

가교결합된 히알루론산 필름의 물리적/생물학적 평가 Physical and Biological Evaluations of Cross-linked Hyaluronic Acid Film

박효승¹ · 김아람¹ · 노인섭^{1,2*}

Hyo Seung Park¹, Ah Ram kim¹, and Insup Noh^{1,2*}

¹서울과학기술대학교 화공생명공학과, ²의공학-바이오소재융합 협동과정

¹Department of Chemical and Biomacromolecular Engineering

²Convergence Institute of Biomedical Engineering and Biomaterials,

Seoul National University of Science and Technology 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received October 25, 2013 / Revised November 5, 2013 / Accepted November 7, 2013)

Hyaluronic acid (HA) has been employed as a typical biomaterial in various medical areas such as dermal filler, scaffolds for tissue engineering and drug delivery, and etc. In this report, the HA films were fabricated by controlling the concentrations of 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) as a cross-linking agent, and their physical and biological properties have been evaluated. After swelling in water and dehydration by lyophilization of the cross-linked HA films, their morphologies and swelling behaviors after swelling in water for 24 hrs have been observed with scanning electron microscopy and measured with a microbalance, respectively. After homogenizing the films into microparticles, cell viability of the films was indirectly performed on the particles by covering the films with the HA films. Their cell compatibilities were evaluated by the assays of live & dead, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), bromodeoxyuridine (BrdU) and neutral red, by using extracts of the microparticles of HA films. The HA particles showed excellent cell compatibilities, showing possibilities of its applications as biomaterials.

Key words: Biomaterials, Hyaluronic Acid, Film, Biocompatibility

서 론

히알루론산은 D-glucuronic acid과 D-N-acetylglucosamine 이 결합의 이당류 반복단위를 가진 천연고분자로 잘 알려져 있으며,¹⁻³⁾ 생체 내에서는 세포외기질의 주요 구성성분이고, 인체 내에서 광범위한 생체반응과 구조체로서 중요한 역할을 담당하고 있다. 생물학적 기능측면에서 히알루론산은 세포의 이동, 분화, 세포들 사이의 신호전달 등에 영향을 미쳐 조직의 발달과 재생을 조절하는 것으로 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 구체적으로, 히알루론산은 연골, 피부, 신경, 혈관의 성장 및 분화에 영향을 미치는 세포외기질로 잘 알려져 있다.⁷⁻¹⁶⁾ 이러한 다양한 생물학적 기능을 가진 히알루론산은 생체내의 hyaluronidase효소 및 가수분해에 의해 생체 내에서 분해되는 특징을 가지고 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 이러한 생분해성 기능은 조직재생 공학의 생분해성 생체재료로의 적용가능성을 인정받아, 생체적합성의 공학 재료로서의 다양하게 활용되고 있다. 현재, 히알루론산은 하이드로젤, 필름 타입의 유착방지제, 조직재생공학을 위한 튜브형 혈관 지지체, 성형수술과 상처 치유 관절염 치료를 위한 하이드로젤 등의 다양한 생체재료로 널리 사용되고 있다.¹⁹⁻²¹⁾

생체재료를 이용한 의료기기 제품 중에서 필름 형태는 고분자 가공기술의 발전으로 인하여 다양한 필름형태로 개발되었으며, 최근에는 필름형 생체재료는 생체 내에서의 조직의 손상을 치료하고 필름의 내부에 세포를 집중시킴으로써 조직재생의 효율을 높이는 형태로 연구되어 왔다.²²⁻²⁴⁾ 더 나아가 필름형태의 생체재료는 바이오센서로의 기술로 발전되고 있으며, 필름의 내부에 나노 입자, 약물, 염료 및 효소 등의 내부에 로딩함으로써 생체활성물질의 국소적 전달체로 개발하여 의공학 분야에서의 응용가능성이 높다.²⁵⁻²⁸⁾ 또한 다층으로 제조된 필름의 경우 각 층마다 물성을 조절하거나 외부환경에 변화하여 기능을 더 높일 수 있는 것으로 보고되고 있다.²⁹⁻³⁰⁾

본 연구에서는 히알루론산을 가교결합 시켜 필름을 제조하였으며, 가교제의 비율에 따른 물리화학적 특성 및 생체적합성을 평가하였다. 제조된 히알루론산 필름은 표면 및 내부를 SEM을 이용하여 물리학적 특성 분석과, 물에서의 팽윤성을 평가하였다. 생물학적 특성평가로서는 히알루론산 필름을 입자형태로 전환하여 샘플을 제조한 다음, 히알루론산 입자샘플 표면에 섬유아세포를 접종하여 필름의 생체적합성을 평가하였다. 또한 MTT, BrdU, Neutral red assay 방법을 사용하여 테플론 및 라텍스 대조군에 대하여 샘플의 용출물을 대상으로 생물학적 안전성 평가를 진행하였다.

*책임연락처: insup@seoultech.ac.kr

재료 및 방법

시약 및 재료

Hyaluronic acid (HA) (MW: 575 kDa)는 (주)한미약품으로부터 제공받았다. 1,4-butanediol diglycidyl ether (MW: 202.25 Da)는 Sigma - Aldrich (ST. Louis. MO, USA) 에서 구입하였다. Sodium hydroxide (MW: 40 Da)는 Yakuri Pure Chemical Co. (Japan)에서 구입하였다. 세포배양 배지 FGM-2는 Lonza Co. (Switzerland)로부터 구입하였으며, live & dead viability/cytotoxicity 키트는 Invitrogen Co. (USA)에서 구입하였다. 독성평가 키트인 bromodeoxyuridine (BrdU), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and Neutral Red 는 Sigma-Aldrich (ST. Louis. MO, USA), Roche Co. (Germany) 및 Gibco BRL (Australia)에서 각각 구입하여 사용하였다.

히알루론산 필름 제조

1% NaOH 수용액에 히알루론산을 녹여 7.5%의 농도인 히알루론산 용액을 제조하였다. 제조한 7.5% 히알루론산 용액 대비 가교결합제 BDDE 첨가하여 0.4%, 0.5%, 0.6% (v/v) 혼합용액으로 전환하였다. Syringe를 이용하여 혼합용액을 균일하게 섞어준 후, 폴리에틸렌 몰드(PE mold)에 담아서 24 시간 상온에서 gelation을 진행하였다. 24 시간 혼합시켜 히알루론산 젤을 유도한 다음, 지름 10 mm, 두께 2 mm의 규격을 가진 히알루론산 필름으로 잘라서 샘플을 제조하였다. 제조된 일정 크기의 히알루론산 필름을 2.5 L 수수에 24 시간 마다 세척을 총 3번 진행하여, 72 시간 세척과정을 진행하여 필름을 얻었다.

팽윤성 평가

다양한 농도에서 제조된 히알루론산 필름 (지름 10 mm, 두께 2 mm)을 물에 넣은 다음, 시간에 따른 필름의 팽윤성을 아래와 같은 방법으로 측정하였다(n = 3). 총 24시간동안의 30 ml의 증류수에서의 필름의 질량변화를 측정하였다. 0시간부터 6시간 까지는 1시간 간격으로 측정하였으며, 6시간부터 24시간까지는 6시간 간격으로 질량을 측정하였다. 매 간격마다 30 ml 증류수를 교체하면서 진행하였다. Swelling(%) = (시간당 HA 필름의 무게(g) / 처음 HA 필름의 무게(g)) × 100(%)공식을 사용하여 필름의 팽윤성을 계산하였다.

생체적합성 평가

히알루론산 필름의 생체적합성을 평가하기 위하여 히알루론산 필름을 균질화 하여 입자로 제조한 다음, 입자들에 세포를 로딩하여 *in vitro* 세포배양 평가를 아래와 같이 진행하였다. 균질기(Nissei AM - 03, ACE Homogenizer, Nihonseiki Kaisha, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조된 히알루론산 필름을 10,000 rpm 에서 5분 동안 입자 갈아서 1차 입자화를 유도한 다음, 5 min, 3500 rpm으로 총 5회를 추가적으로 갈아서 얻어진 히알루론산 필름 입자를 냉동고(deep freezer; -80°C)에 넣어서 하루 동안 동결시킨 후, 동결건조기(FD-8508, IL Shin Bio

Base, Korea)를 이용하여 건조를 진행하였다. 입자화된 히알루론산 필름은 오토클레이브(AC-02, JEIO TECH, Korea)를 이용하여 121°C에서 15 분 동안 고압 멸균을 진행하였다.

성인 섬유아세포(Adult Human Dermal Fibroblast; AHDF, passage < 14)를 사용하여 히알루론산 필름의 생체적합성 평가를 진행하였다. 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 FGM-2배지에 첨가한 다음, 세포배양 배지를 각 well당 1 mL로 분주한 후, CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다.

입자화된 히알루론산 필름을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 녹여 200 uL를 24 well plate 에 고르게 분주한 후, 24 시간 동안 상온에 보관하였다. 입자화된 히알루론산 필름 위에 100,000 cells/well의 농도로 세포를 입자화된 필름의 표면에 접종하였다. 섬유아세포가 로딩된 히알루론산 필름의 입자 위에 2차적으로 200 uL의 히알루론산 필름의 입자를 분주하여 섬유아세포가 히알루론산 필름의 내부에서 배양되도록 유도하였다. 그 후, 1 mL의 배지를 넣은 다음, 3일간 *in vitro* 세포배양을 수행하였다.

Live & Dead assay

히알루론산 필름을 균질기로 분쇄하여 얻은 입자형 샘플, 즉, 필름의 내부로 간주함에 섬유아세포를 접종하여 3일간 *in vitro* 배양한 후, Live & Dead assay를 진행하였다. 2 mM ethidium homodimer-1 (EthD-1) stock 용액(1.2 μl)과 4 mM calcein AM solution (0.3 μl)을 멸균된 PBS (600 μl) 용액에 넣고 혼합하였다. 혼합 용액을 200 uL씩 세포 배양된 히알루론산 필름에 분주하여, 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 형광현미경(Leica DMLB, Germany)으로 관찰하였다. 생존한 세포는 녹색, 사멸한 세포는 붉은색으로 관찰하였다.

MTT 평가

히알루론산 필름의 독성평가는 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) 분석방법을 사용하여 수행하였다. MTT 평가는 HA 필름으로부터 72 시간 동안 방출되어 나오는 용출물 1 mL에 대해서 각 100 uL에 대한 독성 분석을 진행하였으며, 양성대조군인 Teflon 과 음성대조군인 Latex에서 방출되어 나오는 용출물에 대한 독성평가 결과를 비교 분석하여 히알루론산 필름의 독성평가를 수행하였다. 20 uL의 MTT 용액을 샘플에 2차 분주하여 4시간 동안 추가적인 세포 배양을 진행하였다. 그 후, 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 570 nm 파장에서 흡광도를 microplate reader 기기(Tecan, Switzerland)를 통해서 세포의 독성을 측정하였다.

Neutral Red (NR) 평가

MTT 평가와 동일한 방법으로 히알루론산 필름, Latex, Teflon 샘플로부터 72시간 동안 용출시켜 얻어진 용출물 배지를 준비하였다. 섬유아세포를 10,000 cell/well의 밀도로 96 well plate 에 접종한 후, 히알루론산 필름에서 72시간동안 용

출된 용출액 1 mL 중 100 μ L을 분주하여 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 *in vitro* 세포배양을 진행하였다. *In vitro* 실험을 진행하고 있는 배양액에 0.33% Neutral Red 용액 100 μ L를 첨가하여 2 시간 동안 추가적인 *in vitro* 배양을 진행하였다. Neutral Red assay 고정액으로 고정과정을 거친 샘플에 대한 washing 을 진행한 후, 용해 용액을 10분 동안 100 μ L/well에 첨가하여 샘플을 얻었다. micro plate reader 기기를 통해 550 nm 파장 및 690 nm의 파장에서 얻어진 참조 피크에 대하여 샘플의 흡광도를 측정하였다.

Bromodeoxyuridine (BrdU) 평가

MTT 평가와 동일한 방법으로 히알루론산 필름, Latex, Teflon을 배지에 72시간 동안 담가 둔 배지로부터 얻어진 용출물의 배지를 준비하였다. 섬유아세포를 10,000 cell/well의 밀도로 96well 에 접종한 뒤에 히알루론산 필름에서 용출된 용출액 1 mL 중 100 μ L을 분주한 다음, 샘플용액이 포함된 상태에서 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 *in vitro* 세포배양을 진행하였다 BrdU 용액을 10 μ L 를 넣어서 2시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하고 Fixadent 용액을 넣고 실내 온도 조건에서 30 분간 고정시킨 뒤, anti-BrdU-POD working 용액을 넣고 100 μ L/well 의 농도로 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 25 μ L 1M H₂SO₄ 용액을 첨가하여 반응을 종료시킨 뒤, 450 nm 및 690 nm의 파장에서 샘플 용액의 흡광도를 micro plate reader 기기를 통해서 측정하였다.

통계학적 분석

실험결과는 평균 표준편차로 나타내었으며, 통계학적 중요성은 one-way ANOVA SPSS 18.0 program (SPSS for Windows, USA)을 사용하였다. 얻어진 p 값이 0.05 미만일 때, 샘플 간의 값은 통계학적으로 유효성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

주사전자현미경의 관찰

7.5% 농도로 제조된 히알루론산 필름의 가교결합제 농도변화(0.4, 0.5, 0.6%)에 따른 필름의 표면과 단면을 주사전자현미경으로 관찰하였다(Figure 1). 히알루론산 필름의 건조된 표면 및 내부의 형태학적인 분석을 주사전자현미경(SEM)의 500 배율로 평가한 결과, 히알루론산 필름 표면은 기공의 크기 및 표면 형태가 불규칙적으로 관찰되었으나(Figure 1-A, B and C), 필름 내부 기공의 크기는 상대적으로 규칙적인 형태를 나타내는 것으로 평가되었다(Figure 1-D, E, F). BDDE의 농도가 0.4%에서 0.6%로 높일수록 필름 내부의 기공형태가 균일하게 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 가교결합제의 첨가가 증가할수록 히알루론산 고분자 사이의 내부 및 고분자 사이의 가교 결합도가 증가하여, 지지체의 기공형성 능력이 향상되는 것으로 평가되었다.

팽윤성 평가

히알루론산 필름의 증류수에서의 팽윤성 평가는 24 시간 동안 증류수에 침전시킨 다음, 팽윤성을 초기 샘플 질량 대비, 샘플 질량의 비율변화로 평가하였다(Figure 2). 샘플을 물에 1 시간 침전 후에는 필름의 swelling은 각각 549%, 502%, 510% 로 팽창된 것으로 측정되어 0.4%, 0.5%, 0.6% BDDE 가교결합제 첨가량에 따른 하이드로젤 필름의 swelling 이 샘플 간 차이가 없는 것으로 관찰되었으나, 물에 침전시킨 지 2시간 후부터는 히알루론산 필름의 swelling 은 1379%, 1238% 및 1176% swelling이 된 것으로 측정되어, 함유율이 급격히 증가된 것으로 관찰되었으며, 가교결합제 농도가 적을수록 보다 더 함유율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나, 2시간 이후부터는 샘플들의 팽창률에 있어서 가교결합제의 농도에 따른 함

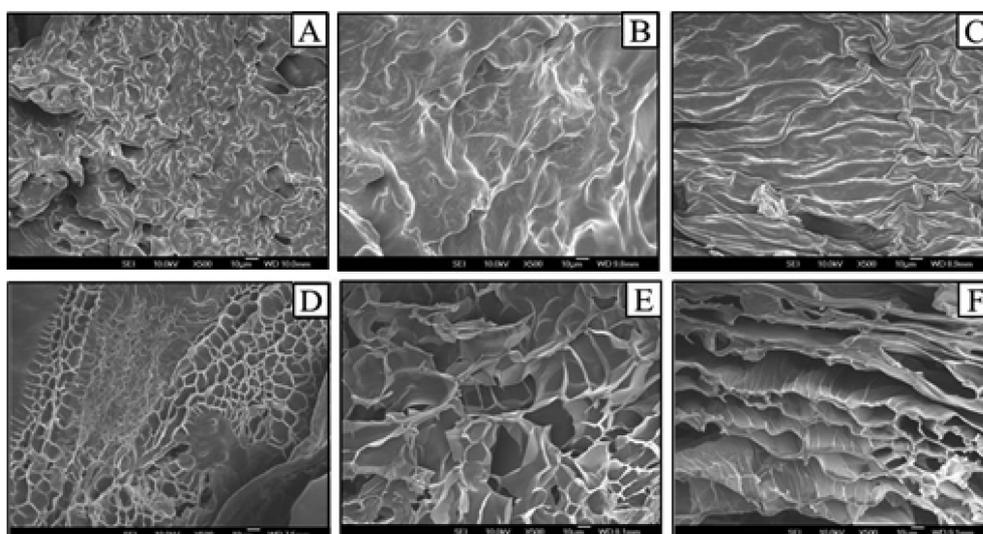


Figure 1. Morphological observation of the HA films with SEM. The films were fabricated with different concentrations of cross-linking agent, BDDE, such as 0.4% (A, D), 0.5% (B, E) and 0.6% (C, F). While the pictures of A, B and C show the film surfaces, those of D, E and F show their x-sections (\times 500).

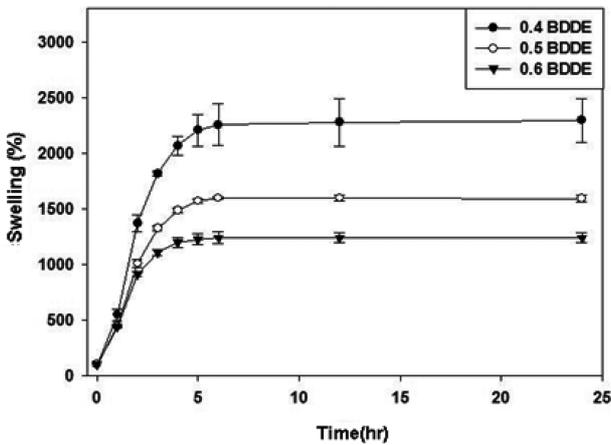


Figure 2. Swellings of the HA films (7.5%) in PBS for 24 hrs. The films were synthesized with different concentrations of the cross-linking agent such as 0.4, 0.5 and 0.6%.

수율이 크게 차이를 보이지 않았으며, 24 시간이 지난 후에도 0.4%, 0.5% 및 0.6% 가교결합제 첨가 비율은 각각 2269%이며, 2020% 1814% 로 각각 측정되는 것으로 평가되어, 샘플의 함수율에는 크게 차이를 보이지 않는 것으로 평가되었다. 따라서, 2시간까지는 물에 침전한 샘플들은 가교결합제의 농도에 따라 함수율의 증가율에서는 차이를 보이는 반면에, 2시간 이후부터는 함수율 증가율은 차이가 없는 것으로 관찰되었으나, 함수량은 가교결합제 농도가 낮을수록 높아지는 것으로 관찰되었다.

생체적합성 평가

히알루론산 필름의 생체적합성을 평가하기 위하여, 히알루론산 필름을 균질기로 입자샘플로 유도한 후, 입자 샘플에 섬유아세포를 3일간 배양하여, 필름 내부의 생체적합성을 평가하였

다(Figure 3). 광학현미경으로 관찰한 결과에서는, 입자들의 형태가 존재하는 것으로 관찰되었으며(Figure 3-A, B, C), 히알루론산 입자 표면에서의 세포 거동을 관찰하였을 때, 0.4% 가교결합제를 사용하여 제조한 히알루론산 필름은 세포들이 부착 및 뻗은 형태로 생존하였음을 관찰되어, 전반적으로 생체적합성이 매우 우수한 것으로 관찰되었다(Figure 3-D). 그러나 0.5% 와 0.6% 가교결합제를 사용하여 제조한 HA 필름의 경우에는 세포들이 뻗는 현상이 관찰되지 않았고, 둥근 형태로 대부분의 세포들이 존재하였으며, 형광 현미경으로 관찰했을 때 청색으로 세포들이 관찰되는 것으로 평가되어 세포들이 살아있음을 확인하였다(Figure 3-E, F).

독성평가

히알루론산 필름의 세포 독성을 평가하기 위하여 0.4, 0.5, 0.6% 가교결합제를 사용하여 제조한 히알루론산 입자들에 대하여 버퍼용액에서 72시간 in vitro 상에서 용출시켜 얻은 용출액 1 ml중 100 ul을 배양 중인 섬유아세포에 주입한 후 24시간이 지난 후, MTT assay, Neutral Red assay, BrdU assay 분석을 통하여 세포생존성을 정량화 하여 평가하였다. 양성 대조군은 Teflon, 음성 대조군은 Latex로 선정하여 평가하였으며, 양성대조군 샘플로부터 얻은 용출액을 배양중인 세포에 첨가하여 평가한 양성대조군 샘플의 용출물 흡광도 값을 세포생존율의 100%로 간주함으로써, 샘플과 음성대조군 용출물의 흡광도 값을 백분율을 계산하여 샘플의 독성 정도를 평가하였다.

MTT assay 를 통하여 섬유아세포의 생존율을 평가한 경우에는, 양성대조군 대비하여 0.4%, 0.5%, 0.6% 의 가교결합제를 사용하여 제조한 필름의 용출물에서는 각각 99%, 88%, 및 74%의 세포생존성을 보이는 결과를 얻었으며, 모든 실험군의 샘플들의 용출물에 대한 흡광도 값들에 대한 세포생존성은 음성대조군인 Latex와 유의적 차이를 보이면서 우수한 세포적합

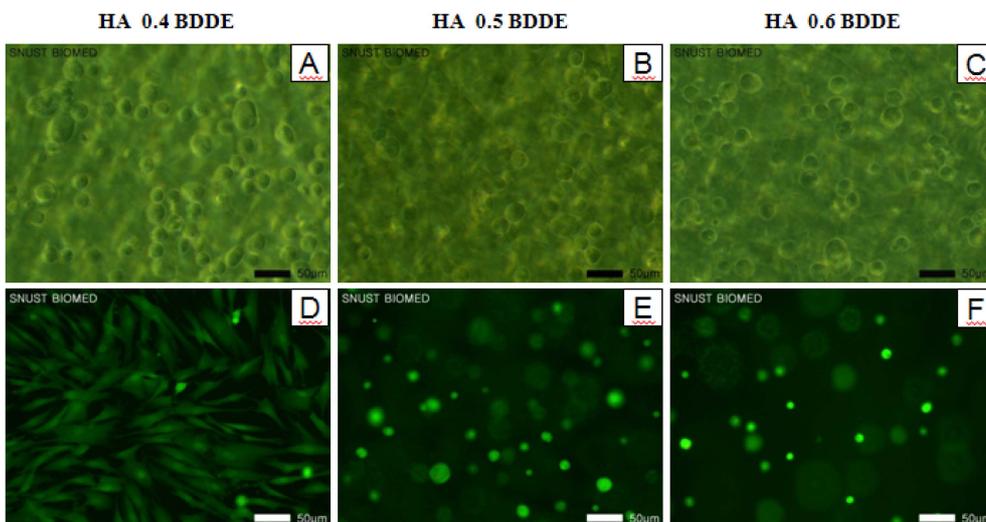


Figure 3. Cell viability inside the HA films at day 3. While the pictures of A, D and C were observed by light microscopy, those of D, E and F stained with the live & dead assay were observed by the fluorescence microscopy.

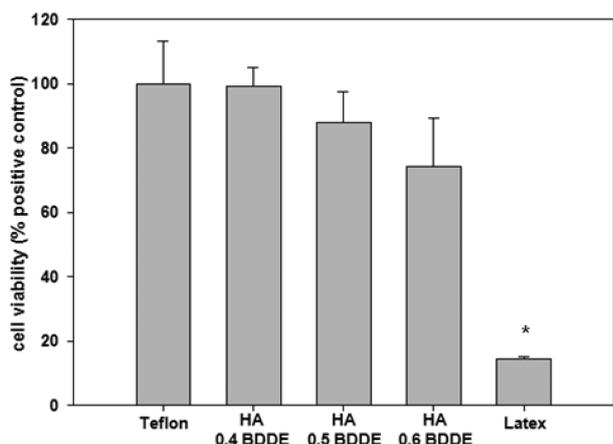


Figure 4. MTT assay of the HA films with adult human dermal fibroblast. The Teflon and Latex films were employed as positive and negative controls, respectively. The asterisk means significantly different in statistics between samples.

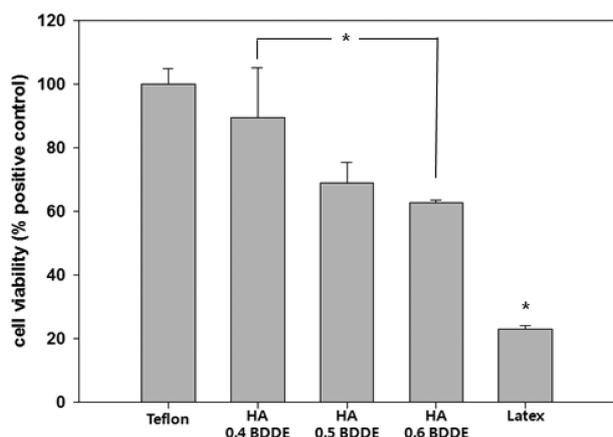


Figure 5. Neutral red assay of the HA film with human dermal fibroblasts. Teflon and Latex films were employed as positive and negative controls, respectively. The asterisk means significantly different in statistics between the samples.

성을 보이는 것으로 평가되었다($p < 0.05$).

Neutral Red assay를 통하여 섬유아세포의 세포적합성을 평가한 결과에 따르면, 양성대조군 테플론 샘플의 흡광도와 대비하여 0.4%, 0.5%, 0.6% 가교결합제를 사용하여 제조한 히알루론산 필름들은 각각 90%, 69%, 63%의 세포적합성을 보였으며, 0.4%의 가교결합제를 이용하여 제조한 필름의 흡광도 값은 0.6% 가교결합제를 이용하여 제조한 HA 필름의 흡광도 값과는 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 평가되었다($p = 0.023$). 또한 모든 실험군의 흡광도 값은 음성대조군인 Latex의 흡광도 값과는 통계학적으로 유의한 차이를 보이고 있어 음성대조군의 용출물과 비해서는 우수한 세포적합성을 보이는 것으로 평가되었다($p < 0.05$).

BrdU assay 분석방법을 통하여 섬유아세포의 세포적합성을 평가한 결과에 따르면, 양성 대조군인 테플론의 흡광도 값과 비교하여 0.4%, 0.5%, 0.6% 가교결합제를 사용하여 제조한 히알

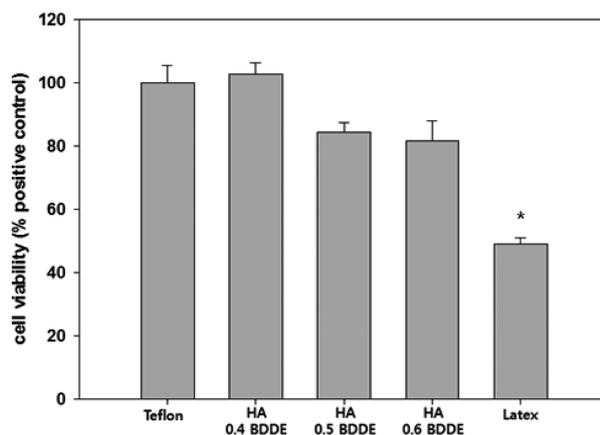


Figure 6. Brd-U assay of the HA film with human dermal fibroblast. Teflon and Latex films were employed as positive and negative controls, respectively. The asterisk means significantly different in statistics between the samples.

루론산 필름들은 각각 103%, 85%, 82%의 세포적합성을 가지는 것으로 평가되었다. 또한 3 가지 농도의 가교결합제를 사용하여 제조한 모든 실험군 샘플들의 용출물은 음성대조군인 Latex 용출물을 이용하여 얻은 흡광도 값과 비교했을 때 유의적 차이를 보이는 세포적합성 결과를 보였다($p < 0.05$)

이러한 결과를 분석해 보면, 히알루론산 필름으로부터 얻은 용출물을 첨가하여 평가한 흡광도 값에 비교하여, 양성대조군인 latex의 용출물을 첨가하여 얻은 세포적합성 보다 상당히 높은 생존율을 보이는 것으로 평가되었으며, 양성대조군인 Teflon의 용출물을 이용하여 흡광도 값을 비교했을 때 비슷하거나 약간 낮은 세포적합성을 보이는 것으로 평가되었다. 따라서 HA 필름을 제조할 때 사용한 가교결합제의 농도선택이 세포적합성에 영향을 끼치는 것으로 평가되었으나, 전반적으로 세포의 독성을 거의 보이지 않는 것으로 관찰되었기 때문에 상기 3가지 농도의 가교결합제를 사용하여 제조한 HA 필름 샘플들은 우수한 세포 적합성을 보이는 것으로 평가되었다.

결론

본 연구에서는 0.3, 0.5, 0.6%의 가교결합제를 사용하여 히알루론산 필름을 제조한 필름에 대하여 전자현미경을 이용하여 필름의 표면과 단면적의 형태학적 관찰을 진행한 결과, 필름 표면은 전반적으로 유사한 형태를 보이는 것으로 관찰되었으며, 가교결합제의 농도가 높아짐에 따라 필름의 단면적은 상대적으로 보다 균일한 기공을 형성하는 것으로 관찰되었다. 0.6%의 가교결합제를 사용하여 제조한 필름은 약 20 마이크로미터의 거리를 가지면서 길이방향의 기공이 형성되는 것으로 관찰되었다.

제조된 필름샘플에 대하여 물에 침전시켜 수화된 필름샘플에 대한 팽윤성 평가를 진행한 결과에 따르면, 가교결합제의 첨가 비율이 높을수록 필름샘플의 팽윤성이 낮아지는 것으로 평가되었으며, 이는 필름을 구성하는 히알루론산 고분자의 내부 및

고분자 사이의 가교도가 증가함에 따른 결과로 사료되었다. HA 필름의 표면과 필름의 균질화 시켜 제조한 입자 샘플에 대하여 섬유아세포로 *in vitro* 세포적합성을 평가한 결과에 따르면, 가교결합제의 비율이 낮은 농도에서 제조한 필름의 경우에는 높은 농도의 가교결합제를 사용하여 제조한 필름의 세포 생존율보다 더 높은 세포적합성을 보였다. 또한 MTT, BrdU, Neutral red assay를 통한 샘플 용출물에 대한 독성평가를 진행한 결과에 따르면, 다양한 농도의 가교결합제를 이용하여 제조한 HA 필름의 세포 생존율은 양성대조군과 비슷한 세포적합성을 보이는 것으로 평가되었다. 그러나 가장 높은 농도 0.6% 가교결합제를 사용하여 제조한 필름의 용출물에 대한 세포적합성은 상대적으로 떨어지는 것으로 관찰되어, 가교결합제의 농도, 세척과정 등이 히알루론산 필름 제조와 생체재료로의 응용하는 데 있어 중요한 인자로 간주되어야 할 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Marecek, K. P. Vercruysea, M. R. Ziebell, "Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives," *J. Controlled Release*, **53**, 93-103 (1998).
- G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner, "Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications," *Biotechnol. Lett.*, **29**, 17-25 (2007).
- G. D. Monheit, K. M. Coleman, "Hyaluronic acid fillers," *Dermatologic Therapy*, **19**, 141-150 (2006).
- S. Yamane, N. Iwasaki, T. Majima, T. Funakoshi, T. Masuko, K. Harad, A. Minami, K. Monde, S. Nishimura, "Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering," *Biomaterials*, **26**, 611-619 (2005).
- K. Kawasaki, M. Ochi, Y. Uchio, N. Adachi, M. Matsusaki "Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels," *J. Clin. Invest.*, **179**, 142-148 (1999).
- J. C. Routh, B. A. Inman, Y. Reinberg, "Dextranomer/hyaluronic acid for pediatric vesicoureteral reflux: systematic review," *Pediatrics*, **125**, 1010 (2010).
- V. C. Hascall, D. Heinegard, "Aggregation of Cartilage Proteoglycans," *J. Biol. Chem.*, **249**, 4232-4241 (1974).
- N. J. Lowe, A. Maxwell, P. Lowe, M. G. Duick, K. Shah, "Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing," *J. Am Acad Dermatol.*, **45**, 930-933 (2001).
- H. M. Schrage, J. G. Rheinwald, M. R. Wessels, *J Clin Invest*, "Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection," *J. Clin. Invest.*, **98**, 1954-1958 (1996).
- J. A. Ripellino, M. M. Klinger, R. U. Margolis, R. K. Margolis, "The hyaluronic acid binding region as a specific probe for the localization of hyaluronic acid in tissue sections, application to chick embryo and rat brain," *J. Histochem Cytochem.*, **33**, 1060 (1985).
- S. Gerecht, J. A. Burdick, L. S. Ferreira, S. A. Townsend, R. Langer, G. V. Novakovic, "Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells," *PNAS*, 11299-11303 (2007).
- W. M. Tian, C. L. Zhang, S. P. Hou, X. Yu, F. Z. Cui, Q. Y. Xu, S. L. Sheng, H. Cui, H. D. Li, "Hyaluronic acid hydrogel as Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain: *in vitro*," *J. Controlled Release*, **102**, 13-22 (2005).
- Y. D. Park, N. Tirelli, J. A. Hubbell, "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks," *Biomaterials*, **24**, 893-900 (2003).
- F. Z. Cui, W. M. Tian, S. P. Hou, Q. Y. Xu, I. S. Lee, "Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering," *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **17**, 1393-1401 (2006).
- C. T. McGary, R. H. RAJA, P. H. Weigel, "Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells," *Biochem.*, **257**, 875-884 (1989).
- L. A. Solchaga, J. E. Dennis, V. M. Goldberg, A. I. Caplan "Hyaluronic acid-B ased polymers as cell Carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage," *J. Orthopavhc. Resvurch.*, **17**, 205-213 (1999).
- H. J. BRODY "Use of hyaluronidase in the treatment of franulomatous hyaluronic acid reactions or unwanted Hyaluronic acid misplacement," *Dermatol. Surg.*, **31**, 893-897 (2005).
- E. J. Franzmann, G. L. Schroeder, W. J. Goodwin, D. T. Weed, P. Fisher, V. B. Lokeshwar, "Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase(Hyal1) in head and neck tomors," *Int. J. Cancer*, **106**, 438-445 (2003).
- P. Bulpitt, D. Aeschlimann, "New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 152-169 (1999).
- J. B. Leach, K. A. Bivens, C. W. Patrick, C. E. Schmidt "Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds," *Biotechnol. and Bioeng.*, **82**, 578-589 (2002).
- J. Kim, I. S. Kim, T. H. Cho, K. B. Lee, S. J. Hwang, G. Tac, I Noh, S. H. Lee, Y. Park, K. Sun "Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells", *Biomaterials*, **28**, 1830-1937 (2007).
- F. Z. Cui, W. M. Tian, S. P. Hou, Q. Y. Xu, I. S. Lee "Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **17**, 1393-1401 (2006).
- L. Meinel, V. Karageorgiou, R. Fajardo, B. Snyder, V. Shinde-Patill, L. Zichner, D. Kaplan, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic "Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow", *Annals. of Biomed. Eng.*, **32**, 112-122 (2004).
- Y. Wang, H. J. Kima, G. Vunjak-Novakovicb, D. L. Kaplana "Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials", *Biomaterials*, **27**, 6064-6082 (2006).
- Y. Luo, K. R. Kirker, G. D. Prestwich "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery", *J. Controlled Release*, **69**, 169-184 (2000).
- R. A. Peattie, A. P. Nayate, M. A. Firpo, J. Shelby, R. J. Fisher, G. D. Prestwich "Stimulation of *in vivo* angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants", *Biomaterials*, **25**, 2789-2798 (2004).

27. D. B. Pike, S. Cai, K. R. Pomraning, M. A. Firpo, R. J. Fisher, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, R. A. Peattie "Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF", *Biomaterials*, **27**, 5242-5251 (2006).
28. B. Wang, J. Zhang, G. Cheng, S. Dong, "Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrogen peroxide based on sol-gel/hydrogel composite film", *Analytica. Chimica. Acta.*, **407**, 111-118 (2000).
29. J. K. Park, J. Yeom, E. J. Oh, M. Reddy, J. Y. Kim, D. W. Cho, H. P. Lim, N. S. Kim, S. W. Park, H. I. Shin, D. J. Yang, K. B. Park, S. K. Hahn "Guided bone regeneration by poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid bi-layer films for periodontal barrier applications", *Acta Biomaterialia*, **5**, 3394-3403 (2009).
30. D. V. Volodkin, M. Delcea, H. Mo hwald, and A. G. Skirtach "Remote Near-IR Light Activation of a Hyaluronic Acid/Poly(L-lysine) Multilayered Film and Film-Entrapped Microcapsules", *Applied Mater. & Interface*, **8**, 1705-1710 (2009).
31. S. Park, S. H. Bhang, W. G. La, J. Seo, B. S. Kim, K. Char, "Dual roles of hyaluronic acids in multilayer films capturing nano-carriers for drug-eluting coatings," *Biomaterials*, **33**, 5468-5477 (2012).
32. X. X. Zhang, T. F. Guo, Y. W. Zhang, "Formation of gears through buckling multilayered film-hydrogel structures," *Thin Solid Films*, **518**, 6048-6051 (2010).