

염화칼슘과 트롬빈을 함유하는 생체흡수성 폴리비닐피롤리돈 나노섬유시트 지혈제의 개발

김현서, 고운제, 김은진*, 권오형

금오공과대학교, *(주)테라시온바이오테크놀로지

ohkwon@kumoh.ac.kr

Fabrication of Bioabsorbable Poly(vinyl pyrrolidone) Nanofibrous Sheets Containing CaCl_2 and Thrombin for Hemostatic Application

Hyeon Seo Kim, Young-Gwang Yun, Jheh Ko, Eun Jin Kim*, and Oh Hyeong Kwon

Kumoh National Institute of Technology

*Theracion Biomedical Co., Ltd.

요약

본 연구에서는 폴리비닐피롤리돈(PVP) 나노섬유형 지혈제를 제조하였다. 나노섬유의 미세구조, 원소함량비, 혈액응고인자의 분산정도는 전자현미경과 에너지분산형 분광분석법을 통해 확인하였다. PVP 나노섬유에 포함된 트롬빈 및 염화칼슘의 비율에 따른 *in vitro* 전혈응고실험에서 5.5 mg/mL 염화칼슘 및 500 unit/mL 트롬빈을 함유한 샘플의 지혈능이 가장 높게 나타났으며, 세포생존율 90% 이상의 낮은 세포독성을 나타내었다. *In vivo* Sprague-Dawley(SD) rat 간출혈 모델 실험에서도 나노섬유 지혈제는 대조군보다 감소된 출혈시간과 출혈량을 보여주었다. 염화칼슘과 트롬빈이 함유된 PVP 나노섬유시트는 고성능 지혈제로 의료현장에서의 활용이 기대된다.

I. 서론

현대사회에서는 사고도 급증하였을 뿐만 아니라 고령인구비율이 증가함에 따라 조직 및 장기의 손상을 치료하기 위한 외과적 수술이 급증하고 있다.[1] 정상 성인의 혈액은 체중의 6-7% 정도이며 전체 혈액량의 10% 이상의 출혈이 발생하면 생존위험을 초래한다.[2] 현재 사용되고 있는 흡수성 패킹은 지혈효과가 떨어지며, 매우 고가로 판매되고 있고, 생체적합성이 낮으며 점막의 재생효과는 미미하다. 따라서 지혈효과는 뛰어나면서 저렴한 가격으로 공급이 가능하며 생체적합성이 뛰어나고 점막의 재생을 촉진하여 재출혈을 방지할 수 있는 고기능성 지혈제의 개발이 필요하다. 위와 같은 문제점을 보완하면서 효과적인 지혈제를 만들기 위해 생체적합성 및 생체흡수성을 가지는 폴리비닐피롤리돈[poly(vinyl pyrrolidone), PVP]을 주재료로 하여 염화칼슘, 트롬빈과 같은 혈액응고인자를 함유하는 나노섬유 형태의 지혈제(PVP- CaCl_2 -thrombin)를 설계하였다.[3-6] PVP- CaCl_2 -thrombin 나노섬유시트 형태의 지혈제는 생체적합성을 유지하면서 기존 제품대비 지혈능을 개선시킬 수 있을 것으로 기대하고, *in vitro* 혈액응고실험과 *in vivo* 동물실험을 통해 지혈특성을 평가하고 의료용 지혈제로서의 적용 가능성을 제시하고자 한다.

II. 본론

본 실험에서는 80 wt% 에탄올 수용액 용매를 이용하여 10 wt% PVP 전기방사용액과 CaCl_2 와 트롬빈의 함유량이 다른 각각 6가지의 시료를 제조하여 사용하였다. 전기방사용액은 주사기에 21 gauge metal needle를 결속하여 주사기펌프에 장착한 후, 인가전압은 20 kV, 주사기 끝과 집전판 사이의 거리는 15 cm, 토출속도는 2 mL/h로 고정시키고, 200 rpm으로 회전하는 드럼형태 집전판에 12시간 동안 24 mL를 대량방사하여 나노섬

유시트를 제조하였다. 25℃에서 제습기를 가동하여 30% 이하의 습도를 유지하였다. 전기방사된 나노섬유시트는 섬유상에 포함된 잔존용매와 습기를 제거하기 위하여 진공오븐에서 24시간 건조한 후 보관하였다.

전기방사법으로 제조된 나노섬유의 미세구조는 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM)을 이용하여 관찰하였다. 시료표면을 관찰하기 전에 150 초간 sputter coater를 이용하여 백금으로 코팅 처리하였다. FE-SEM의 가속전압은 10 kV로 고정하였다. 섬유의 직경 및 직경분포를 조사하기 위하여 영상분석기를 이용하였다. 6가지 나노섬유는 모두 원기둥모양의 방사형 섬유배열로 방사되었고, PVP 단독방사로 얻은 나노섬유와 비교하여 PVP- CaCl_2 , PVP-thrombin, PVP- CaCl_2 -thrombin 나노섬유 모두 평균 직경 및 섬유형태의 차이점이 나타나지 않았다. 방사조건을 확립한 후, 셀룰로오스 부직포 상에 섬유를 방사하였고 나노섬유의 성분을 정량분석하기 위해 EDS 분석을 하였다. CaCl_2 는 칼슘을 통해, 트롬빈의 경우엔 황을 통해 CaCl_2 와 트롬빈이 방사가 잘 되었는지와 각각의 존재유무를 확인하였다. 또한, EDS mapping 분석을 통해 CaCl_2 나 트롬빈이 잘 분산되어 골고루 지혈작용을 촉진할 수 있음을 확인하였다.

전혈응고실험으로 Lee-White법과 Imai-Nose법을 실시하였다. Lee-White법은 유리표면을 대조군으로 설정하여 실험하였다. 대조군과 나노섬유 지혈제 시료를 비교하였을 때 5.5 mg/mL CaCl_2 단독으로 함유된 PVP 나노섬유 시료를 제외하고 모든 시료의 혈액응고시간이 대조군보다 약 4배정도 빠른 것으로 나타났다. Imai-Nose법은 대조군을 유리표면으로 두어 실험을 진행하였다. 나노섬유 지혈제 시료가 대조군보다 짧은 시간에 현저히 많은 혈전이 형성되었고, 이를 통해 혈액이 완전히 응고되는 속도가 훨씬 더 빠르다는 것을 알 수 있었다.

적혈구 용혈 실험을 실시하였다. 대조군과 각 나노섬유 시료마다 일정시간 동안 혈액응고를 진행시킨 뒤, 정제수를 넣어 혈액응고반응을 정지시

키고 잔존하는 적혈구를 용혈시켰다. 적혈구가 용혈되면 적혈구 용혈 용액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 대조군에 비해 나노섬유 시료의 흡광도 값이 현저히 낮게 나온 것으로 보아 잔존하는 적혈구의 양이 더 적다는 것을 알 수 있고, 이는 혈전형성이 더 많이 되었다는 것을 의미한다. 각 나노섬유 시료마다 잔존하는 적혈구의 양을 비교하면 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, 이미 충분한 양의 트롬빈과 칼슘이온이 도입되었기 때문인 것으로 사료된다.

혈장단백질과의 상호작용을 확인하기 위해 platelet-poor plasma (PPP)를 채취하여 칼슘 재침가 실험을 진행하였고, 이를 통해 혈장단백질의 fibrin network 형성시간을 측정하였다. 대조군은 유리표면으로 하였고, 대조군과 나노섬유 시료를 비교하면 5.5 mg/mL CaCl_2 가 함유되어 있는 PVP 나노섬유 시료의 fibrin network 형성속도는 대조군보다 약 7배 정도 빠른 것으로 확인되었다. 5.5 mg/mL CaCl_2 가 함유된 PVP 나노섬유 외에 나머지 시료 종류에 따라서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 혈액응고 인자 염화칼슘과 트롬빈의 함량에 따른 PVP 나노섬유 지혈제의 in vitro 전혈응고실험의 결과들을 종합하면, 500 unit/mL 이상의 트롬빈이 함유된 지혈제의 혈액응고능은 대조군에 비하여 모두 현저히 높은 지혈능을 나타내었다. 반면, 500 unit/mL 트롬빈과 22 mg/mL의 염화칼슘을 모두 함유한 PVP 나노섬유 지혈제의 지혈능은 과량의 염화칼슘으로 인하여 초기 지혈능이 다소 감소하였다. 위와 같은 결과들을 바탕으로 이후의 혈소판점착능 및 in vivo 동물실험에서는 500 unit/mL 트롬빈과 5.5 mg/mL 염화칼슘을 함유한 PVP 나노섬유 지혈제를 실험군에 적용하였다.

혈소판 점착 및 활성능을 확인하기 위해 혈소판이 많이 함유되어 있는 platelet-rich plasma (PRP)를 일반 셀룰로오스 부직포와 혈액응고인자를 함유하는 나노섬유가 방사된 셀룰로오스 부직포에 각각 도입하고 전자현미경을 통해 관찰하였다. 일반 셀룰로오스 부직포에서는 혈소판이 보이지 않았다. 반면, 셀룰로오스-PVP 나노섬유 지혈제의 경우 혈소판이 혈구와 엉켜서 셀룰로오스 섬유표면 및 내부에 점착되어 있는 것이 관찰되었다.

지혈제는 체액과 직접적으로 접촉하는 의료용 소재로 세포독성시험을 통해 생체안정성의 검증이 필수적이다. 양성대조군 용출액에서의 세포는 5%의 세포만 생존하였고, 정성적 반응도는 grade 4인 거의 완전하게 세포층이 파괴되는 것으로 판정되었다. 반면, 5.5 mg/mL CaCl_2 와 500 unit/mL 트롬빈을 함유한 PVP 나노섬유 지혈제로부터 용출된 용액에서 48시간 동안 세포를 배양하여도 92% 이상의 세포가 생존하였으며 정성적 반응도는 광학현미경 관찰 시 grade 1인 20% 이하의 약한 세포형태변화 및 성장저해를 확인할 수 있었다. 이는 세포독성 1등급(>80%)에 해당하는 결과로 생물학적 안전에 관한 기준에서 세포독성이 매우 낮음으로 판정할 수 있다.

In vivo 평가법은 재료를 직접 체내 출혈부위에 적용하여 혈전형성 및 지혈 정도를 관찰하는 방법이다. SD rat의 복부를 개복하여 상처를 형성하여 지혈시간과 혈액 흡수량을 확인하였다. 실험군 시료는 가장 방사성이 좋고 혈액응고실험에서도 효과가 좋았던 5.5 mg/mL CaCl_2 및 500 unit/mL 트롬빈을 함유한 PVP nanofiber-cellulose nonwoven을 이용하였고, 대조군으로는 상처형성 이후로 아무 처리하지 않은 경우와 시판중인 Surgicel®을 사용한 경우, 두 가지를 사용하였다. 각 군당 SD rat 20마리씩을 적용하였다. 지혈시간은 대조군의 경우 평균 2분 30초, Surgicel®의 경우 평균 2분, 실험군 시료의 경우 평균 2분 이내로 지혈이 이루어짐을 확인할 수 있었고, 출혈량은 대조군이 평균 479 mg으로 가장 높았고, Surgicel®이 평균 316 mg, 시료의 경우 평균 194 mg으로 실험군의 출혈량이 가장 적음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 시간당 출혈량을 계산해본 결과, 대조군은 169.07 mg/min, Surgicel®은 154.32 mg/min, 실험군

시료는 114.08 mg/min으로 실험군의 지혈능이 가장 우수하였다.

지혈된 간조직의 지혈부위 상처구역의 조직학적 분석을 하였다. Hematoxylin-eosin 조직염색에서는 상처구역에서 대량으로 응집된 피브린이 쉐기모양으로 세워져 있고, 주변부에서는 간조직의 핵 및 세포질이 관찰되었다.[7, 8] Carstairs's 조직염색으로는 상처내부에 피브린 및 적혈구가 대량으로 존재하고 절개조직의 상부에는 혈소판이 많이 응집되어 있음을 확인할 수 있었다.[8]

III. 결론

본 연구에서는 전기방사 공정인자를 최적화하여 혈액응고인자가 균일하게 분산된 PVP 나노섬유를 셀룰로오스 부직포 상부에 방사함으로써 제작할 수 있었다. 다양한 비율의 CaCl_2 와 트롬빈이 함유된 PVP 나노섬유 실험군들의 평균직경은 약 570-610 nm였으며, 망상구조의 섬유상에 혈액응고인자들이 균일하게 분포하고 있었다. In vitro 혈액응고실험을 통해 5.5 mg/mL CaCl_2 와 500 unit/mL 트롬빈을 함유한 PVP 나노섬유 지혈제의 혈액응고시간이 대조군에 비해 4배 정도 단축되고, 혈전의 형성속도 및 형성량은 현저하게 높게 나타났으며 피브린 형성시간도 약 7배 단축되는 것을 확인할 수 있었다. 셀룰로오스 단층표면에 비해 혈액응고인자를 함유한 나노섬유-셀룰로오스 이중층 표면상에서 과량의 혈소판 응집 및 접착이 관찰되었다. 섬유아세포를 이용한 세포독성평가는 92%의 세포생존율을 나타내었으며, 이는 세포독성 1등급의 안전성을 의미한다. SD rat을 이용한 간출혈 동물실험에서 나노섬유 실험군은 대조군 및 Surgicel®군에 비하여 우수한 지혈능을 보여주었다. Hematoxylin-eosin 및 Carstairs's 조직염색을 통하여 간출혈 부위의 조직에서 다량의 피브린 적혈구 및 혈소판을 확인하였다. 본 연구에서 제조한 PVP- CaCl_2 -thrombin 나노섬유형 지혈제는 상용 지혈제보다 우수한 지혈능을 나타내었으며 외과용 지혈제로 적용 및 응용가능성이 기대된다.

참 고 문 헌

- [1] F.E. Turrentine, H. Wang, V. B. Simpson, and R. S. Jones, *J. Am. Coll. Surg.*, **203**, 865 (2006).
- [2] J. B. Gross, *Anesthesiology*, **58**, 80 (1983).
- [3] Q. Yang, Z. Li, Y. Hong, Y. Zhao, S. Qiu, C. E. Wang, and Y. Wei, *J. polm. Sci. B*, **42**, 3721 (2004).
- [4] X.-Y. Dai, W. Nie, Y.-C. Wang, Y. Shen, Y. Li, and S.-J. Gan, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **23**, 2709 (2012).
- [5] G. Oshima, *Thromb. Res.*, **15**, 93 (1990).
- [6] L. Ruan, H. Zhang, H. Luo, J. Liu, F. Tang, Y.-K. Shi, and X. Zhao, *PNAS*, **106**, 5105 (2009).
- [7] K.C. Cartairs, N. Woolf, and T. Crawford, *J. Pathol.*, **88**, 537 (1964).
- [8] M. Ghasemzadeh, Z. S. Kapln, I. Alwis, S. M. Schoenwaelder, K. J> Ashworth, E. Westein, E. Hosseini, H. H. Salem, R. Slattery, S. R. McColl, M. J. Hickey, Z. M. Ruggeri, Y. Yuan, and S. P> Jackson, *Blood*, **121**, 4555 (2013).