



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월30일

(11) 등록번호 10-1581589

(24) 등록일자 2015년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/01 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0161868

(22) 출원일자 2014년11월19일

심사청구일자 2014년11월19일

(56) 선행기술조사문헌

J Korean Neurosurg Soc, Vol. 55 (5) p. 237-243, 2014*

Osteoarthritis and Cartilage, 2009, Vol. 17, p. 1662-1669

박사학위논문, 고려대학교 대학원, 의학과, 이진훈, 2011.12

Spine (Phila Pa 1976), 2008, Vol. 33 (21), p. 2253-2259

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

최혁

서울시 성동구 성수이로 137, 107-1104 (성수동2가, 성수아이파크아파트)

황민호

서울특별시 관악구 광신길 225, 501호 (신림동)

김경수

인천광역시 남동구 백범로 124번길 126, 406동 1301 (만수동, 주공아파트)

(74) 대리인

특허법인남춘

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 조현경

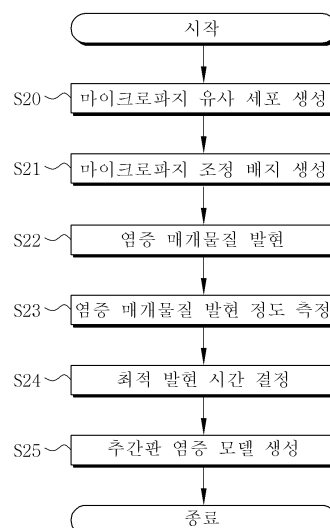
(54) 발명의 명칭 **추간관 염증 모델을 생성하는 방법 및 이를 이용한 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법**

(57) 요약

본 발명은 추간관 염증 모델을 생성하는 방법 및 이를 이용한 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법은 (a) 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



(Macrophage like cell)를 생성하는 단계와; (b) 상기 (a) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포 (Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 단계와; (c) 섬유류 세포에 상기 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 처리하되, 복수의 시간별로 각각 처리하여 상기 섬유류 세포에서 염증 매개물질을 발현시키는 단계와; (d) 상기 (c) 단계에서의 상기 염증 매개물질의 발현 정도를 상기 시간별로 측정하는 단계와; (e) 상기 (d) 단계에서 상기 시간별로 측정된 상기 염증 매개물질의 발현 정도에 기초하여, 최적 발현 시간을 결정하는 단계와; (f) 상기 (a) 단계, 상기 (b) 단계 및 상기 (c) 단계를 순차적으로 수행하여 추간관 염증 모델을 생성하되, 상기 (e) 단계에서 결정된 상기 최적 발현 시간을 상기 (c) 단계에 적용하여 상기 추간관 염증 모델을 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 실제 인간의 추간관에서 발생하는 염증에 근접한 추간관 염증 모델이 생성되고, 이를 이용하여 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정할 수 있게 된다.

명세서

청구범위

청구항 1

추간관 염증 모델을 생성하는 방법에 있어서,

(a) 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 단계와;

(b) 상기 (a) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 염증전구물질과 염증매개물질이 포함된 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 단계와;

(c) 섬유류 세포에 상기 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 처리하되, 복수의 시간별로 각각 처리하여 상기 섬유류 세포에서 염증 매개물질을 발현시키는 단계와;

(d) 상기 (c) 단계에서의 상기 염증 매개물질의 발현 정도를 상기 시간별로 측정하는 단계와;

(e) 상기 (d) 단계에서 상기 시간별로 측정된 상기 염증 매개물질의 발현 정도에 기초하여, 최적 발현 시간을 결정하는 단계와;

(f) 상기 (a) 단계, 상기 (b) 단계 및 상기 (c) 단계를 순차적으로 수행하여 추간관 염증 모델을 생성하되, 상기 (e) 단계에서 결정된 상기 최적 발현 시간을 상기 (c) 단계에 적용하여 상기 추간관 염증 모델을 생성하는 단계를 포함하며,

상기 (b) 단계는

(b1) 상기 (a) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양하는 단계와;

(b2) 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증 전구물질 및 염증매개물질을 측정하는 단계와;

(b3) 상기 (b) 단계에서의 측정 결과에 기초하여, 상기 상호 상이한 시간 중 상기 염증전구물질 및 염증매개물질을 분비하는 최적의 시간을 결정하는 단계를 포함하며;

상기 (b) 단계에서는 상기 (b3) 단계에서 결정된 최적의 시간을 상기 배양시간으로 하여 수행되는 것을 특징으로 하는 추간관 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 휴먼 단핵 세포주(Human monocyte cell line)는 THP-1 세포, U937 세포 및 raw 264.7 세포 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간관 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 처리 시간은 48 시간인 것을 특징으로 하는 추간관 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b1) 단계에서 상기 상호 상이한 시간은 24시간, 48시간 및 72 시간을 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련되는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 상기 복수의 시간은 48시간, 72 시간 및 96시간을 포함하며;

상기 (e) 단계에서는 48시간이 상기 최적 발현 시간으로 결정되는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 모델을 생성하는 방법.

청구항 8

추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 있어서,

(A) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항, 또는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 복수의 추간판 염증 모델을 생성하는 단계와;

(B) 각각의 상기 추간판 염증 모델에 상호 상이한 파장의 레이저를 기 설정된 시간동안 조사하는 단계와;

(C) 상기 (B) 단계 수행 후 상기 각각의 추간판 염증 모델에서의 단백질 양을 측정하는 단계와;

(D) 상기 (C) 단계에서 측정된 단백질의 양에 기초하여 최적의 레이저 파장을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 치료를 위한 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (B) 단계에서 레이저는 10분 조사 - 5분 차단 주기로 조사되는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (D) 단계에서 최적의 레이저 파장은 405nm로 결정되는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 추간관 염증 모델을 생성하는 방법 및 이를 이용한 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 추간관에서 발생하는 염증에 근접한 염증 모델을 생성하고, 이를 이용하여 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정할 수 있는 추간관 염증 모델을 생성하는 방법 및 이를 이용한 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 일반적으로 요통은 전체 인구의 대략 80%에서 한번은 겪게 되는 흔한 질환이다. 요통의 원인은 나이에 따라 조금씩 다르게 나타난다. 예를 들어, 20대 내지 30대의 요통 원인은 허리 근육의 이상으로 인한 요추 염좌나 디스크 질환이 나타나고, 60대 이후에는 골다공증과 관절염이 오면서 디스크 질환 등으로 나타난다. 여기서, 디스크는 추간관이라고도 한다. 추간관은 등뼈 사이에서 충격을 흡수하는 탄력적인 구조를 가진다.
- [0003] 도 1에는 정상 추간관의 해부학적 구조를 개략적으로 도식화한 도면이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 정상 추간관(Intervertebral disc ; IVD)은 디스크 안쪽에 존재하는 수핵(Nucleus pulposus ; NP)과, 수핵 바깥쪽으로 존재하는 섬유륜(Annulus fibrosus ; AF)으로 나누어진다. 또한, 섬유륜 조직 바깥쪽 3분의 1지점까지 유리 신경 말단(Free nerve ending)이 존재한다.
- [0004] 추간관은 연령이 증가함에 따라 탄력성을 잃고 섬유륜이 균열을 일으키는 등의 퇴행성 변화가 일어나는데, 추간관에 외력이 가해지면 섬유륜의 약해진 부분이나 찢어진 부분으로 수핵이 후방으로 밀려 나오면서 증상을 일으키게 된다.
- [0005] 수핵이 밀려나오는 형태에 따라, 섬유륜이 골고루 팽윤되는 추간관 팽윤(bulging), 국소적으로 돌출된 추간관 탈출(protrusion), 섬유륜이 파열되어 경막외 공간으로 수핵이 밀려나왔으나 내부와 연결된 형태인 추간관 추출(extrusion), 파열되어 수핵편이 경막외 공간으로 이동하여 내부와 연결이 끊어진 추간관 수핵 부골화(sequestration) 등으로 구분할 수 있다.
- [0006] 상기에 예시된 바와 같이, 섬유륜 조직에 손상이 일어나면, 해당 손상 부위를 회복하는 과정에서 염증이 발생하게 된다. 이러한 염증 반응에 관여하는 대식세포(Macrophage)는 섬유륜 세포와의 상호작용을 통해 다양한 염증 전구물질(pro-inflammatory mediator)을 발현하게 되고, 이를 통해 섬유륜 세포 역시 다양한 염증 매개물질을 분비하게 된다.
- [0007] 염증과정에서 나타나는 염증 매개물질에 의해 섬유륜 바깥쪽에 존재하는 유리 신경 말단이 자극을 받게 되면, 신경세포가 섬유륜과 수핵의 안쪽으로 내성장(ingrowth)되면서 통증을 유발하게 된다.
- [0008] 이러한 염증 과정에는 대식세포가 깊이 관여하고 있다. 실제로 추간관 탈출증(Herniated disc disease)을 가지고 있는 환자의 추간관 조직에서는 내재면역반응(Innate immune response) 및 염증, 과립조직 형성(Granular tissue formation)과 관련한 많은 수의 대식세포가 나타나고 있다.
- [0009] 대식세포가 발현하는 사이토카인 중 IL-1 β (Interleukin-1beta), TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha)가 추간관 퇴행과 관련이 있는 염증전구물질에 해당하며, 염증전구물질들이 추간관을 이루고 있는 세포 및 조직을 자극하여 염증매개물질의 발현을 촉진하게 되어, 이는 추간관 질환에서 통증이 나타나는 원인으로 작용하게 된다.
- [0010] 상기에 설명된 추간관 질환 치료에 있어서 현재 수술적 치료 방법으로 통증을 완화하는 치료법이 시행되고 있으나, 해당 질환에 대해 궁극적으로 염증 인자의 발현 완화 및 억제와 관련된 근본적인 치료로의 접근도 필요하다.
- [0011] 근래에 한국등록특허공보 제10-1177478호에 개시된 '이중 파장을 이용한 치료용 레이저 장치'에서는 염증성 질환에 578nm 파장대와 511nm 파장대의 레이저를 이용한 치료 방법을 제안하고 있다.
- [0012] 그러나, 같은 염증성 질환이라도 신체의 부위에 따라 또는 증상이나 원인에 따라 그 치료가 달라진다는 점에서 상술한 바와 같은 과정을 통해 발생하는 추간관 염증 질환이 적합한 치료 방법은 별도로 검토되어야 할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 따라서, 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 추간판에서 발생하는 염증에 근접한 염증 모델을 생성하고, 이를 이용하여 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정할 수 있는 추간판 염증 모델을 생성하는 방법 및 이를 이용한 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적은 본 발명에 따라, 추간판 염증 모델을 생성하는 방법에 있어서, (a) 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 단계와; (b) 상기 (a) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 단계와; (c) 섬유유 세포에 상기 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 처리하되, 복수의 시간별로 각각 처리하여 상기 섬유유 세포에서 염증 매개물질을 발현시키는 단계와; (d) 상기 (c) 단계에서의 상기 염증 매개물질의 발현 정도를 상기 시간별로 측정하는 단계와; (e) 상기 (d) 단계에서 상기 시간별로 측정된 상기 염증 매개물질의 발현 정도에 기초하여, 최적 발현 시간을 결정하는 단계와; (f) 상기 (a) 단계, 상기 (b) 단계 및 상기 (c) 단계를 순차적으로 수행하여 추간판 염증 모델을 생성하되, 상기 (e) 단계에서 결정된 상기 최적 발현 시간을 상기 (c) 단계에 적용하여 상기 추간판 염증 모델을 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 모델을 생성하는 방법에 의해서 달성된다.
- [0015] 여기서, 상기 (a) 단계에서 상기 휴먼 단핵 세포주(Human monocyte cell line)는 THP-1 세포, U937 세포 및 raw 264.7 세포 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 (a) 단계에서 상기 처리 시간은 48 시간일 수 있다.
- [0017] 그리고, 상기 (b) 단계는 (b1) 상기 (a) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양하는 단계와; (b2) 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증전구물질 및 염증매개물질을 측정하는 단계와; (b3) 상기 (b) 단계에서의 측정 결과에 기초하여, 상기 상호 상이한 시간 중 상기 염증전구물질 및 염증매개물질을 분비하는 최적의 시간을 결정하는 단계를 포함하며; 상기 (b) 단계에서는 상기 (b3) 단계에서 결정된 최적의 시간을 상기 배양시간으로 하여 수행될 수 있다.
- [0018] 여기서, 상기 (b1) 단계에서 상기 상호 상이한 시간은 24시간, 48시간 및 72 시간을 포함할 수 있다.
- [0019] 그리고, 상기 (b) 단계에서 상기 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련될 수 있다.
- [0020] 그리고, 상기 (c) 단계에서 상기 복수의 시간은 48시간, 72 시간 및 96시간을 포함하며; 상기 (e) 단계에서는 48시간이 상기 최적 발현 시간으로 결정될 수 있다.
- [0021] 한편, 상기 목적은 본 발명의 다른 실시 형태에 따라, 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 있어서, (A) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 복수의 추간판 염증 모델을 생성하는 단계와; (B) 각각의 상기 추간판 염증 모델에 상호 상이한 파장의 레이저를 기 설정된 시간동안 조사하는 단계와; (C) 상기 (B) 단계 수행 후 상기 각각의 추간판 염증 모델에서의 단백질 양을 측정하는 단계와; (D) 상기 (C) 단계에서 측정된 단백질의 양에 기초하여 최적의 레이저 파장을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판 염증 치료를 위한 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법에 의해서도 달성될 수 있다.
- [0022] 여기서, 상기 (B) 단계에서 레이저는 10분 조사 - 5분 차단 주기로 조사될 수 있다.
- [0023] 그리고, 상기 (D) 단계에서 최적의 레이저 파장은 405nm로 결정될 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 상기와 같은 구성에 따라, 본 발명에 따르면 실제 인간의 추간판에서 발생하는 염증에 근접한 추간판 염증 모델이 생성되고, 이를 이용하여 추간판 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정할 수 있게 됨으로써, 레이저

를 이용한 추간관 염증 치료의 효과를 극대화할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1에는 정상 추간관의 해부학적 구조를 개략적으로 도식화한 도면이고,
 도 2는 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법을 설명하기 위한 도면이고,
 도 3은 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법에서 상이한 배양시간에서 분비되는 염증전구물질과 염증매개물질을 측정된 그래프를 나타낸 도면이고,
 도 4는 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법에서 각 시간별로 염증 매개물질의 발현 정도를 측정된 그래프이고,
 도 5는 본 발명에 따른 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장 결정 방법을 설명하기 위한 도면이고,
 도 6은 본 발명에 따른 최적의 레이저 파장을 결정하는 방법에서 레이저 파장별 IL-6의 변화를 나타낸 그래프이고,
 도 7은 본 발명에 따른 최적의 레이저 파장을 결정하는 방법에서 레이저 파장별 IL-8의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하에서는 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명에 따른 실시예들에 대해 상세히 설명한다.
- [0027] 도 2는 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- [0028] 먼저, 추간관에서 발생하는 염증을 포사하기 위해 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성한다(S20). 본 발명에서는 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성한다.
- [0029] 여기서, 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)로는 THP-1 세포, U937 세포 및 raw 264.7 세포 중 어느 하나가 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 THP-1 세포가 적용되는 것을 예로 하며, 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 48 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 것을 예로 한다.
- [0030] 이와 같은 과정을 통해 생성된 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)는 다양한 염증전구물질(Pro-inflammatory mediator)과 염증매개물질(Inflammatory mediator)인 싸이토카인(Cytokine)의 발현이 가능한 상태가 된다.
- [0031] 그런 다음, 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 이용하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성한다(S21). 본 발명에서는 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 것을 예로 한다. 이 때, 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련되는 것을 예로 한다.
- [0032] 본 발명에서는 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성을 위한 배양시간을 실험을 통해 최적으로 구할 수 있다. 보다 구체적으로 설명하면, 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양한다. 여기서, 배양배지는, 상술한 바와 같이, DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련될 수 있다.
- [0033] 그런 다음, 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증전구물질과 염증매개물질을 측정한다. 본 발명에서는 배양시간으로 24시간, 48시간 및 72시간이 적용되는 것을 예로 한다.
- [0034] 도 3은 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법에서 상이한 배양시간에서 분비되는 염증전구물질과 염증매개물질을 측정된 그래프를 나타낸 도면이다.
- [0035] 도 3의 (a)는 염증전구물질인 IL-1 β 의 농도를 나타낸 도면으로, 24시간(MCM24), 48시간(MCM48), 72시간(MCM72)에서 IL-1 β 의 농도가 통계학적으로 큰 차이가 없음을 확인할 수 있다. 또한, 도 3의 (b)는 염증전구물

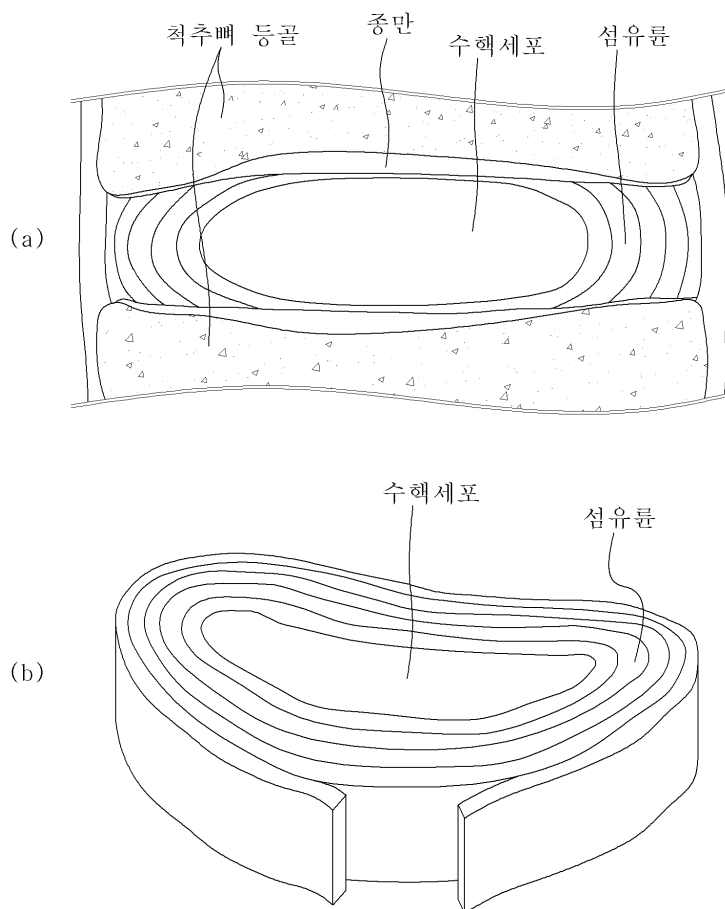
질인 TNF- α 의 농도를 나타낸 도면으로, 24시간(MCM24), 48시간(MCM48), 72시간(MCM72)에서 TNF- α 의 농도 또한 통계학적으로 큰 차이가 없음을 확인할 수 있다

- [0036] 그러나, 도 3의 (c)에 나타난 염증매개물질인 IL-6의 경우, 48시간(MCM48) 이후 72시간(MCM72)에서는 통계학적으로 유의한 정도로 감소하는 경향을 보이므로 72시간은 최적의 배양시간에서 배제한다. 그리고, 도 3의 (d)에 나타난 염증매개물질인 IL-8의 경우, 72시간(MCM72)에서 증가하는 것으로 나타났으나, 통계학적으로 차이가 크지 않음을 확인할 수 있다.
- [0037] 상기와 같은 측정 결과에 기초하여, 상호 상이한 시간 중 염증전구물질 및 염증매개물질의 분비하는 최적의 시간인 48시간을 배양시간으로 결정하게 된다. 그리고, 결정된 배양시간으로 도 2의 S21 단계가 수행된다.
- [0038] 다시 도 2를 참조하여 설명하면, 상기와 같은 배양시간으로 배양된 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 섬유류 세포에 처리하여 염증 매개물질을 발현시킨다(S22). 본 발명에서는 복수의 시간별로 염증 매개물질을 발현하여 최적 발현 시간을 결정한다.
- [0039] 보다 구체적으로 설명하면, 다수의 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)와 섬유류 세포를 준비하고, 각각을 쌍으로 각각 다른 시간동안 처리하여 염증 매개물질을 발현시킨다. 본 발명에서는 48시간, 72시간 및 96시간 동안 각각 염증 매개물질을 발현시킨다. 그런 다음, 각각의 시간동안 발현된 염증 매개물질의 발현 정도를 측정한다(S23).
- [0040] 도 4는 본 발명에 따른 추간관 염증 모델을 생성하는 방법에서 각 시간별로 염증 매개물질의 발현 정도를 측정한 그래프이다. 도 4의 (a)는 염증 매개물질 중 IL-8의 발현 정도를 나타낸 도면이고, 도 4의 (b)는 염증 매개물질 중 IL-6의 발현 정도를 나타낸 도면이다. 그리고, 도 4의 그래프의 가로축은 각각 발현시간이 48시간(AFM48), 72시간(AFM72), 그리고 96시간(AFM96)임을 나타내고 있다.
- [0041] 도 4에서 발현시간이 증가함에 따라 염증 매개물질의 발현 정도가 증가하는 것으로 나타나고 있으나, 그 증가 정도, 특히 IL-6의 증가 정도가 발현시간을 늘리는 것에 비해 상대적으로 적은 것을 고려하여, 최적의 발현 시간을 48시간으로 결정하는 것을 예로 한다(S24).
- [0042] 상기와 같이 최적의 발현 시간이 결정되면, 결정된 최적의 발현 시간으로 추간관 염증 모델을 생성하게 되는데, 도 2에 도시된 S20 단계 내지 S22 단계를 통해 추간관 염증 모델이 생성된다(S25). 이 때, S22 단계에서는 상기 과정을 통해 결정된 최적의 발현 시간동안 염증 매개물질을 발현하게 된다.
- [0043] 이하에서는, 도 5 내지 도 7을 참조하여, 상기와 같은 과정을 통해 생성된 추간관 염증 모델을 이용하여, 추간관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정하는 방법에 대해 상세히 설명한다.
- [0044] 먼저, 상술한 바와 같은 과정을 통해 복수의 추간관 염증 모델을 생성한다(S50). 그런 다음, 각각의 추간관 염증 모델에 상호 상이한 파장의 레이저를 기 설정된 시간동안 조사한다(S51). 본 발명에서는 405nm 파장, 532nm 파장, 그리고 650nm 파장의 레이저를 3개의 추간관 염증 모델에 각각 조사하는 것을 예로 한다. 이 때, 레이저로는 연속 파동(Continuous wave) 방식의 GA-Al-As 반도체 다이오드 레이저가 사용되는 것을 예로 한다.
- [0045] 그리고, 레이저는 10분 조사 - 5분 차단 주기로 조사됨으로써, 지속적인 레이저의 발광에 따라 열이 발생하여 레이저의 에너지 밀도(Energy density)가 변화하여 치료에 영향을 미치는 것을 방지하는 것을 예로 한다.
- [0046] 상기와 같이 각각의 추간관 염증 모델에 대해 각각의 시간별로 레이저 조사가 완료되면, 각각의 추간관 염증 모델에서의 단백질 양을 측정한다(S52). 본 발명에서는 단백질 양의 측정을 위해 엘라이자(ELISA) 검사 방법이 적용되는 것을 예로 한다.
- [0047] 도 6은 본 발명에 따른 최적의 레이저 파장을 결정하는 방법에서 레이저 파장별 IL-6의 변화를 나타낸 그래프이고, 도 7은 본 발명에 따른 최적의 레이저 파장을 결정하는 방법에서 레이저 파장별 IL-8의 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0048] 도 6을 참조하여 설명하면, 도 6의 (a)에 도시된 바와 같이, 24시간 경과 후 초기 추간관 염증 모델(AMF)에서의 IL-6의 농도보다 650nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)과 532nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L532)에서의 IL-6의 농도가 증가했음을 확인할 수 있다.
- [0049] 반면, 24시간 경과 후 405nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)의 경우에는 초기 추간관 염증 모델(AMF)에서의 농도보다 감소하였음을 확인할 수 있다.

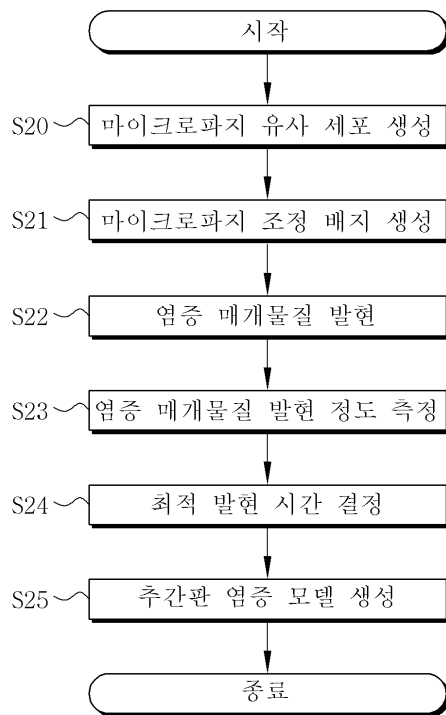
- [0050] 도 6의 (b), (c), (d)에서 확인할 수 있듯이, 650nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)과 532nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L532)의 경우 초기 추가관 염증 모델(AMF)과 시간이 경과 하더라도 큰 차이가 없음을 확인할 수 있으나, 405nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)의 경우 시간의 경과에 따라 IL-6의 농도가 지속적으로 감소함을 확인할 수 있다.
- [0051] 마찬가지로, 도 7의 (a) 내지 (d)에 도시된 바와 같이, IL-8의 농도에 있어서도, 405nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)이 72시간 경과시 일부 증가하는 경향을 보였으나 결론적으로 시간의 경과에 따라 IL-8의 농도가 감소함을 확인할 수 있으나, 650nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L650)과 532nm 파장의 레이저를 조사한 추가관 염증 모델(AMF+L532)의 경우 초기 추가관 염증 모델(AMF)과 시간이 경과하더라도 큰 차이가 없음을 확인할 수 있다.
- [0052] 상기와 같은 과정을 통해, 405nm 파장의 레이저가 추가관 염증 치료에 있어 염증 매개물질을 억제하는 최적의 레이저 파장으로 결정된다(S53).
- [0053] 상기와 같은 구성에 따라, 실제 인간의 추가관에서 발생하는 염증에 근접한 추가관 염증 모델이 생성되고, 이를 이용하여 추가관 염증 치료를 위한 최적의 레이저 파장을 결정할 수 있게 됨으로써, 레이저를 이용한 추가관 염증 치료의 효과를 극대화할 수 있게 된다.
- [0054] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이다.

도면

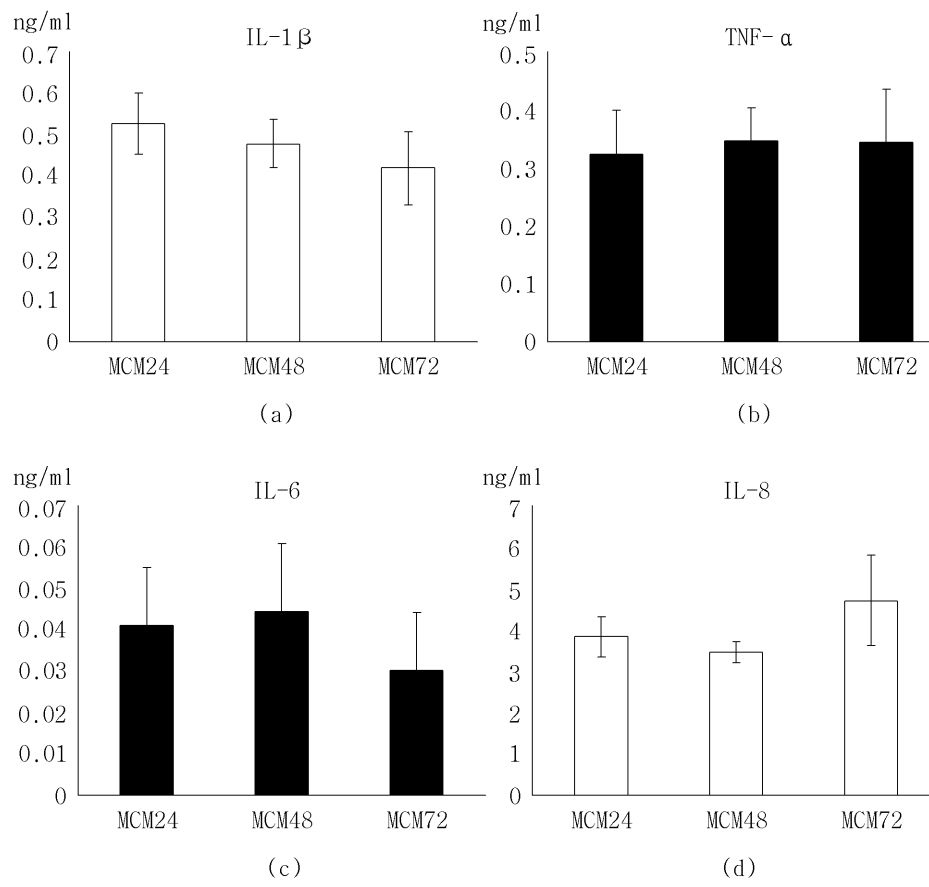
도면1



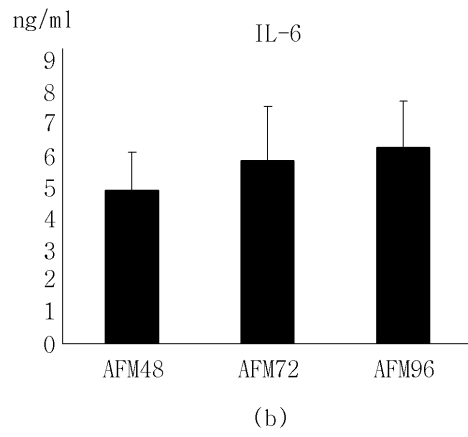
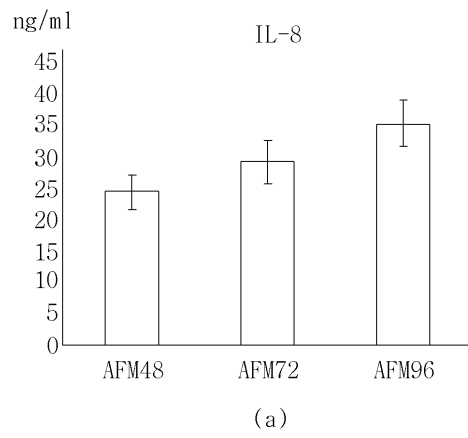
도면2



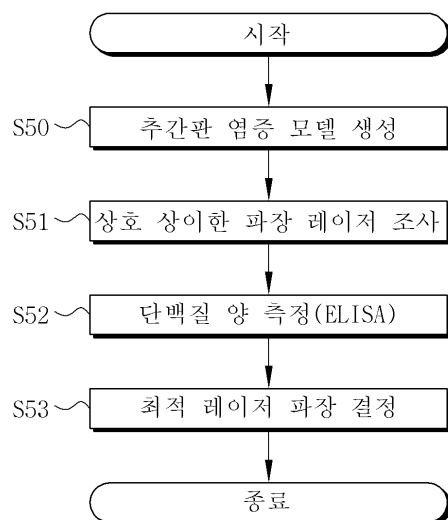
도면3



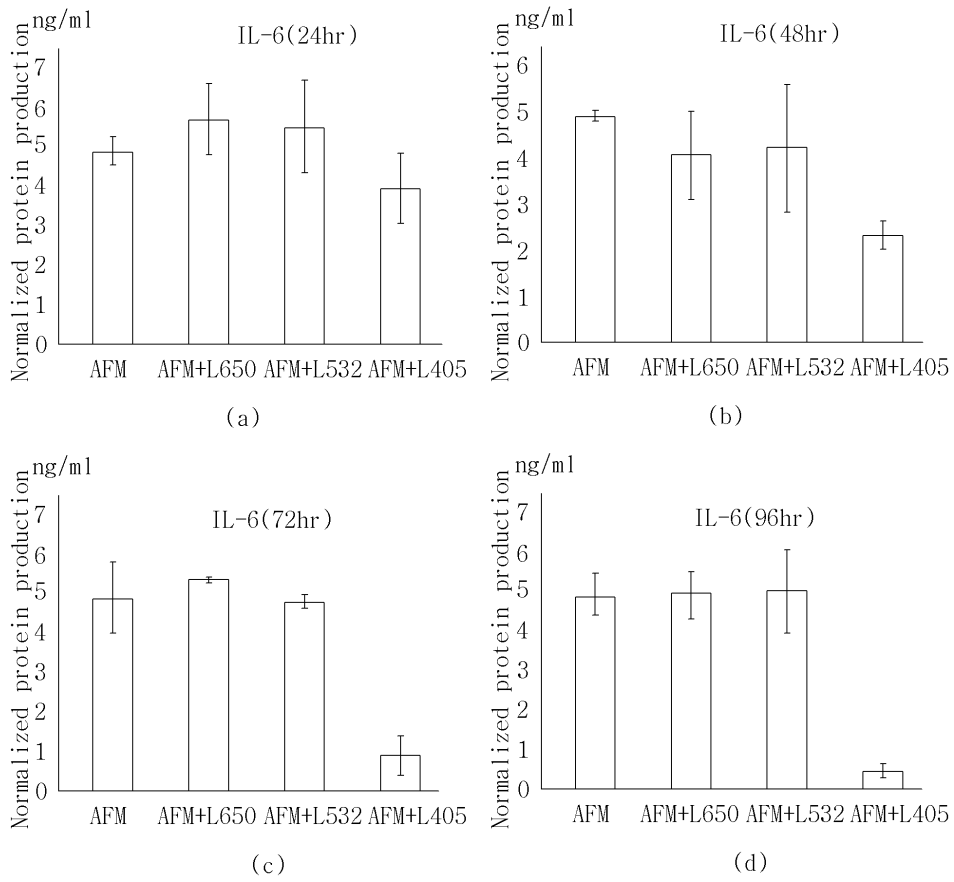
도면4



도면5



도면6



도면7

