

## Rat에서 carboxymethylcellulose, chondroitin 및 carboxymethylchitosan의 복강유착방지 효과의 비교

권영삼 · 장광호\*<sup>1</sup>

위스콘신-매디슨 대학교 수의과대학, \*경북대학교 수의과대학

(게재승인: 2007년 9월 12일)

### Comparative Effect of Carboxymethylcellulose, Chondroitin, and Carboxymethylchitosan on Preventing Intraperitoneal Adhesion Formation in Rats

Young-sam Kwon and Kwang-ho Jang\*<sup>1</sup>

School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

\*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

**Abstract :** This study was performed to compare the effects of carboxymethylcellulose (CMCE), chondroitin sulfate (Chondron), and carboxymethylchitosan (CMCH) on preventing intraperitoneal adhesion. As a result, the tensile strength of adhesions formed between the parietal peritoneum and the ileal serosa was significantly decreased in the groups of three different kinds of anti-adhesive agents. The distance of adhesion site was slightly increased in the treatment groups comparing control group. In the CMCH group, the inflammatory cell infiltration, collagen hyperplasia, and neovascularization were significantly lower than those of control group. It was observed that the damage at intestinal serosa was significantly decreased in the chondron and CMCH groups comparing control group. Therefore, CMCH may be useful as a anti-adhesive agent in the prevention of intraperitoneal adhesion in rats.

**Key words :** carboxymethylcellulose, chondroitin, carboxymethylchitosan

## 서 론

복강 유착은 수술 후 조직의 창상, 국소 빈혈, 감염 등의 원인에 의한 염증반응의 결과로서 발생하며, 이 과정은 조직의 치유 과정이다. 복강 유착의 발생으로 인한 생체 내 부작용으로서 통증, 장폐색, 불임 및 차후 수술의 어려움 등이 발생하며 이로 인한 2차적 치료로 인한 경제적 손실이 상당한 것으로 보고되고 있다(20).

이러한 상황을 바탕으로 유착 방지의 연구는 다양한 방법으로 여러 동물 모델에서 실시되었다. 먼저 여러 약제에 관한 연구로서 corticosteroids(22,25), heparin(1), nonsteroidal anti-inflammatory agents(24), progesterone(3) 등을 이용하였다. 또한 유착 부위를 물리적으로 단절시킴으로써 유착 방지 효과를 가지는 amniotic membrane(2), polytetrafluoroethylene surgical membrane(5), oxidized regenerated cellulose (21)에 관한 연구가 보고 되었다. 이외에도 점성을 가지는 흡수성 고분자 물질인 carboxymethylcellulose(CMCE)(7), hya-

luronic acid(23), dextran 70(16), carboxymethylchitosan(CMCH) (14), chondroitin sulfate(Chonron)(27) 등의 유착 방지 효과에 대한 연구가 활발히 보고되었다.

본 연구에서는 유착 방지 효과가 보고된 CMCE, Chondron 및 CMCH의 비교를 통해 각각의 유착 방지제의 효과와 특징을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

CMCE(시그마, 한국)와 CMCH(캠바이오, 한국) 분말을 각각 1%, 3%가 되도록 증류수에 용해시켜 121°C, 20분간 고압증기멸균 하였다. 1% chondroitin sulfate는 일본 카켄제약의 시판 제품인 Chondron®을 사용했다.

실험동물은 체중 230~250 g의 SD rat 60마리로 물과 고형사료를 자유 급여하고, 케이지당 3마리씩 사육하였다. 각 군당 15마리를 사용하여 마취 후 개복하여 유착 유발 후 아무런 투여를 하지 않은 대조군, 1% CMCE, 1% Chondron, 3% CMCH를 각각 투여한 CMCE, Chondron, CMCH 군으로 나누었다.

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : khojang@knu.ac.kr

마취를 위해 thiopental sodium(치오닐®, 대한제약, 50 mg/kg)을 복강 내 주사한 후, 복부를 삭모하고 povidone-iodine과 alcohol로 수술 부위를 소독하였다. 약 3 cm를 정중선 절개한 후 회장과 맹장을 노출하고 회맹결합부에서 3 cm 떨어진 회장 장막을 1×0.5 cm 크기로 점상출혈이 나타날 때까지 수술도로 소파하였다. 복벽과 소장의 장막 부위에 동일한 조건으로 유착을 유도하기 위해 장 소파 부위의 양단과 복벽을 6-0 polypropylene suture(Prolene®, Ethicon, UK)로 고정하였다. 복막과 근육을 4-0 chromic catgut으로 연속 봉합한 후 마지막 봉합 직전에 CMCE 군, Chondron 군, CMCH 군에 각각 3 ml의 1% CMCE 용액, 1% Chondron 용액, 3% CMCH 용액을 복강 내 투여했다. 피부는 4-0 nylon으로 연속 봉합하였다.

수술 2주 후 halothane으로 안락사를 실시하여 유착유도 부위의 표본을 채취했다. 각 군당 15표본 중 10개는 생리식염수에 침적시키고 곧바로 유착부위의 인장강도를 tensiometer (H500DM, Hounsfield Co., UK)를 이용하여 측정했다. 나머지 표본들은 조직학적 검사를 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켜, 파라핀 포매 후 5 μm로 연속 절편 하여 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 정도, 혈관신생 정도를 0, 관찰 안 됨; 1, 매우 경미; 2, 경미; 3, 중등도; 4, 심함으로 분류하고 점수화하여 관찰했다.

실험결과를 평균치와 표준편차를 구한 후, 각 군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 분석하였다.

### 결 과

유착부위의 인장강도를 측정한 결과 대조군, CMCE 군, Chondron 군, CMCH 군에서 각각 2.7±0.78, 1.6±0.44, 1.6±0.60, 1.4±0.35 Newton으로 대조군에 비해 세군의 처치군에서 유의적인 변화가 관찰되었다(*P*<0.05, Fig 1).

조직학적 검사결과, 대조군에서 유착이 발생한 복벽과 장점막 사이의 거리는 143.5±30.45 μm로 나머지 세군에 비해 가장 밀착되어 있었으며, CMCE 군에서는 167.8±31.72 μm, Chondron 군에서는 198.2±15.12 μm, CMCH 군에서는 164.8±13.39 μm로 Chondron 군에서의 거리가 가장 컸다(Fig 2).

염증세포의 침윤은 대조군(2.4±0.59)에서 다른 처치군에 비해 많은 염증세포가 관찰되었고 처치군들에서는 Chondron 군(2.1±0.45), CMCE 군(1.7±0.61), CMCH 군(1.4±0.36)의 순서로 작아졌으며 CMCH 군(*P*<0.05)에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타냈다(Fig 3과 7).

유착 형성 부위의 콜라겐 형성 정도는 대조군(2.37±0.43), Chondron 군(1.8±0.71), CMCE 군(1.5±0.84), CMCH 군

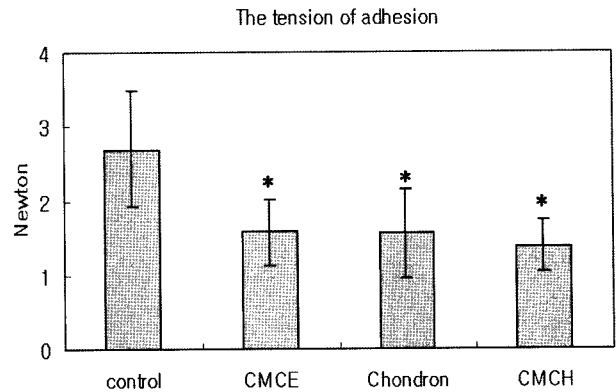


Fig 1. The tensile strength of adhesion on day 14 after operation. \* : *p*<0.05 compared with the control.

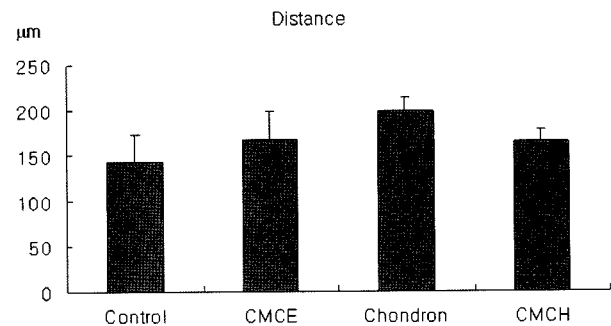


Fig 2. The distance of adhesion formed between the parietal peritoneum and the ileal serosa.

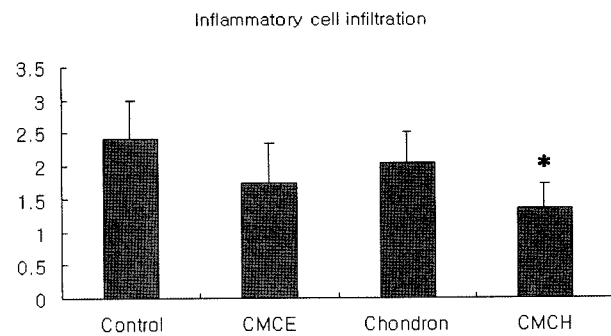


Fig 3. The inflammatory cell infiltration of adhesion on day 14 after operation. \* : *p*<0.05 compared with the control.

(1.1±0.58)의 순서로 나타났으며 CMCH 군에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화가 관찰되었다(*P*<0.05, Fig 4).

장점막의 손상정도는 대조군(2.56±0.42)에서 가장 심하였고 CMCE 군(2.3±0.59), Chondron 군(1.8±0.43), CMCH 군(1.6±0.42)의 순서로 작아졌고 대조군에 비해 Chondron 군과 CMCH 군에서 유의성 있는 변화가 관찰되었다(*P*<0.05, Fig 5).

유착부위의 혈관신생은 대조군(2.4±0.53), CMCE 군(1.7±0.39), Chondron 군(1.6±0.43), CMCH 군(1.2±0.51)의

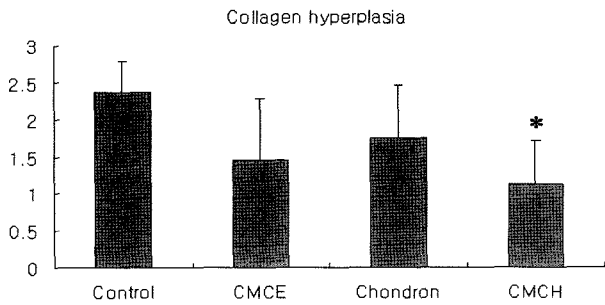


Fig 4. The collagen hyperplasia of adhesion on day 14 after operation. \*:  $p < 0.05$  compared with the control.

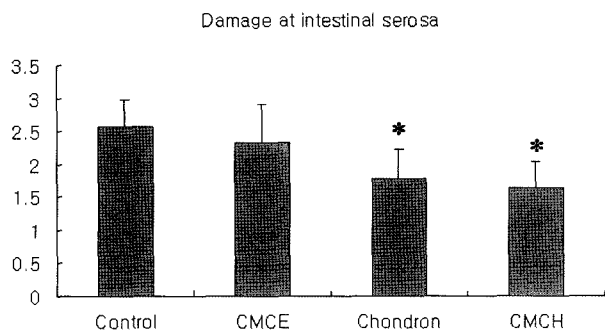


Fig 5. The damage at intestinal serosa of adhesion on day 14 after operation. \*:  $p < 0.05$  compared with the control.

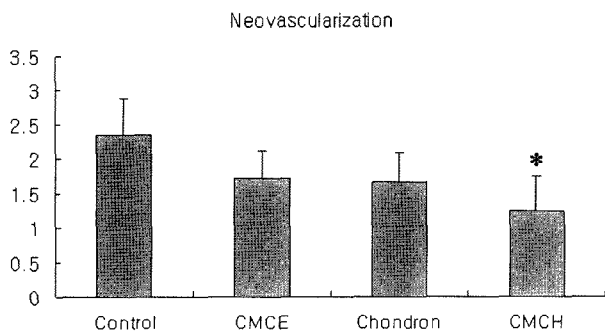


Fig 6. The neovascularization of adhesion on day 14 after operation. \*:  $p < 0.05$  compared with the control.

순서로 작아졌고, 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 CMCH 군에서 관찰되었다( $P < 0.05$ , Fig 6).

### 고 찰

복강 수술 후 유착형성에 의한 부작용으로 장 폐색, 만성 또는 재발성 통증, 불임 및 수술 시간의 지연 등이 발생 할 수 있다(6,10). 이러한 복강 유착의 원인으로는 건조, 빈혈, 고온, 감염, 이물 등이 일으키는 복강 내 창상을 들 수 있다 (17). 이러한 복강 내 창상은 섬유성 삼출액 형성을 초래하고 복막내 중피세포로부터 분비되는 섬유소는 용해되어 흡

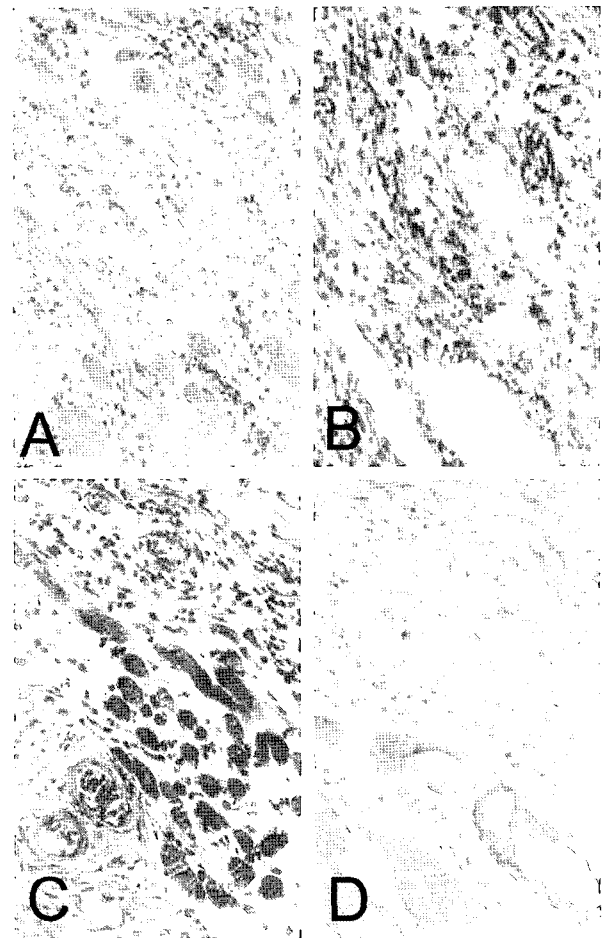


Fig 7. Effect of carboxymethylcellulose (CMCE), chondroitin sulfate (Chondron), and carboxymethylchitosan (CMCH) on the intraperitoneal adhesion formation. Biopsy specimens were taken from the adhesion tissue formed between the peritoneum and ileal serosa in the control untreated (A), CMCE (B), Chondron (C), and CMCH (D) treated rats on day 14 after operation. In the CMCH group, the inflammatory cell infiltration, collagen hyperplasia, and neovascularization were significantly lower than the control group. (Magnification  $\times 200$ )

수되는 것이 정상적인 복강 내 치유 기전이다(8,18). 그러나 유착이 형성되는 대부분의 경우에 있어서는 이러한 섬유성 삼출액의 침착과 그에 반하는 섬유소 용해 작용의 균형을 깨뜨리는 창상에 의해 섬유성 삼출액이 많아지고, 섬유소 용해 작용은 감소함으로써 발생하는 염증반응에 의해 섬유성 유착이 발생한다(11).

염증반응을 억제하거나, 유착 부위의 표면을 물리적으로 분리하거나, 섬유성 삼출액을 희석함으로써 유착의 형성을 방지할 수 있다. 따라서 이상적인 유착방지제는 복강 내 창상 부위의 치유과정이 끝날 때 까지 그 표면을 코팅해주는 효과를 가지면서 항염증 작용도 동시에 가지는 특성을 가져야 할 것이다.

본 실험에 사용된 유착 방지제인 CMCE(19), Chondron(27),

CMCH(13) 수용액은 그 효과가 잘 알려진 제제들이다. 이들 유착 방지제들을 사용한 결과, 유착을 유도한 복벽과 장점막 사이의 거리는 대조군에 비해 모든 처치군에서 증가하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 chitosan을 농도별로 사용하여 유착방지 효과를 비교했을 경우 고농도에서 무처치의 대조군에 비해 유착 형성 부위의 두께가 증가한 이전의 보고(15)와 유사하며, 고분자 수용액인 CMCE, Chondron, CMCH 용액이 유착형성기간 동안 복벽과 소장 장막 사이에서 점성을 지닌 상태로 물리적 장벽의 역할을 하였기 때문이라 생각된다.

대조군과 처치군들에서 관찰한 염증세포 침윤은 대조군이 가장 두드러졌고 Chondron 군, CMCE 군, CMCH 군의 순서로 감소하였다. 이 결과는 유착방지제들이 유착발생부위에서 섬유소를 포함하는 염증성 삼출액을 희석함으로써 염증의 정도를 완화시킨다고 한 Holz의 보고(12)와 같이 본 실험에 사용한 유착방지제들의 그러한 희석 작용에 의해 염증 세포 침윤이 대조군에 비해 감소한 것으로 추측된다. 또한, 기존에 알려져 있는 키토산의 항염증 효과(28)에 의해 CMCH 군의 유착 형성 부위에서 염증세포의 수가 감소하였을 것으로도 생각된다. 수용성 유착방지제는 유착 형성 부위에서 섬유아세포의 증식과 이주를 억제함으로써 콜라겐 생성이 감소하여 유착 형성을 방지한다고 알려져 있다(4,9). 이와 같은 이전의 연구들의 보고와 같이, 본 실험의 결과에서도 콜라겐 침착에 있어서 세 가지 유착방지제들을 적용했을 때에 대조군에 비해 콜라겐 형성이 적었으며, 이는 콜라겐 형성에 역할을 하는 섬유아세포의 창상 부위로의 이주를 감소시켰을 가능성과 창상부위에서의 치유과정을 촉진하였을 가능성을 가진다는 것을 의미한다. 이것을 뒷받침하는 결과로서 소장의 장막의 손상정도를 관찰한 결과 대조군에 비해서 세 처치군에서 보다 손상이 적게 나타났다. 특히 CMCH 군에서 장막의 손상정도가 유의성 있게 감소되었다. Thaler 등(26)은 최근에 섬유성 유착형성에 있어서 섬유아세포에서 발현하는 connective tissue growth factor(CTGF)의 발현과 혈관신생의 밀접한 연관성을 증명하였다. 본 실험에서도 유착부위에서의 신생혈관 정도를 관찰한 결과, 대조군에 비해 처치군들에서 신생혈관이 감소하였고, CMCH 군에서 유의성 있는 감소를 관찰된 것은 이것은 기존의 유착방지제들이 섬유소 용해작용이 모두 있다는 것을 의미하는 동시에 위에서도 언급한 바와 같이 섬유아세포의 증식과 이주를 억제하여 콜라겐 생성을 감소함으로써 유착을 방지하는 기능뿐만 아니라 신생혈관 형성도 유착방지제들이 억제한다는 것을 알 수 있다.

따라서 본 실험의 결과 3% carboxymethylchitosan은 이미 유착방지 효과가 널리 알려진 1% carboxymethylcellulose와 1% chondroitin sulfate와 비교하여 랫트의 소장에 유발시킨 복강 유착 방지 효과가 유사할 뿐 아니라 유착 형성 과정에서 나타나는 염증세포 침윤, 콜라겐 형성, 장막의 손상 및 혈관신생의 감소가 다른 두 방지제에 비해 뒤지지 않음을 알 수 있었다.

## 결 론

랫트의 소장과 복벽에 복강유착을 유도하여 기존의 세 가지 유착방지제의 효과를 비교한 결과, 3% carboxymethylchitosan은 랫트의 복강 유착 방지를 위해 선택할 수 있는 유착방지제로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Al-Chalabi HA, Otubo JA. Value of a single intraperitoneal dose of heparin in prevention of adhesion formation: an experimental evaluation in rats. *Int J Fertil.* 1987; 32: 332-335.
2. Badawy SZ, Baggish MS, ElBakry MM, Baltoyannis P. Evaluation of tissue healing and adhesion formation after an intraabdominal amniotic membrane graft in the rat. *J Reprod Med.* 1989; 34: 198-202.
3. Blauer KL, Collins RL. The effect of intraperitoneal progesterone on postoperative adhesion formation in rabbits. *Fertil Steril.* 1988; 49: 144-149.
4. Bothin C, Midtvedt T, Perbeck L. Orally delivered antibiotics which lower bacterial numbers decrease experimental intra-abdominal adhesions. *Langenbecks Arch Surg.* 2003; 388: 112-115.
5. Boyers SP, Diamond MP, DeCherney AH. Reduction of postoperative pelvic adhesions in the rabbit with Gore-Tex surgical membrane. *Fertil Steril.* 1988; 49: 1066-1070.
6. DeCherney AH, diZerega GS. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am.* 1997; 77: 671-688.
7. Elkins TE, Ling FW, Ahokas RA, Abdella TN, Homsey CA, Malinak LR. Adhesion prevention by solutions of sodium carboxymethylcellulose in the rat. II. *Fertil Steril.* 1984; 41: 929-932.
8. Ellis H, Harrison W, Hugh TB. The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br J Surg.* 1965; 52: 471-476.
9. Falk K, Bjorquist P, Falk P, Hedgren M, Ivarsson ML, Lanne B, Panfilov O, Holmdahl L. Antifibrinolytic proCPU is present in the peritoneal cavity during surgery. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003; 63: 287-296.
10. Fevang BT, Fevang J, Lie SA, Soreide O, Svanes K, Viste A. Long-term prognosis after operation for adhesive small bowel obstruction. *Ann Surg.* 2004; 240: 193-201.
11. Harris ES, Morgan RF, Rodeheaver GT. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery.* 1995; 117: 663-669.
12. Holtz G. Current use of ancillary modalities for adhesion prevention. *Fertil Steril.* 1985; 44: 174-176.
13. Jang KH, Kwon YS, Kim JE, Kwon, EJ, Oh TH, Lee KW, Jang IH. Effect of carboxymethyl chitosan on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat. *Korean J Vet Res.* 2000; 40: 635-643.
14. Kennedy R, Costain DJ, McAlister VC, Lee TD. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-

- carboxymethyl chitosan. *Surgery*. 1996; 120: 866-870.
15. Kwon YS, Jang HS, Jeong JH, Bae JS, Rhee JW, Kang HS, Yang JH, Li WX, Jang KH. Effect of high concentration of carboxymethyl chitosan on preventing formation of peritoneal adhesion in rats. *Korean J Vet Res*. 2003; 43: 151-156.
  16. Larsson B, Lalos O, Marsk L, Tronstad SE, Bygdeman M, Pehrson S, Joelsson I. Effect of intraperitoneal instillation of 32% dextran 70 on postoperative adhesion formation after tubal surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1985; 64: 437-441.
  17. Menzies D. Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention. *Surg Annu*. 1992; 24: 27-45.
  18. Milligan DW, Raftery AT. Observations on the pathogenesis of peritoneal adhesions: a light and electron microscopical study. *Br J Surg*. 1974; 61: 274-280.
  19. Moll HD, Wolfe DF, Schumacher J, Wright JC. Evaluation of sodium carboxymethylcellulose for prevention of adhesions after uterine trauma in ewes. *Am J Vet Res*. 1992; 53: 1454-1456.
  20. Ray NF, Larsen JW Jr, Stillman RJ, Jacobs RJ. Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988. *Surg Gynecol Obstet*. 1993; 176: 271-276.
  21. Reddy S, Santanam N, Reddy PP, Rock JA, Murphy AA, Parthasarathy S. Interaction of Interceed oxidized regenerated cellulose with macrophages: a potential mechanism by which Interceed may prevent adhesions. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1315-1320.
  22. Replogle RL, Johnson R, Gross RE. Prevention of postoperative intestinal adhesions with combined promethazine and dexamethasone therapy: experimental and clinical studies. *Ann Surg*. 1966; 163: 580-588.
  23. Sawada T, Hasegawa K, Tsukada K, Kawakami S. Adhesion preventive effect of hyaluronic acid after intraperitoneal surgery in mice. *Hum Reprod*. 1999; 14: 1470-1472.
  24. Siegler AM, Kontopoulos V, Wang CF. Prevention of postoperative adhesions in rabbits with ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Fertil Steril*. 1980; 34: 46-49.
  25. Swolin K. The effect of a massive intraperitoneal dose of a glucocorticoid on the formation of postoperative adhesions. Clinical studies using laparoscopy in patients operated on for extrauterine pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1967; 46: 204-218.
  26. Thaler K, Mack JA, Berho M, Grotendorst G, Wexner SD, Abramson SR. Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation. *Eur Surg Res*. 2005; 37: 235-241.
  27. Tran HS, Chrzanowski FA Jr, Puc MM, Patel NG, Geldziler B, Malli D, Ramsamooj R, Hewitt CW, DelRossi AJ. An in vivo evaluation of a chondroitin sulfate solution to prevent postoperative intraperitoneal adhesion formation. *J Surg Res*. 2000; 88: 78-87.
  28. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 1999; 20: 1407-1414.