

Gellan Gum/Chondroitin Sulfate 조성 유착방지제의 개발

김 진 · 신동일 · 이기영^{*,†}

전남대학교 신화학소재공학과, *전남대학교 응용화학공학부 & 식품공학 연구소
(2015년 11월 10일 접수, 2015년 12월 24일 수정, 2015년 12월 30일 채택)

Prevention of Post-surgical Tissue Adhesions by a Gellan Gum/Chondroitin Sulfate

Jin Kim, Dong Il Shin, and Ki-Young Lee^{*,†}

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

*Faculty of Applied Chemical Engineering and Functional Food Research Center,
Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received November 10, 2015; Revised December 24, 2015; Accepted December 30, 2015)

초록: 본 연구는 수술 후 유착방지 기능을 갖는 gellan gum(GLG)과 chondroitin sulfate(CH) 조성젤을 만들고 그 효능을 평가하였다. GLG/CH 조성 젤에 phosphate buffered saline(PBS)와 calcium chloride(CaCl₂)를 첨가하여 젤을 가교시켰다. 젤의 특성을 확인하기 위해 팽윤성, 젤화도, 젤강도를 측정하고 FTIR로 특성을 확인하였다. Rat에 양성 대조군, 음성대조군, 실험군을 넣어 유착방지 효능을 평가하였다. GLG/CH(3:3) 조성 젤은 복막의 조직 유착방지제로 높은 효과를 나타냈고 조직 유착방지막 소재로 활용 가능성을 보였다.

Abstract: The purpose of this study was to design the gel composed of gellan gum (GLG) and chondroitin sulfate (CH) and to evaluate their efficacy as an anti-adhesion barrier after abdominal surgery. To improve the mechanical properties of the gels, GLG/CH gels were treated in phosphate buffered saline (PBS) and calcium chloride (CaCl₂) solutions for cross-linking of polymer chains by divalent cations. The physical and mechanical properties of the gels were confirmed by swelling, gel content, gel strength and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) studies. The positive control, negative control and experiment groups were evaluated for prevention of postoperative adhesion formation in rats. The GLG/CH gel (weight ratio of 3:3) showed high effectiveness for the prevention of peritoneal tissue adhesion. In conclusion, the GLG/CH gel can be a good candidate material as a tissue adhesion barrier.

Keywords: gellan gum, chondroitin sulfate, tissue anti-adhesive, gel.

서 론

조직의 유착(adhesion) 현상은 외과수술 후, 염증, 이물, 출혈, 감염, 창상, 마찰 등으로 조직손상이 발생하면 상처의 치유 과정에서 혈액이 유출되어 응고하고, 이에 의해 주변 조직과 비정상적 접합이 일어나는 현상을 말한다. 이러한 유착 부위에 세포가 침투하면 더욱 강한 유착현상이 발생한다.^{1,2} 특히, 조직 유착 현상은 장폐색증의 주요 원인(80~90%)이 되며, 산부인과 시술 후에 장기적 후유증, 골반 통증의 원인이 된다.³ 이러한 유착을 방지하기 위해서는 수술 시 상처를 최소화하거나, 소염제의 사용, 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue

plasminogen activator)를 증가시키는 방법 및 물리적 장벽(barrier)을 사용하는 방법이 사용되고 있다. 이 중 물리적 장벽 유착방지제는 생체적합성이 뛰어나야 하며 염증반응, 면역반응을 일으키지 않고, 체내에서 상처가 치유되는 기간 동안 장벽 역할을 해주고, 이후에는 분해되어야 하며, 분해 및 대사를 통한 배출 물질 역시 인체에 무해해야 한다.⁴ 지금까지 물리적 장벽에 활용되는 소재는 수용성 고분자인 sodium hyaluronate(HA), sodium carboxymethyl cellulose(CMC) 외에 dextran, poly(ethylene glycol)(PEG), pluronic 등이 있으며, 비수용성 고분자로 poly(lactic acid)(PLA), poly(glycolic acid)(PGA), poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) 등이 있다. 유착방지제 중 cellulose 및 dextran 등은 천연고분자이지만 생체를 구성하는 성분은 아니므로 생체 내에 삽입 시 이물반응을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 생

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kilee@chonnam.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

체 내에 이러한 재료들에 대한 분해효소가 없어 분해가 일어나지 않기 때문에 산화시키거나, 가수분해될 수 있도록 조작을 해줘야 하는 것으로 알려져 있다. 한편, HA를 주성분으로 하는 유착방지 용액이 사용되고 있으나, HA는 생체 내에서 반감기가 3일에 불과하여 쉽게 분해되기 때문에 유착방지 역할에 제약이 있다.⁵⁻⁸ 그리고 합성고분자 중 PLA는 분해 산물이 산성을 띠기 때문에 염증반응과 이물반응을 일으킬 수 있다는 단점을 갖는다.

본 연구에서는 미국식품의약안전청(FDA)의 승인을 받아 다양한 분야의 임상에서 직접 응용되고 있으며 유동학적, 구조적 특성이 밝혀지면서 여러 가지 분야에서 각광받는 미생물 유래 다당인 gellan gum(GLG)을 유착방지제 젤 조성에 이용하고자 한다. 식품 첨가제나 약물전달체 등과 같은 다양한 분야에 응용되고 있는 GLG 분말은 글루콘산, 람노오스, 포도당이 1:1:2로 구성된 복합 다당류로 정제한 후 건조 및 분쇄 과정을 거쳐 얻어진다.⁹ 무색 투명한 GLG는 산과 열에 잘 견디고 pH 및 이온 첨가 등을 통하여 물성을 조절할 수 있다. GLG는 열을 이용하여 용해시키는데 여러 번 열을 가하여도 젤의 강도가 저하되지 않는 우수한 물리적 특성을 가지고 있다.^{10,11} 또한 GLG와 더불어 본 연구에서 사용된 chondroitin sulfate(CH)는 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-galactosamine과 황산기로 결합되어 있는 점질성 다당류(mucopolysaccharide)이다. CH는 SO_4^{2-} 혹은 COO^- 를 함유하고 있으며 항염 활성을 가지고 있다. CH는 조직재생을 위한 다양한 고체 지지체, 수화젤, 접착제 등으로 개발되고 있으며, 연골, 점막, 피부재생 등의 생물학적 장점을 활용할 수 있는 조직재생 지지체의 소재로서 약리 기능 및 약물전달체로 활용할 수 있다.¹² 본 연구에서는 GLG와 CH의 최적의 조성비를 찾아 기존 유착 방지제의 문제점을 개선하고, 항염 활성을 갖는 CH를 첨가하여 생체 조직간의 유착을 효과적으로 방지할 수 있는 유착방지제를 개발하고자 한다.

실 험

시약 및 재료. GLG는 엘로데아속 수초로부터 분리된 *Pseudomonas elodea*를 사용하여 순수 배양 발효하여 얻은 고분자로 글루콘산, 람노오스, 포도당이 1:1:2로 구성된 복합 다당류로써, 정제한 후 건조 및 분쇄 과정을 거친 GLG (Gelzan™, $M_w=1000$ kg/mol)는 Sigma Aldrich에서 구입하였다. Chondroitin sulfate sodium salt(CH)($M_w=499.38$ g/mol, total sulfur 5.5~7.5%)은 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-galactosamine과 황산으로 결합되어 있는 점질성 다당류(mucopolysaccharide)로 TCI에서 구입하였다. 가교를 하기 위해 사용한 PBS(D-phosphate buffered saline with calcium and magnesium) pH 7.4(10X)는 Gibco Inc(NY, USA)에서 구입하였고, calcium chloride는 Sigma Aldrich에서 구입하였

다. 양성 대조군은 시판 제품으로 판매되는 HA-CMC 용액 Guardix-sol®을 사용하였다. 이외의 모든 시약은 정제과정 없이 사용되었으며, 물은 3차 증류수와 생리식염수를 사용하였다.

젤 제조. GLG/CH 조성젤은 6 w/v%로 고정하고 각 비율을 2:4, 3:3, 4:2의 조성비(w:w)로 3차 증류수에 고분자 용액을 60 °C에서 12시간 동안 교반시킨 후 완벽하게 용해시켜 6 well plate에 3.5 mL씩 옮겨 48시간 방치 후 젤을 제조하였다. 각 비율별로 GLG/CH 조성 젤에 phosphate-buffered saline(PBS)(1x)와 0.03% 농도로 제조한 calcium chloride(CaCl_2)를 3 mL씩 6시간 동안 처리하고 증류수로 세척한 다음 각 실험에 사용하였다.

젤의 물리적 평가. 팽윤도: 젤화율 측정과 마찬가지로 건조된 젤을 상온에서 증류수에 침지시킨 후 시간 경과에 따른 무게변화를 평형에 이를 때까지 측정하였다. 팽윤도는 식 (1)에 나타낸 바와 같이 팽윤된 젤의 무게(W_s)와 건조된 젤의 무게(W_d) 차를 건조된 젤의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{팽윤도}(\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100 \quad (1)$$

젤화율: 가교반응에 참여하지 않고 남아있는 고분자를 제거시키기 위하여 30 °C에서 48시간 동안 교반하면서 수세하였다. 수세과정을 거친 젤을 꺼내어 젤 표면의 물기를 닦아 60 °C의 오븐에 넣고 48시간 동안 건조시켰다. 젤화율은 식 (2)에 나타낸 바와 같이 건조된 젤의 무게(W_d)를 초기 사용된 고분자 무게(W_i)로 나누어 백분율로 표시하였다.

$$\text{젤화율}(\%) = (W_d / W_i) \times 100 \quad (2)$$

강도 측정: 제조된 젤의 강도를 알아보기 위하여 압축강도를 측정하였다. 젤의 강도는 INSTRON 5569(Instron Co., USA)를 이용하여 상온에서 압축강도를 측정하였다. 압축강도 측정을 위한 젤의 시편 두께는 4.5 ± 0.5 mm이고 지름은 10 mm이었으며 각 조성마다 6개의 시편을 제조하여 측정하였다. 압축강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 10 mm/min이었으며, 시편이 50% 변형이 이루어질 때의 값을 측정하였다. 젤에 처리한 용액에 따라 젤의 강도에 미치는 영향을 연구했다.¹³

FTIR 분석. GLG/CH 조성비에 따른 화학 구조의 변화를 살펴보기 위하여 적외선분광광도계(FTIR spectroscopy, Shimadzu-IR Prestige-21, Japan)를 이용하여 분석하였다. KBr pellet을 만들어 시편을 제조하였으며, 시료와 KBr을 무게비 1:100으로 잘 혼합하여 pellet을 제조하고 60 °C에서 12시간 동안 감압 건조를 이용하여 수분을 제거한 후 4000~500 cm^{-1} 영역에서 측정하였다.

형상 관찰. 제조된 젤을 automatic coater(Sputter Coater 108auto, Cressington Scientific Instruments Inc.)를 이용하여 Au-Pd로 60초 동안 진공 코팅한 후에 scanning electron microscope(SEM, JSM-5400A, JEOL, Japan)를 이용하여

15 kV에서 형태를 관찰하였다.

세포독성 평가. 세포 생존을 측정은 MTT assay 법으로 측정하였다. 세포배양액(DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에 100, 500, 1000 ppm의 농도로 넣고 37°C에서 24시간 이상 용해하여 용출액을 제조하였다. MTT assay법은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약이 세포 내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성한다. 96 well plate에 각 well 당 NIH-3T3 섬유아세포 5×10^4 cells/well를 분주하고 24시간 후 다양한 농도로 제조한 시트 용출액을 함유한 DMEM 배양액으로 갈아준 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Well 당 20 μ L의 MTT 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 동안 반응시킨 후, 배양액을 버리고 DMSO 100 μ L씩 넣어 formazan을 용해한 후, ELISA 측정기(ELX 808, Biotek Instruments, Vermont, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

복막 유착방지 효과. 7주령의 암컷 Sprague-Dowley(SD) 백서를 오리엔트 바이오(Orient Bio Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 공급받아 실험 전 7일간 적응기간을 거쳤다. 백서 사육시 12시간 간격으로 낮과 밤을 구별하였으며 사육 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 고형사료인 Basal diet 5755(PMI Nutrition International, Inc. Richmond, CA, USA)와 물을 자유롭게 섭취하게 하였다. 평균체중 230 g의 SD rat을 diethyl ether로 마취시킨 후 깨끗한 수술기구를 사용하여 복부 중상을 개복하여 맹장을 노출시키고 표면에 찰과상을 내어 출혈이 생기도록 하였으며, 맹장과 접촉되는 복벽을 거친 사포로 마찰시켜 상처를 낸 다음 유착방지 쉬트를 상처부위에 점착한 다음 장기의 찰과상 부위와 복벽의 상처부위가 인접하도록 복강 내에 재배치하고 복벽과 피부층을 일반외과 수술방법에 의하여 봉합하였다. 실험은 양성 대조군, 음성 대조군 및 실험군으로 구분하여 진행하였다. 각 군당 SD rat을 5마리씩 배치하였다.

양성대조군으로 HA-CMC 2:1비율로 조성된 액체형 유착방지제(guardix-sol)를 상처부위에 5 mL 도포하였다. 음성대조군은 PBS만 처리한 군을 의미한다. 그리고 실험군으로 GLG/CH가 3:3이고 PBS로 처리한 겔을 사용하였다. 봉합 후 7일째에 실험동물을 과량의 에테르로 희생시키고 생리식염수로 혈관에 관류시킨 후, 10% 중성 포르말린 용액으로 혈관에 관류시켜 육안소견과 현미경적 소견에 따라 유착도(adhesion grades)와 유착점수를 평가하였다. 각 군마다 각 등급에 해당하는 실험동물의 수를 측정한 후 각 군의 평균등급을 계산하였다. 그리고 개복 후의 모습을 Figure 8에 나타내었다.

유착의 정도는 아래의 등급체계를 이용하였으며 유착발생의 기준은 복벽에 대한 유착을 기준으로 하였다.

-0등급: 유착발생 없음.

-1등급: 복강내 지방질이 상처부위에 약간 붙어 있음.

-2등급: 장간막 등과 상처부위가 유착되어 실 같은 형태를 나타냄.

-3등급: 혈관성 조직이 발달하였고 소장과 복벽이 심하게 유착됨.

복강막 유착방지막의 조직학적 평가. 조직학적 평가를 위해 수술 부위를 근육층과 경막을 포함하여 떼어낸 후 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 넣어 고정시킨 다음 탈골화 용액에 48시간 넣어서 충분히 탈골시킨 후 알코올로 건조시키고 파라핀 블록을 만들었다. 이 블록을 6~8 μ m 두께로 절편을 만들어 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)염색을 하였고 현미경을 통해 관찰하였다.

결과 및 토론

GLG/CH 겔의 물리적 특성. 유착방지제 소재가 빨리 분해, 제거되어 유착방지 효과를 나타내기 어려운 기존 유착방지제의 문제점을 해결하기 위해 생분해성 고분자 사이에 가교를 형성시키는 방법이 제시되고 있다. GLG와 CH 농도비에 따라 가교 후 겔의 팽윤비 변화를 관찰하였다(Figure 1). GLG/CH가 2:4, 3:3, 4:2 조성비로 겔에 아무것도 처리하지 않는군, PBS를 처리한 군, CaCl₂를 처리한 군의 겔 중에서 PBS로 처리한 겔의 형태가 오랜 시간 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 GLG의 농도가 증가될수록 겔의 형태가 견고한 것을 관찰할 수 있었다. 2%의 GLG 농도는 겔의 형태가 잘 만들어지지 않아 물리적 실험을 평가할 수 없었다. 하지만, GLG의 3%와 4%의 농도에서는 PBS 처리군의 팽윤도가 높은 것을 관찰할 수 있었다. Figure 1에서와 같이 GLG의 함량이 3% 조성에서 보다 4% 조성의 겔이 약 30%가 더 높은 팽윤값을 갖는 것을 관찰하였다. GLG의 음전하를 띠는 COOH 그룹이 2가 양이온(divalent cations)인 Ca²⁺, Mg²⁺과

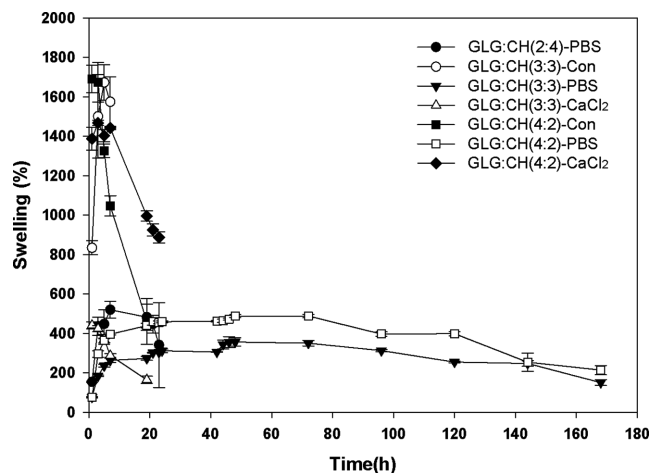


Figure 1. Swelling profiles of gels for 7 days. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

반응하면 이온 결합(ionic interaction)에 의해 헬릭스-코일 전이(helix-coil transition)로 젤화가 형성된다. 따라서 가교된 3차원 망상구조가 농도와 같이 증가하여 젤 내부에 물을 함유할 수 있는 체적의 농도도 증가하게 된다. 일정 시간이 지나자 팽윤된 상태로 평형을 유지하던 젤은 5일째가 되면서 서

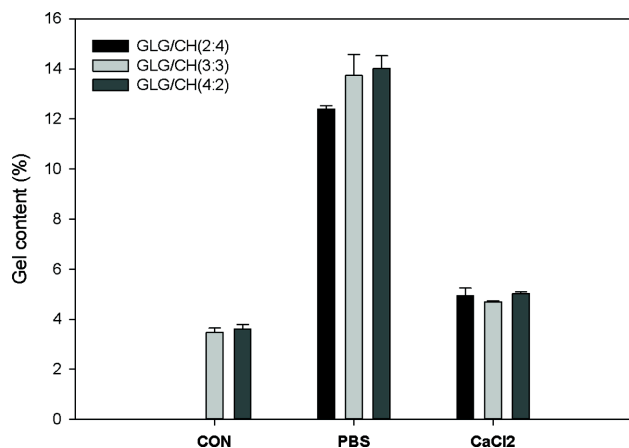


Figure 2. Gel content of GLG/CH. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

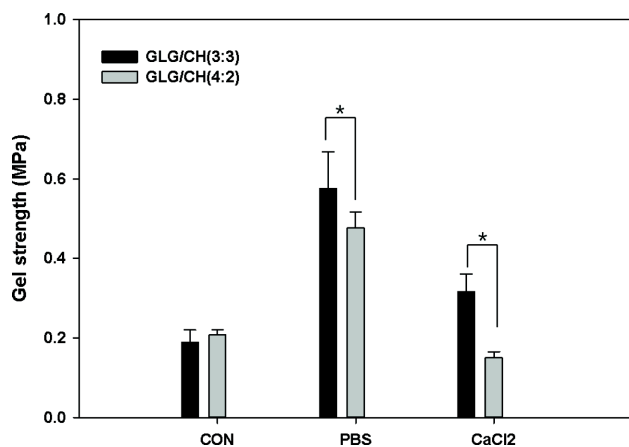


Figure 3. Gel strength (g/cm²) of gel. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$ compared with GLG/CH(3:3) and GLG/CH(4:2).

서히 젤이 분해되는 것을 관찰할 수 있었고 7일이 경과되면 서 팽윤된 젤이 완전 분해가 이루어지는 것을 관찰하였다. 특히, PBS는 중성pH 값을 가지며 Ca^{2+} , Mg^{2+} 조성으로 되어 있고 CaCl_2 는 Ca^{2+} 로만 구성되어 있어 PBS 용액이 CaCl_2 용액 보다 강한 양이온을 형성하고 있어 젤 가교에 더 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었다.¹⁴ 수용성 고분자로만 구성된 젤은 수 분함유량이 높아 전반적으로 젤화를 값이 낮게 관찰되었다 (Figure 2). 하지만, PBS로 가교시킨 젤 조성에서 다른 그룹에 비해 높은 값을 나타낸 것은 가교에 의해 분자량의 변화로 젤화율의 값이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 젤 강도에서도 GLG/CH(3:3)조성과 (4:2)조성의 젤을 아무것도 처리하지 않는 군, PBS를 처리한 군, CaCl_2 를 처리한 군으로 나누어 관찰하였다. PBS 처리군은 가교가 진행됨에 따라 고분자 사슬들이 젤 내부에서 강한 망상 구조를 형성하기 때문에 높은 젤 강도를 나타냈다(Figure 3).¹⁵ 또한 젤의 강도를 육안적으로 확인하기 위해 손으로 압력을 가해 형태의 변화를 관찰한 결과이다(Figure 4). GLG/CH(3:3) 조성의 젤을 아무것도 처리하지 않는 젤 Figure 4(a)은 압력을 가했을 때 쉽게 부서지는 것을 관찰하였고, Figure 4(b)의 경우 PBS를 처리한 젤로 Figure 4(c) CaCl_2 처리한 젤보다 형태가 부서지지 않고 유지되는 것을 관찰하였다. 조성에서 팽윤 후 분해되는 시기와 젤강도 값이 적절한 조성비를 GLG/CH(3:3)으로 판단하여 동물실험 및 그밖에 실험에 사용하였다.

FTIR 분석. 각 조성별로 혼합하여 젤화시킨 후 GLG와 CH의 고유의 피크들이 열건조하여 관찰한 시료에서 확인되었다 (Figure 5). CH의 양이 증가될수록 1460과 1415 cm^{-1} 에서 (C-O-H) 피크가 관찰되었고 1380 cm^{-1} 에서 CH_3 , 1260 cm^{-1} 에서 (C-O-C), 1120 cm^{-1} 에서 (CH-O-CH), 1030 cm^{-1} 에서 CO, 860 cm^{-1} 에서 aliphatic aldehyde(saccharide) 구조가 확인되었으며, 1030 cm^{-1} 에서 CO, 720, 680 cm^{-1} 에서 (S-O) 등의 고유 피크 강도가 커짐을 확인할 수 있었다.

GLG/CH 젤의 형태 관찰. GLG/CH 조성의 젤에 무처리군, PBS 처리군, CaCl_2 처리군의 젤 표면을 관찰한 결과 표면은 매끄럽고 GLG의 농도가 증가될수록 젤의 표면은 고르지 못한 것을 관찰할 수 있었다. 높은 팽윤성과 젤 강도를 가지는 PBS 처리군의 젤의 표면과 단면을 Figure 6에 나타냈

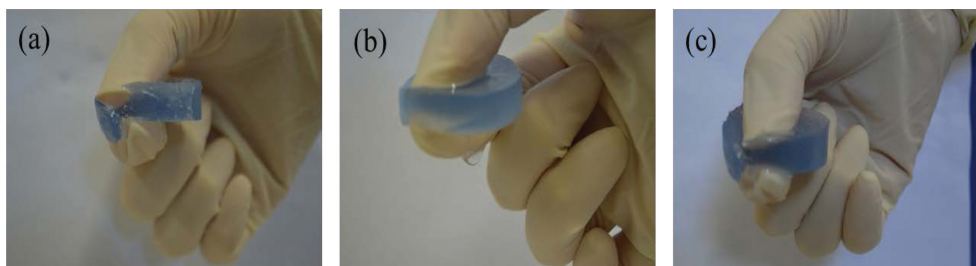


Figure 4. Sequential macroscopic demonstration of gel brittle character in contrast to crosslinking solution-gel ductility during the deformation process: (a) non-treatment; (b) PBS treatment; (c) CaCl_2 treatment.

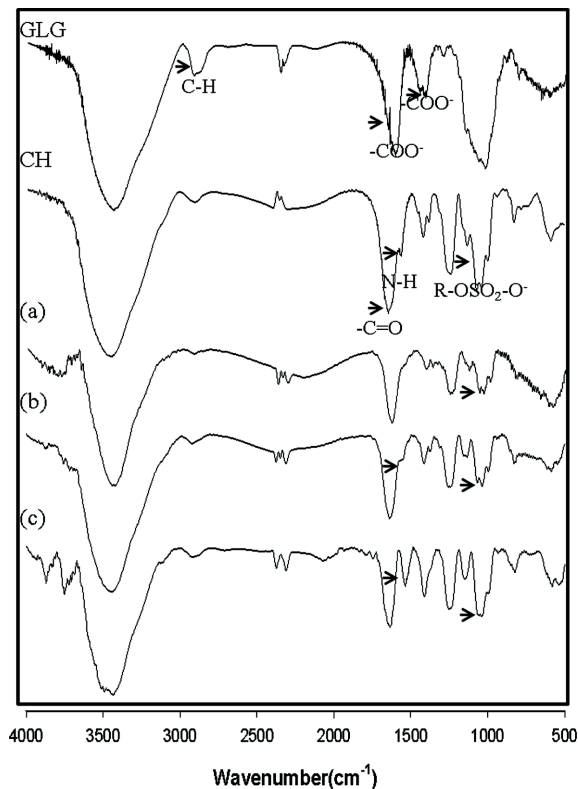


Figure 5. FTIR spectra profiles of GLG and CH powders and (a) GLG:CH(2:4)-PBS gel; (b) GLG:CH (3:3)-PBS gel; (c) GLG:CH (4:2)-PBS gel.

다. Figure 6(a)의 경우는 GLG/CH(3:3) 조성이고 (b)의 경우는 GLG/CH(4:2) 조성으로 GLG 농도가 증가된 젤(b)에서의 표면과 내부는 (a)에 비해 거친 표면과 겹겹히 쌓인 적층 형태의 결을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 활용하고자 하는 유착방지제뿐 아니라 다양한 분야에 기공을 필요로 하는 소재로 활용 가능하며 특히, GLG의 농도를 조절함으로써 약물전달제나 스캐폴드에 활용 가능할 것으로 기대된다.¹⁶

세포독성 분석. GLG/CH 조성 젤을 농도별로 세포독성을 분석하기 위하여 세포의 생존율을 비교하였다. 각 조성에 따른 젤의 농도별 용출액은 모든 농도에서 80% 이상으로 독성이 거의 없었다(Figure 7). 본 실험에 이용된 젤은 세포에 독성이 없는 생체 소재로 체내 삽입이 가능하며, 생체재료로서 다양한 응용도 가능할 것으로 사료된다.

복막 유착방지 효과. 5일이 경과된 후 분해가 이루어지는 GLG/CH(3:3) 조성비로 PBS를 처리한 젤을 동물실험에 사용하였다. Figure 8에서 음성대조군(non-treatment)은 맹장과 복벽에 강하게 유착된 것으로 확인되었다. 또한 주사제형(액상)으로 처리한 양성대조군도 음성대조군과 같이 5마리 모두 유착이 발생한 것으로 나타났다. 이에 반해 GLG/CH(3:3) 조성 젤을 처리한 실험군은 4마리가 유착발생이 없는 것으로 확인되었다. 유착의 정도에 따라 0에서 3단계까지 분류하여 Table 1에 나타났다. 음성대조군에서 복벽과 맹장에 유착이 발생하였고(유착점수 2.6) 액체타입의 주사제형을 처리한 군에서도

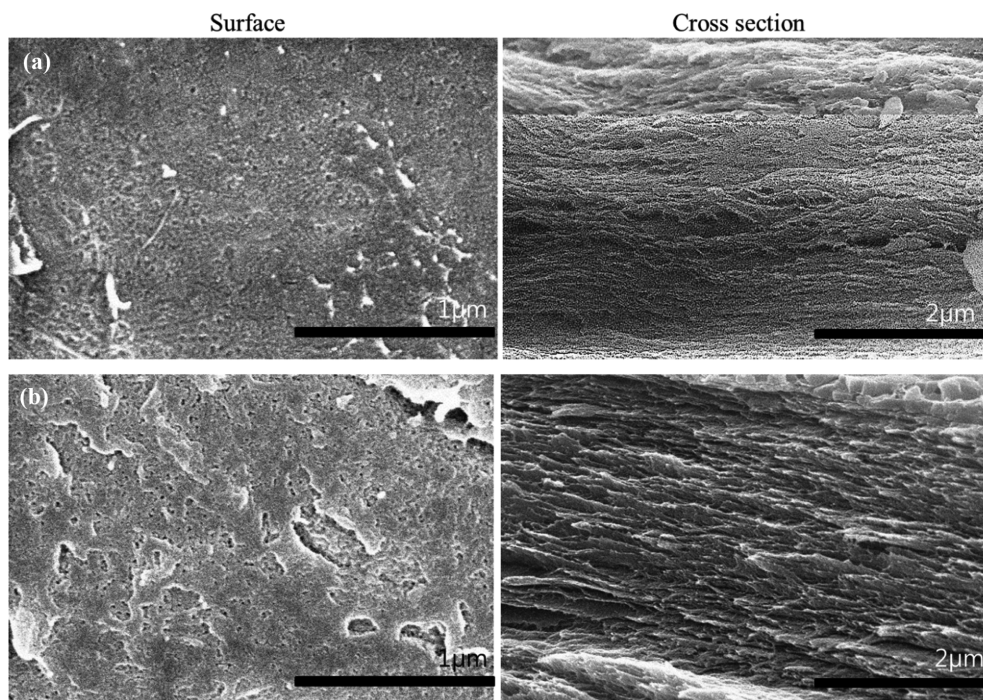


Figure 6. SEM images of surface and cross section of (a) GLG:CH (3:3)-PBS gel; (b) GLG:CH(4:2)-PBS gel (magnification (a) 50k; (b) 20 k).

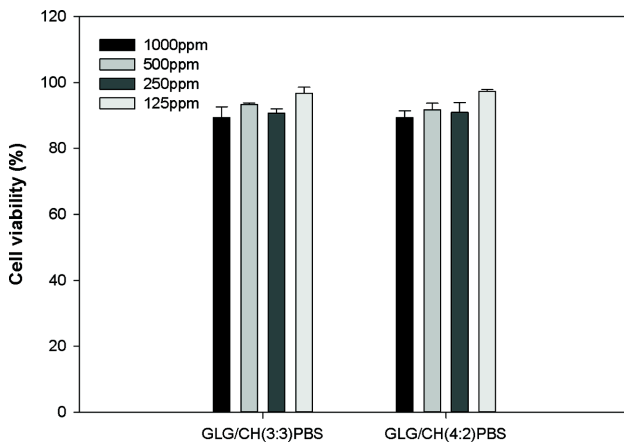


Figure 7. Cell viability of 3T3 cells assessed via MTT assay in the presence of 125 ppm to 1000 ppm gel extracts after culturing for 24 h.

유착점수가 2.2로 임상적으로 유착이 되었다고 평가된다. 그러나 GLG/CH(3:3) 조성의 젤을 삽입한 군에서는 유착점수가 0.2로 유착이 거의 발생되지 않았고 상처가 수복된 조직을 관찰할 수 있었다. 실험군에서 유착이 거의 형성되지 않은 것은 액체 타입의 주사제형보다 GLG/CH(3:3) 젤 타입의 유착방지제가 복벽과 맹장의 조직 사이에서 주사제형보다 오랜시간 잔존하면서 적절한 조직학적 기능과 역할을 수행한 것으로 판단된다.^{17,18}

복강막 유착방지의 조직학적 평가. 실험군의 조직에서는 이물반응에 의한 약한 정도의 염증세포 침윤 및 섬유화 현상 소견이 보였다. 맹장과 복벽 사이에 삽입시킨 GLG/CH(3:3) 조성 젤은 이물질로서 존재하게 되면서 조직에 서서히 흡수되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 9(c)). 이러한 흡수는 조직 재형성 과정에서 자연스러운 현상이며 염증세포와 더불어 거식세포로 구분되는 거대 다핵세포가 발견되는 것으로 알 수 있다.^{19,20}

특히, 음성대조군의 조직은 매우 치밀한 반면에 실험군은 조직 사이사이에 젤이 존재하여 조직이 덜 치밀하게 되었다. 이는 복막과 맹장이 유착되지 않고 쉽게 분리된 이유로 추정된다. 연구결과, GLG/CH 조성의 젤은 유착방지 효과를 보임으로써 유착방지제로의 가능성을 확인하였다.

결 론

GLG와 CH을 활용하여 유착방지제를 제조하였다. 양이온으로 처리함으로써 인체 내에 삽입이 가능한 안정된 구조의 젤을 제조하였다. GLG/CH(3:3) 조성을 PBS로 처리한 젤이 7일만에 분해되는 젤의 형태와 최적의 압축강도의 값을 확인하였다. 특히, 동물모델을 통해 관찰한 조직 유착방지효과를 평가한 결과 GLG/CH 조성젤을 처리한 실험군(유착점수:0.2)이 PBS만 처리한 대조군(유착점수: 2.6)에 비해 10배이상 조직 유착을 낮추는 결과를 보였다. 또한 기존의 CMC와 HA

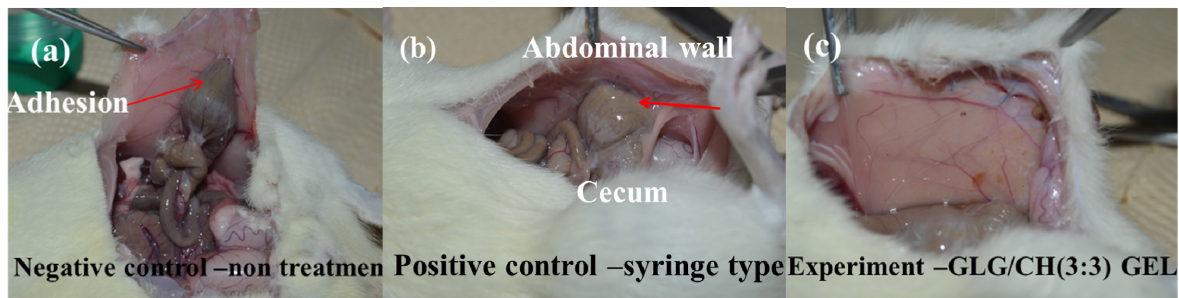


Figure 8. *In vivo* anti-adhesion effects of control group, and experiment group in rats; (a) a negative control not treated with gel; (b) a positive control treated syringe type solution; (c) GLG/CH gels. Adhesion was apparent in the non-treated rat and in the syringe type solution treated rat after surgical damage of the surfaces of the abdominal wall and cecum. No adhesion was observed in the GLG/CH gel treated rat at 7 days after the surgery and the wound to the peritoneum and cecum were healed.

Table 1. Postoperative Adhesion Formation Rates, Grades and Score for Groups

Group	No. of rats	Adhesion grades				Mean of score ^a	Adhesion rate ^b (%)
		0	1	2	3		
Negative control	5	0	0	2	3	2.6	5/5(100)
Positive control	5	0	1	2	2	2.2	5/5(100)
GLG/CH(3:3)-PBS	5	4	1	0	0	0.2	1/5(20)

^aMean of score=(adhesion grades×adhesion number)/total number. ^bAdhesion rate=(adhesion number/total number)×100%.

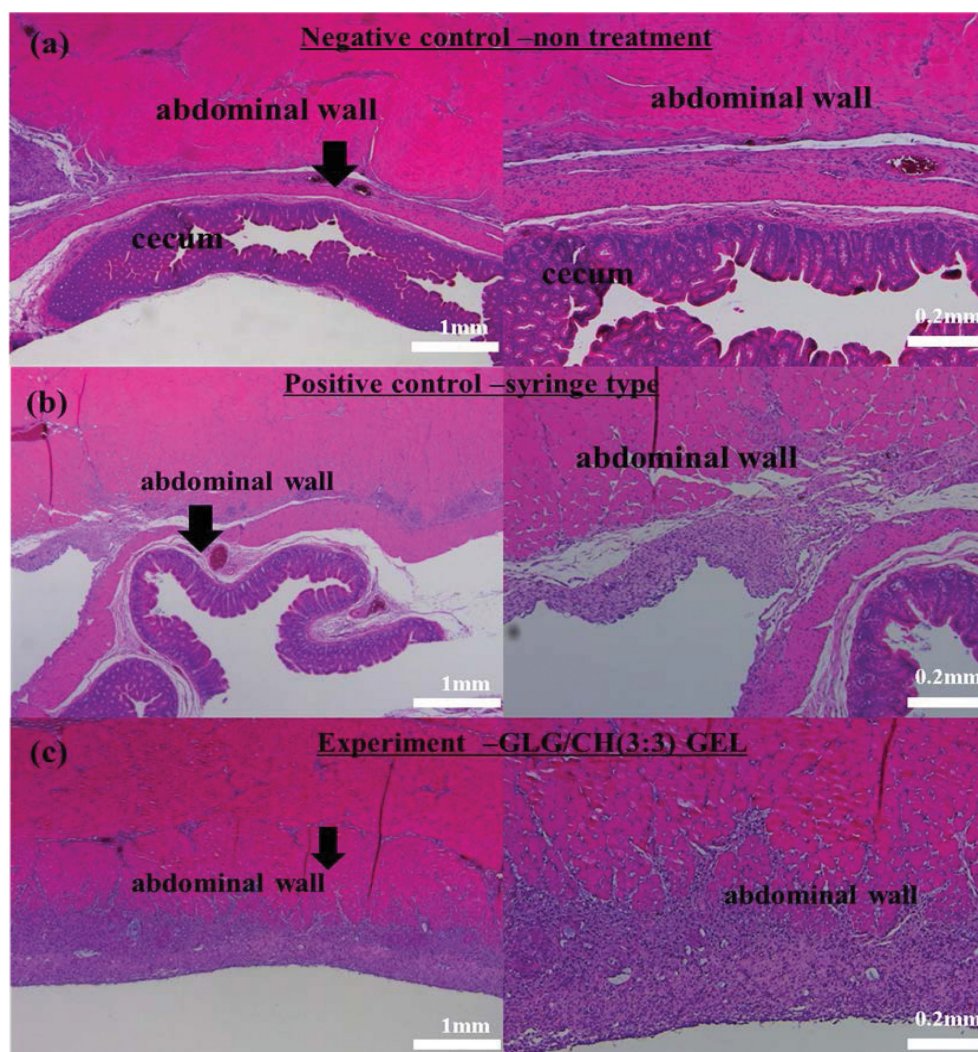


Figure 9. Histological observation of damaged tissue in rats with: (a) negative control; (b) positive control; (c) experiment group- GLG/CH gel applied post-damage. Left: The arrow region was magnified to right image. Scale bars of right and left indicate 0.2 and 1.0 mm, respectively.

조성의 주사제형 유착방지제보다 GLG/CH 조성 형태의 유착 방지제가 복막 내의 유착방지제로 효과적인 결과를 보였다. 이러한 결과로 GLG와 CH 조성의 젤은 유착방지제의 소재로 활용 가능성을 보였다.

감사의 글: 이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015H1C1A1035894).

References

1. G. M. Boland and R. J. Weigel, *J. Surg. Res.*, **132**, 3 (2006).
2. J. W. Burns, M. J. Colt, L. S. Burgees, and K. C. Skinner, *Eur. J. Surg. Suppl.*, **57**, 40 (1997).
3. B. Risberg, *Eur. J. Surg. Suppl.*, **577**, 32 (1997).
4. H. Tsujimoto, A. Tanzawa, M. Matoba, A. Hashimoto, S. Suzuki, S. Morita, Y. Ikada, and A. Hagiwara1, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **101B**, 99 (2013).
5. A. G. Oh, *Biomater. Res.*, **17**, 138 (2013).
6. R. M. Kamel, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **150**, 111 (2010).
7. J. H. Lee and H. Y. Kim, *Biomater. Res.*, **14**, 66 (2010).
8. S. A. Lee, J. S. Kim, J. S. Kim, J. J. Hwang, W. S. Lee, Y. H. Kim, Y. K. Choi, and H. K. Chee, *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **43**, 596 (2010).
9. P. Matricardi, C. Cencetti, R. Ria, F. Alhaique, and T. Coviello, *Molecules*, **14**, 3376 (2009).
10. J. T. Oliveira, T. C. Santos, L. Martins, M. A. Silva, A. P. Marques, A. G. Castro, N. M. Neves, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 493 (2009).

11. M. Ahuja, S. Singh, and A. Kumar, *Inter. J. Biol. Macromol.*, **53**, 114 (2013).
12. H. Friedman, C. Stonerock, J. Lefaivre, and M. Yost, *J. Invest. Surg.*, **17**, 271 (2004).
13. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. Nho, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 505 (2003).
14. A. Verma and J. K. Pandit, *Trop. J. Pharm. Res.*, **10**, 61 (2011).
15. K. R. Park, D. P. Kim, and Y. C. Nho, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **12**, 718 (2001).
16. J. H. Hong, J. W. Choe, G. Y. Kwon, D. Y. Cho, D. S. Sohn, S. W. Kim, Y. C. Woo, C. J. Lee, and H. Kang, *J. Surg. Res.*, **166**, 206 (2011).
17. A. G. Oh, *Biomater. Res.*, **17**, 138 (2013).
18. J. K. Park, J. W. Nah, and C. Y. Choi, *Polymer*, **39**, 480 (2015).
19. A. Piattelli, A. Scarano, P. Russo, and S. Matarasso, *Biomaterials*, **17**, 791 (1996).
20. E. Sandberg, C. Dahlin, and A. Linde, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **51**, 1106 (1993).