

# 효소가교반응을 통한 스프레이형 젤라틴 하이드로젤 창상피복제의 제작 및 특성 연구

이혜영, 김귀재, 신인해, 권오형\*

금오공과대학교

\*ohkwon@kumoh.ac.kr

## Fabrication and Characterization of Sprayable Gelatin Hydrogels Wound Dressing by Enzymatic Crosslinking Reaction

Hyeyoung Lee, Gwijae Kim, Inhae Shin, Oh Hyeong Kwon\*

\*Kumoh National Institute of Technology

### 요 약

손상된 피부 조직을 재생시키기 위해 여러 종류의 상처 드레싱이 개발되어지고 있다. 그 중 하이드로젤 타입은 높은 생분해성과 산소 투과성을 가질 뿐만 아니라 상처부위의 습윤 환경을 지속시킬 수 있다. 하이드로젤은 다양한 합성고분자와 천연고분자로 제작될 수 있고, 천연고분자는 생체적합성, 비면역성인 특징이 있다. 그 중 젤라틴은 독성이 적고 세포 접착성이 우수하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 개질된 젤라틴을 이용하여 빠르고 쉽게 적용가능한 스프레이형 하이드로젤을 개발하였고, 젤화시간 분석, 유변학적 특성평가, 생체적합성평가를 진행하였다. *In vivo* 실험에서 SD rat을 이용한 창상치유효과, 조직학적 평가를 진행하였고, 우수한 피부재생능력을 지님을 확인하였다.

### I. 서 론

손상된 장기와 조직을 재생시키고 주변 환경을 재현하는 방식으로 생체 조직에 대한 연구가 조직공학 분야에서 활발히 이루어지고 있다 [1]. 인체에서 가장 큰 표면적을 차지하는 피부는 체내의 근육, 내부 장기, 혈관과 신경을 외부의 환경으로부터 보호하는 역할을 하는 조직이다. 따라서 피부는 물리적 자극에 강하고, 탄력성이 있어야 하며 인체가 생명체를 유지하는 동안 그 역할을 충분히 수행해야 한다. 피부 손상은 일상생활에서 창상, 욕창, 화상 등 다양한 형태로 종종 발생하며, 그중 창상이 가장 빈번하게 일어난다. 창상은 인체 내에서 자연적으로 창상 치유과정을 거치면서 회복이 되지만, 흉터가 발생하기 때문에 이를 예방하고, 신속하게 치료하는 것이 중요하다. 창상 피복제는 창상, 외상 욕창 등 피부 손상을 치유하기 위하여 습윤환경 유지, 상처 부위 보호, 삼출물의 흡수, 상처 회복 촉진 등의 효능을 가지는 의약품 제제이다 [2]. 배양피부와는 달리 면역 반응에 대한 문제가 전혀 없고, 손쉽게 손상 피부에 적용이 가능하다는 장점이 있다. 창상 피복용 드레싱제로는 가장 간단한 형태인 보습거즈를 포함하여 폼형, 반투과성 필름형, 하이드로젤 형 등 다양한 형태로 상처의 깊이와 분비물의 양에 따라 그에 맞는 드레싱제가 활용되고 있다 [3]. 하이드로젤 형의 경우 신축성이 뛰어나고, 거즈, 폼형 창상피복제보다 접착성이 높다는 장점을 지닌다. 창상에서 방출되는 삼출물을 흡수하며 치유하기에 적합한 습윤환경을 장시간 유지할 수 있다 [4]. 하이드로젤을 구성하는 성분은 크게 천연고분자, 합성고분자, 하이브리드 3가지 이고, 반응 매개체는 크게 화학적, 생화학적, 물리적 반응 매개체들이 있고, 이로 인해 하이드로젤이 가교되어 3차원 망상구조를 이루게 된다 [5]. 본 연구에서는 천연고분자인 젤라틴을 활용하고, 생화학적 매개체인 효소를 통한 가교반응을 진행하여 하이드로젤을 제조한 뒤 이를 조직공학용 스프레이형 제제에 적용하였다. 젤라틴은 동물 체내로부터 얻은 콜라겐에서 추출해낸 천연 고분자로써, 생분해성, 생체적합성, 비면역성 단백질 고분자이다. 젤라틴은 온

도변화에 반응하여 물리적 가교가 발생하기 때문에 기계적 화학적 안정성이 매우 낮고 [6], 따라서 비가역적인 가교를 이루어 안정성을 향상시켜야 실생활에서 사용할 수 있다 [7]. 본 연구에서는 기계적, 화학적 안정성을 높이기 위하여 가교제로써 과산화수소( $H_2O_2$ )를, 촉매로써 Horseradish peroxidase (HRP)를 이용하였다. HRP는 서양 고추냉이에서 추출해낸 효소로써 생화학 응용분야에서 광범위하게 이용되고 있고, 과산화수소와 같이 사용하게 되면 HRP에 있는 철원자와 과산화수소가 반응하여 산화 라디칼을 형성한다는 성질을 이용하여 하이드로젤의 가교반응을 일으킬 수 있다. 젤라틴에 페놀기를 도입하기 위해 티라민으로 젤라틴을 개질시켜 가교반응 site를 제공하였다. 이를 통해 효소 촉매반응을 이용한 젤라틴 하이드로젤을 제조하고, 스프레이형 하이드로젤 창상피복제로써 활용하기 위한 실험을 진행하였다.

### II. 본론

효소촉매 반응을 통해 가교되는 젤라틴 하이드로젤을 제조하기 위해서는 HRP와  $H_2O_2$ 에 반응하기 위한 페놀기가 존재해야한다. 이에 따라 EDC-NHS반응을 통하여 젤라틴에 티라민기를 도입하는 개질단계가 선행되었다. 젤라틴 분자에는 카르복실기가 존재하며, EDC-NHS반응으로 카르복실기와 티라민의 1차 아민이 서로 공유결합하게 하여 아마이드기를 형성한다. 개질 조건을 설정할 때 젤라틴 1 g당 존재하는 mol수를 계산하여 젤라틴에 붙을 수 있는 티라민의 양을 계산하였고, 개질 후 동결건조를 함으로써 스펀지 형태의 Gel-Tyr 시료를 얻었다.  $^1H$ -NMR을 이용하여 젤라틴의 개질 여부를 확인한 결과, EDC-NHS반응을 통하여 티라민을 도입한 경우 특성피크가 6.68, 6.95 ppm에서 뚜렷하게 나타났고, 반응 시 첨가된 EDC와 NHS의 양이 증가함에 따라 피크의 크기가 증가하였다. 개질된 젤라틴을 동결건조하여 얻은 시료를 PBS에 녹여 Gel-Tyr용액을 제조하였다. 다양한 HRP,  $H_2O_2$ 의 농도에 따라 Gel-Tyr 용액에 넣어 섞은

다음 이액형 스프레이를 사용하여 하이드로젤을 제조하였다. 스프레이형 하이드로젤 창상피복제로 활용하기 위해서는 3 wt% 이상의 농도를 사용해야 하는 것을 확인하였다. HRP는 효소 촉매로 작용하여 라디칼을 형성시키기 때문에 가교 속도와 직접적으로 연관이 된다. HRP농도를 증가시키므로써 젤화시간이 감소되는 것을 확인하였고, 3.5 unit/ml 이상의 농도를 사용해야 한다는 것을 확인하였다.  $H_2O_2$ 의 농도에 따른 젤화시간을 측정하였을 때 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 젤화시간의 차이가 나지 않았고 일정한 값을 보여주었다. Gel-Tyr의 농도를 3 wt%,  $H_2O_2$ 의 농도를 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 고정하였을 때, HRP농도가 증가함에 따라 swelling ratio는 점차 감소하였다. 이는 HRP 농도가 높을수록 하이드로젤의 가교도가 높아지므로 내부 네트워크가 더욱 조밀하게 구성되어 swelling ratio가 감소함을 알 수 있다. 젤라틴 하이드로젤의 물성평가는 rheometer기기로 storage modulus를 비교하였다. Gel-Tyr의 농도를 3 wt%,  $H_2O_2$ 의 농도를 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 고정하였을 때, HRP의 농도가 높아짐에 따라 storage modulus는 증가하였다. 이는 하이드로젤의 가교도에 영향을 미치는 HRP의 농도가 증가함으로써 산화 라디칼의 수가 많아지고 이에 따라 하이드로젤의 물성이 높아졌다고 판단하였다. 젤라틴 하이드로젤의 생분해거동을 측정하였다. Gel-Tyr의 농도를 3 wt%,  $H_2O_2$ 의 농도를 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 고정하였을 때, 5주차에는 HRP의 농도와 관계없이 모든 샘플이 완전 분해되었음을 알 수 있고, 그 중 HRP농도가 3.5 unit/ml 인 하이드로젤은 3주차부터 하이드로젤이 분해되면서 표면적이 증가하고, 그 결과 생분해 속도가 급격히 증가한 것을 확인하였다.

하이드로젤 창상피복제가 도입되었을 때 피부에 독성을 띄는지 알아보기 위해 NIH3T3를 이용하여 세포독성실험을 진행하였다. 대조군으로는 cell culture plate에 배양한 세포를 사용하였고, 실험군은 Gel-Tyr의 농도를 3 wt%,  $H_2O_2$ 의 농도를 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 고정하였을 때, HRP의 농도를 2.63, 3.50, 4.38 unit/ml로 증가시키면서 세포독성을 측정한 결과, 세포 생존율이 95%이상으로 높은 생체 적합성을 나타내는 것을 확인하였다. 하이드로젤 창상피복제가 도입된 후 시간이 지남에 따라 피부조직을 재생시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 Live/Dead 염색을 통해 피부세포 성장거동을 분석하였다. 대조군으로는 cell culture dish에 배양한 세포를 사용하였고, HRP농도에 따라 젤라틴 하이드로젤을 도입한 피부세포의 성장거동을 형광현미경으로 관찰하였다. Gel-Tyr의 농도를 3 wt%,  $H_2O_2$ 의 농도를 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 고정하고, HRP의 농도를 2.63, 3.50, 4.38 unit/ml로 증가시키면서 세포를 관찰한 결과 HRP의 농도가 높을수록 피부세포 성장 중에 사멸이 많이 발생한다는 것을 알 수 있다.

젤라틴 하이드로젤이 실제로 창상치유효과가 있는지를 확인하기 위하여 SD rat 8주령으로 실험을 진행하였다. 대조군인 거즈와 실험군인 젤라틴 하이드로젤로 설정하였다. 창상치유능을 분석하여 비교하였고, 2주간의 실험동안 이틀마다 창상크기를 측정하여 창상의 감소율을 계산하였다. 실험 결과 거즈는 77.2% 만큼 창상이 치유되었고, 젤라틴 하이드로젤 창상피복제는 2주만에 86.7% 창상이 치유되어 더욱 우수한 창상치유능을 가졌다는 것을 알 수 있다. 창상피복제 도입 1주와 2주 후 대조군과 실험군의 피부조직을 채취하여 H&E staining과 Masson's trichrome staining을 진행한 후, 광학 현미경으로 관찰하였다. H&E staining 결과를 보았을 때 젤라틴 하이드로젤 창상피복제를 도입한 실험군의 경우 거즈를 사용했던 대조군보다 피부조직을 구성하는 데에 중요한 제 1형 콜라겐의 형성이 더욱 많이 되었고, 보라색으로 염색된 피부세포의 핵을 관찰할 수 있다. 이를 통해 우수한 피부세포 증식능력을 파악할 수 있다. Masson's trichrome staining의 결과, 대조군보다 젤라틴 하이드로젤을 도입한 창상의 피부조직이 더 선명한 청색을 띄어 1형 콜라겐의 형성이 더욱 많이

되었음을 알 수 있다. 또한 bieberich scarlet sol에 의해 적갈색으로 염색된 근섬유들을 관찰할 수 있다. 젤라틴 하이드로젤 창상피복제를 도입한 피부조직에서 더욱 선명한 적갈색을 띄어 거즈보다 smooth muscle cell이 더욱 증식되었음을 확인하였다.

### III. 결론

본 연구에서는 젤라틴을 이용하여 하이드로젤을 제조하고, 이를 스프레이형 창상피복제로 활용하였다. 젤라틴은 천연 단백질 고분자로서 생체적합성이 우수하며, 세포 접착능이 뛰어난 소재이지만, 온도변화에 따라 가역적인 가교가 발생하기 때문에 이러한 불안정성을 제거하기 위하여 효소 촉매 가교반응을 통해 하이드로젤을 제조하였다. 효소촉매 가교반응을 위한 페놀기를 도입하기 위하여 티라민으로 젤라틴을 개질해 주었고, 개질된 젤라틴 용액을 이액형 스프레이에 넣고 양쪽에 HRP와  $H_2O_2$ 를 각각 넣어주어 분부와 동시에 가교되도록 제작하였다. 그 결과, Gel-Tyr은 3 wt%,  $H_2O_2$ 는 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , HRP는 3.5 unit/ml가 적합하다고 판단하였다. *In vitro* 생체적합성 실험에서 Gel-Tyr의 농도가 높을수록 독성이 높아졌으며, 이는 HRP와  $H_2O_2$ 에서도 같은 경향을 보인다. 또한, Live/Dead 염색으로 하이드로젤이 세포성장애 미치는 영향을 시각적으로 확인할 수 있었다. *In vivo* 동물실험을 통해 젤라틴 하이드로젤이 가지는 창상치유능을 wound size 측정을 통해 확인하여 치유능이 우수하다는 것을 확인하였다. 또한, 시간 경과에 따라 조직을 채취하여 2가지 조직염색 결과를 통해 피부세포 증식과 제 1형 콜라겐 재생 정도가 우수함을 입증하였다. 다양한 실험을 통해 본 연구에서 제조한 스프레이형 Gel-Tyr 하이드로젤은 스프레이로 분사하여 더 빠른 가교속도와 다양한 형태에도 적용할 수 있다는 장점을 지니서 기존의 하이드로젤 창상피복제보다 용이하고 창상피복제로써 널리 사용될 것으로 기대된다.

### 참 고 문 헌

- [1] R. Langer and J.P. Vacanti, "Tissue engineering," Science, Vol. 260, 920-926, 1993,
- [2] J.R. Hanna and J.A. Giacomelli, "A review of wound healing and wound dressing product," J.Foot. Surg., Vol. 36, pp. 2-14, 1997.
- [3] S. Dhivya, V.V.Padma, and E. Santhini, "Wound dressings - a review," Biomedicine., Vol. 5, No. 4, pp. 24-28, 2015
- [4] P.H. Corkhill, C.J. Hamilton and B.J. Tighe, "Synthetic hydrogels VI. Hydrogel composites as wound dressings and implant materials," Biomaterials., Vol. 10, pp. 3-10, 1989.
- [5] K. Varaprasad, G.M. Raghavendra and T.Jayaramudu, "A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications," Mater. Sci. Eng. C., Vol. 79, pp.958-971, 2017.
- [6] G.J. Martinez-Diaz, D.Nelson, W.J. Crone and W. J. Kao, "Mechanical and Chemical Analysis of Gelatin-Based Hydrogel Degradation," Macromol. Chem, Phys., Vol. 204, pp.1898-1908, 2003.
- [7] Y.J. Kim and O.H. Kwon, "Crosslinked Gelatin Nanofibers and their Potential for Tissue Engineering," Key. Eng. Master., vol. 342-343, pp.169-172, 2007.