

PVA Microneedle for Storing Nucleic Acid

김규근(1) · 문채린(1) · 설용훈(1) · 이희섭(2) · 이서준(3)
 서울시립대학교 화학공학과(1), 생명공학과(2), 환경공학부(3)

연구 배경 및 방법

[Microneedle; MN이란?]

- 수백 개의 μm 단위의 바늘을 고통 없이 경피를 투과하여 약물을 전달
- 주사기보다 통증이 적고 생체적합성이 높은 재료를 사용하여 부작용을 줄임



PDMS

PVA

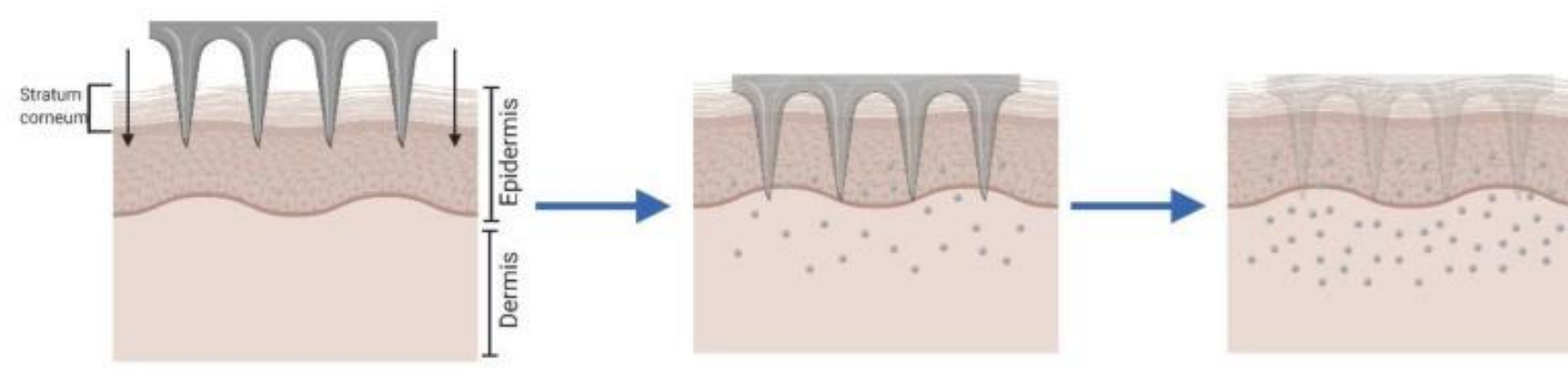
- ✓ 실리콘 기반 고분자
- ✓ 10 : 1(w:w, base:crosslinker)에서 좋은 물성
- ✓ 높은 생체 적합성, 생분해성 및 약물 적재 능력
- ✓ 적합한 물성을 위해 20 vol% 사용

Mold의 재료로 활용

MN의 재료로 활용

[Hydrogel MN(PVA MN)의 특성]

- 물에 녹는 생분해성 재료들로 만들어져 약물 운반 후 분해
- 날카로운 폐기물을 만들지 않으며 뽑는 과정이 없어 상처도 줄임
- MN을 통한 엑소좀과 핵산 전달 관련 연구가 진행됨



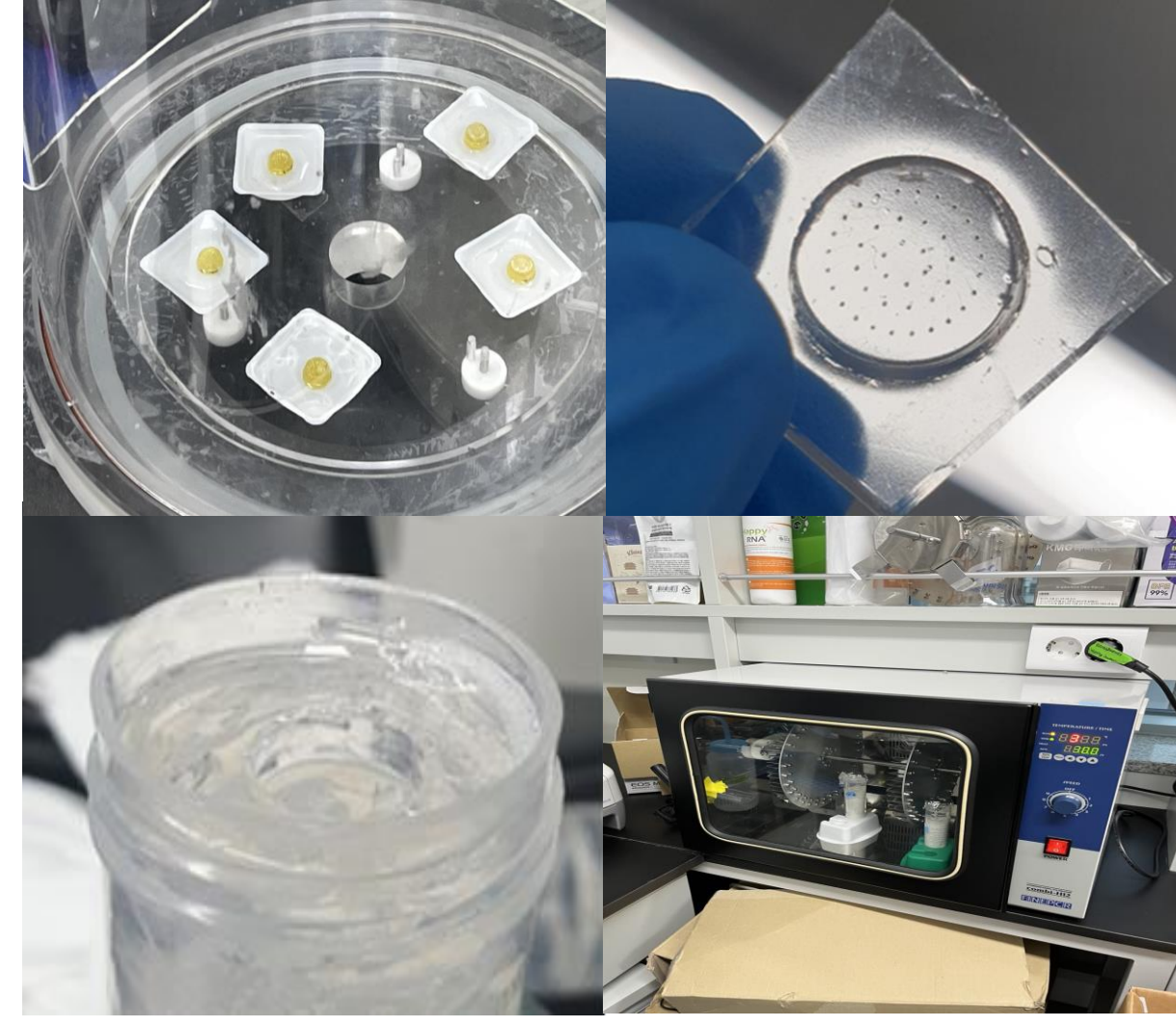
Seeds	Materials (Hydrogel MN)	Height	Application
Exosome	Methacrylamide	860 μm	당뇨병성 상처 치유 촉진
Exosome	Gelatin	500 μm	심근경색 후 심장섬유화를 예방
Exosome	Gelma/HA/PVA	800 μm	아킬레스건병증 치유 촉진
SiRNA	HA	800 μm	SiRNA 전달

길이 별 MN에 핵산을 주입해 저장 능력을 평가함을 목표

1 MN Mold 2 핵산 포함 PVA MN 3 현미경 촬영 4 길이 측정 5 MN의 핵산 저장 능력 분석

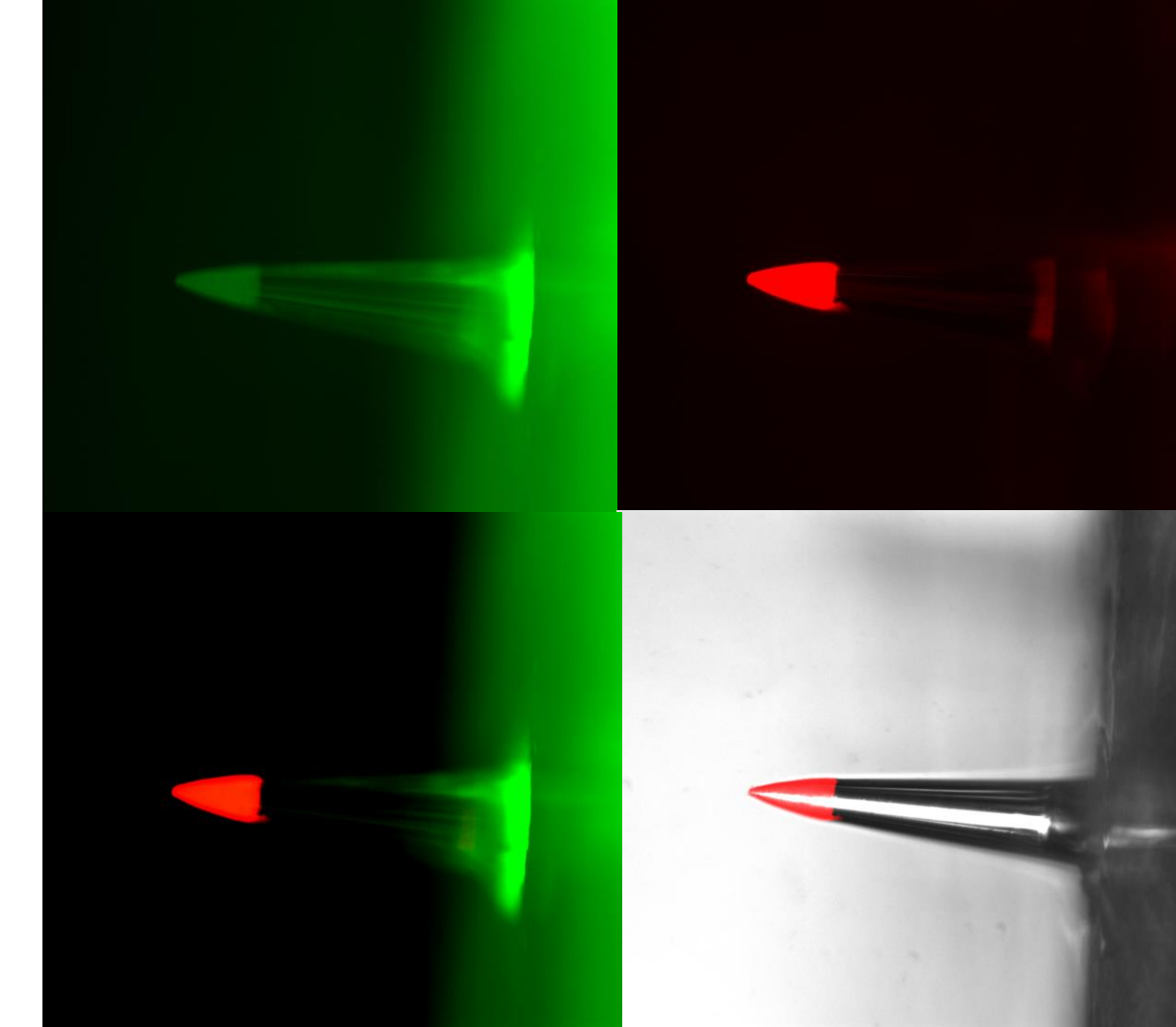
[실험 방법 1. MN mold 제작]

1. Sylgard 184 A (polymer) : B (crosslinker) = 10 : 1 (wt Ratio)가 되도록 혼합 후 기포를 제거
2. PDMS를 Dish에 붓고 진공 펌프로 기포 제거 (20분)
3. PDMS 위에 Master mold를 올리고 진공 펌프로 기포 추가 제거 (20분)
4. 70°C 오븐에서 경화하여 주형 틀 굳히기 (20분)
5. 코니칼 튜브를 45 mL까지 미리 채우고 PDMS를 부은 후 주형 틀을 올린 후 70°C 오븐에서 경화



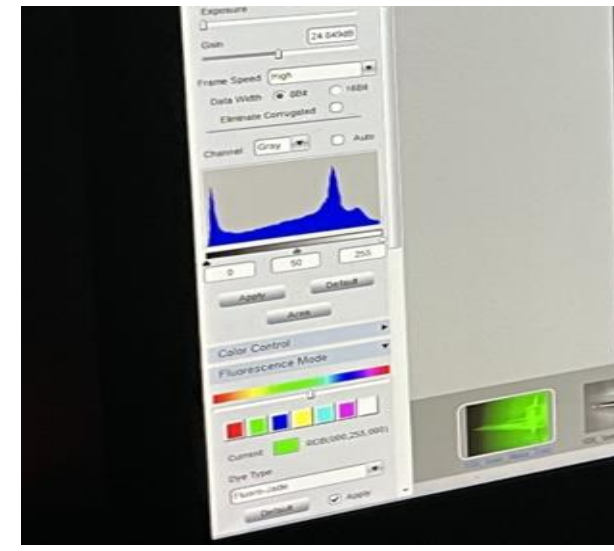
[실험 방법 2. PVA MN 제작]

1. DNA 수용액을 sonification, vortexing, centrifuge로 균일화 후 MN mold에 주입
2. 진공 펌프로 1mbar 상태를 유지하며 DNA molecule 수용액을 30분 증발, 2~3회 반복
3. PVA : Alexa 488 = 499 : 1 혼합액을 주입
4. 진공 펌프로 PVA의 기포를 제거 (10분), Centrifuge (300 RCF, 3 min, 25°C)로 MN mold의 tip 부분에 용액에 충분히 들어가게 함
5. Incubator에서 1일 간 경화



[실험 방법 3. 현미경 촬영]

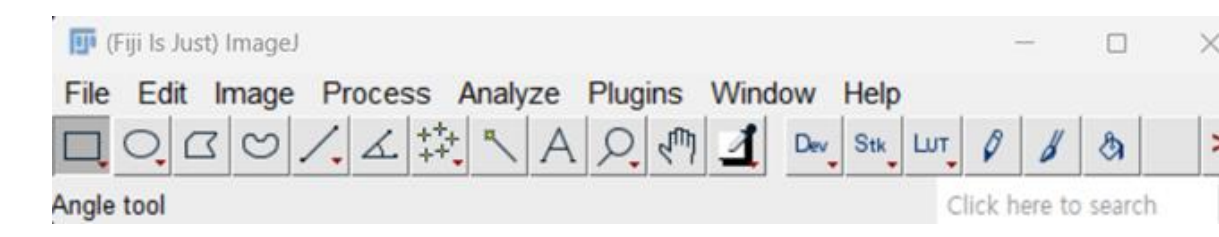
1. ISCapture 접속
2. 색상에 따른 광원 및 형광 모드 설정
3. Exposure mS 값 설정
4. MN 위치 및 초점 조절 후 촬영



Color	Light	Fluorescence Mode
Black and White	DIC	White
Fluorescence	Blue	Green
	CY5	Red

[실험 방법 4. MN 길이 측정]

1. Image - adjust에서 사진의 밝기와 명도를 조절
2. Image - color - merge channels에서 사진 합성
3. Scale bar, MN의 전체 길이와 DNA가 Tip 부위에 들어간 핵산 영역의 길이를 측정
4. 비율에 따라 실제 길이 계산, 10 개의 평균 값으로 MN의 길이 추산

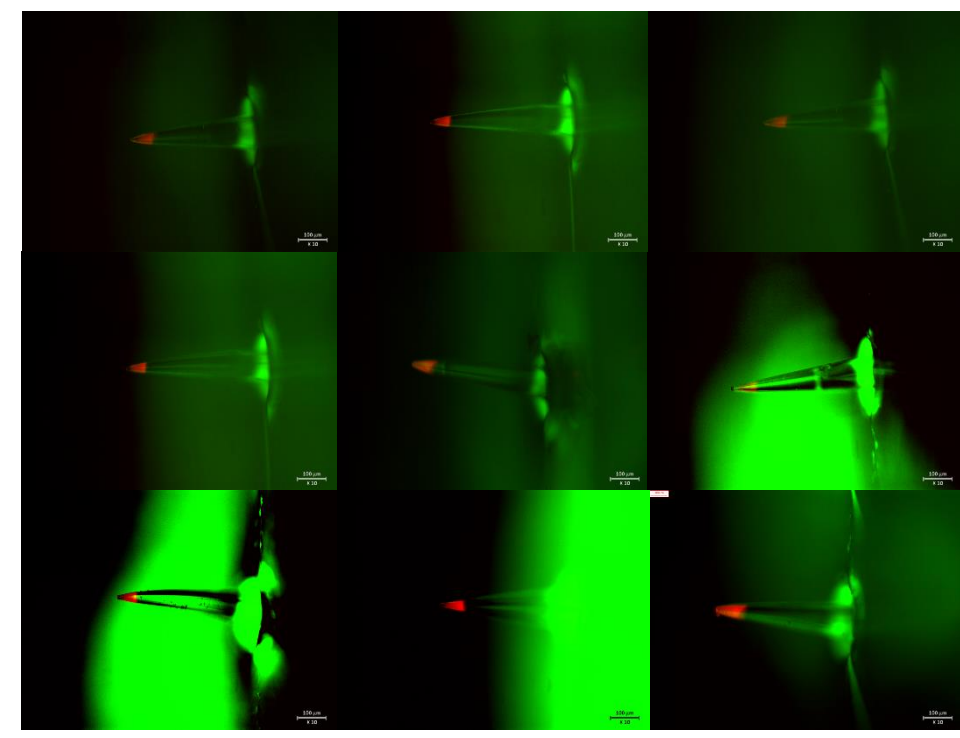


연구 결과

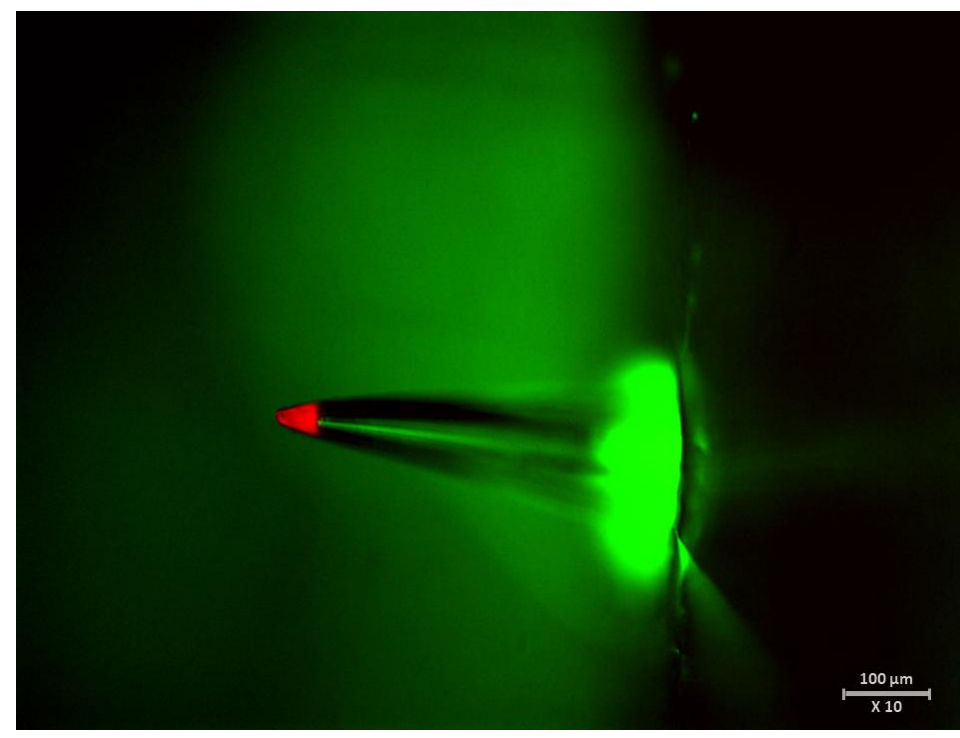
1. MN의 형태학적 특성

- 500 μm , 750 μm , 1000 μm MN을 제작해 길이 등 비교
- 빨강은 핵산 영역을, 초록은 PVA 영역을 표현, 제작물 길이는 핵산과 PVA 전체 영역의 길이
- 제작물을 mold에 따른 목표 길이 대비 7~10 % 짧음, 500 μm MN이 목표와 가장 근접하게 제작
- 핵산 영역의 길이 비중은 약 20~50 %로, 500 μm 외 MN에서 비슷한 경향

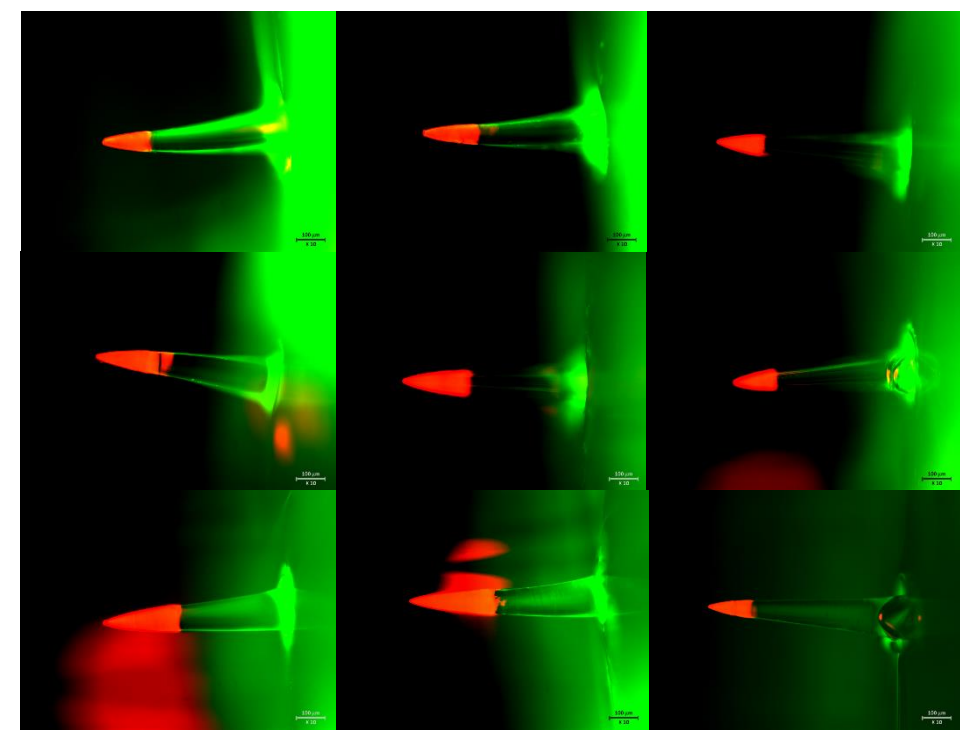
목표 길이	제작물 길이		핵산 영역 길이		핵산 영역의 길이 비중
	평균	표준편차	평균	표준편차	
500 μm	463 μm	12 μm	80 μm	7 μm	12 ~ 22 %
750 μm	679 μm	15 μm	215 μm	30 μm	21 ~ 46 %
1000 μm	893 μm	26 μm	350 μm	31 μm	30 ~ 48 %



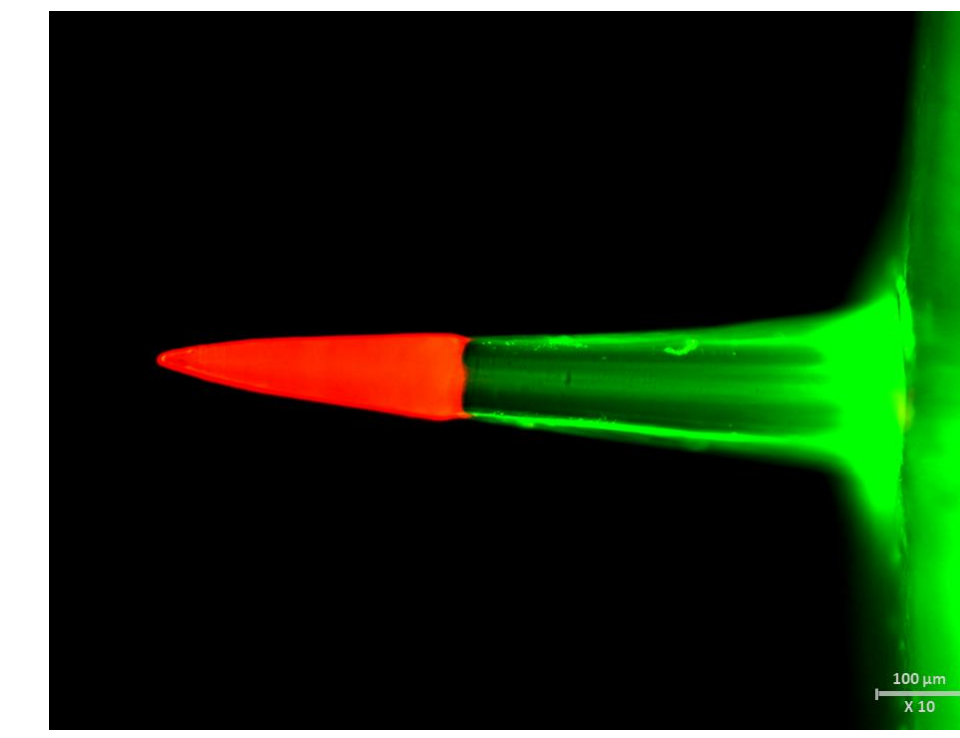
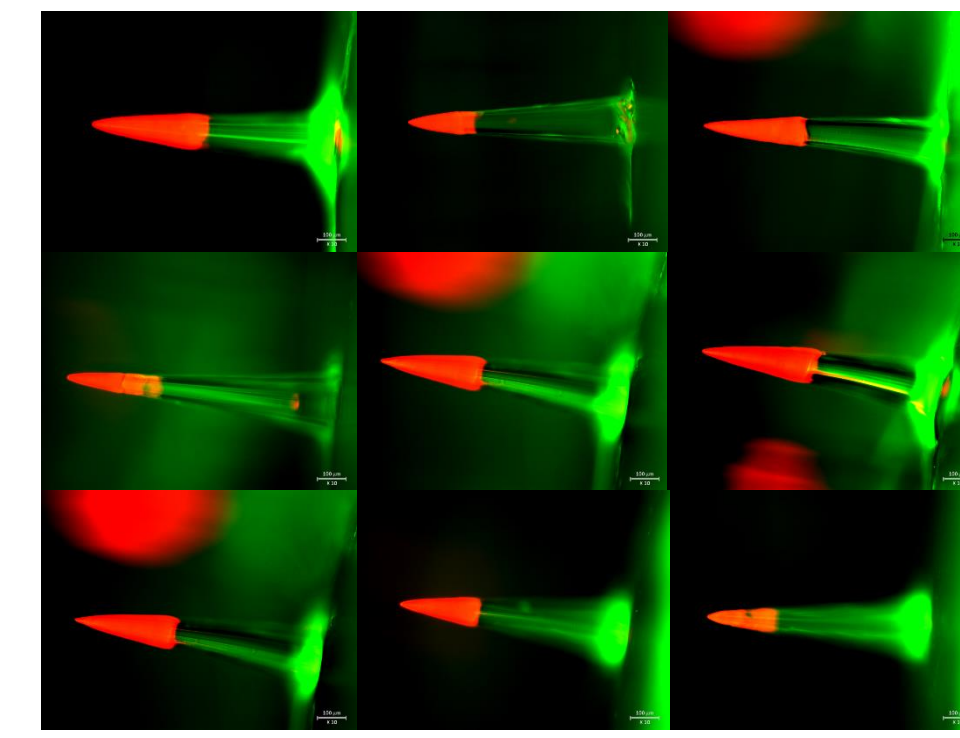
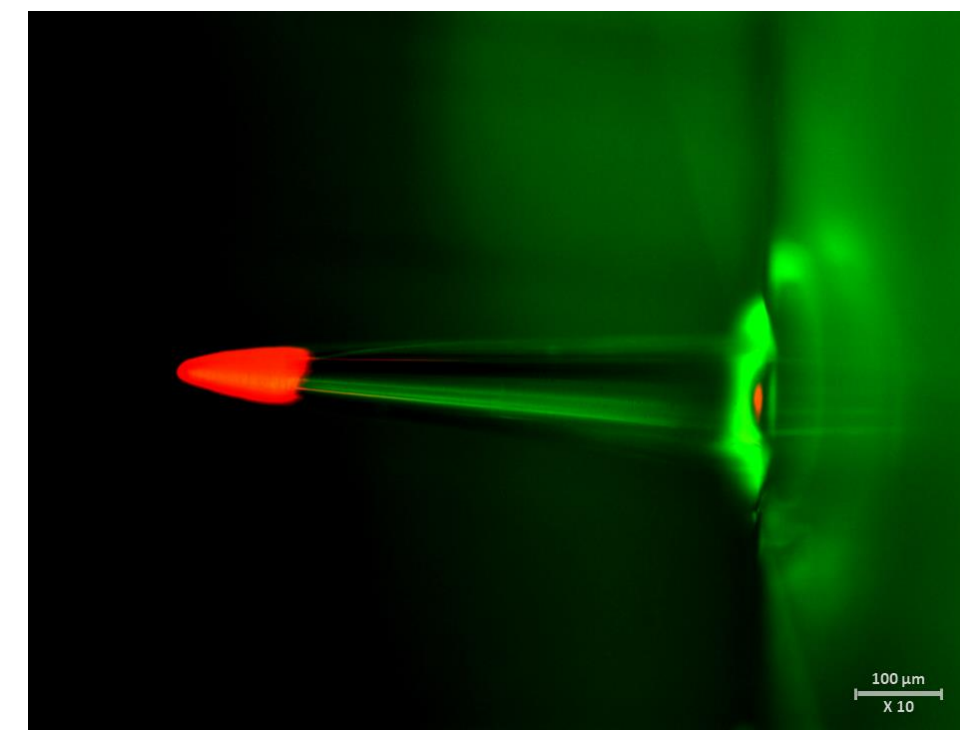
500 μm (10 배율)



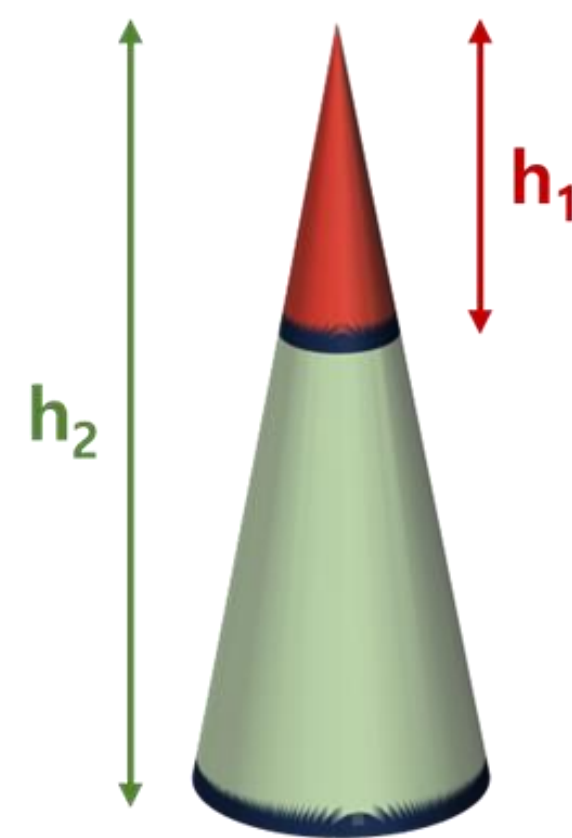
750 μm (10 배율)



1000 μm (10 배율)



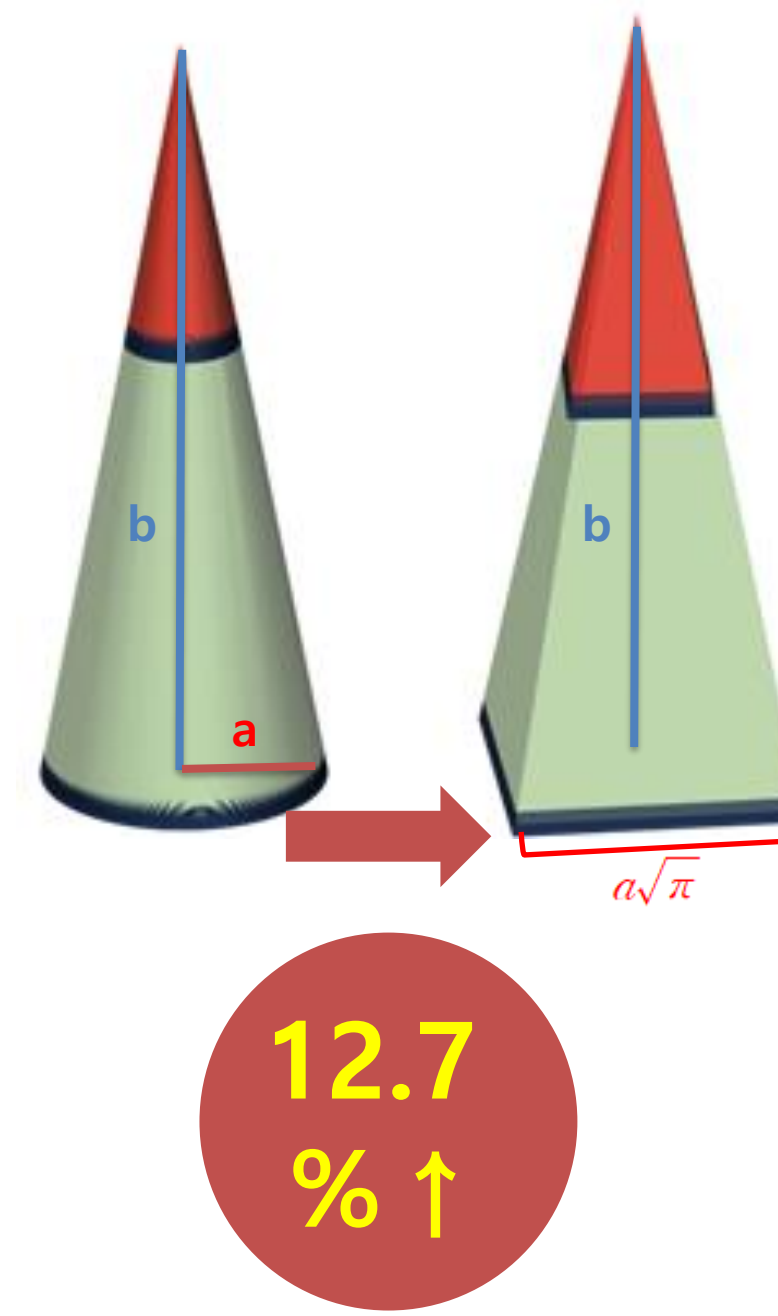
2. MN의 핵산 저장 능력과 저장량



- MN을 원뿔 모양으로 가정
- MN의 핵산 영역 높이 (h_1)와 전체 높이 (h_2)의 비율의 세제곱을 통해 체적 비율 산정
- 체적 비율 (%)을 'MN 핵산 저장 능력'으로 정의
- 체적 비율 (%)과 MN 길이의 세제곱 간의 곱의 비율을 '저장량 비율'로 정의

MN	평균	최소	최대	표준편차	MN	저장 능력	저장량 비율
500 μm	0.6 %	0.2 %	1.1 %	0.3 %	500 μm	0.6 %	$(500 \mu\text{m})^3 * 0.6\%$
750 μm	4 %	1 %	10 %	3 %	750 μm	4 %	$(750 \mu\text{m})^3 * 4\%$
1000 μm	6 %	3 %	11 %	3 %	1000 μm	6 %	$(1000 \mu\text{m})^3 * 6\%$

3. 원뿔형 MN과 피라미드형 MN의 비교



- 가정 1. 원뿔형 MN 높이 = 피라미드형 MN 높이
- 가정 2. 원뿔형 MN 부피 = 피라미드형 MN 부피
- 원뿔형 MN의 옆면 넓이 = $\pi a \sqrt{a^2 + b^2}$
- 피라미드형 MN의 옆면 넓이 = $\sqrt{a^2 \pi / 4 + b^2} * 2a \sqrt{\pi}$
- 계산 결과 피라미드형 MN의 핵산 영역 표면적은 12.7 % 증가
- 옆면 겹넓이가 크면 세포에 접촉하는 면적이 넓어져 약물속도가 증가 기대

12.7 % ↑

연구 결론

- 핵산은 MN의 체적의 평균 0.6 %, 4 %, 6 %를 차지하며 MN이 길수록 저장 능력이 좋으며, 핵산 영역은 전체 길이 중 약 20~50 % 차지
- MN의 핵산 저장량은 1000 μm : 750 μm : 500 μm = 160 : 45 : 2 로, 길이가 길 수록 핵산 저장량이 많음
- 피라미드형 MN 적용 시 표면적이 12.7 % 증가하여 더 빠른 약물 전달을 기대