Polym. Korea, Vol. 45, No. 3, pp. 372-379 (2021)
https://doi.org/10.7317/pk.2021.45.3.372

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

조직접착성 소재로서의 갈릭산 함유 글리콜 키토산 유도체의 제조 및 특성 평가

박슬기[#] · 이미현*,**,[#] · 엄지환*** · 서은영 · 조우경***,[†] · 정윤기**,[†] · 허강무[†]

충남대학교 고분자공학과, *난통대학교 방직의류학과, **한국과학기술연구원, ***충남대학교 화학과

(2020년 11월 12일 접수, 2021년 1월 16일 수정, 2021년 1월 18일 채택)

Synthesis and Characterization of Gallic Acid Conjugated Glycol Chitosans for Tissue Adhesive Applications

Seul Gi Park[#], Mei-Xian Li*,,[#], Ji Hwan Eom***, Eun Yeong Suh, Woo Kyung Cho***,[†], Yoon Ki Joung**,[†], and Kang Moo Huh[†]**

Departments of Polymer Science and Engineering & Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University, 99 Daehakro, Yuseonggu, Daejeon 34134, Korea

**School of Textile and Clothing, Nantong University, Nantong 226019, China*

***Center for Biomaterials, Biomedical Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Korea*

****Department of Chemistry, Chungnam National University, 99 Daehakro, Yuseonggu, Daejeon 34134, Korea*

(Received November 12, 2020; Revised January 16, 2021; Accepted January 18, 2021)

초록: 본 연구에서는 생체적합성이 우수한 글리콜 키토산에 생기능성 분자인 갈릭산(GA)을 화학적으로 결합하고, 자가-가교(self-crosslinking) 및 자가-치유(self-healing)가 가능한 갈릭산 함유 글리콜 키토산(GA-GC) 하이드로젤을 제조하였으며, 조직접착성 소재로의 응용 가능성을 평가하였다. GA의 반응 몰비를 조절하여 GA 함량이 서로 다른 일련의 GA-GC 유도체들을 합성하고, GA의 파이로갈롤기에 의한 자가-가교 반응을 통해 하이드로젤을 제조하였다. GA-GC 하이드로젤의 자가-치유 능력을 점탄성 분석을 통해 확인하였고, 하이드로젤의 GA 함량이 증가됨에 따라 압축강도와 조직 접착강도가 증가하는 것을 관찰하였다. 생분해성과 낮은 세포독성을 보임으로써 GA-GC 하이드로젤은 조직접착성 생체재료로 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, we developed self-crosslinkable and self-healing hydrogels by conjugating biocompatible and biodegradable glycol chitosan (GC) with biofunctional gallic acid (GA) and evaluated their potential application as a new tissue adhesive biomaterial. A series of GA-GC derivatives with different GA content were synthesized by varying the feed molar ratio of GA and their hydrogels were prepared via self-crosslinking reaction between pyrogallol groups of GA. The self-healing ability of GA-GC hydrogels was confirmed by rheological analysis, and their mechanical strength and tissue adhesion strength were observed to increase as the GA content of the hydrogels increased. The GA-GC hydrogels with biodegradability and low cytotoxicity would be useful as new tissue adhesive biomaterials.

Keyword: glycol chitosan, gallic acid, tissue adhesive application, hydrogel, self-crosslinking, self-healing.

서 론

현대 의료기술의 발전으로 인해 인체 내외 조직의 상처 봉합과 지혈 등 외과적 수술이 급증하고 있다. 과거에는 생체조직을 봉합하기 위해 봉합사를 사용하였으나 최근에는 혈관계 질환 및 당뇨병 등의 치료를 위한 외과적 수술 시 봉합사 대신 의료용 접착제의 사용이 지속적으로 요구되고 있다. 특히 출혈이 심한 인체 장기의 봉합 수술 시 지혈 등 문제점을 갖고 있어 강력한 접착력 및 생체적합성을 갖는 의료용 접착소재의 개발이 필요하다. 현재 상용화되어 있는 의료용 접착제는 피브린 글루(fibrin glue), 시아노아크릴레이트(cyanoacrylate), 폴리에틸렌글리콜(PEG) 실란트 등이 있다.[1-5] 피브린 글루는 접착력이 약하여 상처 봉합이 어렵고, 시아노아크릴레이트는 접착력은 높지만 생분해과정에서 방출되는 유해성 물질로 인해 피부 등 인체 외부로만 사용이 제한되고 있다. PEG 실란트 하이드로젤은 낮은 조직접착력과 생체불활

[#]These authors contributed equally to this works.
[†]To whom correspondence should be addressed.
khuh@cnu.ac.kr, ORCID 0000-0002-2406-6659
ykjoung@kist.re.kr, ORCID 0000-0001-8661-481X
wkcho@cnu.ac.kr, ORCID 0000-0003-1370-4720
©2021 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

성으로 인해 그 용도가 제한적이다.[6-8] 따라서 기존 상용화된 접착제의 제한된 특성을 극복하기 위해 접착성과 물성이 향상된 새로운 생체적합성 소재에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

키토산(chitosan)은 게나 새우, 조개껍데기 등 자연에 다량 존재하는 갑각류에서 얻어질 수 있는 키틴(chitin)의 탈아세틸화를 통해 얻어진 천연고분자로서 생체적합성이 뛰어나고 독성이 적으며 인체 내의 효소, 특히 라이소자임(lysozyme)에 의한 분해가 가능하여 다양한 의약학적 응용을 위한 생체재료로 이용되고 있다.[9-12] 또한 양이온성 아민기의 존재로 쉽게 음전하를 띠는 고분자나 거대 분자와 이온성 결합을 할 수 있으므로 우수한 점막 부착성을 갖는 생체재료로도 알려져 있다.[11] 그러나 이러한 키토산의 다양한 생체재료로서의 장점에도 불구하고, pH가 6 이하인 산성조건에서만 용해도를 보임으로써, 일반적으로 중성의 생리학적인 pH 조건 하에서는 응용이 제한되어 왔다. 따라서 다양한 수용성 키토산 유도체에 대한 제조 및 응용이 연구되고 있다.[13-15] 특히, 키토산에 글리콜기를 도입하여 제조된 글리콜 키토산(glycol chitosan, GC)은 기존 키토산의 장점인 뛰어난 생체적합성과 낮은 독성, 생분해성 등의 특성을 그대로 유지하면서, 중성의 수용액에서도 용해될 수 있어 약물전달, 세포 피포화, 조직공학 등 다양한 바이오메디컬 응용분야에서 활용되어 왔다.[16,17]

본 연구에서는 기존 생체접착 소재의 문제점을 극복하고, 우수한 조직접착력을 보이며, 생체적합성 및 생분해성을 갖는 새로운 생체접착 소재를 개발하기 위하여 폴리페놀 유도체인 갈릭산(gallic acid, GA, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid)을 도입한 글리콜 키토산 유도체(GA-GC)를 제조하였다. GA는 탄닌산의 가수분해를 통해서 얻을 수 있는데 독성이 적고 파이로갈롤기에 의해 우수한 항산화 능력을 가지며 부가적인 가교제의 사용없이 분자 간 수소결합과 공유결합을 통해 자발적인 물리적 또는 화학적 가교가 가능한 특징을 가지고 있다.[18,19] 우수한 생체재료의 특성을 갖는 수용성 GC 고분자와 자발적 가교가 가능한 GA기를 화학적 결합을 통해 합성한 GA-GC는 자가-가교(self-crosslinking) 및 자가-치유(self-healing) 특성을 갖는 생체접착성 하이드로젤 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 자가 치유 하이드로젤은 외부의 힘이나 자극으로 하이드로젤의 물성이 파괴됐을 때 스스로 물성을 회복할 수 있는 특성으로 생체접착제로서의 물성을 보다 안정하게 유지시킬 수 있다는 장점을 가진다.[20-22] 본 연구에서는 점막 부착 능력을 가지는 GC와 GA에 기반하여 자가-치유 능력을 가지는 새로운 생기능성 하이드로젤을 제조하고 조직접착성 소재로서 응용 가능성을 평가하고자 하였다. 반응 시 서로 다른 GA 당량비를 사용하여 결합 반응을 수행하여 다양한 GA 함량을 갖는 GA-GC 유도체들을 합성하고, GA 함량에 따른 물리화학적 특성을 비교하였다. 얻어진 GA-GC 유도체들의 화학적 조성은 ^{1}H NMR 및 ATR-FTIR 분석을 통해 진행하였고, 유량계(rheometer)에 의해 자가치유능 평가, 만능재료 시험기(universal testing machine, UTM)에 의한 기계적 물성 평가, 생분해성 및 세포독성 평가를 통해 조직접착성 하이드로젤 소재로서 응용 가능성을 평가하였다.

실 험

시약 및 시료. 본 연구에서 글리콜 키토산(GC, DP ≥200)은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(일본)로부터 구입하였고, 갈릭산은 Sigma-Aldrich(중국) 제품을, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N′*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide(NHS)는 Sigma-Aldrich(미국) 제품을, lysozyme(from chicken egg white)은 Sigma-Aldrich (캐나다) 제품을 구입하여 사용하였다. 용매로는 3차 증류수와 메탄올(삼전 화학, 한국)을 사용하였으며, 침전 시 아세톤(삼전 화학, 한국)을 사용하였다. 투석막(molecular weight cut-off: 12-14 kDa)은 Spectrum Laboratories(미국) 제품을 사용하였다. Deuterium oxide(D_2O) 및 Dulbeccos' phosphate buffered saline(PBS)는 Sigma-Aldrich(미국) 제품을 사용하였다.

GA-GC의 합성 및 분석. GC 0.1 g을 3차 증류수 50 mL에 녹인다. 3차 증류수 20 mL에 GA를 Table 1에서 제시된 반응비에 해당하는 양을 첨가하여 녹인 후 같은 당량의 EDC/NHS를 넣어준 후 질소 상태로 1시간 교반하였다. 충분히 녹인 GC 용액을 첨가하여 질소 상태로 24시간 동안 교반 하에 반응시켰다. 반응 용액을 투석막(molecular weight cut-off: 12-14 kDa)을 이용하여 2일간 투석한 후 동결건조하여 파우더 형태의 GA-GC를 얻었다.[23-25] 합성된 고분자 샘플을 D_2O 용매에 0.5 wt%로 용해시킨 후 Bruker사의 600 MHz NMR (AVANCE III 600 spectrometer, 독일)을 사용하여 얻은 ^{1}H NMR 스펙트럼에 의해 화학적 조성 분석을 수행하였다. Thermo Scientific 사의 ATR-FTIR(Nicolet iS 5, 미국) 기기를 이용하여 4000-750 cm^{-1} 파수 범위에서 4 cm^{-1}의 분해능, 32회 스캔을 통해 얻어진 고분자 샘플의 FTIR 스펙트럼을 분석하였다.

Table 1. Synthetic Results of GA-GCs

Sample	Feed molar ratio[a]	DG (%)[b]	Yield (%)
GA5-GC	0.20	5.17	88.00
GA10-GC	0.45	10.75	82.70
GA15-GC	0.60	15.40	88.45

[a]Feed molar ratio of gallic acid to glucosamine residue.
[b]Degree of gallylation determined by the peak integration of ^{1}H NMR spectra.

하이드로젤 자가-치유 특성 평가. GA-GC 3 wt% 수용액으로 제조된 하이드로젤의 자가치유 능력을 확인하기 위해 유량계를 활용하여 유변학적 물성 변화를 측정하였다. 20 mm 티타늄 평형 플레이트 형태인 Mars-40 Rheometer(Thermo Scientific, 미국)를 사용하여 측정하였다. GA-GCs 하이드로젤을 플레이트 사이에 장착시키고 플레이트 간격을 1.0 mm로 맞춘 후 frequency를 1 Hz로 고정한 상태에서 strain을 0.01~50%까지 증가시켜 하이드로젤의 물성을 파괴하는 strain sweep test를 측정한 후 연속적으로 낮은 strain과 높은 strain을 60초씩 주기적으로 변화시켜 물성이 파괴된 후 회복이 되는지 확인하는 alternate step strain sweep test를 측정하였다.[26,27]

하이드로젤 압축강도 측정. 하이드로젤 샘플을 지름 6 mm, 높이 10 mm의 실린더 형태로 제조하여, 가교 시간에 따른 압축강도를 500 kN load cell이 장착된 만능재료 시험기(UTM, Instron 5966)를 사용하여 5 mm/min의 속도로 측정하였다. 각 샘플에 대해 3회 측정을 실시한 후 평균값을 사용하였다.

조직 접착강도 평가. 조직 접착강도 평가를 위해 한스바이오메드사에서 제공된 건조 돼지 피부조직을 1 cm×1 cm로 자른 후 PBS(pH 7.4)에 넣고 37 ºC에서 1시간 동안 팽윤시킨 뒤 순간접착제를 이용하여 이미드 필름(10 mm×50 mm)에 고정한 후 조직 표면에 합성된 고분자 수용액(3 w/v%)을 도포 후 두 개의 샘플을 클립을 사용하여 함께 고정된 상태로 1시간 동안 방치하였다.[21] 접합된 샘플의 접착 강도를 1 kN load cell이 장착된 UTM기를 사용하여 5 mm/min의 속도로 전단응력을 측정하여 조직 접착강도를 측정하였다. 한 종류의 샘플에 대해 3회 반복 측정하여 평균값을 보고하였다.

생분해성 평가. 생분해성 평가를 위하여 분해 효소인 라이소자임이 첨가된 PBS 용액에 하이드로젤 샘플을 넣고 시간에 따른 질량 변화를 측정하였다. 하이드로젤 샘플을 라이소자임(10 mg/mL)을 함유한 PBS(pH 7.4)에 담그고 37 ºC로 유지된 항온수조에서 1시간 배양한 뒤 무게를 측정하고, 새로운 라이소자임 용액으로 바꾼 뒤 일정한 시간 간격으로 반복 측정하였다. 잔류 하이드로젤 무게(remaining hydrogel weight)를 식 (1)을 이용하여 계산하였다.[17]

$$\text{Remaining hydrogel weight (\%)} = \frac{m_d}{m_i} \times 100(\%) \quad (1)$$

이 식에서 m_i는 초기 하이드로젤의 무게이고 m_d는 시간에 따라 분해된 하이드로젤의 잔류무게이다.

세포 독성평가. 본 연구에서는 cell counting kit-8(CCK-8, Dojindo) 및 LIVE/DEAD® viability assay kit(Life Technologies)를 이용하여 GA-GCs의 생체적합성 시험을 수행하였다. NIH 3T3 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)는 96-well culture plate(1×10^4 cells/well)에 분주하여 37 ºC 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. GA-GCs(3 wt%)는 24시간 동안 자외선 조사 하에서 멸균되었고 그 후 24시간 동안 37 ºC에서 2 mL Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco)이 있는 24-well culture plate(Corning, 미국)에 넣어 용출시켰다. 용출액은 DMEM 용액으로 10분의 1로 희석시킨 후, 세포에 첨가하여 37 ºC에서 24시간 배양시켰다.[28] CCK-8 용액을 well에 추가한 뒤, 37 ºC에서 2시간 유지하고 UV-Vis spectrometer(Multiskan Spectrum, Thermo Scientific)를 통해 450 nm 파장에서의 흡광도 차이를 확인하여 cell viability를 측정하였다. 세포의 live/dead assay는 NIH-3T3 세포(1×10^4 cells/well)를 24시간 동안 24-well culture plate에 분주한 각 well에 합성된 고분자 GA-GCs 용액(1.0 wt%)을 첨가하여 48시간 배양했다. 그 후 키트 프로토콜에 따라 1 μL calcein-AM과 4 μL EthD-1이 함유된 staining 용액으로 처리하고 37 ºC에서 15분 동안 유지시킨 후, PBS로 세척하고 confocal laser-scanning microscopy(Zeiss, 독일)를 통해 cell viability를 측정하여, 분석하였다.

결과 및 토론

GA-GC의 합성 및 분석. Figure 1에서와 같이 본 실험에서는 친수성 고분자인 GC에 EDC/NHS 반응을 통해 생기능성 GA 분자를 화학적 결합하여 GA-GC 유도체를 합성하였다. Table 1과 같이 갈릭산의 반응 당량비를 조절하여 5~15%의 다양한 치환율을 가지는 일련의 GA-GC 유도체들을 합성

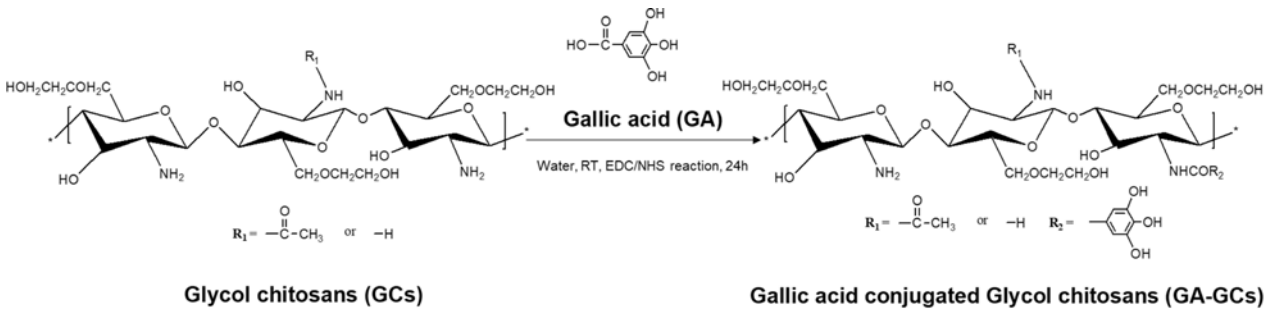

Figure 1. Synthesis scheme of gallic acid conjugated glycol chitosans (GA-GCs).

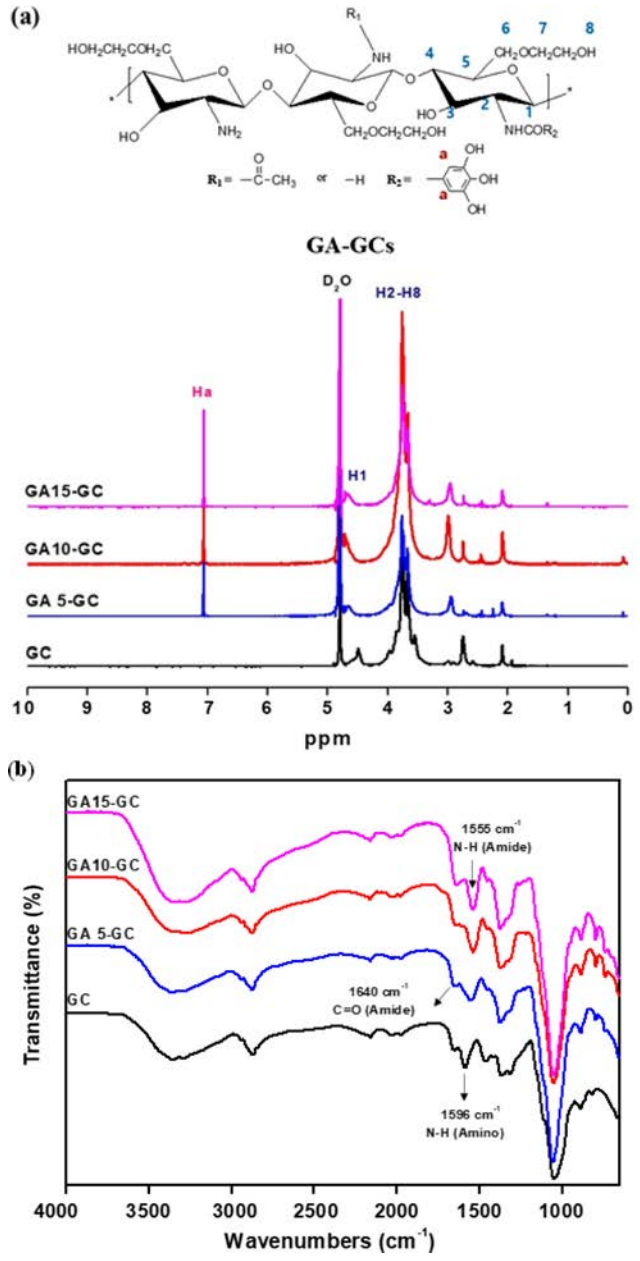

Figure 2. (a) ^{1}H NMR; (b) ATR-FTIR spectra of GC and GA-GCs.

하였고, 합성된 고분자의 화학적 조성과 치환율을 ^{1}H NMR 스펙트럼 분석을 통해 확인하였다. Figure 2(a)에 GC와 합성된 GA-GC 유도체들의 ^{1}H NMR 스펙트럼 분석 결과를 제시하였다. 용매로 사용한 D_2O 특성 피크는 $\delta = 4.8$ ppm에서 관찰되었고, GC의 경우 glucopyranosyl 고리의 2번 수소부터 8번 수소까지의 특성 피크가 $\delta = 3.7$~3.5 ppm에서 뚜렷이 관찰되었다. GA-GC 유도체들의 분석 결과를 보면, GC에서와 같이 $\delta = 3.7$~3.5 ppm에서 glucopyranosyl 고리의 2번 수소부터 8번 수소까지의 피크가 동일하게 나타나고, GA의 파이로갈롤기의 수소(H_a)에 해당하는 새로운 피크가 $\delta = 7.2$ ppm에서 추가적으로 관찰되는 것을 알 수 있었다. 합성된 GA-GC 유도체들의 치환율(degree of gallylation, DG)은 glucopyranosyl 고리의 2번 수소부터 8번 수소까지의 피크와 GA의 파이로갈롤기에 존재하는 수소 피크의 적분을 비교하여 계산하였다. 그 결과 반응 몰비 0.20, 0.45, 0.60로부터 DG가 각각 5.17, 10.75, 15.40%의 서로 다른 치환율을 가지는 GA-GC 유도체들이 성공적으로 합성된 것을 확인하였다. 본 합성에서 적용된 반응비 범위 내에서는 GA의 반응 몰비가 증가함에 따라 거의 비례적으로 치환율이 증가하였다. 합성된 고분자의 작용기 존재를 확인하기 위하여 ATR-FTIR 분석을 진행하였다(Figure 2(b)). GC의 경우 3300 cm^{-1} 부근에서 -OH 기의 신축 진동 피크가 관찰되었고, 같은 영역에서 N-H의 신축 진동 피크가 겹쳐 나타났으며, 1596 cm^{-1} 부근에 아민기의 N-H 피크가 관찰되었다. GC와 비교하여 GA-GC 유도체들에서는 1596 cm^{-1} 부근의 아민기 N-H 피크가 줄어들고 1640 cm^{-1} 부근과 1555 cm^{-1} 부근에 아마이드 결합 형성과 관련된 흡수 피크가 새롭게 나타난 것을 통해 GA가 GC의 아민기와 반응하여 아마이드 결합을 형성하였음을 확인할 수 있었다.[25]

하이드로젤 자가-치유 특성 평가. GA는 분자 간 수소결합 및 공유결합에 참여할 수 있는 3개의 하이드록실기를 포함하는 파이로갈롤기를 가지고 있어 자가-가교 특성을 보이는 것으로 알려져 있다. GA-GC 유도체로부터 제조된 3 wt% 수용액은 시간에 따라 파이로갈롤기의 물리적 및 화학적 가교반응으로 하이드로젤 형성이 가능하였다. 하루 동안 상온에서 제조된 GA-GC 하이드로젤을 Figure 3(a)와 같이 2개의 조각으로 자른 후 다시 붙여 30분 동안 유지한 후 관찰한 결과 분리되었던 단면이 자가-치유되어 다시 재결합된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 자가치유 특성의 정량적 분석을 위해 유변학적 분석을 수행하였다. Figure 3(b)는 낮은 strain(γ=0.01%)부터 높은 strain(γ=50%)을 적용해 GA-GC 하이드로젤의 물성을 파괴한 strain sweep test 결과를 보여준다. 10% strain 이상부터 하이드로젤의 물성이 파괴돼 G' 값이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 하이드로젤의 물성이 파괴된 상태에서 낮은 strain(γ=0.01%)과 높은 strain(γ=50%)을 60초 간격으로 연속적으로 적용해 물성 변화를 관찰하는 alternate step strain sweep test를 측정하였다. Figure 3(c)를 보면 높은 strain(γ=50%)을 가하면 물성이 파괴돼 G' 값이 급격히 감소하지만 낮은 strain(γ=0.01%)으로 바꿔주면 즉각적으로 물성이 다시 회복되어 G' 값이 거의 원래 수준으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 3회 이상 반복 측정 결과 모두 재현성 있게 물성이 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 제조된 GA-GC 하이드로젤은 모두 치환율에 상관없이 그리고 별도의 처리과정 없이 자발적으로 물성을 회복할 수 있는 자기-치유 특성을 보이는 것을 확인하였다.[27]

압축강도 평가. GA-GC는 갈릭산을 구성하는 파이로갈롤

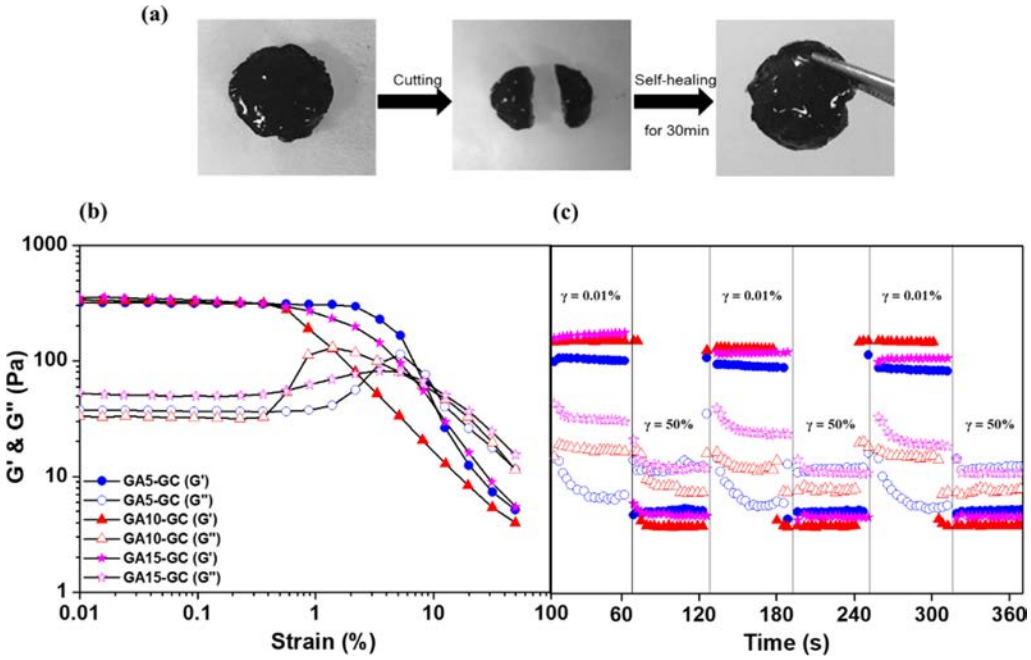

Figure 3. Self-healing ability of the GA-GC hydrogels. (a) Photographs showing the self-healing process of the GA-GC hydrogel; (b) The strain sweep test (γ=0.01%~50%) at 24 ℃ and a fixed frequency (1 Hz); (c) alternate step strain sweep test under a small strain (γ=0.01%) and a large strain (γ=50%) with 60 s intervals at 24 °C and a fixed frequency (1 Hz).

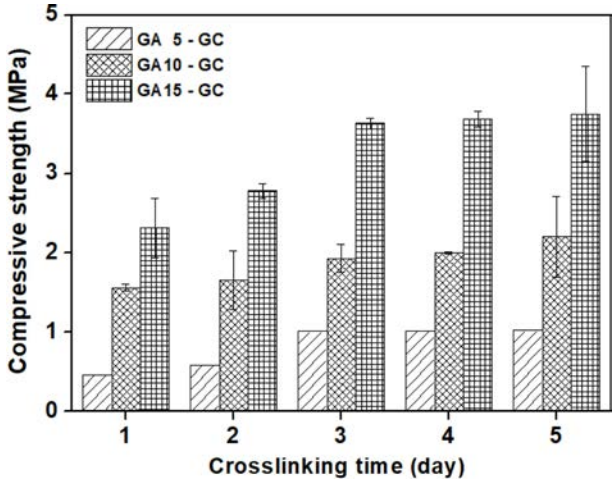

Figure 4. Compressive strength of GA-GC hydrogels. Each data point presents mean ± standard deviation (n=3).

기에 의해 즉각적인 분자 간 수소결합이 가능하며, 또한 파이로갈롤기는 자연 산화에 의해 오쏘 퀴논(*o*-quinone) 형태로 바뀌며 연속적인 라디칼 생성과 탄소-탄소 결합 생성을 통해 공유결합을 형성할 수 있다.[20,22,29] 그러므로, 별도의 부가적인 가교제 사용 없이도 자발적인 가교 반응에 의해 시간이 지날수록 물성이 증가하는 특징을 가지고 있다. 이러한 특징을 가지는 GA-GC 하이드로젤의 기계적 물성을 자연 가교 시간에 따른 압축강도 변화를 측정하여 비교하였다. Figure 4에서와 같이 GA5-GC인 경우 24시간 가교시킨 후 물성을 측정했을 시 0.46 MPa의 압축강도를 가지며 자가-가교 시간이 늘어날수록 점점 물성이 증가하여 최대 1.02 MPa까지 증가하는 결과를 보였다. GA5-GC보다 GA 함량이 높은 GA10-GC와 GA15-GC의 경우, 24시간 가교 시간 후 압축강도가 각각 1.55 MPa와 2.31 MPa로 측정되었으며, 자가-가교 시간이 길어질수록 점점 물성이 증가하여 최종적으로 5일 후에는 2.15 MPa와 3.75 MPa의 값을 보였다. 이러한 결과를 토대로 GA 함량이 높을수록 가교 밀도의 증가로 기계적 물성이 향상됨을 알 수 있었고, 가교 시간이 증가할수록 지속적인 공유결합 형성을 통한 가교 구조의 증가로 하이드로젤의 물성 또한 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 시간에 따른 물성 증가는 3일 정도의 가교 시간에서 포화되는 것으로 보아 자가-가교 반응이 3일에 걸쳐 거의 평형에 도달했을 것으로 사료된다.

조직 접착강도 평가. GC는 아민기와 하이드록실기를 가지고 있는 양이온성 다당류 고분자로 키토산과 같이 점막부착성이 우수한 고분자로 알려져 있다. 이러한 GC에 GA를 도입한 GA-GC 고분자는 GA를 구성하는 파이로갈롤기에 의해서 조직 표면과의 다양한 상호작용이 가능하여 GC보다 우수한 조직 접착능력을 보일 것으로 기대된다.[20] 돼지 조직을 이용하여 조직 접착능력을 측정한 결과, Figure 5와 같이 GC의 조직 접착강도는 46 kPa로 측정된 반면, GA를 함유한 GA5-GC, GA10-GC, GA15-GC은 75, 107, 144 kPa로 각각 증가

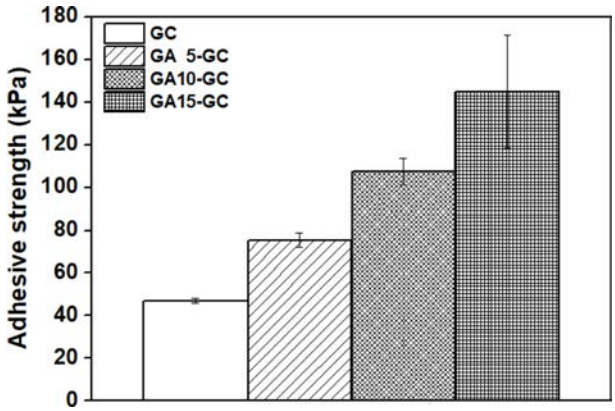

Figure 5. The lap-shear adhesion strength of GC and GA-GCs hydrogels. Each data point presents mean ± standard deviation (n=3).

됨을 확인하였다. 이는 GA 함량이 증가할수록 파이로갈롤기의 반응에 의해 고분자 사슬 간 또는 고분자와 조직 표면 간에 수소결합 및 공유결합 등을 포함하는 다양한 물리화학적 가교결합의 정도가 증가함으로써 조직 접착강도가 향상되는 것으로 사료된다.

생분해성 평가. GC는 인간의 세포외기질(ECM)에 존재하고 있는 다양한 효소, 특히 라이소자임에 의하여 생분해된다고 알려져 있다.[17] 제조된 GA-GC 하이드로젤의 생분해성을 평가하기 위해 정해진 시간 간격으로 라이소자임이 존재하는 PBS 내에서 하이드로젤의 분해 거동을 관찰하였다. Figure 6에서 보이듯이, GA-GC 하이드로젤은 PBS 하에서 초기 팽윤에 의해 질량이 증가하다가 시간에 따라 효소 분해가 진행되면서 질량이 점차 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 가장 적은 GA 함량을 갖는 GA5-GC의 경우 약 11일 정도 경과 후

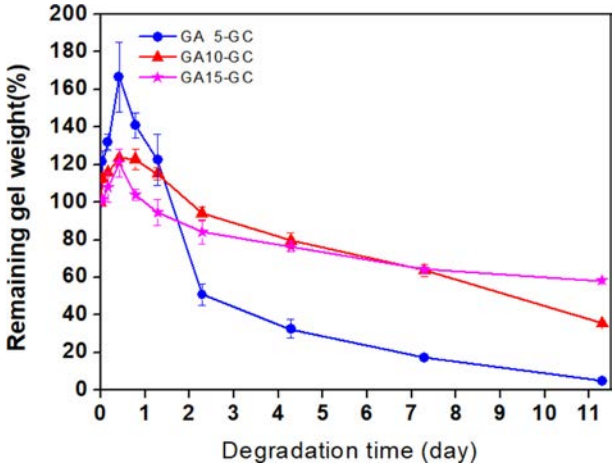

Figure 6. Enzymatic degradation profiles of GA-GCs hydrogels in PBS containing 10 mg/mL lysozyme at 37 °C. Each data point presents mean ± standard deviation (n=3).

거의 생분해되는 것으로 관찰되었고, GA10-GC은 동일한 시간 동안 65%, GA의 함량이 가장 많은 GA15-GC는 55% 정도로 생분해되는 것을 알 수 있었다. GA 함량이 높은 경우 가교 밀도가 높아 하이드로젤의 효소 분해가 느리게 진행되는 것으로 사료된다. 이러한 결과를 토대로 GA의 치환도 변화를 통해 기계적 물성뿐만 아니라 생분해성까지 조절 가능함을 보여주었고, 이는 다양한 바이오메디컬 응용분야에 GA-GC 하이드로젤이 매우 유용한 생체재료로 고려될 수 있을 것으로 기대된다.

세포 독성평가. GA-GC 하이드로젤의 세포독성 평가는 용출법을 사용하여 cell viability test와 live/dead assay 방법을 통해 수행하였다. 세포를 배양시킨 샘플을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 450 nm 파장에서의 흡광도 차이를 확인하여 cell viability를 측정한 결과를 Figure 7(a)에 나타냈다. GA 함량이 가장 낮은 GA5-GC와 가장 높은 GA15-GC의 cell viability를 관찰하였고, 각각 90%와 70% 정도로, 높은 GA 함량의 샘플에서 다소 낮은 cell viability를 보였다. Live/dead 평가에서는 1.0 wt% GA-GC 용액에서 배양한 세포를 관찰한 결과, 두 샘플 모두 48시간 배양 후에도

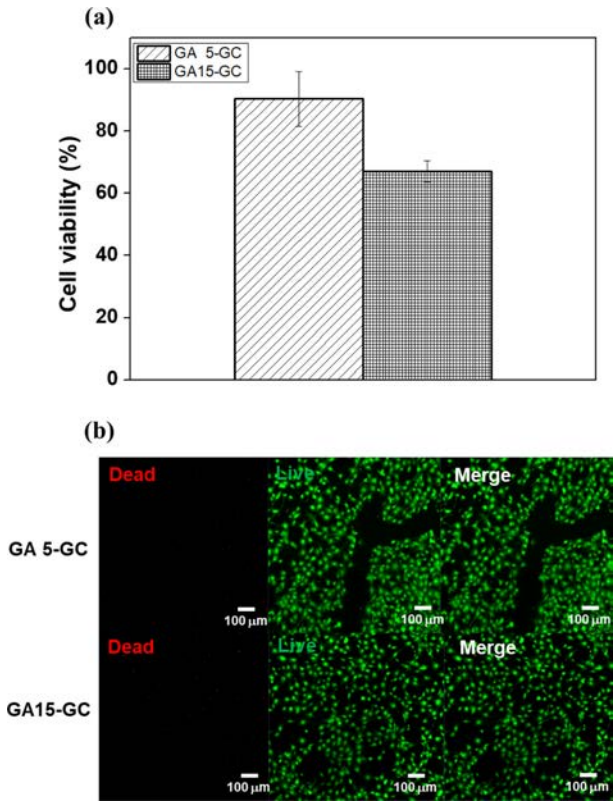

Figure 7. (a) *In vitro* cytotoxicity study of GA5-GC and GA15-GC to observe cell viability in NIH 3T3 cells. Data are presented as the mean ± standard deviation (n=3); (b) live/dead assay of NIH 3T3 cells cultured in cell culture medium containing 1.0 wt% GA-GCs hydrogels for 2 days.

잘 생존하여 있음을 확인하였다. 결과적으로, 생체적합성 소재로 알려진 GC에 추가적으로 GA를 화학적으로 도입하여 제조한 하이드로젤의 경우도 유의미한 세포독성을 보이지 않는 것으로 관찰되어 조직접착성 생체재료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 새로운 조직접착성 소재 개발을 위해 수용성 천연고분자인 GC에 생기능성 분자인 GA를 화학적으로 도입하여, 갈릭산을 함유한 글리콜 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 몰비를 조절하여 다양한 GA 함량을 갖는 일련의 GA-GC 유도체들을 성공적으로 합성하였고, 자가-가교 반응을 통해 자가-치유능을 갖는 하이드로젤을 제조할 수 있었다. 제조된 하이드로젤의 점탄성 분석을 통해 파괴된 물성이 가역적으로 자가 수복이 이루어 짐을 확인하였다. GA 함량이 증가함에 따라 높은 압축강도 및 조직 접착강도를 보인 반면, 효소에 의한 생분해 속도는 더디게 일어나는 것을 확인하였다. 본 GA-GC 하이드로젤은 다양에 용도 및 적용부위에 따라 기계적 물성, 조직접착성, 생분해성의 조절이 용이하고, 낮은 세포독성을 보임으로써 조직접착성 생체재료로서 유용하게 응용될 것으로 전망된다.

감사의 글: 이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

참 고 문 헌

1. Bao, Z. X.; Gao, M. H.; Sun, Y.; Nian, R.; Xian, M. The Recent Progress of Tissue Adhesives in Design Strategies, Adhesive Mechanism and Applications. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2020**, 111, 110796.
2. Zhao, P. C.; Yin, C.; Zhang, Y.; Chen, X. Y.; Yang, B. G.; Xia, J.; Bian, L. M. Mussel Cuticle-Mimetic Ultra-Tough, Self-Healing Elastomers with Double-Locked Nanodomains Exhibit Fast Stimuli-Responsive Shape Transformation. *J. Mater. Chem. A* **2020**, 8, 12463-12471.
3. Dunn, C. J.; Goa, K. L. Fibrin Sealant - A Review of Its Use in Surgery and Endoscopy. *Drugs* **1999**, 58, 863-886.
4. Spotnitz, W. D. Commercial Fibrin Sealants in Surgical Care. *Am. J. Surg.* **2001**, 182, 8s-14s.
5. Carvalho, M. V. H.; Marchi, E.; Fruchi, A. J.; Dias, B. V. B.; Pinto, C. L.; dos Santos, G. R.; Acencio, M. M. P. Local and Systemic Effects of Fibrin and Cyanoacrylate Adhesives on Lung Lesions in Rabbits. *Clinics* **2017**, 72, 624-628.
6. Han, H. H.; Rhie, J. W. Surgical Sealants, Glues and Adhesive Agents in the Medical Market. *J. Korean Med. Assoc.* **2014**, 57, 609-613.
7. Bouten, P. J. M.; Zonjee, M.; Bender, J.; Yauw, S. T. K.; van Goor, H.; van Hest, J. C. M.; Hoogenboom, R. The Chemistry of Tissue Adhesive Materials. *Prog Polym Sci.* **2014**, 39, 1375-1405.
8. Lee, Y. Recent Development of Chemical Adhesives for Medical Applications. *Polym. Sci. Technol.* **2014**, 25, 402-410.
9. Jiang, T.; James, R.; Kumbar, S. G.; Laurencin, C. T. Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery, In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Kumber, S., Laurencin, C., Deng, M., Eds.; 1st ed.; Elsevier: Burlington, USA, 2014, pp 91-107.
10. Bakshi, P. S.; Selvakumar, D.; Kadirvelu, K.; Kumar, N. S. Chitosan as an Environment Friendly Biomaterial - A Review on Recent Modifications and Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 150, 1072-1083.
11. Jayakumar, R.; Prabaharan, M.; Kumar, P. T. S.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomaterials Based on Chitin and Chitosan in Wound Dressing Applications. *Biotechnol. Adv.* **2011**, 29, 322-337.
12. Anitha, A.; Sowmya, S.; Kumar, P. T. S.; Deepthi, S.; Chennazhi, K. P.; Ehrlich, H.; Tsurkan, M.; Jayakumar, R. Chitin and Chitosan in Selected Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39, 1644-1667.
13. Cho, I. S.; Oh, H. M.; Cho, M. O.; Jang, B. S.; Cho, J. K.; Park, K. H.; Kang, S. W.; Huh, K. M. Synthesis and Characterization of Thiolated Hexanoyl Glycol Chitosan as a Mucoadhesive Thermogelling Polymer. *Biomater. Res.* **2018**, 22, 249-258.
14. Park, M. K.; Li, M. X.; Yeo, I.; Jung, J.; Yoon, B. I.; Joung, Y. K. Balanced Adhesion and Cohesion of Chitosan Matrices by Conjugation and Oxidation of Catechol for High-Performance Surgical Adhesives. *Carbohydr. Polym.* **2020**, 248, 116760.
15. Ryu, J. H.; Hong, S.; Lee, H. Bio-inspired Adhesive Catechol-Conjugated Chitosan for Biomedical Applications: A Mini Review. *Acta Biomater.* **2015**, 27, 101-115.
16. Cho, I. S.; Park, C. G.; Huh, B. K.; Cho, M. O.; Khatun, Z.; Li, Z. Z.; Kang, S. W.; Bin Choy, Y.; Huh, K. M. Thermosensitive Hexanoyl Glycol Chitosan-Based Ocular Delivery System for Glaucoma Therapy. *Acta Biomater.* **2016**, 39, 124-132.
17. Cho, I. S.; Cho, M. O.; Li, Z.; Nurunnabi, M.; Park, S. Y.; Kang, S. W.; Huh, K. M. Synthesis and Characterization of a New Photo-Crosslinkable Glycol Chitosan Thermogel for Biomedical Applications. *Carbohyd. Polym.* **2016**, 144, 59-67.
18. Ejima, H.; Richardson, J. J.; Liang, K.; Best, J. P.; van Koeverden, M. P.; Such, G. K.; Cui, J. W.; Caruso, F. One-Step Assembly of Coordination Complexes for Versatile Film and Particle Engineering. *Science* **2013**, 341, 154-157.
19. Wang, Y.; Park, J. P.; Hong, S. H.; Lee, H. Biologically Inspired Materials Exhibiting Repeatable Regeneration with Self-Sealing Capabilities without External Stimuli or Catalysts. *Adv Mater.* **2016**, 28, 9961-9968.
20. Oh, D. X.; Kim, S.; Lee, D.; Hwang, D. S. Tunicate-Mimetic Nanofibrous Hydrogel Adhesive with Improved Wet Adhesion. *Acta Biomater.* **2015**, 20, 104-112.
21. Sanandiya, N. D.; Lee, S.; Rho, S.; Lee, H.; Kim, I. S.; Hwang, D. S. Tunichrome-Inspired Pyrogallol Functionalized Chitosan

for Tissue Adhesion and Hemostasis. *Carbohyd. Polym.* **2019**, 208, 77-85.
22. Cho, J. H.; Lee, J. S.; Shin, J.; Jeon, E. J.; An, S.; Choi, Y. S.; Cho, S. W. Ascidian-Inspired Fast-Forming Hydrogel System for Versatile Biomedical Applications: Pyrogallol Chemistry for Dual Modes of Crosslinking Mechanism. *Adv Funct. Mater.* **2018**, 28, 1705244.
23. Pasanphan, W.; Chirachanchai, S. Conjugation of Gallic Acid onto Chitosan: An Approach for Green and Water-Based Antioxidant. *Carbohyd. Polym.* **2008**, 72, 169-177.
24. Pasanphan, W.; Buettner, G. R.; Chirachanchai, S. Chitosan Conjugated with Deoxycholic Acid and Gallic Acid: A Novel Biopolymer-Based Additive Antioxidant for Polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, 109, 38-46.
25. Xie, M. H.; Hu, B.; Wang, Y.; Zeng, X. X. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities and Alters Rheological Properties of the Copolymer. *J. Agr. Food Chem.* **2014**, 62, 9128-9136.
26. Miao, T. X.; Fenn, S. L.; Charron, P. N.; Oldinski, R. A. Self-Healing and Thermoresponsive Dual-Cross-Linked Alginate Hydrogels Based on Supramolecular Inclusion Complexes. *Biomacromolecules* **2015**, 16, 3740-3750.
27. Qu, J.; Zhao, X.; Liang, Y. P.; Zhang, T. L.; Ma, P. X.; Guo, B. L. Antibacterial Adhesive Injectable Hydrogels with Rapid Self-Healing, Extensibility and Compressibility as Wound Dressing for Joints Skin Wound Healing. *Biomaterials* **2018**, 183, 185-199.
28. Park, E.; Lee, J.; Huh, K. M.; Lee, S. H.; Lee, H. Toxicity-Attenuated Glycol Chitosan Adhesive Inspired by Mussel Adhesion Mechanisms. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, 8, 1900275.
29. Zhu, N. Q.; Wang, M. F.; Wei, G. J.; Lin, J. K.; Yang, C. S.; Ho, C. T. Identification of Reaction Products of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin Gallate and Pyrogallol with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical. *Food Chem.* **2001**, 73, 345-349.

출판자 공지사항: 한국고분자학회는 게재된 논문 및 기관 소속의 관할권 주장과 관련하여 중립을 유지합니다.