(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월23일
(11) 등록번호 10-2668218
(24) 등록일자 2024년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 26/00 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 26/008 (2013.01)
A61L 26/0023 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0178841
(22) 출원일자 2021년12월14일
심사청구일자 2021년12월14일
(65) 공개번호 10-2023-0090425
(43) 공개일자 2023년06월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170011697 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 2 항

(73) 특허권자
강원대학교 산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트 112동 2308호
디네쉬 쿠마르 파텔
강원특별자치도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과학대학 1호관 307동 206호 (효자동, 강원대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
구현서

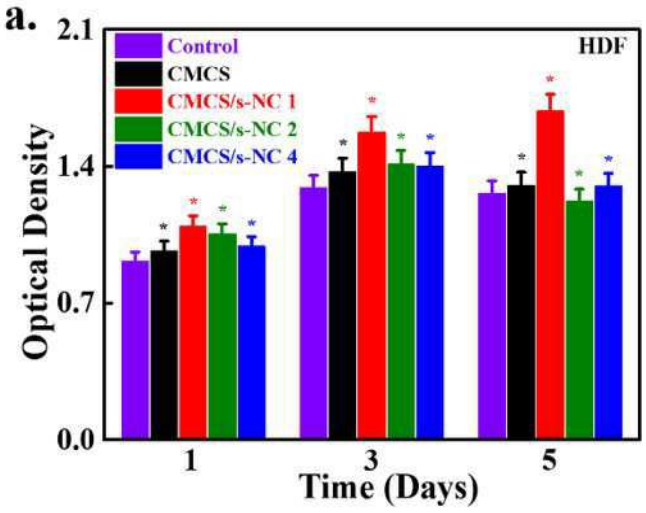
심사관 : 고태정

(54) 발명의 명칭 **항균 및 상처 치료용 주사가능한 하이드로겔 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 카로복실메틸키토산 매트릭스에 구형 나노셀룰로오스를 첨가하여 제조된 하이드로겔, 그 하이드로겔의 항균, 피부 재생 및 상처 치유에 대한 용도 및 물에 카로복실메틸키토산을 5%(w/w) 녹여서 카로복실메틸키토산 매트릭스를 제조하고, 구형 나노셀룰로오스를 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스에 1 내지 4% (w/w) 첨가하는 단계를 포함하는 하이드로겔 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도9a



(52) CPC특허분류
A61L 26/0066 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 2400/06 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)

(72) 발명자
뎁 두타 사얀
강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호
강글리 케야
강원특별자치도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과학대학 1호관 307동 206호 (효자동, 강원대학교)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020110116054 A
KR1020210147652 A
Weijuan Huang et al. "On-demand dissolvable self-healing hydrogel based on carboxymethyl chitosan and cellulose nanocrystal for deep partial thickness burn wound healing."*
Dinesh K. Patel et al. "Multifunctional bioactive chitosan/cellulose nanocrystal scaffolds eradicate bacterial growth and sustain drug delivery."*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345306818
과제번호 2019R1D1A3A03103828
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명 줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 강원대학교 산학협력단
연구기간 2019.11.01 ~ 2022.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345280875
과제번호 2018R1A6A1A03025582
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명 강원지역 산림바이오매스 유래 '나노셀룰로오스 융복합 응용연구 허브' 구축
기 여 율 2/2
과제수행기관명 강원대학교 산림과학연구소
연구기간 2018.06.01 ~ 2027.02.28

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

카로복실메틸키토산 매트릭스에 구형 나노셀룰로오스를 첨가하여 제조된 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 고초균(Bacillus subtilis)에 대한 항균 활성을 가지는 항균용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 하이드로겔은 구형 나노셀룰로오스를 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스에 1 내지 4% (w/w) 첨가하여 제조되는 항균용 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항균 및 상처 치료용 주사가능한 하이드로겔 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 피부 상처 치유 개선을 위한 상처 드레싱으로 항균 효율이 우수한 소나무 유래 구형 나노셀룰로오스 기반 전도성 주

사가능한 하이드로겔에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 척추동물의 가장 큰 기관으로 신체와 주변 환경 사이의 가장 바깥쪽 장벽 역할을 한다. 그것은 0.5- 4 mm의 일반적인 두께표피층, 진피층, 피하층으로 구성되며, 화학적 및 기계적 요인을 포함하여 다양한 측면에서 신체 손상을 예방하는 데 중요한 역할을 한다. 화상, 찰과상, 궤양 및 병변으로 인한 피부의 구조적 완전성의 상실은 상처를 유발한다. 제한된 기증자 출처와 기증자 조직의 항원성으로 인해 피부 이식을 통해 완전한 피부 회복을 달성하기 어렵다.

[0003] 피부 회복을 개선하기 위해 다양한 약리학적, 물리적, 식물치료적 접근이 사용되었다. 조직 공학 접근법은 손상된 조직의 복구 및 재생을 위해 상당한 관심을 받아왔으며, 여기서 구조는 세포외 기질(ECM)의 고유 환경을 모방하도록 개발되었다. 개발된 구조는 세포 성장, 분화, 접착 및 이동을 개선하기 위해 생체 적합성, 생분해성 및 적절하게 다공성이어야 한다. 전기방사, 용제 주조, 가스 발포, 용융 용융, 동결 건조 및 3D 인쇄 접근 방식이 다양한 응용 분야를 위한 다공성 지지체를 제작하는 데 적용되었다. 알지네이트, 키토산, 젤라틴, 콜라겐, 폴리(카프로락톤), 폴리(락트산),및 폴리(락트산-코-글리콜산)은 우수한 물리화학적 특성으로 인해 조직 공학 응용 분야에서 널리 연구되었다.

[0004] 피부는 전기에 민감하고 피부 조직 구성 요소에 따라 2.6 - 1×10^{-4} mS의 전기 전도도를 갖는다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 전도성과 접착 가능성이 유사한 전기 활성 물질은 빠른 상처 치유를 촉진할 것으로 예상된다. 접착력은 다른 기질을 사용하지 않고 이식된 재료와 결손 조직을 폐쇄적으로 접촉시킬 수 있는 특성을 가지고 있다.

[0005] 하이드로겔은 다량의 물을 함유하는 고분자 구조체로 창상 피복 드레싱제, 바이오스캐폴드와 같은 의료 용도뿐 아니라 아이스팩 등과 같은 보냉제 용도에도 활용되고 있다.

[0006] [선행 특허 문헌]

[0007] 대한민국 특허공개번호 제10-2021-0147652호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 항균 및 상처 치료용 주사가능한 하이드로겔을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 카로복실메틸키토산 매트릭스에 구형 나노셀룰로오스를 첨가하여 제조된 하이드로겔을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스는 물에 카로복실메틸키토산을 5%(w/w) 녹여서 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 구형 나노셀룰로오스를 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스에 1 내지 4% (w/w) 첨가하여 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 구형 나노셀룰로오스를 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스에 1% (w/w) 첨가하여 제조되는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 구형 나노셀룰로오스는 소나무 분말로부터 유래한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 11.84, 내지 18.32 kPa 범위의 접착력을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 피브로넥틴 및 콜라겐 1A 유전자 발현을 증가시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 고초균(Bacillus subtilis)에 대한 항균 활성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 상처 치유용 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 물에 카로복실메틸키토산을 5%(w/w) 녹여서 카로복실메틸키토산 매트릭스를 제조하고, 구형 나노셀룰로오스를 상기 카로복실메틸키토산 매트릭스에 1 내지 4% (w/w) 첨가하는 단계를 포함하는 하이드로겔 방법을 제공한다.

[0022] 이하 본 발명을 설명한다.

[0023] 본 발명은 수용성 CMCS와 s-NC로 제작된 하이드로겔 지지체의 상처 치유 가능성 및 항균 활성을 평가하는 것을 목표로 하고 있다. 개발된 하이드로겔 지지체는 다양한 분광 기술을 특징으로 한다. 회복 강도, 팽창 및 분해 가능성을 조사했다. 개발된 하이드로겔 지지체의 생체적합성은 시험관 내에서 WST-1 분석을 통해 인간 진피 섬유아세포(HDF), 인간 각질세포(HaCaT) 및 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)의 공동 배양을 사용하여 조사되었다.

[0024] 또한 전도도와 항균 가능성도 모니터링했다. 마지막으로, 스캐폴드 이식 14일 후 쥐를 사용하여 상처 치유 과정을 평가했다. 본 발명자들은 제조된 하이드로겔 스캐폴드가 다양한 가능성이며 신속한 상처 봉합을 위해 피부 조직 공학에서 탐색할 수 있다고 예상한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 주사 가능한 접착성 하이드로겔은 신속한 피하 상처 치유 적용을 위해 s-NC를 CMCS 매트릭스에 통합하여 개발되었다. 본 발명의 개발된 하이드로겔은 상호작용이 있었고 기계적 강도의 현저한 향상이 관찰되었다. 하이드로겔은 요변성 거동을 나타내었고 높은 전단 속도($1000s^{-1}$) 변형 후 점도에서 ~85% 회복이 관찰되었다. 하이드로겔은 쉽게 주사할 수 있었고 미리 설계된 형태를 유지했다. 강력한 상호 작용으로 인해 제조된 하이드로겔은 다양한 표면(유리, 플라스틱, 고무, 스테인리스 스틸 및 인간의 피부)과 우수한 접착력을 나타낸다. 순수한 고분자 지지체에 비해 복합 하이드로겔 지지체에서 향상된 생체 활성이 관찰되었다.

[0026] 또한, 본 발명의 개발된 하이드로겔 지지체의 생체 적합성을 HDF, HaCaT 세포 및 HUVEC로 개별적으로 모니터링하고 공동 배양했다. 개발된 하이드로겔 지지체로 피부 세포에 대한 부작용은 관찰되지 않았으며 이는 생체 적합성을 나타낸다. 공동 배양 방법은 또한 피부 세포 생존력을 향상시켜 개발된 하이드로겔이 피부 세포 재생을 가속화할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 시사한다.

[0027] 본 발명의 개발된 하이드로겔 지지체에서 대조군보다 피부 조직 관련 유전자 및 단백질 마커의 발현이 더 높게 나타났다. 복합 하이드로겔은 정전기적 상호작용에 의한 세균 세포막의 손상이 더 크기 때문에 대조군과 순수 고분자 하이드로겔보다 우수한 항균력을 보여주었다. 개발된 하이드로겔 지지체는 대조군에 비해 향상된 상처 치유 잠재력을 나타냈으며, 이는 s-NC가 첨가된 지지체에서 실질적으로 더 높았다. 조직학적 분석은 새로운 조직의 발달이 모든 그룹에서 발생했음을 보여주었다. 그러나 그들의 밀도는 s-NC 통합 스캐폴드에서 높았다. 또한, s-NC가 첨가된 스캐폴드에서 더 두꺼운 육아조직이 관찰되어 육아조직의 두께를 자극하여 강화된 상처 치유 효능을 입증하였다. 이러한 결과를 바탕으로 우리는 개발된 하이드로겔이 다중 잠재력을 가지며 신속한 상처 봉합을 위한 피부 조직 공학에 적용될 수 있다고 가정한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 제조된 하이드로겔의 개략도와 피부 상처 치유에 대한 잠재적 응용을 나타낸 그림,

도 2는 소나무 유래 셀룰로오스 및 구형 나노셀룰로오스(s-NC)의 특성을 나타낸 그림.

(a) 셀룰로오스 및 s-NC의 FTIR 스펙트럼,

(b) s-NC의 AFM 이미지, 및

(c) 셀룰로오스 및 s-NC의 XRD 패턴.

도 3은 개발된 하이드로겔 지지체의 구조 및 형태학적 분석을 나타낸 그림으로,

(a) 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼,

(b) 하이드로겔 지지체의 XRD 패턴,

(c) 하이드로겔 지지체의 SEM 형태, 및

(d) 개발된 하이드로겔 지지체의 팽창력.

도 4는 4000-2500 cm^{-1}의 흡수 영역에서 개발된 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 그림.

도 5는 25 ° C에서 개발된 하이드로겔의 기계적 강도 평가를 나타낸 그림으로,

(a) 하이드로겔의 저장 및 손실 계수,

(b) 하이드로겔의 해당 점도 복합체,

(c) 25° C에서 개발된 하이드로겔의 요변성 거동 분석, 및

(d) 주입된 하이드로겔의 이미지.

도 6 (a) 개발된 하이드로겔의 표면이 다른 접착력 조사, (b) 접착력 측정의 도식적 시연, (c) 접착 전단력 대 플라스틱에 의한 하이드로겔의 변위, (d) 접착력 플라스틱 기질이 있는 하이드로겔, 및 (e) 하이드로겔과 다른 표면의 가능한 상호 작용을 나타낸 그림,

도 7(a) 개발된 하이드로겔 지지체의 프로테아제 효소 분해율 분석, (b) 개발된 하이드로겔 지지체의 SBF 처리 14일 후 생체활성 조사한 그림,

도 8은 25mV/s 스캔 속도에서 개발된 하이드로겔의 전기화학적 분석을 나타낸 그림,

도 9는 개발된 하이드로겔 지지체의 피부 세포 증식 가능성 평가를 나타낸 그림으로, (a) HDF, (b) HaCaT, (c) HUVEC, (d) 공동 배양된 세포 및 (e) 공동 배양된 세포의 형광 형태의 생존 가능성.

도 10은 HDF에서 피부 관련 유전자 마커의 평가를 나타낸 그림으로, (a) HDF, (b) HaCaT, (c) HUVEC 유전자 마커, (d) 각각 피브로넥틴, 염기성 사이토케라틴 및 PECAM, HaCaT 및 HUVEC의 면역형광 이미지,

도 11은 개발된 하이드로겔의 항균력 평가를 나타낸 그림으로, (a) 처리 24시간 후의 콜로니 계수 방법 및 (b) 다른 시간 간격에서의 광학 밀도 측정 방법.

도 12는 3주령 ICR 쥐를 사용하여 개발된 하이드로겔 지지체의 상처 치유 가능성 평가를 나타낸 그림으로, (a) 관심 영역이 있는 사용된 쥐의 대표 이미지, (b) 이식된 스캐폴드가 있는 쥐, (c) 이식 7일 및 14일 후 상처 입은 쥐의 사진, (d) 7일 후 남은 상처 부위 및 치료 14일, (e) H&E 및 (f) 이식 14일 후 치유된 부위의 Masson Trichrome 염색.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0030] 본 발명에서는 고분자량 키토산 분말, 수산화칼륨(모두 미국 Sigma Aldrich사), 아염소산나트륨(대중화학), 아세트산, 염산, 황산(Wako Chemicals, 대한민국) 및 수산화나트륨(Junsei Chemicals, Japan)이 사용되었다. 모든 화학물질은 공급자로부터 받은 그대로 사용되었다.

[0031] 실시예 1: 구형 나노셀룰로오스(spherical nanocellulose;'s-NC'라 함) 추출 및 수용성 카르복시메틸 키토산 합성

[0032] s-NC 추출은 소나무 목재 분말에서 화학적 처리를 통해 수행되었으며 자세한 방법은 다음과 같다.

[0033] 요약하면, 소나무 목재 분말(15g)을 3%(w/v) 수산화칼륨 용액에 첨가하고 연속적인 기계적 교반과 함께 90° C에서 1시간 동안 가열하여 소나무에서 무기 성분을 제거했다. 반응 매질을 10%(v/v) 염산 용액으로 중화한 후 여과하고 증류수로 세척하였다. 얻어진 물질을 50℃에서 48시간 동안 건조시켰다. 건조된 샘플(12.9g)은 샘플에서 리그닌 함량을 제거하기 위해 연속적인 기계적 교반과 함께 85° C에서 아염소산나트륨 및 아세트산 용액으로 처

리되었다. 그 후, 반응 매질을 여과하고 증류수로 세척하고, 수집된 샘플을 50℃에서 48시간 동안 건조시켰다. 건조된 샘플(9.2g)을 실온에서 17.5%(w/v) 수산화나트륨 용액에 추가로 첨가하고 1시간 동안 교반하여 헤미셀룰로오스 함량을 제거하였다. 반응 매질을 10%(v/v) 아세트산 용액으로 중화한 후, 여과 및 동결 건조기(EYELA® Freeze Drying Unit 2200, Tokyo, Japan)를 사용하여 36시간 동안 동결 건조시켰다. 얻어진 셀룰로오스는 6.4g이었다.

[0034] s-NC를 얻기 위해서 후속 작업으로

[0035] 계산된 양의 셀룰로오스를 16시간 동안 80° C에서 1M 과황산암모늄 용액으로 처리했다. 그 후, 10배의 빙냉수를 넣어 반응을 켄칭하고, 12-14kDa 분자량 셀룰로오스 튜브로 증류수에 대해 3일 동안 투석하였다. 투석된 샘플은 추가 작업을 위해 동결 건조되고 동결 건조되었다.

[0036] Carboxymethyl chitosan (CMCS)는 다음과 같이 합성되었다. 요약하면, 공지된 양의 키토산(CS)를 50% 수산화나트륨 용액에 첨가하고 냉장고에 24시간 동안 보관한 후 연속 기계적 교반과 함께 필요한 양의 이소프로판올을 첨가하였다. 그 후, 계산된 양의 모노클로로아세트산을 반응 혼합물에 첨가하고 60℃에서 6시간 동안 교반한 다음, 여과하고 에탄올로 세척하였다. 얻어진 시료를 증류수에 녹여 3일간 투석하였다. 투석된 샘플을 회전 증발기로 농축하고 동결 건조기(EYELA® Freeze Drying Unit 2200, Tokyo, Japan)로 동결 건조시켰다.

[0038] 실시예 2: CMCS 및 복합 하이드로겔 지지체(CMCS/s-NC)의 합성

[0039] 하이드로겔은 필요한 양의 CMCS(5%, w/w)를 증류수에 용해시켜 제조했다. 복합 하이드로겔은 CMCS 매트릭스에 다양한 양의 s-NC(1, 2, 4%, w/w, w.r.t. CMCS)를 첨가하여 제조되었다. 개발된 하이드로겔을 -80 ° C에서 6시간 동안 사전 냉각한 후 동결 건조하여 다공성 지지체를 제조했다. 순수 폴리머 및 복합 하이드로겔 스캐폴드는 CMCS 및 CMCS/s-NC-y로 설계되었으며, 여기서 y는 CMCS 매트릭스에서 s-NC의 양이다.

[0041] 실시예 3: 하이드로겔 지지체의 특성화

[0042] 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광법(Frontier, Perkin Elmer, UK)을 사용하여 s-NC의 작용기와 4000-400cm^{-1}의 파장 범위에서 4cm^{-1}의 분해능으로 CMCS 매트릭스와의 상호 작용을 모니터링했다. 투과전자현미경(TEM)(JEM, 2100 F, Jeol, Japan)을 이용하여 s-NC의 크기와 형태를 측정하였다. 개발된 하이드로겔 지지체의 표면 형태는 주사전자현미경(SEM)(S-4800, Tokyo, Japan)으로 조사하였다. 스캐폴드의 구조적 변화는 X선 회절계(X'Pert PRO MPD, Philips, Eindhoven, Netherlands)로 40kV 및 40mA의 작동 전압 및 전류, Cu Kα 방사선(λ = 1.5414 A$^{\circ}$)에서 평가되었다. 작동 범위(2Θ)는 5-40°이었다. 개발된 하이드로겔의 유변학적 특성은 25° C에서 6mm 평행판을 사용하여 ARES-G2 레오미터(TA Instrument, New Castle, Delaware, USA)로 평가했다.

[0044] 실시예 4: 하이드로겔의 회복성, 주사성, 접착력

[0045] 개발된 하이드로겔의 회복 가능성은 다양한 시간 간격(0-100, 101-200 및 201-300 초)에 대해 다양한 전단 속도(0.1, 100 및 0.1s^{-1})로 ARES-G2 레오미터를 통해 점도를 측정하여 평가되었다. 각각 25° C에서. 주사성 특성은 바늘 치수가 21G인 10mL 주사기를 사용하여 평가되었다.

[0046] 접착력 측정을 위해 200㎕의 개발된 하이드로겔을 25mm × 15mm의 면적을 덮도록 플라스틱 표면에 배치했다. 두 번째 플라스틱 시트를 접착층 위에 놓고 실온에서 15분 동안 방치했다. 그 후, 일축 인장 측정을 수행하여 하이드로겔의 접착 강도를 측정하였다. 모든 실험은 삼중으로 수행되었다(n = 3).

[0048] 실시예 5: 팽창력

[0049] 하이드로겔 지지체의 팽윤 가능성은 실온의 증류수에서 측정되었다. 이를 위해 알려진 양의 스캐폴드를 물에 담그고 일정 시간 후에 제거했다. 지지체 표면의 여분의 물을 티슈 페이퍼로 제거하고 팽창된 지지체의 중량을 측정하였다. 그 후 다시 스캐폴드를 물에 담그고 이 과정을 여러 번 반복하였다. 스캐폴드의 팽창 가능성은 다음 공식을 사용하여 계산되었다.

[0050] $$\%\ Swelling = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

[0051] W_s와 W_d는 각각 팽창된 지지체와 건조된 지지체의 무게이다.

[0053] 실시예 6: 분해하이드로겔 지지체의 분해 효율은 실온에서 프로테아제(1 mg/mL) 효소로 분석되었다. 이를 위해

계산된 지지체의 무게는 고정된 시간 동안 효소 배지에 보관되었다. 그 후, 지지체를 배지에서 제거하고 증류수로 헹구었다. 티슈 페이퍼로 표면의 물을 제거한 후 지지체를 건조시켰다. 건조된 지지체의 무게를 재어 이 과정을 여러 번 반복하였다. 3일 간격으로 오래된 효소 배지를 새로운 배지로 교체했다. 분해율은 주어진 공식을 사용하여 계산되었으며,

[0054] $$Weight\ Loss\ (\%) = \frac{W_i - W_d}{W_i} \times 100$$

[0055] W_i 및 W_d는 각각 초기 및 분해된 스캐폴드의 무게이다.

[0057] 실시예 7: 생체 활성 분석

[0058] 하이드로겔 지지체의 생체 활성은 실온에서 시뮬레이션된 체액(SBF) 배지에서 조사되었다. 이를 위해 제작된 지지체를 SBF 용액에 14일 동안 담가두었다. 이 과정에서 스캐폴드의 분해로 인한 양이온 농도의 변동을 제거하기 위해 3일 후에 기존 SBF 배지를 새로운 배지로 교체했다. SBF 처리 후 스캐폴드를 물로 세척하고 SEM 검사 전에 동결 건조시켰다. SBF 용액의 배지 조성은 표 1에 나와 있다. 개발된 하이드로겔 지지체는 SBF 처리 전에 5% $CaCl_2$ 용액으로 가교되었다.

표 1

[0059]

Chemical reagents	Quantity (g/L)
NaCl	6.547
$NaHCO_3$	2.268
KCl	0.373
$Na_2HPO_4.2H_2O$	0.178
$MgCl_2.6H_2O$	0.305
$CaCl_2.2H_2O$	0.368
Na_2SO_4	0.071
$(CH_3OH)_3CNH_2$	6.057

[0060] 표 1은 SBF 배지의 화학적 조성

[0061] 실시예 8: 전도도 및 전기화학적 분석

[0062] 개발된 하이드로겔의 전도도는 Keithley 2460 source meter®와 연결된 4-probe instrument(MS Tech, Solution)를 사용하여 측정하였다. 개발된 하이드로겔의 전기화학적 활성은 Keithley 2460 source meter®를 사용하여 25mV/s의 스캔 속도로 -0.6V?1.2V 범위에서 분석되었다. 전기화학적 분석에 사용된 하이드로겔의 치수는 2.2 × 0.8 × 0.4 cm^3였다.

[0064] 실시예 9: 세포 생존력

[0065] HDF, HaCaT 및 HUVEC의 개별 또는 공동 배양 세포 생존 능력은 개발된 하이드로겔 스캐폴드를 사용하여 WST-1 분석에 의해 모니터링되었다. 이를 위해 1 × 10^4(개별 배양) 및 0.3 × 10^4(공동 배양) 세포를 37° C의 5% CO2 인큐베이터에서 1, 3 및 5일 동안 지지체 유무에 관계없이 배양했다. 스캐폴드 처리가 없는 그룹은 대조군으로 간주되었다. 배양 후, WST-1 염료를 배양 배지에 첨가하고 2시간 동안 더 배양하여 포르마잔을 형성하였다. 포르마잔 양은 분광광도계(Infinite® M Nano 200 Pro, TECAN, Switzerland)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 측정했다. 모든 실험은 삼중으로 수행되었으며(n = 3), 결과는 평균 OD ± 표준 편차(SD)로 표시된다. 통계적 의미는 *p < 0.05에서 취했다.

[0067] 실시예 10: 세포 형태

[0068] 개별 및 공동 배양 세포의 형태는 처리 3일 후 도립 형광 현미경(DMi8 Series, Leica Microsystems, Germany)

을 사용하여 가시화하였다. 이를 위해 2.0 × 10^4(개별 세포) 및 0.5 × 10^4(공동 배양 세포)를 지지체의 유무에 관계없이 배양했다. 스캐폴드가 없는 그룹을 대조군으로 사용했다. 처리 후, 세포를 PBS로 세척하고 4% 파라포름알데히드(PFA)(Sigma-Aldrich, USA) 용액으로 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 0.1% Triton-X 100으로 10분간 처리한 후, 1% Bovine Serum Albumin(BSA)(Sigma-Aldrich, USA)으로 60분간 처리하였다. 그 후 세포를 Alexa Flor 488-conjugated Phalloidin (F Actin Probe; Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA) 200 μL로 20분간 염색한 후 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)(Sigma-Aldrich, USA)로 5분 동안 핵 염색을 하였다. 과잉 염색은 PBS로 세척하여 제거하고 Prolong® Antifade 마운팅 미디어(Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA) 1방울을 첨가하여 마운팅을 수행하고 현미경으로 영상을 촬영하였다.

[0070] 실시예 11: RNA 추출 및 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR) 분석

[0071] qPCR 기술은 지지체의 유무에 관계없이 HDF, HaCaT 및 HUVEC에서 mRNA 발현을 조사하는 데 사용되었다. 어떠한 처리도 하지 않은 그룹을 대조군으로 하였다.

[0072] 이를 위해 1 × 10^6 세포를 24웰 플레이트에서 7일 및 14일 동안 DMEM 배지와 함께 배양한 후 제조업체의 지침에 따라 TRIzol® 시약을 사용하여 RNA 추출을 수행했다. 추출된 RNA의 순도와 농도를 분광기를 이용하여 모니터링한 후 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qPCR은 95° C에서 15초 동안 변성 주기 43회 및 60° C에서 1분 증폭을 포함하는 반응 조건으로 SYBR Green Master mix로 수행되었다. 모든 반응은 3중으로 완료되었고(n = 3), 이를 글리세르알데히드 3-인산 탈수소효소(GAPDH) 하우스키핑 유전자로 정규화했다. Bio-Rad Real-Time PCR(CFX96TM Maestro Real-Time System, BioRad, USA) 시스템을 이용하여 mRNA의 발현을 측정하였다. 대조군 및 스캐폴드 처리군을 갖는 상이한 피부 세포에서 상대적인 mRNA 발현 수준을 히스토그램에서 비교하였다. 이 연구에 사용된 프라이머는 표 2에 나와 있다.

표 2

[0073]

Genes	Sequences (5' to 3')
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCA
Fibronectin	GCCATGACAATGGTGTGAAC
ColA	CTGACCTTCCTGCGCCTGATGTCC
KRT 1	AGAGTGGACCAACTGAAGAGT
KRT 5	TGGTGCCGGTAGTGGATTTG
KRT 10	GGTGGGAGTTATGGAGGCAG
KRT 14	GATGATTGGCAGCGTGGAG
PECAM	GCTGAGTCTCACAAAGATCTAGGA
VEGF	TATGCGGATCAAACCTCACCA
VE-CAD	GGCTCAGACATCCACATAACC

[0074] 표 2는 본 발명에서 사용된 프라이머 서열 리스트.

[0076] 실시예 12: 단백질 마커의 면역세포화학적 분석

[0077] HDF, HaCaT 및 HUVEC에서 각각 피브로넥틴, 염기성 사이토케라틴 및 혈소판 내피 세포 부착 분자-1(PECAM-1 또는 CD 31)을 포함한 다양한 단백질 발현을 조사하기 위해 면역세포화학 분석을 수행했다.

[0078] 이를 위해 2 × 10^4 세포(개별)를 24웰 플레이트에 넣고 지지체 유무에 관계없이 14일 동안 배양했다. 스캐폴드 처리가 없는 그룹을 대조군으로 간주하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고 4% PFA 용액으로 실온에서 20분 동안 고정하였다. 0.1% Triton X-100 용액을 사용하여 상온에서 15분간 세포를 투과시킨 후 PBS로 세척하고 1% BSA 시약으로 차단하였다. 마지막으로, 세포를 피브로넥틴, 염기성 사이토케라틴 및 PECAM-1에 대한 250 μL의 마우스 단일클론 항체로 처리한 다음, 핵을 20 μL의 DAPI 용액으로 2분 동안 대조염색하였다. 과잉 염색 PBS로 세척하여 제거하고 마운팅 미디어를 추가하여 마운팅을 수행했다. 형태는 형광 현미경으로 포착되었다.

[0080] 실시예 13: 하이드로겔 지지체의 항균력

[0081] 고초균(ATCC-6051)의 집락 계수 및 광학 밀도(OD)를 측정하여 하이드로겔 지지체의 항균 활성을 분석했다. 콜로니 카운팅 방법을 위해 100 μL의 박테리아 용액(1 x 10^6)(Difco™, Nutrient broth, BD Biosciences, USA)을 하이드로겔(20 mg/mL)이 포함된 배양 배지 25 mL를 포함하는 페트리 접시에 첨가했다. 37° C에서 24시간 동안 배양했다. 하이드로겔이 없는 그룹을 대조군으로 간주했다. 그 후, 100 μL의 박테리아 용액을 한천 플레이트에 옮기고 24시간 동안 추가 배양하여 콜로니를 형성하였다.

[0082] OD 측정을 위해 준비된 스캐폴드를 세균 배지(1 x 10^6)에 통합하고 6, 24 및 48시간 동안 처리했다. 스캐폴드가 없는 미디어가 대조군으로 사용되었다. OD의 변화는 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 테스트는 세 번 수행되었다.

[0084] 실시예 14: 생체 내(in vivo) 상처 치유 분석

[0085] 생체 내 연구는 이식 7일 및 14일 후 3주령 ICR 수컷 쥐(N = 6)를 사용하여 개발된 하이드로겔 지지체의 상처 치유 효율을 모니터링하기 위해 수행되었다. 실험은 무처리 음성 대조군, 양성 대조군-순수 고분자 지지체(CMCS), 실험군-CMCS/s-NC 1로 구분하였다.

[0086] 여기에서 CMCS/s-NC 1을 실험군으로 선택한 이유는 시험관 내에서 다른 스캐폴드와 비교하여 더 나은 피부 증식력을 나타내었기 때문이다. 각 그룹에는 두 개의 실험 사이트가 있는 중복 쥐(n = 2)가 있다. 간단히 말해서, 쥐의 등 털을 청소하고 피부를 70% 에탄올 용액으로 소독했다. 그 후 멸균 생검 펀치를 이용하여 직경 1cm의 원형 상처를 생성하였다. 등쪽 피부의 두 층을 제거하고 스캐폴드로 채웠다. 모든 쥐는 보호되고 방음이 되는 방에 두었다. 실온과 상대습도(RH)는 각각 21±1° C, 35±1%로 유지하였다. 방은 자동으로 제어되는 12시간 조명 및 12시간 암주기로 유지되었다. 일관된 과학적 결과를 산출하는 데 필요한 동물의 고통과 동물의 수를 최소화하기 위해 가능한 모든 노력을 기울였다. 조직학적 염색을 수행하기 위해 처리 14일 후에 래트를 희생시켰다.

[0087] 조직학적 분석을 위해 수집된 검체를 3.7% PFA 용액으로 2일 동안 고정한 후 4° C에서 12% 에틸렌 디아민테트라아세트산(EDTA)으로 탈회하였다. 그 후 표본을 세척하고 알코올로 탈수하였다. 탈수된 표본을 파라핀에 이식하여 미세 절편을 생성했다. 표본 절편은 hematoxylin, eosin, Masson's trichrome으로 염색하였다. 모든 수술 프로토콜은 Capital Medical University 동물 실험 윤리 위원회(AEEC, Capital Medical University의 동물 관리 및 사용 위원회 연구소, 허가 번호 CMUSH-IRB-KJ-YJ-2020-29)의 승인을 받았다. 스캐폴드는 이식 전에 UV 광처리에 의해 살균되었다.

[0088] 본 발명의 통계는 Origin Pro9.0 소프트웨어를 사용하여 일원 분산 분석으로 통계 분석을 수행했다. 모든 결과는 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시되었다. 통계적 유의성은 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001에서 고려하였다. 모든 비교는 대조군과 처리군 사이에 이루어졌다.

[0090] 상기의 실시예의 결과를 하기에서 기재한다.

[0091] s-NC의 특성화

[0092] 하이드로겔 스캐폴드의 제작과 상처 치유에 대한 잠재적인 응용에 대한 도식적 표현은 도 1에 제시되어 있다.

[0093] 셀룰로오스와 s-NC의 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR) 스펙트럼은 도 2a에 나와 있다. 3325, 1640 및 1019 cm-1의 특징적인 피크는 각각 수산기(-OH) 그룹, 흡수된 물 및 -C-O 신축 그룹에 기인한다. 셀룰로오스와 s-NC는 1500 cm^{-1}에서 유의미한 피크를 나타내지 않았으며, 이는 화학적 처리에 의해 구조에서 리그닌 부분이 제거되었음을 시사한다. s-NC에서 1731 cm^{-1}에서 추가 흡수 피크의 출현은 과황산암모늄(APS)에 의한 셀룰로오스 작용기의 카르복실화에 기인한다. s-NC 스펙트럼에서 다른 중요한 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 APS 가수분해가 순수 셀룰로오스의 구조적 무결성을 변경하지 않았음을 시사한다. 얻어진 s-NC의 형태를 AFM으로 조사하였고, 그 이미지를 도 2b에 나타내었다. 얻어진 s-NC는 평균 직경이 ~65 nm인 입자와 같은 형태를 나타내어 APS 가수분해에 의한 나노입자의 성공적인 형성을 나타낸다. 셀룰로오스와 s-NC의 XRD 패턴은 도 2c에 나와 있다. 11.8°, 20.0° 및 21.5o에서의 회절 피크는 셀룰로오스 I 및 II 구조에 기인한다. s-NC는 셀룰로오스보다 더 날카롭고 더 강렬한 회절 피크를 나타내어 비정질 영역의 제거로 인해 s-NC의 향상된 결정성을 나타낸다.

[0095] 하이드로겔 지지체의 구조 및 형태적 특성화

[0096] CMCS와 그 복합 지지체의 FTIR 스펙트럼은 도 3a에 나와 있다. 순수한 CS의 FTIR 스펙트럼은 도 3a의 삽입에 나와 있다. 순수한 CS에서 3324 cm^{-1}의 넓은 특성 피크는 수소 결합 아민($-NH_2$) 작용기에 기인할 수 있으며, 이는

CMCS 하이드로겔에서 더 낮은 파수(3329 → 3303 cm-1)로 이동했다(도 4). CMCS에서 1639cm^{-1}의 흡수 피크는 아미노기와 겹치는 카르복실기에 할당된다. 1156 cm^{-1}의 흡수 피크는 CMCS에서 약화되어 CS의 하이드록실 그룹에서 카르복시메틸화가 발생함을 나타낸다. 또한, 복합 하이드로겔에서 흡수 피크(1416 → 1409 cm^{-1})의 이동이 관찰되었으며, 이는 통합된 s-NC와 CMCS 사이의 상호작용을 나타낸다. 복합 하이드로겔의 이러한 이동은 폴리머 사슬 사이의 분자내 수소 결합 상호작용을 최소화하고 통합된 s-NC와 폴리머 사슬 사이의 분자간 수소 결합 상호작용을 증가시키기 때문일 수 있다. 이 결과는 개발된 하이드로겔이 고도로 상호 작용하고 수소 결합이 이러한 변화에 중요한 역할을 할 것으로 추정됨을 시사한다.

[0097] 개발된 하이드로겔의 구조적 변화를 X-ray diffractometer를 이용하여 평가하였고, XRD 패턴은 도 3b와 같다. 8.9° 및 20.5°에서 넓고 날카로운 회절 피크가 CMCS에서 관찰되어 구조에서 각각 비정질 및 결정질 영역을 보여준다. 복합 하이드로겔은 피크 위치에서 약간의 변화가 있는 순수한 중합체와 유사한 회절 패턴을 나타낸다. 복합 하이드로겔에서 무정형 영역의 면간 거리(1→0.93 nm)의 감소가 관찰되었으며, 이는 FTIR 결과에서 관찰된 바와 같이 통합된 s-NC와 폴리머 사슬 사이의 상호작용으로 인해 조립된 구조의 형성을 나타낸다. 복합 하이드로겔(0.44 → 0.45 nm)에서 결정질 면간 거리의 유의미한 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 s-NC의 분포가 주로 중합체의 비정질 영역에서 발생했음을 시사한다.

[0098] 하이드로겔 지지체의 표면 형태는 SEM을 사용하여 분석되었으며 이미지는 도 3c에 나와 있다. 제작된 스캐폴드는 다공성이 높고 상호 연결된 형태학적 구조를 나타낸다. 스캐폴드에서 계층 구조가 관찰되었다. 복합 지지체는 순수한 고분자 지지체보다 다공성 형태를 보여주었다.

[0099] 스캐폴드의 팽윤 효율은 세포 대사 산물과 영양소의 교환을 촉진하기 때문에 조직 공학 응용 분야에서 중요한 역할을 한다. 개발된 하이드로겔 지지체의 팽윤 가능성을 실온의 수성 조건에서 조사하였고, 그 결과를 도 3d에 나타내었다. 복합 하이드로겔 지지체는 순수 고분자 지지체보다 팽윤 효율이 낮았고, 이 잠재력은 s-NC 함량이 증가함에 따라 더욱 감소했다. 팽윤 효율의 감소는 s-NC와 폴리머 사슬 사이의 더 현저한 상호작용에 의해 설명될 수 있으며, 이로 인해 수분 흡수를 위한 작용기의 가용성이 낮아진다. 스캐폴드의 팽창은 생리학적 조건에서 제어되어야 한다. 급격한 팽창은 스캐폴드를 약화시키고 저하시킬 수 있다. 또한, 15시간 후에 팽윤 효율의 향상이 관찰되지 않았으며, 이는 제작된 하이드로겔 지지체의 포화점을 나타낸다.

[0101] 유변학적 거동 및 회수 분석

[0102] 조직 공학 응용을 위해 개발된 하이드로겔은 우수한 탄성과 기계적 강도를 가져야 한다. 하이드로겔 조건에서 제조된 시료의 기계적 강도를 레오미터를 이용하여 분석하였고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 측정된 주파수 영역에서 저장 탄성률(G', 선 있음)과 손실 탄성률(G", 선 없음)의 변화는 도 5a에 나와 있다. 복합 하이드로겔은 순수 고분자 하이드로겔보다 더 높은 G 값을 나타내었고, s-NC와 고분자 사슬 사이의 상호작용이 크기 때문에 높은 탄성을 보였다.

[0103] 고분자 사슬과 s-NC 사이의 더 큰 상호작용으로 인해 복합 하이드로겔에서 G' 값(1.11×10^5 Pa → 5.64×10^6 Pa)의 상당한 향상이 관찰되었으며, 이는 상호 연결된 네트워크 구조를 생성하여 높은 탄성으로 이어진다. 복합 하이드로겔의 높은 ω 영역에서 G' 값의 향상은 더 상호 연결된 네트워크 구조의 이완 및 형성으로 설명될 수 있으며, 그 결과 고체와 유사한 구조와 더 높은 G' 값이 생성된다.

[0104] 순수한 고분자 하이드로겔보다 복합 하이드로겔에서 더 높은 G" 값이 관찰되었으며, 그 값은 s-NC 함량이 증가함에 따라 더욱 증가했다. 그러나 G"의 크기는 측정된 ω 영역 전체에서 G'보다 낮았으며, 이는 하이드로겔에서 안정적인 탄성 고분자 네트워크 구조의 형성을 시사한다.

[0105] ω 영역에서 전개된 하이드로겔의 복소점도(η*) 변화도 측정하였으며, 그 결과를 도 5b에 나타내었다. 측정된 영역에서 순수 폴리머 하이드로겔보다 복합 하이드로겔에서 더 높은 η* 값이 관찰되었으며, s-NC 함량이 증가함에 따라 더욱 증가하여 복합 하이드로겔에서 더 고체와 유사한 특성을 나타낸다. η* 값은 낮은 ω 영역에서 증가하는 반면 η* 값의 감소는 높은 ω 영역에서 발생하여 각각 전단 농축 및 전단 박화 특성을 시사한다. 이것은 인쇄 응용 프로그램의 예상되는 속성이다.

[0106] 개발된 하이드로겔의 요변성 거동을 분석하여 인쇄력을 확인했다. 이를 위해 하이드로겔의 η* 값의 변화를 모니터링하기 위해 0.1, 1000 및 0.1 s^{-1}(각각 100초)의 일련의 전단 속도를 적용했다. 인쇄 조건과 유사한 구조를

변형하기 위해 높은 전단 속도($1000s^{-1}$)를 사용했다. 인쇄 가능한 하이드로겔은 높은 요변성 거동을 나타내야 한다. 다른 전단 속도에서 η* 값의 변화는 도 5c에 나와 있다. CMCS, CMCS/s-NC 1, CMCS/s-NC 2, CMCS/s-NC 4의 초기 η* 값은 1314, 4335, 695, 562 Pa이었고, 높은 전단 속도($1000\ s^{-1}$)에서 각각 0.552, 0.326, 0.443, 및 0.687 Pa으로 감소하였다. 이 값은 낮은 전단 속도($0.1s^{-1}$)에서 추가로 증가했으며 CMCS, CMCS/s-NC 1, CMCS/s-NC 2 및 CMCS/s-NC 4의 경우 각각 681, 2787, 484 및 475Pa였다. 회복력은 CMCS, CMCS/s-NC 1, CMCS/s-NC 2 및 CMCS/s-NC 4의 경우 51.7, 64.2, 69.2, 84.2%였다. 복합 하이드로겔의 높은 회복 잠재력은 하이드로겔의 변형을 제한하는 통합된 s-NC와 상호 연결된 고분자 네트워크 구조의 형성에 기인한다.

[0107] 개발된 하이드로겔의 주입력은 상온에서 주사기를 사용하여 테스트되었으며 주입된 하이드로겔의 디지털 이미지는 도 5d에 나와 있다. 하이드로겔은 쉽게 주입되고 구조를 유지했다. 주사 가능한 하이드로겔은 다양한 장점이 있으며 원하는 부위에 주사할 수 있다. 주사 가능한 하이드로겔은 외부 기계적 변형 후에도 이식된 부위의 겔 조각화 가능성을 줄이고 지속적으로 피부 상처 치료를 촉진할 수 있기 때문에 피부 상처 재생을 위한 매력적인 재료로 간주된다. 또한 불규칙한 상처 부위에도 적용할 수 있다.

[0109] 개발된 하이드로겔의 접착력

[0110] 개발된 하이드로겔의 접착 특성을 다양한 표면에 대해 조사하였고, 그 이미지를 도 6a에 나타내었다. 개발된 하이드로겔은 다른 표면에 즉시 접착되어 접착 력을 보여준다. 개발된 하이드로겔의 접착성은 하이드로겔의 작용기와 재료 표면 사이의 다중 상호작용에 기인할 수 있다. 접착력은 출혈 중지, 누출 밀봉, 조직 결합 및 조직 회복 개선을 포함한 다양한 응용 분야에 매우 바람직하다. 또한, 15분 처리 후 소수성 표면(플라스틱)과 현상된 하이드로겔 사이의 접착 강도를 단축 인장 측정으로 정량화하기 위해 랩 전단 테스트를 수행했다. 랩 전단 시험의 개략도는 도 6b에 나와 있다.

[0111] 개발된 하이드로겔을 두 개의 플라스틱 기판(25㎜ × 15㎜) 사이에 끼우고 측정했다. 플라스틱과 다른 하이드로겔에 대한 접착 강도 대 변위의 얻은 곡선이 도 6c에 나와 있다. 순수 폴리머 하이드로겔과 비교하여 복합 하이드로겔에서 접착력의 향상이 관찰되었으며, 이는 접착력을 나타낸다. 이 힘은 폴리머 매트릭스의 s-NC 함량을 증가시켜 더욱 강화되었으며, 이는 접착 특성이 개선되었음을 나타낸다. 강화된 접착력은 표면 사이의 강한 상호작용으로 인한 것이다. 접착 시간, 하이드로겔의 특성 및 적용된 기질을 포함한 다양한 요인이 접착성에 널리 영향을 미쳤다.

[0112] 개발된 플라스틱 기재와 하이드로겔의 접착력의 정량적 값은 도 6d에 나와 있다. 접착강도는 CMCS, CMCS/s-NC 1, CMCS/s-NC 2, CMCS/s-NC 4에서 각각 5.53, 11.84, 15.13, 18.32 kPa였다. 개발된 하이드로겔은 조직 표면의 극성기와 하이드로겔 간의 강한 상호작용으로 인해 돼지와 사람의 피부를 포함한 친수성 표면에서 더욱 접착력을 높일 수 있으며, 피부 상처 치유에도 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0113] 개발된 하이드로겔의 다양한 기질의 접착성에 대한 가능한 메커니즘은 도 6e에 나와 있다. 여기에서 우리는 하이드로겔 표면에 의한 유리와 인간의 피부 표면 사이의 상호 작용 메커니즘을 설명한다. 하이드로겔은 쌍극자-쌍극자 또는 이온-쌍극자 상호작용을 통해 다른 극성 또는 하전된 작용기와 상호작용할 수 있는 하전된 이온($NH4^{+}$ 및 COO^{-})을 가지고 있다. 유리는 음전하를 띤 규산염 그룹을 가지고 있으며 위에서 언급한 상호작용을 통해 하이드로겔의 양전하 아미노 그룹과 상호작용한다. 유사하게, 피부 표면은 하이드로겔과 상호작용할 수 있다.

[0115] 하이드로겔 지지체의 분해 및 생체 활성 가능성

[0116] 개발된 하이드로겔 지지체의 분해 속도를 모니터링하기 위해 시험관 내 분해 연구를 수행했으며 그 결과를 도 7a에 제시했다. 복합 지지체는 프로테아제 존재하에서 순수한 중합체 지지체보다 더 큰 분해율을 나타냈다. 이 거동은 하이드로겔 지지체의 형태학적 측면으로 설명할 수 있다. 순수한 고분자 지지체는 SEM 이미지에서 관찰된 복합 지지체에 비해 상대적으로 폐쇄된 구조를 가지고 있어 프로테아제 매체를 더 크게 제한하여 느린 분해를 유발한다. 스캐폴드는 조직 공학 적용을 위해 적절한 분해 속도를 가져야 한다. 높은 분해 속도는 세포 활동에 적합하지 않은 반면 느린 분해는 주변 조직에서 염증 반응을 일으킬 수 있다. 고분자 물질의 분해는 결정성, 분자량, 매질의 pH 및 효소의 존재에 의해 크게 영향을 받는다. 생분해 메커니즘은 재료의 침식, 가수분해 및 가용화를 포함한 여러 요인에 의해 좌우된다.

[0117] 개발된 하이드로겔 지지체의 생체활성 잠재력을 SEM을 이용하여 분석하였고, 그 결과를 도 7b에 나타내었다. 이러한 물질의 생물학적 활성은 세포 증식 및 분화에 중요한 역할을 한다. 순수한 고분자 지지체보다 복합 지지체

의 표면에서 더 높은 광물화가 관찰되었으며, 이는 개선된 생체활성을 나타낸다. 개발된 스캐폴드의 생체 활성 잠재력은 s-NC 함량에 의해 현저하게 영향을 받았다. 생체 활성 유리 또는 바이오세라믹이 있는 생분해성 고분자는 고분자 지지체 단독보다 더 중요한 생체 활성을 나타냈다. 순수한 키토산은 생체 광물화 가능성이 낮아 세포 분화에 적합하지 않은 것으로 관찰되었다. 나노입자의 혼입은 지지체 표면에 인회석 층을 형성함으로써 생물광물화 가능성을 유도한다. 퇴적된 광물의 EDX 스펙트럼은 SEM 이미지의 인세트에 표시된다. 칼슘과 인 피크의 출현은 비계 표면에 인회석 층이 형성되었음을 나타낸다. 형성된 광물의 침착 비율은 표 3에 나열되어 있다. 복합 지지체는 순수 고분자 지지체보다 칼슘과 인의 비율이 더 높아 생체 활성이 향상되었음을 확인했다.

표 3

[0118]

Sample	Element	Weight (%)	Atomic (%)	Total
CMCS	C K	44.13	51.34	
	O K	55.57	48.55	
	P K	0.07	0.03	
	Ca K	0.23	0.08	
CMCS/CNPs 1	C K	44.04	51.38	
	O K	55.09	48.26	
	P K	0.51	0.23	
	Ca K	0.36	0.13	
CMCS/CNPs 2	C K	36.00	43.07	100
	O K	62.95	56.53	
	P K	0.23	0.10	
	Ca K	0.82	0.30	
CMCS/CNPs 4	C K	44.22	51.59	
	O K	54.80	48.00	
	P K	0.61	0.28	
	Ca K	0.37	0.13	

[0119] 표 3은 SBF 배지 처리 14일 후 개발된 하이드로겔 지지체에 EDX에 의한 증착된 광물의 원소 분석

[0121] 하이드로겔의 전도도 및 전기화학적 분석

[0122] 개발된 하이드로겔의 전도성을 Four-probe 기법으로 측정하였으며, 그 결과를 표 4에 나타내었다. 순수 고분자 하이드로겔과 복합 하이드로겔의 비교. 전도도의 이러한 향상은 s-NC의 존재하에 CMCS의 아미노 작용기의 더 많은 양성자화에 기인하며, 이는 개선된 이온 전도도를 촉진한다. 개발된 하이드로겔은 피부 전도도(2.6 -1 x 10^{-4} mS/cm) 범위 내에서 이온 전도성을 나타낸다. 따라서 전도성과 우수한 접착력을 가진 개발된 하이드로겔은 이식 후 피부 세포 활동을 크게 자극하고 빠른 상처 치유 과정을 도울 수 있을 것으로 기대된다. 키토산의 기능화는 수용성을 향상시킬 뿐만 아니라 이온 전도도를 향상시킨다.

표 4

[0123]

샘플	차원 (cm)	Resistance (R) (ohm)	Conductivity =L/RA (S/cm-1)
CMCS	2.4 X 0.9 X 0.5	1629.73	6.817 X10^{-5}
CMCS/s-NC 1	2.3 X 1.0 X 0.3	1599.61	6.251 X10^{-4}
CMCS/s-NC 2	2.4 X 0.9 X 0.6	1572.22	7.067 X10^{-4}
CMCS/s-NC 4	2.2 X 0.6 X 0.4	864.39	2.892 X10^{-3}

[0124] 표 4는 4개 프로브 시스템을 사용하여 개발된 하이드로겔의 전도도 분석.

[0125] 개발된 하이드로겔의 전기화학적 거동을 3전극 시스템을 이용하여 순환 전압전류법(cyclic voltammetry)으로 평가하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 순수한 폴리머 하이드로겔은 0.41V 및 -0.015V에서 산화 및 환원 피

크를 나타내며, 이는 각각 CMCS 폴리머의 -NH 및 -COOH 작용기의 양성자화 및 탈양성자화를 나타낸다. 산화(0.41 → 0.77 V) 및 환원(-0.015 → 0.051 V) 피크의 체계적인 이동이 복합 하이드로겔에서 관찰되었으며, 이는 폴리머 매트릭스에 s-NC를 추가하면 하이드로겔의 전기화학적 활성을 촉진함을 시사한다. 복합 하이드로겔은 순수한 폴리머 하이드로겔에 비해 더 큰 양극 전류(0.41→0.76㎂)를 나타내어 s-NC가 있을 때 개선된 전기화학적 성능을 보여준다. 복합 하이드로겔의 향상된 전기화학적 성능은 전자 전달을 촉진하는 s-NC 작용기(-COOH 및 -OH)의 브리징 효과에 기인할 수 있다. 또한, 개발된 하이드로겔에서 뚜렷한 상자형 히스테리시스가 관찰되어 전극 표면에서 하이드로겔의 전기 산화를 시사한다. 복합 하이드로겔에서 히스테리시스 영역이 더 증가하여 전극 표면에서 하이드로겔의 더 큰 전기 산화를 보여준다.

[0127] 생체 적합성 및 세포 형태

[0128] 제작된 하이드로겔 지지체의 생체적합성은 WST-1 assay를 이용하여 피부세포(HDF, HaCaT 세포, HUVEC)를 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 본 발명자들은 하이드로겔 지지체가 있는 상태에서 개별 세포 배양을 수행한 후 공동 배양하여 개발된 하이드로겔 지지체가 피부 세포에 미치는 영향을 조사했다. 처리 1일, 3일 및 5일 후 하이드로겔 스캐폴드의 존재 하에서 HDF 생존력이 도 9a에 표시된다. 처리하지 않은 그룹을 대조군으로 간주하였다. 생체 적합성을 나타내는 하이드로겔 스캐폴드의 존재 하에서 부작용이 관찰되지 않았다. 합성 스캐폴드는 대조군 스캐폴드보다 더 큰 세포 생존력을 보여주었다. CMCS/s-NC 1 하이드로겔 지지체를 포함하는 그룹은 다른 지지체에 비해 향상된 생존력을 나타내어 개선된 생체 적합성을 나타낸다. 섬유아세포는 피부 생리학 및 피부 상처 치유에 필수적인 역할을 한다. 접착 및 구조 단백질, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸과 같은 모든 ECM 구성요소를 생산한다.

[0129] 하이드로겔 지지체의 세포독성을 HaCaT 세포를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 도 9b에 나타내었다. 스캐폴드 처리가 없는 배지를 대조군으로 사용했다. 하이드로겔 지지체는 HaCaT 세포에 독성 영향을 미치지 않아 생체 적합성을 나타낸다. 복합 지지체는 순수 고분자 지지체 및 대조군보다 더 높은 세포 생존력을 나타냈다. 복합 스캐폴드의 향상된 생체적합성은 개방형 형태학적 구조와 생체활성 잠재력에 기인한다. HaCaT 세포는 이물질에 대한 장벽 역할을 하여 신체의 수분과 열 손실을 줄인다.

[0130] 하이드로겔 지지체의 생체 적합성은 다른 시간 간격 후에 HUVEC로 모니터링되었으며 그 결과는 도 9c에 나와 있다. 처리하지 않은 그룹을 대조군으로 간주하였다. 스캐폴드 처리군에서는 세포독성이 관찰되지 않았으며 이는 생체 적합성을 나타낸다. 순수한 고분자 지지체 및 대조군 지지체보다 복합 지지체에서 더 높은 세포 생존력이 관찰되었으며, 이는 개선된 생체 적합성을 시사한다. HUVEC는 혈관 신생 및 혈관 형성에 중요한 역할을 한다. 새로 생성된 조직은 생존을 위해 활성 혈관 네트워크가 필요하다.

[0131] 또한 HDF, HaCaT 세포 및 HUVEC를 개발된 스캐폴드와 공동 배양하여 피부 재생 모델을 생성했으며 결과가 도 9d에 나와 있다. 개발된 스캐폴드가 CMCS/s-NC 4를 제외한 모든 처리군에서 피부 세포 증식을 촉진한다는 사실을 확인하는 것이 흥미로웠다. NC 1 처리된 배지는 1% s-NC 함량이 개선된 세포 활성에 최적임을 나타낸다. 개발된 하이드로겔 지지체의 향상된 세포 활성은 유리한 지형 구조, 접착성 및 향상된 생체 활성으로 인한 것이다. 피부 세포(펩티드층 함유)는 지지체 표면과 강하게 상호작용하며, 개방된 구조는 기체 및 영양 교환을 용이하게 한다. 그러나 CMCS/s-NC 4 처리군에서 다른 처리군과 비교하여 피부 세포 생존율의 감소가 발생했다. 이것은 나노 입자의 더 높은 농도, 특성 및 모양 때문일 수 있다.

[0132] 공배양된 세포의 형태는 처리 3일 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였으며, 그 이미지를 도 9e에 나타내었다. 본 발명자들은 더 나은 세포 및 생체 활성 잠재력 때문에 치료 그룹을 위해 CMCS/s-NC 1 스캐폴드를 선택했다. 스캐폴드가 없는 배지를 대조군으로 사용했다. 세포는 건강했고 스캐폴드 위에 퍼졌다. 세포 밀도는 대조군보다 스캐폴드 처리군에서 더 높았으며, 이는 세포 생존율에서 관찰된 바와 같이 우수한 생체적합성을 확인시켜주었다.

[0134] mRNA 및 단백질 마커의 발현

[0135] HDF에서 HDF 관련 유전자 마커(fibronectin 및 collagen 1A)의 발현은 처리 7일 및 14일 후 q-PCR 기법으로 평가하였고 그 결과를 도 10a에 나타내었다. 스캐폴드 처리가 되지 않은 그룹은 대조군이 되었다. 더 높은 피브로넥틴과 콜라겐 1A의 발현이 스캐폴드 처리된 군에서 7일 처리 후 대조군에 비하여 관찰되었으며, 이는 14일 배양 후에 더욱 증가하여 HDF 관련 유전자 마커에 대한 가속 효과를 보여주었다. 이것은 순수한 폴리머 스캐폴드에 비해 CMCS/s-NC1 스캐폴드에서 더 높았다. CMCS/s-NC1에서 HDF 관련 유전자 마커의 더 나은 발현은 더 나은 세포 활성과 유리한 지형 구조에 기인한다. 피브로넥틴은 세포외 기질(ECM)의 중요한 구성 성분으로 간주되며

기질과의 세포 접착에 필요하다. 세포골격 변형, 세포 이동 및 분화에 중요한 역할을 한다. 또한 배아 발생과 상처 치유를 가속화한다. 콜라겐은 ECM의 주요 섬유질 당단백질이며 ECM 조립, ECM-세포 상호작용, 세포 이동 및 분화를 촉진한다.

[0136] HaCaT에서 서로 다른 각질형성세포 관련 유전자 마커(KRT1, KRT5, KRT10, KRT15)의 발현도 조사하였고, 그 결과를 도 10b에 나타내었다. 스캐폴드 처리가 없는 미디어가 대조군으로 사용된다. 스캐폴드에서 대조군에 비해 케라티노사이트 관련 유전자 마커의 더 높은 발현이 발생하여 케라티노사이트 생성 효율을 보여주었다. KRT1/10은 초기 유전자 마커로 간주되며 처리 7일 후에 발현이 증가하고 배양 14일 후에 감소했다. KRT5/KRT15는 중요한 각질형성세포 유전자 마커이며, 이들의 발현은 분화 후기 단계에서 발생한다. 케라티노사이트 관련 유전자 메이커의 더 나은 발현은 개발된 스캐폴드가 상처 회복에 중요한 역할을 하는 케라티노사이트 형성을 가속화할 수 있음을 보여주었다. 치료 7일 및 14일 후에 HUVEC 관련 유전자 마커(VEGF, VE-CAD 및 CD31)를 추가로 조사하고 그 결과를 도 10c에 나타내었다. 스캐폴드가 없는 그룹을 대조군으로 간주했다. HUVEC 관련 유전자 마커의 더 큰 발현은 대조군보다 스캐폴드 처리군에서 발생했으며, 이는 스캐폴드의 혈관신생 가능성을 시사하며, 이는 인큐베이션 14일 후에 더욱 향상되었다. CMCS/s-NC 1 처리 그룹은 개선된 세포 활성으로 인해 CMCS 스캐폴드보다 향상된 발현을 입증했다. VEGF, VE-CAD 및 CD31은 혈관 신생, 유지 및 혈관 구조 구성에서 중요한 역할을 한다. 이 결과는 개발된 스캐폴드가 효율성을 가지며 혈관 신생을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0137] 본 발명자들은 배양 14일 후 형광 현미경을 사용하여 HDF, HaCaT 및 HUVEC에서 fibronectin, basic cytokeratin 및 PECAM-1 단백질의 발현을 추가로 조사했으며 그 결과를 도 10d에 제시했다. 어떠한 처리도 하지 않은 그룹을 대조군으로 간주하였다. 스캐폴드 처리군은 대조군보다 상기 단백질의 더 큰 강도를 발현하였으며, 이는 발달된 스캐폴드가 피부 세포 기능을 긍정적으로 유발함을 시사한다. 피브로넥틴 단백질의 발현은 HDF의 세포골격 전체에서 발생하는 반면, 사이토케라틴 및 PECAM-1은 핵 부근에서 더 많이 발현된다.

[0139] 하이드로겔의 항균력

[0140] 개발된 하이드로겔의 항균력은 Bacillus subtilis 처리 24시간 후 집락 계수법을 사용하여 조사하였으며, 이미지는 도 11a와 같다. 하이드로겔 처리를 하지 않은 그룹을 대조군으로 사용하였다. 대조군과 비교하여 하이드로겔 처리군에서 박테리아 콜로니의 현저한 감소가 관찰되어 항균력을 나타냈고, 복합 하이드로겔 처리 플레이트에서는 콜로니가 관찰되지 않아 향상된 항균력을 나타냈다. 개발된 하이드로겔의 항균 가능성은 박테리아 세포막과 정전기적으로 상호작용하여 손상시키는 양전하 작용기의 존재에 기인한다. 복합 하이드로겔의 개선된 항균 가능성은 s-NC로 양전하를 띤 폴리머 사슬을 감싸고 박테리아에 더 많이 노출되어 더 심각한 정전기 상호작용과 결과적으로 박테리아 사멸을 초래하기 때문일 수 있다.

[0141] 이러한 발견은 시간 간격을 두고 배양된 세균 용액의 광학 밀도를 측정함으로써 더욱 확인되었으며, 그 결과를 도 11b에 나타내었다. 처리하지 않은 그룹을 대조군으로 간주하였다. 처리 6시간 후 대조군에 비해 하이드로겔 처리군에서 OD 값의 유의한 감소가 관찰되어 항균력을 나타내었으며 배양 시간(24시간 및 48시간)에 따라 추가로 감소하여 항균력이 개선되었음을 시사한다. 하이드로겔. 복합 하이드로겔은 순수 폴리머 하이드로겔보다 실질적으로 더 낮은 OD 값을 가지며, 이는 집락 계수 방법의 결과와 일치하는 향상된 항균 가능성을 나타낸다.

[0143] 생체 내(in vivo) 상처 치유 분석

[0144] 상처 치유는 지혈, 염증, 이동, 증식 및 리모델링을 포함한 다양한 단계를 포함하는 복잡한 생물학적 과정이다. 우리는 시험관 내 분석을 기반으로 ICR 쥐를 사용하여 개발된 하이드로겔 지지체의 피하 상처 치유 가능성을 평가했다. 이식을 위해 원하는 영역이 있는 사용된 쥐의 대표적인 이미지가 도 12a에 나와 있다. 상처 치유 과정을 위해 1cm 구형 영역을 만든다.

[0145] 스캐폴드가 이식된 상처 부위의 대표적인 이미지가 도 12b에 나와 있다. 생리적 변화, 실험 동물의 수와 같은 다른 요인의 영향을 최소화하기 위해 각 그룹에 두 개의 상처 부위를 가진 두 마리의 쥐를 사용했다.

[0146] 처리 7일 및 14일 후 사용된 쥐의 이미지가 도 12c에 나와 있다. 하이드로겔 지지체를 이식한 그룹은 치료 7일 후 대조군보다 더 많은 상처 폐쇄 잠재력을 나타냈으며, 이는 치료 14일 후에 더욱 강화되어 상처 치유 효능을 입증했다. 그 중 CSCM/s-NC 1 하이드로겔 지지체 처리된 쥐는 다른 쥐에 비해 더 큰 상처 폐쇄 가능성을 나타냈다. CSCM/s-NC 1 하이드로겔 스캐폴드의 개선된 피부 재생 효능은 체외 결과에서 관찰된 바와 같이 피부 세포 증식을 촉진하고 유전자 및 단백질 발현을 향상시킨 더 나은 세포 활성에 기인한다.

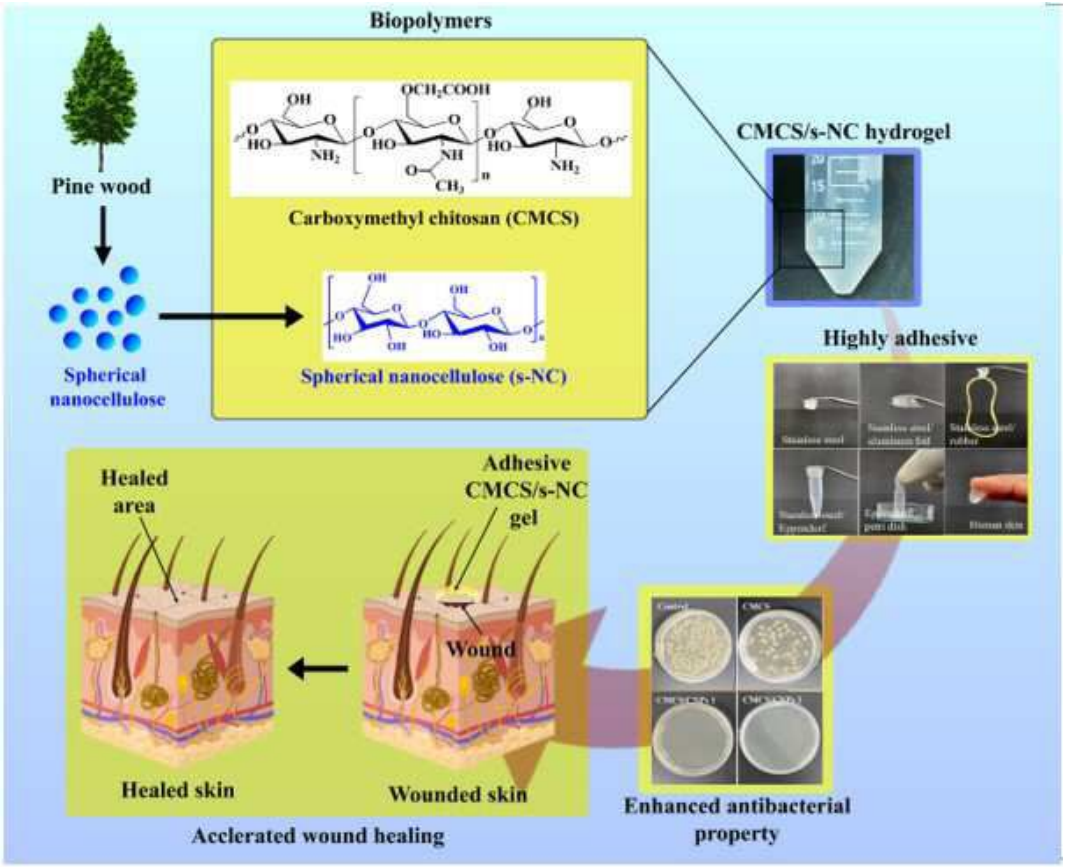
[0147] 치료 7일 및 14일 후 남은 상처 부위의 정량적 결과를 도 12d에 나타내었다. 결과는 CSCM/s-NC 1 하이드로겔 스캐폴드가 다른 것보다 더 나은 상처 봉합 효능을 갖는다는 것을 나타낸다. 나머지 상처 면적은 이식 14일 후 대

조군, CMCS 및 CMCS/s-NC 1 지지체에 대해 각각 0.05 ± 0.003, 0.03 ± 0.001 및 0.02 ± 0.001 mm^2였다. 이식 14일 후 CSCM/s-NC 1 하이드로겔 스캐폴드로 거의 완전한 상처 치유가 관찰되었으며 상처 표면은 새로 생성된 표피로 덮여 있었다.

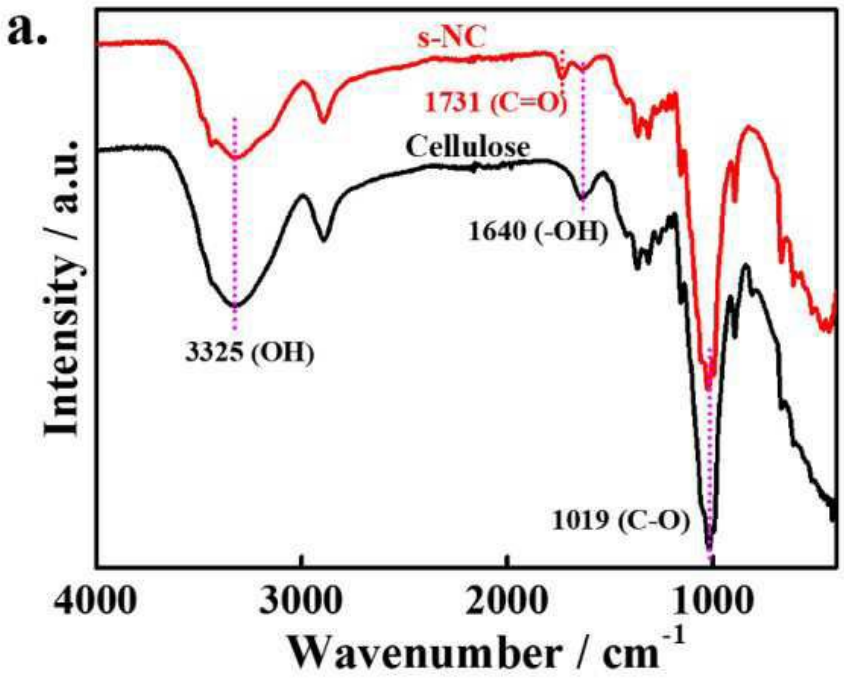
[0148] Hematoxylin and Eosin(H&E) 분석은 14일의 치료 후 스캐폴드가 있거나 없는 새로 재생된 조직을 조사하기 위해 수행되었으며, 그 결과를 도 12e에 나타내었다. 혈관과 모낭을 포함하는 피부층의 형성은 모든 군에서 발생하였지만, 그 밀도는 대조군보다 지지체 처리군에서 더 높았다. 이것은 CSCM/s-NC 1 하이드로겔 스캐폴드 처리 그룹에서 상당히 높았으며, 개선된 재생 가능성을 보여준다. CSCM/s-NC 1 하이드로겔 스캐폴드의 더 높은 재생 능력은 혈관신생에서 중요한 역할을 하는 VEGF를 비롯한 다양한 인자의 더 큰 발현에 할당된다. VEGF의 향상된 발현은 새로운 혈관의 형성을 촉발하고 재상피화 및 콜라겐 합성을 돕는다. 섬유아세포에는 풍부한 육아 조직과 성장 인자가 있다. 육아 조직의 두께를 관찰하여 상처 치유 과정을 모니터링할 수 있다. 육아 조직의 두께는 대조군, CMCS 및 CMCS/s-NC 1 지지체에 대해 각각 83.91, 171.31 및 225.5 μm였다. 따라서, CMCS/s-NC 1 스캐폴드는 대조군보다 개선된 상처 치유 효능을 나타내었고, CMCS 스캐폴드는 육아 조직의 두께를 지지함으로써 개선된 상처 치유 효능을 나타냈다. 또한 치료 14일 후 Masson trichrome 염색법으로 콜라겐 침착을 조사하였다. 콜라겐 침착은 모든 그룹에서 발생했다. 그러나, 그 밀도는 스캐폴드 처리군에서 높았고, 이는 CMCS/s-NC 1 스캐폴드 처리군에서 유의하게 더 높아 재생 가능성이 더 우수함을 시사한다. 빠르고 효과적인 상처 치유 과정은 치료 비용과 상처 치료 보조제를 상당히 낮출 것이다. 이러한 결과는 개발된 재료의 적용이 빠른 피부 상처 치유로 이어짐을 보여주었다.

도면

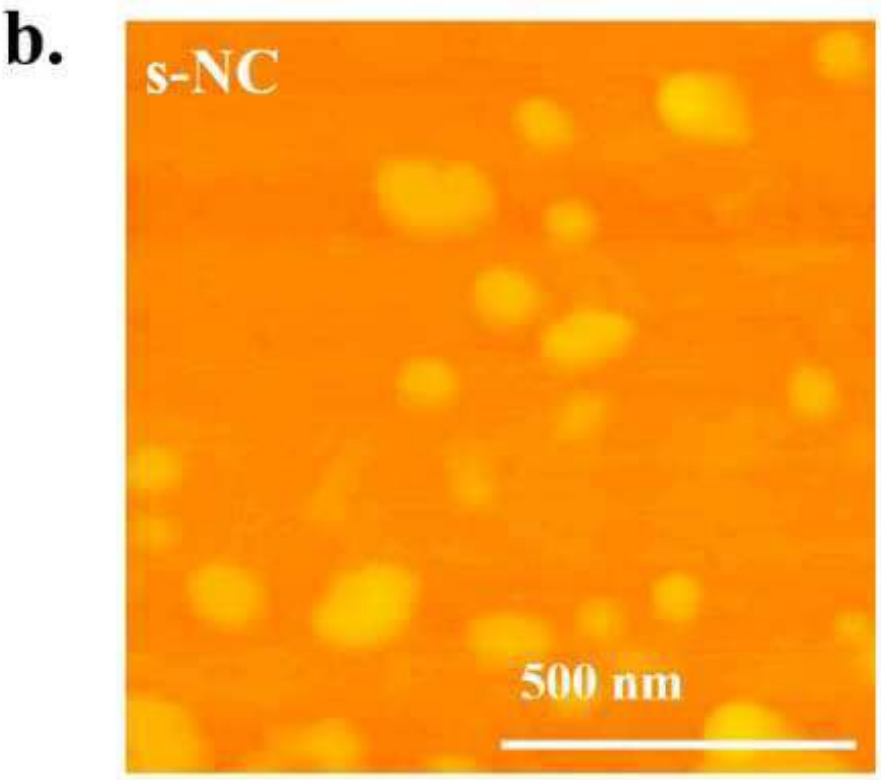
도면1



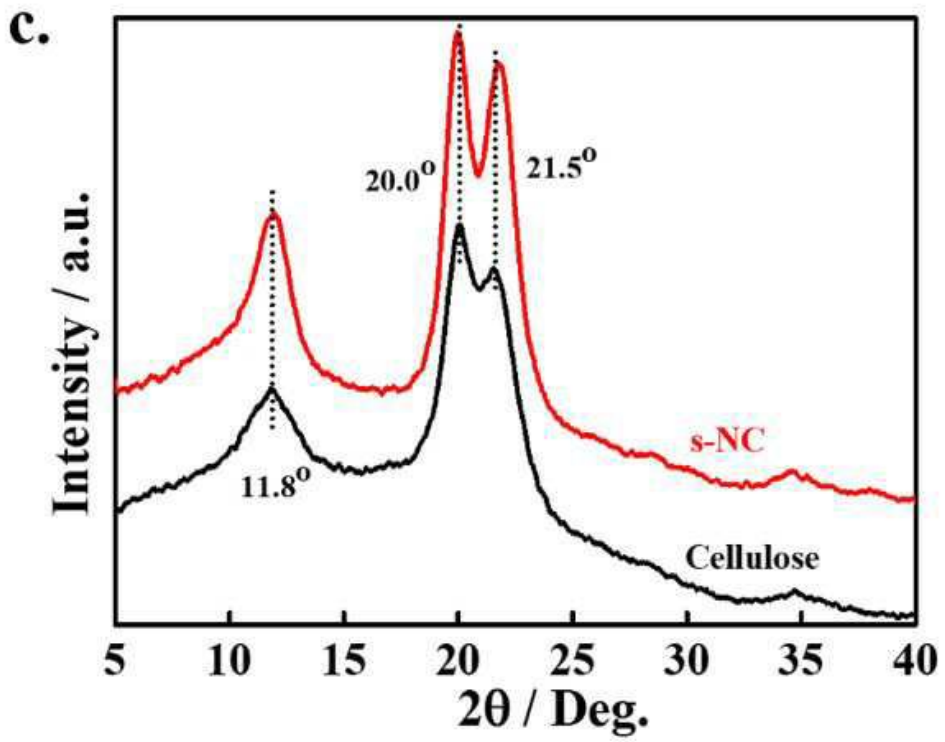
도면2a


a.
s-NC
1731 (C=O)
Cellulose
1640 (-OH)
3325 (OH)
1019 (C-O)
Intensity / a.u.
4000
3000
2000
1000
Wavenumber / cm-1

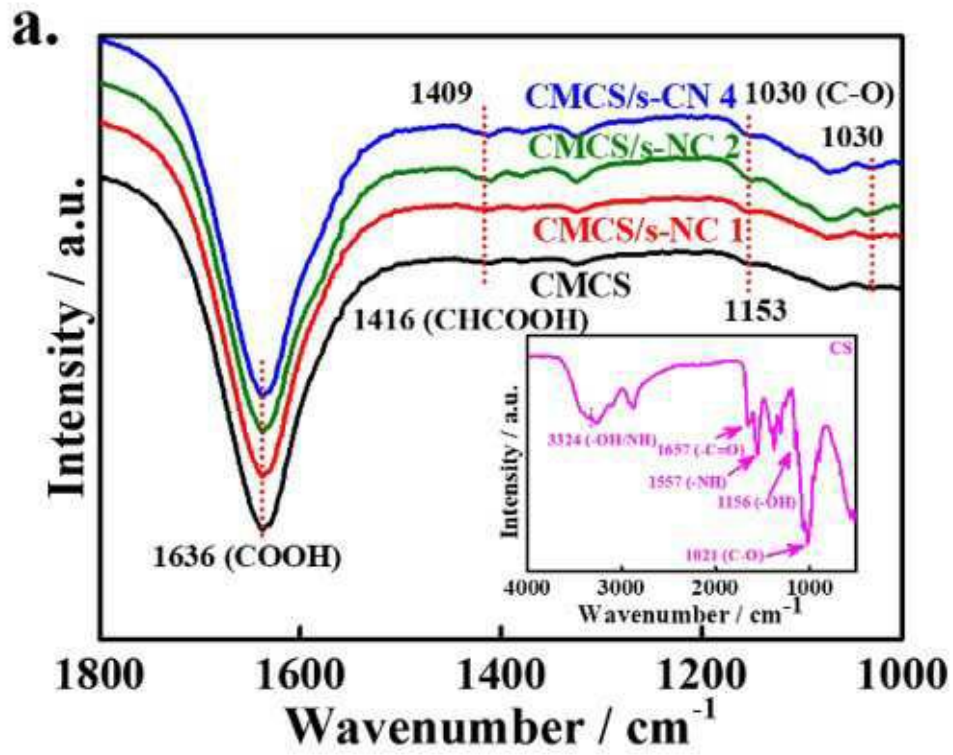
도면2b


b.
s-NC
500 nm

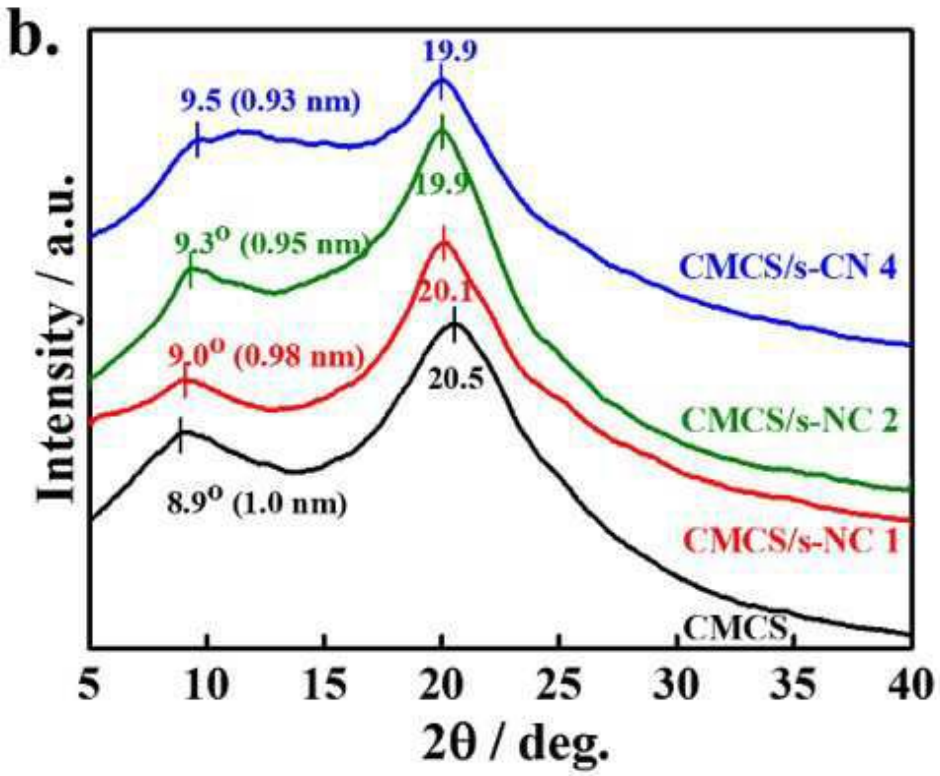
도면2c


c.
Intensity / a.u.
20.0°
21.5°
11.8°
s-NC
Cellulose
5
10
15
20
25
30
35
40
2θ / Deg.

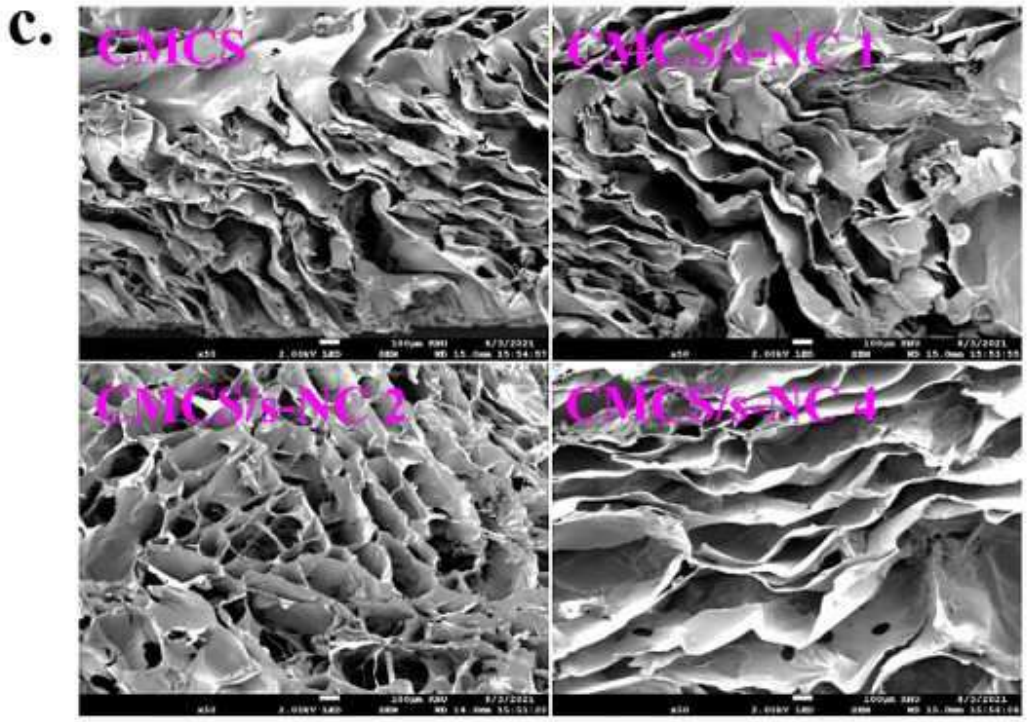
도면3a


a.
Intensity / a.u.
1409
CMCS/s-CN 4
1030 (C-O)
CMCS/s-NC 2
1030
CMCS/s-NC 1
CMCS
1416 (CHCOOH)
1153
1636 (COOH)
CS
3324 (-OH/NH)
1657 (-C=O)
1557 (-NH)
1156 (-OH)
1021 (C-O)
Intensity / a.u.
4000
3000
2000
1000
Wavenumber / cm-1
1800
1600
1400
1200
1000
Wavenumber / cm-1

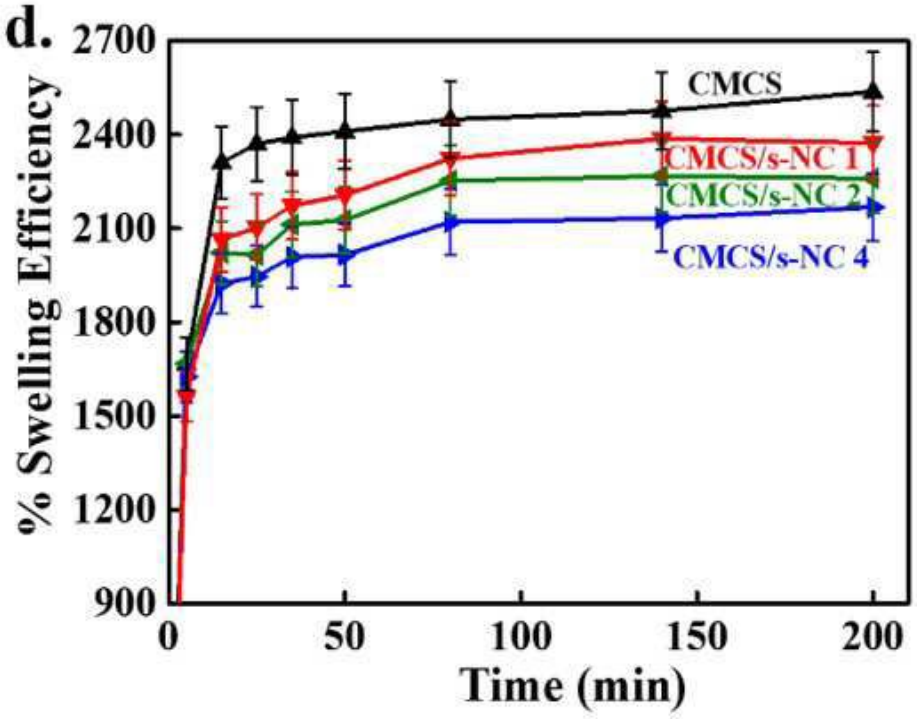
도면3b


b.
19.9
9.5 (0.93 nm)
19.9
9.3° (0.95 nm)
CMCS/s-CN 4
20.1
9.0° (0.98 nm)
20.5
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 1
8.9° (1.0 nm)
CMCS
Intensity / a.u.
5
10
15
20
25
30
35
40
2θ / deg.

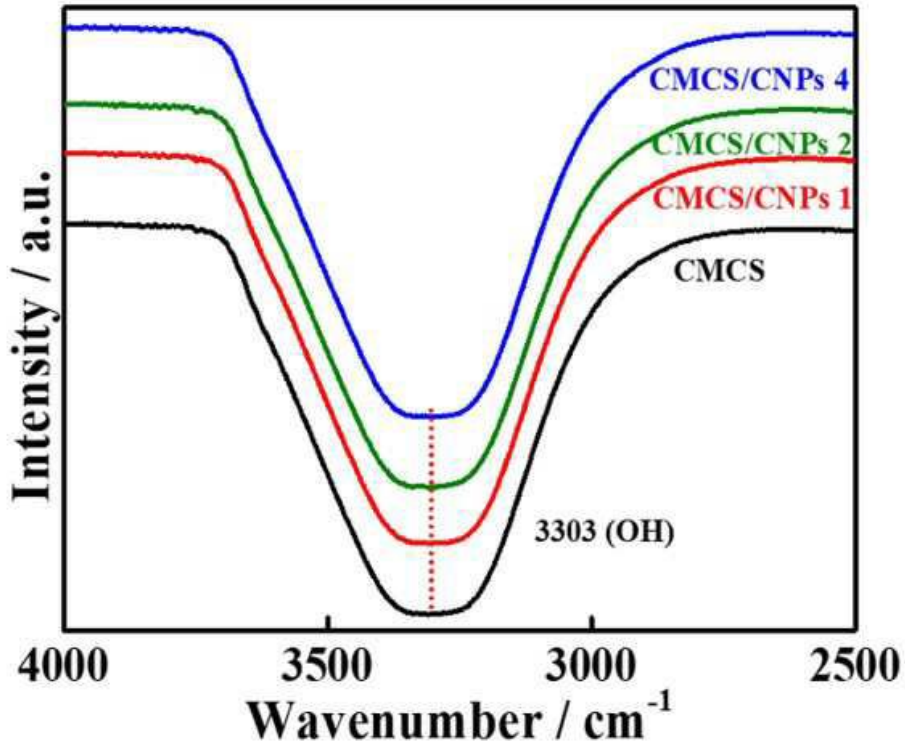
도면3c


c.
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4

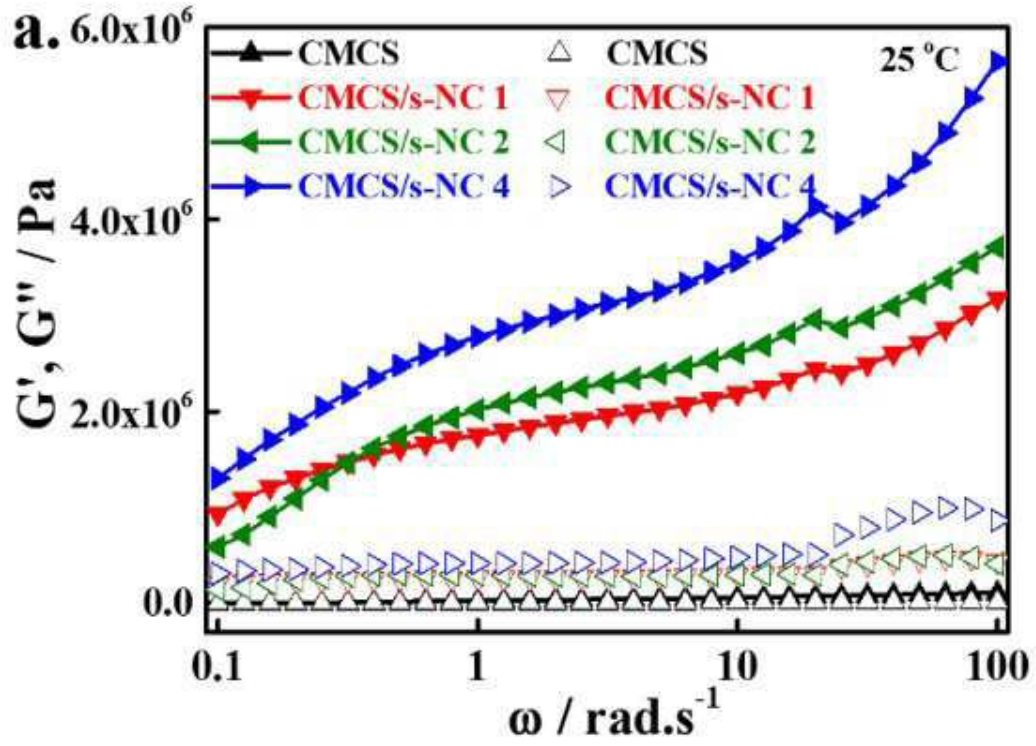
도면3d


d.
% Swelling Efficiency
2700
2400
2100
1800
1500
1200
900
0
50
100
150
200
Time (min)
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4

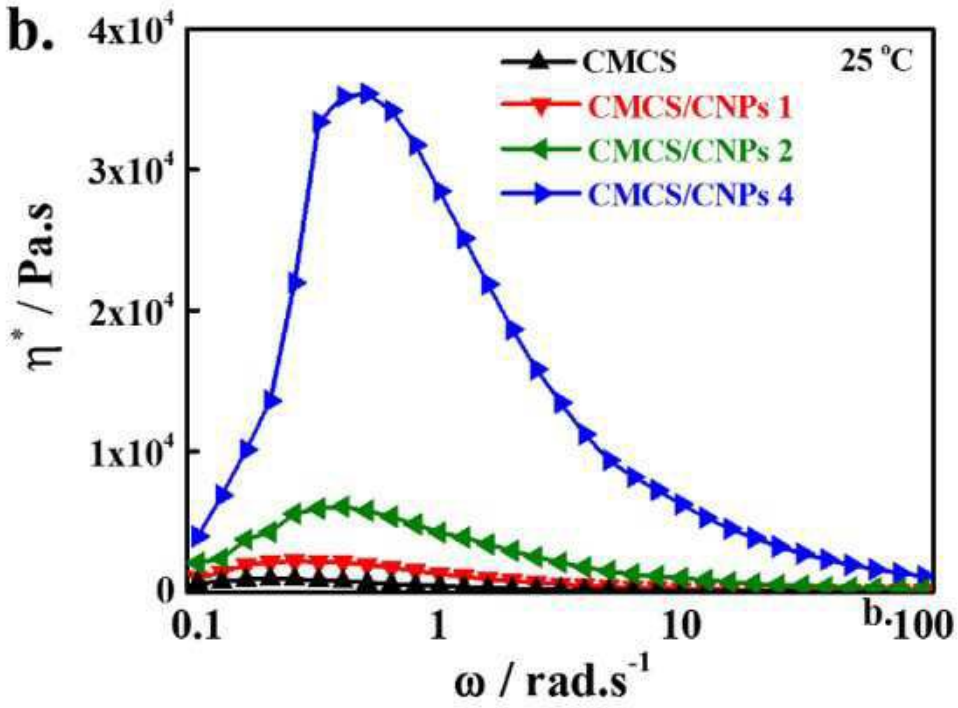
도면4


Intensity / a.u.
4000
3500
3000
2500
Wavenumber / cm-1
CMCS/CNPs 4
CMCS/CNPs 2
CMCS/CNPs 1
CMCS
3303 (OH)

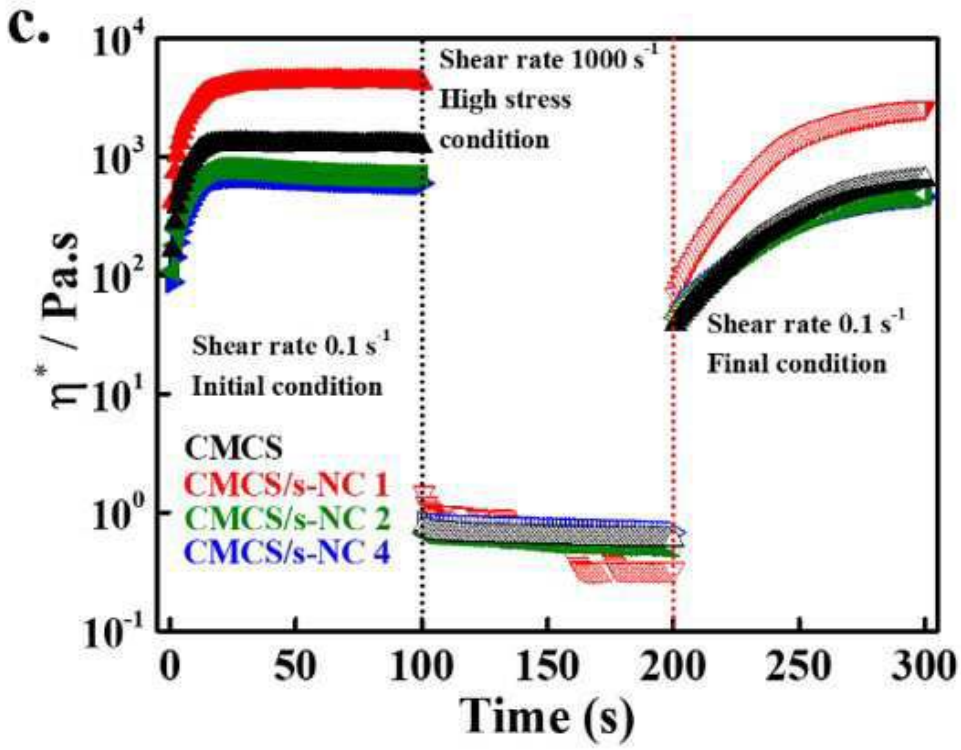
도면5a


a.
6.0x10^6
4.0x10^6
2.0x10^6
0.0
G', G'' / Pa
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
25 °C
0.1
1
10
100
ω / rad.s^-1

도면5b


b.
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
0
η* / Pa.s
CMCS
CMCS/CNPs 1
CMCS/CNPs 2
CMCS/CNPs 4
25 °C
0.1
1
10
100
ω / rad.s^-1

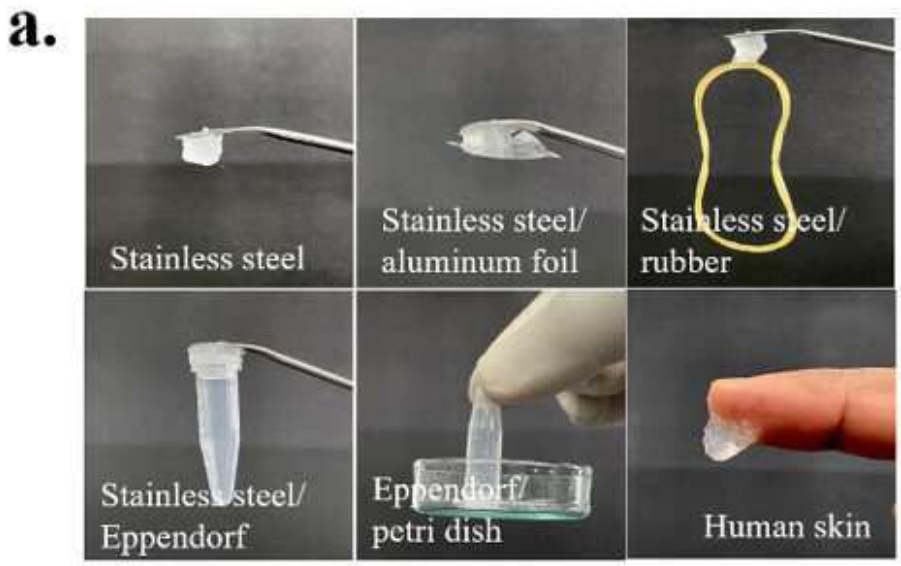
도면5c


c.
Shear rate 1000 s-1
High stress
condition
Shear rate 0.1 s-1
Initial condition
Shear rate 0.1 s-1
Final condition
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
η* / Pa.s
Time (s)

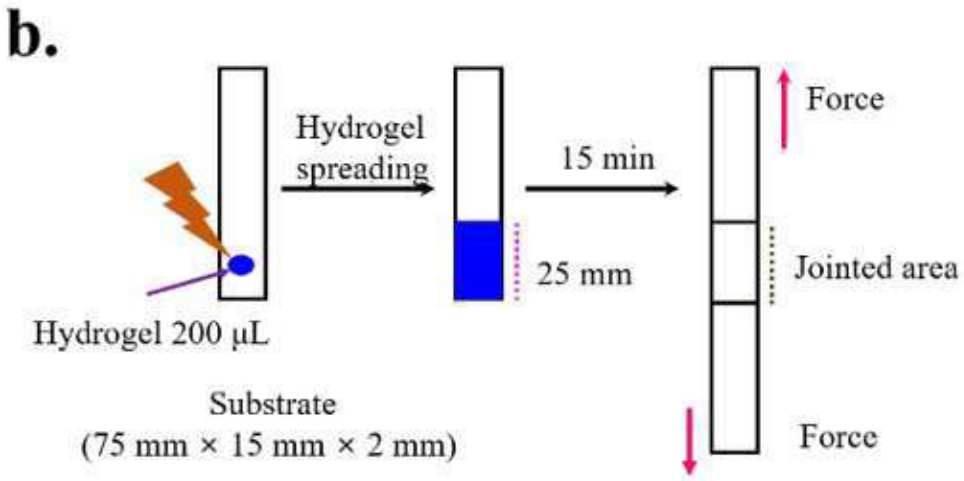
도면5d


d.

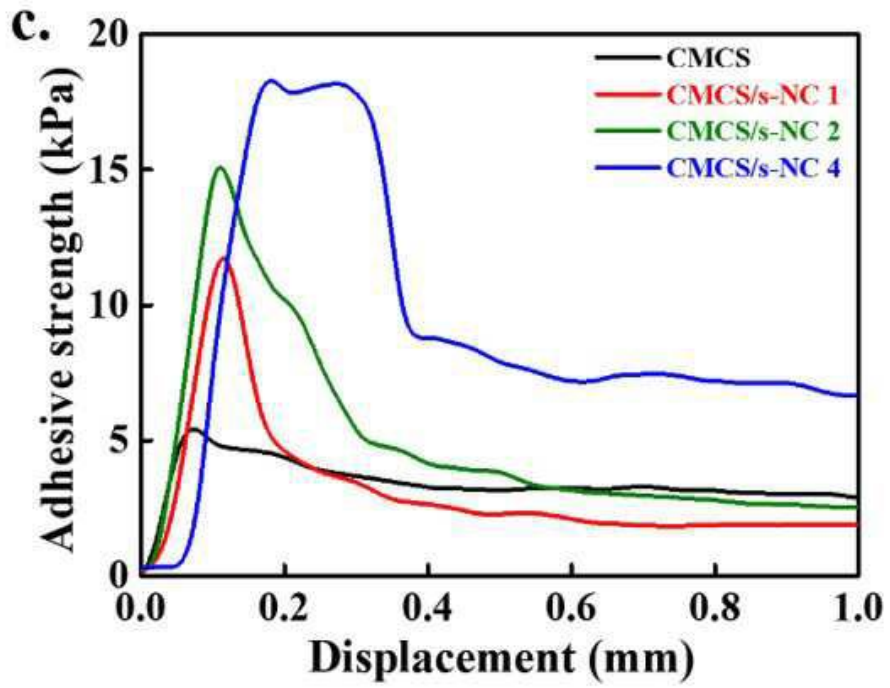
도면6a


a.
Stainless steel
Stainless steel/
aluminum foil
Stainless steel/
rubber
Stainless steel/
Eppendorf
Eppendorf/
petri dish
Human skin

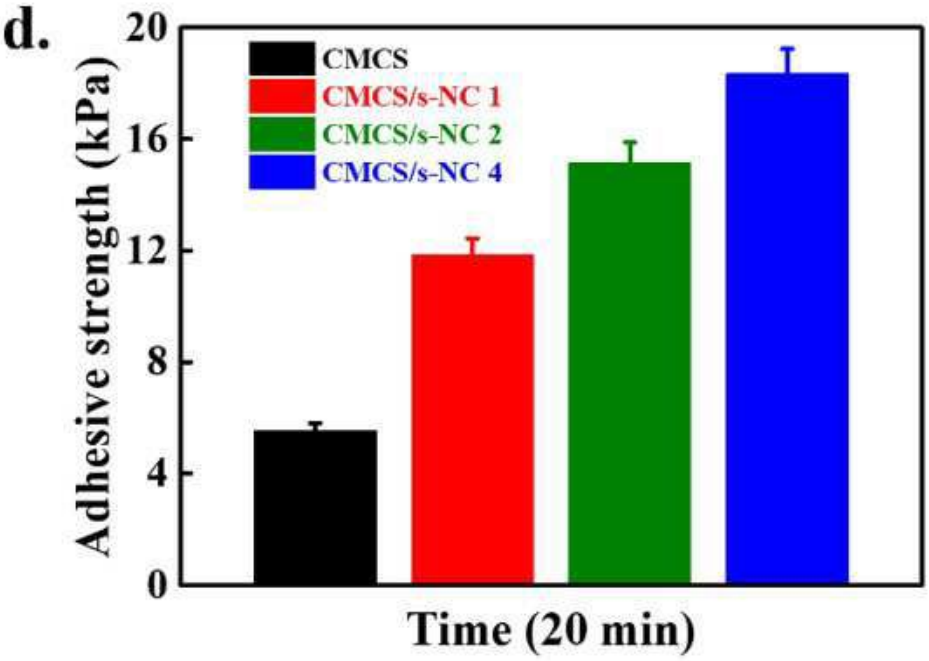
도면6b


b.
Hydrogel
spreading
15 min
Force
25 mm
Jointed area
Hydrogel 200 μL
Substrate
(75 mm × 15 mm × 2 mm)
Force

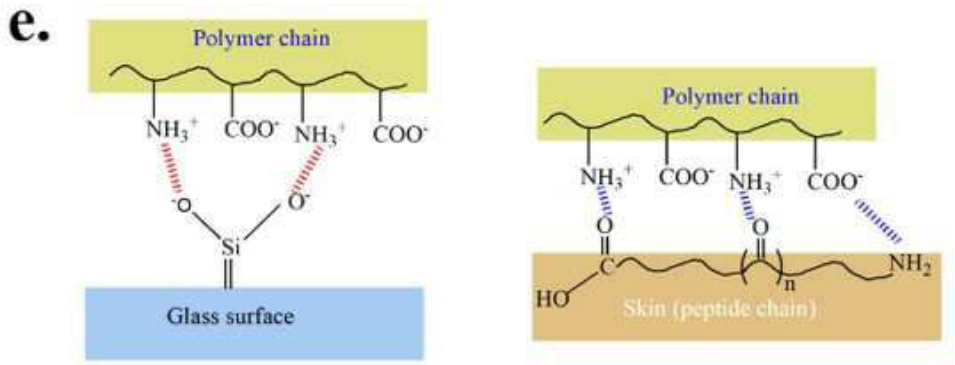
도면6c


c.
Adhesive strength (kPa)
Displacement (mm)
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
0
5
10
15
20
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

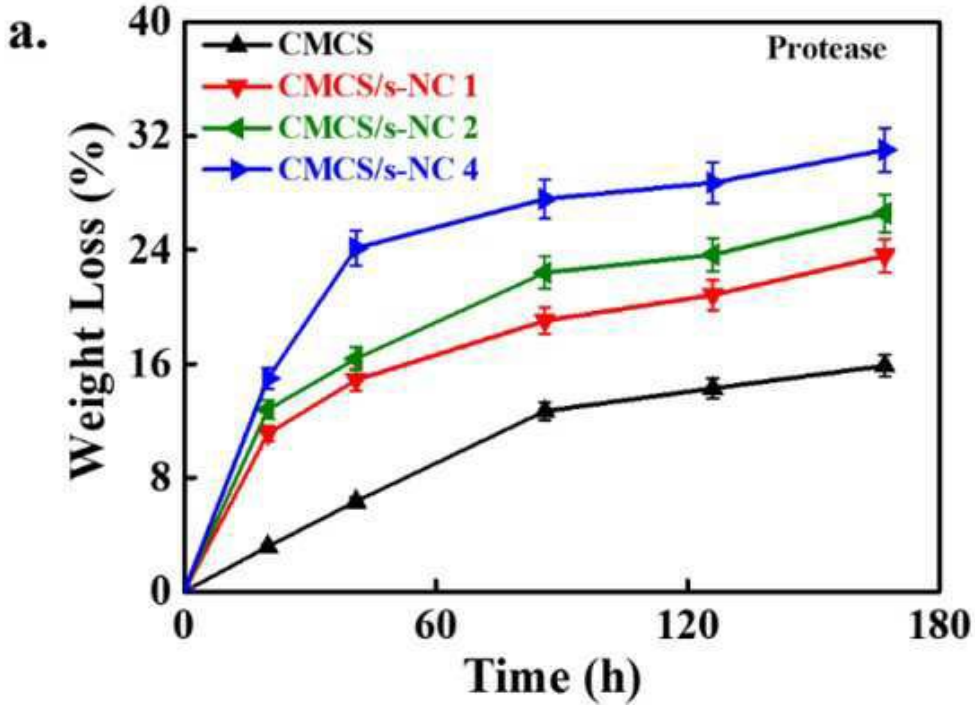
도면6d


d.
Adhesive strength (kPa)
Time (20 min)
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
0
4
8
12
16
20

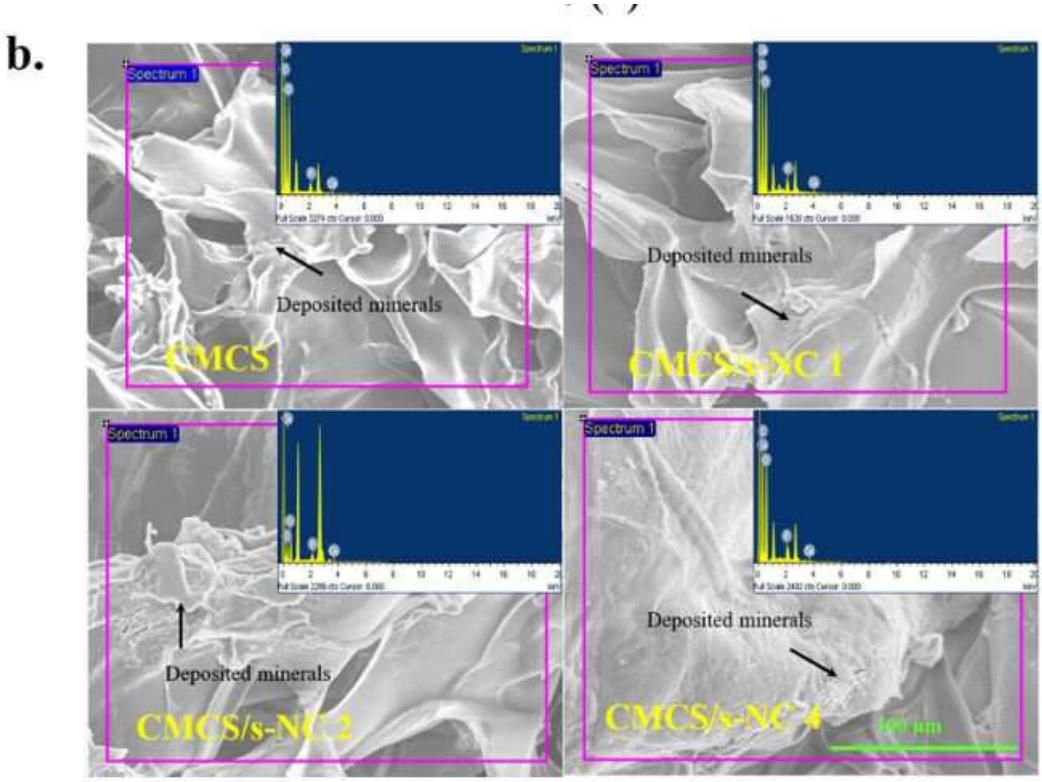
도면6e


e.
Polymer chain
NH3+
COO-
NH3+
COO-
O-
O-
Si
Glass surface
Polymer chain
NH3+
COO-
NH3+
COO-
O
O
C
n
NH2
HO
Skin (peptide chain)

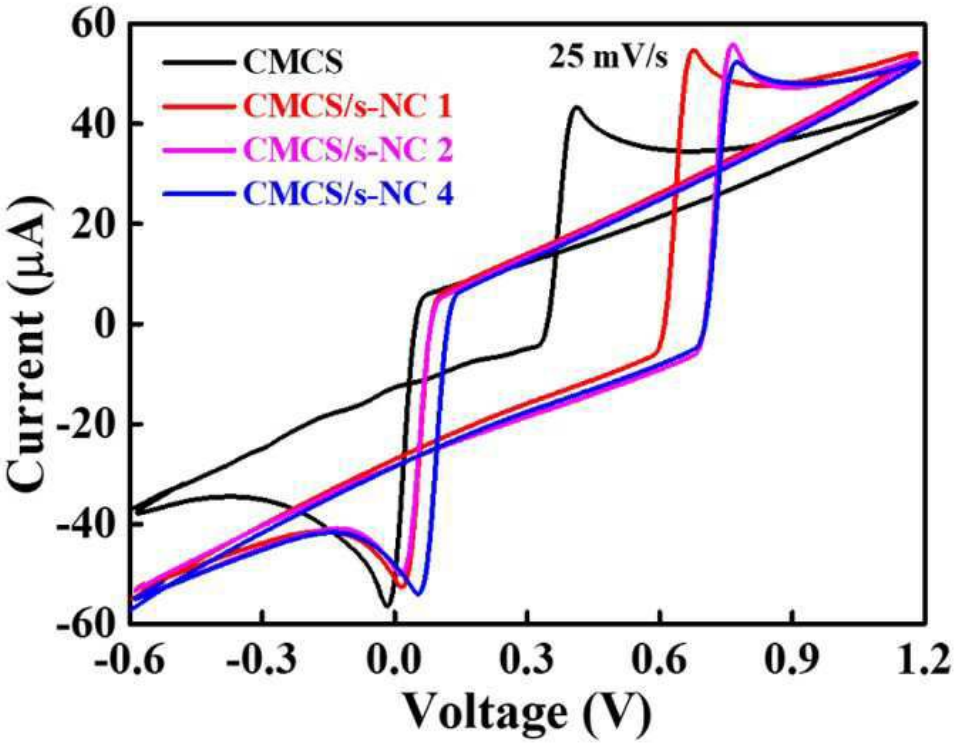
도면7a


a.
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
Protease
Weight Loss (%)
0
8
16
24
32
40
0
60
120
180
Time (h)

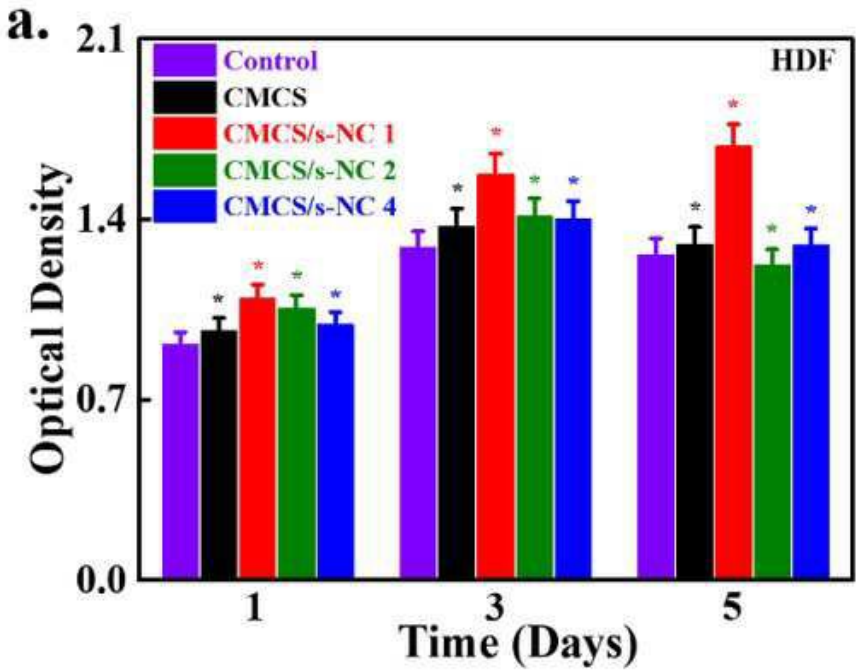
도면7b


b.
Spectrum 1
Deposited minerals
CMCS
Deposited minerals
CMCS/s-NC 1
Deposited minerals
CMCS/s-NC 2
Deposited minerals
CMCS/s-NC 4
100 nm

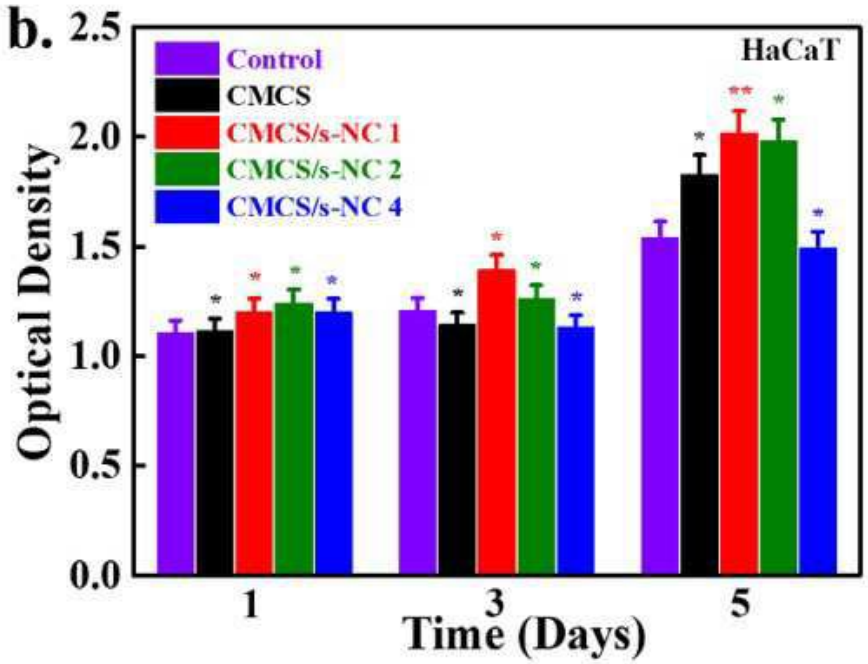
도면8


CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
25 mV/s
Current (μA)
Voltage (V)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-0.6
-0.3
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2

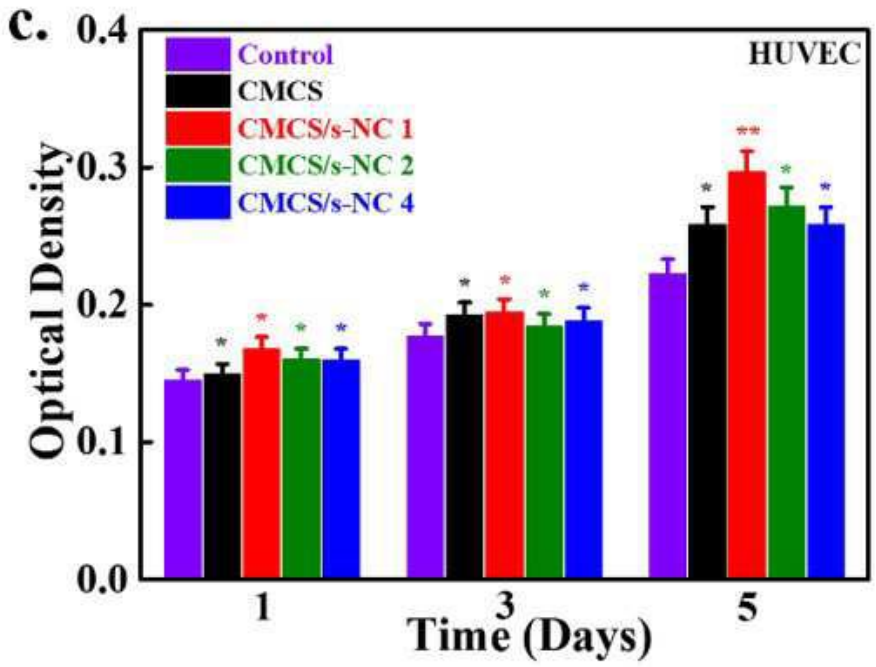
도면9a


a.
HDF
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
Optical Density
2.1
1.4
0.7
0.0
1
3
5
Time (Days)

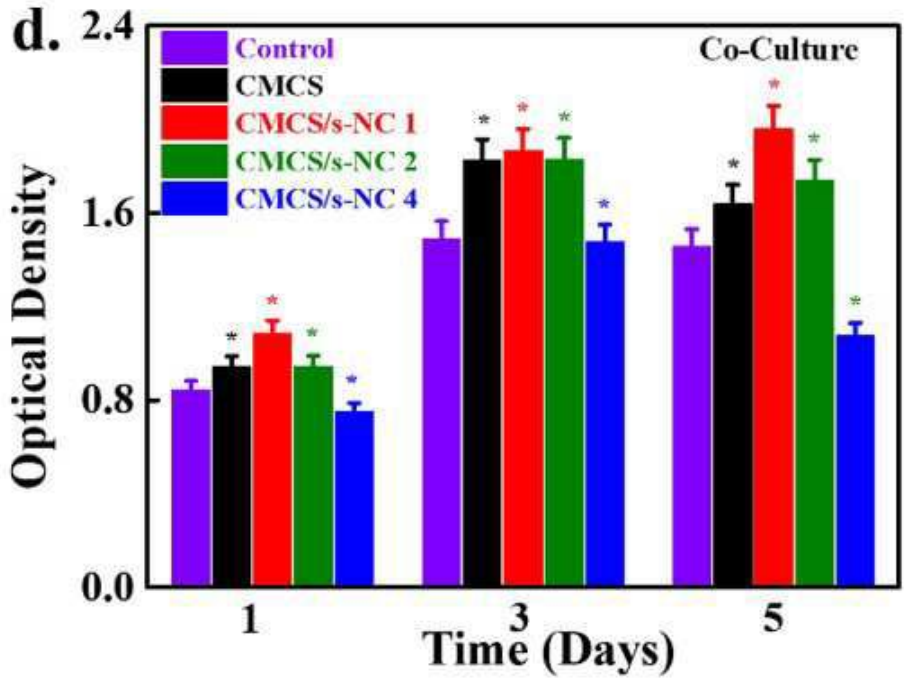
도면9b


b.
HaCaT
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
Optical Density
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
3
5
Time (Days)

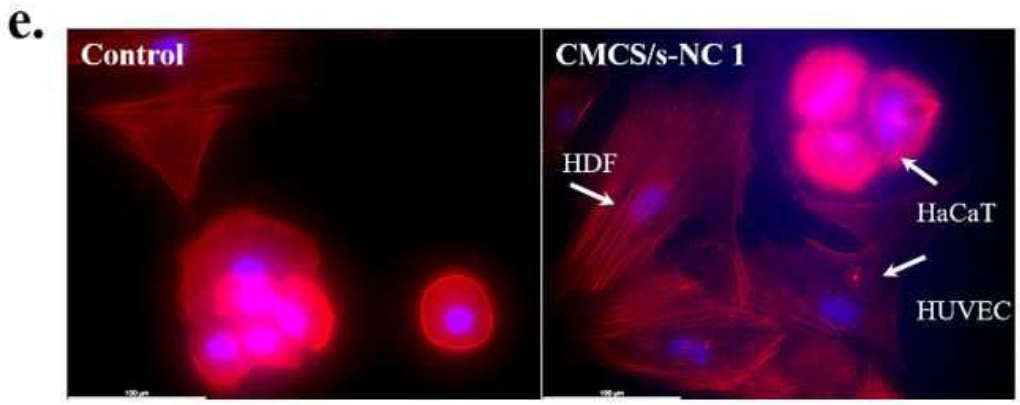
도면9c


c.
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
HUVEC
Optical Density
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
1
3
5
Time (Days)

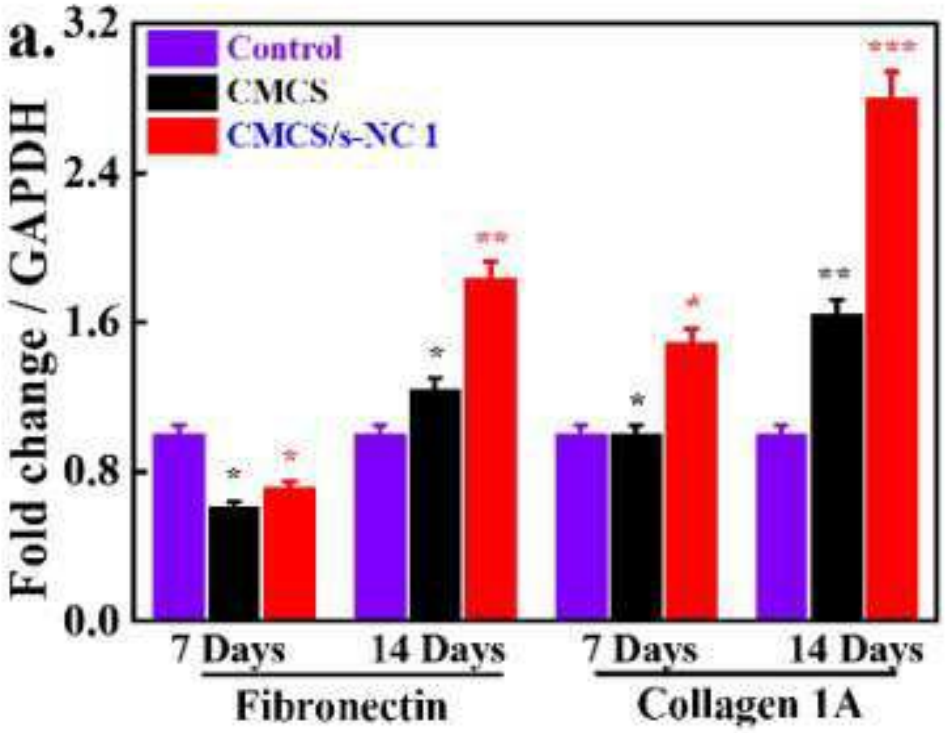
도면9d


d.
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
Co-Culture
Optical Density
0.0
0.8
1.6
2.4
1
3
5
Time (Days)

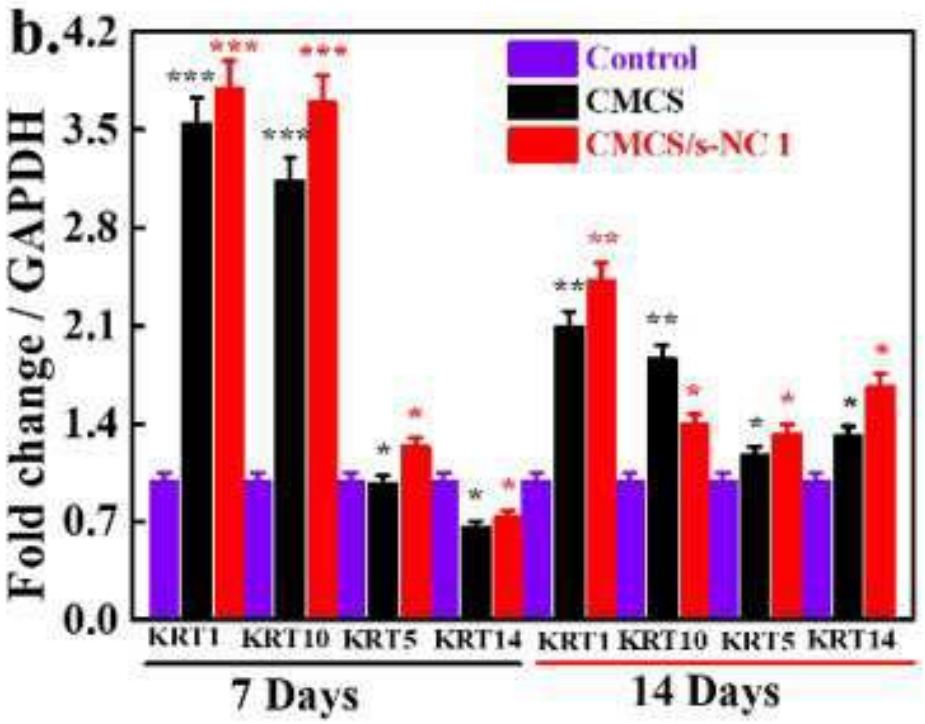
도면9e


e.
Control
CMCS/s-NC 1
HDF
HaCaT
HUVEC

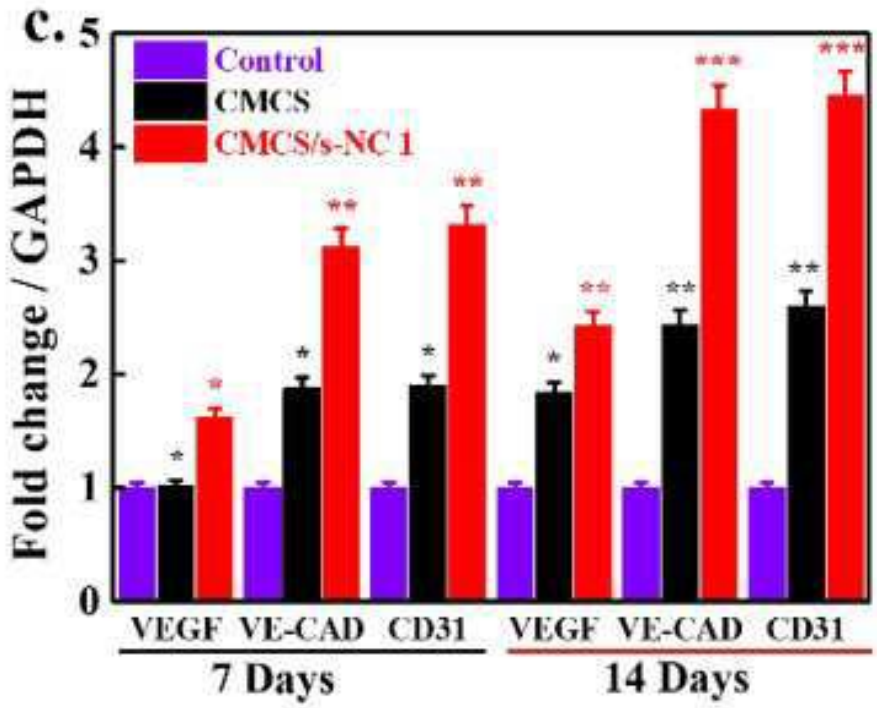
도면10a


a.
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
Fold change / GAPDH
3.2
2.4
1.6
0.8
0.0
7 Days
14 Days
7 Days
14 Days
Fibronectin
Collagen 1A

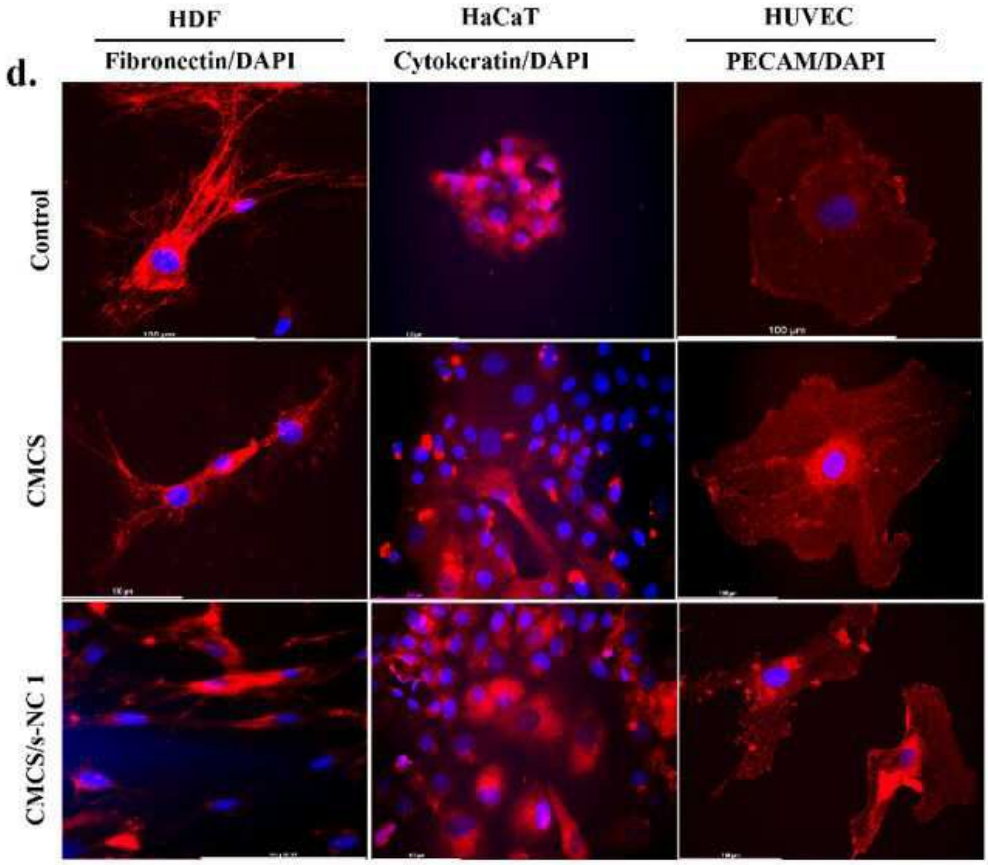
도면10b


b.
Fold change / GAPDH
4.2
3.5
2.8
2.1
1.4
0.7
0.0
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
KRT1 KRT10 KRT5 KRT14 KRT1 KRT10 KRT5 KRT14
7 Days
14 Days

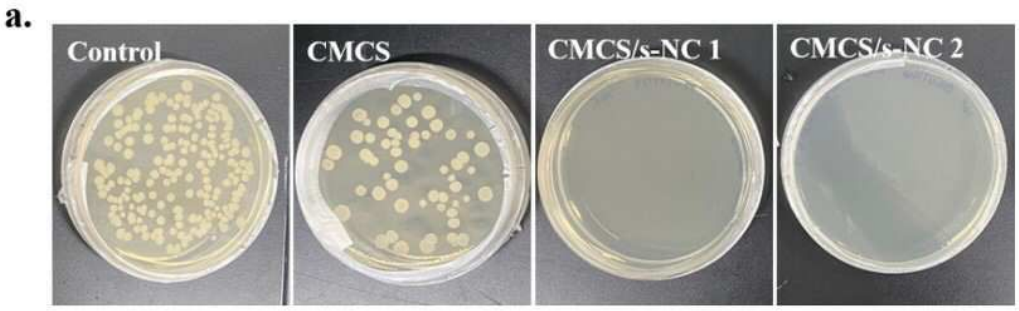
도면10c


c.
Fold change / GAPDH
5
4
3
2
1
0
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
VEGF VE-CAD CD31 VEGF VE-CAD CD31
7 Days
14 Days

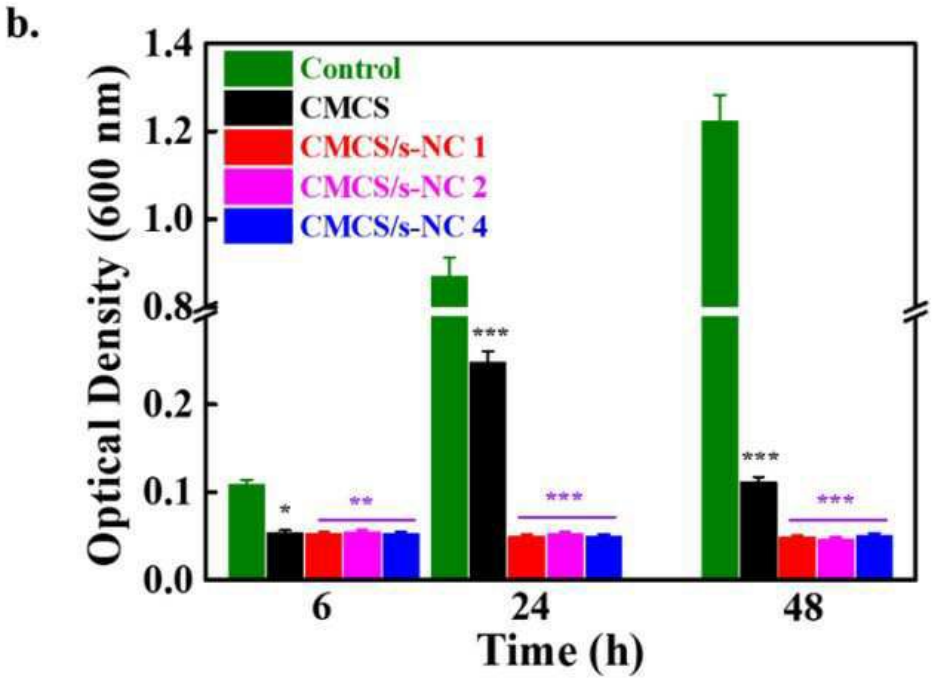
도면10d


d.
HDF
Fibronectin/DAPI
HaCaT
Cytokeratin/DAPI
HUVEC
PECAM/DAPI
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1

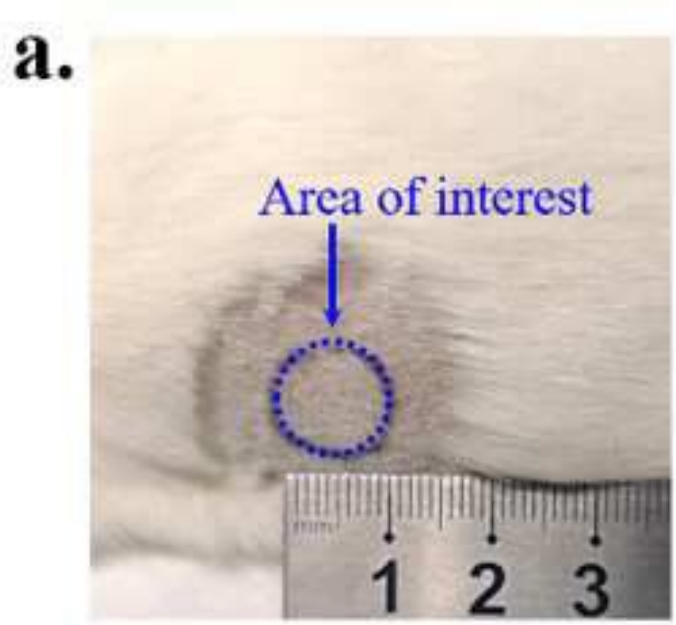
도면11a


a.
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2

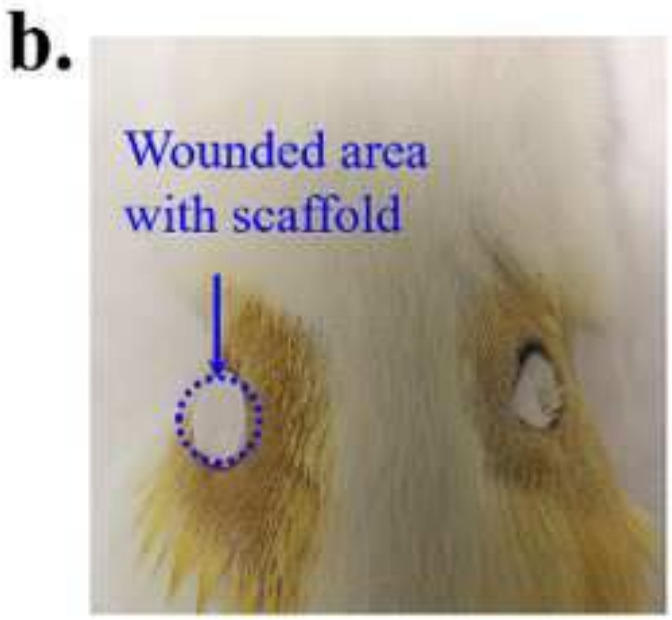
도면11b


b.
Optical Density (600 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.2
0.1
0.0
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
CMCS/s-NC 2
CMCS/s-NC 4
*
**
***
***
***
***
6
24
48
Time (h)

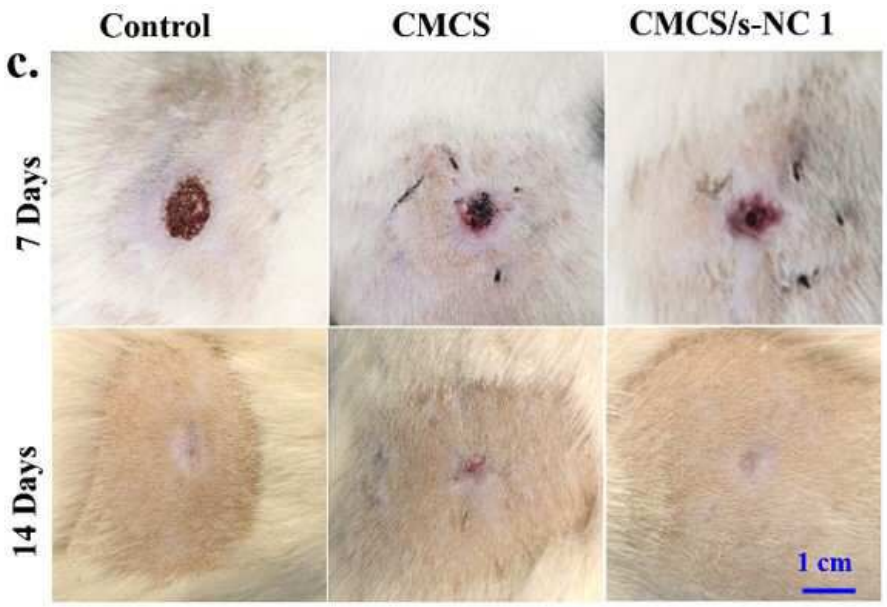
도면12a


a.
Area of interest
1
2
3

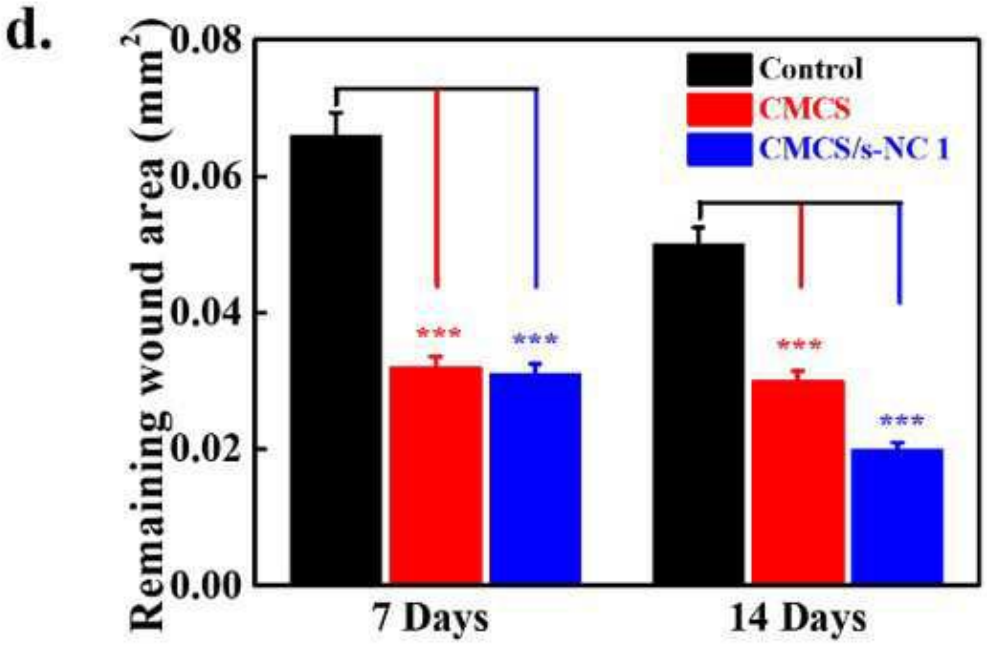
도면12b


b.
Wounded area
with scaffold

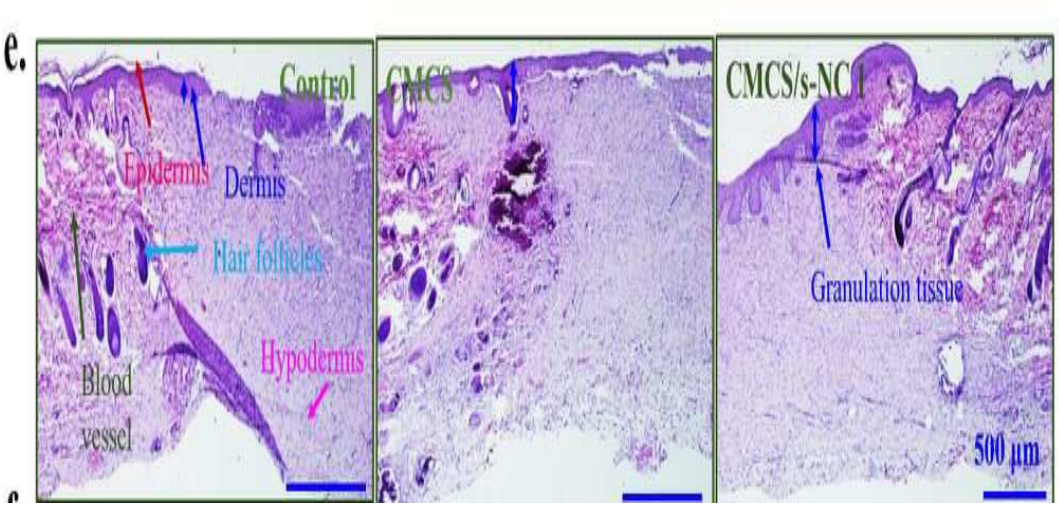
도면12c


Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
c.
7 Days
14 Days
1 cm

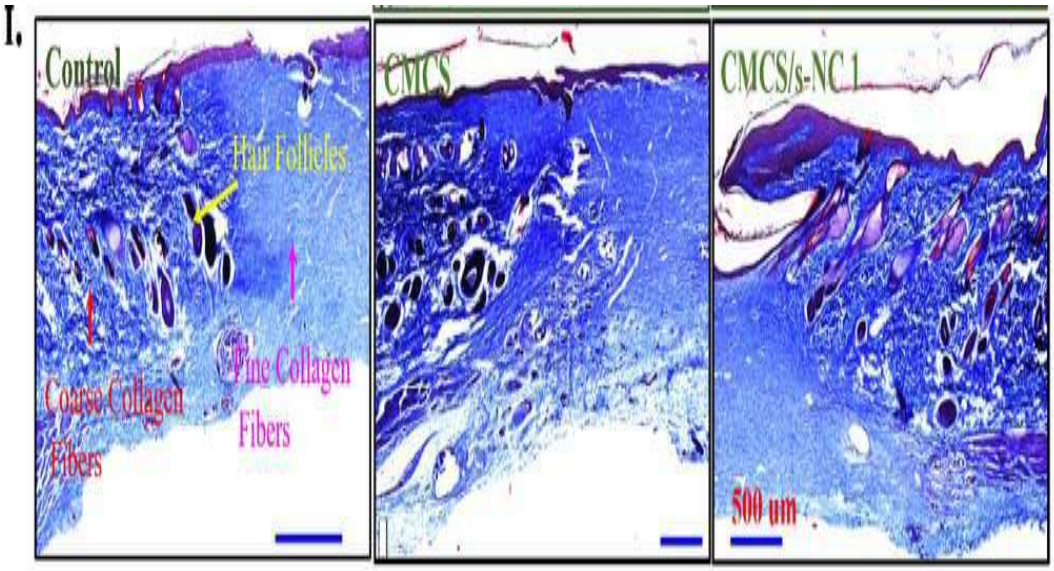
도면12d


d.
Remaining wound area (mm²)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
***
***
***
***
7 Days
14 Days

도면12e


e.
Control
CMCS
CMCS/s-NC 1
Epidermis
Dermis
Hair follicles
Hypodermis
Blood vessel
Granulation tissue
500 μm

도면12f


I,
Control
Hair Follieles
Coarse Collagen Fibers
Fine Collagen Fibers
CMCS
CMCS/s-NC 1
500 um