

Mineral Oil을 활용한 다공성 키토산 지지체의 물리적 특성 조절에 관한 연구

김주승* · 정은진* · 김지혜* · 이우걸***†

*단국대학교 창의융합제조공학과, **단국대학교 화학공학과
(2017년 2월 8일 접수, 2017년 3월 13일 수정, 2017년 4월 5일 채택)

Study on the Manipulation of Physical Properties of Chitosan Scaffolds Using Mineral Oil

Juseung Kim*, Eun Jin Jung*, Ji Hye Kim*, and Woo-Kul Lee***†

*Department of Creative Convergent Manufacturing Engineering, Dankook University

**Department of Chemical Engineering, Dankook University, 152, Jukjeon-ro, Suji-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16890, Korea

(Received February 8, 2017; Revised March 13, 2017; Accepted April 5, 2017)

초록: 본 연구에서는 acetic acid와 NaOH를 활용하여 키토산(CHO) 지지체를 제조하였다. 또한 CHO 용액에 span 80을 녹인 미네랄 오일(mineral oil) (MS) 용액을 혼합한 용액을 사용하여 제조한 지지체의 물리적 특성 변화에 관한 연구를 수행하였다. CHO/MS은 40/10과 60/10의 비율로 혼합하여 사용하였다. 순수한 CHO 용액으로만 제조한 지지체는 대조군(control)으로 사용하였다. CHO/MS 혼합비율이 지지체의 표면 및 3차원 구조, 화학적 상태, 회복력, 기공도, 팽윤율 및 세포독성 등에 미치는 영향을 분석하였다. 분석결과에 의하면 CHO/MS 혼합용액을 사용하는 경우, control에 비해 미세한 기공 형성과 기공도, 지지체의 팽윤율이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 영향은 CHO/MS 60/10 지지체에서 더 현저하게 나타났다. 지지체에서의 조골세포 증식실험에서 MS 용액 혼합에 의한 지지체의 물리적 특성 변화는 세포독성을 유발시키지 않았다. 본 연구의 결과는 MS 용액을 활용하여 지지체의 세포적합성을 유지하면서 동시에 물리적 특성을 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 이 기술은 연조직 대체용 지지체 제조에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, various chitosan (CHO) scaffolds were prepared using acetic acid and NaOH. In addition, we performed investigation on the changes in physical properties of the scaffolds prepared using a mixture of CHO solution and span 80-containing mineral oil (MS) solution. CHO/MS ratios were set at 40/10 and 60/10. The scaffold prepared using pure CHO solution was used as a control. We evaluated the effects of CHO/MS mixing ratio on the surface and 3D structure, chemical state, recovery, porosity, swelling, and cytotoxicity of the scaffold. We observed that the fine pore formation, porosity, and swelling of the prepared scaffold increased when MS solution was used. The behavior was more pronounced when CHO/MS 60/10 was used. In osteoblast proliferation assay, any cytotoxicity was not induced due to usage of MS solution. From the result obtained in this investigation, we noticed that the physical properties of the CHO scaffold can be manipulated by using MS solution while maintaining its cytocompatibility. We expect that this technique can be further utilized in the preparation of soft tissue substitutes.

Keywords: chitosan, scaffold, porosity, swelling, spectroscopy, osteoblast, cytotoxicity.

서 론

조직공학은 재료공학을 포함한 공학, 생물학, 생화학, 의학, 치의학, 약학 등 학제간 융합학문으로 손상된 조직 및 장기를 대체/재생하기 위한 인공지지체를 개발하는 분야이다. 조

직공학은 Langer와 Vacanti가 제안한 인공지지체에 세포를 배양하여 손상된 조직 부위에 적용함으로써 손상부위를 신속하게 대체함과 동시에 재생을 촉진시키기 위한 기술이다.¹

최근들어 생분해성 고분자를 활용하여 제조된 지지체는 손실된 부위를 대체함과 동시에 지지체가 생체 내에서 분해되면서 최종적으로 손상된 부위가 자연조직으로 완전히 대체될 수 있는 효과를 기대할 수 있게 되었다. 인공지지체가 이와 같은 기능을 수행하기 위해서는 다음과 같은 조건들이 충족되어야 한다. 첫째, 지지체는 세포 유입과 영양분 및 대사물

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: leewo@dankook.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

질의 유출입이 가능한 다공성, 기공 크기, 그리고 이 기공들이 3차원적으로 상호 연결된 구조를 가져야 한다.²⁴ 둘째, 지지체와 지지체 분해산물이 세포나 조직에 대해 무독성이고, 생체적합성이 우수한 성분이어야 하며, 이상적으로는 분해산물이 대사과정에 속하는 물질인 경우 이상적이라 할 수 있다.^{5,6} 셋째, 지지체의 분해속도가 조직의 재생속도와 균형을 이루므로써 손상부위에 요구되는 충분한 기계적 특성이 제공될 수 있어야 하며, 최종적으로 체내에 잔류 물질이 없어야 한다.^{7,8}

전술한 조건들을 충족시킬 수 있는 가장 이상적인 소재는 생분해성 고분자라 할 수 있다.^{9,10} 생체재료로 활용되는 고분자들은 합성고분자와 천연고분자로 분류할 수 있으며,¹¹⁻¹⁴ 대표적인 합성고분자로는 PCL, PLLA, PGA, PLGA 등이 있고,¹⁵⁻²² 천연고분자로는 키토산,²³⁻²⁵ 알지네이트,^{26,27} 콜라겐, 피브린, 젤라틴²³⁻²⁹ 등이 이에 해당된다.

천연고분자들 중 키토산은 새우, 게, 곤충 등 갑각류의 껍질 또는 오징어와 같은 연체동물에서 추출한 키틴을 알칼리 처리하여 얻을 수 있다.³⁰⁻³² 키토산은 높은 친수성을 띠며, 인체에 무독하고, 생체적합성이 우수한 동시에 항균성을 갖는 특성이 있어 약물전달시스템, 창상 치유, 그리고 필러와 같은 용도로 활용되는 물질이다.³³⁻³⁸ 키토산으로 지지체를 제조하는 경우, 대부분 지지체의 기계적 강도를 향상시키기 위해 글루탈알데하이드 또는 포르말알데하이드와 같은 가교제를 이용한다.³⁹⁻⁴³ 가교제를 이용하여 지지체를 제조하는 경우, 가교결합반응 이후에도 잔류 가교제가 존재할 수 있으며, 기공의 사이즈를 조절할 수 없고, 물성의 조절이 어려운 단점이 있다.

본 연구에서는 지지체의 생체적합성을 향상시키기 위해, 가교제를 사용하지 않고 지지체를 제조하는 기술을 개발하였으며, 기존 방법과 달리 mineral oil과 span 80을 이용하여 지지체의 기공과 기공도를 조절할 수 있다. 이와 같은 방법으로 제조한 지지체의 물리적, 화학적, 구조적 특성에 관한 분석을 수행하였으며, 조골세포주 MG63 세포를 이용하여 지지체에 대한 세포독성 반응에 관한 분석을 수행하였다.

실 험

재료. 지지체 제조를 위해 탈아세틸화 키토산(Sigma-Aldrich), span 80(대정화학), 그리고 mineral oil(삼천화학) 등을 사용하였다. Dulbecco's modified eagles' medium(DMEM)은 Hyclone Laboratories에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)과 antibiotic-antimycotic, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)은 Gibco사 제품을 사용하였다. Cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo사에서 구매하였다.

키토산 지지체 제조. 0.5% acetic acid에 키토산을 용해시켜 1.5% 키토산 용액을 제조하였다(CHAT 용액). 지지체 제조 용액의 분산력과 물리적 특성 향상을 위해 mineral oil과 span

80을 부피 비율 14:1로 혼합한 용액을 제조하여 활용하였다(MS 용액). 제조된 CHT 용액과 MS 용액을 부피비율이 10/0, 40/10, 60/10으로 혼합하여 지지체를 제조를 위한 혼합용액을 제조하였다. 순수한 CHT 용액으로만 제조한 지지체는 용액은 대조군(control)으로 사용하였다.

지지체를 제조하기 위해 전술한 비율로 제조된 혼합용액을 350 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 내경 10 mm인 몰드에 주입한 후, -80 °C에서 급랭시켰다. 3시간 후 몰드에 0.5 M NaOH를 주입한 후, 8시간 동안 가교결합 반응을 시킨 후, ethyl acetate를 이용하여 지지체 속에 남겨져 있는 MS 용액을 제거하였다. MS 용액이 제거된 지지체를 에탄올 농도가 100, 80, 60, 40, 20%인 용액을 이용하여 순차적으로 세척하였고, 최종적으로 3차 증류수로 3회 세척한 후 동결건조기를 이용하여 3일간 완전히 건조시켜 지지체를 제조하였다.

지지체 표면 및 기공 미세구조 분석. 혼합용액의 키토산 비율에 따른 지지체 기공 및 표면의 미세구조의 변화는 scanning electron microscope(SEM, CX-200, COXEM)을 이용하여 분석하였다. 시료들은 관찰하기 전에 sputter coater를 이용하여 시료 표면을 금으로 코팅하였으며, 관찰은 전압이 20 kV인 조건에서 실시하였다.

FTIR 스펙트럼 분석. 제조된 지지체의 화학적 특성을 분석하기 위해 지지체와 KBr을 혼합하여 미세한 분말로 분쇄한 후, 가압하여 pallet으로 제작하여, 주파수가 450-4000 cm⁻¹ 범위에서 FTIR(Perkin Elmer) 스펙트럼을 얻었다.

지지체 기공도 분석. CHT 용액의 혼합비율에 따른 지지체의 기공도에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 지지체를 완전히 건조시킨 후, 지지체의 부피(V_0)와 무게(W_0)를 측정하였다. 그런 후, 지지체를 에탄올에 담그고 내부의 기포를 제거하기 위해 10분간 초음파 처리한 다음, 에탄올을 포함하고 있는 지지체의 무게를 측정하였다(W_1). 지지체의 기공도는 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{\rho V_0} \times 100 \quad (1)$$

ρ 는 에탄올의 밀도를 나타내고, 0.789 g/mL의 값을 사용하였다. 각 혼합비율별로 4개의 지지체의 기공도 측정값들의 평균값을 기공도로 나타내었다.⁴⁴

지지체의 함수율과 팽윤율 분석. CHT 용액의 혼합비율이 지지체의 함수율과 팽윤율에 미치는 영향을 분석하였다. 지지체의 함수율 측정은 지지체를 초순수에 담근 후 37 °C에서 12시간 동안 방치한 후, 식 (2)를 이용하여 계산하였다.

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

W_1 는 수분을 포함한 지지체의 무게, W_0 는 완전히 건조된 지지체의 무게를 나타낸다.

지지체의 팽윤율을 분석하기 위해 초순수를 지지체에 넣고 37°C에서 30분, 1, 2, 3, 4 시간이 경과한 후, 지지체의 부피를 측정하였으며, 측정치의 평균값으로 나타내었다. 지지체의 함수율과 팽윤율은 각 조건별로 4개의 지지체에 대한 측정값들의 평균값으로 나타내었다.

지지체의 탄성 분석. CHT 용액의 혼합비율에 따른 지지체의 탄성에 미치는 영향을 분석하기 위해 수분을 함유하고 있는 지지체에 하중을 가한 후 회복되는 정도를 측정하여 분석하였다. 지지체의 탄성분석을 위해 INSTRON-D 695(USA)을 활용하였으며, 1.3 mm/min의 속도로 1분간 압축한 후에 압축상태를 제거하여 압축된 지지체를 1분간 물에 담근 후, 지지체의 부피를 측정하여 회복 정도를 측정하였다.

지지체의 생물학적 특성 분석. CHT 용액의 혼합비율별로 제조된 지지체의 세포적합성을 분석하기 위해 지지체에서의 세포증식 실험을 수행하였다. 각 지지체별로 5×10⁴개의 MG63 세포를 분주하였다. 지지체에 세포를 분주한 후, 5% CO₂, 37°C인 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotic antimycotic solution이 보강된 DMEM 배지를 사용하였다. 배양은 1, 3, 5일 동안 진행하였다. 정해진 배양시간에 DMEM을 제거하고, DPBS로 지지체를 세척한 후, DMEM과 CCK-8 kit를 10:1 비율로 혼합한 반응액 1 mL을 첨가한 후, 37°C의 CO₂ 배양기에 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 그런 후 반응액 200 μL을 취하여 96-well plate에 가한 후, microplate reader를 이용하여 450 nm의 파장에서 optical density를 측정하였다.⁴⁵

결과 및 토론

구조적 특성. Figure 1에는 CHT 용액과 MS 용액 비율이 다른 혼합용액으로 제조한 키토산 지지체의 디지털 이미지를 나타내었다. Figure 1(a)는 control로 사용된 순수한 키토산 용액을 이용하여 제조한 3차원 지지체이다. 제조한 키토산 지지체는 육안상으로도 물성이 매우 낮은 것을 인지할 수 있다. Figure 1(b)와 1(c)는 CHT와 MS 용액의 혼합비율이 각각 40/10과 60/10인 혼합용액을 이용하여 제조된 지지체이며, 대조군 지지체에 비해 더 견고한 구조적 형태를 보였다. 다공성

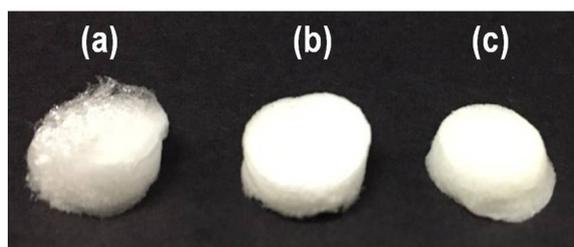


Figure 1. Digital images of chitosan scaffolds: CHT/MS mixing ratios, (a) control; (b) 40/10; (c) 60/10.

구조가 control에 비해 더욱 균일하고, 기공의 크기가 더 미세하게 형성된 것을 확인하였다. 또한 MS를 사용하지 않은 control 지지체의 표면은 거친데 반해, CHT/MS 40/10과 60/10 지지체들의 표면은 훨씬 매끈한 것으로 나타났다. 이는 순수한 키토산용액의 점성이 높아 가교 및 회수 과정에서 불균일성이 증가한 것으로 판단된다. 그러나 MS 용액을 사용한 경우, 이러한 현상들이 감소되고 결과적으로 지지체의 표면 형태에도 영향을 준 것으로 판단된다.^{46,47}

Figure 2와 3에는 CHT/MS 혼합비율이 다른 용액으로 제조된 키토산 지지체의 표면과 단면의 형태를 SEM으로 관찰한 이미지를 나타내었다. 모든 키토산 지지체들은 3차원의 다공성 구조로 이루어져 있다. Figure 2에는 지지체의 외부 표면을 SEM으로 관찰한 micrograph를 나타내고 있으며, control 지지체(Figure 2(a))는 기공 크기가 상당히 크게 형성되어 있고, 다공성 표면으로 이루어져 있는 것을 확인하였다. CHT/MS 혼합용액으로 제조한 지지체들의 경우, control에 비해 다공성 구조가 훨씬 더 균일하게 형성되어 있으며, CHT/MS 혼합비율에 따라 기공 크기가 변하는 것을 관찰하였다. 즉, 40/10 지지체의 경우(Figure 2(b)), 기공의 크기가 control에 비해 훨씬 작은 미세한 기공이 형성되었으며, 60/10 지지체의 경우(Figure 2(c)), 기공의 크기가 control에 비해 약간 감소한 것을 볼 수 있다.

Figure 3에는 각 지지체를 절단하여 절단면을 SEM으로 관

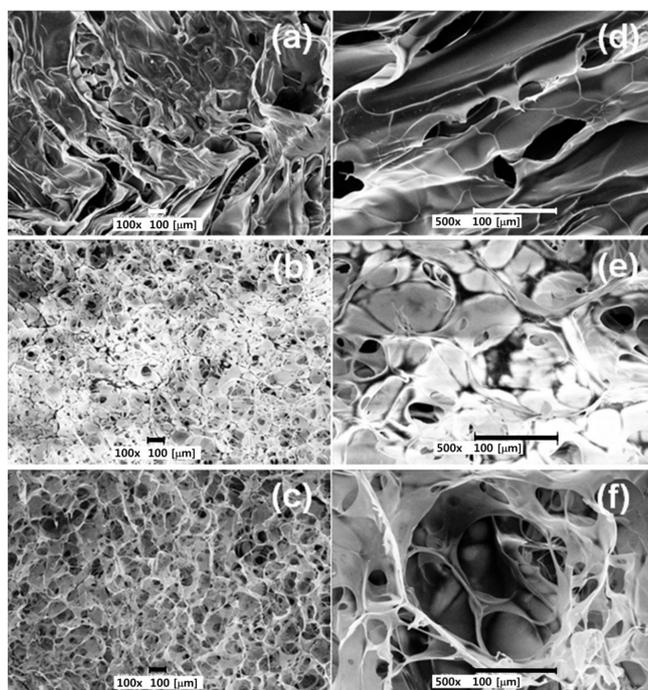


Figure 2. SEM micrographs of the surface of CHT scaffolds: CHT/MS mixing ratios, (a) & (d) control; (b) & (e) 40/10; (c) & (f) 60/10. Magnification: ×100 (left panel) and ×500 (right panel).

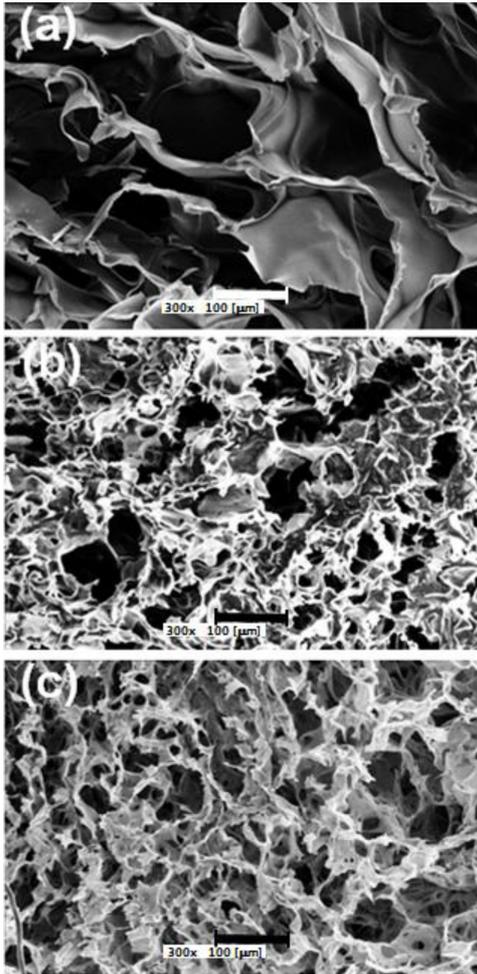


Figure 3. SEM micrographs of the cross section of scaffolds: CHT/MS mixing ratio, (a) control; (b) 40/10; (c) 60/10 (magnification: $\times 300$).

찰한 이미지를 나타내었다. Figure 3(a)은 control 지지체의 절단면을 나타내었고, 그 형태가 지지체 표면의 기공 구조(Figure 2(a))와 유사하였다. CHT/MS 40/10의 경우(Figure 3(b)), 기공의 크기는 control에 비해 상당히 작아졌으나, 기공들의 구조가 불규칙하게 형성되었고, 이는 CHT의 농도가 너무 낮기 때문이라 판단된다. CHT/MS 60/10의 경우(Figure 3(c)), 기공의 크기는 control에 비해서는 감소했고, MS 40/10보다는 크게 형성된 것을 볼 수 있다. 그러나 CHT/MS 40/10에 비해 미세기공구조가 훨씬 더 균일하고 기공간의 연결성이 크게 향상된 것을 볼 수 있다. MS 용액을 혼합한 경우, 분산성이 크게 향상됨으로 인해 기공크기를 약 20% 및 50% 정도까지 감소시킬 수 있었다. 그러나 CHT/MS 40/10의 경우, 불규칙한 기공 구조가 형성된 것은 CHT의 농도가 너무 낮았기 때문으로 판단된다. 이에 비해 CHT/MS 60/10는 균일한 3차원 미세기공 구조를 형성하는데 가장 적절한 혼합비율을 알 수 있다. 따라서 MS 용액을 활용함으로써 기공크기 축

Table 1. Pore Size and Porosity of Chitosan Scaffolds Prepared at Different CHT/MS Blending Ratios

Sample	Control	40/10	60/10
Pore size (μm)	146.3 \pm 15	80.3 \pm 12	116.7 \pm 19
Porosity (%)	53.0 \pm 1.0	74.6 \pm 2.6	88.0 \pm 1.6

소와 미세구조 형성이 촉진되었고, 지지체 내의 표면적이 증가하였음을 예상할 수 있다.

제조된 지지체들의 기공 크기와 다공성을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 측정결과는 SEM 관찰결과와 일치하는 것으로 나타났다. Control의 경우, 기공의 크기가 146 μm 정도로 측정되었다. 그러나 MS 용액을 혼합한 경우, 기공의 크기를 크게 감소시킬 수 있었고, 이는 40/10와 60/10 지지체들을 비교했을 때, CHT의 농도가 감소할수록 기공의 크기가 감소하는 결과를 통해 알 수 있다. 이는 SEM 관찰 결과와 일치하는 결과이다. 기공도 측정결과를 보면, control 지지체의 기공도는 약 53%로 나타났다. 이는 MS 용액을 사용한 다른 지지체들에 비해 현저히 낮은 기공도이다. Control과 CHT/MS 60/10를 비교했을 때, 기공도가 약 67% 정도 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 MS 용액을 활용함으로써 기공크기를 감소시키는 동시에 기공도도 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. 동시에 CHT의 농도의 희석을 통해서 경우, 기공도가 현저히 증가하는 경향을 보였다. 이는 기공의 크기가 감소함에 따라 미세한 기공구조의 형성에 의한 결과라고 할 수 있다. 그러나 CHT의 농도를 추가적으로 희석시켜 제조한 CHT/MS 40/10 지지체의 경우, 60/10 지지체에 비해 기공도가 오히려 더 낮은 것으로 나타났다. 이는 MS 용액의 활용과 CHT 농도의 희석을 통해 지지체의 기공크기 감소 및 기공도의 증가를 예상한 것과는 조금 다른 결과이다. 이는 40/10 지지체에 사용된 CHT 농도가 너무 낮아 균일한 기공구조를 형성하지 못하였고, 이로 인해 지지체의 기공도도 감소한 것으로 판단된다.

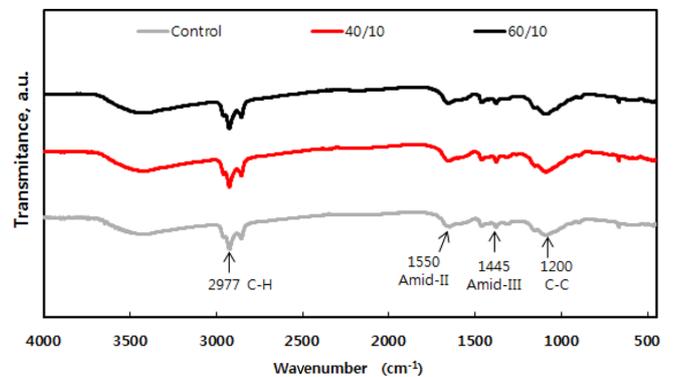


Figure 4. FTIR spectra of chitosan scaffold prepared at different CHT/MS blending ratios.

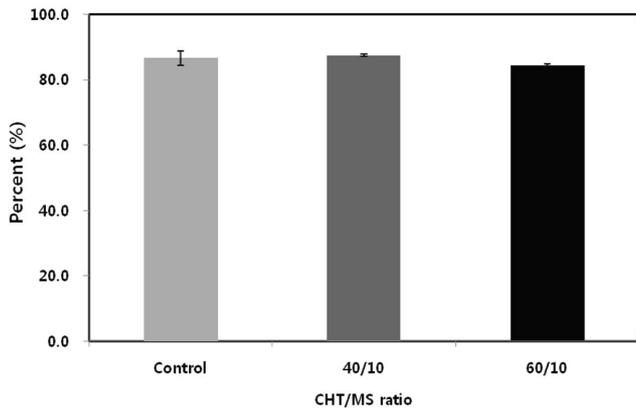


Figure 5. Recovery of scaffolds prepared at different CHT/MS blending ratios.

지지체의 IR Spectrum 분석. Figure 4는 완성된 지지체들의 화학적 특성을 분석하기 위해 측정한 IR 스펙트럼을 나타내었다. 모든 지지체의 IR 스펙트럼은 유사한 개형을 나타내었다. 순수한 키토산으로 제조된 control 지지체로부터 얻은 IR 스펙트럼은 2977 cm^{-1} 에서 C-H 스트레칭 밴드 피크와 $1550, 1445\text{ cm}^{-1}$ 아미드-II, III, 1200 cm^{-1} CC 스트레칭 밴드 피크가 나타는 결과를 나타냈다.⁴⁸ CHT/MS 혼합용액을 이용하여 제조한 키토산 지지체들로부터 얻은 IR 스펙트럼들이 control과 거의 동일하게 나타났으며, 따라서 CHT/MS 혼합용액으로 제조한 지지체들도 순수한 키토산으로 구성되어 있으며, 제조과정으로 인한 키토산의 화학적 구조에 영향을 미치지 않은 것을 알 수 있다.

지지체의 물리적 특성. Figure 5는 CHT/MS 배합 비율에 따른 지지체의 회복률 측정값을 나타내었다. 각 지지체의 기공도는 상당히 달랐지만, 회복률은 그림에 볼 수 있듯이 CHT/MS 혼합용액으로 제조한 지지체들이 회복률이 control과 유사한 스펙트럼을 나타내고 있다. 즉, control, 40/10, 60/10 지지체들의 회복률이 각각 86.7, 87.5, 84.4%로 나타났다. 이러한 결과는 MS의 배합이 키토산 지지체의 기공 형성 또는 기공도에 상당한 영향을 미치지, 회복률과 같은 물리적 특성에는 큰 영향을 미치지 않았다는 것을 알 수 있다.

Figure 6은 CHT/MS 혼합비율이 키토산 지지체의 팽윤율에 미치는 영향을 나타내었다. 팽윤율은 사용한 키토산 지지체들을 물과 30분, 1, 2, 3, 4시간 동안 접촉시킨 후 부피의 변화를 측정하여 나타내었다. Control 지지체의 경우, 시간이 경과함에 따라 팽윤율이 증가하였고, 약 2 시간 후에는 지지체 부피의 변화가 없는 최대팽윤율에 도달하였다. CHT/MS 혼합용액을 사용하여 제조한 지지체의 경우도 물과의 접촉시간에 따른 팽윤율 변화 추세를 control과 거의 비슷한 양상을 보였지만, CHT/MS 지지체들은 control에 비해 훨씬 더 높은 팽윤율을 보였다. 특히 CHT/MS 60/10의 경우, 40/10 지지체와 control에 비해 거의 1.5배 내지 2배 높은 팽윤율을 나타

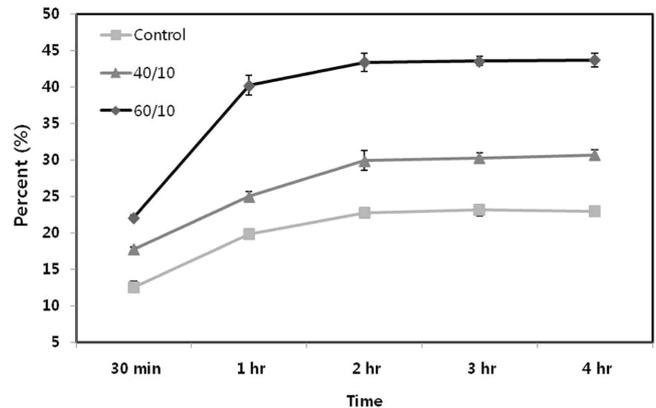


Figure 6. Swelling of scaffolds prepared at different CHT/MS blending ratios.

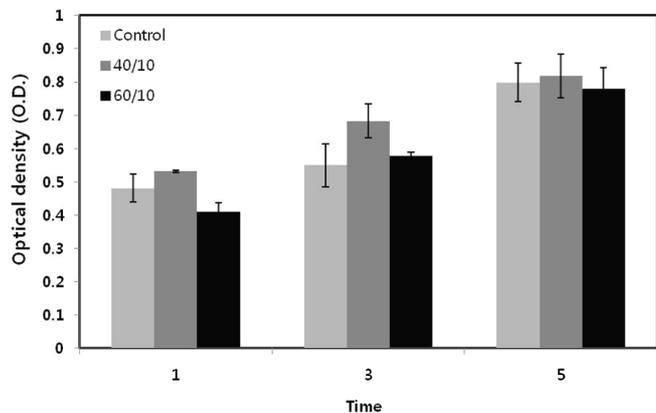


Figure 7. Proliferation of osteoblastic MG63 cell on the chitosan scaffolds prepared at different CHT/MS blending ratios.

내었다. CHT/MS 60/10이 가장 높은 팽윤율을 보인 것은 기공의 크기와 균일한 기공구조를 형성하면서 높은 기공도를 갖는 구조를 형성하였고, 이로 인한 지지체의 함수능력이 향상된 것으로 판단된다. 그러나 CHT/MS 40/10의 경우, 기공의 크기는 작았지만, CHT 농도가 낮아 균일한 기공구조를 형성하지 못함으로써 CHT/MS 60/10 보다 낮은 팽윤율을 나타낸 것으로 판단된다.

지지체의 세포독성 분석. Figure 7은 혼합 비율별로 제조된 지지체에 MG63 조골세포주를 분주한 후 1, 3, 5일 동안 배양한 결과를 나타내었다. 배양시간에 따라 모든 지지체에서 조골세포들의 증식이 활발하게 진행되었으며 증식정도는 CHT/MS 40/10에서 약간 높은 증식률을 보였으나, 모든 지지체들이 거의 유사한 증식속도를 나타내었다. 따라서 CHT 용액에 MS 용액 혼합에 의한 세포독성은 거의 없는 것으로 판단되며, 또한 제조된 지지체들이 갖는 기공과 기공도 등의 미세구조도 세포적합성에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 글루탈알데하이드와 포름알데하이드와 같은 인공적 가교제를 사용하지 않고 acetic acid와 NaOH 용액을 활용한 키토산 지지체 제조 기술을 개발하였다. 또한 mineral oil과 span80 혼합용액을 사용하여 키토산 지지체의 기공과 기공도 등의 미세구조를 조절할 수 있음을 확인하였다. CHT/MS 혼합용액을 이용하여 지지체를 제조하는 경우, CHT 용액으로만 제조한 control 지지체보다 기공도가 증가되지만, 물리적 물성에는 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 특히 기공이 좀 더 조밀해지고 기공도가 증가함으로써 지지체의 흡수능력이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 특히 CHT/MS 60/10의 경우에 그 영향이 가장 현저하게 나타나는 것을 확인하였다. 지지체의 기하학적 특성은 세포 독성이나 증식 등에 상당한 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있는 사실이다. 본 연구에서는 CHT/MS 혼합용액을 이용하여 키토산 지지체를 제조하였고, 이를 통해서 지지체의 미세구조를 조절할 수 있었다. 각각의 지지체에 조골세포를 배양한 결과, CHT/MS 혼합용액으로 제조한 지지체와 control 지지체에서의 조골세포의 증식이 거의 유사한 정도로 나타났으며, 이는 지지체의 변화된 미세구조의 변화가 조골세포에 독성이나 증식에 큰 영향을 유발시키지 않는 것으로 판단할 수 있다. 이와 같은 미세구조 조절에 의한 지지체의 변화된 미세구조와 특성은 뼈와 같은 경조직 뿐만 아니라 흡수능력이 중요한 연골이나 피부와 같은 연조직에 본 연구에서 개발한 기술 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2017년도 산업통상자원부의 ‘창의산업융합 특성화 인재 양성사업’의 지원을 받아 연구되었음(과제번호 N0000717).

참 고 문 헌

- R. Langer and J. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
- I. Y. Kim, S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim, and C. S. Cho, *Biotechnol. Adv.*, **26**, 1 (2008).
- H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, *Biomaterials*, **24**, 2077 (2003).
- S. Gautam, A. K. Dinda, and N. C. Mishra, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 1228 (2013).
- S. Wu, X. Liu, K. W. K. Yeung, C. Liu, and X. Yang, *Mater. Sci. Eng. Rep.*, **80**, 1 (2014).
- K. M. Park, Y. K. Joung, and K. D. Park, *Macromol. Res.*, **16**, 517 (2008).
- F. Croisier and C. Jérôme, *Eur. Polym. J.*, **49**, 780 (2013).
- K. C. Kavya, R. Jayakumar, S. Nair, and K. P. Chennazhi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**, 255 (2013).
- M. Okamoto and B. John, *Prog. Polym. Sci.*, **38**, 1487 (2013).
- D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
- L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. C. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 11 (1993).
- L. Lu, X. M. Zhu, R. G. Valenzuela, G. Richard, B. L. Currier, and M. J. Yaszemski, *Clin. Orthop.*, **391**, 251 (2001).
- G. D. Mogosanu and A. M. Grumezescu, *Int. J. Pharm.*, **463**, 127 (2014).
- J. Cha, W. B. Lee, and C. R. Park, *Macromol. Res.*, **14**, 573 (2006).
- S. A. Park, J. B. Lee, Y. E. Kim, J. E. Kim, J. H. Lee, J. W. Shin, I. K. Kwon, and W. D. Kim, *Macromol. Res.*, **22**, 882 (2014).
- G. Nitya, G. T. Nair, U. Mony, K. P. Chennazhi, and S. V. Nair, *J. Mater. Sci.- Mater. Med.*, **23**, 1749 (2012).
- S. Cardea, L. Baldino, P. Pisanti, and E. Reverchon, *J. Mater. Sci.- Mater. Med.*, **25**, 355 (2014).
- J. Hu, X. Sun, H. Ma, C. Xie, Y. E. Chen, and P. X. Ma, *Biomaterials*, **31**, 7971 (2010).
- C. Z. Jin, B. H. Choi, S. R. Park, and B. H. Min, *J. Biomed. Mater. Res. -A*, **92**, 1567 (2010).
- C. Wang, L. Cen, S. Yin, Q. Liu, W. Liu, Y. Cao, and L. Cui, *Biomaterials*, **31**, 621 (2010).
- J. Li, R. Tao, W. Wu, H. Cao, J. Xin, J. Li, J. Guo, L. Jiang, C. Gao, A. A. Demetriou, D. L. Farkas, and L. Li, *Stem Cells Dev.*, **19**, 1427 (2010).
- Y. Zhang, F. Yang, K. Liu, H. Shen, Y. Zhu, W. Zhang, W. Liu, S. Wang, Y. Cao, and G. Zhou, *Biomaterials*, **33**, 2926 (2012).
- B. Yang, X. Li, S. Shi, X. Kong, G. Guo, M. Huang, F. Luo, Y. Wei, X. Zhao, and Z. Qian, *Carbohydr. Polym.*, **80**, 860 (2010).
- C. Ji, N. Annabi, A. Khademhosseini, and F. Dehghani, *Acta Biomater.*, **7**, 1653 (2011).
- B. Dhandayuthapani, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, *J. Biomed. Mater. Res. -B*, **94**, 264 (2010).
- C. C. Wang, K. C. Yang, K. H. Lin, H. C. Liu, and F. H. Lin, *Biomaterials*, **32**, 7118 (2011).
- Y. Sapir, O. Kryukov, and S. Cohen, *Biomaterials*, **32**, 1838 (2011).
- M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy, and N. Selvamurugan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **47**, 1 (2010).
- W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liud, and J. Fue, *J. Chem. Technol. Biot.*, **88**, 327 (2013).
- H. L. Kim, G. Y. Jung, J. H. Yoon, J. S. Han, Y. J. Park, D. G. Kim, M. Zhang, and D. J. Kim, *Mater. Sci. Eng. C*, **54**, 20 (2015).
- S. Wen, Z. Wang, X. Zheng, and X. Wang, *Mater. Lett.*, **186**, 17 (2017).
- L. Baldino, S. Cardea, I. D. Marco, and E. Reverchon, *J. Supercrit. Fluid*, **90**, 27 (2014).
- L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, and C. Han, *Biomaterials*, **24**, 4833 (2003).
- N. Bhattarai, J. Gunn, and M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **62**, 83 (2010).
- V. M. Esquerdo, T. R. S. Cadaval Jr., G. L. Dotto, and A. A. Pinto, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **424**, 7 (2014).
- M. Annapoorna, P. T. S. Kumar, L. R. Lakshman, V. K.

- Lakshmanan, S. V. Nair, and R. Jayakumar, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 1561 (2013).
37. G. Li, L. Zhang, C. Wang, X. Zhao, C. Zhu, Y. Zheng, Y. Wang, Y. Zhao, and Y. Yang, *Carbohydr. Polym.*, **101**, 718 (2014).
38. S. J. Park, M. S. Kim, S. M. Yu, B. K. Gu, J.-I. Kim, and C.-H. Kim, *Macromol. Res.*, **20**, 397 (2012).
39. Y. Liu, L. Ma, and C. Gao, *Mater. Sci. Eng. C*, **32**, 361 (2012).
40. W. C. Hsieh, J. J. Liau, and Y. J. Li, *Int. J. Polym. Sci.*, **2015**, 1 (2015).
41. E. Zakhem, M. Elbahrawy, G. Orlando, and K. N. Bitar, *Surgery*, **158**, 1598 (2015).
42. A. Martínez, M. D. Blanco, N. Davidenko, and R. E. Cameron, *Carbohydr. Polym.*, **132**, 606 (2015).
43. Y. Liu, L. Ma, and C. Gao, *Mater. Sci. Eng. C*, **32**, 2361 (2012).
44. J. Han, Z. Zhou, R. Yin, D. Yang, and J. Nie, *Biol. Macromol.*, **46**, 199 (2010).
45. S. E. Kim, D. H. Suh, Y. P. Yun, J. Y. Lee, K. S. Park, J. Y. Chung, and D. W. Lee, *Mater. Sci.- Mater. Med.*, **23**, 2739 (2012).
46. S. M. Kuo, S. J. Chang, L.-C. Lin, and C. J. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.*, **89**, 3897 (2003).
47. K. Li, Y. Wang, Z. Miao, D. Xu, Y. Tang, and M. Feng, *Biotechnol. Lett.*, **26**, 879 (2004).
48. R. Nirmala, W. I. Baek, R. Navamathavan, M. H. El-Newehy, and H. Y. Kim, *Macromol. Res.*, **19**, 345 (2011).