

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2021.7.2.113>

Study on radiolabeling method of chitosan to improve the radiolabeling yield of the final product

Jung Ae Kang, A-Ram Yu, Jae Jun Lee, and Yeong Su Ha*

Laboratory Animal Center, Osong Medical Innovation Foundation, Cheongju, Korea.

ABSTRACT

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin by deacetylation. Chitosan is non-toxic, biodegradable, and biocompatible, so that it can be used in wide variety of medical applications such as wound healing and antimicrobial biomaterials. It also used as dermal fillers due to its ability to inject with liquid formulations. For investigation on in vivo distribution of these chitosans, Bolton-Hunter-conjugated chitosan (Chitosan-BH) was synthesized by the reaction between the primary amino group of chitosan and N-hydroxysuccinimide ester group of Bolton-Hunter reagent. Then Chitosan-BH was radiolabeled with ^{125}I (Chitosan-BH- ^{125}I) using a Chloramine-T method. The effects of each radiolabeling step on the radiolabeling yield of the final product were tested. The results showed that purification step had significant effects on the radiolabeling yield of the final product. Finally, SPECT/CT images were obtained to evaluate in vivo uptake of the radiolabeled chitosan (Chitosan-BH- ^{125}I) in several organs. The highest uptake was found in the site of injection at 21 days post-injection. The results of this study suggest that chitosan is expected to be useful for biomaterials of dermal fillers.

Key Word: Chitosan, Radioiodination, ^{125}I , Bolton-Hunter, Dermal filler.

Introduction

과거에는 키토산(chitosan)이 소화 및 흡수 과정에서 생리학적 기능이 없는 유용하지 못한 물질로 여겨졌으나, 1990년대부터 키토산의 각종 기능에 대한 연구성과 및 무독성, 비면역성, 생분해성, 생체적합성의 장점으로 인해 생체의료용 재료로서 응용 가치가 증가되고 있다(1). 키토산은 게나 새우와 같은 갑각류로부터 추출된 천연고분자물질인 키틴(chitin)에 2번 탄소 위치에 있는 아세트아미드(acetamide)기 중에 아세틸(acetyl)기를 제거하여 얻을 수 있는 천연 다당류로 2번 탄소 위치에 하이드록시(hydroxyl)기

대신에 아미노(amino)기로 치환되어 있다(2). 이러한 구조적인 특징으로 인해 인공피부 재료, 미생물 성장 억제제, 약물전달체 등에 광범위하게 응용되고 있다(3).

최근에는 키토산의 항균성으로 인한 생체적합성이 우수한 특징으로 인해 필러(dermal filler) 재료로써 연구가 점차적으로 증가하고 있는 추세이다(4). 기존에 필러로 많이 사용되고 있는 히알루론산(hyaluronic acid)은 젤타입으로 주로 시술되는데, 피부에 주사기로 젤을 짜 넣을 때 높은 압력이 가해져 시술에 어려움이 있을 뿐만 아니라 혈관이나 신경을 잘못 건드려 피부괴사, 안면마비 등의 부작용을 초래할 수 있는 단점이 있다(5). 그로 인해 젤이

Received: December 21, 2021 / Revised: December 27, 2021 / Accepted: December 28, 2021

Corresponding Author: Yeong Su Ha, Laboratory Animal Center, Osong Medical Innovation Foundation (K-Bio), 123 Osongsaengmyungro, Osong-eup, Cheongju, Chungbuk, 28160, Korea.
Tel: 82-43-200-9855, Fax: 82-43-200-9109, E-mail: ysha@kbiohealth.kr.

Copyright©2021 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

아닌 액체 형태의 필러에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 액체 형태로 체내에 필러를 투입하게 되면 압력문제를 해결함으로써 안전성과 편의성을 향상시킬 수 있게 된다. 키토산은 이러한 액체형태의 필러 연구에서 원료로 많이 언급되고 있어(6), 체내 흡수, 분포, 대사, 배출 등을 평가하여 필러로서의 기능을 확인하는 연구가 필요하다고 판단하였다.

핵의학영상은 우수한 정량성을 바탕으로 비침습적으로 방사성동위원소가 표지된 물질의 체내 거동을 평가하는데 우수한 영상 기법이다(7). 깊이에 대한 제약이 적어 체내에 정확한 위치와 방사능을 검출하여 정량함으로써 약물의 거동을 평가할 수 있다. 핵의학영상을 획득하기 위해 방사성동위원소로 ¹²⁵I를 선정하였다. 그 이유로는 ¹²⁵I의 반감기가 59.5일로 길어 장기간 모니터링에 적합하고, 붕괴과정에서 35 keV의 감마선을 방출하여 single photon emission computed tomography (SPECT) 영상을 획득할 수 있기 때문이다(8). 또한 방사성요오드화 기술은 이미 수십 년 전부터 잘 연구되어 키토산의 표지에도 쉽게 적용할 수 있을 것으로 판단하였다(9).

본 연구에서는 앞서 설명한 이유와 특징들을 바탕으로 핵의학영상 기법을 활용하여 필러 재료로서 키토산을 연구하기 위해 ¹²⁵I 표지법 연구 및 필러로서의 가능성에 대한 영상 평가연구를 수행하였다.

Materials and Methods

1. 시약

실험에 사용할 키토산(Chitosan, 70-100 kDa)은 alaska snow crab을 원재료로 하는 medical grade (>97%)로 Matexcel (Shirley, NY, USA)에서 구매하였으며, sulfosuccinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl) propionate (sulfo-SHPP, Bolton-Hunter reagent)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서, 방사성동위원소 Na¹²⁵I와 Pierce™ 20X borate buffer는 Perkin Elmer (Shelton, CT, USA)에서 각각 구매하였다. 반응에 사용된 acetic acid, hydrochloric acid (HCl), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium hydroxide

(NaOH), phosphate buffered saline (PBS), Chloramine-T, sodium metabisulfite, acetone은 Sigma Adrich (St. Louis, MO, USA) 및 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구매하였으며, 별도의 정제과정 없이 사용하였다.

2. 키토산과 sulfo-SHPP (Bolton-Hunter reagent, BH) 컨쥬게이션

키토산은 2% acetic acid에 10 mg/mL 농도로 준비한 후 4 °C에서 밤새도록 부드럽게 교반시켜 주었으며, sulfo-SHPP는 DMSO에 500 µL/mL 농도로 녹여서 준비하였다. 분자비를 1:1로 하여 반응하기 위해 키토산 (70 nmol, 5 mg) 과 sulfo-SHPP (70 nmol, 25 µg)를 0.1 M borate buffer (pH 8)에서 섞어준 후 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 반응을 마치고 정제되지 않은 Chitosan-BH를 이용하여 추후 실험에 사용하였다.

3. Chitosan-BH의 방사성요오드 (¹²⁵I) 표지

3.1 Chitosan-BH 컨쥬게이션 후 별도의 정제과정 없이 ¹²⁵I 표지

첫 번째로 Bolton-Hunter reagent (BH)와 키토산 컨쥬게이션 후 별도의 정제과정 없이 ¹²⁵I를 표지한 후, 50 kDa centrifugal filter (amicon ultra - 0.5 centrifugal filter unit, 50 kDa, Merck Millipore, Burlington, MA, USA)를 이용해 표지에 참여하지 못한 ¹²⁵I와 키토산에 컨쥬게이션 되지 못한 BH-¹²⁵I를 한번에 제거하는 방법으로 표지를 시도 하였다. 우선 정제과정을 거치지 않은 Chitosan-BH 100 µL (키토산 기준 1 mg)에 Na¹²⁵I (2 mCi)와 Chloramine-T 10 µL (5 mg/mL in PBS)를 섞어준 후 thermomixer (Eppendorf)를 이용해 실온에서 3분간 500 rpm으로 반응시켜 주었다. 그리고 반응을 멈추기 위해 sodium metabisulfite 10 µL (12 mg/mL in PBS)를 넣어 준 후 thermomixer를 이용하여 실온에서 1분간 500 rpm으로 반응시켜주고, 반응 직후 radio-TLC스캐너 (AR-2000, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany)를 이용하여 방사화학적 순도를 확인하였다 (Figure 1). 이 때 고정상으로는 iTLC-SG (Agilent, Santa Clara, CA, USA), 이동상으로는 acetone을 사용하였다 (R_f = 0.0: Chitosan-BH-¹²⁵I, R_f = 1.0: free ¹²⁵I). 고순도의 Chitosan-BH-¹²⁵I를 얻기 위해 50 kDa centrifugal filter를

이용해 정제를 진행하였다. 원심분리기(Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 15,000 G로 5분간 원심분리를 진행한 후 radio-TLC 스캐너를 통해 방사화학적 순도를 확인하는 과정을 3회 반복하여 최종물질의 방사화학적 순도를 확인하고 표지수율을 계산하였다.

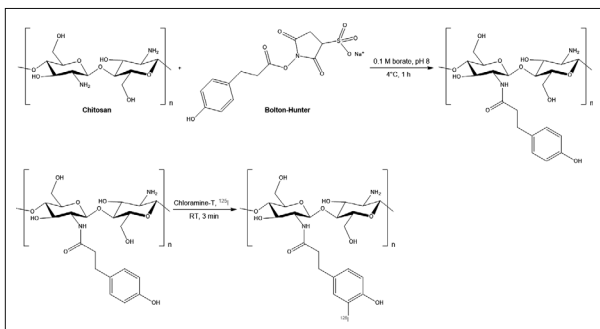


Figure 1. Synthetic scheme for Chitosan-BH-¹²⁵I.

3.2 Chitosan-BH 컨쥬게이션 후 반응에 참여하지 않은 BH 정제 후 ¹²⁵I 표지

정제되지 않은 Chitosan-BH의 정제를 위해 1 M NaOH를 첨가하여 pH를 높여주어 Chitosan-BH를 응집시키고, 이를 원심분리기를 이용하여 15,000 G로 3분간 침전시킨 후 상층액을 제거하여 주는 과정을 3회 반복하였다. 정제과정을 거친 Chitosan-BH 100 μL (키토산 기준 1 mg)를 이용하여 앞서 설명한 방법과 같이 산화제인 Chloramine-T를 이용하여 ¹²⁵I를 표지하였다. 반응에 참여하지 않은 ¹²⁵I의 정제과정은 centrifugal filter를 이용하지 않고 를 이용한 침전방법으로 진행하였다(Figure 3A). 1 M NaOH를 200 μL 넣어 pH를 높여 Chitosan-BH-¹²⁵I를 응집시켜주고, 원심분리기를 이용하여 튜브 바닥으로 침전시켜준 후 상층액에 녹아있을 ¹²⁵I를 제거하여 주는 과정을 2회 반복하였다. 그리고 radio-TLC 스캐너를 이용하여 최종물질의 방사화학적 순도를 확인하고 최종 표지수율을 계산하였다.

4. SPECT/CT 영상

동물에 관련된 모든 절차 및 실험은 오송첨단의료산업진흥재단 실험동물운영위원회로부터 승인을 받은 후 지침에 따라 수행하였다(승인번호: KBIO-IACUC-2021-233-1). 동물은 5주령, 암컷 SKH-1 hairless 생쥐를 사용하였다. Small animal SPECT/CT (Nano PET/CT, Mediso, Budapest,

Hungary) 장비를 이용하여 ¹²⁵I 및 Chitosan-BH-¹²⁵I(100 μCi/100 μL)를 오른쪽 옆구리에 피하주사 후 1, 6시간과 1, 7, 14, 21일차에 생체거동 영상을 획득하였다. 해부학적 정보를 얻기 위한 CT 영상은 480 projection, 관전압 50 kVp, 관전류 720 μA, 노출시간(exposure time) 300 ms으로 영상을 획득하였다. 생쥐를 베드에 복와위(prone position)로 눕혀 호흡 마취(1~2% of isoflurane in 1L/min of oxygen)한 상태에서 에너지 피크 28.4 keV, 에너지 윈도우 20% (25.5~31.2 keV)로 설정하였다. 4개 헤드로 구성된 다중바늘구멍(multipinhole) 콜리메이터를 사용하였으며 각 헤드는 16개의 1.7 mm 바늘구멍(phinhole)으로 구성되어있다. 나선형 step-and-shoot촬영 방식으로 마우스 전신영상을 획득하였다. 산란, 감쇠보정을 적용하여 영상을 재구성하였으며, 매트릭스 크기는 128 × 128 × 360, voxel 크기는 0.234 × 0.234 × 0.234 mm³였다. InterView FUSION (ver3.0) 소프트웨어를 사용하여 시험물질 투여부위의 표준섭취계수(standard uptake value, SUV)를 정량평가하였다.

$$SUV = \frac{\text{tissue radioactivity concentration}}{\text{injected activity/body weight}}$$

Results and Discussion

1. 키토산 용해도

키토산은 물이나 알코올에는 녹지 않는 불용성이지만 약 6.2 이하의 산성 pH를 가지는 acetic acid, hydrochloric acid, formic acid 등의 유기산에서는 잘 용해되는 것으로 알려져 있으며, 단백질이 존재하거나 pH가 높아지게 되면 응집되는 성질이 있다(10). 그 이유는 pH 6 이하에서는 amine기가 양성화(protonation)되고 양전자를 띄게 되어 키토산이 수성매질에 녹지만, 반면에 pH가 높아지게 되면 amine기가 탈양성화(deprotonation)되어 전하를 잃어버리게 되어 불용성이 되기 때문이다(11). 키토산을 방사성 요오드로 표지하기 위해 2% acetic acid와 0.1 M HCl에 10 mg/mL의 같은 농도로 녹여 보았다. 하룻밤 동안 4°C에서 녹였을 때 두 산성 용액에서 높은 용해도를 확인할 수 있었으나 2% acetic acid에 대한 용해도가 더 높은 것을 관찰하여 이후 실험에서는 2% acetic acid를 용매로

사용하여 실험을 진행하였다. 이는 키토산이 acetic acid 에서 1-2%의 용해도를 보여준다는 기존 보고와 일치하는 결과이다(12).

2. Chitosan-BH 컨쥬게이션 및 방사성요오드 (¹²⁵I) 표지

2.1 Chitosan-BH 컨쥬게이션

키토산은 다당류 고분자물질로서 직접적인 방사성요오드 표지가 어려운 분자구조를 가지고 있다. 하지만 키토산은 pyranose 고리의 2번째 탄소에 amino기가 결합하고 있어 sulfo-SHPP의 N-hydroxysuccinimide(NHS) ester 기와 약알칼리성 조건인 pH 7.2-9.0에서 안정한 아마이드 결합을 형성할 수 있기 때문에 Bolton-Hunter reagent를 활용하였다. Bolton-Hunter reagent는 phenolic ring 구조를 기반으로 하는 tyrosine기와 유사한 구조에 생체접합(bio-conjugation)이 가능한 NHS ester기를 가지고 있어, 키토산을 간접적으로 표지하기에 적합한 분자구조를 가지고 있다(13,14). 키토산과 Bolton-Hunter의 분자비를 1:1로 반응하였고, Bolton-Hunter가 잘 컨쥬게이션 되지 않았다면 추후 진행할 방사성요오드 표지실험에서 확인 가능할 것으로 판단해 키토산에 컨쥬게이션 된 Bolton-Hunter에 대한 분석은 별도로 진행하지 않았다.

2.2 Chitosan-BH 컨쥬게이션 후 별도의 정제과정 없이 ¹²⁵I 표지

키토산에 컨쥬게이션 되지 않은 Bolton-Hunter의 경우 ¹²⁵I 표지 후 분리정제 과정에서 제거될 것으로 판단하여 별도의 정제과정 없이 ¹²⁵I의 표지실험을 진행하였다. 그 결과 산화제인 Chloramine-T를 이용한 표지실험 직후 radio-TLC 스캐너를 통해 확인한 방사화학적 순도는 49.4%(Figure 2A)로 확인되었으며, 50 kDa centrifugal filter를 이용해 3번의 정제를 진행하였을 때 최종 순도는 95.7%(Figure 2D)로 확인되었다. 정제를 반복하면서 50 kDa의 분자량 컷오프(molecular weight cut-off, MWCO)를 가진 centrifugal filter를 사용하였으므로 반응에 참여하지 않은 (¹²⁵I와 키토산에 컨쥬게이션 되지 않은 Bolton-Hunter에 표지된 ¹²⁵I (BH-¹²⁵I)는 서서히 제거되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2B-D). 하지만 높은 95.7%의 순도에도

불구하고 최종 표지수율은 약 4.3%인 것을 확인할 수 있었는데, 이는 centrifugal filter를 이용한 정제과정에서 대부분의 radioactivity가 filter에 의해 손실되기 때문이었다 (Figure 2E). 우리는 이러한 radioactivity의 손실을 줄이기 위해 ¹²⁵I 표지 및 정제방법을 수정하여 실험을 진행하였다.

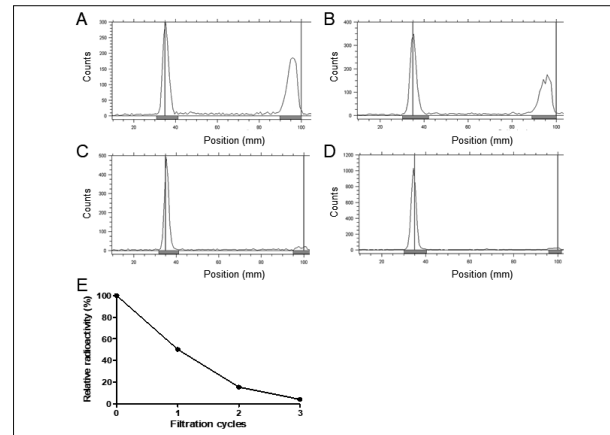


Figure 2. Radiochemical purity analysis of Chitosan-BH-¹²⁵I using radio-TLC scanner. (A) Before filtration of Chitosan-BH-¹²⁵I. (B-D) After filtration cycles of Chitosan-BH-¹²⁵I by 50 kDa centrifugal filter. B : first, C : second, D : third cycle. (E) The relative radioactivity of Chitosan-BH-¹²⁵I obtained after each filtration cycle.

2.3 Chitosan-BH 컨쥬게이션 후 반응에 참여하지 않은 BH 정제 후 ¹²⁵I 표지

표지수율을 향상시키기 위해 키토산과 Bolton-Hunter 컨쥬게이션 후 반응에 참여하지 않은 Bolton-Hunter를 먼저 정제해주었다. 앞선 실험에서 centrifugal filter를 이용한 정제과정에서 손실이 컸기 때문에, centrifugal filter를 사용하지 않고 침전법을 적용하였다. 키토산은 pH가 6.5 이상으로 높아지게 되면 응집되는 특징을 가지고 있는데(15), 이러한 특징을 적용하여 FITC 형광염료를 키토산에 컨쥬게이션 한 후 정제과정에서 NaOH를 첨가하여 침전시키는 방법으로 반응에 참여하지 않은 FITC를 제거하는 실험을 진행한 사례를 확인하였다(16). 이 방법을 본 실험에 응용하여 정제과정을 진행해 보았다. 컨쥬게이션 과정 후 1 M NaOH를 첨가하였을 때 응집반응이 일어나는 것을 육안으로 확인하였고, 원심분리기를 이용해 15,000 G에서 응집된 Chitosan-BH가 침전되는 것을 관찰하였다(Figure 3A). 실험에 사용한 Bolton-Hunter reagent는 수용성으로 상층액에 녹아있어 3번의 반복 과정에서 충분히 제거될

것으로 판단하였다. 침전법을 이용한 3번의 정제과정 후 ^{125}I 의 표지를 진행하였다. 그 결과 radio-TLC 스캐너를 통해 확인한 방사화학적 순도가 84.6% (Figure 3B)로 정제과정 없이 표지를 진행하였을 때 보다 35.2% 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 컨쥬게이션에 참여하지 않은 Bolton-Hunter를 충분히 정제하여 ^{125}I 의 표지과정에서 간섭하지 않았기 때문이라고 생각된다. 그리고 반응에 참여하지 않은 ^{125}I 를 제거하기 위해 1 M NaOH를 넣고 원심분리기를 이용해 침전시키는 과정을 2회 반복한 후 상층액(supernate)과 2% acetic acid에 용해시킨 침전물(precipitate)을 radio-TLC 스캐너를 이용해 분석하였다. 그 결과 상층액에서는 ^{125}I (Figure 3C)를 관찰하였으며 침전물에는 Chitosan-BH- ^{125}I 가 95.7%의 순도(Figure 3D)로 존재하는 것을 관찰할 수 있었고, 최종 표지수율은 65.5%로 이전 방법보다 61.2% 증가된 수치를 보여주었다. 침전법을 이용한 정제과정에서 상층액에 radioactivity 손실이 예상했던 것 보다 컸는데, 이는 낮은 분자량을 가지는 키토산에 ^{125}I 가 결합한 이후 15,000 G로 원심분리 시 침전이 되지 않고 상층액에 존재했다가 제거되었기 때문으로 예상된다. 이 결과를 통해 키토산을 ^{125}I 로 표지하기 전에 먼저 15,000 G로 키토산을 침전시켜 작은 분자량에 키토산을 제거하는 공정이 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.

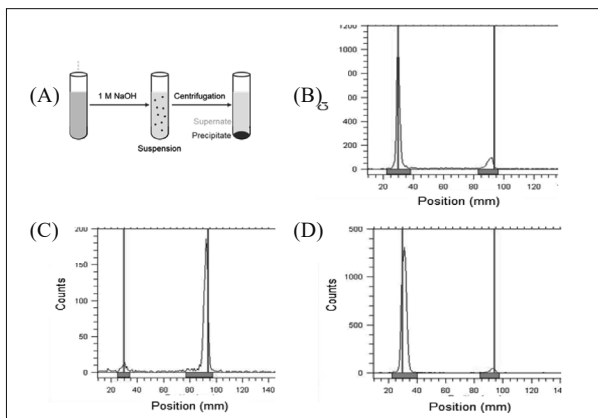


Figure 3. (A) A scheme for a selective precipitation purification of Chitosan-BH- ^{125}I . (B) Radio-TLC chromatogram of Chitosan-BH- ^{125}I after 3 min reaction with Chloramine-T. (C) Radio-TLC chromatogram of supernatant (^{125}I) and (D) precipitate (Chitosan-BH- ^{125}I) after the selective precipitation purification.

3. SPECT/CT 영상

키토산은 다양한 분야에 응용되고 있지만 최근에 필터 원료로서의 가능성을 주목 받고 있다(6). 그래서 우리는 Chitosan-BH- ^{125}I 를 일반 생쥐의 피하에 주사한 후 필터로서의 기능이 가능한지 확인하기 위해 SPECT/CT영상을 획득하였다. 먼저 ^{125}I 를 피하에 투여하여 SPECT/CT 영상을 확인한 결과, 투여 후 1시간에는 갑상선, 위, 방광에서 신호를 관찰할 수 있었으며(Figure 4A), 물질을 투여한 부분(SUV: 0.53)에서는 낮은 섭취율로 인해 신호를 확인할 수 없었다. 갑상선과 위는 소듐 요오드 동반 수송체(sodium iodide symporter, NIS)가 많이 발현되는 장기들로 피하에서 몸 속으로 흡수된 ^{125}I 가 NIS에 의해 수송된 결과이며, NIS에 의해 수송되지 않은 ^{125}I 는 소변을 통해 배설되었다(17). 하루가 지난 후에는 NIS가 가장 많이 발현되는 갑상선에서만 높은 신호를 관찰할 수 있었고 1 시간 때와 마찬가지로 투여한 곳에서는 신호(SUV: 0.01)를 관찰할 수 없었다(Figure 4A). 반면에 Chitosan-BH- ^{125}I 을 투여한 후 획득한 SPECT/CT영상에서는 1일차에도 물질 투여한 곳에서 높은 신호(SUV: 60.31)를 확인하였으며, 나아가 21일까지 물질을 투여한 곳에서 높은 신호(SUV: 57.69)를 유지하는 것을 확인하였다(Figure 4B). Chitosan-BH- ^{125}I 로부터 탈요오드화된 ^{125}I 는 NIS가 많이 발현되는 갑상선에서 신호를 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 Chitosan-BH- ^{125}I 의 피하 투여 후 생체 내 분포를 확인할 수 있었으며, 키토산의 필터로서의 사용가능성을 확인할 수 있었다. 다음 실험에서는 최적화 된 키토산 표지법을 확립하고 피하에 투여하는 radioactivity의 양을 늘려 일 이상의 수개월에 걸친 장기간에 추적연구를 계획하고 있다.

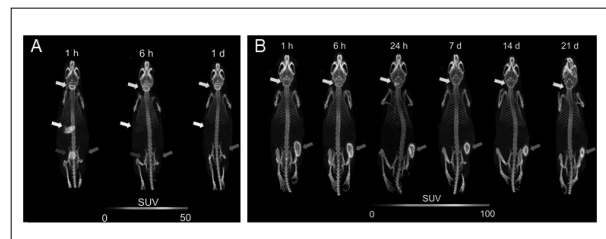


Figure 4. Whole body small animal SPECT/CT images after S.C injection of (A) free ^{125}I and (B) Chitosan-BH- ^{125}I . (Yellow arrows indicate thyroid, white arrows indicate stomach, blue and red arrows indicate bladder and the site of injection, respectively).

Conclusion

키토산의 amino기를 활용하여 Bolton-Hunter를 컨쥬게이션하고 산화제인 Chloramine-T를 이용해 방사성 요오드 ^{125}I 를 표지할 수 있었다. 정제과정에서 radioactivity의 손실을 줄이기 위해 NaOH 첨가를 통해 침전시키는 방법을 적용하였으며, 이 방법을 통해 방사화학적 순도 95.7%, 최종 표지수율 65.5%의 결과를 얻을 수 있었다. 이렇게 표지된 Chitosan-BH- ^{125}I 을 생쥐의 피하에 투여한 후 SPECT/CT영상을 획득하였고, 영상결과를 통해 키토산의 필러로서의 사용가능성에 대해 확인할 수 있었다.

Acknowledgments

이 연구는 보건복지부 첨단의료복합단지 미래의료산업 원스톱 지원 사업(HI19C0763020021)의 지원을 받아 수행하였으며, 다른 이해 관계는 없음을 밝힙니다.

References

- Chandy T, Sharma CP. Chitosan - as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990;18:1-24.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006;31:603-632.
- Foster LJR, Ho S, Hook J, Basuki M, Marcal H. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physicochemical, Material and Biological Properties. *PLoS One* 2015;10: e0135153.
- Phillippart C, Hendrickx B, Rharbaoui S, Natalizio A, Boissic S, Micheels P, Gautier S, Douette P, Hermitte L. Safety and efficacy of a carboxymethyl chitosan dermal injection device for the treatment of skin defects: a first-in-man, pilot, comparative, split-body study. *Eur J Dermatol* 2021;31:549-558.
- Abduljabbar MH, Basendwh MA. Complications of hyaluronic acid fillers and their managements. *J Dermatol Dermatol Surg* 2016;20:100-106.
- Halimi C, Montembault A, Guerry A, Delair T, Viguier E, Fulchiron R, David L. Chitosan solutions as injectable systems for dermal filler applications: rheological characterization and biological evidence. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2015;2015:2596-2599.
- Blankenberg FG, Strauss HW. Nuclear Medicine Applications in Molecular Imaging. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:352-361.
- Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, Gsell W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging* 2011;2011:796025.
- McFarlane AS. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 1958;182:53.
- Rinaudo M, Pavlov G, Desbrieres J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* 1999;40:7029-7032.
- Cunha-Reis C, El Haj AJ, Yang X, Yang Y. Fluorescent labeling of chitosan for use in non-invasive monitoring of degradation in tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:39-50.
- Furuike T, Komoto D, Hashimoto H, Tamura H. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids. *Int J Biol Macromol* 2017;104:1620-1625.
- Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2013. p. 1200.
- Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem J* 1973;133:529-539.
- Sogias IA, Khutoryanskiy VV, Williams AC. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromol Chem Phys* 2010;211:426-433.
- Sun H, Liu XY, Zhu D, Gao D, Ding M. Preparation and reaction of fluorescently-labeled chitosan nano particles. *Asian J Chem* 2013;25:5658-5660.
- Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-1200.