

랫드에서 고농도의 Carboxymethyl Chitosan이 복벽 유착 예방에 미치는 영향

권영삼, 장환수, 정재훈, 배재성, 이정우, 강한샘, 양정훈, 이문학, 장광호*
경북대학교 수의과대학
(게재승인: 2003년 3월 3일)

Effect of high concentrations of carboxymethyl chitosan on preventing formation of peritoneal adhesion in rats

Young-Sam Kwon, Hwan-Soo Jang, Jae-Hoon Jeong, Jae-Sung Bae, Jeong-Woo Rhee
Han-Saem Kang, Jeong-Hoon Yang, Wen-Xue Li, Kwang-Ho Jang*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea
(Accepted: March 3, 2003)

Abstract: The objective of this study was to determine the effective concentration of carboxymethyl chitosan(CMC) solution on preventing intraperitoneal adhesions. In this study, 60 rats were divided into four groups : an untreated control group and three experimental groups that were treated with 3 ml of 3, 5, and 7% CMC solution. Adhesions were induced by suturing both the ileal serosa and peritoneum scraped until petechial bleeding occurred. CMC solutions were instilled intraperitoneally immediately before closure of the peritoneomuscular layer. The tensile strength of formed adhesions was measured by using a computerized tensiometer. Histopathological changes of adhesions were evaluated by hematoxylin-eosin for light microscopic examination and Masson's trichrom staining for collagen fibers. All of CMC solutions reduced significantly the tensile strength of the adhesions. CMC inhibited the increase of inflammatory cell infiltration and damage of adhesion spot, and accelerated the collagen synthesis and neovascularization. No significant differences were observed among all of CMC concentration at inhibiting adhesion formation. Therefore, we could conclude that 3% CMC, the lowest concentration adopted in this study, was appropriate to prevent the formation of peritoneal adhesion.

Key words: carboxymethyl chitosan, peritoneal adhesion, rat, tensile strength

서 론

복강 수술 후 유착의 발생은 거의 모든 경우에서 나타난다¹. 유착은 정상적인 창상 치유의 한 부분이며, 문합 부에서 누출을 방지해 주고, 국소적으로 빈혈인 부위에 신생 혈관을 통해 혈액을 공급하는 등의 기능을 한다. 그러나, 유착으로 인해 장폐색이나 불임을 야기하는 등

체내 정상 기능에 치명적인 영향을 주기도 한다. 이러한 이유로 유착에 대한 치료 비용이 미국내에서 11억7천9백만 달러라는 액수가 보고되기도 하였다².

Carboxymethyl chitosan(CMC)은 chitin의 carboxymethylation 유도체로 수용성이며 생체 적합성 고분자로서 점성과 탄력성을 가지는 물질이다. 또한 섬유아세포 배양 실험이나 복강내, 구강내, 그리고 피하에 고농도로 실험

* Corresponding author: Kwang-Ho Jang

Department of Surgery, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea.
Tel: +82-53-950-5965, E-mail: khojang@knu.ac.kr

적으로 투여한 결과 비독성을 나타내었다. Chitin, chitosan의 여러 연구 중에서 CMC의 유착방지 효과는 Kennedy 등³에 의해서 처음으로 복강 수술 후 유착의 발생과 면적을 감소시켰다는 보고가 있다. 또한 Jang 등⁴은 1~3%의 저농도에서는 3% 용액의 유착 방지 효과가 가장 우수하다 하였다. 일반적으로 복강내에 주입하는 액체성 유착방지제의 효과는 그 농도에 비례한다고 알려져 있으나 3% 이상의 CMC의 유착방지효과가 농도에 비례하는지는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 3% 이상의 농도를 사용하여 그 유착 방지 효과를 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

CMC(캠바이오, 한국) 분말을 3%, 5%, 7%가 되도록 증류수에 용해시켜 121°C, 20분간 고압증기멸균하였다.

실험동물은 체중 230~250g의 SD 랫트 60마리로 물과 고형사료를 자유 급여하고, 케이지당 3마리씩 사육하였다. 각 군당 15마리를 사용하여 개복하여 유착 유발 후 아무런 투여를 하지 않은 대조군, 3%, 5%, 7% CMC를 각각 3 ml씩 투여한 3% CMC군, 5% CMC군, 7% CMC군으로 나누었다.

마취를 위해 thiopental sodium(50 mg/kg)을 복강내 주사한 후, 복부를 삭모하고 povidone-iodine과 alcohol로 수술 부위를 소독하였다. 약 3 cm를 정중선 절개한 후 회장과 맹장을 노출시킨 후 회맹결합부에서 3 cm 떨어진 회장의 장막을 1×0.5 cm² 크기로 점상출혈이 나타날때까지 수술도로 소파한 후 같은 크기로 우측 복벽을 도려낸 후 양측 창상부의 양 끝단을 6-0 polypropylene (Prolene®, Ethicon, UK)으로 고정시켰다. 복막과 근육을 4-0 chromic catgut으로 연속 봉합한 후 마지막 봉합 직전에 CMC 투여군에서는 3 ml의 CMC 용액을 복강내 투여했다. 피부는 4-0 nylon으로 연속봉합하였다.

수술 2주 후 halothane으로 안락사를 시켜서 유착유도 부위의 표본을 채취하였다. 각 군당 15표본 중 10개는 생리식염수에 침적시키고 곧바로 유착부위의 인장강도를 tensiometer(H500DM, Hounsfield Co., UK)를 이용하여 측정했다. 나머지 표본들은 조직학적 검사를 위해 10% 중성 포르말린 용액에 고정시켜, 파라핀 포매한 후 5 μm로 연속 절편하여 HE염색과 콜라겐 섬유를 관찰하기 위해 Masson's trichrom 염색을 하였다.

유착이 발생한 복벽과 장점막 사이의 거리를 automated image analysis process(Soft Image System, Germany)로 현미경상에서 측정하였고, 유착부의 조직병리학적 평가를 위해 염증세포 침윤, 콜라겐 증식, 장벽-복벽간 손상 정

도, 혈관신생 정도를 관찰하였다.

실험 결과는 평균치와 표준편차를 구한 후, 각 군간의 유의성 검정은 Student's one-way ANOVA와 t-test로 분석하였다.

결 과

모든 군에서 실험동물의 이상 폐사는 없었고, 대조군에서 수술 후 7일에 복막염으로 1마리가 폐사하여 실험에서 제외된 후 폐사두수를 추가하였다. 육안적인 검사 결과 점성을 가지는 CMC용액이 복강내에 잔존하지는 않았다.

유착부의 인장강도를 측정한 결과, 대조군에서는 2.59±0.85 Newton, 3% CMC군에서는 1.55±0.60 Newton, 5% CMC군에서는 1.83±0.80 Newton, 7% CMC군에서는 1.69±0.83 Newton으로 대조군에 비해서 모든 CMC 처치군에서 유의적으로 감소하였다(Fig 1).

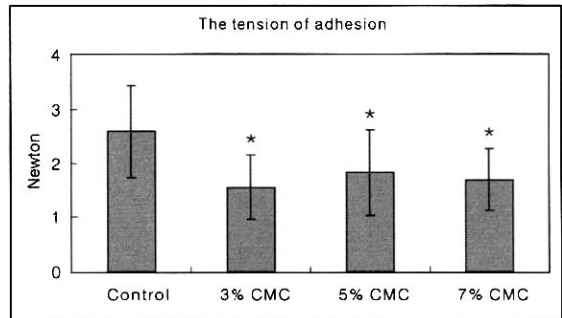


Fig. 1. The tensile strength of the adhesion site to be evaluated with tensiometer on day 14 after surgical procedure in rats. % CMC is the concentration of carboxymethyl chitosan administrated into the peritoneal cavity.

*p<0.05 compared with the control group

조직학적 검사 결과, 유착이 발생한 복벽과 장점막 사이의 거리는 대조군이 107.80±15.32 μm로 비교적 밀착된 유착 부분이 관찰되었으며 유착부에 많은 염증세포가 침윤되어 있었고, 낮은 정도로 콜라겐 섬유가 존재하였다. 또한 유착부의 경계가 분명하지 않았다. 3% CMC 군은 유착부의 거리가 114.80±13.39 μm로 밀착되었으며 유착부는 비교적 많은 염증세포가 침윤되었고 중등도의 밀도로 콜라겐 섬유가 존재하며, 혈관신생은 적었다. 유착부의 경계는 불분명하였으나, 소장측의 손상은 비교적 적었고, 전반적으로 대조군의 소견과 유사하였다. 5% CMC 군에서는 복벽과 장점막 사이 거리가 135.40±8.99 μm로 대조군과 3% CMC 군에비해선 다소 증가하였

Table 1. Distance between intestinal and abdominal walls, and histological scores in adhesion spots

Group	Control	3% CMC	5% CMC	7% CMC
Distance(μm)	107.80 \pm 15.32	114.80 \pm 13.39	135.40 \pm 8.99	175.40 \pm 35.08
Inflammatory cell Infiltration	+++	+	+	±
Collagen hyperplasia	±	++	+++	+
Damage at Intestinal wall	+++	+	±	±
Damage at Intestinal mucosa	++	±	±	-
Neovascularization	+	+	++	++

Mean \pm SD, μm . Distances between laminal muscularis of intestinal mucosa and abdominal wall were calculated at automated image analysis process(Soft Image System, Germany). Degrees of histopathological changes: -, not detected; ±, very slight; +, slight; ++, moderated; +++, severe.

*p<0.05 compared with the control group

다(Table 1).

유착부는 비교적 많은 염증세포와 고밀도의 콜라겐 섬유, 그리고 중등도의 혈관신생 소견이 관찰되었다. 7% CMC 군에서는 복벽과 장점막사이의 거리가 175.40 \pm 35.08 μm 로 비교적 느슨하게 유착이 발생하였고, 대조군의 수치에 비해 유의적으로 증가하였다. 유착부는 염증세포 침윤이 가장 적게 나타났고, 저밀도의 콜라겐 섬유와 중등도의 혈관신생이 관찰되었다. 또한 유착경계부가 명확하였고 소장 측의 손상이 비교적 적게 관찰되었다(Fig 2).

고 찰

유착의 발생기전에서 중요한 과정은 국소빈혈, 혈액이 존재하는 창상, 감염, 이물 등에 의한 조직 플라즈미노겐 활성물질의 활력 감소이다. 섬유소용해력을 가지는 플라즈미노겐의 활성 감소 결과 창상이 존재하는 장막표면 사이 접합면에 섬유성 결합이 발생한다. 따라서 이 초기 결합을 적절히 용해시키지 않으면 단단한 유착으로 발전한다^{3,7}. 물론, 이러한 유착 발생 인자들을 최소화하면서 수술을 하는 것이 가장 효과가 있을 것이다. 그러나 복막이나 장기의 장막에 의원성 외과적 창상을 피하는 것은 복강경 수술일 경우라도 상당히 어려운 문제이다. 따라서 유착방지를 위해 보조적인 방법과 제재들을 사용해오고 있다. 지금까지 유착방지를 위해 사용된 제재들로는 유착부위를 포함하여 복강전체에 공급되는 고분자 수용액들과 창상부에 부분적인 물리적 장벽 역할로 유착을 방지하는 것 등이 있다. 이러한 고분자 수용액으로는 dextran⁸, hyaluronic acid^{9,10}, sodium carboxymethyl cellulose¹¹, polyethylene glycol¹² 등이 있으며,

물리적 장벽 역할의 방지제로 oxidized regenerated cellulose (Interceed[®])¹³, hyaluronic acid와 carboxymethyl cellulose의 합제(Septrafilm[®])¹⁴ 등이 있다. 물리적으로 유착부를 분리시켜주는 물질은 절개창, 문합부, 난소 등의 부분적 유착방지에는 물론 효과가 있으나, 수술 중 조직의 건조, 출혈, 수술장갑의 가루, 복강경 조작 등에 의해 나타날 수 있는 복강내 다른 부위의 유착을 방지할 수는 없다. 따라서, 복강내를 전체적으로 도포해줌으로써 장벽으로 작용하는 고분자 수용액이 효과적이고 경제적인 것이다.

Hyaluronic acid(HA)는 세포외 기질의 glycosaminoglycan 성분으로 정상적인 창상치유에 관여하며^{15,16}, 심낭내¹⁷와 복강내^{18,19} 유착 형성을 억제한다. 그러나 HA는 비싼 가격과 효능의 부분성^{9,10}으로 실제 임상에서의 적용에는 어려움이 있다.

CMC는 HA와 구조가 유사한 제재이며 성질과 화학구조의 범위에 의해서 다양한 형태로 이용가능하다. 유착 방지효과에 대한 보고로는 Kennedy 등³이 랫드의 자궁 각과 소장에서의 유착 모델을 이용해서 유착의 크기, 강도 및 수에 대한 효과를 보고한 바 있다. 또한 Jang 등⁴은 농도별 복강내 투여 모델을 이용하여 3% CMC의 유착방지효과를 보고했다. 이러한 연구 배경을 토대로 저자 등은 고농도의 CMC를 이용하여 연구한 결과, 유착부의 인장강도에 있어서 대조군에 비해서 CMC 처치군들이 유의적으로 감소했고 3% CMC 군이 1.55 \pm 0.60 Newton으로 가장 작았다. 이것은 유착방지가 방지제의 농도와 비례한다는 일반적인 사항과는 상이하였다. 조직학적 검사결과, 유착부위의 복벽과 장점막사이의 거리는 대조군, 3%, 5%, 7% CMC 군 순으로 증가하였다. 이것은 CMC 농도와 비례하는 결과이며, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서의 유착이 처치군에 비해서 밀착

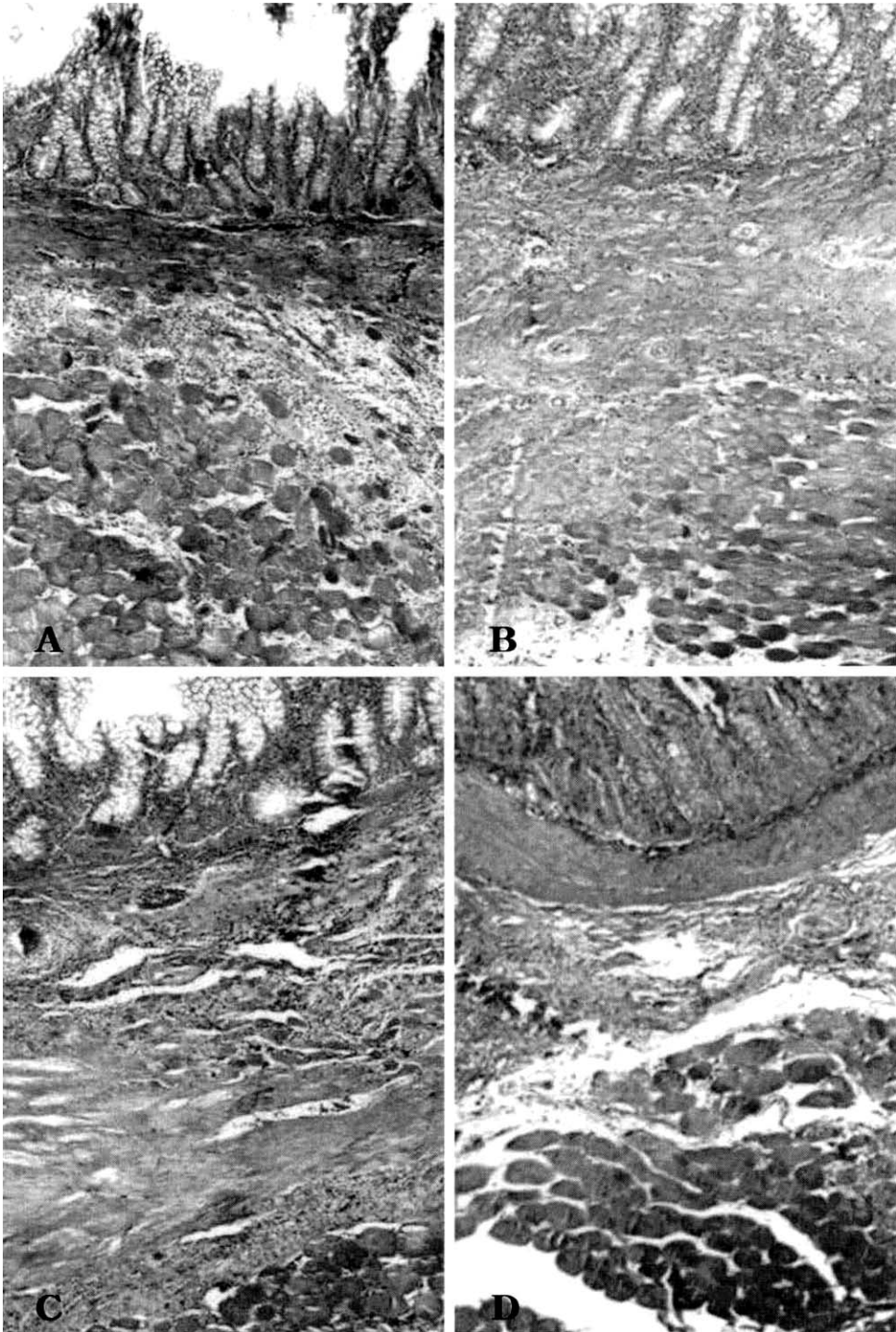


Fig. 2. Effect of carboxymethyl chitosan on collagen content in the adhesion spot. Biopsy specimens were taken from control untreated (A), 3% CMC (B), 5% CMC (C), and 7% CMC treated rats (D). Sections were stained with Masson's trichrom for collagen fibers. By this staining, collagen was stained green. (Original magnification $\times 40$)

되어 있는 것으로 판단되었다. CMC 수용액이 복강내에서 고농도로 존재할수록 복강내 흡수가 더디고, 창상부에 대한 피막 효과와 부유 효과를 나타낸다는 다른 유착방지제에서의 효과와 같은 결과를 보였다. 다른 방지제와 CMC 수용액의 유착 방지 효과 비교, 복강내 흡수 속도 및 키토산 제제의 창상 치유 효과에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다. Usami 등²⁰은 키토산 용액이 개에서 호중구의 주화성을 유발한다고 보고한 바 있다. 이러한 맥락에서 본 연구에서 유착부의 염증세포 침윤이 CMC 처치군들 보다 대조군에서 가장 두드러진 것은 창상 유발 후 2주라는 시간이 지난 점 때문이라고 생각된다. 또한 대조군에서의 염증반응이 CMC 처치군보다 정도가 심하고 염증기간이 오래된 것이라는 추측도 가능하다. CMC 처치군이 대조군에 비해 콜라겐 섬유가 많이 관찰되었고, 혈관신생이 더욱 활발하였던 것은 Ueno 등²¹이 개의 피부 창상 치유과정에서 키토산이 섬유아세포 증식과 콜라겐 섬유의 생성을 촉진한다는 보고와 일치하였다. 또한 그는 콜라겐 섬유의 생성 촉진이 섬유아세포의 수적 증가에 의해선지 섬유아세포 자체의 분비량 증가에 의해서 인지 아직 불명확하다고 하였다. 본 연구에서도 콜라겐 섬유의 증식에 대해서는 CMC에 의한 영향이라고 추측되며, 이에 대한 연구가 앞으로 필요하다고 생각된다.

이상의 결과, 3% 이상 고농도의 CMC 용액에 대해 유착방지 효과를 비교해본 결과, 5%, 7% CMC의 유착 방지 효과가 3% CMC와 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 복강내 수술 후 유착 방지를 위해 3% CMC를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions. How big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl*, 72:60-63, 1990.
2. Ray NF, Larsen JW, Stillman RJ Jr, et al. Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988. *Surg Gynecol Obstet*, 176:271-276, 1993.
3. Kennedy R, Costain DJ, McAlister VC, et al. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan. *Surgery*, 120:866-870, 1996.
4. Jang KH, Kwon YS, Kim JE, et al. Effect of carboxymethyl chitosan on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat. *Korean J Vet Res*, 40:635-643, 2000.
5. Holtz G. Prevention and management of peritoneal adhesions. *Fertil Steril*, 41:497-507, 1984.
6. Buckman RF, Woods M, Sargent L, et al. A unifying pathogenic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J Surg Res*, 20:1-5, 1976.
7. diZerega GS. Biochemical events in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg*, 163:10-16, 1997.
8. Larsson B, Lalos O, Marsk L, et al. Effect of intraperitoneal instillation of 32% dextran 70 on postoperative adhesion formation after tubal surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 64:437-441, 1985.
9. Urman B, Gomel V, Jetha N. Effect of hyaluronic acid on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat model. *Fertil Steril*, 56:563-567, 1991.
10. Urman B, Gomel V. Effect of hyaluronic acid on postoperative intraperitoneal adhesion formation and reformation in the rat model. *Fertil Steril*, 56:568-570, 1991.
11. Elkins TE, Ling FW, Ahokas RA, et al. Adhesion prevention by solutions of sodium carboxymethylcellulose in the rat II. *Fertil Steril*, 41:929-932, 1984.
12. Nagelschmidt M, Minor T, Saad S. Polyethylene glycol 4000 attenuates adhesion formation in rats by suppression of peritoneal inflammation and collagen incorporation. *Am J Surg*, 176:76-80, 1998.
13. Interceed(TC7) Adhesion Barrier Study Group. Prevention of postsurgical adhesions by INTERCEED(TC7), an absorbable adhesion barrier: a prospective, randomized multicenter clinical study. *Fertil Steril*, 51:933-938, 1989.
14. Beck DE. The role of Seprafilm™ biorresorbable membrane in adhesion prevention. *Eur J Surg*, 163:49-55, 1997.
15. Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J*, 239:445-450, 1986.
16. King SR, Nickerson WL, Proctor KG. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, 109:76-84, 1991.
17. Mitchell JD, Lee R, Hadokowski GT, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a hyaluronic acid coating solution. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 107:1481-1488, 1994.
18. Shushan A, Mor-Yosef S, Avgar A, et al. Hyaluronic acid for preventing experimental postoperative intraperitoneal adhesions. *J Reprod Med*, 39:398-402, 1994.

19. Goldberg EP, Burns JW, Yaacobi Y. Prevention of postoperative adhesions by precoating tissues with dilute sodium hyaluronate solutions. *Prog Clin Biol Res*, 381: 191-204, 1993.
20. Usami Y, Okamoto Y, Minami S, et al. Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan. *J Vet Med Sci*, 56:1215-1216, 1994.
21. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20: 1407-1414, 1999.