### 2. 제출물

### 제 출 문

#### 교육과학기술부장관귀하

이 보고서를 "대형연구시설 공동이용활성화에 관한 연구 "과제 (세부과 제 "싸이클로트론 이온 빔에 의한 조직공학용 키토산 코팅된 다공성 하이 브리드 지지체의 조직재생기능 향상유도에 관한 연구")의 보고서로 제출 합니다.

2012. 03. 04

주관연구기관명 : 서울과학기술대학교 주관연구책임자 : 노 인 섭 연 구 원 : 황 윤 재 " : 이 수 연 " : 김 범 철 " : 오 승 진

# 3. 보고서 요약서

# <u>보고서 요약서</u>

과제고유번호	2011- 0006379	해 당 단 계 연 구 기 간	2011/04/01 ~ 2012/03/31	단계구분	1단계/2연차			
	중사업명	업명 원자력연구기반확충사업						
연 구 사 업 명	세부사업명	대형	연구시설 공동	이용활성화	지원사업			
	대과제명 원자력 연구개발사업							
연구과제명	세부과제명	싸이클로트특 다공성 하	론 이온 빔에 의 이브리드 지지켜	한 조직공학용 체의 조직재생	한 조직공학용 키토산 코팅된  의 조직재생기능 향상유도			
연 구 책 임 자	노 인 섭	해당단계 참 여 연구원수 총 연구기간 참 여 연구원수	총 : 5 명 내부 : 1 명 외부 : 4 명 총 : 6 명 내부 : 1 명 외부 : 5 명	해당단계 연 구 비 총 연구비	정부:30,000천원 기업: - 천원 계:30,000천원 정부:60,000천원 기업: - 천원 계:60,000천원			
연구기관명 및 소 속 부 서 명	서울과학; (공과대학	기술대학교 화학공학과)	참여기업명	_				
국제공동연구	상대국명 :	_	상대	국연구기관명	: –			
위탁연구	연구기관명 :	: –	연구	책임자 :	_			
요약(연구결	별과를 중심으	로 개조식 50	0자 이내)	보고서면수	73 page			
<ul> <li>10 MeV 이온 빔 브래그피크 에너지를 키토산 유도체가 코팅된 다공성 PLGA 하이브리 드 지지체에 조사하여 물리/화학적 분석을 진행한 결과, 이온 빔 조사 전, 후 지지체의 벌 크 및 표면의 화학적 특성이 일부 변화된 것을 XPS, FTIR로 확인하였음.</li> <li>다공성 하이브리드 지지체에 대한 세포독성을 평가한 결과, 생체적합성이 우수한 것을 확인하였음.</li> <li>이온 빔 조사 전, 후의 다공성 하이브리드 지지체에 최대 8주 동안 <i>in vitro</i> 세포배양을 진행하였을 때, 세포부착성 및 증식성이 우수한 것을 확인하였음.</li> <li>이온 빔 에너지 조건에 따른 6주 및 8주 <i>in vitro</i> 세포배양된 다공성 하이브리드 지지체 의 콜라겐, 세포외기질 및 근섬유 생성에 대한 조직재생 정도를 H&amp;E, MT 염색분석한 결과, 이온 빔이 조사되지 않은 대조군에 비하여 이온 빔이 조사된 지지체는 세포 수 및 조직재생이 보다 활발한 것으로 평가하였음.</li> <li>NO release 데이터를 기반으로 이온 빔 조사된 지지체의 염증반응 분석을 진행하였음.</li> </ul>								
색 인 어 (가 5개	한 글	폴리(락티드- 빔, 조직재	글리콜리드) 생	지지체, 키토	산, 다공성, 이온			
이상)	영어 poly(lactide-co-glycolide) scaffolds, Chitosan, porous, ion beams, tissue regeneration							

#### 4. 요약문

- I.제 목: 싸이클로트론 이온 빔에 의한 조직공학용 키토산 코팅된 다공성
   하이브리드 지지체의 조직재생기능 향상유도
- Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성
- 가. 연구개발의 목적
  - 키토산유도체가 코팅된 폴리(락티드-co-글리콜리드) 다공성 하이브리드 지 지체에 10 MeV의 브래그피크 고 에너지의 싸이클로트론 이온 빔을 조사하 여, 지지체의 벌크와 표면개질 여부를 관찰하고, 지지체의 분해에 따른 조직 재생 특성 및 생체적합성을 평가하는 것이 본 연구의 목적임.
- 나. 필요성
  - 이온 빔 조사를 이용하여 다양한 생분해성의 PLGA 지지체를 개발함으로써
     바이오소재 산업 활성 가능성에 대한 연구의 필요성에서 출발하였음.
  - 이온 빔 조사에 의하여 특정분자량으로 구성된 지지체의 제조가 가능하므로,
     지지체 분해속도를 조절하여 조직재생속도 조절이 가능한 지지체개발로 활용 가능성에 대한 연구필요성을 평가하고자 하였음.
  - 생분해성 고분자를 이용한 세계 인공장기 시장은 대략 1조 달러로 추정되며,
     그 규모가 급격히 성장할 것으로 예상되기 때문에 앞으로 생체재료 산업시 장에서 필요한 기술로 분석되었음.
  - 생분해성 지지체의 벌크특성 변화에 의해 제조된 조직공학 지지체의 조직재 생 기능성 및 생분해 특성 비교를 통하여 새로운 조직공학용 생분해성 지지 체 개발의 기술을 확립의 가능성을 평가하여, 조직 공학적 분야에 뿐만 아니 라 생분해성 고분자 시장 전반에 걸쳐 기술적용 가능성 개발에 대한 연구의 필요성을 평가하고자 하였음.
  - 고 에너지/브래그피크 에너지 이온 빔 조사에 의한 하이브리드 지지체 특성 분석연구의 필요성이 있었음.
  - 조직공학용으로 사용가능한 하이브리드 지지체 개발에 대한 산업적/사회적 필요성에 대한 평가를 진행하고자 하였음.

#### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

- 가. Film-type 및 다공성의 생분해성 PLGA 지지체 제조
  - Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Film 지지체 제조.

- 생분해성 PLGA 고분자와 ammonium bicarbonate 포로젠 혼합용액을 제조 한 다음, 포로젠을 발포시켜 다공성의 PLGA 지지체를 제조하였음.
- 나. 다공성 하이브리드 지지체 제조
  - 3% 키토산-아미노벤조산(키토산 유도체)용액을 제조된 다공성 PLGA 지지
     체 표면에 일차 코팅한 다음, 동결건조 시켜 다공성의 키토산유도체가 코팅
     된 PLGA 하이브리드 지지체를 제조함.
- 다. 10 MeV 고 에너지의 싸이클로트론 이온 빔 조사와 지지체 특성 평가
  - Film형 및 다공성 PLGA 지지체에 대하여 10 MeV 이온 빔 에너지를 조사 함.
  - Film형 및 키토산유도체가 코팅된 PLGA 하이브리드 지지체를 이온 빔 출구 로부터 일정거리에 위치시킨 다음, 고 에너지 이온 빔(10 MeV)으로부터 발 생하는 Bragg peak 에너지 이온 빔을 PLGA 필름 및 하이브리드 지지체에 일정 시간동안 조사하여 브래그피크 이온 빔 조사된 Film 및 다공성 지지체 들을 제조함.
  - 이온 빔 조사된 지지체들의 표면부분과 벌크부분으로 분리하여, 이온 빔 조
     사된 지지체의 표면과 벌크부분에 대하여 XPS, FTIR, 전자현미경 등으로
     이화학적 특성을 분석함.
- 라. 하이브리드 지지체의 계면현상 연구
  - 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체의 벌크특성 변화를 유도하고, 키토산유도체와 PLGA 지지체 사이에서 발생되는 화학구조변화, 키토산의 탈리 현상 등을 XPS와 전자현미경으로 하이브리드 지지체 계면의 물리화학적 특성변화를 분석함.
  - in vitro 세포배양 과정에서 하이브리드 지지체의 세포 및 조직반응성에 대
     한 관찰을 진행함.
- 마. 생체적합성 평가
  - 10 MeV 브래그피크 에너지 이온 빔이 조사된 다공성의 키토산 코팅된 하이
     브리드 PLGA 지지체 지지체들에 대하여 평활근세포를 이용하여 in vitro
     세포배양을 8주까지 진행함.
  - 8주 동안의 세포배양 과정에서 1, 3, 7일 등의 일정 기간 동안 광학현미경

으로 세포 부착 및 증식을 관찰하고, cck-8 kit를 이용하여 세포증식성을 평가함.

- 형광염료를 이용한 Live&Dead 분석으로 이온 빔이 조사된 키토산유도체가
   코팅된 하이브리드 지지체에서의 세포생존성을 형광현미경으로 관찰함.
- 브래그피크 에너지 이온 빔이 조사된 하이브리드 지지체 지지체들에 대하여 평활근세포를 이용하여 세포독성평가(BrdU assay, MTT assay, Neutral red assay)를 진행함.
- in vitro 세포배양과정에서 지지체의 형태학적 변화와 세포증식 유무를 광학 현미경으로 관찰함.
- 6주 및 8주 in vitro 세포배양된 지지체들에 대하여 MT 염색 및 H&E 염색
   을 진행하여, 콜라겐, 세포외기질 및 근섬유의 조직재생정도와 이온 빔 조사
   조건과의 상호관계를 분석함.

Ⅳ. 연구개발결과

- 10 MeV 이온 빔으로부터 생성되는 브래그피크 에너지의 이온 빔 중에서 0.12J, 0.25J, 0.48J 에너지를 다공성 하이브리드 지지체에 조사하였음.
- 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체에서는 키토산의 엷은 노 란색이 관찰되었으나, 싸이클로트론 이온 빔 조사 후에는 진한 갈색으로 변 하는 것을 육안으로 관찰함으로써, 이온 빔 조사에 의한 지지체의 개질을 관 찰할 수 있었음.
- 물리/화학적 분석을 진행한 결과, 벌크 및 표면에 대한 이화학적 특성이 변
   하는 것을 XPS, FTIR 등을 통해 확인하였음.
- 주사전자현미경(SEM) (50 배율과 200 배율, 250 배율)을 이용하여, 이온
   빔 조사 전, 후의 다공성 하이브리드 지지체의 표면 및 내부의 형태학적 변
   화를 관찰하였음.
- 이온 빔 조사 전에는 다공성 하이브리드 지지체의 내부는 30 80 um의 기공 크기를 가진 것으로 관찰되었으나, 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체 에서는 30 110 um으로 관찰 되었으며, 하이브리드 지지체의(50 배율) 표면보다는 내부의 기공이 보다 더 큰 것으로 관찰되었음. 이온 빔 조사된 지지체 들 중에서 이온 빔 세기가 가장 약한 0.12J의 에너지가 조사된 지지 체이 가장 밀도가 높았으며, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 넓은 밀도 를 가진 것으로 관찰되었음.
- 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 PLGA를 용매에 72시간 용출시

켜 얻어진 용출물을 이용하여 MTT, Neutral Red 및 BrdU 분석을 진행한 결과, 이온 빔 조사된 지지체는 세포 독성이 매우 낮은 것으로 평가되었음.

- 이온 빔 조사된 키토산 코팅된 다공성 하이브리드 PLGA 지지체에 최대 8주 동안 *in vitro* 세포배양된 지지체의 CCK-8 kit 분석을 진행하였음. 이온 빔 조사되지 않은 대조군에 비하여 이온 빔 조사된 지지체가 보다 우수한 세포 증식률을 보이는 것으로 관찰되었으며, 생성된 브래그피크 0.12J, 0.25J, 0.48J 에너지가 조사된 지지체의 세포증식을 비교한 결과에서는 0.12J의 이 온 빔이 조사된 지지체에서 가장 높은 세포증식률을 보였음.
- 이온 빔이 조사된 지지체에서 더 많은 세포들이 생존하고 있음을 Live & Dead 분석을 통해 확인하였으며, 0.12J의 에너지가 조사된 지지체가 가장 우수한 세포생존성을 보였음.
- 6주 및 8주 동안 in vitro 세포배양한 다공성 지지체 지지체를 H&E, MT 염색을 진행하여 콜라겐, 세포외기질 및 근섬유 재생을 평가하였음. 이온 빔 조사되지 않은 대조군에 비하여 이온 빔 조사된 지지체에서 세포 수 및 조 직재생이 보다 활발한 것으로 분석되었음.
- 6주차의 MT 염색을 분석한 결과, 이온 빔 에너지가 높을수록 기공의 크기 가 커지는 것이 관찰되었으나 제조과정에서 큰 기공이 발생하였는지는 명확 하지 않았음. 광학현미경(40배율)으로 재생조직의 표면을 관찰한 결과, 세포 핵 및 세포질의 분포가 지지체의 기공을 중심으로 형성되어 있는 것으로 관 찰되었음.
- 8주차 MT 염색으로 지지체를 분석한 결과, 6주차와 같이 대조군 지지체는 이온 빔이 조사된 하이브리드 지지체에 비해서 세포핵과 세포질이 적게 관 찰되었음. 그와 반대로, 이온 빔이 조사된 지지체의 경우에는 6주차에서 지 지체 외벽에 많이 포진되어 있던 세포들이 지지체 내부로 세포들이 이동 및 증식하고 있음이 관찰되었음.
- 6주간 세포배양한 지지체에 대한 H&E 염색분석에 따르면, 붉은색으로 염색 된 세포질이 기공을 중심으로 넓게 분포되었으며, 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서의 세포 분포가 0.25J와 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서의 세포분포에 비해 골고루 분포된 것으로 관찰되었음. 8주 동안 세포배양된 지 지체의 H&E 염색 결과, 대조군을 제외한 이온 빔 조사된 하이브리드 지지 체들이 높은 세포증식률을 보이는 것으로 관찰되었음.
- 8주 동안 세포배양된 지지체를 SEM으로 형태학적 분석을 진행한 결과, 이
   온 빔을 처리하지 않은 하이브리드 지지체와 이온 빔 조사된 지지체의 표면

은 이온 빔 세기와 상관없이 세포배양이 잘 이루어지지 않은 것이 관찰되었 음. 지지체의 내부의 경우, 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서 세포배양이 가장 골고루 분포된 반면에 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에 가장 낮은 세포분포가 관찰되었음. 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체 는 많은 기공이 있으나 높은 세포분포가 관찰되었음.

- 기공 및 다공성 조절이 어려운 다공성 하이브리드 지지체의 세포배양에 따른 문제점을 극복하기 위하여, Film형 지지체에 이온 빔 조사를 수행하여 지지 체의 생체적합성 연구를 추가수행 하였음. 가장 낮은 에너지가 조사된 0.17J 의 지지체에 세포배양을 진행하였을 때 흡광도 값이 가장 높은 것으로 관찰 되었으며, 0.72J의 브래그피크 에너지가 조사된 지지체의 흡광도 값이 가장 낮게 측정되었음.
- 이온 빔이 조사된 PLGA Film의 경우 다공성하이브리드 지지체와 동일하게 독성이 검출되지 않았기 때문에, 이온 빔 조사에 의해 지지체의 살균효과가 유도된 것으로 추정되었음.
- Chitosan-PLGA Film과 PLGA Film에 대식세포를 접종하여 염증세포 적 합성을 nitric oxide (NO<sup>-</sup>) 생성농도를 측정하였음. 비슷한 값의 브래그 피 크 에너지(0.71 vs 0.72 J)가 조사된 Chitosan-PLGA 지지체와 PLGA 지 지체의 NO 농도는 Chitosan-PLGA 지지체에서는 시간에 따라 감소하였으 나, 0.72J의 에너지가 조사된 PLGA Film은 대식세포에 의한 NO 방출은 시간에 비례하여 증가하였음. 48시간 지점에서 측정하였을 때, 0.71J 에너 지가 조사된 Chitosan-PLGA 지지체 보다는 0.72J 에너지가 조사된 PLGA 지지체의 NO가 2.4배 이상 높게 방출되는 것으로 관찰되었음.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 가. 기술적 측면에서의 활용방안
  - 싸이클로트론 이온 빔을 이용하여 고분자량의 PLGA 지지체의 벌크 및 표면
     변화 유도기술로 활용 가능성이 있는 것으로 평가되었음.
  - 서로 다른 특성의 고분자를 이용하여 제조되는 하이브리드 지지체에 대하여
     싸이클로트론 이온 빔을 조사하여 새로운 특성의 의료용 생체재료 개발기술
     로 활용이 가능할 것으로 평가되었음.
  - 싸이클로트론 이온 빔 조사에 의해 멸균과 벌크특성이 동시에 조절되는 조직
     공학용 지지체의 기술로 활용이 가능할 것으로 평가되었음.

- 나. 경제 산업적 측면에서의 활용방안
  - 다양한 분자량의 고부가가치의 의료용 PLGA 지지체를 개발 효과
  - 조직공학용 지지체, 생분해성 약물전달체, 하이드로젤의 소재개발의 활용가
     능
  - 싸이클로트론을 이용한 개발기술을 통해 멸균처리 되는 바이오소재(생체재 료)로의 적용영역 확대.

5. 영문 요약서

### SUMMARY

- Fabrications of the biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) porous scaffolds and Films were performed.
- Coating of chitosan on the porous PLGA scaffolds was performed in advance for irradiation of ion beams and their evaluations.
- 10 MeV ion beam on the biodegradable PLGA scaffolds and films has been irradiated for possibly modification of its bulk and surface properties by utilizing diverse generated Bragg peak energies.
- Chemical analyses of the ion beam-treated scaffolds was performed with XPS and FTIR.
- In vitro cell culture of the chitosan-coated hybrid scaffolds and films were processed for upto 8 weeks with observations of cell adhesion and proliferation. The live & dead assay showed better cell viability of the ion beam-treated hybrid scaffolds.
- Assays of MTT, Neutral Red and BrdU showed better *in vitro* biocompatibilities of the hybrid scaffolds.
- Inflammatory responses of the scaffolds were evaluated by measuring the amount of nitric oxide released.
- The ion beam-treated scaffolds seemed to demonstrate better *in vitro* cell compatibility and tissue regeneration than those of the untreated and chitosan-coated PLGA scaffolds as observed by H&E and MT staining.

# СОΝТЕΝТЅ

		1 Introduction	Chapter
16		1. Final Goal	Session
ch16	of Current Research	2. Necessity	Session

Chapter 2 Current Status of Domestic and Abroad Research Development 19
Session 1. Current Status of Related Research Examples19
1. Abroad
2. Domestic
3. Self-Analysis and Evaluation of Research Trends
Session 2. The Results of Review Analysis of Detailed Technologies19
1. Comparison of the Status of Domestic and Abroad Technology19
2. Major Technologies Based on the Process Units and Analysis
3. Current Status and Analysis of Traditional Processing and
Technologies20
4. Major Technologies Related to This Research
Session 3. Comparison of the Differences Between Previous Patents and
Foreign Technologies21
1. The Differences Compared to Previous Patents21
2. The Differences Compared to Previously Developed Foreign
Technologies22
3. Comparison Results22
Session 4. Analysis of the Review of Raw Materials22
1. Current Status of Domestic and Foreign Raw Materials and
Their Prospects22
2. Analysis and Prospects of the Current Status of Domestic and Foreign
Technologies Related to the Raw Materials

Session 5. Current Sta	tatus of Industry ·	23
1. Aspects of the Pro	oduct Life Cycle	

Chapter 3 Contents and Results of This Research	25
Session 1. Contents and Results of Major Research	25
1. Research Contents2	25
2. Research Results	32

Chapter	4	Achiev	vement	of	Resear	ch Goal	and	Contribution	to	the	Related
Researc	hes	s	••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	•••••	•••••	······68
Session	n 1	. Goal	of This	Ye	ar and	Achieve	ement	•••••		•••••	

Chapter 5 Application Plan of Research Results	
Session 1. Application Plan in Technological Aspects	
Session 2. Application Plan in Economic and Industrial Aspects	
Session 3. Research Outcome	
1. Researcher's Activity and Major Research Achievement	······69

Chapter	6	Information	of	Oversea	Science	and	Technology	Obtained	during
		This Resear	ch	••••••		•••••	•••••	•••••	······71

Chapter 7 Reference	3	•7	2	)
---------------------	---	----	---	---

7. 목차

제1장 연구개발과제의 개요 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
제1절 연구족적
제2설 연구의 필요성
1. 기술적 즉면 ···································
2. 경제·산업적 즉면
3. 사회·문화석 즉면
제2장 국내외 기술개발 현황
제1절 유사 연구사례에 대한 조사 현황
1. 외국의 경우
2. 국내의 경우
3. 조사한 연구개발사례에 대한 자체분석 및 평가결과
제2절 세부 기술사항의 검토 분석결과19
1. 국내·외 세부기술 수준 비교표
2. 공정단위별 주요 기술(技術)내용 및 그 기술수준의 분석 결과
가. 외국의 경우
나. 국내의 경우
3. 기존 공정방법·기술에 대한 현황 조사·분석
가. 기술적인 평가 : 적용의 난이성, 기술수준 등
나. 경제적인 평가 : 제조원가, 투자규모 등
다. 산업기술에 미치는 파급효과 분석
4. 본 연구와 관련된 주요기술 현황
가. 이온 빔 기술
나. 생분해성 고분자 생산 기술
다. 이온 빔 조사된 생분해성 고분자의 화학적·물리적 평가
라. 이온 빔 조사된 생분해성 고분자의 생물학적 평가
제3절 기존의 특허 및 외국의 기술과의 차이점 비교 검토21
1. 기존 특허내용과의 차이점
2. 기존 개발된 외국의 기술과의 차이점
3. 비교분석 결과

제3장 연구개발수행 내용 및 결과
제1절 세부연구목표별 주요연구내용 및 결과25
1. 연구내용
가. 하이브리드 지지체 제조 및 싸이클로트론 이온 빔 조사 조건 선정 25
(1) 다공성 PLGA 디스크 제조
(2) 키토산유도체 합성25
(3) 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 디스크 제조
(4) PLGA Film 제조
(5) 싸이클로트론 이온 빔 조사 준비
(6) 싸이클로트론 이온 빔 조사
나. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드
지지체의 물리/화학적 특성 평가
(1) XPS를 이용한 화학적 특성 평가
(2) FT-IR spectroscopy를 이용한 화학적 특성 평가
(3) SEM을 이용한 형태학적 특성 평가
다. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드
지지체의 <i>in vitro</i> 생체적합성 평가
(1) 지지체 멸균
(2) 세포 부착성 및 증식성 평가(CCK-8)
(3) Live & Dead29
(4) 독성평가
라. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드
지지체의 조직재생유도 및 평가
(1) <i>in vitro</i> 조직재생 특성 평가 (MT 및 H&E 염색)30

(2) SEM을 이용한 형태학적 변화 평가	··31
마. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 PLGA지지체의 <i>in vitro</i> 생체적합성평가	·31
(1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK−8)	·31
(2) 독성평가	·31
(3) 염증세포 반응성 평가	·31
2. 연구결과	··32
가. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리	Ľ
지지체의 제조 및 물리/화학적 특성 분석	··32
(1) 다공성 하이브리드 지지체 제조 및 평가	··32
(2) 싸이클로트론 이온 빔 조사	··33
(3) XPS를 이용한 화학적 특성 분석	··36
(4) FT-IR spectroscopy를 이용한 화학적 특성 분석	·37
(5) SEM을 이용한 형태학적 특성 분석	··38
나. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리	티드
지지체의 <i>in vitro</i> 생체적합성 분석	··40
(1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK−8)	··40
(2) Live & Dead	·48
(3) 독성평가	·49
다. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리	티드
지지체의 조직재생 특성 분석	·51
(1) <i>in vitro</i> 조직재생 특성 평가 (MT 및 H&E 염색)	·51
(2) SEM을 이용한 형태학적 특성 평가	·•58
라. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 하이브리드 지지체의 in vitro 생체적합식	성
평가	·•59
(1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK-8)	··59
(2) PLGA Film의 독성평가	·61
(3) 염증세포 반응성 평가	<del>.</del> 63
3. 연구결과에 대한 분석	··65
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	<del>.</del> 68
제1절 당해 단계목표 및 달성도	· <b>6</b> 8
제5장 연구개발결과의 활용계획	·69

<b>्</b> रे	제1적 기숙적 측면에서의 확용비	ズ
하 위 바 아	게이저 겨게 • 사어저 츠며에서이	7
철중 8 년	세2월 경제 전급적 특한에서ન	
	제3절 연구성과	ス
469	1. 참여연구월별 연구활동 및 주요 연구실	
	가. 참여연구원별 연구활동	
	나. 참여연구원별 연구실적	

# 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ..71

제7장	참고문헌		72
-----	------	--	----

# 제1장 연구개발과제의 개요

### 제1절 연구목적

 키토산유도체가 코팅된 폴리(락티드-co-글리콜리드) (PLGA) 하이브리드 지지체에 고 에너지 브래그피크 에너지의 싸이클로트론 이온 빔을 조사시킴 으로써, 지지체의 벌크 및 표면특성변화를 유도시켜 지지체의 분해에 따른 in vitro 조직재생분석과 하이브리드의 계면현상에 대한 연구를 진행하고자 함.

### 제2절 연구의 필요성

- 1. 기술적 측면
  - 폴리(락티드-co-글리콜리드)(PLGA) 고분자는 생분해성 고분자로써 조직 공학 지지체, 약물전달체 등으로 널리 활용되고 있음.
  - 특히 의료용고분자로써 고부가가치의 생체재료로 활용되고 있기 때문에 이를 다양한 분자량으로 구성된 소재로 개질한다면 소재의 활용도가 매우 높은 의료용 고분자임.
  - 현재는 효소 및 열처리로 합성과정에서 PLGA의 분자량을 조절하고 있으나, 제조공정에서의 일정비율의 락티드와 글리콜리드로 구성하여 제조하는 공정 을 거치므로 이에 대한 비용 상의 문제점 등이 발생하고 있기 때문에, 다양 한 분자량의 PLGA를 제조하여 고기능성, 고가의 소재로 활용하는 데 제한 점으로 작용하고 있음.
  - 현재 판매되고 있는 고분자량의 PLGA를 이용하여 지지체를 제조한 다음, 제조된 지지체에 대하여 고 에너지의 싸이클로트론 이온 빔을 조사함으로써 지지체를 구성하는 PLGA의 분자량을 저분자량으로 전환시킴과 동시에 이온 빔 조사과정에서 지지체에 존재하는 미생물을 사멸시킴으로써 멸균처리 된 조직공학용 지지체로 개발할 필요성이 있음.
  - 따라서 본 연구는 다양한 레벨의 고 에너지 싸이클로트론 이온 빔을 다공성
     PLGA 지지체에 적용하여 특정의 저분자량으로 구성되는 PLGA 지지체로
     간단하게 전환시킴과 동시에 지지체의 미생물을 제거시키는 기술의 가능성
     을 평가하였음.
  - 또한 이온 빔 조사된 생분해성 PLGA 지지체를 조직공학용 지지체로의 활용
     가능성을 평가하기 위하여 동물세포를 지지체에 배양하고, 지지체의 분해에
     따른 조직재생의 상관관계를 연구하고자 하였음.

- 특히 이온 빔을 적용하여 특정의 저분자량으로 구성되는 다공성 PLGA 지지 체는 분해속도가 달라지는 특성을 보이므로, 이온 빔 조사에 의하여 분자량 의 변화와 이에 따른 지지체의 분해속도를 조절한다면 이는 곧 환자의 조직 재생속도를 조절할 수 있는 기술로 응용될 수 있기 때문에 조직공학 적용가 능성에 대한 기술개발을 진행하였음.
- 2. 경제·산업적 측면
  - 폴리(락티드-co-글리콜리드) 고분자는 생분해성 고분자로 잘 알려져 있으
     며 조직공학 지지체 및 약물전달체 등으로 널리 활용되고 있으며,
  - 특히 의료용 고분자로 활용되기 때문에 고부가가치의 생체재료로 활용되어
     산업적 측면에서 매우 중요한 역할을 함.
  - 특히 PLGA는 근골격계 장기와 조직(인공 골, 연골, 비뇨기과 소재, 성형소 재 등)을 재생하는 데 생물학적 특성이 매우 우수한 생체활성물질 전달체로 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있는 고분자임.
  - 의료산업의 세계 및 국내시장규모가 10조원과 1,000억 원으로 추정되는 근 골격계 관련시장은 전 세계적으로 인구의 노령화로 인해 급격한 성장이 예 상됨.
  - 생분해성 고분자 중 PLGA의 생분해성 특성은 조성비 변화를 통하여 조절이 이루어지고 있으나, 생체재료로서의 특성의 편차가 발생하여 원하는 조건을 얻기 힘들 뿐만 아니라 그 절차와 비용의 확대로 이어지기 때문에, 결국 생 산단가가 높아지는 단점이 발생하고 있음.
  - 이러한 문제를 해결하기 위해 조절방법을 개발하여 다양한 분자량을 가진
     PLGA를 제조하여 생체재료 산업의 활성화가 필요함.
  - 다양한 분자량의 PLGA와 다른 생체적합성 고분자(예, 폴리에틸렌옥사이드)
     를 조합하여 상전이 하이드로젤로 합성하는 기술 및 다양한 분자량의 PLGA
     고분자와 항암제를 결합시켜 약물전달체로 활용, 조직재생속도 조절 가능한
     PLGA의 조직공학 지지체로 활용, 조직유착방지의 차폐막으로의 활용, 근골
     격계/신경 조직재생에 필요한 바이오소재로 활용 등과 같은 차세대 바이오소
     재로 활용가능하기 때문에, 다양한 분자량의 PLGA 특성조절기술은 바이오
     소재산업 기술로 중요함.
  - 본 연구에서 진행하였던 PLGA 분자량 조절 이외에도 키토산, 히알루론산,
     알긴산 등과 같은 생체재료의 분자량 조절 및 특성조절 기술로 활용가능하
     기 때문에 싸이클로트론 이온 빔 이용기술은 다양한 기능성 바이오소재 개

발을 위한 바이오산업으로 확장하여 활용 가능할 것으로 사료되어 산업적으 로 매우 중요한 것으로 사료됨.

- 3. 사회·문화적 측면
- 한국은 이미 고령화 사회(2002년)를 지나 노령화사회(2019년 예상)가 진행
   됨에 따라, 고령인구에 의한 골다공증, 관절염, 만성요통, 비뇨기계 등의 노
   인성 질환 환자들이 급증하는 실버사회의 문제점이 발생하고 있음.
- 급변하는 산업의 발달로 인하여, 산업화 사회의 부작용인 재해와 사고로 인
   한 고절손상 환자의 급증에 따른, 노인성 환자의 조직재생과 글루코사민 관
   절염 치료제와 같은 약물전달체 개발은 국내외 사회적 측면에서 필요함.
- 국내외 고령화 사회의 고령인구에 대한 의료복지 차원의 기능성 생체재료를
   이용한 조직수복에 필요한 의료용 소재개발은 사회-문화적으로 필요한 기술
   임.
- -상기에서 지적한 기술적/사회적/산업적 필요성에 따라, 본 연구과제에서는 고 분자량의 PLGA 디스크 지지체를 모델 생체재료/조직공학 지지체로 선정하 여, 싸이클로트론 10 Mev의 이온 빔 및 Bragg peak 이온 빔 에너지를 생 분해성 PLGA 지지체 조사하여 다양한 분자량의 PLGA로 전환가능성에 대 하여 평가하는 연구를 진행하였으며, 이온 빔 조사된 PLGA 지지체에 세포 배양을 진행함으로써 조직재생 가능성에 대한 평가를 진행하였음.

# 제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 유사 연구사례에 대한 조사 현황

1. 외국의 경우

- 고 에너지의 싸이클로트론을 이용한 생분해성 지지체의 표면과 벌크특성을 변화
   시킨 다음, 조직재생 속도조절을 위한 지지체로 활용하는 연구사례는 없는 것으로 추정됨.
- 2. 국내의 경우
- 싸이클로트론을 이용한 특정물질로 코팅된 생분해성 지지체의 표면과 벌크특성
   을 변화시킨 후, 조직재생속도조절에 대한 연구사례는 본 연구자그룹이 처음 시 도하고 있는 것으로 추정됨.
- 3. 조사한 연구개발사례에 대한 자체분석 및 평가결과
- 본 과제는 지지체의 벌크 특성조절과 분자량의 다양화 유도 및 조직재생에서의
   조직재생속도 조절가능성 유도기술에 대한 연구인데 반하여,
- 현재 국내외에서 진행하는 연구는 주로 생체재료의 화학적 개질 이외에 물리적
   특성변화 유도 기술로는 코로나 방전 및 플라즈마 처리를 통하여 지지체의 표면
   특성을 개질하는 연구를 진행해 왔음.

### 제 2절 세부 기술사항의 검토 분석결과

- 1. 국내·외 세부기술 수준 비교표
  - 지지체의 벌크특성 조절은 국외의 기술적용기술이 없는 관계로 국내외 비교
     할 수 있는 기술은 없는 것으로 사료됨.
  - 생분해성 고분자로 구성된 지지체의 벌크특성 조절에 따른 조직재생유도 기 술은 국내외 기술과 비교할 수 없는 것으로 사료됨.
  - 용도측면의 비교 기술은 아래와 같이 요약 가능할 것으로 사료됨.

유사연구사례	PGA : PLA 비율별	γ -irradiation 빔 조사를	코로나 방전 및 플라즈마
	중합을 통한 분자량	통한 PLGA의 분자량	처리를 통한 PLGA
세부기술항목	조절	조절	표면개질
특성 조절 물질	아연화디에틸, 톨루엔, 메탄올 등	$\gamma$ –irradiation	코로나 방전 및 플라즈마
특성 조절 평가	GPC를 이용한 평균 분자량 측정	Size exclusion chromatography (SEC)	접촉각 측정 및 섬유아세포 배양
특성 조절 범위	MW=20,000과 25,000Da 범위로 조절	18,700 Da에서 11,300 Da의 범위내로 조절	20% 표면 접촉각의 감소 및 조직재생 속도 향상

2. 공정단위별 주요 기술(技術)내용 및 그 기술수준의 분석 결과

가. 외국의 경우

- 생체재료의 생분해 기간을 조절하기 위하여 생체재료에 쓰이는 PLA 및
   PGA의 조성비를 다르게 하여 중합과정을 거치며 중합체로서 합성되어 생분
   해 기간을 조절함.
- 대표적인 조성 비율로는 PLA : PGA = 50:50, 70:30, 85:15 등이 있고
   일반적으로 각 비율별 기계적 특성 및 생분해 기간을 고려한 후 선정하여
   연구개발에 쓰이고 있음.
- 원하는 물성 강도와 생분해 기간 사이의 조절이 용이하지 않으며 표면 소수
   성인 특성을 갖기 때문에 세포 부착성이 떨어져, 개질을 통하여 세포의 부착
   성을 높이려는 시도가 필요.
- 나. 국내의 경우
- PLA 및 PGA를 용액 상으로 만든 후, 170℃의 100 rpm의 조건하에서 열 중합 하여 공중합체를 제조하며 분자량을 조절하였고, 20,000과 25,000 Da 의 분자량을 얻었으며, 이로써 지지체의 생분해 기간을 제어하여 약물 방출 속도 조절함
- 생분해성 고분자에 전자빔을 2.5 to 50 Mrad 의 강도로 하여 분자량을 조 절함.
- 3. 기존 공정방법·기술에 대한 현황 조사·분석.
  - 가. 기술적인 평가 : 적용의 난이성, 기술수준 등
  - 기존 공정방법은 화학적 용매를 사용하고 열을 가하는 등의 절차를 거치는
     반면에, 본 과제에서는 용매를 수반하지 않기에 조직공학용 다공성 고분자

지지체로의 기술적 제조가 용이하고, 공정상의 복잡한 단계가 축소되어 시간 및 경비를 줄일 수 있을 것으로 예상됨.

- 나. 경제적인 평가 : 제조원가, 투자규모 등
- 본 연구를 통하여서 얻어지는 결과로서 제조원가와 비슷한 수준으로 분자량
   및 특성이 조절된 결과물을 얻을 수 있을 것으로 생각됨.
- 생체재료로서의 사용이 널리 연구되고 있어 그 수요가 증가하고 있으므로,
   새로운 시장 형성과 확장이 예상되며, 그 규모에 영향을 끼칠 것으로 예상
   됨.
- 다. 산업기술에 미치는 파급효과 분석
- 본 기술의 완성으로 조직공학, 의료공학, 생명공학, 분석기술, 고분자 산업기
   술 및 고분자-생명공학의 산업 기술 분야에서의 조화를 유도할 수 있을 것
   으로 예상되며, 이를 바탕으로 조직공학 및 의료공학산업 적용이 예상됨.
- 4. 본 연구와 관련된 주요기술 현황
  - 가. 이온 빔 기술 : 화학공학, 의료공학, 생명공학, 물리학 전반에서 싸이클로트
     론의 이론 및 활용을 활발히 연구 중임.
  - 나. 생분해성 고분자 생산 기술 : 국내 회사 중 생체 재료로써 연구개발을 진행 하고 있는 삼양사 및 메타바이오메드사에서 PGA 및 PCL, PLA를 주로 다 루고 있으며, 그 밖에도 대상, SK, 호남석유화학, 한화, 새한, 신한 케미컬 등에서는 전분/PCL 블렌드 및 AP를 이용하여 생분해성 고분자를 실용화하 고 있음.
  - 다. 이온 빔 조사된 생분해성 고분자의 화학적·물리적 평가 : 화학공학 전반에 걸쳐 각종 기기를 이용한 분석기술이 확립되어 있으므로 분자량 변화에 따 른 구조변화 유무 규명과, 물성강도 측정 등 분석연구가 가능함.
  - 라. 이온 빔 조사된 생분해성 고분자의 생물학적 평가 : 조직재생 분야에서 생 분해성 지지체를 통한 조직재생 평가기술을 상당히 확보한 수준으로, 빔 조 사된 지지체의 조직 재생성 평가가 용이할 것으로 예상됨.
- 제 3절 기존의 특허 및 외국의 기술과의 차이점 비교 검토 1. 기존 특허내용과의 차이점
  - 기존의 널리 알려진 방법으로서 PGA 및 PLA를 유기용매와 혼합하여 약
     24-52시간동안 60°C의 온도와 질소 분위기 하에서 축중합하고, 메탄올을
     이용하여 환류하는 방법으로 각 50:50 또는 75:25의 비율로 중합된 PLGA

를 제조하고, 생분해 시간에 따라 약물 방출 시간이 다르도록 제어함.

- 본 과제에서는 싸이클로트론 이온 빔 조사에 의한 생분해성 지지체 제조기술
   로의 적용 가능성을 평가하려 함.
- 2. 기존 개발된 외국의 기술과의 차이점
  - 현재 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 생분해성 고분자의 분자량 조절기술 특
     허는 보고된 바 없으므로 외국 기술과 차이점을 비교할 수 없음.
- 3. 비교분석 결과
  - 본 과제는 국내외에서 시도된 적이 없는 기술이므로, 연구 개발을 통하여 생 분해성 생체재료 특성 조절을 위한 기술면에서 매우 독창적으로 평가받을 수 있을 것으로 사료됨.
  - 고 에너지 이온 빔 조사기술은 본 과제의 PLGA 소재 이외에도 다양한 의료
     용 소재에 적용할 수 있는 기술임.
  - 고순도를 요구하는 의료용 생분해성 생체재료의 특성을 갖추기 위하여 유기
     용매를 사용하지 않는 방법으로 특성을 조절하므로, 이온 빔 조사에 다공성
     소재는 의료용으로 적용하는데 안전성이 매우 높을 것으로 예상됨.
  - 의료용 소재는 마지막 단계에서 멸균처리를 필요하여 공정 추가요인으로 작 용하나, 본 기술을 적용하는 경우 이온 빔 조사에 의해 벌크 및 표면특성 조 절(하이브리드형 소재의 특성조절 경우)을 진행하면서 멸균처리가 동시에 진행되기 때문에 멸균처리가 추가된 소재특성조절 및 공정단축 기술로 활용 가능한 것이 차이점이 될 수 있음.
  - 또한 (다공성) 지지체의 표면에 키토산을 코팅하여 하이브리드형 지지체로 제조한 다음, 이온 빔 조사를 통한 벌크개질과정에서 2개의 서로 다른 물질 들의 융합 및 특성개질을 유도하여 새로운 바이오소재를 개발할 수 있는 새 로운 기술이 될 것으로 사료됨.

#### 제 4절 원자재에 대한 검토 분석

- 1. 원자재의 국내·외 수급현황 (생산, 수요, 수출입량 등) 및 그 전망
  - 원자재로 사용하려는 생분해성 고분자 PLGA는 의공학 분야에서 조직재생
     지지체와 약물방출 물질로서 개발하려는 연구가 활발히 이루어지고 있음.
  - 국내에서는 삼양사 및 메타바이오메드에서 생체재료로 사용되는 생분해성 고 분자를 제조 및 연구하여 판매하고 있는 것으로 알려져 있으며,

- 국외에서는 미국의 Sigma-Aldrich사, Polysciences사, 독일의 Boehringer Ingelheim, 미국의 American Cyanamid 등의 기업에서 PLGA를 판매 중 임.
- 본 사업의 고 에너지 이온 빔 조사기술은 연구하였던 PLGA에만 적용하는
   것이 아니기 때문에, 원자재 수급현황은 크게 의미가 없음.
- 2, 원자재에 관련된 국내·외 기술의 현황분석 및 전망
  - PLGA는 각 회사 모두 단 분자량의 상품으로 연구·판매되고 있어 다양한 저 분자량으로의 특성 조절기술이 체계적으로 확립되지 않은 것으로 사료됨.
  - 생체재료 특허 부분에서는 전체 출원중 상위권 재료별 출원 건수에서 PLA,
     PGA, PCL 등의 생분해성 고분자 연구개발에 대한 특허가 1위를 차지하고
     있으나, 고 에너지 싸이클로트론 이온 빔 조사기술을 통한 생분해성 고분자
     분자량조절 특허사례는 찾을 수 없었음.
  - 에너지 싸이클로트론 이온 빔 조사기술을 제조된 지지체 특성변화를 유도하
     기 위한 분자량 조절 기술은 생분해성 고분자 물질의 개발 및 조직 공학 지
     지체 연구에 많은 영향이 있을 것으로 사료됨.

### 제 5절 산업계 현황

- 1. 제품의 발전주기(Product life cycle)측면
  - 가. 세계시장에서 개발할 제품의 현재적 수준
  - 현재 생분해성 고분자는 친환경적 소재로서 수요가 급증하고 있으며, 각 국
     가 및 수십 개의 기업들이 생분해성 소재 개발에 참여하여 활발한 시장이
     형성될 것으로 예상됨.
  - 의료용 생분해성 고분자 시장은 플라스틱 시장의 규모에 비하여 작으나 매우 고부가가치의 제품으로서 20세기 후반부터 PLGA의 연구 및 상품화가 진행 되어 현재 제품시장이 상당히 확대되고 있는 단계임.
  - 의료용으로 사용되는 생분해성 고분자는 고순도의 품질을 가져야 하기 때문 에 잔류 유기용매 및 오염 물질을 제거하기 위해 별도의 정제과정을 거쳐야 만 하는 단점이 있으며, 이는 생분해성 고분자 지지체의 가격이 상승하는 요 인이 됨.
  - 싸이클로트론 이온 빔을 이용하여 생분해성 고분자의 특성 조절 기술로 수립
     된다면, 조직공학 지지체의 제조 및 응용, 약물전달체, 조직재생 산업에 많은

기여를 할 수 있을 것임.

- 산업적 응용에 있어서도 생분해성 고분자에서의 적용뿐만 아니라 생분해성
   플라스틱, 생분해성 섬유 등의 분야에서 기존 공정 및 비용을 단축할 수 있
   어 그 파급이 클 것으로 기대됨.
- 나. 개발될 제품을 국내에서 생산 또는 수출을 시작할 때에 선진국에서의 동 제 품의 위치

구분	개발기	도입기	성장기	포화기	쇠퇴기
표시		•			

# 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 세부연구목표별 주요연구내용 및 결과

- 1. 연구내용
  - 가. 하이브리드 지지체 제조 및 싸이클로트론 이온 빔 조사 조건 선정
  - (1) 다공성 PLGA 디스크 제조
  - lactide : glycolide가 65:35의 비율로 혼합된
     poly(DL-lactic-co-glycolic acid)를 (Sigma Aldrich Chemical Co.)
     1,4-dioxane에 18%의 비율로 용해하였음.
  - 원기둥모양의 mold(지름: 1cm, 길이: 2.5cm)에 앞서 제조된 PLGA용액과 150-180 um의 크기를 갖는 ammonium bicarbonate porogen 1.8 g을 혼 합하고 동결건조 하여 1,4-dioxane을 제거하였음.
  - 동결건조가 완료된 PLGA 로드(rod)와 ammonium bicarbonate 혼합물을 2 mm의 두께로 절단하여 디스크(disc) type으로 제조된 지지체를 37℃ 증류 수에 넣고 30분마다 증류수를 교환하며 6번 반복하여 3시간 동안 ammonium bicarbonate를 제거하여 다공성의 PLGA 디스크 지지체를 제조 하였음.
  - 동결 건조하여 (지름 1 cm, 두께 2 mm) 다공성 PLGA 디스크 지지체를 제조하였음.
  - (2) 키토산유도체 합성
  - 키토산 (5K~10K)이 (KITTO LIFE) 용해 된 증류수용액과 aminosalicylic acid (PAS)를 용해한 acetone용액을 함께 넣은 다음, 60℃로 가열하여 acetone을 증발시킨 뒤 N-(3-dimethylaminopropyl)—N'
     ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)를 넣어 3시간 동안 합성하였음.
  - (3) 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 디스크 제조
  - 미리 제조된 다공성 PLGA 디스크를 에탄올에 10분간 담지 시켜 기공 크기 를 넓힌 후, 합성된 Chito-PAS이 3% 비율로 distilled water(DW)가 용해 된 Chitosan-PAS 용액에 다공성 PLGA 디스크 지지체를 20분 동안 3회 60분간 담지 하였음. 코팅처리 된 지지체를 동결건조 하여 키토산유도체가 코팅된 다공성 PLGA 하이브리드 지지체를 제조하였음.

(4) PLGA Film 제조

- lactide : glycolide가 65:35의 비율로 혼합된 poly(DL-lactic-co-glycolic acid)를 1,4-Dioxane에 18%의 비율로 용해 하여 원기둥모양의 mold에 앞서 제조된 PLGA 용액을 온도를 서서히 낮춘 다음, 동결건조 하여 1,4-Dioxane을 제거하였음. 동결건조가 완료된 PLGA 로드(rod)와 ammonium bicarbonate 혼합물을 2 mm의 두께로 절단하여 PLGA Film을 제조하였음.
- (5) 싸이클로트론 이온 빔 조사 준비
- 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사조건을 수립하기 위하여 다공성 PLGA 디 스크의 밀도와 화학구조식을 기초로 Stopping and Range of Ions in Matter (SRIM) 프로그램에 대입하여 브래그피크의 범위, 에너지 세기와 조 사시간을 사전에 설정하였음.
- 싸이클로트론 이온 빔 조사를 위하여, 미리 계산된 SRIM 소프트웨어의 조건 에 따라 beam alignment razer를 이용하여 이온 빔이 정확하게 원통형 다 공성 PLGA 지지체 중앙에 조사되도록 조절한 다음, beam line 최종단으로 부터 134 cm 정도에 PLGA 지지체를 고정시켰음.
- 샘플 setting이 완료되면 proton accelerators로 MC-50 Cyclotron (Scanditronics Co.: Sweden) 장치를 이용하여 이온 빔 조사시간, 조사 강 도 및 조사거리를 다양한 조건으로 변화시켜 PLGA 샘플에 이온 빔을 조사 하였음.
- 이온 빔 조사과정에서 발생되는 조사전류와 조사에너지의 변화정도는 각각
   ion source의 power supply에 의해서 생성된 플라즈마 양과 ion beam
   line 끝에 위치한 알루미늄 판의 두께를 조절하여 실험을 진행하였음.
- 싸이클로트론 이온 빔 조사장치에서 발생된 이온 빔이 지지체 표면에 도달할 때의 실질 전류량은 beam current leading copper로 detection 하였으며, current meter (Danfysik, Current integrator 556)로 전류량을 확인하였음.

(6) 싸이클로트론 이온 빔 조사

이온 빔의 종류를 proton으로 선정 후 키토산유도체로 코팅된 다공성
 PLGA 디스크 지지체 3개와 코팅되지 않은 PLGA 디스크 지지체 2개를 교
 차로 세워 10 MeV 브래그피크 이온 빔을 4분 동안 다공성 PLGA 디스크

지지체에 조사함으로써 디스크를 구성하는 키토산유도체가 코팅된 PLGA 고 분자의 특성 조절 가능성을 평가하였음.

- 빔 조사거리에 따른 PLGA의 분자량 평가를 위하여 원반형 PLGA 디스크 표면과 beam line 최종단으로 부터 134cm의 위치에 PLGA 디스크 지지체 를 고정시킨 후 이온 빔을 조사하여 지지체의 변화를 관찰하였음.
- 이온 빔 조사실험이 끝나면, 조사된 이온 빔이 더 이상 방사되지 않도록 Pb
   판을 이용하여 이온 빔 라인을 차단하였음.
- 표면 처리된 지지체는 약 하루 정도 상온에서 방치시킴으로써, 지지체 표면
   의 잔류 방사선량을 제거하였음.
- 샘플에 존재하는 방사선 잔량은 허용범위까지 떨어지도록 샘플을 준비하여,
   이온 빔 조사된 다공성 하이브리드 지지체에 대한 평가를 진행하였음.
- 나. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체의 물리/화학적 특성 평가
  - (1) XPS를 이용한 화학적 특성 평가
  - 다공성 하이브리드 지지체 디스크의 화학적 특성 평가는 XPS(X-ray photo-electron spectroscopy, PHI 5800 ESCA System, Physical Electronics, Co. Ltd.)에 의한 표면분석을 통해 진행하였음.
  - 다공성 하이브리드 지지체 지지체의 화학적 특성 변화를 관찰하기 위해 2 x
     2 mm<sup>2</sup>의 크기로 잘라, 이온 빔 조사된 다공성 하이브리드 지지체 샘플을 XPS 분석용으로 준비하였음.
  - 전자현미경용 샘플 받침대에 샘플을 이중테이프로 고정시킨 다음, 지지체이 놓인 받침대를 XPS 내부에 위치하여, 진공펌프로 XPS 내부를 진공상태를 유지한 다음, spot size가 400 μm x 400 μm 인 X-ray를 발사하여 지지 체로부터 방출된 전자에너지를 collection 하여 실험을 진행하였음.
  - 조건은 background pressure가 2x10-10 torr, source는 Monochromator Al K-alpha 의 이온소스를 1486.6 eV의 출력을 사용하였고, anode는 250 W 및 10 kV, 27 mA의 조건에서 운행하였으며, calibrating은 C1s peak 인 284.6 eV 를 기준으로 하여 피크위치를 보정하여 결과를 분석하였음.
  - Survey scan과 high resolution data를 분석하여 싸이클로트론 이온 빔 조
     사 전과 후 지지체의 화학구조의 변화여부를 평가하였음.

(2) FT-IR spectroscopy를 이용한 화학적 특성 평가

- 비 조사된 다공성 하이브리드 지지체의 화학구조 변화 유무를 판단하기 위하
   여, FT-IR로서 빔 조사된 다공성 하이브리드 지지체와 싸이클로트론 이온
   빔 조사 되지 않은 다공성 하이브리드 지지체의 FT-IR peak 구조를 비교 확인하였음.
- FT-IR의 시료부인 직경 1 mm의 다이아몬드 판 위에 시료를 놓지 않은 상 태에서 금속 막대로 가압하여 background를 측정한 후, 다이아몬드 판 위에 빔 조사된 다공성 하이브리드 지지체 지지체 0.01 g을 놓고 금속 막대로 가 압하여 Attenuated Total Reflectance (ATR)—FTIR 스캔으로 다공성 Chitosan-PAS-PLGA 디스크지지체의 스펙트럼을 얻을 수 있었음.

(3) SEM을 이용한 형태학적 특성 평가

- 빔 조사된 다공성 하이브리드 지지체의 구조변화 유무를 판단하기 위하여,
   주사전자현미경(Scanning electron microscope: SEM)을 이용하여 표면
   250배율과 내부 200배율로 촬영하였음.
- 조사 전 다공성 하이브리드 지지체 지지체와 조사 후 지지체를 비교해서 물 리적 변화를 관찰하였음.
- 다. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체의 *in vitro* 생체적합성 평가
  - (1) 지지체 멸균
  - 세포배양에 들어가기 전에 미리 제조된 다공성 하이브리드 지지체를 70% 에탄올용액에 1시간씩 3회 담지한 후, 멸균된 PBS 용액으로 1시간씩 3회 헹구어 지지체의 에탄올 잔류액을 제거하였음. 추가적으로, 무균 작업대 안 에서 하루 UV-overnight하여 지지체의 잔류 PBS용액을 증발시켜 실험하 였음.
  - (2) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK-8)
  - 이온 빔 조사를 하지 않은 다공성 PLGA 하이브리드 지지체와 이온 빔 조 사된 다공성 PLGA 지지체 표면에 낮은 계대의 평활근세포(PASMC)를 지 지체당 200,000 cells/(지지체 표면)의 농도로 지지체양면 접종하여 10% FBS, PS 100µl/ml 넣어 8주 동안 *in vitro* 세포배양을 진행하였음.
  - 8주 동안의 세포배양 과정에서 1, 3, 7일차 등의 일정 기간 동안 광학현미

경으로 세포 부착 및 증식을 관찰하고, 배지와 Cell Counting Kit-8를 9:1 의 비율로 분주하여 2시간 반응 후 흡광도를 측정하여 이온 빔 조사 전, 후 의 다공성 PLGA 하이브리드 지지체의 세포증식성을 평가하였음.

- (3) Live & Dead
- 멸균된 PBS용액 600µl에 ethidium homodimer-1(EthD-1)을 1.2µl와 0.3µl의 4mM Calcein AM solution을 혼합하여 8주 동안 PASMC 세포가 배양된 24 well plate에 200µl/well 분주하였음. 15분 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 추가 배양한 후, 세포의 생존여부를 Fluorescence microscope 통해 관찰하였음.
- (4) 독성평가 (BrdU assay, MTT assay, Neutral red assay)
- 멸균 처리된 이온 빔 조사를 하지 않은 다공성 PLGA 지지체, 이온 빔 조사
   된 다공성 PLGA 지지체와 1 cm x 1 cm의 면적의 Teflon, Latex를 각각
   배양배지에 72시간동안 담지 하여 얻은 용출물로 독성평가를 수행하였음.
- 평활근세포(PASMC)를 96 well plate에 10,000cells/well 농도로 접종한 후 100µl/ml streptomycine와 100 unit/ml penicilin을 함유한 배지를 분 주하여 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 세포배양을 진행하였음.
- 24시간동안 세포배양된 96well plate의 배지를 제거하고 상기에서 얻는 용 출물을 배양된 세포에 100µl/well 농도로 2차 분주하여 24시간 추가 세포 배양을 진행하였음.
- Bromodeoxyuridine (BrdU assay) : 용출물을 2차 분주하여 24시간 추가 배양된 세포에 10µl/well BrdU labeling solution을 넣고 CO<sub>2</sub> incubator (5%, 37℃)에서 2시간 배양하였음. 배지를 제거하여 Fixdenat solution을 100µl/well 넣고 상온에서 30분간 고정시킨 후, Anti-BrdU-POD working solution을 100µl/well로 첨가하여 상온에서 20분간 반응시켰음. 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25µl/well 첨가하여 450nm 파장(참고파장 690nm)에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포증식률을 계산하 였음.
- Methylthiazolydiphenyl-tetrazolium bromide (MTT assay) : BrdU assay와 동일한 방법으로, 용출물 배지를 96well plate에 재분주하여 24시 간 추가 배양하였음. MTT solution으로 4시간 처리하여 상층액을 제거하고 formazan 침전물은 100μl/well dimethyl sulfoxide 용액에 약 10분간 녹

였다. 550nm 파장에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율 을 계산하였음.

- Neutral red assay: BrdU assay와 동일한 방법으로, 용출물 배지를 96 well plate에 재분주하여 24시간 추가배양을 수행하였음. 배양배지와 0.33% Neutral red solution 을 9:1 비율로 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator(5%, 37℃)에서 2시간 보관 후 상층액을 제거하여 Neutral red assay fixation 으로 washing 후, 상온에서 10분 동안 Neutral red assay solubilization 을 100µl/well로 처리하여 540nm 파장에서 microplate reader로 흡광도 측정을 통해 세포생존율을 계산하였음.
- 라. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체의 조직재생유도 및 평가
  - (1) in vitro 조직재생 특성 평가 (MT 염색 및 H&E 염색)
  - in vitro 세포배양된 다공성 하이브리드 지지체의 조직재생정도를 관찰하기
     위해 MT 및 H&E 염색을 진행하였음.
  - 6주 및 8주 동안 세포배양된 지지체를 2.5.% Glutaraldehyde용액에 하루,
     PBS 용액에 6시간 담지 하여 고정시킴. 일련의 에탄올용액에서 dehydration, clearing, impregnation 그리고 embedding 과정을 거친 후,
     paraffin wax와 함께 지지체를 paraffin block에 넣어 고정시켰음.
  - paraffin block에 고정된 지지체를 염색하기 위해 5um 두께로 절단 후 rack에 고정 시켜 순차적으로 xylene, 100, 90, 80, 70, 60, 50% Et-OH 그리고 DW에 각각 3분씩 담지 하여 Paraffin을 제거하였음.
  - Masson's Trichrome(MT) 염색은 56℃로 중탕한 Bouin's solution에 15 분 간 처리 후 증류수로 세척, 5분간 Weigert's iron hematoxylin solution 에 처리하여 핵을 염색시키고 증류수로 세척하였음. biebrich scarlet-acid fuchsin solution에 5분간 처리하여 근섬유, 섬유질을 염색하였음. 다시 증 류수 세척 후 순차적으로 phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution 과 aniline blue solution에 각각 5분간 처리, 1% acetic acid 2분간 처리 하여 콜라겐을 염색하였음.
  - Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색은 10분간 mayor Hematoxylin의 처리
     와 5분간 Eosin Y의 처리로 핵과 세포질을 염색하였음.
  - 염색된 슬라이드를 증류수로 충분히 세척 후, 순차적으로 50, 70, 80, 90,
     100% Et-OH 그리고 Xylene에 각각 30초 담지 하여 수분을 제거한 후 광

학현미경(x40, x100, x400)을 이용하여 조직을 관찰하였음.

#### (2) SEM을 이용한 형태학적 변화 평가

 in vitro 세포배양과정에서 이온 빔이 조사된 다공성 하이브리드 지지체의 세포배양 유무를 판단하기 위하여 8주간 세포배양 된 다공성 하이브리드 지 지체의 표면과 내부를 주사전자현미경(x500, x1000)을 이용하여 지지체의 형태학적 변화와 세포증식 유무를 광학현미경으로 관찰하였음.

마. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 PLGA 지지체의 *in vitro* 생체적합성 평가 (1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK-8)

- PLGA film을 다공성 하이브리드 지지체와 동일한 조건(10 Mev, 1.4 nA, 4분)의 이온 빔을 조사시킨 후, 동일한 방식으로 멸균하여 표면에 평활근세 포(PASMC)를 200,000 cells/(지지체 표면)로 양면 분주하였음.
- 다공성 하이브리드 지지체와 동일한 조건으로 2주 동안 in vitro 배양을 진 행하면서 세포배양 1일, 3일, 1주, 2주시점의 지지체에 대하여 cell counting Kit-8 (CCK-8)를 이용하여 흡광도를 측정하여 세포부착성 및 세포증식성을 비교 평가하였음.
- (2) 독성평가 (BrdU assay, MTT assay, Neutral red assay)
- 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 다공성 지지체의 생체적합성평가에서의 독성
   평가 방법과 동일한 방식으로 독성평가를 진행하였음.
- (3) 염증세포 반응성 평가
- nitric oxide의 생체 내 전변물질인 nitrite (NO<sup>2-</sup>)를 간접적으로 측정하여
   지지체로부터 발생된 nitric oxide 방출 양을 측정하였음.
- 지름 1 cm의 Chitosan-PLGA, PLGA Film을 제조하여 10 Mev, 1.4 nA
   4분간 이온 빔 조사 후, 대식세포를 200,000cell/지지체 농도로 지지체 표
   면에 분주하였음. 10% FBS, PS 100 μl/ml 넣은 배지를 지지체에 분주하여
   6시간, 24시간, 48시간 마다 배양배지를 추출하였음.
- 추출한 배지는 원심분리기와 0.22μm 필터를 사용하여 필터멸균을 하고 96 well plate에 100μl/well 재 분주하여 subtract solution 50μl/well 첨가 하였음. 상온에서 10분 반응, coloring solution을 50μl/well 넣어 상온에서 10분 반응 후 550nm 과장에서 microplate reader기를 통해 흡광도를 측정

하였음.

- 2. 연구결과
- 가. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체 코팅된 다공성 하이브리드 지 지체의 제조 및 물리화학적 특성 분석
  - (1) 다공성 하이브리드 지지체 제조 및 평가
  - 키토산유도체를 3% 용해시킨 증류수에 다공성 PLGA 지지체를 20분간 3회
     담지 하여 제조된 하이브리드 지지체의 키토산유도체의 코팅여부를 관찰하
     기 위해 키토산유도체가 코팅되기 전의 PLGA와 키토산유도체가 코팅된
     PLGA 지지체의 표면 및 단면을 관찰하였음.
  - 그 결과, 코팅 전 다공성 PLGA 지지체에서는 [그림 1-A]와 같이 표면과 단면 모두에서 PLGA 고유의 흰색이 관찰되는 반면 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체에서는 표면과 단면 모두에서 키토산의 엷은 노란 색을 띠는 것이 [그림 1-B]에서 관찰되었으며, 싸이클로트론 이온 빔 조사 후에는 진한 갈색을 띄는 것이 [그림 1-C]에서 보이는 바와 같이 육안으로 지지체의 개질여부를 관찰할 수 있었음.
  - 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체의 코팅여부의 확인을 위해 지지체를 절반으로 절단 후 계면을 디지털카메라를 통해 관찰한 결과, 엷은 황토색이 내부까지 관찰되어, 키토산유도체가 다공성 PLGA 지지체 내부까 지 코팅된 것이 육안으로 관찰되었으며 이는 코팅되지 않은 다공성 지지체, 이온 빔 조사된 지지체와 비교한 결과 색변화를 통해 키토산유도체의 코팅 여부가 구분되었음.[그림 1.]



그림 1. 지지체의 키토산유도체 코팅관찰: 다공성 PLGA(A), 싸이클로트론 이온 빔 조사 전 하이브리드 지지체(B), 이온 빔 조사 후 하이브리드 지지체(C)

- (2) 싸이클로트론 이온 빔 조사
- 고분자 지지체의 분자량 조절 유도 및 표면개질과 지지체의 벌크특성을 변경시킬 수 있는 이온 빔 조사조건을 SRIM 소프트웨어를 사용하여 10 MeV의 이온 빔 세기 및 1.4 nA의 전류량을 갖는 proton 이온 빔을 4분간 지지체에 조사되도록 설정하였음.
- beam line 최종단으로 부터 134 cm가 되도록 시료부에 3개의 키토산유도 체가 코팅된 PLGA 와 2개의 PLGA 지지체를 연속적으로 고정시켜 싸이클 로트론 이온 빔을 조사(10 MeV, 1.4 nA, 4min)하여 이에 따른 싸이클로트 론 이온 빔 에너지 분포를 관찰한 결과, 이온 빔이 조사된 5개의 지지체(거 리 1cm)까지 싸이클로트론 이온 빔 에너지가 조사되는 것을 관찰하였음
- 총 5개의 고정된 지지체 중 1, 3, 5번째 지지체의 이온 빔 에너지는 고정된 순서에 따라 0.12J, 0.25J, 0.48J로 나타났으며 브래그피그(Bragg peak) 에너지(조사된 에너지 중 최고점의 에너지)는 5번(0.48J) 지지체에 조사되 는 것이 관찰되었음.



그림 2. 거리에 따른 10 MeV 브래그 피크 에너지 세기 예측 (SRIM software)

지지체순서	1	3	5
이온 빔 거리 (cm)	134	134.4	134.8
에너지 세기(J)	0.12	0.25	0.48

표 1. 거리에 따른 10 MeV 브래그 피크 에너지 세기

- 이온 빔 출구부터 지지체표면까지 0.2 cm 간격으로 지지체를 위치시킴으로 써 134.0 cm에서 135.0 cm 까지 떨어진 상태에서 0.12, 0.25, 0.48J의 다양한 이온 빔 세기의 Proton 이온 빔이 조사되었으며 [표 1.], 지지체에 조사되는 에너지는 135 cm까지 지속적으로 증가하였음.
- 다섯 번째 놓여진 135.0 cm의 지지체에서 0.48J의 가장 높은 이온 빔 에너 지가 조사되며, 첫 번째 놓여진 134.0 cm에서 0.12J의 가장 낮은 에너지가 조사되는 것이 SRIM 프로그램으로 분석되었음.



지지체순서		1	3	5
이온 빔 거리 (cm)		134	134.4	134.8
에너지	PLGA Film	0.17	0.46	0.72

 PLGA
 0.20
 0.70
 0.

 표 2. 거리에 따른 10 MeV 브래그 피크 에너지 세기

0.70

0.712

0.26

세기(J)

Chito-

- 이온 빔 출구부터 지지체표면까지 0.2 cm 간격으로 지지체를 위치시킴으로 써 134.0 cm에서 135.0 cm 까지 떨어진 상태에서 SRIM 프로그램으로 분 석한 결과, 지지체에 조사되는 에너지는 135.0 cm까지 지속적으로 증가하여 PLGA Film의 경우 0.17, 0.46, 0.72J(브래그피크)의 다양한 10 MeV Proton 이온 빔이 조사되는 것이 관찰되었으며, 첫 번째 놓여진 134.0 cm 에서 0.17J의 가장 낮은 에너지가 조사되었고, 다섯 번째 놓여진 135.0 cm 의 지지체에서 0.72J의 가장 높은 브래그피크 에너지가 조사되는 것을 관찰 하였음.
- Chitosan-PLGA 경우 또한 0.26, 0.7, 0.712J(브래그피크)의 10 MeV Proton 이온 빔이 조사되어 다섯 번째 지지체이 0.71로 가장 높은 브래그피

크 에너지로 관찰되었음.

(3) XPS를 이용한 화학적 특성 분석

- 지지체의 화학적 특성을 Survey scan과 high resolution 결과를 비교함으
   로써 이온 빔 조사 전, 후 지지체 표면의 화학적 원소 구성함량 및 화학적
   결합의 변화들을 관찰하였음.
- 면저 Survey Scan으로 지지체 표면의 탄소와 산소의 원소구성 조성비를 측 정한 결과, 59.9%의 탄소원소와 40.1%의 산소원소로만 구성된 순수 PLGA [표 3-A]가 키토산유도체로 코팅되면서 [표 3-B]와 같이 55.8%의 탄소 원소와 35.5%의 산소원소로 탄소와 산소원소의 조성이 약간 감소한 반면 새로이 4.7%의 질소원소와 2.3%의 규소원소의 조성이 증가하였음.
- 이온 빔 조사 후 키토산유도체가 코팅된 하이브리드 지지체의 탄소와 산소의 함량은 이온 빔 조사 전보다 탄소원소의 조성비는 3.9% 증가한 59.7%이였 으며 산소원소는 0.3% 증가한 35.8%로 유사한 수치를 [표 3-C]에서 확인 한 반면 질소, 규소, 염소함량은 각각 2.6%, 1.0%, 1.1%로 감소하였음.

	C1s(%)	N1s(%)	01s(%)	Si2p(%)	Cl2p(%)
А	59.9	0	40.1	0.0	0.0
В	55.8	4.7	35.5	2.3	1.8
C	59.7	2.6	35.8	1.0	1.1

표 3. 지지체 표면의 XPS Survey scan 분석 결과: PLGA(A), 이온 빔 조사 전 하이브리드 지지체(B) 이온 빔 조사 후 하이브리드 지지체(C)

- XPS Survey Scan 결과를 기반으로 하여, C1s high resolution을 이용하여 이온 빔 조사 전의 키토산유도체와 PLGA 피크를 비교하여 이온 빔 조사 전, 후의 다공성 하이브리드 지지체 표면의 탄소원자를 중심으로 하는 화학 구조를 분석하였음.
- [그림 4-A]에서 286.2 eV에서의 강한 피크로 키토산유도체 (Chitosan-PAS)의 결합이 확인되었으며 [그림 4-B]에서 보이는 바와 같 이 PLGA에서는 246 eV의 -CH2- Hydrocarbon 결합, 286 eV의 -C-O- Ether 및 Alcohol 결합 그리고 288.2 eV의 -C(=O)-O ester의 carbonyl 결합이 총 3개의 강한 피크로 관찰되었음.
- 이온 빔 조사 전 키토산유도체가 코팅된 다공성하이브리드 지지체에서는 PLGA에서 확인한 246 eV와 288.2 eV에서의 피크가 [그림 4-C]에서 다 소 약하게 나타났으며, 반면 286.2 eV에서의 키토산유도체 결합이 강하게 나타나 상대적으로 키토산유도체와 유사하게 관찰되었음.
- 이온 빔 조사 후 키토산유도체가 코팅된 다공성하이브리드 지지체에서는 이 온 빔 조사전 보다 강한 246 eV의 -CH<sub>2</sub>-Hydrocarbon 결합과 288.2 eV 의 -C(=O)-O ester의 carbonyl 결합과 키토산유도체의 286.2 eV에서의 약한 결합이 관찰되었으나 새로운 피크가 생성되지 않아 이온 빔 조사 후에 도 PLGA와 키토산 유도체의 화학 구조를 상대적으로 잘 유지하고 있는 것 으로 관찰되었음. [그림 4-D]



그림 4. XPS 분석 : Chitosan-PAS(A), PLGA(B), 이온 빔 조사 전 키토산유도체가 코팅된 하이브리드 지지체 표면(C), 이온 빔 조사 후 키토산유도체가 코팅된 하이브리드 지지체 표면(D).

(4) FTIR spectroscopy를 이용한 화학적 특성 분석

- FT-IR을 통해 이온 빔 조사 전, 후의 다공성 하이브리드 지지체의 화학구 조를 이온 빔 조사 전의 키토산유도체(Chitosan-PAS)가 코팅된 다공성 하 이브리드 지지체와 PLGA를 비교하여 분석하였음.
- 다공성 하이브리드 지지체에서는 PLGA 고유피크인 3000-2800 cm<sup>-1</sup>

C-H stretching, C=O stretching at 1750-1735 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub> asymmetric at 1470-1430 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>-C=O asymmetric at 1425 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub> symmetric at 1395-1365 cm<sup>-1</sup>, O-C-C stretching at 1330-1050 cm<sup>-1</sup>그리고 CH<sub>3</sub> at 1250-800 cm<sup>-1</sup> 가 관찰되었음.

- Chitosan의 고유피크인 3294 cm<sup>-1</sup>의 -OH stretch vibration, -NH symmetric vibration, 1630 cm<sup>-1</sup>의 carbonyl (C=O) stretch vibration 그리고 1523 cm<sup>-1</sup>의 C-N stretch vibration, PAS의 고유피크인 3112 cm<sup>-1</sup> for =C-H aromatic stretch vibration and at 1698 cm<sup>-1</sup> for C=C aromatic vibration을 다공성 하이브리드 지지체에서 관찰되었음.
- 이온 빔 조사 후 상대적으로 3294 cm<sup>-1</sup>의 -OH stretch vibration, -NH symmetric vibration, 1630 cm<sup>-1</sup>의 carbonyl (C=O) stretch vibration, 1523 cm<sup>-1</sup>의 C-N stretch vibration 의 키토산 피크가 감소하는 것이 관 찰되었으며 이온 빔 조사 후 지지체 내부에서도 이온 빔 조사 후 표면과 유 사하게 피크들의 감소가 관찰되었음.
- 따라서 이온 빔 조사 전, 후 지지체의 기존 피크의 감소 및 증가와 약간의
   이동 변화 관찰로 이온 빔 조사로 인하여 하이브리드 지지체의 벌크 특성의
   화학적 변화를 분석하였음. [그림 5.]



그림 5. FT-IR분석 : PLGA (A), 이온 빔 조사 전 하이브리드 지지체 표면(B), 이온 빔 조사 후 하이브리드 지지체 표면 (C), 이온 빔 조사 후 하이브리드 지지체 내부 (D)

(5) SEM을 이용한 형태학적 특성 평가

- 주사전자현미경(50, 200, 250 배율)을 이용하여 이온 빔 조사 전, 후의 다 공성 하이브리드 지지체의 표면 및 내부를 형태학적으로 이온 빔 조사에 따 른 변화를 평가하였음.
- 이온 빔 조사 전에는 다공성 하이브리드 지지체의 내부는 30 80 um의 기공 크기를 가진 것으로 관찰되었으나, 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체 에서는 30 - 110 um으로 관찰 되었으며, 하이브리드 지지체의(50 배율) 표면보다는 내부의 기공이 보다 더 큰 것으로 관찰되었음. [그림 6.]
- 50배율로 지지체 내부를 관찰한 결과, 이온 빔 조사 후 지지체의 밀도는 이 온 빔 조사 전보다 넉넉하게 관찰되었으며, 이온 빔 조사된 지지체 중 이온 빔 세기가 가장 약한 0.12J의 에너지가 조사된 지지체가 가장 밀도가 높았 으며, 브래그피크 에너지인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 가장 넓은 밀도를 가진 것으로 관찰되었음.
- 200배율로 확대하여 내부를 관찰한 결과, 이온 빔이 조사되지 않은 지지체 내부의 경우 PLGA가 하나의 구성으로 된 상태에서 약간의 기공들이 형성되 어 육안 상으로 지지체의 높은 조밀도가 관찰되었음.[그림 6.]
- 반면 이온 빔이 조사된 지지체 내부의 경우 이온 빔 조사 전 보다 더 많은 기공이 형성되어 지지체의 조밀도의 정량적 분석이 어려웠으며, 작은 기공이 뭉쳐 큰 기공이 형성된 것을 관찰하였으나 명확한 기공의 형태를 유지하지 못하는 것이 관찰되었음.[그림 6.]
- 앞서 평가한 XPS와 FT-IR의 결과를 종합하면 이온 빔 조사에 의해 다공성 하이브리드 지지체 내부는 화학적 구조 변화에 큰 변화을 주지 않는 범위 내에서 이온 빔 조사 시의 순간적 발열에 의한 PLGA와 Chito-PAS의 물리 적 변화로 이온 빔 조사 전 지지체의 큰 기공이 더 작은 기공들로 추가 형 성되었으며 그 작은 기공들이 뭉쳐 이온 빔이 조사된 지지체 내부의 기공면 적이 커진 것으로 관찰되었음.[그림 6.]



그림 6. Chitosan-PAS coating 된 PLGA의 (1.4 nA, 10 MeV) 이온 빔 조사 전, 후의 SEM 표면 및 내부의 형태학적 모습.

나. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지 지체의 *invitro* 생체적합성 평가

(1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK-8)

- 이온 빔을 조사 하지 않은 다공성 PLGA 지지체와 10 MeV 싸이클로트론 브래그피크 이온 빔 에너지가 0.12J, 0.25J, 0.48J로 조사된 다공성 하이브 리드 지지체에 돼지대동맥 평활근세포(PASMC)를 사용하여 200,000 cells 의 농도로 지지체 양면에 분주한 후 10% FBS, PS 100 µl/ml 넣어 8주 동 안 in vitro 배양을 진행하였음.
- 최대 8주간의 배양기간 동안 1일차, 3일차, 7일차 등의 시점에서 이온 빔
   조사 전, 후의 흡광도 값을 cell counting assay (CCK-8) kit을 이용하여
   세포 증식의 정도를 평가하였음.
- 먼저 배양 초기인 1일차에서는 Control(이온 빔 조사 전 다공성 하이브리드 지지체)의 흡광도 값은 0.46 OD로 0.12J, 0.25J의 에너지가 조사된 다공성 하이브리드 지지체의 각각의 흡광도 값 0.42 OD와 0.46 OD 보다 크거나 비슷하였으며 가장 높은 0.48J 에너지가 조사된 지지체의 경우 0.47 OD 값 으로 다공성 하이브리드 지지체 중 가장 큰 흡광도 값이 관찰되었으나 1일 차에는 Control과 이온 빔이 조사된 다른 에너지의 하이브리드 지지체의 흡

광도 값 차이가 0.05이하로 이온 빔 조사 전, 후에 따른 세포 부착성 정도의 확연한 차이가 발견되지 않았음.

- 지지체에서의 세포배양 3일차의 흡광도 값을 1일차와 비교하였을 시 모든 지지체에서 흡광도 값이 증가하였으며, 0.12J이 조사된 지지체의 경우 0.54 OD 값으로 Control의 0.56 OD 보다 낮은 흡광도 값으로 1일차와 동일한 경향이 관찰되었으나 3일차의 0.24J의 지지체의 0.54 OD 값과 0.48J 지지 체의 0.62 OD 값은 Control보다 더 큰 흡광도 값으로 관찰되었음.[그림 8.]
- 배양 1주차의 다공성 하이브리드 지지체의 에너지 세기에 따른 흡광도 값을 관찰한 결과에서도 모든 지지체의 흡광도 값은 증가하였으며 0.12J가 조사 된 지지체 경우 0.85 OD 값으로 처음으로 Control의 0.84 OD 값 보다 높 은 흡광도 값이 관찰되었음.[그림 9.]
- 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우 1주차의 흡광도 값은 0.92 OD 이 미1일차와 3일차에 가장 높았던 브래그피크가 조사된 0.48J의 지지체는 0.25J의 지지체보다 낮은 0.89 OD 값이 관찰되었으나 흡광도 값이 Control 보다 0.12J의 지지체에서 적었던 1일차, 3일차와 달리 1주차에서 이온 빔이 조사된 지지체(0.12J, 0.25J, 0.48J)가 Control 보다 모두 높은 흡광도 값을 나타내었음.[그림 9.]
- 세포배양 4주차의 지지체의 흡광도 분석 결과, Control은 1.73 OD, 0.25J
   의 지지체는 1.86 OD, 0.12J의 지지체 1.87 OD, 0.25J의 지지체 2.00 OD
   값 순으로 1주차와 동일한 지지체 간의 흡광도 값 크기의 순서를 나타냈으
   며 1주차보다 2배 이상의 흡광도 값 증가로 높은 세포증식성이 관찰되었음.[그림 10.]
- 세포배양 6주차 다공성 하이브리드 지지체에서의 세포부착성 및 증식성을 흡광도 값으로 관찰한 결과에 따르면, Control의 경우 세포배양 6주차 지지 체 중 가장 낮은 1.90 OD 값을 보였으며 0.12J의 지지체 경우 2.34 OD 값, 0.25J의 지지체 경우 2.22 OD 값과 0.48J의 지지체 경우 2.20 OD 값 이 관찰되어 이전과 다르게 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서 가장 높은 세포증식성 증가가 나타났으며 이온 빔 조사된 지지체 중 브래그피크인 0.25J의 지지체에서 가장 낮은 흡광도 증가가 관찰되었음.[그림 11.]
- 마지막 8주차에서 Control는 2.02 OD 값으로 지지체 중 가장 낮은 흡광도
   를 나타냈으며 6주차에서 가장 높은 증가세를 보였던 0.12J의 지지체에서
   2.32 OD 값으로 2번째로 큰 흡광도 값이 관찰되었음. 0.25J 지지체의 경우
   에는 2.25 OD 값이며 브래그피크인 0.48J의 지지체에서 가장 큰 흡광도인

2.33 OD 값의 흡광도가 관찰되었음.[그림 12.]

- 8주간의 CCK 흡광도 값을 비교하면 Control의 경우 이온 빔이 조사된 다공
   성 하이브리드 지지체보다 흡광도가 낮은 경향성이 1주차에 처음 관찰되었
   으며 8주차까지 변함없이 지지체 중 가장 낮은 흡광도 값을 보였음.
- 반면에 1주차에 가장 높은 흡광도를 나타낸 0.25J의 에너지가 조사된 지지 체의 경우에는 4주차, 6주차, 8주차에서 Control보다는 높은 흡광도 값이나 이온 빔이 조사된 지지체 중에서 가장 낮은 흡광도 값을 나타내었음. 증가율 의 변화가 가장 적었던 브래그피크의 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경 우에는, 세포배양 초기인 1주차까지 지지체에서의 느린 세포부착과 성장으로 세포증식률 변화가 더뎠으나 4주와 8주에서 활발한 세포 증식으로 가장 높 은 흡광도가 관찰되었음.[그림 13.]
- 8주간의 세포배양 결과, 4가지 조건의 지지체 모두 1일 보다 흡광도 값이 시간에 따라 높아져 세포가 지지체에 부착하여 원활히 증식하였다고 판단되 며 특히 1일차와 3일차를 제외한 8주 동안의 세포배양에서 이온 빔 조사된 다공성 PLGA 하이브리드 지지체의 흡광도 값이 이온 빔 조사를 하지 않은 다공성 PLGA 지지체에서의 흡광도 값보다 높은 수치로 관찰되어 10MeV의 이온 빔 조사로 인해 다공성 하이브리드의 지지체에서의 세포 증식이 보다 적합한 환경으로 조성됨을 확인하였음.[그림 13.]





그림 10. 10 MeV 브래그피크 이온 빔 에너지 세기 별 흡광도 (4week)



그림 11 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 12 10 MeV 브래그피크 이온 빔 에너지 세기 별 흡광도(8week)

그림 9.10 MeV 브래그피크 이온 빔 에너지 세기 별 흡광도 (1week) CCK 6주차 3.0

1.4

1.2

1.0

0.8 O.O

0.6

0.4

0.2 ·

0.0 ·



에너지 세기 별 흡광도 (6week)



그림 13. 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 브래그피크 에너지 조사된 지지체의 세포증식성에 따른 흡광도 변화량 (1day-8week).

- 또한 1일차에서 관찰된 이온 빔 조사 전, 후의 하이브리드 지지체의 흡광도 값을 기준으로 3일차, 7일차, 1주차, 4주차, 6주차, 8주차의 흡광도 값의 증 가율을 통해 세포 증식정도를 관찰하였다. 10MeV 이온 빔 에너지 세기에 따른 흡광도 값의 증가율을 관찰한 결과에 따르면, 1일차 대비 3일차의 증 가율에서 이온 빔 조사 전의 Control에서 122% 증가율, 0.12J에서 125% 증가율이 관찰되었음. 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증가 율은 134%의 세포증식률을 보였고, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경 우에는 0.25J의 에너지가 조사된 지지체보다 낮은 131%의 세포증가율이 관찰되었음.[그림 14.]
- 1일차 대비 7일차의 증가율에서 Control의 증가율은 180%로 관찰되었고,
   3일차에 비해서 58%의 증가치를 나타내었음. 0.12J의 에너지가 조사된 지
   지체의 경우의 세포증가율은 197%로 측정되어 72%의 증가율을 나타내었으
   며, 3일차와 비교하였을 때에는 Control과 많은 차이를 나타내지 않았던 증
   가율이 7일차에서 많은 증가율이 관찰되었음.[그림 15.]
- 0.25J의 에너지가 조사된 지지체를 측정한 경우 199%의 세포증식률이 관찰 되었으며, 3일차와 비교하였을 시 64%의 증가율을 보였으며, 브래그피크의
   0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 185% 세포증가율이 관찰되었

음. 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 이온 빔이 조사된 지지체 중 가장 낮은 세포증식률을 보였음.

- 1일차 대비 4주차의 증가율에서 Control은 372%로 관찰된 반면 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증가율은 435%로 관찰되었음.
   Control과 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증가율은 1주차 와 비교하였을 때 많은 증가율이 상승한 것으로 관찰되었음.[그림 16.]
- 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증가율은 401%로 관찰되었고 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 417%로 관찰되었음. 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체 중 가장 높은 증가율을 보인 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증가율이 4주차에 들어서가장 낮은 증가율이 관찰되었음. Control과 이온 빔 조사된 지지체를 비교하였을 시 이온 빔을 처리 하지 않은 Control의 경우 이온 빔 조사된 다른 지지체들에 비해 세포증가율이 가장 낮게 측정되었음.
- 1일차 대비 6주차의 흡광도 값의 증가율을 관찰한 결과 Control의 경우 410%의 세포증가율이 관찰되었고, 0.12J와 0.25J의 에너지가 조사된 지지 체의 경우에는 545%와 467%의 세포증가율이 관찰되었음. 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 468%의 세포증가율이 관찰되 었고, 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에 1일차 대비 4주차의 그래 프 결과와 같이 가장 높은 세포증가율이 관찰되었음.
- 마지막으로 1일차 대비 8주차 결과에서는, Control은 435%의 세포증가율이 관찰되었고 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 6주차와 동일한 540%가 관찰되었음. 0.25J와 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 1일차 대비 6주차의 흡광도 값와 유사하게 성장한 485%와 487%의 증가율 이 관찰되었음.[그림 18.]
- 8주를 통틀어 1일차 대비 세포증식률에서 관찰한 결과 3일차와 7일차에서 느린 성장률을 보인 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에 4주차와 6주 차, 8주차에서 가장 높은 세포증가율이 관찰되었으며 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 가장 낮은 에너지의 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에 비해 가장 느린 증가율이 관찰되었음.
- 이는 흡광도 값과 비교하였을 시 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우
   이온 빔 조사에 의한 지지체 내부의 분자량 감소가 가장 적기 때문에 배양
   초기에 높은 성장률을 보인 후 6주차와 8주차에서 성장률이 저조한 반면,
   배양초기에는 다른 지지체보다 저조한 세포성장율을 보인 브래그피크인

0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우 배양후기인 6주차와 8주차에서도 꾸준한 성장률이 관찰되었음. 이러한 결과는 이온 빔 조사로 지지체의 벌크 특성이 변화되어 세포 성장이 가능한 영역의 감소로 인한 것으로 추정되었 음.[그림 19.]

- 1일차 대비 세포증식률에서 8주 동안 이온 빔 조사된 다공성 하이브리드 지 지체의 세포증식률이 이온 빔 조사를 하지 않은 다공성하이브리드 지지체의 세포증식률보다 높은 수치를 보이며, 이온 빔 조사된 다공성하이브리드 지지 체 중 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 세포증식률이 2주부터 8 주까지 가장 높아 세포가 성장하고 활성화되는데 가장 적합한 조건의 지지 체로 분석되었음.
- 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체의 0.25J와 0.48J의 에너지가 조사된 지 지체의 경우에는 세포증식률의 차이가 확연하지 않아 뚜렷한 경향성은 관찰 되지 않았음.
- 배지에 담긴 채로 8주간 배양평가가 진행되는 동안 같은 조건의 지지체에서 도 지지체크기가 수축과 팽창을 반복하여 정확한 CCK 값을 얻는데 변수로 작용하여 시간이 지날수록 1일차보다 편차가 커지는 이유로 볼 수 있음



0.4796





그림 19. 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 브래그피크 에너지 조사에 따른 지지체의 조직재생 정도에 따른 1일차 대비 흡광도 증가율 (3d/1d-8w/1d).

- (2) Live & Dead
- 세포배양 8주 후 지지체별 세포배양정도를 분석하기 위해 Live & Dead assay를 진행한 결과, 이온 빔이 조사되지 않은 Control에 비해 이온 빔이 조사된 0.12J와 0.25J, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 이미지에서 녹색 및 붉은색이 더 많이 분포하는 것으로 분석되었음.[그림 20, 21.]3
- 이온 빔이 조사되지 않은 Control의 A, B는 살아있는 세포의 녹색이 관찰은 되어있으나 일부분에 포진된 반면 이온 빔 조사된 0.12J의 C, D의 경우 이 미지 전체에 녹색과 약간의 붉은색이 고루 포진되어 있는 것이 관찰되었음.
   이와 같은 경향성은 0.12J 뿐만 아니라 0.25J 및 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서도 100과 200배율의 형광현미경 관찰을 통해 분석되었음.[그림 20.]
- 이온 빔 세기 별 세포 분포를 관찰한 결과 0.12J의 에너지가 조사된 지지체 에서 가장 많은 세포 분포를 보여 세포의 성장 및 분포가 가장 높은 것으로 관찰되었음. 0.25J의 에너지가 조사된 지지체는 살아있는 세포의 많은 것으 로 분석되었음. 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에는 살아있는 세포와 죽은 세포가 다량으로 관찰되었으나 0.12J의 에너지가 조 사된 지지체의 경우에 비해 낮은 세포분포가 관찰되었음.[그림 21.]

세포 분포가 일련의 한 층이 아닌 다공성 지지체의 여러 층에 분포되어 검경
 시 형광현미경의 초점을 돌리면 지지체 층층마다 초록형광색을 띤 살아있는
 세포가 지지체 안에 겹겹이 존재하는 것이 확인되었으나, 컴퓨터 프로그램을
 이용하여 지지체 중 한 곳으로 초점을 맞춰 이미지를 찍을 때에는 세포분포
 가 고르게 보이지 않아는 어려움이 있어 염색을 통해 추가 확인이 필요함.



그림 20. 세포배양 8주 후 Live&Dead: Control 100x(A), Control 200x(B), 0.12J 100x(C), 0.12J 200x(D)



그림 21. 세포배양 8주 후 Live&Dead: 0.25J 100x(E), 0.25J 200x(F), 0.48J 100x(G), 0.48J 200x(H)

(3) 독성평가

- 이온 빔이 조사를 하지 않은 다공성 PLGA 하이브리드 지지체와 이온 빔 조 사된 다공성 PLGA 하이브리드 지지체의 용출물이 돼지대동맥 평활근세포 (PASMC)에 미치는 영향을 분석하기 위하여 PASMC 10,000 cells/well을 이용하여 BrdU assay, MTT assay, Neutral red assay를 진행하였음.
- 무독성인 Teflon의 용출물을 분주한 값을 음성 대조군, latex의 용출물을 양성 대조군으로 하여 상기의 세 가지 실험을 진행한 결과, MTT assay에서 세포생존율은 latex에서 29%인 반면에, Control은 118%가 관찰되었음. 이 온 빔이 조사된 0.12J의 에너지가 조사된 지지체와 0.25J의 에너지 조사된 지지체, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체는 각각 113%, 99%, 92%의 세포 생존성이 관찰되었음. 모든 지지체들의 세포생존율은 latex보다 높게 나타났으나, 이온 빔이 조사되지 않은 지지체에서 가장 높게 측정되었음. [그림 22.]
- 음성대조군인 Teflon 대비 BrdU assay 결과 양성대조군인 latex의 경우
   60%의 생존율을 보인 반면에, 이온 빔을 조사하지 않은 Control의 경우

112%가 분석되었음. 반면 10MeV의 이온 빔 0.12J, 0.25J, 0.48J의 에너 지가 조사된 다공성 하이브리드 지지체의 경우 108%와 127%, 129%가 측 정되었음. Control과 비교하였을 시 0.12J가 조사된 지지체를 제외한 0.25J, 0.48J가 조사된 지지체에서 더 높은 세포생존율이 관찰되었음.[그림 23.]

- Neutral Red assay를 이용한 PASMC 세포의 생존율은 latex에서 6%의 세 포생존성을 보이는 반면에, Control의 경우에서 92%의 높은 생존율이 관찰 되었고 이온 빔을 처리 한 0.12J, 0.25J의 에너지가 조사된 지지체는 그 보 다 낮은 85%와 80%가 관찰되었음. 반면 브래그피크 에너지가 조사된 지지 체인 0.48J의 지지체 경우 102%의 세포생존율이 분석되어 latex와 비교하 였을 시 월등히 높은 세포생존율이 관찰되었음. [그림 24.]
- 상기의 독성평가를 진행하여 분석한 결과에 따르면, 하이브리드 지지체는 독 성이 있는 양성대조군 latex에 비해 세포생존율이 현저히 높고, 음성대조군 인 Teflon과 유사한 세포생존율 수치가 확인되었기 때문에 이온 빔 조사 유 무와 관계없이 다공성 PLGA의 용출물이 세포증식에 미치는 영향이 없음을 알 수 있었음.
- 통계프로그램인 SPSS version 18을 사용하여 실험설계에 대한 분산분석
   결과 BrdU assay, Neutral red assay 결과 값이 p < 0.05 인 경우에 해</li>
   당하여 통계적 유의성(\*)이 있는 것으로 판정되었음.
- 3가지 실험마다 가장 높은 세포생존율이 각각 다른 지지체로 분석이 되었으
   나 이온 빔이 조사되지 않은 지지체보다 이온 빔 조사가 된 지지체들의 세 포생존율이 높은 이유는 하이브리드지지체가 이온 빔을 받은 내부에서 짧은
   시간이나 높은 고온으로 인한 지지체 자체의 살균능력으로 위와 같이 latex
   및 이온 빔이 조사되지 않은 지지체에 비해 높은 세포생존율이 관찰되었다
   고 사료됨.





그림 22 독성평가분석: Neutral red assay





그림 24 독성평가 분석: MTT assay

- 다. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지 지체의 조직재생 특성 분석
  - (1) *invitro* 조직재생 특성 분석 (MT 및 H&E 염색)
  - 이온 빔이 조사된 다공성 PLGA 하이브리드 지지체의 조직재생 정도를 관찰 하기 위하여 PASMC가 배양된 6주차 및 8주차 지지체를 Masson's Trichrome(MT) 및 Hematoxylin and eosin (H&E)염색을 실행하여 조직 재생 정도를 평가하였음.
  - 다공성 지지체에 세포들을 이식한 후에 세포들이 기공내부로 이동하면서 조
     직을 형성하기 때문에 세포 수와 조직재생 정도를 정량적으로 분석하기 어

려운 문제점이 도출되었음. 세포증식성에 따른 조직재생을 평가하기 위하여 조직염색방법이 사용되고 있으나 분석하는 연구자와 지지체 위치에 따라 달 라지는 결과의 주관적 특성을 극복하기 위하여, 염색 데이터 수를 늘려 객관 성을 확보하는 실험을 진행하였음.

- 6주차의 MT 염색을 분석한 결과, 기공의 크기는 이온 빔 에너지가 높을수록 기공의 크기가 커지는 것이 관찰되었으며 표면을 40배율로 관찰한 결과, 세포핵 및 세포질의 분포가 기공을 중심으로 분포되어 있는 것이 관찰되었음. Control과 0.12J, 0.25J, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 기공 크기를 비교하였을 때, 이온 빔 세기가 커질수록 기공의 크기가 커짐이 관찰되었음.[그림 25.]
- Control은 이온 빔이 조사된 지지체에 비해 많고 넓은 지지체를 보유하고 있으나 세포 성장은 적은 것으로 관찰되었음. 반면 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서 기공을 중심으로 세포핵과 세포질의 많은 분포가 확인되었음.[그 림 25.]
- 0.25J과 0.48J의 이온 빔 에너지가 조사된 지지체에서 유사한 정도의 세포 핵과 세포질 분포가 분석이 되었으나, 이온 빔에 의한 지지체 기공의 크기가 커져 지지체 면적이 줄어든 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서는 많은 세 포가 관찰되지 않았음.[그림 25.]
- 100배율로 조직재생을 관찰한 결과 Control의 지지체 외벽 부분은 약간의 세포가 분포했으나 이온 빔이 조사된 지지체에 비해 적은 양인 것으로 관찰 되었음. 0.12J과 0.25J 및 0.48J의 에너지를 조사한 지지체들은 지지체 외 벽 부분에 많은 세포배양이 진행된 것이 관찰되었음.[그림 26.]
- 하이브리드 지지체의 외부 및 내부를 400배율로 관찰한 결과에 따르면 이온 빔 조사 유무와 관계없이 콜라겐 생성으로 지지체 일부에 푸른색으로 옅게 염색된 것을 확인하였으며 이온 빔이 조사되지 않은 지지체에서 세포질 및 핵이 관찰 되었으나 이온 빔이 조사된 지지체에 비해 적은 양의 세포분포가 관찰되었음. 가장 적은 에너지인 0.12J이 조사된 지지체에서는 지지체의 기 공이 0.25J과 0.48J이 조사된 지지체의 기공에 비해 기공크기가 작고 많은 세포가 증식되어 있는 것이 관찰되었음. [그림 27, 28.]



그림 25 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 26 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 6주차 (40X, MT assay) 6주차 (100X, MT assay)



그림 27 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 28 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 6주차 주변부 (400X MT assay) 6주차 내부 (400X, MT assay)

- 8주차의 MT염색 분석한 결과 Control을 포함한 하이브리드 지지체의 표면
   의 기공크기가 6주차에 비해 더 커진 것이 관찰되었음. 이는 세포를 배양하
   기 위해 배양액에 장시간 담가 놓은 상태에서 지지체가 일부 분해되거나 약
   해진 것으로 사료됨.
- 8주차 지지체분석에서도 6주차와 동일하게 Control의 경우 낮은 세포증식률 을 보이며 다른 이온 빔이 조사된 하이브리드 지지체에 비해 세포핵과 세포 질이 적게 관찰되었음. 그와 반대로 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 6주 차에서 지지체 주변주에 많이 포진되어 있던 세포들이 지지체 내부까지 많 은 증식한 것이 관찰되었음. 위와 같은 경향은 0.25J와 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서도 관찰되었으며, 시간이 지날수록 이온 빔을 조사한 하이 브리드 지지체의 세포성장률이 점차 좋아지는 것이 MT염색을 통해 관찰되 었음. [그림 29, 30, 31, 32.]



그림 29 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 30 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chito-PAS-PLGA 8주차 (100X MT assay)

조사 전, 후 Chito-PAS-PLGA 8주차 (40X MT assay)



그림 31 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 32 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 8주차 주변부 (400X MT assay)

조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 8주차 내부 (400X MT assay)

- H&E 염색을 수행하여 세포배양 6주차의 다공성 하이브리드 지지체를 분석 한 결과 기공의 크기는 MT염색과 같이 이온 빔이 조사되지 않은 지지체는 기공이 많지 않은 것이 관찰되었으나 이온 빔이 조사된 지지체는 에너지가 커질수록 큰 기공이 관찰되었음.[그림 33.]
- 붉은색으로 염색된 세포핵과 세포질이 기공을 중심으로 넓게 분포되었고, 세 포들의 분포정도는 0.12J의 에너지가 조사된 지지체가 다른 크기의 에너지 가 0.25J과 0.48J가 조사된 지지체에 비해 골고루 포진한 것이 관찰되었 음.[그림 34.]
- 이를 400배 주변부로 분석한 결과, Control의 경우 약간의 세포핵과 세포질 이 분석되었으나 이온 빔이 조사된 지지체의 경우 Control에 비해 다량의 세포가 분포된 것이 관찰되었음. 그러나 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조 사된 지지체에 비해 0.12J이 조사된 지지체에서 더 많은 핵과 세포질의 분

포가 붉은색과 보라색으로 관찰되었음.[그림 35.]

- 지지체의 주변부과 내부를 분석한 결과에 따르면 Control의 경우 주변부 및 내부에서 세포 분포가 적게 관찰되었으나 이온 빔이 조사된 지지체의 경우 주변부에서 더 많은 세포증식이 이루어 진 것이 관찰되었음.



그림 33 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 34 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 6주차 (40X H&E assay) 6주차 (100X H&E assay)



그림 35 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 36 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 6주차 주변부 (400X H&E assay) 6주차 내부 (400X H&E assay)

조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA

- 8주간의 세포배양 후 H&E 염색을 통해 조직재생 정도를 분석한 결과, Control을 제외한 이온 빔이 조사된 하이브리드 지지체의 세포증식률이 높 아진 것이 관찰되었음. MT 염색과 같이 지지체 표면에 퍼져있는 세포들이 8주간의 배양으로 시간이 지남에 따라 지지체 내부에도 많은 세포가 포진된 것이 관찰되었음.[그릮 37, 38.]
- 가장 많은 세포배양이 진행되었던 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서의 세포 증식은 시간에 지남에 따라 더 이상 증식이 확인되지 않았으나 가장 낮은 증식률을 보인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에서 시간이 지

남에 점점 많은 세포증식이 관찰되었음.

- 이와 같은 결과가 나온 것은 CCK-8의 세포증식과 같은 양상으로 세포배양 초기에는 적은 기공을 보유하고 있는 0.12J의 에너지가 조사된 지지체이 세 포가 증식하는데 있어서 더욱 용이한 환경조건을 가지고 있으나 시간이 지 남에 따라 더 이상 증식이 가능한 지지체 표면이 줄어들어서 증식이 어려운 것으로 추정되었음. 반면 0.25J과 브래그피크 0.48J의 에너지가 조사된 지 지체는 면적이 적었던 지지체 표면에 증식이 이루어지면서 8주차의 CCK-8 결과에서도 꾸준한 세포증식이 이루어지고 있는 것이 MT 및 H&E 염색을 통해 관찰되었음.[그림37, 38, 39, 40.]



그림 37 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 38 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 8주차 (40X H&E assay) 8주차 (100X H&E assay)



그림 39 10 MeV 브래그피크 이온 빔 그림 40 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 8주차 주변부 (400X H&E assay)

조사 전, 후 Chitosan-PAS-PLGA 8주차 내부 (400X H&E assay)

- 10MeV 이온 빔의 에너지 세기에 따른 하이브리드 지지체별 기공면적과 세 포배양면적을 분석하기 위해 세포배양 6주차와 8주차의 다공성 하이브리드 지지체에 MT 염색을 수행하여 얻은 이미지로 계산하였음.

- 세포배양된 6주차 지지체의 MT 염색이미지를 이용하여 지지체별 기공크기 를 분석한 결과, 이온 빔이 조사되지 않은 지지체의 경우 1513µm<sup>2</sup>의 면적이 측정되었고 10 MeV의 이온 빔 0.12J 에너지가 조사된 지지체는 815µm<sup>2</sup>, 0.25J의 에너지 조사된 지지체는 1,889µm<sup>2,</sup> 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서는 3,240µm<sup>2</sup>의 면적이 측정되어 그 결과 조사된 이온 빔
- 이 커질수록 기공의 크기는 점차 커지는 것으로 관찰되었음.[그림 41.]
  세포배양이 6주차, 8주차 진행된 10 MeV 이온 빔의 에너지 세기별 지지체 를 MT염색하여 염색된 세포배양 면적을 측정하였음. 먼저 세포배양 6주차 의 지지체를 분석하면 빔이 조사되지 않은 지지체의 경우 22,722µm<sup>2</sup>면적이 측정된 반면 0.12J의 이온 빔 에너지가 조사된 지지체의 경우 58,460µm<sup>2</sup>의 면적이 측정되었고, 0.25J의 에너지가 조사된 지지체에서는 34,907µm<sup>2</sup>의 면 적과 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서는 33,410µm<sup>2</sup>의 면적이 측정되었 음. 세포배양된 6주차 지지체의 염색된 세포배양면적은 이온 빔이 조사되지 않은 지지체에 비해 이온 빔이 조사된 지지체에서 세포분포 면적이 넓었으 며 가장 낮은 에너지 세기가 조사된 0.12J의 지지체가 가장 넓은 세포분포 면적을 나타내고 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 가장 적은 세포면적 이 측정되었음.[그림 41.]
- 세포배양 8주 후 MT 염색으로 지지체의 세포배양 면적을 측정한 결과, 이 온 빔이 조사되지 않은 지지체의 경우 세포배양면적이 16,775µm<sup>2</sup>인 반면 이 온 빔 조사된 0.12J의 에너지가 조사된 지지체의 경우는 25,588µm<sup>2</sup>로 측정 되었고 0.25J의 이온 빔 에너지가 조사된 지지체는 37,167µm<sup>2</sup>, 0.48J의 이 온 빔 에너지가 조사된 지지체는 23,936µm<sup>2</sup>의 면적이 측정되었음.[그림 41.]
- 세포배양 6주차에 비해 8주차 지지체에서 세포배양 면적이 줄어든 이유로 8
   주 동안 배지용액에 수화되어 지지체가 분해됨에 따라 지지체의 조직재생에 따른 지지체 크기가 줄어드는 것으로 사료됨.[그림 42.]



- (2) SEM을 이용한 형태학적 평가
  - 세포배양 8주 후 하이브리드 지지체 내부의 세포배양 유무와 그 정도를 관 찰하기 위해 SEM을 이용하여 표면과 내부를 500배율과 1000배율로 관찰 하였음.
  - 이온 빔이 조사되지 않은 다공성 하이브리드 지지체와 이온 빔이 조사된 다 공성 하이브리드 지지체의 표면은 10MeV 이온 빔의 에너지 세기와 상관없
     이 세포배양이 잘 이루어지지 않은 것이 관찰됨.
  - 포셉을 이용하여 지지체를 자연적으로 절단 후 내부를 분석한 결과에 따르
     면, 이온 빔이 조사되지 않은 지지체의 경우 상단부 부분에 약간의 세포증식
     의 흔적은 있으나 확연한 세포의 분포는 관찰되지 않았음. 반면 0.12J의 에
     너지가 조사된 지지체의 경우에서는 내부를 중심으로 모서리를 제외한 상당
     량의 부분에 세포배양이 이루어진 것이 관찰되었음. [그림 43.]
    - -0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에 있어서, 이온 빔이 처리되지 않은 지지체에 비해 많은 양의 세포가 관찰되었으나 0.12J의 에너지가 조사된 지 지체에 비해 많은 수의 세포는 관찰되지 않았음. 브래그피크의 에너지 0.48J 이 조사된 지지체는 0.12 J 에너지가 조사된 지지체에 비해 많은 기공을 가 지고 있으나 지지체 위에 다량의 세포가 분포되어 있는 것이 관찰되었음.[그 림 43, 44.]



그림 43. Chitosan-PAS-PLGA SEM분석 : 세포배양 8주 후 표면 및 내부 (500x)



그림 44 Chitosan-PAS-PLGA SEM분석 : 세포배양 8주 후 표면 및 내부 (1000x )

라. 싸이클로트론 이온 빔을 이용한 PLGA 지지체의 생체적합성평가

- 이온 빔 조사된 다공성 PLGA 하이브리드 지지체의 증식세포 수 및 조직재 생정도의 상관관계에서 일관성을 보이지 않는 실험에 대한 개선대책으로 기 공 및 다공도 조절이 어려운 다공성 하이브리드 지지체를 대신하여 PLGA Film에 10Mev의 이온 빔 조사를 수행하여 이온 빔 조사의 효과를 확인하 기 위해 이온 빔 조사된 Film 상의 생체적합성 연구를 추가 수행하였음.
- (1) 세포 부착성 및 증식성 평가 (CCK-8)
- 다공성 지지체에서의 결과에서의 편차를 고려하여 10 Mev 이온 빔 조사된
   다공성이 아닌 PLGA Film 지지체 중 0.17J, 0.46J, 0.72J(브래그피크)의
   에너지를 받은 지지체를 이용하여 2주간의 배양평가를 진행하였음.
- PLGA Film 지지체의 흡광도 값을 측정한 결과 1일차의 0.17J의 에너지가 조사된 지지체의 경우 0.51 OD 값이 측정되었고, 0.46J과 0.72J의 에너지

가 조사된 지지체 경우 0.5와 0.41 OD 값이 측정되어 0.17J의 에너지가 조 사된 지지체와 0.72J의 에너지가 조사된 지지체의 흡광도 값은 미비한 차이 는 있으나 가장 낮은 이온 빔 에너지인 0.17J이 조사된 지지체의 흡광도 값 이 가장 높아 세포부착성이 가장 좋음을 확인하였음.[그림 45.]

- 3일차의 0.17J 에너지가 조사된 지지체의 경우 0.76 OD 값으로 흡광도가 증가하였고 0.46J, 0.72J 에너지가 조사된 지지체의 경우 0.62와 0.58 OD 값으로 측정되었으며, 1주차의 흡광도를 관찰한 결과 0.17J 에너지가 조사 된 지지체의 경우 0.99 OD 값으로 분석되었고 0.46J 에너지가 조사된 지지 체의 경우 0.94 OD 값, 0.72J 에너지가 조사된 지지체의 경우 0.75 OD 값 이 측정되어 3일차에서 약간의 차이가 보이던 0.17J 에너지 조사된 지지체 와 0.46J 에너지가 조사된 지지체의 흡광도 값 차이가 다소 줄어드는 것으 로 분석되었음.[그림 45.]
- 2주차의 흡광도 값을 분석한 결과 1주차와 유사하게 0.17J 에너지가 조사된
   지지체의 흡광도가 1.18 OD 값으로 가장 높은 세포 증식성을 나타냈으며
   0.46J과 0.72J 에너지가 조사된 지지체는 1.0 OD와 0.8 OD 값이 측정되었음.[그림 45.]
- 1일차부터 2주차까지의 흡광도 순위는 0.17J의 에너지가 조사된 지지체에서 가장 높으며, 0.72J의 에너지 조사된 지지체의 흡광도 값이 가장 낮게 측정 되어 조사된 이온 빔의 에너지 세기가 커질수록 PLGA Film에서의 흡광도 값이 작아지는 경향을 확인하였음.[그림 45.]
- 1일차 대비 PLGA Film의 흡광도 값의 증가율을 2주간 분석한 결과, 1일차
   대비 3일차의 0.17J의 지지체 경우 149%의 증가율로 지지체 중 가장 높은
   수치로 측정되었으며 0.46J의 지지체에서 가장 낮은 123%, 0.72J의 지지체
   에서 141%의 증가율이 관찰되었음. [그림 46.]
- 흡광도 증가율은 시간이 지날수록 모든 지지체에서 증가하였으며 1일차 대비 1주차의 흡광도 증가율 분석결과에 따르면 0.17J의 지지체에서 가장 높은 세포증가율인 193%를, 0.46J의 지지체에서 186%, 0.72J의 지지체 경우 182%의 가장 낮은 증가율이 관찰되었음. 1일차 대비 2주차 경우에도 0.17J의 지지체에서 가장 높은 231%로 높은 세포증가율이 관찰되었으며 0.46J의 지지체는 206%, 0.72J의 지지체에서 가장 낮은 203%로 분석되어 1주차와 동일한 경향성이 관찰되었음.
- 다공성이 아닌 PLGA Film형의 일자별 흡광도와 1일차 대비 흡광도 값의 증가율의 결과 그래프[그림 45, 46.]를 통해 10 MeV의 이온 빔 에너지 세

기(0.17J, 0.46J, 0.72J)가 커질수록 PLGA Film에서의 세포부착성과 세포 증식률이 작아지는 경향을 확인하였음.[그림 45, 46.]



그림 45 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 후 PLGA Film의 에너지 세기별 흡광도 : (1day-2week)



그림 46 10 MeV 브래그피크 이온 빔 조사 후 1일차 대비 PLGA Film의 흡광도 증가율(3d/1d-2w/1d)

(2) PLGA Film의 독성평가

- BrdU를 분석한 결과 대조군인 latex의 경우 세포생존율이 56%로 측정된

반면 에너지 세기가 가장 낮은 0.17J가 조사된 지지체의 경우에는 105%로 관찰되었고 0.46J 에너지가 조사된 지지체는 184%로 가장 높게 관찰되었 음. 가장 높은 에너지 0.72J가 조사된 지지체의 경우에는 153%로 0.17J의 에너지가 조사된 지지체에 비해 높게 측정되었으나, 0.46J 에너지가 조사된 지지체에 비해 낮게 분석이 되었음. latex와 비교하였을 시 이온 빔이 조사 된 지지체의 세포생존율이 현저하게 높게 관찰되었음. [그림 47.]

- MTT로 분석한 결과, latex는 17%의 세포생존율을 보였으며 0.17J 에너지
   가 조사된 지지체는 116%, 0.46J, 0.72J 에너지가 조사된 지지체는 각각
   101%와 119%의 세포생존율로 측정되어 세포생존율이 latex에 비해 월등
   히 높은 것으로 관찰되었음. [그림 48.]
- 마지막으로, Neutral red를 이용하여 분석한 결과에 따르면, latex의 경우 14%의 세포생존율을 보이는 것으로 측정되었으며 이온 빔이 조사된 0.17J 에너지가 조사된 지지체는 82%의 세포생존율을 보이는 것으로 분석되었음.
  0.46J, 0.72J의 에너지가 조사된 지지체의 경우 119%와 92%의 세포생존 율로 측정되어 BrdU와 같은 양상을 보였음. latex와 비교하였을 시 역시 월 등히 높은 세포생존율이 관찰되어 이온 빔이 조사된 지지체가 일반 latex에 비해 낮은 독성을 보이고 이로 인해 세포의 생존율이 높게 측정되었다고 판 단됨.[그림 49.]
- 세 독성평가 결과 무독성인 Teflon을 100% 기준으로 하여 그와 비슷하거나 월등히 높은 값을 나타내 이온 빔 조사된 PLGA Film의 세포독성의 무독성 임을 확인하였음.[그림 47, 48, 49.]





그림 47 이온 빔 조사 후 PLGA Film 독성평가분석: BrdU assay





- (3) 염증세포 반응성평가 (Nitric Oxide Detection)
- 10 MEV의 이온 빔이 조사된 Chitosan-PLGA(0.26J, 0.70J, 0.71J의 에 너지 조사)와 PLGA Film(0.17J, 0.46J, 0.72J의 에너지 조사)이 염증성 질환에 있어서 어떠한 영향을 끼치는지 분석하기 위해 배양된 대식세포에서 nitric oxide(NO)의 생체 내 전변물질인 nitrte(NO<sup>2-</sup>)를 간접적으로 측정하 였음.
- Nitric oixde (NO<sup>-</sup>)는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의 해 citrulline으로 전변되면서 생성되는 라디칼로 macrophage-mediated cytotoxicity의 effector molecules로 미토콘드리아의 호흡이나 DNA 합성 등을 저해하며, anti-종양면역반응을 저해하는 suppressive factor의 하나 로 인식되면서 많은 관심을 일으키고 있는 물질임.
- 염증반응 시 생성이 증가하는 것으로 알려진 nitric oixde (NO-)를 각각의 Chitosan-PLGA, PLGA Film 지지체에 대식세포를 분주하여 배양시간(6, 24, 48 시간)에 따라 지지체별, 10MV 이온 빔 에너지 세기별로 비교하였 음.
- 0.17J의 에너지가 조사된 PLGA의 경우 6시간의 NO의 농도 11.6 μ M/ml에
   서 24시간에 11,4 μ M/ml로 소폭 감소했다가 48시간에 13.48 μ M/ml로 증
   가하는 양상을 보였음.[그림 50]
- 0.46J의 에너지가 조사된 PLGA의 6, 24, 48시간별 농도는 각각 12.21 μ
   M/ml, 10.41 μ M/ml, 10.36 μ M/ml로 줄어드는 것을 확인하였음. 0.72J의 에너지가 조사된 PLGA의 경우 6, 24, 48시간 순으로 14.30 μ M/ml, 24.30 μ M/ml 27.43 μ M/ml로 NO의 농도가 시간에 비례적으로 증가하였음.[그림

50.1

- 0.26J의 에너지가 조사된 Chitosan-PLGA에서의 시간별(6,24,48시간) NO 의 농도는 18.80 µ M/ml에서 27.15 µ M/ml로 증가하다 17.3 µ M/ml로 감소 하는 양상을 보였음. 0.70J의 에너지가 조사된 Chitosan-PLGA의 6시간에 서 29.82 µ M/ml, 24시간에 19.95 µ M/ml로 크게 감소하고 48시간에 21.05 µ M/ml로 증가하였으나 차이는 미비한 것으로 관찰되었음.[그림 51]
- 0.71J의 에너지가 조사된 Chitosan-PLGA에서 시간이 지남에 따라 (6,24,48시간) NO의 형성이 13.72μM/ml, 13.65μM/ml, 11.93μM/ml의 농도로 소폭 감소하는 양상을 보였음.[그림 51]
- 비슷한 값의 이온 빔 에너지가 조사된 0.71J의 Chitosan-PLGA와 0.72J의 PLGA의 NO의 농도를 비교하면 6시간에서 13.72 $\mu M/ml$ (Chitosan-PLGA), 14.30 µ M/ml(PLGA)으로 비슷한 농도를 보이나 24시 간에서 13.65 µ M/ml, 24.30 µ M/ml로 48시간에서 11.93 µ M/ml, 27.43 µ M/ml으로 0.72J의 에너지가 조사된 PLGA Film의 대식세포에서 NO형성이 0.71J의 Chitosan-PLGA보다 48시간에서는 2.4배 이상으로 농도가 커 세 포독성을 유발할 가능성이 더 있는 것으로 보였음.[그림 52]



그림 50 빔처리 된 PLGA Film의 에너지 그림 51 빔처리 된 Chitosan PLGA의 에너지 세기별 시간의 경과에 따른 NO의 농도 세기별 시간의 경과에 따른 NO의 농도



그림 52 10 MeV(0.72J)—treated PLGA, 10 MeV(0.71J)—treated Chitosan-PLGA의 시간별 NO의 농도

- 3. 연구결과에 대한 분석
  - 10 MeV 이온 빔으로부터 생성되는 브래그피크 에너지의 이온 빔을 0.12J,
     0.25J, 0.48J 에너지의 조사 조건을 선정한 후 다공성 PLGA 하이브리드 지지체에 조사하였음.
  - 키토산유도체가 코팅된 다공성 하이브리드 지지체에서는 키토산의 엷은 노란
     색이 관찰되었으며, 싸이클로트론 이온 빔 조사 후에는 진한 갈색을 띄는 것
     이 관찰되어 개질여부를 관찰할 수 있었음.
  - 물리/화학적 분석을 진행한 결과, 벌크 및 표면에 대한 이화학적 특성이 변
     화하는 것을 XPS, FTIR 등을 통해 확인하였음.
  - 주사전자현미경(SEM)의 50 배율과 200 배율, 250 배율을 이용하여 이온
     빔 조사 전, 후의 다공성 하이브리드 지지체의 표면 및 내부를 형태학적으로
     관찰하여 이온 빔 조사에 따른 변화를 평가하였음.
  - 이온 빔 조사 전 다공성 하이브리드 지지체의 표면의 30 80 um의 기공 크기가 이온 빔 조사 후 30 - 110 um으로 커진 것이 관찰 되었으며 50 배 율 상에서 표면보다 내부의 기공이 큰 것이 관찰 됨. 이온 빔 조사된 지지체 중 조밀도는 이온 빔 세기가 가장 약한 0.12J의 에너지가 조사된 지지체이 가장 밀접하였고, 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에서 넓은 조밀도가 관찰 되었음.
  - 이온 빔 조사한 다공성 하이브리드 지지체의 세포 독성 평가 및 배양평가를 진행한 결과, MTT assay, Neutral Red assay, BrdU assay을 통해 이온 빔 조사된 지지체는 세포 독성이 낮다는 것을 확인하였음.

- 8주 동안 in vitro 세포배양을 진행하여 지지체 표면에서의 세포부착과 증식 정도를 관찰하고 CCK-8 kit를 이용하여 세포부착성 및 세포증식성을 평가 한 결과 이온 빔 조사되지 않은 대조군에 비하여 이온 빔 조사된 지지체는 우수한 세포증식률을 보이는 것으로 관찰되었음.
- 형광염료 이용한 Live&Dead 분석으로 형광현미경을 통해 이온 빔 조사를
   한 지지체에서 더 많은 세포의 생존을 확인하였으며, 0.12J의 에너지가 조사
   된 지지체에서 가장 많은 세포의 생존을 관찰하였음.
- 6주 및 8주 in vitro 세포배양한 다공성 지지체 지지체를 이온 빔 조사 조건
   에 따른 조직재생 정도를 H&E, MT 염색을 통해 콜라겐 세포외기질 및 근
   섬유 생성 정도와의 상관관계를 분석한 결과, 이온 빔 조사되지 않은 대조군
   에 비하여 세포 수 및 조직재생이 보다 활발한 것으로 분석되었음.
- 6주차의 MT 염색을 분석한 결과, 기공의 크기는 이온 빔 에너지가 높을수
   록 기공의 크기가 커지는 것이 관찰되었음. 광학현미경 40배율로 재생조직
   의 표면을 관찰한 결과, 세포핵 및 세포질의 분포가 지지체의 기공을 중심으
   로 형성되어 있는 것이 관찰되었음.
- 8주차 MT 염색을 분석한 결과 소량의 콜라겐이 대부분의 지지체에서 관찰 되어 이온 빔 조사 유무와는 큰 상관관계가 없는 것으로 간주되며 6주차와 같이 Control의 경우 이온 빔이 조사된 하이브리드 지지체에 비해 세포핵과 세포질이 적게 관찰되었음. 그와 반대로 이온 빔 조사가 된 지지체의 경우에 는 6주차에서 지지체 외벽에 많이 포진되어 있던 세포들이 지지체 내부까지 많은 증식한 것이 관찰되었음.
- 세포배양을 6주간 실행 후 H&E 염색분석 결과 붉은색으로 표시되는 세포질
   이 기공을 중심으로 넓게 분포되었고, 세포들의 분포정도는 0.12J의 에너지
   가 조사된 지지체이 다른 0.25J과 0.48J의 에너지가 조사된 지지체에 비해
   골고루 포진 된 것이 관찰되었음. 배양 8주차 지지체의 H&E 염색 결과
   Control을 제외한 이온 빔 조사된 하이브리드 지지체의 세포증식률이 높아
   진 것이 관찰되었음.
- 세포배양 8주 후 SEM을 이용하여 분석한 결과 이온 빔을 처리하지 않은 하 이브리드 지지체와 이온 빔 조사된 지지체의 표면은 이온 빔 세기와 상관없 이 세포배양이 잘 이루어지지 않은 것이 관찰되었으며 지지체의 내부의 경 우 0.12J의 에너지가 조사된 지지체에서 세포배양이 가장 골고루 분포된 반 면 0.25J의 에너지가 조사된 지지체의 경우에 가장 낮은 세포분포가 관찰되 었음. 브래그피크인 0.48J의 에너지가 조사된 지지체은 많은 기공이 있으나

높은 세포분포가 관찰되었음.

- 기공 및 다공성 조절이 어려운 다공성 하이브리드 지지체를 대신하여 지지체 Film에 이온 빔 조사를 수행하여 이온 빔 조사의 효과를 확인하기 위해 이 온 빔 조사된 Film 상의 생체적합성 연구를 추가수행 하였음. 그 결과 가장 낮은 에너지가 조사된 0.17J의 지지체이 흡광도 값이 가장 높게 관찰되었고 브래그피크의 0.72J의 에너지가 조사된 지지체의 흡광도 값이 가장 낮게 측 정되었음.
- 이온 빔이 조사된 PLGA Film의 경우 다공성하이브리드 지지체와 동일하게
   독성이 검출되지 않아서 이온 빔 조사가 지지체의 자체적 살균을 유도한다
   는 것이 추정되었음.
- Chitosan-PLGA Film과 PLGA Film에 대식세포를 접종하여 염증세포 적 합성을 nitric oxide (NO-)농도로 측정한 결과 비슷한 값의 에너지가 조사 된 0.71J의 Chitosan-PLGA와 072J의 PLGA의 NO의 농도는 0.71J의 Chitosan-PLGA에서는 시간에 따라 감소하고 0.72J의 에너지가 조사된 PLGA Film의 대식세포에서 NO형성은 시간에 비례하게 증가였음. 48시간 에서 0.71J의 Chitosan-PLGA보다 0.72J의 PLGA Film의 NO농도가 2.4 배 이상 되어 세포독성을 유발할 가능성이 더 있는 것으로 보였음.

## - 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관 련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술)

제1절 당해 단계목표 및 달성도

구분	세부연구목표	가중치	달성도	비고
	<ul> <li>싸이클로트론 이온 빔 조사 가 능한 지지체 제조.</li> <li>이온 빔 조사된 PLGA 지지체 의 벌크와 표면에서의 개질.</li> </ul>	30 %	100%	<ul> <li>키토산유도체가 코팅된 다공성 PLGA 하이브리드 디스크 지지체 제조</li> <li>싸이클로트론 이온 빔 10 MeV조사</li> <li>지지체의 물리적화학적 변화분석 (XPS, FT-IR, SEM)</li> </ul>
2차년도 /2011년	<ul> <li><i>in vitro</i> 생체적합성평가</li> <li>세포배양 및 독성평가</li> <li>live &amp; Dead</li> <li>생분해 속도와 조직재생평가</li> <li>조직염색 (MT 및 H&amp;E)</li> </ul>	70 %	100%	<ul> <li>싸이클로트론 이온 빔을 이용한 다 공성 하이브리드 PLGA 의 8주간 의 in vitro 세포배양</li> <li>세포 부착성 및 증식성 평가 : 평활 근세포에 의한 in vitro 평가</li> <li>Live &amp; Dead</li> <li>독성평가</li> <li>MT 및 H&amp;E 염색</li> <li>8주차 배양된 지지체에 대한 SEM 을 이용한 물리적 변화 평가</li> </ul>
	추가 실험			<ul> <li>PLGA Film, Chitosan-PLGA제조</li> <li>싸이클로트론 이온 빔을 이용한 PLGA 지지체의 세포 부착성 및 증식성 평가</li> <li>독성평가</li> <li>in vitro 염증세포적합성</li> </ul>
	총계	100 %	100%	

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 기술적 측면에서의 활용방안

- 싸이클로트론을 이용한 고분자량의 PLGA 지지체의 특성을 변화시켜 새로운 특
   성의 PLGA 지지체로 전환하는 기술로 활용가능
- 싸이클로트론 이온 빔을 이용하여 생분해성 또는 비분해성 고분자의 벌크특성을
   조절할 수 있는 기술로 분해성 의료용 생체재료 개발기술로 활용 가능함.
- 싸이클로트론 이온 빔 조사에 의해 멸균과 함께 분자량이 조절되는 조직공학용
   지지체의 기술로 활용이 가능함

제2절 경제 • 산업적 측면에서의 활용방안

- 아직까지 상품화가 진행되지 않은 다양한 분자량의 고부가가치의 의료용 PLGA
   지지체를 개발이 가능할 것으로 사료됨.
- 조직공학 지지체, 약물전달체, 하이드로젤의 기능성 PLGA 기술로 활용 가능
- 싸이클로트론을 이용한 개발기술을 통해 바이오소재(생체재료)의 적용영역 확대.

제3절 연구성과

1) 참여연구원별 연구활동 및 주요연구실적

(1) 참여연구원별 연구활동

연구	47118	由二川片川名	달성도
분담자	친구대중	친구세구내중	(%)
노이서	자료조사/	이온 빔 조사 가능한 지지체조건 결정	
오승진	실험조건 분석	고 에너지 브래그피크 이온 빔 조건설정	100
노인섭		다공성 PLGA 디스크 지지체 제조	100
오승진 기버척	지지체제조	키토산유도체가 코팅된 다공성 PLGA 하이브리드 디스크 지지체 제조	
노인섭	브래그피크 이온	화학적 변화 분석(FTIR, XPS)	100
황윤재	빔 조사된 PLGA	무리저 벼하 부서(SFM)	
김범철	지지체분석		
노인섭 이수연	세포적합성 및 염색 평가	in vitro 독성평가 세포 적합성(부착성 및 증식성) 평가 염증세포 반응성 평가	100
		소식새생 특성 평가	
이수연	보고서 작성	보고서 작성	_
오승진			
사업진도			100
총합(%)			100

## (2) 참여연구원별 연구 실적

참여연구원		지적재산권	출원등록번호	
노인섭 김도연 조성연 김수미		아미노살리실산이 결합된 고분자 화합물	10-2011-0004180 한숨지 (회의) 주관단체	
<u>우성운</u> <b>착여여구워</b>		연구 실적		
노 인 섭	오승진 김수미 신은경 신철호 이수연 김범철	High Energy Beam Treatment and Characterization of poly(lactide-co-glycolide) Scaffolds Coated with Chitosan-Para-aminosalic yclic Acid	2011 생체재료 아카데미	한국생체재료학회
	오승진 신철호 김수미 신은경	싸이클로트론 이온 빔의 브래그피크에 따른 키토산이 코팅된 다공성 하이브리드지지체의 물리 화학적 평가	KTERMS 13th Annual Meeting	한국조직공학• 재생의학회
	신철호 오승진 김수미 신은경 이수연 김범철	이온 빔을 처리한 Chitosan-Para-aminosalic yclic Acid가 코팅된 poly(lactide-co-glycolide) Scaffold 특성	KTERMS 13th Annual Meeting	한국조직공학● 재생의학회
	신은경 황윤재 김범철 오승진	Evaluation of the Chitosan-coated porous poly(lactide-co-glycolide) scaffold surface modified by proton ion beams (2012.06 발표예정)	9th World Biomaterials congress	National Engineering Research Center for Biomaterials

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

## 제7장 참고문헌

- I. Noh and E.R. Edelman, Key Eng Mater 288-289 (2005) 367-372.
- [2] Y.J. Choi, S.K. Choung, I.S. Shin, C.M. Hong, S.H. Hong, S.N. Park, H.K. Park, Y.H. Park, Y.S. Son and I. Noh, J Biomed Mater Res 75A (2005) 824-831.
- [3] M. Dunne, O.I. Corrigan and Z. Ramtoola, Biomaterials 21 (2000) 1659.
- [4] J. Liu, D. Meisner, E. Kwong, XY Wu, M.R and Johnston, Cancer Res 69-3 (2009) 1174-1181.
- [5] J.H. Woo, D.Y. Kim, S.Y. Jo, H. Kang and I. Noh, J Biomed Mater 4 (2009) 6.
- [6] H.O. Se, G.K. Soung, and H.L. Jin, J Mater Sci Mater Med 17 (2006) 131.
- [7] I. Noh, K. Chittur, S.L. Goodman and J.A. Hubbell, J Polym Sci Part A Polym Chem 35 (1997) 1499-1514.
- [8] M.S. Kim, Y.J Choi and I. Noh, J Phys Chem Solids 69 (2008) 1577-1580.
- [9] R.C. Mundargia, V.R. Babua and V.R Rangaswamy, J Controlled Release 125 (2008) 193-209.
- [10] H. Zhang, S.H. Neau, Biomaterials 23 (2002) 2761-2766.
- [11] T.K. An, H.J. Kang, D.S. Moon, J.S. Lee, H.S. Seong, J.K. Jeong,G. Khang, and H.B. Lee, J Polym Kor 26 (2002) 691.
- [12] W.Y. Jang, S.H. Kim, I.W. Lee, M.S. Kim, J.M. Rhee, G. Khang, and H.B. Lee, Tissue Eng Regen Med 2 (2005) 100.
- [13] J. Yang, C. Cao , W. Wang, X. Tong, D. Shi, F. Wu, Q. Zheng, C. Guo, Z. Pan, C. Gao, J. Wang, J Biomed Mater Res A Mar 11 (2009) 817-829.
- [14] X. Xu, R.W.M Kwok and W.M. Lau, Thin Solid Films 514 (2006) 182-187.
- [15] M.L. Manca, G. Loy, M. Zaru, A.M. Fadda and S.G. Antimisiaris, Colloids Sur B 67 (2008) 166.
- [16] F.L. Mi, Y.M. Lin, Y.B. Wu, S.S. Shyu and Y. H. Tsai, Biomaterials 23 (2002) 3257.
- [17] S.K. Kim, K.D. Hong, S.H. Kmm, M.S. Kim, G. Khang, I.W. Lee, C. W. Han, H.K. Lee, and H.B. Lee, Tissue Eng Regen Med 2 (2005) 130.
- [18] Y.J. Choi, M.S. Kim, H.K. Kang, H. Lee, H.S. Park and I. Noh, Surf Coat Technol 202 (2008) 5713-5717.
- [19] H.S. Choi, G. Khang, H. Shin, J.M. Rhee, and H.B. Lee, Int J Pharm 195 (2002) 234
- [20] Y.I. Chung, J.C. Kim, Y.H. Kim, G.Y. Tae, S.Y. Lee, K.M. Kim and I.C. Kwon, J Controlled Release 143 (2010) 374.
- [21] M.L. Manca, G. Loy, M. Zaru, A.M. Fadda and S.G. Antimisiaris, Colloids Sur B 67 (2008) 166.

## 수정·보완요구사항 대비표

## 과제명 : 싸이클로트론 이온 빔에 의한 조직공학용 키토산 코팅된 다공성 하이브리 드 지지체의 조직재생기능 향상유도

주관기관(책임자) : 서울과학기술대학교 산학협력단(노인섭)

전문기관의 수정·보완요구사항	<sup>주1)</sup> 수정·보완요구사항 반영내용 요약	<sup>주2)</sup> 비 고
PLGA에 대해 이온 빔 조사 및 재질에 대한 생체적합성 추 가연구가 필요함.	<ul> <li>중기간 세포배양 및 <i>in vitro</i> 세포적합성 추가 연구를 진행 하였음.</li> <li>평활근세포 이용한 8주 동안 <i>in vitro</i> 세포배양 수행하였음.</li> <li><i>in vitro</i> 세포 부착성 및 증식성 평가, 독성평가, 염증세포 적합성 평가하였음</li> <li>세포독성평가(BrdU, MTT, Neutral Red)를 추가 진행하 였음.</li> </ul>	P.28~30 P.40~58
연구계획을 조직적 으로 배열하고 실험 계획에 대한 WBC 를 설정하여 실험계 획을 설립 요망함.	아래 내용에 따라 단계적인 실험을 완료하였음. 1)다공성 PLGA 지지체 제조 후 키토산 살리실산 합성하여 키토산-살리실산 코팅된 다공성 PLGA 지지체 제조하였 음 2)키토산-살리실산 코팅된 다공성 PLGA 지지체에 싸이클 로트론 이온 빔 조사하였음 3) <i>in vitro</i> 세포배양을 통한 생체적합성을 평가하였음. 4)면역학적 조직염색을 통하여 소재의 조직재생유도 정도를 비교 평가하였음.	P.12~13 목차명시
1차년도시 발생한 이온 빔에너지, 증 식세포 수 및 조직 재생정도의 상관관 계에서 일관성을 보 이지 않은 실험에 대한 개선대책이 필 요하다고 판단함.	<ul> <li>다공성 지지체에 세포들을 이식한 후에, 세포들이 기공내 부로 이동하면서 조직을 형성하기 때문에 세포수와 조직재 생정도를 정량적으로 분석하기 어려웠음.</li> <li>조직염색방법에 의한 분석은 연구자와 지지체의 위치에 따라 달라지는 결과의 주관적 특성으로 인하여 객관적 데 이터 확보에 어려움을 겪고 있어 염색데이터 수를 늘려 객 관성을 확보하려고 노력하였음.</li> <li>기공 및 다공도 조절이 어려운 다공성 하이브리드 지지체 대신에 지지체 Film을 제조하여 이온 빔 조사를 수행하여 지지체의 특성 분석 연구를 수행하였음.</li> <li>이온 빔 조사된 Film 상의 세포부착성 및 조직재생 연구 를 추가 수행하여 기공에 의한 조직재생유도 과정에서 발 생하였던 기공영향을 최소화 하는 연구를 수행하였음.</li> </ul>	P.30−32 P.51~66
유사연구과제의 수 행자와의 교류를 위 해서 학술발표에도 적극적으로 참여가 요망됨.	유사연구과제 수행자와의 교류에 적극 참여하였음 1. 2011~2012 MC-50 싸이클로트론 이용연구 연차보고, 한국원자력의학원, 연구보고서 제출 및 발표(2012.03.30). 2. 국내 학술대회에서 3건의 초록 및 포스터 발표하였음. (1) 한국생체재료학회 생체재료아카데미 (2011.03) (2) 한국조직공학재생의학회 13차 연례학술대회 2건 (2011.05). 3. 2012년 국내외 학술대회 2건 초록제출 및 발표예정임. (1) 9th World Biomaterials Congress, 중국 성도 (2012.06) (2) 한국고분자학회 춘계연구논문발표회 (2012.04).	