

시스틴으로 화학흡착된 금 코팅 니티놀 표면에 양쪽성 이온 폴리에틸렌글리콜의 그래프트 및 특성 평가

신흥섭*** · 박귀덕* · 김재진* · 김지흥**,*† · 한동근**,*†

*한국과학기술연구원 바이오소재연구센터, **성균관대학교 화공과
(2008년 10월 7일 접수, 2008년 10월 28일 수정, 2008년 10월 29일 채택)

Grafting and Characterization of Zwitter Ionic Poly(ethylene glycol) on Gold-Coated Nitinol Surface Chemisorbed with L-Cysteine

Hong Sub Shin***, Kwideok Park*, Jae-Jin Kim*,
Ji Heung Kim**,*†, and Dong Keun Han**,*†

*Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

**Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University,
300 Cheoncheon-dong, Jangan-gu, Suwon, Gyeonggi-do 440-746, Korea

(Received October 7, 2008; Revised October 28, 2008; Accepted October 29, 2008)

초록: 니티놀(Nitinol) 합금(TiNi)은 혈관 스텐트로서 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 니티놀 합금의 혈액적 합성을 개선시키기 위해서 화학적인 표면개질을 행하였다. 먼저 니티놀의 표면을 금으로 코팅한 다음 시스틴(L-cysteine, C/N)을 화학흡착한 후 신규 합성한 양쪽성 이온 폴리에틸렌글리콜(PEG) (PEG-N⁺-SO₃⁻)을 그래프트시켜서 TiNi-C/N-PEG-N-S를 제조하였다. 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 니티놀의 표면은 ATR-FTIR, ESCA 및 SEM을 통해서 확인하였고 친수성 표면은 물 접촉각의 감소를 통해서 입증하였다. 또한, 단백질 흡착 및 혈소판 점착과 혈액응고시간 측정과 같은 혈액적합성 평가 결과로부터 미처리 니티놀 합금에 비해서 표면개질된 니티놀 합금이 상대적으로 훨씬 우수한 혈액적합성을 나타내었다. 이는 그래프트된 친수성 PEG와 항응혈성 양쪽성 이온의 상승효과에 의해서 혈액적합성을 대폭 개선시킨 것으로 사료된다.

Abstract: Nitinol alloy (TiNi) has been widely used in vascular stents. To improve the blood compatibility of Nitinol alloy, its surface was chemically modified in this study. Nitinol was first coated with gold, then chemisorbed with L-cysteine (C/N), and followed by grafting of zwitter ionic poly(ethylene glycol) (PEG) (PEG-N⁺-SO₃⁻) to produce TiNi-C/N-PEG-N-S. The zwitter ionic PEG grafted on the Nitinol surface was identified by ATR-FTIR, ESCA and SEM. The hydrophilized surface was proven by the decrease of water contact angle. In addition, from the blood compatibility tests such as protein adsorption, platelet adhesion, and blood coagulation time, the surface-modified TiNi alloy exhibited a better blood compatibility as compared to the untreated Nitinol control. These results indicated a feasibility of synergistic effect of hydrophilic PEG and antithrombotic zwitter ion.

Keywords: vascular stent, nitinol, chemisorption, zwitter ionic PEG, blood compatibility.

서 론

스텐트(stent) 시술은 말초혈관 폐쇄성 질환을 치료하기 위해서 일반적으로 시술하는 방법이다. 그러나, 이 시술의 장기적인 성공은 말초동맥에 스텐트 시술을 받았던 환자들 중 약 40%의 환자가 신생혈관내막의 과다형성때문에 스텐트 내에 만성적인 재협착증(restenosis)이 일어나 여전히 제한적으로 사용되고 있다.¹⁻³ 재협착증은 혈관성형술 또는 스텐트 시술 위치에서 섬유조직의 성장때문에 혈관이 다시

좁혀지는 현상으로, 혈관이 재협착되면서 말초동맥 질병과 관련된 증상들이 일어나는 것이다. 혈액 구성요소의 비선택적인 흡착은 혈액접촉 장치의 기능을 현저히 저해하기 때문에 스텐트의 표면은 우수한 혈액적합성을 가지고 있어야만 한다.

니켈-티타늄 합금인 니티놀은 초탄성과 형상기억의 특성때문에 의학적인 분야에 많이 사용되고 있다. 현재 자동 팽창 혈관 스텐트는 초탄성이 필요한 대정맥 필터 및 와이어 등에 응용되고 있다.^{4,5} 일반적으로 니켈은 과민증 반응과 조직 괴사를 유발하는 것으로 알려져 있고 니켈 이온은 암을 유발하는 것으로 추정하고 있다.⁶ 그러나, 니켈-티타늄 합금은 주로 티타늄 산화물과 부식을 막는 니켈

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: dkh@kist.re.kr, kimjh@skku.edu

로 이루어진 표면 산화막때문에 많은 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해서 안정성과 생체적합성이 크게 개선된 것으로 보고되고 있다. 이러한 표면 산화층은 금속 스텐트를 이식한 후 순환하는 혈액과 접촉 하면서 생체조직에 많은 영향을 끼칠 수 있다. 그러나, 금속물질의 다결정 산화물은 생리유사액에서 낮은 부식저항성을 갖고며 혈액에 이식 후 상호작용하면서 양전하 이온이 방출될 수도 있다. 따라서, 이식 후 스텐트에서 방출된 양전하 금속 이온은 섬유소의 활동, 심각한 혈전 생성, 섬유아세포의 성장 자극, 단백질 흡착과 혈소판 점착 및 세포독성의 원인이 될 수 있다.⁷

혈액적합성 생체재료를 개발하기 위하여 혈액에 접촉하는 표면의 화학적인 개질을 많이 연구하고 있다. 이 중 poly(ethylene glycol) (PEG)은 우수한 혈액적합성, 친수성 고분자, 입체 안정성, 사슬 운동 효과가 있어서,⁸ PEG와 같은 친수성 고분자를 사용한 표면개질된 혈액적합성 생체재료는 단백질 흡착과 혈소판 및 세포 점착을 감소시킨다.^{9,10} 또한, PEG는 유연한 친수성 사슬의 운동으로 인하여 세포와 단백질이 붙지 않게 하는 독특한 특성을 갖고 있으며 무독성과 무면역원성을 나타내고 있다.^{11,12} 한편, 표면개질 방법에는 단순한 물리적 흡착, 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer, SAM),^{13,14} 화학적 커플링,^{15,16} 그래프트 중합 등이¹⁷⁻¹⁹ 알려져 있다. 규소 또는 금/황 화합물들을 사용한 SAM 방법은 유리, 금속 그리고 고분자 개질에 적용되면서 여러 방면에서 연구되어지고 있다. Whitesides 등에^{20,21} 따르면 PEG로 구성된 자기조립단분자층은 단백질 흡착을 감소시킨다고 보고하였다. SAM 방법을 통해서 PEG를 그래프트한 표면은 고분자와²² 금속, 유리²³ 등에 응용해 왔다. 이러한 모든 연구에서 단백질 흡착과 혈소판 점착이 감소되었고 이로 인하여 혈액적합성이 개선됨을 증명하였다. 한편, 설포베타인(-N⁺-SO₃⁻)은 생체막 인지질과 같이 잘 규명된 양쪽성 이온(zwitter ion) 고분자와 유사한 특성을 갖기 때문에 혈액적합성이 우수하다고 알려져 있다.²⁴⁻²⁷

이전 결과로서 본 연구팀은 술포산화 PEG가 그래프트된 폴리우레탄과 생체재료를 제조한 바 있으며 술포산의 음이온과 PEG의 유동성의 상승효과에 의한 음이온 섬모(negative cilia) 작용에 의해 생체적합성이 대폭 개선됨을 확인하였다.^{24,28} 따라서, 이번 연구에서는 양쪽성 이온 PEG(zwitter ionic PEG)을 합성하여 혈관 스텐트로 사용되고 있는 니티놀에 적용시켜서 혈액적합성을 개선시키려 시도 하였다. 먼저, 니티놀의 표면을 금으로 코팅한 다음 SAM을 통해 표면개질하고 여기에 양쪽성 이온 PEG(PEG-N⁺-SO₃⁻)를 그래프트시킨 후 처리하지 않은 control과 표면특성 및 혈액적합성을 비교하였다.

실 험

재료 및 시약. 혈관 스텐트용 금속으로 니티놀 합금(10×10×0.5 mm³, SMA Co., Korea)을 전기화학적으로 연마하여 사용하였다. 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 2000), hexamethylene diisocyanate (HDI), *N,N*-dimethylethanolamine (DMEA), 시스틴(L-cysteine, C/N), 알부민(bovine serum albumin, fraction V) 및 피브리노겐(human fibrinogen)은 Aldrich(USA)에서 구입하였고 di-*n*-butyltin dilaurate (DBTDL)와 propane sultone (PST)은 동경화성(Japan)에서 구입하였다. 또한, 혈소판 농축액(platelet concentrate, PC)과 신선 동결혈장(fresh frozen plasma, FFP)은 한국적십자사 동부혈액원에서 구입하였다. Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 검출 시약은 Sigma(USA)에서 구입하였고 Lactate dehydrogenase (LDH) 세포독성 검출 시약은 Takara(Japan)에서 구입하였다. 그밖의 시약은 1급 제품을 그대로 사용하였다.

양쪽성 이온 PEG의 합성. 양쪽성 이온 PEG는 이전 방법으로 합성하였으며²⁹ 간단히 기술하면 다음과 같다. 먼저, PEG에 HDI를 반응하여 디이소시아네이트기(-NCO)를 PEG의 양쪽말단에 작용기로 도입하고(NCO-PEG-NCO) 계속해서 한쪽말단에 DMEA를 결합하여 삼차 아민기(-N-(CH₃)₃)를 유도하였다(NCO-PEG-N). 최종적으로 프로판 술포톤의 개환반응에 의해서 술포산기(-SO₃⁻)를 결합하여 양이온과 음이온이 함께 있는 양쪽성 이온 PEG(NCO-PEG-N⁺-S⁻)를 합성하였다.

양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 니티놀 제조. 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 니티놀 합금(TiNi) 시편의 표면개질 모식도를 Figure 1에서 나타내었다. 먼저, 니티놀 합금을 증류수로 세척하고 건조한 다음 Ar 가스로 400 eV에서 30분간 플라즈마 표면처리를 한 후 600 eV에서 5분간 스퍼터링 과정을 통해서 표면에 금을 코팅하였다(TiNi-Au). 금 코팅된 니티놀 합금은 증류수로 상온에서 세척해서 불순물을 제거하였다. 티올(thiol) 함유 화합물인 시스틴(C/N로 표기함)을 3차 증류수에 넣어 1 mM의 수용액으로 만든 후 금 코팅된 니티놀 시편을 수용액에 넣고 24시간 동안 상온에서 반응시킨 다음 진공오븐에 넣고 24시간 동안 건조하여 TiNi-COOH/NH₂(TiNi-C/N)를 제조하였다. 미리 합성한 양쪽성 이온 PEG(NCO-PEG-N⁺-S⁻) 0.2 g과 magnesium stearate 0.002 mL 촉매를 toluene 2 mL에 녹이고 그 용액과 TiNi-C/N 시편을 유리튜브에 넣고 항온수조(BS-20, JEIO TECH, Korea)에서 40 °C에서 24시간 동안 100 rpm으로 흔들면서 그래프트시킨 후 진공오븐에서 24시간 동안

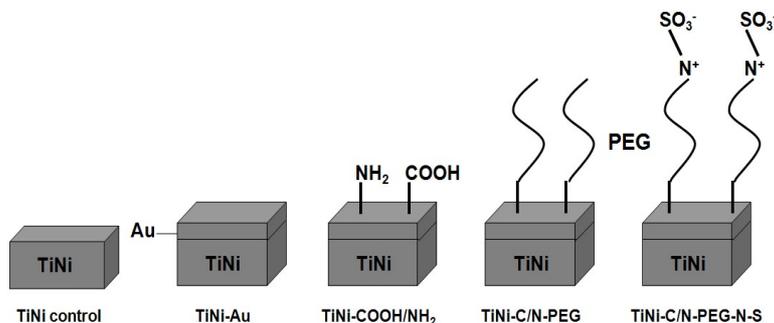


Figure 1. Scheme for surface modification of TiNi alloys.

건조하여 최종적으로 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 니티놀인 TiNi-C/N-PEG-N-S를 제조하였다. 또한, 이것과 비교하기 위해서 TiNi-C/N에 친수성 PEG인 NCO-PEG-N만을 그래프트시킨 TiNi-C/N-PEG를 제조하였다.

표면특성 분석. 표면개질된 니티놀 합금 표면의 화학적인 구조를 확인하기 위하여 attenuated total reflection-Fourier transform infrared(ATR-FTIR, IFS 66 spectrometer, Bruker사)로 측정하였다. 표면개질된 니티놀 합금의 화학적 표면 조성은 electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA, S-Probe, Surface Science사)를 사용하여 분석하였으며 표면형태는 scanning electron microscopy (SEM, S-2500 C, Hitachi사)로 관찰하였다. 표면개질 전, 후의 니티놀 합금의 친수화 정도는 물 접촉각(contact angle)으로 평가하였다. 물 접촉각 측정 장치는 optical bench type contact angle goniometer (VCA Optima XE Video Contact Angle System, Crest Technology사)를 이용하였고 니티놀 합금 표면에 증류수(3 μ L)를 떨어뜨리고 곧바로 goniometer를 사용하여 측정하였다.

혈액적합성 평가. 표면개질된 니티놀의 혈액적합성은 단백질 흡착(알부민 및 피브리노젠), 혈소판 점착실험 및 혈액응고시간(activated partial thromboplastin time, APTT) 측정을 통해서 평가하였다.

먼저, 단백질 흡착실험은 표면개질된 니티놀 시편을 플라스틱 튜브 안에 넣고 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액을 가하여 1시간 동안 수화시킨 후 PBS 용액을 버리고, 알부민 3 mg/mL과 피브리노젠 0.2 mg/mL의 농도로 제조된 단백질 용액 2 mL를 각각 가하여 37 °C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 후 단백질 용액을 제거한 니티놀 시편을 PBS 용액으로 세척하고 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) 2 mL를 가하고 37 °C에서 24시간 동안 교반하여 흡착된 단백질을 탈착시켰다. 흡착된 단백질의 양을 정량하는데 사용한 BCA protein assay kit는 A 완충용액과 B 완충용액을 50 : 1의 비율로 섞어서 제조하였다. 단백질을 탈착시킨 SDS용액 100 μ L와 BCA protein assay kit 120 μ L를 96 well plate에 넣어서 혼합한 후 37 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 96 well plate를 ELISA (VERSA-max, Molecular Device Inc., USA)에 넣고 562 nm에서 흡광도를 측정하여 흡착된 단백질의 양을 정량하였다.

혈소판 점착실험은 LDH 방법을 사용하여 점착된 혈소판의 수를 측정하였다.^{30,31} 혈소판 점착실험은 표면개질된 니티놀 시편을 튜브에 넣고 PBS용액을 가하여 1시간 동안 수화시킨 후 PBS 용액을 버리고, 1×10^5 혈소판/ μ L로 희석된 혈소판 농축액(PC) 2 mL를 첨가하여 37 °C에서 2시간 동안 점착시켰다. 혈소판 농축액을 제거한 시편을 PBS로 세척한 후 깨끗한 튜브에 넣고 1% Triton X-100 용액 2 mL를 넣고 37 °C에서 30분 동안 점착된 혈소판을 탈착시켰다. 점착된 혈소판의 수를 측정하기 위해 사용한 LDH cytotoxicity kit는 촉매로 사용되는 A 용액 250 μ L과 염색용액으로 사용된 B 용액 11.25 μ L를 섞어서 제조하였다. LDH cytotoxicity kit 100 μ L와 혈소판이 탈착된 Triton X-100 용액 100 μ L를 96 well plate에 넣고 혼합한 용액을 37 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응한 용액을 ELISA로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 시편에 점착된 혈소판의 수를 계산하였다. 또한, 혈소판이 점착된 시편이 들어있는 튜브에 2% 글루타르알데히드 용액 2 mL를 가하여 실온에서 1시간 동안 고정화를 하고 순차적으로 50, 70, 90 및 100% 에탄올 수용액에 10분씩

담가 점착된 혈소판을 탈수시켰다. 이렇게 탈수된 시편을 24시간 동안 진공오븐에서 건조 후 SEM을 사용하여 니티놀 표면에 점착된 혈소판을 관찰하였다.

혈액응고시간(APTT) 측정실험은 표면개질된 니티놀 시편을 PBS 용액으로 세척한 후 튜브에 넣고 신선 동결혈장(FFP) 2 mL를 가하여 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 시편을 꺼내서 APTT 분석기(Sysmex, 모델 CA-50, USA)를 사용하여 혈액 응고에 따른 최대흔탁도가 절반에 도달하는 위치의 시간을 산출하였다. 시편을 제거한 신선 동결혈장 용액 50 μ L와 액틴시약 50 μ L를 반응튜브에 넣고 37 °C에서 1분 동안 기다린 후 CaCl₂ 용액 50 μ L를 첨가해서 37 °C에서 3분간 반응시킨 후 혈액응고시간을 측정하였다.

통계처리. 모든 자료는 평균±표준편차로 나타내었다. 미처리 및 표면개질된 니티놀의 통계 유의성을 비교하기 위해서 Student *t* test로 분석하였으며, 그 차이를 *p* 값으로 나타내었다(**p*<0.05 및 ***p*<0.01).

결과 및 토론

니티놀 합금의 표면개질. 고분자, 유리 및 금속의 표면을 개질하는 방법은 여러 가지가 있다. 특히 금속은 작용기를 갖고 있지 않기 때문에 몇가지 방법이 연구되고 있지만 그 중에서도 자기조립 단분자층(SAM) 방법이 잘 알려져 있다. SAM이란 금속 시편을 계면 활성분자가 녹아있는 용액에 침지시켜서 자발적으로 표면위에 유기 활성물질이 결합하여 단분자층을 형성하는 것을 말한다.^{13,14} 여기서, 금속 시편으로는 실리콘 산화물, 금 또는 백금이 사용되고 유기 활성물질로 유기규소, 티올계 유기물, 아민계 유기 활성물질이 사용되어 자기조립 단분자층을 형성한다. 특히 계면 활성분자는 금속표면에 화학적으로 결합하는 부분이나 분자간 또는 금속표면과의 반데르발스 인력으로 상호작용하는 부분과 반대쪽 분자말단의 작용기 역할을 하는 부분으로 구성된다.

본 연구에서는 니티놀 금속표면에 자기조립 단분자층 방법을 사용하여 작용기(-NH₂ 및 -COOH)를 도입하였다. 먼저, 니티놀 표면에 금을 코팅한 후 여기에 계면 활성분자인 alkanethiol 화합물의 시스틴을^{13,14} 첨가하여 금과 시스틴의 설포하이드릴기(티올기, -SH)와의 화학흡착(chemisorption)에 의해서 니티놀 표면을 개질시켰다. 여기서, 사용된 시스틴 화합물은 금과 강하게 결합하는 것으로 증명된 설포하이드릴기를 갖고 있고 다른 쪽은 카르복실기와 아민기의 두 개의 작용기를 갖고 있어서 설포하이드릴기를 통해서 금에 화학적으로 흡착한 후 다른 두 개의 작용기를 통해서 친수성 PEG나 양쪽성 이온 PEG를 쉽게 결합시킬 수 있다. 이렇게 제조된 TiNi-C/N에 NCO-PEG-N나 NCO-PEG-N-S를 각각 결합하여 PEG만이 그래프트된 TiNi-C/N-PEG나 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S를 제조할 수 있었다. 이와 같은 그래프트 반응에 있어서 Zhao 등과¹⁸ Liu 등은¹⁹ 반응성이 우수한 이소시아네이트기가 아민기와 카르복실기에 각각 우레아반응과 아미데이션반응을 통해서 잘 결합한다고 보고한 바 있다.

표면개질된 니티놀의 표면특성. 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S를 제조한 다음 여러 가지 표면분석을 행하여 미처리 TiNi control, TiNi-Au, TiNi-C/N 및 TiNi-C/N-

Table 1. Characteristics of Surface-Modified TiNi Alloys

Material	ESCA Atomic(%)				Contact angle (degree)
	C	O	N	S	
TiNi control	60.27	39.73	-	-	76.7±2.5
TiNi-Au	85.22	14.78	-	-	85.3±0.5
TiNi-C/N	70.66	21.55	4.95	2.84	43.1±1.5
TiNi-C/N-PEG	62.39	29.41	6.89	1.31	30.0±1.1
TiNi-C/N-PEG-N-S	67.66	20.56	8.76	3.02	18.2±1.7

PEG와 비교, 평가하였다.

Table 1은 표면개질된 니티놀 표면의 ESCA 및 물 접촉각을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 먼저, ESCA 분석 결과, 금 코팅한 니티놀에 시스틴이 자기조립 단분자층을 만들면서 TiNi-C/N의 경우 아민기와 티올기의 영향으로 인해 TiNi control과 TiNi-Au 표면에는 없던 질소(N)와 황(S)이 각각 존재함으로써 시스틴이 성공적으로 화학흡착되었음을 확인하였다. 화학흡착된 니티놀 표면 위로 PEG를 그래프트하면서 NCO-PEG-N의 질소만이 추가되면서 N/C의 상대적인 비가 0.07에서 0.11로 증가하고 S/C의 상대적인 비가 0.04에서 0.02로 감소하는 것으로부터 PEG가 그래프트된 것을 확인하였다. 또한, 양쪽성 이온 PEG를 그래프트하면서 술폰산기의 황이 첨가됨으로 인하여 PEG를 그래프트한 것보다 S/C의 상대적인 비가 약 0.05로 기존의 0.02보다 크게 증가함으로 양쪽성 이온 PEG가 성공적으로 그래프트되었음을 확인할 수 있었다. 한편, 접촉각의 경우, 미처리한 TiNi control과 TiNi-Au의 접촉각이 각각 77도와 85도로 전형적인 소수성 표면을 나타내고 있으며, 이것을 시스틴을 사용해서 자기조립 단분자층을 만들어 아민기와 카르복실기가 표면에 도입됨으로써 친수성이 증가해 접촉각이 43도로 감소하였다. 계속해서 PEG와 양쪽성 이온 PEG가 그래프트되면서 표면개질된 시편은 PEG의 친수성과 양쪽성 이온 PEG의 영향으로 각각 30도, 18도로 크게 접촉각이 감소하였다. 특히 양쪽성 이온 PEG가 그래프트한 시편이 다른 시편에 비해서 크게 친수화가 진행되었음을 확인할 수 있었다.^{9,10,26}

Figure 2는 미처리된 니티놀과 표면개질된 니티놀 시편의 ATR-FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 금코팅한 니티놀 시편에 시스틴을 화학흡착해서 자기조립 단분자층을 만든 후 분석한 결과 카르복실기의 C=O기와 O-H기가 각각 1732 및 940 cm⁻¹에서 나타났고 아민의 C-N기가 1160 cm⁻¹에서 나타난 것을 확인하였다. 이와 관련하여 본 연구의 결과도 다른 연구팀에서 시스틴을 금속에 화학흡착한 후의 IR 피크가 유사하게 나옴으로써 화학흡착이 잘 되었음을 알 수 있었다.¹³ 이 니티놀 시편에 PEG와 양쪽성 이온 PEG를 결합하면서 카르복실기의 C=O 및 O-H기와 아민의 C-N기의 피크들이 사라지고 PEG의 C-O(약 1100 cm⁻¹)와 양쪽성 이온 PEG의 SO₃⁻(약 1028 cm⁻¹)의 신규 특성 피크들이 나타났다. 다른 연구에서도 술폰산기가 그래프트되면 SO₃⁻의 특성 피크가 1030-1040 cm⁻¹에서 나타남을 확인할 수 있었다.^{26,29} 본 연구에서는 ESCA의 황의 비율이 약 3%의 소량으로 인하여 IR의 술폰산기 특성 피크가 아주 약하게 나타났다.

Figure 3은 미처리된 니티놀과 표면개질된 니티놀 시편의 표면 모폴로지를 SEM을 통해 관찰한 것이다. 미처리 시편 표면과 마찬가지로

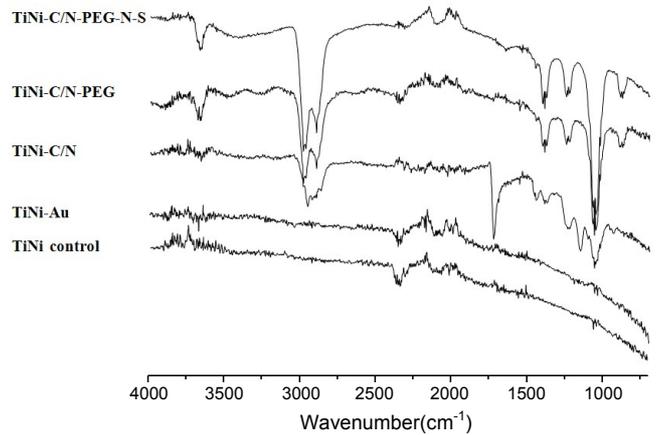


Figure 2. ATR-FTIR spectra of surface-modified TiNi alloys.

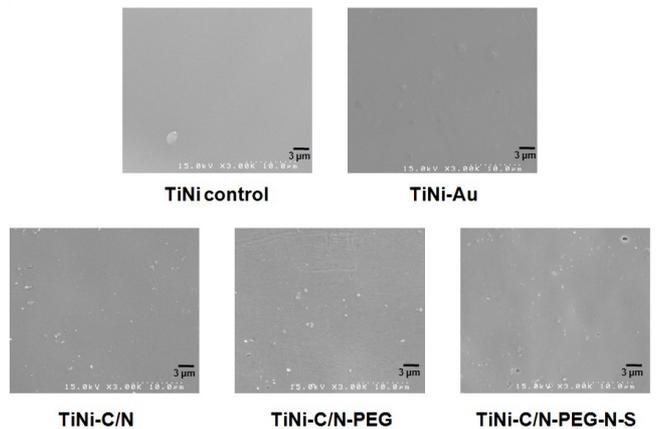


Figure 3. SEM morphology of surface-modified TiNi alloys.

지로 개질된 니티놀 시편도 비록 화학적인 반응을 통해서 표면의 화학적인 조성이 달라질지라도 비교적 평활한 표면 모폴로지를 나타내었다.

표면개질된 니티놀의 혈액적합성. 일반적으로 생체재료는 혈액에 접촉하는 순간 단백질들이 제일 먼저 표면에 흡착한다. 이어서 혈소판이 점착되고 활성화되면서 응집함으로 인해 혈전이 형성된다. 본 연구에서는 표면개질된 니티놀의 혈액적합성 평가하기 위해서 알부민과 피브리노겐을 이용한 단백질 흡착실험과 혈소판 점착실험을 행하였고 혈액응고시간인 APTT도 분석하였다.¹²

Figures 4와 5는 표면개질된 니티놀에 알부민과 피브리노겐의 흡착거동을 나타낸 것이다. 미처리 니티놀과 개질된 니티놀 시편의 흡착된 단백질의 양은 각각의 표면 특성에 크게 영향을 받고 있다. 먼저, Figure 4에서와 같이 알부민의 흡착량은 표면개질을 행함으로써 그 흡착량이 적어지는 경향을 보였다. 즉, TiNi control에 비해서 TiNi-C/N-PEG가, TiNi-C/N-PEG보다는 TiNi-C/N-PEG-N-S이 더 적은 알부민의 흡착량을 나타내었다. 또한, Figure 5에서 보는 바와 같이 피브리노겐 흡착량은 표면개질을 행함에 따라서 현저하게 감소하였다. 즉, 그 흡착량은 TiNi control > TiNi-Au > TiNi-C/N > TiNi-C/N-PEG > TiNi-C/N-PEG-N-S의 순서로 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S가 가장 적은 흡착량을 나타내었다.^{8,12,25}

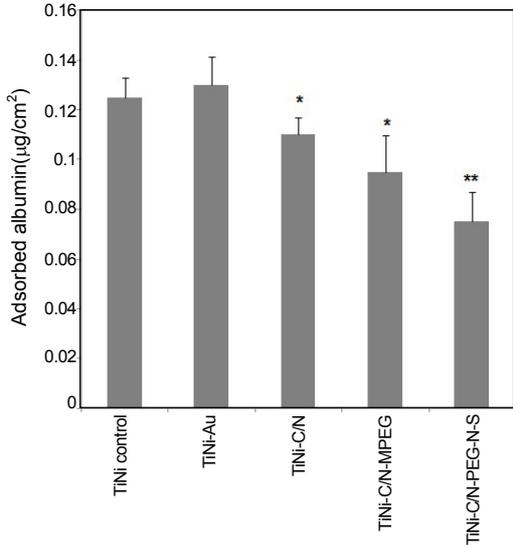


Figure 4. Albumin adsorption on the surface-modified TiNi alloys (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

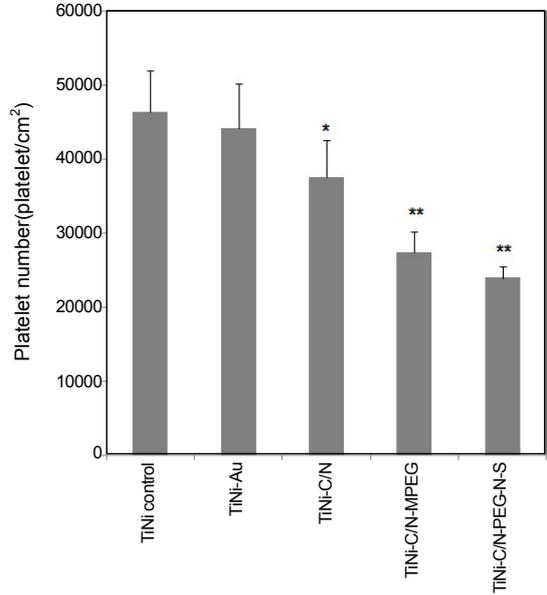


Figure 6. Platelet number adhered on the surface-modified TiNi alloys (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

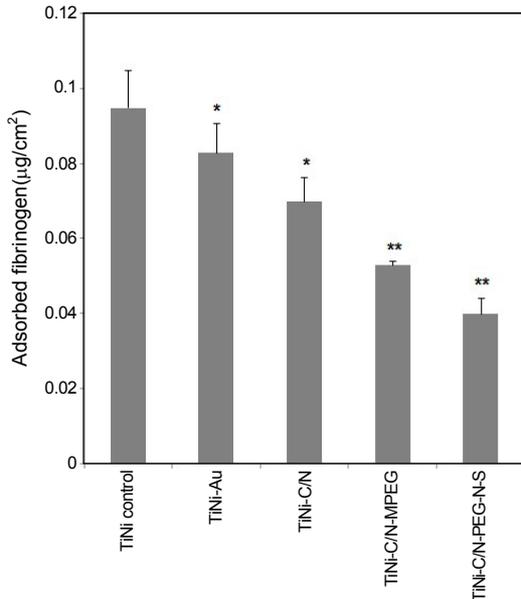


Figure 5. Fibrinogen adsorption on the surface-modified TiNi alloys (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Figure 6은 표면개질된 니티놀에 점착된 혈소판수를 나타낸 것이다. 혈소판 점착실험의 결과는 단백질 흡착실험의 결과와 거의 유사한 경향을 보였다. 즉, TiNi control > TiNi-Au > TiNi-C/N > TiNi-C/N-PEG > TiNi-C/N-PEG-N-S의 순서로 혈소판이 적게 점착되었다. 특히 이 중에서 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S 시편이 미처리 TiNi control 보다 약 1/2 정도로 낮은 혈소판 점착 결과를 나타내었다. 또한, Figure 7은 표면개질된 니티놀에 점착된 혈소판의 점착거동을 나타낸 것이다. Figure 6의 혈소판수의 결과로도 예측할 수 있는 것처럼 미처리된 니티놀 시편이 혈소판의 점착이 가장 많이 되고 일부 스프레딩에 의한 활성화도 진행되었으며 표면개질을 행함으로써 혈소판의 점착이 적어지고 활성

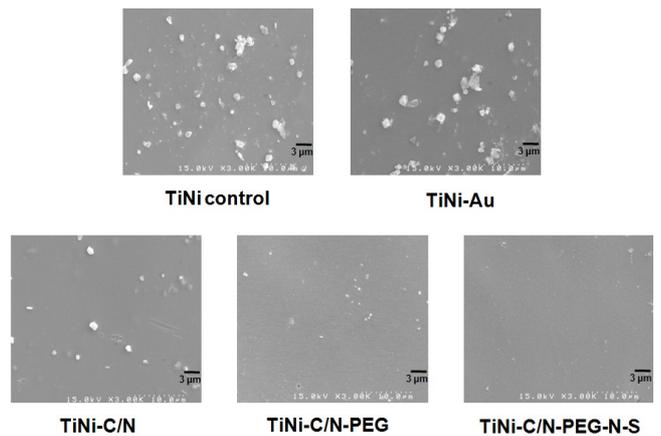


Figure 7. SEM morphology of platelets adhered on the surface-modified TiNi alloys.

화도 낮아졌다. 즉, TiNi-C/N-PEG 시편도 거의 혈소판의 점착이 일어나지 않았지만 특히 TiNi-C/N-PEG-N-S 시편의 경우는 혈소판의 점착이 전혀 관찰되지 않는 깨끗한 표면을 나타내었다.^{8,24,28}

Figure 8은 니티놀 시편에 대한 내적 혈액응고인자의 생체 활성을 측정하는 혈액응고시간(APTT)의 결과를 나타낸 것이다. 다른 시편에 비해서 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S가 월등하게 혈액응고시간이 연장되었다. 이는 양쪽성 이온을 나타내는 부분중 헤파린과 같은 항응고작용을 하는 유사한 성분의 SO_3^- 의 음전하 효과로 인해서 표면 음전하를 가진 혈액응고인자의 반발력에 의해 활동을 방해해서 혈액응고시간이 훨씬 길어진 것으로 여겨진다.^{9,27,32}

이상의 단백질 흡착과 혈소판 점착실험 및 혈액응고시간 분석의 혈액적합성 결과로부터, 이러한 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S가 가장 낮은 단백질 흡착 및 혈소판 점착거동과

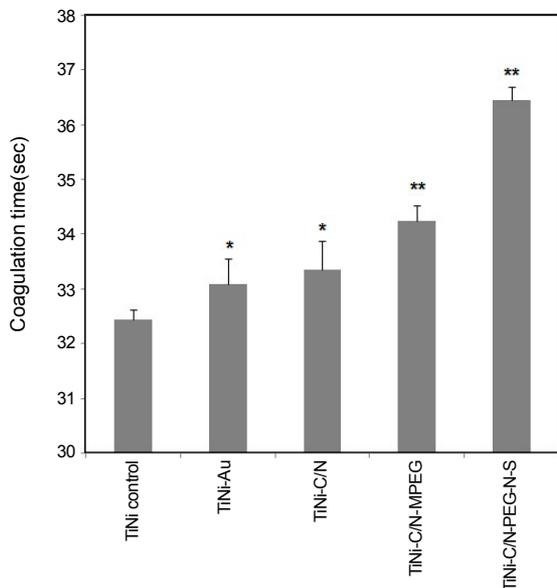


Figure 8. APTT of surface-modified TiNi alloys (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

연장된 혈액응고시간을 나타낸 것은 그래프트된 PEG와 양쪽성 이온의 상승효과(synergistic effect)로 사료된다. 일반적으로 PEG는 낮은 계면 자유에너지, 친수성, 유연한 사슬 유동성과 입체 안정화 효과로 인해서 혈액적합성이 우수하다고 잘 알려져 있다.^{8,9,28} 또한, 양쪽성 이온($-N^+ - SO_3^-$)은 생체막과 유사한 구조를 가지고 있어서 인지질만을 선택적으로 먼저 흡착함으로써 다른 단백질이나 혈액성분을 붙지 않게 할뿐만 아니라 말단의 술포산에 의한 음전하로 인하여 음이온끼리의 반발력과 헤파린과 같은 항응고작용으로 응고시간이 연장되는 결과를 보이고 있다.^{24,27,28} 따라서, PEG와 양쪽성 이온 특성이 같이 합쳐짐으로 인하여 기존의 분자 섬모(molecular cilia, PEG)나 음이온 섬모(negative cilia, $PEG-SO_3^-$) 개념보다도 본 연구의 양쪽성 이온 섬모(zwitter ionic cilia, $PEG-N^+ - SO_3^-$) 모델이 훨씬 더 우수한 혈액적합성을 나타내는 것으로 사료된다.

결론

기존 스텐트의 혈액적합성을 향상시키기 위해서 혈관 스텐트로 사용되고 있는 니티놀 합금(TiNi)을 금 코팅과 화학흡착으로 표면개질하여 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S를 제조하였다. 제조된 TiNi-C/N-PEG-N-S는 ATR-FTIR, ESCA, SEM 및 접촉각의 여러 가지 표면분석 결과, 양쪽성 이온 PEG가 잘 그래프트된 것을 확인할 수 있었으며 특히 개질된 표면이 평활하고 친수성을 나타내어 혈액적합성을 개선할 수 있는 좋은 환경을 제공하였다. 이러한 표면특성은 단백질 흡착 및 혈소판 점착과 혈액응고시간의 혈액적합성 평가 결과, TiNi-C/N-PEG-N-S이 다른 시료보다도 월등한 혈액적합성의 개선을 나타내었다. 이와 같이 양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 TiNi-C/N-PEG-N-S의 우수한 혈액적합성은 그래프트된 친수성 PEG와 유사 생체막의 양쪽성 이온의 상승효과에 의한 양쪽성 이온 섬모작용으로 사료된다. 따라서, 이러한

양쪽성 이온 PEG가 그래프트된 스텐트를 제조하여 이식할 경우 충분히 혈전 형성과 재협착을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 한국과학재단을 통해 교육과학기술부의 미래유망 융합기술 파이오니어사업(M1AM11-2008-00030)과 21세기 프론티어 연구개발사업인 ‘나노소재기술개발사업단’(08K1501-01210)의 지원받아 수행되었습니다.

참고 문헌

1. S. Windecker, I. Mayer, G. D. Pasquale, W. Maier, O. Dirsch, P. D Groot, Y. P. Wu, G. Noll, B. Leskosek, B. Meier, and O. M. Hess, *Circulation*, **104**, 928 (2001).
2. A. L. Lewis, L. A. Tolhurst, and P. W. Stratford, *Biomaterials*, **23**, 1967 (2002).
3. I. K. Jung, H. K. Park, C. S. Lim, K. S. Lee, and K. D. Park, *Biomater. Res.*, **7**, 59 (2003).
4. T. Duerig, A. Pelton, and D. Stöckel, *Mater. Sci. Eng. A*, **149**, 273 (1999).
5. L. E. Medawar, P. Rocher, J. C. Hornez, M. Traisnel, J. Breme, and H. F. Hildebrand, *Biomol. Eng.*, **153**, 19 (2002).
6. J. C. Wataha, N. L. O'Dell, B. B. Singh, M. Ghazi, G. M. Whitford, and P. E. Lockwood, *J. Biomed. Mater. Res.*, **537**, 58 (2001).
7. C. C. Shin and C. M. Shin, *Appl. Surf. Sci.*, **219**, 347 (2003).
8. J. H. Lee, H. B. Lee, and J. D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.*, **20**, 1043 (1995).
9. D. K. Han, K. D. Park, K.-D. Ahn, S. Y. Jeong, and Y. H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomater.*, **23(A1)**, 87 (1989).
10. F. Zhang, E. T. Kang, K. G. Neoh, P. Wang, and K. L. Tan, *Biomaterials*, **22**, 1541 (2001).
11. Y. Mori, S. Nagaoka, H. Takiuchi, T. Kikuchi, N. Noguchi, H. Tanzawa, and Y. Noshiki, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org.*, **28**, 459 (1982).
12. W. R. Gombotz, W. Guanghui, T. A. Horbett, and A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1547 (1991).
13. A. Ihs and B. Liedberg, *J. Colloid Interf. Sci.*, **144**, 1 (1991).
14. M. Wirde and U. Gelius, *Langmuir*, **15**, 6370 (1999).
15. T. B. McPherson, H. S. Shim, and K. Park, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.*, **38**, 553 (1997).
16. K. Holmberg, K. Bergstrom, C. Brink, E. Osterberg, F. Tiberg, and J. M. Harris, *J. Adhes. Sci. Tech.*, **7**, 503 (1993).
17. Y. X. Qui, D. Klee, W. Pluster, B. Severich, and H. Hocker, *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 2373 (1996).
18. C. Zhao, L. Ji, H. Liu, G. Hu, S. Zhang, M. Yang, and Z. Yang, *J. Solid State Chem.*, **177**, 4394 (2004).
19. J. Liu, T. Xu, M. Gong, F. Yu, and Y. Fu, *J. Membr. Sci.*, **283**, 190 (2006).
20. C. D. Bain and G. M. Whitesides, *Science*, **240**, 62 (1988).
21. C. D. Bain and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7164 (1989).

22. F. Lim, X-H. Yu, and S. L. Cooper, *Biomaterials*, **14**, 537 (1993).
23. P. Claesson, *Colloids Surf. A*, **77**, 109 (1993).
24. D. K. Han, S. Y. Jeong, Y. H. Kim, B. G. Min, and H. I. Cho, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 561 (1991).
25. D. K. Han, K. D. Park, and Y. H. Kim, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 163 (1998).
26. J. Yuan, C. Mao, J. Zhou, J. Shen, S. C. Lin, W. Zhu, and J. L. Fang, *Polym. Int.*, **52**, 1869 (2003).
27. K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998).
28. Y. H. Kim, D. K. Han, K. D. Park, and S. H. Kim, *Bio-materials*, **24**, 2213 (2003).
29. J. H. Kim, J. S. Son, K. Park, J.-M. Kim, J.-J. Kim, K.-D. Ahn, and D. K. Han, *Key Eng. Mater.*, **342**, 805 (2007).
30. W. Tsai, M. Grunkemeier, and A. Horbett, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 130 (1999).
31. Y. Tamada, E. A. Kulik, and Y. Ikada, *Biomaterials*, **16**, 259 (1995).
32. D. K. Han, N. Y. Lee, K. D. Park, Y. H. Kim, H. I. Cho, and B. G. Min, *Biomaterials*, **16**, 467 (1995).