

쥐 맹장/복벽 찰과상 모델에서 Sodium Hyaluronate/sodium Carboxymethyl Cellulose 멤브레인의 수술 후 유착방지에 대한 유효성 평가

이 영 우 · 이 영 무[†]

한양대학교 응용화학공학부
(2005년 8월 19일 접수, 2005년 9월 16일 채택)

Evaluation on Effectiveness for Preventing Post Surgical Adhesion of Sodium Hyaluronate/Sodium Carboxymethyl Cellulose (HA/CMC) Membrane in Rat Cecum/Peritonium Model

Young Woo Lee and Young Moo Lee[†]

School of Chemical Engineering, College of Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea
(Received August 19, 2005, Accepted September 16, 2005)

요 약: 본 연구에서는 히알루론산나트륨/카르복시메틸셀룰로오스나트륨(HA/CMC)으로 구성된 유착방지 막을 제조하였고, 쥐에서 유착방지에 대한 효과를 평가하였다. 유착방지 막은 HA/CMC 용액을 동결건조한 후 1-에틸-3-(3-디메틸아미노 프로필) 카보디이미드 (EDAC)로 가교하여 제조하였다. Sprague-Dawley 쥐의 맹장/복벽 찰과상 모델에서 복부 중앙선 절개 후 장막과 복벽을 bone burr로 1×2 (cm²) 크기로 찰과상을 만들고, 상처 면 주위의 3곳을 봉합사로 고정시켰다. 상처난 장을 실험군의 경우 HA/CMC 막으로 덮어주었으며, 대조군은 아무치지도 하지 않은 상태로 복벽을 마주보게 하였다. 대조군의 대부분은 수술 후 7, 14, 21, 28일에 유착정도 3 이상을 나타내었고, 반면 실험군의 60~70%는 수술 후 14, 21, 28일에 유착정도 2 이하를 나타내었다. 이는 유착세기에서도 유사하였다. 일반적으로 유착정도와 유착세기는 수술 후 14일까지 점차 증가하였고, 수술 후 21일에는 거의 동일하거나 약간 증가하였으며, 28일째에는 감소하였다. 대조군은 유착정도와 유착세기, 유착면적에서 높은 수치를 나타내었다. 이 유착방지막은 수술 후 유착방지에서 좋은 임상결과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: We prepared an anti-adhesion membrane made of sodium hyaluronate/sodium carboxymethylcellulose (HA/CMC) and evaluated its effectiveness for adhesion prevention in a rat model. The anti-adhesion membrane was prepared by lyophilizing HA/CMC solution and cross-linking properly with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC). In a cecum/abdominal wall abrasion model of Sprague-Dawley rat, cecal serosa and abdominal wall were abraded in 1×2 (cm²) with a bone burr after peritoneal midline incision and sutured at 3 points around the injured surface. The denuded cecum was covered with HA/CMC membrane (experimental group), or nothing (control group) and apposed to the abdominal wall. Most of the control group represented 3 or more of adhesion grade at POD 7, 14, 21, and 28, whereas 60~70% of the experimental group was 2 or less of adhesion grade at 14, 21, and 28. It was similar in the adhesion strength. In a general manner, the adhesion grade and strength showed gradual increasing until POD 14, almost same or a little increasing POD 21, but decreasing POD 28. Also the control group was much higher in adhesion grade, strength, and area than the experimental group. It is expected that the anti-adhesion membrane will have a good clinical result in postoperative adhesion prevention.

Keywords: post-surgical adhesion, sodium hyaluronate, sodium carboxymethylcellulose, porous membrane, preclinical test

1. 서 론

유착이라 함은 정상적으로는 분리된 채 존재해야 하

는 인체 내의 두 조직 혹은 장기가 어떤 이유 - 수술, 염증, 이물, 출혈, 감염 등 - 에 의해 달라붙는 현상을 말한다. 이들 원인 중에서 수술에 의한 창상이 가장 중요한 원인이 되며, 수술 후 상처가 치유되는 기간

[†]주저자(e-mail : ymlee@hanyang.ac.kr)

동안 혈전 및 섬유세포 등에 의해 섬유성 밴드가 만들어지고 이들이 두 조직 혹은 장기를 유착시키게 된다. 한편 유착방지제는 수술 후 부작용으로 발생하는 유착을 방지하기 위한 의료용 제품을 일컫는다.

또한 이러한 유착에 따른 부작용 또한 다양하다. 예를 들어, 산부인과의 수술 후 골반 내에 유착이 발생하는 경우 만성통증, 성기능 장애, 불임 등의 원인이 되기도 하며, 외과 수술에서는 복강 내 수술 후 장 유착에 의한 장 폐쇄, 복막과 장 유착 경우 2차 수술 시의 장 천공 위험성, 그밖에 척추 수술의 경우 유착에 의한 신경 압박, 이비인후과의 축농증 수술 후 유착에 의한 재발 등을 포함하여 많은 부작용이 알려져 있다. 복부수술 후 유착에 의해 발생하는 합병증의 발생율은 소장폐쇄가 49~74%, 불임이 15~20%, 만성골반통증이 20~50%, 후속 수술 시 장 천공이 19% 정도에 이르는 것으로 알려져 있다[1,2]. 또한 이비인후과의 만성 비부비동염의 치료를 위한 비강 내시경술 후 재발율이 환자의 7.6%에서 38%에 이르고 있다[3]. Ramadan에 따르면 이로 인해 재수술을 받는 환자의 56%에서 유착이 발생되어 있었다고 보고되었다[4]. 한편, 산부인과의 경우 불완전한 유산, 사산, 재발성 유산 등에 대한 소파술 혹은 suction evacuation 후 20~50%에서 자궁내막에 유착이 발생하며, 이러한 유착으로 인해 불임, 무월경, 습관성 유산 등이 초래되는 것으로 알려져 있다[5].

유착은 경제적으로도 커다란 부담이 되고 있으며, 1988년 미국통계자료에 의하면, 복부 수술 후 유착으로 인한 합병증의 치료에 사용된 비용이 12억 달러에 이른다고 보고되었다[6].

이러한 유착을 방지하는 방법으로는 수술 시 상처를 최소화하거나, 항염제의 사용 혹은 섬유소의 형성을 막기 위해 tissue plasminogen activator를 활성화시키는 방법 등이 있고, 근래에는 물리적 장벽(barrier)을 사용하는 방법이 개발되어 사용되고 있다[7,8]. 물리적 장벽으로는 결정성 용액, 고분자 용액, 고체 막의 3가지 종류로 크게 분류될 수 있다. 결정성 용액으로는 lactated linge 용액, 생리적 완충 용액 등이 있으며, 고분자 용액으로는 수용성 고분자인 dextran, sodium hyaluronate (HA), sodium carboxymethylcellulose (CMC), polyethyleneglycol, Poloxamer 등이 수용액으로 사용된다 바 있으며, 고체 막으로는 비분해성인 Gore-Tex를 비롯하여 생분해성인 oxidized regenerated cellulose (ORC)

의 식물(상품명 Interceed, Johnson & Johnson), 화학적으로 개질된 HA/CMC 필름(상품명 Seprafilm, Genzyme Biosurgery)이 알려져 있다.

용액형 유착방지제의 경우 결정성 용액을 사용하는 경우는 hydrofloating 효과에 조직 혹은 장기를 부유시키고 유동성이 좋게 만들어 줌으로써 유착이 방지되는 것으로 설명하고 있으며, 고분자 수용액의 경우는 siliconizing 효과에 의해 조직 혹은 장기를 코팅하여 윤활성 표면을 제공함으로써 유착이 방지된다고 설명하고 있다. 고체 막의 경우는 두 조직 혹은 장기 사이를 완전 차단하여 줌으로써 유착을 방지하는 효과를 나타내는 것으로 설명된다. 한편 유착방지제는 일정기간의 상처 치유가 끝난 후에는 분해 혹은 흡수되어 제거되어야 하며, Barrier용 재료 자체 혹은 그 분해산물이 인체에 무해하여야 한다.

유착방지제로 사용 가능한 재료들 중에서 CMC는 음이온성 셀룰로오스 유도체로써, 고점도의 수용액을 제공하며, 증점제, 안정화제, 현탁제, 바인딩제 등으로 식품 및 의약품 분야에서 널리 사용되어 왔다. Sodium CMC 용액은 dextran-70보다 rat과 토끼의 유착형성 방지실험에서 보다 효과적이고 독성은 낮은 것으로 나타났다[9,10]. 또한 HA 경우 세포외 기질을 구성하는 성분의 하나로써, 즉 결합조직에서 발견되는 일종의 다당류이다. 이것은 점성이 있는 용액이나 고체의 막으로서 만들어질 수 있다. Diamond는 산부인과 수술을 받은 246명의 여성에 대한 다기관, 무작위, 위약-조절 임상실험을 실시하여 0.4% sodium hyaluronate (HA) 용액으로 precoating하면 수술 및 수술부위의 건조와 관련하여 발생할 수 있는 외상으로부터 조직을 보호하여 수술 후 유착형성을 감소시킬 수 있을지 확인하였다[11]. 이 실험에서 HA 용액에 의해 처리된 환자들과 비교하였을 때 대조군의 환자들은 새로운 유착 형성이 30% 높게 발생했다. 또한 심 등의 연구에서 백서에 대하여 여러 가지 수용성 고분자를 실험한 결과, CMC와 HA가 다른 재료에 비하여 유착방지 효과가 우수한 것으로 나타났다[12].

본 연구에서는 다공성 멤브레인 형태의 HA/CMC 유착방지제를 제조하였으며, 이에 대하여 시간의 경과에 따른 유착방지 효과를 알아보려고 하였다. 따라서 본 연구에서는 백서의 맹장/복벽 찢과상 모델을 만들어 유착방지제를 사용하지 않은 대조군 및 멤브레인형 유착방지제를 사용한 실험군에서 시간의 경과에 따른

유착의 변화를 관찰하였다. 이를 통하여 유착정도의 변화를 평가하고 다공성 멤브레인형 유착방지제에 의한 유착방지 가능성을 동물모델을 통하여 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 유착방지 멤브레인 제조

실험에 사용한 sodium hyaluronate와 sodium carboxymethyl cellulose의 다공성 유착방지제는 (주)바이오레인에서 공급받았으며, 이는 두 고분자의 수용액을 동결건조하고 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDAC, Sigma-Aldrich)에 의해 가교함으로써 다공성의 멤브레인형 구조로 제조되었다. 멤브레인형 유착방지제에 대하여 밀도, 팽윤도, 다공도(porosity)를 측정하였으며, hyaluronidase (10 U/mg)로 24시간 생분해 후의 질량감소를 측정하였다. 밀도는 질량을 겔보기 부피로 나누어 계산하였으며, 팽윤도는 [(팽윤무게-건조무게)/건조무게]의 식으로 계산하였다. 한편 다공도는 [(멤브레인 상태의 부피-필름부피)/멤브레인 상태의 부피]로 계산하였다. 생분해에 의한 분해정도를 확인하기 위하여 분해 전후의 질량 변화율을 계산하여 백분율로 무게감소율을 표시하였다.

2.2. 실험동물 및 수술재료

실험동물 [Sprague-Dawley rat (4-week-old female, Sam: TacN(SD)BR, Samtako Co., Seoul, Korea)]은 안정을 위하여 들어온 지 3일 후 실험을 실시하였다. 마취제[ketamine hydrochloride (유한양행, Seoul, Korea)]는 실험동물에 적당하도록 희석(5 mg/실험동물 100 g)하여 사용하였다. 진통제[디프론 (한동(주), Seoul, Korea)]와 항생제[gentamycin (대성미생물연구소, Seoul, Korea)]는 10배 희석한 후 실험동물 당 0.3 mL씩 주사하였다. 이하의 실험용 재료는 povidone-iodine, 3/0 SURGIFIT polyglycolic acid braided (AILEE. Co. Ltd. Seoul, Korea), 4/0 및 3/0 Blue NYLON mono (AILEE. Co. Ltd. Seoul, Korea), 6/0 SURGIFIT polyglycolic acid braided (AILEE. Co. Ltd. Seoul, Korea)이며, 별도의 처리 없이 구입한 그대로 사용하였다.

2.3. 동물실험 방법

실험동물의 마취를 위하여 ketamine hydrochloride를

체중 100 g당 5 mg씩 복강에 주사하였고, 마취가 불충분한 경우 체중 100 g당 2.5 mg을 추가로 주사하였다. 마취가 되면 몸무게를 측정하여 기록한 후 복부의 털을 깎고 포비돈으로 소독한 다음 4~5 cm 정도로 중앙선을 따라 개복술을 실시하였다. 그리고 맹장을 꺼내어 1×2 (cm) 크기로 bone burr를 이용하여 얇게 주어 출혈이 일어날 정도로 장막에 손상을 가하고, 마주 보이는 복강막에 같은 크기로 bone burr로 손상을 가하였다. 두 창상 면을 맞닿도록 하고, 창상 부위로부터 1 cm 떨어진 3곳을 3/0 Nylon 봉합사로 고정함으로써 유착의 형성을 촉진시켰다. 대조군인 경우에는 별도의 조치 없이, 실험군은 HA/CMC 멤브레인을 사용하여 찰과상 유도 부위를 충분히 덮을 수 있는 크기 (2×3 cm²)로 잘라서 맹장과 복벽 사이에 끼워 넣어주었으며, 복강 막은 연속봉합방법에 의하여 봉합하였고, 피부도 마찬가지로 봉합하였다. 수술이 끝난 동물은 물과 먹이를 충분히 주면서 2, 4, 7, 14, 21, 28일째에 희생시켜 유착정도, 유착세기, 유착면적을 평가하였다.

유착의 정도에 대한 평가는 Vlahos 등의 방법에 따라 실시하였다[13]. 즉 간단히 정리하면, 유착정도는 0에서 5까지 분류하며, 0=유착이 없는 경우, 1=하나의 얇은 필름형 유착, 2=둘 이상의 얇은 필름형 유착, 3=점상의 집중화 된 두꺼운 유착, 4=판상의 집중화 된 두꺼운 유착, 5=혈관이 형성된 매우 두꺼운 유착 혹은 하나 이상의 판상의 두꺼운 유착으로 분류한다. 또한 유착세기를 1에서 4까지 네 등급으로 분류하며, 1=필름형이며 매우 약한 힘으로도 떨어지는 유착, 2=중간 정도의 힘이 요구되는 유착, 3=상당한 압력이 걸려야 뗄 수 있는 유착, 4=유착이 매우 강해서 떼기 힘들거나, 매우 큰 압력이 요구되는 경우로 분류하였다. 각 군에서 유착의 정도와 유착의 세기를 앞서서의 기준에 따라 구분하여 평가하였으며, 전체적인 유착의 면적을 측정하여 평가하였다. 유착의 평가 시에는 평가자가 실험군을 알 수 없도록 하여 객관성을 높일 수 있도록 하였다. 유착정도, 세기 및 면적의 측정값은 평균값과 이의 표준편차로 표시하였다. 측정값에 대한 통계처리는 Student's t-test를 이용하였고, 표에서 측정값은 평균값과 표준편차로 나타내었으며, p-value 0.05 이하를 유의성이 있는 것으로 보았다.

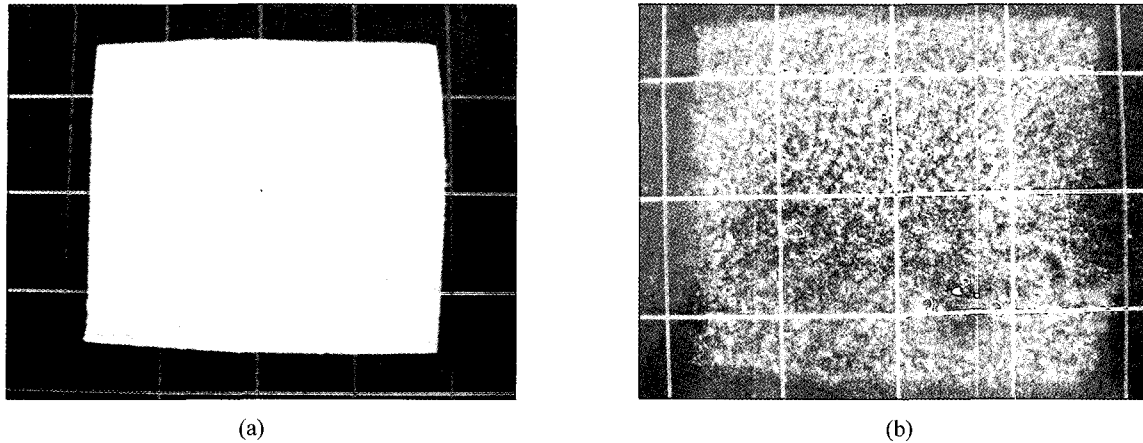


Fig. 1. Photographs of HA/CMC membrane in both (a) dried and (b) swollen states.

Table 1. Properties of the Membrane Type Barrier for Anti-adhesion

	Before degradation		After degradation	
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Density (g/mL)	0.15	0.02	0.18	0.04
Swelling [(Ws-Wd)/Wd]	70	12	63	13
Porosity (%)	56	5	43	12
Weight loss rate after degradation (%)	-	-	33	8

3. 결과

3.1. 유착방지 멤브레인 제조

동결건조 방법을 이용하여 제조된 멤브레인형 유착방지제는 Fig. 1과 같은 형태를 나타내고 있다. 멤브레인형 유착방지제의 생분해 속도 조절은 EDAC를 이용한 화학적 가교 정도를 조절함으로써 이루어질 수 있다. 본 연구는 생분해성, 생체적합성 재료를 이용하여 제조된 유착방지제를 평가하기 위한 연구이다. 복강 내 유착은 초기 7일간의 기간 동안 주요 과정이 진행되므로 이 기간 동안 분리 막으로써 존재해야 한다.

Table 1에 동결건조 방법을 이용하여 제조된 HA/CMC의 멤브레인형 유착방지제에 대하여 생분해 전·후의 특성을 나타내었다. 겉보기 밀도는 생분해 전에 0.15 ± 0.02 였으며, 생분해 후에는 0.18 ± 0.04 를 나타내었다. 팽윤도는 생분해 전·후 각각 70 ± 12 , 63 ± 13 을 나타내었고, 다공도는 생분해 전·후에 각각 56 ± 5 , 43 ± 12 였다. 본 제품은 HA/CMC의 멤브레인형 구조

이므로 많은 공극을 포함하고 있어 다공도는 높고, 밀도는 상대적으로 낮게 나타난다. 또한 수용성 고분자인 CMC와 HA를 가교하여 제조된 제품이므로 수분 접촉 시 수분을 흡수하여 부피가 급격하게 팽창하며 비교적 높은 팽윤도를 나타내고 있다. 효소 처리에 의한 생분해에서 24시간 경과 후 약 33%의 질량 감소가 있었으나, 겉보기 밀도, 팽윤도, 다공도에서는 크게 변화되지 않았다. 즉 *in vitro* 상에서의 실험이긴 하지만 이 정도의 분해에서는 멤브레인의 형태에 커다란 변화 없이 분해가 진행되며 비교적 일정한 물성을 나타낸다고 볼 수 있다. Fig. 2에 생분해 전·후의 멤브레인형 유착방지제의 전자현미경 사진을 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 분해 후 멤브레인이 분해되어 얇은 섬유 상들이 많이 늘어난 것을 확인할 수 있다.

3.2. 동물실험

HA/CMC의 멤브레인형 유착방지제에 대하여 유착방지 효과를 알아보기 위한 맹장/복벽 찰과상 모델을 실험하였다. Table 2에는 멤브레인형 유착방지제의 유

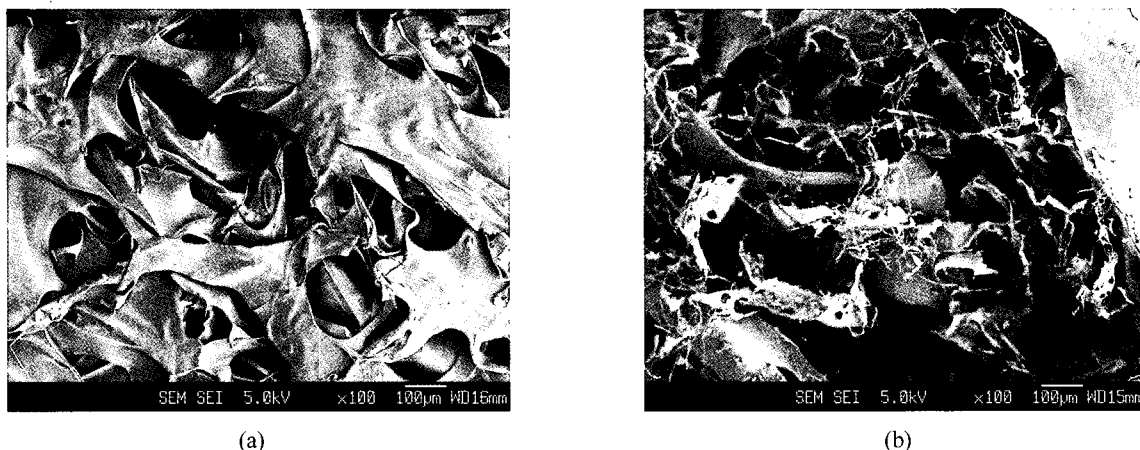


Fig. 2. SEM photographs (a) before and (b) after the degradation of HA/CMC membrane.

Table 2. Incidence on Adhesion Grade in Control and Experimental (HA/CMC Membrane) Groups

POD	Group	No. of Cases	Incidence (%) on adhesion grade					
			0	1	2	3	4	5
2	Control	8	-	12.5	37.5	50	-	-
	HA/CMC	8	50	50	-	-	-	-
4	Control	8	-	12.5	37.5	50	-	-
	HA/CMC	8	62.5	37.5	-	-	-	-
7	Control	8	-	-	-	25	50	25
	HA/CMC	8	12.5	12.5	75	-	-	-
14	Control	10	-	-	-	-	20	80
	HA/CMC	10	30	10	10	20	30	-
21	Control	10	-	-	-	-	-	100
	HA/CMC	10	40	-	30	20	10	-
28	Control	10	-	-	-	20	40	40
	HA/CMC	10	30	20	10	20	-	20

착정도에 따른 개체수 및 유착정도별 발생율을 나타내었다. 실험 결과 2일 경과 후에 대조군(n=8)에서는 유착정도 3인 경우가 50%로 가장 많았으며 유착정도 2가 37.5%, 1이 12.5%였다. 반면 멤브레인형 유착방지제를 사용한 경우(n=8)에서는 2일째에 유착정도 0과 1이 각각 50%였다. 또한 4일째의 결과에서는 대조군(n=8)이 유착정도 1, 2, 3인 경우가 각각 12.5%, 37.5%, 50%였으며, 0인 경우는 없는데 반하여, 실험군(n=8)에서는 유착정도 0과 1이 각각 62.5%, 37.5% 발생하여 여전히 유착이 발생하지 않은 개체수가 많다는 것을 알 수 있었다. 수술 후 7일째에는 대조군(n=8)의 대부분이 유착정도 3, 4, 5인 것으로 나왔으나, 실험군

에서는 유착정도 1, 2, 3에 분포되어 있었다. 따라서 유착의 발생이 2, 4일 사이에 시작되어 7일째에는 유착의 정도가 크게 심화되는 것을 알 수 있다. 수술 후 14일째에도 이러한 경향이 유지되었으며, 즉 대조군(n=10)은 유착정도 4에 20%, 5에 80%를 나타내어 수술 7일 이후에도 유착정도가 약간 더 심화되었음을 나타내었다. 반면, 이 시기에 실험군(n=10)에서는 유착정도가 0인 경우가 30% 있었으며, 유착정도 1, 2, 3, 4에서 각각 10%, 10%, 20%, 30%를 나타내었다. 21일째에 대조군(n=10)은 유착정도가 5를 나타낸 데 반하여, 실험군(n=10)에서는 유착정도 0인 경우가 40%, 유착정도 2, 3, 4인 경우 각각 30%, 20%, 10%를 나타내었

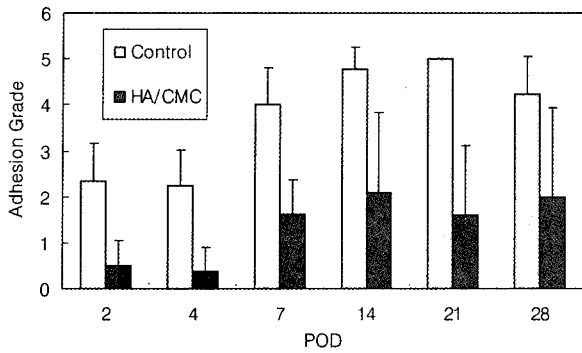


Fig. 3. Comparison of adhesion grade as measured on POD 2, 4, 7, 14, 21, and 28. HA/CMC group was found to have significantly reduced adhesion grade when compared with control.

다. 28일째에는 대조군에서 다소 유착정도가 완화되어 유착정도 3, 4, 5가 각각 20%, 40%, 40%를 나타내었으며, 실험군에서는 유착정도가 그 전과 유사한 수준으로 유지되고 있었다. 이러한 실험 결과는 유착의 발생 과정에서 설명되고 있는 초기의 7일간의 기간에 유착이 생성되고 이후에는 발생한 유착의 고정화 과정이 진행된다는 설명과 잘 부합되고 있다. 따라서 유착을 효과적으로 방지하기 위해서는 7일 정도의 유착을 막아주는 분리장벽으로써의 역할이 중요하다는 것을 보여주고 있다.

유착정도를 평균으로 나타내면(Fig. 3 참조), 대조군이 2일째와 4일째에 평균 2.4 정도를 나타낸 데 비하여 실험군인 멤브레인형 유착방지제는 각각 평균 0.5

와 평균 0.4 정도를 나타내어 초기에 작게 나타났다. 또한 7일째와 14일째에는 유착정도가 급격히 증가하여 대조군에서는 각각 평균 4.0, 4.8을 나타냈으며, 실험군에서는 각각 평균 1.6, 2.1을 나타내었다. 수술 21일째와 28일째에는 유착정도가 약간 증가하거나 혹은 다소 감소하는 경향을 나타내었으며, 즉 대조군에서는 각각 평균 5.0, 4.2를 나타내었고, 실험군에서는 평균 1.6, 2.0을 나타내었다. 전체 기간 중에서는 14일째 혹은 21일째에서 가장 큰 값을 나타내었으나 14일째 이후에는 그 증가가 크지 않으며, 실험군에서는 오히려 다소 감소하였다.

HA/CMC 멤브레인형 유착방지제의 유착세기에 따른 개체수를 Table 3에 나타내었다. 유착세기의 경우를 보면, 수술 후 2일째에 대조군(n=8)에서는 유착세기가 1과 2에 각각 37.5%, 62.5%였으며, 실험군(n=8)에서는 유착세기 0과 1에서 각각 50%이었다. 수술 후 4일째에도 이러한 경향은 유사하게 나타났다. 수술 7일째의 경우 대조군(n=8)은 유착세기 2, 3, 4에 각각 50%, 25%, 5%로 나타났으며, 실험(n=8)군은 유착세기 0, 1, 2, 3에 각각 12.5%, 50%, 25%, 12.5%를 나타내었다. 14일째에는 대조군(n=10)이 유착세기 3과 4에 대부분 존재하나, 실험군에서는 10마리 중 30%는 유착세기 0을 나타내었다. 수술 21일째와 28일째는 유착정도에서 나타난 경향과 유사하였다.

유착세기의 평균을 살펴보면 전체적으로 유착정도와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 4 참조). 대조군이

Table 3. Incidence on Adhesion Strength in Control and Experimental (HA/CMC Membrane) Groups

POD	Group	No. of cases	Incidence (%) on adhesion grade				
			0	1	2	3	4
2	Control	8	-	37.5	62.5	-	-
	HA/CMC	8	50	50	-	-	-
4	Control	8	-	62.5	37.5	-	-
	HA/CMC	8	62.5	37.5	-	-	-
7	Control	8	-	-	50	25	25
	HA/CMC	8	12.5	50	25	12.5	-
14	Control	10	-	-	-	20	80
	HA/CMC	10	30	20	10	10	30
21	Control	10	-	-	-	-	100
	HA/CMC	10	40	30	-	30	-
28	Control	10	-	-	20	40	40
	HA/CMC	10	30	30	10	10	20

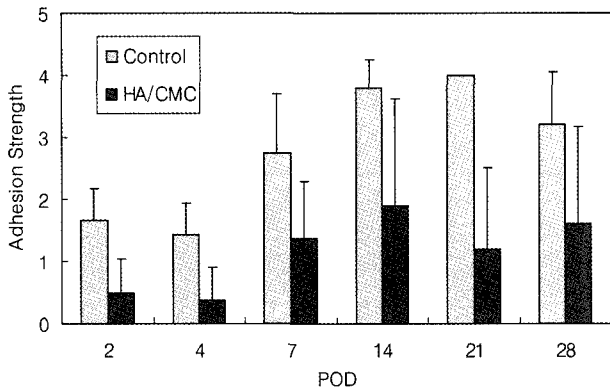


Fig. 4. Comparison of adhesion strength as measured on POD 2, 4, 7, 14, 21, and 28. HA/CMC group was found to have significantly reduced adhesion strength in comparison with control.

2일째와 4일째에 평균 1.6, 1.4 정도를 나타낸 데 비하여 실험군인 멤브레인형 유착방지제는 각각 평균 0.5, 0.4를 나타내어 대조군에 비해 확연히 작은 값을 나타내었다. 7일째와 14일째에는 급격히 증가하여 대조군에서 각각 평균 2.8, 3.8을 나타내었으며, 실험군에서는 각각 평균 1.4, 1.9를 나타내었다. 또한 21일째와 28일째에는 대조군이 각각 평균 4.0, 3.2를 나타내었으며, 실험군의 경우 각각 평균 1.2, 1.6을 나타내었다. 즉 유착정도와 마찬가지로 4일 이후 14일까지는 유착세기가 크게 증가하고 있으며, 14일 이후에는 약간의 증가 혹은 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 대조군과 실험군에서 마찬가지로 나타내었으나, 실험군은 대조군

에 비하여 유착세기 평균 값이 2 정도 차이 나도록 현저하게 작은 값을 나타내어 유착방지 효과가 크다는 것을 알 수 있었다.

HA/CMC 멤브레인형 유착방지제의 유착면적에 따른 개체수를 Table 4에 나타내었다. 유착면적의 경우는 6단계로 분류하였으며, 이는 수술 초기 유착의 유도를 위하여 만든 찰과상의 크기 2 cm²를 기준으로 나누었다. 유착면적 2 cm² 이상에서는 이미 원래의 찰과상 크기를 벗어난 것이므로 2단계로만 분류하였으며, 그 이하에서는 4단계로 분류하여 의미를 더 두고자 하였다. 즉 0~0.5 cm²(0.5로 표시), 0.5~1 cm²(1로 표시), 1~1.5 cm²(1.5로 표시), 1.5~2 cm²(2로 표시), 2~3 cm²(3으로 표시), 3 cm² 이상(3 이상으로 표시)으로 분류하였다. 수술 2일째에 대조군(n=8)은 1과 1.5에서 각각 37.5%씩 보였으나, 실험군(n=8)은 모두 0.5 이하였다. 수술 7일째까지도 실험군(n=8)은 실험동물 모두 유착면적이 0.5 이하였으나, 대조군(n=8)은 유착면적 1.5와 2에 각각 50%, 25%를 나타내어 유착면적이 계속 증가하는 경향을 나타내었다. 수술 14일째에는 대조군(n=10)에서 유착면적 2, 3, 3 이상이 30%, 20%, 10%를 나타내었으나, 실험군(n=10)에서는 유착면적 0.5와 1에 각각 70%, 30%를 나타내었다. 수술 후 21일과 28일째에는 대조군에서 유착면적이 14일째에 비해 감소하는 경향을 나타내었으며, 실험군에서는 앞서서와 마찬가지로 대부분 유착면적 0.5와 1 이하를 나타내었다.

Table 4. Incidence on Adhesion Area in Control and Experimental (HA/CMC Membrane) Groups

POD	Group	No. of cases	Incidence (%) on adhesion area					
			0.5	1	1.5	2	3	> 3
2	Control	8	25	37.5	37.5	-	-	-
	HA/CMC	8	100	-	-	-	-	-
4	Control	8	12.5	62.55	12.5	12.5	-	-
	HA/CMC	8	100	-	-	-	-	-
7	Control	8	25	-	50	25	-	-
	HA/CMC	8	100	-	-	-	-	-
14	Control	10	-	20	20	30	20	10
	HA/CMC	10	70	30	-	-	-	-
21	Control	10	-	40	20	30	10	-
	HA/CMC	10	80	20	-	-	-	-
28	Control	10	10	50	30	10	-	-
	HA/CMC	10	70	30	-	-	-	-

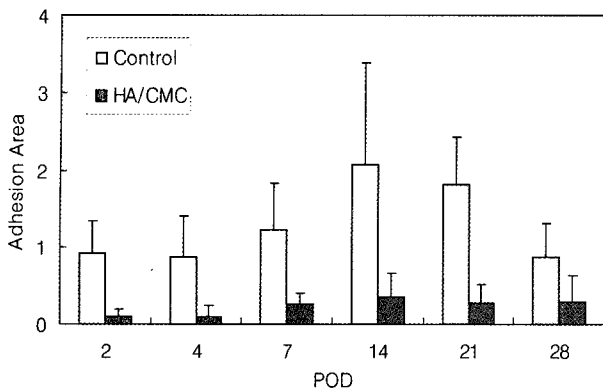


Fig. 5. Comparison of adhesion area as measured on POD 2, 4, 7, 14, 21, and 28. HA/CMC group was found to have significantly reduced adhesion area when compared with control.

유착면적의 평균에 있어서는(Fig. 5 참조) 초기 수술 후 2일째와 4일째에는 대조군에서 각각 평균 0.9, 0.8 cm²을 나타내었으며, 실험군에서는 각각 평균 0.1 cm²를 나타내었다. 또한 7일 째와 14일째에 대조군은 유착면적이 각각 평균 1.2, 2.0 cm²를 나타내었고, 실험군에서는 각각 평균 0.3, 0.2를 나타내었다. 수술 21일째와 28일째에는 대조군에서 유착면적이 각각 1.8, 0.8 cm²를 나타내었으며, 실험군에는 각각 평균 0.3 cm² 정도를 나타내었다. 대조군의 경우 4일째까지는 유착면적이 일정하게 유지되다가 4일 이후 시간의 경과에 따라 증가 경향을 나타내었으며 유착면적이 14일째에 최고 값이 되었다가 이후 감소하였다. 반면 멤브레인형 유착방지제를 사용한 실험군에서는 14일까지 다소 증가경향을 보여주긴 하였지만 그 값이 모두 0.5 cm² 이하로써, 변화가 매우 작으며, 이는 전체 실험기간인 28일 동안 큰 변화 없이 유사하였다. 따라서 유착정도, 유착세기에서와 마찬가지로 유착면적에서도 실험군이 대조군에 비해 크게 낮은 값을 나타내었다. 대조군의

경우 유착정도와 유착세기가 14일 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었으며, 유착면적은 비교적 크게 감소하였다. 따라서 14일 이후 유착이 일부 풀어지는 것으로 보이지만 심하게 유착된 부분은 여전히 분리가 되지 않으며, 이는 계속하여 영구 유착으로 고착화될 가능성을 보여주는 것이다. 실험군에서도 유착정도와 유착세기가 14일까지 증가하다 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 대조군에 비해 현저히 낮은 값을 나타내었다. 더욱이 유착면적은 전체 실험기간인 28일 동안 0.5 cm² 이하를 나타내어 유착의 크기도 현저하게 작다는 것을 알 수 있었다. 따라서 향후 유착이 영구 유착으로 남지 않고 자연적으로 분리될 가능성이 대조군에 비하여 훨씬 크다고 여겨진다.

한편, 대조군에서의 평균값과 실험군에서의 평균값에 대한 P-value를 Table 5에 나타내었다. 거의 대부분에서 0.05 이하의 값을 나타내어 이 결과가 통계적으로 유의함을 알 수 있었다.

4. 고 찰

유착은 외과, 산부인과, 정형외과 및 신경외과의 수술 등에서 광범위하게 보고되고 있는 일반적인 수술 후유증이다. 유착의 발달은 수술 후 발생한 삼출물 중 혈액의 응고과정에서 생기는 섬유소에 의해 시작된다 [14]. 이 후 몇 일 간 여러 가지 세포 인자들이 섬유소 모체에 침투해 들어가게 되고, 이후 대식세포, 섬유모세포, 거대세포를 포함하는 혈관육아조직으로 대체된다. 수술 후 4일이 경과하면 대부분의 섬유소는 없어지고 더 많은 섬유모세포와 교원질이 형성된다. 5일에서 10일간 섬유모세포는 유착 내에서 배양되어 2주 후에는 주로 섬유모세포들이 존재한다. 1, 2 개월 후에는 교원질섬유가 불연속적인 다발로 조직화된다. 이러한

Table 5. P-values Versus Control Group by Student's t-test

	POD	P-values		
		Adhesion grade	Adhesion strength	Adhesion area
HA/CMC	2	1.321E-03	1.657E-03	3.889E-03
	4	8.317E-07	3.079E-04	1.913E-05
	7	3.323E-03	5.592E-02	5.021E-02
	14	8.185E-04	6.960E-03	1.339E-09
	21	5.417E-05	8.602E-05	1.059E-05
	28	6.110E-03	1.313E-02	5.270E-03

유착기전에 근거하여 유착을 방지하는 방법이 제안되었는데 크게 4 가지로 분류될 수 있다. 그 하나는 미세수술 기법을 이용하여 수술 시 손상을 최소화하는 것이다. 두 번째로는 스테로이드 및 항염제를 투여하여 염증을 감소시키는 방법이 있다[15]. 그리고 세 번째로는 tissue-plasminogen activator (t-PA)의 활성을 증가시켜 혈전의 주성분인 피브리린 분해를 촉진시키는 방법이 있다. 마지막으로 최근에는 상처 면을 주변조직과 분리시키기 위하여 물리적 장벽을 사용하는 것이다 [16]. 마지막 방법의 경우 조직의 상처가 치유되고 유착이 발생하는 초기의 5~7일 동안 두 장기 혹은 조직 사이에 장벽으로 작용하여 유착이 형성되는 것을 막아주고, 상처 치유가 끝난 후에는 분해 혹은 흡수되어 자연적으로 제거되어야 한다. 따라서 유착방지제는 인체에 삽입되는 재료이므로 생체적합성이 우수하여 염증의 발생을 유도하지 않아야 하며, 생분해 속도가 조절되어 초기의 혈전 형성 및 세포의 침투 기간 동안 장벽 역할을 수행해야 한다.

현재까지 이러한 물리적 장벽 역할을 하는 유착방지제로는 용액 혹은 젤, 필름, 직물 및 멤브레인 형태가 알려져 있다. 용액형 유착방지제는 일반적으로 분해, 흡수가 빠르고 여러 가지 다른 이유로 충분한 역할을 수행하지 못하는 것으로 알려져 있다. 용액형 장벽의 하나로 lactated Ringer 용액, phosphate buffered saline, 일반적인 saline 용액 등이 수술 후 사용된 보고가 있다. 그러나 이러한 용액의 동물실험에서는 혼동된 결과를 나타내었으며[17,18], 이는 용액의 물과 염류들이 24시간 이내에 빠른 속도로 전부 흡수되어 버리기 때문이다[19]. 한편 용액형의 다른 종류로는 수용성 고분자 용액을 제조하여 사용하는 경우가 있으며, 이러한 예로는 32% dextran 70 용액[20], 10% dextran 40 용액[21], heparin[17], CMC[22], HA[23], chondroitin sulphate[24] 등의 용액이 사용된바 있다. Dextran 용액의 경우 결과가 일정하지 않고 혼동된 결과를 나타내었으며[18], 또한 이 용액은 *in vitro*에서 박테리아와 곰팡이 등의 증식을 향상시키는 것으로 나타났다[25]. Heparin의 경우 혈전 형성을 막아주긴 하지만 유착형성을 막아주진 못한다. 더욱이 heparin은 전신적으로 작용할 경우 출혈의 위험이 있다. CMC와 HA 용액을 사용한 경우에서 다른 재료의 용액형 보다 유착방지 효과가 우수한 것으로 나타났으며, CMC는 dextran에 비하여 항원성이 낮고 박테리아 성장을 그다지 증가시

키지 않는 것으로 보고되었다. 이러한 결과는 본 연구팀의 선행 연구에서도 입증된바 있다[12].

고체 형태의 유착방지제로는 Teflon 쉬트, HA/CMC의 투명 필름(Seprafilm, Genzyme Biosurgery) 및 산화재생 셀룰로오스의 직물(Interceed, Johnson & Johnson)이 사용되고 있으며, 상처조직과 주변 조직 사이에서 가로막이 역할을 함으로써 유착을 방지한다. 용액형의 경우 특정한 형태 없이 액체상태로 녹아져 있으므로 수술부위에 집중되지 못하고 복강 내에 전체적으로 퍼져 있으며, 중력의 작용에 의해 아래쪽에 고이게 된다. 또한 용액형은 가교되지 않은 고분자를 사용하기 때문에 쉽게 분해, 흡수되는 것으로 알려져 있다. 반면, 고체형은 수술 부위에 고정되어 존재할 수 있으므로 유착방지 효과가 액체형 보다 우수한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 유착방지용 재료 중에서 우수한 유착방지 혹은 감소 특성을 나타낸다고 알려진 sodium carboxymethyl cellulose (CMC)와 sodium hyaluronate (HA)[26-29]를 이용하여 멤브레인 형태의 유착방지제를 제조하여, 쥐의 맹장/복벽 찰과상 모델에서 유착방지 효과를 확인하고자 하였다. HA/CMC 멤브레인은 동결건조 방법으로 제조하여 다공성 구조를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 동물실험 결과 대조군에 비하여 유착정도, 유착세기 및 유착 면적에서 통계적으로 유의한 유착방지 특성을 나타내었다. 대조군의 경우 유착은 초기에는 약하게 형성되나 시간이 경과함에 따라 유착이 더 강하고 넓게 형성되고 있음을 보여 주었다. 또한 초기 4일까지는 유착정도 및 유착세기가 약하게 유지되나 그 이후 14일까지 크게 증가하는 것으로 나타났다. 실험군에서는 초기에 효과적으로 유착을 격리하여 낮은 유착정도, 유착세기를 나타내며, 시간이 경과하여도 이런 경향이 계속 유지되고 있다. 즉 수술 후 두 장기 혹은 조직을 분리시켜 유지함으로써 유착 발생 초기에 방지하는 것이 중요하다는 것을 알 수 있다.

이러한 유착방지 효과는 우선 앞서 언급되었던 다른 고체형 유착방지제처럼 수술에 의한 창상 후 유착의 형성기간 동안 물리적 장벽으로써 작용하기 때문인 것으로 보인다. 일반적으로 다공성 멤브레인 구조는 조직공학의 스케폴드로 이용되고 있으며, 이 경우 기공의 크기를 세포의 침투가 가능하고 대사 산물의 이동이 용이하도록 충분히 크게 해 주어야 하고, 이 기공

들은 서로 연결된 상태 즉 ‘닫힌’ 상태가 아닌 ‘열린’ 구조를 가져야 한다. 또한 재질은 생분해성이며 세포의 부착이 용이한 재질이어야 한다. 그러나 그와는 달리 유착방지제에서는 구조나 재질 면에서 세포의 부착이나 침투가 일어나지 않도록 해야 하며, 유착이 진행될 수 있는 일정 기간 동안 장벽으로써 유지되어야 한다. 본 연구에 사용된 멤브레인 구조의 유착방지제는 다공률이 56% 정도로써 일반적으로 조직공학용으로 사용하는 스키펴드에 비하여 낮은 다공성을 나타낸다. 물론 현재의 다공률이 유착방지에 가장 효과적이라고 볼 수는 없으며 어느 정도가 효과적인지에 대하여는 더 연구가 필요할 것으로 보인다.

한편 본 연구에서 제조된 유착방지제는 멤브레인 구조이긴 하나, 여기에 사용된 재료인 HA와 CMC는 친수성 고분자이며 나트륨 염과 결합되어 있다. 따라서 HA와 CMC는 물을 빠르게 흡수하고 해리되어 음이온을 띠게 된다. 이들 음이온 고분자는 세포의 부착을 방해하는 특성을 지니고 있으며, 이는 세포의 표면이 음이온으로 인하여 반발력을 나타내게 되기 때문이다. 또한 멤브레인 구조는 필름이나 직물보다 부피가 크고 두껍게 만들어질 수 있으며, 이 경우 두 장기 혹은 조직 사이를 충분히 벌여줄 수 있게 된다. 즉 단백질 혹은 세포의 부착을 막아 줄 수 있고, 세포의 침투가 어려운 상황에서 거리도 충분히 벌여줄 수 있으므로 효과적으로 유착을 방지할 수 있다.

5. 결론

본 연구에서는 유착방지 역할을 위하여 HA/CMC 멤브레인을 제조하였으며, 쥐의 맹장/복벽 찰과상 모델에 적용하였다. 적용 결과 유착방지 효과가 매우 우수하였으며, 이러한 유착방지 효과는 사용한 재료의 음이온 특성과 멤브레인 자체의 물리적 장벽으로써의 역할에 기인한 것이다. 향후 추가적인 연구를 통하여 유착방지 효과가 우수한 제품이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 벤처 및 중소기업기술개발지원 프로그램(02-PJ1-PG11-VN01-SV03-0054)의 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. N. F. Ray, W. G. Denton, M. Thamer, S. C. Henderson, and S. Perry, "Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the U.S. in 1994", *J. Am. Coll. Surg.*, **186**(1), 1 (1998).
2. H. van Goor, "Morbidity and mortality of inadvertent enterotomy during an adhesiotomy", *British Journal of Surgery*, **87**, 467 (2000).
3. H. J. Chung, M. J. Cosenza, R. Rahbar, and R. B. Metson, "Mitomycin C for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: A randomized, controlled study", *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **126**, 468 (2002).
4. H. H. Ramadan, "Surgical causes of failure in endoscopic sinus surgery", *Laryngoscope*, **109**, 27 (1999).
5. J. R. von Kurman and T. M. Mazur, "Benign disease of the endometrium", *Blaustein's pathology of the female genital tract*, pp. 315-316, Springer, Berlin (1987).
6. N. F. Ray, J. W. Jr. Larsen, R. J. Stillman, and R. J. Jacobs, "Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988", *Surg. Gynecol. Obstet.*, **176**, 271 (1993).
7. K. Falk, P. Bjorquist, M. Stromqvist, and L. Holmdahl, "Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1", *British Journal of Surgery*, **88**, 286 (2001).
8. J. W. Burns, M. J. Colt, L. S. Burgess, and K. C. Skinner, "Preclinical Evaluation of Seprafilm™ Bioresorbable Membrane", *Eur. J. Surg. Suppl.*, **577**, 40 (1997).
9. T. E. Elkins, F. W. Ling, and R. A. Ahokas, "Adhesion prevention by solutions of sodium carboxymethylcellulose in the rat Parts I & II", *Fertil. Steril.*, **41**, 926 (1984).
10. C. M. Fredericks, L. Kotry, G. Holtz, A. H. Askalani, and G. I. Serour, "Adhesion prevention in the rabbit with sodium carboxymethylcellulose solutions", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **155**, 667 (1986).

11. M. P. Diamond, "Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoating with Sepracoat (HAL-C) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study. The Sepracoat Adhesion Study Group.", *Fertil. Steril.*, **69**(6), 1067 (1998).
12. S. H. Shim, Y. W. Lee, Y. M. Lee, Y. H. Oh, S. W. Kwon, J. H. Kim, and S. K. Sohn, "Evaluation of resorbable materials for preventing surgical adhesion on rat experiment", *J. Kor. Surg. Soc.*, **63**(3), 179 (2002).
13. A. Vlahos, P. Yu, C. E. Lucas, and A. M. Ledgerwood, "Effect of a composite membrane of chitosan and Poloxamer gel on postoperative adhesive interactions", *The American Surgeon*, **67**, 15 (2001).
14. D. A. Grainger, "Incidence and causes of pelvic adhesions", *Infert. Reprod. Med. Clin. North Am.*, **5**(3), 391 (1994).
15. K. E. Rodgers, "Late peritoneal response to infection and injury: Adhesion formation", *Sepsis*, **3**, 317 (1999).
16. E. S. Harris, R. F. Morgan, and G. T. Rodeheaver, "Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents", *Surgery*, **117**, 663 (1995).
17. R. P. S. Jansen, "Failure of peritoneal irrigation with heparin during pelvic operations upon young women to reduce adhesion", *Surg. Gynecol. Obstet.*, **166**, 154 (1988).
18. Adhesion Study Group, "Reduction of postoperative pelvic adhesions with intraperitoneal 32% dextran 70: A prospective, randomized clinical trial", *Fertil. Steril.*, **40**, 612 (1983).
19. J. R. Pappenheimer, "Passage of molecules through capillary walls", *Physiol. Rev.*, **33**, 387 (1953).
20. J. Rozga, B. Ahren, and S. Bengmark, "Prevention of adhesions by high molecular weight dextran in rats; Re-evaluation in nine experiments", *Acta Chir. Scand.*, **156**, 763 (1990).
21. W. A. Polishuk and B. Bercovici, "Intraperitoneal low molecular weight dextran in tubal surgery", *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, **78**, 724 (1971).
22. H. D. Moll, J. Schumacher, and J. C. Wright, "Evaluation of sodium carboxymethylcellulose for prevention of adhesions after uterine trauma in ewes", *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 1454 (1992).
23. B. Urman, V. Gomel, and N. Jetha, "Effect of hyaluronic acid on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat model", *Fertil. Steril.*, **56**, 563 (1991).
24. G. Oelsner, R. A. Graebe, S. B. Pan, F. P. Haseltine, E. R. Barnea, H. Fakih, and A. H. DeCherney, "Chondroitin sulphate: A new intraperitoneal treatment for postoperative adhesion prevention in the rabbit", *J. Reprod. Med.*, **32**, 812 (1987).
25. I. R. King, "Candida albicans pelvic abscess associated with the use of 32% dextran-70 in conservative pelvic surgery", *Fertil. Steril.*, **51**, 1050 (1989).
26. J. M. Becker, M. T. Dayton, V. W. Fazio, D. E. Beck, S. J. Stryker, S. D. Wexner, B. G. Wolff, P. L. Roberts, L. E. Smith, S. A. Sweeney, and M. Moore, "Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study", *J. Am. Coll. Surg.*, **183**, 297 (1996).
27. P. A. D. Iaco, M. Stefanetti, D. Pressato, S. Piana, M. Don, A. Pavesio, and L. Bovicelli, "A novel hyaluronan-based gel in laparoscopic adhesion prevention: preclinical evaluation in an animal model", *Fertil. Steril.*, **69**(2), 318 (1998).
28. A. M. Ghellai, A. F. Stucchi, D. F. Lynch, K. C. Skinner, M. F. Colt, and J. M. Becker, "Role of a hyaluronate-based membrane in the prevention of peritonitis-induced adhesions", *J. Gastrointest. Surg.*, **4**, 310 (2000).
29. K. E. Greenawalt, T. J. Butler, E. A. Rowe, A. C. Finneral, D. S. Garlick, and J. W. Burns, "Evaluation of sepramesh biosurgical composite in a rabbit hernia repair model", *J. Surg. Res.*, **94**, 92 (2000).