

플루로닉(pluronic) 기반의 나노운반체(nano-carrier)에 충전된 카이모파파인(chymopapain)의 척추 추간판 조직내 작용성에 관한 연구

최원일¹, 태기웅², 홍영기^{3*}

¹대웅제약 생명과학연구소, ²광주과학기술원 신소재공학부, ³청주대학교 스포츠의학과

Study of the enzymatic action of the chymopapain using pluronic based nano-carrier system on the cadaveric nucleus pulposus tissue

Won Il Choi¹, Gi Yoong Tae², Young Ki Hong^{3*}

¹Life Science Research Institute, Daewoong Pharm,

²School of Materials Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology,

³Department of Sports Medicine, Cheongju University

요약 이 연구의 목적은 척추 추간판 용해제인 카이모파파인을 나노캐리어 시스템에 충전시켜 주입시, 추간판내 약제의 확산범위가 감소하는지 평가하기 위한 것이다. 총 3주간 시행된 실험의 재료로는 두 개의 카데바에서 채취된 열다섯 개의 척추 추간판이 쓰였고, 이들은 주입되는 카이모파파인의 종류에 따라 일반 카이모파파인 그룹과 나노캐리어 시스템 그룹으로 나뉘었다. 나노캐리어 시스템 그룹은 다시 그 기반재료가 되는 플루로닉의 종류에 따라 플루로닉 F 127(DA-PF 127) 나노캐리어 그룹과 플루로닉 F 68(DA-PF 68) 나노캐리어 그룹으로 나뉘었다. 실험결과 나노캐리어 시스템을 사용한 그룹은 일반 카이모파파인 그룹에 비해, 척추 추간판 내부로 주입되었을 때, 주입지점에서 멀리 확산되지 않고 국소적으로 작용하는 특성을 보였다($p < 0.01$). 이러한 특성은 향후 추간판 내 병소만을 선택적으로 제거하는 최소침습적 척추시술의 기반약제로 응용될 가능성을 제시해준다

Abstract The objective of this study is to determine if when chymopapain is loaded onto a nano-carrier, an injection of it reduces the spreading range of the drug within the discs. The materials for the experiment, which were conducted for three weeks, included fifteen intervertebral discs taken from two cadavers, which were divided according to the types of injected chymopapain solutions as follows: ordinary chymopapain group and nano-carrier system group. The nano-carrier system group was again divided into two subgroups according to the types of pluronics, the basic material for the nano-carriers: Pluronic F 127(DA-PF 127) in the nano-carrier group and Pluronic F 68(DA-PF 68) in the nano-carrier group. The results showed that the action of chymopapain using a pluronic-based nano-carrier system was localized around the center of the injection site instead of broad spreading, compared to that of the ordinary chymopapain group ($p < 0.01$). This characteristic suggests a possible application to effective agents for minimally invasive spinal treatment through which disc lesions were removed selectively.

Key Words : chymopapain, intervertebral disc herniation, minimally invasive spinal treatment

1. 서론

척추 추간판 탈출증의 치료는 크게 보존적 요법, 중재

시술 요법 그리고 수술 요법으로 나누어 볼 수 있다[1].

이 가운데 중재시술 요법이란, 척추를 수술적으로 절개하지 않고, 경피적으로 시술바늘을 척추 추간판에 진입

*Corresponding Author : Young Ki Hong(Cheongju Univ.)

Tel: +82-43-229-7576 email: spinehong@gmail.com

Received October 29, 2014

Revised (1st November 19, 2014, 2nd November 21, 2014)

Accepted January 8, 2015

시켜, 조직을 제거하는 최소 침습적 치료(minimally invasive therapy)를 의미한다. 중재시술에 사용되는 시술바늘은 그 작용유형에 따라 드릴구조의 기계적 방식[2], 레이저나 플라즈마 빔을 이용하는 물리적 방식[3,4], 그리고 추간관 용해 약물을 사용하는 화학적 방식[5]으로 구분해 볼 수 있다. 본 논문에서 실험된 카이모파파인은 이중 화학적 방식으로 추간관을 제거하는데 쓰이는 용액이다. 카이모파파인은 1941년 Jansen 과 Balls가 파파야(papaya)나무의 수액으로부터 분리한 단백질 분해 효소로서[6], 추간관 수핵 내에 주입했을 때 수핵의 주요 구성성분의 하나인 프로테오글리칸(proteoglycan)을 분해시키는 작용이 있다[7]. 이러한 작용을 이용해 1964년 Smith는 임상적으로 요추 추간관 탈출증 치료에 만족할 만한 결과를 얻었다고 보고하였으며, 카이모파파인을 통한 수핵제거술을 화학적 용해술(chemonucleolysis)이라 명명하였다[8].

카이모파파인을 이용한 수핵 용해시술은 수술적 치료와 비슷한 수준의 효과를 나타내는 것으로 보고된다[5]. 따라서 척추 추간관 탈출증 환자가 일반적 수술을 시행하기 전 단계에서 카이모파파인 치료와 같은 중재시술을 시도해 보는 것은 의미있는 일일 것이다. 그런데, 카이모파파인을 이용한 화학적 용해술을 비롯해 앞서 언급한 기계적 혹은 물리적 척추 중재시술들은, 일반적인 수술적 치료와는 달리 병변부위의 탈출된 추간관 조직 자체를 제거하는 것이 아니다. 이러한 유형의 중재시술의 치료원리는 외부로 탈출된 추간관조직을 직접 제거하는 대신에, 시술바늘을 병변의 위치와는 무관하게 추간관의 중심부로 진입시켜, 그곳에 존재하는 정상적인 수핵을 '비선택적'으로 제거한다. 즉, 이 시술은 직접적 병변제거가 아닌, 수핵 내부의 전체적 압력을 낮추는 것을 목적으로 수행된다[9]. 다시 말해, 시술을 통해 추간관 내부의 중심압력이 낮춰지면, 외부로 탈출된 병소부위로 전달되는 압력도 낮아지므로, 그에 따라 탈출된 조직이 다시 원래의 자리로 돌아오도록 유도하는 이차적 효과를 기대하는 것이다. 이러한 치료원리에 근거한 척추중재시술 기법은 경피적(percutaneous)으로 접근되는 시술바늘을 사용하므로 척추 주변부 조직을 보존하는 장점은 있지만, 충분한 감압효과를 만들어 내기 위해 시술바늘이 척추 역학 구조의 핵심기능을 담당하는 추간관 내부를 광범위하게 파괴하는 단점이 있다. 이로 인해 추간관의 건강성은 손상되며 장기적으로 추간관의 변성을 야기할 수 있

다[10]. 또한 시술적용의 대상은 포괄적인 추간관 탈출질환이 아니라, 감압효과를 통해 이차적 치유현상을 기대할 수 있는, 작은 크기의 추간관 탈출질환으로 한정된다[11]. 따라서 보다 안전하고 효율적인 척추중재시술 기법을 개발해 내기 위해선, 기존의 방식처럼 '비선택적으로' 척추 추간관 내부를 광범위하게 파괴해서 감압효과를 유도하는 방식이 아니라, 국소적으로 탈출된 부위만을 '선택적으로' 직접 제거하는 방법이 고안되어야 한다.

이것이 가능하기 위해선 두 가지 기술적 고려가 요청된다. 첫째는, 추간관의 국소적 병변부위로 시술바늘을 접근시키는 기술이 있어야 하며, 둘째는, 조직제거시 병변이 위치한 시술지점 너머의 정상 주변조직은 가능한 손상시키지 않는 기술이 필요하다. 본 연구진은 이전 연구에서 세계최초로 시술바늘의 위치를 척추 추간관의 국소적 병변부위로 방향제어하여 접근시키는 기술을 개발하였다[12]. 이 방식은 현재 플라즈마빔을 이용한 최초의 선택적 방향제어형 척추 추간관 제거시술에 사용되고 있다[13]. 우리는 척추추간관 내부의 병변위치로 시술바늘을 방향제어 시켜 정밀하게 접근시키는 기반기술위에, 병변에 도달한 시술바늘이 추간관 조직을 제거하는 방법으로, 기존에 사용했던 플라즈마빔 대신 화학적 약제를 이용한 선택적 추간관 용해술을 구상하고자 한다. 아직까지 이와 관련한 연구는 전 세계적으로 이루어진바 없으며, 본 연구가 최초의 시도이다. 우리가 향후 목표로 하는, 이러한 '선택적' 추간관 용해술이 가능하기 위해선, 약제가 추간관 내부로 주입되었을 때, 가능한 주입지점에서 멀리 확산되지 않아야 한다. 그래야 주변조직을 손상시키지 않으면서 원하는 부위만을 선택적으로 제거할 수 있기 때문이다. 우리는 약제의 약물전달 체계에 변화를 주어, 약제에 이러한 물성을 부여하는 방안을 모색하였다. 이를 위해 이 연구에서 우리가 선택한 약물전달 체계는 플루로닉(pluronic)을 이용해 만든 나노캐리어 시스템(nano-carrier system)이다. 이 시스템은 생체적합성과 약물전달체로서의 기능이 우수하며, 생체 내에서의 안정성이 뛰어나다[14]. 또한 세포 독성이 없고, 단백질 약물과 금속나노입자 등 다양한 모델 약물들에서 90% 이상의 효율적인 포집율을 보여주었다[15,16]. 게다가 lysozyme, BSA, VEGF, BMP-2 등 다양한 단백질 약물들을 충전시킨 후 방출거동을 관찰한 결과, 방출속도의 제어뿐만 아니라 방출된 단백질 약물들의 생물학적 활성도를 거의 100% 안정적으로 유지시켜 주는 결과를 나타

념으로서, 나노 캐리어 안에 단백질 약물의 충전과정 및 방출과정 동안 단백질의 변성에 전혀 영향을 주지 않는 것을 확인하였다[15]. 이 플루로닉 나노캐리어는 생체에 적용했을 시 소수성이 증가하여 약물을 운반하는 캐리어 간에 응집되는 현상을 기대할 수 있으며, 충전(loading)된 약물을 서방형으로 배출하므로 생체 내에서 약물이 급격하게 퍼져나가는 현상을 방지할 수 있다. 따라서 이 나노캐리어에 단백질성분의 수핵용해제인 카이모파파인을 충전시킨 후, 추간판 내부로 주입하면, 약제의 확산되는 범위가 카이모파파인 단독으로 주입했을 때에 비해 일정 정도 제한될 수 있을 것이라 예상된다.

이러한 특성을 통해 수핵용해제가 추간판 내부에서 필요이상 확산되는 현상을 제어할 수 있다면, 확산범위를 조절할 수 없는 기존의 용해약제에 비해, 주입지점 주변부의 정상조직을 보다 잘 보존할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 그러므로 본 논문에선 이러한 플루로닉 기반의 나노운반체에 충전된 카이모파파인 제제를 인간 사체 추간판 내부에 주입하여, 카이모파파인 제제가 확산되는 범위를 관찰하였다. 이를 통해 이 약제시스템이 향후 개발을 목표로 본 연구진이 개념을 제안하는 '선택적 화학적 수핵용해술' 즉, 시술바늘의 주입지점의 병변부위만을 선택적으로 제거하는 화학적 척추중재시술의 기반약제로 기능할 수 있는지 그 가능성을 고찰해 보고자 한다.

2. 본론

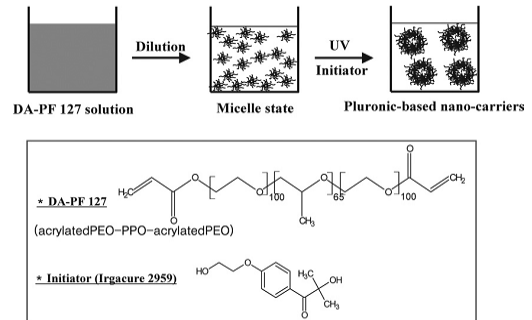
2.1 실험기간

이 실험은 총 3주에 걸쳐 진행되었다. 과정별로 나누어 보면, 플루로닉을 재료로 나노캐리어를 제작하는데 4일, 제작된 약물을 추간판에 주입 후 대기하는 기간 1주, 그리고 약물이 주입된 추간판의 조직학적 분석을 위한 표본제작에 1주 가량이 소요되었다.

2.2 실험방법

실험에 쓰이는 추간판은, 두 구의 카테바(cadavar)의 척추뼈(vertebral body)를 횡단면으로 톱질하여 15개의 추간판 부위를 적출하였다. 각 추간판은 위 아래의 종말판(endplate)을 포함하는 척추뼈(vertebral body)에 둘러 쌓인 상태로 적출되었다. 카이모파파인의 서방형 분비를 위해 사용될 나노운반체(nano-carrier)는 플루로닉

(Pluronic) 중합체를 기반으로 말단기가 아크릴레이트 그룹(di-acrylate; DA)으로 치환된 플루로닉 F 127(DA-PF 127)과 플루로닉 F 68(DA-PF 68)의 두 종류를 사용하여, 광가교(photo-crosslinking) 반응[14]을 통해서 플루로닉의 소수성 결합에 의해 발생한 미포(micelle)에 자외선 빛의 조사 및 광개시제(initiator)의 첨가를 통한 화학적 결합에 의해 제조되었다 (Fig. 1).



[Fig. 1] Schematic representation of the preparation of pluronic-based nano-carriers by single phase photo-polymerization. (This diagram is extracted from the cited paper under original author's approval)

그 구체적인 방법은, 플루로닉 F-127(상품명: PF 127, 제조사: BASF Corp.) 5g 및 10배 몰의 아크릴로일 클로라이드(제조사: Aldrich)와 트리에틸아민(제조사: Aldrich)을 50ml 무수 톨루엔에서 24시간 동안 아르곤 대기 하에서 교반시켜 플루로닉 F-127의 히드록시기를 아크릴화 하였다. 아크릴화된 플루로닉 F-127을 무수 다이에틸 에테르에서 침전시키고 여과한 다음 진공 하에서 3일 동안 건조시켰다. 아크릴화 정도는 300MHz 1H-NMR 스펙트로미터(JNMLA300WB FT-NMR Spectrometer, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였고, 98% 이상 아크릴 작용기로 치환된 다이아크릴레이트(diacrylate) 플루로닉 F-127(이하, DA-PF 127 이라 함)이 제조됨을 확인하였다.

이렇게 만든 DA-PF 127을 탈이온수에 용해하여 10.0%(w/w)의 전구체 용액을 제조한 뒤, 0.77%(w/w)의 농도를 갖는 희석된 전구체 용액을 제조하였다. 희석된 전구체 용액에 70% 에탄올에 녹인 광개시제 이가큐어 2959 (제조사: Ciba Specialty Chemicals Inc.)를 0.05%(w/w)양으로 첨가하였다. 이어서, 필터를 제거한

1.3mW/cm² 자외선 램프(VL-4.LC, 8W, Vilber Lourmat, France)를 광원으로 15분간 조사하여 본 실험에 사용된 플루오닉-기반 나노운반체를 제조하였다. 플루로닉 F-68 (상품명: PF 68, 제조사: BASF Corp.)에 대해서도 같은 방법의 공정을 시행하였다. 이렇게 제조된 나노운반체들은 저온에서는 팽창하며 고온에서는 수축하는 온도 민감성 특성을 지니게 되므로, 나노운반체(300 uL)에 카이모파파인(200 units/50 uL)을 첨가한 용액을 4°C에 12시간 동안 방치하여 카이모파파인이 자발적으로 팽창된 나노운반체 안으로 충전(loading) 되도록 하였다.

사체로 부터 얻은 15개의 추간판은 주입되는 카이모파파인의 조성에 따라 각각 다섯 개씩 총 세군으로 분류하였다. 각 군에는 카이모파파인 (200 units) 350ul 이 주입되었는데, 용액의 조성에 따라 (A)군 1-5번 추간판에는 대조군으로서 기존의 일반적인 카이모파파인 용액이 주입되었고, (B)군 6-10번 추간판에는 DA-PF 127을 기반으로 한 나노운반체에 충전된 카이모파파인이, (C)군 11-15번 추간판에는 DA-PF 68을 기반으로 한 나노운반체에 충전된 카이모파파인을 주입하였다. 카이모파파인 용액의 주입은 1mm의 주사기를 사용하여 추간판의 앞쪽에서 뒤쪽으로 횡방향 중심선을 따라 주입하였다. 주사 1주일후 추간판을 횡방향으로 절개하여, 추간판 내부에 진입한 주사바늘의 끝부분이 놓인 지점을 중심으로, 수핵이 용해되어있는 모습을 조직검사로 관찰하였다.

2.3 분석방법

카이모파파인의 작용은 추간판 수핵내에서 미세적 구조변화를 통해 이루어지므로, 그 작용의 범위를 육안적으로 명확히 구분하는 것은 어렵다. 따라서, 실제적 계측 데이터는 병리학교실에서 수핵 내 구조물의 정렬상태를 현미경조건으로 분석하여 변화가 관찰되는 곳의 범위를 측정하는 방식으로 진행하였다. 그 구체적 방법은 다음과 같다. 채취된 각 추간판들은 10%의 neutral buffered formalin에 1주일간 고정 시키고, ethylene diamine tetra acetic acid에 탈회(decalcification) 시킨 후 파라핀 절편하였다. 각 조직들을 파라핀에 함몰한 후 박절기(microtome)를 이용해 5um의 두께로 절편내고 헤마톡실린/에오신(H&E) 염색 후 광학현미경(Olympus)으로 관찰하며, 추간판의 손상된 용적의 표면적을 계측하였다. 그리고 One-Way ANOVA를 이용해 각 군별 추간판 용해면적의 평균에 차이가 있는가를 분석하였다.

(유의수준 $\alpha = 1\%$)

2.4 실험결과

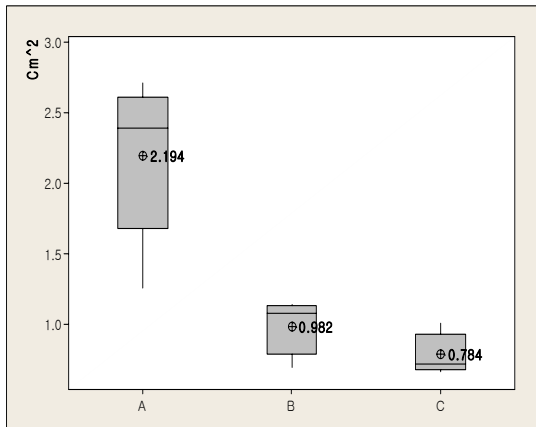
조직학적 검사로 수핵내 미세구조가 파괴된 영역을 관찰해본 결과 일반 카이모파파인을 주입한 그룹(A)의 추간판내 용해면적은 평균 2.2±0.7 Cm² 이었고, 나노운반체를 사용한 그룹 (B)와 (C)의 평균 용해면적은 각각 0.98±0.24 Cm², 0.784±0.18 Cm²이었다 (table 1, Fig 2). 나노운반체를 사용한 그룹은 일반카이모파파인을 사용한 그룹에 비해 추간판 내 카이모파파인의 확산범위가 통계적으로 유의하게 적었으며, 나노운반체 그룹간에는 의미 있는 차이가 없었다. (p<0.01) 육안적 관찰상, 추간판을 횡절개한 단면을 보면 일반 카이모파파인 그룹에서 보다 광범위하고 확연한 추간판 손상의 모습이 나타났다 (Fig. 3). 이러한 육안적 소견은 조직학적 변화의 결과를 반영하고 있다.

조직학적 소견을 보면, 일반 카이모파파인을 사용한 그룹은 추간판내로 주입된 카이모파파인이 붉은 무정형 물질 (amorphous eosinophilic material)의 소견으로 넓게 퍼져있으며 추간판의 기질과 세포들이 전반적인 구조적 변형을 보이는데 비해 플루로닉을 기반으로 한 나노캐리어를 사용한 그룹에선 카이모파파인의 확산이 좀더 제한적이며, 그 범위의 바깥 영역에선 추간판의 기본 구조가 상대적으로 보다 잘 유지되어 있다 (Fig. 4).

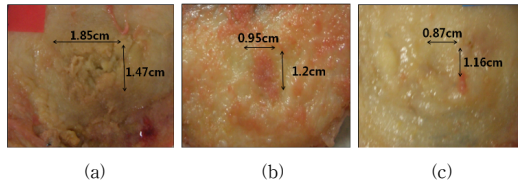
[Table 1] Areas of destruction field of each group

	Disc no.	Destruction area (Cm ²)	Mean destruction area (Cm ²)
Group A Ordinary chymopapain	1	2.71	2.2±0.7
	2	2.1	
	3	1.26	
	4	2.51	
	5	2.39	
Group B NC(DA-PF127) chymopapain	6	1.12	0.98±0.24
	7	0.69	
	8	1.14	
	9	1.08	
	10	0.88	
Group C NC(DA-PF68) chymopapain	11	0.66	0.784±0.18
	12	0.69	
	13	1.01	
	14	0.84	
	15	0.72	

(NC : nano-carrier)

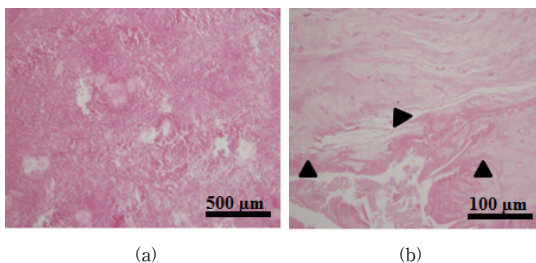


[Fig. 2] Graphs of destruction area of each group. Statistically significant differences in areas of dissolution field were observed between group using nano-carrier (A and B) and group using ordinary chymopapain (C). There was no statistically significant difference between nano-carrier groups ($p < 0.01$).



[Fig. 3] Gross findings of transverse plane of bisected disc after chemonucleolysis using each chymopapain group.

Sample disc after injection of ordinary chymopapain (a), chymopapain loaded in DA-PF 127 based nano-carrier (b) and chymopapain loaded in DA-PF 68 based nano-carrier (c). In disc (a), more distinct destructed field is seen, compared with that of disc (b) and (c) (demarcated by scale bars)



[Fig. 4] Microscopic findings of intervertebral discs after chymopapain injection.

(a) Sample disc of ordinary chymopapain group (x40 Magnification)

(b) Sample disc of chymopapain loaded in DA-PF127 based nano-carrier group (x200 Magnification) In sample (a) disc, chymopapain is widely distributed in the findings of amorphous eosinophilic material, and basic microstructure and cells of disc are largely degenerated. By comparison, in sample (b) disc, the working range of chymopapain is more limited (demarcated by arrow head) and the basic microstructure of disc beyond the effective region is maintained better.

3. 결론 및 고찰

본 연구는 선택적 화학적 수핵용해술을 개발하기 위한 기반약제의 발굴을 위해 수행되었다. 기존의 화학적 수핵용해술에 쓰이는 약제들은 추간판 내부로 주입시, 용액이 광범위 하게 확산되어 퍼져나가는 상황을 제어할 방법이 없다. 따라서, 시술바늘이 위치한 주입지점의 조직만 일정하게 제거하고, 그 주변부의 정상조직은 최대한 보존하고자 하는 선택적 시술의 약제로는 적합하지 않다고 볼 수 있다. 이러한 기존 약제의 특성을 개선하기 위해 본 연구에선 플루로닉을 기반으로 제작된 나노캐리어에 수핵용해제인 카이모파파인을 충전시켜 추간판에 주입하였다. 그 결과 일반 카이모파파인 제제에 비해 상대적으로 확산이 적게 일어나 주사된 지점을 중심으로 머물며 화학적 용해를 일으키는 것으로 나타났다. 이러한 약리적 특성은 추간판내 주입되는 화학용해제의 약제 작용범위를 일정영역 내로 제한할 수 있는 가능성을 제시하므로, 향후 선택적 화학적 수핵용해술의 모델을 만드는 데 기반원리를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

카이모파파인은 최초로 개발된 수핵용해제로서, 1960년대부터 활발히 임상에서 시술되어 왔으나, 2000년 이후로는 생산이 중단되고, 현재는 거의 쓰이지 않는다. 이 약제의 도입 초기엔 일부 환자에서 아나필락시스의 발생이 문제로 제기되었지만, 이 문제는 이후 환자의 선별과 항히스타민치료를 통해 해소되었다. 그럼에도 화학적 수핵용해 시술이 임상현장에서 외면을 받게 된 중요한 이유는, 약제를 추간판 내부로 주입시 그 확산범위가 조절이 되지 않으므로, 추간판 내부에 광범위한 파괴를 일으킬 수 있기 때문이다. 그로 인해 중재시술이 지향하는 최소침습적 치료(minimally invasive treatment)라는 대의에 어긋나는 결과를 가져오게 된다. 이러한 부작용에 관한 기존의 연구내용은 다음과 같다.

카이모파파인이 추간판의 중심부에서 크게 확산되며, 디스크 내부의 수핵을 전체적으로 훼손시키게 되면, 수핵은 신체 하중의 완충 및 분산 기능을 상실하여, 해당 추간판과 그 위, 아래의 후관절로 이루어진 척추분절의 기능적 단위의 작용과 균형에 영향을 미칠 수 있다[17]. 즉, 추간판이 신체의 하중을 담당하는 기능이 줄어들게 됨에 따라 후관절이 지탱해야 하는 하중이 늘어나고 그에 따라 후관절에 골관절염이 발생할 수 있다[17,18]. 카이모파파인 시술 후 영상학적 소견을 보면[19], 수핵의 용적감소에 의해 추간판의 높이가 낮아져 있고 MRI의 T2 영상강도가 크게 저하되는 것을 볼 수 있다. 이러한 문제들로 인해 현재 임상에서 화학적용해술은 잘 사용되지 않으며, 카이모파파인을 이용한 임상연구는 2000년 이후로는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 화학적용해술이 다시금 임상에서 그 가치를 발휘하기 위해선, 새롭게 추간판의 보존성을 높이는 방법을 찾아야 한다. 이를 위해 본 연구진은 '선택적 화학적 수핵용해술'이라는 개념을 제안하고자 한다. 이 개념은, 본 연구진이 세계 최초로 개발한 방향제어형 '선택적 플라즈마 척추수핵 제거술'[12]의 원리를 응용해 플라즈마빔 대신에 화학적 약제를 사용해 척추의 보존성을 높이는 중재시술방법을 구현하는 것을 목표로 한다. 이를 실현하기 위해선 서론에서 언급한 것처럼, 척추 추간판 수핵 내 병변의 위치로 시술바늘을 방향제어시키는 기반기술 위에, 약제가 갖추어야 할 특성으로서, 약제는 주입지점에서 멀리 퍼져나가지 않고, 가급적 주입지점에 머물러 있는 성상을 지녀야 한다. 약제에 이러한 물성을 부여하기 위해, 우리는 생체적합성과 화학적 안정성을 지니고 있으며, 생체내 주입 시 소수성이 증가하여 약제간 응집되는 현상을 기대할 수 있고, 약제가 서방형으로 작용하여 약물이 급격하게 주변조직을 파괴하며 퍼져나가는 현상을 방지할 수 있을 것으로 기대된 플루로닉 기반의 나노캐리어에 카이모파파인을 충전시키는 방법으로 그 가능성을 실험하였다.

본 실험에 사용된 nano-carrier의 기반물질인 플루로닉(pluronic)은 poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethyleneoxide)(PEO-PPO-PEO)의 구조로 구성되어 있으며, 온도에 따라 변이되는 작용양상을 지닌 생체적합성(biocompatible) 물질이다[20]. 그 구성성분중 PPO 부분이 소수성의 성질을 나타내며 특정한 온도(critical micelle temperature) 및 농도(critical micelle

concentration)에서 소수성 결합이 발생하여 미포(micelle)를 형성하게 되는데[21], 플루로닉을 이용한 기존의 나노운반체는 그 조합과정에서 독성 용매(toxic solvent)와 고속의 초음파처리(high-speed ultrasonification)를 요하기 때문에, 운반체에 함유된 약제를 변성시킬 수 있으며, 불안정한 구조를 지니고 있는 단점이 있다[14]. 이번 실험에선 기존의 통상적인 방법으로 제조된 나노운반체가 아니라 본 연구진이 원천기술을 확보한 평가교 기법[14]에 따라, 플루로닉의 소수성 결합에 의해 발생한 미포(micelle)에 자외선 빛의 조사 및 광개시제(initiator)의 첨가에 의해서 화학적 결합에 의해서 발생한 구형 모양의 나노젤로 제작하였다. 따라서 화학적 결합에 의해서 형성되었기 때문에 물리적 결합에 의해서만 형성된 기존의 미포(micelle) 상태의 나노운반체보다 훨씬 더 안정하며 약물을 효율적으로 충전 및 전달할 수 있는 기능을 갖추고 있다[14].

한편, 추간판을 용해시킬 수 있는 약제 중, 우리가 최근 중국 등 일부국가의 임상에서 사용되고 있는 콜라겐 분해효소(collagenase)[22]나, 에탄올(ethanol)[23]대신, 카이모파파인을 선택한 이유는, 카이모파파인이 척추 추간판의 탈출부위 제거에 좀더 특화된 화학적 성질을 지니고 있다고 판단했기 때문이다. 그 이유는 다음과 같다. 척추의 추간판은, 중심부의 수핵과 그것을 둘러싼 섬유륜이라는 두 부분으로 구성되어 있다. 그리고 척추 추간판 탈출질환이란, 추간판을 둘러싼 보호막 역할을 하는 섬유륜 부분이 약해져서, 중심의 수핵이 바깥으로 빠져나가는 질환이다. 그러므로 만일 치료과정에서 섬유륜이 손상된다면, 그 손상된 섬유륜 부위로 수핵은 지속적으로 반복해서 탈출할 가능성이 있다. 따라서 시술시 추간판의 수핵 영역은 제거하되, 섬유륜 영역은 최대한 보존할 수 있는 방법을 택해야 한다. 그런데 카이모파파인은 수핵의 주요기질의 하나인 프로테오글리칸(proteoglycan)에만 선택적으로 작용하는 특성이 있고[7], 콜라겐에 대해선 작용력이 약하므로, 주로 콜라겐 성분으로 이루어진 섬유륜 구조를 파괴할 가능성이 콜라겐 분해효소 같은 여타의 화학용해제보다 낮다고 할 수 있다. 따라서 우리는 향후 추간판의 정상조직을 가급적 보호하고 병변부위만 선택적으로 제거하는 화학용해술을 개발해 내기 위해선, 현재의 여러 수핵용해약제 중 카이모파파인이 후보약제로 가장 적합하다고 생각한다. 본 실험은 생체 실험의 전단계로서 사체의 추간판에 적용한 실험이므로,

앞으로 살아있는 동물실험 등을 통해 생체 내에서의 작용양상에 대한 연구를 보완하여야 할 것이다.

References

- [1] Adam D, Pevzner E, Gepstein R. Comparison of percutaneous nucleoplasty and open discectomy in patients with lumbar disc protrusions. *Chirurgia (Bucur)*. 108(1): pp. 94-8. 2013.
- [2] Laxmaiah Manchikanti, Vijay Singh, Frank J.E. Falco, Aaron K. Calodney, Obi Onyewu, Standiford Helm II, Ramsin M. Benyamin, Joshua A. Hirsch. An Updated Review of Automated Percutaneous Mechanical Lumbar Discectomy for the Contained Herniated Lumbar Disc, *Pain Physician*, 16 p.151-84 2013.
- [3] Singh V, Manchikanti L, Calodney AK, Staats PS, Falco FJ, Caraway DL, Hirsch JA, Cohen SP. Percutaneous lumbar laser disc decompression: an update of current evidence. *Pain Physician*. 16(2) pp. 229-60. 2013.
- [4] Ogbonnaya S, Kaliaperumal C, Qassim A, O'Sullivan M. Outcome of nucleoplasty in patients with radicular pain due to lumbar intervertebral disc herniation. *J Nat Sci Biol Med*. 4(1) pp.187-90. 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0976-9668.107288>
- [5] Wardlaw D, Ritchie IK, Sabboubeh AF, Vavdha M, Downing M, Eastmond CJ. Prospective randomized trial of chemonucleolysis compared with surgery for soft disc herniation with 1-year, intermediate, and long-term outcome: part II: the radiological outcome. *Spine*. 1:38(17) pp.1058-64. 2013.
- [6] Deyo RA. Chymopapain for herniated intervertebral disc. A methodologic analysis and an agenda for future research. *Spine*. 9(5) pp.474-8. 1964.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007632-198407000-00010>
- [7] Garvin PJ, Jennings RB, Stern IJ. Enzymatic digestion of the nucleus pulposus: a review of experimental studies with chymopapain. *The Orthopedic clinics of North America*. 8(1) pp.27-35. 1977.
- [8] Smith L. Enzyme Dissolution of the Nucleus Pulposus in Humans. *Jama* 187 pp.137-40. 1964.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1964.03060150061016>
- [9] Chen YC, Lee SH, Saenz Y, Lehman NL. Histologic findings of disc, end plate and neural elements after coblation of nucleus pulposus: an experimental nucleoplasty study. *Spine J*. 3(6) pp.466-70. 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1529-9430\(03\)00143-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1529-9430(03)00143-8)
- [10] Castro WH, Halm H, Jerosch J, Steinbeck J, Meyer M, Gohlke KH et al. Long-term changes in the magnetic resonance image after chemo nucleolysis. *Eur Spine J*. 3(4) pp.222-4. 1994.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02221597>
- [11] Sharps LS, Isaac Z. Percutaneous disc decompression using nucleoplasty. *Pain Physician*. 5(2) pp.121-6. 2002.
- [12] Hong YK, Derby R, Wolfer LR, Kim SU, Kang BS, Kim NH, Yoo SH, Lee SJ, Lee SH. An assessment of a new navigatable percutaneous disc decompression device (1'DISQ) through histologic evaluation and thermo-mapping in human cadaveric discs. *Pain Medicine*. 13(8) pp. 1000-3. 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-4637.2012.01447.x>
- [13] Lim JH, Lee HJ, Lee SH. Application of percutaneous cervical nucleoplasty using the navigable disc decompression device in patient of cervical herniated intervertebral disc: a case report. *Ann Rehabil Med*. 37(5) pp. 730-4. 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5535/arm.2013.37.5.730>
- [14] Choi WI, Tae GY, Kim YH. One pot, single phase synthesis of thermo-sensitive nano-carriers by photocrosslinking of a diacrylated pluronic. *J. Mater. Chem*. 18 pp.2769-2774. 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b801262h>
- [15] Choi WI, Kim YH, Tae GY. Controlled release of proteins from Pluronic-based nano-carrier. *Macromolecular Research*. 19(6) pp.639-642. 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13233-011-0602-9>
- [16] Choi WI, Kim JY, Kang C, Byeon CC, Kim YH, Tae GY. Tumor regression in vivo by photothermal therapy based on gold-nanorod-loaded, functional nanocarriers. *ACS Nano*. 5(3) pp.1995-2003. 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/nm103047r>
- [17] Gotfried Y, Bradford DS, Oegema TR, Jr. Facet joint changes after chemonucleolysis-induced disc space narrowing. *Spine*. 11(9) pp. 944-50. 1986.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007632-198611000-00016>
- [18] Dunlop RB, Adams MA, Hutton WC. Disc space narrowing and the lumbar facet joints. *J Bone Joint Surg Br*. 66(5) pp.706-10. 1984.
- [19] Castro WH, Halm H, Jerosch J, Steinbeck J, Meyer M, Gohlke KH et al. Long-term changes in the magnetic resonance image after chemonucleolysis. *Eur Spine J*. 3(4) pp.222-4. 1994.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02221597>
- [20] P.Linse, M.Malmsten, Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions.

Macromolecules. 25 pp.5434-5439. 1992.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ma00046a048>

[21] R.Nagarajan, Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic (PEO-PPO-PEO) block copolymers, Colloids Surfaces B. Bio interfaces 16 pp.55-72. 1999.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00061-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00061-2)

[22] Wu Z, Wei LX, Li J, Wang Y, Ni D, Yang P, Zhang Y. Percutaneous treatment of non-contained lumbar disc herniation by injection of oxygen-ozone combined with collagenase. Eur J Radiol. 72(3) pp.499-504. 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.07.029>

[23] Riquelme C, Musacchio M, Mont'Alverne F, Tournade A. Chemonucleolysis of lumbar disc herniation with ethanol. J. Neuroradiol. 28(4) pp.219-29. 2001.

홍 영 기(Young Ki Hong)

[정회원]



- 2009년 2월 : 고려대학교 대학원 의학과 (의학석사)
- 2011년 8월 : 고려대학교 대학원 의학과 (의학박사)
- 2011년 10월 ~ 2012년 9월 : 고려대학교 의과학 연구센터 연구교수
- 2012년 10월 ~ 2013년 2월 : 고려대학교 실용해부연구소 연구교수
- 2013년 3월 ~ 현재 : 청주대학교 스포츠의학과 조교수

<관심분야>

척추 디스크 질환, 재활치료

최 원 일(Won Il Choi)

[정회원]



- 2007년 8월 : 광주과학기술원 신소재공학부 (공학석사)
- 2012년 8월 : 광주과학기술원 신소재공학부 (공학박사)
- 2012년 9월 ~ 2014년 5월 : Brigham and Women's Hospital (BWH) & Harvard Medical School (HMS) 박사후 연구원

• 2012년 12월 ~ 2014년 6월 : Massachusetts Institute of Technology (MIT) 박사후 연구원

• 2014년 6월 ~ 현재 : 대응제약 생명과학연구소 신제형연구실 책임연구원

<관심분야>

나노 의공학, 나노 바이오

태 기 용(Gi Yoong Tae)

[정회원]



- 1994년 2월 : 카이스트 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 2002년 6월 : 캘리포니아 대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 2002년 3월 ~ 2004년 2월 : 워싱턴대학교 생체공학 선임연구원
- 2004년 월 ~ 현재 : 광주과학 기술원 신소재공학과 교수

<관심분야>

생체재료, 재생의료