creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000502524

의학박사 학위논문

빌리루빈 나노물질을 이용한 방사선치료에 따른 정상조직의 독성 완화

Alleviation of radiation-induced normal organ toxicity using Bilirubin Nanoparticles

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

조 윤 영

빌리루빈 나노물질을 이용한
방사선치료에 따른 정상조직의 독성 완화

지 도 교 수　　김　영　석

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2021년　8월

울 산 대 학 교 대 학 원
의　　학　　과
조　윤　영

조윤영의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원 안 지 용 (인)

심사위원 박 진 홍 (인)

심사위원 정 현 석 (인)

심사위원 박 상 규 (인)

심사위원 김 영 석 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 8 월

감사의 글

먼저 이 논문이 완성되기까지 여러 가지 부족한 점을 관심과 애정으로 지도해주신 김영석 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 논문 심사를 맡아 주시고 소중한 조언과 도움을 주신 안지용, 박진홍, 정현석, 박상규 교수님께도 고개 숙여 감사 드립니다. 마지막으로 언제나 변함없는 사랑과 용기를 주시며 좋은 날들과 어려운 날들을 함께하며 제 곁에서 응원을 아끼지 않는 사랑하는 가족 여러분들에게 감사와 사랑을 보냅니다.

국문요약

연구목적

국내의 암 발생자는 해마다 증가하며 2017년 국가 암통계 자료에 따르면 2017년 조 발생률은 인구 10만 명당 453.4명이다. 생활양식이 점차 서구화되어 가고 있는 우리나라의 경우 전립선암, 유방암의 증가가 지속될 것으로 생각되며 향후 방사선치료가 필요한 암 환자수 또한 증가할 것으로 예상할 수 있다. 방사선치료는 알려진 치료 효과에도 불구하고, 치료 이후 주위 정상조직에 급 만성 부작용을 일으키는 경우가 있는데, 예를 들어 골반부위 방사선치료 이후 60~80%에서 급성 장독성을 보고하고 있다. 치료 기술 발전으로 이러한 부작용의 가능성은 줄어들고 있으나, 장기 암 생존자의 증가, 부작용의 발생시 뚜렷한 치료약제나 해결책이 없음을 고려하면, 방사선 치료 독성 발생의 가능성을 낮추는 것이 가장 중요하다. 따라서 본 연구에서는 빌리루빈 나노물질을 이용하여 방사선치료 이후 나타나는 방사선치료 영역 주위의 정상조직 변화를 완화 시킴으로써 방사선 장독성의 부작용을 줄이고자 연구를 계획하게 되었다.

연구방법

빌리루빈은 우리 몸의 담즙 구성성분으로 적혈구, 헤모글로빈이 분해되면서 생성되는 Heme의 최종 대사물질이다. 1980년대 후반부터 발표된 여러 연구들을 통해 빌리루빈이 인체 내에서 활성산소를 제거하여 항산화 역할을 하는 것을 보고하였으며, 또한 항염증제로서의 효능에 대한 문헌들이 뒤따라 보고되어 왔다. 하지만 빌리루빈 자체가 수용액에서 전혀 녹지 않아 이를 의료용 소재로 응용한 예는 찾아보기 어려웠다. 이점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 빌리루빈에 친수성 고분자를 결합시켜 합성한 뒤 수용액에서 자기 조립시켜 만든 빌리루빈 나노물질을 이용하여 연구하였다. 이렇게 만들어진 빌리루빈 나노물질을 마우스에 주입한 뒤 복부/골반 부위 방사선조사 이후 소장과 대장의 조직소견을 대조군과 비교하는 과정을 통하여 빌리루빈 나노물질을 이용한 정상조직의 방사선독성의 감소 여부를 확인하고, 나아가 그 기전을 연구하여 급성 방사선 장독성과 관련된 후보물질을 탐색하고자 하였다.

연구결과

먼저 15 Gy의 방사선조사 이후 실험동물의 체중 변화를 측정하였다. 빌리루빈 나노물질의 용량에 따라 체중변화의 폭이 달라짐을 확인할 수 있었는데

이는 대조군에 비해 빌리루빈 나노물질 20 mg/kg을 사용한 군에서 체중 감소 이후 체중의 회복이 빨라지고, 더 잘 되는 것을 확인 할 수 있었으며 세 군 모두에서 약 7일 째 장독성으로 인한 약 30% 정도의 체중감소는 공통적으로 관찰되었다.

빌리루빈 나노물질을 이용한 방사선유발 장독성의 완화실험으로 15 Gy의 방사선조사 이후 4주 째 적출한 소장에서 대조군과 비교하여 20 mg/kg의 나노물질 투약군이 조직소견에서 lamina propria의 섬유화가 적으며 상피의 편평화 소견이 보이지 않음을 확인하였다. 또한 15 Gy의 방사선조사 이후 2주 째 적출한 대장에서 대조군, 나노물질 5 mg/kg 투여군, 20 mg/kg 투여군을 비교하여 염증반응이 대조군에서 훨씬 심하게 발생하며 정상 상피의 구조가 무너짐이 관찰되었다. 추가적으로 FITC-dextran을 장기적출 6시간 전 주입 후 채취한 혈액에서 dextran 농도를 측정하였다. 이론적으로 장의 정상적인 barrier가 문제 없이 존재한다면 dextran의 농도가 혈액에서 검출이 적게 되며, barrier의 손상 정도에 따라 혈액에서 검출량이 증가하게 된다. 본 연구에서는 빌리루빈 나노물질의 사용을 통해 대조군과 비교하였을 때 dextran의 검출량이 감소함을 확인하였고, 이에 따라 장독성이 완화됨을 확인할 수 있었다.

추가적으로 빌리루빈 나노물질의 방사선유발 장독성 완화 기전을 탐구하였다. 사용한 빌리루빈 나노물질의 항염증작용의 기전을 알아보기 위하여 대표적인 pro-inflammatory cytokine들의 소장/대장 내 농도를 quantitative real-time PCR 방법을 이용하여 확인하였다. 이 때 소장에서는 빌리루빈 나노물질의 투여군이 대조군에 비하여 소장 내 IL-1β 및 TNF-α 등의 mRNA 발현량이 감소하는 것을 알아보았으며 이를 통해 빌리루빈 나노물질의 방사선 장독성 완화 기전에 IL-1β 등의 발현 억제를 통한 급성기 염증감소가 있음을 확인할 수 있었다.

결론

빌리루빈 나노물질을 이용하여 방사선 치료 시행 이후 정상조직의 방사선 독성의 완화가 가능하며 이는 부작용의 발생 기전인 급성기의 염증반응을 줄임으로써 주변 정상 조직의 방사선 독성의 감소를 시킬 수 있음을 확인하였고, 추가적으로 염증반응의 기전에 후보가 될 수 있을만한 물질들을 탐색하여 이후 방사선치료에 따라 발생하는 정상조직의 급 만성 독성을 줄이기 위한 약물 개발의 가능성 또한 볼 수 있었다.

중심단어 : 방사선치료, 빌리루빈 나노물질, 정상장기 독성, 완화, 급성염증

차 례

국문 요약 · i
그림목차 · iv
서론 · 1
연구 방법 · 4
연구 결과 · 11
고찰 · 17
결론 · 22
참고 문헌 · 23
영문 요약 · 26

그림 목차

그림 1. 빌리루빈 나노물질(Bilirubin nanoparticles, BRNPs)의 제조 · · 5
그림 2. 빌리루빈 나노물질의 특성화 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 5
그림 3. ICG@BRNPs로 처리한 마우스에서 확인한 생체 장기 내 분포 · · · 6
그림 4. BRNPs 처리한 마우스에서 체중변화 및 주요장기 H&E 염색결과 · 7
그림 5. 방사선 조사 2주후 적출한 대장에서의 대표적인 조직 소견 · · 12
그림 6. 방사선 조사 4주후 적출한 소장에서의 대표적인 조직 소견 · · · 12
그림 7. BRNPs의 용량에 따라 혈액에서 검출된 덱스트란의 농도 · · · · 13
그림 8. BRNPs의 용량에 따른 마우스의 체중 변화 · · · · · · · · · · 14
그림 9. 염증성 사이토카인 발현을 확인한 소장에서의 PCR결과 · · · · 15
그림 10. 염증성 사이토카인 발현을 확인한 대장에서의 PCR결과 · · · · 16

서론

1. 연구 배경

방사선치료는 골반에 발생한 종양의 치료에서 중요한 역할을 하는데, 근치적 목적의 일차적인 치료방법으로, 또 수술 후 보조적 방사선치료 방법으로도 이용된다. 주로는 골반 전체가 방사선 조사 범위에 들어가게 되며, 최근의 경향에 따라 더 높은 종양 제어율을 얻기 위해 더 높은 양의 방사선을 조사하고자 시도하고 있지만, 이 경우에 높은 양의 방사선조사량으로 하여금 골반 내에 주변 정상조직에 일시적/영구적인 손상을 입히게 된다. 전세계적으로 2007년 기준 년간 30만명 이상의 환자가 암 치료의 일환으로 골반 방사선 치료를 받았다 [1]. 미국의 경우 2013년 기준 년간 20만명 이상의 환자들이 복부/골반 방사선 치료를 받았으며 그 중 적게는 25%에서 많게는 75%까지의 환자가 급성 장독성을 경험하였다 [2, 3]. 최근에는 미국 내 암 생존자가 점차 증가하는 경향을 보이며 한 연구에서는 방사선 치료 후 발생한 장독성을 보이는 환자가 160만명으로 보았는데, 이는 미국의 과민성장질환을 앓고 있는 환자수인 140만명을 우회하는 넘은 높은 유병률이다 [4]. 이를 중점으로 보았을 때, 암환자의 장기 생존이 가능해짐에 따라 치료 시/후의 부작용을 줄이는 것이 이후 환자의 삶의 질을 향상 시키고 일반적인 삶을 영위하는 데 도움이 될 것이다.

급성 방사선 장염의 경우 주로 방사선 치료 시작 후 3개월 이내에 나타나게 되는데, 복부/골반 방사선 치료를 시행 받는 환자들 중 많게는 75% 까지 하부위장관의 증상을 호소하였고, 50% 이상의 환자들이 이로 인해 치료가 중단되거나 연기됨을 경험하였다 [3, 5]. 급성 형태의 경우 방사선 치료 후 수일 내에 증상이 발생할 수 있는데 초기에는 주로 구역감이 흔하게 나타나며, 주로 치료 시작 후 2~3주의 시점에서 가장 빈번하게 발생하며 이 시기에 가장 많이 호소하는 증상은 설사이다. 대부분의 경우 장독성으로 인한 급성 증상들은 방사선치료 종료 후 짧게는 1개월에서 길게는 3개월 이후에는 점차 사라지게 된다. 급성 방사선 장염의 병태생리학적인 기전으로는 크게 방사선 조사로 인해 빠르게 증식하는 crypt 장상피세포들이 사멸하게 되는 것과, lamina

propria에서 급성 염증반응을 유도하게 되는 것으로 나눌 수 있다 [6]. 조직학적으로는 방사선 조사 후 수 일이 지나면 세포 내 단백실과 섬유질 등이 침착 되며 장벽의 염증반응과 부종을 일으키는 것을 관찰 할 수 있는데 [7], 융모세포의 길이와 숫자가 줄어들며, 장의 점막기능에 영향을 주어 단백질, 전해질뿐만 아니라 담즙산과 물의 흡수가 저하됨에 따라 설사 발생에 기여하게 된다 [8, 9].

만성 방사선 장염의 경우 주로는 치료 이후 6개월에서 3년 사이에 발생하는 데 잠복기를 지나 20-30년 이후에 발생하는 경우도 종종 보고되고 있다. 자궁경부암에서 방사선 치료 이후 발생하는 만성 장독성의 경우 9 ~ 10% 정도로 보고된 바 있다 [10]. 주로는 점막의 위축, 장벽의 섬유화, 미세혈관의 경화 등으로 인해 배변활동의 변화, 영양소 흡수의 저하 및 장 운동이상 등을 들 수 있다. 심한 경우에는 장 폐색, 장 천공 뿐만 아니라 주변 조직/기관으로의 누공도 발생할 수 있다. 만성 방사선 장염의 경우 특히 장기 암 생존자들에게서 특히 중요한 문제로 치료법이 대부분 보존적인 형태로서 치료의 선택지가 한정적으로 존재하며, 이러한 증상의 발생 자체가 장기적인 병적 상태와 궁극적으로는 사망률에 기여하기 때문이다. 일례로 지속적으로 재발하는 만성 방사선 장염으로 인한 사망률이 10%정도로 보고된 바 있다 [11, 12]. 만성 방사선 장염의 병태생리학적인 기전으로는 방사선 손상이 hydroxyl radical을 매개로 일어나며 이는 transforming growth factor-β1(TGF- β1)의 생성을 촉진하게 되어 잠재적인 섬유소성 및 전염증성 역할을 하게 된다 [13, 14]. 조직학적으로는 점막하 섬유화와 혈관염을 발생시키며 작은 혈관들의 혈전생성을 일으키게 되고 이 과정을 통해 장벽의 허혈, 점막의 궤양, 누공과 collateral vessels들을 발달시키게 됨으로써 대장 출혈, 만성적인 설사, 장 폐색들을 일으키게 된다.

위에 언급하였던 각각의 단편적인 급성/만성 방사선장염 발생뿐만 아니라 급성 장독성이 이후 latent free interval을 거쳐 만성 장독성의 발생에 직접적으로 영향을 준다는 consequential late effect(CLE) 또한 생각해 볼 수 있다. 대규모의 전립선암 환자의 전향적인 삶의 질 연구에서 방사선 치료를 시행 받은 전립선암 환자들에게서 발생한 급성 장독성이 이후 만성 장독성의 발

병에 주요한 역할을 하였던 것을 확인 할 수 있었으며 [15], 급성 장독성과 만성 장독성의 관계를 조명한 systematic review에서 여러 문헌들 중 가장 높은 연관성을 보인 Zelefsky et al.의 연구에서는 grade 2이상의 급성 장독성을 보였던 경우에 이후 grade 2 이상의 만성 장독성을 예측할 수 있는 가장 강력한 인자로 보고 되었다. 이러한 CLE의 mechanism으로는 dose-volume relationship으로 발생된다는 가설과, 여러 동물모델들 [16] 에서 증명된 바와 같이 급성 장독성과 관련된 염증반응의 결과로 intestinal content의 leakage를 만들어 결과적으로는 fibrosis를 일으켜 만성 장독성을 일으킨다는 가설이 있다.

빌리루빈은 우리 몸의 담즙 구성성분으로서 적혈구, 헤모글로빈이 분해되면서 생성되는 Heme의 최종 대사물질이다. 빌리루빈이 축적되면 황달을 일으키게 되어 흔히 독성이 있는 것으로 오해하지만 빌리루빈 자체로는 독성이 없으며 오히려 활성산소를 제거하는 항산화 효과를 가지고 있다. 1980년대 후반부터 발표된 여러 연구들을 통해 빌리루빈이 인체 내에서 활성산소를 제거하여 탁월한 항산화 역할을 하는 것을 보고하였으며, 또한 항염증제로서의 효능에 대한 문헌들 [17-21]이 뒤를 이어 보고되어 왔다. 그러나 빌리루빈 자체가 수용액에서 전혀 녹지 않는 점 때문에 의료용 약품으로 개발하는 시도는 번번히 좌절되어 왔다. 본 연구에서는 '페길화'(-PEG)를 이용하여 빌리루빈에 친수성 고분자를 결합시켜 합성한 뒤 수용액에서 자기 조립시켜 vesicle 형태의 나노입자를 형성하게 한 michelle을 이용하여 정상조직의 방사선독성의 감소 여부를 확인하고 나아가 그 기전 뿐 아니라 급성 염증반응에 관련된 후보물질을 탐색하고자 하였다.

2. 연구 목적

본 연구에서는 빌리루빈 나노물질을 이용한 동물실험을 통해 방사선치료 이후 나타나는 장독성 부작용의 발생 기전의 중심에 있는 염증반응을 줄이는데 효과가 있음을 입증하고, 이를 이용하여 방사선치료 영역 주위의 정상조직 변화를 완화 시킴으로써 방사선 장독성의 부작용을 줄이고자 연구를 계획하게 되었다.

연구대상 및 방법

1. 빌리루빈 나노물질의 합성과 특성

: 본 연구에서 사용된 PEG-bilirubin의 합성 및 이를 기반으로 한 빌리루빈 나노입자의 제조는 Jon, S.등의 2016년 연구 [22] 에 따른 것으로 자세한 제조 및 빌리루빈 나노물질의 분포 및 독성은 다음과 같다.

1) PEG-bilirubin 접합체 합성 및 접합체 기반 나노입자의 제조

0.5 mmol of (ZZ)-bilirubin-IX-alpha와 0.6mmol of EDC carbodiimide를 5ml의 DMSO에 용해시킨 뒤 0.2 mmol의 mPEG2000- NH_2와 150 ul triethylamine을 혼합물에 첨가하고 실온에서 4시간동안 저어준다. 이후 chloroform 200 ml를 첨가하고 0.1M HCL과 brine으로 세척한다. 이후 유기 층을 수집하고 진공하에 농축시킨다. 유리 빌리루빈을 제거한 뒤ether를 농축된 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 침전물을 클로로포름에 용해시켜 이동상으로 클로로포름:메탄올(85:15)을 사용하는 칼럼 크로마토그래피로 정제한다. 마지막으로 용매를 증발시켜 PEG-BR을 얻은 뒤 1H-NMR, UV/VIS spectrometry, MALDI-TOF,IR, elemental analysis를 수행한다.

합성된 PEG-bilirubin 접합체를 친수성 용매인 물이나 PBS buffer에 녹이면 빌리루빈의 소수성 상호작용으로 인해 물과 친화력 있는 PEG가 바깥쪽을 향하게 되고 물과 접촉하지 않으려는 빌리루빈이 안쪽으로 모여서 자기조립을 하고 안과 밖에는 PEG를 가진 친수성부분과 중간에 빌리루빈을 가진 소수성부분이 나노입자를 형성하게 된다. 이렇게 PEG-bilirubin 접합체를 유기용매에 녹인 뒤, film layer를 만들고 친수성 용매를 넣어 PEG-bilirubin 나노입자를 제조한다. 균등한 크기와 zeta potential을 가지기 위해 Nanosizer ZS90을 통해 특성화하고(그림 2), BRNP의 형태는 Tecnai TF30 ST와 Magellan XHR 400L 시스템을 사용하여 TEM 및 SEM으로 조사한다. 나노입자를 만들기 위해 sonication 장치를 이용하고 나노입자

를 형성하지 못한 나머지는 정제과정을 통해 제거한다.

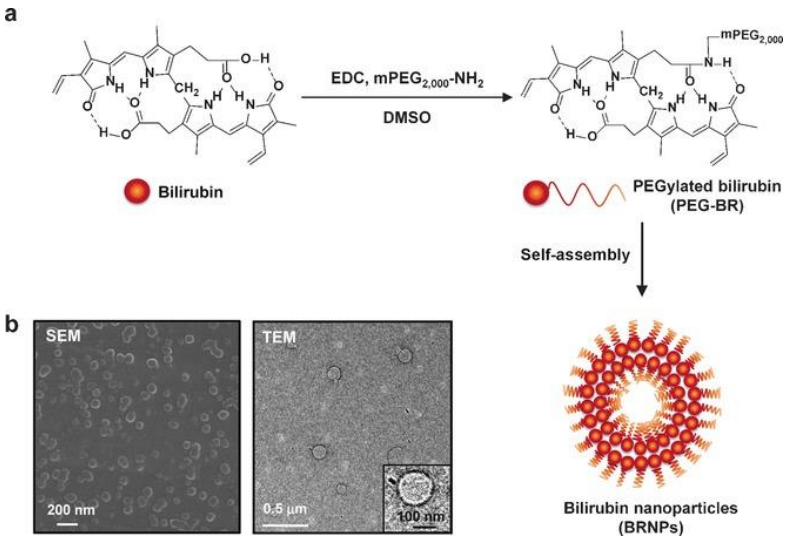

그림 1. 빌리루빈 나노물질(Bilirubin nanoparticles, BRNPs)의 제조. a) 유리 빌리루빈과 폴리에틸렌 글리콜부터 PEG-BR 의 합성 및 합성된 PEG-BR 의 자기조립을 통한 BRNPs 의 제조. b) 합성한 BRNPs 의 SEM 과 TEM 이미지.

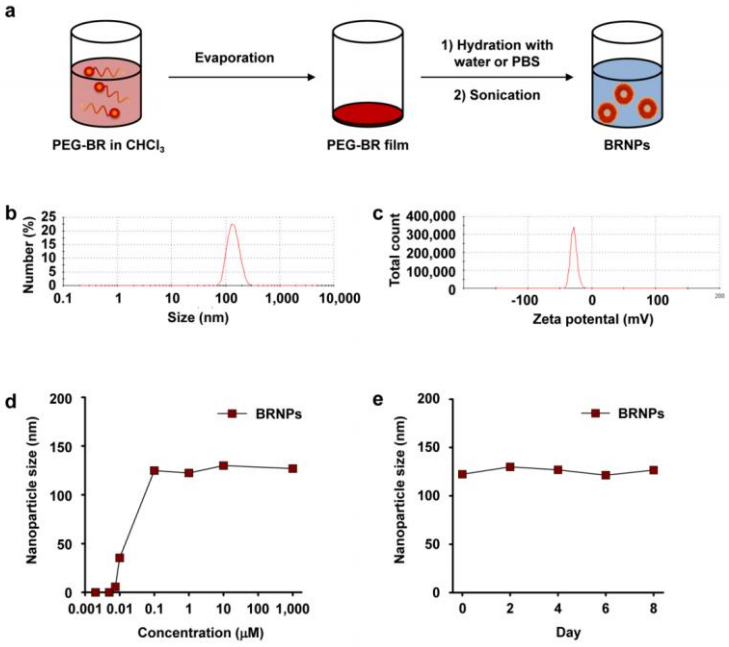

그림 2. 빌리루빈 나노물질의 특성화. (a) BRNPs 합성의 간단한 모식도. (b) Dynamic light scattering size. (c) Zetasizer 를 통해 측정한 zeta potential 분포. (d&e) BRNPs 의 critical nanoparticle 농도와 실온에서의 안정성.

2) BRNPs의 분포와 Toxicity 분석

앞서 설명되었던 BRNPs의 제조를 통하여 Jon, S.등의 연구[22]에서 확인한 BRNPs의 마우스 체내분포 확인 방법은 다음과 같았다. 6주된 암컷 C57-BL/6 마우스를 이용하여 3.5%의 DSS가 포함된 물을 5일간 섭취하고 이후에는 물을 섭취하였고, 대조군인 건강한 마우스의 경우 물만 제공받았다. 5일째 100ul의 ICG@BRNPs가 IV를 통해 마우스에게 주입되었고, 주입 5시간 이후 마우스를 희생시키고 주요 장기(대장, 신장, 간, 비장, 폐와 심장)을 수집하였다. 각 그룹의 형광 강도는 Xenogen IVIS Lumina invivo 이미징 시스템을 사용하여 분석을 통해 BRNPs의 장기내부 분포를 확인하였다. 그 결과 그림 3에서와 같이 DSS로 염증이 유발된 대장에 BRNPs가 선택적으로 분포함을 확인할 수 있었다. 이를 이용하여 본 논문의 실험연구에서도 방사선치료로 인해 급성 염증반응이 일어나는 마우스의 장기에 BRNPs가 특이선택적으로 분포할 것임을 가정하여 진행되었다.

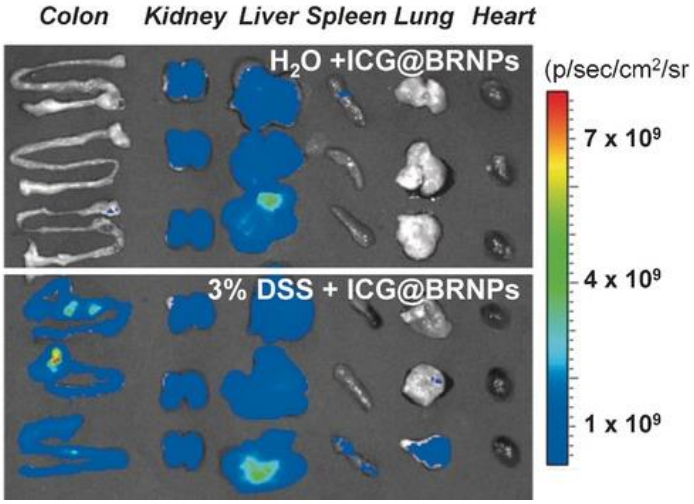

그림 3. ICG@BRNPs로 처리한 마우스에서 확인한 생체 장기 내 분포 이미지. (17 μg ICG; 340 μg BRNPs 로 처리후 5시간 후에 수집함)

이어 Jon, S.등의 연구[22]에서 시행한 BRNPs의 Toxicity 분석은 다음과 같이 진행되었다. 6주의 암컷 C57-BL/6 마우스 6마리에 300 ul의

BRNPs(150mg/kg) 혹은 같은 양의 PBS를 주사한 뒤 1주일 후의 행동과 체중변화를 관찰하고 혈액검사를 시행하였다. 이후 마우스는 희생되어 주요 장기(간, 폐, 신장 과 비장)을 적출하고 조직병리학적 분석을 시행하여 BRNPs의 toxicity를 확인하였다. 그 결과 그림4의 상단에서와 같이 실험동물에 실험약물과 PBS를 각각 투여한 마우스가 체중변화에서 차이를 보이지 않아 in vivo 측면에서 안전함을 관찰하였으며, 그림4의 하단에서 볼 수 있듯 각 장기를 현미경으로 관찰하였을 시에도 주요 장기인 폐, 간, 신장, 비장에서 모두 특별한 변화사항은 관찰 할 수 없었다. 이를 바탕으로 본 논문에서 사용한 BRNPs의 Toxicity 또한 독성 측면에서 유의한 차이를 보이지 않고 안전할 것으로 생각되어 진행되었다.

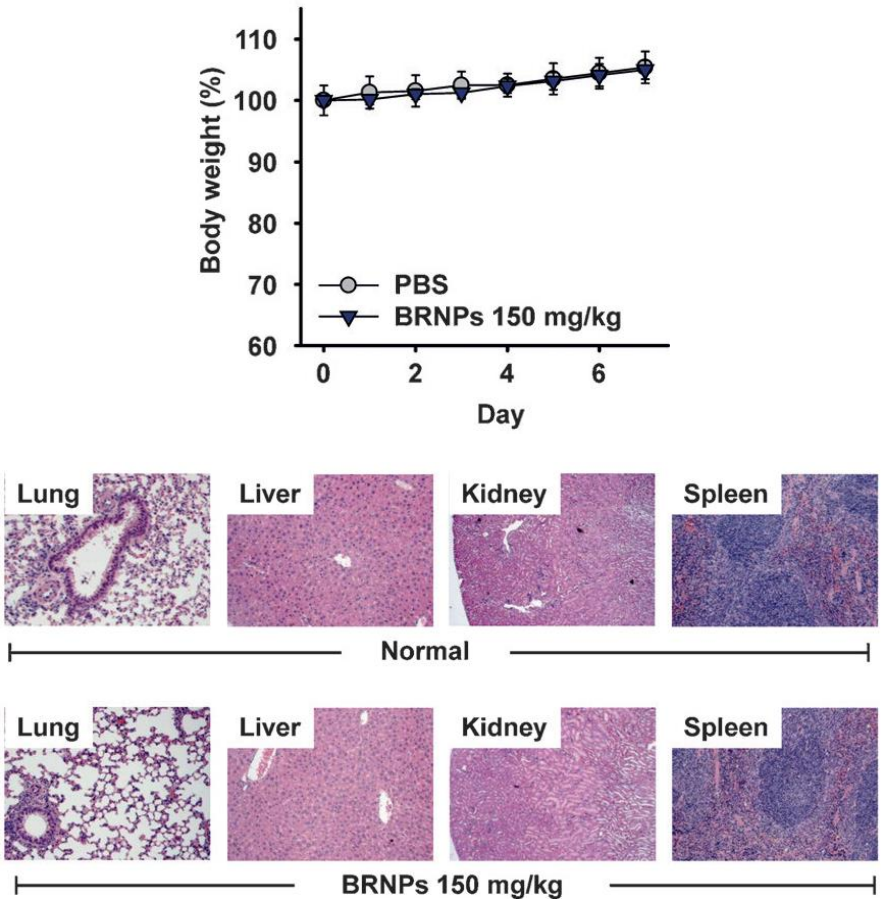

그림 4. (상단) 마우스에 BRNPs나 PBS를 처리 후 시행한 매일의 체중변화 측정 그래프 **(하단)** 마우스에 BRNPs나 PBS를 처리한 뒤 1주일 후에 확인한 주요 장기의 H&E 염색 결과.

3) BRNPs의 Anti-inflammatory effect의 확인- DSS-induced colitis 모델

BRNPs의 anti-inflammatory effect를 확인하기 위하여 앞선 연구[22]에 실험한 방법으로는 DSS-induced colitis 모델 마우스 및 대조군의 건강한 마우스에 1일째 250ul의 BRNP(125mg/kg) 또는 PBS를 정맥주사를 통해 투여하였다. 대장염의 중증도는 체중과 대장 길이의 변화를 측정하고 대장의 조직학적 분석을 통해 대장의 상피 손상 정도와 염증성 세포의 침윤의 정도를 합하여 0-12점으로 평가하였다. 그 결과 장염모델에 PBS를 처리한 마우스에는 대조군과 비교하여 현저하게 짧은 대장 길이가 관찰되었으며, 심각한 염증반응을 시사하는 출혈의 신호를 보였고, 증상적으로는 무른 변과 설사 등이 확인되었다. 그와 반대로 BRNPs를 처리한 장염모델 마우스에서는 출혈이나 대장길이의 변화나 비정상적인 배변활동은 보이지 않았으며 세 군의 H&E 염색에서도 BRNPs 투여군은 점막 및 점막하층 등 대장의 전층으로 적은 양의 면역 세포들의 침투를 볼 수 있었으며 약간의 점막 손상만이 관찰되었다. 그 와는 대조적으로 PBS 처리를 한 장염모델 마우스에서는 점막의 심각한 파괴뿐만 아니라 장상피 손상, 면역세포들의 대량 침투 등이 관찰되었으며 대장염의 중증도를 점수화 하여 비교하였을 시에도 통계적으로 유의하게 차이를 보였다. 본 연구에서는 이를 이용하여 방사선 치료로 인해 유발되는 급성 대장염의 발생을 예방하고 줄일 수 있는 후보물질로 BRNPs를 사용하여 실험하였다.

2. 실험 동물 및 방사선 조사

본 연구에 사용된 동물 모델은 BALB/C 4주령 마우스로 ㈜중앙실험동물에서 구입하여 사용하였다. 마우스는 cage당 4마리씩 수용되었으며 고형사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였으며, 23±1°C및 55±5% 상대 습도 및 명암주기가 12시간 간격으로 조절되는 방에 보관되었다. 마우스는 방사선 조사 전 마취되었으며 고정된 상태로 준비되었다. 전체 복부에 2 Gy/분(전체조사량 15 Gy)를 photon 6MV linear accelerator를 이용

해 조사하였다. 1㎝ 조직보상체(bolus)가 복부에 균등한 방사선 분포를 위해 사용되었으며 각각의 마우스는 single dose로 방사선을 조사 받았다.

3. 연구 디자인

방사선치료 1일전/당일/1일후에 각각 제조된 빌리루빈 나노물질을 마우스에 정맥주사하고, 15 Gy의 방사선량을 조사한 후, 소장/대장을 적출한다. 이후 적출한 소장/대장 조직에서 방사선조사 이후 장독성의 원인으로 생각되는 허혈, 염증 및 섬유화의 정도를 조직학적으로 관찰한다. 또한 혈액/체액을 채취 하여 방사선 유발 장독성의 연관된 물질의 농도 변화를 측정하여 급성 장 독성의 예방 및 완화 효과를 검증한다.

1) 장독성의 조직병리학적 분석 (H&E staining)

조직을 4% 포름알데하이드가 포함된 0.1M PBS에 고정하고 파라핀에 포매한뒤 5um 두께로 잘라 섹션을 만들어 H&E 염색을 시행한다. DSS-induced colitis의 조직병리학적 등급체계 (표 1)을 이용하여 방사선조사 후 유발된 장염의 조직병리학적 분석을 시행하고 점수를 매겨 객관화 한다.

Aspect	Score
Normal	0
Slight increase in cellularity	1
Increased cellularity including neutrophils, mild edema	2
Focal erosions, ulcerations of the edema	3
Large and multifocal mucosal ulcerations	4
Loss of mucosal architecture	5

표 1. DSS-induced colitis 에서 장손상의 조직병리학적 등급체계

0㎎/㎏의 빌리루빈 나노물질을 투약한 대조군과 5㎎/㎏의 빌리루빈 나노물질을 투약, 20㎎/㎏의 빌리루빈 나노물질을 투약한 실험군에 각 15 Gy의 방사선 조사 이후 0주/2주/4주째의 소장과 대장을 적출한다. 적출한

대장의 조직학적인 변화를 확인한다.

2) 혈액에서의 dextran 농도 측정

장기적출 6시간전 gastric lavage방법으로 FITC-dextran을 주입한 마우스에게서 채취한 혈액의 dextran의 농도를 측정한다. 장의 정상적인 barrier가 있다면 혈액에서 검출이 적게 되며, barrier의 손상 정도에 따라 혈액에서 검출량이 증가하게 되므로, 대조군, 빌리루빈 나노물질 저농도/고농도 투약 군에서 방사선치료 시행 시와 시행하지 않았을 때 각각 혈액에서의 dextran 농도를 측정한다.

3) 실험동물의 체중변화 측정

15 Gy의 방사선 조사 이후 실험동물의 체중변화를 측정한다. 대조군, 5mg/kg 빌리루빈 나노물질 투약군, 20mg/kg 빌리루빈 나노물질 투약 군으로 나누어 체중변화 여부 및 그 정도를 확인한다.

4) Quantitative real-time PCR을 이용한 proinflammatory cytokine의 DNA 발현 량 확인

빌리루빈 나노물질의 방사선유발 장독성 완화의 기전을 탐구하기 위하여 대표적인 proinflammatory cytokine들의 소장/대장 내 농도를 quantitative real-time PCR을 이용하여 mRNA발현량의 변화를 확인한다. 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.

Primer	Sequence	Size (bp)
TNF-α	ATG AGC ACA GAA AGC ATG A AGT AGA CAG AAG AGC GTG GT	152
TGF-β1	CCT GCA AGA CCA TCG ACA TG TGT TGT ACA AAG CGA GCA CC	153
IL-1β	GCA CTA CAG GCT CCG AGA TGA AC TTG TCG TTG CTT GGT TCT CCT TGT	1296
H2AX	GCGTGTCCAGGGAGTTTATAAGG GTAGTGGCCTTTCCGCAGCAG	234
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC ACTCCTTCTGTGACTCCAGC	1436
GAPDH	AAGGTCATCCCAGAGCTGAA CTGCTTCACCACCTTCTTGA	137

표 2. Quantitative real-time PCR 에 사용한 primer 의 sequence 및 size

연구 결과

1. 방사선유발 장독성 모델의 확립

본 연구에서 사용하게 된 방사선유발 장독성 모델의 확립을 위해 4주령의 Balb/C 마우스를 이용하여 10/15/20 Gy의 방사선 조사를 시행한 결과 10 Gy에서는 미미한 변화가 관찰되었으며 반면 20 Gy의 조사를 시행한 경우에는 대부분의 실험동물이 사망하였다. 따라서 비교적 장기적 생존을 기대할 수 있고, 조직의 뚜렷한 변화가 관찰된 15 Gy의 방사선 조사를 시행하기로 결정하였다.

2. 빌리루빈 나노물질을 이용한 방사선유발 장독성의 완화 평가

방사선치료 1일전/당일/1일후에 각각 제조된 빌리루빈 나노물질을 마우스에 정맥주사하고, 15 Gy/fx의 방사선량을 조사한 후, 대장과 소장을 적출하여 방사선의 장독성의 원인으로 생각되는 허혈, 염증 및 섬유화의 정도를 조직학적으로 관찰하여 상피 손상 정도와 염증성 세포의 침윤의 정도를 합하여 조직학적 등급체계를 매기고 그 정도를 관찰하였다.

1) 대장에서 방사선유발 장독성의 완화 평가

그림 5 는 15 Gy 의 방사선 조사 이후 2 주째 적출한 대장의 소견으로 상단 2 개는 대조군이며 중간은 빌리루빈 나노물질 5mg/kg 투여군, 하단 2 개의 조직은 20mg/kg 의 빌리루빈 나노물질 투약군이다. 조직 소견에서 중/하단의 빌리루빈 나노물질 투약군과 비교하여 대조군에서 화살표로 표시된 염증반응이 훨씬 심한 것을 알 수 있으며 대정상 상피의 구조의 무너짐이 관찰되었다.

2) 소장에서 방사선유발 장독성의 완화 평가

그림 6은 15 Gy의 방사선 조사 이후 4주째 적출한 소장의 소견으로 상단 2개는 대조군이며 하단 2개의 조직은 20mg/kg의 빌리루빈 나노물질 투약군이다. 조직 소견에서 상단의 대조군과 비교하여 아래쪽의 실험군의 경우 lamina propria의 섬유화가 적고, 상피의 flattening은 보이지 않았다.

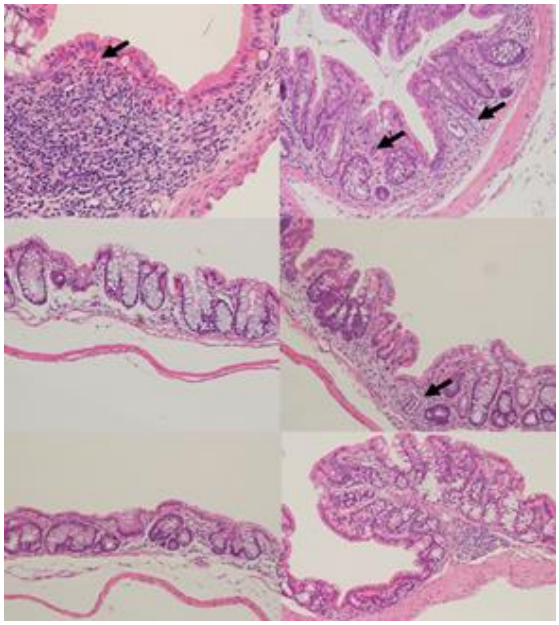

그림 5. 마우스에 15 Gy 방사선 조사 2 주후 적출한 대장에서의 대표적인 조직 소견 (상단) 대조군. (중단) 5 mg/kg BRNPs 를 투여한 실험군. (하단) 20 mg/kg BRNPs 투여한 실험군.

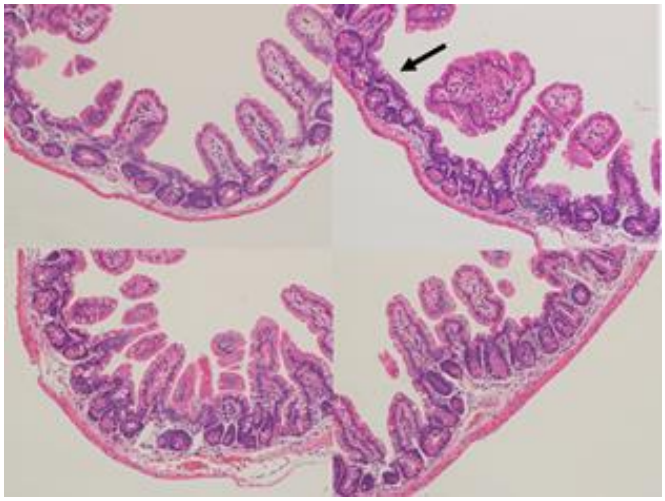

그림 6. 마우스에 15 Gy 방사선 조사 4 주후 적출한 소장에서의 대표적인 조직 소견 (상단) 대조군. (하단) 20 mg/kg BRNPs 를 투여한 실험군.

3) 혈액에서의 dextran 농도의 측정을 통한 장독성의 완화 평가

그림 7의 경우 조직소견 확인을 위한 장기적출 6시간 전 채취한 혈액에서의 dextran 농도로 방사선 치료를 시행하지 않은 군과 비교하여 시행한 군에서 대조군, 5mg/kg투여군 및 20mg/kg투여군에서 모두 혈액의 dextran 검출량이 증가하였으며 이는 RT로 인한 장의 정상적인 barrier의 손상여부를 알 수 있고, 반면 각 대조군과 비교하여 빌리루빈 나노물질 투약군에서 dextran의 검출 량의 감소를 확인하고 장독성의 완화를 증명하였다. 다만, 5mg/kg투여군과 비교하여 20mg/kg투여군에서 양-반응 관계를 보여주지는 않았다.

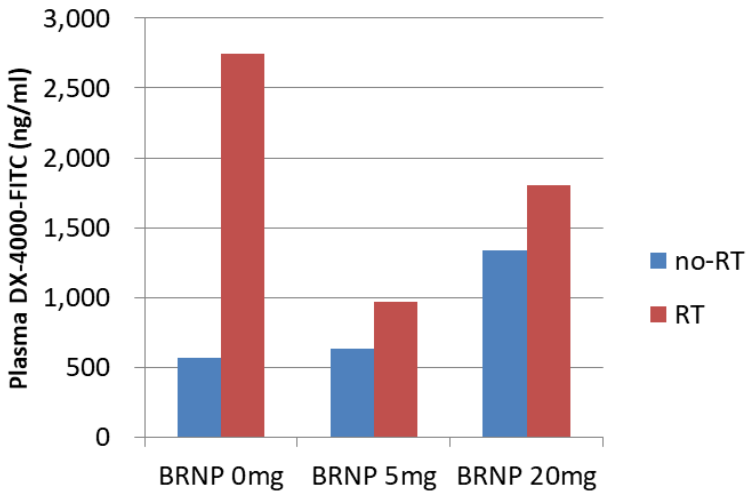

그림 7. BRNPs 의 용량에 따라 혈액에서 검출된 덱스트란의 농도

4) 빌리루빈 나노물질 투여에 따른 실험동물의 체중평가

그림 8의 경우 15 Gy의 방사선조사 이후 실험동물의 체중 변화를 측정한 결과이다. 세군 모두에서 약 7일 째 장독성으로 인해 체중이 약 30%정도 감소하는 것은 공통적인 현상으로 관찰되었으며, 그 이후 체중의 회복은 대조군 및 빌리루빈 5mg/kg 실험군에 비하여서 빌리루빈 나노물질 20mg/kg을 사용한 군에서 회복의 속도 및

정도가 빠른 것을 볼 수 있었다.

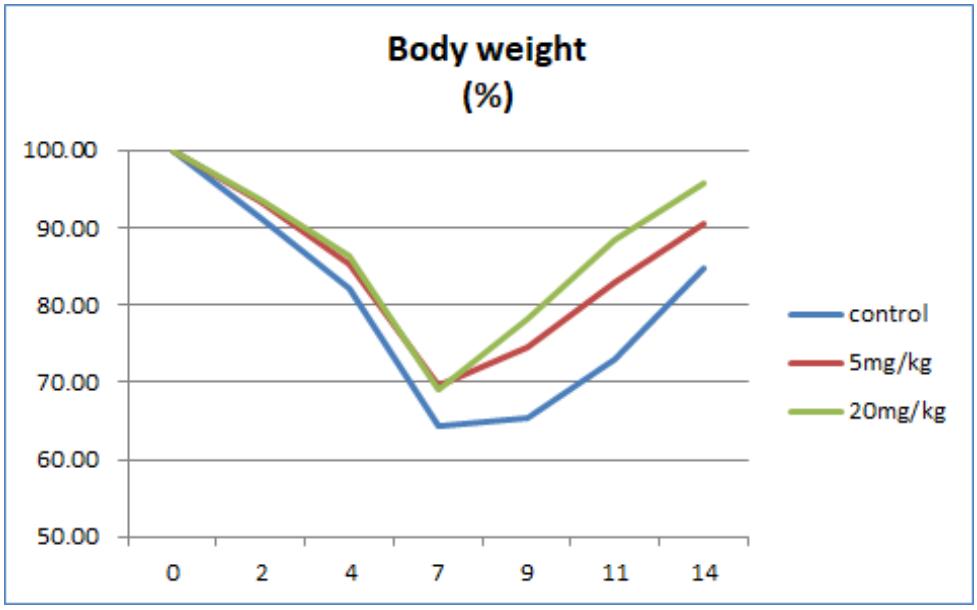

그림 8. BRNPs 의 용량에 따른 마우스의 체중 변화

5) 빌리루빈 나노물질의 방사선유발 장독성 완화 기전 탐구

사용한 빌리루빈 나노물질의 항염증작용의 기전을 알아보기 위하여 대표적인 pro-inflammatory cytokine들의 소장 및 대장 내 농도를 방사선치료 여부와 빌리루빈 나노물질 투여에 따라 quantitative real-time PCR 방법을 이용하여 확인하였다 (그림 9와 10). 이 때 빌리루빈 나노물질의 20mg/kg 투여 시 대장에서는 IL-6와 TNF-alpha의 mRNA 발현 량이 감소하는 것을 알아보았으며 이를 통해 빌리루빈 나노물질의 방사선 장독성 완화 기전에 IL-6와 TNF-alpha의 발현 억제를 통한 급성기 염증감소가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 동일한 방식으로 시행한 소장에서의 실험 결과 IL-1β와 TNF-alpha의 mRNA발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 추가적으로 만성 염증반응의 key molecule인 TGF-beta의 경우 소장과 대장 모두에서 빌리루빈 나노물질 투여를 통해 감소함을 확인함을 확인함으로써 나노물질을 통해 방사선조사 이후 급성 염증반응을 줄이는 것뿐만 아니라 만성 염증반응 또한 감소시켜 주로

발생하는 만성독성인 섬유화까지 억제할 수 있을 가능성 또한 확인 할 수 있었다.

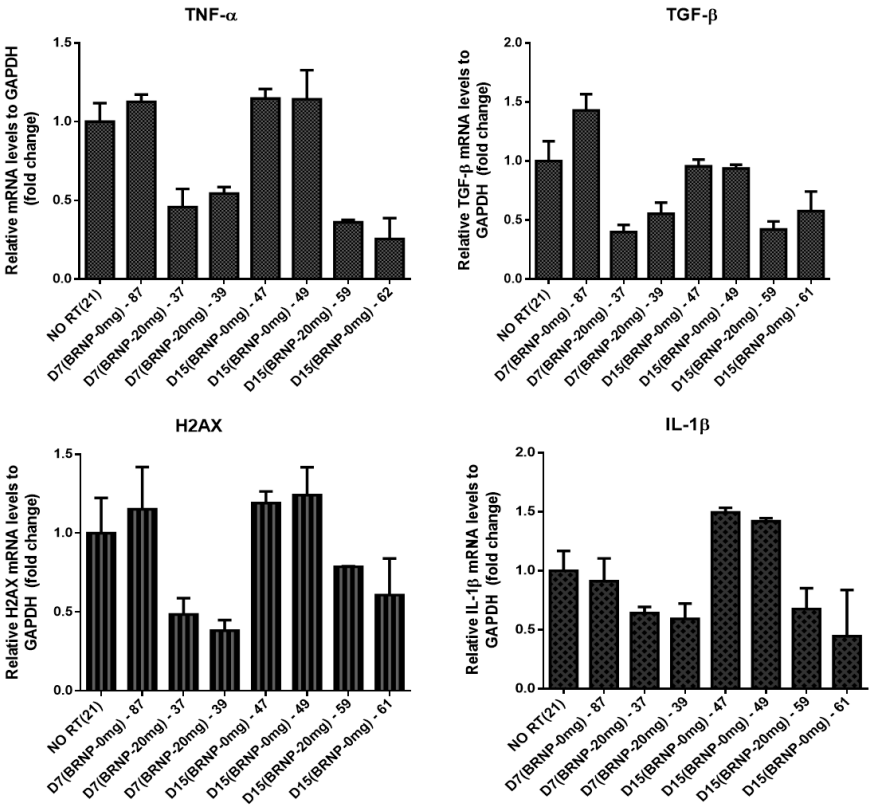

그림 9. BRNPs 투여와 방사선 치료 여부에 따른 염증성 사이토카인 발현을 확인한 소장에서의 quantitative real-time PCR 결과

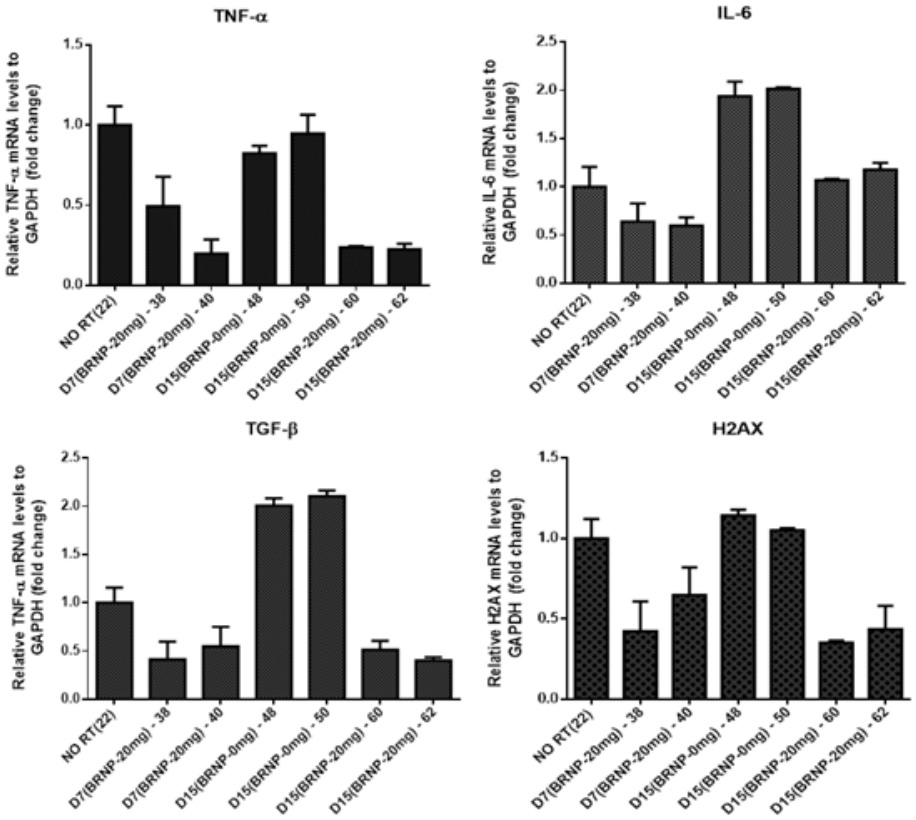

그림 10. BRNPs 투여와 방사선 치료 여부에 따른 염증성 사이토카인 발현을 확인한 대장에서의 quantitative real-time PCR 결과

고찰

나노약물을 이용한 암 치료의 적용은 급증하는 관심에 힘입어 다양한 가능성을 가진 수많은 나노물질이 개발되었으나, 이중 실제로 현재까지 임상에서 사용되는 것은 많지 않은 실정이다 [23]. 특히 나노물질을 이용하여 방사선 치료 시 필연적으로 발생하게 되는 방사선유발 장독성을 완화하는 연구는 국내뿐만 아니라 국외에서도 찾아보기 힘들어 본 연구의 차별성을 찾을 수 있다. 초기에 빌리루빈의 항산화 효과와 항염증 작용에 대해서는 심혈관계 질환에서 역의 상관관계를 보이는 것 [24]으로 주목 받게 되었는데, 가족성 고빌리루빈혈증을 특징으로 하는 길버트 신드롬 환자들에게서 발견된 심혈관 보호작용의 기전을 연구하던 중, 세포 내 빌리버딘/빌리루빈 쌍의 증가로 매개되는 혈관내피의 성능을 향상[25]이 실험적으로 확인되었다. 추가적으로 빌리루빈의 radical scavenger로써의 역할[26] 또한 여러 연구들을 통해 보고되었다.

그러나 빌리루빈 자체가 수용액에서 전혀 녹지 않는 점 때문에 의료용 약품으로 사용하려는 시도가 번번히 좌절되었는데, 이를 극복한 것이 '페길화'(-PEG)를 이용, 빌리루빈에 친수성 고분자를 결합시켜 합성하여 만들어진 빌리루빈 나노물질이다. 본 연구에서는 빌리루빈이 가진 항산화 효과와 항염증 작용을 이용하여 정상조직의 방사선독성의 감소 여부를 확인하고 방사선 치료 시 장독성을 완화시키는 빌리루빈 나노물질의 효과를 동물실험을 통해 알아보고자 하였다. 방사선 치료 시 빌리루빈 나노물질을 투여했을 때 대조군과 비교하여 소장 및 대장의 조직소견에서 상피 손상 정도와 염증성 세포의 침윤 정도가 적었고, 혈액에서 dextran 농도의 측정을 통하여서도 실험약물 투여군에서 동일하게 방사선을 조사한 대조군과 비교하여 장독성의 완화를 증명하였다. 또한 장독성 완화의 기전을 탐구한 실험에서 quantitative real-time PCR을 이용한 pro-inflammatory cytokine의 농도가 감소하는 것을 확인하였으며 이는 빌리루빈 나노물질의 방사선 장독성 완화 기전에 전염증성 사이토카인의 발현 억제를 통한 급성기 염증의 감소를 증명하였다. 따라서 이 연구의

결과를 앞으로 임상으로 진행시킨다면 복부 및 골반의 방사선 치료 시 치료선량 결정에 큰 영향을 주었던 방사선 장독성을 완화할 수 있기 때문에 종양에 줄 수 있는 방사선량을 증가시킬 수 있어 치료효과 증대에 대한 기대 뿐만 아니라 치료 후 환자의 삶의 질에 있어서도 편의를 도모할 수 있을 것으로 생각된다.

이전부터 방사선 장독성을 줄이고자 여러 약물/물질을 투여하는 연구들이 다양하게 시도되었는데, 가장 대표적인 것이 Amifostine이다. Amifostine 의 경우 multicenter, randomized phased III trial에서 골반 종양을 가진 환자에게서 acute grade 2-3 방광/하부위장관 독성을 감소시키는 것을 확인한 바 있으며 현재 head and neck cancer에서 xerostomia를 예방하기 위한 radioprotector로 사용되고 있다 [27]. 그 밖에, 5-Aminosalicylates(5-ASA) 중 sulfasalazine 2g/day가 4개의 double-blind 그리고 placebo controlled study들중 1개의 연구에서 radiation enteritis를 예방하는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 [28, 29]. prophylactic probiotics의 복용 또한 large placebo-controlled trial에서 acute radiation enteritis의 발생률을 줄이는 것으로 보고되었다. 비교적 최근인 Delia et al [30].의 연구에 의하면 double-blind and placebo-controlled trial을 통해 490명의 환자에게서 VSL#3 probiotic Lactobacilli를 이용해 실험하였고, 방사선 유발 설사의 증상이 placebo group에서 더욱 자주, 심하게 나타남을 확인하였다.

빌리루빈 나노물질의 사용은 방사선치료로 인한 장독성, 그 중에서도 주로는 급성 장독성의 완화를 목적으로 하였으며 방사선 치료의 급성 부작용의 기전은 다음과 같다. 급성 장독성은 방사선으로 유발되는 ROS(reactive oxygen species)에 의한 산화 스트레스 또는 세포의 손상에서 기인된다. 급성 산화스트레스가 활성 산소 종 생성을 유발하게 되고 [31, 32], 활성 산소 종의 과도한 생성은 대식세포(Macrophage)내부의 Nuclear factor-kappa B(NF-κB)의 활성을 유도하게 된다. 이렇게 해서 활성화된 대식세포는 전 염증성 사이토카인

인 Tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin(IL)-1β, interferon(INF)-ɣ의 분비를 일으키고 [33] 이를 통해 T lymphocyte를 활성화시키게 됨으로써 다른 macrophage와 neutrophil등의 축적을 유도하여 [34] 궁극적으로 세포의 손상을 일으킨다. 반면 방사선 치료의 만성 부작용인 Radiation induced fibrosis의 경우 TGF-β1의 myofibroblast 활성화가 중요한 기전이다. TGF-β1이 자신의 specific receptor(TβRII)와 결함 함으로써 TβRI kinase가 RSmads(Smad2와 Smad3)의 인산화를 일으킨다. 이 인산화를 통해 활성화된 Smads는 Smad4로 조립되어 다양한 타겟 gene의 발현을 유도하게 됨으로써 Connective tissue growth factor(CTGF)를 main stream으로 하는 장내 섬유화를 유도하게 된다 [35]. 뿐만 아니라 TGF-β 신호전달 하부의 INF-ɣ 및 TNF-α의 신호전달을 특징으로 하는 염증반응 또한 관여하는데 [36], 이 염증반응을 줄임으로써 만성 부작용으로 가는 가능성 또한 낮출 수 있으며 이는 서론을 통해 소개하였던 consequential late effect로 설명할 수 있다. 본 연구에서는 위와 같은 병태생리학적 특성을 이해하고 방사선 장독성을 줄이기 위해 염증 반응을 억제하고자 하였으며 그 결과 대장에서 빌리루빈 나노물질을 투여한 실험군과 대조군을 비교하여 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF-α의 소장 내 농도가 방사선치료 15일 째 대조군에 비하여 발현 량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 섬유화와 관련된 key molecule인 TGF-β또한 대조군에 비하여 실험약물을 투여한 군에서 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

빌리루빈 나노물질을 적용한 다른 연구들로는 In vitro 및 In vivo에서 BRNPs를 이용하여 anti-asthmatic effect를 본 연구[37]가 있다. 이 연구에서 BRNPs사용시 APO 항원으로 유발된 천식 마우스에게서 eosinophil과 같은 airway inflammatory cell, glycoprotein 생성, goblet cell metaplasia가 감소함을 관찰하였고, IL-4, 5 와 IL-13 생산을 하는 CD44+, CD4+ T cell 집단 또한 대조군과 비교하여 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 In vitro에서도 동일하게 CD4+ T cell억제를 확인 할 수 있었다. 이를 통해 BRNPs가 면역조절 메커니즘을 이용하여 항 염증 작용에 관여함을 재차 확인

해 볼 수 있었다. 이에 더하여 빌리루빈 나노물질을 cargo로 사용하여 core에 약물을 탑재한 뒤 체내 물질 전달에 사용하는 방법 또한 생각해 볼 수 있었는데, 활성 산소나 특정 파장의 빛에 붕괴되는 빌리루빈의 특성을 고려할 때 탑재된 약물의 방출을 조절할 수 있는 가능성을 함유하여 임상에 유용하게 사용할 것으로 생각되어 지기 때문이다. 이와 비슷하게 인간혈청알부민에 페길화를 통하여 만든 나노물질에 재발과 전이성 유방암에서 사용하는 Paclitaxel(PTX)를 탑재한 HAS-PEG/PTX의 경우 동물모델에서 일반 PTX에 비하여 체내 순환 시간이 연장되고, 종양 내 축적을 증가시켜 더 높은 세포독성 효과를 가져와 생존의 연장을 가져온 결과를 보고하였다[38]. 흥미롭게도 빌리루빈 나노물질의 항 염증 작용을 이용하여 cytokine storm을 막고 TGF-β등의 발현을 줄이고자 COVID-19 치료제로 사용할 가능성을 제시한 가설[39]도 등장하였다.

본 연구의 한계점으로는 이는 탐색적 연구였기 때문에 각 군에 배정된 실험 동물의 수가 충분하지 않았고, 이런 연유로 빌리루빈 나노물질의 사용 이후 확인한 조직학적 소견 및 기전 탐색 연구를 위한 quantitative real-time PCR등을 확인할 시에 대표적으로 반응을 보인 검체에서 나노물질의 효과를 확인 했다는 점이 있다. 또한 만성적인 염증반응으로 조직의 섬유화를 확인해 보는 것이 가장 좋았겠으나, 실험동물의 장기적인 생존이 어려워 결과를 보지 못했던 점이 있다. 따라서 본 실험을 통해 얻은 시행착오 및 결과를 바탕으로 방사선 치료의 용량을 높이고 효과를 극대화시킬 수 있도록 추가적인 연구가 필요하며, 장독성 뿐만 아니라 폐독성등 다른 독성에 대한 확인으로의 확장 및 실험 동물의 생존율 향상을 같이 알아보는 연구 계획이 필요할 것으로 생각된다.

본 실험을 통하여 빌리루빈 나노물질을 이용하여 복부/골반의 방사선 치료 시행 이후 필연적으로 발생하는 소장 및 대장 등의 방사선 독성을 완화하고 감소시킬 수 있는 가능성을 확인하였으며 또한 독성의 기전 연구를 통해

향후 임상실험으로 진행할 수 있는 가능성을 볼 수 있었다. 그리하여 이후 방사선 치료 시 발생하는 부작용을 줄이고 종양의 치료선량을 증가시켜 방사선 치료 성적의 향상을 기대해 본다.

결론

빌리루빈 나노물질을 이용하여 방사선 치료 시행 이후 정상조직의 방사선 독성의 완화가 가능하며 이는 부작용의 발생 기전인 염증반응을 줄임으로 써 주변 정상 조직의 방사선 독성의 감소를 시킬 수 있음을 확인하였고, 추가적으로 염증반응의 기전에 후보가 될 수 있을만한 물질들을 탐색하여 이후 방사선치료에 따라는 정상조직의 급 만성 독성을 줄이기 위한 약물개발의 가능성 또한 볼 수 있었다.

Reference

[1] Andreyev H. Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future. Clinical Oncology. 2007;19:790-9.

[2] Kozelsky TF, Meyers GE, Sloan JA, Shanahan TG, Dick SJ, Moore RL, et al. Phase III double-blind study of glutamine versus placebo for the prevention of acute diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy. J Clin Oncol. 2003;21:1669-74.

[3] Yavuz MN, Yavuz AA, Aydin F, Can G, Kavgaci H. The efficacy of octreotide in the therapy of acute radiation-induced diarrhea: a randomized controlled study. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002;54:195-202.

[4] Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? World J Gastroenterol. 2006;12:6102-8.

[5] Tanum G, Tveit KM, Karlsen KO. Chemoradiotherapy of anal carcinoma: tumour response and acute toxicity. Oncology. 1993;50:14-7.

[6] Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy--pathogenesis, treatment and prevention. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:470-9.

[7] Novak JM, Collins JT, Donowitz M, Farman J, Sheahan DG, Spiro HM. Effects of radiation on the human gastrointestinal tract. Journal of clinical gastroenterology. 1979;1:9-39.

[8] Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, et al. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. J Surg Res. 2003;109:149-54.

[9] Maj JG, Paris F, Haimovitz-Friedman A, Venkatraman E, Kolesnick R, Fuks Z. Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. Cancer Res. 2003;63:4338-41.

[10] Weiss E, Hirnle P, Arnold-Bofinger H, Hess CF, Bamberg M. Therapeutic outcome and relation of acute and late side effects in the adjuvant radiotherapy of endometrial carcinoma stage I and II. Radiother Oncol. 1999;53:37-44.

[11] Larsen A, Reitan JB, Aase ST, Hauer-Jensen M. Long-term prognosis in patients with severe late radiation enteropathy: a prospective cohort study. World J Gastroenterol. 2007;13:3610-3.

[12] Regimbeau JM, Panis Y, Gouzi JL, Fagniez PL. Operative and long term results after surgery for chronic radiation enteritis. Am J Surg. 2001;182:237-42.

[13] Hauer-Jensen M, Richter KK, Wang J, Abe E, Sung CC, Hardin JW. Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. Radiat Res. 1998;150:673-80.

[14] Nguyen NP, Antoine JE, Dutta S, Karlsson U, Sallah S. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. Cancer. 2002;95:1151-63.
[15] Pinkawa M, Holy R, Piroth MD, Fischedick K, Schaar S, Székely-Orbán D, et al. Consequential late effects after radiotherapy for prostate cancer - a prospective longitudinal quality of life study. Radiation Oncology. 2010;5:27.
[16] Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T, Langberg CW. Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. 2000;48:871-87.
[17] Vogel ME, Zucker SD. Bilirubin acts as an endogenous regulator of inflammation by disrupting adhesion molecule-mediated leukocyte migration. Inflamm Cell Signal. 2016;3:e1178.
[18] Horsfall LJ, Hardy R, Wong A, Kuh D, Swallow DM. Genetic variation underlying common hereditary hyperbilirubinaemia (Gilbert's syndrome) and respiratory health in the 1946 British birth cohort. Journal of hepatology. 2014;61:1344-51.
[19] Peng F, Deng X, Yu Y, Chen X, Shen L, Zhong X, et al. Serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis. Journal of Clinical Neuroscience. 2011;18:1355-9.
[20] de Vries HS, Te Morsche RH, Jenniskens K, Peters WH, de Jong DJ. A functional polymorphism in UGT1A1 related to hyperbilirubinemia is associated with a decreased risk for Crohn's disease. Journal of Crohn's and Colitis. 2012;6:597-602.
[21] Tran DT, Jeong YY, Kim JM, Bae HB, Son SK, Kwak SH. The Anti-Inflammatory Role of Bilirubin on "Two-Hit" Sepsis Animal Model. Int J Mol Sci. 2020;21.
[22] Lee Y, Kim H, Kang S, Lee J, Park J, Jon S. Bilirubin Nanoparticles as a Nanomedicine for Anti-inflammation Therapy. Angew Chem Int Ed Engl. 2016;55:7460-3.
[23] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nature Reviews Cancer. 2017;17:20-37.
[24] Boon A-C, Lam AK, Gopalan V, Benzie IF, Briskey D, Coombes JS, et al. Endogenously elevated bilirubin modulates kidney function and protects from circulating oxidative stress in a rat model of adenine-induced kidney failure. Scientific reports. 2015;5:1-16.
[25] Mancuso C, Bonsignore A, Di Stasio E, Mordente A, Motterlini R. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. Biochemical pharmacology. 2003;66:2355-63.
[26] Foresti R, Hoque M, Bains S, Green CJ, Motterlini R. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway. Biochemical Journal. 2003;372:381-90.

[27] Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. Semin Radiat Oncol. 2003;13:62-72.
[28] Prakash A, Spencer CM. Balsalazide. Drugs. 1998;56:83-9; discussion 90.
[29] Greenfield SM, Punchard NA, Teare JP, Thompson RP. Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 1993;7:369-83.
[30] Delia P, Sansotta G, Donato V, Frosina P, Messina G, De Renzis C, et al. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. World J Gastroenterol. 2007;13:912-5.
[31] Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, Hynes KL, Schumacker PT, Gewertz BL. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1999;277:L1057-L65.
[32] Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. Journal of biological chemistry. 1998;273:11619-24.
[33] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. The EMBO journal. 1991;10:2247-58.
[34] Ito T, Yang M, Wang Y-H, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10–producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. The Journal of experimental medicine. 2007;204:105-15.
[35] Zhu Y, Zhou J, Tao G. Molecular aspects of chronic radiation enteritis. Clin Invest Med. 2011;34:E119-24.
[36] Yarnold J, Brotons M-CV. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. Radiotherapy and oncology. 2010;97:149-61.
[37] Kim DE, Lee Y, Kim M, Lee S, Jon S, Lee S-H. Bilirubin nanoparticles ameliorate allergic lung inflammation in a mouse model of asthma. Biomaterials. 2017;140:37-44.
[38] Lee JE, Kim MG, Jang YL, Lee MS, Kim NW, Yin Y, et al. Self-assembled PEGylated albumin nanoparticles (SPAN) as a platform for cancer chemotherapy and imaging. Drug Delivery. 2018;25:1570-8.
[39] Khurana I, Allawadhi P, Khurana A, Srivastava AK, Navik U, Banothu AK, et al. Can bilirubin nanomedicine become a hope for the management of COVID-19? Med Hypotheses. 2021;149:110534-.

Abstract

Introduction

The number of cancer incidence in Korea increases year by year, and according to the national cancer statistics in 2017, the incidence rate in 2017 is 453.4 per 100,000 populations. In the case of Korea, where the lifestyle is gradually becoming more Western, it is thought that the increase in prostate cancer and breast cancer will continue, and the number of cancer patients who need radiation therapy in the future can also be expected to increase. Irrespective of the known therapeutic effect, radiation therapy sometimes causes acute and chronic side effects to surrounding normal tissues after treatment. For example, after pelvic radiation therapy, early bowel toxicity is reported in 60-80%. The possibility of such toxicity is decreasing with advances in treatment technology, but it is most important to lower the possibility of radiation therapy toxicity, considering the increase in long-term cancer survivors and the lack of clear therapeutic drugs or treatment for toxicities. Therefore, in this study, a study was planned to reduce the side effects of radiation toxicity by using bilirubin nanoparticles (BRNPs) to alleviate normal tissue changes around the radiation treatment area.

Materials and Methods

Bilirubin is the final metabolite of Heme, which is produced by the breakdown of red blood cells and hemoglobin as a component of the bile of our body. Through several studies published since the late 1980s, it has been reported that bilirubin acts as an antioxidant by removing active oxygen from the human body, and literature on its effectiveness as an anti-inflammatory agent has been followed. However, it was difficult to find an example of applying it as a medical material because bilirubin itself did not dissolve in aqueous solution at all. In order to overcome this, in this study, BRNPs made by binding hydrophilic polymer to bilirubin and then self-assembling in an aqueous solution were used. After injecting the BRNPs into the mouse, after abdominal/pelvic radiation irradiation, the tissue findings of the small and large intestine were compared with the control group to confirm whether the RT toxicity of normal tissues using the BRNPs were reduced. By studying the mechanism, we tried to search for candidates related to acute radiation enteritis.

Results

After irradiation of 15 Gy, the weight change of the mouse was measured. It was confirmed that the extent of weight change was different depending on the dose of the BRNPs, which was found to be faster and better recover after weight loss in the group using the BRNPs 20 mg/kg compared to the control group. On the 7th day, weight loss of about 30% due to intestinal toxicity was commonly observed. As compared to the control group from the small intestine extracted 4 weeks after irradiation of 15 Gy, as BRNPS used to alleviate radiation-induced intestinal toxicity, 20 mg/kg of BRNPs treated group

showed less fibrosis of lamina propria and less epithelial flattening in histologic findings. In addition, the inflammatory reaction occurred more severely in the control group then the BRNPs treated group in the colon harvested 2 weeks after irradiation of 15 Gy. Additionally, the concentration of dextran was measured in blood collected after injection of FITC-dextran 6 hours before organ extraction. In theory, if the normal barrier of the intestine is present without problems, the concentration of dextran is less detected in the blood, and the amount of detection in the blood increases according to the degree of damage to the barrier, In this study, when compared with the control group through the use of BRNPs, it was confirmed that the detection amount of dextran decreased, and accordingly, it was confirmed that intestinal toxicity was reduced. In addition, the mechanism of mitigation of radiation-induced intestinal toxicity of BRNPs was investigated. In order to find out the mechanism of the anti-inflammatory action of the used BRNPs, the concentrations of representative pro-inflammatory cytokines in the small and large intestine were confirmed using the quantitative real-time PCR method. At this time, it was found that the amount of mRNA expression such as IL-1β and TNF-α in the small intestine decreased in the group administered with the BRNPs compared to the control group. It was confirmed that there is a reduction in acute inflammation through inhibition.

Conclusions

It was confirmed that the use of BRNPs can alleviate the radiation toxicity of normal tissues after radiation treatment, and this can reduce the radiation toxicity of the surrounding normal tissues by reducing the inflammatory reaction of the acute organs, which is the mechanism of occurrence of side effects. In addition, it was possible to develop a drug to reduce the acute and chronic toxicity of normal tissues that may occur following radiotherapy by searching for substances that may be candidates for the mechanism of the inflammatory reaction.

Key words: Radiation therapy, Bilirubin Nanoparticles, Radiation enteritis, normal organ toxicity