



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학박사 학위논문

전기방사를 이용한 골 전도성 및
생분해성 부직포 제조

2016년 2월

서울대학교 대학원

치의과학과 치과생체재료과학 전공

김 인 애

전기방사를 이용한 골 전도성 및 생분해성 부직포 제조

지도교수 이 상 훈

이 논문을 김인애의 박사학위논문으로 제출함

2015년 10월

서울대학교 대학원

치의과학과 치과생체재료과학 전공

김 인 애

김인애의 박사학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장 임 범 순 (인)

부 위 원 장 이 상 훈 (인)

위 원 김 석 영 (인)

위 원 이 명 현 (인)

위 원 손 원 준 (인)

초 록

칼슘실리케이트, 생분해성 고분자, 및 칼슘실리케이트/생분해성 고분자 복합형 부직포를 각각 전기방사법으로 제조 후 이들 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트를 형성시키는 방법에 대해 연구했다. 칼슘실리케이트가 포함된 부직포는 칼슘이온의 용출에 의해 의사체액 내의 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시키는 방법으로 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성을 유도했고 순수한 생분해성 고분자 부직포는 칼슘이 함유된 PVA 전달체 시스템을 이용해 의사체액 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트가 형성되도록 설계했다.

골 전도성 칼슘실리케이트 부직포 제조를 위해 칼슘염의 농도가 서로 다른 칼슘실리케이트 졸을 전기 방사해 부직포를 제조한 후 300°C에서 열처리 했다. 그 결과, 의사체액 내에서의 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성능이 증가했고 조골세포의 증식과 분화는 느리게 일어나는 경향을 보였다. 한편, 토끼의 두개골 원형 결손부에 칼슘실리케이트 부직포를 매식한 결과 순수한 실리케이트 부직포에 비해 우수한 신생골의 형성을 보였다.

칼슘실리케이트/폴리카프로락톤 복합형 부직포의 제조 및 골 전도성 평가를 위해 산 촉매 내에서 TEOS의 수화 및 축합 반응으로 제조된 칼슘실리케이트 졸과 HFIP에 용해된 폴리카프로락톤 용액을 각각 서로 다른 농도를 사용해 동시에 전기 방사했다. 대조군으로 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤 부직포도 각각 전기방사로 제조했다. 생체활성 평가를 위해 의사체액에 부직포를 담지한 결과, 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 표면에는 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성되었으나 순수한 폴리카프로락톤 부직포 표면에는 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성되지 않았다. 한편, 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 기계적 물성은 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤의

중간적 과단특성을 보였다. 토끼의 두개골 원형 결손부에서 골 전도도 평가를 수행한 결과, 의사체액 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트 형성능을 보였던 칼슘실리케이트 및 칼슘실리케이트/폴리카프로락톤 복합형 부직포의 경우 우수한 골 전도성을 보인 반면 폴리카프로락톤 부직포의 경우는 염증반응만이 관찰됐다.

칼슘실리케이트/생분해성 고분자 복합형 부직포에서 고분자의 분해속도가 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성에 미치는 영향을 평가하기 위해 칼슘실리케이트와 분해속도가 서로 다른 두 가지 PLGA를 사용해 칼슘실리케이트/PLGA 복합형 부직포를 제조했다. 분해속도가 서로 다른 두 개의 PLGA를 각각 HFIP에 용해시킨 후 칼슘실리케이트 졸과 함께 서로 다른 농도를 사용해 동시에 전기 방사했다. 대조군으로는 칼슘실리케이트와 복합형 부직포 제조 시 사용한 두 개의 PLGA 부직포를 각각 전기 방사해 제조했다. 분해속도가 느린 PLGA를 포함하는 칼슘실리케이트/PLGA7525 복합형 부직포는 의사체액 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트 형성을 보였으나 분해속도가 빠른 PLGA를 포함하는 칼슘실리케이트/PLGA5050 복합형 부직포는 저 결정성 탄산 아파타이트 형성을 보이지 않았다. 또한 PLGA5050으로 제조된 모든 부직포는 의사체액 내에서 PLGA 섬유의 팽윤 현상이 관찰됐다. 이는 생체물성 시험 후 잔류 의사체액 중 원소농도를 평가해 아파타이트에 대한 이온화도적 계산 결과, 생분해 속도가 빠른 경우 산성을 띠는 분해산물이 이온화도적을 낮춰 저 결정성 탄산 아파타이트의 생성을 방해했기 때문으로 평가됐다.

생체활성이 없는 순수한 고분자 부직포에 저 결정성 탄산 아파타이트 형성능을 부여하기 위해 칼슘염이 포함된 PVA 전달체 시스템을 설계했다. 전기방사를 이용, PLGA 부직포를 제조 후 4M 농도의 염화칼슘이 함유된 PVA 용액을 PLGA 부직포 표면에 코팅하여 실험군을 제작했고, PVA 없이 4M 농도의 염화칼슘 용액을 직접 PLGA 부직포 표면에 도포한 것과 순수한 PLGA 부직포를 각각 대조군으로 제작했다. 각 시료의 저 결정성 탄산 아파타이트 생성능을 확인하기 위해 세 가지 부직포를

의사체액에 시간별로 침전했다. 그 결과, PVA 전달체 시스템을 이용한 부직포에서 의사체액 침전 3시간 후부터 저 결정성 탄산 아파타이트가 형성됐고 7일후에는 PLGA섬유 전체에 균일하게 저 결정성 탄산 아파타이트가 형성됨이 관찰됐다. 한편, 칼슘용액만 도포한 PLGA 부직포에서는 불균일하게 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성되었고 순수한 PLGA 부직포에서는 아파타이트가 형성되지 않았다. 따라서 PVA-칼슘염 전달체 시스템을 사용했을 경우 단순히 칼슘염만을 도포했을 경우에 비해 효과적으로 저 결정성 탄산 아파타이트를 고분자 부직포의 표면에 도포할 수 있는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과와 같이 본 연구에서는 생체활성 칼슘실리케이트와 PVA-칼슘염 전달체 시스템을 이용하여 전기방사법으로 제조된 칼슘실리케이트, 칼슘실리케이트/생분해성 고분자, 순수한 고분자 부직포 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트 형성을 성공적으로 구현 할 수 있었다. 이러한 저 결정성 탄산 아파타이트 생성능을 매개로한 우수한 골 전도성과 부직포로부터 기인한 생체 모방형 구조를 이용하여 골 유도막 및 골 이식재로 응용 가능할 것으로 기대된다.

주요어: 전기방사, 부직포, 저 결정성 탄산 아파타이트, 골 전도성,
칼슘실리케이트, 칼슘실리케이트/고분자, 생분해성,
PVA 전달체 시스템

학 번: 2008-30630

List of Figures

- Figure 1. Viscosity of SiO₂-CaO solutions after hydrolysis and condensation at 60°C for 4 h. 18
- Figure 2. FE-SEM photographs of heat-treated non-woven SiO₂-CaO fabrics with four different Ca contents; (a) SCa0.00, (b) SCa0.05, (c) SCa0.10 and (d) SCa0.15. 19
- Figure 3. XRD patterns of the heat treated non-woven SiO₂-CaO fabrics contained four different Ca contents. 20
- Figure 4. FT-IR spectra of the heat treated non-woven SiO₂-CaO fabrics contained four different Ca contents. 21
- Figure 5. FE-SEM photographs of heat-treated non-woven SiO₂-CaO fabrics soaked in SBF for 7 days; (a) SCa0.00, (b) SCa0.05, (c) SCa0.10 and (d) SCa0.15. 23
- Figure 6. TF-XRD spectra of heat-treated non-woven SiO₂-CaO fabrics soaked in SBF for 7 days. 24
- Figure 7. Proliferation of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells cultured on heat-treated non-woven SiO₂-CaO fabrics and TCP as a control. Data are expressed as mean \pm standard deviation of five determinations. (**p* < 0.05) 25

Figure 8. ALP activity of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells on heat treated non-woven SiO₂-CaO fabrics after 7 d of culture in osteogenic medium at an initial seeding density of 10⁶ cells/well. Data are expressed as mean ± standard deviation of five determinations. (**p* < 0.05) 26

Figure 9. Optical micrographs of (a) negative control, (b) bone defect filled with specimen S_{Ca0.00}, and (c) with specimen S_{Ca0.10} (original magnification 340) 4 weeks after implantation into rabbit calvarial defects: Bone margins are indicated by black lines. Newly formed bone and fibrous tissue are indicated with black and gray arrows, respectively. 28

Figure 10. Detailed microstructure of Fig. 9. 29

Figure 11. FE-SEM images of (a) specimen P, (b) specimen S, and (c) specimen PS. 45

Figure 12. Fiber size distributions of specimens P, S, and PS. 46

Figure 13. TF-XRD patterns of specimens P, S, and PS. 47

Figure 14. FT-IR spectra of specimens P, S, and PS. 49

Figure 15. FE-SEM images of (a) specimen P, (b) specimen S, and (c) specimen PS after soaking in SBF for 1 week. 50

Figure 16. Fracture surfaces of (a) specimen S and (b) specimen PS after soaking in the SBF for 1 week. 51

Figure 17. TF-XRD patterns of specimens P, S, and PS after soaking in SBF for 1 week.	52
Figure 18. Changes in element concentrations and SBF, pH as a function of soaking time.	54
Figure 19. Changes in ionic activity product of apatite in SBF due to immersion of specimens P, S, and PS.	55
Figure 20. Tensile fracture strength-strain curves of specimens P, S, and PS. ...	56
Figure 21. Optical micrographs of specimens (a) P, (b) S, and (c) PS after 2 weeks of implantation into calvarial defects of New Zealand white rabbits. New and old bone tissues are denoted by white and black arrows, respectively. Specimen P is denoted by a white asterisk, and the original defect margin is indicated by two black lines. (Original magnification 40)	58
Figure 22. Detailed micro structures of Fig 21.(x 100)	59
Figure 23. Optical micrographs of specimens (a) P, (b) S, and (c) PS after 4 weeks of implantation into calvarial defects of New Zealand white rabbits. New and old bone tissues are denoted by white and black arrows, respectively. Specimen P is denoted by a white asterisk, and the original defect margin is indicated by two black lines. (Original magnification 40)	60
Figure 24. Detailed micro structures of Fig. 23. (x100)	61

Figure 25. Histomorphometric results at 2 and 4 weeks post implantation. Total new bone is expressed as a percentage of the total region of the defect. The values represent the mean \pm standard deviation of samples (n=4 in each group). * Significantly different from PCL group at 2 and 4 weeks, respectively ($*p < 0.05$). 62

Figure 26. FE-SEM images of specimens (a) S, (b) P5050, (c) P7525, (d) P5050S, and (e) P7525S. 74

Figure 27. Relative frequency of fiber diameters of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S. 75

Figure 28. TGA thermogram of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S. 76

Figure 29. TF-XRD patterns of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S. 77

Figure 30. FT-IR spectra of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S. 79

Figure 31. FE-SEM images of specimens (a) S, (b) P5050, (c) P7525, (d) P5050S, and (e) P7525S after soaking in SBF for 1 week. 80

Figure 32. TF-XRD patterns of specimen S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S after soaking in SBF for 1 week. 81

Figure 33. Changes in elemental (a) calcium, (b) phosphorous, and (c) silicon concentrations, and (d) pH of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S after different soaking periods in SBF. 83

Figure 34. Changes in ionic activity products of apatite in SBF due to the immersion of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S. ..	84
Figure 35. (a) FE-SEM image and (b) fiber size distribution of non-woven PLGA fabric.	95
Figure 36. FT-IR spectra of PVA, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and the mixture of PVA and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96
Figure 37. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen P after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.	97
Figure 38. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen PC after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.	98
Figure 39. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen PPC after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.	100
Figure 40. FE-SEM photographs of the other side of specimens PC and PPC observed in Figs 4f and 5f; (a) low- and (c) high-magnification FE-SEM photographs of specimen PC, (b) low- and (d) high-magnification observation of specimen PPC.	101
Figure 41. TF-XRD patterns of specimens (a) P, (b) PC and (c) PPC after soaking in SBF for 0, 3, 6, 9, 12 h, 1 day and 7 days.	102

Figure 42. Changes in elemental concentrations and SBF pH as a function of soaking time: (a) Ca, (b) P, (c) pH and (d) IAP. 103

Figure 43. Schemes of apatite formation on specimens PC and PPC with time · 107

목 차

초 록	i
List of Figures	v
I. 서론	1
II. 문헌연구	4
III. 전기방사법으로 제조된 칼슘실리케이트 부직포의 생체활성 및 골 전도도 평가	10
IV. 전기방사를 이용한 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 제조 및 골 전도도 평가	35
V. PLGA의 생분해성이 전기방사법으로 제조된 PLGA/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 생체활성에 미치는 영향 ..	67
VI. PVA-칼슘염 전달체 시스템을 이용한 아파타이트 코팅법 연구 ...	89
VII. 종합결론	109
VIII. 참고문헌	112
Abstract	133

I. 서론

산업화를 통한 생활수준의 향상과 노령화로 골 손상 환자들이 매년 증가함에 따라 신생골의 형성을 유도하고 골을 대체할 수 있는 골 이식재와 골조직 재생 유도막 시장은 급속도로 발전되고 있다. 현재 골조직 재생 유도막으로 가장 많이 이용되는 물질은 콜라겐과 같은 고분자로 좋은 생체적합성과 생분해성을 가지고 있으며 물리학적 특성상 가공성이 매우 뛰어나다. 또한 분자량이나 공중합체의 조성 조절을 통해 비교적 쉽게 기계적 물성과 생분해 속도를 조절할 수 있어 봉합사, bone plate, 스크류, 인공 골두 및 약물 전달체과 같은 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 하지만 이러한 고분자 차폐막은 골 전도성이 전혀 없어 직접적으로 신생골의 생성을 유도할 수 없기 때문에 생체활성 세라믹 재료와 혼합하여 세라믹/고분자 복합체 형태의 차폐막 개발이 이루어지고 있다.¹⁻⁵

세라믹/고분자 복합체 연구에서 가장 많이 이용되는 생체활성 세라믹인 아파타이트는 사람의 뼈 안에 존재하는 무기질로써 결정도가 낮은 저 결정성이고 입자 크기가 수십 나노미터 수준으로 골 전도성이 우수한 것으로 알려져 있다.^{4,6} 그러나 합성된 아파타이트의 경우 고온의 소결 과정을 거침으로써 결정도가 높아지게 되고 아파타이트 구조내의 탄산기가 산화하여 이산화탄소의 형태로 배출되므로 뼈에서 관찰되는 저 결정성 탄산 아파타이트가 아닌 고 결정성 수산화아파타이트이다. 이러한 수산화아파타이트는 저 결정성 탄산 아파타이트에 비해 골 전도도와 생분해도가 낮기 때문에 저 결정성 탄산 아파타이트를 재현해 내고자 하는 많은 노력이 이루어지고 있다.^{7,8}

실리카 기반의 생체유리는 인체 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트 층을 형성시키는 탁월한 생체활성 물질이다.^{9,10} 이는 인체 내 식립 후 칼슘이온이 녹아나면서 재료 표면에 생성되는 실라놀 그룹(Si-OH)이 아파타이트의 핵 생성 사이트로 작용하고 녹아난 칼슘이온은 저 결정성 탄산

아파타이트를 생성하는 촉매제로의 역할을 함으로써 탄산 아파타이트 층을 형성한다.¹¹⁻¹³

세라믹/고분자 복합체를 제조하는 방법은 크게 벌크형과 표면 코팅법으로 나눌 수 있는데 벌크형은 다시 물리적 혼합법과 졸-겔을 이용한 나노 복합체 제조법으로 나눌 수 있다. 물리적 혼합법은 고분자와 세라믹 과립을 균일하게 혼합하기 어려울 뿐만 아니라 서로 다른 친수성 성질로 인하여 상 분리 현상이 일어나기 쉽다. 또한, 제조된 복합체의 표면에 세라믹 상이 드러나지 않는 문제점이 있었다. 따라서 이를 극복하고자 세라믹 전구물질을 이용하여 분자규모에서 세라믹과 고분자를 공유 결합시키는 나노 복합체의 개발이 이루어졌다. 이러한 나노복합체는 상 분리 현상을 해결하고 세라믹 상에 의해 우수한 골 전도성을 가지며 고분자상에 의해 생분해성과 높은 인성을 부여할 수 있었다.¹⁴⁻¹⁶ 그러나 이러한 나노 복합체도 체내에 이식 시 복합체의 구조에서 발생하는 새로운 화학적 결합이 임상적인 사용에 있어 안전성이 검증되지 않았으며 대식세포의 활동으로 인해 나노 입자는 이물반응이 일어날 수 있다는 단점을 가지고 있다. 따라서 고분자 표면에 생체활성 세라믹 층을 도포하는 방법이 대두되었다.^{1,17} 이는 생체활성이 없는 합성 고분자의 표면을 실리카 전구체로 개질하거나 의사체액 내에 고분자와 실리카 기반의 생체유리를 함께 담지하여 그 표면에 아파타이트의 핵 생성 사이트를 형성시킨 후 아파타이트를 코팅하는 방법이다. 이러한 코팅을 통한 복합체 제조법은 지지체의 표면에 세라믹 층이 노출됨으로써 골 전도성을 부여하고 내부에 있는 고분자가 안정적인 기계적 물성을 보완할 뿐만 아니라 새로운 화학적 결합이 없어 인체 내 안정성 또한 보장된다.

세라믹/고분자 복합체의 제조에 있어서 또 다른 주요인자는 3차원 연결기공이다. 골유도 차폐막에서 기공은 새로운 혈관의 형성과 조직의 성장을 위해 매우 중요하다. 최근에 이러한 3차원 연결구조체를 제조하는 방법으로 전기방사법이 대두되었다. 전기방사법은 점성이 있는 액상물질을 높은 전기장 하에서 방사함으로써 섬유가 제조되는 방법으로 고분자,

세라믹 및 이의 조합에 의한 복합체의 제조도 가능하다. 이러한 전기방사법으로 제조된 부직포는 세포외기질 내 콜라겐과 유사한 구조를 가지고 있으며 높은 표면적 대 체적비, 높은 공극율 그리고 물리학적 강도와 분해능의 조절이 손쉬운 장점을 가지고 있어 조직공학적 지지체로 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁸⁻²⁴

따라서 본 연구에서는 골 전도도 및 생분해성을 가진 3차원 다공성 부직포를 전기방사법으로 제조하고 이들 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트를 형성시키는 방법에 대해 연구했다.

II. 문헌연구

1. 골조직 재생 유도막

골조직 재생 유도막이란 치주조직이나 치조골 손상 시 골 조직이 재생되는 속도에 비해 주변 연조직이 결손부위로 침투하는 속도가 더 빠르기 때문에 결손부위를 멤브레인으로 감싸서 인접한 연조직 세포가 결손부위에 침투하는 것을 차단하고 신생골이 형성될 수 있는 공간을 확보하는 차폐막이다.

초기 차폐막은 Magnusson²⁵ 등이 millipore 필터를 이용하여 적용하고자 했으나 쉽게 부서지고 치근면에 적용하기가 어려운 단점이 있었다. 그 후 여러 실험^{26,27}에서 expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE)막을 이용하였고 e-PTFE 막은 연조직의 차폐능력이 뛰어나고 생체 안정도와 친화성, 조작성이 우수하여 조직유도 재생에 효과적인 것으로 보고되었다.⁵ 그러나 이러한 비 흡수성 차폐막은 2차 수술로 인한 환자의 불편함과 경제적 부담으로 인해 최근에는 PLA, PGA, 콜라젠과 같은 흡수성 차폐막이 많이 이용되고 있다. 하지만 합성 고분자로 제조된 차폐막은 분해 시 산분해산물이 부산물로 나오면서 주변 조직에 염증을 일으키거나 골 조직을 분해시키기도 한다.²⁸ 이러한 골조직 재생유도막은 현재까지 주변 골조직이 재생할 수 있는 공간을 확보함으로써 간접적으로 골형성을 유도했으나 최근에는 더 효과적인 골 조직 재생을 위해 고분자와 생체활성 세라믹을 혼합한 유, 무기 복합형태의 차폐막 연구가 이루어지고 있다.²⁹⁻³⁴ Kikuchi²⁹ 등은 β -TCP와 PLGCL 고분자를 물리적으로 혼합한 후 hot press를 이용하여 멤브레인을 제조하였고, Liao³⁰와 Teng³¹ 등은 나노 수산화 탄산아파타이트와 콜라젠을 공침법을 통해 유, 무기 복합형 막으로 제조한 후 또 다른 고분자인 PLGA나 키토산 층을 첨가하여 물리적인 강도가 보강된 차폐막을 제조하였다. 하지만 이러한 멤브

레인은 상호 연결된 개기공이 없을 뿐만 아니라 고분자와 세라믹을 물리적으로 혼합함으로써 두 물질간의 젖음성 차이로 인해 계면 박리현상, 고분자 내에 세라믹 상의 불균일한 분산 그리고 표면에 세라믹 상의 노출이 어려운 단점을 가지고 있다. 따라서 멤브레인의 표면에 연결 기공을 만들고 표면에 세라믹 상을 노출시키기 위해 Fujihara³²와 Yang³³ 등은 폴리카프로락톤과 Calcium carbonate³² 또는 나노아파타이트^{33,34}를 물리적으로 혼합 후 전기방사법으로 부직포 형태의 멤브레인 제조하였다. 그러나 이러한 다공성 멤브레인도 표면에 세라믹 상의 노출이 어려워 멤브레인의 표면에 직접적으로 세라믹 상을 도포하는 공정이 필요하다.

2. 전기방사법

전기방사는 점성이 있는 액상물질을 높은 전기장 하에서 방사하여 수십 nm~ μ m 스케일의 직경을 갖는 섬유를 구현하는 방법으로 제조법이 간단하고 섬유로 제조 가능한 재료의 선택이 쉽고 다양한 장점을 가지고 있다. 전기방사로 제조된 부직포는 인체 내의 세포외기질에 존재하는 콜라겐과 유사한 3차원 다공성 구조로 높은 비표면적과 공극률을 가진다. 또한, 섬유의 크기 및 밀도 조절이 용이한 장점을 바탕으로 의료산업에서 많은 관심을 받아왔다.^{19,35-37}

전기방사는 1934년 Formhals가 고분자 필라멘트 제작을 위해 정전기력을 활용한 기기제조에 관한 특허를 출원하면서 소개되었다.^{38,39} 이후 약 30년 뒤인 1969년에 Taylor가 전기장 내에서 고분자 용액의 표면 장력 및 액체제트의 거동에 관한 연구를 발표하면서 전기방사법이 빠르게 전파되었다.⁴⁰ 이후 다양한 분야에서 나노섬유를 활용한 연구가 진행되었고 1978년 Annis와 Bornat이⁴¹ 인공혈관의 제조에 전기방사법을 이용하면서 조직공학 분야에 적용되었다.⁴²

전기방사 장치는 크게 고전압기, 방사구 그리고 섬유를 수집하는 집진기로 이루어진다. 일반적으로 주사기 펌프를 통해 방사용액을 일정한 속도로 방사구 끝에 있는 주사바늘을 통해 토출시킨다.

이때 한쪽 전극은 고전압기와 노즐 바늘을 연결하고 반대전극은 집진기에 연결하여 전기장을 인가한다. 일정한 표면장력을 가지고 방사구 끝에 매달려 있는 용액에 높은 전기장을 가하게 되면 + 또는 -의 한쪽 전하가 용액의 표면에 계속 축적되면 같은 전하의 정전기적인 상호반발력에 의해 용액의 형상이 구형에서 반구형상의 테일러 콘으로 변형된다. 이때 전기장의 세기가 미세방울이 가지는 표면 장력을 넘어서면서 노즐 끝단의 반구형상이 테일러 콘 형상의 제트로 방사된다.

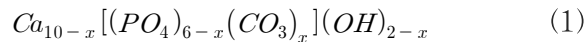
이때 방사된 용액은 공기 중에서 용매가 휘발되고 섬유는 집진기에 3차원 네트워크 구조로 적층되어 부직포 형태의 그물구조를 형성하게 된

다. 전기방사에 의해 제조된 섬유는 직경은 방사조건에 크게 좌우되며 고분자 용액의 점도가 가장 결정적인 변수로써 일반적으로 섬유의 직경은 고분자 용액의 농도의 제곱에 비례한다. 또한 높은 전압, 용액의 주입 속도, 노즐과 집진기 사이의 거리 등이 주요 인자로 작용된다.⁴³

이러한 방법으로 만들어진 부직포는 부피 대비 표면적의 비가 극히 높으며 공극률이 매우 높아 뛰어난 투수성을 지니고 있으며 복합성분의 고분자나 세라믹을 이용할 수 있어 기존의 고분자가 갖는 물성 한계를 극복 가능한 장점이 있다.⁴⁴⁻⁴⁸ 그리고 간단한 장비로 비교적 쉽게 나노 또는 마이크로 섬유를 제작할 수 있으며 소량의 재료만 가지고도 방사가 가능하다. 이러한 특성으로 인해 조직 공학 분야에서 조직 재생을 위한 지지체로서의 활용 가능성에 주목받아 많은 연구가 진행되고 있다.⁴³

3. 아파타이트 생성기전

생체활성 세라믹이란 인체 내에서 그 표면에 저 결정성 탄산아파타이트가 형성되어 신생골과 직접적인 결합을 이룰 수 있는 물질이다. 저 결정성 탄산 아파타이트는 사람의 뼈와 물리, 화학적으로 유사한 구조를 가진 물질로 일반적으로 다음의 식(1)과 같이 인산기가 존재하는 사이트에 탄산기가 치환된 형태를 이루고 있다고 알려져 있다.⁴⁹



인체 내에서 이러한 생체활성을 나타낼 수 있는 대표적인 물질로는 수산화아파타이트, 삼인산칼슘, 칼슘실리케이트 글라스 등이 있다.⁵⁰ 특히 칼슘실리케이트가 함유된 세라믹은 생체 내에서 표면에 저 결정성 탄산아파타이트를 생성시키는 탁월한 물질로 그 기전은 다음과 같이 설명될 수 있다.¹³

사람 체액의 이온화활동도적(IAP; ionic activity product)은 2.12×10^{-96} 이며 37°C 수용액 내에서 아파타이트의 용해도적(K_0)은 5.5×10^{-118} 이므로 체액 내 아파타이트는 이미 과포화 상태이다. 임계크기의 불균일 핵생성에 필요한 자유에너지 ΔG^* 는 다음 식(2)와 같이 나타낼 수 있는데 σ 는 수용액과 핵 사이의 계면에너지이며, k 는 Boltzmann 상수, T 는 온도, $f(\theta)$ 는 재료 표면과 수용액간의 접촉각의 수이며, V_β 는 결정의 분자량이다.

$$\Delta G^* = \frac{16\sigma^3 f(\theta)}{3(kT/V_\beta \ln(IAP/K_0))^2} \quad (2)$$

체액의 경우, V_β , σ 와 K_0 가 모두 일정한 상수가 되므로 불균일 핵생성이 일어나기 위해서는 재료가 함수 $f(\theta)$ 의 값을 낮춰줄 수 있는 핵형성 사이트인 Si-OH⁵¹, Ti-OH⁵², 혹은 Zr-OH⁵³ 그룹 등을 제공하거나 아

파타이트에 대한 과포화도를 높일 수 있어야 한다.¹³

따라서 칼슘실리케이트가 포함된 물질을 생체 내에 식립하면 그 표면에 핵생성 사이트인 실라놀 그룹(Si-OH)이 생성되고 칼슘이온이 용출되면서 주위 체액의 아파타이트에 대한 과포화도를 높이게 되어 불균일 핵형성이 이루어진다. 이렇게 형성된 핵은 주위 체액으로부터 Ca, PO₄, OH, CO₃ 등의 이온을 공급받으며 성장하여 재료 표면에 균일한 탄산아파타이트 층을 형성시킨다.^{11,13}

Ⅲ. 전기방사법으로 제조된 칼슘실리케이트 부직포의 생체활성 및 골 전도도 평가

1. 서론

실리카 기반의 생체재료는 인체 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트 층을 형성시키는 탁월한 골 전도능을 가지고 있어 골 충전재로써 많은 연구가 이루어져 왔다.^{9,10} 이식초기에 전하의 균형을 위해 비가교 산소와 결합되어 있던 칼슘이온이 녹아나면서 생성되는 표면의 실라놀 그룹이 아파타이트 핵 사이트의 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이때 녹아난 칼슘이온은 저 결정 탄산 아파타이트를 생성하는 촉매제로의 역할을 한다.⁵⁴

그러나 이러한 탁월한 골 전도성에도 불구하고 실리카 기반의 유리재료는 너무 쉽게 깨지는 성질로 인해 임상적용이 어려운 실정이다. 또한, 세포의 침투가 가능한 3차원 연결구조 형태를 만들기 어려워 골 충전재나 골 유도 차폐막으로써의 활용에 어려움이 있었다.

최근에 고분자나 세라믹을 이용한 3차원 연결구조체 제조법으로 전기방사법이 대두되었다.^{35,45,46,55-57} 생분해능이 있는 고분자 부직포는 세포외기질과 유사한 구조와 높은 표면적 대 체적비, 높은 공극율, 적합한 물리학적 강도와 분해능⁴⁴, 표면 개질 가능성^{45,46} 그리고 약물이나 유전자의 loading이 가능한 장점을^{47,48} 가지고 있어 조직 공학적 지지체로 많은 연구가 되어왔다. 실제로 전기 방사된 생분해성 고분자 부직포는 용매제거법을 이용하여 제조된 고분자 필름에 비해 혈관 근육세포의 부착과 증식 분화에 더 좋은 효과를 보였다.^{35,55,56}

그러나 전기방사법을 이용한 세라믹 부직포에 관한 연구는 많이 보고되지 않았다. 그 이유는 소수의 세라믹 재료만이 전기방사를 위한 점착

성 용액의 제조가 가능하기 때문이다. 따라서 전기방사법으로 세라믹 부직포를 제조하기 위해서는 졸-겔 과정을 통해 직접적으로 점성이 있는 세라믹 겔을 만드는 금속 알콕사이드법과^{22,58-60} 높은 점성의 고분자나 겔 용액에 세라믹 파우더를 혼합하여 세라믹 겔을 제조하는 두 가지 방법이 있다.^{21,22,61,62}

첫째로 졸-겔 과정을 이용한 방법은 열처리를 통해 수축이 적은 치밀하고 단단한 세라믹 섬유를 쉽게 만들 수 있을 뿐만 아니라 세라믹과 고분자 섬유가 혼합된 복합형 부직포를 제조할 수 있는 유일한 방법이다.⁶³ 왜냐하면 세라믹 겔 제조 시 고분자를 사용하지 않으므로 이후 고분자 제거를 위한 열처리 과정이 필요 없기 때문이다.^{21,22,61,62} 그러나 졸-겔 방법은 세라믹 졸 용액의 겔화가 시작되면 점성이 기하급수적으로 증가되기 때문에 전기방사를 위한 충분한 제조시간을 얻기 힘든 단점이 있다. 반면 세라믹/고분자 혼합법은 제조시간이 자유로운 장점이 있으나 세라믹 섬유 내에 있는 고분자를 열처리로 제거해야하고 이로 인해 단단하고 치밀한 세라믹 섬유를 얻기 힘들어 적절한 강도를 가지기 어렵다.^{21,22,61,62}

전기방사 된 실리카 부직포는 의사체액 내에서 낮은 아파타이트 형성능을 보일뿐만 아니라 골 충전재로 사용하기에는 너무 빠른 분해능을 보인다.⁵⁸ 그러나 열처리를 통해 분해속도를 느리게 하면 섬유의 표면에 아파타이트 핵 생성 사이트로 작용하는 실라놀 그룹이 사라져 아파타이트 형성능을 잃어버린다. 따라서 열처리 이후에도 아파타이트 형성능을 얻기 위해서는 실리카 매트릭스 내부에 칼슘이온을 함유시키는 방법이 적절하다. 칼슘이온이 의사체액 내에서 방출되면 새로운 실라놀 그룹이 형성되고 방출된 칼슘 이온자신은 아파타이트의 이온화활동도적을 증대시키는데 이용된다. 실제로 실리카 매트릭스에 칼슘이 함유된 부직포에서 열처리 후에 칼슘실리케이트 부직포의 표면에 아파타이트가 성공적으로 형성되었다.⁶⁰

본 연구에서는 칼슘실리케이트 부직포 내 칼슘농도가 아파타이트 생성능과 조골세포의 반응에 미치는 영향에 관하여 연구했다. 골 전도성은 4

개의 다른 칼슘농도를 가진 부직포 중에서 아파타이트 생성능과 세포반응이 가장 높은 것과 낮은 것을 선택하여 평가했고 아무것도 매식하지 않은 결손부는 음성 대조군으로 사용했다.

2. 실험방법

2.1 부직포의 제작

실리카 전구체인 tetraethyl orthosilicate (TEOS)를 물, 에탄올, 염화칼슘, 염산과 함께 60°C에서 4 시간 동안 반응시켜 수화 응축시켰다. 이때 물과 에탄올, 염산은 Si에 대한 몰 비로 각각 4: 1: 0.02로 혼합했고 칼슘염은 각각 0, 0.05, 0.1 그리고 0.15 농도로 첨가했다. 용액의 졸-겔 반응이 시작되면 16-gauge 스테인리스 스틸 바늘이 장착된 플라스틱 주사기에 넣고 주사기 펌프를 이용하여 5 ml/h의 속도로 이송하면서, 20 kV의 높은 전압 내에서 전기 방사했다. 방사된 칼슘실리케이트 부직포는 24 시간 동안 실온에서 건조한 후 2°C/min의 속도로 올리면서 300°C에서 3 시간 동안 열처리했다. 각기 다른 농도의 칼슘염을 함유한 칼슘실리케이트 부직포는 칼슘염의 농도에 따라 SCa0.00, SCa0.05, SCa0.10 그리고 SCa0.15로 명명했다.

2.2 생체활성 시험

칼슘실리케이트 부직포의 생체활성은 의사체액 내에서 생성되는 아파타이트의 형성능으로 평가했다. 의사체액은 NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₃ · 3H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂, NaSO₄를 Na⁺ 142.0, K⁺ 5.0, Mg²⁺ 1.5, Ca²⁺ 2.5, Cl⁻ 147.8, HCO⁻ 4.2, HPO²⁻ 1.0, SO₄²⁻ 0.5 mM의 농도로 증류수에 용해시켜 제조했고 tris-buffer 용액 [tris(hydroxymethyl)aminomethane, H₂NC(CH₂OH)₃]과 1N의 염산용액을 가하여 36.5°C에서 용액의 pH를 7.4로 맞추었다.

부직포는 12 mm 직경, 1 mm 두께의 디스크 형태로 잘라 자외선 멸균기 내에서 30 분간 멸균한 후 30 ml의 의사체액에 36.5°C에서 7 일간 담지했다. 7 일후 의사체액에서 꺼낸 시료를 증류수로 세척한 다음 상온에서 건조했다.

2.3 특성 분석

칼슘실리케이트 용액의 점도는 점도계 (DV-III+Cone/Plate type, Brookfield)를 이용하여 온도가 60°C로 일정한 수조 (HTRC-20, Jeio Tech)내에서 측정했다. 칼슘실리케이트 부직포의 미세구조를 관찰하기 위해 의사체액 담지 전후의 시료를 금으로 코팅한 후 전계방사형 주사전자현미경 (FE-SEM; S-4700, Hitachi)을 이용했다. 칼슘실리케이트 부직포의 작용기 분석은 적외선 분광광도계 (FT-IR; Nexus, Thermo-Nicolet)를 이용했고 4 cm⁻¹의 분해능으로 시료를 128회 스캔 하여 얻어진 누적 값으로 나타냈다. 작용기 분석용 시료는 미분 상태의 부직포와 시료대비 200 배 무게의 KBr 분말을 혼합하여 제작한 후 측정했으며 background noise는 순수한 KBr 분말만 측정한 값으로 보정했다. 의사체액 담지 전후 칼슘실리케이트 부직포의 결정상은 X-선 회절분광장치 (Thin Film-XRD; D8 discover, Bruker)를 통해 측정했다.

2.4 세포활성도 실험

2.4.1 세포 증식시험

세포증식 시험을 위해 디스크 형태의 시료를 48 well 배양접시에 넣고 그 위에 마우스의 두개골에서 유래된 조골세포인 MC3T3-E1세포⁶⁴ (Subclone4, CRL-2593TM, ATCC[®])를 10⁵ cells/well의 농도로 분주했다. 대조군으로 같은 크기의 tissue culture plate (TCP)에 같은 농도의 세포를 분주했다. 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 다양한 시간 동안 배양했다. 배양 배지는 10% 소혈청 (FBS; Gold SerumTM, Welgene)과 100 µg/ml penicillin (Gibco), 100 ml streptomycin (Gibco)이 함유된 α - minimum essential medium (α-MEM; Fresh MediaTM, Welgene)을 사용했다. 살아있는 세포의 수를 측정하기 위해서 3 시간, 1, 3, 7 일 배양된 세포에 MTS assay (CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive cell Proliferation Assay kit, Promega)를 수행했다. 그 과정을 간략히 기술하면, 배양된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 가볍게 세척한 후 30 µl

MTS 용액이 함유된 200 μ l PBS용액을 각 well에 넣은 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1시간 방치했다. 그 후 490 nm ELISA microplate reader (Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 흡광도를 측정했고 이때 정량된 standard curve를 이용하여 측정된 흡광도를 세포수로 변환했다.

2.4.2 Alkaline Phosphatase (ALP) 활성도 평가

ALP 활성을 평가하기 위해 48 well 배양접시에 들어있는 부직포와 TCP에 MC3T3-E1세포를 10⁶ cells/well의 농도로 분주했다. 배양 배지는 10% 소혈청과 100 U/ml penicillin, 100 ml streptomycin, 100 nM dexamethasone (Sigma), 50 μ g/ml ascorbic acid (Sigma) 그리고 10 mM β -glycerol phosphate (Sigma)가 함유된 α -MEM을 사용했다. MC3T3-E1 조골세포의 분화를 평가하기 위해 7일간 배양된 세포의 ALP를 측정했다. 배양된 세포는 Hank's balanced salt solution (Cellgro[®], Mediatech)에 2회 세척 후 ALP 완충용액을 이용하여 세포를 처리했다. ALP 활성도는 p-nitrophenyl phosphate로부터 방출되는 p-nitrophenol의 양을 측정하여 계산했고 p-nitrophenol의 양은 흡광도 측정기(spectrophotometric plate reader)로 405nm의 파장에서 측정되었다. Protein content는 Bradford assay⁴⁵ (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad)를 이용하여 측정했다. ALP 활성도는 μ mol p-nitrophenol/ mg protein/ min 으로 계산했다.

2.5 골 형성능 시험

2.5.1 동물실험

골 형성능 시험은 뉴질랜드산 백색 웅성가토 (2~2.5 kg; 각 그룹 당 8 마리)를 사용했으며 케타민 (35 mg/kg)과 자일렌 (8.8 mg/kg)을 혼합 후 복강에 주입하여 마취했고 베타민으로 시술부위를 소독한 후 2% 리도카인을 이용하여 부분 마취했다. 소독된 두피의 정중선을 따라 절개한 후 골막을 박리하여 두개골을 노출시켰다. 두개골의 골 결손부는 외경 8mm의 trephine burr를 사용하여 형성했고 이때 두개골의 열 손상 방지를

위해 식염수로 충분히 관주 했다. 골 결손부에 시료를 식립 한 후 골 막과 두피를 각각 4-0 chromic gut와 3-0 silk (Ethicon) 봉합사로 봉합했다. 시료를 넣지 않은 골 결손부를 음성 대조군으로 사용했다. 이식 4주 후에 동물을 희생했고 회수된 시료는 10% 포르말린 용액에서 고정한 후 단계별 에탄올 용액으로 탈수했다. 비탈회 방식으로 Technovit 7200 (Exakt)을 이용하여 조직시료를 만들고 diamond saw (300CP, Exakt Apparatebau)를 이용하여 coronal section 방향으로 절단했다. 조직 절편은 최종 두께가 30 μm 가 되도록 연마했고 Multiple Stain (Polysciences)으로 염색한 후 광학현미경 (Eclipse 80i, Nikon)으로 관찰했다.

2.5.2 통계분석

통계 분석은 SPSS v12.0 software package (SPSS/PC)를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 통계적 유의성을 검정했으며 결과 값은 평균 (mean) \pm 편차 (standard deviation; SD)로 나타냈다. 그룹간의 유의성은 Bonferroni test 를 통해 검증했고 P value는 0.05이하 일 때 유의성이 있는 것으로 나타냈다.

2.5.3 동물실험 윤리

모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 ‘Guide for the Care and Use of Laboratory animal’ (1996, USA)에 준하여 취급했으며 동물실험은 서울대학교 수의과대학 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에서 수행했다.

3. 실험결과

Fig. 1은 각각 칼슘염의 농도가 다른 4개의 칼슘실리케이트 용액을 60°C에서 4 시간 동안 수화, 축합반응 시킨 후 용액의 점도를 측정한 결과이다. Ca/Si 값이 증가될수록 칼슘실리케이트 용액의 점도가 증가되어 SCa0.15 시료에서 가장 높은 점성을 보였다.

Fig. 2는 칼슘실리케이트 부직포의 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다. 칼슘실리케이트 섬유 직경은 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 두꺼워졌다. SCa0.00 시료가 가장 균일하고 작은 직경의 섬유로 제조되었고 SCa0.05 시료는 얇고 굵은 섬유가 불균일하게 섞여 있는 양상이었다. 그러나 SCa0.10 시료의 섬유는 SCa0.00과 SCa0.05에 비해 균일하고 약 1 mm의 큰 직경으로 이루어졌다.

Fig. 3은 칼슘실리케이트 부직포의 TF-XRD를 통한 상 분석 결과이다. 열처리된 시료는 한 개의 큰 halo 피크를 제외하고 어떠한 피크도 나타나지 않았다. 이것은 열처리 후 부직포의 표면에 어떠한 결정상도 생성되지 않았음을 나타낸다.

Fig. 4는 칼슘실리케이트 부직포의 FT-IR 흡수스펙트럼을 이용한 작용기 분석결과이다. 799 cm^{-1} , 951 cm^{-1} 에서 Si-O-Si symmetric stretching 과 Si-OH asymmetric stretching 피크가 관찰되었으며⁴⁶ 1099 cm^{-1} 에서 Si-O-Si asymmetric stretching 피크를 보였다. 또한, 1634 cm^{-1} , 3435 cm^{-1} 에서 H₂O에 해당하는 흡수 피크가 확인되었고,⁴⁶ 피크의 크기는 Ca/Si 값이 증가함에 따라 크게 나타났다. SCa0.00 그룹을 제외한 모든 시료에서 아파타이트의 핵 생성 사이트로 작용하는 실라놀 그룹의 피크가 951 cm^{-1} 에서 명확히 관찰되었다.

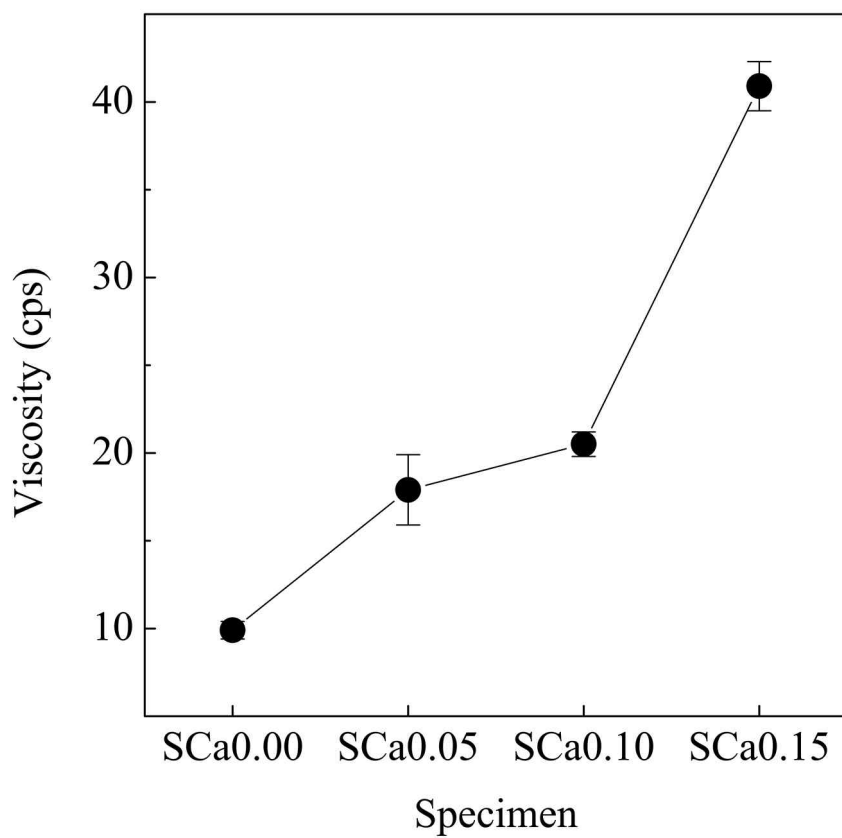


Figure 1. Viscosity of SiO₂ - CaO solutions after hydrolysis and condensation at 60°C for 4 h.

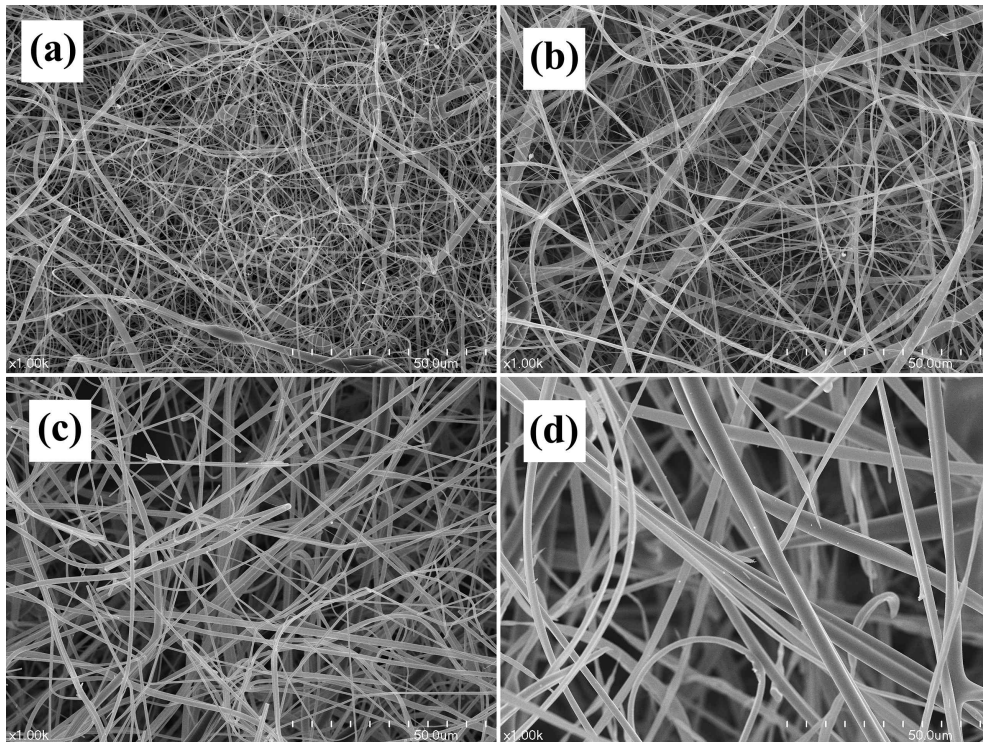


Figure 2. FE-SEM photographs of heat-treated non-woven SiO_2 -CaO fabrics with four different Ca contents; (a) Sca0.00, (b) Sca0.05, (c) Sca0.10 and (d) Sca0.15.

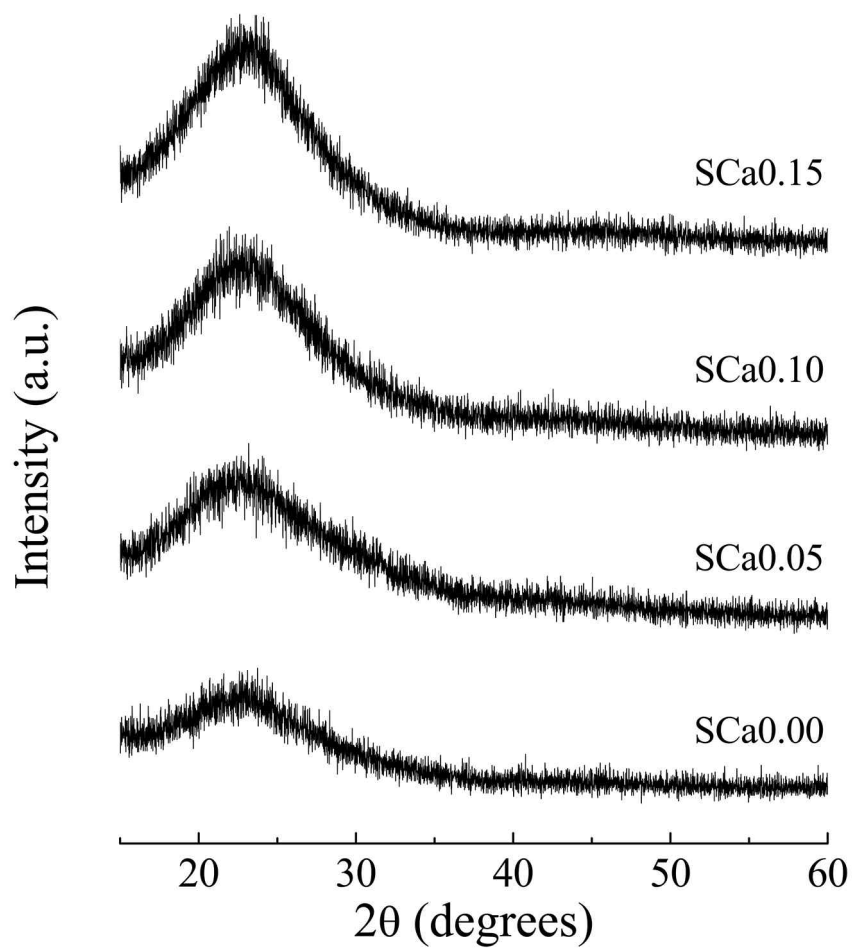


Figure 3. XRD patterns of the heat treated non-woven SiO_2 - CaO fabrics contained four different Ca contents.

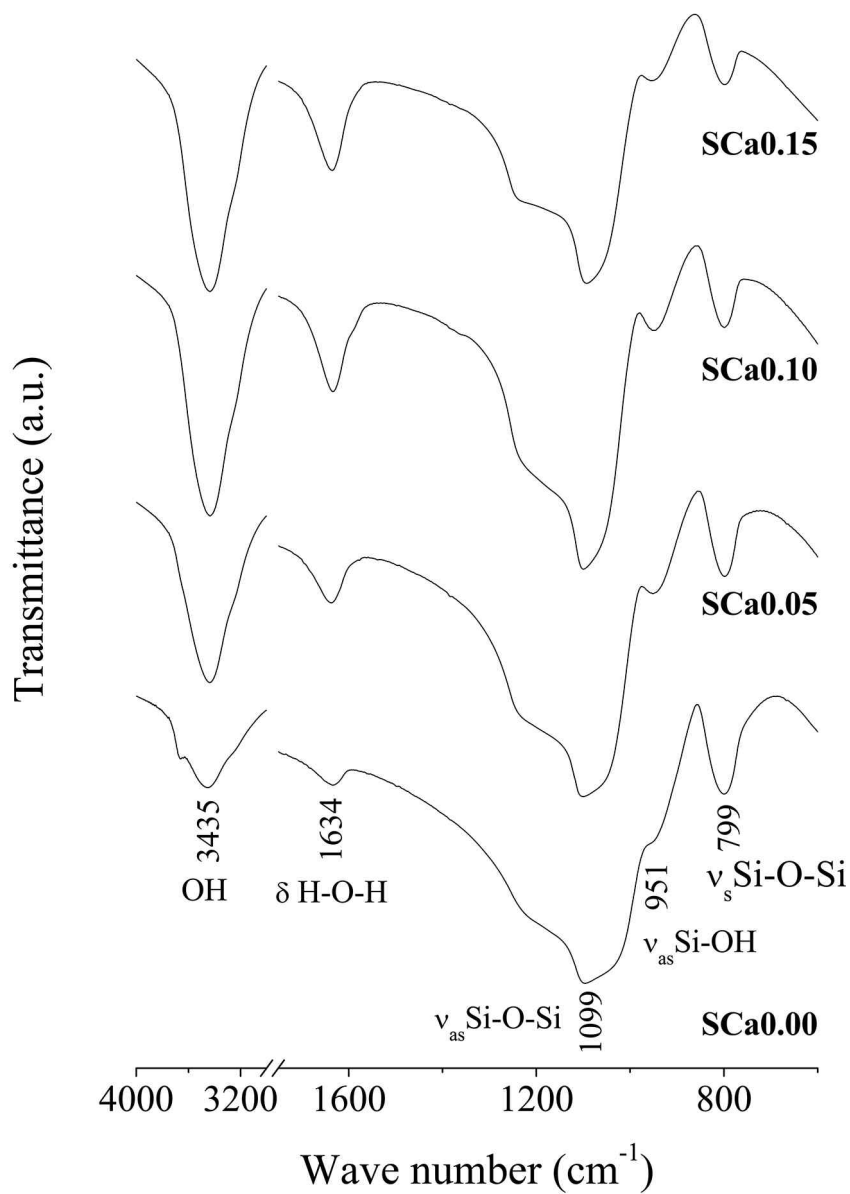


Figure 4. FT-IR spectra of the heat treated non-woven SiO₂ - CaO fabrics contained four different Ca contents.

Fig. 5는 칼슘실리케이트 부직포를 의사 체액에 7 일간 담지 후 주사 전자현미경으로 미세 구조를 관찰한 결과이다. SCa0.00를 제외한 모든 시료에서 아파타이트 결정이 섬유의 표면에 나타났으며 칼슘염의 함량이 높을수록 그 양이 많았다. 또한, 시료 SCa0.05는 아파타이트 결정이 섬유 전체를 덮지 않은 반면 SCa0.10과 SCa0.15 시료의 경우 칼슘실리케이트 섬유 전체에 아파타이트가 코팅되었다. SCa0.15 시료에서는 아파타이트 결정이 가장 많이 생성되었으나 의사체액에 내에서 많은 칼슘실리케이트 섬유가 작은 조각으로 부서진 것이 관찰되었다.

Fig. 6은 칼슘실리케이트 부직포의 의사체액 담지 7일 후 TF-XRD를 이용한 상 분석 결과이다. 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 아파타이트 결정상의 피크가 높아졌고 주사전자현미경을 통한 미세구조 결과에서도 이를 뒷받침하고 있다.

Fig. 7은 칼슘실리케이트 부직포와 TCP (대조군)위에서 배양된 MC3T3-E1 조골세포의 증식결과이다. 칼슘실리케이트 부직포에서 배양된 세포의 수는 시간이 지남에 따라 점차적인 증가를 보였으나 TCP는 매우 빠르게 증가했다. TCP 그룹은 통계적으로 유의하게 높은 세포증식 결과를 보였으나 칼슘염의 농도가 다른 칼슘실리케이트 부직포 그룹간에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

Fig. 8은 칼슘실리케이트 부직포와 TCP에서 골화 배지를 이용하여 배양된 MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성화도 결과이다. 시료 내 칼슘염의 양이 증가할수록 통계적으로 유의하게 낮은 ALP 활성도를 보였다.

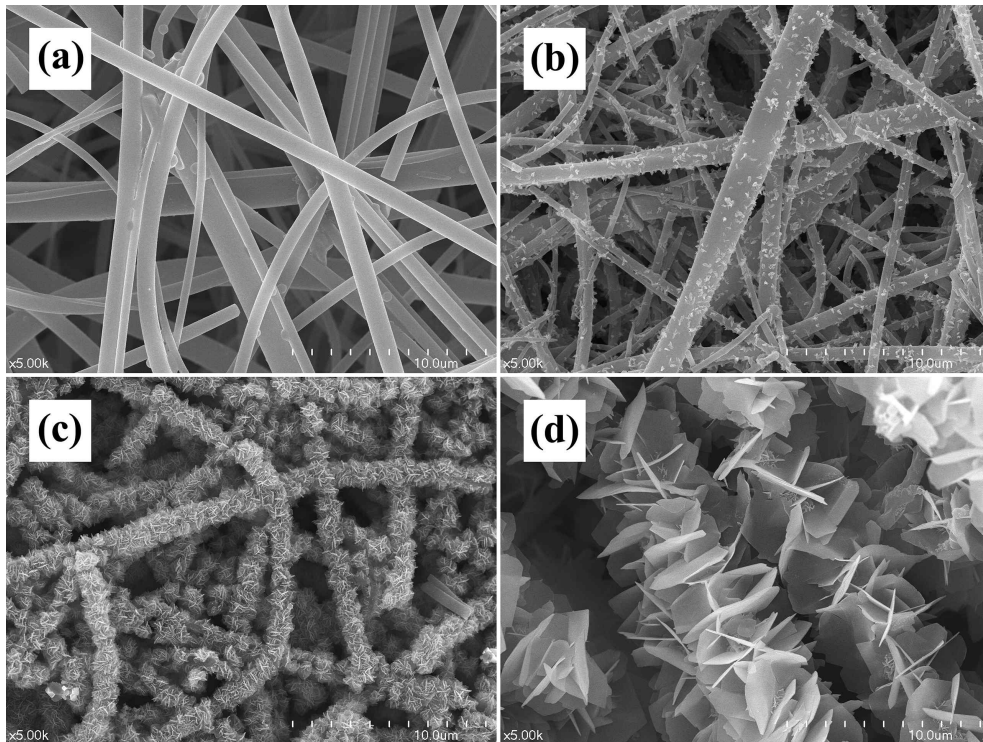


Figure 5. FE-SEM photographs of heat-treated non-woven SiO_2 -CaO fabrics soaked in SBF for 7 days; (a) SCa0.00, (b) SCa0.05, (c) SCa0.10 and (d) SCa0.15.

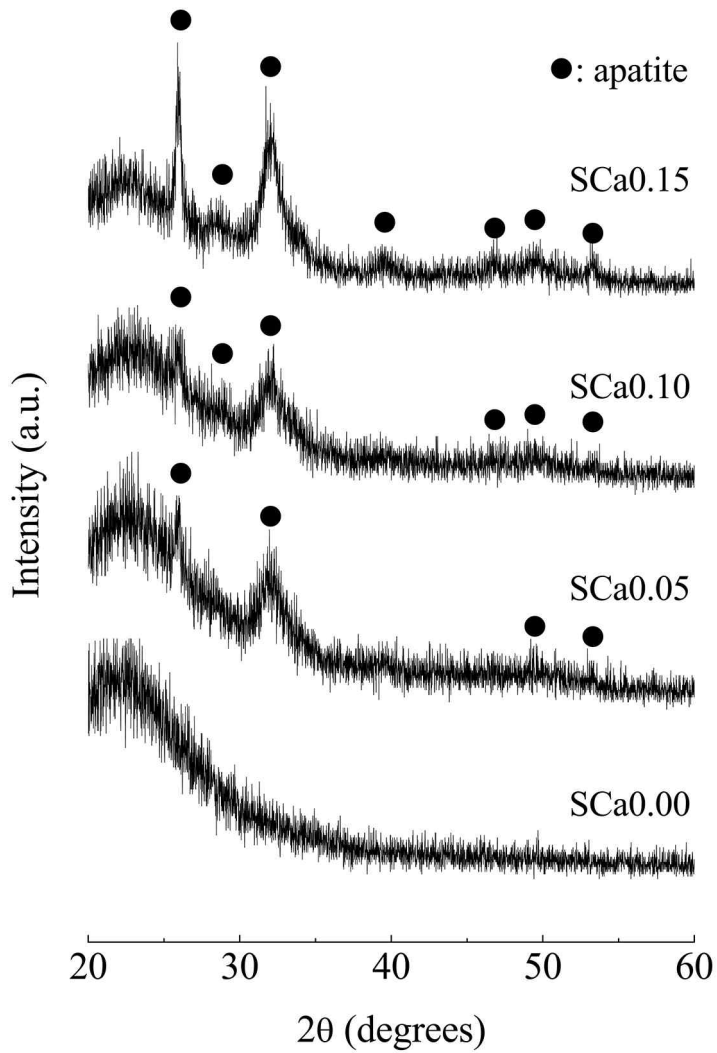


Figure 6. TF-XRD spectra of heat-treated non-woven SiO_2 - CaO fabrics soaked in SBF for 7 days.

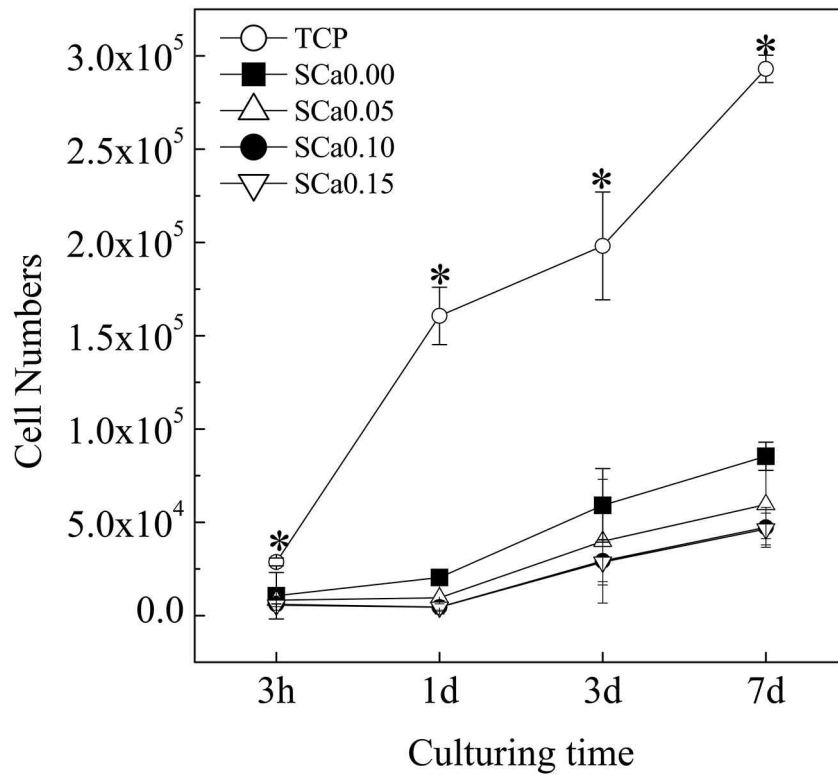


Figure 7. Proliferation of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells cultured on heat-treated non-woven SiO₂ - CaO fabrics and TCP as a control. Data are expressed as mean \pm standard deviation of five determinations. (**p* < 0.05)

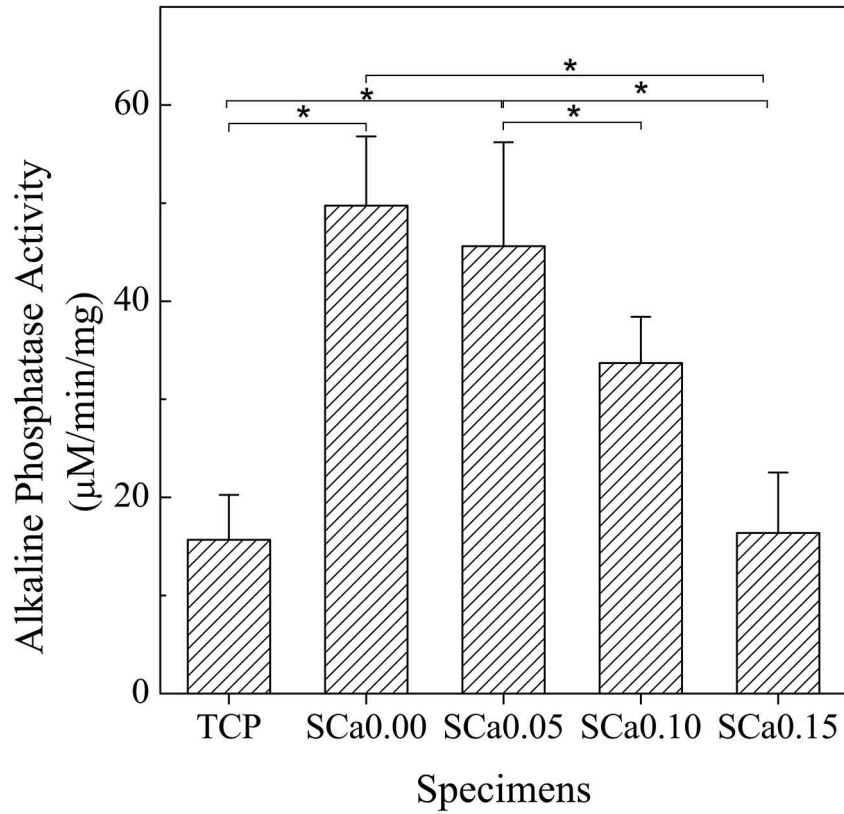


Figure 8. ALP activity of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells on heat treated non-woven SiO₂-CaO fabrics after 7 d of culture in osteogenic medium at an initial seeding density of 10⁶ cells/well. Data are expressed as mean ± standard deviation of five determinations. (**p* < 0.05)

Fig. 9와 10은 SCa0.00, SCa0.10 시료를 가토의 두개골 결손부에 4주 동안 식립 한 후 얻어진 조직을 40배 (Fig. 9)와 100배 (Fig. 10; Fig. 9의 A-C 고 배율 사진)에서 광학현미경으로 관찰한 사진이다. 식립 4주 후 시료가 없는 결손부에는 얇고 느슨한 결합조직이 채워져 있고 결손부의 가장자리와 아래 부분에서 섬 형태로 신생골이 보였다. SCa0.00을 이식한 시료에서는 골 재생이 일어나지 않고 섬유조직만이 시료 내부에서 관찰되었다. 반면에 SCa0.10을 이식한 시료에서는 결손부위 전체에 골 재생이 나타났으며 혈관조직을 함유한 신생골 생성과 lacunae (골소강)이 관찰되는 것으로 미루어 볼 때 osteocyte-like cell이 생성되었음을 알 수 있다.

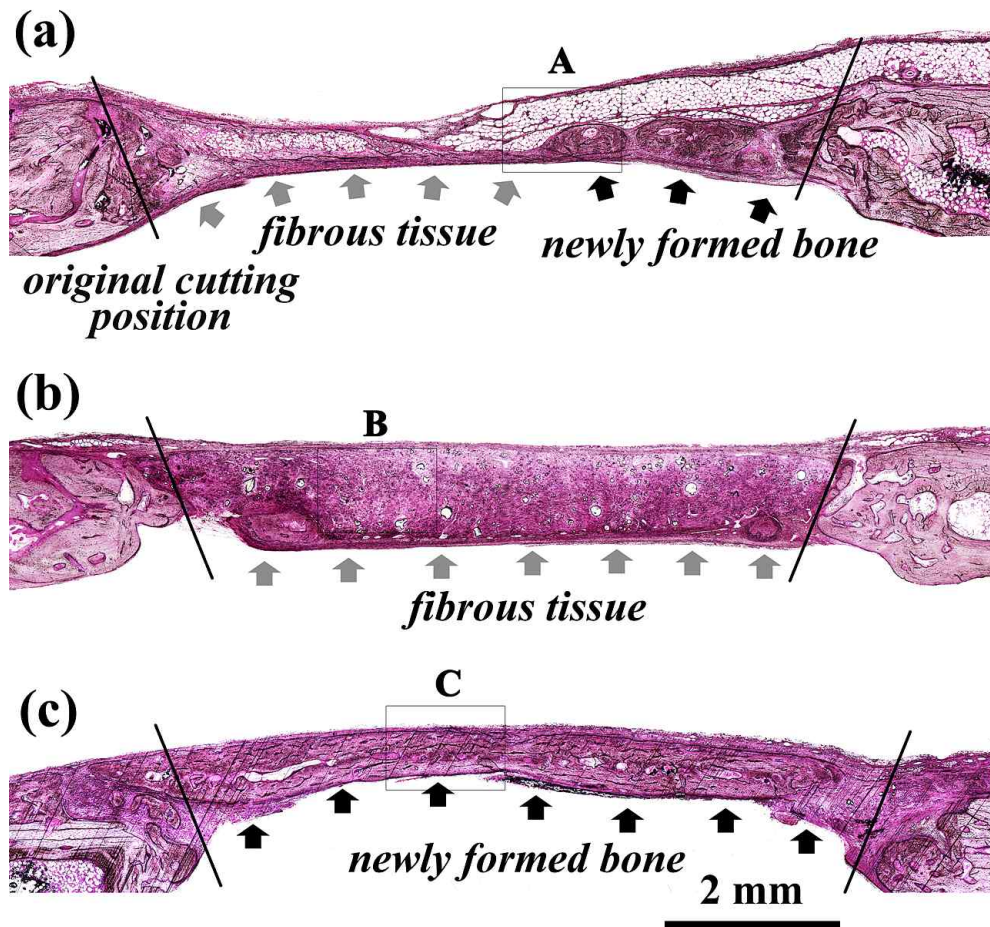


Figure 9. Optical micrographs of (a) negative control, (b) bone defect filled with specimen SCa0.00, and (c) with specimen SCa0.10 (original magnification 340) 4 weeks after implantation into rabbit calvarial defects: Bone margins are indicated by black lines. Newly formed bone and fibrous tissue are indicated with black and gray arrows, respectively.

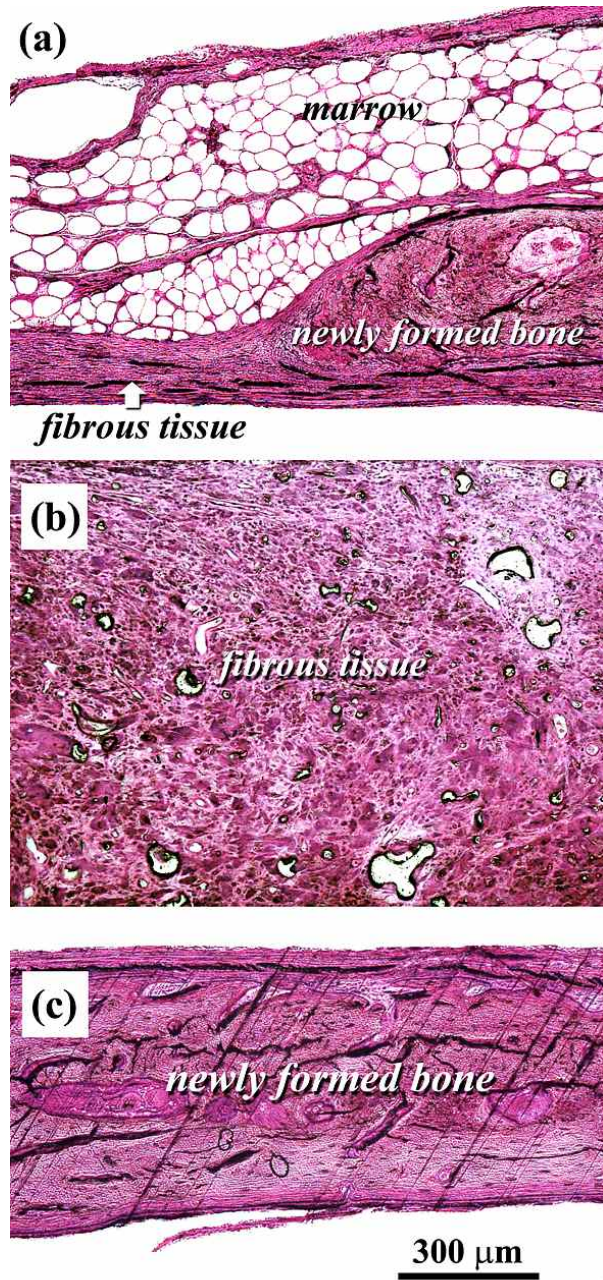


Figure 10. Detailed microstructure of Fig. 9.

4. 고찰

실리카 기반의 세라믹 재료는 탁월한 골 전도성으로 인해 골 충전재로서 광범위하게 연구되어 왔으나 높은 취성과 낮은 성형성, 3차원 상호 연결된 기공의 제조가 어려워 임상에서의 활용이 제한되어왔다. 따라서 연성과 인성의 특성을 가진 고분자를 결합하여 실리카 유리의 물성을 보완한 세라믹/고분자 복합체가 대두되었으나^{14-16,67-69} 여전히 3차원 연결기공의 구현은 어려웠다.

전기방사법은 초기 공정재료에 제한이 있으나 세라믹에서 3차원 연결기공을 구현할 수 있는 좋은 방법이다. Tetraethyl orthosilicate는 실리카의 전구체로써 가장 많이 사용되고 있으며 이를 이용하여 전기방사법으로 실리카 부직포를 성공적으로 제조할 수 있었다.^{44,47,48,58-60,63} 그러나 높은 온도에서 열처리된 순수한 실리카 부직포는 표면의 실라놀 그룹이 열처리 과정 동안 축합 반응으로 인해 실록산 그룹으로 변하기 때문에 의사체액 내에서 아파타이트 결정의 핵 생성과 성장능력을 잃어버린다.^{12,51,58,70} 그러나 졸-겔 방법으로 칼슘염이 함유된 실리카 전구체를 이용하면 실리카 부직포의 아파타이트 생성 능력을 유지할 수 있다. 왜냐하면 열처리 후에 칼슘 이온이 칼슘실리케이트에서 방출되면서 의사체액 또는 체액 내 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시키고^{60,70,71} 이는 아파타이트의 핵 생성을 활성화시키기 때문이다. 전기방사 후 열처리된 실리카 부직포는 의사체액 내에서 낮은 아파타이트 형성능을 보였으나⁵⁸ 칼슘염이 함유된 실리카 부직포는 아파타이트 형성능을 통계적으로 유의하게 높은 수준으로 향상시킨 결과가 이를 뒷받침한다.⁶⁰

본 연구에서는 첫째로 칼슘염 함량이 아파타이트의 생성과 조골세포의 반응에 미치는 영향을 평가했고 둘째로 세포실험에서 평가된 칼슘실리케이트 부직포 중 2개를 선정하여 (SCa0.00과 SCa0.10) 동물실험을 통해 골 전도성을 평가했다.

실리카 전구체에 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 전기 방사된 칼슘실리케이트 섬유는 열처리 전, 후 모두 상변화 없이 증가되었다 (Fig.2, 3). 이것은 전기방사법으로 제조된 많은 다른 고분자 시스템과 마찬가지로 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 초기 방사용액인 칼슘실리케이트 용액의 점도가 증가하였기 때문일 것으로 생각된다 (Fig.1).^{18,72,73}

아파타이트의 핵 생성 사이트로 알려진 실라놀 그룹은 칼슘이온이 없을 경우 (Fig. 4) 실리카 블록에 사용되는 온도보다 낮은 온도인 300°C에서 거의 사라지는데 이는 블록과 부직포의 비표면적이 다르기 때문에 나타나는 차이로 생각된다.¹² 왜냐하면 실리카 부직포는 실리카 블록보다 훨씬 많은 비표면적으로 가지고 있기 때문에 칼슘실리케이트 부직포의 표면에 있는 실라놀 그룹의 축합 반응이 가속화되었을 것이다. 한편 칼슘염이 첨가되었을 경우 (Fig. 4) 실라놀 그룹은 열처리 후에도 표면에 유지되는데 이는 양극성의 칼슘이온이 더해졌을 때 전하 보상 기전에 의한 비 가교 산소의 형성 때문인 것으로 생각된다.^{54,74} 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 흡수된 물의 양이 증가한 것 또한 친수성의 실라놀 그룹이 표면에 형성된 것을 나타낸다 (Fig. 4).

열처리된 칼슘실리케이트 부직포를 의사체액에 7일간 담지 했을 때 SCa0.00 시료를 제외한 모든 시료에서 섬유의 표면에 저 결정성 아파타이트가 생성되었다 (Fig. 5, 6). 시료 SCa0.00에서 아파타이트 결정의 부재는 열처리 시 표면에 있는 실라놀 그룹을 잃었기 때문일 것으로 생각된다. 한편, 칼슘염 함량이 증가될수록 아파타이트 결정의 양은 증가되는데 이는 칼슘이온이 방출되면서 그 자신이 의사체액 내의 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시키기 때문인 것으로 추측된다.^{10,67} 그러나 SCa0.15 시료는 의사체액 내에 담지 하는 동안 칼슘실리케이트 섬유 자체가 부스러짐을 보였는데 이는 섬유에 함유되어 있던 많은 양의 칼슘이온이 방출됨으로써 칼슘실리케이트 겔 네트워크의 분해를 가속화 시켰으며 칼슘실리케이트 부직포의 넓은 표면적 또한 이에 주요한 역할을 했을 것으로 생각된다. 이미 실리카 기반의 bioactive glass가 인체 내에서

천천히 분해되고 분해된 실리콘은 소변을 통해 액체 상태로 몸 밖으로 배출된다고 알려져 있기 때문에⁷⁵ 칼슘염을 함유한 칼슘실리케이트 부직포도 인체 내에서 분해되며 미세구조의 관찰 결과를 통해 그 분해시간은 예상한 것보다 빠르게 일어날 것으로 추측된다. 그러나 칼슘실리케이트 부직포의 정확한 분해특성은 더 많은 연구가 필요하다.

칼슘실리케이트 부직포에 배양된 MC3T3-E1 조골세포의 증식은 TCP보다 낮은 값을 보였다. 부직포는 3차원 구조로 무질서하게 배열된 칼슘실리케이트 섬유가 부직포 내부에 큰 공간을 만들게 되는데 이는 세포의 이동에는 필수적이거나 세포의 부착과 성장, 공간을 채우는 것이 어려워 *in vitro*에서 증식을 지연시키는 역할을 하기도 한다.⁷⁶

반면, 칼슘실리케이트 부직포 간의 세포증식은 유사한 경향을 보였다 (통계학적 유의성 없음). 그러나 SCa0.00과 SCa0.15는 각각 가장 높은 값과 낮은 값을 각각 보였는데 이것은 섬유의 표면안정성으로부터 기인한 결과로 생각된다. 즉 아파타이트의 핵 생성과 성장이 일어날 때 칼슘실리케이트 섬유의 표면에 초기 부착된 세포들은 아파타이트 결정이 생성되면서 떨어지게 되고 증식은 지연된다.⁷⁷ 시료 SCa0.15에서 섬유의 분해 작용 또한 세포의 증식을 늦추는 역할을 할 것이다. 그러므로 세포의 증식과 분화는 시료 SCa0.15에서 가장 낮고 SCa0.00에서 가장 높은 결과를 보여주었다.

시료 SCa0.00, SCa0.05, SCa0.10의 ALP 활성이 TCP보다 높은 것은 특수한 부직포 구조에 기인한 것으로 생각된다.⁷⁸ 우리의 이전 연구에서 보여주듯이 길고 좁은 실리카 섬유가 조골세포의 표현형에 영향을 주었고 ERK 경로를 통해 TCP 그룹보다 더 빠르게 골세포 신호를 전달하였으며 뼈를 형성하는 주요한 전사활성인자인 Runx2를 효율적으로 자극시켰다.⁷⁹

동물실험을 위해 시료 SCa0.00과 SCa0.10이 선택되었는데 이는 의사체액 내에서 섬유의 분해를 보이지 않고 아파타이트 형성능이 가장 낮은 군과 높은 군일뿐만 아니라 조골세포를 통한 증식과 분화의 평가에서 평

균적인 결과 값을 보인 시료이기 때문이다.

가토의 두개골 결손부에 4주간 시료를 식립한 결과 시료 SCa0.10은 골 재생이 결손부 전체와 시료의 내부에 나타났으나 (Fig. 9c와 10c) 대조군(결손부)과 시료 SCa0.00에서는 얇고 느슨한 결합조직만이 생성되었다 (Fig. 9, 10). 실제로 대조군에서 신생골은 결손부의 가장자리와 아래쪽에 섬의 형태로 나타났으며 시료 SCa0.00에서는 단지 느슨한 조직화된 결합조직만 시료안쪽으로 침투되었음을 확인했다. 이것은 시료 SCa0.10이 좋은 골 전도성을 가지고 있다는 것을 보여준다.

이러한 결과로부터 전기방사법으로 제조된 칼슘실리케이트 부직포가 의사체액 내에서 우수한 아파타이트 형성능 뿐만 아니라 좋은 조골세포 반응성과 골 전도성을 가진다고 할 수 있다. 더 나아가 이러한 결과는 생체활성을 가진 칼슘실리케이트 부직포가 골 충전재료써의 큰 가능성을 가지고 있음을 보여준다.

5. 결론

본 연구는 칼슘실리케이트 부직포에 함유된 칼슘염의 양이 부직포의 특성에 미치는 영향을 연구를 통해 골 충전재로써의 응용 가능성을 평가했다. 의사체액을 통해 아파타이트 형성능을 평가하고 세포실험을 통해 조골 세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 평가했다. 또한, 가토 두개골 결손부 모델을 이용한 동물실험을 통해 시료의 골 전도성을 평가했다. 칼슘염의 함량이 증가함에 따라 섬유질 직경과 아파타이트 형성능이 증가했고 반면에 조골세포의 세포반응은 지연되었다. 시료에서 선택된 2개의 군 (SCa0.00과 SCa0.10)과 결손부 (defect)를 이용하여 진행된 동물실험에서는 SCa0.10 시료가 가장 우수한 골 전도성을 보여주었다. 이로써 생체활성과 생체적합성을 가진 칼슘실리케이트 부직포는 골 충전재로 응용 가능성이 높은 것으로 생각된다.

IV. 전기방사를 이용한 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 제조 및 골 전도도 평가

1. 서론

최근 고분자나 세라믹 재료를 이용한 3차원 연결 기공구조의 지지체를 쉽게 제조할 수 있는 방법으로 전기방사법이 각광받고 있다. 실제로 많은 전기방사로 제조된 생분해성 고분자 부직포가 조직 공학적 지지체로서의 응용 가능성을 평가받고 있다.^{19,23,35-37} 왜냐하면 그들은 세포외기질과 유사한 구조일 뿐만 아니라 높은 단위 체적당 면적율, 높은 공극률, 적절한 물리학적 분해특성,⁴⁴ 표면 개질의 가능성,^{45,46} 약물이나 유전자 전달을 위한 유연성^{47,48} 등의 장점을 가지고 있기 때문이다. 더 나아가 전기 방사된 생분해성 고분자 부직포는 고휘주입 형성법으로 제조된 고분자 필름에 비해 세포의 부착 및 증식 그리고 분화에 탁월함을 보이고 있다.^{35,55,56} 그러므로 생체활성을 가진 세라믹 부직포가 전기방사법에 의해 제조되었을 때 이는 골 충전재나 골 조직 재생 분야에 새로운 재료의 접근일 뿐만 아니라 지지체의 관점에서 유용할 것이다.

세라믹 재료의 적용이 유용함에도 불구하고 전기방사법으로 세라믹 부직포의 제조가 어려운 이유는 전기방사를 위해 요구되는 방사액의 점도를 구현할 수 있는 세라믹 재료가 제한적이기 때문이다. 이러한 적합한 유동학적 특성을 얻기 위해서는 2가지 접근이 가능하다.

첫 번째는 세라믹 분말과 높은 점성의 고분자 용액을 혼합하는 방법이 고^{21,22,24,61,62} 두 번째는 졸 겔 과정을 이용하여 직접적으로 점성을 가진 세라믹 겔 용액을 제조하는 금속 알콕사이드법을 이용하는 것이다.^{78,80} 세라믹과 고분자 혼합시스템을 이용하는 첫 번째 공정의 장점은 전기방

사에 필요한 충분한 시간을 확보할 수 있다는 것이다. 그러나 그것은 치밀하고 단단한 세라믹 섬유를 제조하기에는 어려움이 있는데 그 이유는 적절한 점도를 얻기 위해 사용된 고분자가 세라믹 섬유 내에 포함되어 있기 때문에 열처리 과정을 통해서 이 고분자를 제거해야 되기 때문이다.

두 번째 금속 알콕사이드법을 이용한 공정은 치밀하고 단단한 세라믹 섬유를 쉽게 제조할 수 있을 뿐만 아니라 고분자/세라믹 혼합시스템에 비해 열처리 후 낮은 수축성을 보인다. 그러나 이것 또한 전기방사를 위한 충분한 방사시간을 얻기 힘들다는 단점이 있다. 왜냐하면 초기 세라믹 용액의 겔화가 시작되면 겔 용액의 점도가 기하급수적으로 증가하기 때문이다. 그러나 이러한 공정방법에 관계없이 모든 세라믹 섬유는 좋은 골세포 반응과^{62,78,80} 골 전도성을^{78,80} 가지고 있지만 쉽게 깨지는 세라믹 부직포의 성질은 여전히 임상에 적용하기에 어려움이 있다. 따라서 이러한 세라믹 고유특성의 손실 없이 파괴인성을 향상시키기 위해서 질긴 인성을 가진 고분자를 혼합하여 사용해왔다.

전기방사법을 이용하여 고분자/세라믹 복합형 부직포를 제조하기 위한 방법은 2가지가 있다. 그 첫 번째는 고분자/세라믹 혼합 시스템을 이용하여 제조된 세라믹 부직포의 빈 공간 안에 또 다른 고분자 용액을 부어서 복합체를 만드는 방법이다.⁶² 그러나 이 방법은 세라믹과 고분자가 무작위로 혼합된 복합체 부직포를 제조하는데 제한적이다. 왜냐하면 전기방사를 이용한 세라믹 섬유 제조 시 적절한 점성을 얻기 위해 사용된 고분자는 열처리 과정에 의해 제거되기 때문에 이후에 혼합된 고분자 용액이 균일하게 분포되기 어렵다. 이러한 복잡한 방법을 통해 세라믹 고분자 복합체는 제조할 수 있으나 그것은 부직포의 가장 큰 장점인 3차원 연결 기공구조와 큰 표면적을 재현하는데 한계가 있다. 게다가 소결된 강하고 단단한 세라믹 섬유가 인체 내에서 작은 조각으로 깨어질 경우 휘스커와 유사한 구조를 보임으로써 발암물질로 생성될 가능성이 있다.⁸¹⁻⁸⁵

고분자/세라믹 복합형 부직포를 직접적으로 생산하기 위한 두 번째 방법은 세라믹 분말과 고분자 용액을 이용하는 것이다.⁸⁶⁻⁸⁹ 이 방법의 장점은 전기 방사 시 필요한 시간을 증대시킬 수 있고 전기방사 섬유의 파괴인성을 향상시킬 수 있다. 그러나 이 방법도 생체활성 세라믹 분말과 고분자가 혼합될 때 고분자 매트릭스 내에 세라믹 분말이 골고루 혼합되지 않는 단점이 있다. 세라믹 분말의 함량이 증가될수록 세라믹 분말을 복합체의 표면에 노출시키는 것은 어려운데 이는 두 상 사이에 다른 젖음성 때문이다. 실제로 이축 스크롤 압출법과 전기방사로 제조된 삼인산칼슘(β -TCP)/폴리카프로락톤(PCL) 부직포의 접촉각을 측정한 결과 약 120° 로⁸⁹ 섬유의 표면이 고분자 상으로 이루어져 있음을 나타낸다. 그러므로 *in vivo* 상에서 작게 부서져 휘스커를 생산할 수 있는 소결된 세라믹 섬유의 함유가 없고 섬유의 표면에 생체활성 세라믹 상이 노출되면서 다른 특성은 유지되는 새로운 부직포의 디자인이 요구된다.

주목할 만 하게도 실리카 섬유를 이용한 금속 알콕사이드법은 이러한 요구를 충족하면서 부직포를 제조할 수 있는 좋은 방법이다. 왜냐하면 전기방사 시 요구되는 점도의 생성을 위해 고분자를 사용하지 않으므로 부직포 제조 후 열처리과정이 필요 없으며 열처리되지 않은 생체활성 실리카 섬유가 *in vivo*에서 빠르게 분해되면 실라놀 그룹을 가지고 있는 실리케이트 이온이 주변 고분자 섬유의 표면에서 아파타이트 결정의 생성을 위한 핵생성 사이트로의 역할을 할 수 있기 때문이다.^{17,90,91} 그러나 이러한 세라믹 섬유는 그들 자신만으로는 기계적 물성 유지가 어려운 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 동시 전기방사법을 이용하여 고분자/세라믹 복합형 부직포를 제조했다. 고분자/세라믹 부직포는 나노크기의 생체활성과 빠른 분해를 보이는 칼슘실리케이트 섬유와 마이크로 크기의 생분해성 폴리카프로락톤 섬유를 동시에 방사하여 제조했다.

마이크로 크기의 폴리카프로락톤 섬유는 생분해성을 가지고 있으나 실질적인 분해는 1년 이상 걸리기 때문에⁹² 골 재생을 위한 안정된 공간의 확보와 물리학적 특성을 유지할 뿐만 아니라 아파타이트 결정이 표면에

코팅된 이후에는 골 전도성 지지체로서의 실질적인 역할을 할 것으로 가정했다. 반면 나노 크기의 빠른 분해특성을 가진 칼슘실리케이트 섬유는 생체 내에서 아파타이트 형성능을 부여하여 복합체 부직포의 골 전도성을 생성시킬 것으로 가정했다.

2. 실험방법

2.1 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 부직포의 제조

전기방사를 통한 고분자 부직포의 제조를 위해 폴리카프로락톤(PCL; Mw 80,000, Aldrich)을 17vol%의 농도로 1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Acros) 용매에 녹여 고분자 용액을 제조했다. 세라믹 부직포는 칼슘실리케이트 용액을 이용하여 제조되었고 이때 이용된 세라믹 겔은 tetraethyl Orthosilicate (TEOS), 물, 에탄올, 이수화물 염화칼슘 그리고 염산을 80°C에서 20 시간 동안 축합 반응시킨 후 약 60°C, 9 kPa의 압력 내에서 2 시간 동안 수화시켜 제조했다. 이때 이수화물 염화칼슘과 물, 에탄올, 염산은 si를 기준으로 0.1: 2: 1: 0.02의 몰 비율로 혼합하여 겔 용액을 제조했다. 폴리카프로락톤 용액과 칼슘실리케이트 용액을 16-gauge의 스테인리스 스틸 바늘이 연결된 2개의 다른 플라스틱 주사기에 넣고 전압기와 연결했다. 원기둥 형태의 집진기는 알루미늄 호일로 감싸고 집진기와 주사기 사이의 거리는 10 cm를 유지했다. 폴리카프로락톤과 칼슘실리케이트 용액은 실린지 펌프를 통해 각각 7.5 ml/h와 5 ml/h의 속도로 서로 평행한 위치에서 동시 방사되었고 이때 집진기와 주사기 사이에 각각 10, 20 kV의 높은 전압을 걸어주었다. 대조군으로 폴리카프로락톤과 칼슘실리케이트 부직포도 각각 동일한 조건으로 전기 방사하여 제조했다. 제조된 부직포는 24 시간 동안 상온에서 건조했고 폴리카프로락톤 부직포와 칼슘실리케이트 부직포 그리고 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 부직포는 각각 시료 P, 시료 S, 그리고 시료 PS로 명명했다.

2.2 생체활성 시험

3가지 다른 부직포의 생체활성은 의사체액 (SBF) 내에서 생성되는 아파타이트 형성능으로 평가했다.⁹³ 의사체액은 NaCl, NaHCO₃, KCl,

$K_2HPO_3 \cdot 3H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$, $NaSO_4$ 를 $Na^+142.0$, $K^+5.0$, $Mg^{2+}1.5$, $Ca^{2+}2.5$, $Cl^-147.8$, $HCO_3^-4.2$, $HPO_4^{2-}1.0$, $SO_4^{2-}0.5$ mM의 농도로 증류수에 용해시켜 제조했으며 tris-buffer 용액 [Tris(Hydroxymethyl)aminomethane, $H_2NC(CH_2OH)_3$]과 1N의 염산용액을 가하여 36.5°C에서 pH 7.4로 맞춘 후 필터 (Millipore, 0.22 μ m)를 이용하여 멸균했다.

부직포는 12 mm 직경, 0.1 mm 두께의 디스크 형태로 잘라 자외선 멸균기 내에서 30분간 멸균했고 제조된 30 ml의 의사체액에 담지 하여 36.5°C에서 일주일간 보관했다. 일주일 후 의사체액에서 꺼낸 시료를 증류수로 세척하고 상온에서 건조한 후 아파타이트의 생성을 관찰했다.

2.3 특성 분석

각 시료의 미세구조는 전계방사형 주사전자현미경 (FE-SEM; S-4700, Hitachi)을 이용하여 관찰했고 섬유직경 분석을 위해 image analyzer (Image J, NIH)를 사용하여 시료 당 500개 이상의 섬유를 측정 한 후 섬유직경에 따른 빈도수로 나타냈다. 이때 섬유의 직경은 가장 짧은 대각선의 길이로 정의하여 측정했다.

각 시료의 기공크기와 기공율은 3.5 kPa의 압력으로 수은을 시료에 채워 측정하는 수은 침투법 (Autopore IV 9500, Micromeritics)을 이용했다. 각 그룹 당 5개의 시료를 측정 한 후 그 값을 평균과 표준편차로 나타냈다.

각 부직포의 작용기 분석은 적외선 분광광도계 (FT-IR; Spectrum One, Perkin Elmer)를 이용했고 4 cm^{-1} 의 분해능으로 시료를 128회 스캔하여 얻어진 누적 값으로 나타냈다. 시료는 미분상태의 시료와 시료대비 200 배 무게의 KBr 파우더를 혼합하여 제작한 후 측정했으며 background 노이즈는 순수한 KBr 파우더만 측정한 값으로 보정했다.

부직포에 생성된 결정상은 의사체액 담지 전후의 시료를 이용하여 X-선 회절분광장치 (Thin Film-XRD; D8 discover, Bruker)를 이용하여 측정했다.

각 부직포의 열분해 특성은 thermo-gravimetric analyzer (TGA; TGA Q500, TA Instrument)을 이용하여 측정되었다. TGA 분석은 air flowing 100 cm³/min의 조건아래에서 25°C~900°C까지 10°C/min의 속도로 승온하면서 측정했다. 시료에 함유된 칼슘실리케이트의 상대적인 양은 TGA 측정 후에 시료 P와 S 그리고 PS의 잔량을 기초로 하여 계산되었다.

시료의 용해 특성을 측정하기 위해 시간 별로 의사체액 내 녹아난 칼슘, 인, 실리콘 이온의 원자학적 농도를 inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES; Optima-4300 DV, Perkin Elmer)를 이용하여 측정했다.

시료의 담지 시간에 따른 의사체액의 pH는 pH미터 (DK-20, Horiba)를 이용하여 각 시간마다 5개의 시료를 측정했고 그 값을 평균과 표준편차를 이용하여 나타냈다.

시료 S와 PS에 있는 칼슘실리케이트 함유의 분해를 관찰하기 위해 각각 36.5°C의 phosphate-buffered Saline (PBS)와 의사체액에 담지 했다. 담지 시간에 따른 시료의 미세구조를 FE-SEM으로 관찰했고 각 시료당 적어도 30개의 함유를 관찰, 분석했다.

각 부직포의 인장강도는 general purpose-testing machine (LF plus 1 kN, LLOYD Instruments)을 이용하여 23°C, 50 % 습도의 조건에서 측정되었다. 가로 60 mm, 세로 10 mm, 두께 0.1 mm로 직사각형 형태의 부직포 시료를 그룹별로 7개씩 준비했고 시료가 파단 될 때까지 인장했다. 이때 gauge length는 35 mm, cross-head speed는 5 mm/min으로 시험했다. 영률은 stress-strain 곡선의 초기 직선탄성구간의 기울기로 계산했다.

2.4 골전도성 시험

2.4.1 동물실험

골 전도성 시험은 뉴질랜드산 백색 웅성가토 (2~2.5 kg; 각 그룹 당 8마리)를 사용했으며 모든 동물은 각각 다른 cage에 사육되었고 건조한 먹이와 물을 자의 섭식했다. 복강을 통해 케타민과 럼푼 (ketamine; 7.5 mg/kg, Yuhan and rompun; 3.5 mg/kg, Bayer Korea)으로 마취했고 2% 리도카인 (2% lidocaine with 1:100,000 epinephrine)으로 시술부위를 부분 마취했다. 시술부위를 제모, iodine과 5% chlorhexidine digluconate로 소독하고 두피의 정중선을 따라 비 전도골의 중앙으로부터 외후두 돌기까지 절개한 후, 골 막을 박리하여 두개골을 노출시켰다. 두개골은 직경 6 mm trephine burr (3i-Implant Innovations)를 사용하여 골 결손부를 형성했고 이때 두개골의 열 손상을 방지하기 위해 식염수로 충분히 관주했다. 3개의 다른 종류의 시료를 골 결손부에 식립 한 후 골 막과 두피를 각각 4-0 chromic gut (Ethicon) 봉합사로 봉합했다. 시술 후 항생제를 3일간 근육주사로 투여했다.

이식 2주, 4주후에 동물을 희생했고 회수된 시료는 10% 포르말린 용액에서 고정한 후 단계별 에탄올 용액으로 탈수했다. 낮은 점도의 embedding 용액을 이용하여 비 탈회 방식으로 Technovit 7200 (Exakt)을 이용하여 조직시료를 만들고 coronal section 방향으로 diamond saw (300CP, Exakt Apparatebau)를 이용하여 잘랐다. 최종 시료의 두께가 40 μ m가 되도록 표본을 연마 (400CS, Exakt Apparatebau)한 후 Multiple Stain (Polysciences)으로 염색하여 광학현미경 (Eclipse 80i, Nikon)을 이용하여 시료를 관찰했다.

신생골 면적을 측정하기 위해 컴퓨터를 통한 자동이미지 분석시스템 (Image analysis software Package; Tomoro Scope Eye 3.6, Techsan)으로 조직형태학적 측정을 시행했다. 이때 신생골은 기존의 결손부와 염색 후 채도, 골세포와 matrix의 다른 형태 등 조직학적 특성에 기초하여 구별된다. 이미지 분석 프로그램을 통해 신생골이 형성된 영역을 각각

지정하여 전체 결손 면적 대비 백분율로 계산했다.

2.4.2 통계분석

통계 분석은 SPSS v12.0 software package (SPSS/PC)를 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)으로 통계적 유의성을 검정했으며 결과 값은 평균(mean)±편차(standard deviation; SD)로 나타냈다. 그룹간의 유의성은 *Tukey's post hoc test*를 통해 검증되었고 *P* 값은 0.05 이하 일 때 유의성이 있는 것으로 나타냈다.

2.4.3 동물실험 윤리

모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 'Guide for the Care and Use of Laboratory animal' (1996, USA)에 준하여 취급했으며 동물실험은 서울대학교 수의과대학 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에서 수행했다.

3. 실험결과

Fig. 11은 전기 방사된 부직포의 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 사진이며 ((a) 폴리카프로락톤 부직포 (시료 P), (b) 칼슘실리케이트 부직포 (시료 S), (c) 폴리카프로락톤/칼슘실리케이트 복합형 부직포 (시료 PS)), Fig. 12는 각 부직포 섬유 직경을 상대분포로 나타낸 결과이다. 시료 S에서 칼슘실리케이트 섬유의 직경은 0.2 에서 2.2 μm 사이의 분포를 보였고 평균 0.6 μm 로 측정되었다. 폴리카프로락톤 섬유의 직경은 1.4 에서 6.5 μm 사이의 분포를 보였으며 평균은 2.4 μm 였다. 시료 PS에서 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤 섬유의 직경은 0.5~4.0 μm 이고 평균 1.8 μm 의 직경을 가진다. 반면에 시료 P, S, PS의 기공율은 각각 약 $92.7 \pm 0.2 \%$, $92.4 \pm 0.3 \%$, $89.6 \pm 0.4 \%$ 를 보였다. 시료 PS에서의 섬유는 얇은 칼슘실리케이트와 굵은 폴리카프로락톤 섬유가 무질서하게 무작위로 섞여 있었다. 이때 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤 섬유는 energy-dispersive spectroscopy (EDS) 분석을 통해 실리콘의 유무로 구별했고 TGA를 이용한 열분해 분석을 통해 시료 PS에서 칼슘실리케이트 섬유가 약 $31 \pm 4 \text{ wt}\%$ 함유된 것을 확인했다.

Fig. 13는 시료 P, S, PS의 TF-XRD를 통한 상 분석 결과를 보여준다. 시료 S에서는 어떠한 특별한 결정상도 관찰되지 않은 반면 시료 P와 PS에서 폴리카프로락톤 피크가 관찰되었는데 이는 폴리카프로락톤이 반 결정질 구조이기 때문이다. 특히 21.5° , 22.1° 그리고 23.8° 에서 각각 폴리카프로락톤의 [100], [111], [200] 면이 관찰되었다.^{94,95}

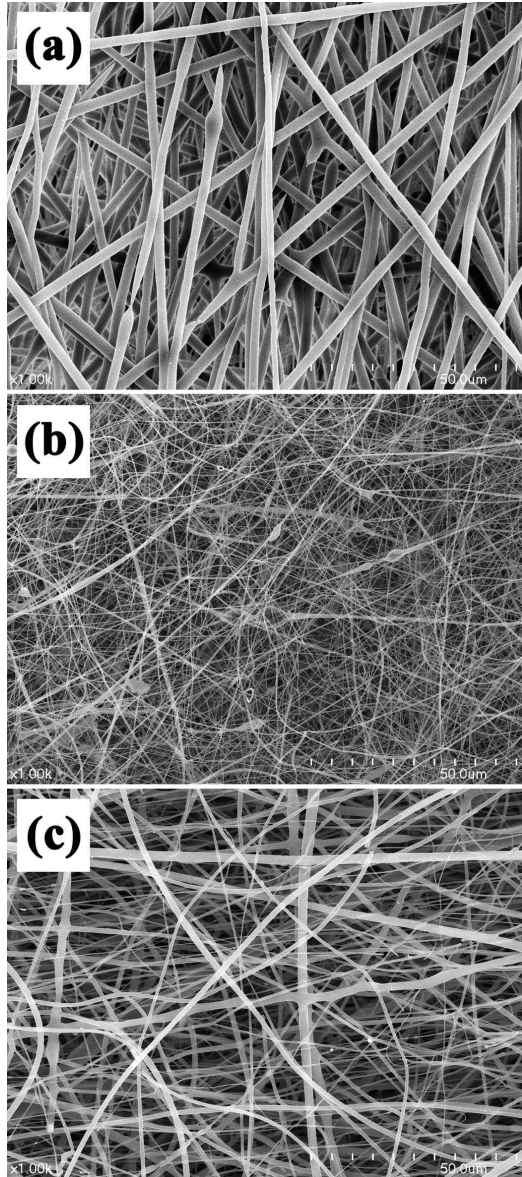


Figure 11. FE-SEM images of (a) specimen P, (b) specimen S, and (c) specimen PS.

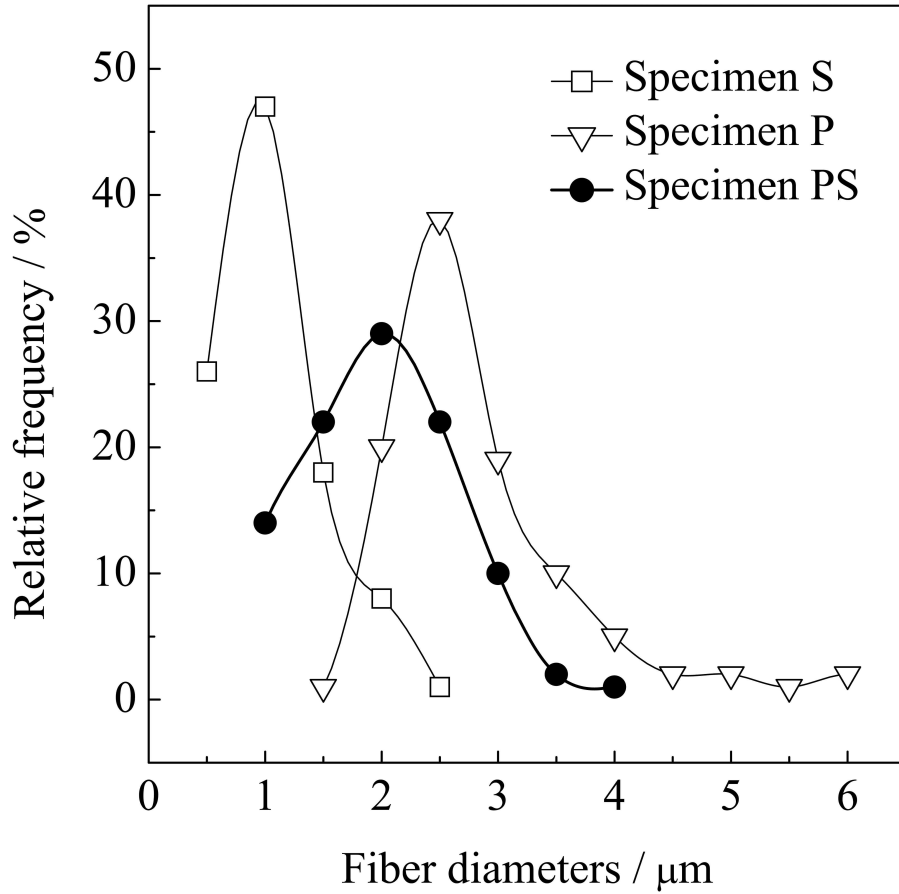


Figure 12. Fiber size distributions of specimens P, S, and PS.

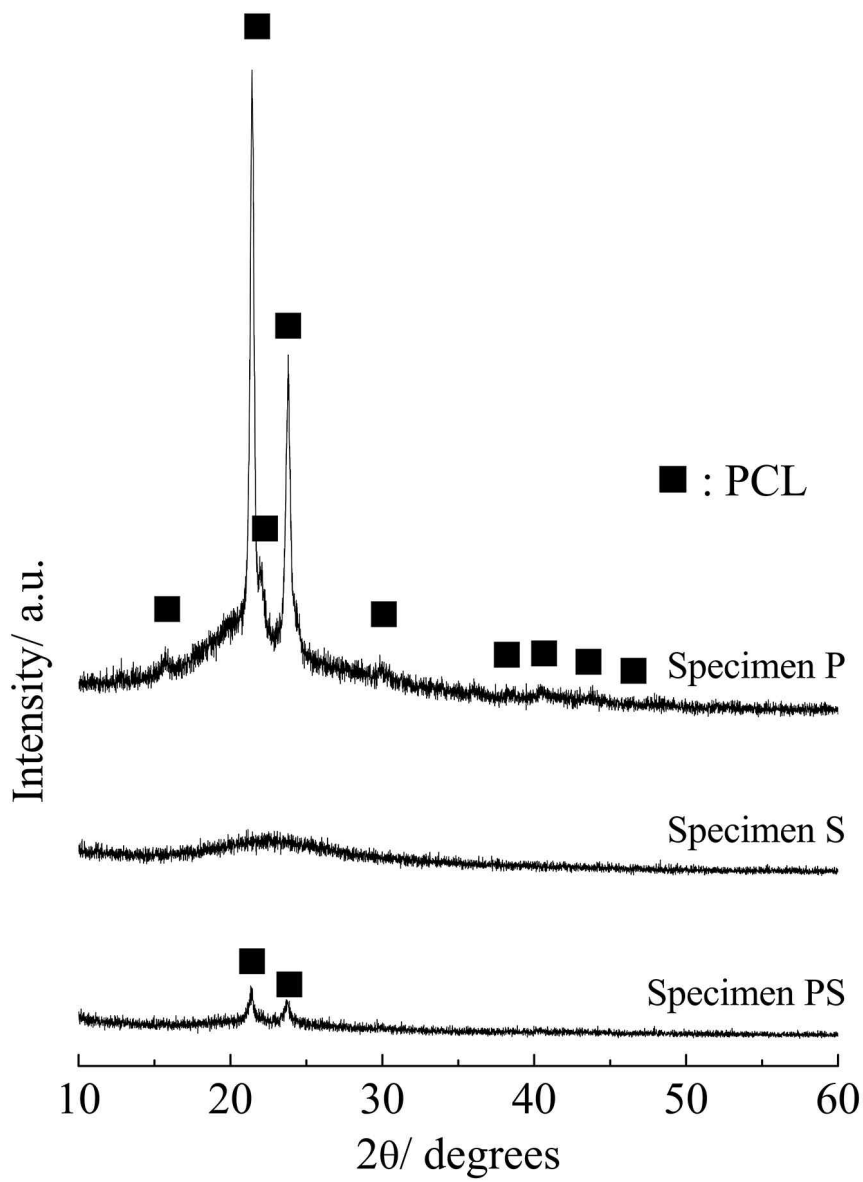


Figure 13. TF-XRD patterns of specimens P, S, and PS.

Fig. 14는 시료 P, S, PS에서 FT-IR 흡수스펙트럼을 이용한 작용기 분석결과를 보여준다. 799 cm^{-1} , 951 cm^{-1} 에서 Si-O-Si symmetric stretching 과 Si-OH asymmetric stretching 피크가 관찰되었으며 1099 cm^{-1} 에서 Si-O-Si asymmetric stretching 피크를 보였다.⁴⁶ 또한, $\sim 1634\text{ cm}^{-1}$, 3435 cm^{-1} 에서 H₂O에 해당하는 흡수 피크가 확인되었으며⁴⁶ $\sim 1731\text{ cm}^{-1}$, 2869 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} 에서 C=O와 CH₂의 symmetric, asymmetric stretching 피크를 각각 확인했다.

Fig. 15는 시료를 의사체액에 일주일간 담지 후 주사전자현미경으로 미세구조를 관찰한 결과이다. 시료 S와 PS에서는 폴리카프로락톤을 포함한 모든 섬유의 표면이 완전히 아파타이트로 코팅된 반면, 시료 P에서는 어떠한 섬유도 아파타이트가 생성 또는 코팅되지 않았다. 또한 시료 S와 PS에 있는 긴 형태의 칼슘실리케이트 섬유는 의사체액에 담지 후 짧은 섬유로 끊어져 있었으며 아파타이트의 코팅으로 인해 직경은 두꺼워져 있었다. 시료 P에서는 어떠한 다른 변화도 관찰되지 않았다.

Fig. 16은 시료 S와 PS의 의사체액 담지 후 일주일 후 섬유 단면의 미세구조를 보여준다. 시료 S와 PS에서 모든 칼슘실리케이트 섬유는 hollow한 튜브형태로 아파타이트가 둘러싸여 있었으나 그 안쪽에 칼슘실리케이트 섬유는 관찰되지 않았다. (현미경뿐만 아니라 EDS로도 내부의 실리콘 유무를 관찰하였으며 각 시료마다 적어도 30 개의 시료를 관찰했다.) 또한 PBS에서 시행한 섬유의 분해시험 결과 시료 S와 PS에서 칼슘실리케이트가 완전히 분해되었으며 담지 일주일 후에는 어떤 것도 남아있지 않았다. 반면에 폴리카프로락톤 섬유는 느린 분해속도 때문에 여전히 남아있었다.⁹²

Fig. 17은 시료를 의사체액에 담지한지 일주일 후에 TF-XRD를 이용한 상 분석 결과이다. 저 결정성 아파타이트 상이 (검은색 원) 시료 S와 PS에서 관찰되었으나 시료 P에서는 관찰되지 않았다. 이와 같이 TF-XRD 결과 또한 주사전자현미경을 통한 미세구조의 결과와 일치함을 보여준다.

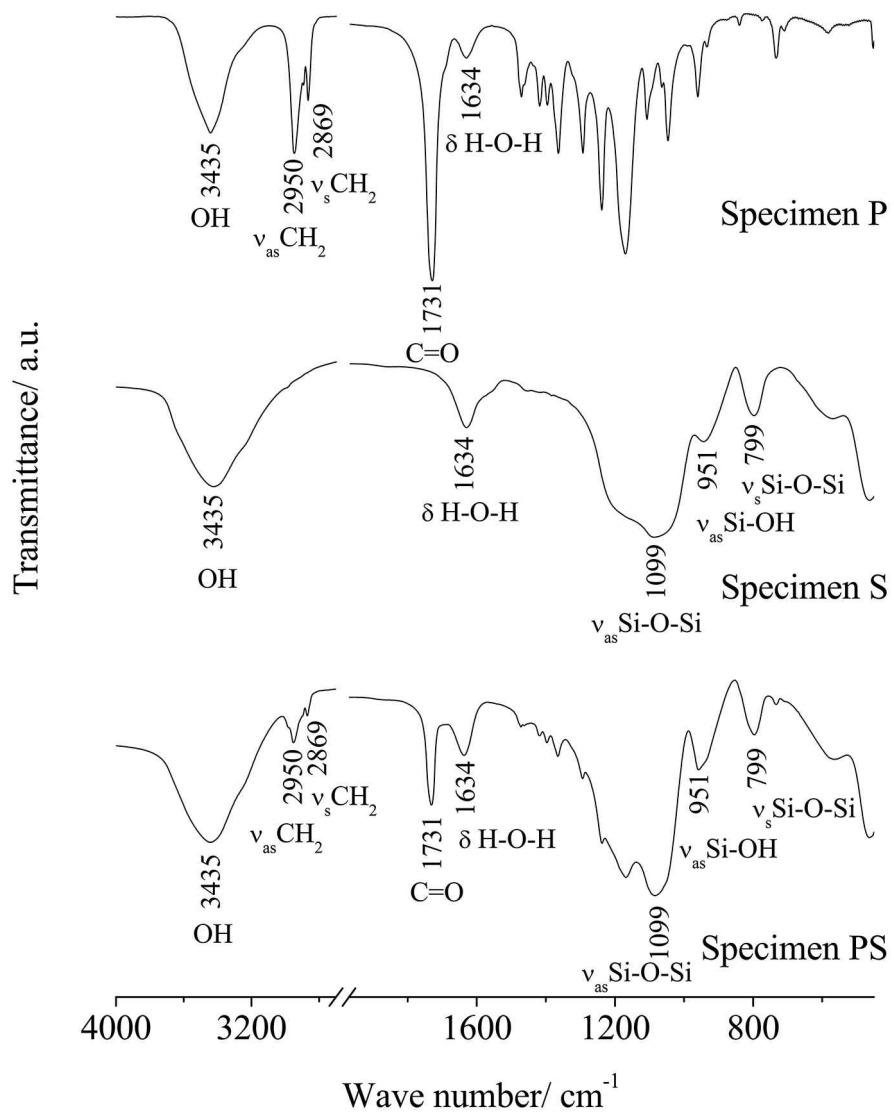


Figure 14. FT-IR spectra of specimens P, S, and PS.

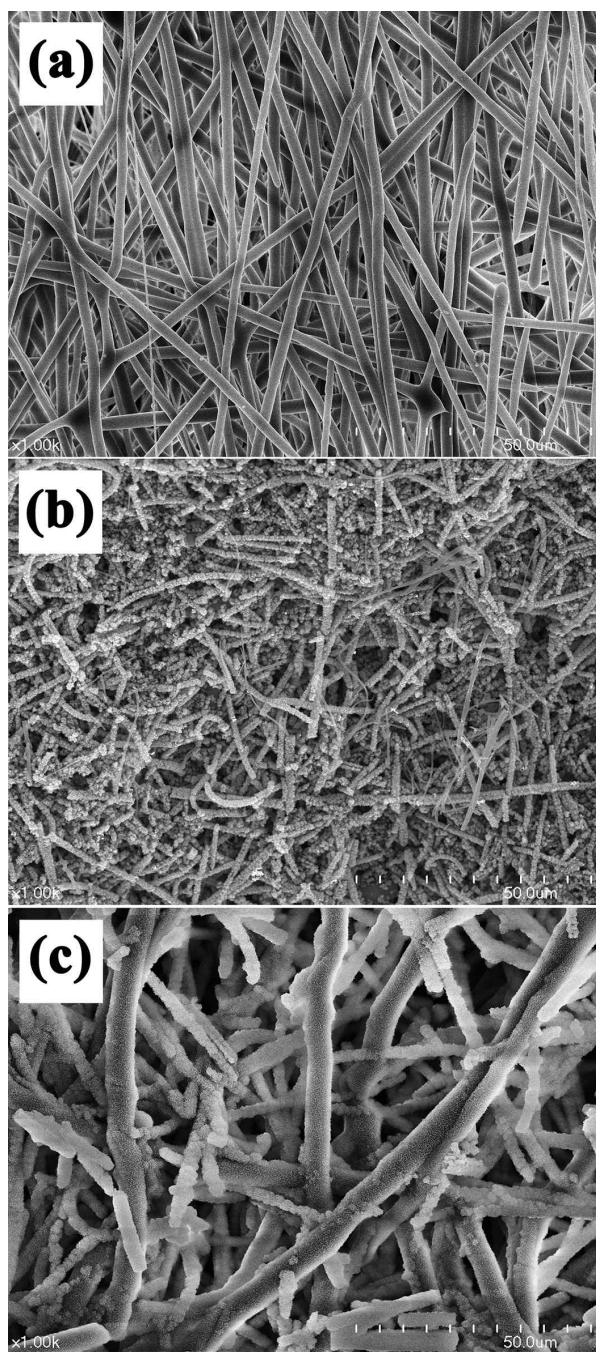


Figure 15. FE-SEM images of (a) specimen P, (b) specimen S, and (c) specimen PS after soaking in SBF for 1 week.

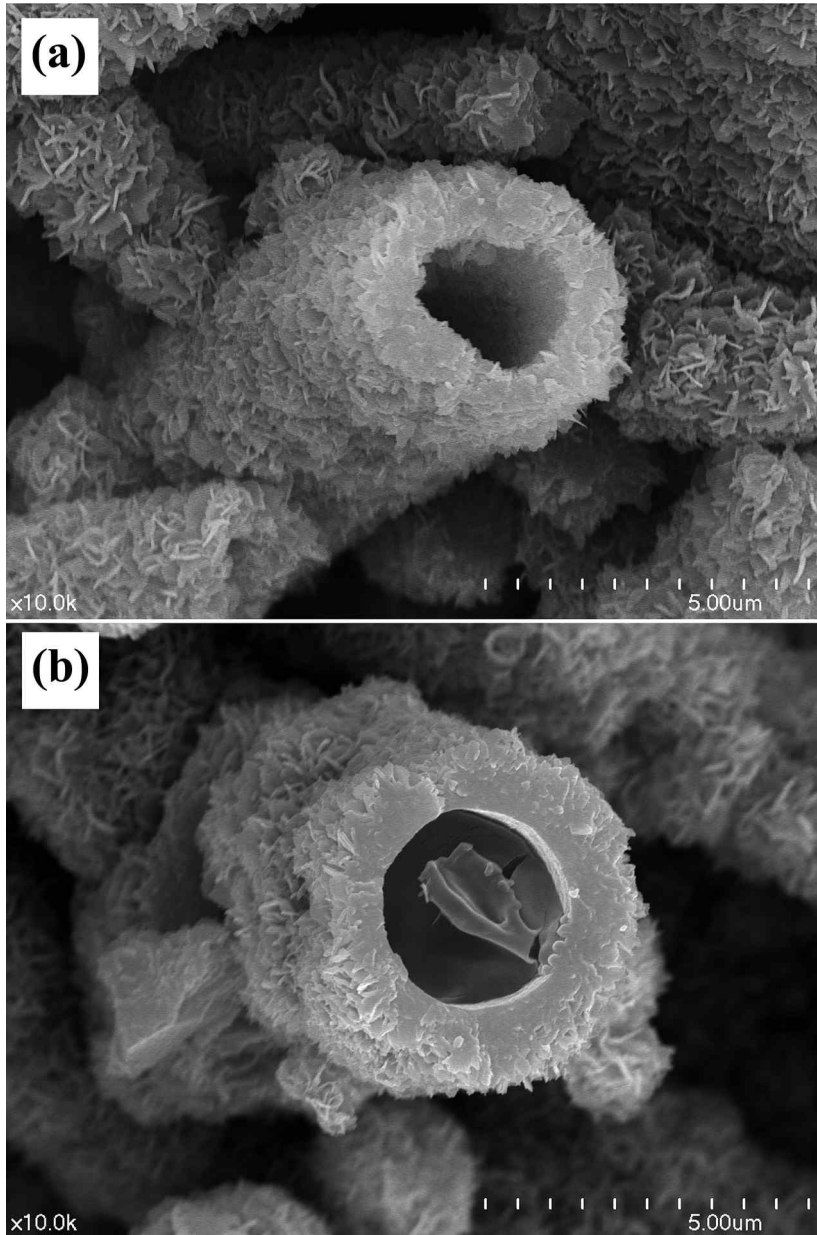


Figure 16. Fracture surfaces of (a) specimen S and (b) specimen PS after soaking in the SBF for 1 week.

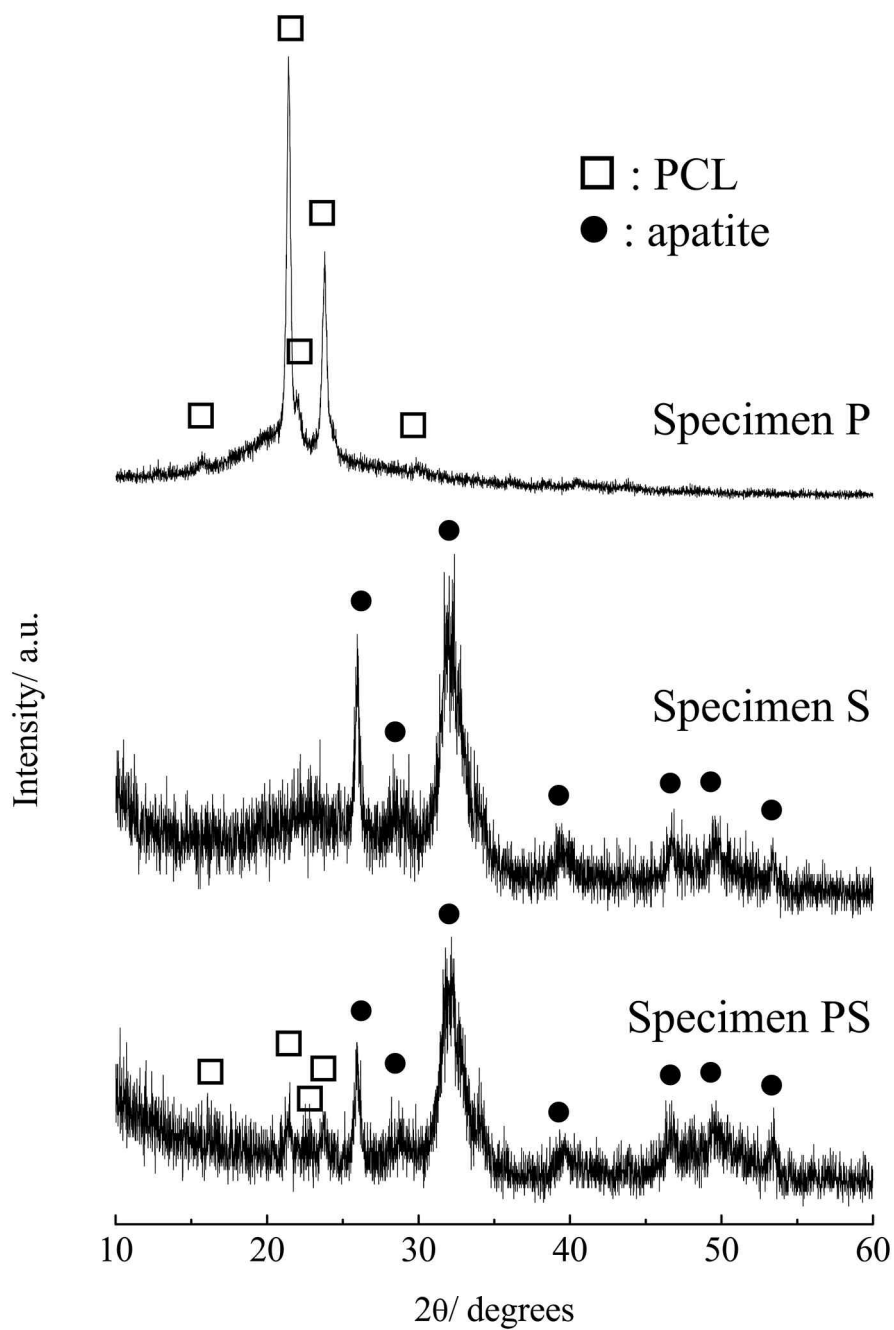


Figure 17. TF-XRD patterns of specimens P, S, and PS after soaking in SBF for 1 week.

Fig. 18은 3개의 시료를 의사체액에 담지 한 후 시간 경과에 따른 의사체액 내 (a)칼슘, (b)인, (C)실리콘 이온의 농도와 용액의 (d)pH 측정 결과이다. 시료 S와 PS의 칼슘의 농도는 각각 6 시간, 3 시간 후 가장 높은 값을 나타냈으며 시료 P의 칼슘농도는 일주일 담지 기간 동안 거의 변하지 않았다. 시료 S와 PS에서 인의 농도는 담지 초기부터 감소했고 시료 P는 어떠한 변화도 없었다. 이와 같은 경향은 실리콘 농도에서도 동일하게 관찰되었는데 시료 S와 PS에서 의사체액에 담지 기간이 늘어날수록 실리콘 농도가 점점 증가하였으나 시료 P에서는 변화가 없었다. 시료 S와 PS의 pH는 각각 3 시간과 9 시간 후 가장 높은 값을 보였고 그 이후에는 점점 감소했다. 시료 P의 pH는 시험기간 동안 변화가 없었다.

Fig. 19는 시료의 의사체액 내 각각의 아과타이트에 대한 이온화활동도적 (IAP)을 나타냈다.²⁰ 이는 용출된 칼슘, 인, 수산화기 이온의 농도 값을 통해 계산되었다. 시료 P와 PS의 IAP값은 3시간 후에 최댓값을 나타낸 후 빠르게 감소하였으나 시료 P는 담지 기간 동안 거의 변화가 없었다.

Fig. 20는 시료 P, S, PS의 인장시험 결과를 응력-변형 곡선으로 나타냈다. 예상한 바와 같이 시료 S는 쉽게 깨지는 취성을 보이는 반면 시료 P는 연성의 특성을 보였다. 그리고 시료 PS의 파단 특성은 시료 S와 P의 중간이었다. 시료 S, PS, P의 최대 파단 강도는 각각 0.10 ± 0.01 MPa, 0.60 ± 0.05 MPa, 2.70 ± 0.66 MPa였다. 시료 S와 PS의 변형 파단율은 각각 0.6 ± 0.1 %, 48.7 ± 1.5 % 였고 시료 P는 192.3 % 였다. 시료 S, PS, P의 영률은 각각 0.8 ± 0.2 MPa, 6.7 ± 1.5 MPa, 27.0 ± 6.9 MPa 로 측정되었다.

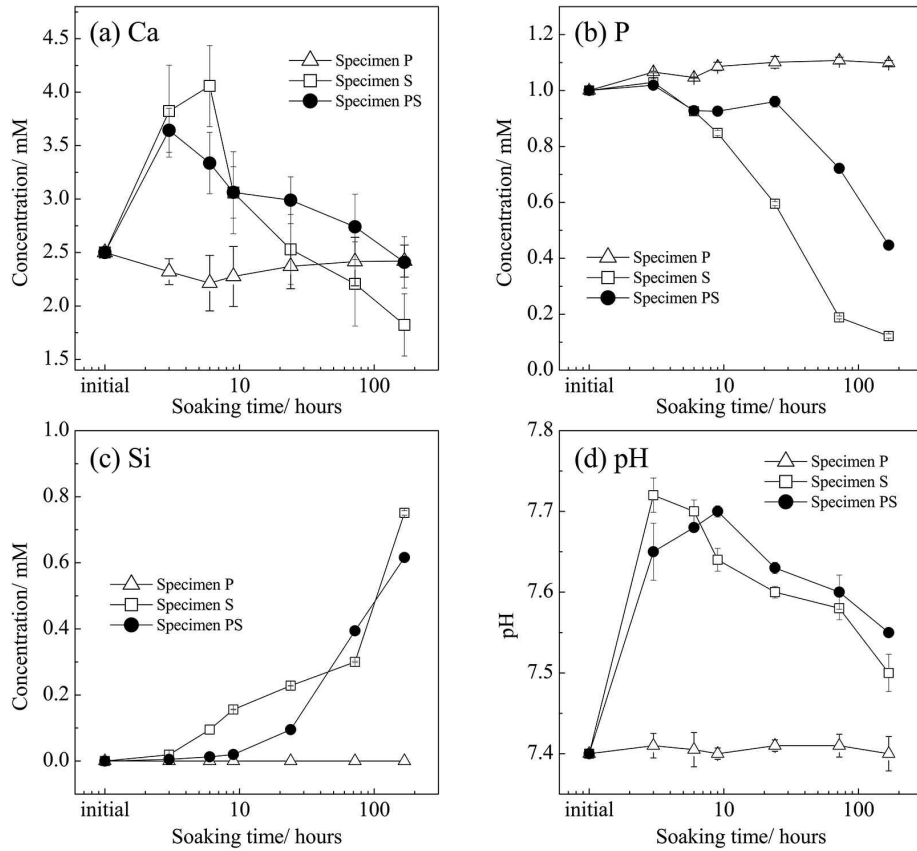


Figure 18. Changes in element concentrations and SBF pH as a function of soaking time.

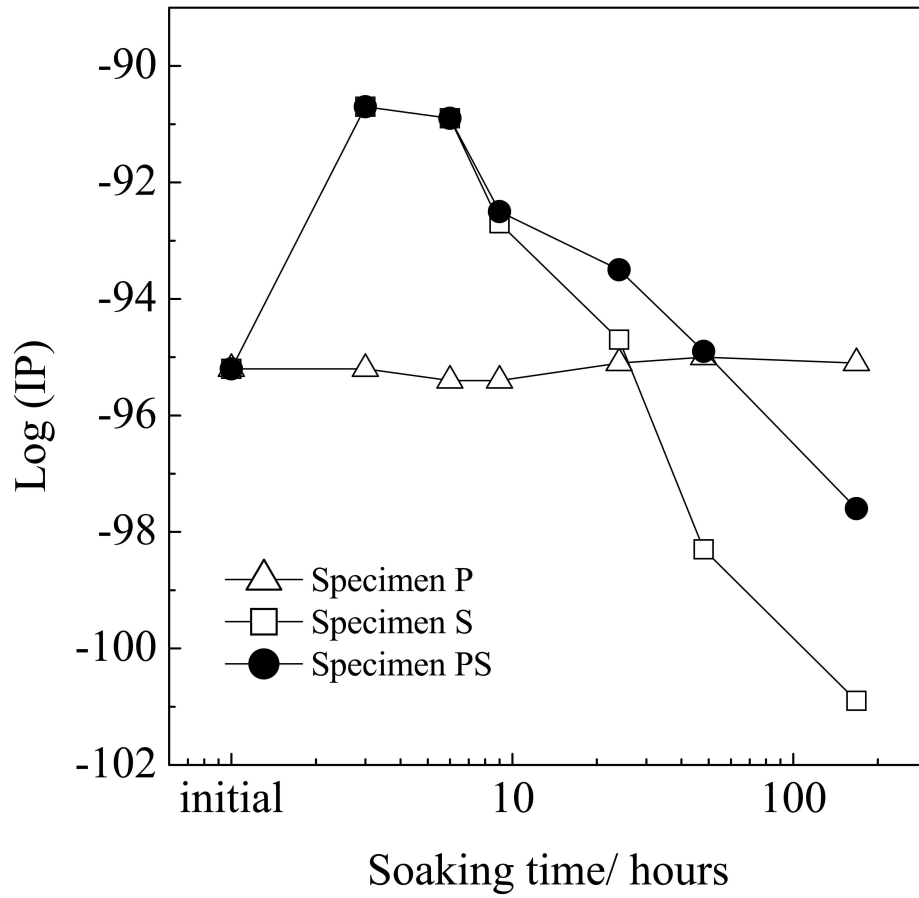


Figure 19. Changes in ionic activity product of apatite in SBF due to immersion of specimens P, S, and PS.

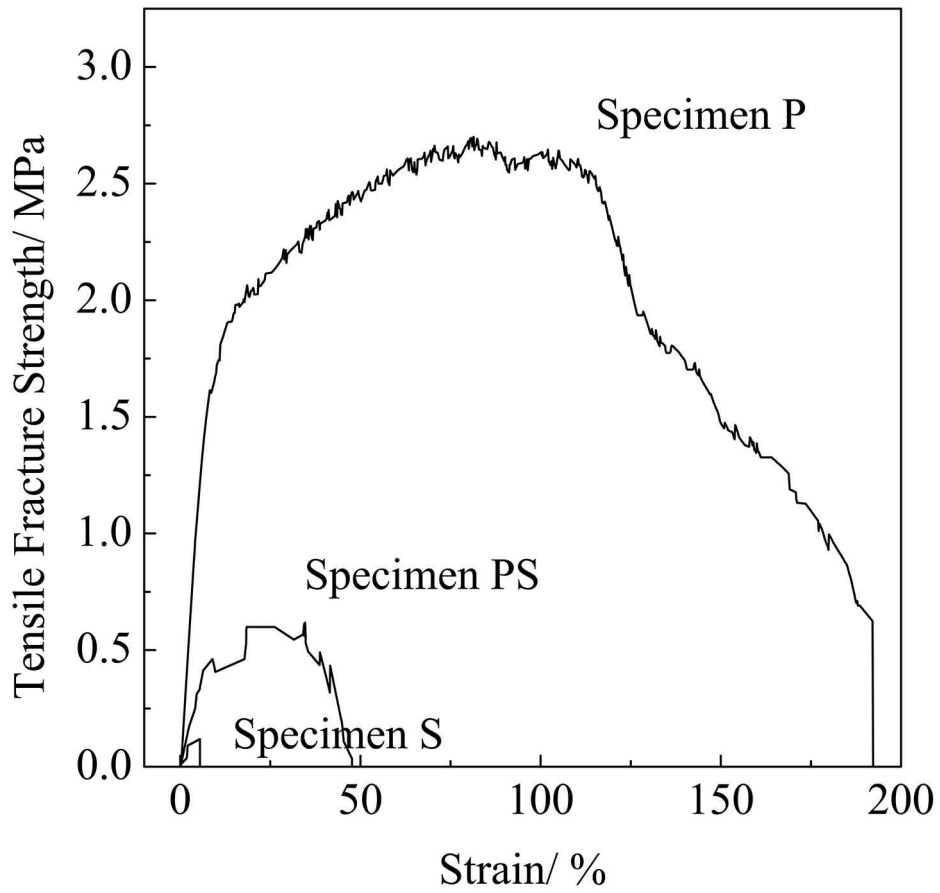


Figure 20. Tensile fracture strength - strain curves of specimens P, S, and PS.

Fig. 21과 22는 시료 P, S, PS를 가토의 두개골 결손부에 2주간 식립한 후 조직을 40배 (Fig. 21)와 100배(Fig. 22)에서 광학현미경으로 관찰한 사진이다. 각 사진에는 초기 결손부의 경계 (검은 라인)와 기존골 (검은색 화살표) 그리고 신생골(흰색 화살표)을 기호로 표시했다. 시료 P에서는 대부분의 결손부가 폴리카프로락톤 부직포로 채워져 있고 그 시료는 완전히 연조직으로 둘러싸여 있을 뿐만 아니라 몇몇의 이물반응이 이식재 내부에서 관찰되었다. 그러나 적은 양의 신생골 또한 기존골을 따라 형성되어 있었다. 반면에 시료 S와 PS에서는 결손부의 대부분이 신생골과 골양 조직으로 채워져 있었고 염증반응은 보이지 않았다. 단지 최소한의 이물반응이 두 개의 시료에서 관찰되었다.

Fig. 23과 24는 가토의 두개골 시술 후 4주후 결손부의 이미지를 40배 (Fig. 23)와 100배 (Fig. 24)로 광학현미경에서 관찰한 사진이다.

시료 P는 이식재 (흰색 별표)가 명확히 관찰되고 연조직이 완전히 그 주변을 감싸고 있는 것이 확인되었다. 2주후와 마찬가지로 적은 양의 신생골이 기존골을 따라 보였으나 많은 양의 면역세포들이 여전히 이식재 내부에서 관찰되었다. 반면 시료 S와 PS는 대부분의 결손부에서 기존골 위로 성숙된 신생골이 채워져 있음을 확인했다. 골수와 지방조직 역시 신생골 내부에서 관찰되었다.

Fig. 25는 가토의 두개골에 시료를 식립 한 후 2주와 4주후 결손부에 형성된 신생골의 면적을 조직계측학적 분석을 통해 측정한 결과이다. 2주와 4주후에 시료 P는 신생골이 전체 결손부의 각각 13.5 %와 16.1 % 생성된 반면 시료 S는 33.9 %와 34.8 %가 형성되었고 시료 PS는 전체 결손부의 29.0 %와 35.0 %에 신생골이 형성되었다. 각 그룹별로 2개의 시점 사이에는 유의성이 없었으나 시료 P와 S 그리고 시료 P와 PS 사이에는 각 시점마다 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

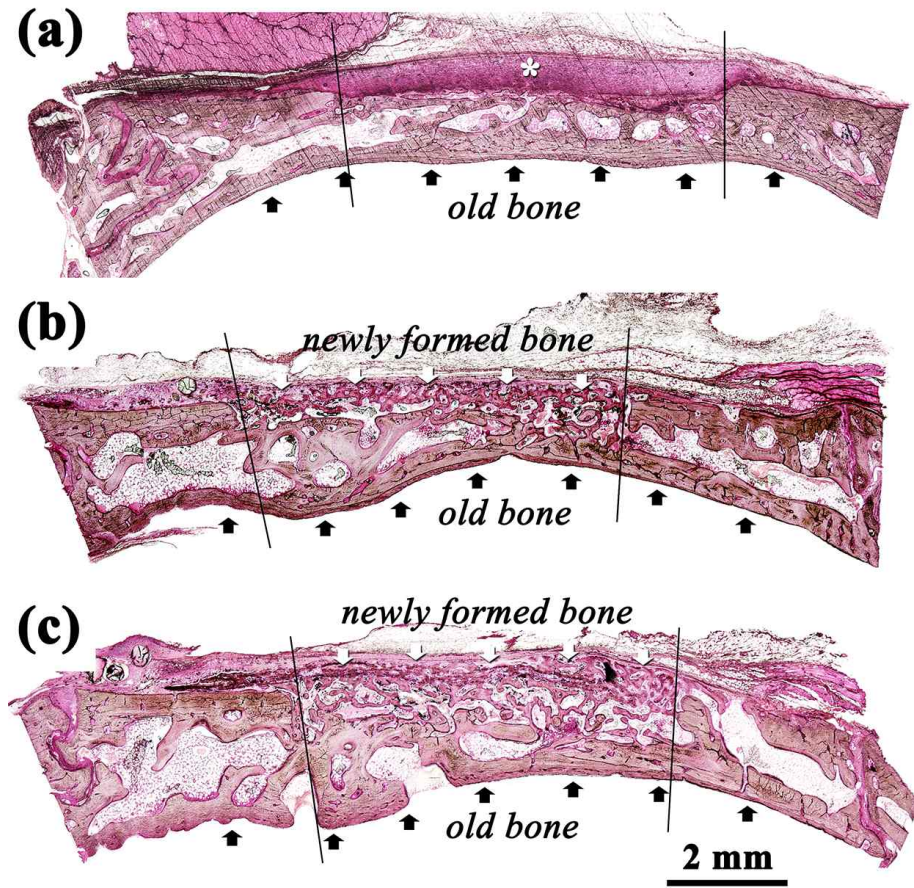


Figure 21. Optical micrographs of specimens (a) P, (b) S, and (c) PS after 2 weeks of implantation into calvarial defects of New Zealand white rabbits. New and old bone tissues are denoted by white and black arrows, respectively. Specimen P is denoted by a white asterisk, and the original defect margin is indicated by two black lines. (Original magnification 40)

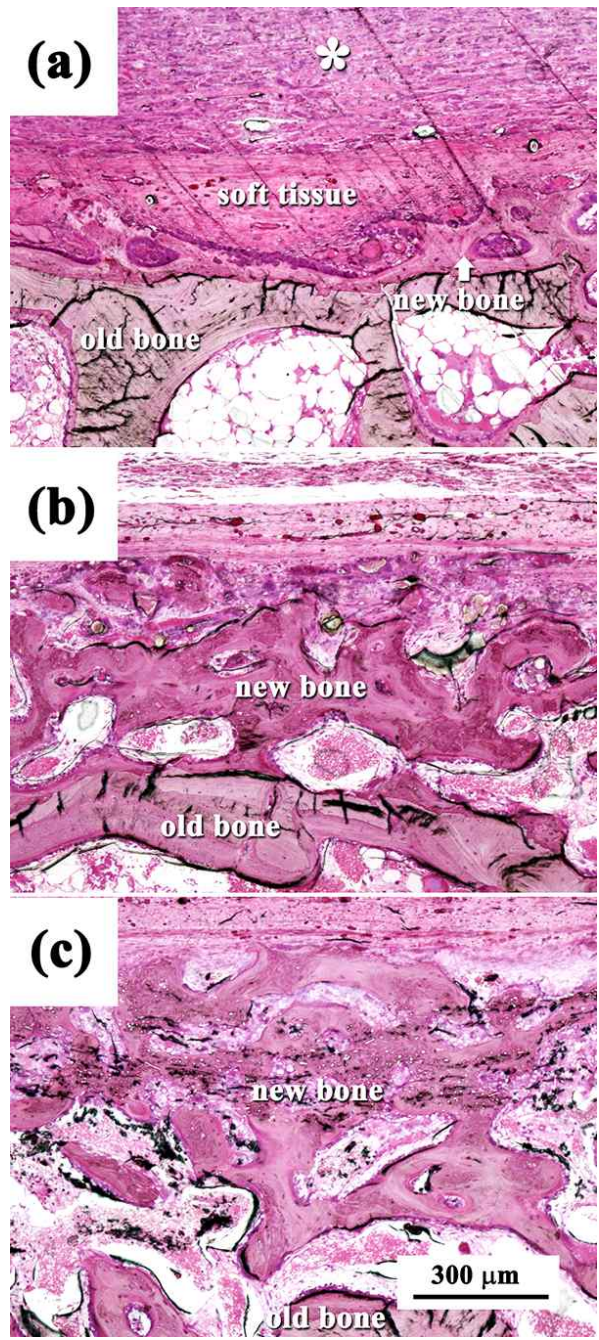


Figure 22 . Detailed micro structures of Fig 21.(x 100)

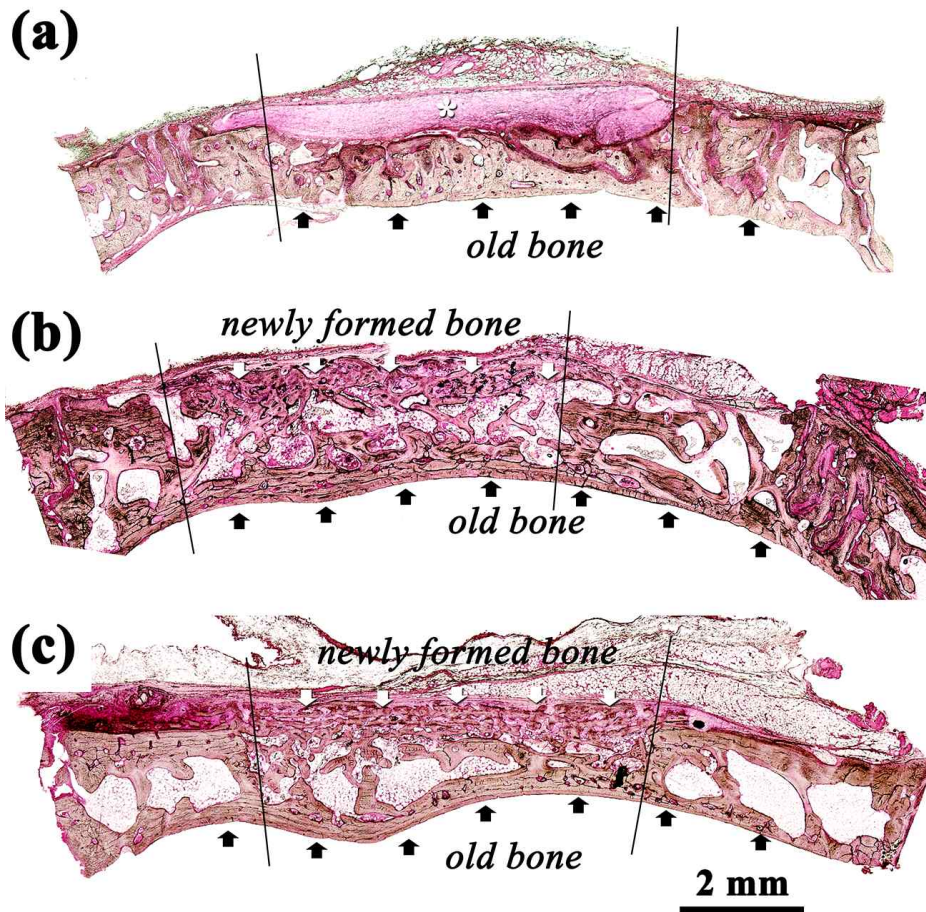


Figure 23. Optical micrographs of specimens (a) P, (b) S, and (c) PS after 4 weeks of implantation into calvarial defects of New Zealand white rabbits. New and old bone tissues are denoted by white and black arrows, respectively. Specimen P is denoted by a white asterisk, and the original defect margin is indicated by two black lines. (Original magnification 40)

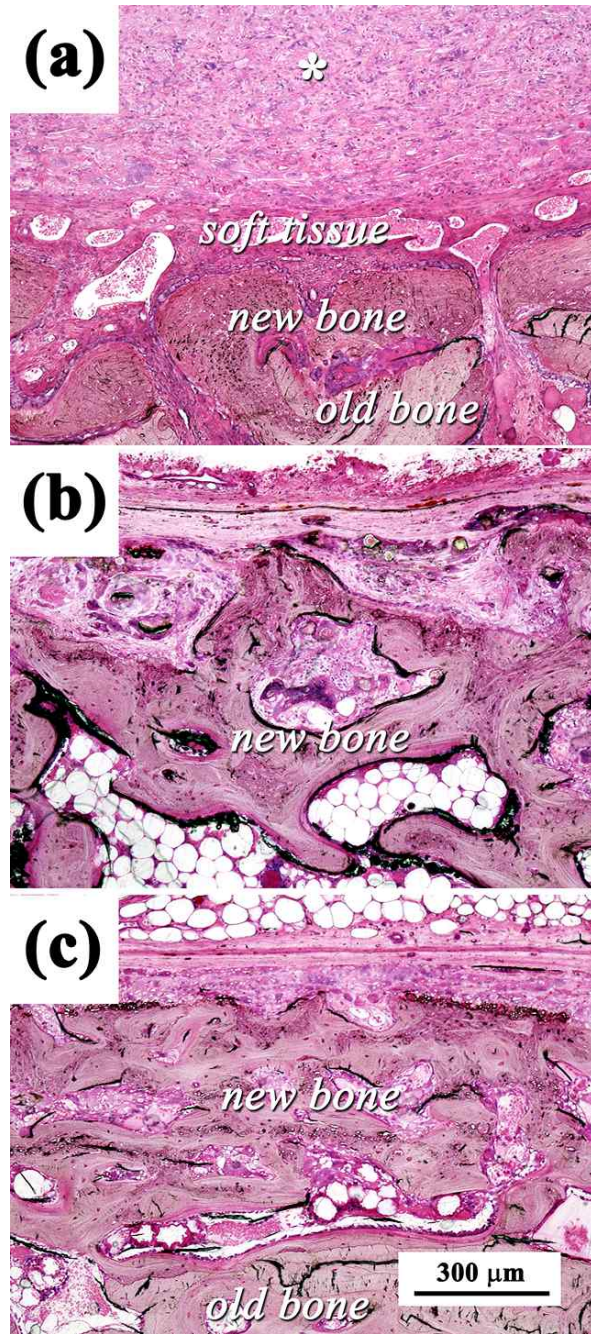


Figure 24. Detailed micro structures of Fig. 23. (x100)

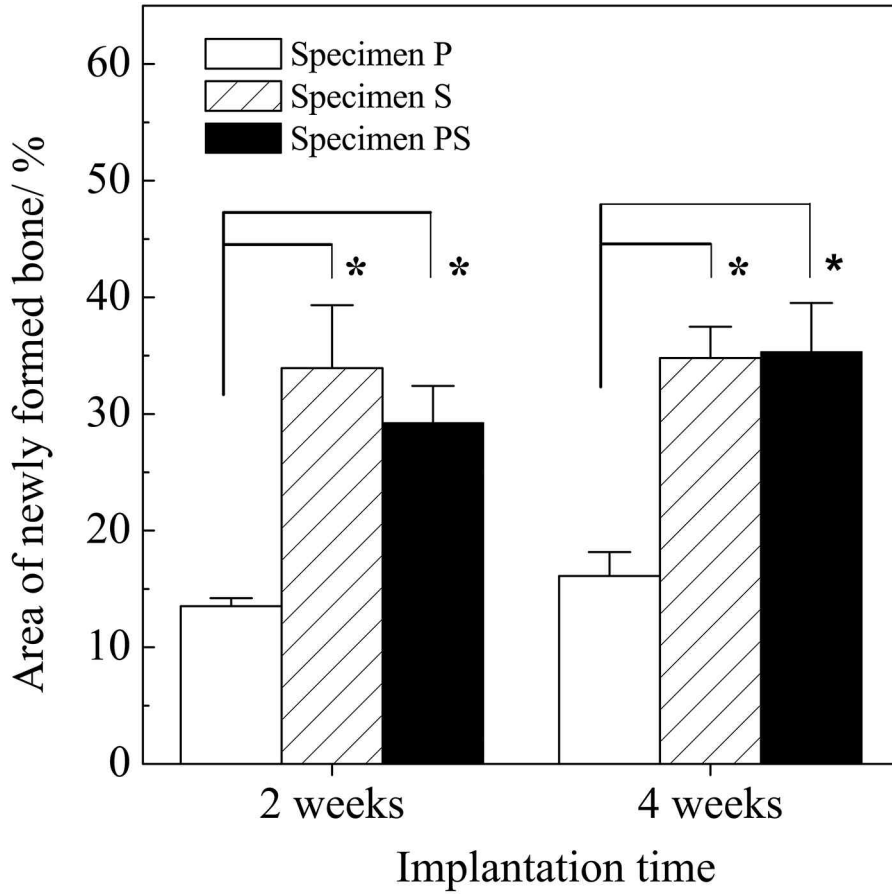


Figure 25. Histomorphometric results at 2 and 4 weeks post implantation. Total new bone is expressed as a percentage of the total region of the defect. The values represent the mean \pm standard deviation of samples ($n=4$ in each group). *Significantly different from PCL group at 2 and 4 weeks, respectively ($*p < 0.05$).

4. 고찰

본 연구에서는 체내에서 아파타이트 형성능을 가지고 있으며 물리학적 성능이 향상된 고분자/세라믹 복합형 부직포가 전기 방사법으로 제조될 수 있음을 입증했다. 칼슘실리케이트 세라믹 겔과 폴리카프로락톤 고분자 용액을 두 개의 노즐로 동시에 방적하는 동시 전기방사법을 적용하였는데 이는 아파타이트 형성과 빠른 분해를 가진 칼슘실리케이트 섬유와 좋은 파단인성의 폴리카프로락톤의 기능을 모두 성공적으로 적용하기 위해서이다.

칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤 섬유를 무작위로 혼합하여 제조된 복합형 부직포는 주사전자현미경을 통해 그 미세구조와 섬유의 직경을 확인했고 칼슘실리케이트 섬유는 얇으나 폴리카프로락톤은 굵은 직경을 보였다. 또한 의사체액 내에서 아파타이트 핵 생성의 가능성을 확인하기 위해 FT-IR 흡수스펙트럼을 이용하여 부직포 표면에 실라놀 그룹의 유무 관찰했다. 실제로 실라놀 그룹이 확인된 시료 PS와 S에서 의사체액에 일주일간 담지 후 아파타이트 생성능을 보였으나 실라놀 그룹이 없는 시료 P에서는 어떠한 아파타이트의 생성도 보이지 않았다. 더욱이 시료 PS에서는 실라놀 그룹이 없는 폴리카프로락톤 표면에도 아파타이트 결정이 생성되었으나 시료 P에서는 어떠한 아파타이트 형성가능성도 보이지 않았다. 이것은 ICP-AES의 결과로 설명되는데 칼슘실리케이트 섬유가 분해되면서 섬유의 표면에 실라놀 그룹을 함유한 실리케이트 이온이 핵 생성 사이트의 역할을 하고^{17,91} 칼슘실리케이트 섬유로부터 방출된 칼슘이온은 의사체액 내에 아파타이트에 대한 이온화도적을 높여 아파타이트 결정의 생성을 가속화시키는 역할을 한다. ICP-AES의 결과는 칼슘과 실리콘 이온이 실제로 칼슘실리케이트 섬유에서부터 방출되는 것을 보여준다. 특히 그 결과는 시료 PS에서 칼슘실리케이트 섬유가 실리콘 이온을 방출하는 것을 보여준다. 또한 그 실리콘 이온들은 순차적으로

폴리카프로락톤 섬유 표면에 부착되면서 칼슘실리케이트 섬유와 동일하게 아파타이트가 코팅된다. 이러한 아파타이트 형성 체제는 이미 비 생체활성 고분자 표면에서 확인되어왔다.^{17,90,91}

의사체액 내에서 칼슘실리케이트 섬유의 용해는 주사전자현미경 관찰과 ICP-AES 분석, 그리고 PBS 내 분해도 시험을 통해 확인했다. 시료 S와 PS에서 칼슘실리케이트 섬유는 PBS 내에서 1 주일 만에 완전히 용해되었다. 의사체액 내에서 전체 담지 기간 동안 실리콘 농도의 기하급수적인 증가가 이를 뒷받침한다. 시료 S와 PS에서 초기 칼슘이온의 농도 증가 또한 섬유의 분해에 의한 결과이며 아파타이트 결정의 생성에 의해 점차 칼슘이온의 농도가 감소된다. 이러한 칼슘실리케이트 섬유의 용해는 전기방사 후에 열처리 과정의 부재에 의한 결과이다. 칼슘실리케이트 섬유가 열처리가 되지 않았기 때문에⁹⁶ 미 반응된 Si-OH와 Si(OCH₂CH₃)그룹 그리고 느슨한 구조의 Si-O-Si 연결은 의사체액 내에서 칼슘실리케이트 섬유의 용해를 빠르게 할 수 있고 칼슘실리케이트 섬유 자체를 약하게 만들 수 있다. 실제로 시료 S의 인장파단강도-변형률 곡선에서 쉽게 부러지는 파단양상을 보여준다. 게다가 빠른 용해 특성을 가진 칼슘실리케이트 부직포의 영률은 약 0.8 + 0.2 MPa 이었으나 그 섬유를 600°C에서 소결한 이후에는 약 5.5 GPa로 증가되었다.⁹⁷ 이 모든 결과가 본 연구에서 제조한 칼슘실리케이트 섬유가 빠르게 분해되면서 분해된 실리케이트 이온이 폴리카프로락톤 섬유 위에서 아파타이트의 생성을 위한 핵생성 사이트의 역할을 한다는 것을 시사한다. 생성된 탄산 아파타이트 피복재는 탁월한 골 전도성을 보이고 이는 파골 세포에 의해 나중에 분해될 수 있다.^{98,99} 반면에 시료 P의 인장파단강도-변형률 곡선은 질긴 인성파단을 보여줬으나 시료 PS는 시료 S와 P사이의 값을 보였다. 시료 PS의 인장강도는 거의 시료 P의 1/5 수준이나 그것은 칼슘실리케이트 섬유가 혼합된 결과를 보인다. 그러므로 시료 PS에서 폴리카프로락톤 섬유의 수 밀도를 줄여서 시료 P와 비교하였을 때 인장강도가 감소함을 확인했다.

골 전도성 시험의 결과를 생체활성 시험의 결과와 함께 비교, 분석한 결과 의사체액 내에서 아파타이트의 활성을 보인 시료 PS가 동물실험에서도 탁월한 골 전도성을 보였다. 시료 S에서도 같은 결과를 확인했다. 시료 S와 PS가 이식된 부위에 신생골이 채워졌다. 생체활성 시험과 이전 연구들에^{8,100} 기초하면 시료 S와 PS가 생체 내 이식되었을 때 저 결정성 탄산 아파타이트가 순차적으로 칼슘실리케이트와 폴리카프로락톤 섬유 표면에서 형성되고 그들의 표면을 따라 신생골이 형성되었으리라 생각된다. 시간이 지남에 따라 시료 PS에서는 신생골의 양이 증가하는 반면 시료 S에서는 그 증가되는 양이 미미했다. 이는 시료 PS에 골 전도성이 없는 폴리카프로락톤 섬유가 포함되었기 때문인 것으로 생각된다. 생체활성 실험 결과를 보면 의사체액 내에서 칼슘실리케이트 섬유에 의해 골 전도성이 없는 폴리카프로락톤 표면에도 아파타이트 결정이 코팅은 되었으나 이는 섬유보다 훨씬 느리게 일어났음을 알 수 있다. 따라서 비록 *in vivo* 상으로 확인은 어려우나 폴리카프로락톤 섬유가 함유된 시료가 신생골의 생성이 느리기 때문에 2주 후에 비해 4주 후에 신생골의 양이 증가된 것으로 생각된다.

의사체액 내에서 어떠한 아파타이트의 형성도 보이지 않은 시료 P는 낮은 골 전도성을 보였다. 시료 P에서도 신생골이 관찰되었으나 그 양이 적고 신생골이 시료 P에 직접적으로 접촉하지 않았으며 시료의 주변은 연조직으로 둘러싸여 있었다. 게다가 많은 염증세포가 시료 P의 내부에서 관찰되었고 골 형성양은 시간이 지남에 따라 증가되지 않았다.

결론적으로 생분해성 폴리카프로락톤과 생체활성, 빠른 분해를 가진 칼슘실리케이트 섬유를 혼합한 복합형 부직포는 동시 전기방사를 통해 성공적으로 제조되었다. 이 부직포는 의사체액 내에서 좋은 아파타이트 형성능을 가지고 폴리카프로락톤과 칼슘실리케이트의 중간수준의 기계적 특성을 가졌으며 생체 내에서 좋은 골 전도성도 보였다. 따라서 이러한 재료는 골 충전재나 골 조직 재생 분야의 응용에 적합할 것으로 생각된다.

5. 결론

폴리카프로락톤과 칼슘실리케이트 섬유를 무작위로 혼합한 복합형 부직포는 두 개의 노즐을 이용한 동시 전기방사법으로 제조했다. 이 복합형 부직포는 물리학적 특성이 칼슘실리케이트 부직포에 비해 향상되었을 뿐만 아니라 의사체액 내에서 아파타이트 형성능도 나타냈다. 또한 가토의 두개골에 이식 2주 만에 탁월한 골 전도성을 보였다. 이것으로 종합해 볼 때 폴리카프로락톤과 칼슘실리케이트 섬유를 혼합한 복합형 부직포는 골 조직 재생을 위한 재료로서의 응용에 적합할 것으로 생각된다.

V. PLGA의 생분해성이 전기방사법으로 제조된 PLGA/칼슘실리케이트 복합형 부직포의 생체활성에 미치는 영향

1. 서론

Polyglycolide (PGA)와 Polylactide (PLA)의 공중합체인 Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)는 poly(α -hydroxy acids) 군의 고분자 물질로 좋은 생체적합성과 생분해성 특성 때문에 널리 사용되어 왔다. PLGA는 분자량뿐만 아니라 공중합체 조성을 쉽게 조절할 수 있어 임상적으로 봉합사, bone plate, 스크류, 그리고 약물 전달체와 같은 다양한 분야에 적용되어 왔으며 안정성 또한 입증되었다.

PLGA의 분해는 생체내의 특정 효소의 작용 없이 체액과의 접촉에 의해 일어나는데 PLGA의 젖산과 글리콜산 단량체 내에 있는 에스테르 결합이 가수분해가 일어나면서 비 특이적인 분해 메커니즘을 보인다. 분해물의 흡수는 생체의 대사 메커니즘에 따라 대사 사이클을 따라 흡수되며 최종적으로 이산화탄소와 물로 배설된다.¹⁰¹ 이러한 분해 과정에서 미량의 전신독성이 나타날 수 있는데 산성 분해산물이 주변 조직의 pH를 감소시키며 그 결과 국부적 염증반응과 조직발달의 저해를 가져올 수 있다.^{102,103}

PLGA를 골 충전 재료로 적용할 때 골 전도성이 전혀 없기 때문에 대부분의 연구에서 PLGA와 인산칼슘, 유리와 같은 생체활성 세라믹을 혼합하여 골 전도성을 부여하고자 했다.^{104,105} 그러나 마이크로 크기의 생체활성 세라믹 분말과 PLGA는 서로 다른 젖음성의 차이로 인해 혼합이 어려웠다. 게다가 PLGA matrix 내에 세라믹 분말의 균일한 분산이 어려우며 세라믹 분말의 양을 증대시키는 것은 복잡할 뿐만 아니라 분산제

의 사용 없이 복합체의 표면에 세라믹 분말을 거의 노출시킬 수 없다.

그러므로 이러한 마이크로 복합체의 단점을 극복하기 위해 졸-겔 방법을 이용한 나노 복합체가 개발되었다.^{63,106-108} 그러나 이 방법 또한 충분한 연결기공 구조를 얻기 어려워 골 충전재로써의 응용에 제한적이었다. 그 이유는 골 충전재에서 기공은 새로운 혈관의 형성과 조직의 성장을 위한 공간이기 때문이다. 그러므로 나노 복합체의 좋은 특성을 유지하면서 쉽게 연결기공 구조를 만드는 새로운 공정 디자인이 요구된다.

전기방사법은 최근에 고분자나 세라믹 소재를 이용하여 쉽게 3차원 연결 기공을 만들 수 있는 새로운 방법으로 떠오르고 있다. 실제로 많은 생분해성 고분자 부직포가 조직 공학적 지지체로써 응용되고 있는데^{19,55-57} 그 이유는 부직포의 구조가 인체 내 세포외기질 (Extra cellular matrix)과 유사하며 높은 비표면적과 공극율을 가지고 있고 적절한 기계적 특성, 생분해성, 표면 개질의 가능성^{45,46} 그리고 약물과 유전자 전달을 위한 유연성을^{47,48} 가지고 있기 때문이다.

그러나 고분자를 이용한 부직포를 골 충전재로 적용하기에는 골 전도성이 없다는 단점이 있고 세라믹 부직포는 골 전도성은 있으나^{78,80} 세라믹에 내재하는 결점인 쉽게 깨지는 성질이 있다. 그러므로 만약 골 전도성 세라믹과 연성-질감의 성질을 가진 고분자를 이용하여 고분자/세라믹 복합체 부직포를 동시 전기방사로 제조할 수 있다면 그것은 3차원 연결 기공 구조를 가진 복합체일 것이다.

몇몇의 생체활성 세라믹/고분자 복합형 부직포 시스템은 이미 발표되었다.^{86,88,109-123} PLGA와 같은 생분해성 합성 고분자가 고분자/세라믹 복합형 부직포에서 분해된다면 그것의 분해 산물은 산성일 것이고 그래서 그들은 아파타이트의 형성을 방해할 가능성이 있다. 왜냐하면 아파타이트 결정은 낮은 pH (pH5.6 이하)에서 분해되기 때문이다.¹⁰⁹ 그러나 아직까지 산의 부산물과 분해에 관한 연구는 보고되지 않았는데 이는 대부분 분해속도가 느린 고분자를 사용했기 때문이다.^{88,113,119,120,125}

따라서 본 연구에서는 공중합체의 조성에 따라 분해속도가 다른 두 개

의 PLGA를 이용하여 각각 칼슘실리케이트/PLGA 복합형 부직포를 제조했고 PLGA의 분해속도가 의사체액 내에서 부직포의 아파타이트 형성능에 미치는 영향을 연구했다. 본 연구결과는 생체활성을 가진 생분해성 고분자/세라믹 복합형 부직포를 개발할 때 고분자를 선택하는 가이드로써 제공될 수 있을 것이다.

2. 실험방법

2.1 시료의 준비

분해속도가 다른 두 개의 PLGA (LACTEL®) 고분자를 1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Acros) 용매에 17 wt%의 농도로 녹여 각각 낮은 분해도 (75PLA25PGA, I.V.0.55 - 0.75)와 높은 분해도 (50PLA50PGA, I.V. 0.55 - 0.75)를 가진 PLGA 용액을 제조했다. 칼슘실리케이트 용액은 tetraethyl orthoSilicate (TEOS), 물, 에탄올, 이수화물 염화칼슘 그리고 염산을 80°C에서 20 시간 동안 축합 반응시킨 후 적절한 점성을 얻기 위해 약 60°C, 9 kPa의 압력 내에서 2 시간 동안 수화시켜 제조했다. 이때 염화칼슘과 물, 에탄올, 염산은 si를 기준으로 0.1: 2: 1: 0.02의 몰 비율로 혼합하여 겔 용액을 제조했다. PLGA 용액과 칼슘실리케이트 용액을 16-gauge의 스테인리스 스틸 바늘이 연결된 2개의 다른 플라스틱 주사기에 넣었다. 분사구와 집진기 사이에 높은 전기장을 발생시키기 위해 전압발생기에 바늘을 연결했고 집진기는 드럼 형태로 표면은 알루미늄 호일을 감쌌다. PLGA와 칼슘실리케이트 섬유는 동시 방사를 통해 제조되었고 각각 주사기 펌프를 이용하여 1.5, 3 ml/h의 속도로 분사되었으며 이 때 걸어준 전기장은 각각 1, 2 kV/cm, 전압은 15, 20 kV로 걸어주었고 그 분사구와 집진기의 거리는 각각 15, 10 cm로 조정했다. 대조군으로 PLGA와 칼슘실리케이트 부직포도 각각 동일한 조건으로 전기 방사하여 제조했다. 제조된 부직포는 24시간 동안 상온에서 건조했고 그 이후에 PLGA5050, PLGA7525, 칼슘실리케이트, 칼슘실리케이트/PLGA5050, 칼슘실리케이트/PLGA7525 복합형 부직포는 각각 그들의 구성에 따라 시료 P5050, 시료 P7525, 시료 S, 시료 P5050S 그리고 시료 P7525S로 명명되었다.

2.2 생체활성 시험

각기 다른 5개의 부직포는 의사체액 내에서 아파타이트 형성능을 통해 생체활성이 평가되었다.⁹³ 의사체액은 NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₃ · 3H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂, NaSO₄를 Na⁺ 142.0, K⁺ 5.0, Mg²⁺ 1.5, Ca²⁺ 2.5, Cl⁻ 147.8, HCO⁻ 4.2, HPO²⁻ 1.0, SO₄²⁻ 0.5 mM의 농도로 증류수에 용해시켜 제조했으며 tris-buffer 용액 (Tris(Hydroxymethyl) aminomethane, H₂NC(CH₂OH)₃)과 1N의 염산용액을 가하여 36.5°C에서 pH 7.4로 맞춘 후 필터 (Millipore, 0.22μm)를 이용하여 멸균했다.

부직포는 12 mm 직경, 0.1 mm 두께의 디스크 형태로 잘라 자외선 멸균기 내에서 30분간 멸균했고 제조된 30 ml의 의사체액에 담지 하여 36.5°C에서 일주일간 보관했다. 일주일 후 의사체액에서 꺼낸 시료를 증류수로 세척하고 상온에서 건조한 후 아파타이트의 생성을 관찰했다.

2.3 특성평가

각 시료의 미세구조는 전계방사형 주사전자현미경 (FE-SEM; S-4700, Hitachi)을 이용하여 관찰했고 섬유 직경 분석을 위해 image analyzer (Image J, NIH)를 사용하여 시료 당 500개 이상의 섬유를 측정 후 섬유 직경에 따른 빈도수로 나타냈다. 이때 섬유의 직경은 가장 짧은 대각선의 길이로 정의하여 측정했다.

각 부직포의 열분해 특성은 온도 변화에 따른 시료의 무게 변화를 측정하여 분석하는 thermo-gravimetric analyzer (TGA; TGA Q500, TA Instrument)를 이용하여 측정했다. TGA 분석은 air flowing 100 cm³/min의 조건아래에서 25°C~900°C까지 10°C/min의 속도로 승온하면서 측정했다. 시료 P5050S, P7525S에서 함유된 칼슘실리케이트 섬유가 함유된 상대적인 양은 TGA 측정 후에 시료 S, P5050 그리고 P7525의 잔량을 기초로 하여 계산되었다.

각 시료의 작용기 분석은 적외선 분광광도계 (FT-IR; Spectrum One, Perkin Elmer)를 이용했고 4 cm⁻¹의 분해능으로 시료를 128회 스캔하여

얻어진 누적 값으로 나타냈다. 시료는 미분상태의 시료와 시료대비 200배 무게의 KBr 파우더를 혼합하여 제작한 후 측정했으며 background 노이즈는 순수한 KBr 파우더만 측정한 값으로 보정했다.

부직포에 생성된 결정상은 의사체액 담지 전후의 시료를 X-선 회절분광장치 (Thin Film-XRD; D8 discover, Bruker)를 이용하여 측정했다.

시료의 용해 특성을 측정하기 위해 시간 별로 의사체액 내 녹아난 칼슘, 인, 실리콘 이온의 원자학적 농도를 inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES; Optima-4300 DV, Perkin Elmer)를 이용하여 측정했다.

시료의 담지 시간에 따른 의사체액의 pH는 pH미터 (DK-20, Horiba)를 이용하여 각 시간마다 5개의 시료를 측정했고 그 값을 평균과 표준편차를 이용하여 나타냈다.

3. 실험결과

Fig. 26은 전기 방사된 부직포의 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 사진이고 ((a) S (b) P5050 (c) P7525 (d) P5050S (E) P7525S), Fig. 27는 그룹별 섬유직경의 상대분포를 나타낸 결과이다. 시료 S에서 칼슘실리케이트 섬유의 직경은 0.2~2.2 μm 분포를 보였고 그 평균은 0.6 μm 로 측정되었다. P5050 시료에서 PLGA 섬유의 직경은 0.7~5.5 μm 사이, 평균은 2.3 μm 였고 P7525 시료에서는 0.7~5.6 μm 사이의 분포, 평균은 2.4 μm 로 측정되었다. 시료 P5050S에서 칼슘실리케이트 섬유와 PLGA 섬유의 직경은 0.2~4.7 μm 사이의 분포를 보이고 평균은 1.9 μm 였으며 시료 P7525S에서는 직경이 0.1~7.7 μm 사이의 분포를 보이고 평균은 1.4 μm 로 측정되었다.

Fig. 28은 각 시료의 열분해 특성 측정 결과이다. 시료 S에서 급격한 무게 감소는 약 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 나타났으며 이후에는 900 $^{\circ}\text{C}$ 까지 점차적인 무게 감소가 있었다.

시료 P5050, P7525, P5050S 그리고 P7525S에서 240 $^{\circ}\text{C}$ 근처에서 급격하게 무게 감소가 일어났으며 420 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 온도에서는 추가적인 무게감소가 보이지 않았다. 각 그룹의 시료 잔량율은 시료 S와 P5050, P7525, P5050S, P7525S에서 각각 66, 1, 0, 44 그리고 37%를 보였다.

Fig. 29는 각 시료의 TF-XRD를 통한 상 분석 결과를 보여준다. 모든 시료에서 완만한 hollow 피크를 제외하고 어떠한 결정상도 관찰되지 않았다.

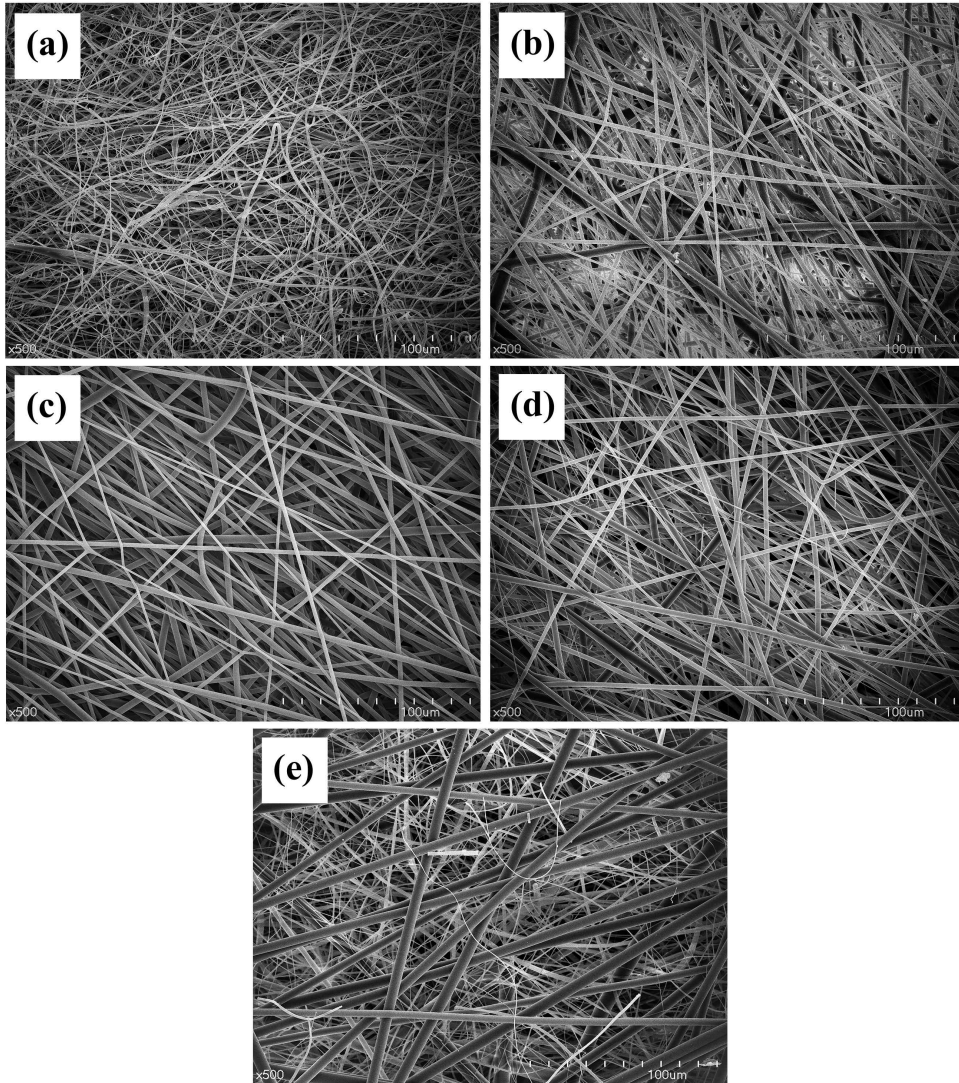


Figure 26. FE-SEM images of specimens (a) S, (b) P5050, (c) P7525, (d) P5050S, and (e) P7525S.

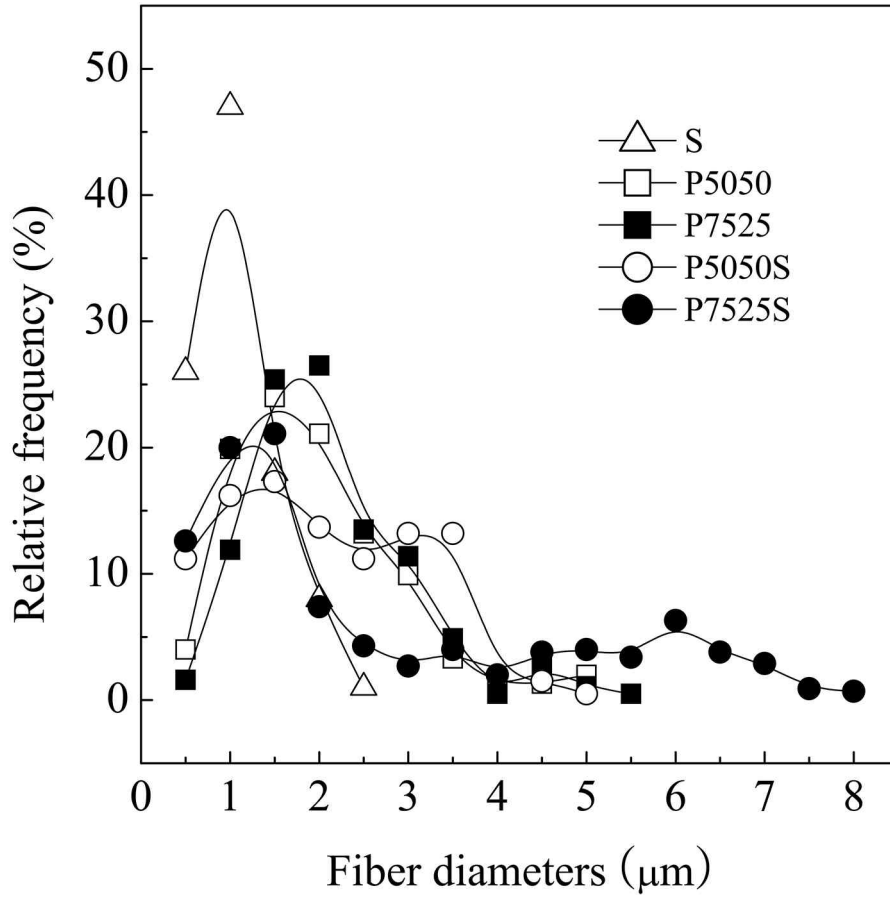


Figure 27. Relative frequency of fiber diameters of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S.

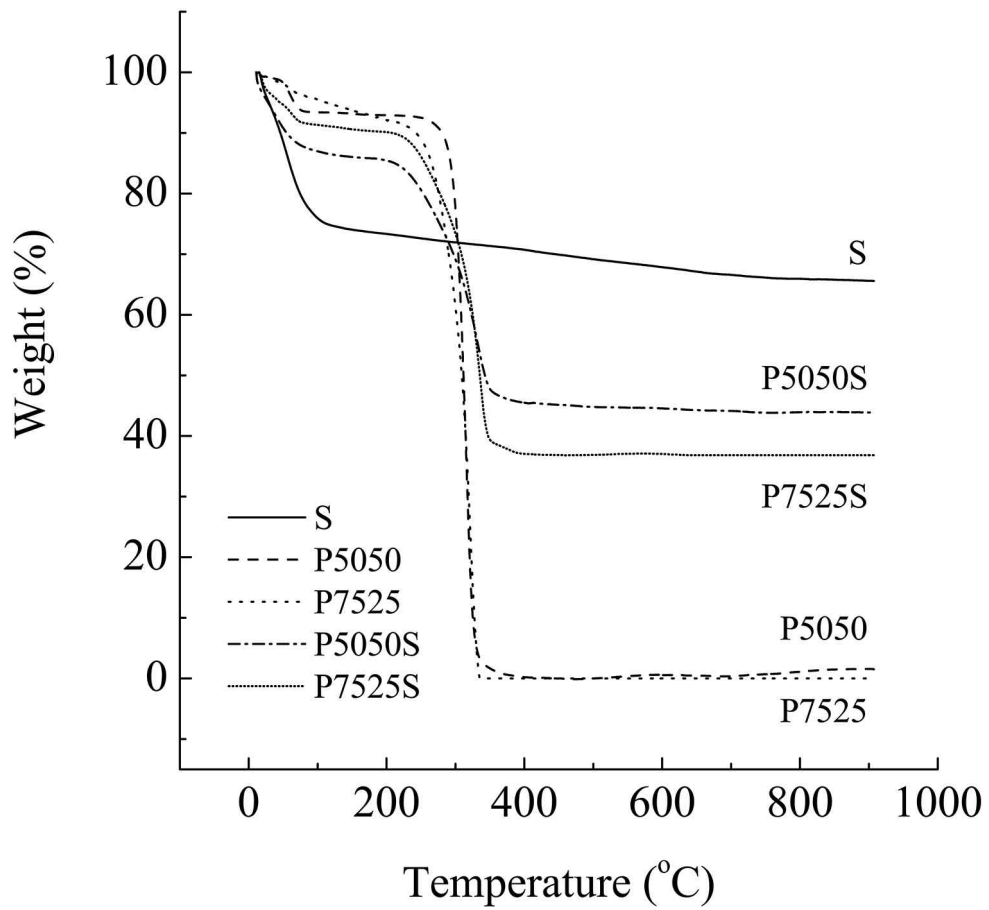


Figure 28. TGA thermograms of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S.

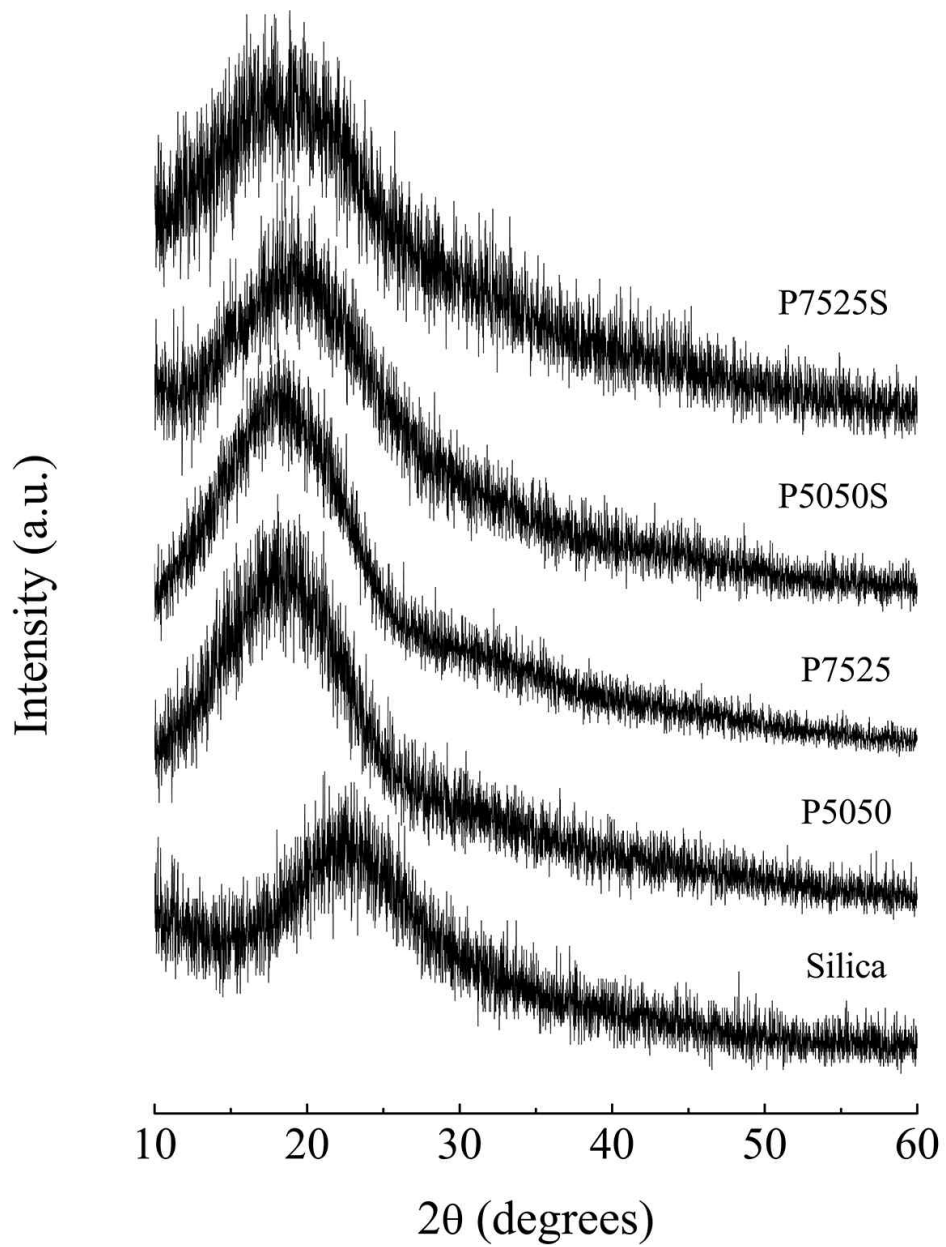


Figure 29. TF-XRD patterns of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S.

Fig. 30는 시료 S, P5050, P7525, P5050S, P7525S의 FT-IR 흡수스펙트럼을 이용한 작용기 분석결과를 보여준다. 시료 S, P5050S 그리고 P7525S에서 si가 포함된 작용기가 관찰되었다. 799 cm^{-1} , 951 cm^{-1} 에서 Si-O-Si symmetric stretching 과 Si-OH asymmetric stretching 피크가 관찰되었으며⁶⁶ 1099 cm^{-1} 에서 Si-O-Si asymmetric stretching 피크를 보였다. 또한, $\sim 1634\text{ cm}^{-1}$, 3435 cm^{-1} 에서 H₂O에 해당하는 흡수 피크가 확인되었으며⁶⁶ $\sim 1731\text{ cm}^{-1}$, 2869 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} 에서 C=O와 CH₂의 symmetric, asymmetric stretching 피크를 각각 확인했다.

Fig. 31은 시료를 의사체액에 일주일간 담지한 후 주사전자현미경으로 미세구조를 관찰한 결과이다. 시료 S와 P7525S에서는 PLGA를 포함한 모든 섬유가 완전히 아파타이트로 코팅된 반면 시료 P5050, P7525, P5050S에서는 어떠한 섬유도 아파타이트 코팅이 되지 않았다. 그러나 특이하게도 P5050S시료에서 섬유의 표면에 흰색 결정들이 관찰되었으나 상 분석 결과에서 어떠한 상도 측정되지 않았다 (Fig. 7). 따라서 EDS를 이용하여 결정의 원소를 분석한 결과 Si, Ca, O 원소가 측정됨으로써 이 결정은 칼슘실리케이트의 잔량으로 간주된다. 또한 초기에 길이가 긴 칼슘실리케이트 섬유들이 의사체액 담지 후 짧은 섬유로 끊어져 있었다. 특히 주목해야 할 점은 아파타이트 형성이 보이지 않는 시료 P5050, P7525 그리고 P5050S에서 섬유의 팽윤과 말리는 현상이 관찰된 것이다. 팽윤과 말림은 대부분 시료 P5050에서 일어났고 3개의 시료 중 P5050S에서 가장 적게 일어났다. 특히 P5050 시료에 있던 3차원 연결기공이 PLGA 5050 섬유의 팽윤에 의해 완전히 막혔다.

Fig. 32은 시료의 의사체액 담지 일주일 후 TF-XRD를 이용한 상 분석 결과이다. 저 결정성 아파타이트가 시료 S와 P7525S에서 관찰된 반면에 시료 P5050, P7525, P5050S에서는 관찰되지 않았다. 이처럼 TF-XRD 결과는 미세구조의 결과와 일치함을 보인다.

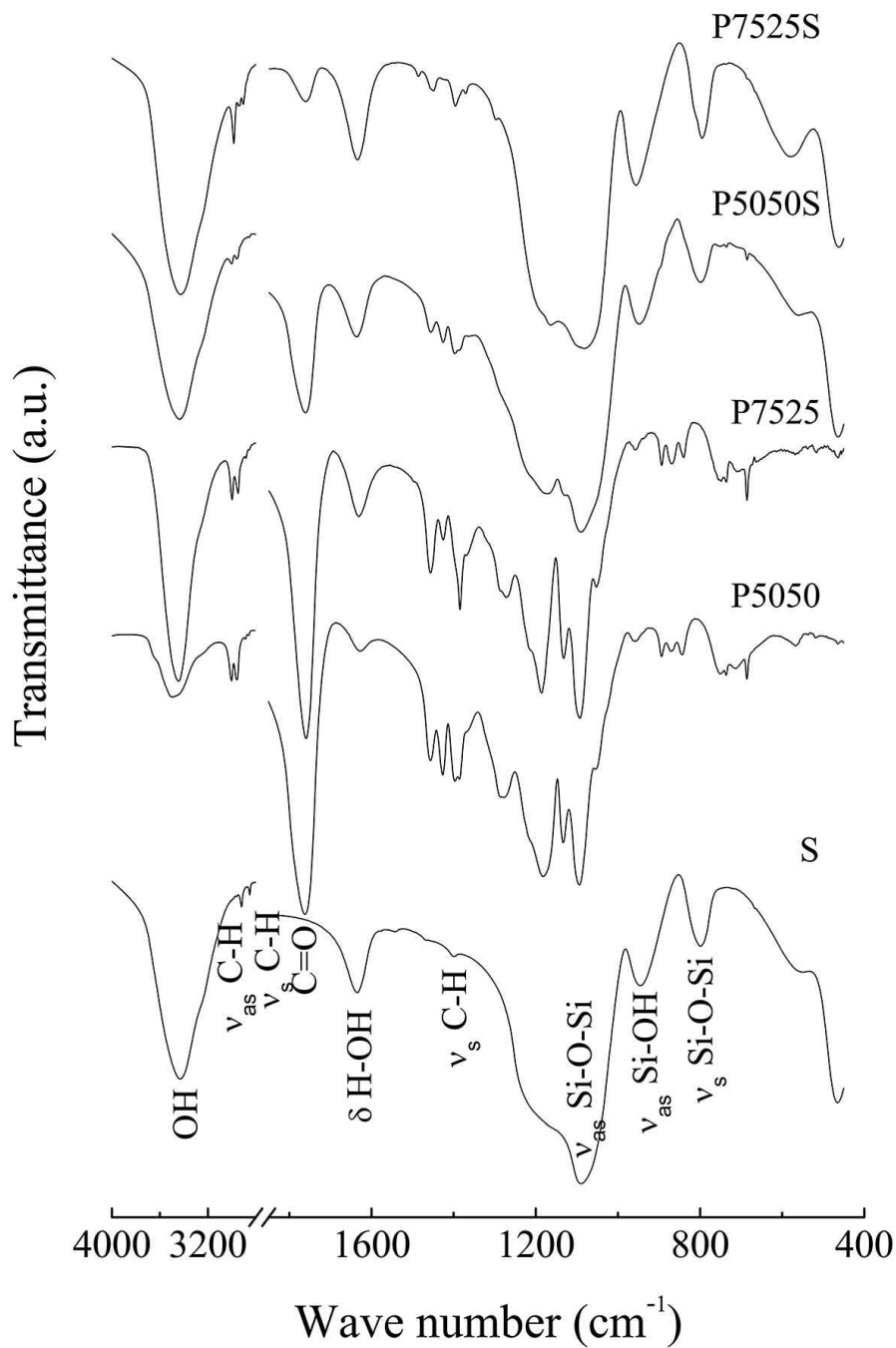


Figure 30. FT-IR spectra of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S.

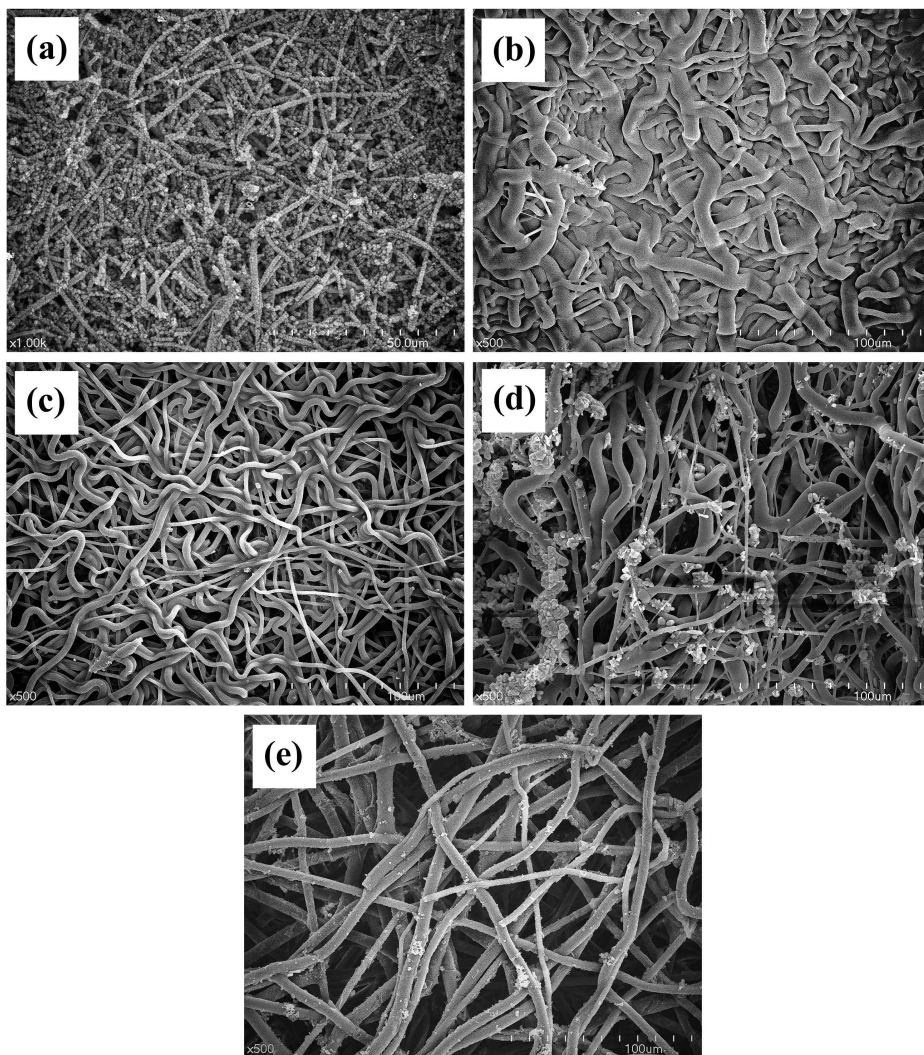


Figure 31. FE-SEM images of specimens (a) S, (b) P5050, (c) P7525, (d) P5050S, and (e) P7525S after soaking in SBF for 1 week.

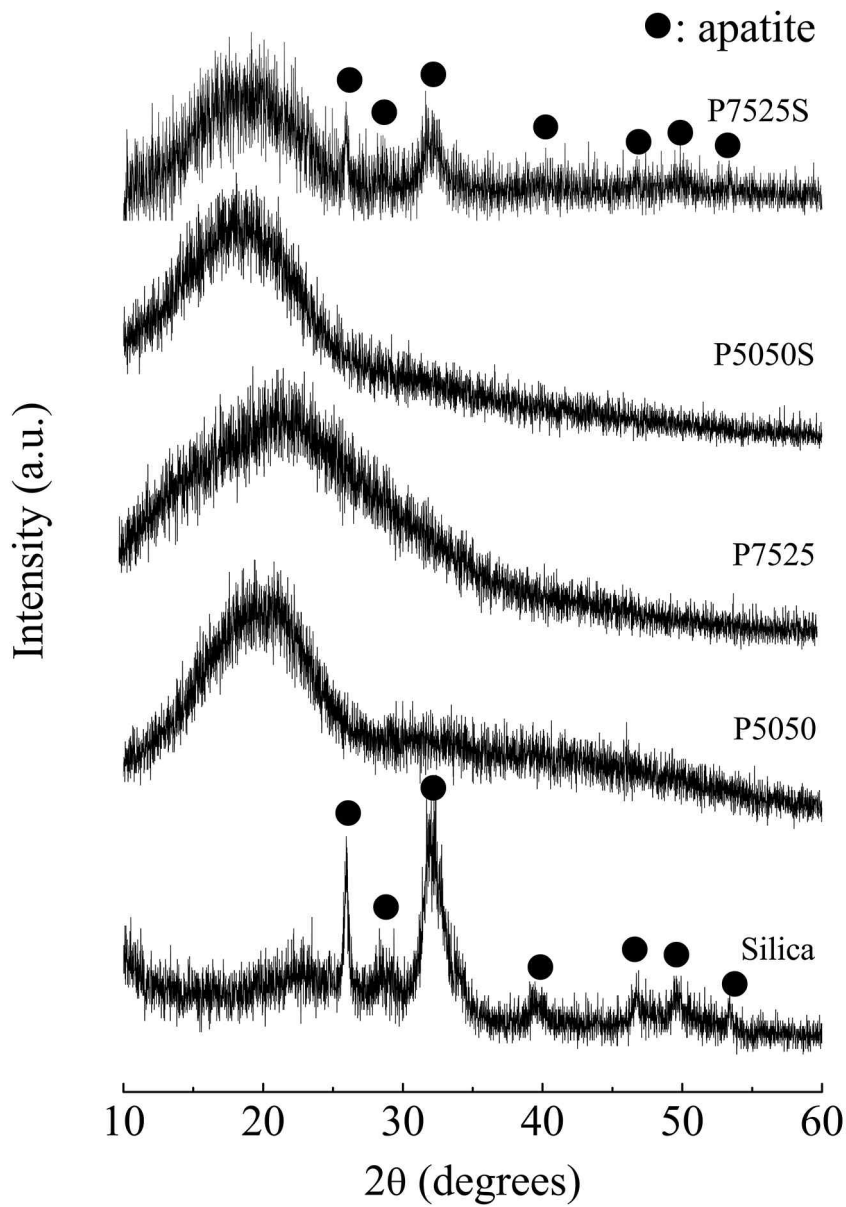


Figure 32. TF-XRD patterns of specimen S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S after soaking in SBF for 1 week.

Fig. 33은 시료를 의사체액에 담지 한 후 시간에 따른 pH의 변화와 칼슘, 인 그리고 실리콘 이온의 농도 변화를 보여준다. 시료 S와 P7525S에서 칼슘 이온의 농도는 6시간 후 최솟값을 보이고 점차적으로 감소한 반면, 시료 P5050과 P7525에서는 칼슘이온이 측정되지 않았다. 시료 P5050S는 점차적으로 칼슘 이온의 농도가 증가했고 연구기간 내에 감소는 보이지 않았다. 이와 유사하게 시료 S와 P7525S에서 인의 농도는 담지 초기부터 감소한 반면 시료 P5050, P7525, P5050S는 어떠한 변화도 나타나지 않았다. 이러한 경향은 실리콘에서도 동일하게 관찰되었는데 시료 S와 P5050S, P7525S에서는 담지 기간이 늘어날수록 실리콘 농도가 점점 증가하였으나 시료 P5050, P7525에서는 실리콘이 관찰되지 않았다. 시료 S와 P7525S의 pH는 3시간후 가장 높은 값을 보였고 그 이후에는 점차적으로 감소했다. 시료 P7525S의 pH는 시험기간 동안 변화가 없었으며 시료 P5050과 P5050S는 점차적으로 pH가 감소했다.

Fig. 34는 의사체액 내의¹¹ 아파타이트 이온화활동도적(IAP)을 보여준다. 시료 S와 P7525S는 3시간 후 가장 높은 IAP 값을 보였고 그 이후에 점차 감소했다. 그러나 시료 P5050, P7525는 어떠한 변화도 보이지 않았으며 시료 P5050S의 IAP 값은 점차적으로 증가하였으나 그 증가량이 매우 미미했다.

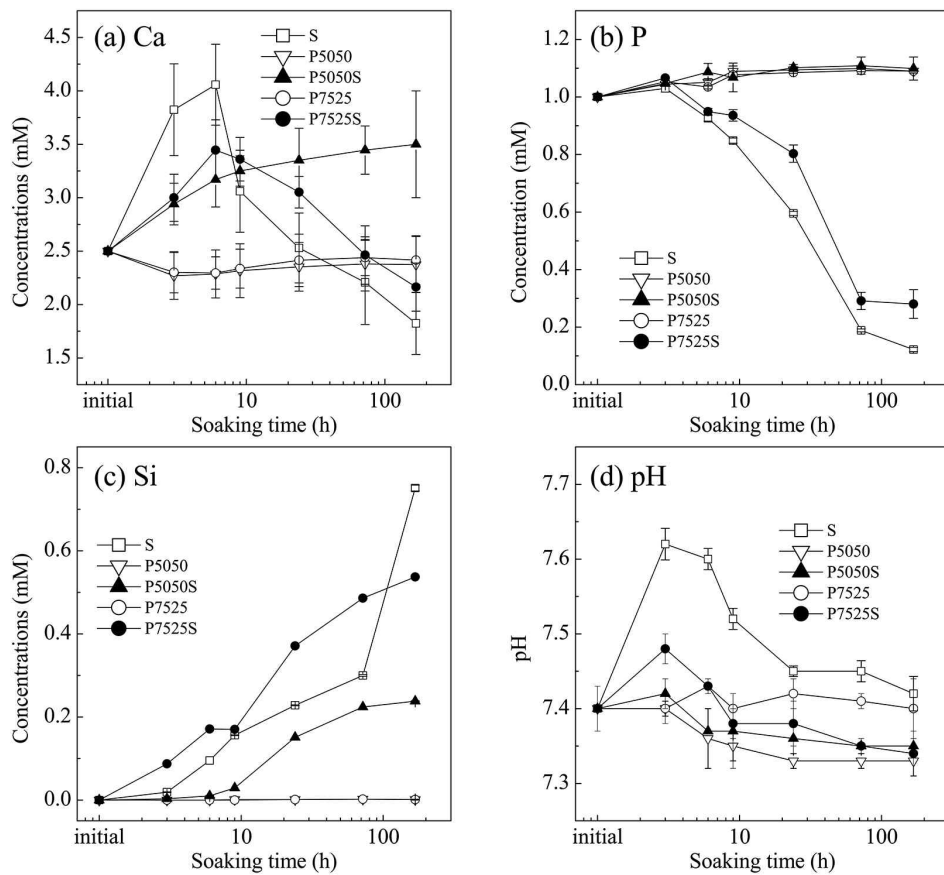


Figure 33. Changes in elemental (a) calcium, (b) phosphorous, and (c) silicon concentrations, and (d) pH of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S after different soaking periods in SBF.

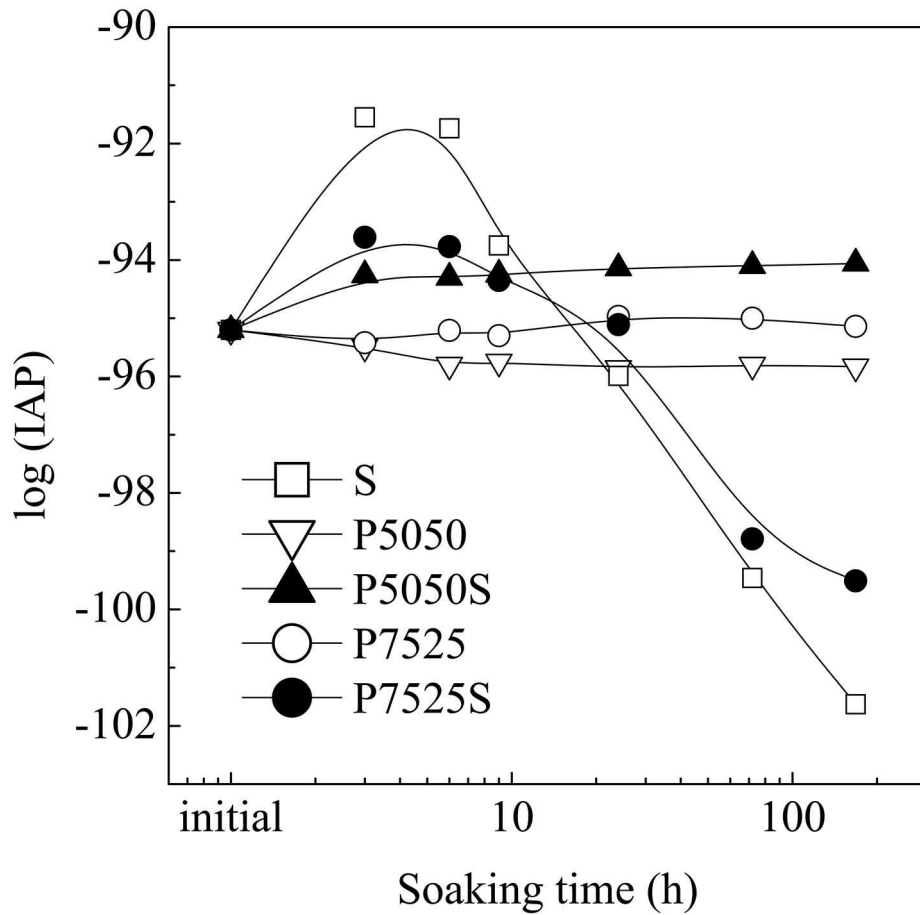


Figure 34. Changes in ionic activity products of apatite in SBF due to the immersion of specimens S, P5050, P7525, P5050S, and P7525S.

4. 고찰

우리는 생분해성 PLGA의 분해속도가 동시 전기방사법으로 제조된 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포의 아파타이트 형성에 미치는 영향에 관하여 연구했다. *In vivo*에서 PLGA가 분해되면 글리콜산이나 젖산과 같은 분해산물이 생체의 대사 사이클에 포함되어 인체에 무해하게 배출되는 것으로 알려져 있으나 사실 그들의 산성 성질 때문에 국부적인 염증을 일으킨다는 보고도 있다. 우리는 이전 연구에서 PLGA의 산성 분해산물이 의사체액 내에 있는 PLGA/Organosilioxane 나노하이브리드 재료의 아파타이트 형성을 방해하는 것을 확인했다.¹²⁶ 실제로 분해속도가 빠른 PLGA를 이용한 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포는 의사체액 내에서 아파타이트의 형성을 보이지 않았으나 분해도가 낮은 PLGA에서는 아파타이트 결정이 형성됨을 확인했다. 이러한 결과로부터 PLGA 단량체의 조성비는 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포의 아파타이트 형성 능력에 결정적인 영향을 주는 것으로 생각된다.

의사체액 내에서 SiO₂ - CaO 섬유에 생성된 아파타이트 결정은 실라놀 그룹의 음전하에 의한 불균일 핵 생성으로부터 발생되었다. SiO₂ - CaO 섬유가 의사체액 내에 담지 되었을 때 의사체액 안으로 칼슘이온이 용해되고 전하보상을 위해 연결되지 않은 산소와 물의 수소이온이 결합되면서 물에 있던 남은 수산화 이온의 절대 양이 증가하게 된다.^{11,74} 이로 인해 의사체액의 pH가 증가하게 되고 그것은 아파타이트의 이온화활동도적을 증가시키게 된다. 의사체액 내에서 아파타이트의 과포화 정도가 핵 생성을 위한 한계치를 넘어서게 되면 아파타이트는 핵 생성을 시작하게 되고 그 후 의사체액 내에서 자연스럽게 결정이 성장하게 된다.

시험기간 동안 시료 P5050S의 칼슘이온은 지속적으로 방출된 반면, 시료 S 와 P7525S에서는 일정시간까지 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 실리콘의 경우에는 시료 S와 P5050S 그리고 P7525S에서 시간이

지남에 따라 점차적으로 방출되는 농도가 증가했다.

이 두 가지 ICP-AES 결과는 아파타이트 형성 메커니즘이 시편 P5050S에서도 제대로 작용되었음을 보여준다. 시료 S와 시료 P7525S에서 이온화활동도적을 높이는 증폭제로 사용된 칼슘 이온과 아파타이트의 핵 생성 사이트로 작용되는 실라놀 그룹을 생성하는 실리케이트 이온이 방출되듯이 P5050S에서도 칼슘과 실리콘 이온이 방출되고 있기 때문이다. 그러나 아파타이트 결정이 성장하는 동안 감소해야 하는 인의 농도가 시료 S와 시료 P7525S에서 감소한 반면 시료 P5050S에서는 감소하지 않았다. 또한 의사체액의 pH는 칼슘이온의 방출과 함께 초기에는 증가하다가 아파타이트가 생성되면 감소해야 하는데 실제로 시료 S, P7525S와는 다르게 시료 P5050S를 담지한 의사체액의 pH는 초기부터 감소했다. 이러한 결과는 시료 P5050S에서 칼슘과 실리케이트 이온은 지속적으로 나오나 인의 감소가 일어나지 않았기 때문에 아파타이트가 수산화 그룹의 오작동에 의한 메커니즘에 따라 형성되지 않는 것을 의미한다.

의사체액에 시료를 담지하자마자 pH가 낮아지고(Fig. 33(d)) PLGA 섬유가 부풀 것으로(Fig.31) 보아 우리는 담지 기간 동안 PLGA 섬유가 분해되었음을 추측할 수 있다. 실제로 시료 P5050을 담지한 의사체액의 pH가 점차적으로 감소한 반면에 시료 P7525에서는 어떠한 특별한 pH의 변화가 보이지 않았으며 시료 P5050이 시료 P7525보다 더 심하게 부풀었다.

이를 종합적으로 볼 때 시료 P5050의 분해속도가 시료 P7525 보다 빠르기 때문에 글리콜산이나 젖산과 같은 높은 농도의 산성 분해물이 생성되었음을 시사한다. 그러나 시험기간 동안 의사체액의 pH가 실제로 아파타이트의 형성을 방해할 만큼 충분히 낮지 않다는 점에 주목해야 한다. 일반적으로 아파타이트는 pH 5.6 이하에서 용해되어지는 것으로 알려져 있다.

우리의 이전 연구에서 보고된 것처럼¹²⁶ 측정된 pH는 의사체액 전체의

평균값을 보여주기 때문에 이것은 실제로 분해가 일어나는 PLGA 섬유 부근의 pH를 나타내지 못한다는 것을 의미한다. PLGA 섬유의 분해에 의해 발생하는 산 분해산물이 우선 국부적으로 pH를 감소시키고 그 이후에 점차적으로 전체 용액으로 확산된다. 의사체액에 담지 후 심하게 팽윤된 PLGA 섬유는[Fig. 31(b,c)] 이러한 가설을 뒷받침해 준다. 게다가 시료 P5050의 팽윤정도가 시료 P7525보다 심하기 때문에 이것은 시료 P5050S가 시료 P7525S보다 더 빠르게 분해됨을 시사하고 그것은 아파타이트의 생성을 방해할 것이다.

실제로 많은 종류의 전기 방사된 생체활성, 생분해성 세라믹/고분자 복합형 부직포가 보고되어 왔으나^{86,88,109-123} 어느 연구도 산성 분해산물이 아파타이트 형성을 방해한다는 보고는 없었다. 왜냐하면 기존 연구에서는 분해속도가 느린 고분자만 사용했기 때문에 이것을 관찰할 기회가 적었다. 또한 organosiloxane 그룹을 가진 변형 PLGA에서도 동일한 현상이 관찰된 점을 주목해야 한다.¹²⁶

종합적으로 분해가 빠른 고분자는 생체 내에서 빠르게 산성 분해산물을 생성하고 이는 생체활성과 생분해성을 가진 고분자/세라믹 복합형 부직포의 초기 아파타이트 생성을 방해할 수 있다. 따라서 생체활성과 생분해성을 가진 복합형 부직포를 골 충전재나 골 조직 공학적 지지체로 이용할 때에는 생분해성 고분자의 선택에 있어서 주의가 요구된다.

5. 결론

우리는 PLGA의 분해속도가 전기방사로 제조된 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포의 아파타이트 생성에 영향을 줄 수 있다는 것을 입증했다. 분해가 빠른 PLGA를 이용한 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포는 의사체액 내에서 아파타이트의 핵 생성이 유도되는 충분한 과포화 상태임에도 불구하고 아파타이트 결정이 생성되지 않았다.

반대로 분해가 느린 PLGA 섬유를 이용한 시료에서는 아파타이트 핵 생성을 보였다. 의사체액 내 pH 감소와 시간에 따른 팽윤을 통해 우리는 PLGA/SiO₂ - CaO 복합형 부직포의 아파타이트 생성능이 PLGA의 분해속도와 밀접하게 연관되어 있는 것으로 판단하였는데 그 이유는 산성 분해산물이 직접적으로 아파타이트의 용해에 영향을 주기 때문이다. 이러한 이유로 생체활성과 분해능을 가진 복합형 부직포를 골 충전재나 조직 공학적 지지체로 사용할 때 생분해성 고분자의 선택에 있어서 주의가 요구된다.

VI. PVA-칼슘염 전달체 시스템을 이용한 아파타이트 코팅법 연구

1. 서 론

골 충전재 재료의 개발에 있어서 가장 주요한 목표 중에 하나는 생체 내에서 재료의 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트를 생성시키는 생체활성을 부여하는 것이다. 왜냐하면 생체활성을 가진 저 결정성 수산화 탄산 아파타이트는 탁월한 골 전도성을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문이다.^{10,127} 그 결과 사람의 혈장과 유사한 이온 농도로 제조된 의사체액 내에서⁹³ 생체활성 물질의 표면에 생성되는 아파타이트 형성 메커니즘을 밝히는 많은 시도가 있었다.^{7,11,74,128} 생체활성 물질의 표면에 아파타이트가 형성되는 첫 번째 단계는 특별한 핵 생성 사이트에 칼슘이온이 킬레이트 되는 것인데 실리카를 기반으로 한 생체유리의 경우에 이 핵 생성 사이트는 실라놀 그룹이다.^{12,129,130} 그 이후에 인, 수산화, 탄산, 그리고 칼슘이온의 흡수에 의해 일정한 크기로 균집을 형성하고 그 결과 3차원적인 균집은 아파타이트의 결정을 위한 핵의 역할을 한다. 핵 생성 이후에 아파타이트의 과포화 농도 상태인 의사체액 때문에⁹³ 아파타이트 결정은 순차적으로 성장하게 된다. 사실, 많은 실리카 기반의 생체활성 유리-세라믹이 발달되어왔는데^{9,10,127,131} 그들 중 몇몇은 골 충전재로써 유용하게 사용되고 있다.^{10,127} 그러나 세라믹의 취성 때문에 힘이 가해지지 않은 곳이나 약하게 힘이 가해지는 부분으로 임상에서의 사용이 제한되고 있다.^{132,133} 그러므로 생체활성 유리나 세라믹과 비교하여 파단저항이 향상된 새로운 생체활성 물질이 필요하다.^{10,14,15,105,134-144}

생체활성 세라믹 분말과 연성의 고분자 상으로 구성된 벌크 형태의 복합체는 인공적인 골 충전재로써 적합할 것으로 생각된다. 왜냐하면 뼈는

나노 크기의 수산화 탄산 아파타이트 결정과 콜라겐 섬유로 구성되어 있기 때문이다.⁶ 좋은 골 전도성과 기계적 물성을 가진 많은 생체활성 세라믹/고분자 복합체가 발달되어 왔다.^{10,14,15,105,133-140-142-146} 그러나 생체활성 복합체에도 몇몇의 단점을 가지고 있다. 예를 들면 고분자에 마이크로 크기의 생체활성 세라믹 분말을 혼합하는 과정에서 고분자 매트릭스 내에 세라믹 분말을 균일하게 분산시키는 것이 어렵다. 또한 세라믹 분말의 함량을 증가시키는 것은 더 복잡한 혼합과정이 필요하며 세라믹 분말이 복합체의 표면에 노출되는 양도 미미하다. 따라서 다른 젖음성을 가진 두 개의 상으로부터 상 분리 문제를 해결하는 것은 어렵다. 마이크로 복합체의 공정에서 발생하는 이러한 문제는 졸-겔 반응을 이용한 나노복합체 제조공정으로 최소화시킬 수 있다.^{14,15,143,147-149} 그러나 나노복합체 구조에서 발생하는 새로운 화학적 결합은 임상적인 사용에 있어 안전성이 검증되지 않았다.

단지 복합체의 표면만이 골 결손부의 조직과 접촉되기 때문에 단일 기계적 물성과 안정성이 만족된다면 저 결정성 수산화 탄산 아파타이트가 코팅된 고분자 복합체는 골 충전재로써 매우 좋은 역할을 할 것이다.

실제로 고분자 표면에 저 결정성 수산화 탄산 아파타이트 층을 코팅하기 위한 많은 시도가 있었다.^{17,34,70,90,91,100,150-170} 초기에는 의사체액 내에 고분자 물질의 아래에 생체활성 유리 입자를 놓아 생체활성 유리로부터 용해된 실리케이트 이온 (실라놀 그룹)이 고분자의 표면에 부착되도록 했다.^{100,152,154,155,158,159} 이 고분자의 표면에 부착된 실라놀 그룹은 아파타이트의 핵 생성 사이트로 작용했고 높은 농도의 의사체액에 담지 하였을 때 성공적으로 빠르게 아파타이트 결정이 성장했다.

이 방법은 직접적으로 고분자 표면에 실란 커플링 에이전트를 이용하여 핵 생성 사이트로써의 실라놀 그룹을 고정하는 방법으로 수정되었다. 그리고 의사체액 내에서 아파타이트 형성을 가속화시키기 위해 칼슘이온을 추가했다. 그 다음에 칼슘염과 실리콘 알콕사이드로부터 제조된 칼슘 실리케이트 용액에 반응시켰다.^{160,167} 더 발전된 교정은 칼슘염이 포함된

고분자 표면에 실란 커플링 에이전트가 결합된 이후에 수화가 수행되어졌다.⁷⁰ 그리고 더 나아가 칼슘과 인 이온 용액에 고분자 물질을 담지 했다.^{156,157,164,165} 아파타이트에 대해 과 포화된 용액 내에서 고분자 표면에 아파타이트의 불균일 핵 생성과 성장을 유도도 보고되어 왔다.^{34,162,169}

위에 기술된 이러한 방법들은 고분자 표면에 아파타이트 결정을 코팅 하는데 적합하지만 모두 복잡하고 많은 시간이 걸린다. 여기서 우리는 칼슘이온을 운송할 수 있는 poly(vinyl alcohol) (PVA) 전달체 시스템을 이용하여 고분자 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트를 코팅하고자 한다. 칼슘 킬레이트와 PVA의 부착성질은 PVA가 효율적으로 고분자 표면에 칼슘이온을 운송하고 아파타이트 결정의 생성을 유도할 수 있는지에 대해 실험되었다. 골 대체재로 응용을 위해 우리는 전기 방사된 생분해성 PLGA 부직포에 아파타이트 결정을 코팅했다. 왜냐하면 그것은 연결기공 구조를 가지고 있고 적합한 기계적 물성과 적절한 분해도 그리고 골 전도성을 부여할 수 있기 때문이다.

2. 실험 방법

2.1 시편의 준비 및 방법

Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50:50 (PLGA, 10 wt%; RESOMER[®] RG509S, Boehringer-Ingelheim)를 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Across Organics) 용매에 10 wt%의 농도로 녹인 후 상온에서 12 시간 이상 교반하여 PLGA 전기방사 용액을 제조했다. 고전압장치를 이용하여 직경 16 게이지의 스테인리스 스틸 주사기 바늘과 원형 금속 집진기 사이에 20 kV의 전압을 인가했고 거리는 20 cm로 고정하여 1 kV/cm의 전기장을 생성했다. 이때 PLGA 용액은 주사기 펌프를 이용하여 3.0 ml/h의 속도로 원형 금속 집진기에 방사되었고 원형 금속 집진기의 회전 속도는 2 m/s로 고정하여 용매의 휘발을 용이하게 했다. 방사된 PLGA 부직포는 잔류 용매를 휘발시키기 위해 후드에서 24 시간 건조시킨 후 디스크 형태로 잘라 (12mm 직경 x 1mm 두께) 사용했다. PLGA 부직포는 시료 P로 명명했다.

PVA 전달체와 칼슘이온으로 구성된 PVA-Ca 코팅 용액을 제조하기 위해, PVA (MW: 148000; Sigma-Aldrich) 분말을 증류수에 2.4 wt%의 농도로 녹인 후 제조된 10 ml PVA 용액에 4 M의 농도로 염화칼슘 2수화물 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Junsei Chemical)을 첨가했다.

시편 P위에 PVA-Ca 용액을 30 ml씩 코팅한 후 1일간 진공오븐 내에서 건조했다. 이렇게 제조된 시편을 PPC라 명명했다. 비교 군으로 PVA가 없는 4M의 칼슘용액을 시편 P에 코팅했고 이를 PC 시편이라 명명했다.

2.2 아파타이트 결정의 코팅

우리는 의사체액(simulated body fluid, SBF)의 제조를 위해 증류수에 NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₃ · 3H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂, NaSO₄를 용해시킨 후 Tris-buffer 용액 (Tris(Hydroxymethyl) aminomethane, H₂NC(CH₂OH)₃)과 1N의 염산용액을 가하여 36.5°C에서 pH7.4의 완충용액을 이루도록 했다. 각 시편 P, PC, PPC는 30분간 UV멸균 한 후 30ml 의사체액 내에 매달아 시간별로 (3, 6, 9, 12 시간, 1, 3, 7 일) 담지했다. 담지 후 모든 시료는 용액에서 제거하여 증류수로 세척한 후 상온에서 건조했다.

2.3 특성분석

각 시료의 미세구조는 전계방사형 주사전자현미경 (FE-SEM; S-4700, Hitachi)을 이용하여 관찰했고 Image analyzer (Image J, NIH)를 이용하여 전기방사 된 PLGA 부직포의 섬유직경을 측정했다. 각 시료 당 500 개 이상의 섬유를 측정 후 섬유직경에 따른 빈도수로 나타내었으며 섬유의 직경은 가장 짧은 대각선의 길이로 정의하여 측정했다. 각 시료의 작용기는 적외선 분광광도계 (FT-IR; Spectrum One, Perkin Elmer)를 이용하여 4 cm⁻¹의 분해능으로 시료를 128회 스캔하여 얻어진 평균 값으로 측정했다. 의사체액 담지 전후의 시료의 결정상은 X-선 회절분광장치 (Thin Film-XRD; D8 discover, Bruker)로 측정되었다. 시간에 따른 의사체액 내 녹아난 칼슘, 인, 실리콘 이온의 원자학적 농도를 측정하기 위해서 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES; Optima-4300 DV, Perkin Elmer)를 이용했다. 시료의 담지 시간에 따른 의사체액의 pH는 pH미터 (DK-20, Horiba)를 이용하여 각 시간마다 5개의 시료를 측정했고 그 값을 평균과 표준편차로 나타냈다.

3. 실험결과

Fig. 35은 전기방사법으로 제작된 시편 P의 전자현미경 사진(Fig. 1a)과 섬유 직경 분포(Fig. 35b)를 보여준다. PLGA 섬유는 무질서하게 무작위로 배열되어 있었고 그 직경은 0.5~6 μm 의 분포로 평균 $2.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$ 의 크기를 보였다.

Fig. 36는 PVA, 염화칼슘, PVA-Ca의 적외선 분광기 측정결과이다. PVA는 3414 와 1631 cm^{-1} 에서 각각 OH envelop과 물 변형 피크를 보였다.⁶⁶

1435, 1330 cm^{-1} 에서 OH bending mode⁶⁶, 1238 cm^{-1} 에서 COH bending mode를 보였다.¹⁷¹ 반면에 919 cm^{-1} 에서 CO stretching mode⁶⁶ 피크가 관찰되었고¹⁷¹ 850, 1094 cm^{-1} 에서 CCO stretching mode¹⁷¹가 관찰되었다. 염화칼슘에서는 3414 와 1631 cm^{-1} 에서 OH envelop과 물 변형 피크를 제외하고는 특별한 피크를 보이지 않았다. 그러나 물 변형 피크의 강도가 PVA 것보다 매우 큰 것을 확인할 수 있었다.

반면에 PVA-Ca 구조의 스펙트럼에서는 1435, 1330 cm^{-1} 에서 1412, 1304 cm^{-1} 로 OH bending mode 파수가 적색편이 (red shift)됨이 관찰된 것을 제외하고는 PVA와 염화칼슘을 혼합한 형태의 피크가 관찰되었다.

Fig. 37은 의사체액에 시편 P를 담지 한 후 시간에 따른 (3, 6, 9, 12 h, 1d, 7d) 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 침적 후 6시간 부터 PLGA 섬유가 약간 팽윤된 것을 제외하고 아파타이트 결정의 생성과 같은 특별한 미세구조의 변화는 보이지 않았다.

Fig. 38는 의사체액에 시편 PC를 담지 한 후 시간에 따른 (3, 6, 9, 12 h, 1d, 7d) 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 시편 P와는 달리 시편 PC에서는 담지 9시간 이후부터 PLGA 섬유의 표면에 작은 아파타이트 결정이 생성되었다. 아파타이트 결정의 수는 담지시간이 증가함에 따라 증가했고 1일 후에는 아파타이트 결정이 섬유 표면의 대부분 코팅되었다.

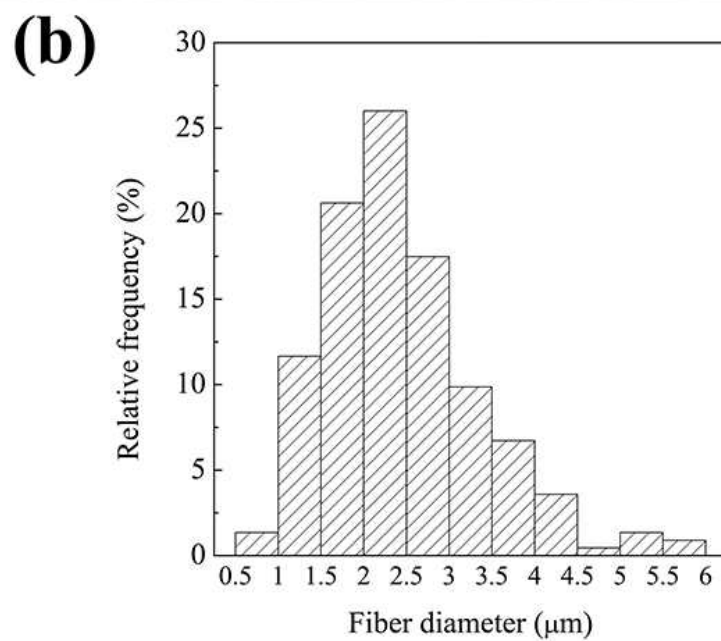
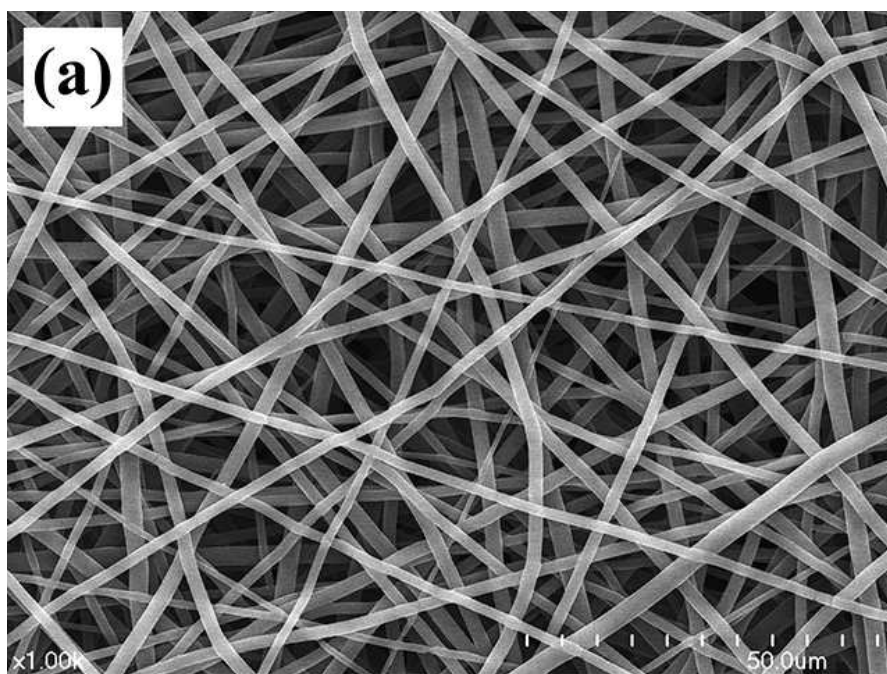


Figure 35. (a) FE-SEM image and (b) fiber size distribution of non-woven PLGA fabric

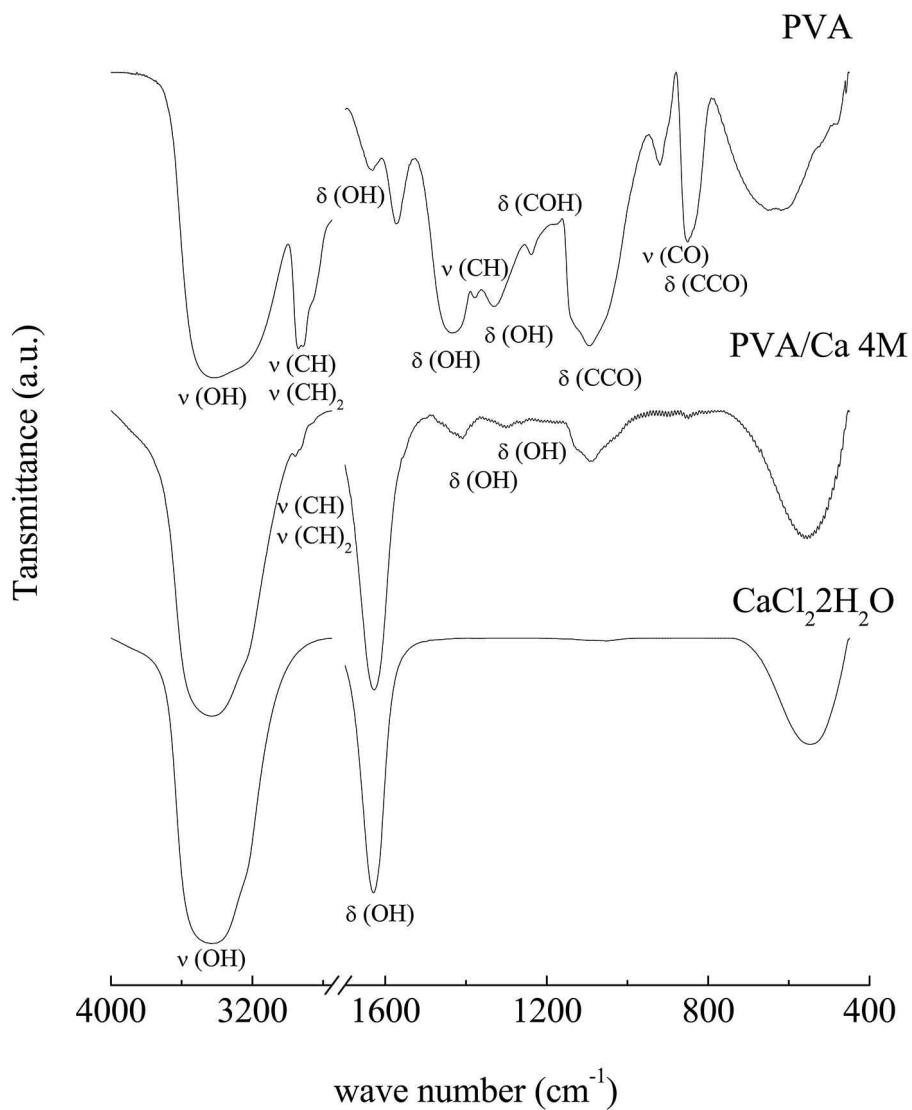


Figure 36. FT-IR spectra of PVA, CaCl₂·2H₂O, and the mixture of PVA and CaCl₂·2H₂O.

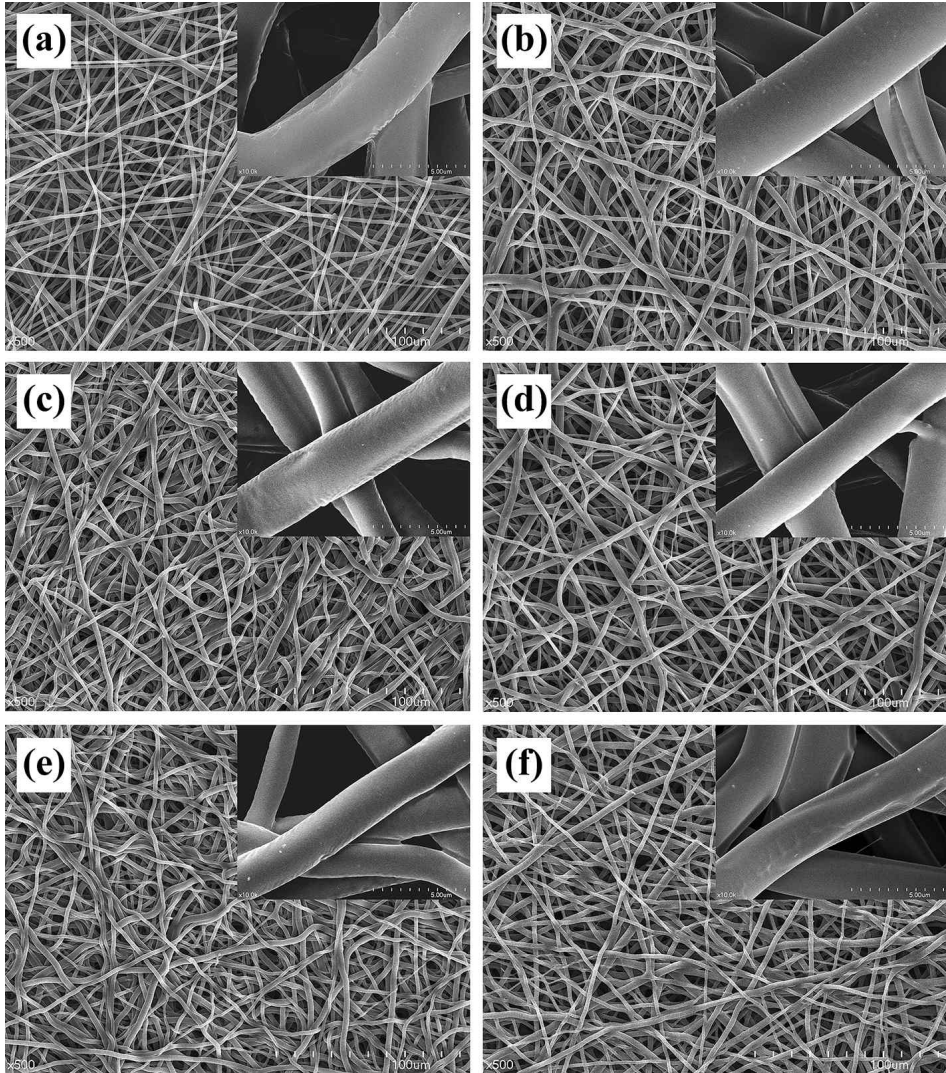


Figure 37. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen P after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.

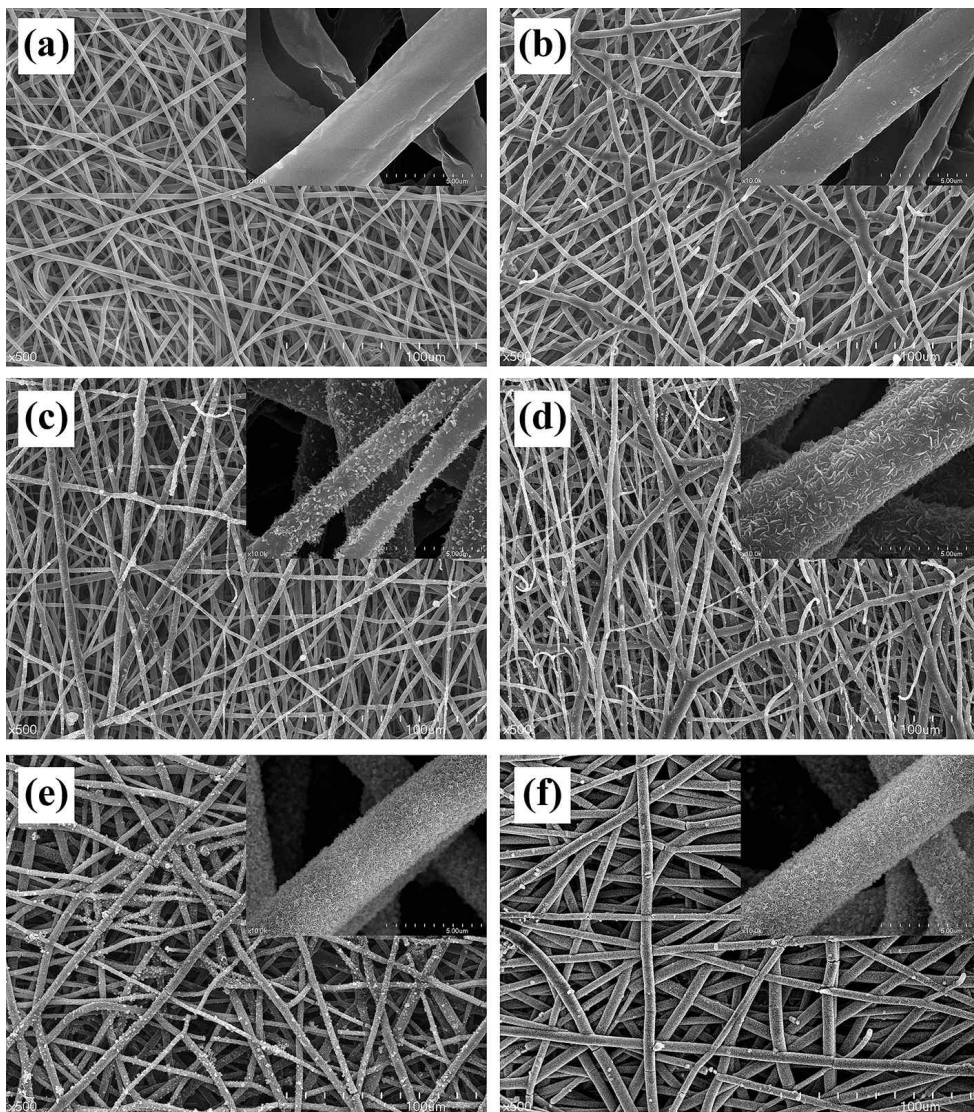


Figure 38. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen PC after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.

Fig. 39는 의사체액에 시편 PPC를 담지 한 후 시간에 따른(3, 6, 9, 12 h, 1d, 7d) 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 담지 6시간 이후부터 수많은 작은 아파타이트 결정이 PLGA 섬유의 표면에 생성되었고 또한 시간에 지남에 따라 그 수가 증가되었다. 또한, 담지 12시간 이후에는 모든 표면에 아파타이트 결정이 코팅되었다.

Fig. 40은 의사체액에 담지 7일 후 각각 Fig. 4,5에서 관찰된 시료 PC와 PPC의 뒷면을 관찰한 사진이다. 시료 PC의 표면은 아파타이트 결정이 완전히 코팅되지 않은 반면 시료 PPC의 표면은 완전히 코팅되어 있음을 확인했다. 이 두 개의 시료는 각각 5개씩 샘플링 하여 미세구조를 관찰한 결과 동일한 현상을 확인했다.

Fig. 41은 의사체액에 시료P, PC, PPC를 담지 후 0, 3, 6, 9,12h, 1d, 7d후에 각 시료의 상을 분석한 결과이다. 저 결정성 아파타이트 상이 시편 PPC와 PC에서 담지 후 6시간, 9시간 후 처음으로 확인되었다. 그들의 피크는 시간이 지남에 따라 점점 높이가 증가되었으며 담지 7일 후 시편 PC보다 PPC시료에서 더 높은 강도로 관찰되었다. 반면에 시편 P의 경우 전 시험기간 동안 어떠한 아파타이트 상도 관찰되지 않았는데 이는 미세구조 분석결과가 이를 뒷받침해준다.

Fig. 42은 시료를 의사체액 침지 후 시간에 따른 pH, 칼슘과 인 이온의 농도변화와 아파타이트에 대한 이온화도적의 변화를 보여준다. 시료 PC와 PPC는 각각 3시간과 6시간 후 칼슘 이온의 농도가 최고조에 도달한 이후 점점 감소한 반면 시료 P는 어떠한 농도 변화도 측정되지 않았다. 시료 PC와 PPC에서 인과 pH의 농도는 담지 시작부터 감소하였으나 시료 P에서는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 의사체액에서 아파타이트에 대한 이온화도적은 시료 PPC를 담지 한 후 3시간 후에 최솟값을 보이고 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소했다. 그러나 시편 PC에서의 아파타이트에 대한 이온화도적은 담지 시작부터 감소하였으며 시편 P에서는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

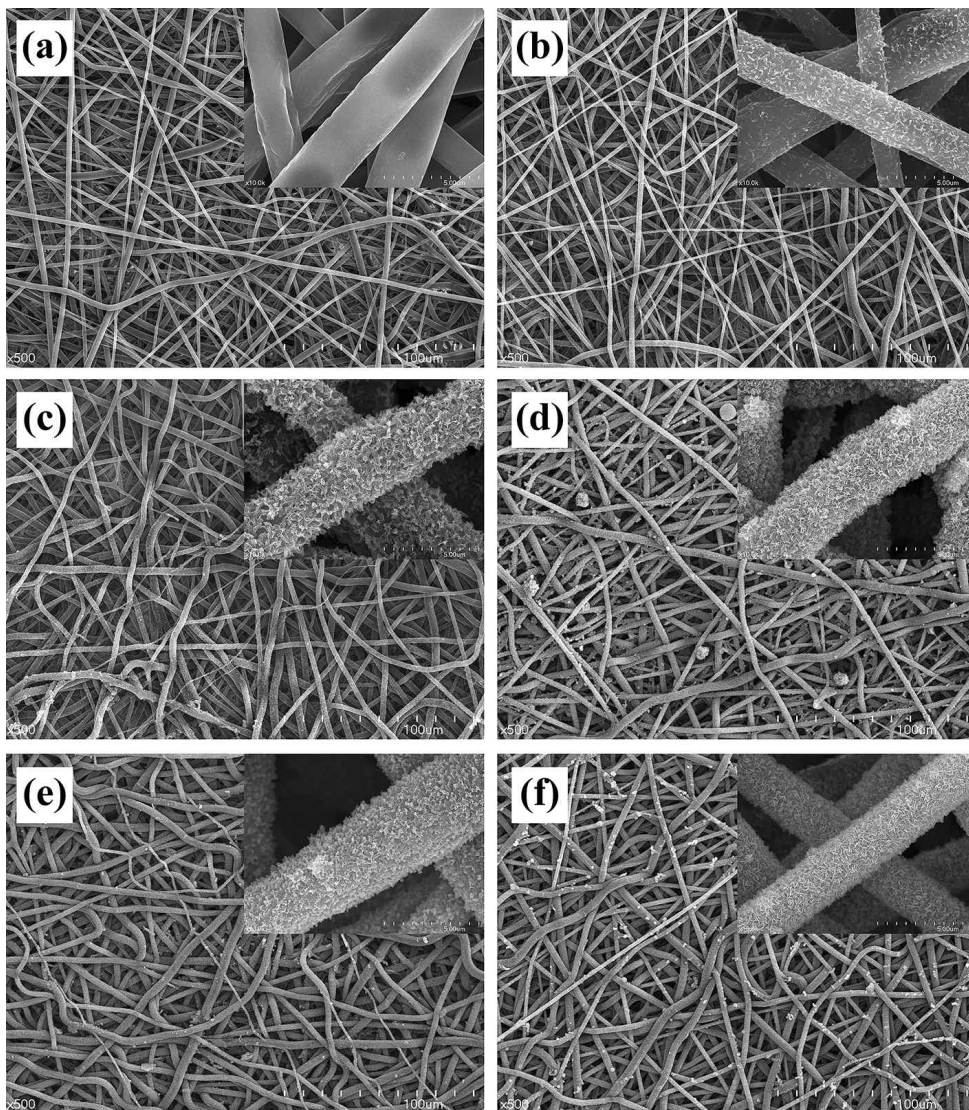


Figure 39. Low- and high-magnification (insets) FE-SEM photographs of specimen PPC after soaking in SBF for (a) 3, (b) 6, (c) 9, (d) 12 h, (e) 1 day and (f) 7 days.

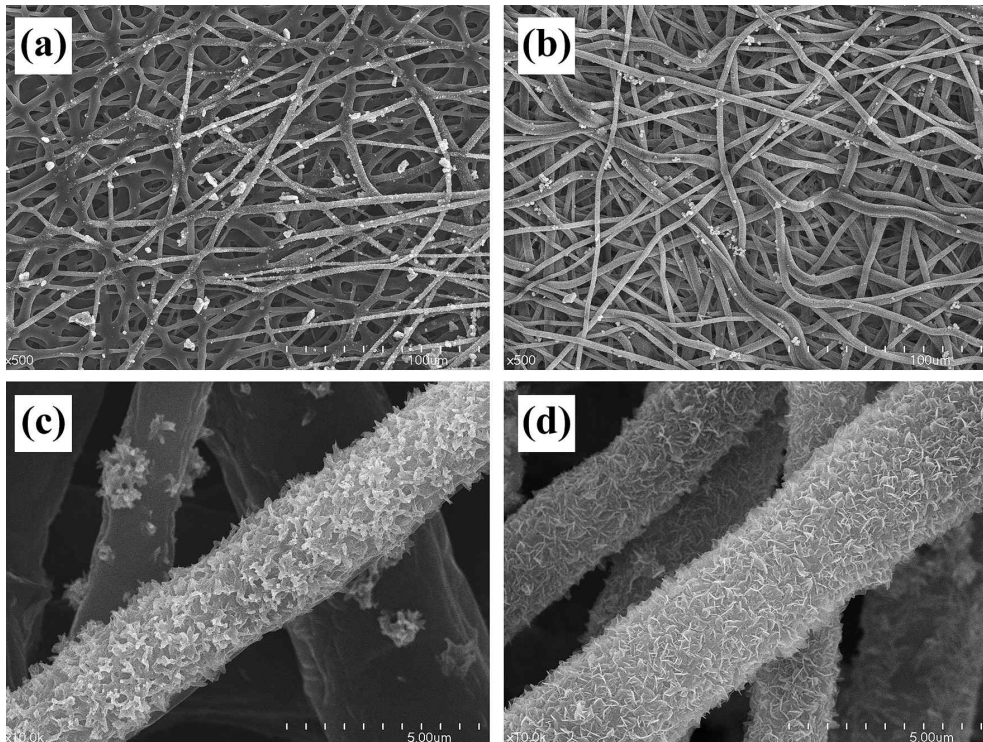


Figure 40. FE-SEM photographs of the other side of specimens PC and PPC observed in Figs 38f and 39f; (a) low- and (c) high-magnification FE-SEM photographs of specimen PC, (b) low- and (d) high-magnification observation of specimen PPC.

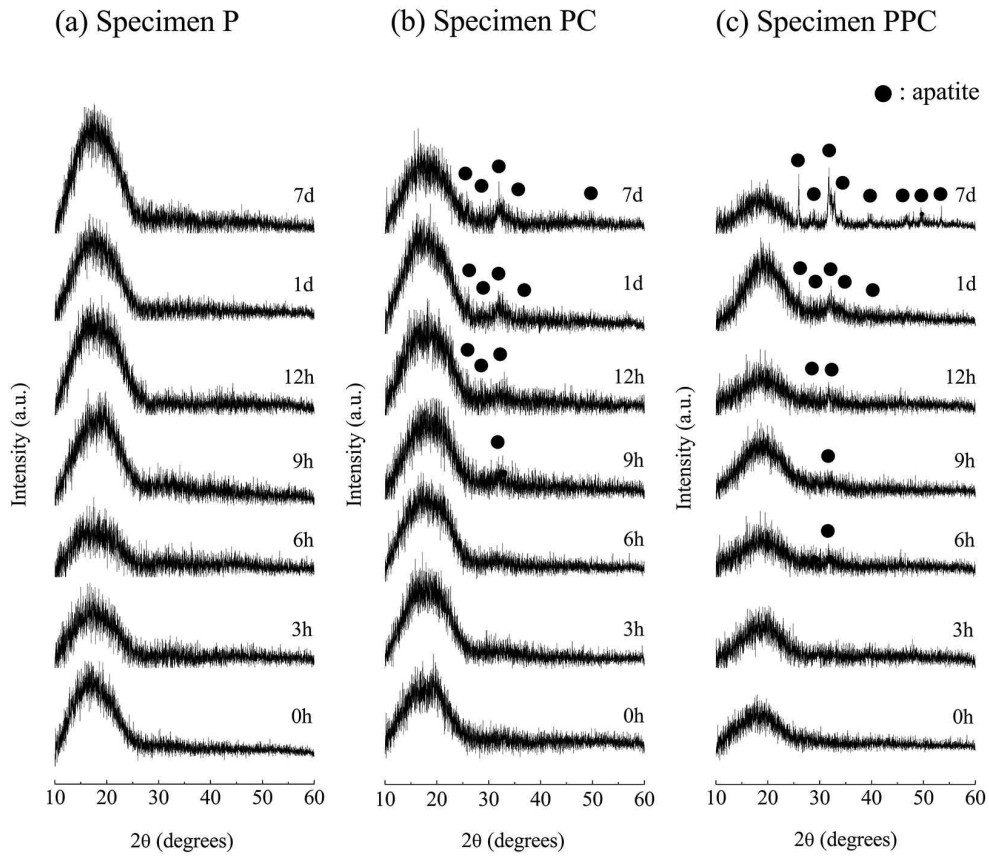


Figure 41. TF-XRD patterns of specimens (a) P, (b) PC and (c) PPC after soaking in SBF for 0, 3, 6, 9, 12 h, 1 day and 7 days.

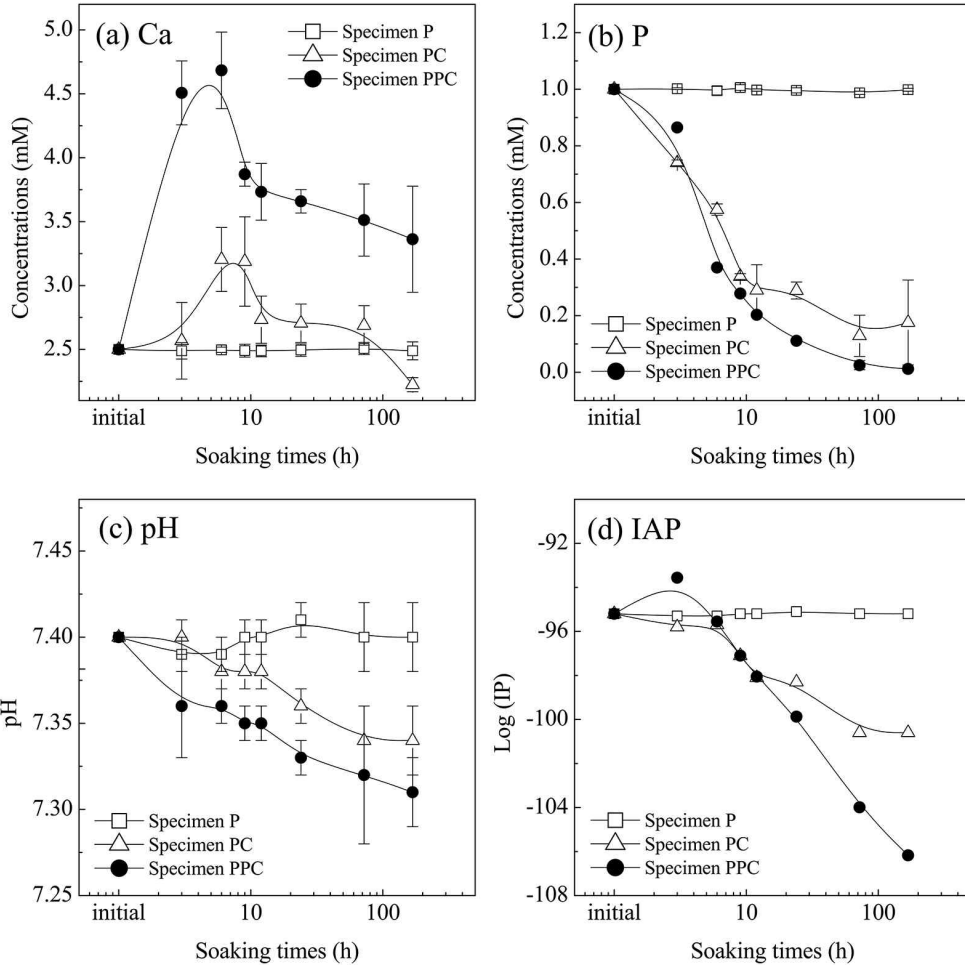


Figure 42. Changes in elemental concentrations and SBF pH as a function of soaking time: (a) Ca, (b) P, (c) pH and (d) IAP.

4. 고 찰

In vitro 나 *in vivo*에서 자연적으로 재료의 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트를 생성시킬 수 있는 능력을 가진 재료는 생체활성 물질이라 명명되었고 그들은 좋은 골 전도성을 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁷² 그러므로 골 충전 재료의 응용을 위해 이미 수많은 생체활성 물질을 개발하는 시도가 있어왔다. 골 전도성을 얻기 위한 다른 한 가지 대체방안은 인공적으로 비 생체활성 물질의 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트 층을 코팅하는 것이다.^{17,34,70,90,71,100,150-152,154-170} 이 방법의 장점은 고분자나 금속, 세라믹과 같은 다양한 종류의 기질물질을 사용할 수 있다는 것이며⁹⁰ 그것은 생성된 최종 물질의 기계적 물성을 쉽게 조절할 수 있다. 그러나 이러한 물질들에 골 전도성은 코팅된 저 결정성 탄산 아파타이트 표면층에 의해 제어된다.

비 생체활성 물질에 저 결정성 탄산 아파타이트를 코팅하는 모든 방법은 칼슘이온을 이용한다. 왜냐하면 칼슘이온이 아파타이트가 과 포화되어 있는 의사체액과 같은 용액 내에서 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시켜 아파타이트의 불균일 핵 생성을 유도하기 때문이다.

비 생체활성 물질에 아파타이트 형성을 유도하는 가장 간단한 방법은 칼슘이온이 함유된 용액에 비 생체활성 물질을 담근 후에 아파타이트나 인 이온이 과 포화된 다른 용액에 그 물질을 담지 하는 것이다.^{156,157,164,165} 그러나 이러한 방법은 특히 고분자와 같은 비 생체활성 물질에 균일하게 아파타이트 코팅을 유도하기는 어려운데 그 이유는 물질의 다른 친수성 때문이다. 게다가 칼슘이온의 점도는 매우 낮기 때문에 고분자의 표면에 효율적으로 고정되기 어렵고 코팅 후에 고분자 표면에 남아있는 칼슘이온의 양은 매우 작다. 이러한 원인으로 인하여 칼슘이온이 불균일하게 코팅되고 아파타이트 층의 형성도 불균일해진다.(Fig. 38, 40-42). 따라서 본 연구에서는 칼슘이온이 비 생체활성 물질의 표면에

간단하고 효율적으로 부착될 수 있는 PVA 전달체 시스템을 이용했다.

본 실험에서 PLGA 섬유 표면에 생성된 균일한 아파타이트 코팅층은 PVA가 칼슘이온을 킬레이트하고 부착능력을 가지고 있음을 보여준다. PVA는 종종 접착제로 사용되는데 그 이유는 높은 분자량뿐만 아니라 구조적으로 많은 수산화기 때문에 발생하는 부착성질 때문이다. PVA 구조에 있는 많은 양의 수산화이온은 쿨롱의 인력에 의해¹⁷³ 용액 내에서 칼슘이온을 킬레이션 할 수 있는 높은 잠재력을 가지고 있음을 의미한다. 왜냐하면 PVA는 부분적인 음전하를 띠는 반면에 칼슘이온은 양전하를 띠고 있기 때문이다. 실제로 FT-IR 스펙트럼에서 PVA의 수산화 밴드는 (Fig. 36) 칼슘이온과 함께 반응하여 적색편이가 나타났다. 이것은 PVA의 수산화기와 칼슘이온 사이에 화학적 반응이 일어났음을 강력하게 뒷받침한다.¹⁷³ 실제로, 의사체액 내에서 시간에 따른 시료 PPC의 미세구조는 시료 PC와 다른 양상을 보여주는데 시료 PC의 아파타이트 형성이 9시간에 일어난 것에 비해 PPC 시료는 단지 6시간후 일어났다 (Fig. 38, 39). 이것은 시료 PC와 PPC에 코팅된 칼슘이온의 양이 다를 수 시사한다. 게다가 시료 PC에서 아파타이트 형성이 균일하지 않은 반면 시료 PPC에서는 균일한 아파타이트 층을 보인다. 이것은 PVA 전달체 시스템이 의사체액 내에서 균일한 아파타이트 형성을 유도하는 것을 시사한다. 시료 PC에 비해 시료 PPC에서 빠른 아파타이트 형성을 보이는 것은 ICP-AES의 결과로도 설명이 가능하다. 의사체액 내에서 시료 PPC의 칼슘 이온의 농도는 시료 PC에 비해 빠르게 증가하는데 (Fig. 8a) 이것은 아파타이트에 대한 이온화도적을 높이는 결과를 가져옴으로써 (Fig. 42d) PLGA 섬유의 표면에 빠르게 아파타이트 결정을 형성 시킨다 (Fig. 38-41).

이러한 현상은 Fig. 43의 도식화로 설명되는데 단지 칼슘이온이 포함된 용액을 PLGA에 섬유의 표면에 코팅할 때 그 용액의 낮은 점도와 PLGA의 다른 친수성으로 인해 흡착되는 칼슘이온의 양은 적을 것이다 (Fig. 43c). 그러나 PVA와 칼슘염이 함께(PVA-Ca) 포함된 용액으로

PLGA 섬유를 코팅할 경우 PVA의 수산화기가 많은 양의 칼슘이온을 킬레이트화 시키고 PVA의 높은 분자량은 좋은 접착성을 부여하여 PLGA 섬유의 표면에 많은 양의 칼슘이온을 흡착시킬 것이다. 시료 PC는 의사체액 내에서 적은 양의 흡착된 칼슘이온이 녹아나면서(Fig. 43e) 아파타이트에 대한 이온화도적을 약간 증가시키게 되고(Fig. 42d) 그 결과 불균일한 아파타이트 층이 PLGA 표면에 코팅되게 된다.(Fig. 40c, 43g) 그러나 시료 PPC가 의사체액에 담지되면 PVA와 많은 양의 칼슘이온이 PLGA 섬유표면으로부터 녹아나게 되고(Fig. 43f) 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시키게 된다. (Fig. 42d) 순차적으로 균일한 아파타이트 층이 빠르게 생성되게 된다.(Fig. 40d, 43h)

종합적으로 볼 때 우리는 칼슘염을 킬레이트하고 접착력을 가진 PVA가 상승작용에 의해 PLGA 섬유의 표면으로 칼슘이온을 전달하기 위한 좋은 전달체 의 역할을 한다. 이러한 PVA 전달체 시스템은 분명하게 간단하지만 비 생체활성 물질의 표면에 균일한 아파타이트를 코팅을 빠르게 유도하는 효율적인 방법이다.

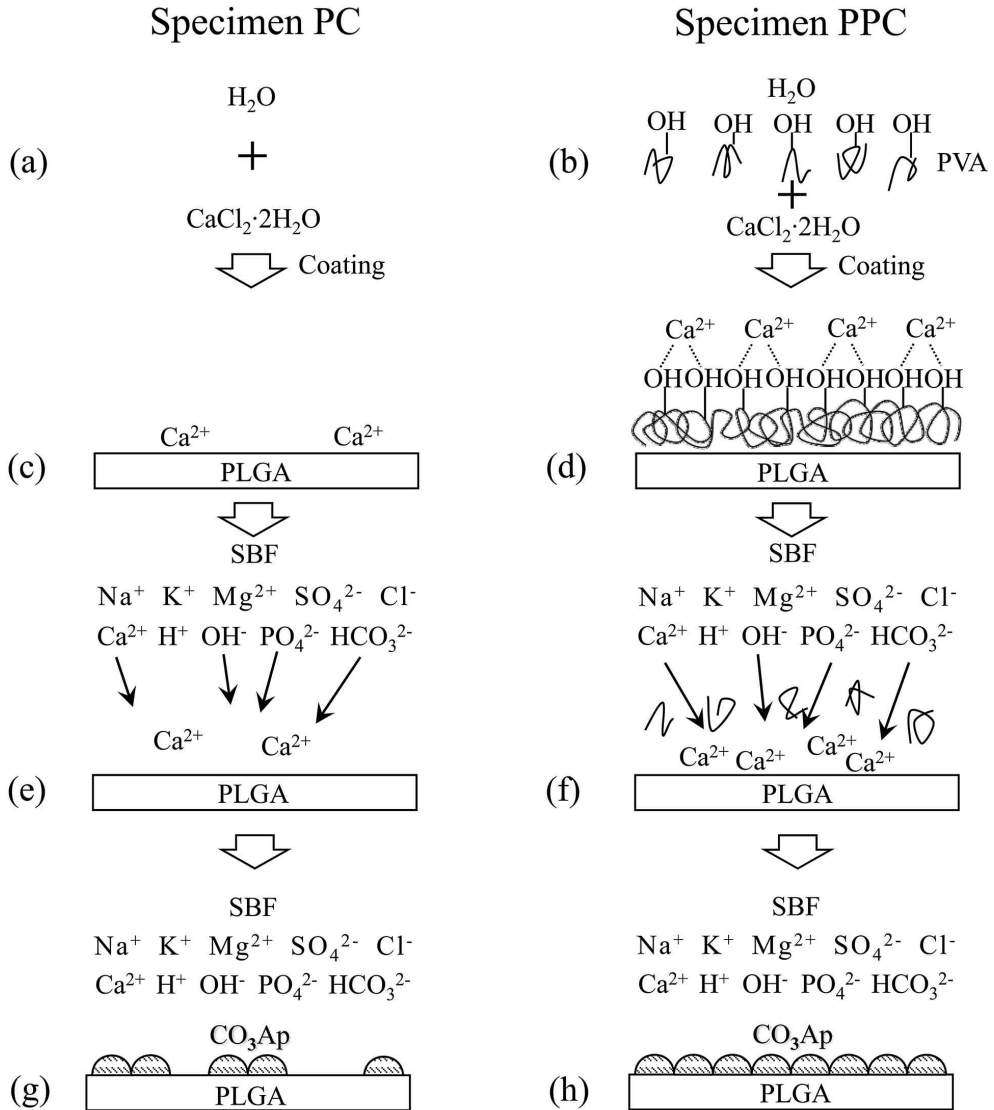


Figure 43. Schemes of apatite formation on specimens PC and PPC with time.

5. 결 론

본 연구에서는 비 생체활성 물질의 표면에 균일하게 빠르게 저 결정성 탄산 아파타이트 층을 생성할 수 있는 PVA 전달체 시스템을 개발했다. 충분한 양의 수산화기를 가진 PVA는 쿨롱 인력에 의해 칼슘이온을 효율적으로 킬레이션하고 PVA의 높은 분자량은 PVA-Ca 구조가 균일하고 풍부하게 PLGA의 섬유 표면에 흡착될 수 있도록 했다. 이러한 PVA-Ca 구조는 비 생체활성 PLGA 섬유의 표면에 성공적으로 빠르고 균일한 아파타이트 층을 생성을 유도했다. 그리고 이러한 구조는 비 생체활성 물질의 표면에 아파타이트 층을 코팅하는 쉽고 효율적인 방법이 될 것으로 생각된다.

VII. 종합결론

본 연구에서는 전기방사법을 이용하여 생체활성 칼슘실리케이트, 생분해성 고분자 (PCL, PLGA), 칼슘실리케이트/고분자 복합형 부직포를 제조했고 이들의 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성되도록 했다. 칼슘실리케이트가 포함된 부직포는 칼슘이온의 용출에 의해 의사체액 내의 아파타이트에 대한 이온화도적을 증가시키는 방법으로 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성을 유도했고 순수한 생분해성 고분자 부직포는 칼슘이 함유된 PVA 전달체 시스템을 이용해 의사체액 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트가 형성되도록 설계했다. 제조된 부직포는 다양한 분석을 통해 골유도 차폐막 및 골 대체재료의 응용 가능성을 평가했다.

생체활성 칼슘실리케이트 섬유는 칼슘 함량이 증가함에 따라 섬유의 직경이 증가했고 의사체액 내에서 저 결정성 탄산 아파타이트 형성능이 증가하였다. 반면 조골세포의 세포반응은 느리게 일어났는데 이는 섬유의 표면 안정성으로부터 기인한 결과로 생각된다. 섬유의 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트 결정의 생성으로 인해 초기 부착된 세포가 떨어지면서 증식이 지연될 뿐만 아니라 섬유의 분해 작용 또한 세포의 증식과 분화를 늦추는 역할을 할 것이다. 칼슘의 함량이 서로 다른 2개의 칼슘실리케이트 부직포 (SCa0.00, SCa0.10)와 매식체가 없는 결손부 (defect)를 이용한 토끼 두개골 이식시험에서는 SCa0.10 시료가 다른 시료에 비해 가장 우수한 골 전도성을 보였다. 이는 칼슘이온이 저 결정성 탄산 아파타이트의 생성에 주요한 역할을 하는 것을 보여준다. 또한, 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성된 칼슘실리케이트, 칼슘실리케이트/고분자 복합체의 ICP-AES의 결과에서 칼슘실리케이트 섬유가 의사체액 내에서 초기에 칼슘과 실리콘 이온을 방출했고 아파타이트 형성과 동시에 의사체액 내에 있던 인 이온과 칼슘이온, 그리고 pH가 감소함을 보였다. 이러한 결과로 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성 메커니즘을 설명할 수

있는데 칼슘실리케이트 섬유가 분해되면서 섬유의 표면에 실라놀 그룹을 함유한 실리케이트 이온이 핵 생성 사이트의 역할을 한다. 칼슘실리케이트 섬유로부터 방출된 칼슘이온은 의사체액 내에 저 결정성 탄산 아파타이트에 대한 이온화도적율을 높여 저 결정성 탄산 아파타이트 결정 생성을 가속화시키게 된다.

칼슘실리케이트, 생분해성 고분자, 및 칼슘실리케이트/생분해성 고분자 부직포를 관찰한 결과 칼슘실리케이트 섬유는 생분해성 고분자 섬유에 비해 얇고 부스러진 형상을 보였으며 의사체액 내에서 빠른 분해 양상을 보였고 칼슘실리케이트/생분해성 고분자 부직포에서는 의사체액 내에서 칼슘실리케이트 섬유가 분해되면서 그 표면뿐만 아니라 생체활성이 없는 주변의 고분자 섬유에도 아파타이트를 형성시킴을 확인했다. 그러나 칼슘실리케이트가 없는 순수한 생분해성 고분자는 오랜 기간 의사체액에 담지 하여도 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트의 형성이 보이지 않았으며 오히려 생분해성 고분자의 분해 속도에 따라 섬유의 팽윤과 부서짐이 관찰되었다. 또한 고분자의 산성 분해산물이 아파타이트의 형성을 방해하여 빠른 분해를 보이는 PLGA5050이 포함된 칼슘실리케이트/PLGA5050 복합형 부직포에서는 저 결정성 탄산 아파타이트가 생성되지 않고 분해가 느린 PLGA7525가 포함된 칼슘실리케이트/PLGA7525 복합형 부직포에서만 아파타이트가 형성되었다. 이는 XRD와 FT-IR 분석에서도 동일한 결과를 보였는데, PLGA5050이 포함된 시편을 제외한 모든 생체활성 세라믹과 세라믹/고분자 복합체의 표면에서 저 결정성 아파타이트가 형성됨을 확인했다. 또한, 인장강도 시험을 통해 세라믹 부직포에 비해 세라믹/고분자 복합형 부직포의 기계적 물성이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

생체활성이 없는 순수한 고분자에서는 저 결정성 탄산 아파타이트가 스스로 형성될 수 없기 때문에 이를 개선하고자 아파타이트 구성물질인 칼슘이온과 PVA 고분자를 이용한 PVA 전달체 시스템을 설계했다. PVA 전달체 시스템은 비 생체활성 물질의 표면에 칼슘염을 균일하게

코팅함으로써 의사체액 내에서 빠르게 저 결정성 탄산 아파타이트 층을 생성할 수 있었다. 그 이유는 충분한 양의 수산화기를 가진 PVA는 콜로이드 인력에 의해 칼슘이온을 효율적으로 킬레이션하고 PVA의 높은 분자량은 PVA-칼슘염 구조가 균일하고 풍부하게 고분자 섬유 표면에 흡착될 수 있었기 때문일 것이다. 이러한 구조는 비 생체활성 물질의 표면에 아파타이트 층을 코팅하는 쉽고 효율적인 방법이 될 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 생체활성 칼슘실리케이트와 PVA-칼슘염 전달체 시스템을 이용하여 전기방사법으로 제조된 칼슘실리케이트, 칼슘실리케이트/생분해성 고분자, 순수한 고분자 부직포 표면에 저 결정성 탄산 아파타이트 형성을 성공적으로 구현할 수 있었다. 이러한 복합체는 골 전도성과 생체활성이 우수했고 부직포로부터 생체모방형 구조를 재현하여 뼈의 재생뿐만 아니라 다양한 조직 재생을 위한 재료로써 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

VIII. 참고문헌

1. 이상훈, 이재도, "생체활성 유· 무기 복합체의 개발과 응용", *세라미스트*, 3[3] 47-57 (2000).
2. 김상현, 김수현, "생체기능성 생분해성 고분자", *Polymer Science and Technology*, 18[5] 450-57 (2007).
3. 임상철, 권영혁, 이만섭, 박준봉, "골형태 백질과 흡수성차폐막이 치주조직 재생에 미치는 영향", *대한치주과학회지*, 30[4] 757-79 (2000).
4. M. J. Glimcher, "On the Form and Function of Bone: From Molecules to Organs", pp. 617-73. *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. Edited, (1981).
5. M. J. G. D. D. Lee, "Three-Dimensional Spatial Relationship between the Collagen Fibrils and the Inorganic Calcium Phosphate Crystals of Pickerel (*americanus americanus*) and Herring (*clupea harengus*) Bone", *Journal of Molecular Biology*, 217[3] 487-501 (1991).
6. S. Mann, "Molecular recognition in biomineralization", *Nature*, 332 119-24 (1998).
7. T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W", *J Biomed Mater Res*, 24[3] 331-43 (1990).
8. M. Neo, T. Nakamura, C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: A comparative study by transmission electron microscopy", *J Biomed Mater Res*, 27[8] 999-1006 (1993).
9. T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Bone bonding behavior of MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glass (mother glass of A-W-glass-ceramics)", *J Biomed Mater Res*, 23[6] 631-48 (1989).

10. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee Jr., "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials", *J Biomed Mater Res*, 2[1] 117-41 (1971).
11. C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid", *J Non-Cryst Solids*, 143 84-92 (1992).
12. S. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, and T. Nakamura, "Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment", *J Am Ceram Soc*, 78 1769-74 (1995).
13. 조성백, 김윤중, "우리 몸의 기능을 수복하고 치료하는 생체재료", *세라미스트*, 3[3] 5-19 (2000).
14. S.-H. Rhee, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, J. Yoo, and H. Kim, "Evaluation of a novel poly(ϵ -caprolactone)-organosiloxane hybrid material for the potential application as a bioactive and degradable bone substitute", *Biomacromolecules*, 5[4] 1575-79 (2004).
15. S. H. Rhee, J. Y. Choi, and H. M. Kim, "Preparation of a bioactive and degradable poly(ϵ -caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method", *Biomaterials*, 23[24] 4915-21 (2002).
16. S.-H. Rhee, "Effect of molecular weight of poly(ϵ -caprolactone) on interpenetrating network structure, apatite-forming ability, and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/silica nano-hybrid materials", *Biomaterials*, 24[10] 1721-27 (2003).
17. M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, and T. Yamamuro, "Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process", *J Am Ceram Soc*, 77[11] 2805-08 (1994).
18. X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber

- membranes", *Polymer*, 43[16] 4403-12 (2002).
19. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 24[12] 2077-82 (2003).
 20. C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering", *Biomaterials*, 25[5] 877-86 (2004).
 21. Y. Wu, L. L. Hench, J. Du, K. L. Choy, and G. J. "Preparation of hydroxyapatite fibers by electrospinning technique", *J Am Ceram Soc*, 87[10] 1988-91 (2004).
 22. C. Shao, H. Y. Kim, J. Gong, B. Ding, D. R. Lee, and S. J. Park, "Fiber mats of poly(vinyl alcohol)/silica composite via electrospinning", *Mater Lett*, 57[9-10] 1579-84 (2003).
 23. W.-J. Li, R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K. G. Danielson, D. J. Hall, and R. S. Tuan, "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells", *Biomaterials*, 26[6] 599-609 (2005).
 24. A. Bishop, C. Bala'si, J. H. C. Yang, and P.-I. Gouma, "Biopolymer-hydroxyapatite composite coatings prepared by electrospinning", *Polym Adv Technol*, 17[11-12] 902-06 (2006).
 25. I. Magnusson, S. Nyman, T. Karring, and J. Egelberg, "Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing", *Journal of periodontal research*, 20[2] 201-08 (1985).
 26. J. Gottlow, S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring, and J. Wennström, "New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports", *Journal of clinical periodontology*, 13[6] 604-16 (1986).

27. R. Pontoriero, J. Lindhe, S. Nyman, T. Karring, E. Rosenberg, and F. Sanavi, "Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars", *Journal of Clinical Periodontology*, 15[4] 247-54 (1988).
28. 신승윤, 박호남, 김경화, 이승진, 박윤정, 구영, 류인철, 한수부, and 정종평, "키토산 나노 차폐막의 골조직 재생유도 능력에 관한 조직학적 연구", *대한치주과학회지*, 34[3] 543-549 (2004).
29. M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, Y. Imamura, T. Okada, N. Shirahama, K. Akita, K. Takakuda, and J. Tanaka, "Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites", *Biomaterials*, 25[28] 5979-86 (2004).
30. S. Liao, W. Wang, M. Uo, S. Ohkawa, T. Akasaka, K. Tamura, F. Cui, and F. Watari, "A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration", *Biomaterials*, 26[36] 7564-71 (2005).
31. S. H. Teng, E. J. Lee, P. Wang, D. S. Shin, and H. E. Kim, "Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87[1] 132-38 (2008).
32. K. Fujihara, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers", *Biomaterials*, 26[19] 4139-47 (2005).
33. F. Yang, S. K. Both, X. Yang, X. F. Walboomers, and J. A. Jansen, "Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application", *Acta biomaterialia*, 5[9] 3295-304 (2009).
34. F. Yang, J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen, "Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for bone

- tissue engineering", *Chem Eng J*, 137[1] 154-61 (2008).
35. C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering", *Biomaterials*, 25[5] 877-86 (2004).
 36. T. Sun, S. Mai, D. Norton, J. W. Haycock, A. J. Ryan, and S. Macneil, "Self-organization of skin cells in three-dimensional electrospun polystyrene scaffolds", *Tissue Eng*, 11[7-8] 1023-33 (2005).
 37. S. Sahoo, H. Ouyang, J. C. H. Goh, T. E. Tay, and S. L. Toh, "Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering", *Tissue Eng*, 12[1] 91-99 (2006).
 38. F. Anton, "Process and apparatus for preparing artificial threads." in Google Patents, 1934.
 39. F. Anton, "Method and apparatus for spinning." in Google Patents, 1939.
 40. G. Taylor, "Electrically driven jets", pp. 453-75 in Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. Vol. 313.
 41. D. Annis, A. Bornat, R. Edwards, A. Higham, B. Loveday, and J. Wilson, "An elastomeric vascular prosthesis", *ASAIO Journal*, 24[1] 209-14 (1978).
 42. T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering", *Biomaterials*, 29[13] 1989-2006 (2008).
 43. M. S. Bae, S. I. Jeong, S. E. Kim, J. B. Lee, D. N. Heo, and I. K. Kwon, "Nanofiber scaffold for tissue regeneration using electrospinning method", *TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, 5[2] 196-203 (2008).
 44. I. Kwon, S. Kidoaki, and T. Matsuda, "Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics,

- mechanical properties and cell adhesion potential", *Biomaterials*, 26[18] 3929-39 (2005).
45. Z. Ma, W. He, T. Yong, and S. Ramakrishna, "Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation", *Tissue Eng*, 11[7-8] 1149-58 (2005).
 46. Z. Ma, M. Kotaki, T. Yong, W. He, and S. Ramakrishna, "Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering", *Biomaterials*, 26[15] 2527-36 (2005).
 47. E.-R. Kenawy, G. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D. Simpson, E. Sanders, and G. Wnek, "Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend", *J Control Release*, 81[1-2] 57-64 (2002).
 48. Y. Luu, K. Kim, B. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, "Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers", *J Control Release*, 89[2] 341-53 (2003).
 49. B. Wopenka and J. D. Pasteris, "A mineralogical perspective on the apatite in bone", *Materials Science and Engineering: C*, 25[2] 131-43 (2005).
 50. 이상훈, "세라믹/고분자 하이브리드형 골 대체재의 개발과 응용", *세라미스트*, 7[1] 47-60 (2004).
 51. P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and T. Nakamura, "Apatite formation induced on silica gel in a simulated body fluid", *J Am Ceram Soc*, 75 2094-97 (1992).
 52. P. Li, I. Kangasniemi, K. Groot, and T. Kokubo, "Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium

- Substrate", *Journal of the American Ceramic Society*, 77[5] 1307-12 (1994).
53. M. Uchida, H. M. Kim, T. Kokubo, F. Miyaji, and T. Nakamura, "Bonelike apatite formation induced on zirconia gel in a simulated body fluid and its modified solutions", *Journal of the American Ceramic Society*, 84[9] 2041-44 (2001).
 54. T. Kokubo, "Surface chemistry of bioactive glass-ceramics", *J Non-Cryst Solids*, 120 138-51 (1990).
 55. X. Mo, C. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation", *Biomaterials*, 25[10] 1883-90 (2004).
 56. C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering", *Tissue Eng*, 10[7-8] 1160-68 (2004).
 57. W. He, T. Yong, Z. Ma, R. Inai, W. Teo, and S. Ramakrishna, "Biodegradable polymer nanofiber mesh to maintain functions of endothelial cells", *Tissue Eng*, 12[9] 2457-66 (2006).
 58. S.-H. Rhee, Y.-K. Lee, and B.-S. Lim, "Bioactive non-woven silica fabric made through electro-spinning method", *Key Eng Mater*, 309-311 465-68 (2006).
 59. M. Hwang, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, and S.-H. Rhee, "Osteoblast-like cell behaviors on non-woven silica fabric", *Key Eng Mater*, 309-311 469-72 (2006).
 60. S.-H. Rhee, I.-Y. Chung, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, and Y.-J. Seol, "Apatite forming ability of a non-woven silica fabric containing calcium", *Key Eng Mater*, 330-332 699-702 (2007).

61. H. W. Kim and H. E. Kim, "Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite bioceramics", *J Biomed Res Part B*, 77B[2] 323-28 (2006).
62. H. W. Kim, H. E. Kim, and J. C. Knowles, "Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial", *Adv Func Mater*, 16[12] 1529-35 (2006).
63. Y. J. Seol, Y. M. Kang, I. A. Kim, and S. H. Rhee, "Preparation of a bioactive poly(lactic-co-glycolic)acid and silica gel mixed non-woven fabric", *Key Eng Mater*, 361-363 519-22 (2008).
64. H. Kodama, Y. Amagai, H. Sudo, and S. Yamamoto, "Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria", *Jpn J Oral Biol*, 23 899-901 (1981).
65. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 72 248-54 (1976).
66. D. Ou and A. Seddon, "Near- and mid-infrared spectroscopy of sol-gel derived ormosils: vinyl and phenyl silicates", *J Non-Cryst Solids*, 210 187-203 (1997).
67. S. H. Rhee, "Effect of calcium salt content in the poly(ϵ -caprolactone)/silica nanocomposite on the nucleation and growth behavior of apatite layer", *J Biomed Mater Res*, 67A[4] 1131-38 (2003).
68. S. H. Rhee, M. H. Hwang, H. J. Si, and J. Y. Choi, "Biological activities of osteoblasts on poly(methyl methacrylate)/silica hybrid containing calcium salt", *Biomaterials*, 24[6] 901-06 (2003).
69. S.-H. Rhee, "Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(ϵ -caprolactone) content", *Biomaterials*, 25[7-8] 1167-75 (2004).

70. S. Rhee, S. Lee, and J. Tanaka, "Synergistic effect of silanol group and calcium ion in chitosan membrane on apatite forming ability in simulated body fluid", *J Biomater Sci -Polym Ed*, 17[3] 357-68 (2006).
71. C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₄ glasses in a simulated body fluid", *J Non-Cryst Solids*, 143 84-92 (1992).
72. M. Helgeson and N. Wagner, "A correlation for the diameter of electrospun polymer nanofibers", *AIChE J*, 53[1] 51-55 (2007).
73. K. Park, S. Jung, S. Lee, B.-M. Min, and W. Park, "Biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers", *Int J Biol Macromol*, 38[3-5] 165-73 (2006).
74. T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, and S. Sakka, "Chemical reaction of bioactive glasses and glass-ceramics with a simulated body fluid", *J Mater Sci: Mater Med*, 3 79-83 (1992).
75. W. Lai, J. Garino, and P. Ducheyne, "Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone", *Biomaterials*, 23[1] 213-17 (2002).
76. Y.-M. Kang, K.-H. Kim, Y.-J. Seol, and S.-H. Rhee, "Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method", *Acta Biomater*, 5[1] 462-69 (2009).
77. J. Yoo, J. Lee, H. Kim, S.-J. Kim, J. Lim, S. Lee, J. Lee, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, and S.-H. Rhee, "Comparative *in vitro* and *in vivo* studies using a bioactive poly(ϵ -caprolactone)-organosiloxane nanohybrid containing calcium salt", *J Biomed Mater Res*, 83B[1] 189-98 (2007).
78. Y.-M. Kang, K.-H. Kim, Y. J. Seol, and S.-H. Rhee, "Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method", *Acta Biomaterialia*, In Press, Corrected Proof.

79. H. Drissi, Q. Luc, R. Shakoori, S. Chuva De Sousa Lopes, J. Y. Choi, A. Terry, M. Hu, S. Jones, J. C. Neil, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, and G. S. Stein, "Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene", *Journal of cellular physiology*, 184[3] 341-50 (2000).
80. Y.-J. Seol, K.-H. Kim, Y. M. Kang, I. A. Kim, and S.-H. Rhee, "Bioactivity, pre-osteoblastic cell responses, and osteoconductivity evaluations of the electrospun non-woven SiO₂-CaO gelfabrics", *J Biomed Mater Res*, 90B[2] 679-87 (2009).
81. B. T. Mossman and J. E. Craighead, "Mechanisms of Asbestos Carcinogenesis", *Environ Res*, 25[2] 269-80 (1981).
82. N. Johnson and F. Hahn, "Induction of mesothelioma after intrapleural inoculation of F344 rats with silicon carbide whiskers or continuous ceramic filaments", *Occup Environ Med*, 53 813-16 (1996).
83. S. Adachi, K. Kawamura, and K. Takemoto, "A trial on the quantitative risk assessment of man-made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples", *Ind Health*, 39 168-74 (2001).
84. P. Romundstad, A. Andersen, and T. Haldorsen, "Cancer Incidence among workers in the Norwegian silicon carbide industry", *Am J Epidemiol* 153[10] 978-86 (2001).
85. M. Carbone and C. W. M. Bedrossian, "The pathogenesis of mesothelioma", *Semin Diagn Pathol*, 23[1] 56-60 (2006).
86. Y. Zhang, J. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, and C. Lim, "Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 29[32] 4314-22 (2008).

87. J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, A. B. Kumar, and S. Ramakrishna, "Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells", *J Biomed Mater Res*, 85A[2] 408-17 (2008).
88. C. Erisken, D. Kalyon, and H. Wang, "Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications", *Biomaterials*, 29[30] 4065-73 (2008).
89. C. Erisken, D. Kalyon, and H. Wang, "A hybrid twin screw extrusion/electrospinning method to process nanoparticle-incorporated electrospun nanofibres", *Nanotechnology*, 19[16] 165302 (2008).
90. Y. Abe, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process " *J Mater Sci: Mater Med*, 1[4] 233-38 (1990).
91. S. B. Cho, F. Miyaji, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and T. Nakamura, "Apatite-forming ability of silicate ion dissolved from silica gels", *J Biomed Mater Res*, 32[3] 375-81 (1996).
92. H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, and P. Wang, "The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant", *Biomaterials*, 27[9] 1735-40 (2006).
93. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramics A-W", *J Biomed Mater Res*, 24 721-34 (1990).
94. S. Nojima, K. Hashizume, A. Rohadi, and S. Sasaki, "Crystallization of ϵ -caprolactone blocks within a crosslinked microdomain structure of poly(ϵ -caprolactone)-block-polybutadiene", *Polymer*, 38[11] 2711-18 (1997).
95. S. Jiang, X. Ji, L. An, and B. Jiang, "Crystallization behavior of PCL in hybrid confined environment", *Polymer*, 42[8] 3901-07 (2001).

96. J. J. Yoo and S. H. Rhee, "Evaluations of bioactivity and mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone)/silica nanocomposite following heat treatment", *J Biomed Mater Res*, 68A[3] 401-10 (2004).
97. H. Lu, T. Zhang, X. P. Wang, and Q. F. Fang, "Electrospun submicron bioactive glass fibers for bone tissue scaffold", *J Mater Sci: Mater Med*, 20 793-98 (2009).
98. H.-M. Kim, Y.-S. Kim, K.-M. Woo, S.-J. Park, C. Rey, Y. Kim, J. Kim, and J. Ko, "Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite", *J Biomed Mater Res*, 56[2] 250-56 (2001).
99. M. Siebers, K. Matsuzaka, X. Walboomers, S. Leeuwenburgh, J. Wolke, and J. Jansen, "Osteoclastic resorption of calcium phosphate coatings applied with electrostatic spray deposition (ESD), in vitro", *J Biomed Mater Res*, 74A[4] 570-80 (2005).
100. M. Tanahashi, T. Kokubo, T. Nakamura, Y. Katsura, and M. Nagano, "Ultrastructural study of an apatite layer formed by a biomimetic process and its bonding to bone", *Biomaterials*, 17[1] 47-51 (1996).
101. O. Bostman, "Absorbable implants for the fixation of fractures.", *J Bone Joint Surg Am*, 73 148-53 (1991).
102. M. S. Taylor, A. U. Daniels, K. P. Andriano, and J. Heller, "Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products", *J Appl Biomater* 5151-57 (1994).
103. J. Klompaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, J. H. de Groot, A. J. Nijenhuis, and A. J. Pennings, "Porous polymer implant for repair of meniscal lesions: a preliminary study in dogs", *Biomaterials* 12 810-16 (1991).
104. J. Yao, S. Radin, P. S. Leboy, and P. Ducheyne, "The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly

- (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering", *Biomaterials*, 26[14] 1935-43 (2005).
105. S. S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi, and B.-S. Kim, "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 27[8] 1399-409 (2006).
 106. Q. Chen, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Effect of heat treatment on bioactivity and mechanical properties of PDMS-modified CaO-SiO₂-TiO₂ hybrids via sol-gel process", *J Mater Sci: Mater Med*, 12[6] 515-22 (2001).
 107. C. Ohtsuki, T. Miyazaki, and M. Tanihara, "Development of bioactive organic-inorganic hybrid for bone substitutes", *Mater Sci and Eng: C*, 22 27-34 (2002).
 108. M. Kamitakahara, M. Kawashita, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Apatite-forming ability and mechanical properties of CaO-free poly(tetramethylene oxide) (PTMO)-TiO₂ hybrids treated with hot water", *Biomaterials*, 24[8] 1357-63 (2003).
 109. V. Thomas, D. Dean, and Y. Vohra, "Nanostructured biomaterials for regenerative medicine", *Curr Nanosci*, 2[3] 155-77 (2006).
 110. S. Catledge, W. Clem, N. Shrikishen, S. Chowdhury, A. Stanishevsky, M. Koopman, and Y. Vohra, "An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering", *Biomed Mater*, 2[2] 142-50 (2007).
 111. G. Sui, X. Yang, F. Mei, X. Hu, G. Chen, X. Deng, and S. Ryu, "Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration", *J Biomed Mater Res*, 82A[2] 445 - 54 (2007).
 112. J. Venugopal, P. Vadgama, T. Kumar, and S. Ramakrishna, "Biocomposite nanofibres and osteoblasts for bone tissue engineering", *Nanotechnology*, 18[5] 55101-01 (2007).

113. P. Wutticharoenmongkol, P. Pavasant, and P. Supaphol, "Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles", *Biomacromolecules*, 8[8] 2602-10 (2007).
114. D. Guan, Z. Chen, C. Huang, and Y. Lin, "Attachment, proliferation and differentiation of BMSCs on gas-jet/electrospun nHAP/PHB fibrous scaffolds", *Appl Surf Sci*, 255[2] 324-27 (2008).
115. O. Schneider, S. Loher, T. Brunner, L. Uebersax, M. Simonet, R. Grass, H. Merkle, and W. Stark, "Cotton wool-like nanocomposite biomaterials prepared by electrospinning: In vitro bioactivity and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells", *J Biomed Mater Res*, 84B[2] 350-62 (2008).
116. A. Stanishevsky, S. Chowdhury, P. Chinoda, and V. Thomas, "Hydroxyapatite nano particle loaded collagen fiber composites: Micro-architecture and nano-indentation study", *J Biomed Mater Res*, 86A[4] 873 - 82 (2008).
117. J. Venugopal, S. Low, A. Choon, A. Kumar, and S. Ramakrishna, "Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration", *Artif Organs* 32[5] 388-97 (2008).
118. J. Venugopal, S. Low, A. Choon, T. Sampath Kumar, and S. Ramakrishna, "Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers", *J Mater Sci: Mater Med*, 19[5] 2039-46 (2008).
119. D. Gupta, J. Venugopal, S. Mitra, V. Giri Dev, and S. Ramakrishna, "Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts", *Biomaterials*, 30[11] 2085-94 (2009).

120. M. Ngiam, S. Liao, A. Patil, Z. Cheng, C. Chan, and S. Ramakrishna, "The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering", *Bone*, 45 4–16 (2009).
121. A. Oliveira, S. Costa, R. Sousa, and R. Reis, "Nucleation and growth of biomimetic apatite layers on 3D plotted biodegradable polymeric scaffolds: Effect of static and dynamic coating conditions", *Acta Biomater*, 5[5] 1626-38 (2009).
122. O. D. Schneider, F. Weber, T. J. Brunner, S. Loher, M. Ehrbar, P. R. Schmidlin, and W. J. Stark, "In vivo and in vitro evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitute material for complex defects", *Acta Biomater*, 5[5] 1775-84 (2009).
123. C. Spadaccio, A. Rainer, M. Trombetta, G. Vadal , M. Chello, E. Covino, V. Denaro, Y. Toyoda, and J. Genovese, "Poly-l-lactic acid/hydroxyapatite electrospun nanocomposites induce chondrogenic differentiation of human MSC", *Ann Biomed Eng*, 37[7] 1376-89 (2009).
124. J. C. Voegel and P. Garnier, "Biological apatite crystal dissolution", *J Dent Res*, 58(B) 852-56 (1979).
125. W. Cui, X. Li, S. Zhou, and J. Weng, "In situ growth of hydroxyapatite within electrospun poly (DL-lactide) fibers", *J Biomed Mater Res*, 82A[4] 831 - 41 (2007).
126. S.-H. Rhee and S. Lee, "Effect of acidic degradation products of poly(lactic-co-glycolic)acid on the apatite-forming ability of poly(lactic-co-glycolic)acid-siloxane nanohybrid material", *J Biomed Mater Res*, 83A[3] 799-805 (2007).
127. T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, T. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro, and S. Higashi, "Apatite- and wollastonite-containing

- glass ceramics for prosthetic application", *Bull Inst Chem Res, Kyoto Univ*, 60 260-68 (1982).
128. T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Effects of ions dissolved from bioactive glass-ceramic on surface apatite formation", *J Mater Sci: Mater Med*, 4[1] 1-4 (1993).
 129. P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, and K. De Groot, "Induction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids on sol-gel prepared silica", *Biomaterials*, 14[13] 963-68 (1993).
 130. H. Takadama, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "X-ray photoelectron spectroscopy study on the process of apatite formation on a sodium silicate glass in simulated body fluid", *J Am Ceram Soc*, 85[8] 1933-36 (2002).
 131. K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y. Kotoura, and M. Oka, "Bone-bonding ability of P₂O₅ free CaO-SiO₂ glasses", *J Biomed Mater Res*, 25[3] 357-65 (1991).
 132. R. D. Rawlings, "Bioactive glasses and glass-ceramics", *Clin Mater*, 14[2] 155-79 (1993).
 133. D. C. Clupper, L. L. Hench, and J. J. Mecholsky, "Strength and toughness of tape cast bioactive glass 45S5 following heat treatment", *J Europ Ceram Soc*, 24[10-11] 2929-34 (2004).
 134. Y. Taguchi, T. Yamamuro, T. Nakamura, N. Nishimura, T. Kokubo, E. Takahata, and S. Yoshihara, "A bioactive glass powder-ammonium hydrogen phosphate composite for repairing bone defects", *J Appl Biomater*, 1[3] 217-23 (1990).
 135. H. M. Elgendy, M. E. Norman, A. R. Keaton, and C. T. Laurencin, "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymer

- composite material", *Biomaterials*, 14[4] 263-69 (1993).
136. K. Kawanabe, J. Tamura, T. Yamamuro, T. Nakamura, T. Kokubo, and S. Yoshihara, "A new bioactive bone cement consisting of BIS-GMA resin and bioactive glass powder", *J Appl Biomater*, 4[2] 135-41 (1993).
137. J. A. Jansen, J. E. de Ruijter, P.T.M. Janssen, and Y.G.C.J. Paquay, "Histological evaluation of a biodegradable polyactive[®]/hydroxyapatite membrane", *Biomaterials*, 16[11] 819-27 (1995).
138. A. Piattelli, M. Franco, G. Ferronato, M. T. Santello, R. Martinetti, and A. Scarano, "Resorption of composite polymer-hydroxyapatite membranes: a time-course study in rabbit", *Biomaterials*, 18[8] 629-33 (1997).
139. C. Du, F. Z. Cui, X. D. Zhu, and K. de Groot, "Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture", *J Biomed Mater Res*, 44[4] 407-15 (1999).
140. S. J. Peter, L. Lu, D. J. Kim, and A. G. Mikos, "Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/b-tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite", *Biomaterials*, 21[12] 1207-13 (2000).
141. S.-H. Rhee, Y. Suetsugu, and J. Tanaka, "Biomimetic configurational arrays of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics", *Biomaterials*, 22[21] 2843-47 (2001).
142. N. C. Bleach, S. N. Nazhat, K. E. Tanner, M. Kellomäki, and P. Tömälä, "Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-poly lactide composites", *Biomaterials*, 23[7] 1579-85 (2002).
143. M. Kamitakahara, M. Kawashita, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Bioactivity and mechanical properties of

- polydimethylsiloxane (PDMS)-CaO-SiO₂ hybrids with different calcium contents", *J Mater Sci: Mater Med*, 13[11] 1015-20 (2002).
144. G. Wei and P. X. Ma, "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 25[19] 4749-57 (2004).
 145. M. Kikuchi, J. Tanaka, Y. Koyama, and K. Takakuda, "Cell culture test of TCP/CPLA composite", *J Biomed Mater Res*, 48[2] 108-10 (1999).
 146. M. Hashimoto, H. Takadama, M. Mizuno, and T. Kokubo, "Mechanical properties and apatite forming ability of TiO₂ nano particles/high density polyethylene composite: Effect of filler content", *J Mater Sci: Mater Med*, 18[4] 661-68 (2007).
 147. Q. Chen, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Apatite formation on PDMS-modified CaO-SiO₂-TiO₂ hybrids prepared by sol-gel process", *Biomaterials*, 20[12] 1127-32 (1999).
 148. N. Miyata, K. I. Fuke, Q. Chen, M. Kawashita, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Apatite-forming ability and mechanical properties of PTMO-modified CaO-SiO₂ hybrids prepared by sol-gel processing: Effect of CaO and PTMO contents", *Biomaterials*, 23[14] 3033-40 (2002).
 149. M. Kamitakahara, M. Kawashita, N. Miyata, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Apatite formation on CaO-free polydimethylsiloxane (PDMS)-TiO₂ hybrids", *J Mater Sci: Mater Med*, 14[12] 1067-72 (2003).
 150. K. Hata, T. Kokubo, T. Nakamura, and T. Yamamuro, "Growth of a bonelike apatite layer on a substrate by a biomimetic process", *J Am Ceram Soc*, 78[4] 1049-53 (1995).
 151. M. Nagano, T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Kokubo, and M. Tanahashi, "Bone bonding ability of an apatite-coated polymer produced using a

- biomimetic method: A mechanical and histological study in vivo", *J Biomed Mater Res*, 31[4] 487-94 (1996).
152. M. Tanahashi, T. Kokubo, and T. Matsuda, "Quantitative assessment of apatite formation via a biomimetic method using quartz crystal microbalance", *J Biomed Mater Res*, 31[2] 243-49 (1996).
153. T. Hanawa, M. Kon, H. Ukai, K. Murakami, Y. Miyamoto, and K. Asaoka, "Surface modification of titanium in calcium-ion-containing solutions", *J Biomed Mater Res*, 34[3] 273-78 (1997).
154. G. J. Liu, F. Miyaji, T. Kokubo, H. Takadama, T. Nakamura, and A. Murakami, "Apatite-organic polymer composites prepared by a biomimetic process: Improvement in adhesion of the apatite layer to the substrate by ultraviolet irradiation", *J Mater Sci: Mater Med*, 9[5] 285-90 (1998).
155. F. Miyaji, M. Iwai, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Chemical surface treatment of silicone for inducing its bioactivity", *J Mater Sci: Mater Med*, 9[2] 61-65 (1998).
156. T. Taguchi, A. Kishida, and M. Akashi, "Hydroxyapatite formation on/in poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices using a novel alternate soaking process", *Chem Lett*, 27[8] 711-12 (1998).
157. T. Taguchi, A. Kishida, and M. Akashi, "Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process: II. Effect of swelling ratios of poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices on apatite formation", *J Biomater Sci -Polym Ed*, 10[3] 331-9 (1999).
158. H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and T. Nakamura, "Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products", *J Biomed Mater Res*, 46[2] 228-35 (1999).

159. F. Miyaji, H. M. Kim, S. Handa, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Bonelike apatite coating on organic polymers: Novel nucleation process using sodium silicate solution", *Biomaterials*, 20[10] 913-19 (1999).
160. A. Oyane, M. Minoda, T. Miyamoto, R. Takahashi, K. Nakanishi, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silanol groups", *J Biomed Mater Res*, 47[3] 367-73 (1999).
161. A. Oyane, K. Nakanishi, H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, N. Soga, and T. Nakamura, "Sol-gel modification of silicone to induce apatite-forming ability", *Biomaterials*, 20[1] 79-84 (1999).
162. H.-M. Kim, Y. Kim, S.-J. Park, C. Rey, L. HyunMi, M. J. Glimcher, and J. Seung Ko, "Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature", *Biomaterials*, 21[11] 1129-34 (2000).
163. H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and T. Nakamura, "Composition and structure of apatite formed on organic polymer in simulated body fluid with a high content of carbonate ion", *J Mater Sci: Mater Med*, 11[7] 421-26 (2000).
164. T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, and Y. Tamada, "Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process", *J Biomed Mater Res*, 50[3] 344-52 (2000).
165. T. Taguchi, Y. Muraoka, H. Matsuyama, A. Kishida, and M. Akashi, "Apatite coating on hydrophilic polymer-grafted poly(ethylene) films using an alternate soaking process", *Biomaterials*, 22[1] 53-8 (2001).

166. H. M. Kim, M. Uenoyama, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, and T. Nakamura, "Biomimetic apatite formation on polyethylene photografted with vinyltrimethoxysilane and hydrolyzed", *Biomaterials*, 22[18] 2489-94 (2001).
167. A. Oyane, M. Kawashita, K. Nakanishi, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, and T. Nakamura, "Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silane coupling agent and calcium silicate solutions", *Biomaterials*, 24[10] 1729-35 (2003).
168. T. Kokubo, M. Hanakawa, M. Kawashita, M. Minoda, T. Beppu, T. Miyamoto, and T. Nakamura, "Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF", *Biomaterials*, 25[18] 4485-88 (2004).
169. Y.-J. Lee, J. S. Ko, and H.-M. Kim, "The role of cell signaling defects on the proliferation of osteoblasts on the calcium phosphate apatite thin film", *Biomaterials*, 27[20] 3738-44 (2006).
170. F. Balas, M. Kawashita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Formation of bone-like apatite on organic polymers treated with a silane-coupling agent and a titania solution", *Biomaterials*, 27[9] 1704-10 (2006).
171. R. Silverstein, G. Bassler, and T. Morrill, "Spectrometric identification of organic compounds", pp. 103-20. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.
172. L. L. Hench and J. Wilson, "Surface-active biomaterials", *Science*, 226[4675] 630-36 (1984).
173. S.-H. Rhee, J. D. Lee, and J. Tanaka, "Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen", *J Am Ceram Soc*, 83[11] 2890-92 (2000).

Abstract

Preparation of the osteoconductive and biodegradable non-woven fabrics by electrospinning

Kim In Ae

Biomaterials Science in department of Dental Science

The Graduate School

Seoul National University

The calcium silicate, biodegradable polymers, and calcium silicate/biodegradable polymer composite non-woven fabrics were prepared using an electro-spinning method, and their formation capabilities of a low crystalline carbonate apatite and osteoconductivities were evaluated in simulated body fluid (SBF) and with a calverial defect model of New Zealand white rabbit, respectively.

The evaluations of the fibers characteristics, bioactivity, pre-osteoblastic cell responses, and osteoconductivity of the non-woven $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ fabric made by electrospinning method was carried out. Silica gels with four different calcium contents were prepared by condensation following hydrolysis of tetraethyl orthosilicate under acidic conditions. The molar ratios of Ca to Si prepared ranged from 0 to 0.15. $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ fabrics were heat-treated at 300°C for 3 h after spinning. The apatite-forming ability of

heat-treated, non-woven $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ fabric was evaluated in SBF and tended to increase with an increasing Ca to Si molar ratio. However, proliferation and differentiation tended to decrease with an increasing Ca to Si molar ratio. The sample which had the Ca to Si ratio as 0.10 showed good osteoconductivity in vivo in the calvarial defect New Zealand white rabbit model compared to that had the Ca to Si ratio as 0 and empty defect.

The non-woven calcium silicate/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) composite fabric was prepared using the electrospinning method and its osteoconductivity was evaluated. A 17% PCL solution is prepared using 1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) as the solvent, whereas the $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ gel solution is prepared via a condensation reaction following the hydrolysis of tetraethyl orthosilicate. PCL and $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ gel solutions are spun simultaneously with two separate nozzles. As controls, pure PCL and $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ non-woven fabrics are also made by the same methods. The three non-woven fabrics were exposed to SBF for 1 week and resulted in the deposition of a layer of apatite crystals on the surfaces of both the $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ and PCL/ $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ composite fabrics, but not on the PCL fabric. The fracture behaviors of the non-woven calcium silicate fabric was brittle but that of the non-woven PCL fabric was ductile-tough. Meanwhile, the fracture behavior of the PCL/calcium silicate composite fabric was intermediate between that of the calcium silicate and PCL fabrics. The $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ and PCL/ $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ composite fabrics had excellent osteoconductivity in calvarial defects of New Zealand white rabbits within 4 weeks. On the other hand, the pure PCL fabric was observed only the inflammatory response.

The effects of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) degradability on the apatite-forming ability of electrospun PLGA/ $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ composite fabric were investigated. Two PLGA copolymer compositions with low and high

degradability were used in experiments. They were dissolved in HFIP, and each PLGA and SiO₂-CaO gel solutions were spun simultaneously with two separate nozzles under electric fields of 1 and 2 kV/cm using two syringe pumps with flow rates of 7.5 and 5 mL/h, respectively. As controls, low and high degradable PLGA and non-woven SiO₂-CaO fabrics were also made by the same methods. The five non-woven fabrics that were produced were exposed to SBF for 1 week. SBF exposure resulted in the deposition of a layer of apatite crystals on the surfaces of both the SiO₂-CaO and the low degradable PLGA7525/SiO₂-CaO composite fabrics, but not on the low and high degradable PLGA or the high degradable PLGA5050/SiO₂-CaO composite fabrics. The results are explained in terms of the acidity of the PLGA degradation products, which could have a direct influence on apatite dissolution.

A novel method to coat electrospun PLGA fiber surfaces evenly and efficiently with low-crystalline carbonate apatite crystals using a poly(vinyl alcohol) (PVA) vehicle system carrying calcium ions was presented. A non-woven PLGA fabric, which was prepared by electrospinning, was coated with a PVA solution containing 4M calcium chloride dihydrate (specimen PPC). As controls, pure non-woven PLGA fabric (specimen P) and fabric coated with a calcium chloride dihydrate solution without PVA (specimen PC) were also prepared. Three specimens were exposed to SBF for 1 week and this exposure led to form uniform and complete apatite coating layer on the fiber surfaces of specimen PPC. However, no apatite had formed to the fiber surfaces of specimen P and only inhomogeneous coating occurred on the fiber surfaces of specimen PC. These results were explained in terms of the calcium chelating and adhesive properties of PVA vehicle system. The

practical implication of the results is that this method provides a simple but efficient technique for coating the fiber surface of an initially non-bioactive material with low-crystalline carbonate apatite.

The calcium silicate, calcium silicate/biodegradable polymers, and pure non-woven polymer fabrics were fabricated by electrospinning and the low crystalline carbonate apatite was successfully formed on their surfaces through the bioactive calcium silicate and PVA vehicle system with the calcium salt. These electrospun non-woven fabrics, which had good osteoconductivities and biomimetic structures, are believed to be suitable for use in applications such as the guided bone regeneration membrane or bone graft materials.

Key words: electrospinning, non-woven fabric, osteoconductivity, biodegradability, low crystalline carbonate apatite, calcium silicate, calcium silicate/polymer, PVA vehicle system.

Student number: 2008-30630