유착방지제의 응용을 위한 가시광 경화형 Carrageenan 유도체의 제조

김재원·김은혜·한가득·노승현·김신웅·최창순*·나재운**·김태연***·손태일^{*}◎ 중앙대학교 시스템생명공학과, *중앙대학교 식품생명공학부 식품영양학과, **순천대학교 고분자공학과, ***분당재생병원 성형외과학과

(2017년 10월 9일 접수, 2017년 11월 20일 수정, 2017년 12월 1일 채택)

Preparation of Visible light-Curable Carrageenan Derivatives for Application as Anti-adhesion Agent

Jae-Won Kim, Eun-Hye Kim, Ga-Dug Han, Seung-Hyun Noh, Shin-Woong Kim, Chang-sun Choi*, Jae-woon Nah**, Tae-Yeon Kim***, and Tae-II Son^{†®}

Department of Systems Biotechnology, Chung-Ang University, Anseong-si, Gyeonggi-do 17546, Korea *Department of Food and Nutrition, School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung-si, Kyounggi-do 17546, Korea **Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 57940, Korea ***Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Bundang-Jesaeng-General Hospital, Seohyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi 13590, Korea (Received October 9, 2017; Revised November 20, 2017; Accepted December 1, 2017)

초록: 유착방지제를 개발하기 위해 천연고분자인 K-Carrageenan을 이용하여 가시광 경화형 carrageenan 유도체(F-Cm-Carrageenan)를 제조하였다. Carrageenan은 생분해성, 생체적합성 등과 같은 특성을 가진 천연고분자이다. Riboflavin은 무독성, 생체적합성을 가지는 천연 광개시제이다. Riboflavin은 가시광 경화형 carrageenan 유도체에 광 경화를 유도한다. 'H NMR(proton nuclear magnetic resonance), GPC(gel permeation chromatography) 분석을 통하 여 F-Cm-Carrageenan이 제조된 것을 확인하였으며 가시광 조사시간에 따른 광경화 정도를 판단하기 위해서 광경화 실험을 진행하였다. 또한 유착방지제로 응용가능 여부를 판단하기 위해서 세포독성 실험, 유착방지 실험, 세포투과 실 험을 진행하였다. 따라서 가시광 경화형 carrageenan 유도체는 새로운 형태의 유착방지제로서 응용될 수 있다고 사료 된다.

Abstract: To develop anti-adhesion agent using photo-reaction, visible light curable carrageenan derivatives (F-Cm-Carrageenan) was prepared by using K-Carrageenan which is natural polymer. Carrageenan is a natural polymer having properties such as bio-degradability and bio-compatibility. Riboflavin is a non-toxic, bio-compatible natural photo-initiator. Riboflavin induces photo-crosslinking in visible light-curing carrageenan derivatives. ¹H NMR (proton nuclear magnetic resonance) and GPC (gel permeation chromatography) analysis were conducted to confirm that F-Cm-Carrageenan was prepared. Photo-curing test was conducted to determine the degree of photo-curing with visible light irradiation time. To evaluate the applicability as an anti-adhesion agent, cytotoxicity test, anti-adhesion test and cell penetration test were conducted. Therefore, it is considered that the visible light curable carrageenan derivatives can be applied as a new type of anti-adhesion agent.

Keywords: visible light curable carrageenan derivatives, riboflavin, photo-curing, anti-adhesion, anti-adhesion agent.

서 론

유착은 수술 후 회복 과정에서 나타날 수 있는 대표적인

문제로 정상적으로 분리되어 있던 생체 조직들이 외과 수술 등으로 인하여 주변 조직과 비정상적으로 접합되는 현상이 다. 일반적으로 유착은 자가 치유과정에서 볼 수 있는 현상 이며 유착은 육아(granulation tissue)나 반흔(scar)이 형성될 때 서로 엉켜 붙거나 또는 상처부위에서 석출되는 다량의 섬 유소가 엉겨서 유착을 발생시키기도 한다.¹ 유착이 발생하게 되면 상처 부위에 조직 또는 기관이 제대로 된 기능을 수행

[†]To whom correspondence should be addressed. tisohn@cau.ac.kr, ORCiD[®]0000-0002-7705-5662 ©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

할 수 없다. 이러한 문제로 인하여 수술 후에 여러 종류의 후 유증이 발생될 수 있다.¹⁴

수술 후에 후유증의 발생을 예방하기 위해서 유착방지는 중요하다. 그래서 유착 방지와 관련하여 다양한 방법이 시도 (수술시 조직손상과 이물질에 의한 유착을 최소화하는 방법, 약물을 이용한 유착을 억제하는 방법, 물리적으로 유착을 차 단하는 방법)가 되고 있지만 다양한 방법 중에서도 물리적으 로 유착을 차단하는 유착방지제에 대한 연구가 많이 진행되 고 있다.! 물리적장벽을 이용한 유착방지제는 수술 과정에서 유착이 예상되는 부위에 물리적 장벽(barrier)을 형성시켜 수 술 부위에 정상 조직 사이에서 유착이 일어나는 것을 막아주 는 역할을 한다.^{2,5,6} 유착방지제는 기본적으로 무독성, 생체적 합성, 생분해성을 가져야 하며 또한 치유 기간동안 체내에 존 재하여 면역반응을 일으키지 않아야 한다.⁷

유착방지제 소재로 여러 고분자가 이용되고 있지만, 그 중 에서도 유착방지제의 기본적인 특성을 가지는 천연고분자 소 재를 활용한 유착방지제에 대한 연구가 많이 진행되어오고 있다. 여러 종류의 천연고분자가 존재하지만 그 중에서 carrageenan은 갈조류에서 추출한 선형의 고분자 다당류 (polysaccharide)이며 galactose와 3.6 anhydro-galactose의 반 복적인 형태로 구성된 천연고분자이다.8.9 각 단위체는 α-1,4glycoside결합과 β-1,4-glycoside결합이 교대로 연결되어 있으 며, ester sulfate기의 수와 위치에 따라 Kappa-, iota-, lambdacarrageenan이라 명명한다(Figure 1).⁹⁻¹¹ 그래서 각 carrageenan 종류마다 젤화되는 정도가 다르며 용도에 따라 다르게 이용 된다.^{8,10,12} Carrageenan은 생체적합성, 생분해성, 낮은 독성의 특성을 가지고 있다. 또한 carrageenan은 항 염증 성질(antiinflammatory property)을 가지고 있으며 일부의 in vitro 연구 에서 포진(herpes)와 A형 간염 바이러스(hepatitis A virus)의 복제를 억제하는 항 바이러스 성질(anti-viral property)이 발견 되었다.¹⁰ Carrageenan은 점도 형성, 안정제(stabilized agent)로 서 식품 산업에 이용되고 있다. 9,10,12 또한 의료 산업에서 체액 을 흡수하는 성질이 있기 때문에 상처 드레싱(wound dressing) 에 활용되고 있다. Carrageenan은 식품 산업, 의료 산업 뿐만 아니라 화장품 산업과 같이 여러 산업에 응용되고 있다.10,12 현재 물리적 장벽을 이용한 유착방지제는 형태적으로 필름

연재 물디직 정력을 이용한 규직정지세는 영대적으로 될음 (film), 직물(knit), 젤(gel), 용액(solution), 스프레이(sprayable hydrogel, spray) 등과 같은 여러 형태로 연구가 진행되고 있 다. 3-5,7,13 각각의 형태는 장점과 단점이 존재한다. 필름과 직 물형태는 유지력이 뛰어나다는 장점을 가지지만 장기 표면에 잘 부착되지 않으며, 정확한 목표 부위에 부착하기 힘들다는 단점을 가진다. 젤과 용액형태는 목표부위에 도포하기 쉬우 나 유지하기 어렵다는 단점을 가진다. 현재 연구된 유착방지 제에 대한 단점을 보완하기 위해 젤과 용액 형태의 장점인 목표부위에 도포하기 쉬우면서도 필름과 직물형태의 장점인 유지력을 높일 수 있는 새로운 형태의 유착방지제를 개발하 는 것이다. 물질 소재의 유지 형태를 높이기 위해 물리적, 화 학적, 생물학적 등 여러 형태의 반응을 하여 유지력을 높인 다. 그러나 이러한 반응을 이용한 방식들은 물리적, 화학적 변형이 일어날 수 있으며, 잔여물질이 남아 잠정적인 문제점 을 가질 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 광반응을 활용한 광경화형 소재에 대한 여러 연구가 진행되어오고 있다. 여러 연구에서 개발되고 있는 광경화형 소재들은 주로 자 외선(ultraviolet rays; UV)에 의하여 경화되는 소재들이다. 그

러나 자외선은 피부암, 유전자 변형, 면역체계 약화 등 여러 심각한 문제를 야기시킬 수 있다. 그러나 가시광은 자외선과 달리 여러 악영향을 미치지 않는다.¹⁴¹⁷ 가시광 반응성 작용 기인 퍼퓨릴기(furfuryl group)는 광개시제(photo-initiator) 존재 하에서 가시광이 조사되면 photo-oxdiation crosslinking(POC) mechanism에 의해서 경화가 진행된다.^{18,19}

현재 여러 종류의 광개시제가 존재하지만 인공적으로 합성 된 광개시제인 경우에는 적은 양이더라도 인체 내에서 잠정적 인 문제를 야기시킬 수 있다. 일부 연구자들은 생체 소재(biomaterial) 내에 잔류하고 있던 광개시제가 작은 독성물질로 작 용할 가능성이 있다고 주장한다.²⁰⁻²² 이러한 문제점을 해결하 기 위해서 천연 광개시제인 riboflavin(vitamin B2)을 이용하 였다.²³ Riboflavin은 식물과 많은 미생물 군집에 의해 생성된 수용성 비타민으로 식용으로 사용할 수 있으며 많은 식품산 업에서 승인된 황색 염료이다. Riboflavin은 무독성, 생체적 합성, 생분해성 등 여러 특성을 가지는 천연 광개시제이다. Riboflavin은 근자외선, 가시광선 영역에서 흡수 스펙트럼을 나타내기 때문에 가시광선을 이용하여 광반응을 유도할 수 있어서 다양한 광반응을 유도하는 개시제로 이용되고 있다.²⁰ 본 연구의 목적은 도포하기 쉬우며 가시광 경화반응을 이



kappa-Carrageenan

iota- Carrageenan

lambda- Carrageenan

Figure 1. Chemical structures of three types of carrageenan.



RF: Riboflavin(Dye)

Figure 2. Visible light-curing progress scheme of F-Cm-Carrageenan riboflavin photosensitizes the oxygen molecules to generate singlet oxygen, and the resulting singlet oxygen reacts with furan derivatives to afford crosslinking through the formation of furan endoperoxide.

용하여 물리적 장벽의 유지력을 향상시켜 유착방지 효과를 높일 수 있는 유착방지제의 개발이다. 이를 위해 가시광 경 화형 carrageenan 유도체를 제조하였고 가시광 경화형 carrageenan 유도체는 광개시제인 riboflavin 존재 하에서 가 시광이 조사되면 광경화반응이 진행된다(Figure 2). 이 때 조 직과 조직 사이에 장벽을 형성시켜 유착 방지 효과를 얻을 수 있다.

가시광 경화형 carrageenan 유도체는 수소 핵 자기공명법 (proton nuclear magnetic resonance; ¹H NMR), 젤 투과 크로 마토그래피(gel permeation chromatography; GPC)를 통해 제 조되었음을 확인하였다. 가시광 경화형 carrageenan 유도체의 독성 유무를 판단하기 위해 세포독성 실험을 진행하였다. 가 시광 경화형 carrageenan 유도체가 장벽 역할을 할 수 있는 지 유무를 확인하기 위하여 유착방지 실험과 세포 투과실험 을 하였다.

실 험

재료. *Kappa*-Carrageenan(K-Carrageenan; sulfated plant polysaccharide), furfurylamine, riboflavin(vitamin B2), deuterium oxide(D₂O), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA)은 Sigma-Aldrich(USA)의 제품을 사용하였으 며, monochloroacetic acid, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3ethylcarbodiimide(EDC), *N*-hydroxysuccinimide(NHS)는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하 였다. 또한 dimethylsulfoxide(DMSO)는 삼전순약공업 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 WelGene Inc. 제품을 사용하였으며, Fetal bovine serum (FBS), bovine calf serum(BCS), penicillin-streptomycin은 Gibco(Eggenstein, Germany) 제품을 사용하였다. Nylon net filter(pore size: 10 µm)은 Merck Millipore Ltd.(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다.

F-Cm-Carrageenan의 제조. 카르복시 메틸화 반응을 통 해 K-Carrageenan에 카보닐기(carboxyl group)를 도입하여 carboxymethyl carrageenan(Cm-Carrageenan)을 제조하였다.¹³ 간단히 설명하자면, K-Carrageenan(5 g)과 2-propanol(100 mL) 을 30분 동안 교반하였으며, 1 mL의 24 N NaOH 용액(8 mL) 을 매 15분마다 첨가하였다. Monochloroacetic acid(27.2 g)를 넣고 50 °C에서 5시간 교반하였다. 여과 후, 생성물을 희석된 ethanol(4:1 비율)과 ethanol로 세척하였다. 세척 후, 70 °C에 서 오븐 건조하였다.

카복시 메틸화된 carrageenan(Cm-Carrageenan, 500 mg)을 MES 완충액(100 mL)에 용해시켰다. 이어서, 1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC, 500 mg)와 N-hydroxysuccinimide(NHS, 700 mg)를 첨가하고 30분 동안 교반하였 다. Furfurylamine(900 μL)을 dimethylsulfoxide(DMSO, 40 mL) 에 희석시킨 후, 혼합물에 첨가하였다. 1 N HCl을 사용하여 pH 4.8로 적정하였다. 혼합물을 어두운 곳에서 24시간 동안 반응시켰다. 용액을 하루동안 투석하고, 투석된 용액을 증발 시켰다. Methanol과 dimethyl ether를 사용하여 생성물을 세 척하고, 동결건조를 통해 최종생성물인 furfuryl carboxymethyl carrageenan(F-Cm-Carrageenan)을 제조하였다.

F-Cm-Carrageenan의 구조 분석. K-Carrageenan, Cm-Carrageenan, F-Cm-Carrageenan의 구조는 ¹H NMR spectroscopy(Gemini 2000, 300 MHz, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. K-Carrageenan, Cm-Carrageenan, F-Cm-Carrageenan의 분자량 비교는 GPC(GPC DP-8020, TOSOH, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. 이 때, GPC 조건은 α TSK-GEL, a series column(model No. H0042, TOSOH, Tokyo, Japan)에서 0.4 mL/min⁻¹ 속도로 진행하였다.

F-Cm-Carrageenan의 광경화 실험. 가시광 조사시간에 따른 경화되는 정도를 판단하기 위해, 광경화 실험을 진행하

였다. 0.5% riboflavin을 포함한 2% F-Cm-Carrageenan 용액 을 준비한 후, 각 petri-dish에 riboflavin을 함유한 F-Cm-Carrageenan 용액(100 μL)을 도말하였다. 각 petri-dish에 가 시광을 1, 3, 5, 10분간 조사하였고, 다른 하나의 petri-dish에 는 가시광을 조사하지 않았다. 가시광 조사시간에 따른 경화 되는 정도가 어떻게 되는지 확인하기 위해, 각 petri-dish에 증 류수를 넣고 매일 증류수를 갈아주며 경화된 부분이 풀어지 는지 확인하였다.

F-Cm-Carrageenan의 세포독성 실험. 0.5, 0.7, 1, 2%의 농도로 F-Cm-Carrageenan 용액을 준비하였다. 5% CO₂ incubator에서 NIH3T3 섬유아세포를 FBS(1%)과 penicillinstreptomycin(1%)을 함유하는 DMEM배지에 배양하였다. 세 포(4×10⁴ cell/mL, 100 μL)를 96-well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 세포가 부착된 후, 각각의 F-Cm-Carrageenan 용액(10 μL)을 첨가하였다. 5% CO₂ incubator에서 12, 24, 36, 48시간 동안 배양을 진행하였 다. 각 배양시간마다 CCK-8 용액(10 μL; Kumamoto, Japan) 을 첨가하고, 세포를 2시간 동안 배양하였다. Microplate reader 를 사용하여 optical density를 450 nm에서 측정하였다.

유착방지 실험. 5% CO₂ incubator에서 NIH3T3 섬유아세 포를 FBS(1%)과 penicillin-streptomycin(1%)을 함유하는 DMEM 배지에 배양하였다. 24-well plate에 0.1% riboflavin 이 함유된 F-Cm-Carrageenan 용액(2%, 300 μL)으로 well 바 닥면에 도말하였으며, 가시광으로 7분간 조사한 후 건조시켰 다. 각각의 F-Cm-Carrageenan로 광경화한 well과 비처리한 well을 1X DPBS(500 μL)로 세척하고, NIH3T3 섬유아세포 (4.68×10⁴ cell/mL, 500 μL)를 접종하였다. 24시간 동안 배양 한 후, 24-wellplate를 현미경으로 관찰하였다.

세포 투과 실험. 가시광 경화형 carrageenan 유도체가 장벽 을 형성하여 유착을 방지할 수 있는지 확인하기 위해, 세포 투과실험을 진행하였다. Nylon net filter(pore size: 10 μm) 위 에 대조군은 PBS 150 μL를 도말한 후, 건조하였다. 실험군 1 (layer 1)은 0.1% riboflavin이 함유된 2% F-Cm-Carrageenan 150 μL를 도말하였고, 가시광으로 5분간 조사한 후 건조하였 다. 실험군 2(layer 2)는 이와 같은 방법을 2번 반복하였다. 12-well plate의 각 well에 3가지의 filter를 부착시킨 후, 각 well당 NIH3T3 섬유아세포(0.08×10⁶ cell/mL)를 filter 위에 주 입하였다. 48시간 뒤에 광경화시킨 filter에 세포를 함유한 배 지를 투과하여 well에 세포가 자라는지 현미경을 통해 확인 하였고, 세포가 얼마나 존재하는지 확인하기 위해, auto cell counter를 이용하여 세포 수를 확인하였다(Figure 9).

결과 및 토론

F-Cm-Carrageenan의 구조 분석. Cm-Carrageenan은 카 복시 메틸화를 통해, K-carrageenan에 카복실기를 도입하여



Figure 3. Preparation scheme of F-Cm-Carrageenan: (A) the carboxymethylation process of carrageenan; (B) the introduction process of furfuryl group in Cm-Carrageenan.



Figure 4. ¹H NMR of F-Cm-Carrageenan the ¹H NMR spectra of carrageenan, Cm-Carrageenan and F-Cm-Carrageenan in D_2O . Cm-Carrageenan and F-Cm-Carrageenan showed a peak corresponding to the methyl group at 1 ppm, indicating that the carrageenan was successfully caboxymethylated. And the furfuryl group has three specific peaks at 6-8 ppm. Three peaks are peaks of the furan ring of the furfuryl group, indicating that F-Cm-Carrageenan was successfully prepared.

제조하였다. F-Cm-Carrageenan은 furfurylamine의 퍼퓨릴 기를 Cm-Carrageenan의 카복실기에 결합시킴으로써 제조 되었다(Figure 3). F-Cm-Carrageenan의 구조는 'H NMR spectroscopy에 의해 확인하였다. 'H NMR 스펙트럼상에서 퍼퓨릴기의 퓨란 고리를 나타내는 3개의 피크가 6-8 ppm에 서 존재한다. 'H NMR을 통해, 제조된 F-Cm-Carrageenan이 6-8 ppm에서 3개의 피크를 나타내는 것을 확인하였다(Figure 4). 'H NMR 결과를 통해, K-Carrageenan의 하이드록시기를 카복시메틸기로 치환되는 정도와 Cm-Carrageenan에 퍼퓨릴 기를 도입되는 정도를 분석 및 아래와의 공식을 통해 계산하 였다.

치환율 = $\frac{\text{Intergal of } A / \text{ The number of } A's \text{ Proton}}{\text{Intergal of } B / \text{ The number of } B's \text{ Proton}} \times 100\%$

A:치환된 작용기 부분 B: Back bone 부분

하이드록시기의 피크는 약 3.6~3.7 ppm에서 나타났으며, 약 1 ppm에서 카복시 메틸기 부분에서 메틸기에 대한 해당되는 피크가 나타내는 것을 확인하였다. 이를 통해 치환된 정도와 도입된 정도를 측정하였을 때, K-Carrageenan에 카복시메틸 기는 대략 93.5% 정도로 치환되었으며, 대략 31.0% 정도로 퍼퓨릴기가 도입되었다는 것을 확인하였다.

GPC는 머무르는 시간에 반비례하는 분자량을 분석하는데



Figure 5. GPC of K-Carrageenan, Cm-Carrageenan and F-Cm-Carrageenan Cm-Carrageenan showed that Cm-Carrageenan and F-Cm-Carrageenan was the fastest (MW of K-Carrageenan: about 788 g/mol, Retention time: 14.080 min; MW of Cm-Carrageenan: about 864.67 g/mol, retention time: 13.015 min; MW of F-Cm-Carrageenan: about 929.6 g/mol, retention time: 10.960 min).

사용되는 방법이다. K-Carrageenan, Cm-Carrageenan, F-Cm-Carrageenan에 대한 GPC 결과는 Cm-Carrageenan이 K-Carrageenan보다 빠르다는 것을 보여 주었다(K-Carrageenan 의 MW: 약 788 g/mol, 체류시간: 14.080분; Cm-Carrageenan 의 MW: 약 864.67 g/mol, 체류시간: 13.015분). 그리고 F-Cm-Carrageenan이 가장 빨랐다(F-Cm-Carrageenan의 MW: 929.6 g/mol, 체류 시간: 10.960분)(Figure 5). 따라서 ¹H NMR와 GPC에 의해 퍼퓨릴기가 carrageenan에 도입된 것을 확인할 수 있었다.

F-Cm-Carrageenan의 광경화 실험. 가시광 조사 시간에 따라 경화되는 정도를 확인한 결과, 가시광 조사하지 않은 petri-dish에선 F-Cm-Carrageenan이 증류수를 넣은 후, 얼마 지나지 않아서 풀어졌다. 반면에 가시광 조사한 petri-dish에 선 9일까지 확인한 결과, 가시광을 1분간 조사한 petri-dish에 선 5일 정도까지는 경화된 부분이 남아있었으며, 가시광을 3, 5분간 조사한 petri-dish에선 7일 정도까지 경화된 부분이 남아있는 것을 확인하였다. 10분간 조사한 petri-dish에서는 9일 뒤 확인한 결과 처음에 도말한 정도보다는 적었지만, 어느 정 도 경화된 부분이 남아있는 것을 확인하였다.

이 결과를 통해, 가시광 조사시간에 따라 경화되는 정도가 차이가 있다는 것을 확인하였으며, 가시광 조사를 통한 물리 적 장벽을 형성 및 유지할 수 있는 유착방지제를 제안할 수 있다고 확인하였다(Figure 6).

F-Cm-Carrageenan의 세포독성 실험. 0.5, 0.7, 1, 2% 농 도의 F-Cm-Carrageenan에 대한 *in vitro*상에 세포 독성을 WST 분석으로 측정하였다. 0.5, 0.7, 1, 2% 농도의 F-Cm-



Figure 6. Photo-curing test of F-Cm-Carrageenan.



Figure 7. Cytotoxicity test: *in vitro* cytotoxicity of the F-Cm-Carrageenan was measured with a WST assay. Cell viability of the F-Cm-Carrageenan was more than 90% when compared to the control group for 48 h.

Carrageenan에 대한 세포 생존율은 48시간 동안 대조군에 비 해 90% 이상이었다(Figure 7). 2% F-Cm-Carrageenan에서 대 조군대비 세포 생존율이 조금은 줄어들었지만, 일반적으로 대 조군 대비 80% 이상의 세포 생존율이 존재한다면 독성이 없다고 판단하기 때문에 이러한 결과는 F-Cm-Carrageenan이 독성이 없으며, 세포에 영향을 미치지 않는다는 것을 말해준다. 그렇지만, 2% 이상 농도의 F-Cm-Carrageenan의 세포독성 실험을 하지 않은 이유는 실제 도포하기 용이한 유착방지 제로 이용하기 위해선 점도가 너무 높으면 안된다. 3% 이상의 농도에서는 점도가 너무 높아서 주입이 어려움이 있어서 2%의 농도까지 실험을 진행하였다. 세포독성 실험 결과, F-Cm-Carrageenan은 생체에 이용 가능하며, 도포가 용이한 유착방지제로서 응용 가능하다고 판단된다.

유착방지 실험. NIH3T3 섬유아세포를 접종한 후 배양하게 되면, 세포의 형태학적 형태가 원형에서 뾰족한 삼각형 형태 로 변하게 된다. F-Cm-Carrageenan으로 코팅하지 않은 대조 군에서는 세포가 부착 및 성장하여 세포의 형태학적 형태가 뾰족한 삼각형 형태로 바뀌었다. 반면에, F-Cm-Carrageenan 으로 광 코팅된 실험군에서는 세포가 부착되지 않았고, 세포 의 형태학적 형태는 원형형태로 되어 있었다(Figure 8). 광 코 팅된 부분에서 세포가 부착하지 않는다는 것을 시사한다. 이 러한 결과로부터 F-Cm-Carrageenan은 유착방지효과를 가지 며 유착방지제로서 응용될 수 있다.



Figure 8. Anti-adhesion test. When NIH3T3 fibroblast cells are incubated after they were seeded, the morphological shape of the cell changes from a circular shape to a pointed triangle. In the control group, cells were adhered and grown, and the morphological shape of the cells was changed to a triangular shape with a sharp point. On the other hand, in the experiment group photo-coated with F-Cm-Carrageenan, the cells were not adhered and the morphological shape of the cells was circular shape.



Figure 9. Cell penetration test: (A) Scheme of cell penetration test procedure; (B) cell penetration test through microscope observation; (C) cell penetration test through cell counting.

폴리머, 제42권 제3호, 2018년



Figure 9. Continued.

세포 투과 실험. NIH3T3 섬유아세포를 48시간 동안 배양 한 다음, 현미경으로 관찰하였다. 대조군에서는 세포가 filter 를 통과하여 well 바닥면에 부착되어 성장하였다. 반면에, 실 험군(layer 1 group, layer 2 group)에서는 세포가 코팅된 필 터를 통과하지 못하였다. 또한 auto cell counter를 이용하여, 실험군과 대조군의 세포 수를 세었다. 그 결과, 대조군에서는 세포의 수가 측정되었으나, 실험군(layer1 group, layer2 group)에서는 세포 수가 측정되지 않았다(Figure 9). 이러한 결과를 통해, F-Cm-Carrageenan은 가시광 조사를 통해 외부 와 내부 사이의 유착을 막는 장벽을 형성할 수 있다고 유추 할 수 있다.

결 론

최근에 많은 연구자들에 의해서 유착방지제에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구의 목적은 광반응을 이용한 새로운 형태의 유착방지제를 개발하는 것이다. 유착을 방지 하고자 하는 부위에 가시광 경화형 carrageenan 유도체를 도 말한 후 가시광을 조사하게 되면 광경화반응에 의하여 장벽 을 형성시켜 유착방지 효과가 나타난다. 유착방지제의 소재 는 생체적합적인 성질을 가지고 있어야 한다. Carrageenan은 이에 해당하는 적합한 천연고분자 소재이다. ¹H NMR, GPC 분석을 통하여 카복시메틸기와 퍼퓨릴기가 carrageenan에 도 입된 것을 확인하였다. 광경화 실험을 통하여 가시광 경화형 carrageenan 유도체는 광개시제 존재 하에서 가시광이 조사되 게 되면 광경화반응이 진행되는 것을 확인하였다. 세포독성 실험을 통하여 가시광 경화형 carrageenan 유도체가 생체 적 합성을 가진다는 것을 보여주었다. 또한 광반응이 진행되어 장벽이 형성되며 그 표면에 세포가 부착되지 않는다는 실험 결과로부터 유착방지 효과가 있다고 사료된다. 그리고 세포 투과 실험을 통하여 외부와 내부 조직사이에 장벽을 형성할 수 있다는 것을 확인하였다.

결론적으로 가시광 경화형 carrageenan 유도체는 생체적합 성, 생분해성 등과 같은 유착방지제의 기본적인 특성을 가지 며 유착방지 효과를 나타낸다. 이러한 결과로부터 새로운 형 태의 유착방지제로 응용될 수 있다고 사료된다.

감사의 글: 이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2017R1D1A1B03028877) 및 2016년도 중앙대학교 연구장학 기금 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- 1. M. P. Diamond and A. H. Decherney, *Microsurgery*, **8**, 103 (1987).
- E. Lih, S. H. Oh, Y. K. Joung, J. H. Lee, and D. K. Han, *Prog. Polym. Sci.*, 44, 29 (2015).
- L. Li, N. Wang, X. Jin, R. Deng, S. Nie, L. Sun, and C. Gong, Biomaterials, 35, 3903 (2014).
- H. Nakagawa, Y. Matsumoto, Y. Matsumoto, Y. Miwa, and Y. Nagasaki, *Biomaterials*, 69, 166 (2015).
- R. Shi, J. Xue, H. Wang, R. Wang, M. Gong, D. Chen, and W. Tian, J. Mater. Chem. B, 3, 4064 (2015).
- Y. Yeo, T. Ito, E. Bellas, C. B. Highley, R. Marini, and D. S. Kohane, *Ann. Surg.*, 245, 819 (2007).
- C. Hu, S. Liu, Y. Zhang, B. Li, H. Yang, C. Fan, and W. Cui, *Acta Biomaterialia*, 9, 7382 (2013).

- 8. K. M. Picker, Drug Dev. Ind. Pharm., 25, 340 (1999).
- V. K. Gupta, M. Hariharan, T. A. Wheatley, and J. C. Price, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 241 (2001).
- V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. d. Silva, and I. Carvalho, *Carbohydr. Polym.*, **77**, 167 (2009).
- 11. M. Nakano and A. Ogata, Chem. Pharm. Bull., 32, 782 (1984).
- K. H. Leong, L. Y. Chung, M. I. Noordin, K. Mohamad, M. Nishikawa, Y. Onuki, M. Morishita, and K. Takayama, *Carbohydr. Polym.*, 83, 1507 (2011).
- H. J. Song, J. W. Kim, J. S. Park, Y. S. Kim, Y. S. Choi, B. G. Kim, S. J. Cha, S. J. Park, I. T. Chang, S. I. Park, E. S. Park, and S. A. Hong, *Ann. Surg. Treat. Res.*, 77, 7 (2009).
- H. N. Na, S. H. Park, K. I. Kim, M. K. Kim, and T. I. Son, *Macromol. Res.*, **20**, 1144 (2012).
- S. H. Park, S.Y. Seo, H. N. Na, K. I. Kim, J. W. Lee, H. D. Woo, J. H. Lee, H. K. Seok, J. G. Lee, S. I. Chung, K. Chung, D. Han, Y. Ito, E. C. Jang, and T. I. Son, *Macromol. Res.*, **19**, 921 (2011).
- 16. S. H. Park, S. Y. Seo, H. J. Lee, H. N. Na, J. W. Lee, H. D. Woo,

and T. I. Son, Macromol. Res., 20, 842 (2012).

- Y. Heo, H. J. Lee, E. H. Kim, M. K. Kim, Y. Ito, and T. I. Son, J. Appl. Polym. Sci., 131, DOI: 10.1002/app.40113 (2014).
- T. I. Son, M. Sakuragi, S. Takahashi, S. Obuse, J. Kang, M. Fujishiro, H. Matsushita, J. Gong, S. Shimizu, Y. Tajima, Y. Yoshida, K. Suzuki, T. Yamamoto, M. Nakamura, and Y. Ito, *Acta Biomater.*, 6, 4005 (2010).
- K. I. Kim, H. N. Na, Y. Ito, and T. I. Son, *Macromol. Res.*, 19, 216 (2011).
- S. H. Kim and C. C. Chu, J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 91, 391 (2009).
- M. Vinuth, H. S. Bhojya Naik, B. M. Vinoda, S. M. Pradeepa, G. A. Kumar, and K. C. Sekhar, *J. Environ. Anal. Toxicol.*, 6, DOI: 10.4172/2161-0525.1000355 (2016).
- 22. H. M. Tabery, Acta Ophthalmol., 76, 142 (1998).
- H. Rich, M. Odlyha, U. Cheema, V. Mudera, and L. Bozec, J. Mater. Sci. Mater. Med., 25, 11 (2014).