대한치주과학회지 : Vol. 28, No. 2, 1998

이온 빔 조사 처리된 키토산 스펀지의 세포적합도에 관한 연구

구 영

서울대학교 치과대학 치주과학교실 및 치학연구소

I. 서론

염증성 치주질환으로 인해 파괴된 골 결손부의 재생 및 수복은 여전히 치주치료에 있어서 관심분야 중의 하나이다. 치조골과 부착기구의 재생을 위한 많은 시도들이 있어 왔지만 실질적인 재생을 통한 성공적인 치료 결과에 대해서는 여전히 논란의 대상이 되고 있다. 자가골 및 동종골을 이식재료를 사용한 동물 실험 및 임상실험 결과, 조직학적으로 신생 백악질과 치조골 및 기능적 치주인대의 성공적인 재생을 보고한 다수의 문헌들이 있으나 실질적으로 자가골의 이용에는 한계가 있으며 동종골의 경우 질병의 전염으로부터 완전할 수 없다는 점이 단점으로 지적되고 있다[1-5]. 이상적인 이식재의 구비요건으로서는 신생골 및 신생백악질을 유도하여 새로운 치주인대의 부착이 가능할 수 있어야 하며, 생체적합성이 우수하고 독성이 없어야 하며 구입이 용이하고 경제적으로도 저렴하여 사용에 부담이 없어야 한다. 지금 까지 사용되어온 이식재료로는 피질 및 망상골 등을 이용한 자가골, 냉동 동결건조 동종탈회골과 같은 동종골 및 인회석 및 비흡수성 경조직 대체고분자, 트리칼슘인산세라믹 등과 같은 합성골들을 이용하여 손상부에서의 충전기능 및 재생기능성을 어느 정도 갖춘 것으로서 보고되고 있다[6-9]. 그러나 앞에서도 이미 언급했듯이 골분말 등의 재료에서는 면역반응 및 질병의 전염 등의 문제점이 있고, 합성물질들은 감염에 민감하고 이식 후 자기들끼리 집적되어 버리는 단점을 안고 있다[10].

키틴은 자연계에서 풍부한 천연 생고분자로서 무척추동물(새우, 게, 바다가제)의 외골격을 이루는 주성분이며, 진균류나 곰팡이 또는 효모의 세포벽의 주성분을 구성하고 있는 매우 안정된 다당류이다[11, 12] 키토산(1-4, 2-amino-2-deoxy-β-D-glucan)은 키틴을 고온의 강알칼리로 처리하여 측쇄를 탈아세틸화시켜 정제한 탄수화물 고분자로서 hyaluronic 산과 비슷한 구조이다[13]. 키토산은 생분해성이며 독성이 없으며 800-1,500Kd의 분자량을 갖고있으며[13], 용액, 분말, 박편, 겔 및 얇은 필름 형태로 공급되며 특이한 화학구조와 생물학적인 성질로 인해 다양한 분야의 생체재료로

* 이 논문은 과학기술처 생명공학 기술개발사업 (97-N1-02-01-A-13) 지원에 의하여 이루어졌음.

이용되고 있다. 키토산은 박테리아, 바이러스 감염 및 암세포증식에 대항하는 비특이성 면역반응 활성화에 대한 효과적인 면역조절물질로 알려져 있다[14, 15]. 의료용 소재로서 키토산은 인공신장 막으로 응용되어져 왔고 제산 효과, 항궤양 효과, 콜레스테롤 수치저하 작용을 나타내고 있어서 의약학 분야에서 유용한 재료로 사용되고 있다[16, 17]. 또한 생체재료로서 키토산은 화상부위를 보호하면서 새로운 조직의 재생을 촉진시키는 목적으로서 인공피부로 사용되며 기계적 강도가 우수하고 물질의 투과조절이 용이하므로 생체흡수성 봉합사로서도 활용성이 크다[18]. 동물 실험을 통하여 키토산은 지혈작용을 확인할 수 있었으며[19, 20] 상처의 치유를 촉진시킨다고 알려져있다[21, 22]. 키틴과 그 유도체인 키토산이 포유류의 상처 치유를 촉진시키는 기전은 수세기동안 과학적인 설명 없이 단지 추측으로만 이해되어 오던 것이 지난 수년동안 광범위한 연구를 통하여 이제는 구체적으로 알려지게 되었다[23]. 1960년 Reynolds는 상처치유를 촉진하는데 단당류인 N - acetylglu - cosamine의 유용성에 관한 과학적인 근거를 제시하였으며[24], 1970년에 이르러서는 동물실험을 통하여 N - acetylglucosamine이 상처치유의 속도를 촉진한다는 결과가 보고되었다[25].

최근에는 사람 구강내의 상처에 키토산을 적용하여 치유를 촉진시킬 수 있었다는 보고가 있었다. Sapelli등은 증례 보고를 통하여 치주낭, 구개부 상처 및 발치창의 치유에 키토산 분말을 이용하여 만족할만한 임상적 결과를 얻었음을 보고하였다[26]. Muzzarelli등은 치주 결손부에 키토산을 적용한 결과 섬유증식(fibro - plasia)이 감소하고 조직화가 촉진되었다고 보고하였으며[27], 뒤이어 발치창 및 근단절제술 후의 골 결손부에 적용한 결과 방사선학적 소견 및 생검을 통하여 정상적인 골의 형성이 촉진되었음을 보고하였다[28]. 이와 같은 상처치유의 촉진효과의 기전은 골 결손부에 적용된 키토산 유도체들이 거대세포와 단핵세포를 활성화시켜 성장인자의 형성을 촉진시키고 나아가 골조직의 구성을 유도시키는 것으로 설명하고 있다[14, 15].

이온 조사는 고분자의 화학구조나 물리적 성질을 변화시키는 유용한 방법이다[29, 30]. 이온조사로 고분자 층의 화학성분을 적절히 조절하여 변화시킬 수 있을 뿐 아니라 일정한 면적에 조사되는 입자의 총 수를 조절하는 것과 같은 간단한 방법으로 고분자의 물리적 성질 또한 선택적으로 변화시킬 수 있다. 뿐만 아니라 적절한 이온 량이나 에너지를 선택함으로써 고분자의 변화된 층의 두께도 조절할 수 있다[31]. 최근에 Suzuki 등과 Nakao는 150keV정도의 에너지범위에서 이온 주입법(Na^+, O_2^+, N_2^+같은 반응성 이온 및 Kr^+과 같은 비반응성 이온 이용)을 이용하여 폴리우레탄, 폴리스티렌 또는 실리콘 고무와 같은 고분자의 세포적합성을 높일 수 있었다고 보고하였다. 특히 이들은 폴리우레탄의 경우 이온 주입이 내피세포의 부착과 퍼짐 증가에 크게 영향을 미치는 반면 폴리스티렌에는 효과가 미미하였다고 하였다. 이러한 효과는 사용된 고분자에 $1\times10^{17}/cm^2$ 정도의 이온조사를 가함으로써 탄성상(carbonaceous phase)이라는 특이한 구조의 형성에 기인한 것으로 설명하고 있다[32 - 34]. 다른 보고에서는 이와 같은 세포의 부착과 증식이 조사된 고분자 표면의 표면자유에너지(surface free energy)의 변화나 고분자 기질의 화학적 성질의 변화에 기인하는 것으로 해석하고 있다[35 - 37].

이 연구에서는 약리적인 효과가 있는 키토산을 스펀지의 형태로 제조한 후 이온빔에 의한 표면개질을 통하여 골 결손부에 적용시의 충전효율을 높이고 손상된 골 조직 재생력을 높일

수 있을 것이라는 가설 하에서 그 기초적 연구로써 이온빔 처리된 키토산 스펀지의 세포친화성의 변화 양상을 알아보는데 그 목적이 있다.

Ⅱ. 실험방법 및 재료

1. 키토산 스펀지의 제조

5% 키토산 용액(1% acetic acid에 녹인 것)을 동결건조하고, 건조된 스펀지에 대하여 sodium tripolyphosphate에서 반응시켜 경화시켰으며, 다시 동결건조하였다. 제조된 키토산 스펀지의 형태를 시차주사현미경(Stereoscan 360, Cambridge Inc., UK)을 이용하여 관찰하였다.

2. 키토산 스펀지에 대한 이온빔 조사

키토산 스펀지 표면의 세포친화성을 높이고 향후의 골조직 내에서의 골조직 형성능을 높일 목적으로 키토산 표면에 대해서 이온을 주입하였다. 이온 빔 주입을 하지 않은 키토산 스펀지를 대조군으로 하였으며, 35KeV의 에너지로 아르곤(Ar^+)이온을 5×10^{13}, 5×10^{15}의 용량으로 스펀지 표면에 대해 주입한 것을 실험군으로 하였다.

3. 세포접착력 실험

아르곤 이온이 주입된 표면에 대해서 백서의 골아세포(osteoblast)를 1×10^5cells의 밀도로 하여 세포접착력 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 골아세포는 임신한지 18 - 19일째 경과한 fetal Sprague - Dawley계 백서의 두개골로부터 채취하였다. 채취된 골아세포를 hemo - cytometer로 수를 측정하여 경조직 형성용 complete media(DMEM supplemented with 10% FBS, 8μg/ml gentamycine, 10mM Na β - glycerol phosphate, 50μg/ml L - ascorbic acid)에 일정밀도로 가하여 분산시켰다. 24 well plate바닥에 vacuum grease를 접착하고 여기에 키토산 스펀지, 아르곤 일가 이온이 주입된 키토산 스펀지를 장착하여 향후 세포배양액에 의해 부유하는 것을 방지하였다. 스펀지는 미리 50μℓ의 상기 배양액으로 미리 wetting하였으며 wetting후 세포가 분산된 액을 30μℓ씩 스펀지에 가하였다. 가한 세포의 밀도는 각 $1\times1cm^2$의 스펀지당 1×10^5cells로 하였다. 세포액을 접종한 상태에서 3시간동안 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하여 세포가 접착하도록 하였고 이후 1ml씩 배양액을 가하였다. 1일 배양 후 키토산 스펀지에 부착된 세포의 수를 측정하기 위해 스펀지에 부착된 세포를 trypsin - EDTA 처리하여 탈리시키고 여기에 α- MEM 배지를 가하여 부유시킨 후 hemocy - tometer를 이용하여 세포 수를 측정하였으며, 세포의 분산액을 flowcytometer를 이용하여 세포의 생존성(viability)을 측정하였다. 부착된 세포가 표면의 개질에 의해 그 형질에 영향을 받는지를 관찰하기 위해 띄어 낸 세포에 대해 전항의 방법에 따라 alkaline phosphatase activity를 측정하였다.

4. 세포 접착력 실험

배양 후 1일째에 cell이 부착되어 있는 스펀지를 채취하였다. 키토산 스펀지에 부착 및 증식된 세포의 수를 측정하기 위해 스펀지에 부착된 세포를 trypsin - EDTA 처리하여 탈리시키고 여기에 α- MEM 배지를 가하여 분산시켜 hemocytometer를 이용하여 액내에 들어있는 골아세포의 수를 산출하였다. 또한 탈리시킨

세포부유액 일정량을 flowcytometer를 통해서 액내에 들어있는 세포의 생존성을 검사하였다.

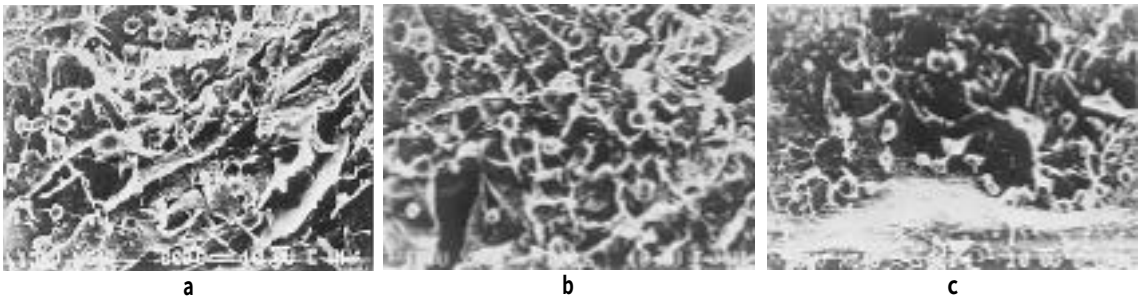
키토산 스펀지에 부착된 세포의 상태 및 분화된 정도를 시차주사 현미경(SEM)하에서 관찰하기 위한 조작은 다음과 같다. 골아세포가 부착된 스펀지를 세척하여 부착되지 않은 세포는 제거하고 0.1M 인산완충생리식염수(PBS, pH 7.4)에 녹인 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 40 분간 전고정하였다. 고정후 0.1M 인산완충 생리식염액으로 세척하고 다시 0.1M 인산완충생리식염액에 1% 농도로 녹인 osmium tetroxide로 0°C에서 40분간 후고정하였다. 후고정 후 -70°C 에서 24시간 보관하였으며 이를 동결건조하였다. 동결건조된 시료는 gold-palladium coating하여 시차주사현미경으로 관찰하였다.

5. Alkaline phosphatase activity 측정

키토산 스펀지에 부착, 증식된 골아세포에서의 alkaline phosphatase 합성은 흡광도법으로 측정하였다. 골아세포가 부착되어 배양한 키토산 스펀지를 배양 1일 째 채취하고 이로부터 trypsin-EDTA용액에 의해 세포를 탈리시켜 수집하였다. 수집된 세포에 대해서 증류수를 가하고 30%의 출력으로 30초간 ice상에서 homogenization하였다. Homogenization 후 상등액을 취해서 여기에 $MgCl_2$ 함유 Glycin-NaOH buffer, 0.1% Triton-100을 가하여 혼합한 후 20mM의 p-nitrophenylphosphate용액을 가하고 나서 37°C에서 30분간 반응시킨 후 2N NaOH로 반응을 종결시켰다. Alkaline phosphatase 존재 하에서의 p-nitrophenol의 형성을 405nm에서의 흡광도를 측정하여 그 양을 산출하고 이것으로서 alkaline phosphatase activity로 하였다. 통계분석은 one way analysis of variance(ANOVA)와 Tukey test를 이용하여 대조군과 실험군을 비교하였으며 5%의 유의도를 채택하였다.

그림 1 SEM of chitosan sponge

III. 실험결과



a b c

그림 2 SEM of attached osteoblast onto ion beam irradiated chitosan sponge
a. control b. 5×10^{13} Ar^+ irradiated c. 5×10^{15} Ar^+ irradiated

표 1 Attachment level of osteoblast onto ion beam irradiated chitosan sponge

	Control	5×10^{13} Ar^+	5×10^{15} Ar^+
Cell count($\times10^4$)	4.3±0.64	6.7±0.35*	3.3±1.14

* P<0.05

1. 키토산 스펀지의 제조

5% 키토산 용액을 동결 건조시켜 제조한 키토산 스펀지의 시차주사현미경을 이용한 관찰 결과를 그림 1에 나타내었다. 전반적으로 평균 100㎛의 잘 발달된 미세공을 볼 수 있었다. 또한 이온빔이 조사된 스펀지표면 및 내부에서도 이온빔의 조사에 의한 표면구조의 변화는 관찰되지 않았으며 다공성 구조가 잘 유지되고 있음을 알 수 있었다(그림 2 - b,c).

2. 이온빔 조사에 의한 세포접착력 실험

키토산 스펀지에 대하여 아르곤 일가 이온을 각 스펀지 표면에 대하여 아르곤 용량 5×10^{13}, 및 5×10^{15}로 조사하고 이의 세포친화성을 골아세포를 이용하여 실시하였다. 그림 2는 각 아르곤 용량에 따른 세포의 부착정도를 시차주사현미경을 이용하여 관찰한 것이다.

이온 조사에 의해 세포의 부착 정도가 증가한 것을 관찰할 수 있었는데 특기할 것은 5×10^{13}의 아르곤 용량을 조사한 경우 세포부착이 가장 큰 반면(그림 2 - b), 5×10^{15}의 용량으로 조사한 경우는 더 이상의 증가를 보이지 않고 오히려 이온빔 처리하지 않은 경우보다 감소하였다(그림 2 - c). 이러한 세포접착 정도를 정량적으로 측정한 결과를 표 1에 나타내었다.그림 3에는 아르곤 이온이 조사된 키토산 스펀지에 부착된 골아세포의 생존성을 flow cytometry에 의해 관찰한 결과로써 부착된 세포 모두 생존

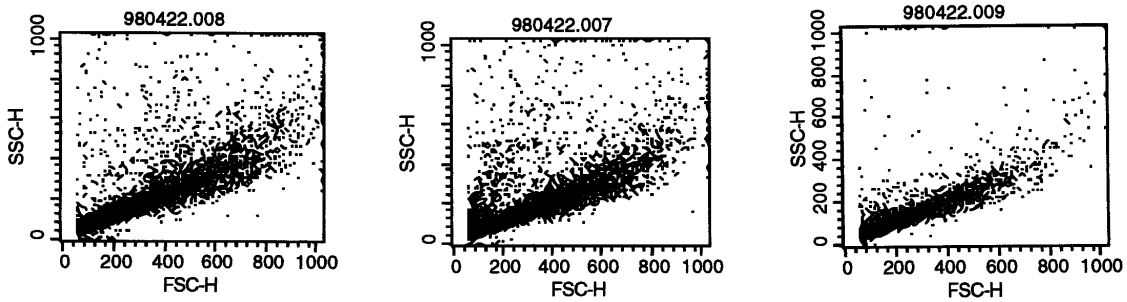


그림 3 Viability of adhered osteoblast cells onto ion irradiated surface of chitosan sponge
a. control b. 5×10^{13} Ar^+ irradiated c. $5x10^{15}$ Ar^+ irradiated

표 2 Alkaline phosphatase activity of osteoblasts onto ion beam irradiated chitosan sponges

	Control	5×10^{13} Ar^+	5×10^{15} Ar^+
ALPase Activity (μmol/30min/10^4 cells)	0.066±0.01	0.094±0.01*	0.060±0.02

* P<0.05

성을 잘 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한 p - nitrophenol의 형성을 405nm에서의 흡광도법을 이용하여 측정한 alkaline phosphatase의 활성도 측정 결과 5×10^{13}dose의 아르곤 이온이 조사된 키토산 스펀지의 경우에 가장 높은 활성을 가지고 있음을 관찰하였다(표 2).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

골 재생에 있어서 키토산의 작용은 키토산 내 N - acetylglucosamine 잔기에 기인하는데 주로 직접적인 역할로는 성장인자들과 결합하여 골아세포의 분열자극을 통하여 신생골의 형성을 촉진하며 간접적으로는 섬유아세포의 부착과 증식을 방해함으로써 나타난 결과로 설명되고 있다[30, 38].

조직의 재생에 있어서 골대체물의 조건이나 향후 조직공학(tissue engineering)에 활용될 경우, 스펀지 matrix의 다공도(porosity)가 중요시되는데 현재까지 보고된 바에 의하면 소수성인 폴리락타이드나 이의 글라이콜라이드와의 공중합체를 이용하여 스펀지 형태의 다공성 matrix에서는 150 - 200㎛의 다공도가 세포의 이행이나 신생혈관의 침투에 유용하다고 알려져 있다[39, 40]. 그러나 이는 수분의 침투가 어려운 소수성인 matrix에 대한 조건이며 상대적으로 수분의 침투가 용이하며 침투된 수분에 의해 팽윤(swelling)하는 키토산 matrix에 대하여는 적용이 곤란할 것으로 사료되었다. 이 연구에 의해 고안된 키토산 스펀지는 수분에 의해 팽윤시 건조시보다 1.5 - 1.8배의 부피의 증가를 보이므로 건조상태에서 80 - 100㎛의 다공도를 보이는 것이 적절할 것으로 생각된다.

생체재료들의 세포친화성이나 조직친화성을 증가시킬 목적으로 표면의 성질을 개조하는 방법으로는 표면에 대한 단백질의 이식, 표면 코팅, 약물의 도입 그리고 아르곤과 같은 일가의 이온을 주입하는 방법(이온 조사 또는 이온 주입) 등을 들 수 있다. 이중에서 이온 조사에 의한 표면성질의 개조는 가장 간단하면서 그 효율이 높은 방법으로 최근 생체재료 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다[29 - 37, 41]. 이온 조사에 의한 표면성질 개조는 일정한 에너지 전위하에서 일정 용량의 이온입자를 생체재료의 표면에 조사하거나 주입하게 되면 그 에너지에 의해 표면의 형태, 표면의 화학적 구조 및 물리화학적 성질이 바뀌면서 이것이 세포 및 조직친화성을 바꾸어 준다는 것에 그 원리를 두고 있다[29, 30].

이 연구에서는 키토산 스펀지에 대하여 일가의 아르곤 이온을 각 스펀지 표면에 대하여 아르곤 용량 5×10^{13}, 및 5×10^{15}로 조사하고 이의 세포친화성을 골아세포에 대해서 실시하였다. 이온 조사결과 세포의 부착율의 증가를 관찰할 수 있었는데 특기할 것은 5×10^{13}의 아르곤 용량을 조사한 경우 세포부착이 가장 큰 반면 5×10^{15}의 용량으로 조사한 경우는 더 이상의 증가를 보이지 않고 오히려 이온빔 처리하지 않은 경우보다 감소하였다. 이러한 경향에 대하여 현재 표면 접촉각, 표면원소분석 등의 연구가 진행중인데, 이는 친수성인 키토산에 대해 5×10^{13}의 아르곤 용량을 가하게 되면 소수성이 어느 정도 부여되어 부착에 적절한 친수 - 소수성의 표면으로 전환이 되나 더 이상의 이온 용량에 의해서는 소수성이 증가하게 되어버려 오히려 세포부착이 감소하는 것으로 생각된다. 1×10^{16} 이상의 매우 높은 용량의 이온 조사를 통하여 표면 처리를 한 이전의 연구들에서는 증가된 세포 적합성이 아직까지 구조의 완전한 규명은 되어있지 않은 탄성상(carbonized phase)의 형성에 의한 결과임을 보고하고 있다[32 - 36]. 그러나 Pignataro 등은 이보다

낮은 조사량(1×10^{15})으로도 상당히 증가된 세포적합성을 관찰할 수 있었다고 보고하였는데[41] 이는 용량 증가에 따라 세포의 부착도가 감소된다는 이 연구의 결과와 일치하고 있다.

아르곤 이온이 조사된 키토산 스펀지에 부착된 골아세포의 생존성을 flow cytometry에 의해 관찰한 결과 부착된 세포 모두 생존성을 잘 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한 p - nitro - phenol의 형성을 405nm에서의 흡광도법을 이용하여 측정한 alkaline phosphatase의 활성도 측정 결과 5×10^{13}용량의 아르곤 이온이 조사된 키토산 스펀지의 경우에서 가장 높은 활성을 가지고 있음을 관찰하였다. 따라서 키토산 스펀지표면에 대해 이온 조사는 세포의 생존성 및 형질에 영향을 미치지 않고 세포의 부착율을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이와같은 연구의 결과는 이온조사를 이용한 고분자의 화학적, 물리적 성질개조를 함으로써 키토산 고분자의 표면에 대한 조직 세포들의 부착을 유도함으로써 조직 적합성을 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며 향후 세포 배양을 통한 조직 공학분야의 담체로서 또는 골조직 재생용 골충전재료로도 활용성이 클 것으로 생각된다.

V. 결론

이온빔 처리된 키토산 스펀지의 세포친화성의 변화 양상을 알아보고자 키토산 스펀지에 35keV의 에너지로 아르곤(Ar^+)이온을 5×10^{13}, 5×10^{15}의 용량으로 각각 스펀지 표면에 대해 조사하고, 백서태자의 두개관세포의 세포접착력 및 Alkaline phosphatase 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 이온빔이 조사된 키토산 스펀지에 부착된 골아세포의 생존성을 flow cytometry에 의해 관찰한 결과, 부착된 세포는 생존성을 잘 유지하고 있음을 알 수 있었다.
2. 5×10^{13} Ar^+ ion/cm^2를 조사한 스펀지에서 대조군에 비해 유의한 세포부착도의 증가를 보인 반면, 5×10^{15}의 용량으로 조사한 경우는 더 이상의 증가를 보이지 않고 오히려 대조군에 비해 감소하였다
3. Alkaline phosphatase의 활성도 측정 결과, 5×10^{13} Ar^+ ion/cm^2 이온이 조사된 키토산 스펀지에서 대조군에 비해 유의한 활성증진이 관찰되었으며, 5×10^{15}의 용량에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

이 연구결과, 적절한 용량(5×10^{13} Ar^+ ion/cm^2)을 이용한 이온빔 조사법이 키토산 스펀지의 세포친화성 및 활성을 높이는 유용한 방법임을 알 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Froum, S. J., Thaler, R., Scopp, I.W., Stahl, S.S.: " Osseous autografts. I. Clinical responses to bone blend or hip marrow grafts ", J. Periodontol., 46 : 515 - 521, 1975.
2. Mellonig, J. T.: " Decalcified freeze - dried bone allograft as an implant material in human periodontal defects ", Int J Periodont Restorative Dent., 4(6) : 41 - 55, 1984.
3. Schallhorn, R. G.: " Present status of osseous grafting procedures ", J. Periodontol., 48 : 570 - 576, 1977.
4. Bowers, G. M., Chadroff, B., Carnevale, R. et al: " Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III, " J. Periodontol., 60 : 683 - 693, 1989.

5. Dragoo, M. R., Sullivan, H. C.:“ A clin - ical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. I. Wound healing 2 to 8 months ”, J. Periodontol., 44 : 599 - 613, 1973.
6. Patterson, R. L., Collings, C., Zimmermann, E.:“ Autogenous implants in the alveolar process of the dog with induced periodontitis ”, Periodontics, 5 : 19 - 25, 1967.
7. Ross, S. E., Cohen, D. W.,“ The fate of a free osseous tissue autograft: a clinical and histologic case report ” , Periodontics, 6 : 145 - 151, 1968.
8. Narang, R., Wells, H.:“ Bone induction in experimental periodontal bone defects in dogs with decalcified allo - genic bone matrix grafts ”, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 33 : 306 - 313, 1972.
9. Pearson, G., Rosen, S., Deporter, D.: “ Preliminary observations on the use - fulness of a decalcified freeze - dried cancellous bone allograft material in periodontal surgery ”, J. Periodontol., 52 : 55 - 59, 1981.
10. Turner, D., Mellonig, J. T.:“ Antigenicity of freeze - dried bone allograft in peri - odontal osseous defects ”, J. Periodont. Res.,16 : 89 - 99, 1981.
11. Aspinall, G. O.,“ The Polysaccharides. Chitin and Chitosan ”, New York, Academic Press, Inc., 2 ; 386, 1986.
12. Ruiz - Herrera, J.,“ The distribution and quantitative importance of chitin in fungi, ” In Proceed. First Internat. Conf. Chitin/Chitosan, Muzzarelli and Pariser(eds)., MIT Sea Grant Report 78 - 7, 1978, 11 - 21
13. Sandford, P. A., Chitosan: Commercial uses and potential application. In: Skjak - Braek G, Anthonsen T, Sandford P,(eds.), Chitin and Chitosan. London: Elsevier Applied Science; 51 - 70, 1989.
14. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., Azuma, I.: “ Immunological activity of chitin and its derivatives ”, Vaccine, 2 : 93 - 99, 1984.
15. Nishimura, K., Nishimura, S., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S., Azuma, I.: “ Macrophage activation with multi - porous beads prepared from partially deacetylated chitin ”, J. Biomed. Mat. Res., 20 : 1359 - 1272, 1986.
16. Allan, G. G., Altman, L. C., Bensinger, R. E., Ghosh, D. K., Hirabayashi, Y., Neogi A. N. , Neogi, S.: “ Biomedical applications of chitin and chitosan ”. In: J.P. Zikakis, ed., Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, 119 - 134. Orlando, Fl: Academic Press, Inc., 1984.
17. Ferro, A., “ Appetite moderating and anti - gastritis composition ”, European Patent Application 219, 156, Sept. 22, 1986.
18. Yano, H., Iriyama, K., Nishiwaki, H., Kifune, K: “ Effects of N - acetylglu - cosamine on wound healing in rats ”, Mie. Med. J., 35 : 53 - 56, 1985.
19. Malette, W. G., Quigley, H., Gaines, R.D., Johnson, N. D., Rainer, W. G.: “ Chitosan: A new hemostatic, ” Ann.

Thorac. Surg., 36 : 55 - 58, 1983.

20. Brandenberg, G., Leibrock, L. G., Shuman, R., Malette, W. G., Quigley, H.:“ Chitosan: a new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue ”, Neurosurg., 15 : 9 - 13, 1984.
21. Muzzarelli. R. A., Baldassarre, V., Conti, F., Ferrara, P., Biagini, B.: “ Biological activity of chitosan: Ultrastructural study, ” Biomaterials, 9 : 247 - 252, 1988.
22. Van der Lei, B., Wildevuur, C. R. H., “ Improved healing of microvascular PTFE prostheses by induction of a clot layer: An experimental study in rats, ” Plast. Reconst. Surg., 84 : 960 - 968, 1989.
23. Brine, C. J., Introduction: Chitin: Accomplishments and perspectives. In: Zikakis J. P.,(ed), Chitin, Chitosan and Related Enzymes. London: Academic Press, Inc.; 1984:xvii
24. Reynolds, B. L., “ Wound healing III: Artificial maturation of arrested regen - erate with an acetylated amino sugar, ” Am. Surgeon., 26 : 113 - 117, 1960.
25. Prudden, J. F., Migel, P., Hanson, P., Friederich, L., Balassa, L. L.:“ Discovery of a potent pure chemical wound heal - ing accelerator ”Am. J. Surg., 119 : 560, 1970.
26. Sapelli, P. L., Baldassare, V., Muzzarelli, R. A. A., Emanuelli, M. Chitosan in dentistry. Chitin in Nature and Technology. 507 - 512, 1986.
27. Muzzarelli, R., Bianini, G., Pugnaloni, A., et al:“ Reconstruction of paradontal tissue with chitosan ”, Biomaterials, 10 : 598 - 603, 1989.
28. Muzzarelli, R. A. A., Biagini, G., Bellardini, M., Simonelli, L., Castaldini, C., Fratto, G.,“ Osteoconduction exert - ed by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery, ” Biomaterials 14 : 39 - 43, 1993.
29. Marletta, G.,“ Chemical reactions and physical property modifications induced by keV ion beam in polymers ”, Nucl. Instrum. Methods B. 46 : 295 - 305, 1990.
30. Marletta, G., Iacona, F., Chemical and physical property modifications induced by ion irradiation in polymers. In: Y.

Pauleau.,(eds.) Materials and Processes for Surface and Interface Engineering. Vol. 290, NATO - ASI Series, Serie E, Applied Sciences, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 597 - 640, 1995.

31. Venkatesan, T., Calcagno, L, Elaman, B. S., Forte, G., Ion beam effects in organic molecu - lar solids and polymers. In: P. Mazzoldi and G. W. Arnold(eds.), Ion Beam Modification of Insulators. Elsevier, Amsterdam, 301 - 379, 1987.
32. Suzuki, Y., Kusakabe, M,. Akiba, H., Kusakabe, K., Iwaki, M.: " In vivo evaluation of antithrombogenicity for ion implanted silicone rubber using indium - 111 - tropolone platelets ", Nucl. Instrum. Methods. B. 59/60, 698 - 704, 1991.
33. Suzuki, Y., Kusakabe, M., Iwaki, M., Akiba, H., Kusakabe, K.: " In vivo evaluation of antithrombogenicity and surface analysis of ion - implanted silicone rubber ", Radiat. Phys. Chem. 39(6): 553 - 560, 1992.
34. Nakao, A., Kaibara, M., Iwaki, M., Suzuki, Y., Kusakabe, M.:" XPS and SERS studies of cell adhesion controlled polymer modified by ion implantation ", Surf. Interf. Anal. 24 : 252 - 256, 1996.
35. Dejun, L., Zhao, J.:" The structure and biomedical behaviour of ion bombarded and plasma polymerized segmented polyurethane ", Appl. Surf. Sci., 78 : 195 - 200, 1994.
36. Lhoest, J. B., Dewez, J. L., Bertrand, P.:" PMMA surface modification under keV and MeV ion bombardment in relation to mammalian cell adhesion ", Nucl. Instrum. Methods B., 105 : 322 - 327, 1995.
37. Svorcik, V., Rybka, V., Hantowicz, V., Bacakova, L., Lisa, V., Kocourek, F.:" Surface prop - erties and biocompatibility of ion - implanted polymers ", J. Mater. Chem., 5 : 27 - 31, 1995.
38. Klokkevold, P. R., Vandemark, L., Kenney, E. B., Bernard, G. W.," Osteogenesis enhanced by chitosan(poly - N - acetyl glucosaminoglycan) in vitro ", J. Periodontol. 67 : 1170 - 1175, 1996.
39. White, R. A., Weber, J. N., White, E. W., " Replanmineform: A new process for preparing porous ceramic, metal, and polymer prosthetic materials ", Science 176 : 922 - 926, 1972.
40. Holmes, R. E., " Bone regeneration within a corralline hydroxyapatite implant ", Plast. Reconstr. Surg., 63 : 626 - 633, 1979.
41. Pignataro, B., Conte, E., Scandurra, A., Marletta, G.:" Improved cell adhesion to ion beam irradiated polymer surfaces ", Biomaterials 18 : 1461 - 1470, 1997.

- Abstract -

A study on cytocompatibility of ion beam-irradiated chitosan sponges

Ku, Young
Department of Periodontology and Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

Chitosan is a biodegradable and non - toxic material with a molecular weight of 800 - 1,500Kd which can be obtained in various forms with extraordinary chemical structures and biological characteristics of which enables it to be used in many fields as a biomaterial. Ion irradiation is a useful tool to modify chemical structures and physical properties of high molecular weight polymers. The basic hypothesis of this study is that when surface properties of chitosan in a sponge form are modified with ion beam - irradiation and cell adhesion properties of chitosan would improve and thereby increase the regenera - tive ability of the damaged bone. The pur - pose of this study was to illuminate the changes in the cytocompatibility of chitosan sponges after ion beam - irradiation as a pre - liminary research. Argon(Ar^+) ions were irra - diated at doses of 5×10^{13}, 5×10^{15} at 35 keV on surfaces of each sponges. Cell adhesion and activity of alkaline phosphatases were studied using rat fetal osteoblasts. The results of this study show that ion beam - irradiation at optimal doses(5×10^{13} Ar^+ ion/cm^2) is a useful method to improve cytocompatibility without sacrificing cell viability and any changing cell phenotypes. These results show that ion beam - irradiated chitosan sponges can be further applied as carriers in tissue engineering and as bone filling materials.

Key words : chitosan sponge; ion beam; surface modification; osteoblast; cytocom - patibility