

Poly(γ -benzyl L-glutamate)/ poly(ethylene glycol) block 공중합체 표면의 항혈전성에 관한 연구

조종수 · 송수창 · 김선웅 · 양동욱*

성용길** · 김계용***

=Abstract=

Antithrombogenicity of the Surface of Poly(γ -benzyl L-glutamate)/ Poly(ethylene glycol) Block Copolymer

Chong-Su Cho, Soo-Chong Song, Seun-Ung Kim, Dong-Wook Ryang*,
Yong-Kiel Sung**, Kae-Yong Kim***

ABA type block copolymers composed of γ -benzyl L glutamate as the A component and poly(ethylene glycol) as the B component were obtained. Platelet adhesion on their surfaces was investigated by a column elusion method to examine the effects of microdomain and secondary structure. The number of platelets adhered from whole blood and plasma rich platelet was smaller for the block copolymer systems than for the homopolymers.

In the block copolymer system, the number of platelets adhered on their surfaces increased with increasing the content of PEG, that is, with decreasing of α -helix of block copolymers. A thick thrombus formation on the PBLG homopolymer was observed than block copolymer by scanning electron micrographs. The platelets adhesion increased with increasing the critical surface tension of the block copolymer.

1. 서 론

고분자재료가 인공장기로 쓰이는데 있어서 기계

<접수 : 1987년 12월 15일>

전남대학교 고분자공학과

Dept. of Polymer Eng., Chonnam National University

* 전남대학교 임상병리과

* Dept. of Clinical Pathology, Chonnam National University

** 동국대학교 화학과

** Dept. of Chemistry, Dongguk University

*** 한양대학교 공업화학과

*** Dept. of Industrial Chemistry, Hanyang University

적성질은 대부분 해결되었지만 아직도 문제가 되는 것은 혈액적합성으로 고분자재료가 혈액과 접촉하면 혈전을 형성하게 되는데 이것은 환자에게 치명적인 영향을 준다. 따라서 고분자재료가 혈액과 접촉했을때 혈전이 형성되지 않는 새로운 재료를 개발하려고 하고 있다. 많은 연구자들이 고분자표면에 생기는 혈전형성을 막기 위하여 주로 두가지 방법을 시도하고 있는데 첫째는 계면화학적으로 접근하여 고분자표면을 개질¹⁾하거나 항혈전성이 있는 새로운 고분자를 합성하는 것²⁾이며 다른 하나는 약학적으로 접근하는 방법으로 혈전형성을 방지하는 heparin^{3, 4)}, prostaglandin⁵⁾, urokinase⁶⁾ 등을 고분

자에게 화학적 또는 물리적으로 결합시켜 문제점 해결에 접근하려고 하고 있다.

Vascular endothelium은 친수성과 소수성으로 이루어진 마이크로상분리구조를 나타냄으로써 이상적인 항혈전성을 나타내고 있는 점에 착안하여 Okano^{7,8)} 등은 위의 두가지 방법중 첫번째인 마이크로상분리구조를 갖는 새로운 항혈전성 고분자 개발에 역점을 두고 있다.

전번 연구⁹⁾에서는 친수성으로서 poly(ethylene glycol) (PEG)를 소수성으로서 polypeptide의 일종인 poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG)를 택하여 마이크로상분리구조를 갖는 ABA형의 PBLG/PEG의 블록공중합체를 합성하여 여기에 대한 특성과 구조에 대하여 살핀바 있다. 금번 연구에서는 상기의 블록공중합체의 혈액적합성을 검토하기 위하여 microsphere column방법으로 in vitro에서 whole blood와 platelet rich plasma (PRP)을 이용하여 혈소판의 흡착실험을 살폈으며 특히 블록공중합체의 2차구조와 혈액적합성과의 관계를 살피고자 한다.

2. 실험

2-1. 시료 및 시약

Amine-terminated poly(ethylene glycol) (ATPEG): 양말단에 있는 아미노기를 갖는 분자량 2,000인 ATPEG는 Texace Chem. Co.에서 제공되었으며 Chloroform에 녹여 n-hexane으로 침전시켜 정제하였다.

용매: n-hexane, tetrahydrofuran (THF), dioxane은 1급시약을 증류에 의하여 정제하여 수분을 제거하였다.

γ -benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride (BLG NCA)의 합성: BLG는 Goodman등¹⁰⁾의 방법에 의하여 phosgen을 사용하여 합성하였다.

poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG)의 합성: BLG-NCA를 triethylamine을 개시제로 하여 dioxane중에서 중합하였다.

PBLG/PEG 블록공중합체의 합성: 전번 논문⁹⁾에서와 같은 요령으로 PBLG/PEG 블록공중합체는 dichloromethane을 용매로 소정량의 ATPEG와 BLG-NCA를 중합하여 얻어졌는데, 중합후에는 BLG-

NCA의 특성흡수대인 1785cm⁻¹와 1860cm⁻¹가 IR에서 없어짐으로 중합이 확인되었다.

2-2. 분자량측정

Block공중합체의 분자량은 dichloroacetic acid (DCA)에서 고유점도를 측정하여 Doty등¹¹⁾이 제안한 분자량과 고유점도와의 관계에서 산출되었다.

2.3-1. 항혈전성 평가실험

Fig. 1에서 나타내는 바와 같은 microsphere column method를 사용하여 각 재료에 대한 혈소판의 점착정도를 살펴보았다. 15~35mesh 정도의 glass bead에 THF용매에 녹인 각시료를 코팅한 다음 길이 10cm, 내경 3mm의 glass column에 균일하게 충전시키고 정상적인 사람의 혈액을 주사기로 채취하여 실린지펌프로 3ml/min의 유속으로 1분간 통과시키고 흡착되지 않고 유출된 혈액을 ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)로 코팅된 병에 채취하여 platelet counter (Coulter counter model S-plus)로 혈액중의 혈소판수를 측정하였다. 혈액을 통과시킨 column내의 glass bead를 꺼내 생리식염수로 씻은 다음 1.25% glutaraldehyde 생리식염수 용액에 하룻동안 침지시킨 다음 냉동건조조기로 건조하여 주사전자현미경 (TSM-35형)으로 각 재료 표면에서의 혈소판 점착상태와 혈전형성을 관찰하였다.

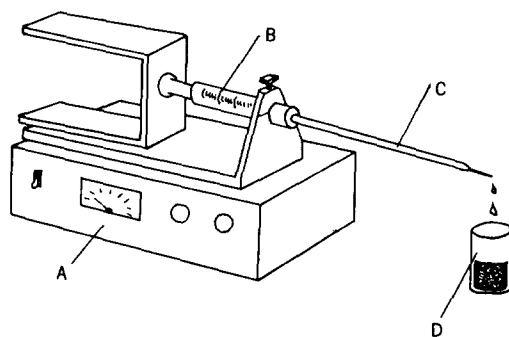


Fig. 1. Apparatus used for the estimation of the degree of interaction between blood platelets and polymer surfaces; (A) syringe pump, (B) syringe filled with blood, (C) column packed with glass beads precoated with polymer, (D) EDTA sampling bottle

3-2. 점착된 혈소판수의 측정

각 재료표면에서의 혈소판 점착량은 microsphere column method를 이용하여 관찰되었다. GEG 블록공중합체, PEG 및 PBLG homopolymer, glass bead 각각에 있어서 혈소판 점착결과를 Fig. 2에서 나타내었다. 그림에서 나타나는 바와 같이 GEG-1에 있어서 혈소판의 점착이 가장 적게 일어났다. 이러한 결과는 Okano 등⁷⁻⁸⁾이 밝힌 바와 같이 microseparated structure를 갖는 블록공중합체는 혈소판의 점착을 억제하는 역할을 한다는 경향과 일치하였다.

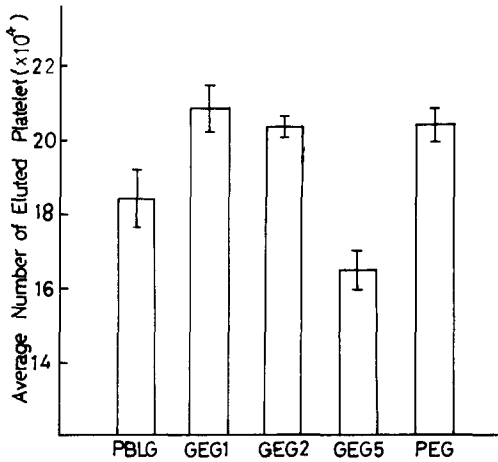


Fig. 2. Average number of eluted platelet through polymer-coated glass beads column

Fig. 3은 GEG 블록공중합체에서 PEG의 함량과 혈소판의 점착량과의 관계를 밝힌 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이 PEG의 함량이 증가할수록 혈소판의 점착량은 증가하는 경향을 나타냈다. 이것은 PEG의 함량이 증가할수록 블록공중합체의 2차구조인 α -helix가 감소하고 있었고 α -helix가 감소할수록 혈소판의 점착은 증가하고 있었다. 또한 GEG 블록공중합체, PEG, PBLG homopolymer에서의 혈소판의 점착정도를 PRP를 사용하여 나타낸 것이 Fig. 4로 Fig. 2에서 같은 경향으로 블록공중합체는 PBLG homopolymer나 glass bead에 비하여 혈소판의 점착량은 적었고, GEG-1에서 가장 점착량이 적었다. 이러한 결과는 혈소판의 점착에 있어서 고분자의 2차구조가 관여하고 있다고 생각되는 흥미있는 결과로서 여기에 대하여서는 더욱 검토가

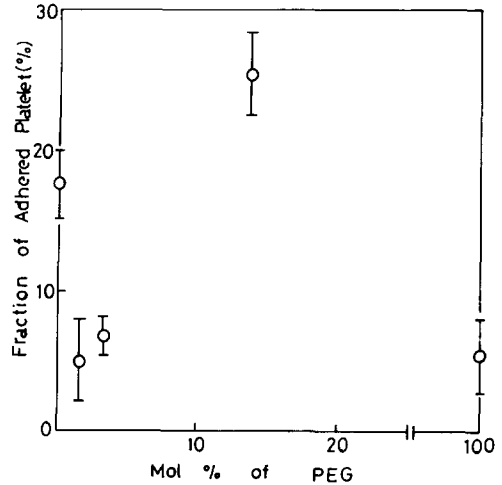


Fig. 3. Platelet adhesion on the surface of PBLG / PEG block copolymer according to the content of PEG

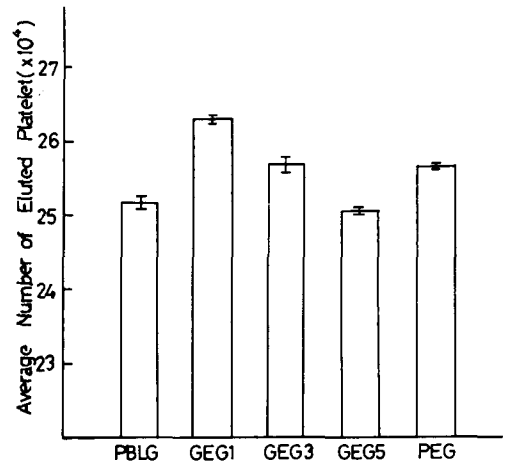
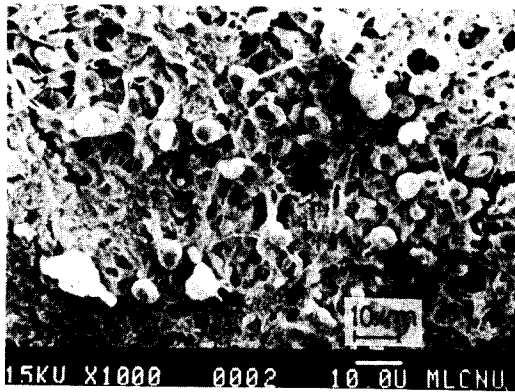


Fig. 4. Average number of eluted platelet through polymer-coated glass beads column

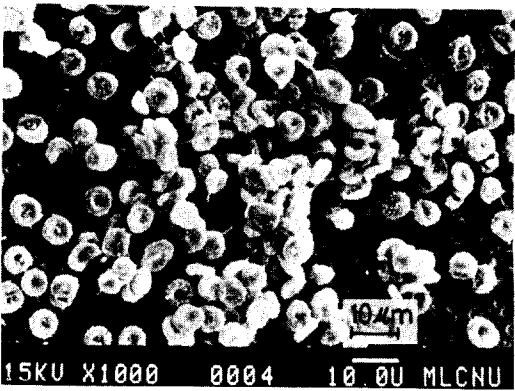
필요하리라 믿는다.

3-3. 주사전자현미경에 의한 혈전형성의 관찰

PBLG homopolymer와 GEG 블록공중합체표면에 혈전형성을 살펴보기 위하여 주사전자현미경으로 관찰한 사진을 Fig. 5에 나타내었다. PBLG homopolymer에서는 혈소판, 적혈구등이 점착되고 과립 내용물이 방출 및 형태변화등에 의하여 많은 혈전



(a)



(b)

Fig. 5. Appearance of thrombus formation on the surfaces of PBLG homopolymer(a) and GEG-1 block copolymer(b)

이 형성된 것을 관찰할 수 있었으나 GEG 블록공중합체에서는 혈소판, 적혈구등은 점착되었지만 혈전은 형성되지 않은 것으로도 2차구조를 갖고 마이크로상분리구조를 나타내는 블록공중합체는 항혈전성이 우수하다는 것을 알았다.

3-4. PBLG/PEG 블록공중합체의 임계표면장력과 혈소판 점착과의 관계

Table 3은 각 재료의 접촉각과 임계표면장력을 나타냈다 Table 에서 나타내는 바와 같이 PEG의 함량이 증가함에 따라 각각 액체의 접촉각은 감소하였고 임계표면장력은 증가하였는데 이것은 PEG

Table 3. Contact angle($^\circ$) and critical surface tension(γ_c) of the PBLG homopolymer and GEG block copolymers

Sample Solvent	PBLG	GEG-1	GEG-3	GEG-5
Water	72	60	56	48
Glycerol	61	55	52	42
Formamide	59	46	45	39
1, 2-di-Ethanediol	57	44	42	37
Diethylene Glycol	21	18	17	16
Oleic acid	11	11	11	11
γ_c (dyn/cm)	25.0	32.5	37.0	39.0

의 친수성으로 인하여 이런 결과가 나왔다고 생각된다. 또한 실험에 사용한 재료의 임계표면장력은 25~39dyne/cm정도의 값을 나타냈고 특히 GEG-1 블록공중합체의 γ_c 는 32.5dyne/cm값을 나타냈다.

GEG 블록공중합체의 임계표면장력과 혈소판의 점착량과의 관계를 살펴본 것을 Fig. 6에 나타내었다. 그림에 나타내는 바와 같이 블록공중합체의 임계표면장력이 증가함에 따라 혈소판의 점착량은 증가하였다. 이러한 결과는 일반적으로 친수성이 증가하면 혈소판의 점착이 감소한다는 경향과는 상반

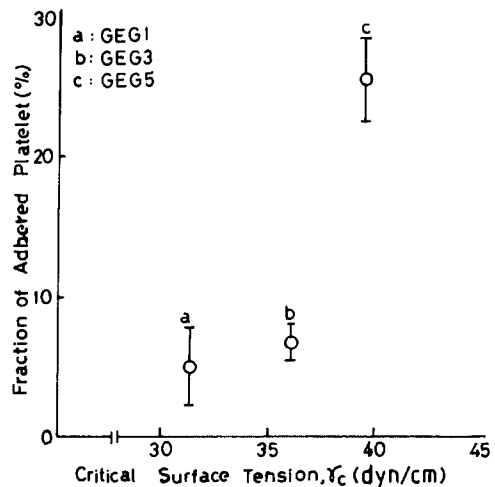


Fig. 6. Relationship between fraction of adhered platelet and critical surface tension of block copolymer

되는 것으로서 블록공중합체에 있어서 혈소판의 점착이 고분자의 임계표면장력보다는 고분자의 2차구조가 더욱 연관이 있지 않나 생각되어 진다.

4. 결 론

친수성으로 PEG를 소수성으로 polypeptide일종인 PBLG를 택하여 마이크로상분리구조를 나타내고 2차구조를 갖는 PBLG/PEG 블록공중합체를 합성하여 여기에 대한 in vitro에서 혈소판의 점착량을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1) 마이크로상분리구조를 갖는 블록공중합체가 PBLG, PEG, glass bead에 비하여 혈소판의 점착량은 적었다.

2) GEG 블록공중합체에서 PEG의 함량이 증가함에 따라서 혈소판의 점착은 증가하였다.

3) GEG 블록공중합체의 임계표면장력이 증가함에 따라 혈소판의 점착은 증가하였다.

사사 : 본 연구는 한국과학재단의 연구비지원(1986년 목적기초)에 의하여 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표하는 바입니다.

참 고 문 헌

- 1) J.D. Andrade, "Interfacial phenomena and biomaterials," *Med. Instrum.*, 7, 1973, 110~120.
- 2) R.I. Leininger, C.W. Cooper, R.D. Falb, and G.A. Grode, "Nonthrombogenic plastic surfaces," *science*, 152, 1966, 1625~1626.
- 3) P.W. Heyman, C.S. Cho, J.C. McRea, D.W. Olsen, and S.W. Kim, "Heparinized polyurethanes : In vitro and in vivo studies," *J. Biomed. Mat. Res.*, 19, 1985, 419~436.
- 4) Y. Mori, S. Nagaoka, Y. Masubuchi, M. Itoga, H. Tanzawa, T. Kikuchi, Y. Yamada, T. Yonaha, H. Watanabe, and Y. Iaezaki, "The effect of released heparin from the heparinized hy-

- drophilic polymer on the process of thrombus formation," *Trans. ASAIO*, 24, 1978, 736~745.
- 5) J.C. McRea, C.D. Ebert, and S.W. Kim, "Prostaglandin releasing polymers-stability and efficacy," *Trans. ASAIO*, 27, 1981, 511~516.
- 6) H.P. Kim, S.M. Byun, Y.I. Yeom, and S.W. Kim, "Immobilization of urokinase on agarose matrices," *J. Pharm. Sci.*, 72, 1983, 225.
- 7) T. Okano, S. Nishiyama, I. Shinchara, T. Akaike, Y. Sakurai, K. Kataoka, and T. Tsuruta, "Effect of hydrophilic and hydrophobic microcloains on mode of interaction between block polymer and blood platelets," *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 1981, 393~402.
- 8) T. Okano, K. Kataoka, Y. Sakurai, M. Shimada, M. Miyahara, T. Akaike, and I. Shinohara, "Molecular design of block and graft copolymers having the ability to suppress platelet adhesion," *Artif. Org.*, 5(Suppl.), 1981, 468.
- 9) C.S. Cho, S.U. Kim, and T. Komoto, "Synthesis and structural study of the block copolymer consisting of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the A component and poly(ethylene glycol) as the B component," To be submitted in *Makromol. Chem.* (1988).
- 10) W.D. Fuller, M.S. Verlander, and M. Goodman, "A procedure for the facile synthesis of amino acid N-carboxyanhydrides," *Biopolymers*, 15, 1976, 1989~1871.
- 11) P. Doty, J.H. Bradbury, and A.M. Holzer, "Polypeptides. IV. The molecular weight, configuration and association of poly- γ -benzyl-L-glutamate in various solvents." *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1956, 947~954.
- 12) H.Y. Fox and W.A. Zisman, *J. Colloid Sci.*, 7, 1952, 109.