

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0038854

(43) 공개일자 2023년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/16 (2015.01) A61K 35/19 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/16 (2013.01)

A61K 35/19 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0121451

(22) 출원일자 2021년09월13일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

김지원

인천광역시 연수구 신송로118번길 6, 106동 1401호(송도동, 송도풍림아이원1단지아파트)

최정석

인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 207동 1401호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)

김정미

서울특별시 용산구 이촌로65가길 51, 214동 801호(이촌동, 한가람아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

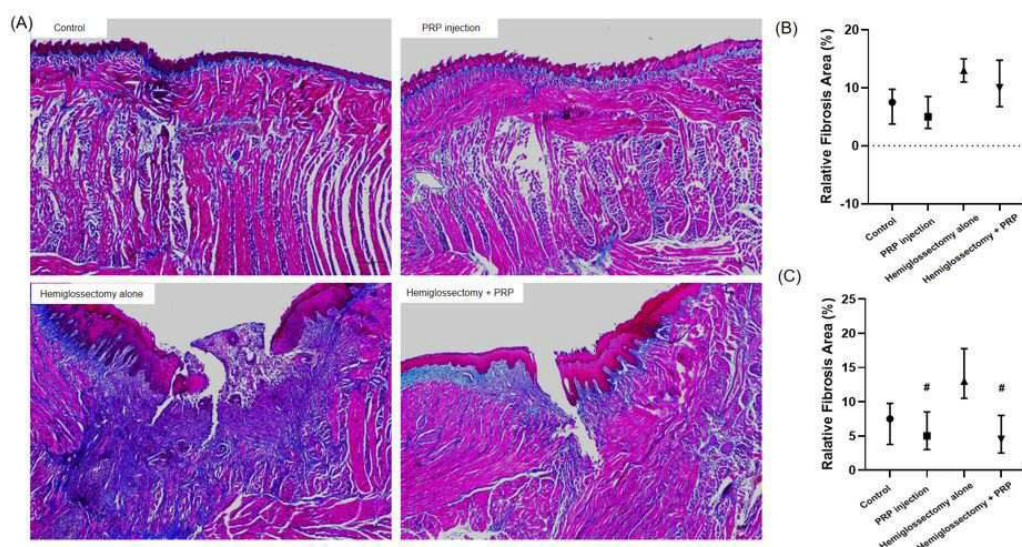
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 혈소판풍부혈장을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 조성물

(57) 요약

본 발명은 혈소판풍부혈장을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 허절반절제술로 허가 절제된 동물모델에 혈소판을 활성화시킨 혈소판풍부혈장을 주사한 실험군의 경우, 허 상처 부위가 상처 전의 허 모양으로 재생되었으며, 상처 부위의 염증 및 섬유화 감소가 확인됨에 따라, 상기 혈소판풍부혈장을 유효성분으로 함유하는 조성물은 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 17/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131211
과제번호	2019M3E5D1A02069612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명	신경재생의 정합성 향상을 위한 혈소판 풍부혈장 탑재 신경도관 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교의과대학부속병원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137725
과제번호	2021R1A5A2031612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	세포교신 제어 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320552
과제번호	2020R1I1A1A01067879
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	자가 혈소판 유래 베지클을 이용한 노화 및 항암치료 유발 타액선 기능저하 치료제

적용 연구

기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345332055
과제번호	2020R1I1A1A01075043
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	Sodium-Iodide Symporter 제어를 통한 갑상선암 방사성요오드 치료 기인 칩샘 손상

예방기술 개발

기 여 율	10/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조직은 혀, 간, 심장, 위, 폐, 대장, 소장 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 상처는 창상(wound), 찰과상(abrasion), 열상(laceration), 자상(stab wound) 및 궤양으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 혈소판풍부혈장은 혈소판 $3 \sim 5 \times 10^8/\text{mL}$ 를 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 혈소판풍부혈장은 염증 및 섬유화를 억제하는 것을 특징으로 하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈소판풍부혈장을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈액은 적혈구, 백혈구, 혈소판 등으로 이루어지며, 이 중에서 혈소판은 주로 혈장에 존재하며 혈장은 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP)층 및 혈소판결핍혈장 (Platelet poor plasma, PPP)층으로 나뉘어진다.

[0003] 혈소판풍부혈장(PRP)은 전혈에서 밀도구배 원심분리를 통해 분리한 자가 물질로 소량의 혈장에 다량의 혈소판이 농축되어 있고 백혈구가 고농도로 함유된 비활성 물질이다. 혈관 내 비활성화된 혈소판은 둥근 형태를 유지하면서 혈관 내를 순환하는데 약 10일 정도의 life time을 갖고, 혈액 속에 $2 \sim 4 \times 10^8/\text{mL}$ 정도 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 혈소판풍부혈장(PRP) 내의 혈소판은 혈관 내에 포함되어 있는 물질을 통하여 활성화되어, 성장물질(growth factor)과 다양한 활성물질(active substance)을 배출하게 되는데, 활성화시키는 물질로는 콜라겐, 트롬빈, adenosine diphosphate (ADP)와 epinephrine이 있다. 특히 콜라겐과 트롬빈은 강한 작용물질(strong agonist)로 알려져 있는데, 콜라겐의 특이적인 서열이 혈소판과 부착시켜 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 활성인자에 의해 혈소판이 활성화되면 혈소판의 알파 그레인(alpha granules)의 탈과립(degranulation)으로 성장인자(growth factor)가 방출하여 초기 상처 치유(wound healing)에 중요한 역할을 하며, 이때 방출되는 성장인자(growth factor)로는 platelet derived growth factor (PDGF-AB), transforming growth factor-b1(TGF-b1), vascular endothelial growth factor(VEGF), epidermal growth factor(EGF)와 insulin-like growth factor(IGF)등이 있다. 또한 혈소판풍부혈장(PRP)는 생체 외 조건에서 사이토카인 등을 방출하여 섬유아세포의 DNA를 합성하고, 콜라겐의 생성을 증가시켜, 콜라겐 구조를 조직화하게 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0113587호 (2011.10.17. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 혈소판풍부혈장(PRP)을 유효성분으로 함유하는 조성물을 상처 치유 및 조직 재생용 조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 허절반절제술로 허가 절제된 동물모델에 혈소판을 활성화시킨 혈소판풍부혈장을 주사한 실험군의 경우, 허 상처 부위가 상처 전의 허 모양으로 재생되었으며, 상처 부위의 염증 및 섬유화 감소가 확인됨에 따라, 상기 혈소판풍부혈장을 유효성분으로 함유하는 조성물은 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 허의 형태와 수축을 확인한 결과로, 도 1A는 허절반절제술이 수행된 마우스 동물모델이며, 도 1B는 허 길이(세로 축) 및 너비 (가로 축)를 확인한 결과이며, 도 1C는 수술 후 12일째 (POD12) 육안으로 허 모양을 확인한 결과이며, 도 1D는 POD12째에 허 길이를 확인한 결과로, 허 길이는 허절반절제술+혈소판 풍부 혈장 (PRP) 처리 그룹보다 허절반절제술 그룹에서 유의미하게 짧은 것을 확인한 결과이며 (#, $P < 0.05$), 도 1D는 POD12째에 허 너비를 확인한 결과로, 정상 대조군, PRP 처리 그룹, 허절반절제술 그룹 및 허절반절제술+PRP 처리 그룹에서 유의한 차이가 확인되지 않았다. POD; postoperative day, PRP: platelet-rich plasma.

도 2는 허절반절제술 후 혈소판 풍부 혈장 처리에 의한 영향을 확인한 결과로, 도 2A는 수술 후 12일째 (POD12)의 파라핀 절편에서 헤마톡실린 & 에오신 염색한 결과로, 화살촉은 상피 재생을 나타내며, 화살표는 혈관을 나타내고, 별표는 재생된 점막(유두층, 고유판)을 나타낸다. 도 2B 및 도 2C는 허 면적에 대한 염증 면적 비율을 나타내며, 염증 세포 침윤은 POD12에서 허절반절제술 그룹보다 허절반절제술 + PRP 처리 그룹에서 현저하게 적은 것을 확인한 결과이다 (##, $P < 0.01$). POD; postoperative day, PRP; platelet-rich plasma, H&E; hematoxylin & eosin.

도 3은 수술 후 12일째 (POD12) Masson's trichrome 염색을 수행한 결과로 (Scale bar = 200 μ m), 허절반절제술 + PRP 처리 그룹 동물은 반응성 상피 증식 및 콜라겐 침착과 신규 형성된 혈관을 가진 새로 형성된 점막 조직으로 재생된 허를 가졌으며, 도 3B 및 도 3C는 각각 POD5 및 POD12 째의 허의 섬유화 영역의 면적 비율을 나타낸 결과로, 섬유화 조직량은 POD12에서 허절반절제술 그룹 보다 허절반절제술 + PRP 처리 그룹에서 낮게 나타나는 것을 확인한 결과이다 (#, $P < 0.05$). POD; postoperative day, PRP; platelet-rich plasma.

도 4는 c-kit (줄기세포 인자)의 면역화학조직(IHC) 분석을 수행한 결과로, 도 4A는 POD12 (Scale bar = 100 μ m, arrow = c-kit positive cell) 째에 c-kit (줄기세포 인자)의 면역화학조직(IHC) 분석 결과로, 화살표는 강한 양성 c-kit 발현을 나타내며, 도 4B는 수술 후 5일째 (POD5)의 c-kit 양성 면적 대 허 면적 비율을 확인한 결과이며, 도 4C는 POD12의 c-kit 양성 면적 대 허 면적 비율을 확인한 결과로, POD12에서 c-kit 발현 강도는 허절반절제술 그룹보다 허절반절제술 + PRP 처리 그룹에서 강하게 나타났다 (데이터는 중앙값 $\pm$ IQRs (interquartile Ranges); #은 $P < 0.05$). IHC; Immunohistochemical, POD; postoperative day, PRP; platelet-rich plasma

도 5A는 신경섬유 발현을 확인한 면역화학조직(IHC) 분석 결과이며 (Scale bar = 100 μ m), 도 5B는 신경섬유 양성 조직 영역의 분석 결과로, 허절반절제술 그룹보다 허절반절제술 + PRP 처리 그룹에서 유의미하게 높은 발현을 나타내는 것을 확인한 결과이며, 데이터는 중앙값 $\pm$ IQRs (# P < 0.05, ## P < 0.01)로 나타났다. IHC; Immunohistochemical, POD; postoperative day, PRP; platelet-rich plasma, IQR; InterQuartile Range

도 6A는 S100 발현을 확인한 면역화학조직(IHC) 분석 결과이며 (Scale bar = 100 μ m), 도 6B는 허절반절제술 그룹 보다 허절반절제술 + PRP 처리 그룹에서 S100 양성 영역이 유의미하게 많은 것을 확인한 결과로, 데이터는 중앙값 $\pm$ IQRs (# P < 0.05, ## P < 0.01)로 나타났다. IHC; Immunohistochemical, POD; postoperative day, PRP; platelet-rich plasma, IQR; InterQuartile Range

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0013] 본 발명은 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0014] 상기 조직은 허, 간, 심장, 위, 폐, 대장, 소장 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0015] 상기 상처는 창상(wound), 찰과상(abrasion), 열상(laceration), 자상(stab wound) 및 궤양으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 혈소판풍부혈장은 혈소판 $3 \sim 5 \times 10^8$ /mL를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 혈소판풍부혈장은 염증 및 섬유화를 억제하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 혈소판풍부혈장은 c-kit 양성 줄기세포를 증가시키는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)을 유효성분으로 함유하는 상처 치유 및 조직 재생용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0024] 상기 혈소판풍부혈장의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에

제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0029] <실험예>

[0030] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0032] 1. 실험 동물

[0033] 실험용 랫트 (Sprague-Dawley rat; 250~300g)와 마우스 (4주령 female C57BL/6; 18~22g)는 오리엔트 바이오사의 실험동물생산센터 (Orient Bio., 성남, 대한민국) 에서 구입하였으며, 인하대학교 실험동물 가이드라인에 따라 사육하였다. 48 마리의 마우스는 다음과 같이 4 그룹으로 나누고, 그룹당 12 마리로 5 일차 및 12 일차 실험군에 각각 6 마리씩 배정하였다: treatment-naive control group (the normal control group), no hemiglossectomy + PRP treated group (the PRP group), hemiglossectomy alone group (the hemiglossectomy group), 및 PRP-treated hemiglossectomy group (the hemiglossectomy+PRP group).

[0034] 모든 동물실험은 인하대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다 (INHA 1612140464).

[0036] 2. 허절반절제술 (hemiglossectomy) 동물모델

[0037] 허절반절제술 마우스모델을 만들기 위하여, 케타민 (100 mg/kg) 을 마우스 복강내 투여하여 마취시키고, 리도카인 (lidocaine, 0.5%) 과 에피네프린 (epinephrine, 1:100,000) 2 mg/kg을 국소부위에 주사한 뒤, 혀의 끝부분 (apex)에서 몸체 (body)의 1/2 지점까지 정중구 (median sulcus) 를 따라서 수술가위로 절제하고 (대략 5mm 길이, 2mm 두께), 출혈이 멈출때까지 압박하여 지혈하였다. 수술 후, 마우스의 무게와 사료와 물의 소비량을 매일 체크하였다.

[0039] 3. 혈소판젤 제조 및 주사

[0040] 호흡마취한 랫트의 심장에서 2.2% 구연산 나트륨 (sodium citrate, 1:9, v/v) 이 담긴 일회용 주사기를 이용하여 전혈을 채취한 뒤, 1500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈소판풍부혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 얻고, 3000 rpm에서 20 분 동안 원심분리하여 혈소판제거혈장을 분리하였다. 혈소판 수를 $4\sim4.5 \times 10^8/\text{mL}$ 로 조정 한 혈소판풍부혈장을 37℃, 1100 rpm 에서 3분 간 미리 배양한 다음, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 콜라겐 (collagen) 을 처리하고 37℃, 1100rpm 에서 20분간 배양하여 혈소판을 활성화시킨 후 4℃, 1500g 에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액은 3 kDa MWCO centrifugal filter unit을 사용하여 농축시킨 후, 사용직전까지 -80℃에서 보관하였다. 얻어진 혈소판젤은 인슐린주사기(26G 주사침)에 50 μL 씩 분주하고, 허절반절제술 + PRP 그룹에서 허절반절제술이 실행된 직후 절제된 혀의 표면에 주사하였다.

[0042] 4. 혀의 전체 모양 확인 및 현미경적 검사

[0043] 각 그룹에서 4 마리의 마우스는 수술 후 5일 (POD5)에 희생되었고 나머지는 수술 후 12일 (POD12)에 희생되었다. 얻어진 혀조직의 전체 윤곽 이미지를 전자현미경으로 얻은 다음, 혀의 끝부분(tip)에서 배상유두 (vallate papillae)까지의 길이와 폭을 이미지 분석 프로그램을 이용하여 측정하여 비교하였다. 조직학적 분석

을 위하여 얻어진 허조직을 10% 포르말린 고정액에 담가 48시간동안 고정후 만들어진 파라핀블럭을 5 μ m 두께로 섹션한 뒤 탈파라핀화 및 수화시킨 다음 헤마토실린&에오신 (HE), masson' s trichrome (MT) 으로 염색하고 염증세포의 수와 섬유화 정도를 각각 디지털현미경 (Olympus, Japan) 으로 관찰하였다. 각 그룹의 조직재생과 신경재생을 확인하기 위하여 c-Kit 그리고 S100 와 neurofilament (1:200, santa cruz, USA)의 발현을 면역화학적 방법으로 확인하고, 디지털 현미경으로 비교분석하였다. NF와 S100의 발현은 ImageJ 프로그램 (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 수치화하여 비교하였다.

5. 통계분석

허길이와 너비는 중앙값과 범위(최하-최대)로 표시하였고, 각 그룹간의 통계적 유의성은 GraphPad Prism 8 프로그램으로 확인하였으며, Mann-Whitney U test 에서 $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

<실시예 1> 전혈과 혈소판풍부혈장(PRP)의 성분 분석

전혈과 PRP 내에 존재하는 혈구성분을 비교확인하기 위하여 혈액분석기를 이용하여 적혈구, 백혈구 및 혈소판수를 확인하였다.

그 결과, 표 1과 같이 전혈에 비해서 PRP 에서의 백혈구 및 적혈구의 수가 현저히 적고, 혈소판의 수는 현저히 높음을 확인되었다.

상기 결과로부터 본실험에서 제조한 PRP에 백혈구나 적혈구없이 혈소판이 주된 성분임을 확인하였다.

표 1

Parameters	Whole Blood	PRP	Reference [33].
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Range
Leukocytes ($\times 10^3$ cells/ μ L)	4.62 $\pm$ 0.11	0.03 $\pm$ 0.03	4.4-14.8
Erythrocytes ($\times 10^6$ cells/ μ L)	6.61 $\pm$ 0.11	0.08 $\pm$ 0.01	3.8-06.68
Platelets ($\times 10^3$ cells/ μ L)	716 $\pm$ 11.31	993.5 $\pm$ 58.69	170-557

- Abbreviation: SD, standard deviation

- Reference [33]: Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, Seneviratne MD, Dissanayaka ML, Batagoda SS, et al. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. Animal Model Exp Med. 2018 Dec; 1(4): 250-254.

<실시예 2> PRP 처리에 따른 허 상처회복효과

PRP 처리 후 원래의 허모양으로 재생되는 지를 확인하였다.

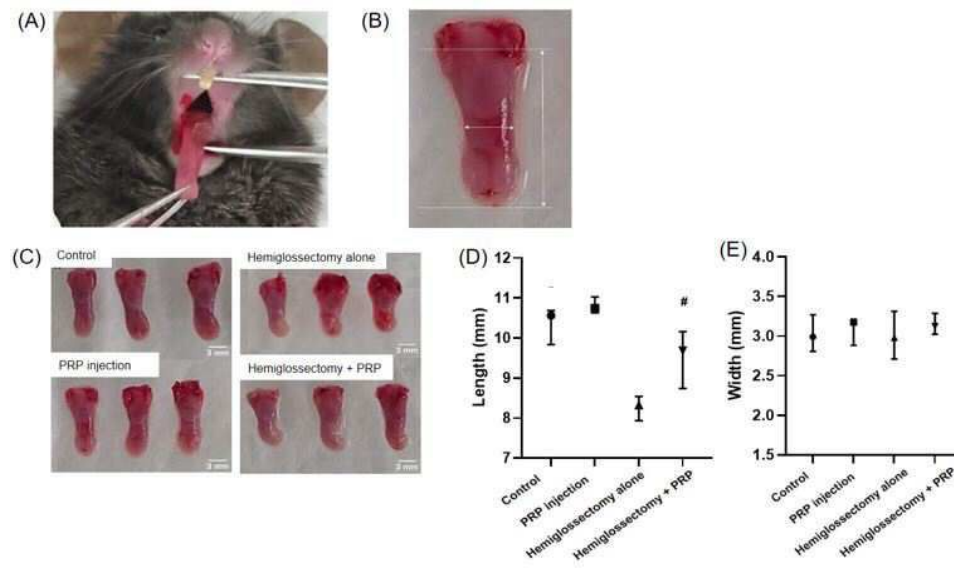
POD12에서, 허절반절제술 (hemiglossectomy) 그룹의 허 윤곽이 잘라진면쪽으로 휘어졌으나, 허절반절제술+PRP 그룹에서는 원래모양대로 재생됨을 확인하였다. POD5에서, 정상대조군 (normal control), PRP, 허절반절제술 및 허절반절제술+PRP 그룹의 평균 허길이는 각각 10.09 mm [9.52-10.22], 10.27 mm [10.02-10.22], 8.68 mm [6.22-8.94] 및 9.36 mm [9.36-9.68] 로 확인되었으나, 각 그룹간의 통계적유의성은 없었다.

하지만, POD12에 각 그룹의 평균 허길이를 확인해본 결과, 도 1D와 같이 허절반절제술 그룹에 비해 허절반절제술+PRP 그룹의 평균 허길이가 길게 측정되었다 (8.32 mm [7.85-8.55] vs. 9.21 mm [8.13-10.16], $P < 0.05$). 반면에, POD12에서 각 그룹의 평균 허너비를 비교한 결과, 각 그룹간의 현저한 차이는 확인되지 않았다 ($P < 0.05$).

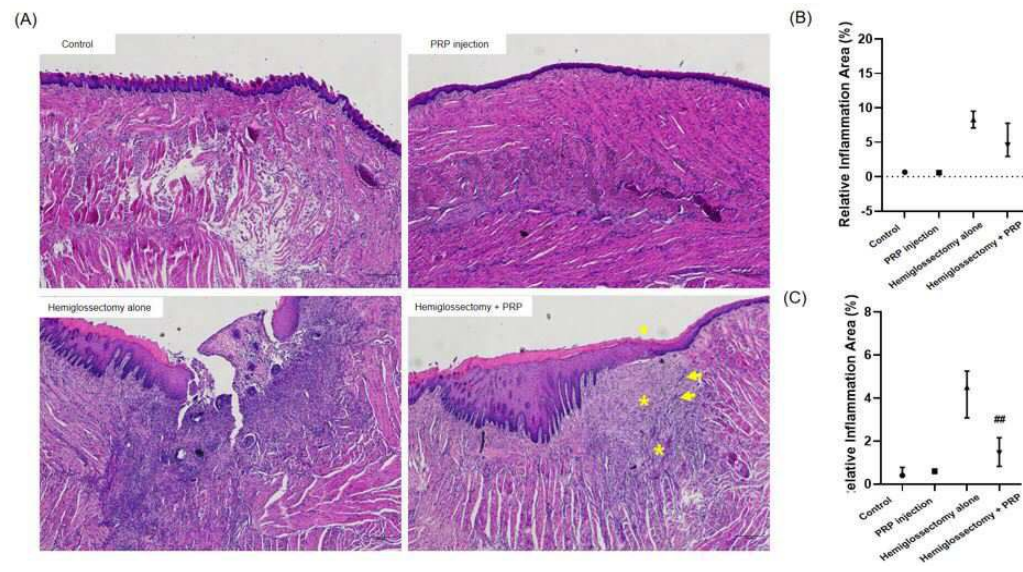
- [0061] <실시예 3> 반혈절제술에 따라 생긴 염증부위에서의 PRP 처리에 따른 염증감소효과 확인
- [0062] 모든 그룹 허조직 슬라이드를 H&E 염색 한 뒤, 염증부위를 현미경으로 확인하였다.
- [0063] 그 결과, 도 2B와 같이 반혈절제술을 진행한 그룹들에서는 POD5 및 POD12 에서 모두 수술부위에 염증소견이 확연하게 나타났으며, POD5 에서는 모든 그룹에서 염증부위의 차이가 나타나지 않았다. 그러나, 도 2A 및 도 2C를 참고하면 POD12 에서 혈절반절제술 그룹에 비해서 혈절반절제술+PRP 그룹에서 염증세포의 침투가 현저히 적게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0065] <실시예 4> 반혈절제술 후 생기는 섬유화도에 미치는 PRP의 효과 확인
- [0066] 도 3A를 참고하면, 혈절반절제술 이후 허가 재생되면서 반응성 상피 증식이 있었고 새로 형성된 점막 조직이 콜라겐 침착 및 새로 형성된 혈관과 함께 확인되었다. 또한, 도 3B와 같이 POD5에서 MT 염색은 혈절반절제술 그룹과 혈절반절제술+PRP 그룹간에 차이가 없는 것으로 확인되었다. 그러나 POD12에서 혈절반절제술+PRP 그룹은 상피 증식 및 재생 측면에서 재생 가능성을 보였다.
- [0067] 또한, 도 3C와 같이 혈절반절제술 그룹보다 혈절반절제술+PRP 그룹에서 콜라겐 양은 더 많았고 섬유 조직 양(fibrous tissue amount)은 더 적게 나타났으나 PRP와 대조군 그룹 사이에는 유의한 차이가 확인되지 않았다.
- [0069] <실시예 5> 손상된 허근육에 PRP 처리에 따른 c-kit 양성 줄기세포 기인 재생 효과 확인
- [0070] 도 4A와 같이 각 그룹의 POD12에서 c-kit(수용체 및 줄기세포 인자)의 발현을 확인하였다. 한편, IHC 분석 결과 도 4B와 같이 POD5에서 그룹 간의 c-kit 발현 간에 유의한 차이가 없었으나, c-kit 발현은 도 4C와 같이 POD12에서 혈절반절제술 그룹에 비해 혈절반절제술 + PRP 그룹($P<0.05$)에서 유의하게 더 높게 나타났다.
- [0071] 또한, 허 상처에서 신경섬유(NF) 및 S100의 발현을 도 5A 및 도 6A와 같이 IHC으로 그룹당 3마리 동물의 6개 섹션에서 확인하였다. 그 결과, 도 5B 및 도 6B와 같이 POD12에서 NF 및 S100 발현은 혈절반절제술 + PRP 그룹에서 혈절반절제술 그룹보다 유의하게 높게 나타나는 것이 확인되었다.
- [0073] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

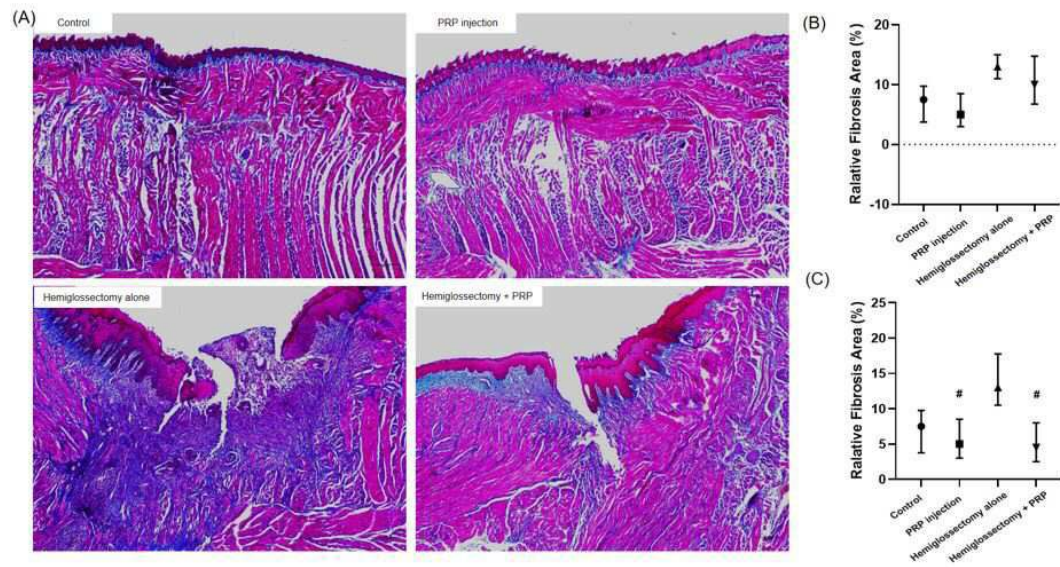
도면1



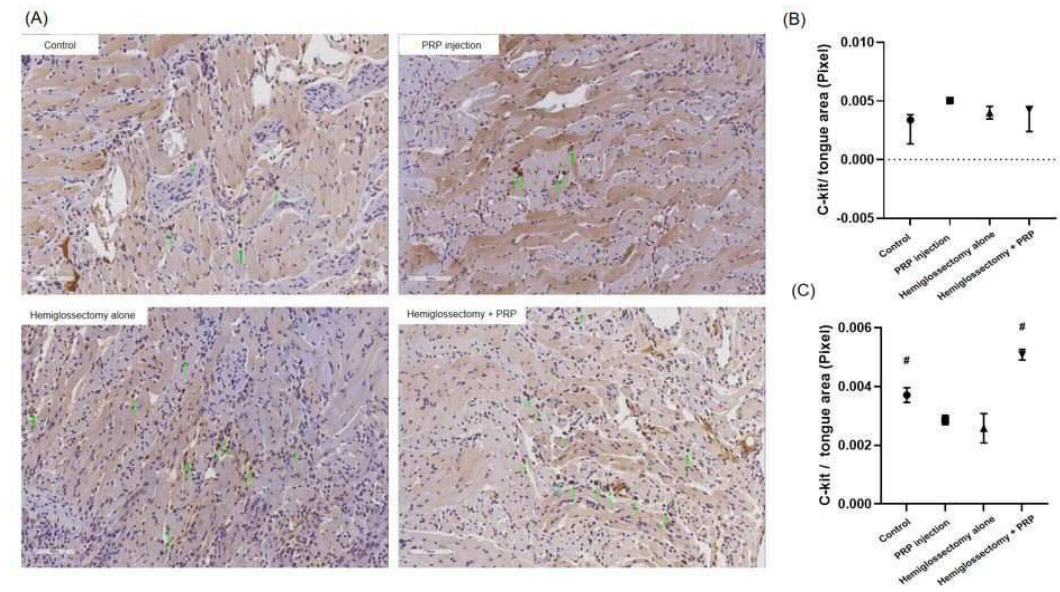
도면2



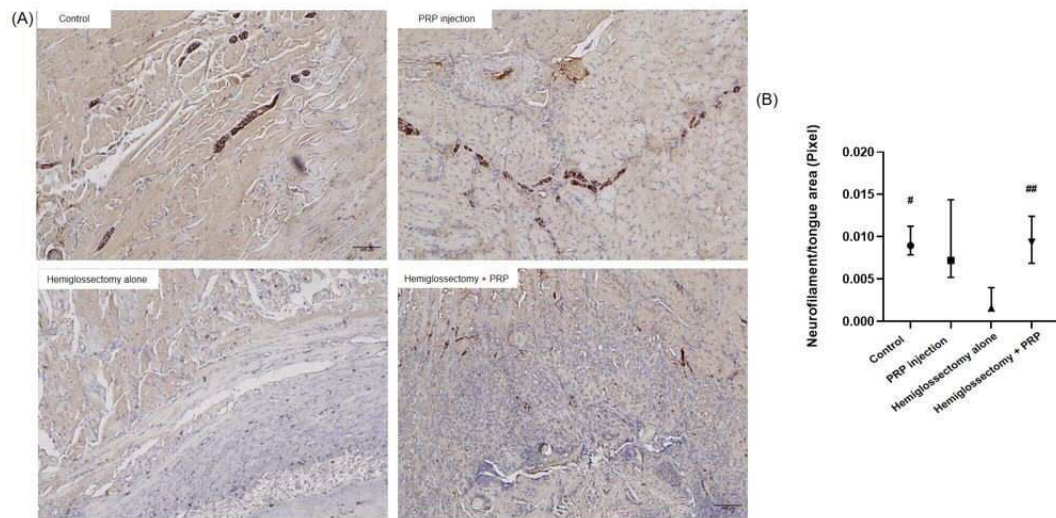
도면3



도면4



도면5



도면6

