

Rat에서 Carboxymethylchitosan Fabric과 Low Molecular Weight Heparin의 자궁각 유착 형성 방지 상승효과

권영삼* · 장광호¹

경북대학교 수의과대학, *위스콘신-매디슨 대학교 수의과대학

(게재승인: 2008년 6월 11일)

Synergistic Effects of Carboxymethylchitosan Fabric and Low Molecular Weight Heparin in Reducing Adhesion Formation in the Rat Uterine Horn Model

Young-Sam Kwon* and Kwang-Ho Jang¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 701-702, Korea

*School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, WI 53706-1102, USA

Abstract : This study was performed to compare the efficacy of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) with that of the combination of CMCF and low molecular weight heparin (LMWH) for the prevention of postoperative uterine adhesion in rats. Adhesions were induced by suturing both the uterine serosa and peritoneum abraded until petechial bleeding occurred. Fourteen days later, adhesions were evaluated clinically and histopathologically. The mean tensile strength was significantly decreased in the CMCF and CMCF+LMWH groups compared to that of control group, and the CMCF+LMWH group had the lowest tensile strength. The distance of adhesion site was highest in the CMCF group and slightly decreased in the CMCF+LMWH group comparing to that of control group. The inflammatory cell infiltration and neovascularization of the CMCF group were significantly lower than those of the control group. It was observed that the damage at intestinal serosa was significantly decreased in the CMCF+LMWH group comparing to that of control group. Therefore, it was concluded that CMCF and LMWH may be useful to prevent postoperative uterine adhesion in rats.

Key words : carboxymethylchitosan fabric, low molecular weight heparin, adhesion.

서 론

복강유착은 일반 복강 수술 후 67-93%, 산과 수술 후 97% 정도의 발생율을 나타낸다(19,20,28). 유착으로 인한 부작용으로 골반 부위의 통증, 장 폐색 및 불임의 증상이 나타나며, 이로 인해 환자의 임상 경과에 악영향을 끼치고 경제적 부담을 증가시키기도 한다(10).

수술 후 유착 형성을 방지하기 위해 조직 손상의 최소화, fibrin 제거 및 섬유모세포의 증식 억제를 목표로 하는 몇 가지 접근 방법이 사용되었다. 이러한 목적으로 미세 수술의 기준이 개발되었고, 글루코코르티코이드 제제(24), 비스테로이드성 항염증약(12), 크리스탈로이드 용액(14) 및 헤파린(1) 등의

많은 방지제들이 소개되었다. 그 이후에 carboxymethylcellulose의 Interceed® (Johnson & Johnson Medical Inc., USA) (6,8)와 sodium hyaluronate와 carboxymethylcellulose의 합제인 Seprafilm® (Genzyme Corp., USA) (5,9) 등의 흡수성 막(membrane)형태의 유착방지제의 적용이 임상에서 사용되고 있다.

Carboxymethylchitosan은 생체 적합성 고분자로서 점성과 탄력성을 가지며, 생체 내 비독성이고 복강 내 유착 방지 효과가 증명되었다(15,17). Low molecular weight heparin (LMWH)은 기존의 헤파린 보다 항혈전능력과 생체적합성이 높고 생물학적 반감기가 길다고 알려져 있으며 유착방지 효과도 우수하다고 알려져 있다 (16,26).

따라서, 본 연구는 랫드의 자궁각 유착 유도 모델을 이용하여 carboxymethylchitosan의 흡수성 막 형태인 carboxymethylchitosan fabric (CMCF)을 단독 적용했을 경우와 LMWH와 병용 적용했을 때의 유착방지 효과를 알아보고자 한다.

¹Corresponding author.
E-mail : khojang@knu.ac.kr

재료 및 방법

Carboxymethylchitosan을 직물(fabric) 구조로 변형한 CMCF (캠바이오, 한국)와 시판용 주사제인 LMWH (Fraxiparine®, Sanofi Korea Co.)를 실험에 이용하였다.

실험동물은 체중 230~250 g의 SD rat 45마리로 물과 고형사료를 자유 급여하고, 케이지당 3마리씩 사육하였다. 각 군당 15마리를 사용하여 마취 후 개복하여 유착 유발 후 아무런 투여를 하지 않은 대조군, 유착 유발 후 CMCF를 적용한 군(CMCF 군), 유착 유발 부위에 CMCF를 적용하고 복강 폐쇄 직전 LMWH를 복강 내 투여한 군(CMCF+LMWH 군)의 세 군으로 나누었다.

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 우측 자궁각을 노출하고 중앙부위를 1 cm 크기로 점상출혈이 나타날 때까지 수술도로 소파하였다. 복벽과 자궁각 장막 부위에 동일한 조건으로 유착을 유도하기 위해 자궁각 소파 부위의 양단과 복벽을 6-0 polypropylene suture (Prolene®, Ethicon, UK)로 고정하였다. CMCF 군과 CMCF+LMWH 군에서는 1×1 cm² 크기의 CMCF를 복벽과 자궁각 사이에 적용하여 함께 봉합했다. 복강 폐쇄 직전에 CMCF+LMWH 군에서는 1000 IU의 LMWH를 복강 내 투여하였다. 복강 복막과 근육을 4-0 chromic catgut으로 연속 봉합한 후 4-0 nylon으로 피부를 연속 봉합하여 복강을 폐쇄하였다.

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

유착이 발생한 복벽과 자궁각 장막 근층 사이의 최단 거리를 automated image analysis process (Soft Image System, Germany)로 현미경상에서 측정하였고, 유착부의 조직병리학적 평가를 위해 염증세포 침윤 정도를 유착부위 1 mm² 당 0; 관찰안됨, 1; 30~50개, 2; 50~100개, 3; 100개 이상, 콜라겐 증식은 0; 관찰안됨, 1; 20층 이하, 2; 20~50층, 3; 50층 이상, 자궁각-복벽간 손상 정도는 0; 관찰안됨, 1; 벽층의 손상에 따라 장막층 손상, 2; 근육층의 1/3이하 손상, 3; 근육층 1/3 이상 손상, 혈관신생 정도는 유착부 혈관 수의 따라 0; 관찰안됨, 1; 5 이하, 2; 5~10, 3; 10이상으로 분류하고 점수화하여 관찰했다. 실험 군의 정보를 알리지 않은 채 병리 조직 전문가에 의해서 조직학적 검사와 평가가 실시되었다.

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

결 과

유착부위의 인장강도를 측정한 결과 대조군, CMCF 군, CMCF+LMWH 군에서 각각 1.1 ± 0.26 , 0.8 ± 0.38 , 0.5 ± 0.32 Newton으로 대조군에 비해 나머지 두 군에서 유의적인 변화가 관찰되었다($p < 0.05$, Fig 1).

조직학적 검사결과, 대조군에서 유착이 발생한 복벽과 자궁각 사이의 거리는 182.0 ± 12.34 μm로 나머지 두 군에 비해 가장 밀착되어 있었으며, CMCF 군에서는 1418.3 ± 519.13 μm, CMCF+LMWH 군에서는 184.5 ± 17.60 μm로 CMCF 군에서의 거리가 가장 크게 관찰되었다(Fig 2).

염증세포는 처치군에 비해 대조군에서 많이 침윤되었으며

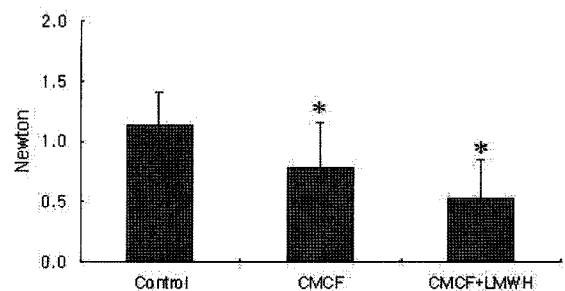


Fig 1. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the tensile strength of adhesion on 14 days after operation. The tensile strength was significantly decreased in the CMCF and CMCF+LMWH groups compared to that of control group, and the CMCF+LMWH group had the lowest tensile strength. *: $p < 0.05$ compared with the control.

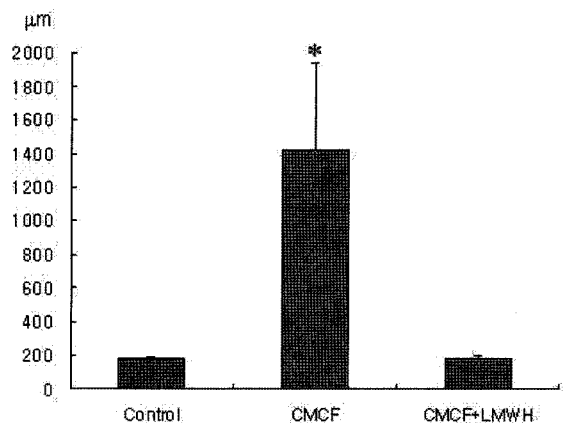


Fig 2. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the distance of adhesion formed between the parietal peritoneum and the uterine serosa. The distance of adhesion site was highest in the CMCF group and slightly decreased in the CMCF+LMWH group comparing to that of control group. *: $p < 0.05$ compared with the control.

처치군들에서는 CMCF+LMWH 군(2.2 ± 0.45), CMCF 군(1.4 ± 0.55)의 순서로 관찰되었고, CMCF 군($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타냈다(Fig 3 and 7).

유착 형성 부위의 콜라겐 형성 정도는 대조군(2.6 ± 0.55), CMCF 군(2.4 ± 0.55), CMCF+LMWH 군(2.2 ± 0.45)의 순서로 관찰되었다(Fig 4).

장점막의 손상 정도는 대조군(2.8 ± 0.45)에서 가장 심하였고 CMCF 군(2.6 ± 0.55), CMCF+LMWH 군(1.6 ± 0.55)의 순서로 낮아졌고, 대조군에 비해 CMCF+LMWH 군에서 유의성 있는 변화가 관찰되었다($p < 0.05$, Fig 5).

유착부위의 혈관신생은 대조군(2.8 ± 0.45), CMCF+LMWH 군(2.4 ± 0.55), CMCF 군(1.6 ± 0.55)의 순서로 관찰되었고, 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 CMCF 군에서 나타났다($p < 0.05$, Fig 6).

고 찰

복강 유착 유도 모델로서는 소장의 일부분에 상처를 주거나,

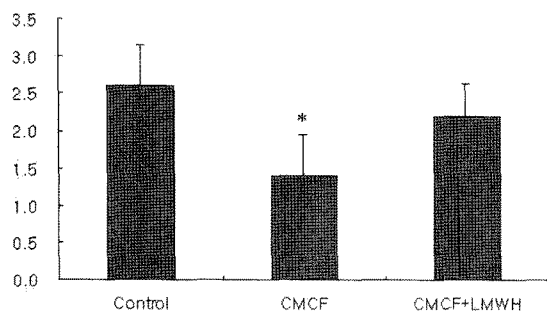


Fig 3. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the inflammatory cell infiltration of adhesion on 14 days after operation. The inflammatory cell infiltration of the CMCF group were significantly lower than that of control group. *: $p < 0.05$ compared with the control.

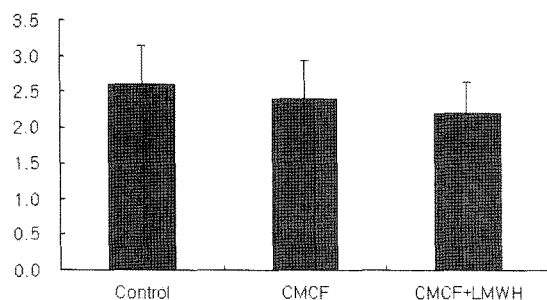


Fig 4. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the collagen hyperplasia of adhesion on 14 days after operation. The collagen hyperplasia was lowest in the CMCF+LMWH group and there was no significant difference.

복강 내 염증을 유발 시켜 복강 전체의 유착을 유도하거나, 자궁각과 복벽에 유착을 유도 하는 방법 등이 널리 이용되고 있다. 복강 유착은 복강 수술과 산과 수술 후 발생하며, 산과 수술 후 나타나는 유착으로 생기는 불임 등의 문제는 환자에게 큰 정신적, 경제적 타격을 주고 있다.

랫트를 이용한 자궁각 유착 유도 모델은 이미 질적 양적으로 기준이 확립된 실험 방법이며, 산과 수술을 모방한 방법으로 유착의 형성이 매우 높고 일정한 형태의 유착을 제공한다(3,13,22,25).

Carboxymethylchitosan은 chitin의 carboxymethylation에 의한 유도체로 수용성이며 생체적합성 고분자로서 점성과 탄력성이 있는 물질이다. 가장 큰 특징은 chitosan과 달리 보습성과 친수성이 우수하다는 점이다. 복강 내 적용하여 유착 형성을 방지한다는 효과가 Kennedy 등(15)에 의해 처음 보고되었다.

LMWH는 기존의 헤파린을 분절 및 정제화한 제제로 부작용이 적고 섬유소 용해 효과가 기존의 헤파린 보다 높고 효과 지속 기간도 더 길다는 것이 여러 연구를 통해 보고되었다(7,10).

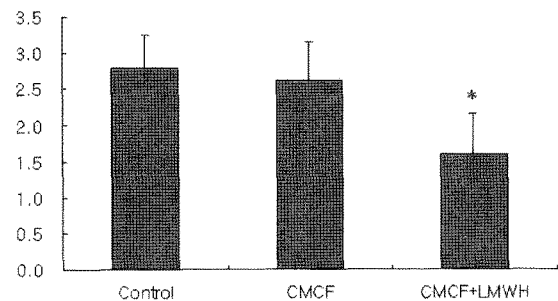


Fig 5. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the damage at uterine serosa of adhesion on 14 days after operation. The damage at intestinal serosa was significantly decreased in the CMCF+LMWH group comparing to that of control group. *: $p < 0.05$ compared with the control.

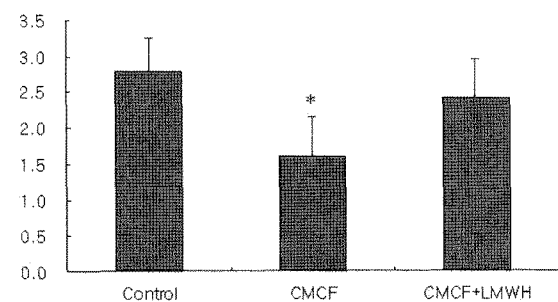


Fig 6. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the neovascularization of adhesion on 14 days after operation. The neovascularization of the CMCF group were significantly lower than that of control group. *: $p < 0.05$ compared with the control.

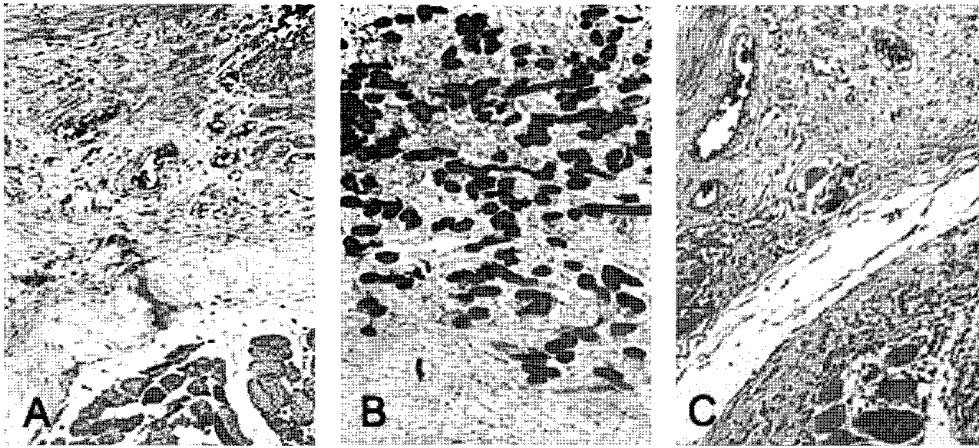


Fig 7. Effect of carboxymethylchitosan fabric (CMCF) and the combination of CMCF with low molecular weight heparin (LMWH) on the intraperitoneal adhesion formation. Biopsy specimens were taken from the adhesion tissue formed between the peritoneum and uterine serosa in the control untreated (A), CMCF (B), and CMCF+LMWH (C) treated rats on 14 days after operation. In the CMCF group, the inflammatory cell infiltration, and neovascularization were significantly lower than the control group. It was observed that the collagen hyperplasia and damage at the uterine serosa were significantly lower in the CMCF+LMWH group than control group (Magnification $\times 200$).

본 연구의 결과, 유착부의 인장강도는 대조군에 비해 CMCF 군과 CMCF+LMWH 군에서 유의적인 감소가 나타났으며, CMCF 군과 CMCF+LMWH 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 이 결과는 Basbug 등(4)이 hyaluronic acid와 기존의 헤파린을 병용 사용하였을 때 보다 LMWH를 병용 사용했을 때에 유착 형성을 감소시켰다는 것과, Sahin 등(23)이 carboxymethylcellulose와 LMWH를 병용 사용했을 때의 유착 형성을 방지했다는 것과 유사하며 LMWH가 기존의 유착 방지제와 병용 사용했을 때 상승효과를 나타낸다는 것을 추측할 수 있다.

랫트의 유착 모델에서 유착방지를 위해서는 방지제가 36 시간 이상 복강 내에 존재하여야 한다고 보고되었다(14). 이러한 이유로 용액성 제제 보다는 흡수시간이 길고 차단 효과가 우수한 흡수성 막(membrane) 형태의 방지제가 개발 되어 연구에 사용되었다. 그러나 그 효과가 아직 확실히 밝혀지지 않았으며 많은 연구가 진행 중이다. 본 연구에서도 carboxymethylchitosan을 기존의 성질을 그대로 가지는 직물구조(fabric)의 형태로 사용하였다.

자궁각 장막과 복벽 사이의 유착 형성부의 두께는 CMCF 군에서 가장 컸고, CMCF+LMWH 군에서는 대조군에 비해 약간 증가했다. 조직학적 검사 결과, CMCF는 유착 형성부위에서 완전히 흡수되지 않았고 잔존하였고, CMCF+LMWH 군에서는 CMCF가 완전히 흡수되었다. 이것은 LMWH가 CMCF의 복강 내 분해 및 흡수를 촉진했다고 추측할 수 있을 것이다. 유착형성 부위의 거리를 측정하는 것은 유착 방지제의 성상에 따라서 유착형성부의 두께가 상이할 수 있음을 알 수 있다.

염증세포 침윤과 혈관신생의 정도는 CMCF 군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이것은 CMCF가 유착 형

성 부위에서 실험기간 동안 서서히 흡수되고 잔존하면서 chitosan이 가지는 항염증 효과(27)를 지속적으로 나타낸 결과라고 생각된다.

콜라겐 증식은 대조군, CMCF 군, CMCF+LMWH 군의 순으로 감소되었고 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 자궁각 장막의 손상 정도는 대조군, CMCF 군, CMCF+LMWH 군의 순으로 감소되었고, CMCF+LMWH 군에서 대조군에 비해 유의적인 감소가 나타났다. 이 결과는 헤파린이 콜라겐 섬유를 생성하는 섬유아세포의 증식을 촉진하는 섬유소의 침착을 감소시키는 섬유소 용해 능력을 가지고, 섬유아세포 증식인자와 결합하여 창상 치유를 촉진한다고 언급한 이전의 보고들(2,11,18,21)과 같이 헤파린의 섬유소 용해 작용과 창상 치유 작용에 의한 것으로 생각된다.

따라서 랫트의 자궁각과 복벽에 유발시킨 유착형성에 있어 CMCF와 LMWH의 병용이 CMCF를 단독 사용했을 때에 비해 방지 효과를 상승시킴을 알 수 있었다. 이 후의 연구로서 CMCF의 복강 내 흡수 속도에 대한 연구와 fabric 형태와 membrane 형태의 유착 방지 효과의 비교 등이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

랫트의 자궁각과 복벽에 복강유착을 유도하여 CMCF와 LMWH를 병용 사용 시에 CMCF를 단독 사용하였을 때 보다 유착 방지 효과를 상승시킴을 알 수 있었다.

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. Andrade-Gordon P, Strickland S. Interaction of heparin with plasminogen activators and plasminogen: effects on the activation of plasminogen. *Biochemistry.* 1986;25: 4033-4040.
 3. Bakkum EA, van Blitterswijk CA, Dalmeijer RA, Trimboos JB. A semiquantitative rat model for intraperitoneal postoperative adhesion formation. *Gynecol Obstet Invest.* 1994; 37: 99-105.
 4. Basbug M, Aygen E, Tayyar M, Kaya E, Narin F, Oktem O. Hyaluronic acid plus heparin for improved efficacy in prevention of adhesion formation in rat uterine horn model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 78: 109-112.
 5. Becker JM, Dayton MT, Fazio VW, Beck DE, Stryker SJ, Wexner SD, Wolff BG, Roberts PL, Smith LE, Sweeney SA, Moore M. Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study. *J Am Coll Surg.* 1996;183: 297-306.
 6. Best CL, Rittenhouse D, Vasquez C, Norng T, Subias E, Sueldo CE. Evaluation of interceed(TC7) for reduction of postoperative adhesions in rabbits. *Fertil Steril.* 1992; 58: 817-820.
 7. Borten M, Seibert CP, Taymor ML. Recurrent anaphylactic reaction to intraperitoneal dextran 75 used for prevention of postsurgical adhesions. *Obstet Gynecol.* 1983; 61: 755-757.
 8. Bothin C. Counteracting postsurgical adhesions--the effect of combining oxidized regenerated cellulose and tissue plasminogen activator. *Int J Fertil Menopausal Stud.* 1995; 40: 102-105.
 9. Burns JW, Skinner K, Colt MJ, Burgess L, Rose R, Diamond MP. A hyaluronate based gel for the prevention of postsurgical adhesions: evaluation in two animal species. *Fertil Steril.* 1996; 66: 814-821.
 10. diZerega GS. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril.* 1994; 61: 219-235.
 11. Freedman MD, Leese P, Prasad R, Hayden D. An evaluation of the biological response to Fraxiparine, (a low molecular weight heparin) in the healthy individual. *J Clin Pharmacol.* 1990; 30: 720-727.
 12. Fukasawa M, Girgis W, diZerega GS. Inhibition of postsurgical adhesions in a standardized rabbit model: II. Intraperitoneal treatment with heparin. *Int J Fertil.* 1991; 36: 296-301.
 13. Golan A, Maymon R, Winograd I, Bukovsky I. Prevention of post-surgical adhesion formation using aspirin in a rodent model: a preliminary report. *Hum Reprod.* 1995; 10: 1797-1800.
 14. 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.
 15. Hill-West JL, Chowdhury SM, Dunn RC, Hubbell JA. Efficacy of a resorbable hydrogel barrier, oxidized regenerated cellulose, and hyaluronic acid in the prevention of ovarian adhesions in a rabbit model. *Fertil Steril.* 1994; 62: 630-634.
 16. Holtz G. Current use of ancillary modalities for adhesion prevention. *Fertil Steril.* 1985; 44: 174-176.
 17. Kennedy R, Costain DJ, McAlister VC, Lee TD. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan. *Surgery.* 1996; 120: 866-870.
 18. Kwon YS, Jang IH. Adhesion prevention in the dog with sodium carboxymethylcellulose and low molecular weight heparin. *Korean J Vet Clin Med.* 1999; 16: 50-56.
 19. 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.
 20. Markwardt F, Klocking HP. Heparin-induced release of plasminogen activator. *Haemostasis.* 1977; 6: 370-374.
 21. Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl.* 1990; 72: 60-63.
 22. Operative Laparoscopy Study Group. Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second-look procedures. *Fertil Steril.* 1991; 55: 700-704.
 23. Orita H, Campeau JD, Gale JA, Nakamura RM, diZerega GS. Differential secretion of plasminogen activator activity by postsurgical activated macrophages. *J Surg Res.* 1986; 41: 569-573.
 24. Reijnen MM, Meis JF, Postma VA, van Goor H. Prevention of intra-abdominal abscesses and adhesions using a hyaluronic acid solution in a rat peritonitis model. *Arch Surg.* 1999; 134: 997-1001.
 25. Sahin Y, Saglam A. Synergistic effects of carboxymethylcellulose and low molecular weight heparin in reducing adhesion formation in the rat uterine horn model. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1994; 73: 70-73.
 26. Sanfilippo JS, Cox JG, Nealon NA, Barrows GH. Comparison of corticosteroid therapy in the prevention of pelvic tissue reaction and adhesion formation. *Int J Fertil.* 1986; 30: 57-61.
 27. Szabo A, Haj M, Waxman I, Eitan A. Evaluation of seprafilm and amniotic membrane as adhesion prophylaxis in mesh repair of abdominal wall hernia in rats. *Eur Surg Res.* 2000; 32: 125-128.
 28. The European Fraxiparin Study (EFS) Group. Comparison of a low molecular weight heparin and unfractionated heparin for the prevention of deep vein thrombosis in patients undergoing abdominal surgery. *Br J Surg.* 1988; 75: 1058-1063.
 29. 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.
 30. Weibel MA, Majno G. Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. A postmortem study. *Am J Surg.* 1973; 126: 345-353.