

핵의학 영상을 이용한 chitosan의 galactosylation 효과에 대한 평가

원광대학교 의과대학 핵의학교실¹, 원광대학교 의과학 연구소², 서울대학교 농생명공학부³,
전남대학교 의과대학 핵의학교실⁴
정환정^{1,2} · 김은미^{1,2} · 박인규³ · 조종수³ · 김창근^{1,2} · 범희승⁴

Nuclear Imaging Evaluation of Galactosylation of Chitosan

Hwan-Jeong Jeong, MD.^{1, 2}, Eun-Mi Kim, MS.^{1, 2}, In-Kyu Park, Ph.D.³, Chong Su Cho, Ph.D.³,
Chang-Guhn Kim, MD.^{1, 2}, Hee-Seung Bom, MD.⁴

Department of Nuclear Medicine¹, Wonkwang University School of Medicine, Wonkwang Institute of Medical Science Iksan, Korea

School of Agricultural Biotechnology³, Seoul National University, Seoul, Korea

Department of Nuclear Medicine⁴, Chonnam National University School of Medicine, Gwang-ju, Korea

Purpose: Chitosan has been studied as a non-viral gene delivery vector, drug delivery carrier, metal chelator, food additive, and radiopharmaceutical, among other things. Recently, galactose-graft chitosan was studied as a non-viral gene and drug delivery vector to target hepatocytes. The aim of this study was to investigate the usefulness of nuclear imaging for *in vivo* evaluation of targeting the hepatocyte by galactose grafting. **Methods and Materials:** Galactosyl methylated chitosan (GMC) was produced by methylation to lactobionic acid coupled chitosan. Cytotoxicity of ^{99m}Tc-GMC was determined by MTT assay. Rabbits were injected via their auricular vein with ^{99m}Tc-GMC and ^{99m}Tc-methylated chitosan (MC), the latter of which does not contain a galactose group, and images were acquired with a gamma camera equipped with a parallel hole collimator. The composition of the galactose group in galactosylated chitosan (GC), as well as the tri-, di-, or mono-methylation of GMC, was confirmed by NMR spectroscopy. **Results:** The results of MTT assay indicated that ^{99m}Tc-GMC was non-toxic. ^{99m}Tc-GMC specifically accumulated in the liver within 10 minutes of injection and maintained high hepatic uptake. In contrast, ^{99m}Tc-MC showed faint liver uptake. ^{99m}Tc-GMC scintigraphy of rabbits showed that the galactose ligand principally targeted the liver while the chitosan functionalities led to excretion through the urinary system. **Conclusion:** Bioconjugation with a specific ligand endows some degree of targetability to an administered molecule or drug, as in the case of galactose for hepatocyte *in vivo*, and evaluating said targetability is a clear example of the great benefit proffered by nuclear imaging. (Korean J Nucl Med 38(3):253-258, 2004)

Key Words: ^{99m}Tc, hepatocyte-targeted, nuclear imaging, galactosylated chitosan

서 론

키틴과 키토산은 천연에 존재하는 생분해성 다당류로서 최근에 특히 주목을 받고 있는 신기능성 소재이다. 키틴은 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육, 그리고 곤충류, 버섯류 및

사상균의 세포벽 등에 함유되어 있으며, 연간 생산되는 양이 100 억톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있다.¹⁾ 키토산은 생분해성이며, 독성이 없으며, 생체적합성이 높고, 면역반응을 일으키지 않는 등의 여러 가지 장점으로 인해 많은 연구자들에 의해 연구되어져 조직공학(tissue engineering), 약물 전달담체(drug delivery carrier), 유전자전달벡터(gene delivery vector), 금속이온 착화제(metal chelating agent), 식품보조제(food additives) 등 여러 가지 용도로 사용되고 연구되어지고 있다.²⁻⁶⁾ 또한 키토산을 이용한 방사성의약품도 최근에 개발되어 보고된 바 있다.⁷⁾

핵의학 영상을 이용한 연구기법은 세포막에 존재하는 특정

• Received: 2003. 11. 28. • Accepted: 2004. 4. 14.

• Address for reprints: Chang-Guhn Kim, M.D., Department of Nuclear Medicine Wonkwang University Hospital 344-2 Sinyong-dong, Iksan Jellabuk-do, 570-711, Korea

Tel : 82-63-850-2822, Fax : 82-63-852-1310

E-mail : leokim@wonkwang.ac.kr

※ 본 논문은 2003년도 원광대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었음.

수용체에 결합하는 리간드를 사용하거나, 세포내 소기관에 결합하는 화합물을 이용하거나, 또는 특정 장기나 조직의 세포에서 섭취되는 화합물을 이용하여 원하는 장기나 조직의 기능을 평가하고 병적인 상태를 평가할 수 있는 것으로 알려져 있다. 핵의학 영상법으로 간 기능을 평가하는데는 기전에 따라 크게 2가지로 분류할 수 있다. 하나는 간세포의 기능과 담관의 개통성을 평가하는 것이고, 다른 하나는 쿠퍼 세포(Kupffer cell)의 탐식능을 평가하는 것이다. Dye와 친지질성 (lipophilic) 계열은 전자에 속하며, 교질 형태를 사용하는 것은 후자에 속한다.⁸⁻⁹⁾ 후자의 교질 간스캔의 경우 추적자가 간세포가 아닌 탐식세포에서 섭취되므로 간세포의 기능을 간접적으로 반영한다는 문제점이 있다.¹⁰⁾ 다양한 연구분야에서 여러가지 리간드를 붙힌 고분자를 이용하여 간세포를 표적·지향하는 실험이 연구되고 있는데 갈락토스, apolipoprotein E, 락토스 등을 붙여 간세포를 목표로 한 실험들이 그 예이다.¹¹⁻¹⁴⁾ 핵의학에서 간세포에 존재하는 특정 리간드를 목표로 하여 만들어진 방사성의약품으로는 현재 일본 Medi-Physics (Nishinomia, Japan)에서 개발된 ^{99m}Tc galactosylated human serum albumin (GSA)이 있으며, 최근 국내에서도 ^{99m}Tc lactosylated human serum albumin (LSA)가 개발되었다.¹⁵⁾ 이들은 모두 간세포의 세포막에 존재하는 asialoglycoprotein receptor (ASGP-R)에 결합하도록 제조된 방사성의약품이다.¹⁶⁾

키토산을 약물전달 담체나 유전자전달 벡터로 사용하기 위해서는 표적 지향성을 가지는 것이 매우 중요하며, 이러한 연구로서는 간세포 지향성에 관한 연구가 많이 이루어져 있다. 간세포 지향성을 위해서 위에서 언급한 ASGP-R과 결합시키기 위해 키토산에 갈락토스나 락토스 리간드를 결합시키는 방법이 많이 이용되어 왔다. 그러나 대부분의 연구들은 시험관내에서 HepG2와 같은 세포주를 대상으로 시행되어져 왔으며, 키토산에 갈락토스 리간드를 결합시켰을 때 체내에서 생체내 분포에 어떤 변화를 가져오는지에 대한 연구결과는 찾아보기가 힘들다. 갈락토스 수식 키토산의 생체내 영상을 통한 간 지향성 여부를 확인하는 것은 키토산을 backbone으로 한 전달시스템(delivery system) 관련연구에 있어서 매우 중요할 뿐만 아니라 키토산이 분자영상의학에 이용될 수 있는 가능성을 확인하는 데에도 중요하다고 하겠다.

저자들은 갈락토스 수식 키토산의 생체내 영상을 획득하는데 핵의학 영상법이 매우 유용할 것으로 판단하여, 갈락토스 수식 키토산을 제조한 후에 착화제를 사용하지 않고 테크네슘과 표지할 수 있는 방법을 고안하고 이를 이용하여 생체내 영상을 얻어 간 지향성 여부를 확인하여 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. Galactosyl methylated chitosan (GMC)의 합성

EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)와 NHS (N-hydroxysuccinimide), 그리고 lactobionic acid를 10 mM *N,N,N,N*-tetramethylethylenediamine (TEMED)/HCl buffer solution (pH 4.7)에 넣어 녹인 뒤 키토산(M ν 5k: 97% deacetylated)을 넣고 stirring 하면서 72시간 반응시켰다. 반응물에 50% hydroxylamine solution 0.6 ml을 넣고, NaOH를 넣어 최종반응물을 얻어냈다. 이것을 Spectra/Por7 membrane (MWCO = 3,500)에 넣어서 3일 동안 투석하여 동결 건조한 후 갈락토스 수식 키토산(Galactosylated chitosan, GC)을 얻었다. 0.1 g 갈락토스 수식 키토산을 0.24 g sodium iodide와 4 ml *N*-methyl-2-pyrrolidone에 넣어 60°C 에서 stirring하여 녹인다. 녹인 후에 15% aqueous sodium hydroxide solution 0.55 ml 과 0.6 ml methyl iodide를 넣어 1시간 동안 stirring하여 반응시켰다.¹⁷⁾ 반응물을 에탄올에 침전시켜 원심 분리한 후 10% NaCl aqueous solution 5 ml 에 녹여 95% 에탄올로 침전시켰다. 원심분리 후 에탄올과 에테르로 반복 침전시켜 건조시킨 후 최종반응물을 D₂O에 녹여 ¹H-NMR로 확인하였다 (Bruker, 600 MHz, Germany).

2. GMC의 ^{99m}Tc 표지

100 ug/ul GMC에 ^{99m}Tc을 표지하기 위하여 환원제인 SnCl₂ · 2H₂O를 사용하였다. SnCl₂ · 2H₂O는 HCl에 녹여 사용하였다. 환원제와 염산의 농도는 다양하게 변화를 주어가며 최적의 표지 효율을 보이는 농도로 결정하였다. 제조시 사용되는 증류수는 질소가스로 30분 이상 충전하여 사용하였다. 반응물에 222 MBq (6 mCi)의 Na^{99m}TcO₄을 넣어 실온에서 30분 반응시킨 후 0.22 um 필터 (Millipore, Bedford, Mass., USA)로 여과하였다. ^{99m}Tc-GMC의 표지 수율은 Instant thin layer chromatography-silica gel (ITLC-SG, Gelman Sciences INC.)를 사용하고 이동상으로는 아세톤과 생리식염수를 사용하여 전개시켰고, 이를 TLC scanner (BIOSCAN, Washington D.C., USA)를 사용하여 확인하였다.

3. GMC의 세포 독성측정

동물세포에 대한 화합물의 세포독성을 측정하기 위하여 HepG2 (human hepatocellular cancer cell line)와 HeLa (human cervix carcinoma cell line) 세포를 96-well plates에 세포수가 각각 5 × 10⁴ cells/ml 이 되도록 분주한 다음 37°C,

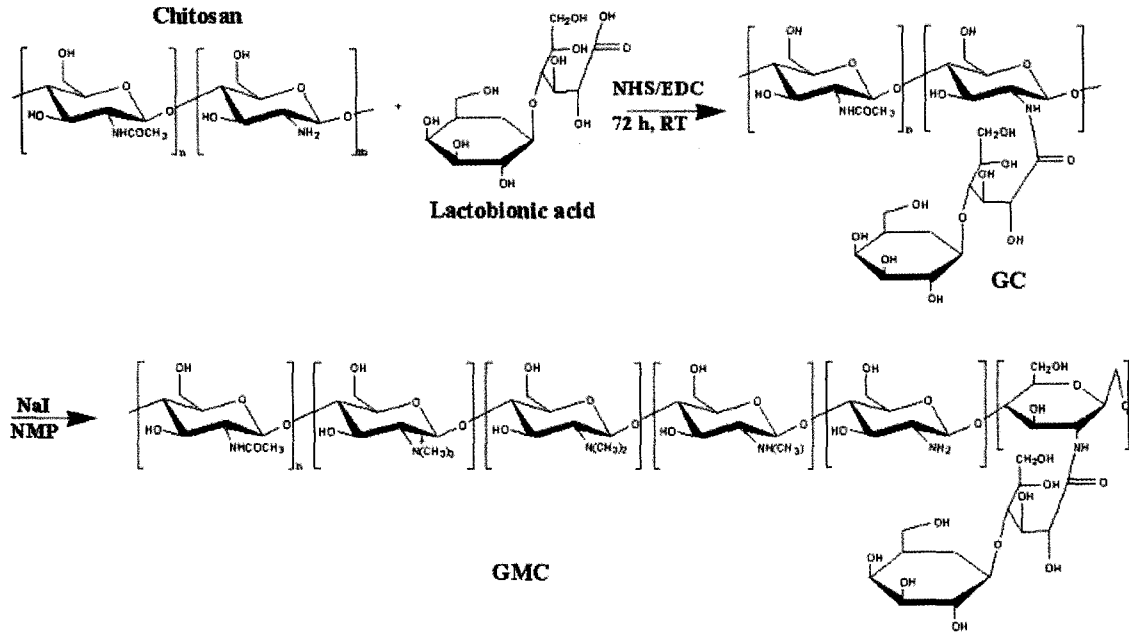


Fig 1. Schematic structures of galactosylated chitosan (GC) and galactosyl methylated chitosan (GMC).

5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. GMC를 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25와 100 ug/ml의 농도로 처리한 다음 24시간 배양하였다. 배양 후에 배지를 버리고 FBS free 배지로 채운 후 MTT (Sigma, USA, 5 mg/ml)가 함유된 PBS 20 ul를 각각 첨가한 후 37°C 에서 4 시간 배양시켰다. 배양 후에 배지를 버리고 well에 DMSO (dimethyl sulfoxide) 100 ul를 넣어 5분간 방치시켜 MTT formazen을 용해시키고 분광광도계 ELISA reader를 사용하여 흡광도 570 nm에서 그 발색정도를 측정하였다. 3회 반복 측정하여 구하였다.

5. ^{99m}Tc-GMC의 Imaging

케타민:렘폰을 4:1의 비로 혼합한 후 토끼의 외이정맥 (auricular vein)에 1.5 ml을 정맥주사하여 마취시킨 다음 ^{99m}Tc-GMC와 ^{99m}Tc-methylated chitosan (MC) 55.5 MBq (1.5 mCi)를 토끼의 외이정맥으로 주사하였다. 주사와 동시에 감마카메라(Vertex; ADAC laboratories, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 10분, 30분, 60분, 90분 간격으로 전면영상을 얻었다.

6. 통계분석

자료의 분석은 SPSS 11.0 version (standard version, SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하였으며, 세포독성을 측정하기 위해 시행한 GMC 각 농도별 비교는 paired t-test를 시행하였으며, p 값 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의있는 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. GMC의 합성

키토산 5 kDa에 lactobionic acid 30 mol%를 반응시켜 얻은 화합물을 ¹H-NMR 피크의 면적을 계산한 결과 7.4 mol%의 갈락토스가 키토산에 결합한 것을 확인하였다. 갈락토스 수식 키토산에 메틸화한 결과는 tri, di, mono가 각각 8.8, 46, 35.2%인 것을 확인하였다(Fig. 1).

2. GMC의 ^{99m}Tc 표지

GMC에 222 MBq (6 mCi)의 Na^{99m}TcO₄를 사용하고 환원제와 염산의 농도를 다양하게 변화시켜 표지 시킨 결과 0.02N HCl, SnCl₂·2H₂O 10 ug을 사용했을 때 높은 표지 수율을 보였다. ITLC-SG를 이용한 크로마토그래피를 시행했을 때 아세톤에서는 15분과 1시간에서 각각 97.7%와 96.4%를 나타내었고, 생리식염수에서는 각각 96.3%와 96.8%의 표지 효율을 보여 평균 1시간까지 96%이상의 표지 효율을 나타내었다. ^{99m}Tc-GC의 경우는 아세톤에서는 96%에서 88%로, 생리식염수에서는 73.9%에서 72%로 ^{99m}Tc-GMC에 비하여 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다.

3. GMC의 세포 독성평가

96-well plates에 분주한 HepG2와 HeLa 세포주에 GMC를 농도에 따라 처리하여 MTT assay 한 결과 대조군(GMC를 배지에 처리하지 않은 군, HepG2: 100±5.3, HeLa: 100±1.6)과 비교하여

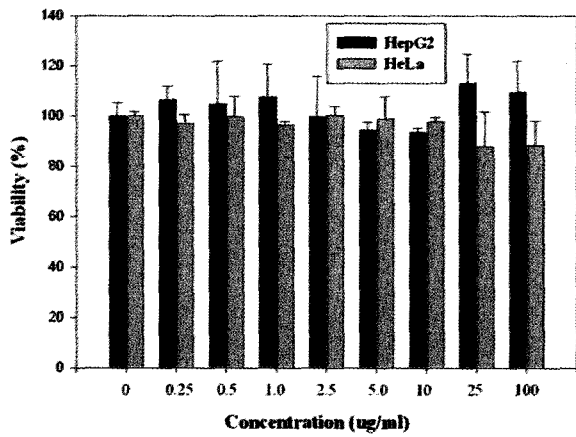


Fig 2. The viability of GMC in HepG2 and HeLa cells. There were no significant differences in the viability of control group when 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, and 100 ug/ml of GMC were added to each well against HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line) and HeLa cells (human cervix carcinoma cell line) ($p > 0.05$).

생존능은 각각 농도별로 HepG2에서는 106.3±5.7, 104.6±16.9, 107.5±13.1, 99.9±15.9, 94.4±3.1, 93.5±1.6, 113.1±11.6, 109.3±12.7 이었고, HeLa에서는 96.8±3.8, 99.7±7.9, 96.2±1.5, 100.2±3.8, 98.8±9.1, 97.8±1.6, 87.9±13.9, 88.5±9.6였으며, 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 2).

5. ^{99m}Tc-GMC의 Imaging

토끼의 외이정맥을 통해 ^{99m}Tc-GMC와 ^{99m}Tc-MC를 주사후 감마카메라를 이용하여 전면영상을 얻은 결과 ^{99m}Tc-GMC는 특이적으로 간에 집적되는 결과를 보였다. 주사후 10분 이내에 특

이적으로 간에 집적되었으며 90분까지 방사능의 분포에 큰 변화가 없는 분포를 얻을 수 있었으며, 관심영역을 그려 계산하여 본 결과 주사 후 10분째는 전신 방사능의 27%가, 주사후 90분째는 25%이상이 간에 집적되어 있음을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 ^{99m}Tc-MC의 경우 간 방사능은 GMC의 비해 약하게 관찰되고 대부분 신장에 모여 방광으로 배설되는 영상을 보였다(Fig. 3).

고 찰

이번 연구 결과는 핵의학 영상을 이용하여 갈락토스가 수식된 키토산이 수식되지 않은 키토산에 비해 간에 섭취되는 정도가 현저하게 증가됨을 객관적으로 보여주었으며, 이는 키토산의 glucosamine 중합체 중 리간드 그룹을 수식하기 위해 사용되는 부위 외에 리간드가 결합되지 않은 다른 부위를 부분적으로 메틸 화시킴으로써 간단하게 테크네슘을 표지할 수 있는 방법을 고안함으로써 가능하였다.

키토산은 키틴을 탈아세틸화한 것으로 glucosamine이 β-1,4결합으로 길게 중합되어 있고 전이금속과 착화합물을 잘 형성하며,^{5,6)} 독성이 매우 적고 생분해성과 생체적합성이 뛰어난 뿐만 아니라 다양한 생체유용성이 알려져 있다. 이번 연구의 세포독성 결과에서 GMC가 100 ug/ml의 매우 높은 농도에서까지 GMC를 넣지 않은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의있는 차이를 보이지 않았다는 것은 키토산의 생체적합성을 확인한 결과라 할 것이다(Fig. 2). 테크네슘은 -COO⁻, -OH, -NH₂, -SH같은 비공유 전자쌍을 가진 화학구조를 가진 물질과 배위공유결합을 형성할 수 있는데,^{9,18)} 키토산의 subunit가 glucosamine이므로 테크네슘과 배위공유결합을 할 수 있을 것으로 생각하였다. 갈락토스

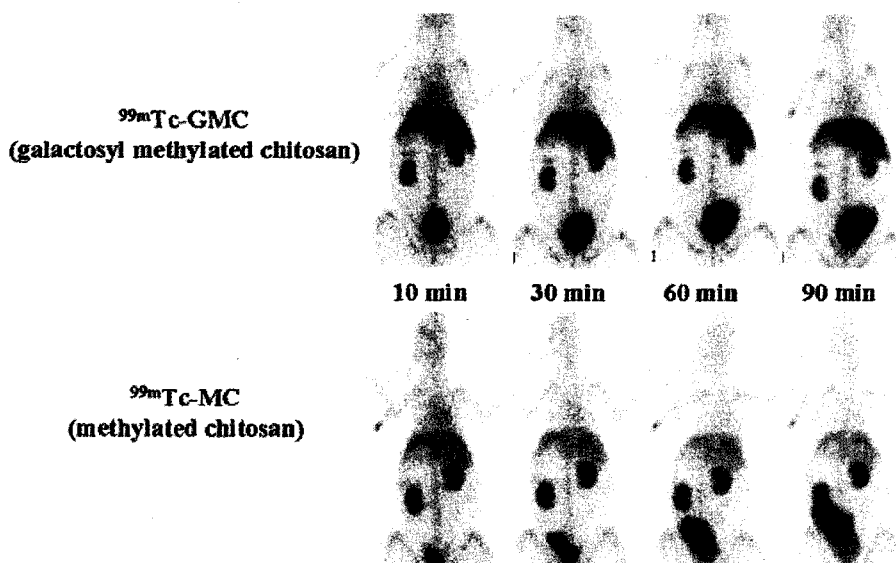


Fig 3. Planar gamma camera imaging of ^{99m}Tc-GMC and ^{99m}Tc-MC in rabbit. ^{99m}Tc-GMC was located in the liver intensely within 10 minutes after injection. However, faint liver uptake was shown in ^{99m}Tc-MC injected mouse. Liver uptake pattern was markedly different between two materials because of galactose residue positioned outside of chitosan.

수식 키토산으로 테크네슘을 표지 할 수는 있으나 표지 수율이 낮았는데 그러한 이유는 키토산의 subunit인 glucosamine이 산성 조건에서 양이온을 띄면서 테크네슘과의 배위결합 부위가 줄어들게 되는데 있다고 사료되었다. 이러한 단점을 피하기 위해 원래 키토산의 일차 아민 구조를 2차, 3차 아민으로 제조하면 배위결합 부위를 늘림으로써 테크네슘과의 표지 수율을 높일 수 있을 것으로 판단되었다.¹⁹⁾ 표지효율을 높이기 위해 일반적으로 널리 쓰이는 화학적 착화제인 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), DTPA-Ca, DTPA-Na, sodium tetramethylene diaminetetraacetate 등은 이들 대부분이 세포독성을 띄고 있다고 알려져 있으며, 이러한 착화제를 사용할 경우 원래 키토산의 생체내 분포에 영향을 미칠 수도 있기 때문에, 여기에서는 갈락토스 수식 키토산의 메틸화 방법을 사용하였다.

키토산은 양전하를 띄고 있으며 이러한 양전하성 화합물들은 유전자와 복합체를 형성한 후 양전하의 표면전하에 의해 세포표면에 붙게 되고 이 후 세포 안으로 유전자를 전달하게 되는 비바이러스성 유전자 전달 벡터로서 이용되기도 한다.^{20,21)} 그러나 이러한 키토산의 세포에 대한 유전자 전달은 국소전달이 아닌 경우에는 키토산의 생체내 분포에 대한 기존의 연구들을 보면 큰 효용성이 없을 것 같다. 왜냐하면, Onishi 등이 보고한 바에 의하면 키토산을 복강내 주사를 통해 생체에 주사하면 빠른 시간안에 가장 많은 비율(약 8~15%ID/g 정도)이 신장에서 관찰되며, 신장을 통해 소변으로 빠져나간 양도 이에 비례하여 상당량 있을 것이며, 매우 적은 비율(약 1~2%ID/g 정도)만이 간과 비장에서 관찰되었기 때문이다.²²⁾ 즉, 키토산에 유전자나 약물을 결합시켜 생체내에 주입하여도 대부분의 키토산은 신장을 통해 체외로 배출될 것이기 때문이다. Onishi 등은 이러한 연구를 키토산에 FITC를 결합시켜 신장, 간, 비장, 혈액 등에서만 분석하였는데 이러한 결과는 이번 연구에서 ^{99m}Tc-MC를 주사하고 얻은 영상과 비교하여 아주 유사한 결과이며, 영상에서는 이 외에도 골격계가 약하게 관찰되는 소견도 알 수 있었다. 그러므로, 키토산을 이용한 전달시스템을 위해서는 키토산에 표적 지향성을 부여하여 키토산의 여러 장점을 이용하면서 전달의 효용성을 높이는 것이 중요하다. 이번 연구에서는 간세포 지향성을 위해 갈락토스 리간드를 수식하였으며 갈락토스 수식을 통하여 목표 지향성을 획득하였는가를 핵의학 영상을 통하여 확인하고자 하였다. 그림 3의 ^{99m}Tc-GMC 결과는 갈락토스 리간드에 의해 간세포 지향성이 획득되었음을 보여주고 있으며, ASGP-R 결합체를 형성하지 않은 나머지 키토산들은 신장을 통해 신속히 배설됨을 보여주고 있다.

이번 연구결과를 다시 한번 정리하면, ^{99m}Tc-GMC와 ^{99m}Tc-MC

를 토끼의 외이정맥을 통해 주사한 후 얻은 영상에서 ^{99m}Tc-GMC는 강한 간섭취가 관찰되는 반면, ^{99m}Tc-MC는 간섭취는 약하게 관찰되었다. GMC와 MC를 합성하는 다른 조건은 모두 같고, 갈락토스 수식여부만이 차이가 있으므로 갈락토스 리간드에 의해 간지향성을 획득하였음을 알 수 있으며, 지금까지의 시험관내 세포실험 및 동물실험을 통해 얻었던 결과를 핵의학 영상을 통해 평가할 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다.^{3,11)} 이번 연구의 의의는 핵의학 연구기법을 bioengineering 분야로 확대시켜 다학제간 협동체계의 구축 가능성을 보여주었다는 것이다.

결론적으로, 이번 연구에서는 갈락토스 리간드를 이용하여 높은 간조직 결합특이도를 가지고, 테크네슘과 높은 표지효율을 보이는 GMC를 합성할 수 있었으며, 이를 이용한 동물실험을 통해 GC의 간세포 지향성을 핵의학 영상을 통해 확인할 수 있었다. 키토산은 현재까지 유전자전달이나 약물전달에 이용되어 왔으므로, 리간드가 수식된 키토산의 전달의 효용성과 표적 지향성 등을 확인하기 위해 핵의학 영상법을 이용하는 것은 시험관내 세포실험 결과와 더불어 연구를 진척시키는 데 많은 도움이 될 것으로 사료된다. 또한 영상을 통해서도 확인하였듯이 키토산의 생체내에서의 신장을 통한 빠른 제거율과 생적합성 그리고 리간드 수식의 편리성 등은 키토산이 표적 지향성 분자영상에 이용될 수 있는 가능성을 가지고 있음을 의미하는 것이므로, 이에 대한 충분한 검토과정이 필요하다 하겠다.

요 약

목적: 약물이나 유전자 전달에 이용되는 생체적합성이 높은 키토산의 간세포 지향성을 위해서 갈락토스를 수식하는 방법이 널리 이용되어지고 있다. 이번 연구에서는 갈락토스 수식 키토산의 간세포 지향성 획득을 평가하는데 있어서 핵의학 영상법의 유용성에 대해 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법: 키토산에 NHS와 EDC를 이용하여 30 mol%의 lactobionic acid를 결합시켜 갈락토스 수식 키토산을 제조하였다. 얻어진 갈락토스 수식 키토산을 투석 시킨 후 동결 건조하여 얻어 낸 다음 키토산의 기본구조인 glucoseamine에 methyl기를 첨가시키는 반응을 하여 최종화합물을 합성하였다. GMC의 세포내 독성은 MTT assay를 통하여 확인하였다. 제조된 GMC에 SnCl₂·2H₂O를 이용하여 ^{99m}Tc를 표지하였다. 표지 후 안정성은 아세트산과 생리식염수를 이용하여 1시간까지 확인하였다. ^{99m}Tc-GMC와 ^{99m}Tc-MC 55.5 MBq (1.5 mCi)를 토끼의 외이정맥으로 주사 후, 감마카메라를 이용하여 10분, 30분, 60분, 90분 간격으로 전면 영상을 얻었다.

결과: 키토산에 lactobionic acid 30 mol%를 반응시켜 7.4 mol %의 galactose group이 키토산에 결합한 것을 확인하였다. 갈락토스 수식 키토산을 메틸화한 결과는 tri, di, mono가 각각 8.8%, 46%, 35.2%인 것을 확인하였다. MTT assay결과를 통해 GMC의 세포에 미치는 독성은 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 표지효율은 메틸화시키지 않은 ^{99m}Tc-GC가 아세톤과 생리식염수에 서 각각 88%, 72%를 보인 반면에 ^{99m}Tc-GMC는 96%정도를 보여 보다 높은 표지효율을 가지는 것을 확인하였다. ^{99m}Tc-MC를 주사후 얻은 토끼 영상에서 키토산은 일반적으로 대부분 신장을 통해 배출되며, 간과 비장, 골격계에는 매우 적은 분포를 보이는데 비해, 갈락토스가 수식된 ^{99m}Tc-GMC에서는 분포에 변화가 생겨 간, 신장, 그리고 방광에서 높은 방사능이 관찰되는 소견을 보였다.

결론: 핵의학 영상법은 갈락토스 리간드 수식 키토산의 간세포 지향성 여부를 평가하기 위한 생체내 평가법으로 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

References

1. Skjåk-bræk, G, Anthonsen, T, Sandford, P. Chitin and Chitosan. In: Sandford, P, eds. *Chitosan: commercial uses and potential applications*. LONDON; Elsevier Science Publishers Ltd. 1989. p.51-69.
2. Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum KM, et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* 2001;8:1108-21.
3. Chung TW, Yang J, Akaike T, Cho KY, Nah JW, Kim SI, et al. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials* 2002 ;23:2827-34.
4. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 1998 ;24:979-93.
5. Muzzarelli RAA, Rocchetti R. Enhanced capacity of chitosan for transition-metal ions in sulphate-sulphuric acid solutions. *Talanta* 1974;21:1137-43.
6. Rhazi M, Desbrières J, Tolaimate A, Rinaudo M, Vottero P, Alagui A. Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomer. *Polymer* 2002;43:1267-76.
7. Suzuki YS, Momose Y, Higashi N, Shigematsu A, Park KB, Kim YM, et al. Biodistribution and kinetics of holmium-166-chitosan complex (DW-166HC) in rats and mice. *J Nucl Med* 1998;39: 2161-6.
8. Sasaki N, Shiomi S, Iwata Y, Nishiguchi S, Kuroki T, Kawabe J, et al. Clinical usefulness of scintigraphy with ^{99m}Tc-galactosyl-human serum albumin for prognosis of cirrhosis of the liver. *J Nucl Med* 1999;40:1652-6.
9. Saha GB. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4th ed. NEW YORK: Springer-Verlag; 1998. p.98-9.
10. Lee J. Quantitative Evaluation of Liver Function with Hepatic Receptor Scintigraphy using Tc-99m Galactosylated Serum Albumin (GSA). *Korean J Nucl Med* 1998;32:305-13.
11. Park IK, Kim TH, Park YH, Shin BA, Choi ES, Chowdhury EH, et al. Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Release* 2001;76:349 - 62.
12. Zanta MA, Boussif O, Adib A, Behr JP. In vivo gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug Chem* 1997;8:841-4.
13. Rensen PC, Herijgers N, Netscher MH, Meskers SC, van Eck M, van Berkel TJ. Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptors versus hepatic remnant receptor in vivo. *J Lipid Res* 1997;38:70-1084.
14. Choi YH, Liu F, Park JS, Kim SW. Lactose-poly-(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell targeted gene carrier. *Bioconjug Chem* 1998;9:708-18.
15. Jeong SY, Lee JT, Seo MR, Yoo JA, Bae JH, Ahn BC, et al. Evaluation of liver function using ^{99m}Tc-lactosylated serum albumin liver scintigraphy in rat with acute hepatic injury induced by dimethylnitrosamine. *Korean J Nucl Med* 2003;37:418-27.
16. Kudo M, Ikekubo K, Todo A, Mimura J, Okabe Y, Kashida H, et al. Hepatic receptor imaging with Tc-99m GSA: estimates of liver function in acute liver disease. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992;89:616-26.
17. Siecal AB, Thanou M, Kortze AF, Verhoel JC, Brussee J, Junginger HE. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers* 1998;36:157-65.
18. Arano Y. Delivery of diagnostic agents for gamma-imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;37:103-20.
19. Domingo JL. Developmental toxicity of metal chelating agents. *Reprod Toxicol* 1998;12:499-510.20. Duncan R, Pratten MK, Lloyd JB. Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1979;587:463-75.
21. Leonetti JP, Degols G, Lebleu B. Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake. *Bioconjug Chem* 1990;1:149-53.
22. Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999;20:175-82.