

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">누에고치 단백질의 화상 치료효과에 대한 입증과 이를 이용한 화상 전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 개발</p> <div data-bbox="183 1411 391 1534" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">농림수산식품부 3cm</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div data-bbox="614 470 877 560" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 20px;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1543000-000773-01</p> </div> <p style="text-align: center;">5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">누에고치 단백질의 화상 치료효과에 대한 입증과 이를 이용한 화상 전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 개발(생명기술개발사업)</p> <p style="text-align: center;">(To establish effect of silk protein as treatment for burn wounds and to develop burn wound dressing using a silk fibroin nanofibrous foam/sponge</p> <p style="text-align: center; margin-top: 40px;">한림대학교산학협력단</p> <p style="text-align: center;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농 립 축 산 식 품 부</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “누에고치 단백질의 화상 치료효과에 대한 입증과 이를 이용한 화상 전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 12월 1일

주관연구기관명 : 한림대학교산학협력단
주관연구책임자 : 박 찬 흠
연 구 원 : 이 준 호
연 구 원 : 김 동 규
연 구 원 : 이 중 섭
연 구 원 : 이 옥 주
연 구 원 : 김 정 호
연 구 원 : 주 형 우
연 구 원 : 문 보 미
연 구 원 : 박 현 정
연 구 원 : 김 동 욱
연 구 원 : 이 민 채
연 구 원 : 김 수 현
연 구 원 : 유 현 승
연 구 원 : 소 정 원
연 구 원 : 박 희 준
연 구 원 : 서 한 솔
연 구 원 : 정 민 선
참 여 기 업 명 : (주)시지바이오

요 약 문

I. 제 목

누에고치 단백질의 화상 치료효과에 대한 입증과 이를 이용한 화상 전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 누에고치 단백질의 화상 치료에 대한 효과 입증
- 화상전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지를 제조하여 화상 치료 기간의 단축과 완치율을 높임
- 양잠산업의 고부가 가치를 창출하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 실크 피브로인의 화상 효과 검증
- 실크 피브로인 융합 기술 개발
- 실크 피브로인 나노섬유 폼, 스펀지 제작 기술 개발
- 화상 치유 효과가 뛰어난 실크 피브로인 함유 드레싱제 제조 및 선별
- 화상전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 물성 시험 및 개선
- 실크 피브로인과 CMC를 함유한 하이드로겔 제조
- 화상전용 실크 피브로인 함유 드레싱제의 생체 적합성 평가 및 효과 입증
- 대량생산이 가능한 화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 기술 개발
- 화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 실용화를 위한 전임상 시험 및 기술 고도화, 인증 승인 및 추진

IV. 연구개발결과

- 2도 화상을 입힌 동물 모델에서 실크 나노폼에 의한 화상 치유 효과 확인
- 화상 치유에 관여하는 유전자 발현 패턴 확인
- 인체에 무해한 수용성 용매인 PEO와 다양한 전기 방사용 용매를 이용하여 실크 피브로인과 융합시켜 방사하는 기술 개발
- 전기 방사를 이용한 나노섬유 폼의 두께, 크기 조절 기술 개발
- 습윤상태 유지 및 화상치유에 효과적인 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 대량생산 기술 개발

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 실크 피브로인 나노입자/CMC 하이드로콜로이드 제조 방법에 관한 특허 출원 및 기술 이전 ((주)시지바이오)
- 실크 피브로인/CMC 하이드로겔 제조, 특허 등록(1014624850000) 및 논문 게재

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

To establish effect of silk protein as treatment for burn wounds and to develop burn wound dressing using a silk fibroin nanofibrous foam/sponge

II. Aimes of Research

- Identification of burn wound healing effects of silk protein
- Development of burn wound dressing using a silk fibroin nanofibrous foam/sponge for shorten treatment term and high cure rate for burn wound
- Higher value-added in sericulture industry

III. Contents of Research

- Identification of burn wound healing effects of silk fibroin
- Development of fusion technique using silk fibroin
- Development of nanofiber, sponge fabrication technique using silk fibroin
- Fabrication of silk fibroin based dressing materials for burn wound
- Test and improvement of mechanical property of silk fibroin nanofibers foam/sponge for burn wound
- Fabrication of hydrogels containing silk fibroin and CMC
- Identification of biocompatibility and burn wound healing effect of silk fibroin based dressing materials
- Development of mass production of silk fibroin hydrocolloids for burn wound
- Preclinical test, technical sophistication, approvals and implementation of burn wound hydrocolloids using silk fibroin for commercialization

IV. Expected contribution of Results

- Identification of burn healing effect of silk nanofibrous foam in second degree burn wounds as animal model
- Identification of gene expression patterns in the burn healing process
- Development of electrospinning method using PEO as water-soluble solvent and various solvents that are harmless to human
- Development of electrospinning method which control thickness and size of nanofibrous foam
- Development of Mass production technology for superior wet silk fibroin hydrocolloid with burn healing effect

V. Application Plan of Research Results

- A patent application and technical transfer of fabrication methods for silk fibroin nanoparticle/CMC hydrocolloid (CGBIO)
- Fabrication of silk fibroin/CMC hydrogel, a patent registration (1014624850000) and paper publication

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction of Research Task

Chapter 2. The Present State of Technique Development at Home and Abroad

Chapter 3. Contents and Results of Research Achievement

Chapter 4. Achievement Rate and Contribution Rate to Related Areas

Chapter 5. Application Plan of Research Results

Chapter 6. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

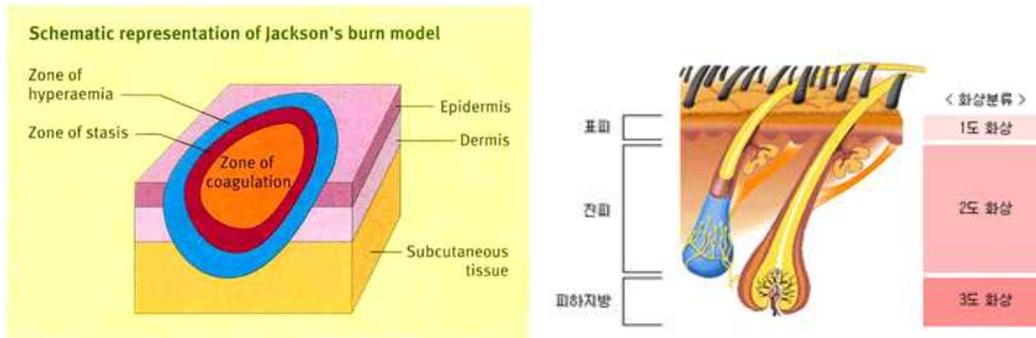
제 1 절 국내외 현황 및 문제점

그동안 누에고치는 주로 의복을 제조하기 위하여 사용되어 왔다. 이러한 누에고치가 최근에 들어 입는 실크에서 벗어나 먹고 마르고 마시는 실크로 변화하고 있다. 누에고치는 자연계에서 가장 순수하게 대량으로 생산되는 단백질로서 생체 친화성이 높아 옛 선인들은 누에고치를 태운 가루를 이용한 화상치료를 비롯하여 의복용 소재로서 지난 수천년 간 인류의 유용한 물질로 사용되어 왔다. 최근에 들어 실크분말, 맥, 다공질체, 겔 등 여러 가지 형태로 연구되고 있는 실크단백질은 콜레스테롤 및 혈당 저하, 알코올 대사 촉진, 치매 예방 및 치료 효과, 기억력 증진 효과 등 식·의약품소재, 상처보호막, 약물전달매체, 조직공학용 소재 등 다양한 생체재료 소재로 연구 개발되고 있다.¹⁾ 그러나 아직까지 누에고치의 화상 및 피부 창상 재생에 대한 이론적인 근거 및 이에 대한 정확한 연구 자료는 미미하다.²⁾

누에고치에서 추출되는 실크단백질의 대부분을 차지하고 있는 피브로인은 글리신과 알라닌이 특이하게 많이 존재한다. 사람 피부 콜라겐 단백질도 피브로인 단백질과 비슷한 매우 특이한 아미노산 조성을 하고 있다. 그 뿐 아니라 자외선을 차단하여 기미나 주근깨가 생기지 않도록 하는 티로신이라는 아미노산도 실크 피브로인에 포함되어 있어, 보습력과 미백효과를 함께 가진 기능성 화장품의 원료 등 피부 관련 소재로 실크단백질이 사용된다. 실크단백질은 피부를 구성하는 주요 구성 성분인 콜라겐 형성을 촉진하는 효과가 있다. 천연실크 화장품은 기존 화장품에 비하여 보습효과가 뛰어나 피부의 수분 손실을 막고 피부 노화를 방지하며 피부주름개선 효과까지 있어 윤택 있는 탱탱한 피부를 유지시켜주는 것으로 알려져 있다. 실크단백질은 동물실험을 통하여 피부세포의 재생을 촉진하는 것으로 알려져 있고 실크단백질이 함유되어 있는 치약을 제조하여 50대 여성의 구강 상피세포의 탈리 현상을 관찰한 결과 구강세포의 탈리현상이 33% 감소하였다. 이와 같이 실크단백질은 피부친화성이 탁월하고 피부세포를 건강하게 자랄 수 있도록 세포외기질인 콜라겐이 잘 형성될 수 있도록 도와주고 보습 효과가 뛰어나다. 동의보감 등의 문헌에서 화상치료를 위하여 누에고치를 태워서 사용하라고 되어 있으며, 민간에서는 누에고치나 비단을 태워서 화상 치료에 이용하고 있다.³⁾ 그렇지만 화상 치료에 실크단백질이 효과가 있는지는 과학적으로 입증되어 있지 않은 실정으로서 이를 과학적으로 입증하여, 이를 이용한 화상전용 드레싱으로 개발할 수 있을 것이다.⁴⁾

화상이란 열로 인해 단백질이 변성되고 응고하여 세포가 손상되고 나아가서 조직이 괴사되는 것이다. 화상의 치유 기전을 이해하기 위해서는 조직 손상의 세 지대에 대한 이해가 필요하다. 응고지대(Zone of coagulation)는 가장 손상이 심한 부분으로 열에 가장 가까이 접한 부분이며 세포의 응고가 발생한다. 열로 인한 세포 손상은 단백질 변성을 유발한다. 만일 이 지대의 손상이 진피 전체로 확대된다면 전층 손상이 발생한 것이다. 만일 응고지대가 표피 부속물 수준 위라면 재상피화에 의한 치유가 진행될 것이다. 정체지대(Zone of stasis)는 응고지대를 둘러싸고 있으며 혈관계를 포함한다. 혈전증과 혈관 수축으로 인해 일시적인 진피의 허혈 상태가 유발된다. 이 지대에 적절한 관류가 이루어지고 감염이나 물리적 손상과 같은 추가적인 손상이 없어 혈액 순환이 회복되면 조직도 복구될 것이다. 충혈지대(Zone of hyperemia)는 가장 바깥층으로 세포괴사는 없는 부분이다. 이 지대의 세포는 7-10일내 회복한다. 이 지대는 혈관

확장과 염증반응으로 인해 붉은 색을 띄게 된다.⁵⁾

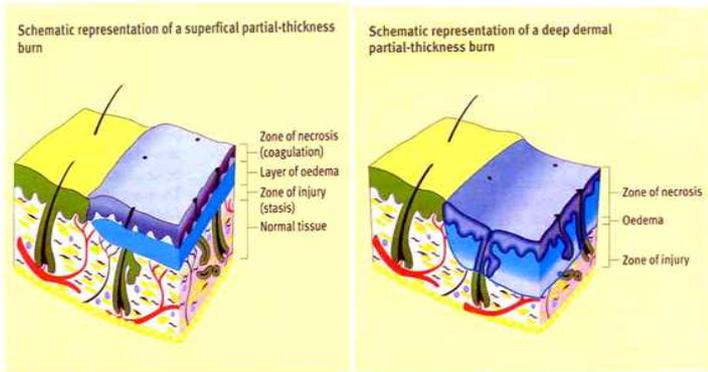


화상은 깊이에 따라 1~3도, 또는 4도까지의 3~4단계로 나누는 경우가 많다.

1도 화상은 햇볕에 타는 것과 같이 보통 60.0℃ 정도의 열에 의해 표피층에 손상을 입은 것이므로, 부분층 피부 손상에 속하며 표피 복구 과정을 통해 치유된다. 기저막의 노출이 포함된 표피층 손상이 있는 경우 화상 상처는 홍반을 띄게 된다. 1도 화상의 경우 즉시 찬물로 식히는 등의 처치만으로도 효과를 보는데, 초기 염증반응과 상피 세포의 증식과 이주, 표피층의 재건과 분화를 통해 정상 피부의 기능을 회복하며 7-14일내 치유된다.⁶⁾



2도 화상은 발적, 부종이 뚜렷하고 몇 시간 또는 24시간 이내에 크고 작은 수포가 형성되는데, 깊이에 따라 표층 2도 화상과 심층 2도 화상으로 나뉜다. 표층 2도 화상은 유두 진피까지 화상을 입게 되어 화상의 응고지대, 정체지대, 충혈지대가 모두 진피 내에 존재하는 것으로 깨끗한 수포를 가지는 발적과 압력에 의해 하얗게 변하는 특징을 가진다. 표피와 진피 일부가 손상된 전형적인 부분층 피부 손상 치유 기전과 동일하며 14-21일내 치유된다. 심층 2도 화상은 깊은 곳인 망상 진피까지 화상을 입어 응고지대까지는 진피층 내에 있으나, 정체지대와 충혈지대가 피하층까지 확대된 것으로, 출혈이 동반되는 수포와 함께 발적이 나타나고 압력에 의한 변화가 잘 나타나지 않는다. 치유 기간이 수주로 길어지며 전층 손상으로 전환될 가능성이 높아 흉터나 구축의 합병증을 유발할 수 있으므로 세밀한 관리가 필요하다. 2도 화상은 자각적으로는 작열감, 동통이 심하고, 수포가 터지면 미란면을 나타내고 다량의 분비액이 나온다. 진피 손상을 포함하고 있으므로 결체조직 복구, 즉 육아조직 형성과 표피 복구가 동시에 발생한다. 2차 감염이 발생하면 국소증세는 더 심하고 경과도 오래간다.



표피 복구는 상처내의 사이토카인(cytokine)과 성장인자(growth factor)에 반응하여 손상 후 수 시간 내 시작된다. 이들에 대한 반응으로 상처 가장자리와 상처 기저부 전체의 기저세포들이 단일층으로 이주하고 길어지게 된다. 기저세포는 손상 후 24-72시간 내 최고조에 도달하는데 낮은 농도의 산화질소와 몇몇 성장인자가 기저세포의 증식을 자극한다. 습윤 환경에서 표피의 복구 과정이 잘 된다는 것은 이미 알려진 사실이다. 공기 중에 노출되어 건조된 상처는 딱지로 덮이게 되며 상피세포가 딱지를 부드럽게 만들기 위해 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase)를 분비하고 각질세포가 이주할 수 있는 환경을 만드는 동안 상처 치유가 지연된다. 새로운 상피로 덮이는 과정이 끝나며, 상피 세포는 수직 이주와 표피 분화를 계속하여 정상적인 표피 두께와 기능을 회복하며 새로운 표피는 점차 재색소화 된다. 상피세포의 수직 이주는 산화질소 수치가 높아지면서 부분적으로 조절된다. 상처 기저부의 각질세포 수가 많아지면서 산화질소 수치가 높아지게 되는데 이는 각질세포 증식의 자극이 없어지는 것과 같다.

진피 복구는 재상피화와 거의 동시에 진행된다. 새로운 혈관이 돌아나오기 시작하면서 섬유아 세포는 7일쯤 많아지게 되고 콜라겐 섬유는 9일쯤 상처 기저부에서 보인다. 콜라겐 합성을 통해 손상 후 10-15일 쯤까지 결체 조직 생성을 계속하며 새 결체 조직이 계속 자라나는 동안 편평한 표피는 새로운 혈관과 콜라겐 섬유를 둘러싸고 아래로 떨어지면서 진피-표피 연결점을 다시 만들게 된다. 새로운 결체조직이 점점 수축하면서 표피는 진피에 가깝게 유도된다. 모공을 둘러싸고 있는 상피서 진피 세포는 부분층 상처의 진피 복구에서 중요한 기능을 한다.

3도 화상은 피부의 전층과 피하지방층까지 화상을 입은 것으로 때로는 근육이나 뼈가 노출될 수 있다. 화상을 입은 부위는 피사에 빠지고, 회백색 또는 흑갈색의 딱지로 덮이며, 증기에 의한 화상에서는 흰색 또는 대리석 모양을 나타낸다. 만져도 아픔을 느끼지 않는다. 2주일 쯤 지나면 딱지가 벗겨져 궤양면이 나타난다. 분비액이 많고, 출혈하기 쉽지만, 점차 육아조직이 생겨 표피가 재생되어 반흔을 남기고 치유된다. 피사가 깊은 경우, 또는 2차 감염을 일으킨 경우, 치유가 늦고 반흔 표면이 불규칙해져서 켈로이드(keloid)가 생기거나, 변형이나 운동장애가 남기도 한다. 화상 입은 면적이 체표면적의 10% 이상에 미치는 경우는 특히 주의한다. 빠른 시간 내에 전문적인 치료를 받아야 하고 완전한 상처 치유와 흉터를 줄이기 위해서 피부 이식(skin graft)이 필요하다. 근육, 근막, 골막, 골까지 침범한 화상을 4도 화상이라 말한다.

3도 화상은 전층 피부 손상 복구 과정을 통해 치유된다. 일반적인 급성 상처의 피부 손상 치유 기전은 지혈, 염증반응, 증식기, 재건기의 4가지 주요 단계로 개념화되어 있다. 각각의 단계는 상당히 겹치는 부분이 있고 한 단계에서 겹치는 세포는 화학적 자극을 만들고 상처가 다음 단계로 움직이도록 하는 물질을 만든다. 지혈 과정은 출혈이 응고 다단계를 활성화시켜 발생하는 것이다. 혈관 손상이 내피하층의 콜라겐을 혈소판에 노출시켜 혈소판 활성화와 응집을 촉진

하는 동시에 손상받은 세포는 내외적 응고 경로를 모두 활성화하는 응고인자를 방출한다. 화상 상처가 다른 급성 상처와 다른 점은 일반적인 상처와 같이 혈관 구조물의 물리적 손상이 거의 없이 상처에 출혈이 없다는 것이다. 즉 다른 급성 상처 치유의 초기 단계에 생성되는 혈액성 채움(hematogenous infill)이 화상 상처에는 없다.⁷⁾

화상 조직에서는 다양한 혈관활성 염증 물질이 형성되는데 가장 주목할 만한 것은 트롬복산 A(Thromboxane A), 프로스타글란딘 F(Prostaglandin F)이다.^{8,9)} 염증 과정은 깨끗한 상처 기저부의 구축을 위해 죽은 조직이나 손상 받은 조직을 부수고 백혈구에 의해 과도한 세균을 제거하는 것이다. 염증의 임상적 증상은 부종, 홍반, 삼출물 등이며 화상상처에서는 부종이 매우 심각하게 나타난다. 모세혈관 이완, 사이토카인, 성장인자들이 백혈구를 끌어들이는 화학유인 과정을 통해 백혈구를 끌어들이는 것이다. 가장 처음 나타나는 백혈구는 중성구로 세균과 괴사 조직을 탐식한다. 손상 후 3일째 쯤 중성구는 세포자멸사 결과로 자연스럽게 사라지기 시작하며 대식세포로 대체된다. 대식세포는 상처복구의 조절자라 불릴 정도로 상처 치유 과정에서 많은 역할을 한다. 대식세포는 세균 탐식과 손상된 조직 파괴 외에 산화질소를 합성하는데 이는 항균 효과를 가진 물질이며, 콜라겐분해효소와 엘라스틴분해효소를 합성하여 괴사 조직 파괴에 기여한다. 효소를 이용하여 괴사 조직을 파괴하는 것은 상처 내의 건강한 조직에게 잠재적인 위협요인이 될 수 있으므로 대식세포는 효소성 활동을 방해함으로써 건강한 조직을 보호하는 금속단백분해효소억제제(Tissue inhibitor of metalloproteinase)도 생산한다. 또한 대식세포는 많은 수의 강력한 성장인자를 방출하여 신생혈관형성, 섬유아세포의 이주와 증식, 결합조직 합성을 자극한다.

전층 상처 치유의 다음 단계는 증식기이다. 이 단계 동안 혈관 통합성이 회복되고 절개 부위 결손은 새로운 결합 조직으로 채워지며 상처 표면은 새로운 상피로 덮인다. 증식기의 주요 요소는 상피세포화 과정, 신생혈관형성과정, 기질 축적, 콜라겐 합성 등이다. 신생혈관형성은 상처 기저부에 있는 각질세포가 분비하는 혈관형성성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)와 저산소 환경에 의해 자극된다. 산화질소는 VEGF 생산을 증진시켜 내피 증식을 자극하는 것으로 생각된다. 섬유아세포는 탈과립 혈소판과 활성화된 백혈구(중성구와 대식세포)에 의해 방출된 성장인자에 반응하여 상처 주위 조직에서 기저부로 이주한다. 섬유아세포는 염증기 마지막에 상처 기저부에 나타나기 시작하여 증식기에 주된 세포가 된다. 일단 섬유아세포가 상처에 도달하면 성장인자는 섬유아세포 수용체 부위와 결합하여 섬유아세포가 세포주기 중 재생산기로 들어가도록 세포내 과정을 촉발하여 섬유아세포의 증식을 자극한다. 세포외기질이 성숙해가면서 콜라겐은 세포외기질의 50% 이상을 차지한다. 하이알루론산(hyaluronic acid)은 세포 이주를 촉진하고 자유기와 단백질분해성 손상에 대해 세포를 보호하며 새로운 기질의 점도탄력성 형성에 기여한다. 초기 콜라겐은 제한된 장력을 가졌으나 콜라겐이 성숙해감에 따라 III형 콜라겐이 진피 조직에서 정상적으로 발견되는 유형인 I형 콜라겐으로 바뀐다. 증식기에 발생하는 상처 수축은 이차 유합으로 상처가 봉합되는 경우에 더욱 중요하다. 개방성 상처에서 수축 속도는 1일 0.6-0.7mm이다. 근섬유아세포와 평활근 단백질이 수축을 중개하는 것으로 여겨진다. 세포내의 가는 근육미세섬유(actin filament)와 세포외의 섬유결합소가 실제적으로 세포외기질을 수축시키기 위한 물리적 힘을 가한다. 섬유아세포를 근섬유아세포로 전환시키는 것은 상처기저부에서 발휘되는 물리적 스트레스에 의해 자극이 되며 가는 근육미세섬유는 TGF- β 에 의해 중개된다. 개방성 상처에는 상피화과정이 지연되거나 어려운 경우가 많다. 특히 크기가 큰 화상의 경우, 상처를 빨리 봉합할수록 치료 결과가 좋으므로 피부 이식을 통해

상처를 봉합하는 경우가 많다.

재건기에는 과형성된 콜라겐이 분해되며 상처의 용기되었던 부분이 점차 낮아지며, 부드러워지는 시기로 몇 년 이상 지속된다.

화상의 치유 기전은 혈관성 손상에 대한 반응으로 나타나는 지혈과정이 없다는 점에서 상처 치유의 모델로 이용되는 절개성 상처 치유 기전과는 다르다. 화상의 단계에 따라 부분층 피부 손상 치유 과정에 따라 치유되거나, 전층 피부 손상인 경우, 이차 유합에 의한 상처 치유 과정과 유사하나, 크기가 큰 화상은 재상피화가 어려워 치료 결과 개선을 위해 피부 이식이 주로 수행된다.

1도와 3도 화상에서는 분명한 치료 프로토콜이 확립되어 있지만 2도 화상에서는 여전히 논란이 많다. 진피층 화상은 혈류 손상 (저혈량증, 부종), 감염, 표면 건조, 삼출액 생성, 기계적 또는 화학적 외상, 패혈증, 과도한 대사작용, 동반 질환 등과 같은 여러 가지 국소적 또는 전신적 요인이 작용한다. 따라서 치료 전략을 세우는 것이 상처 치유에 중요한 역할을 한다. 전통적인 방법으로는 괴사 조직이나 가피, 이물질 등을 제거하고 충분히 세척한 후 Silver sulfadiazine 크림(실바딘, Flamazine)을 도포하고 거즈를 올린 다음 폐쇄 드레싱을 시행한다. 그렇지만 실바딘은 치유 기간을 연장시킬 수 있고 거즈 교환 시 심한 통증과 외상을 유발한다. 또 다른 방법으로 파라핀 거즈 등이 사용된다.

화상 치료의 주된 필요조건은 쉽게 이용할 수 있으면서 통증을 줄여주고 치유를 증진시키면서 감염으로부터 예방할 수 있고 열과 수분 손실을 막을 수 있어야 한다. 또한 탄력성이 있어 움직임에 불편함이 없어야 되며 알레르기 반응을 유발하지 않아야 하고, 진피 화상의 표피화가 진행되는 동안 상처에 잘 부착될 수 있어야 하지만 조직 손상 없이 제거도 쉬어야 한다. 가장 좋은 것은 환자의 다른 부분의 피부를 이용하는 것이지만 공여부의 합병증을 유발하므로 쉽게 이용할 수 없다. 그 외 양막이나 이종 피부는 바이러스 감염의 위험성이 있다. 따라서 화상 환자의 치유 과정을 도와주고 가속화 시키고 기능적, 미용적 결과를 향상시키기 위해서 피부 대체물과 생합성 상처 드레싱 분야가 최근 수년 동안 급속도로 발전하고 있고 이에 대한 임상적 적용이 중요해지고 있다. 특히 표피의 부분두께 (1도 또는 표층 2도)의 화상 치료에서 생합성 상처 드레싱의 소비는 수년 동안 매우 증가하고 있고 그 효과가 여러 연구에서 입증되고 있다.¹⁰⁾

Table 2
Dressings for Pressure Ulcers

Type	Indication	MOA	Dosage	Commercially Available Product
Skin sealant, film	Stage I ulcers	Acts as a protective coating on the skin	Apply 1-4 times/day	Decubitene, Preppies, Pro-Q
Hydrocolloid	Stage II ulcers	Maintains a moist environment; naturally promotes autolytic debridement	Change every 3-7 days	Comfeel Plus, Curaderm, DuoDERM
Hydrogel	Ulcers with little to no exudate	Maintains a moist environment; naturally promotes autolytic debridement	1-4 times/day	AcryDerm, Aquaflo, Aquagauze, Aqua Skin, CarraDres, CarraGauze, CarraSmart Gel, Carrasyn, Carrasyn V, DermaGauze, DermaSyn, FlexiGel, SAF-Gel, SoloSite, Tegagel, TransiGel, Woun'Dres
Moist saline gauze	Stage II-IV ulcers	Maintains a moist environment; has antibacterial activity	3 times/day, as needed	Curasalt, Curity, Dermagran, Kerlix
Iodine-solution wet gauze	—	Has broad-spectrum antimicrobial activity	1-4 times/day	—
Alginate	Exudating stage II ulcers; stage III-IV ulcers that are deep	Serves as an absorbent by maintaining a moist environment	1 time/day, if needed	AlgiCell, AlgiSite M, CarboFlex, CarraGinate, DermaGinate, Kalginate, Kaltostat, Melgisorb, Restore CalciCare, Sorbsan
Foam	Exudating stage II ulcers; stage III-IV ulcers that are deep or have moderate drainage	Serves as a repellent for water, bacteria, other contaminants; maintains a moist environment; acts as insulation; reduces odor	1 time/day, if needed	Allewyn, Biatain, CarraSmart Foam, Curafoam, DermaLevin, Epigard, HydroCell, Lyofoam, Mepilex, Optifoam, Polyderm, PolyMem, Silon, SOF-Foam, Tielle, VigiFOAM

MOA: mechanism of action.
Source: References 9, 10, 15-17.

1) Hydrocolloids

sodium carboxymethylcellulose (NaCMC)과 젤라틴과 같은 겔을 형성하는 물질들로 이루어져 있다. 많은 생산물에서 elastomer, 접착제와 함께 섞여 흡수성이면서 접착 가능하고 방수되는 웨이퍼를 형성하기 위해서 대개 폴리우레탄 폼이나 필름과 같은 매개체로 적용된다. 대표적으로 Granuflex/Duoderm (ConvaTec, Skillman, New Jersey) 있으며 그 외 Comfeel (Coloplast, Humlebaek, Denmark), Tegisorb (3M, St. Paul, MN) SureSkin (Euromed, Orangeburg, NY), Restore (Hollister, Libertyville, IL) 등이 판매되고 있다.

삼출액이 존재할 때 하이드로콜로이드는 수분을 흡수하여 겔을 형성한다. 가장 큰 장점은 다른 드레싱과는 다르게 젖은 상태에서 점성이 있어서 건조한 상태뿐만 아니라 젖어 있는 상태에서도 부착되어 있을 수 있다. 많은 연구들에서 하이드로콜로이드 드레싱은 통증을 줄이고 치유기간을 단축시키며 자주 교체하지 않아도 되고 치유될 확률을 높임으로서 파라핀 거즈, 마른 거즈, 식염수 적심과 같은 전통적인 드레싱보다 효과적임을 밝혀냈다. 그럼에도 불구하고 수십년 동안 상대적인 비용의 문제로 인하여 전통적인 방법을 계속 사용하게 하였다.



단점으로는 드물게 알레르기 접촉성 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그렇지만 일부 하이드로콜로이드 드레싱은 점착성 강화 물질로 hydrogenated rosin의 pentaerythritol ester를 포함하고 있어 과민반응을 유발할 수 있다. 또한 하이드로콜로이드는 중간 이상의 삼출액이 많은 상처에는 적당하지 않으며, 부착은 쉬우나 제거할 때 더 어려운 것으로 알려져 있다.

2) Biobrane

바깥쪽은 실리콘, 중간층에 나일론, 안쪽에 돼지 콜라겐 Type I으로 되어 있는 필름 형태이다. 반투과성으로 혈액과 혈장 등의 상처액이 막을 통과할 수 있게 하고 재상피화가 일어날 때까지 상처에 남아있다.



상처부위가 잘 관찰될 수 있고 빠르고 쉽게 사용할 수 있으며 상처 치유 시간을 단축시키고 실리콘이 감염의 위험성을 낮추는 장점들을 갖고 있다. 일반적인 치료에 비하여 통증을 줄여주며 silver sulfadiazine 드레싱을 교환할 때마다 발생하는 신체적, 정신적 외상이 없으며 비용 절감 효과를 볼 수 있다. 유연하여 운동성을 증가시키고 외부의 오염에 방어막으로 기능한다.

Biobrane은 죽은 조직에는 부착하지 않기 때문에 모든 응고물과 딱지는 제거되어야만 하고 부착 전에 지혈이 되어 있어야만 한다. 부착 후 7-14일 후에 조직이 재생되면 biobrane을 제거

한다. Biobrane에 의한 알레르기 반응을 유발할 수 있다.

3) Suprathel (Stapleline)



L-laktidtri-methylenecarbonate과 e-caprolakton의 혼성고분자로 되어 있는 흡수성의 합성 상처 도포제이다. 높은 성형율과 체온에서 상처 부위에 즉시 적응하는 장점이 있다. 수분 투과성은 상처 분비물의 축적을 예방하고 상처부위의 탈수를 막는다. 빠른 상처 치유와 상피화를 가능하게 한다.

4) Allevyn



Allevyn은 통기성이어서 과도한 수분을 증발시키면서 외부의 수분과 세균이 통과하지 못하는 폴리우레탄 필름(polyurethane top film)과 삼출물을 흡수하는 하이드로셀룰라 폼(Hydrocellular Foam), 점도가 높은 삼출물도 흡수할 수 있으면서 비접착성의 다공성 상처접촉층(wound contact layer)의 3층으로 되어 있다. 이 3층은 함께 수분의 균형을 맞추면서 빠른 상처 치유를 돕는다. 유연하며 교환이 쉽고 부드러운 재질로 되어 있어 완충효과가 있다. 그렇지만 불투명하여 상처의 치유 과정을 확인할 수 없다.

그렇지만 현재 화상 치료에 상용되고 있는 이와 같은 생합성 상처 드레싱은 화상전용으로 특화된 것이 아니라 일반적인 상처 복구 과정에서 가이드 역할만을 하는 것으로 화상에서는 완전 치유 가능성이 높지 않다. 또한 개당 5만원에서 10만 원 이상의 고가로 화상면적이 넓은 곳에는 고액의 비용이 발생할 수 있으며, 고가로 판매되고 있어 화상면적이 넓은 곳에는 고액의 비용이 발생한다. 따라서 화상 치료의 필요조건을 만족하면서 상처 치유기간을 단축시키고 상처 치유확률을 높일 수 있으며 비용이 적게 드는 화상전용 드레싱을 개발할 필요가 있다.

제 2 절 필요성

누에고치에서 추출되는 실크 단백질은 세리신과 피브로인으로 구성되어 있으며, 오랫동안 수술용 봉합사, 화상치료 등 민간요법으로 활용되어 온 전통적인 의료용 고분자 소재 중의 하나이다. 또한 실크 소재로 만든 의복은 단순히 입기만 해도 피부 가려움증이나 다발성 피부질환

이 치료되는 효과가 있다고 알려져 있다. 경제적인 측면에서도 자연계에서 생산되는 다른 천연 고분자와는 달리 곤충(누에)을 통하여 순수한 단백질은 대량으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 실크는 조직 대체와 치유를 위해 특히 인대를 대체하거나 봉합사로서 100년 이상 사용되어 왔으며, 미국 FDA에서 인정한 생체고분자의 하나인 실크 단백질을 이용한 생체의료용 소재 개발에 관한 관심이 증대되고 있다. 화상치료를 위하여 누에고치를 태워서 사용했다는 기록이 동의보감 등에 기록되어 있으며, 실크단백질은 생체 매립 시 염증반응이 거의 일어나지 않을 정도로 생체적합성이 우수하고 수증기 및 산소 투과성, 그리고 습윤 상태에서의 기계적 성질 등이 우수하므로 화상 드레싱에의 적용 가능성이 높다.

실크 고분자는 사람 피부의 천연보습인자와 유사한 아미노산 조성을 가지고 있을 뿐 아니라 실크 단백질이 코팅된 재료에 사람 피부 섬유아세포를 배양한 결과 초기 부착율이 증대됨을 보고하고 있다. 뿐만 아니라, 수정체 상피 세포 등 실크 고분자에 부착하여 성장하는 세포는 특별한 형태 변화 없이 잘 자라는 것으로 보고되었다. 다시 말하면, 실크 단백질은 일반적인 세포에 대한 세포독성이 없어 생체친화성이 높고 안전한 물질임을 확인할 수 있으며 세포 재생과 관련된 생체재료 개발에 실크 고분자의 응용 가능성이 높음을 시사한다.

실제로 실크 피브로인은 높은 장력, 조절할 수 있는 생체 분해성, 항상성, 무세포독성, 낮은 항원성, 비염증성 특징을 갖고 있어 생체의학부분에서 다양하게 이용되고 있는데, 다양한 세포와 조직과의 생체적합성으로 인하여 여러 생체적합물질 영역에 적용되고 있다. 특히 다양한 범위의 분자 구조와 다양한 처리 능력, 표면 변형가능성 등이 조직 공학에 대한 고분자 생체적합물질로 적용될 수 있게 한다. 다른 자연 또는 합성 고분자 물질인 셀룰로오스나 키토산과 함께 섞어 뼈와 인대와 같은 골격을 만들 수 있고 피부와 같은 결합조직을 만들 수 있다. 현재 실크 피브로인을 이용한 고막, 신경관, 인공진피 (그림 1) 등이 활발히 개발되고 있는 중이다.

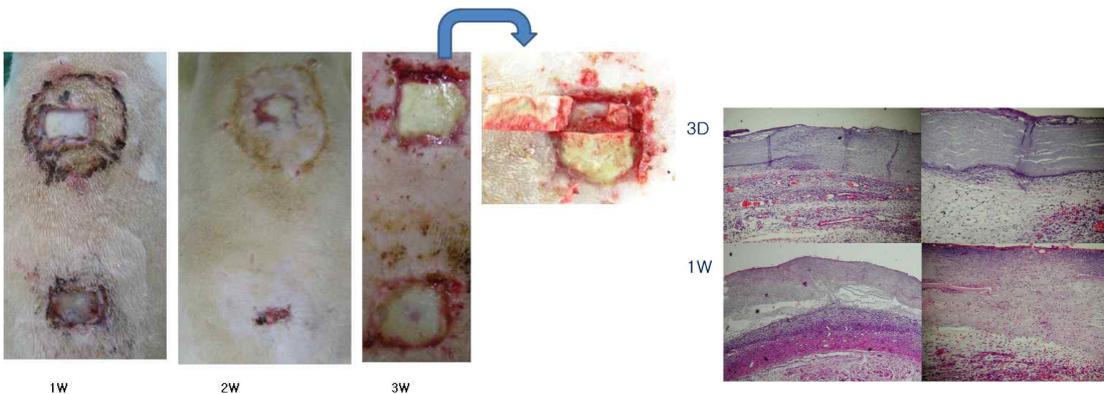


그림 1. 실크 나노 섬유막을 rat의 진피가 제거된 부위에 덮은 후 생체 적합성 및 피부 재생 과정. 3주 경과 후 자가 진피 이식 부위에 비해 비교적 염증 반응 및 창상 치유 효과가 차이가 없었으며 또한 자가 진피에 비해 창상 후 수축이 적은 장점이 있음(한림대학교 나노바이오재생의학연구소).¹¹⁾

실크 피브로인은 현재 널리 사용되고 있는 폴리우레탄 재질의 드레싱보다 더 빠른 상피화를 유도하면서 염증반응을 거의 일으키지 않는 것으로 여겨진다. 실크 피브로인 하이드로겔(hydrogel)과 현재 시판 중인 폴리우레탄 재질의 Cutinova hydro와 창상 치유 효과를 비교한 동물 실험에서 실크 피브로인 하이드로겔은 상처가 유발된지 3일 이내에 상처 가장자리의 재생피화가 시작되게 하여 Cutinova hydro보다 3일 더 빠르게 상처를 완전히 낫게 한다. 또한

염증 세포가 더 적고 혈관 재형성, 섬유아세포와 콜라겐 합성을 더 많이 촉진하고 세포들이 부착할 수 있는 지지체 역할을 하여 상처 치유 과정을 촉진시킨다. 다른 연구에서도 DuoActive 보다 7일 더 빨리 상처 치유를 유도하고 상처 부위를 적당히 습윤을 유지할 수 있게 하며 성장인자, TGF, 인터루킨, 사이토카인 등을 유지시켜 상피화를 촉진할 수 있게 한다고 보고하였다. Cutinova hydro는 폴리우레탄 겔 매트릭스에 폴리우레탄 필름이 덮여 있어 방수 효과와 세균에 대한 방어능력이 있고, 상처 부위의 삼출물은 흡수하는 한편 상처 치유에 중요한 상처 내 성장인자와 단백질은 흡수하지 않는다고 하였는데, 그 효과가 실크 피브로인 하이드로겔에서 더 높아 빠른 상처 치유를 유도하는 것이다.

이와 같이 실크 피브로인을 이용한 화상전용 드레싱은 현재 많이 쓰이고 있는 폴리우레탄 재질에 비하여 더 효과가 뛰어나면서 염증반응을 일으키지 않고 수증기 및 산소 투과성이 뛰어나는 것이다. 실크 피브로인은 습윤 상태에서의 기계적 성질이 뛰어나므로 폼(foam)이나 스펀지(sponge) 형태의 다공성 구조로 제작한다면 삼출물 흡수력은 훨씬 뛰어나면서 탄력성 있고 상피화가 진행되는 동안 상처에 잘 부착될 수 있을 것이다. 특히 전기 방사한 나노섬유는 세포의 기질과 구조적, 물리적으로 비슷하며 신체 조직으로부터 세포 부착과 성장을 촉진시키는 좋은 재료로 평가 받고 있어 생체 의학용 사용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전기 방사한 실크 피브로인 나노섬유막은 매우 부드러우며 쉽게 모양을 바꿀 수 있어 각이 지거나 운동이 많은 부위에 적용하여도 쉽게 부착 가능할 것이다. 나노섬유 사이 공극의 크기가 1 μ m로 상처의 삼출액 흡수는 잘되지만 외부의 세균의 침투가 불가능하며, 재생하는 세포가 드레싱 내부로 침투하지 못하여 상피화가 끝난 후 드레싱을 제거할 때 조직 손상이 없을 것으로 생각된다. 그러나 일반적인 전기 방사를 통한 나노섬유막의 경우, 직경 100~800 nm의 섬유가 불규칙하게 망상 구조로 배열된 일종의 부직포이며, 나노섬유막의 두께는 통상 50~200 μ m의 정도이며 넓은 면적으로 제작이 힘들어 임상에 적용하기 어려운 실정으로 두께와 크기를 조절할 수 있는 기술은 확립되어 있지 않다. 특히 실크 피브로인 나노섬유를 이용하여 상처 드레싱으로 만들 수 있을 정도의 기술은 전무한 실정이다.

한편 실크 피브로인 막은 수증기 및 산소투과성은 뛰어난 반면 물과 세균은 통과시키지 않으므로 이를 폼이나 스펀지의 바깥면에 부착시킨다면 외부의 수분이나 세균에 대한 방어막으로 기능할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 민간에서 사용하고 있는 누에고치의 화상 치료에 효과적인 것의 입증하여 실크 피브로인 나노 폼이나 실크 피브로인 스펀지를 제작 후 실크 피브로인 막과 함께 이중 구조로 만들어 생체적합하면서 치유 기간을 감소시키고 치유 확률을 높이면서 감염 예방과 부착과 제거가 용이한 획기적이면서 최적화된 화상전용 드레싱을 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구 현황

- 화상 드레싱제는 건조드레싱제와 습윤드레싱으로 구분할 수 있으며, 최근에는 습윤환경의 장점들의 부각으로 습윤환경 치료 개념을 쓰고 있다. 습윤드레싱제는 폐쇄성과 개방형이 있으면 대부분은 폐쇄성 드레싱제이다.

- 폐쇄성 습윤드레싱제의 종류로는 폴리우레탄 필름 드레싱제, 하이드로콜로이드제 (Duoderm, Compeel, Exuderm, Combiderm), 폼드레싱제(Medifoam), 하이드로겔(Purilon), 알지네이트, 하이드로 화이버(Aquacel), 혼합형, 액티코트 등이 있다.

- 실크 단백질의 생체안정성에 착안하여 실크단백질을 이용한 조직공학용 지지체 및 인체 보형물 소재 개발 연구가 수행되고 있다 (농촌진흥청, 한림대학교, 서울대학교 등)

- 실크 단백질을 이용한 창상 치유 효과 및 진피 대체용 개발 연구가 진행되고 있으나 (서울대학교, 한림대학교 등), 화상전용 드레싱제 개발 연구는 전무하다.

- Nano-fiber를 이용한 드레싱제제 및 스케폴드 개발을 위한 연구가 진행되고 있다 (베스티안 중앙연구소)

제 2 절 국외 연구 현황

- 미국 Tufts 대학 등은 2000년대 초반부터 실크단백질 3차원 지지체를 이용한 조직공학용 생체재료 개발을 선도하고 있으며, 유럽, 중국, 인도에서도 활발하게 이루어지고 있다.

- 실크 나노막 및 스폰지를 이용한 창상 치유 효과에 관한 연구는 많이 보고되어져 있으나, 실용화 사례는 보고되어 있지 않으며, 화상 드레싱제로의 개발 연구는 진행되고 있지 않고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실크 피브로인의 화상 효과 검증

1. 재료 및 방법

1) 동물 실험

21마리의 rat을 이용하여 실험을 진행하였다. 모든 실험군에 럽푼 (바이엘코리아, Korea)과 졸레틸 (VIRBAC, France)을 1:2로 혼합한 마취액 1.5 ml을 복강 주사하여 전신 마취시킨 후 전기 제모기로 쥐의 등 부위 털을 제거한 후, 등 부위의 3곳을 60도로 가열한 plate (1 X 1.5cm)를 30초간 처리해서 2도 화상을 유발하였다. 화상 부위에 맞는 실크 피브로인 나노 스펀지폼을 덮었으며 대조군과 비교군으로는 거즈와 메디폼을 이용하였다. 화상 유발 후 6시간, 1, 3, 7, 14, 21, 28일에 화상 부위의 변화를 육안 관찰 및 조직학적 염색을 통해 기간별로 관찰하였고 Real-time RT-PCR을 통해 유전자 발현을 확인하였다.

2) 조직학적 염색

-H&E 염색

조직절편을 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거한 후 100, 90, 80, 70% 알코올과 증류수로 5분간 함수시켰으며, 증류수로 세척한 후 사용하였다. Harris hematoxylin으로 6분간 염색하였고, 물에 조직을 5분간 세척하였다. 세척이 끝난 조직을 Eosin으로 5분간 반응을 유도한 후 70, 80, 90, 100% 알코올 및 자일렌을 이용하여 탈수한 후 Shandon Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하였다.

-Masson's trichrome 염색

조직 절편을 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거한 후 100, 90, 80, 70% 알코올과 증류수로 5분간 함수시켰으며, 증류수로 세척한 후 사용하였다. 50°C에서 Bouins (IMEB, USA) 용액에 한 시간 동안 조직을 반응시킨 후 물에 5분간 세척하였다. Hematoxylin (IMEB, USA)으로 7분간 반응을 유도한 후, 물에 세척하였다. 반응과 세척이 끝난 조직을 다시 Biebrich scarlet-acid fuchsin, Phosphomolybdic-phosphotungstic acid, Aniline blue stain solution (IMEB, USA)으로 각각 5분간 처리한 후 물로 세척하였다. 70, 80, 90, 100% 알코올 및 자일렌을 이용하여 탈수한 후 Shandon Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하였다.

3) Real-time RT-PCR

기간별로 얻은 조직으로부터 RNA를 추출 후 cDNA를 합성하였다. 발현 변화를 알아보고자하는 각 유전자의 primer는 NCBI에 등록된 sequence로부터 제작하여 PCR product 200bp 미만으로 제작하였다. PCR은 denaturation 95°C, 20s, annealing 50°C, 20s, extention 72°C, 20s 조건으로 40 cycles을 수행하였다.

2. 연구 결과

1) 실크 피브로인 나노스펀지폼에 의한 화상치유 효과 관찰 (육안적 관찰)

동물 모델 이용하여 2도 화상에서의 실크 피브로인 나노스펀지폼에 의한 화상치유 효과 실험을 수행하였다. 육안적 관찰 및 화상 면적 계산을 통해 화상 유발 후 7일 이후부터 실크 피브로인 나노스펀지폼에 의해 화상 치유 효과가 뚜렷이 나타남을 확인하였다.



그림 2. 실크 피브로인 나노 스펀지폼의 화상 치유 효과 검증을 위한 동물 실험.

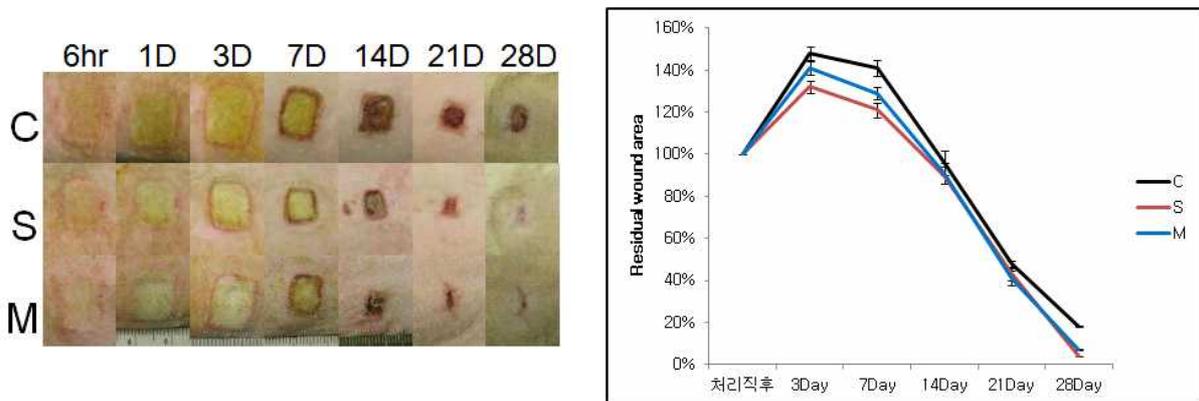


그림 3. 실크 피브로인 나노 스펀지폼에 의한 화상 치유 효과 관찰. C: control (거즈), S: Silk, M: Medifoam.

2) 조직학적 염색 결과

- 화상 후 1 일차에서는 2도 화상에 준하는 조직학적 소견으로 열상으로 괴사된 조직의 깊이가 각군간의 커다란 차이점이 보이지 않았으나, 3 일차에서는 실크 피브로인 나노스펀지폼에서 진피 부분의 재생이 뛰어나 거즈 및 메디폼 처리군에 비해 열상으로 괴사된 부위가 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- 7 일차에는 3군 모두에서 진피 및 상피 재생 과정을 확인할 수 있었으나 3일차와 마찬가지로 실크 피브로인 나노스펀지폼에서 다른 군에 비해 높은 재생 효과를 확인하였다. 14 일차에 거즈 처리군은 상피화가 완벽하게 이루어지지 않은 상태로 가피(crust) 및 부분 상피화가 있는 상태였으나, 실크 피브로인 나노스펀지폼과 메디폼 처리군에서는 새로운 상피층이 형성되어 정상적인 상피에서 볼 수 있는 케라틴을 확인할 수 있었다.
- 21 일차에 실크 피브로인 나노스펀지폼과 메디폼 처리군에서는 정상 상피 조직으로 재생되어 케라틴 분비 소견을 보였으나, 거즈 처리군은 이에 비해 부분 상피 재생 소견 및 가피 소견을 보였다.
- 28 일차에는 거즈 처리군에서는 상피층이 과성장(overgrowth) 소견을 보였으며, 실크 피브로인 나노스펀지폼과 메디폼 처리군에서는 비교적 완벽한 상피 및 진피 재생 소견을 보였고, 특히 실크 피브로인 나노스펀지폼의 경우 진피 부분의 재생 소견상 비교적 일정한 배열을 보여 흉터가 적은 소견을 나타내었다.
- 같은 기간에 콜라겐 침착 및 배열을 확인 위해 Masson's trichrome 염색을 한 결과, 실크

피브로인 나노스펀지폼의 경우 거즈 및 메디폼 처리군에 비해 비교적 일정한 콜라겐 배열 소견을 확인할 수 있었으며, 이는 실크 피브로인 나노스펀지폼이 화상 후 흉터가 적다는 것을 나타내었다.

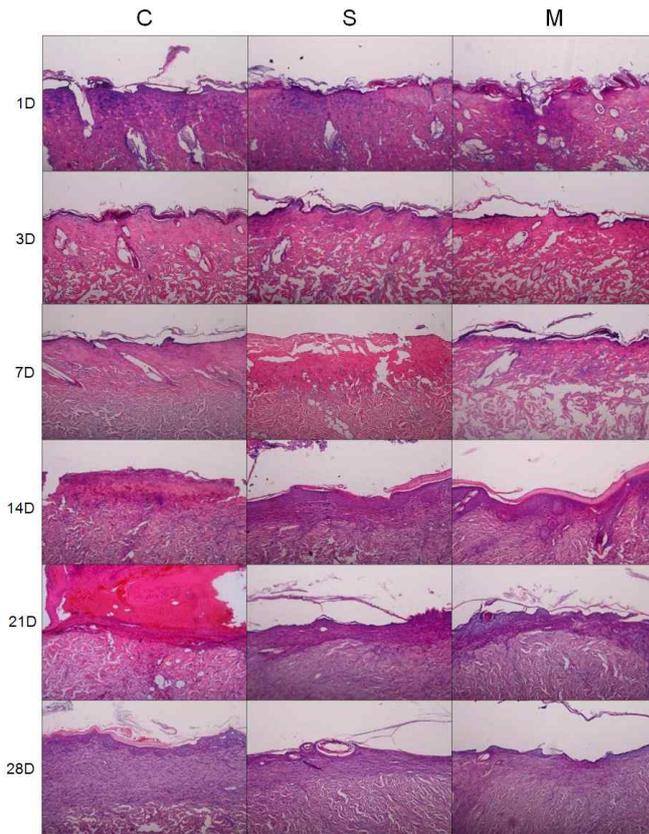


그림 4. H&E 염색을 통한 피부 재생 확인.
C: control (거즈), S: Silk, M: Medifoam

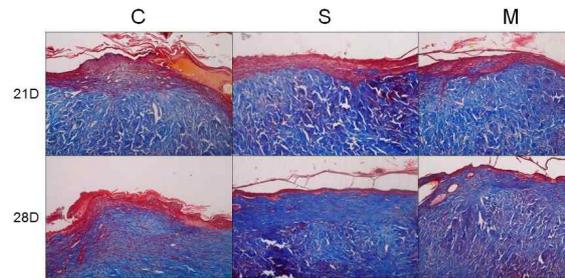


그림 5. MT 염색을 통한 콜라겐 발현 확인.
C: control (거즈), S: Silk, M: Medifoam

3) 유전자 발현 변화

- 화상 치유 과정에 관여하는 성장인자의 변화를 확인하고자 조직 재생에 관여하는 성장 인자인 TGF-beta(transforming growth factor beta)와 창상 염증 유발 인자인 IL(interleukin)-1 alpha의 발현 정도를 Real-Time RT-PCR로 확인하였다.

- TGF-beta의 경우, 조직 손상의 심한 정도에 따라 초기에 증가하는데 초기에 과도한 증가는 흉터를 만든다. 이와 관련하여, 실크 피브로인 나노스펀지의 경우 초기에 이와 같은 성장인자를 거즈 및 메디폼 처리군에 비해 억제하는 소견을 보이나 화상 치유 후기(21일)에는 증가하는 소견을 보였다. 이로서 실크 피브로인 나노스펀지의 화상 치유 과정에서 가장 중요한 흉터 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

- 특히, 21일째 실크 피브로인 나노스펀지에서 발현이 증가하는 것을 확인하였는데, 이 시기는 콜라겐 합성의 증가 및 조직 재배열이 일어나는 시기여서 상기 성장인자의 발현을 증가시킴으로써 흉터 없이 화상을 치유하는 것으로 생각된다.

- 실크 피브로인 나노스펀지의 경우 거즈 및 메디폼 처리군에 비해 초기에 염증세포 유발 인자인 IL-1a의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며, 이는 후기 화상 치유 시 흉터를 적게 하

는 효과를 나타내는 것으로 파악되었다.

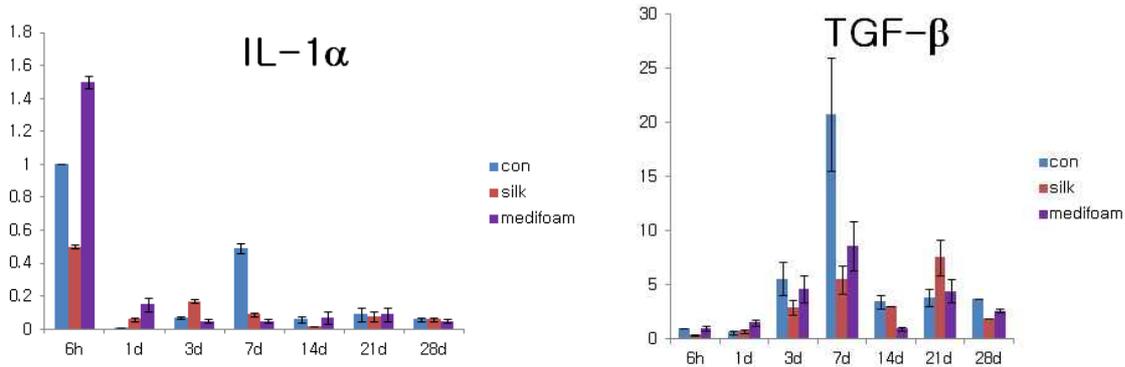


그림 6. 화상 치유에 관여하는 유전자 발현 패턴 확인 (Real-Time RT-PCR)

제 2 절 실크 피브로인을 함유한 스펀지 제작

1. 재료 및 방법

1) 실크 피브로인 스펀지의 제작

실크 피브로인, Polyvinyl alcohol (PVA), Hyaluronic acid (HA)를 혼합하여 거품을 내어 동결건조를 통해 스펀지를 제작하였다. 만들어진 스펀지는 100% EtOH를 분무하여 실크 피브로인을 부분 결정화하거나, 수화 과정을 통해 실크 피브로인을 부분 결정화하였다. 또한 실크 피브로인, PVA, 젤라틴을 위와 같은 방법으로 스펀지를 제작하였으며 160°C에서 3시간동안 젤라틴을 결정화하였다.

2) 스펀지의 접착력 확인

1x1cm 크기로 자른 샘플의 위,아랫면에 saline 10uL를 떨어뜨리고 디바이스를 이용해 15N의 힘으로 10분간 눌러준 다음 각 디바이스를 떨어뜨리며 스펀지에 의한 접착력을 측정하였다.

3) 팽윤도 확인

각 스펀지를 1x1cm 크기로 잘라 무게를 측정하고 saline에 3시간 침지한 후 다시 무게를 측정하여 팽윤도를 계산하였다. 계산 방법은 다음과 같다.

$$\text{Swelling power} = \text{Weight of sediment} / \text{Weight of dry sample}$$

4) 용해도 확인

saline에서 스펀지를 침지시킨 후 0시간, 3시간, 24시간 관찰하였다.

2. 연구 결과

1) 실크 피브로인 스펀지의 형태

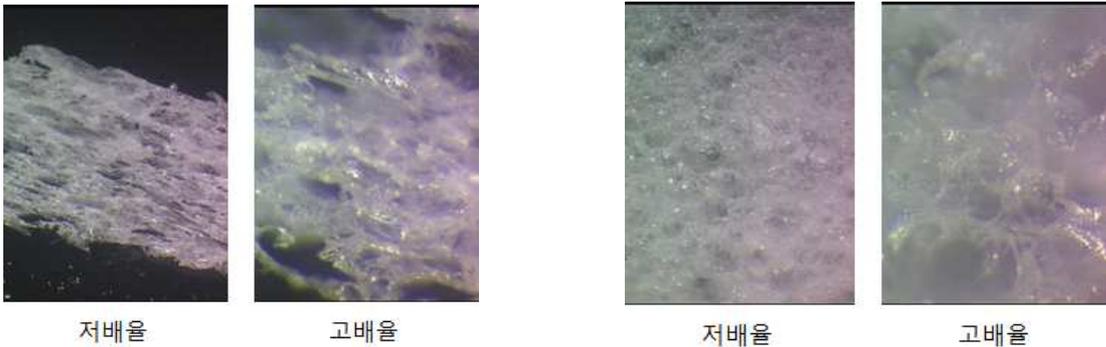


그림 7. 실크 피브로인, PVA, HA를 혼합 및 동결건조 한 스펀지. 불규칙하고 납작한 모양의 공극을 가진 구조. 실크 피브로인을 결정화하기 전에는 유연성을 가지나 결정화 후에는 유연성이 감소하여 brittle함. (저배율 X40, 고배율 X200)

그림 8. 실크 피브로인, 젤라틴, PVA를 혼합 및 동결건조 한 스펀지. 젤라틴에 의해 동그란 공극을 가짐. 젤라틴 결정화 전에는 유연함을 가지고 있으나 결정화 후에는 유연성이 감소함. (저배율 X40, 고배율 X200)

2) 실크 피브로인 스펀지의 접착력 및 팽윤도

	침지 전			평균	침지 후			평균	팽윤도
	1차	2차	3차		1차	2차	3차		
T-1	0.013	0.013	0.013	0.013	0.132	0.193	0.176	0.167	12.846
T-5	0.01	0.009	0.009	0.009	0.132	0.137	0.139	0.136	14.571
T-6	0.014	0.012	0.013	0.013	0.077	0.051	0.066	0.065	4.974

3) 실크 피브로인 스펀지의 용해도

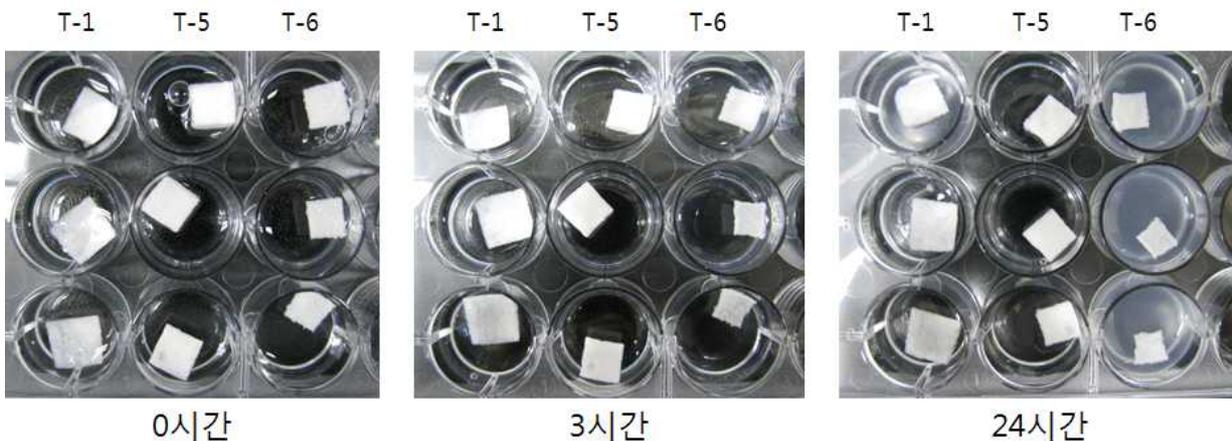


그림 9. 실크 피브로인 스펀지의 용해도 관찰. T-6의 경우 3시간부터 샘플 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, 24시간에서는 saline이 탁해진 것을 확인. T-1에서도 일부에서는 용액이 조금 탁해졌으며 샘플 크기 증가함. 이는 T-6은 T-1보다 실크 피브로인의 결정화가 더 적게 되었음을 나타내며 saline에서 보다 빠르게 녹는다는 것을 의미함.

제 3 절 실크 피브로인을 함유한 이중구조 스펀지

1. 이중구조 스펀지 제작 방법

1) 알긴산나트륨(알지네이트) 수용액을 페트리디쉬에 부어 기포를 제거한 후 동결 건조시켰다. 그 다음 CaCl₂에 침전시킨 뒤 증류수로 3회 씻은 후 동결하였다. 실크 피브로인, HA, PVA를 혼합하여 거품을 낸 다음 미리 만들어 둔 알지네이트 스펀지 위에 부어 고르게 퍼주고 동결건조하여 이중 구조 스펀지를 얻었다.

2) 물에 녹인 젤라틴을 거품 내어 페트리디쉬에 부어 얼려준 다음 실크피브로인, HA, PVA를 혼합하여 거품을 낸 다음 얼려진 젤라틴 폼에 부어 이를 동결 건조하여 이중 구조의 스펀지를 제작하였다.

2. 연구 결과

1) 구조 관찰

본 연구에서 제작한 이중 구조의 스펀지는 윗면과 아랫면의 접착력에 차이를 보였다. 윗면은 접착력이 강한 반면에 아랫면은 접착력이 거의 없었다. 또한 윗면은 녹아 실크 피브로인의 효과를 볼 수 있으며 아랫면이 구조를 유지해 줌으로써 드레싱제로의 응용이 가능할 것으로 예상된다.

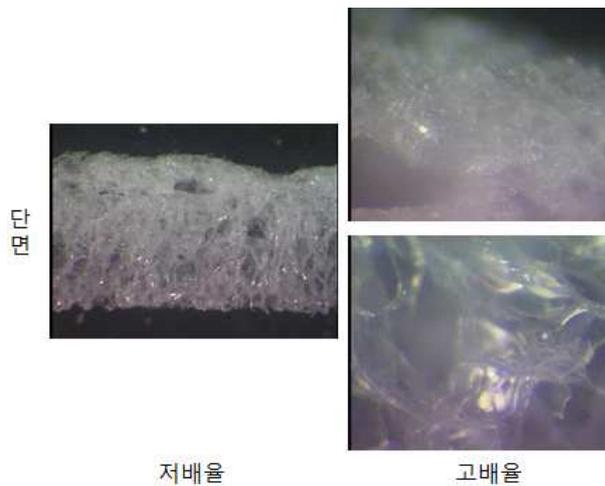


그림 10. 이중구조 스펀지 1. 위쪽: 실크 피브로인, HA, PVA 혼합, 아래쪽: 알지네이트. 공극 모양의 차이 확인. (저배율 X40, 고배율 X200)



그림 11. 이중구조 스펀지 2. 아래쪽: 젤라틴, 위쪽: 실크 피브로인, HA, PVA 혼합. (저배율 X40, 고배율 X200)

제 4 절 실크 피브로인 / Polyethylene oxide(PEO) 혼합방사

1. 재료 및 방법

1) 실크 피브로인/PEO 혼합용액 제조

인체에 무해한 수용성 폴리머인 PEO와 Silk fibroin의 혼합방사 조건을 잡기 위해 다양한 silk fibroin / PEO 혼합용액을 제조하였다 (표 2).

	방사원료	첨가재료	혼합비(Silk : PEO)
sample 1	Silk 8% 수용액	MW90만 10% PEO	3 : 2
sample 2	Silk 8% 수용액	MW90만 10% PEO	3 : 1
sample 3	Silk 8% 수용액	MW20만 PEO powder	10 : 1
sample 4	Silk 8% 수용액	MW20만 PEO powder	20 : 1
sample 5	Silk 8% 수용액	MW20만 30% PEO	4 : 1
sample 6	Silk 8% 수용액	MW20만 30% PEO	5 : 1

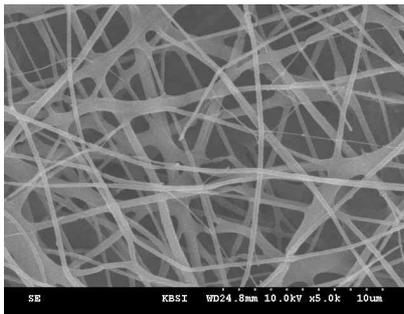
표 2. 실크 피브로인 / PEO 혼합용액 조건

2) 실크 피브로인 / Polyethylene oxide(PEO) nano-fiber 제작

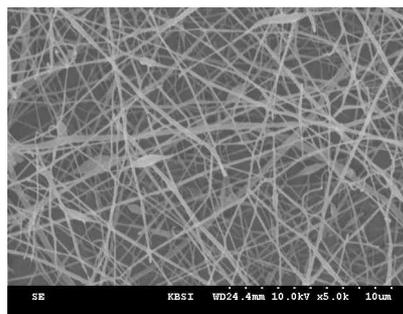
누에고치(*Bombyx mori*)로부터 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거하기 위해 탄산나트륨 등의 염기성 수용액에 넣고 가열한 후 증류수로 세척하였다. 상기 과정을 거친 실크 피브로인을 염화칼슘 등의 염 용액에 넣고 용해시켰다. 상기 용액으로부터 이온 성분을 제거하기 위해 증류수로 36 ~ 72시간 투석한 후, 투석된 실크 피브로인 용액에 실크 피브로인의 물성 개선을 위해 폴리머를 첨가하였다. 실크 피브로인 용액의 점도 및 방사성을 증가시키기 위해 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxidel)을 첨가하여 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액을 제조하였다. 나노 섬유 원액을 주사기에 담고 송출펌프를 이용하여 시간당 1ml으로 토출하였다. 이때 주사기 바늘에 전극을 연결하여 직류전원장치로 정전압(+18KV)을 가하고 collector와의 거리는 15cm로 조절하였다. 형성된 실크 나노 섬유를 회전형 드럼 표면에 수집하였다.

2. 연구 결과

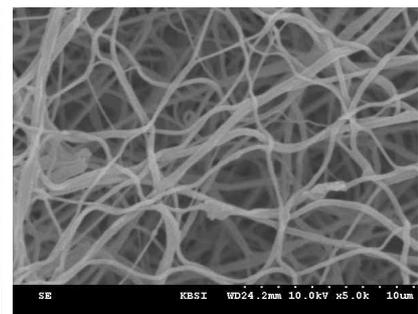
1) nano-fiber 구조 관찰



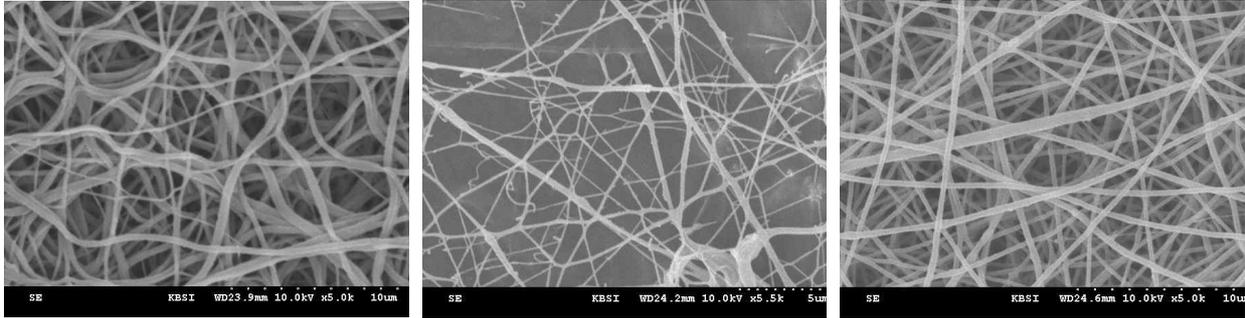
Sample 1 : MW90만 10% PEO, 3:2



Sample 2 : MW90만 10% PEO, 3:1



Sample 3 : MW20만 PEO powder 10:1



Sample 4 : MW20만 PEO powder
20:1

Sample 5 : MW20만 30% PEO 4:1

Sample 6 : MW20만 30% PEO 5:1

그림 12. 실크 피브로인/PEO blend nano-fiber sheet

2) 관찰 결과

- 표 2과 같은 조건의 실크 피브로인/PEO 혼합용매를 전기방사 해본결과 위와 같은 섬유 구조를 얻을 수 있었다.

- Sample 1과 Sample 2를 보면 nano-fiber가 가늘고 굵은 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 섬유 구조가 나온 이유는 두 종류 모두 분자량 90만의 PEO를 사용하였기 때문에 용액 간 상분리가 빨리 일어나 고르게 방사가 되지 않기 때문이다. 본 연구에서 사용하는 실크 피브로인 수용액의 경우 분자량이 20만정도이기 때문에 PEO의 분자량을 동일하게하여 상분리를 방지하였다.

- Sample 3,4,5,6은 분자량 20만짜리 PEO를 혼합한 용매를 전기방사 하여 얻은 섬유상으로 Sample 3와 Sample 4는 PEO를 Powder 형태로 혼합하였고, Sample 5과 Sample 6은 30% PEO 수용액을 제조하여 혼합하였다. Sample 3,4는 PEO powder를 실크 피브로인 용액에 넣어 제조하였는데, 이때 거품이 많이 생겨서 가라앉히는 과정이 필요함. 방사되어 나온 섬유 구조의 경우 섬유가 끈게 뺄지 못하고 구불구불 한 것을 확인하였다.

- Sample 5,6번 제조 시 PEO를 수용액 상태로 제조하여 실크 피브로인 용액에 첨가하였다. Sample 5번의 경우 실크 피브로인 용액과 PEO의 혼합비가 4:1, Sample 6번은 혼합비가 5:1. Sample 5번은 PEO가 좀 더 함유되어 용액의 점도가 높아 방사상태가 좋지 않고 fiber가 끊기는 양상을 보였으나 적절한 점도를 가진 Sample 6번은 fiber가 고르고 비교적 일정한 지름을 가진 것을 확인하였다.

- 결과적으로 최적의 실크 피브로인 / PEO 의 혼합용액의 최적 방사조건은 30% PEO 수용액을 사용 5:1 비율임을 확인하였다.

제 5 절 Salt를 이용한 공극 조절 전기방사법

기존 전기방사 기법은 전압에 의해 토출되는 용액이 랜덤 nano-fiber로 방사되는 양상을 보이면서 수집되기 때문에 공극을 조절하기 어려운 단점을 보완하고 nano-fiber sheet의 공극을 조절하기 위하여 sodium을 첨가하여 전기방사를 하였다.

1. 재료 및 방법

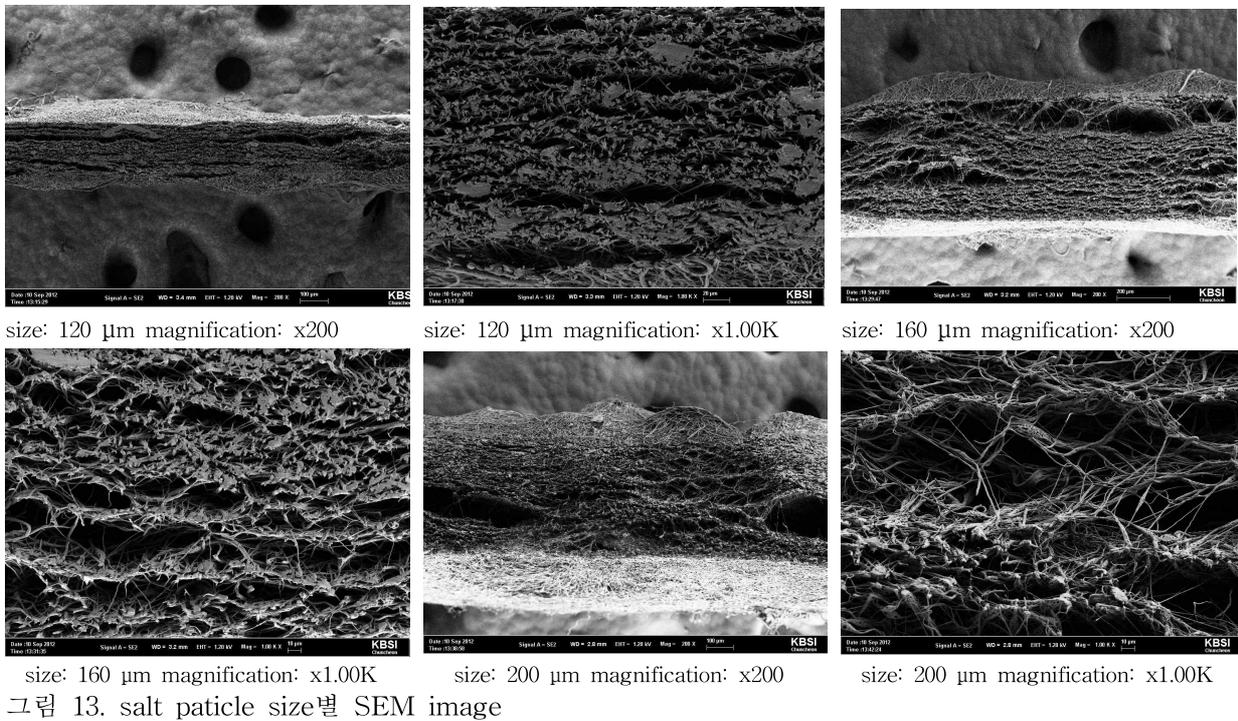
Chloroform과 methanol를 8:2 비율로 혼합한 용매에 분자량이 8만인 polycaprolactone(PCL)을

첨가하여 60°C 오븐에 넣어 용해하여 8% PCL 방사용액을 제조하여 준비. Salt는 믹서기에 갈아 분쇄하여 120,160,200 μm size의 체에 걸러 size별로 준비하였다. PCL용액을 주사기에 담고 송출펌프를 이용하여 시간당 1.5 ml으로 토출하였다. 이때 주사기 바늘에 전극을 연결하여 직류전원장치로 정전압(+12KV)을 가하고 collector에 (-4KV)를 가해줌. collector와의 거리는 15 cm로 조절하였다. 형성된 PCL nano-fiber를 회전형 드럼 표면에 수집할 때 size가 조절된 salt를 첨가하였다. 수집된 PCL nano-fiber를 증류수에 침지시켜 3일간 Salt를 제거해준 뒤, 공극 구조 유지를 위해 급속동결 시켜준 뒤 동결건조를 하여 수분을 제거하여 공극이 조절된 PCL nano-fiber를 얻었다.

2. 연구 결과

1) 구조 관찰

같은 조건에서 동일한 양의 PCL용액을 전기방사한 결과 salt의 particle size에 따라 nano-fiber sheet의 pore size가 차이가 나는 것을 SEM image를 통해 관찰. salt particle의 size가 120μm < 160μm < 200μm 순서대로 nano-fiber sheet의 pore size가 증가하였음.



2) Tension strength test

- 각각 얻어진 공극조절 pcl nano-fiber sheet들을 1.5x3cm의 크기로 잘라 측정기계로 인장강도를 측정하였다. 아래 그래프는 각 sample당 5회씩 측정하여 평균값을 구한 수치로 160μm의 salt particle를 사용한 sample이 인장강도가 가장 높게 측정하였다.

- 160 μm, 200 μm의 경우 salt particle size가 클수록 인장강도가 약한 것으로 측정되었으나, 120μm salt particle를 사용한 sample의 인장강도가 160 μm보다 약하게 나타났다. 이는 sheet의 전체 두께가 영향이 있다고 판단되며, 120 μm sample의 경우 다른 sample들 보다 두께가 약 200μm이상 낮은 것을 SEM이미지를 통하여 확인하였다.

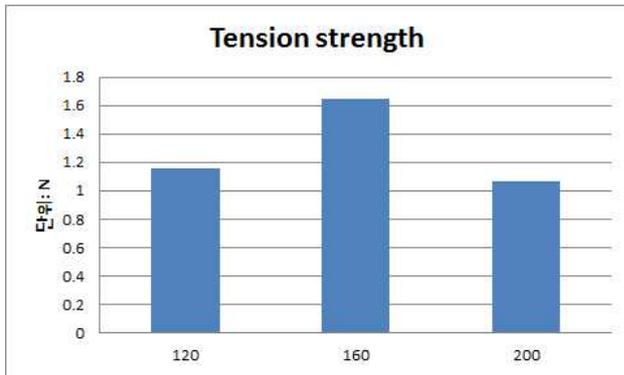


그림 14. Salt particle size 별 tension strength test

4) pore size 측정

각 sample의 1000배 SEM image를 9개의 구역으로 나눈 뒤 측정 프로그램(innerview, KOREA)를 사용하여 calibration하여 측정하였다. 9개의 구역 중 5개 구역의 pore size를 각각 50개씩 도합 250개를 측정하여 평균값을 구하여 아래 그래프와 같이 결과를 얻었다. salt particle size에 비례하여 공극의 크기가 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 salt를 이용하여 전기방사 시에 공극을 조절할 수 있음을 확인하였다.

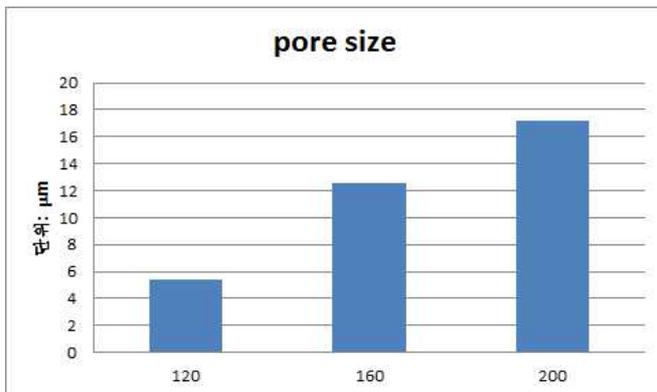


그림 15. Salt particle size별 평균 pore size

제 6 절 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔 화상 효과 검증

1. 재료 및 방법

1) 동물 모델

실험동물은 Sprague-Dawley 쥐(8주령, 체중 300g 내외의 수컷)를 한림대학교 실험동물부에서 인양 받아 7주일간 기초사육한 뒤 사용하였다. 실험 기간에는 고형 사료와 음용수를 자유 섭식하도록 하였으며 화상의 면적을 측정하였다.

2) 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔 제조

- 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔을 제작하기 위해 실크 피브로인 추출과정을 진행하였다. 누에고치(*Bombyx mori*)를 0.02 M의 탄산나트륨 수용액에 넣고 100°C에서 30분 동안 가열하여 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거하고 증류수로 세척하여 정련된 순수한 실크 피브로인을 얻었다.
- 추출한 실크 피브로인을 9.3 M 브롬화리튬 용액에 60°C에서 4시간 동안 용해시켰다. 얻어진 약 8 w/% 실크 피브로인 용액을 48시간 동안 증류수로 투석하여 브롬화리튬 이온을 제거하여 약 3.7 w/%의 순수한 실크 피브로인 수용액을 제조하였다. 이후 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 6 w/% 및 칼슘 알지네이트 1 w/%를 물에 용해하여 겔화제를 제조하였다. 겔화제와 실크 피브로인 수용액을 각각 멸균하였다. 겔화제와 실크 피브로인 수용액을 1:1의 비율로 혼합하여 실크 피브로인 1.85 w%, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 3 w% 및 칼슘 알지네이트 0.5 w%의 하이드로겔을 제조하였다.

3) 화상 유도

모든 실험군에 림퐁(바이엘코리아, Korea)과 졸레틸(VIRBAC, France)을 1:2로 혼합한 마취액 1.5ml을 복강 주사하여 전신 마취 시킨 후 제모기와 면도날을 이용하여 털을 완전하게 제거하여 주었다. 베타딘으로 소독하여주고 심재성 2도 화상을 유발하기 위해 온도 조절이 가능한 디바이스를 제작하여 1.5 X 1cm의 크기로 60°C, 15초 처리해 주었다.

심재성 2도화상 유도 후 각각 거즈(C), CMC 함유 실크 피브로인 하이드로겔(SH), Purilon Gel(P)으로 나누어 300ml씩 적용하였으며, 물질을 화상부위에 고정하기 위해 Tegaderm[®]과 의료용 테이프, 자체 제작한 쥐옷으로 드레싱하여 쥐가 화상치유과정에 관섭하지 못하도록 처리해 주었다. 드레싱은 2일마다 새로 교체 해 주며 총 3번의 드레싱이 이뤄졌다. 드레싱 후 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일, 21일에 각 3마리씩 육안적 소견 및 화상 치유 면적 변화의 관찰을 위해 화상 면적 측정 및 조직학적 관찰을 위해 조직을 생검하였다.

4) 조직학적 염색

-H&E 염색

드레싱 후 1일, 7일, 14일, 21일에 기간별로 쥐를 희생하여 화상 부위 및 주변 조직을 채취한 후 4% Paraform aldehyde(PFA) 용액에 48시간 고정한 후, 화상 증상을 통과하는 절편을 취하여 탈수 시키고 파라핀 블록에 포매하였다. 채취한 조직의 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 박절한 후 건조시켜 파라핀 절편을 제작하였다. 이후 H&E 염색을 다음과 같이 실행하였다. 탈파라핀 과정을 위해 60°C 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 10분간 1번, 90% 에탄올에서 10분간 1번, 80% 에탄올에서 10분간 1번, 70% 에탄올에서 10분간 1번 반응시킨 후, 물에 10분간 세척하였다. Harris hematoxylin으로 3분간 반응시킨 후 물에 5분간 세척하고, Eosin으로 2분간 반응시킨 후 물에 10분간 세척하였다. 70% 에탄올에 3분간 1번, 80% 에탄올에 10분간 1번, 90% 에탄올에 10분간 1번, 100% 에탄올에 10분간 1번, xylene에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

-Masson's trichrome 염색

탈파라핀 과정을 위해 60°C 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 10분간 1번, 90% 에탄올에서 10분간 1번, 80% 에탄올에서 10분간 1번, 70% 에탄올에서 10분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 10분간 세척하였다. 60°C Bouins (IMEB, USA) 용액에 1시간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, Hematoxylin (IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Biebrich scarlet-acid fuchsin(IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Phosphomolybdic-phosphotungstic acid (IMEB, USA)으로 10분간 1번, Aniline blue stain solution (IMEB, USA)으로 10분간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, 70% 에탄올에 3분간 1번, 80% 에탄올에 10분간 1번, 90% 에탄올에 10분간 1번, 100% 에탄올에 10분간 1번, 자일렌에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

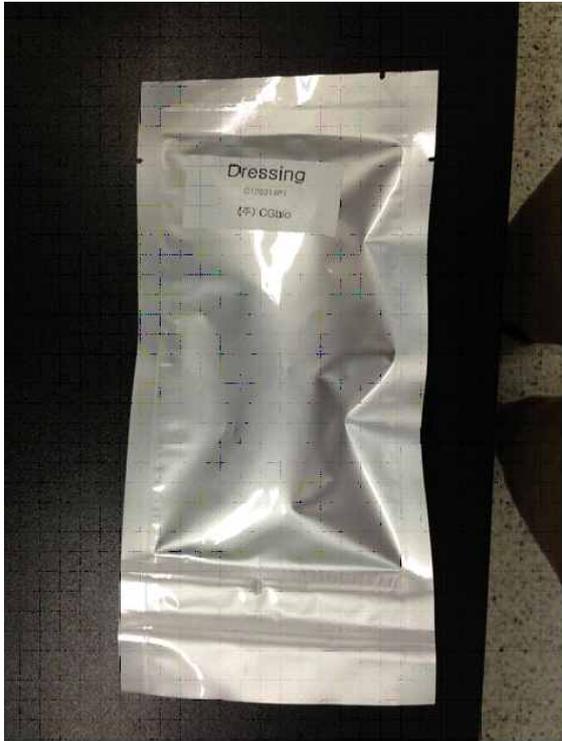
5) Real-time RT-PCR

기간별로 얻은 조직으로부터 RNA를 추출 후 cDNA를 합성하였음. 발현 변화를 알아보하고자 하는 각 유전자의 primer는 NCBI에 등록된 sequence로부터 제작하여 PCR product 200bp 미만으로 제작하였음. PCR은 denaturation 95°C, 20s, annealing 50°C, 20s, extension 72°C, 20s 조건으로 40 cycles을 수행하였음.

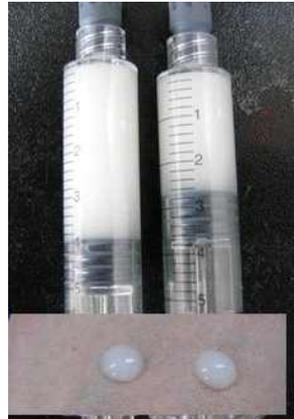
2. 연구 결과

1) 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔 보관 방법에 따른 관찰

실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔의 멸균 포장 시 보관 방법 및 기간에 따른 물성 변화를 관찰하기 위해 상온, 냉장(4도), 냉동(-70도)에 구분해서 저장하여 기간별로 관찰하였다. 10일 후, 냉장보관 샘플만 변색(하얀색) 되었고, 점도는 떨어졌다. 20일 후에는 상온, 냉장 보관 샘플이 변색이 되었고, 점도가 떨어지는 것을 관찰하였다. 냉동 샘플의 경우, 녹여서 관찰했을 때 색깔과 점도가 초기 상태와 비슷하였다. 50일 후 상온 샘플보다 냉장 샘플이 더 변색되었으며, 70일 경과 후 상온 샘플의 경우 점도가 많이 떨어지는 것을 확인하였다.



실크 피브로인이 함유된 CMC 하이드로겔의 멸균 포장 샘플



냉장 보관 하에서 멸균 포장 밀봉과 개봉 샘플 비교 (50일 후)-샘플 변색, 점도 떨어짐.

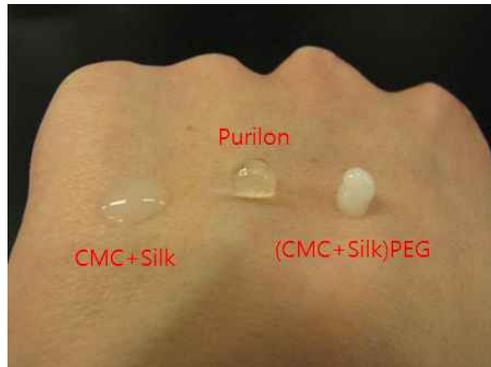


그림 16. 실크 피브로인이 함유된 CMC 하이드로겔.



그림 17. 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔의 기간별 물성 변화 관찰.

2) 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔에 의한 화상치유 효과 관찰 (육안적 관찰)

육안 관찰 결과 화상 치유 기간 중 초기 모든 실험군은 화상의 면적이 증가 되는 양상을 보이고 있었다. 3일 C에 비해 SH 및 P의 면적 증가가 적은 것을 확인 할 수 있었고 7일 이후부터 화상 면적이 감소하는 현상을 볼 수 있었다. 특히 21일에는 C, SH, P의 각각 화상 면적이 21%, 14%, 12%로 감소율로 SH와 P의 화상면적 감소 효과를 확인하였다.



그림 18. 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔의 화상치유 효과 검증을 위한 동물실험.

C: control(거즈), P : Purilon Gel, SH : 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔

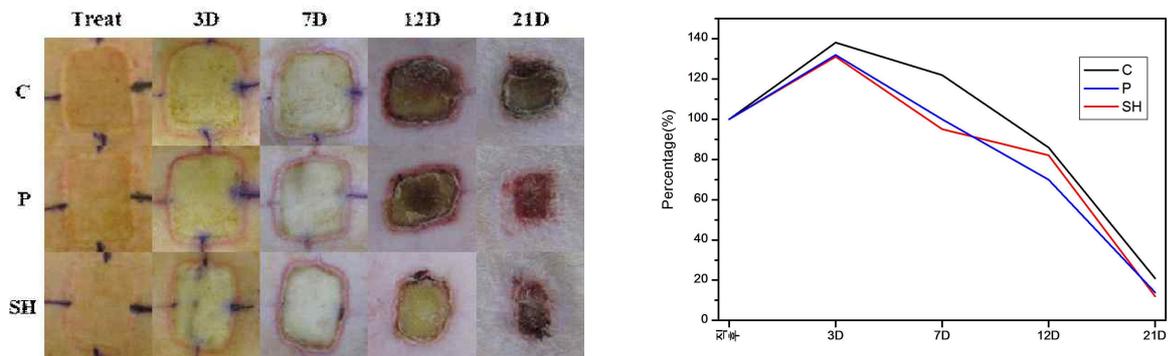


그림 19. 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔에 의한 화상 치유 효과 관찰.

C: control(거즈), P : Purilon Gel, SH : 실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔

3) 조직학적 염색 결과

화상 후 1 일차에서는 2도 화상에 준하는 조직학적 소견으로 열상으로 괴사된 조직의 깊이가 각 군간의 큰 차이점이 보이지 않았으나, 7 일차에는 3군 모두에서 진피 및 상피 재생 과정을 확인 할 수 있었으나, SH 및 P에서 C에 비해 높은 재생 효과를 확인할 수 있었다. 또한 면역 세포의 분포 역시 SH 및 P에서 C에 비해 상대적으로 적은 소견을 보이고 있었다.

14일차에 정상조직과 괴사조직 사이에 새로운 상피화의 진행 정도에서 볼 때 SH 및 P에는 C에 비해 뚜렷한 세포들의 밀집을 확인 할 수 있었다.

21 일차에 SH 및 P에서는 정상 상피 조직으로 재생되어 케라틴 분비 소견을 보였으나, C은 이에 비해 부분 상피 재생 소견 및 가피의 불분명한 경계를 가지는 소견을 보였다.

또한 같은 기간에 콜라겐 침착 및 배열을 확인 위해 Masson's trichrome 염색을 한 결과, SH 및 P에서 C의 비해 재생성되는 콜라겐이 밀도가 높은 것으로 관찰되었으며, 21일차에서 비교

적 일정한 콜라겐 배열 소견을 확인할 수 있었으며, 이는 SH 및 P가 화상 후 흉터가 적다는 것을 나타내었다.

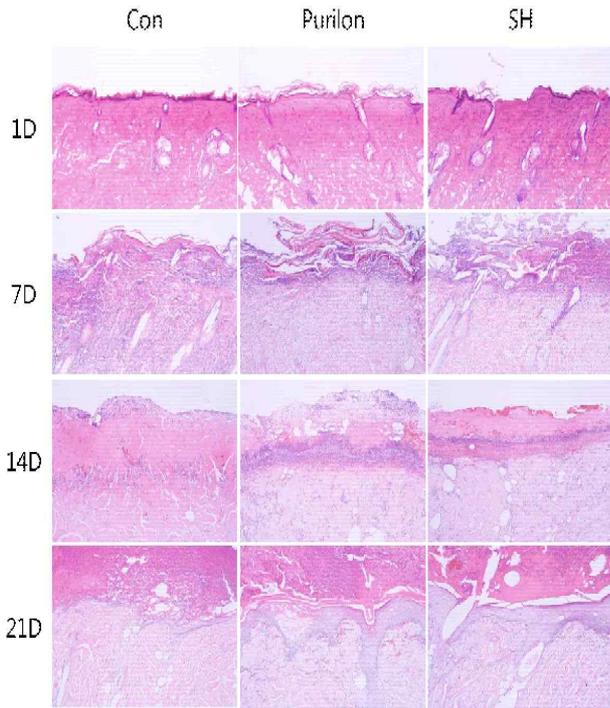


그림 20. H&E 염색을 통한 피부 재생 확인.
C: control(거즈), P : Purilon Gel, SH : CMC
함유 실크 피브로인 하이드로겔

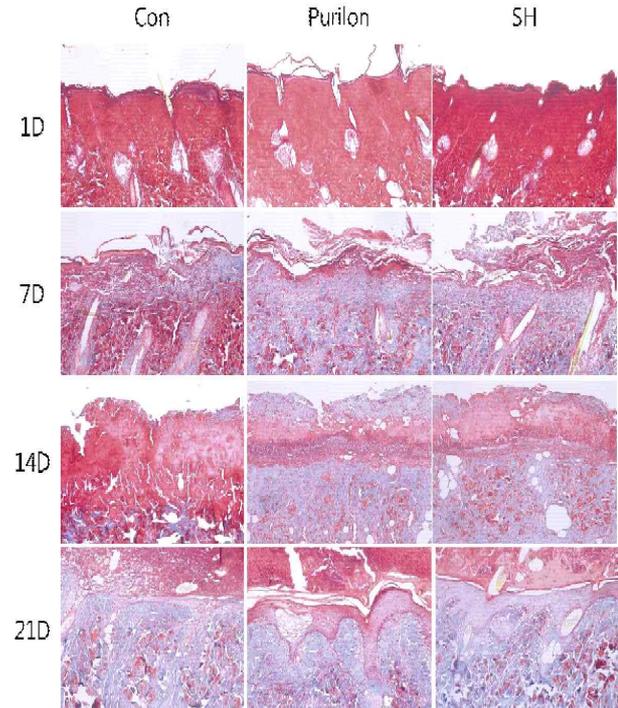


그림 21. Masson's trichrome 염색을 통한
콜라겐 발현 확인.
C: control(거즈), P : Purilon Gel, SH : CMC
함유 실크 피브로인 하이드로겔

3) 유전자 발현 변화

화상 치유 과정에 관여하는 성장인자의 변화를 확인하고자 조직 재생에 관여하는 성장 인자인 TGF-beta(transforming growth factor beta)와 창상 염증 유발 인자인 IL(interleukin)-1 alpha의 발현 정도를 Real-Time RT-PCR로 확인하였다. TGF-beta의 경우, CMC/실크 피브로인 하이드로겔의 경우 거즈 및 퓨리론겔 처리군에 비해 초기에는 발현이 억제하는 소견을 보이나 7일 이후부터 증가하여 14일까지 증가하다 화상 치유 후기(21일)에는 감소하는 패턴을 보였다. 이러한 성장인자의 발현 패턴은 흉터 없이 화상을 치유하는 데에 기여하는 것으로 사료된다.

실크 피브로인 함유 CMC 하이드로겔의 경우 거즈 및 퓨리론겔 처리군에 비해 염증세포 유발 인자인 IL-1a의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며, 이는 후기 화상 치유 시 흉터를 적게 하는 효과를 나타내는 것으로 파악될 수 있다.

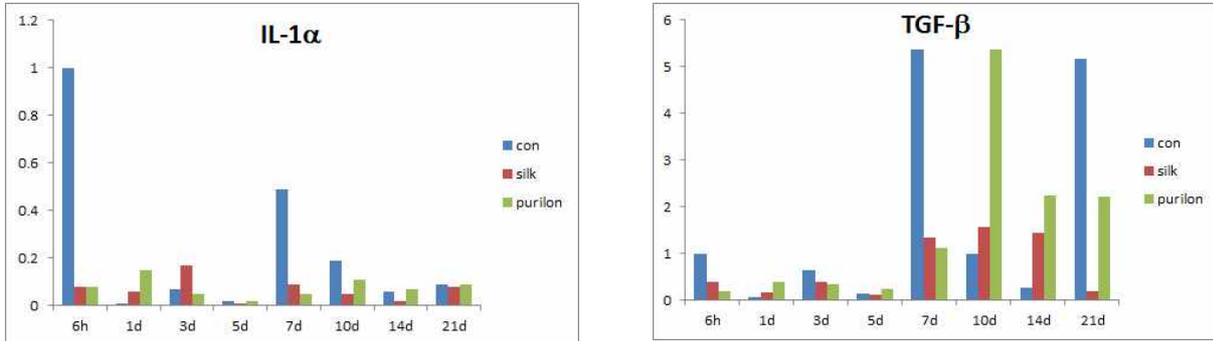


그림 22. 화상 치유에 관여하는 유전자 발현 패턴 확인 (Real-Time RT-PCR)

제 7 절 실크와 PVA 혼합 비율을 달리한 하이드로겔 제조 및 특성 평가

1. 재료 및 방법

1) 하이드로겔 제조. PVA를 8 wt%로 80°C에서 1시간 동안 용해시켰다. 실크 피브로인 수용액 8 wt%에 PVA 수용액을 각각 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100의 비율로 균일하게 섞는다. 실크/PVA 혼합 수용액의 총량은 20 ml이었다. 제조된 실크/PVA 용액을 각각 single well plate에 부어 20% amplitude로 10분 동안 초음파(VC750, Sonics&Materials, USA)를 처리해준 후 -80°C에서 급속냉동, 상온에서 해동하는 동결/용해 과정을 3회 거쳐 하이드로겔을 제조하였다.

2) 하이드로겔의 물리적 특징

팽윤도: 건조된 실크/PVA 하이드로겔을 상온에서 PBS buffer에 침지시킨 후 무게변화가 평형에 이를 때까지 측정하였다. 팽윤도는 식 (1)에 나타낸 바와 같이 팽윤된 겔의 무게(W_s)와 건조된 겔의 무게(W_d)차를 건조된 겔의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{팽윤도(\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

3) 인장 및 압축 강도: 하이드로겔의 강도를 알아보기 위해 범용 테스트 기계(QM100S, Qumesys, Korea)를 이용하여 인장 및 압축 강도를 측정하였다. 각 조성마다 5개의 시편을 준비하였고, 각 시료의 두께를 평균화하였다. 인장 강도는 상온에서 dumb-bell 모양의 tensile tester를 이용하여 측정하였다. 압축 강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 5 mm/min이었으며, 시편의 변형이 50% 이루어질 때의 값을 측정하였다.

4) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR): 제조된 실크/PVA 하이드로겔의 구조변화를 측정하기 위해 FTIR(FT-3000, BIO-RAD, USA)를 사용하였고, 2000-400 cm^{-1} 파장범위에서 분석하였다.

5) Thermogravimetric Analysis (TGA): 실크/PVA 하이드로겔의 온도 변화에 따른 질량변화를 살펴보기 위하여 TGA를 이용하여 (SDT Q600, TA instruments, USA) 질소 기류하에서 10°C/min의 승온 속도로 50~700°C의 범위 내에서 열중량 분석을 행하였다.

6) 세포 독성 실험. 실크/PVA 하이드로겔의 세포 독성을 확인하기 MTT 분석법을 시행하였다. NIH3T3 세포를 각 하이드로겔에 2X10⁵cell/ml로 파종하였다. 1,3,5일 째에 MTT 용액(5 mg/ml)을 배양액의 1/10씩 넣은 다음 2시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후 1.5 ml 튜브에 하이드로겔을 옮겨 Dimethyl sulfoxide(DMSO, sigma) 용액을 1ml씩 넣어 보라색 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 30분 용해하였다. 용액을 96 well에 100 µl씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 연구 결과

실크와 PVA의 비율을 달리하여 혼합한 수용액을 이용하여 하이드로겔을 제조하였다. 실험 결과 PVA 함량이 높은 실크/PVA 하이드로겔의 팽윤도는 낮은 값을 보였으며, 인장강도는 높게 나타났다. FTIR을 이용하여 분석한 결과 초음파 및 동결/해동에 의한 구조적인 변화는 없는 것을 확인하였다. 세포 증식률 실험을 통해 나타난 결과 제조된 하이드로겔의 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서, 실크/PVA 하이드로겔은 초음파를 통해 겔화된 실크에 반복적인 동결/용해 과정으로 인한 PVA의 탄성과 강도를 증가시켜 순수 실크 피브로인 하이드로겔에 비해 기계적 물성을 높였다. 이와 같이 본 연구에서 제작한 하이드로겔은 PVA 혼합을 통하여 실크의 기계적 물성의 단점을 보완하고 신축성을 향상시킴으로써 드레싱 재료로서의 개발 가능성을 보였다.

1) SEM 관찰 및 팽윤도. 실크/PVA 하이드로겔의 단면을 SEM을 통해 관찰하였다 (Fig 1). 하이드로겔 단면에서 다공성 구조 (porous structure)가 관찰되었다. PVA 함량이 높을수록 공극 크기가 작아지는 것으로 나타났다. 하이드로겔의 공극 크기는 각각 202.18 ± 75.13 µm, 105.96 ± 37.83 µm, 59.42 ± 20.43µm, 21.87 ± 6.6 µm, 12.06 ± 6.41 µm (실크/PVA 혼합비율 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100) 이었다. 팽윤도 또한 PVA 함량이 높아질수록 낮은 것으로 나타났다 (Fig 2). PVA 함량이 높을수록 공극 크기는 작아지고 그 수는 증가하며, 물을 함유할 수 있는 체적이 감소하므로 팽윤도가 낮아진다.

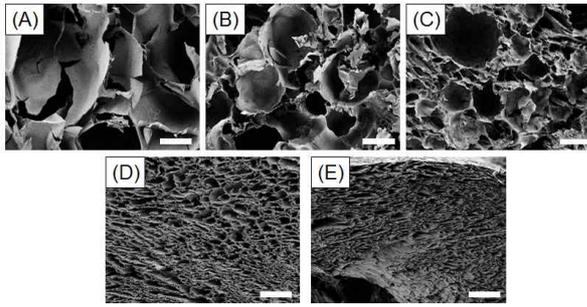


그림 23. SF/ PVA hydrogel의 단면 SEM 이미지. (a) 100/0, (b) 75/25, (c) 50/50, (d) 25/75 and 0/100. Scale bars: 100 μ m.

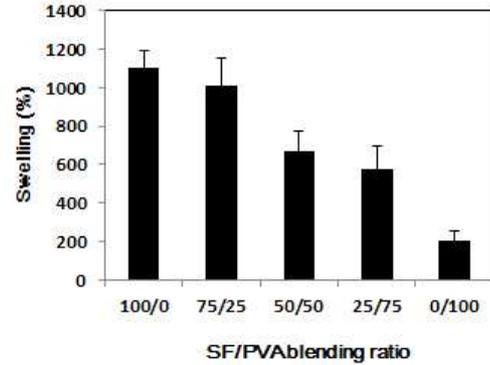


그림 24. 혼합 비율을 달리한 SF/PVA hydrogels 팽윤도.

2) 인장 및 압축 강도. 실크/PVA 하이드로겔의 인장과 압축강도를 측정하였다 (Fig 3,4). PVA 함량이 높을수록 크게 나타났다. 이는 PVA 수용액의 반복적인 동결-해동 과정으로 인해 하이드로겔의 압축 강도가 높은 값을 갖게 되는 것으로 판단된다.^{12,13} 순수 실크 하이드로겔보다 PVA 혼합 시 팽윤도는 떨어지나 압축 강도 증가로 인한 형태 유지가 가능하여 드레싱제로서의 응용은 가능할 것으로 본다.

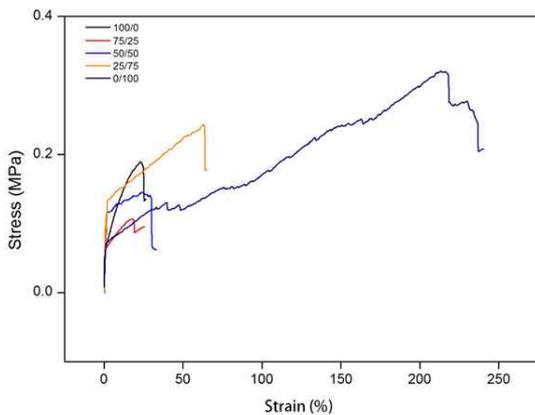


그림 25. SF/ PVA hydrogel의 인장 강도.

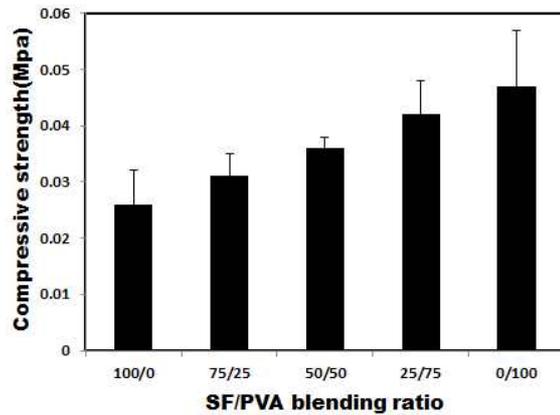


그림 26. SF/ PVA hydrogel의 압축 강도.

3) FTIR 및 TGA. 실크와 PVA 간의 분자 수준에서의 상호작용을 살펴보기 위하여 하이드로겔 조성 변화에 따른 FTIR을 행한 후 그 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 순수 실크 하이드로겔 (100/0)의 경우 1622 cm^{-1} (C=O stretch, amide I), 1518 cm^{-1} (N-H bond, amide II), 1232 cm^{-1} (C-N stretch, amide III) peak가 강하게 나타났다. 순수 PVA 하이드로겔 (0/100)의 경우 1419 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} , 1089 cm^{-1} peak가 강하게 나타났다. 그래프상에서 실크/PVA 하이드로겔에서의 함량에 따른 peak 위치의 변화는 나타나지 않았다. 이는 초음파에 의한 실크 결정화의 경우 PVA 함량에는 영향을 받지 않고 하이드로겔을 형성하고 있음을 나타낸다.

TGA는 고분자 물질의 열 안정성을 분석하는 방법으로써 온도에 따른 실크/PVA 하이드로겔의 질량 변화를 살펴보았다. Fig 6에서 보여지듯이, TGA 측정 결과 순수 실크 하이드로겔과 PVA 하이드로겔은 각각 260 $^{\circ}$ C, 213 $^{\circ}$ C에서 7% 질량 감소를 보였고, 실크 하이드로겔은 354 $^{\circ}$ C,

PVA 하이드로겔은 298°C에서 50%의 질량 감소를 나타내는 것으로 보아 순수 실크 하이드로겔이 PVA 하이드로겔보다 열 안정성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 실크/PVA 혼합 하이드로겔의 경우, 질량 감소율은 순수 실크와 PVA 하이드로겔 사이에서 나타나는 것으로 보아 순수 PVA보다는 높고 실크 하이드로겔보다는 낮은 열 안정성을 나타내는 것으로 판단된다.

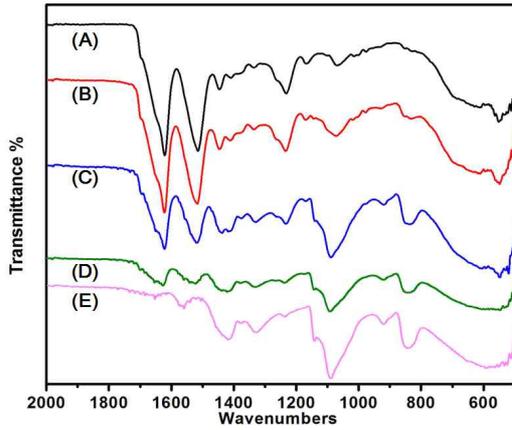


그림 27. FTIR. (a) 100/0, (b) 75/25, (c) 50/50, (d) 25/75 and 0/100.

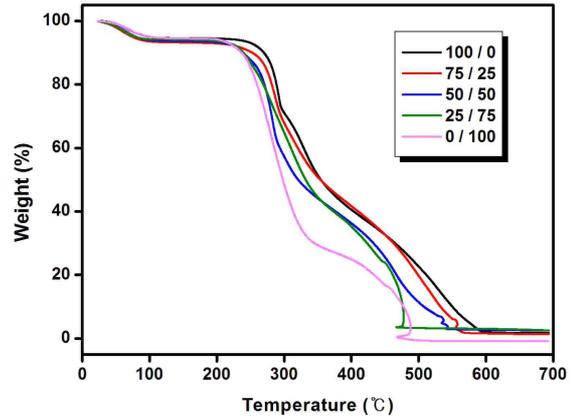


그림 28. TGA. (100/0, 75/25, 50/50, 25/75 and 0/100).

4) 세포 독성. MTT assay를 통해 실크/PVA 하이드로겔의 세포 독성을 평가하였다 (Fig 7). 모든 하이드로겔에서 세포 증식률의 큰 차이는 보이지 않아 세포 독성은 없는 것으로 보인다. 실크와 PVA 모두 독성이 없는 생체 적합성이 높은 물질로 알려져 있어, 본 연구에서 제작한 하이드로겔 역시 세포 독성이 없는 것을 예측할 수 있다. 따라서 본 실험에 이용된 실크/PVA 하이드로겔은 드레싱제로의 사용이 가능하며, 하이드로겔 소재를 다루는 의학 및 제약 분야에서 다양한 생체 재료로의 응용도 예측할 수 있다.

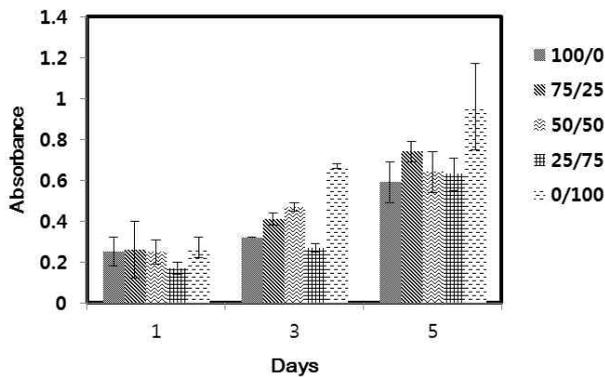


그림 29. 세포 독성 측정.

제 8 절 화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 대량생산 기술 개발

1. 재료 및 방법

1) 실크 피브로인 나노입자 제조

누에고치 (*Bombyx mori*)를 0.02 M Sodium Carbonate에 넣고 100 °C에서 30분 동안 가열하여 세리신 단백질을 제거한 후 D.W로 세척하여 정련된 순수한 SF fiber를 얻었다. 추출된 SF fiber는 CaCl₂ : Et-OH : D.W (1 : 2 : 8 mol ratio)의 Solution에 95 °C, 2시간 동안 15 w/v%로 용해시켜 SF Solution 얻었다. 얻어진 SF Solution의 염을 제거하기 위해 Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA)에 여과 후 72시간 동안 Spectra/Por®Dialysis Membrane MWCO : 12-14,000 (Spectrum Laboratories, Inc, CA, USA)을 이용하여 D.W로 투석 후, 최종적으로 8 w/t% SF solution 얻었다. 8 w/t% SF solution을 mold에 가득 채운 후 30°C incubator에서 보관하여 물을 모두 증발시킨 100% SF membrane을 만든다. SF membrane을 분쇄기를 이용해 분쇄시킨 후, ball milling 방법을 이용하여 나노입자를 더 작고 부드럽게 만들어 준다.

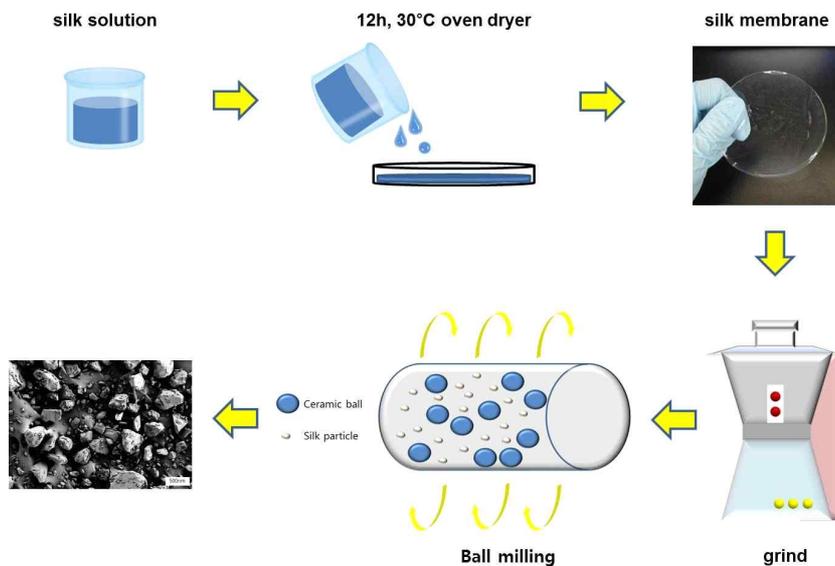


그림 30. 실크 나노입자 제조방법

2) 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱제 개발

190-200°C로 예열된 Bath에 Styrene-Isoprene-Styrene (SIS)를 넣고 30분간 교반하여 녹인다. SIS가 다 녹으면 혼합해둔 CMC-Na와 실크 나노입자 파우더를 섞어 30분간 충분히 혼합시킨다. 교반이 끝나면 폴리우레탄 필름에 heating roller로 도포한다. 도포 후, 하이드로콜로이드의 온도가 내려가며 경화가 된다. 경화가 된 하이드로콜로이드에 이형지를 붙인다. 다음으로 제작된 하이드로콜로이드를 포장 후 25 Kgray 감마선에서 멸균한다.

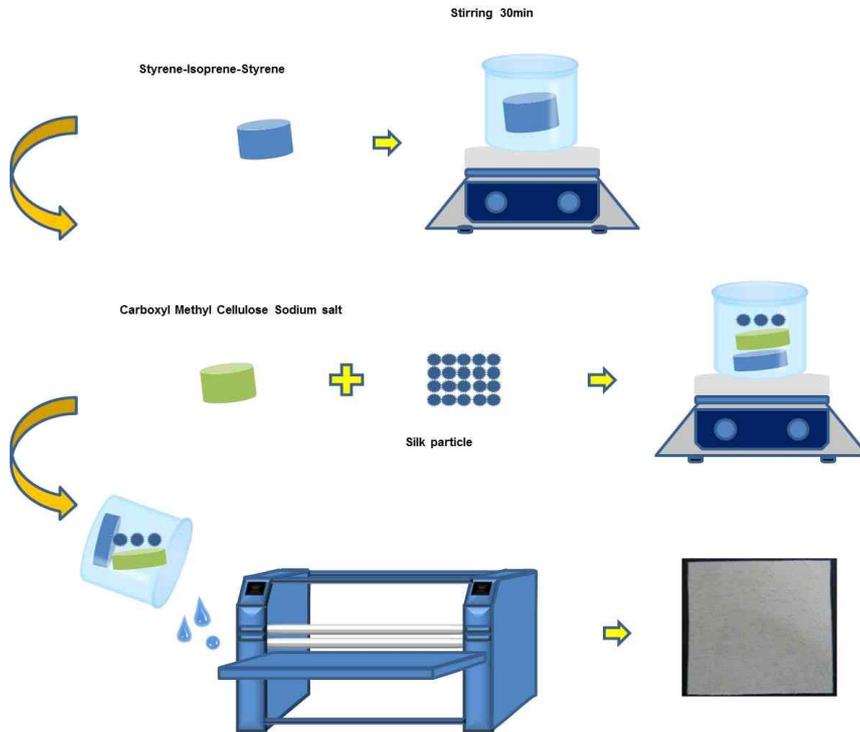


그림 31. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱 제작방법

2. 연구 결과

1) 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱 물리적 특성

실크 나노입자가 함유된 각각의 하이드로콜로이드 드레싱의 흡수력 및 팽윤도를 측정하였다. 비교군으로는 시중에서 판매하는 하이드로콜로이드 드레싱인 Neoderm을 사용하였다. 실험 결과 실크 나노입자가 10% 들어가 하이드로콜로이드 드레싱은 Neoderm에 비해 흡수력 및 팽윤도 모두 높은 결과 값을 나타냈으나 0.5%, 1%, 5%는 낮은 결과 값을 나타냈다. 위 결과를 토대로 실크 1%와, 10%를 선정하여 동물실험을 진행하였다.



그림 32. 실크/CMC 하이드로콜로이드 드레싱.

제조된 하이드로콜로이드 드레싱의 수분흡수력을 확인하기 위해 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 흡수된 하이드로콜로이드 드레싱 무게(W_s)와 건조된 하이드로콜로이드 드레싱 무게(W_d)차를 흡수된 하이드로콜로이드 드레싱의 무게(W_s)로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{Water uptake(\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100$$

그림 33에서부터 볼 수 있듯이, 실크피브로인 나노입자가 1% 들어간 하이드로콜로이드 드레싱은 수분 흡수율이 42.58 ± 8.4 로 대조군 56.54 ± 6.2 에 비해 적은 결과를 나타냈다. 하지만 실크 피브로인 나노입자가 10% 들어간 하이드로콜로이드 드레싱은 57.14 ± 12.3 으로 대조군에 비해 소폭 상승한 결과를 나타냈다. 그리고 제조된 하이드로콜로이드 드레싱이 일정 시간 동안 용액 속에 침지되었을 때의 용적변화율을 확인하기 위해 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 건조된 하이드로콜로이드 드레싱 무게(W_d)와 팽윤된 하이드로콜로이드 드레싱 무게(W_s)차를 건조된 하이드로콜로이드 드레싱 무게(W_d)로 나누어 나타냈다.

$$\text{Swelling ratio(\%)} = \frac{W_d - W_s}{W_d}$$

대조군이 1.33 ± 0.33 , 실크 피브로인 나노입자 1% 하이드로콜로이드 드레싱 0.76 ± 0.25 , 실크 피브로인 나노입자 10% 하이드로콜로이드 드레싱 1.5 ± 0.36 을 나타냈다. 제작된 실크피브로인 나노입자 10% 하이드로콜로이드 드레싱은 기존 제품인 대조군과 비교하여 팽윤력이 좋은 결과를 확인했다.

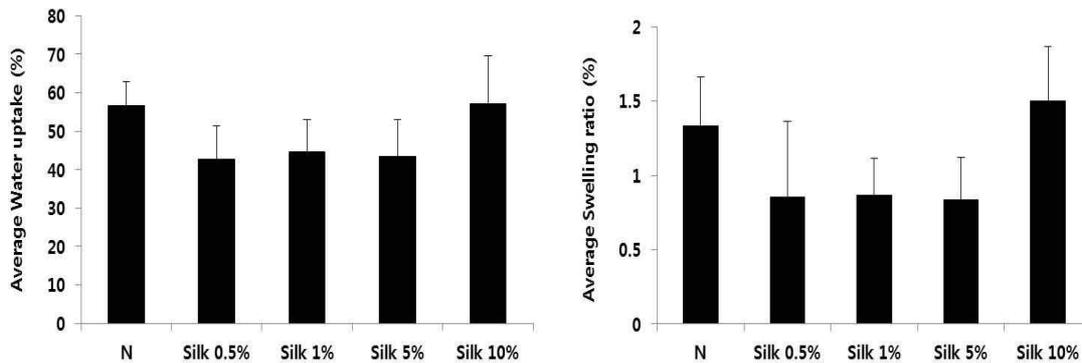


그림 33. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱 물리적 특성

실크 나노입자가 함유된 각각의 하이드로콜로이드 드레싱과 기존에 시중에서 판매되고 있는 하이드로콜로이드 드레싱인 Neoderm의 접착력 테스트를 비교하였다. 그 결과 제조된 드레싱의 접착력이 Neoderm과 비교하여 비슷하거나 높은 결과를 나타내었다. 따라서 하이드로콜로이드 드레싱제로 사용하기에 적합하다고 판단된다.

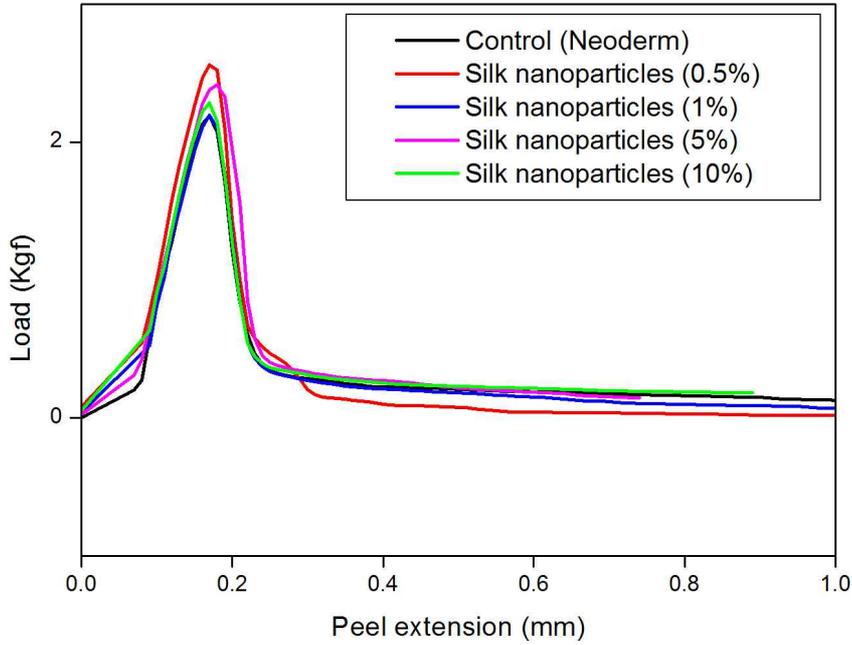


그림 34. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱 접착력 테스트

실크 나노입자가 함유된 각각의 하이드로콜로이드 드레싱의 인장강도를 측정하였다. 비교군으로 시중에서 판매하는 하이드로콜로이드 드레싱인 Neoderm을 사용하였다. 그 결과 실크 나노입자가 함유된 하이드로콜로이드 드레싱인 Neoderm에 비해 인장강도가 높게 측정되었다. 이러한 결과는 하이드로콜로이드 드레싱제로서 사용하기에 신축성이 좋은 것으로 판단된다.

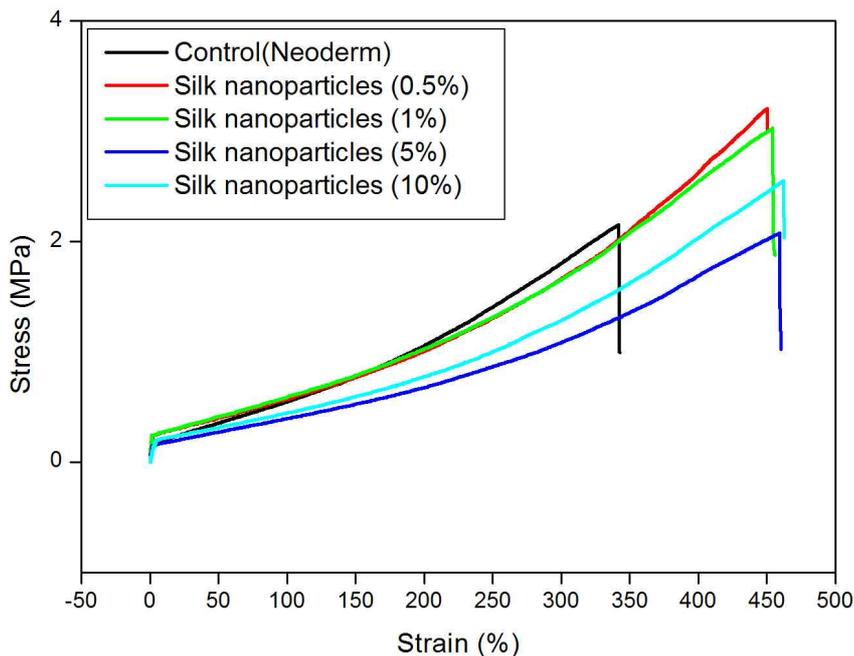


그림 35. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱 인장강도 테스트

2) 대량 생산 기반 화상 전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드 제작 기술 확립

- 대량 생산 기술 확립: 1일 10x 10 cm 기준으로 10,000장 이상 화상 전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드 제작 기술을 확립하였다.
- 제작된 하이드로콜로이드를 포장 후 25 Kgray 감마선에서 멸균함(의료용)한 후에 물성 변형이 없는 것을 확인함으로써 의료용에 사용가능한 멸균법을 확립하였다.

제 9 절 화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 실용화를 위한 전임상 시험 및 기술 고도화, 인증 승인 및 추진

1. 재료 및 방법

1) 동물 모델

실험동물은 Sprague-Dawley 쥐(8주령, 체중 300g 내외의 수컷)를 한림대학교 실험동물부에서 인양 받아 7주일간 기초사육한 뒤 사용하였다. 실험 기간에는 고형 사료와 음용수를 자유 섭식하도록 하였으며 화상의 면적을 측정하였다.

2) 화상 유도

본 실험에서는 Sprague-Dawley Rats (8주령, 250-300 g, 수컷)를 실험동물로 사용하였다. 모든 실험군에 Rompun (바이엘코리아, Korea)과 Ketamine을 1:2로 혼합한 마취액 1.5 ml을 복강 주사하여 전신 마취시킨 후 Rats의 등 부위 털을 제거하였다. 2도 화상을 유도하기 위해 60 °C의 1 × 1.5 cm 크기의 가열판을 이용하여 등의 네 부위에 15초간 처리했다 (Fig. 3A). 각 화상 부위에 의료용 거즈 (대조군), 실크 피브로인 나노입자 1% 하이드로콜로이드 드레싱 (실험군), 실크 피브로인 나노입자 10% 하이드로콜로이드 드레싱 (실험군), Neoderm® (비교군)으로 덮은 후 필름드레싱 (3MTegadermTMFilm, 3MTMHealthCare, MN, USA)하였다. 각 드레싱이 떨어지는 것을 방지하기 위해 Surgifix를 사용하였다. 드레싱은 3주 동안 2일마다 교체하였으며, 이 기간 동안 OHP필름을 사용하여 화상 조직의 면적을 기록하고, INNERVIEW 2.0 software (INNERVIEW, Korea)를 사용하여 면적을 측정하였다. 각각의 실험군은 1, 3, 7, 14, 21 차에 3마리의 동물을 희생시켜 화상 부위의 조직을 적출하여 조직학적 관찰 및 유전자 분석을 시행하였다.

3) 조직학적 염색

-H&E 염색

드레싱 후 1일, 7일, 14일, 21일에 기간별로 쥐를 희생하여 화상 부위 및 주변 조직을 채취한 후 4% Paraform aldehyde (PFA) 용액에 48시간 고정된 후, 화상 증상을 통과하는 절편을 취하여 탈수 시키고 파라핀 블록에 포매하였다. 채취한 조직의 파라핀 블록을 5 µm 두께로 박절한 후 건조시켜 파라핀 절편을 제작하였다. 이후 H&E 염색을 다음과 같이 실행하였다. 탈파라핀 과정을 위해 60°C 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 10분간 1번, 90% 에탄올에서 10분간 1번, 80% 에탄올에서 10분간 1번, 70% 에탄올에서 10분간 1번 반응시킨 후, 물에 10분간 세척하였다. Harris hematoxylin으로 3분간 반응시킨 후 물에 5분간 세척하고, Eosin으로 2분간 반응시킨 후 물에 10분간 세척하였다. 70% 에탄올에 3분간 1번, 80%

에탄올에 10분간 1번, 90% 에탄올에 10분간 1번, 100% 에탄올에 10분간 1번, xylene에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

-Masson's trichrome 염색

탈파라핀 과정을 위해 60℃ 오븐에서 30분, 자일렌에서 10분간 2번, 100% 에탄올에서 10분간 1번, 90% 에탄올에서 10분간 1번, 80% 에탄올에서 10분간 1번, 70% 에탄올에서 10분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 10분간 세척하였다. 60℃ Bouins (IMEB, USA) 용액에 1시간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, Hematoxylin (IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Biebrich scarlet-acid fuchsin (IMEB, USA)으로 5분간 1번, 물에 10분간 세척, Phosphomolybdic-phosphotungstic acid (IMEB, USA)으로 10분간 1번, Aniline blue stain solution (IMEB, USA)으로 10분간 1번, 흐르는 물에 10분간 세척, 70% 에탄올에 3분간 1번, 80% 에탄올에 10분간 1번, 90% 에탄올에 10분간 1번, 100% 에탄올에 10분간 1번, 자일렌에 10분간 1번 반응시킨 후 Synthetic Mountant (Thermo scientific, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

-면역 염색

조직 절편을 xylene을 이용하여 파라핀을 제거한 후 100, 90, 80, 70% 알코올과 증류수로 5분간 함수, 증류수로 세척한 후 사용한다. PCNA 일차 항체를 반응시킨 다음, 이차 항체를 결합시키고 효소 활성을 가시화하여 발현 여부와 발현 부위를 현미경하에서 관찰한다.

2. 연구 결과

1) 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱에 의한 화상치유 효과 관찰 (육안적 관찰)

화상 치유 과정에서 실크 피브로인 나노입자를 함유한 하이드로콜로이드 드레싱의 효과를 확인하기 위해 화상을 유발한 부위에 시료를 드레싱 후 1, 3, 7, 21, 일차 화상 면적의 변화를 측정하였다. 그 결과, 거즈의 경우 7일차에 염증반응에 의한 팽창이 일어난 반면 실크 피브로인 나노입자를 함유한 하이드로콜로이드 드레싱을 사용한 경우 3일차에 팽창이 일어난 후 상처부위가 7일차부터 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히 Neoderm®보다 실크 1%와 10%를 함유한 하이드로콜로이드 드레싱 처리군에서 21일차에 상처면적이 감소하는 것이 관찰되었다.

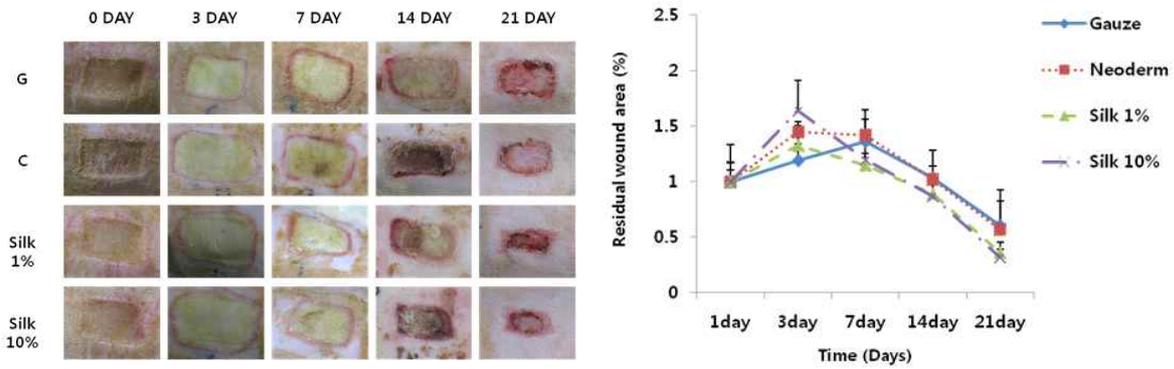


그림 36. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱제에 의한 화상치유 효과 관찰. G: 거즈, C: Neoderm, Silk 1%: 실크 나노입자 1% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱, Silk 10%: 실크 나노입자 10% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱

2) 조직학적 관찰(H&E 및 MT 염색)

실크 피브로인 나노입자를 함유한 하이드로콜로이드 드레싱에 의한 화상 치유 효과를 조직학적 염색을 통해 관찰하였다. 먼저 H&E stain 결과 1일과 3일차에는 상피 및 일부 진피, 모낭의 열에 의한 피사가 모든 군에서 일어났다. 7일 후, 하이드로콜로이드 드레싱 처리군과 Neoderm® 처리군은 피사된 조직 밑 상피의 재생을 위한 세포 군집이, 의료용 거즈 처리군 보다 증가하였고, 특히 실크 10%의 경우 피사 조직이 거의 없어진 것을 확인할 수 있었다. 14일 후, 거즈와 Neoderm®에 비해 하이드로콜로이드 드레싱 처리군의 경우 가피의 형성이 적고 고르게 형성되어있는 것을 확인하였다. 21일 후, 거즈와 Neoderm®은 가피가 남아있고, 상피의 재생이 적은 반면, 하이드로콜로이드 드레싱 처리군은 상피의 재생이 많이 관찰되고, keratin형성도 관찰되었다 (그림 37). 다음으로 화상조직에서의 치유과정 중 Collagen 침착 정도를 관찰하기 위해 Masson Trichrome Stain으로 확인하였다 (그림 38). 1일과 3일차에는 화상으로 인한 콜라겐 형성이 없는 반면 7일차의 경우, 거즈, Neoderm®, 1% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군의 경우 상처 내 미성숙 섬유화 전층이 넓은 반면 10% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군은 미성숙 섬유화 전층이 얇고 Collagen이 많이 침착되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 14일차 이후부터는 1% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군도 Collagen 형성이 증가하였고 21일차에서 모든 하이드로콜로이드 드레싱 처리군에서 keratin과 많은 양의 Collagen 형성을 확인하였다.

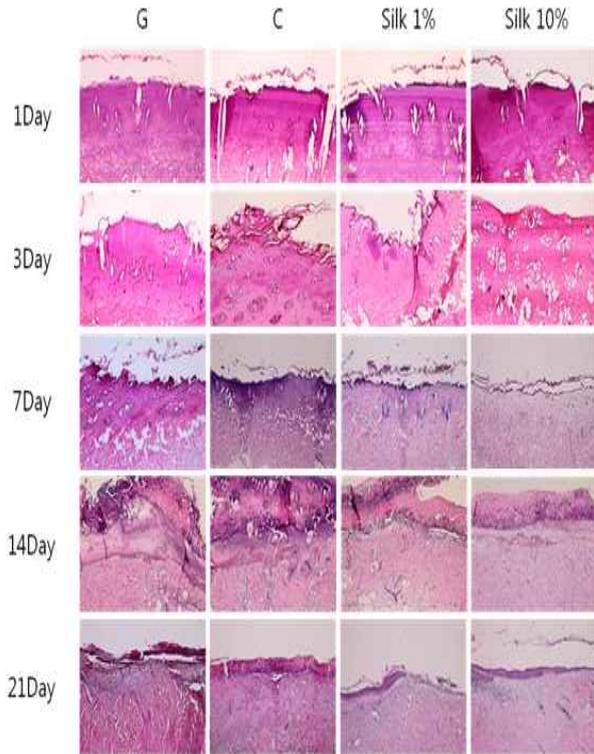


그림 37. H&E 염색을 통한 피부 재생 확인.
G: 거즈, **C:** Neoderm, **Silk 1%:** 실크 나노입자 1% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱, **Silk 10%:** 실크 나노입자 10% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱

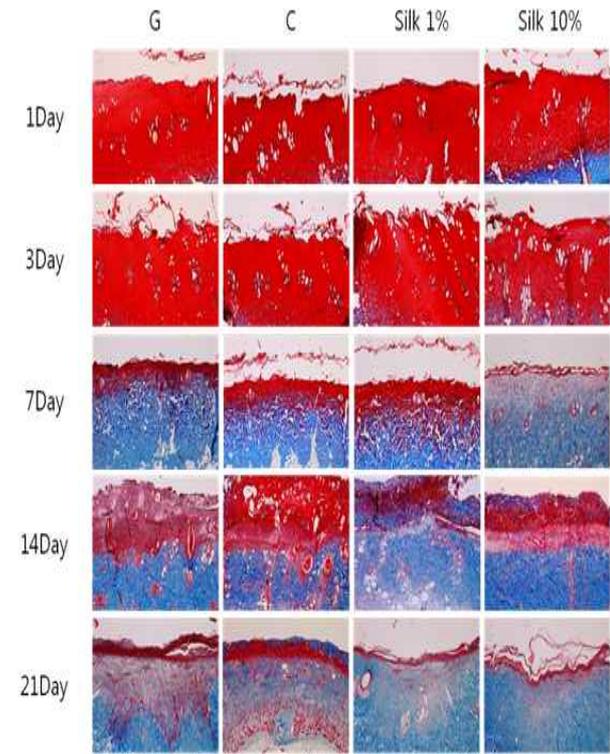


그림 38. Masson's trichrome 염색을 통한 Collagen 발현 확인. **G:** 거즈, **C:** Neoderm, **Silk 1%:** 실크 나노입자 1% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱, **Silk 10%:** 실크 나노입자 10% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱

3) 화상 조직에서 PCNA의 발현 관찰

화상 드레싱 처리 후 세포 증식에 대한 차이를 보기 위해 21 일차에 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 발현을 면역염색 방법을 통해 관찰하였다 (그림 39). 그 결과 거즈를 사용한 조직보다 실크 피브로인 나노입자 하이드로콜로이드 드레싱을 사용한 실험군에서 PCNA 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 특히 실크 피브로인 나노입자 하이드로콜로이드 드레싱을 사용한 실험군에서 각질생성세포를 형성하는 기저층에서 PCNA의 발현이 집중적으로 형성되어있는 것을 확인하였다. 기저층은 모세혈관으로부터 영양분을 공급받아 지속적인 세포분열을 통해 새로운 세포를 만들어내 피부표면으로 밀어 올려 새로운 피부를 생성하는 역할을 하는데 실크 피브로인 나노입자 하이드로콜로이드 드레싱이 세포의 생성을 촉진하여 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다.

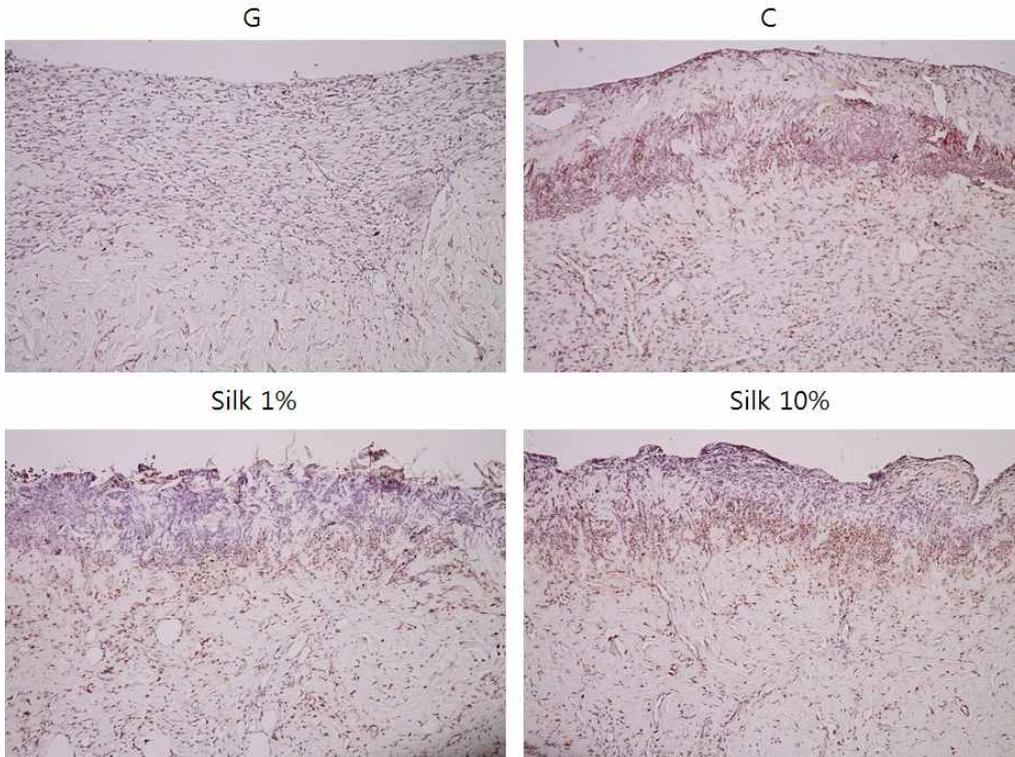


그림 39. PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 염색을 통한 피부 재생 확인.
G: 거즈, **C:** Neoderm, **Silk 1%:** 실크 나노입자 1% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱,
Silk 10%: 실크 나노입자 10% 함유한 CMC 하이드로콜로이드 드레싱

제 10 절 화상 치유 시 실크 피브로인에 의하여 발현을 조절 받는 유전자들의 메커니즘 규명

1. 재료 및 방법

1) Real-time RT-PCR

기간별로 얻은 조직으로부터 RNA를 추출 후 cDNA를 합성하였다. 발현 변화를 알아보하고자 하는 각 유전자의 primer는 NCBI에 등록된 sequence로부터 제작하여 PCR product 200bp 미만으로 제작하였다. PCR은 denaturation 95°C, 20s, annealing 50°C, 20s, extension 72°C, 20s 조건으로 40 cycles을 수행하였다.

2) Western blot

기간별로 얻은 조직으로부터 먼저 gel electrophoresis를 이용하여 size별로 분리해낸다. Transfer를 통해 size별로 분리된 protein을 membrane으로 이동시킨 후 skim milk ((0,5%dry milk, Incubation 30min RT)에 담아 blocking을 한 후 세척한다. detection 하고자하는 first antibody인 FOXO3a, Mn-SOD가 담긴 TBST 용액을 transfer한 nitrocellulose membrane에 잘 부어 준 후 45~60분간 rocker 위에 올려둔다. 새 TBST용액 10mL 씩 5분 간격으로 세 번 washing 해준다. Secondary antibody를 함유하고 있는 TBST 용액 (HRP conjugate Ab(1:2500) 5ml당 2ul)를 부어준 후 다시 45~60분간 rocker위에 올려 둔다. 다시 새 TBST 용

액 10mL씩 10분 간격으로 세 번 washing 해준다. 준비된 substrate solution을 넣고 10분간 반응 시킨 후 발색이 완료되면 증류수에 세척하여 결과를 기록한다.

2. 연구 결과

1) RT(real time)-PCR에 의한 유전자 발현 확인

화상 치유 과정에서 발현되는 Cytokine과 growth factor의 발현 양상을 Real-time PCR을 이용하여 관찰하였다. IL-10 (Interleukin 10)은 각질형성 세포의 사이토카인의 하나로서 염증반응을 완화시켜 줌으로써 지나친 염증반응에 의한 피부괴사를 막아준다고 알려져 있다. 이러한 IL-10의 발현양상을 관찰한 결과 실험에 사용한 모든 군에서 1일차에 비해 7일차에서 발현양상이 줄어들었다가 14일차와 21일차에 순차적으로 증가하는 양상을 나타냈다 (그림 40). 다만 특이한 점은 10% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군의 경우 다른 실험군과 다르게 1일차에서 발현이 적은 것이 관찰되었다. 다음으로 1차 염증반응에 관여하는 Cytokine으로 다른 Cytokine을 촉진하여 혈관내피세포 유착 및 각질형성 세포증식에 촉진하는 IL-1 α (Interleukin 1 alpha)의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 10% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군의 경우 1일차를 제외한 7일, 14일, 21일 차에서 다른 군에 비해 IL-1 α 의 발현이 증가하는 양상을 확인하였다. 이러한 IL-1 α 의 발현 촉진으로 인해 10% 하이드로콜로이드 드레싱 처리군의 화상 치유 효과가 좋은 것으로 사료된다.

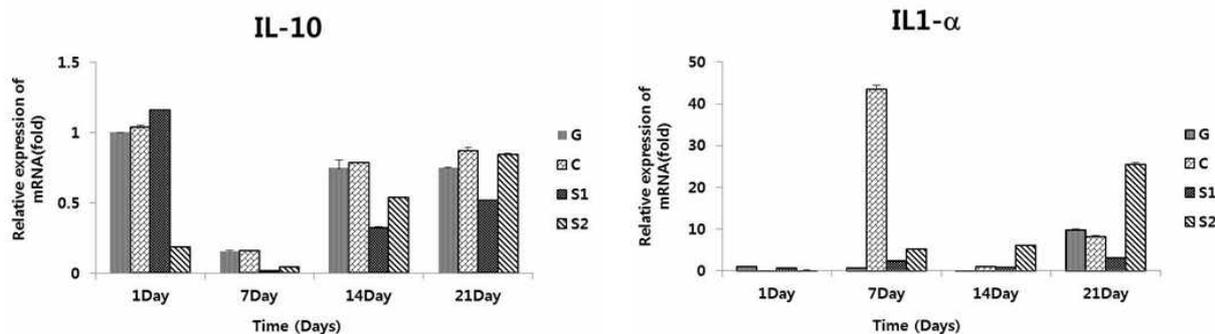


그림 40. 화상 치유에 관여하는 유전자 발현 패턴 확인 (Real-Time RT-PCR)

2) Western-blot 의한 발현 기작 확인

실크 피브로인 나노입자 하이드로콜로이드 드레싱에 의한 화상 치유 효과의 발현 메커니즘을 확인하기 위하여 Western-blot을 통해 확인해 보았다. 그 결과, 실크 용액과 실크 피브로인 나노입자 하이드로콜로이드 드레싱에 의해 FOXO 3a라는 유전자가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 증가는 항산화제로 잘 알려져 있는 Mn-SOD를 같이 증가시키는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 실크 피브로인이 FOXO 3a를 증가시키고 이에 따라 Mn-SOD가 증가하여 화상에 의한 상처를 빠르게 회복시키는 것으로 판단된다.

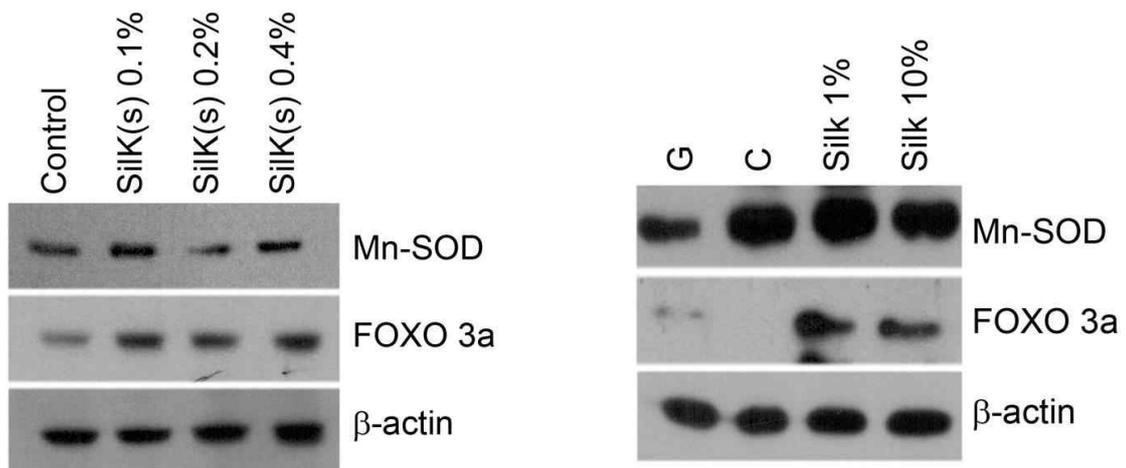


그림 41. 실크 피브로인 나노입자 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱에 의한 화상치유 유전자 관찰 **G**: 거즈, **C**: Neoderm, **Silk 1%**: 실크 나노입자 1% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱, **Silk 10%**: 실크 나노입자 10% 함유 CMC 하이드로콜로이드 드레싱, **Silk(S)**; 실크 피브로인 용액

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	달성도 및 대외기여도
실크 피브로인의 화상 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 2도 화상을 입힌 동물 모델에서 실크 나노폼에 의한 화상 치유 효과를 기간별로 육안적 관찰 • 조직학적 염색을 통한 화상 치유 효과 관찰 • RT-PCR 기법을 통해 화상 치유에 관여하는 유전자 발현 패턴 확인 • 실크 피브로인 나노폼에 의하여 화상 치유 효과 확인 • Western blot을 이용한 단백질 발현을 통한 상처 치유 기전 규명
실크 피브로인 융합 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 인체에 무해한 수용성 용매인 PEO와 다양한 전기 방사 용 용매를 이용하여 실크 피브로인과 융합시켜 방사하는 기술 개발
실크 피브로인 나노섬유 폼, 스펀지 제작 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 전기 방사를 이용한 나노섬유 폼의 두께, 크기 조절 기술 개발 • 실크 피브로인 스펀지 개발 • 실크 피브로인 막과 나노섬유 폼/스펀지의 이중 구조 제작 기술 개발
화상 치유 효과가 뛰어난 실크 피브로인 함유 드레싱제 제조 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> • 실크 피브로인/CMC 하이드로겔 제조 및 특허 등록 (1014624850000) • 실크 피브로인/PVA 하이드로겔 제조 • 실크피브로인을 함유한 화상 드레싱제 SCI 저널 게재
화상전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 물성 시험 및 개선	<ul style="list-style-type: none"> • 인장, 압축 강도 측정 • sonication 방법을 통한 하이드로겔 제조
실크 피브로인과 CMC를 함유한 하이드로겔 제조	<ul style="list-style-type: none"> • 실크 피브로인과 CMC를 혼합하여 하이드로겔 제조
화상전용 실크 피브로인 함유 드레싱제의 생체 적합성 평가 및 효과 입증	<ul style="list-style-type: none"> • 동물 실험을 이용한 효과 검증 • 세포 독성 평가
대량생산이 가능한 화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 습윤상태 유지 및 화상치료에 효과적인 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 대량생산 기술 개발 (참여기업) • 실크 피브로인 나노입자/CMC 하이드로콜로이드 제조 방법에 관한 특허 출원 및 기술 이전 ((주)시지바이오)
화상전용 실크 피브로인 하이드로콜로이드의 실용화를 위한 전임상 시험 및 기술 고도화, 인증 승인 및 추진	<ul style="list-style-type: none"> • 전임상 시험 및 기술 고도화 • 세포 분화 연구, 급성 부작용 확인, 기존의 생합성 상처 드레싱과 비교 연구

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 정량적 성과

구분		특허		(예시)신품종				(예시) 유전자원 등록	논문		기타 (학회발표)
		출원	등록	품종명칭등록	품종생산수입판매신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표										
	달성								1	1	4
	달성도%								100	100	400
2차 년도	목표	1							1	1	·
	달성	3							4	·	4
	달성도%	300							400		400
3차 년도	목표	1	1						1	1	·
	달성	1	3						2	1	6
	달성도%	100	300						200	100	200
계	목표	2	1						2	2	·
	달성	4	3						7	2	14
	달성도%	200	300						350	100	1400

(단위 : 건수)

제 2절 연구결과 활용계획

1) 두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법

특허 등록 : 두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법, 이에 의하여 제조된 나노섬유 지지체 및 이에 사용되는 나노섬유 지지체의 제조장치 (등록번호 : 10-1387886)

가) 핵심 기술 내용

- 나노 섬유막의 공극과 두께를 증가
- 결정화 과정에서 생분해 속도를 조절하여 인체 진피와 유사한 구조의 나노 매트릭스를 제작
- 기존의 진피 대체물에 비해 제조 원가가 저렴
- 인체 감염 질환 등의 문제가 없으며 생체 적합성이 뛰어나 화상 및 미용 기타 의료용 진피 대체물을 개발이 가능한 핵심 기술임
- 연구 개발 내용을 토대로 향후 나노 섬유를 이용한 다양한 생체재료 개발의 기초 기술을 제공

나) 활용 계획 및 기대 효과

국내의 정확한 통계는 없으나, 미용목적 또는 안면재건용으로 사용되는 연조직 충전제의 소모

량은 매우 많으며, 생활수준의 향상에 따라 사용이 증가의 추세에 있음. 또한 최근 식생활의 변화와 인구의 노령화로 인하여 당뇨병 환자가 증가하고 있으며 이에 따른 합병증으로 당뇨병성 족부 궤양이 꾸준히 증가하고 있음. 미국의 당뇨병성 궤양환자는 60~80만 명이고 욕창환자는 100만 명 이 중 정도가 심한 환자 20%(30만명)가 인공피부이식 기술을 받고 있음. 또한 현재 피부 궤양의 전 세계 환자수는 약 1,800만 명으로 추정되며 피부 창상치료제의 세계 시장규모는 약 25억 달러이며, 2004년부터 인공피부 및 생인공피부가 전체 창상치료 시장의 10%(3조원)를 점유할 것으로 예측되고 있음. 국내 당뇨병성 궤양 환자수는 약 3만 명에 달하며(데일리팜 2001.5.30)당뇨병성 족부 병변은 당뇨병환자의 2/3에서 일생동안 적어도 한번 이상 발생하며 약 10~15%의 환자에서 족부 궤양 발생하고 이 궤양환자의 10~30%가 족지 및 하지절단술을 시행 받음으로서 수술부위의 피부이식이 필요함. 현재 이들 재료의 100%를 수입에 의존하고 있고 독점적으로 생산하는 몇몇 외국회사와 국내의 수입상들에 의한 가격 상승을 현재로는 해결할 방법이 없어 오직 이에 대응할만한 국내 제품의 생산만이 이를 해결할 수 있음. 이 제품의 개발로 수입대체 효과는 물론 보다 안전하고 효과적인 제품의 특성으로 차세대 생체의료 재료로 사용될 수 있을 것임. 제품으로 되기까지는 많은 시간과 연구가 있어야 하겠으나, 단기 내에 가시적인 연구효과도 기대할 수 있음

- 실크 피브로인 이용하여 나노 매트릭스의 공극 및 생분해성 조절 기술 개발을 통해 생체 재생 소재 개발을 선점
- 실크 피브로인 인공 진피 개발을 고부가 의료용 실크 소재 개발로 양잠 농가의 소득 증대
- 인공 진피 개발을 통해 국가 경쟁력 확보 및 고부가가치를 창출하는데 이바지 할 것으로 기대됨

(2004년부터 인공피부 및 생 인공 피부가 전체 창상치료 시장의 10%(3조원)를 점유 예측)

2) 실크 피브로인을 포함하는 화상치료용 하이드로겔 조성물

- 특허 등록 : 실크 피브로인을 포함하는 화상치료용 하이드로겔 조성물 (등록번호 : 10-1462-4850000)
- 논문 게재 : Silk fibroin based hydrogel for regeneration of burn induced wounds.

Tissue engineering regenerative medicine. 2014

가) 핵심 기술 내용

- 실크 피브로인과 하이드로겔 성분 혼합 물성 확립
- 실크 피브로인 화상 치료용 하이드로겔의 생물학적 활성화 비율 확립
- 화상 치료용 하이드로겔 제제 개발 기술 확립

나) 활용 계획 및 기대 효과

- 현재 제품화를 위해서 제조 업체를 고려 중에 있으며 기술 이전 대상 기업에 기술 이전을 적극적으로 시도할 예정임

사업화 전략 (기대효과)



- 3) 실크 피브로인 나노입자를 함유하는 화상치료용 하이드로콜로이드 드레싱의 제조 방법
- 특허 출원 : 실크 피브로인 나노입자를 함유하는 화상치료용 하이드로콜로이드 드레싱의 제조 방법 (출원번호 : 10-2014-0051812)
 - 기술 이전 : 실크 피브로인 나노입자를 함유하는 화상치료용 하이드로 콜로이드 드레싱의 제조 방법

가) 핵심 기술 내용

- 대량 생산이 가능한 화상 치료용 실크 피브로인 나노 입자를 함유한 하이드로 콜로이드 드레싱 제조 기술 확립
- 실크 피브로인 화상 치료용 하이드로 콜로이드 드레싱의 생물학적 동등성 확립
- 화상 치료용 세계 최초 실크 피브로인 하이드로 콜로이드 드레싱 제제 개발 기술

나) 활용 계획 및 기대 효과

- 의료기기 허가 심사 등에 관한 규정 제 26조 8항에 따라 「대학 또는 연구기관 등 국내·외 의 전문기관에서 시험한 것으로서 해당 기관의 장이 발급하고 그 내용(기관의 시험시설 개요, 주요설비, 연구인력 구성, 시험자의 연구경력 등을 포함한다)을 검토하여 타당하다고 인정할 수 있는 시험성적서」가 인정되므로 과제수행기간 동안에 본 연구소에서 수행한 연구결과를 식약처에 제출할 예정임

내용	3년차 연구 개발 후 화상 치료용 실크 콜로이드 드레싱 인약품 업체 기술 이전	화상 치료용 실크 콜로이드 드레싱 기술 문서 작성 제품화 생산 기술 확립	화상 치료용 실크 콜로이드 드레싱 전임상시험	화상 치료용 실크 콜로이드 드레싱 임상시험	허가 등록 및 제조 판매
기간	1년	1년	1년	2년	2017
전략	GMP 시설을 기준 업체 선정 및 의료용 실크 피브로인 양잠 농가 선정	대량 생산 기술 및 제품 다양화	임상 시험 대비 안전화	한림대학교 의료원 화상 센터	해외 판매망 고려

다) 경제적, 기술적 파급 효과

- 경제적 파급 효과
 - 국내 : 메디폼과 같은 습윤 드레싱 제제가 600억원대 일반 밴드류(500억원) 2006년도 수입 창상피복재 : 1,511만불, 매년 20% 이상 증가
 - 해외 : 피부 창상 치료제의 경우, 2010년 세계시장 규모가 43억달러대
- 기술적 파급 효과
 - 세계 최초로 실크 피브로인을 이용한 화상 전용 드레싱 개발 기술 및 공정 개발
 - 실크 피브로인 원천 소스 기술 표준화 및 제품화 개발
 - 실크 피브로인을 이용한 의료용 소재 개발 원천 기술 확립
 - 화상 치료의 사회적 비용 절감 및 국민건강 증진

라) 농 식품 분야 정책적 파급 효과

- 실크 피브로인 화상 전용 드레싱 개발로 의료용 누에고치 생산 농가 및 관련 산업 육성 증가
- 국내 원천기술을 활용한 실크 피브로인 드레싱 소재의 국내외 시장 개척으로 잠업의 고부가가치 산업으로 변화를 소득 증대
- 실크 피브로인을 이용한 고품질 의료용 소재 개발에 따른 국가 위상 제고

제 6 장 참고문헌

1. 권혜용, 이광길, 여주홍, 우순옥, 한상미. 의료용 실크 고분자. 고분자과학과 기술, 16(5):568-576, 2005.
2. Xiang Wu, Xiang-Yang Liu, Ning Du, Gang-Qin Xu & Bao-Wen Li, Molecular spring: from spider silk to silkworm silk, Biological Physics , 1:1-5, 2009.
3. 거래한의학연구소, 민간 한방요법. 북피아, 2006.
4. 현 지 원 . 이 광 길 . 여 주 홍 . 최 태 부, 저분자 Silk Peptide의 모발 보호효과 및 미세구조 분석, 한국생물공학회지, 23:439-444, 2008.
5. Hettiaratchy S, Dziewulski P, Pathophysiology and types of burns, British Medical Journal, 328:1427-1429, 2004.
6. Proksch E, Jensen JM, Crichton-Smith A, Fowler A, Clitherow J, Rational treatment of first-degree burns, Hautarzt.,58(7):604-610, 2007.
7. Chiarotto GB, Neves LM, Esquisatto MA, do Amaral ME, dos Santos GM, Mendonça FA, Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats, Lasers in Medical Science, 29(5):1685-1693, 2014.
8. Manafi A1, Hashemlou A, Momeni P, Moghimi HR, Enhancing drugs absorption through third-degree burn wound eschar, Burns, 34(5):698-702, 2008.
9. Jonsson CE, Shimizu Y, Fredholm BB, Granström E, Oliw E, Efflux of cyclic AMP, prostaglandin E2 and F2 alpha and thromboxane B2 in leg lymph of rabbits after scalding injury, Acta Physiologica Scandinavica, 107(4):377-384, 1979.
10. Goldina Ikezuagu Erowele, Ruth Ebiasah, The Prevention and Treatment of Pressure Ulcers, Pharmacists
11. 이옥주, 이정민, 진형준, 박찬흠. 실크 나노 섬유를 이용한 인공진피 개발에 대한 연구. International Journal of Tissue Regeneration, 1(2):68-73, 2010.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.