

## 락타이드로 가교시킨 히아루론산 막의 세포독성

김원중 · <sup>1</sup>권지영 · <sup>1</sup>정성일 · †김인섭  
한남대학교 생명과학과, <sup>1</sup>한남대학교 나노생명화학공학과  
(접수 : 2006. 2. 23., 게재승인 : 2006. 7. 12.)

## Cytotoxicity of Hyaluronic Acid Membrane Cross-linked with Lactide

Won Jung Kim, Ji Young Kwon<sup>1</sup>, Seong Ihl Cheong<sup>1</sup>, and In Seop Kim†

Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and Nano-Bio Technology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

(Received : 2006. 2. 23., Accepted : 2006. 7. 12.)

The biodegradable hyaluronic acid (HA) membranes cross-linked with lactide using the crosslinking agent, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) were prepared as a potential biocompatible material for tissue engineering. HA membranes having different mechanical properties were synthesised by varying degree of the mole ratio of lactide to HA, EDC concentration, and crosslinking temperature. HA membranes were degradable in water solution and the degradation became slower with the increasing mole ratio of lactide to HA. HA membranes were sterilized using ethylene oxide gas and extracted with cell culture medium for 24 h at 37°C and 200 rpm. Cytotoxicity of the extract was tested using NIH/3T3 mouse embryo fibroblast as a model cell. Growth inhibition was not observed in the extracts of HA membranes with the mole ratios of lactide to HA, 5 or 10, and 10% EDC concentration, however 11% of growth inhibition was observed in the extract with the mole ratio of 13. Growth inhibition was not observed in the extracts of HA membranes prepared with 5% EDC or 10% EDC and the mole ratio of lactide to HA, 10, however 12% of growth inhibition was observed in the extract with 20% EDC. Cytotoxicity was not observed in the extracts of HA membranes prepared at varying crosslinking temperatures, 15°C, 25°C, and 28°C with the mole ratio of lactide to HA, 10 and 10% EDC.

**Key Words** : Biodegradable polymer, hyaluronic acid, lactide, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC), cytotoxicity

### 서론

과학의 발달로 인간의 수명이 연장되고 고품질의 삶에 대한 욕구가 커지면서 보형 및 성형 재료의 수요가 급증하여 생체 의학 분야에서 천연 및 인공 물질을 생체 재료로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 목적에 적합한 물질로 고분자를 가교시켜 만든 3차원 망상구조의 하이드로젤을 들 수 있다. 하이드로젤은 높은 흡습성과 안정성, 무독성을 가지고 있고 혈액, 체액 및 생체와 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 보인다. 1960년 폴리하이드록시 에틸메타아크릴레이트를 이용한 제품이 처음 선보인 이래(1) 상처 치료용 드레싱, 콘택트렌즈, 약물 전

달게, 성형 보형물 등의 생체 재료로 널리 사용되고 있다(2-4). 하이드로젤이 약물 전달체 또는 성형 보형물의 용도로 사용되기 위해서는 단백질이나 효소 등과 화학 반응을 일으키지 않고 인체 변화 조건에 순응하여야 한다.

히아루론산은 조직 내의 간질에 광범위하게 분포되어 있는 천연 무코다당류로서 세포간 분자의 3차원 가교 역할을 하고, 점도가 높아 연골사이에서 연골을 보호하며, 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 갖는다(5). 또 그 독특한 화학적 특성으로 인해 필요에 따라 다양한 분자량을 갖도록 할 수 있으며, 생체 내에서 효소적으로 재구성 가능하고, 관능기의 조절 및 가교화, 하이드로젤 형태로의 재구성이 용이하다. 이러한 히아루론산의 우수한 물리 화학적 성질을 이용하기 위해 히아루론산을 개조하여 면역성 조직공학과 약물 전달체, 인체 보형물 등에 적용되는 생체 재료물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(6-10). 히아루론산은 친수성기인 카르복실기를 다량 함유하고 있어 수분과 접

† Corresponding Author : Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

Tel : +82-42-629-8335, Fax : +82-42-629-7487

E-mail : inskim@hannam.ac.kr

축시 기계적 강도가 약화되고 신속히 분해되나(11, 12) 적절한 방법을 도입하여 카르복실기를 개조함으로써 기계적 강도를 높이고 인체 내에서 분해 속도를 지연시킬 수 있다. 이 목적으로 가장 적합한 물질로 polylactide (PLA)를 들 수 있다. PLA는 1962년 수술용 봉합사로 사용된 이래 가장 널리 사용되는 합성 생체 고분자 재료중 하나로서 기계적 강도가 우수하고 생체 내에서 신진대사를 통해 서서히 분해되어 배출되는 생체 분해성이 우수한 고분자이다(13). PLA는 카르복실기와 에스테르 결합을 유도할 수 있는 하이드록시기가 다량 존재하며, 반복단위에 존재하는 이성질체의 구조를 조절함으로써 분해속도를 조절할 수 있다(14, 15). 또 PLA의 올리고머도 D/L형 이성질체의 비율 및 분자량에 따라 기계적 물성과 분해속도가 달라진다(16). 이와 같은 PLA의 분해속도 조절 능력을 생체 재료에 도입하기 위하여 PLA 혹은 그 모노머인 젯산을 히아루론산에 가교시켜 생체 내에서 분해 능력을 조절 할 수 있는 새로운 고분자를 제조하였다. 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용하여 히아루론산과 젯산과의 가교반응이 진행됨을 확인하였으나 친수성이 너무 크고 분해 속도가 빨라 생체 재료나 세포 배양용으로 사용하는데 문제점이 있었다(17). 이러한 단점을 개선하기 위해 소수성이 더 큰 젯산의 무수 환형 이량체인 락타이드를 사용하여 가교시킨 히아루론산 막을 제조하였다.

본 연구에서는 냉동 건조법을 이용하여 가교제 EDC로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 제조한 새로운 유도체의 생체적합성을 측정하고자 하였다. 히아루론산과 락타이드의 혼합 몰비, 가교 온도, 가교제 농도 등의 반응 조건에 따라 여러 종류의 막을 제조하고, 수용액상에서의 분해 속도와 NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 막의 제조

막의 제조를 위해 사용한 히아루론산은 평균분자량  $2 \times 10^6$  Da인 Fulllongchem사 (Changzhou, China)의 의약품 제품을 사용하였다. 락타이드, 에탄올과 가교제로 쓰인 EDC는 씨그마 알드리치 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 1% 히아루론산 수용액에 히아루론산 기준으로 락타이드를 5-13 몰비로 첨가하여 상온에서 4시간 교반하였다. 히아루론산과 락타이드의 혼합 용액을 캐스팅 판에 부어 Gardner 칼을 이용하여 균일한 두께로 캐스팅한 후  $-80^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동결시켰다. 이것을 꺼내  $-80^\circ\text{C}$ , 1 Pa하의 동결건조기에서 24시간 동결 건조하였다. 제조된 막은  $15 \sim 28^\circ\text{C}$ 에서 에탄올에 대한 EDC 가교제를 5~20% 비율로 섞은 혼합액에 담가 가교제가 막 속으로 충분히 침투된 상태에서 24시간 자석 젯개를 교반시키면서 가교시켰다. 가교 후 막은 초음파 세척기로 5분간 3회 세척하여 가교제를 완전히 제거한 후 건조기에서 건조시켰다. 제조된 막의 가교됨을 확인하기 위해 NMR을 사용하여 관능기를 확인하였다. NMR은  $\text{D}_2\text{SO}_4$ 를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz (Karlsruhe,

Germany)로 측정하였다.

### 막의 가수분해

제조된 막을 다른 효소 없이 증류수에 침전시킨 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 분해가 얼마나 이루어지는지 살펴보았다. 시료는 일정한 크기로 잘라 50 ml 병에 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 가수분해 시키면서 정해진 시간에 꺼내어 세척한 후  $37^\circ\text{C}$  건조기에서 24시간 건조한 후 시료의 무게를 재어 분해 정도를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복하여 평균값을 취하였다.

### 막에서 침출물 추출

락타이드로 가교시킨 히아루론산 막을 지름이 1.2 cm 정도로 일정하게 자르고 24 well PS 배양 플레이트 (Corning, USA)에 넣은 후 ethylene oxide gas로 멸균하였다. 10% fetal bovine serum (FBS: HyClone Laboratories, Inc.)이 첨가된 RPMI (HyClone Laboratories, Inc.) 배지 2 ml을 각 well에 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 200 rpm으로 24시간동안 교반하면서 침출물을 추출하였다.

### 막 침출물의 세포독성 실험

막 침출물의 세포독성을 평가하기 위한 모델 세포로 NIH/3T3 섬유아세포 (KCLB 21685, Korean Cell Line Bank, Korea)를 사용하였다(18). 섬유아세포는 10% FBS와 100 units/ml의 페니실린 (Sigma) 및  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 황산 게타마이신 (Sigma)이 첨가된 RPMI 배지를 사용하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 incubator에서 배양하였다. 섬유아세포를 0.25% 트립신 (GIBCO Lab., USA)을 처리하여 배양용기 바닥에서 떼어낸 후 24 well PS 배양용기에  $4 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>의 세포농도로 파종하였다. 24시간동안 배양한 후 배지를 피펫으로 제거하고 미리 준비한 침출물을 첨가하여 4일동안 배양하였다. 이때 세포배양배지를 막 침출물의 대조구로 사용하였다. 세포계수를 위해 Phosphate buffered saline을 이용하여 각 well을 세척한 후 0.25% 트립신을 처리하여 세포를 분리시킨 후 세포배양배지를 넣고 현탁한 뒤 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 트립신을 제거하였다. 1 ml 세포배양 배지를 첨가하여 현탁한 뒤 동량의 trypan blue solution (sigma)을 처리하고 5분간 반응시킨 후 hemacytometer를 이용하여 계수하였다. 세포독성은 막 침출물에 의해서 섬유아세포의 성장이 저해받는 정도를 아래와 같은 계산에 의해 % growth inhibition으로 나타내었다.

$$\% \text{ growth inhibition} = (A-B)/A \times 100$$

A: 세포배양배지를 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

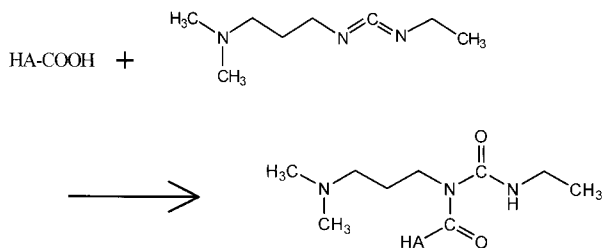
B: 막 침출물을 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

## 결과 및 고찰

### 막의 제조

생체 적합성이 우수한 히아루론산과 생분해성이 우수한 폴리락타이드의 이량체인 락타이드를 가교제 EDC로 가교

시켜 고분자막을 제조하였다. 합성된 고분자 막의 구조는 핵자기 공명 분광법으로 확인하였다. 히아루론산과 락타이드에 존재하는 하이드록시기와 카르복실기가 반응하여 얻어진 가교된 고분자는 물에 녹지 않는 성질을 가지므로 이를 관찰함으로써 가교반응의 유무를 일차적으로 관찰하였다. 가교 반응에 의해서 형성된 에스테르기는 락타이드가 말단기로 존재하는 형태(a)와 완전히 가교된 형태(b)로 존재할 수 있다. 이 두 가지 형태의 분자 구조를 Fig. 1에 보였다. 완전히 가교된 형태는 기계적 강도를 증가시키지만, 말단기로 존재하는 경우 이웃한 히아루론산과 완전히 가교가 되지 않아 기계적 강도를 증가시키는데 한계가 있다. 따라서 두 경우를 구분할 수 있다면 우수한 물성의 고분자를 합성하는데 유익한 정보로 활용될 수 있다. 두 경우 연결된 메틸기의 구조가 다른 점에 주목하여 말단기로 존재하는 에스테르기에 연결되어 있는 메틸기와 가교된 상태로 존재하는 에스테르기에 연결된 메틸기가 분리되는지를 살펴보았다. 관능기의 구조를 확인하기 위하여 NMR로 분석하였으며 대표적인 도표의 하나를 Fig. 2에 보였다. 도표를 분석한 결과 두 종류의 메틸기 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )가 1.7 ppm부근(a)에서 중첩하여 나타나 말단기로 존재하는 형태와 완전 가교된 메틸기를 구분할 수 없었다. 그러나 이 피이크는 젯산기가 히아루론산과 가교 반응에 참가하여 형성된 피이크이므로 반응에 참여한 젯산기의 양으로 볼 수 있다. 한편 순수한 히아루론산도 아마이드기에 연결되어 있는 메틸기가 존재하므로 NMR로 확인한 결과 2.1 ppm 부근(b)에서 완전히 분리된 피이크가 나타남을 확인하였다. 또 EDC는 히아루론산의 카르복실기와 반응하여 아래와 같은 분자구조를 형성하는 것으로 알려져 있다(19).



그런데 EDC 구조에도 메틸기가 존재하여 이것의 위치를 NMR로 확인한 결과 1.3 ppm(c)에서 나타났다. 이로써 그림 3의 NMR 도표로부터 반응에 참가한 젯산기에 존재하는 메틸기(a), 히아루론산에 존재하는 메틸기(b), 반응에 참가한 EDC 분자에 존재하는 메틸기(c) 등 3가지의 메틸기가 각각 1.7, 2.1, 1.3 ppm의 서로 다른 위치에 존재함을 확인하였다.

**막의 가수 분해**

생성된 고분자의 생체 내에서 분해 능력을 살펴보기 위해 수용액상에서 생분해성을 살펴보았다. 폴리락티드의 분자쇄 절단은 에스테르기의 가수분해에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다(20). Fig. 3에서 동일한 분자량의 히아루론산으로부터 가교된 고분자를 증류수에 침전시킨 후 37 °C, pH 7.4에서 시간에 따른 분해거동을 살펴보았다. 시간

이 지남에 따라 모든 종류의 고분자가 분해되었으며 몰비가 커 락타이드가 많이 첨가된 고분자일수록 분해 속도가 느렸다. 락타이드와 히아루론산의 몰비를 조절함으로써 인체 내에서 분해 속도를 조절할 수 있으리라 예상되었다.

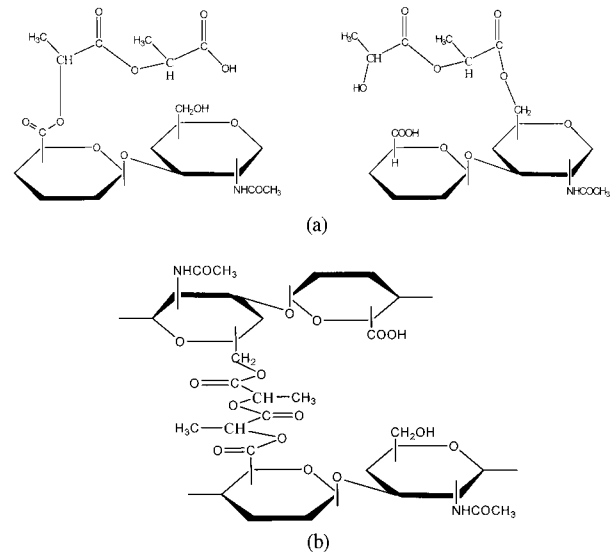


Figure 1. Structure of hyaluronic acid membranes cross-linked with lactide using the cross-linking agent, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC).

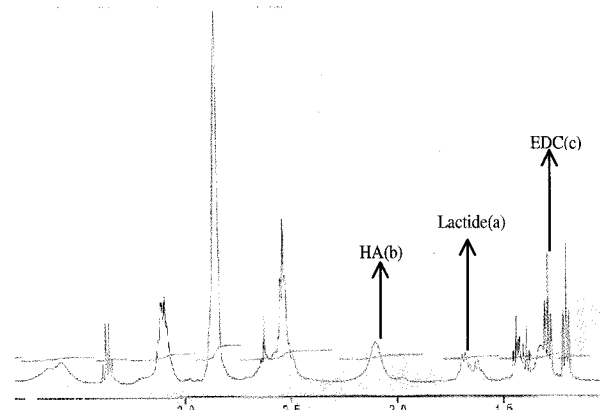


Figure 2. <sup>1</sup>H-NMR spectra of hyaluronic acid membranes cross-linked with lactide using the cross-linking agent, EDC ((a) methyl group in hyaluronic acid, (b) methyl group in reacted lactyl group, (c) methyl group in reacted EDC).

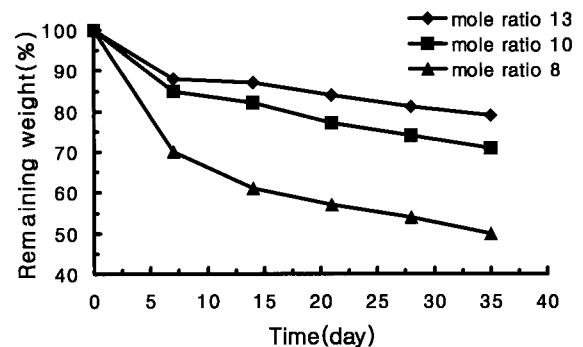
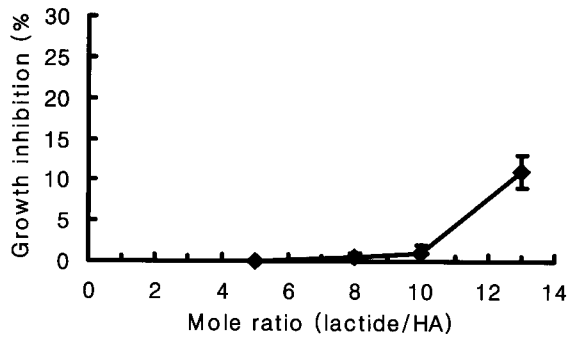


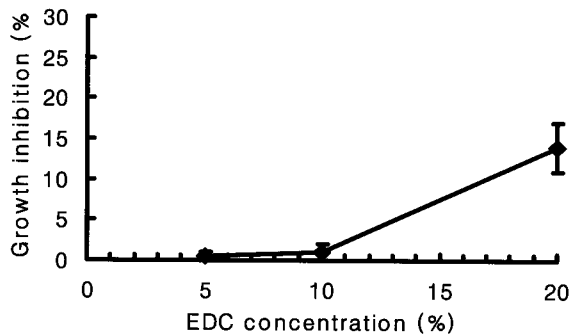
Figure 3. Degradation profiles of hyaluronic acid membranes cross-linked at different mole ratio of lactide to hyaluronic acid.

**막 침출물의 세포독성**

조직공학, 약물전달계, 인체 보형물 등에 적용되는 의약품 생분해성 고분자는 물리화학적 특성과 기계적인 특성이 생체재료로 사용하기에 적합해야 할 뿐만 아니라 인체 세포에 독성을 나타내지 않아야만 한다(21). 따라서 EDC로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 제조한 새로운 유도체의 생체적합성을 확인하고자 하였다. 합성된 고분자의 물성은 히아루론산과 락타이드의 혼합 몰비, 가교 온도, 가교제 농도 등의 반응 조건에 따라 변화하므로 이러한 운전 변수를 변화시켜 막을 제조하고, NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하였다.



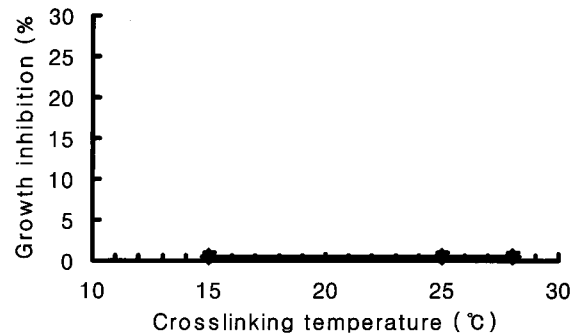
**Figure 4.** Growth inhibition of NIH/3T3 mouse embryo fibroblast cell in the extracts of hyaluronic acid membranes prepared with varying mole ratios of lactide to hyaluronic acid, 5, 10, or 13, and 10% EDC at the cross-linking temperature of 15°C.



**Figure 5.** Growth inhibition of NIH/3T3 mouse embryo fibroblast cell in the extracts of hyaluronic acid membranes prepared with varying concentrations of EDC, 5%, 10%, or 20%, and the mole ratio of lactide to hyaluronic acid, 10 at the cross-linking temperature of 15°C.

가교제의 농도를 10%로 고정하고 가교 온도 15°C에서 히아루론산에 대한 락타이드의 혼합 몰비를 변화시켜 막을 합성한 후 막 침출물의 NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하는 결과, 몰비가 5 또는 10에서는 세포독성을 나타내지 않았지만 몰비 13에서는 11% 정도의 성장저해를 나타내었다(Fig. 4). 히아루론산에 대한 락타이드의 혼합 몰비를 10으로 고정하고 가교 온도 15°C에서 가교제 EDC의 농도를 5%, 10%, 20%로 변화시켜 막을 합성한 후 막 침출물의 NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정

한 결과, EDC 농도가 20%인 경우에만 12% 정도의 성장저해를 나타내었다(Fig. 5). 히아루론산에 대한 락타이드의 혼합 몰비를 10, 가교제 EDC의 농도를 10%로 고정하고 가교 온도를 15°C, 25°C, 28°C로 변화시켜 막을 합성한 후 막 침출물의 NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하는 결과, 가교 온도에 따른 영향은 나타나지 않았다(Fig. 6). 위와 같은 결과에서 합성된 고분자의 세포독성은 히아루론산과 락타이드의 혼합 몰비와 가교제 농도에 의해 영향 받음을 알 수 있었다. 즉 혼합 몰비가 클수록, 가교제 EDC의 농도가 증가할수록 침출물의 세포독성 효과가 커짐을 알 수 있었다.



**Figure 6.** Growth inhibition of NIH/3T3 mouse embryo fibroblast cell in the extracts of hyaluronic acid membranes prepared at varying cross-linking temperatures of 15°C, 25°C or 28°C, and with the mole ratio of lactide to hyaluronic acid, 10 and 10% EDC.

본 연구를 통해서 생체 적합성이 우수한 히아루론산과 생분해성이 우수한 폴리락타이드의 이량체인 락타이드를 결합하여 인체 내에서 분해속도를 조절할 수 있는 생체재료를 제조하였다. 락타이드와 히아루론산의 몰비와 EDC의 농도를 조절함으로써 인체 내에서 분해 속도를 조절할 수 있으며, 세포독성이 없는 새로운 생체적합성 고분자막을 제조할 수 있었다. 새롭게 합성된 고분자 막은 조직공학, 약물전달계, 인체 보형물 등에 적용되는 생체 재료물질로 활용 가능할 것으로 판단된다.

**요 약**

생체 적합성이 우수한 히아루론산과 생분해성이 우수한 폴리락타이드의 이량체인 락타이드의 혼합 몰비, 가교제 EDC 농도, 가교 온도 등의 반응 조건을 변화시켜 생체적합성 고분자막을 제조하였다. 히아루론산에 대한 락타이드의 혼합 몰비가 증가할수록 수용액상에서의 분해속도는 감소하였다. 합성된 고분자막을 ethylene oxide gas로 멸균한 후 세포배양매지를 첨가하여 37°C에서 200 rpm으로 24 시간동안 교반하면서 침출물을 추출한 다음 NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하였다. EDC 농도 10% 조건에서 히아루론산에 대한 락타이드의 혼합 몰비가 5 또는 10에서는 세포독성을 나타내지 않았지만 몰비 13에서는 11% 정도의 성장저해를 나타내었다. 혼합 몰비를 10

로 고정하고 가교 온도 15℃에서 EDC의 농도를 5%, 10%, 20%로 변화시켜볼 때, EDC 농도가 20%인 경우에서부터 12% 정도의 성장저해를 나타내었다. 혼합 몰비 10, EDC 농도 10% 조건에서 가교 온도를 15℃, 25℃, 28℃로 변화시켰을 때, 가교 온도에 따른 세포독성은 나타나지 않았다. 따라서 락타이드와 히아루론산의 몰비와 EDC의 농도를 조절함으로써 인체 내에서 분해 속도를 조절할 수 있는 새로운 생체적합성 고분자막을 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 2005년 산업자원부의 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 연구결과로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Wichterle, O. and D. Lim (1960), Hydrophilic gels for biological use, *Nature* **185**, 117-118 .
2. Krsko, P. and M. Libera (2005), Biointeractive hydrogels, *Materials Today* **8**, 36-44.
3. Khang, G., M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, J. H. Chang, and K. J. Kim (2003), Recent development trend of stimuli sensitive hydrogels, *Polym. Sci. and Tech.* **14**, 431-437.
4. Lim, F. and A. M. Sun (1980), Microencapsulation of islets as bioartificial endocrine pancreas, *Science* **210**, 908-910.
5. Park, Y. D., N. Tirelli, and J. A. Hubbell (2003), Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, *Biomaterials*, **24**, 893-900.
6. Prestwich, G. D., D. M. Marecak, and J. F. Marecek (1998), Controlled chemical modification of hyaluronin acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives, *J. Control. Rel.* **53**, 93-103.
7. Luo, Y., K. R. Kirker, and G. D. Prestwich (2000), Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery, *J. Control. Rel.* **69**, 169-184.
8. Park, S. N., H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh (2002), Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking, *Biomaterials* **22**, 1205-1212.
9. Park, S. N., H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh (2003), Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration, *Biomaterials* **24**, 1631-1641.
10. Nam, H. S., J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Jung (2001), Synthesis of Hyaluronic acid scaffold for tissue engineering and evaluation of its drug release behaviors, *Polymer(Korea)*, **25**, 476-485.
11. Tokita, Y. and A. Pkamoto (1996), Degradation of hyaluronic acid-Kinetic study and thermodynamics, *Eur. Polym. J.* **32**, 1011-1014.
12. Zhong, S. P., D. Campoccia, P. J. Doherty, R. L. Williams, L. Benedetti, and D. F. Williams (1994), Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase, *Biomaterials* **15**, 359-368.
13. Lee, J. S., D. J. Choo, S. H. Kim, and Y. H. Kim (1998), Synthesis and degradation property of star-shaped poly(lactide), *Polymer(Korea)*, **22**, 880-889.
14. Grandfils, C., P. Flandroy, and R. Jerome (1996), Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials, *J. Control. Rel.* **38**, 109-122.
15. Fukuzaki, H., M. Yoshida, M. Asano, and M. Kumakura (1989), Synthesis of copoly(D,L-lactic acid) with relatively low molecular weight and *in vitro* degradation, *Eur. Polym. J.* **25**, 1019-1026.
16. Li, S., M. Tenon, H. Garreau, C. Braud, and M. Vert (2000), Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, D,L- and meso-lactides, *Polym. Deg. and Stab.* **67**, 85-90.
17. Kwon, J. Y. and S. I. Cheong (2005), Characterization of Hyaluronic Acid Membrane Containing Lactic Acid, *Membrane J.(Korea)* **15**, 8-14.
18. Oh, S. H., J. Y. Lee, S. H. Ghil, S. S. Lee, S. H. Yuk, and J. H. Lee (2006), PCL microparticle-dispersed PLGA solution as a potential injectable urethral bulking agent, *Biomaterials* **27**, 1936-1944.
19. Kuo, J. W., D. Swann, and G. D. Prestwich (1991), Chemical modification of hyaluronic acid by carboimides, *Bioconjugate Chem.* **2**, 232-241.
20. Miranda, L. F., A. B. Lugao, L. D. B. Machado, and L. V.Ramanathan (1999), Crosslinking and degradation of PVP hydrogels as a function of dose and PVP concentration, *Radia. Phys. Chem.* **55**, 709-712.
21. Marques, A. P., R. L. Reis, and J. A. Hunt (2002), The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: *in vitro* studies, *Biomaterials* **23**, 1471-1478.