐린을 고정화한 폴리우레탄 막의 제조 및 섬유아세포와의 상호작용

맹만* · 김우식 · 이동호 · 박이순 · 강인규[†]

경북대학교 고분자공학과, *연변대학교 화학공학과 (중국)

(2004년 9월 3일 접수, 2004년 11월 12일 채택)

Preparation of Insulin-Immobilized Polyurethane Films and Their Interaction with Fibroblasts

Wan Meng*, Woo-Sik Kim, Dong-Ho Lee,

Lee-Soon Park, and Inn-Kyu Kang[†]

Department of Polymer Science, Kyungpook National University,

1370 Sangyuk-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

*Department of Chemical Engineering and Polymer Science,

Yanbian University, Yanji, 133002, China

[†]e-mail : ikkang@bh.knu.ac.kr

(Received September 3, 2004; accepted November 12, 2004)

초록 : Z-라이신 올리고머를 사슬연장제로 하고 D-다이페닐이소시아네이트와 폴리테트라메틸글리콜을 반응시켜 주사슬에 L-라이신 분절을 함유하는 폴리우레탄 (PULL)을 합성하였다. PULL 표면의 아민기와 인슐린의 공유 결합으로 인슐린 고정화 폴리우레탄 (PULL-In)을 제조하였다. Bradford법으로 측정한 고정화 인슐린의 양은 약 0.30 nmol/cm²이었다. ³H-thymidine 분석방법과 광학 현미경법으로 NIH/3T3 섬유아세포와 표면 개질된 PULL의 상호작용을 조사하였다. 그 결과 PULL-In 필름 표면에서의 세포 성장 속도는 다른 기질에서보다 높았다. 또한 고정화된 인슐린에서의 세포증식이 배양액에 용해된 인슐린에서와 거의 유사한 특성을 나타내었다.

ABSTRACT : Polyurethanes containing L-lysine segments in the main chain (PULL) were synthesized from 4, 4'-diphenylmethyl diisocyanate, poly(tetramethylene glycol), and z-lysine oligomer as a chain extender. Insulin-immobilized polyurethanes (PULL-In) were prepared by a coupling reaction of PULL surface amino groups with insulins. The amount of immobilized insulin was about 0.30 nmol/cm², as determined by Bradford method. The interactions of NIH/3T3 fibroblasts with surface-modified PULLs were investigated using ³H-thymidine incorporation and optical microscopy. The cell growth rate on PULL-In film was higher than those on other substrates. The cell proliferation by the immobilized insulin was almost same as that by the free one.

Keywords : insulin, polyurethane, fibroblasts, surface modification, proliferation.

1. 서론

최근 각종 인공장기를 중심으로 의용재료의 고기능화에 대한 요구가 점점 더 부각되고 있다. 환자들 질환중에서 수술이나 약리적으로 치유가 불가능하고 이식 등의 임상에 있어서 한계가 있는 인체장기들을 손쉽게 인공장기로 대체하여 인체기관의 기능을 대신하려고 하고 있

다. 합성고분자를 의용재료로 이용하기 위해서는 생체적 합성의 향상이 불가피하다. 특정 고분자재료로 제작한 인공장기를 인체내에 이식시켰을 때 대부분의 경우에는 생체거부반응이 일어나고 이로 인해 인체내에 부작용이 생기거나 인공장기 표면에 인체내의 여러 단백질이나 혈액 성분들이 흡착됨으로써 본래 목적하였던 장기의 기능이 저하하게 된다.¹ 따라서 고분자재료를 인체내 조직세포들

과 친화성을 갖도록 표면을 개질하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

의료용 폴리우레탄은 주로 비발포성 탄성체인 분절화 폴리우레탄 (SPU)을 말한다. SPU는 “딱딱한 분절”인 방향족 디아이소시아네이트와 사슬연장제인 저분자 지방족 다이아민 또는 다이올, “연한 분절”인 지방족 폴리다이올 영역으로 미세상분리된 구조로 되어 있다.²³ 따라서 딱딱한 분절 또는 연한 분절 조성을 바꿈으로써 여러 가지 물리적 및 기계적 특성을 갖는 SPU를 얻을 수 있어 다른 범용고분자보다 우수한 물리적 특성 즉, 강도, 유연성, 인장 후에 빠른 회복 속도, 굴곡 견딤성, 그리고 내피로 강도를 갖는 PU을 얻을 수 있다.⁴⁵ 또한 SPU는 미세상분리 구조를 가짐으로써 다른 범용고분자보다 생체적합성이 우수하다.

고분자재료 표면의 생체적합성을 향상시키기 위한 연구가 많이 진행되어 왔으며 이들 방법은 인체내의 환경과 거의 비슷하게 만들어 주는 생물학적 개질법과 물리화학적 개질법으로 크게 나뉜다. 생물학적 개질법으로는 헤파린, 프로스타그란딘, 알부민과 같은 생리활성 물질을 고정화하여 생체적합성을 향상시키는 방법이 있다.⁶⁹ 물리화학적 개질법으로는 하이드로젤 등을 이용하여 친수성 표면으로 개질시키는 방법,¹⁰⁻¹² 실리콘이나 불소고분자를 이용하여 소수성 표면으로 변성시키는 방법, PU나 폴리스티렌/폴리(하이드록시 메타크릴레이트) 블록공중합체 등과 같은 미세상분리된 구조를 갖게 하는 방법,¹³ 재료 표면을 술폰 그룹과 같은 음이온을 갖게 하여 헤파린과 같은 생리활성을 나타내도록 하는 방법,^{14,15} 유동성이 큰 폴리(에틸렌 옥사이드) 사슬을 그라프트하는 방법,¹⁶ 그리고 재료 표면을 인지질의 극성 그룹을 갖게 함으로써 생체유사막 표면으로 만들어 주는 방법 등이¹⁷ 있다. 인슐린은 세포성장인자로서 알려져 있으며 많은 연구자들이 이를 재료 표면에 도입시켜 세포증식 거동을 조사하였다. 즉 Choi 등은¹⁸ 폴리에스터 표면에 공유 결합법으로, Mansur 등은¹⁹ 유리표면에 물리적 흡착법으로 인슐린을 고정화하였다.

본 연구에서는 폴리 L-라이신을 사슬연장제로 이용하여 폴리우레탄 (PULL)을 합성하였고 이를 DMF에 용해시켜 필름을 제조한 후 가수분해를 통하여 표면에 아민기를 도입하였다. 아민기가 도입된 폴리우레탄 (PULL-N) 필름 표면에 생리활성 물질인 인슐린을 공유 결합시켰다. 각 관능기의 도입은 attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) 분광분석법과 electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA)로 확인하였다. 또 인슐린이 고정화된 PULL 필름 표면에서 섬유아세포의 점착과 성장 거동 및 형태 등을 조사하였다.

2. 실험

시약. 폴리우레탄 (SPU)합성에 이용한 4,4'-다이페닐메탄 디아이소시아네이트 (MDI)와 촉매인 디이-n-부틸틴 다이로레이트 그리고 폴리라이신 합성에 이용된 염화카보벤조일은 Wako Chem. Co. (Japan)사의 제품을, 폴리(테트라메틸 글리콜) (PTMG, MW 1000)은 Polyscience Co.(USA)의 제품을 사용하였다. L-(+)-라이신 염산염은 Tokyo Kasei Kogyo Co.(Japan)의 제품을, 수용성 카르보디이미드 (WSC), 인슐린 (bovine pancreas, 28.5 USP units/mg)은 Sigma Chem. Co.(USA)의 제품을 사용하였다. 세포의 점착과 성장의 측정을 위해 사용된 ³H-thymidine (specific activity: 925GBq/mmL)은 Sigma Chem. Co. 사의 제품을, 우태아혈청 (FCS)은 Gibco BRL(USA)사의 제품을 이용하였다.

L-라이신을 함유한 폴리우레탄 (PULL)의 합성.²⁰ PTMG 10 g을 삼구 플라스크에 넣고 30 °C에서 DMF 10 mL을 이용하여 녹인 후 MDI 3.75 g을 넣고 완전히 용해시켰다. DMF 8 mL에 디이-n-부틸틴 다이로레이트 0.1 mL을 녹인 후 반응기에 0.1 mL를 취해 투여하고 온도를 60 °C, 1시간 동안 PU 전구체를 제조하였다. 한편, 본 연구실에서 L-(+)-라이신 염산염과 염화카보벤조일을 이용하여 합성한 디이-z-라이신으로 합성된 LysNCA 14.5 g을 DMF에 녹이고, DMF에 0.3 mL 에틸렌디아민을 녹인 용액을 투입하여 2시간 반응시켜 NCA 전구체를 제조하였다. PU 반응기에 사슬연장제로 NCA 전구체를 2 cc씩 취해 넣어주었다. 그리고 부틸아민을 DMF에 충분히 희석시킨 용액을 넣어 반응을 완결시킨 후 증류수에 침전시키고 메탄올로 용매치환 후 진공건조하였다 (Figure 1).

필름 제조. DMF를 용매로 하여 10 w/v%의 PU 용액을 제조하고 유리판 (6×6 cm²) 위에 유연시킨 후 적외선 램프 (40 °C) 하에서 용매를 서서히 증발시켜 필름을 제조하였다. PULL 필름은 20 w/v%의 용액으로 녹여 위와 같은 방법으로 필름을 제조하였다.

표면 개질. 필름 표면에 아민기를 도입하기 위하여 10% 브롬화수소/아세트산 용액에 필름을 일정 시간 (30 s) 동안 담구어 둔 후 에틸에테르, 에탄올로 세척하고 탄산수소나트륨 수용액에 침적시키고 증류수 세척하여 진공건조하였다.

PULL-N의 아민기와 인슐린의 카복시기를 1-에틸-3-디이메틸 이미도프로필 카보디이미드 (WSC)를 이용하여 공유 결합시켜 인슐린이 고정화된 필름을 얻었으며 0.075 M, pH 4.7의 구연산 나트륨 수용액 80 mL에 인슐린을 0.1 g을 넣어 녹인 후 WSC 80 mg을 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 인슐린의 카복시기를 활성화하였다. 이 용액에 PULL-N 필름을 침적시키고 24시간 동안 4 °C에서 인슐

린을 고정화하였다. 이상의 반응식을 Figure 2에 나타내었다. 고정화된 인슐린의 양은 Bradford 법으로²⁰ 정량하였다.

표면 분석. PULL, PULL-N, 및 PULL-In 필름의 표면을 정성분석하기 위해 ESCA (ESCA LAB VIG microtech, MT 500/1 etc, East Grin, UK)와 ATR-FTIR (JASCO-620, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 필름 표면의 접촉각을 접촉각 측정계 (Erma, G-1 type, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 각 시료마다 20 ± 3 °C에서 5번 이상 위치를 바꾸어 측정하여 그 평균값을 물의 접촉각으로 사용하였다.

세포 배양 및 점착. 계대 배양중인 NIH/3T3 cell (Korean

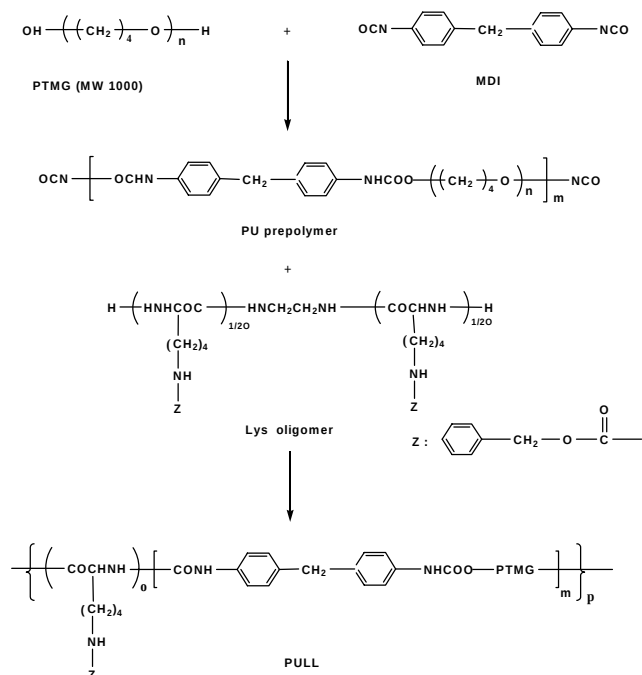


Figure 1. Synthesis of polyurethane containing L-lysine segments

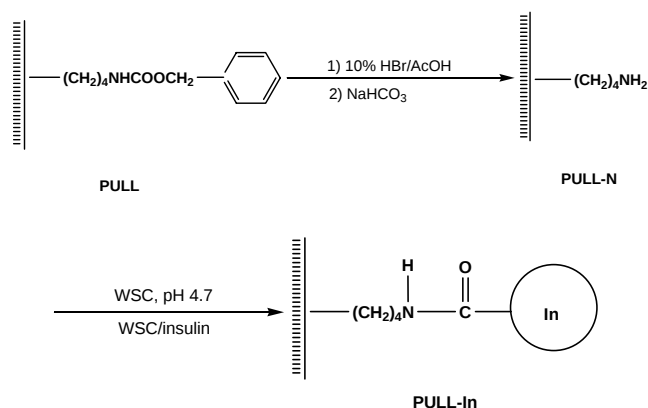


Figure 2. Schematic diagram showing surface hydrolysis and insulin grafting.

Cell Line Bank, KCLB 21658, Seoul, Korea)에 trypsin-EDTA 1 mL을 첨가하여 세포를 확인하였다. 원심분리된 세포는 hemocytometer (Nikon ECLIPSE TS 100, Tokyo, Japan)로 세포 수를 센 다음 100×20 mm 세포 배양 dish에 3×10^5 개씩 파종하였다. 표면 개질된 PULL 필름을 세포 배양 용 24 well에 넣고 알코올 멸균을 하였다.

세포의 수가 0.5×10^5 cells/mL 되도록 세포액을 묻혀 사용하였으며 PU 필름 표면에서 FCS와 칼슘 이온이 세포 점착에 주는 영향을 조사하였다. 세포가 현탁된 배양액을 1 mL 취하여 멸균해 놓은 PULL 필름에 주입하고 5% CO₂ 배양기에서 일정 시간 동안 배양하여 현미경으로 세포 거동을 관찰하였다.

세포 성장. 세포 증식을 조사하기 위하여 ³H-thymidine의 결합량으로 세포의 증식을 평가하는 방법을²¹ 이용하였다. 즉, 1.5×10^5 cells/mL의 세포 현탁액을 1 mL 취하여 멸균해 놓은 재료가 들어 있는 24 well dish에 주입하고 6시간 배양한 후 ³H-thymidine의 최종 농도를 0.5 μ Ci/mL로 맞추었다. 계속해서 배양기에서 42시간 배양한 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 10% 삼염화초산 (TCA) 1 mL를 넣어 세포의 탈수 및 침전 반응을 3회 행한 후 0.3 N NaOH/1% 소듐 도데실설페이트 (SDS) 용액 300 μ L를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 이를 scintillation vial에 옮기고 톨루엔/Triton X-100 (3/1 v/v)의 혼합액에 2, 5-디페닐옥시졸 (1 g/L)과 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene (75 mg/L)을 넣어 만든 cocktail 용액을 2 mL 투입하였다. 그리고 vortex 혼합기로 섞은 후 β -섬광 계수기로 결합된 ³H-thymidine의 양을 측정하였다.

고정화되지 않은 인슐린과 고정화 인슐린이 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 한쪽 24 well dish에는 인슐린이 고정화된 PULL 필름을 넣고, 다른 24 well dish에는 고정화되지 않은 PULL 필름을 넣고 고정화된 인슐린의 양만큼 인슐린을 녹인 배양액을 이용하여 실험하였다. 이때 고정화된 인슐린의 양은 0.30 nmol/cm² 이었다. 사용한 PULL 필름의 면적은 1.77 cm² 이므로 배양액 1 mL에 0.54 nmol 고정화되지 않은 인슐린을 넣어서 실험을 행하였다.

세포 형태 관찰. 세포의 형태를 관찰하기 위해 광학 현미경 사진을 촬영하였다. 세포성장 측정할 때와 같은 농도의 세포를 멸균해 놓은 재료가 들어 있는 24 well dish에 넣은 후 3시간, 48시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 세포를 배양하여 광학 현미경으로 촬영하였다.

3. 결과 및 토론

고정화된 인슐린의 정량. 인슐린이 고정화된 PULL-In

필름을 Bradford 법을 이용하여 색소정량법으로 인슐린을 정량하였다. 그 결과 고정화된 인슐린의 양은 0.30 nmol/cm^2 이었다. Kim 등은²² 플라즈마 글로우 방전법으로 폴리우레탄 표면에 아민기를 도입하고, 도입된 아민기의 양이 증가함에 따라 고정화된 인슐린의 양이 0.025에서 0.09 nmol/cm^2 까지 증가됨을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 공중합법을 이용하여 겔사슬에 아민기를 도입함으로써 더욱 많은 인슐린을 표면에 도입할 수 있음을 확인하였다.

개질고분자의 표면 분석. PULL 및 표면 개질한 필름들의 표면 분석을 위해 ATR-FTIR을 이용하였다. Figure 3은 PULL, PULL-N, PULL-In 필름의 ATR-FTIR 스펙트라를 보이고 있다. PULL에서는 겔사슬의 벤질옥시카보닐기의 C=O 그룹의 피크가 1690 cm^{-1} 부근에서 강하게 나타났던 것이 PULL-N 필름에서는 감소됨으로써 가수분해에 의해 벤질옥시카보닐기가 감소됨을 알 수 있었고, 또 가수분해로 인하여 표면의 펩티드 그룹이 재배열됨으로써 아마이드 I (1650 cm^{-1})의 특정 피크에 변화가 생김을 알 수 있었다. 그러나 표면에 인슐린을 도입한 후에는 펩티드 그룹의 특정 피크들의 겹침으로 인하여 현저한 변화가 보이지 않았다.

Figure 4는 PULL, PULL-N, PULL-In 필름의 ESCA survey scan 스펙트라를 나타내었다. 위의 그림으로부터 계산된 표면의 원소조성을 Table 1에 나타내었다. ESCA 결과로부터 알 수 있듯이 PULL은 가수분해되면서 표면의 산소함량이 증가하였고 또 표면에 인슐린이 고정화되면서 0.4%의 황 피크가 나타났다.

고분자 표면의 적심성은 재료의 친수성 정도를 알 수 있는 요소이다. 그러나 친수성의 정도가 너무 높거나 낮은 경우 세포의 초기점착을 억제시키게 된다. 본 실험에서

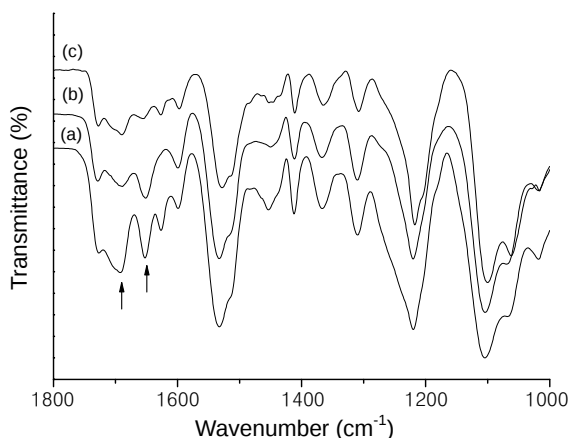


Figure 3. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectra of (a) PULL, (b) PULL-N, and (c) PULL-In films.

는 개질 PULL 필름 표면의 접촉각을 측정하여 Table 2에 나타내었다. PULL의 접촉각이 69° 로 가장 높았고 표면에 아민기를 도입함으로써 48° 로 낮아졌다. 또한 친수성 고분자인 인슐린을 도입됨으로써 접촉각이 더욱 감소하여 40° 를 나타내었다.

표면 개질된 PULL 필름과 섬유아세포의 상호작용. Figure 5는 배양액 (혈청 존재, 37°C)의 칼슘 이온을 제거했을 때와 제거하지 않았을 때 점착률을 측정한 결과이다. 그림에 나타내었듯이 칼슘 이온을 제거하였을 때 (PULL 4.78%, PULL-N 7.7%, 및 PULL-In 10.2%)보다 칼슘 이온이 존재할 때 (PULL 21.4%, PULL-N 30.2%, 및 PULL-In 67.8%)와 비교하여 매우 낮은 점착률을 나타냈다. 이는 세포막과 고정화된 인슐린 사이에 촉매작용을 하는 칼슘 이온이 존재하지 않으므로 세포 점착에 영향을 준 것으로 생각된다. Figure 6은 혈청이 세포 점착에 주는 영향 (37°C ,

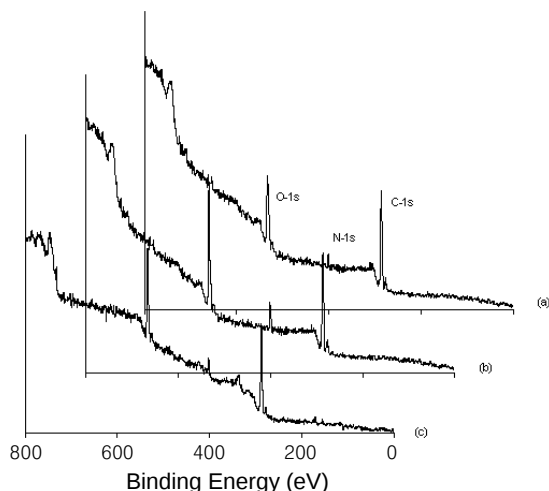


Figure 4. Electron spectroscopy for chemical analysis survey scan spectra of (a) PULL, (b) PULL-N, and (c) PULL-In films.

Table 1. Chemical Composition of Surface-Modified PULLs Calculated from ESCA Survey Scan Spectra

Sample	Atomic Percentage (%)			
	C	O	N	S
PULL	72.4	24.8	2.8	
PULL-N	69.2	28.8	2.0	
PULL-In	67.8	29.6	2.2	0.4

Table 2. Water Contact Angle of Surface-Modified PULL Films

Sample	Water Contact Angle ($^\circ$)
PULL	69 ± 3
PULL-N	48 ± 3
PULL-In	40 ± 4

칼슘 이온 존재)을 측정된 결과이다. 그림에서 볼 수 있듯이 혈청이 첨가되었을 때 상대적으로 많은 세포 점착률을 나타내었다.

Figure 7은 세포를 48시간 배양한 후 ^3H -thymidine 결합방법에 의해 세포 성장을 측정된 결과이다. 이때 ^3H -thymidine 결합량은 β -섬광 계수기에 의해 분당 방사량 (count per minute, cpm)의 단위로 측정되며, 이 값은 직접적으로 세포의 성장과 비례하는 것으로 볼 수 있다. 그림에 나타내었듯이 인슐린이 도입된 PULL-In ($P < 0.05$)에서 세포 증식이 다른 재료와 비교하여 볼 때 증가하였다. Figure 8에 고정화 인슐린과 고정화되지 않은 인슐린이 세포 성장에 어떠한 차이를 가지는지를 ^3H -thymidine 결합법으로 측정된 결과이다. 고정화된 인슐린과 고정화되지 않은 인슐린 모두에서 12시간 이내에서는 세포 성

장이 촉진되었으나 두 경우 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다.

세포의 형태를 관찰하기 위해서 일정시간 동안 5%, 37 °C 배양기에서 배양한 후 PBS로 세척하고 광학 현미경으로 관찰하였다. Figure 9는 표면 개질된 PULL 필름에서 세포를 3시간 배양한 후의 광학 현미경 사진으로 세포의 점착실험의 결과와 마찬가지로 PULL-N에서와 PULL-In에서 상대적으로 많은 점착을 나타내었다. 그리고 PULL-In에서 점착된 세포 퍼짐이 진척된 것으로 보아 이미 세포성장 단계에 들어갔음을 알 수 있다. Figure 10은 48시간 배양한 후의 광학 현미경 사진으로 PULL에서는 그 세포 형태가 거의 변화가 없지만 PULL-N에서는 일정한 퍼짐이 일어났음을 알 수 있었으며 PULL-In에서는 많은 양의

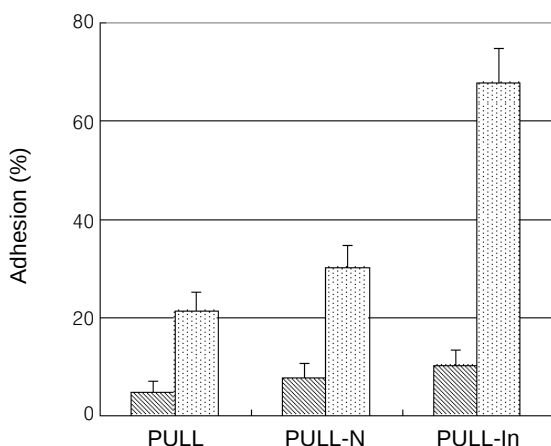


Figure 5. Adhesion of fibroblasts on the PULL films after 2 h incubation at 37 °C with (▨) and without (▤) calcium.

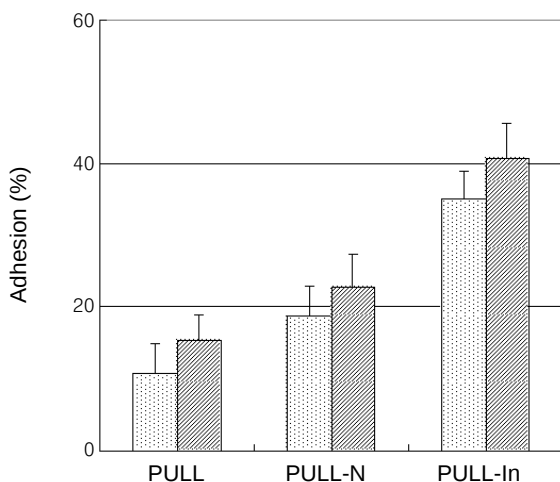


Figure 6. Adhesion of fibroblasts on the PULL films after 2 h incubation at 37 °C with (▨) and without (▤) serum.

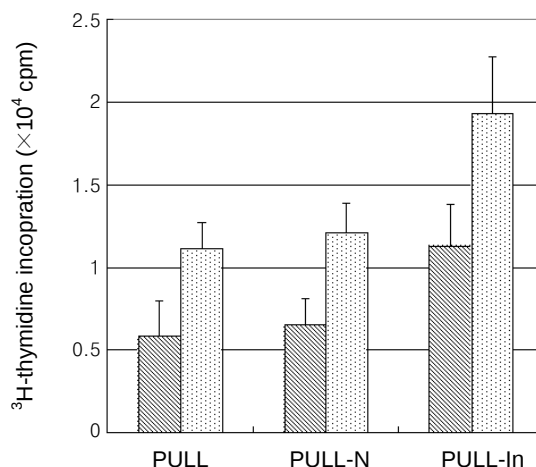


Figure 7. Proliferation of fibroblasts on surface-modified PULL films after 48 h incubation without (▨) and with (▤) serum.

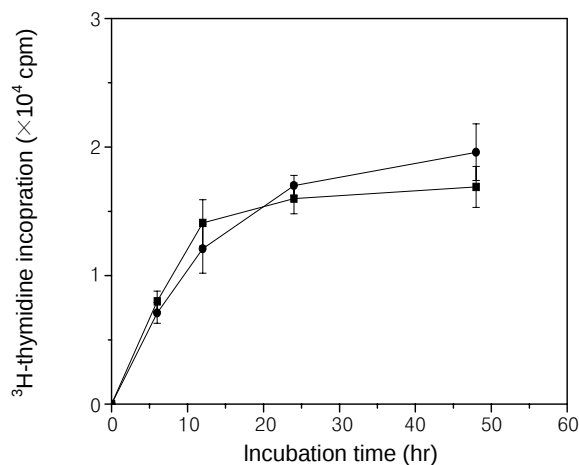


Figure 8. Influence of free and immobilized insulin on the proliferation of fibroblasts: (●); immobilized insulin and (■); free insulin.

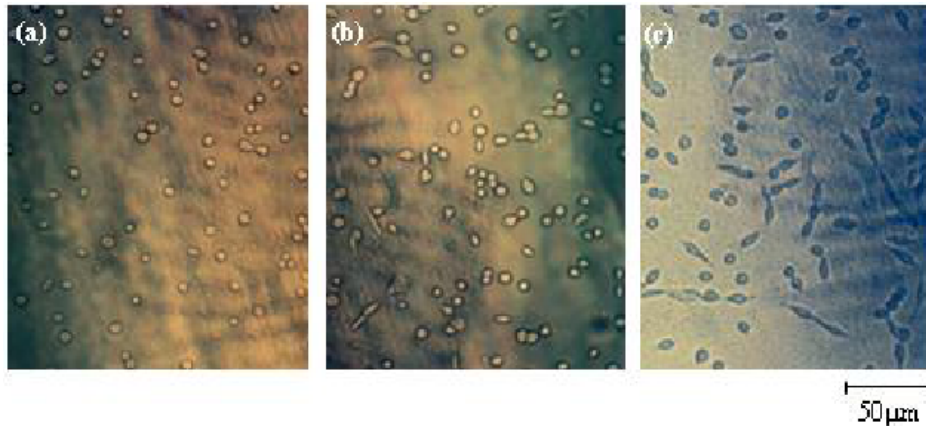


Figure 9. Phase-contrast microphotographs of fibroblasts cultured for 3 h on surface modified PULL films : (a) PULL, (b) PULL-N, and (c) PULL-In ($\times 100$).

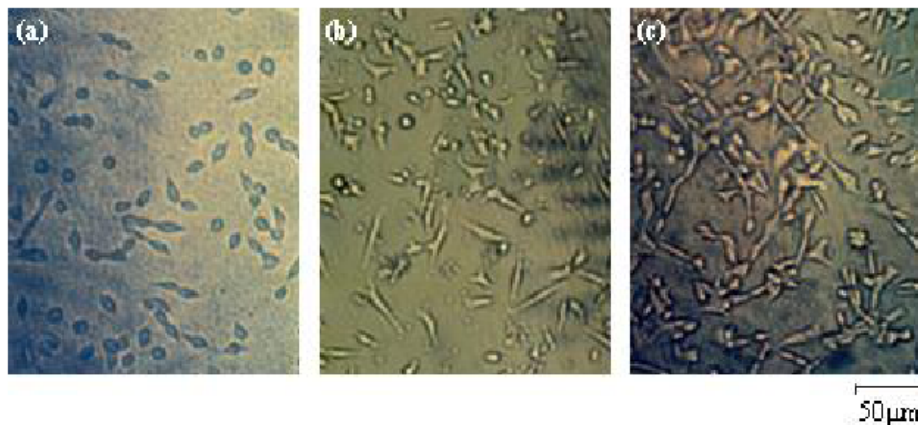


Figure 10. Phase-contrast microphotographs of fibroblasts cultured for 48 h on surface modified PULL films : (a) PULL, (b) PULL-N, and (c) PULL-In ($\times 100$).

세포가 성장되었음을 알 수 있었다.

4. 결론

PULL 필름의 조직적합성을 향상시키기 위하여 필름 표면을 가수분해하여 아민기를 도입한 후 여기에 WSC를 이용하여 성장 인자인 인슐린 (0.3 nmol/cm^2)을 공유 결합시켰고, 표면 개질된 PULL 필름의 접촉각을 측정 결과 PULL은 69° 였으나 PULL-N와 PULL-In는 각각 48° 와 40° 로 친수화됨을 알 수 있었다. 그리고 인슐린을 고정화한 PULL-In 필름에서 세포 거동을 조사한 결과 세포 부착과 성장이 상대적으로 우수하게 나타남을 확인하였다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부의 첨단 진단/예측 의료기술 클러스터의 재정지원에 의해 이루어졌으며 이

에 감사드린다. 또한 BK21의 지원에도 감사드린다.

References

1. R. E. Baier, *Bull. NY Acad. Med*, **48**, 257 (1972).
2. W. Marconi, A. Piozzi, and D. Romoli, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, **8**(4), 237 (1996).
3. M. Szycher, "High Performance Biomaterials", Technomic Publishing Company., Inc, Lancaster (1991).
4. J. H. Chen, J. Wei, C. Y. Chang, R. F. Laiw, and Y. D. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**(4), 633 (1998).
5. N. M. K. Lamba, K. A. Woodhouse, and S. L. Cooper, "Polyurethanes in Biomedical Application", CRC, Boca Raton, FL (1998).
6. O. H. Kown, Y. C. Nho, and C. Jue, *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**(7), 1726 (2003).
7. T. Daniele, B. Enzo, D. N. Marta, D. M. Rocco, and R.

- Giuseppe, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **241**(8), 625 (2003).
8. M. A. Belisario, S. Tafuri, C. D. Domenico, R. D. Morte, C. Squillacioti, A. Lucisano, and N. Staiano, *Biochim. Biophys. Act.*, **1497**(2), 227 (2000).
9. M. C. L. Maritins, D. Wang, J. Ji, L. Feng, and M. A. Barbosa, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, **14**(5), 439 (2003).
10. B. D. Ratner and A. S. Hoffman, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **31**, 1 (1976).
11. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Jeon, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **24**, 869 (2000).
12. S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **24**, 877 (2000).
13. T. Okano, S. Nishiyama, I. Shinohara, T. Akaike, Y. Sakurai, K. Kataoka, and T. Tsuruta, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**, 393(1981).
14. D. K. Han, S. Y. Jeong, and Y. H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res., Appl. Biomater.*, **23**, 211 (1989).
15. J. S. Choi, S. J. Lee, J. W. Jang, G. Khang, Y. M. Lee, B. Lee, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **27**, 397 (2003).
16. Y. Mori, S. Nagaoka, H. Takiuchi, T. Kikuchi, N. Noguchi, H. Tanzawa, and Y. Noishiki, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **28**, 459 (1982).
17. K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watanabe, and T. Nakabayshi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 1069 (1990).
18. I. K. Kang, S. H. Choi, D. S. Shin, and S. C. Yoo, *Int. J. Biol. Macromol.*, **28**(3), 205 (2001).
19. H. S. Mansur, Z. P. Lobato, R. L. Orefice, W. L. Vasconcelos, C. Oliveira, and L. J. Machado, *Biomacromolecules*, **1**(4), 789 (2000).
20. W. Meng, J. H. Hyun, D. I. Song, and I. K. Kang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **90**, 1959 (2003).
21. J. J. Sendemark and S. E. Grossbery, *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
22. E. J. Kim, I. K. Kang, M. K. Jang, and Y. B. Park, *Biomaterials*, **19**, 239 (1998).