

성장인자/키토산이 담지된 온도감응성 하이드로젤의 유착방지제로서의 응용

박준규*** · 나재운**† · 최창용**†

*(주)바이오알파, **순천대학교 공과대학 고분자공학과

(2014년 10월 13일 접수, 2014년 11월 16일 수정, 2014년 11월 19일 채택)

Thermosensitive Chitosan-based Hydrogel with Growth Factor as Adhesion Barrier

Jun-Kyu Park***, Jae-Woon Nah**†, and Changyong Choi**†

*Bioalpha Co. Ltd., Jangseong, Jeonnam 515-893, Korea

**Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

(Received October 13, 2014; Revised November 16, 2014; Accepted November 19, 2014)

초록: 조직과 장기 유착은 외과적 수술 후 부작용으로 자주 발생된다. 이러한 조직 유착을 방지하기 위하여 유착 부위에 장벽을 형성하여 장기 유착을 방지할 수 있는 온도감응성 하이드로젤 유착방지제를 제조하고자 하였다. 폴록사머, 키토산과 표피성장인자를 가지고 온도감응성 키토산 하이드로젤을 제조하였다. 제조한 키토산 하이드로젤은 인체 내 온도와 유사한 35 °C에서 졸-겔 전이현상을 보였고, 1분 이내에 빠르게 젤화되었다. 키토산 하이드로젤은 표피성장인자를 7일 동안 천천히 방출하였고, 마우스모델에서 평가한 결과 조직 유착 방지를 효과적으로 하는 것을 확인하였다. 온도 감응성과 항균성을 갖는 키토산 하이드로젤이 장기 부착의 증가와 표피성장인자를 천천히 방출하는 유착방지제로서 유용하게 사용될 수 있다.

Abstract: The adhesion of tissue and organ occur with frequency after surgery. Thermosensitive hydrogel was prepared from poloxamer/chitosan/epidermal growth factor as adhesion barrier agent. The prepared hydrogel showed sol-gel transition temperatures around human temperature and gelation temperature was the faster within 1 min. The hydrogel sustained the release of epidermal growth factor during 7 days. The hydrogel was highly effective for the prevention of tissue and organ adhesion in rat model. The thermosensitive and antibacterial chitosan hydrogel can be useful to consider the anti-adhesion barrier with increased adhesion of organ and sustained release of epidermal growth factor.

Keywords: poloxamer, chitosan, tissue anti-adhesion, hydrogel, epidermal growth factor.

서 론

조직 유착은 외과적 수술 후 흔히 발생하는 합병증으로 수술적 치료 후 손상된 복막이 회복되는 과정에서 인체 내부 조직 또는 막 등이 염증에 의해 들러붙는 현상이다. 조직 유착이 가장 빈번하게 일어나는 부위는 복부이며 이로 인하여 장기능 장애, 장폐색, 만성통증의 후유증을 유발한다.¹ 수술 후 한번 발생한 조직 유착을 제거하기 위해서는 수술적 치료가 고려되어지며 이 경우 환자 및 수술 의사에게 많은 부담을 준다.² 이러한 이유로 수술 시 발생하는 조직 유착을 방지하기 위한 방안이 연구되어지고 있다. 조직 유착을 방지하기 위하여 수술 시 상처를 최소화하고, 염증 발생을 억제할 수 있는 아스피린, 이부프로펜과 같은 항염제를 사용하고, 피브

린의 형성을 막기 위해 조직 플라스미노젠 활성화인자(tissue plasminogen activator)를 투여하고, 그리고 조직간의 물리적 장벽을 만들어 주는 방법 등이 사용되고 있다.^{3,4} 일반적으로 사용되는 유착방지제는 치유되는 동안 세포조직이 영키는 것을 방지하는 물질로, 섬유소로 덮은 표면을 물리적으로 분리시켜 조직간의 유착형성을 억제시키는 기능을 갖고 있다.⁵ 상업적으로 시판 중인 유착방지제 사용되는 주요성분에는 천연 고분자인 sodium carboxymethyl cellulose(CMC), sodium hyaluronate(HA), alginate와 합성고분자인 polyethylene glycol-polypropylene glycol(PEG-PPG, block copolymer), poloxamer 188(PEG-PPG-PEG, triblock copolymer), poloxamer 407(PEG-PPG-PEG, triblock copolymer) 등의 고분자를 함유하고 있다. HA는 생분해성 고분자로 생체 내 반감기가 1~3일로 짧아 조직 유착을 방지할 수 있는 충분한 시간을 갖고 있지 않고, CMC는 인체 내에서 분해가 이루어지지 않는 단점을 가지고 있다. 최근 유착방지제로 주로 연구되어지는 폴

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jwnah@sunchon.ac.kr; ccy@sunchon.ac.kr
©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

록사머는 친수성인 에틸렌 옥사이드(A)와 소수성 부분인 프로필렌 옥사이드(B)가 ABA 구조를 형성하고 있다.⁶ 폴록사머는 물에서 친수성과 소수성 상호작용으로 하이드로젤을 형성할 수 있으며, 이러한 형태의 하이드로젤 제제는 생체적합성이 높고, 수분을 흡수하여 팽윤하는 성질을 갖기 때문에 부드럽고 감촉이 좋으며, 피부에 대한 자극이 적은 장점이 있다.⁷

키토산은 게나 일반새우, 가재 등의 갑각류, 갑오징어 등의 연체류, 그리고 곤충류 및 세균의 세포벽 등에서 얻을 수 있는 *N*-acetyl-*D*-glucosamine이 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합한 형태의 천연다당류인 키토산을 탈아세틸화하여 제조한다.⁸ 키토산은 무기산 수용액에 쉽게 용해되므로 폐수처리용 응집제, 중금속 흡착제, 식품 및 화장품 등 다양한 분야에 활용되어 진다.^{9,10} 키토산은 천연물에서 얻어지는 다당류로서 생체적합성 및 생분해성이 우수할 뿐만 아니라 세포의 결합 및 생체 조직 배양, 항균성, 항취성, 무독성, 지혈작용 등의 생리활성이 있는 것으로 보고되었다.¹¹⁻¹³

표피성장인자(EGF)는 53개 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드로서 혈소판, 대식세포 및 단핵세포에서 생성되며, 상피세포와 섬유아세포상에 존재하는 상피세포성장인자 수용체와 결합함으로써 점막의 상피세포를 포함한 다양한 조직세포의 분화 및 성장을 촉진시켜준다. 상처 내에서 EGF는 재생피화, 육아조직증식, 혈관생성작용을 통한 상처 재건을 촉진시키고, 세포와의 상호작용이 커서 조직부위에 부착을 높여준다.¹⁴ EGF는 피부조직이나 장막과 같은 장기조직의 상피세포의 증식과 분화에 대한 촉진효과가 있다.¹⁵⁻¹⁷ 따라서 EGF는 수술 부위의 상처 난 조직을 빠르게 치료함으로써 정상상태로 되돌리고, 다른 조직과의 유착을 효과적으로 막을 수 있다.

본 연구에서는 표피성장인자가 담지된 폴록사머/키토산 혼합 조성 온도감응성 하이드로젤을 제조하고 이들의 조성에 따른 젤화 온도, 젤화 시간 및 표면 특성을 규명하였다. 좀 더 나아가 제조되어진 하이드로젤의 항균활성 시험 및 하이드로젤로부터 EGF의 방출 특성을 규명하고 동물실험을 통한 조직 유착 특성을 제시함으로써 유착방지제로서 응용 가능성을 제시하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 수용성 젖산염 키토산(M.W.: 200000 Da, 탈아세틸화도: 92%)은 Kittolife Co.(Kyoungki-Do, Korea)에서 제공받았으며, 표피성장인자(EGF)와 폴록사머407는 Simga사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. L-929 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며 배양하기 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)는 Gibco laboratories(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, fetal

bovine serum(FBS)은 Hyclone laboratories(Logan, UT, USA)에서, ninety-six well tissue culture plates 및 tissue culture dish는 Nunc Inc.(North Aurora Road, IL, USA)에서 각각 구입하였다. 그 외의 세포 배양에 필요한 기구는 life technologies(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하고, 모든 시약 및 배양액의 오염 여부는 colorimetric limulus amoebocyte lysate assay법에 의해서 확인되었다. 그 외 모든 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

키토산 하이드로젤의 제조. 폴록사머를 증류수에 17 w/v%가 되도록 용액을 제조한 후 수용성 젖산염 키토산을 1.0, 1.5, 2.0 w/v% 첨가하여 폴록사머/키토산 하이드로젤을 제조하였다. 제조한 하이드로젤을 저온에서 방치한 후 졸 상태에서 EGF를 0.05 w/v%를 첨가하여 균일하도록 교반하여 주었다. 제조한 젤의 안정화를 위하여 제조 후 4시간 동안 4 °C에서 방치하였다.

키토산 하이드로젤의 특성 분석. 제조된 폴록사머/키토산/EGF 혼합 조성물 1 mL을 마이크로 튜브에 넣어 항온조(Jeiotech, Korea)에서 25부터 41 °C까지 1 °C씩 올려주면서 5분 유지시켜 각각의 젤화 온도를 측정하였고, 젤화 시간은 항온조의 온도를 37 °C로 고정하고 젤화되는 시간을 육안으로 확인하여 측정하였다.

온도 증가의 따른 점도변화 측정을 위해 브룩필드 점도계(Brookfield, USA)를 사용하여 샘플 4 g을 spindle CPE 51, speed 5 조건에서 온도를 올려가면서 측정하였다. 또한 레오미터(rheometer; Bohlin Instruments, UK)를 이용하여 하이드로젤의 G' 과 G'' 값을 측정하였다. 젤의 표면 상태를 확인하기 위하여 동결건조 후 금속 스테브 위에 올려놓고 금으로 1분 30초간 진공 증착시킨 후 주사전자현미경(scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용해 표면을 관찰하였고, 주사전자현미경 측정 시 가속전압 20.0 kV에서 측정하였다.

키토산 하이드로젤로부터 EGF의 방출 특성 분석(In Vitro). 폴록사머/키토산/EGF 혼합 조성물 1 mL을 마이크로 튜브에 넣고, 37 °C에서 항온조에 한 시간 동안 젤화시킨 후 1 mL 인산 완충용액(pH 7.4)을 조심스럽게 젤 위에 넣는다. EGF의 방출은 7일 동안 수행하였고, EGF의 함량은 ELISA kit(R&D System, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

하이드로젤의 항균성 실험. 항균력 시험은 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 6538(MRSA)와 *Escherichia coli*(*E. coli*)균 배양액을 1.0 mL씩 채취하여 250 mL 용량의 멸균 삼각플라스크에 접종하여 37±1 °C에서 24시간 진탕 배양하여 균수를 흡광 광도계로 측정하여 1~5 ×10⁵ CFU/mL이 되도록 희석 조제하여 1 mL씩 고체배지에 균을 접종하여 37 °C에서 배양하였다. 배양된 배지에 대조 시료와 하이드로젤을 0.1 mL 씩 각각 넣고, 37 °C에서 24시간 배양하여 균수를 측정하였다.

세포독성 실험. 키토산 하이드로젤의 세포독성은 MTT

assay 이용하여 실험을 수행하였다. 키토산 하이드로젤을 37 °C에서 72시간동안 세포 배양액에서 용출시킨다. 용출시킨 세포 배양액을 가지고 배양하여 세포의 상대적 활성도 측정을 통하여 조사하였다. 실험에는 mouse fibroblast cell L-929 세포를 이용하였다. 570 nm에서의 흡광도 및 식 (1)을 이용하여 생존 세포의 비율을 측정하였다.

세포의 상대적 활성도(%) =

$$\frac{OD_{570(\text{sample})} - OD_{570(\text{blank})}}{OD_{570(\text{control})} - OD_{570(\text{blank})}} \times 100 \quad (1)$$

여기서, $OD_{570(\text{sample})}$ 은 하이드로젤을 용출시킨 배양액의 well의 흡광도, $OD_{570(\text{blank})}$ 은 배양액만 처리된 well의 흡광도이다.

동물 실험. 키토산 하이드로젤의 유착방지 효과와 분해 거동을 확인하기 위하여 Sprague-Dawley rats(Orient bio, Kyeonggi, Korea) (5주령, 150~180 g) 모델을 이용하여 평가하였다. 본 실험은 순천대학교 동물 실험 윤리위원회 허가를 받고 실시하였다. 마취는 케타민과 럽폰을 이용하였고, 젤의 분해 시험은 쥐의 등 피하에 1 cc 주입하여 시간대별로 부피를 측정하여 분해정도를 확인하였다. 유착방지 효과를 확인하기 위하여 쥐의 복부를 절개하여 맹장 표면과 복막에 1×1 cm² 크기의 인위적인 상처를 내고 강제 유착을 일으켰다. 상처를 낸 부위에 하이드로젤을 처리하여 1주일 후 쥐의 맹장과 복막의 유착 정도를 평가하였다. 유착정도는 0~3까지 구분하여 유착 정도는 0=유착이 일어나지 않은 경우, 1=박리가 쉽게 되는 유착이 매우 적게 일어난 경우, 2=유착이 중간 일어난 경우, 3=유착이 심하게 된 경우로 구분하여 평가하였다.^{18,19}

결과 및 토론

키토산 하이드로젤의 물리적 특성. 졸-젤 전이가 가능한 생체적합성 고분자를 이용하여 혼합한 용액으로 상온에서는 액체상태로 존재하여 주사기에 주입이 가능하고, 유착 부위에 주입하게 되면 체온에 의하여 젤 상태로 되는 하이드로젤을 제조하였다. 하이드로젤의 주요 성분인 폴록사머는 생체적합한 물질로서 FDA 승인받았고, 특정 농도에서 자가 응집

성질에 의하여 졸-젤 전이현상을 갖는다.²⁰⁻²² 폴록사머를 증류수에 농도별로 녹이고 24시간 냉장보관을 통해 16, 17, 18 w/v% 샘플을 만들어 젤화 온도를 측정하였고, 그 중에서 상온에서는 졸 상태이면서 온도가 상승함에 따라 졸-젤 전이 온도를 보이는 조성을 조사하였다(Table 1). 16 w/v%의 폴록사머 용액은 졸-젤 전이온도가 인체의 온도보다 높게 나타났고, 18 w/v%의 폴록사머 용액은 젤화온도가 낮아서 상온에서 젤화되었다. 17 w/v%의 폴록사머 용액은 28 °C에서 졸-젤 전이온도를 보였다. 폴록사머는 농도 의존적으로 졸-젤 전이 온도가 바뀌며 일반적으로 폴록사머의 20% 이상의 농도에서는 25 °C 이하의 낮은 농도에서 졸-젤 전이온도를 보인다.²³ 또한 폴록사머의 졸-젤 전이현상은 농도가 15~16%일 때부터 나타나기 시작하며, 이 농도 부근에서는 작은 농도의 변화에 의해서도 졸-젤 전이온도가 급격하게 변하는 현상을 보고하고 있다.²⁴⁻²⁶ 보고에²⁴ 의하면 폴록사머의 졸-젤 전이온도는 농도가 16%일 때 약 38 °C이며, 17%일 때 약 29 °C로 급격하게 감소되며, 그 이상의 농도에서는 졸-젤 전이온도 변화가 작다는 것을 보여 주고 있다. 이러한 폴록사머의 졸-젤 전이온도와 농도와의 상관관계는 본 연구의 결과와 일치하고 있다. 키토산이 첨가되지 않은 순수 폴록사머의 수용액의 경우 폴록사머의 농도가 증가함에 따라 졸-젤 전이온도가 낮아지는 경향을 보이고 있다. 이는 졸-젤 전이에 영향을 주는 분자 내 또는 분자간의 소수성 상호작용이 높은 농도에서 증가하고 이 결과 젤화 온도가 낮아지는 것으로 보인다. 17 w/v%의 폴록사머 용액은 28 °C에서 졸-젤 전이온도를 보임으로써 키토산과 같은 친수성 물질을 도입시키면 졸-젤 전이 온도의 상승이 예측되어 인체 내에서 적용이 가능한 졸-젤 전이온도에 따른 하이드로젤을 제조할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 폴록사머의 농도는 17 w/v%로 고정시키고 항균성과 친수성을 갖는 키토산을 1.0, 1.5, 2.0 w/v% 등의 농도로 폴록사머 용액에 첨가하여 이들의 젤화온도 및 젤화 속도 등을 규명하였다. 이 결과는 Table 1에 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 키토산의 농도가 증가함에 따라 젤화 온도가 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 키토산이 2.0 w/v% 첨가되었을 때 인체의 체온과 가장 비슷한 35 °C에서 졸-젤 전이를 보이

Table 1. Composition and Gelation Characteristic of Poloxamer/Chitosan Solution

Sample name	Contents			Gelation temp. (°C) ^a	Start swelling temp. (°C) ^b	Gelation time (sec)
	Poloxamer (w/v%)	Chitosan (w/v%)	EGF (w/v%)			
C1	16	-	0.05	39	37.12	-
C2	17	-	0.05	28	27.61	30
H1	17	1.0	0.05	30	28.91	20
H2	17	1.5	0.05	33	31.20	30
H3	17	2.0	0.05	35	32.24	40
C3	18	-	0.05	20	N.D.	10

^aThe phase transition temperature determined by tube inversion method and rheometer. ^bThe start swelling temperature measured by Rheometer.

는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 졸-젤 전이온도를 낮추는 폴록사머 분자 내의 소수성 정도를 친수성 키토산이 첨가되면서 분자간의 소수성 상호작용을 저해시킴으로써 졸-젤 전이온도가 상승되는 것으로 사료된다. 또한 졸-젤 전이로 인한 젤화 시간은 분자간의 소수성 상호 작용이 증가함에 따라서 즉 폴록사머의 농도가 높을수록, 동일한 폴록사머의 농도에서는 친수성인 키토산의 농도가 낮을수록 짧아지는 현상을 보였다(Table 1). 키토산과 글리세롤 인산나트륨을 이용한 젤의 경우는 키토산의 아민과 인산나트륨의 이온결합으로 인하여 젤이 형성되고,²⁷ 알지네이트가 포함된 폴록사머 젤의 연구에서는 폴록사머의 젤에 알지네이트는 영향을 주지 않고 젤의 강도를 증가시킨다고 보고되어졌다.²² 이러한 연구 결과는 본 연구 결과에서 나타난 젤의 형성은 폴록사머에 의해서만 젤이 형성되는 것을 확인할 수 있고, 키토산의 영향으로 졸-젤 전이온도가 변한다는 것과 잘 일치하고 있다. 특히 폴록사머/알지네이트 하이드로젤에 관한 연구 등에서 알지네이트는 키토산과 비슷한 구조를 갖고 있는 폴리사카라이드로 본 연구에서 제시하는 폴록사머/키토산 하이드로젤과 비슷한 결과를 보고하고 있다.²² 또한 폴록사머의 수용액에 친수성 물질의 첨가제가 도입되었을 때 젤화 온도가 상승된다는 보고가²⁸ 있으며, 이 결과 역시 본 연구에서 친수성 역할을 하는 키토산이 첨가됨에 따라 졸-젤 전이온도가 상승한다는 결과와 일치하고 있다.

인체의 체온 근처인 37°C 부근에서 졸-젤 전이온도를 기대할 수 있는 폴록사머의 농도를 17 w/v%로 고정하고 여기에 키토산의 농도를 1.0, 1.5 2.0 w/v%로 변화시켜 온도에 따른 점도를 측정하여 졸-젤 전이온도를 측정하였다. 용액의 점도는 Brookfield 점도계를 사용하였으며 이 결과는 Figure 1에 나타냈다. 키토산의 함량이 1.0 w/v%인 H1의 경우 상온

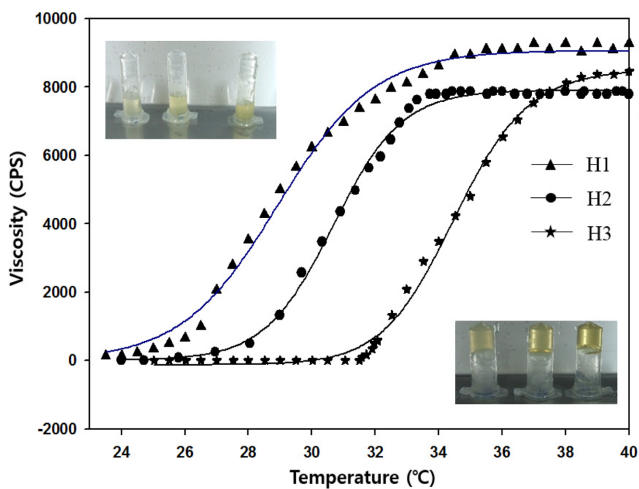


Figure 1. Viscosity of chitosan hydrogel with the increment of temperature (Hydrogel composition (poloxamer/chitosan/EGF, w/v%); H1 (17/1.0/0.05), H2 (17/1.5/0.05), H3 (17/2.0/0.05)).

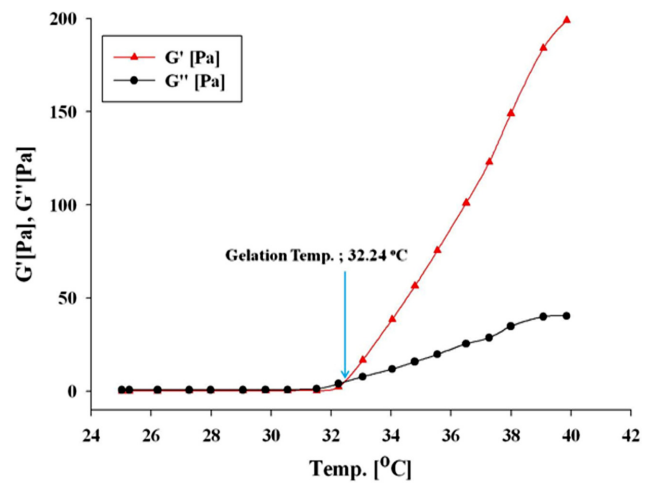


Figure 2. Rheological properties (G' and G'') of chitosan hydrogel (H3).

에서부터 점도가 상승되어 32°C 부근에서부터 점도가 변화하지 않았다. 또한 H2 경우 H1 보다 높은 온도인 27°C부터 점도가 상승하고 33°C부터 점도의 변화가 관찰되지 않았다. 키토산의 함량이 2.0 w/v%인 H3의 경우 친수성의 증가로 32°C에서부터 점도가 증가하여 38°C까지 점도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 H3가 체온 부근에서 졸-젤 전이가 가능하여 유착방지제로 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대되어 이하의 H3를 이용한 다음 실험을 진행하였다.

H3의 정확한 젤화 시작온도를 특정하기 위하여 레오미터를 이용하여 elastic modulus(G')과 loss modulus(G'')를 측정하였으며 이들의 교차하는 부분을 젤화 시작온도로 결정하였다(Figure 2).²⁹ Figure 2와 Table 1에 이 결과를 요약하여 나타냈으며, 이 결과에서 볼 수 있듯이 키토산의 농도가 증가함에 따라 졸-젤 전이온도가 상승하고 있는 것을 알 수 있었다. 이는 친수성을 갖는 키토산의 첨가에 의한 결과이다. 또한 키토산 하이드로젤의 점도 및 G' 와 G'' 는 낮은 온도에서는 낮은 값을 보이지만 젤이 형성함에 따라 점차적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.

인체에 적용이 가능한 H3의 키토산 하이드로젤의 모폴로지를 확인하기 위하여 H3의 단면과 표면을 SEM으로 관찰하였으며 이 결과는 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에서 H3의 단면을 보여주는 결과로부터 내부에 많은 기공을 갖는 다공성 하이드로젤임을 알 수 있었다. 이러한 다공성은 다공성 내부로 본 연구의 성장인자를 효과적으로 담지할 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 본 연구에서 제시하는 키토산 하이드로젤은 유착방지제 뿐만 아니라 다공성 특성을 활용하여 연골 재생 등과 같이 다공성을 필요로 하는 스케폴드에도 적용이 가능할 것으로 기대된다.

키토산 하이드로젤로부터 EGF의 방출 특성. 키토산 하이

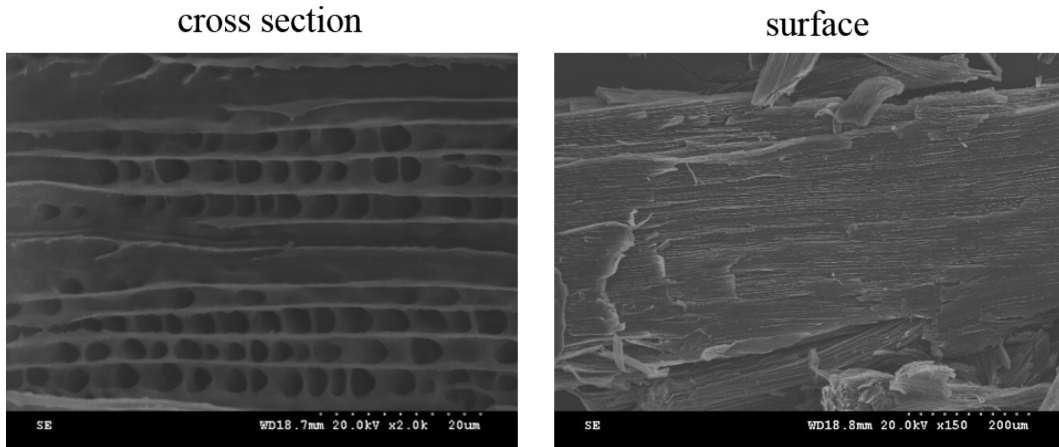


Figure 3. Images of cross section and surface of chitosan hydrogel (H3) by SEM.

드로젤 H3에 담지된 EGF 방출 거동을 규명하기 위하여 하이드로젤을 형성시킨 후 PBS(pH 7.4)를 넣고 37 °C에서 7일간 측정하였다. EGF 방출 거동을 7일로 고정시킨 이유는 본 연구에서 유착방지제로 적용시킬 부위는 복막이며 이 부위 상처는 7일 이내에 대부분 치유되기 때문에 이 기간에 준하여 실험하였으며³⁰ 그 결과는 Figure 4에 나타났다. 이 결과에서 볼 수 있듯이 EGF는 7일간 지속적으로 방출되며, 7일에 90% 이상 방출된 것을 확인할 수 있었다.

키토산 하이드로젤로의 항균력 시험. 하이드로젤의 항균력 시험은 MRSA균과 *E. coli*균을 가지고 실험을 하였으며 이 결과는 Table 2에 요약하였다. 대조군으로는 키토산이 포함되지 않은 17 w/v% 폴록사머 용액을 사용하였으며 이때의 MRSA와 *E. coli*에 대한 항균활성은 각각 33.3%와 41.2%를 보였다. 이는 폴록사머의 폴리에틸렌글리콜이 수화작용으로 인하여 균주의 성장을 방해하기 때문이다. 또한 키토산이 첨

Table 2. Antimicrobial Activity of Poloxamer and Poloxamer/Chitosan Hydrogel with EGF

Sample	Contents			Antibacterial activity (%)	
	Poloxamer (w/v%)	Chitosan (w/v%)	EGF (w/v%)	MRSA	E. Coli.
C2	17	-	0.05	33.3	41.2
H1	17	1.0	0.05	57.7	90
H2	17	1.5	0.05	75.0	95
H3	17	2.0	0.05	90.6	98

가되어 있는 키토산 하이드로젤의 경우 키토산의 농도가 높아질수록 항균력이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 H3의 경우 MRSA와 *E. coli*에 대하여 각각 90.6%, 98.0%의 높은 항균 활성을 보였다. 이러한 결과는 키토산의 아민그룹에 의해 키토산이 균의 세포벽을 파괴함으로써 균의 대한 항균력을 갖는다는 보고와도 일치하고 있다.³¹

키토산 하이드로젤 세포독성 시험. 하이드로젤 제조에 사용된 키토산과 폴록사머는 세포독성이 없는 물질로 알려져 있다. 그러나 항균력과 세포독성은 밀접한 관계를 있으므로 제조되어진 키토산 하이드로젤 중 키토산의 농도가 가장 높으면서 유착방지제로 응용이 가능한 H3를 이용하여 L-929 세포 독성을 MTT assay 방법으로 수행하였다. 이 결과는 Figure 5에 나타났다. 결과에서 볼 수 있듯이 H3의 경우 하이드로젤 제형에서도 70% 이상의 세포 생존율을 보임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 H3는 높은 항균력을 갖고 있음과 동시에 낮은 세포독성을 갖고 있는 물질로서 인체 내의 적용이 가능한 물질로 기대된다. 일반적으로 의료기기의 세포독성은 기준보다 중간 정도의 독성 이하이어야 의료기기의 적용이 가능하다. 세포독성이 적으면서 항균력을 갖는 온도감응성 키토산 하이드로젤은 수술 시 또는 수술 후의 환자에 적용한다면 수술 현장에서의 감염을 예방할 수 있을

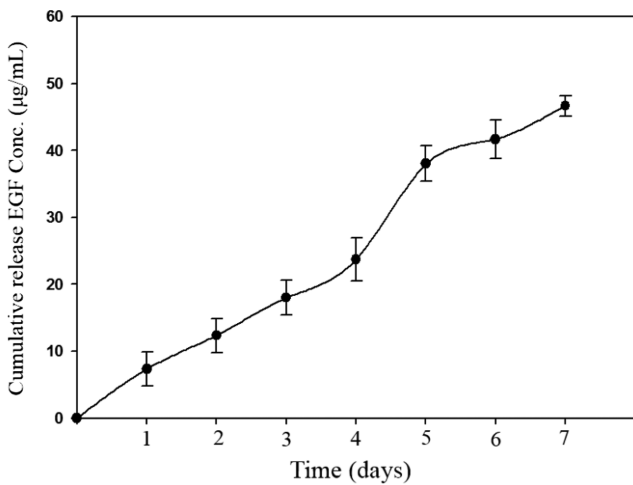


Figure 4. Cumulative release profile of EGF from chitosan hydrogel (H3) in PBS, pH 7.4 at 37 °C (n=3).

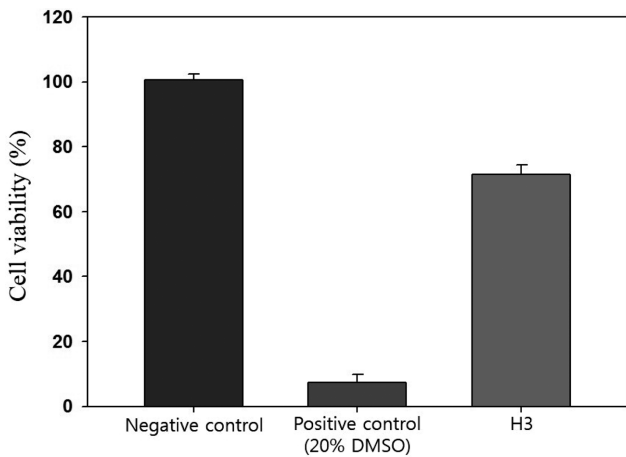


Figure 5. Cytotoxicity of chitosan hydrogel (H3) against L929 cells (n=5).

것으로 기대된다.

키토산 하이드로젤을 이용한 유착방지 동물 실험. 키토산 하이드로젤의 분해기간을 확인하기 위하여 쥐의 등 피부에 키토산 하이드로젤을 주입하여 크기를 비교한 결과 점차적으로 크기가 감소하였고, 7일이 지난 후에는 하이드로젤이 완전히 분해되어 없어지는 것을 확인하였다(Figure 6).

키토산 하이드로젤의 유착방지 효과를 규명하기 위하여 쥐의 맹장 표면과 복막에 인위적인 상처를 내어 강제 유착을 일으키고, 그 부위에 키토산 하이드로젤을 처리하여 1주일 지난 후 개복을 하여 유착여부를 확인하였으며 이 결과는 Figure 7에 나타냈다. 대조군으로서는 PBS만 사용한 군은 조직 유

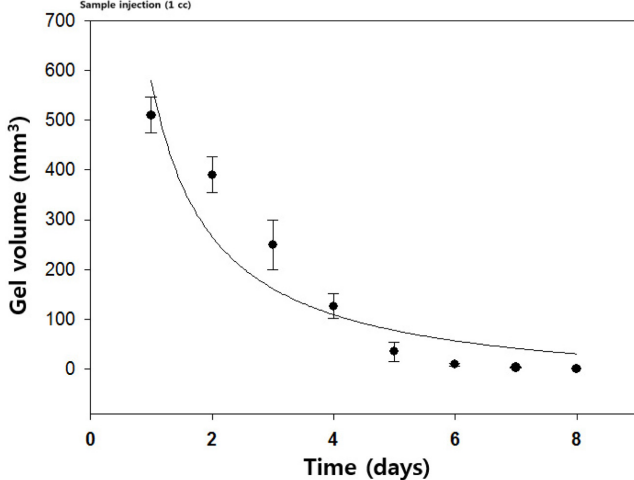
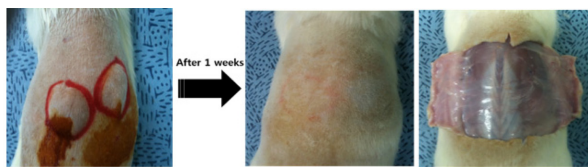


Figure 6. *In vivo* degradation of chitosan hydrogel (H3) (n=3).

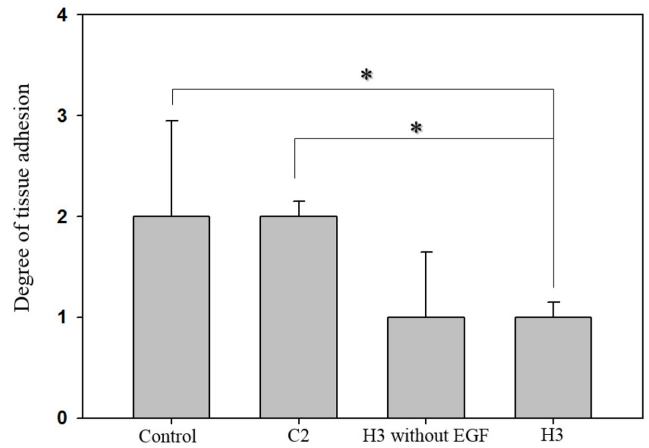
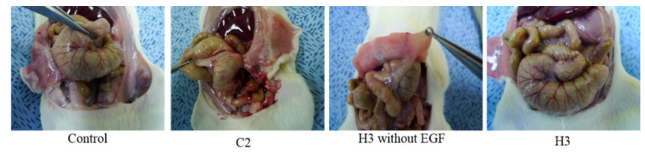


Figure 7. Comparison of peritoneal tissue adhesion of chitosan hydrogel after 7 days (n=5). Results presented as median + standard deviation. * $p < 0.05$.

착이 많이 발생하였고, 이에 비하여 키토산이 함유된 군과 EGF를 담지된 키토산 하이드로젤군은 유착이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 표피성장인자인 EGF가 담지된 군과 키토산이 포함된 군간의 통계적으로는 유의하지 않았지만 EGF가 손상된 장기 조직의 회복에 도움을 준다는 보고에 의하면 EGF가 포함된 키토산 하이드로젤의 경우 조직 유착 방지제 및 손상 조직에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, EGF와 키토산이 포함됨으로서 하이드로젤은 유착방지가 필요한 부위의 장기나 조직에 대하여 부착력이 더 증가되어,³² 시술 부위에서 흘러내리지 않고 부착되어 있어 조직간의 장벽을 잘 형성함으로써 효과적으로 유착을 방지할 수 있게 된다. 임상적으로 유착점수가 2 이상일 때 유착의 되었다고 판단하며, EGF가 포함된 키토산 하이드로젤은 그 이하의 효과를 보였다.

본 연구에서는 키토산 하이드로젤의 졸-겔 전이온도, 점도, 항균성, 유착 평가에 대해서만 실험을 하였지만, 키토산과 EGF의 첨가의 따른 젤의 접착 강도와 염증 및 세포증식과 같은 조직변화의 대한 추가적인 연구가 필요하다. 하지만, 이러한 연구결과로서 상온에서는 액체상태로서 주사기에 주입하여 상처부위에 처리함으로써 젤을 형성하여 유착방지 효과를 보임으로써 유착방지제로서의 가능성을 확인하였다.

결론

생체적합성이 좋고 항균력을 갖는 온도감응성 키토산 하이드로젤을 제조하고 표피성장인자를 첨가하여 조직에서의 젤

의 부착과 상처치유를 촉진하는 유착방지제를 제조하였다. 제조한 젤은 상온에서는 액체 상태로 주사기기를 이용하여 인체 내에 편리하게 주입이 가능한 제형이며, 인체 내에서 주입 또는 분사 시 인체 내의 온도에 의해 젤을 형성하여 조직에 일정기간 부착하여 막을 형성함으로써 유착을 방지하게 된다. 제조한 키토산 하이드로젤은 35 °C에서 졸-젤 상전이 현상을 보였고, 30초 이내에 젤을 형성함으로써 정확한 조직 부위에 처치가 가능하다. 최적의 키토산 하이드로젤 조성은 17 w/v%의 폴록사머 수용액에 2.0 w/v%의 키토산을 첨가한 조성이 최적의 조건이었다. 제조한 키토산 하이드로젤은 항균력 시험결과 MRSA와 *E. coli*균에서 90%이상의 항균력을 보였으며, 세포독성이 거의 없는 것을 확인하였다. 동물모델을 통하여 조직 유착방지 효과를 평가한 결과 EGF가 포함된 키토산 하이드로젤을 처리한 실험군(평균 유착점수: 0.6)이 PBS만 처리한 대조군(유착 평균 유착점수: 2.4)에 비하여 4 배 정도 조직 유착을 낮추는 결과를 보였다. 이러한 결과로서 제조한 성장인자가 담지된 온도감응성 키토산 하이드로젤이 유착방지제로서의 응용이 가능하다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HI13C1527).

참 고 문 헌

- H. Y. Yang, K. S. Suh, Y. K. Youn, S. W. Kim, S. J. Kim, K. U. Lee, and Y. H. Park, *J. Korean Surg. Soc.*, **52**, 335 (1997).
- W. J. Lee, B. I. Moon, J. B. Park, I. M. Kim, and B. O. You, *J. Korean Surg. Soc.*, **49**, 192 (1995).
- K. Falk, P. Bjorquist, M. Stromqvist, and L. Holmdahl, *Br. J. Surg.*, **8**, 286 (2001).
- H. S. Shim, Y. W. Lee, Y. M. Lee, Y. H. Oh, S. W. Kwon, J. H. Kim, and S. K. Sohn, *J. Korean Sur. Soc.*, **63**, 179 (2002).
- M. Hurme, K. Katevuo, F. Nykvist, T. Aalto, H. Alaranta, and S. Einola, *Acta Radiol.*, **32**, 286 (1991).
- D. Attwood, J. H. Collett, and C. J. Tait, *Int. J. Pharm.*, **126**, 25 (1985).
- V. V. Ranade and J. B. Cannon, *Drug Delivery Systems*, CRC Press, London, 2011.
- C. J. Brine and P. R. Austin, *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.*, **69**, 283 (1981).
- F. Shahi, J. K. V. Arachchi and Y. J. Jeon, *Trends Food Sci. Technol.*, **10**, 37 (1999).
- E. E. Evans and S. P. Kent, *J. Histochem. CytoChem.*, **10**, 24 (1962).
- S. Tokura and I. Azuma, *Chitin Derivatives in Life Science*, Japan Soc. Chitin, Sapporo, 1992.
- I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, and K. Hatano, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 431(1993).
- R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Carbohydr. Res.*, **164**, 433 (1987).
- D. H. Na, Y. S. Youn, I. B. Lee, E. J. Park, C. J. Park, and K. C. Lee, *Pharm. Dev. Technol.*, **11**, 513 (2006).
- R. A. Goodlad, T. G. Wilson, W. Lenton, H. Gregory, K. G. McCullagh, and N. A. Wright, *Experientia*, **41**, 1161 (1985).
- L. E. Bragg, T. C. Hollingsed, and J. S. Thompson, *J. Parenter. Enteral Nutr.*, **14**, 283 (1990).
- M. Reim, T. Kehrer, and M. Lund, *Ophthalmologica*, **197**, 179 (1988).
- Y. Jaacobi, A. A. Israel, and E. P. Goldberg, *J. Surg. Res.*, **55**, 422 (1993).
- A. A. Luciano, K. S. Hauser, and J. Benda, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **146**, 88 (1983).
- I. R. Schmolka, *J. Am. Oil. Chem.*, **54**, 110 (1977).
- G. Wanka, H. Hoffman, and W. Ulbricht, *Macromolecules*, **27**, 4145 (1994).
- S. H. Oh, J. K. Kim, K. S. Song, S. M. Noh, S. H. Ghil, S. H. Yuk, and J. H. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **72A**, 306 (2005).
- K. Edsman, J. Carlfors, and R. Petersson, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 105 (1998).
- Y. Y. Chen, H. C. Wu, J. S. Sun, G. C. Dong, and T. W. Wang, *Langmuir*, **29**, 3721 (2013).
- H. H. Jung, K. Park, and D. K. Han, *J. Control. Release*, **147**, 84 (2010).
- R. K. Prud'homme, G. Wu, and D. K. Schneider, *Langmuir*, **12**, 4651 (1996).
- J. K. Park, K. J. Lee, D. H. Son, C. Choi, M. K. Jang, and J.-W. Nah, *J. Chitin Chitosan*, **16**, 45 (2011).
- J. Chen, R. Zhou, L. Li, B. Li, X. Zhang, and J. Su, *Molecules*, **18**, 12415 (2013).
- G. Wei, H. Xu, P. T. Ding, S. M. Li, and J. M. Zheng, *J. Control. Release*, **83**, 65 (2002).
- H. Ellis, W. Harrison, and T. B. Hugh, *Br. J. Surg.*, **52**, 471 (1965).
- M. H. Kim, S. C. Park, M. K. Jang, J. W. Nah, K. S. Hahm, and Y. Park, *J. Chitin Chitosan*, **13**, 1 (2008).
- T. Gratieri, G. M. Gelfuso, E. M. Rocha, V. H. Sarmoto, O. D. Freitas, and R. F. V. Lopez, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **75**, 186 (2010).