약학회지 제 48 권 제 1 호 55~59 (2004)
Yakhak Hoeji Vol. 48, No. 1

藥學會誌

화상 및 창상 치료용 외용제제 개발에 대한 기초 연구

조동현 · 신영희#
경성대학교 약학대학
(Received January 28, 2003; Revised February 12, 2004)

Studies on the Wound Healing by the PVA-soft hydrogel

Dong-hyun Cho and Young-hee Shin#
College of pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736

Abstract — A PVA-soft hydrogel, which is a semi-solid form in container, whereas after applying on the skin, it formed a thin layer within a few minutes. In this study, we prepared a novel type PVA-soft hydrogel containing 6-methyluracil as active drug, and the therapeutic value was characterized. To evaluate the therapeutic value of the PVA-soft hydrogel containing drug, various animal models, thermal burn model, incision & excision wound rat model were used. We also measured the wound size and breaking strength to calculate the wound healing extent after single or multiple administration. The wound size of soft hydrogel treated group decreased rapidly than that of control group after multiple dosing in excision wound model. And, the breaking strength of the soft hydrogel treated group was greater than that of control group in incision wound model.

Keywords □ soft-hydrogel, wound healing, thermal burn model, incision & excision wound model

피부를 통한 약물송달시스템 즉, 경피흡수시스템(Transdermal Therapeutic System, TTS)은 피부를 통하여 일정속도로 약물을 투여함으로서 국소 뿐만 아니라 전신작용을 기대할 수 있으며 적용하기 간편하고 부작용 발생 시 쉽게 제거할 수 있다는 특징 등 많은 장점을 가지고 있으므로 주목받고 있다.[1] 특히 방출속도를 조절할 목적으로 고분자물질을 이용한 polymeric delivery system에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.[2-4]

Lee 등[5]은 poly vinyl alcohol(PVA)을 이용한 peel-off type의 soft hydrogel을 제조하고 이들의 약물방출 특성에 관하여 보고한 바 있다. PVA는 무독성이며 수용성의 고분자 물질로서 피부 적용 시 필름 형성력이 우수하며, 강도가 높고, 친수성 성질을 가지고 있으며 알칼리성에 잘 견디므로 fibers, films, sponges, coatings, cosmetics, pharmaceutics 등 화학공업이나 의료 공학에 매우 유용하게 이용되고 있다.[6-8] Peel-off type의 soft hydrogel은 기밀용기 내 저장 시에는 반 고형상태이나 피부 적용 시 박막을 형성하므로 피부의 보호기능 뿐만 아니라 지속적인 약물 방출력을 가지고 있는 겔 타입의 외용 제제이다.

본 연구에서는 peel-off type의 soft hydrogel을 이용하여 피부의 상처부위의 치료에 영향을 미치는 약물 송달시스템에 관하여 연구하고자 한다. 수용성 고분자 물질인 PVA로 제조한 soft hydrogel을 적용하여 피부 적용 시 형성된 박막으로 상처 부위를 보호하고, 삼출물을 흡수 제거하며, 형성된 박막으로부터의 지속적인 약물 방출로 인하여 wound healing에 효과적일 것으로 생각하여 여러 가지 동물모델에 적용하고 그 효과를 평가하고자 하였다. Model 약물로는 세포재생능력이 있는 6-methyluracil[9]을 사용하여 soft hydrogel을 제조하여 동물모델에 적용하였다. 실험에 사용한 동물 모델은 thermal burn rat model, incision & excision wound rat model을 각각 작성하여 평가하였다.

실험방법

실험동물

실험동물로서는 대한실험동물센터에서 분양 받은 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(200~250 g)를 일정한 조건(온도 : 20±2°C, 습도 : 50±5%, 12시간 명암주기)에서 1주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4886 (팩스) 051-628-6540
(E-mail) yhshin@ks.ac.kr

시약 및 기구

6-methyluracil, 에탄올, 폴리에칠렌글리콜#1540, 프로필렌글리콜, 글리세린, Tween 60®, 디메칠포름아미드는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였으며, 폴리비닐알콜(PVA)은 Nihon Coshei사(Tokyo, 일본)에서 구입하였으며, pirotiodecane(1-2[(decylthio)ethyl] azacyclopentane-2-one, HPE-101®)은 Hisamitsu Pharm. Co.(Tokyo, 일본)에서 기증 받아 사용하였다. 그 외 시약들은 특급시약 또는 LC grade를 사용하였다. 분석기기로서 Hitachi HPLC system(L-4000H UV Detector, L-7100 Pump, D-2500 Chromato-integrator)을, breaking strength tester (Shimadzu, S-100 Universal testing machine), optical microscope(Olympus사, BH-2) 및 thermal controlled device(Jfli사, Temperature controlled soldering station, JF96, 대만)를 사용하였다.

Soft hydrogel의 처방 및 조제

실험에 사용한 Soft hydrogel은 기 보고된 Lee[5] 등의 방법에 따라 조제하였다. 제조 방법을 간략히 설명하면 먼저 PVA 및 에탄올을 정제수 약 50 ml에 혼합하여 미리 soaking한 다음, 85℃로 가열하여 둔다. 별도로 폴리에칠렌글리콜#1540, 에탄올, 프로필렌글리콜, 글리세린, Tween 60® 그리고 피부투과 촉진제 및 나머지 물을 칭량하여 전부 혼화한 후, 85°C로 가열하고 이를 미리 soaking하여둔 용액에 가하고 800 rpm으로 30분간 교반 혼화한 후 50°C로 하여 둔다. 별도로 디메칠포름아미드에 용해한 active agent를 위의 50°C 용액에 가하여 실온까지 교반하여 제조한 다음 기밀용기에 보관하여 실험에 사용하였다. 이때 피부투과 촉진제로 pirotiodecane(1-[2[(decylthio)ethyl] azacyclopentane-2-one, HPE-101®)[10]을 사용하였다.

Thermal burn rat model 작성 및 치료효과 평가

Thermal burn rat model 작성[11-15] – SD계 흰쥐(200~250 g)를 펜토바르비탈 나트륨(50 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 후 electric clipper로 등 피부의 털을 피부에 상처가 나지 않도록 주의하여 제거하였다. 털이 깨끗이 제거된 등 피부에 직경 1 cm인 thermal controlled device를 이용하여 200°C에서 60초간 적용하여 thermal burn model을 작성하였다.

체중 변화 관찰 비교 – 위와 같이 작성한 thermal burn rat model에서 대조군으로는 약물을 적용하지 않았고 약물처치군은 매일 1% 6-methyluracil soft hydrogel을 1 g씩 적용하였으며, 각 군은 12마리씩으로 하였다. Thermal burn rat model 작성 후 제 1, 2, 3, 4, 6, 7 , 8, 10, 11, 12 및 14일째 각각 흰쥐의 체중을 측정하여 비교하였다.

Burn grade 변화 관찰 비교 – 체중 변화 관찰 시와 동일한 방법으로 thermal burn rat model을 작성하였다. 약물을 적용하지 않은 군을 대조군으로 하고, 약물처치군에는 매일 1% 6-methyluracil soft hydrogel을 1 g씩 적용하여 제 1, 2, 3, 4, 6, 7 및 9일째 각각 rat의 burn grade를 측정하여 비교하였다. Burn grade는 전체 상처부위를 6등분으로 나누어서 가피의 유무를 관찰한 후 가피가 존재하는 부위에 해당하는 수치를 더하였다. 전체적으로 가피가 다 존재하는 경우 burn grade는 6이라 하고, 가피가 하나도 없이 모두 새로운 피부가 형성된 경우 burn grade는 0이라 하였으며, 이 기준에 따라서 burn grade를 정하였다.

Incision wound rat model 작성 및 breaking strength 측정

털을 깨끗이 제거한 흰쥐의 척추와 평행한 등 피부의 중앙으로부터 양쪽 1.5 cm 부분을 surgical scissors로 3 cm 절개하여 incision wound rat model을 작성하였다.[16-18] 상처는 0.5 cm 간격으로 매듭 없이 연결하여 봉합하고 각각 한쪽은 대조군(약물을 처치하지 않은 군)으로 하고 반대편 쪽은 약물처치군으로 1% 6-methyluracil soft hydrogel을 매일 1 g씩 적용하였으며 각 군은 12마리씩으로 하였다. Incision wound rat model 작성 후 제 3, 5, 7 및 9일째 각 군의 동물 3마리씩을 희생하여 상처부위를 취하여 breaking strength를 측정하였다. Breaking strength 측정 방법은 시료를 breaking strength tester에 고정시킨 후 시료의 양쪽에 일정한 속도로 힘을 늘려가면서 상처부위의 결합이 끊어질 때까지 가한 힘의 세기를 측정하였다.

Excision wound rat model 작성 및 약효평가

털을 깨끗이 제거한 흰쥐의 등 피부에 직경 0.8 cm인 skin punch를 이용하여 등 피부를 punching하여 excision wound rat model을 작성하였다.[19,20] 약물을 적용하지 않는 군을 대조군으로 하고 약물처치군은 제 5일째까지 매일 1회 6-methyluracil soft hydrogel을 1 g씩 적용하였다. 각 군을 12마리로 하였으며 상처치료에 대한 평가는 초기 상처의 크기에 대한 관찰시(0, 1, 3 및 5일) 상처 크기의 백분율로 하였다.

결과 및 고찰

Thermal burn rat model

Thermal burn rat model의 체중 변화 – Thermal burn rat model의 경우 thermal controlled device로 200°C에서 60초간의 적용시 3도의 화상이 유발되었다. 3도 화상으로 인한 burn shock 등에 의하여 체중이 감소할 것이 예상되었으며 체중이 정상적으로 증가하는 시점부터 상처의 회복이 어느 정도 진행되는 것으로 추정되어 thermal burn rat model의 체중의 변화를 관찰하였다. 화상 유발 후 약물처치가 없는 대조군은 화상 유발 후 3일째에 초기체중의 약 10% 정도 감소현상이 나타났으나 그 이후에

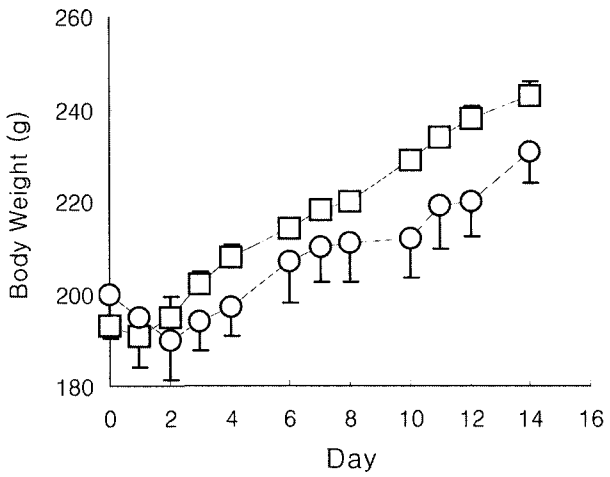

Fig. 1 – Change of body weight in thermal burn rat model. Key; □, Control group. ○, 6-methyluracil soft hydrogel group.

는 회복되는 양상을 나타내었으며 1% 6-methyluracil soft hydrogel을 처치한 군은 화상유도 초기부터 체중 감소 없이 지속적으로 증가하였다(Fig. 1). 이것으로 보아 화상유도 초기에 약물을 적용할 경우 wound healing에 도움이 될 것으로 예측되었다.

Thermal burn rat model의 burn grade 변화 – Thermal burn rat model의 wound healing 정도를 평가하기 위하여 burn grade를 측정하였다. Burn grade는 화상 부위의 가피를 6등분으로 하여서 가피의 색상, 회복정도를 기준으로 판단하였다. Burn grade가 높을수록 회복이 지연된 것이며, burn grade가 낮을수록 회복이 촉진된 것을 나타낸다. 1% 6-methyluracil soft hydrogel을 적용한 군이 초기에는 burn grade가 높았으나 2일 이후 점차 감소하는 경향을 보여주고 있으나, 대조군은 오히려 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 2). 약물처치군이 초기에 burn grade가 증가하는 이유는 가피의 빠른 형성으로 인하여 가피의 색상이 짙어짐에 의한 것이고, 그 이후 가피 아래의 피부부위는 점차 새로운 조직이 형성되고 있으므로 burn grade는 낮아졌다. 이에 반해 대조군은 새로운 조직 형성이 전반적으로 느리게 진행됨으로 인하여 가피의 형성도 늦게 되어 약물처치군에 비하여 초기의 burn grade는 낮으나 점차 burn grade가 증가하는 양상을 나타내었다.

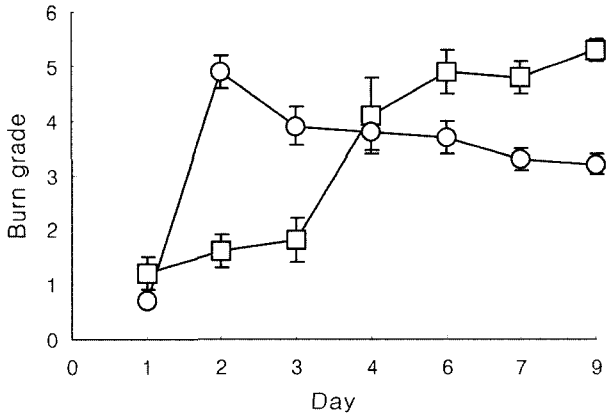

Fig. 2 – Change of burn grade in thermal burn rat model. Key; □, Control group. ○, 6-methyluracil soft hydrogel group.

Incision wound rat model

Breaking strength의 비교 – Incision wound rat model에서는 상처의 치유가 빠를수록 상처부위에서 섬유상으로 결합하게 되어 결합력이 강할 것으로 생각하여 상처의 회복정도를 알아보는 지표로 상처부위의 결합력을 측정하는 방법을 사용하였다. 상처 부위의 결합력은 상처부위의 breaking strength를 통하여 간접적으로 비교, 평가하였다. Breaking strength는 상처 부위의 결합이 어느 일부분이라도 분리되는 점을 기준으로 하여 측정하였다. 1% 6-methyluracil soft hydrogel group과 대조군의 제 3, 5, 7 및 9일째 각각 동물을 희생하여 상처부위를 채취한 후 breaking strength를 측정한 결과 약물 처치군의 wound healing 효과가 제 9일째의 경우에는 30% 이상 개선됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 이로서 약물처치 시 incision wound rat model에서 상처의 결합력이 강해짐으로부터 섬유상의 결합의 형성을 촉진함을 알 수 있었다.

Excision wound rat model

예비실험 – Soft hydrogel의 구성성분인 PVA는 피부 적용 시 필름 형성력이 우수하며, 강도가 높아서 상처부위의 보호기능 뿐만 아니라 지속적인 약물의 방출력을 가질 것으로 생각되었다. 그래서 soft hydrogel 제제의 피부보호효과 및 작용지속의 성질을 평가하기 위하여 실험동물에 초기 1회 1 g 약물 함유 soft hydrogel 적용 후 10일간 치료효과를 측정하였다. 이 실험은 피막형성 후 인위적인 제거 시까지 피막의 유지 뿐만아니라 지속

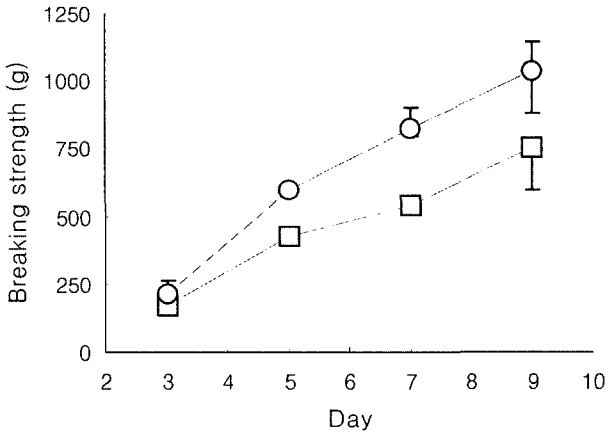

Fig. 3 – Effect of wound healing of 6-methyluracil soft hydrogel on incision wound rat model. Key; □, Control group. ○, 6-methyluracil soft hydrogel group.

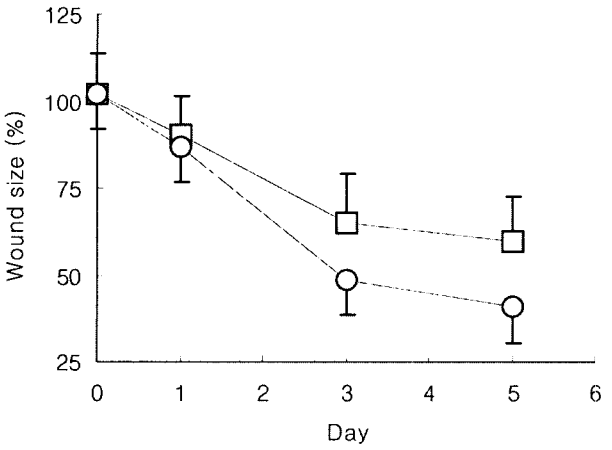

Fig. 4 – Effect of wound healing of 6-methyluracil soft hydrogel on excision wound rat model by multiple dosing. Key; □, Control group. ○, 6-methyluracil soft hydrogel group.

적인 약물의 방출 정도를 측정하기 위하여 수행하였다. 그러나 약물처치군과 대조군은 유의성 있는 치료효과의 차이를 나타내지 않아(data not shown) excision wound rat model 작성 후 1회 약물 적용으로는 유의성 있는 결과를 구할 수 없어 매일 1회 적용하는 방법을 사용하였다.

반복 적용에 의한 상처 크기 비교 – 앞선 예비실험에서 약물을 1회 적용 시 별다른 치료효과의 차이를 나타내지 못하였으므로 매일 반복 적용하는 방법을 선택하였다. 인위적인 피막의 제거 시 피부자극을 최소화하기 위하여 전일 약물처치로 형성된 피막을 생리식염수로 수화하여 피막을 제거한 후 약물처치를 반복하였으며, 제 1, 3 및 5일 후 상처의 크기를 비교하였다. 그 결과 대조군에 비하여 약물처치군의 상처 크기가 제 5일째의 경우 33% 정도 작아짐을 알 수 있었다(Fig. 4).

결 론

1. Thermal burn rat model의 경우 체중 변화는 6-methyluracil 함유 soft hydrogel 처치군은 대조군에 비하여 초기 감소 없이 증가하였으며, burn grade는 초기에 비하여 soft hydrogel 처치군이 유의성 있게 감소하였다.

2. Incision wound rat model의 경우 breaking strength는 6-methyluracil 함유 soft hydrogel 처치군이 대조군에 비하여 breaking strength의 현저한 증가가 있음을 알 수 있었다.

3. Excision wound rat model의 경우 6-methyluracil 함유 soft hydrogel을 반복 처치한 군의 상처 회복이 빠르게 진행됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 PVA soft hydrogel이 thermal burn rat model, incision & excision wound rat model의 피부에 도포되면 겔화되어 피막을 형성하여 외부로부터의 피부보호작용을 가지며 또한 형성된 피막으로부터 약물이 방출, 흡수되어 화상이나 창상의 치료에 도움을 주는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도 경성대학교 연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드린다.

참고문헌

1) Johnson, P., Hansen, D., Matarazzo, D., Petterson, L., Swisher, C. and Trappolini, A. : Transderm Scop for prevention of motion sickness. *N. Engl. J. Med.* **311**(7), 468 (1984).
2) Schneeweiss, A. and Marmor, A. : Transdermal nitroglycerin patches for silent myocardial ischemia during antianginal treatment. *Am. J. Cardiol.* **61**(9), 36E (1988).
3) Chien, Y. W. : Pharmaceutical considerations of transdermal nitroglycerin delivery: the various approaches. *Am. Heart. J.* **108**(1), 207 (1984).
4) Letendre, P. W., Barr, C. and Wilkens, K. : Adverse dermatologic reaction to transdermal nitroglycerin. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **18**(1), 69 (1984).
5) Lee, E. K., Shin, Y. H. and Lee, C. H. : Anti-inflammatory Activity of Ketoprofen Soft Hydrogel. *J. Kor. Pharm. Sci.* **29**(2), 137 (1999).
6) Morimoto, K., Fukanoki, S., Hatakeyama, Y., Nagayasu, A. and Morisaka, K. : Design of a polyvinyl alcohol hydrogen containing phospholipid as controlled-release vehicle for rectal administration of (dl)-propranolol HCl. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**(10), 720 (1990).
7) Morimoto, K., Nagayasu, A., Fukanoki, S., Morisaka, K., Hyon, S. H. and Ikada, Y. : Evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel as a sustained-release vehicle for rectal administration of indomethacin. *Pharm. Res.* **6**(4), 338 (1989).
8) Suzuki, Y., Tanihara, M., Nishimura, Y., Suzuki, K., Kakimaru, Y. and Shimizu, Y. : A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**(1), 112 (1998).
9) Raake, W. and Tempel, K. : Effects OR 6-methyl-uracil upon the phargocytic activity in mice following whole-body X-irradiation OR 2,4,6-triethyleneimino-s-triazine treatment. *Strahlentherapie.* **153**(12), 843 (1977).
10) Yano, T., Higo, N., Furukawa, K., Tsuji, M., Noda, K. and Otagiri, M. : Further evaluation of a new penetration enhancer, HPE-101. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**(9), 775 (1993).
11) Dressler, D. P., Barbee, W. K. and Sprenger, R. : The effect of Hydron burn wound dressing on burned rat and rabbit ear wound healing. *J. Trauma* **20**(12), 1024 (1980).

12) Choi, M. and Ehrlich, H. P. : U75412E, a lazaroid, prevents progressive burn ischemia in a rat burn model. *Am. J. Pathol.* **142**(2), 519 (1993).
13) Eloy, R. and Cornillac, A. M. : Wound healing of burns in rats treated with a new amino acid copolymer membrane. *Burns* **18**(5), 405 (1992).
14) Regas, F. C. and Ehrlich, H. P. : Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. *J. Trauma* **32**(5), 557 (1992).
15) Kuroda, T., Harada, T., Tsutsumi, H. and Kobayashi, M. : Hypernatremia deepens the demarcating borderline of leukocytic infiltration in the burn wound. *Burns* **23**(5), 432 (1997).
16) Drenda, P., Lampe, P., G'orka, Z., Bursig, H. and Dylag, S. : Evaluation of the usefulness of dressings made from chitosan and lyophilized human placenta on wound healing. *Wiad Lek* **50**(1), 252 (1997).
17) Allendorf, J. D., Bessler, M., Huang, J., Kayton, M. L., Laird, D., Nowygrod, R. and Treat, M. R. : Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm^2 failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. *Lasers Surg. Med.* **20**(3), 340 (1997).
18) Witte, M. B., Thornton, F. J., Kiyama, T., Efron, D. T., Schulz, G. S., Moldawer, L. L. and Barbul, A. : Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery* **124**(2), 464 (1998).
19) Margaret, I. and Jamil, K. : Influence of naproxen on the healing of open excision wound in rats. *Biomed. Sci. Instrum.* **33**, 226 (1997).
20) Saha, K., Mukherjee, P. K., Das, J., Pal, M. and Saha, B. P. : Wound healing activity of Leucas lavandulaefolia Rees. *J. Ethnopharmacol.* **56**(2), 139 (1997).