

Histological Change and Collagen Formation on Laser Wounded Rat using 808 nm Diode Laser and CO₂ Laser

Phil-Sang Chung², Jang-In Shin¹, So-Young Chang¹ and Jin-Chul Ahn^{1,†}

¹Medical Laser and Device Research Center, ²Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

Lasers are necessity in our life related to the fields of medicine and cosmetic surgery. With 808 nm diode laser and CO₂ laser, we made some wounds on a dorsum of rat by laser irradiation. All of irradiations shows thermal effects on the whole region of skin tissues. They make wound damage depending on laser power and irradiation time. Because a collagen is plays an important role in tissue repair, we studied collagen accumulation in wound tissue. For wound healing, collagen accumulation was found in the near region of damage in epidermis and dermis layer of the rat skin. In case of the quantitative analysis of collagen in wound tissue, the amount of collagen in wound tissue by CO₂ laser irradiation is higher than that of 808 nm diode laser irradiation. And re-epithelialization was significantly faster in wound by CO₂ laser irradiation compared with that of 808 nm diode laser irradiation.

Key Words: 808 nm diode laser, CO₂ laser, Wound healing, Collagen, Re-epithelialization

서 론

레이저 조사에 의해 조직 내 생물자극 (Bio-stimulation) 이 일어나 통증완화, 염증치료, 상처치유에 효과 등이 있다고 보고된 이후 (Mester et al., 1971) 임상치료 분야는 물론 피부미용 분야에서 레이저의 다양한 응용은 사회 전반적으로 자리잡고 있으며 없어서는 안되는 필수품이 되었다.

1 watt 미만의 낮은 에너지를 이용하는 저출력레이저의 경우 통증의 감소, 염증성 질환의 치료에 효과가 있다고 보고된 바 있으며 (Posten et al., 2005), 특히, 상처치유에 대한 저출력레이저를 이용한 광조사는 섬유아세포 증식 (fibroblast proliferation), 콜라겐 합성, 대식세포 자극 (macrophage stimulation) 등 세포와 조직, 기관들에서 생화학적, 생리학적으로 상처부위 재생에 관여하는 것으로 보고된 바 있다 (Skinner et al., 1996; Loevschall et al., 1994).

또한 높은 에너지를 지닌 고출력레이저는 조직절단을

위주로 한 외과적 수술에 많이 이용되고 있는 등 많은 레이저 기기들이 그 사용용도, 파장과 출력, 조사 방식의 다양화와 같은 수많은 연구개발들이 진행되고 있다. 그러나 연구에 이용되는 실험동물이 다르거나 창상의 조직과 크기가 다르거나 창상치유 결과를 확인하는 방법론적 차이, 사용된 레이저의 종류와 에너지 세기의 다양성 등으로 인하여 각 연구 그룹마다의 결과가 서로 다른 정도 차이를 보임으로써 정확한 적용범위를 정함에 있어서 많은 어려움이 있고, 레이저를 이용한 많은 적용범위에서 최종적으로 사람에게 적용하기 위해서는 인체에 부작용을 유발하지 않으면서 각각의 최대한 효과를 나타낼 수 있는 레이저의 최적세기와 최적조사시간에 대한 자료가 확립되어야 한다.

조직의 구성물질인 콜라겐은 조직 재생성에 근본 요소로 피부의 탄력과 인장강도를 유지시켜주는 중요한 지표이기 때문에 (Pugliese et al., 2003) 창상치료에 있어서도 콜라겐의 조직 내 분포와 축적되는 양의 변화 관찰은 치료효과를 측정하는 주요 요인으로 작용한다.

본 연구에서는 실제 임상에서 사용빈도수가 높은 808 nm 레이저와 CO₂ 레이저를 이용하여 에너지 출력과 시간에 따라 야기되는 창상을 실험동물의 피부에 유발시킨 후 생성되는 창상의 모양에 따른 조직의 변화와 창상치유가 진행되면서 생성되는 콜라겐의 분포위치와 양을 측

*논문 접수: 2009년 3월 11일

수정재접수: 2009년 3월 20일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29번지, 단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터
Tel: 041-550-1786, Fax: 041-550-1788
e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

정하여 변화 정도를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

250 g의 female Sprague Dawley rat에 zoletil (Virbac Laboratories, France)과 rompun (바이엘코리아, 대한민국)을 4:1로 섞은 혼합액 0.1 ml을 근육주사하여 마취시킨 뒤 제모크림으로 등부위 털을 제거하였다. 레이저 조사를 위해 가슴부위와 허리부분의 중간부분에 위치한 등쪽에 각각 808 nm 레이저와 CO₂ 레이저를 조사하였다.

2. 레이저 조사

808 nm diode 레이저 (LAS-30A, Korea) 조사에 의한 세기별 손상 정도를 확인하기 위해 0.5 W, 1.0 W, 2.0 W로 나누어 조사하였고, CO₂ 레이저의 경우 1.0 W, 1.5 W, 2.0 W로 나누어 조사를 시행하였다. 레이저 조사에 의한 창상치유를 관찰하기 위해 진피층까지 창상이 일어나도록

808 nm diode 레이저와 CO₂ 레이저의 출력을 모두 20 J (1 W × 20 sec)로 고정한 다음 레이저 조사 이후 3, 7, 10 일 후 창상부위를 채취하여 조직의 창상변화를 살펴보았다.

3. 조직학적 관찰

레이저 조사에 의한 창상부위의 조직학적 변화를 알아보기 위해 레이저 조사 후 3, 7, 10일째 되는 rat의 창상조직을 절개하여 파라핀 표본을 만들고 조직절단기 (Leica HI-1210, Germany)를 이용하여 두께 5 μm의 조직절편을 제작하였다. 탈파라핀 시킨 후 흡수과정을 거쳐 핵과 세포질을 염색하는 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색을 실시하여 창상부위의 세포를 개괄적으로 확인하였다.

4. 콜라겐변화 관찰

1) 조직염색

창상과 관련하여 조직 재생에 관여하는 콜라겐의 변화를 조직학적으로 살펴보기 위해 레이저 조사 실시 후 3,

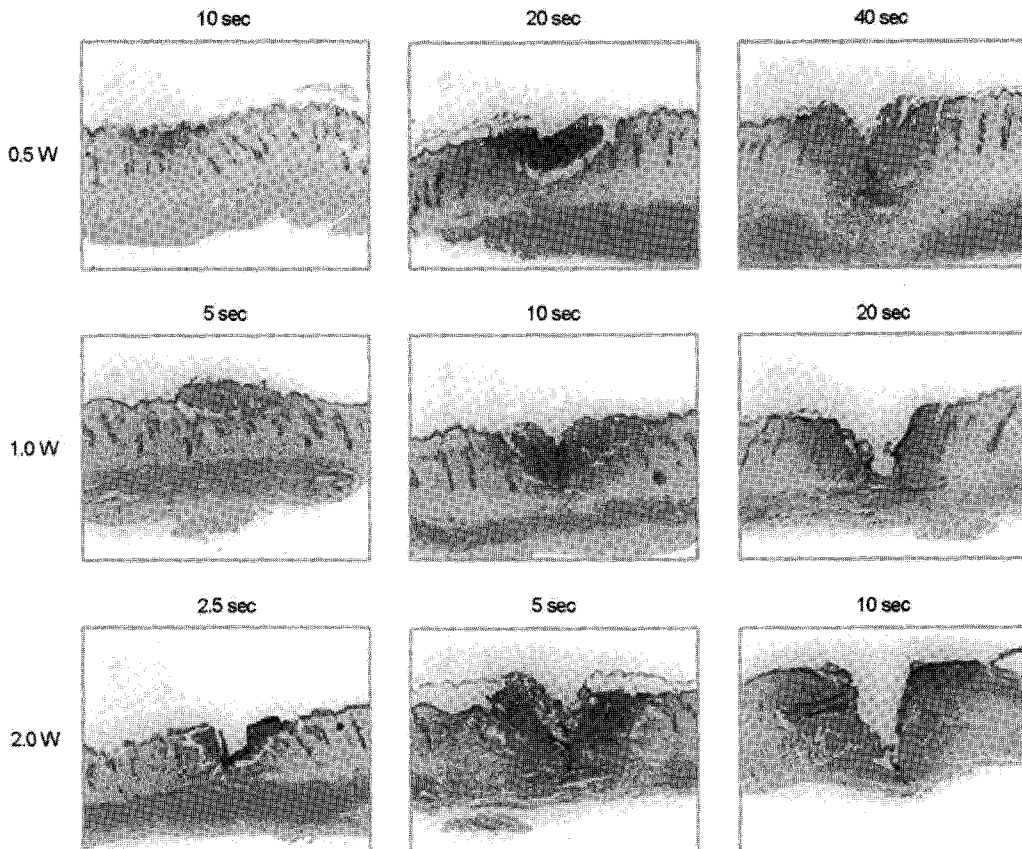


Fig. 1. Photomicrographs of rat skin after irradiation of 808 nm diode laser. 808 nm diode laser makes wound damage depending on laser power and irradiation time (H&E stain, original magnification: ×56).

7, 10일째 되는 rat의 창상조직을 절개하여 실험방법 3과 같은 방법으로 제작한 조직절편을 탈파라핀 시키고 함수, 수세를 거쳐 bouin 용액에 담가 60°C에서 1시간 동안 둔 다음 weigert hematoxyline 용액, biebrieh scarlet fuchsin 용액, aniline blue 용액을 이용하여 핵과 세포질, 콜라겐을 염색하는 Masson's trichrom (MT) 염색을 실시하여 레이저 조사 후 유발된 창상조직 내의 콜라겐 양의 분포를 확인하였다.

2) 콜라겐 정량

창상과 관련하여 조직 재생에 관여하는 콜라겐의 변화를 정량적으로 확인하기 위해 레이저 조사 실시 후 3, 7, 10일째 되는 rat의 창상조직을 절개하여 얻은 조직의 무게를 정확히 측정하여 10배 양의 0.5 M acetic acid 용액을 넣고 4°C에서 18시간 동안 교반한 다음 15,000 g 60분 동안 원심분리 후 상층액을 취하여 부피가 총 100 μ l가 되게 하였다. 1 ml의 sircol dye reagent를 첨가하여 콜라겐과 염색시약을 결합시킨 뒤 10,000 g 10분 동안 원심분리 후 얻은 pellet에 1 ml의 alkali reagent를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하는 soluble collagen assay kit (Sircol™ Biocolor Ltd., Ireland)를 이용하여 각 조직 내의 정량적인 콜라겐 양을 확인하였다.

결 과

레이저 세기와 조사시간에 따른 조직손상을 확인하기 위하여 808 nm diode 레이저와 CO₂ 레이저를 다양한 조건에서 조사한 결과 같은 에너지 세기에서 레이저 세기가 증가할수록 기화에 의한 더 깊은 열손상을 나타내었다. 그리고 레이저 조사시간이 증가할수록 조직의 기화 부위가 넓어졌으며, 주변의 열손상도 증가하였다.

808 nm diode 레이저의 경우 조사된 에너지가 동일한 0.5 W \times 40 sec, 1.0 W \times 20 sec, 2.0 W \times 10 sec 조사 후 조직을 관찰해 보면 레이저 세기가 클수록 조직이 열에 의한 기화가 더 많이 일어나고 있음을 확인하였다. 또한 지정된 레이저 세기에서는 레이저 조사시간이 길수록 일어나는 창상부위도 더 깊고 넓어져 심각한 손상이 야기되는 것을 확인하였는데, 0.5 W \times 40 sec의 경우 조직의 피하까지 기화되는 열손상이 일어나고 넓은 부종이 형성되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

CO₂ 레이저의 경우도 808 nm diode 레이저와 마찬가지로 1.0 W, 1.5 W, 2.0 W로 레이저 세기를 고정하고 조사시간을 달리하였을 때 조사시간이 길수록 조직이 손상

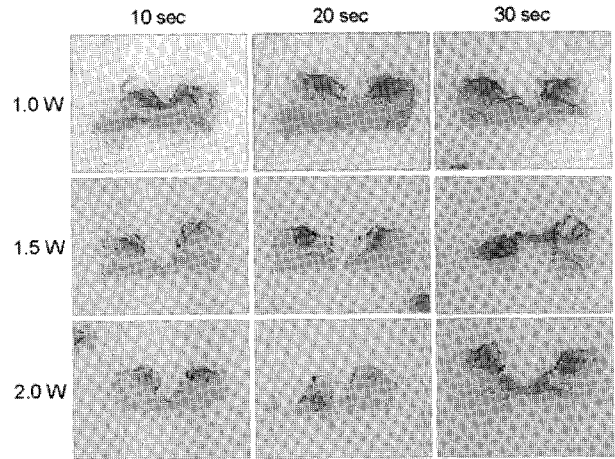


Fig. 2. Photomicrographs of rat skin after irradiation of CO₂ laser. Epidermis and dermis are destroyed and evaporated by CO₂ laser irradiation. All of irradiations shows thermal effects on the whole region of skin tissues. (H&E stain, original magnification: \times 25)

되었음을 확인하였으며, 1.5 W 이상의 세기에서는 피하는 물론 근육층까지도 조직이 파괴되어 레이저에 의한 열손상을 받았음을 확인할 수 있었다. 1.0 W의 레이저 세기로 20 sec 레이저 조사 시 피부의 표피는 물론 진피까지 조직이 기화되어 파괴되고 주변에 열에 의한 부종이 형성되는 것을 알 수 있었고, 조사된 에너지가 동일한 2.0 W \times 10 sec의 레이저 조사 시 1.0 W \times 20 sec와 에너지 세기는 같았지만 더 깊이 조직이 기화되고 손상되었음을 확인하였다. 마찬가지로 CO₂ 레이저 역시 일정한 레이저 세기에서 조사시간이 길수록 더 깊고, 넓은 조직이 레이저에 의한 열손상을 받았음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

본 연구에서 확인한 레이저 세기별 손상 정도 결과를 토대로 808 nm diode 레이저와 CO₂ 레이저가 진피층까지 손상이 가는 에너지 세기는 1.0 W \times 20 sec임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 레이저 조사에 의한 창상치유를 알아보기 위해 진피층까지 창상이 형성되도록 창상을 유발시킨 후 시간에 따른 창상치유의 조직학적 변화를 관찰한 결과 808 nm diode 레이저의 경우 레이저 조사 후 시간이 경과됨에 따라 손상주변으로 상피화가 진행되면서 주변의 부종이 사라지고 콜라겐의 양이 증가됨을 확인할 수 있었다. 레이저 조사 후 10일 째는 열에 의해 기화되었던 표피와 진피부분에 세포 증식이 일어나 상피화가 모두 진행되어 창상정상조직과 잘 연결되어 있는 모습을 알 수 있었고, 조직의 재생성을 의미하는 콜라겐 양이 증가하면서 창상이 모두 치유되고 있음을 확인할

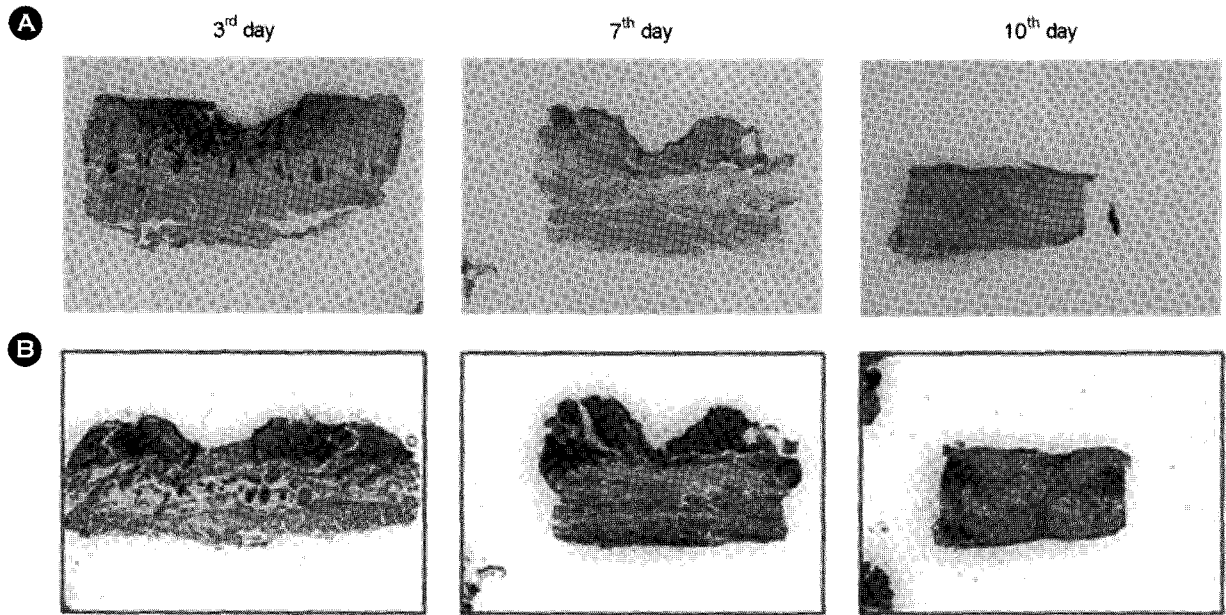


Fig. 3. Wounds of 808 nm diode laser irradiation at indicated time points after injury. As shown the 10th day after irradiation, collagen is accumulated at tissue evenly. **A:** H&E stain **B:** Masson's trichrom stain (Original magnification: $\times 56$)

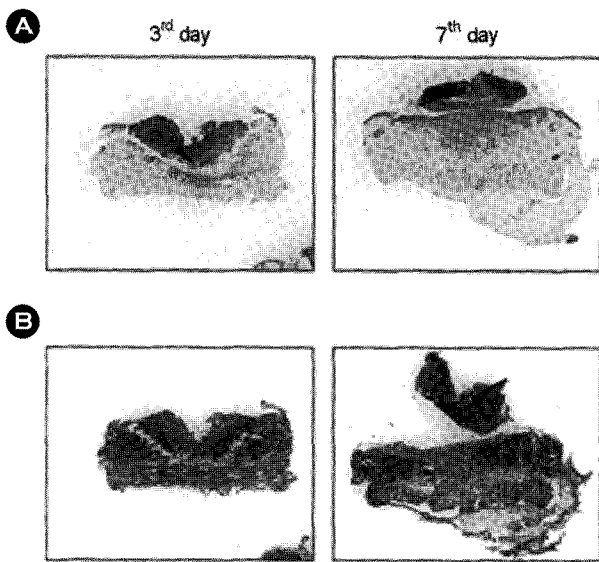


Fig. 4. Wounds of CO₂ laser irradiation at indicated time points after injury. As shown the 7th day after irradiation, wound is almost healed. **A:** H&E stain **B:** Masson's trichrom stain (Original magnification: $\times 25$)

수 있었다 (Fig. 3).

CO₂ 레이저의 경우 레이저 조사에 의해 진피층까지 창상을 유도하였을 때, 마찬가지로 열손상에 의한 조직의 기화와 주변조직의 부종이 일어났으나 808 nm diode 레이저 보다는 기화되는 조직이 상대적으로 좁게 형성되었고, 주변의 부종부위도 적게 나타남을 알 수 있었다.

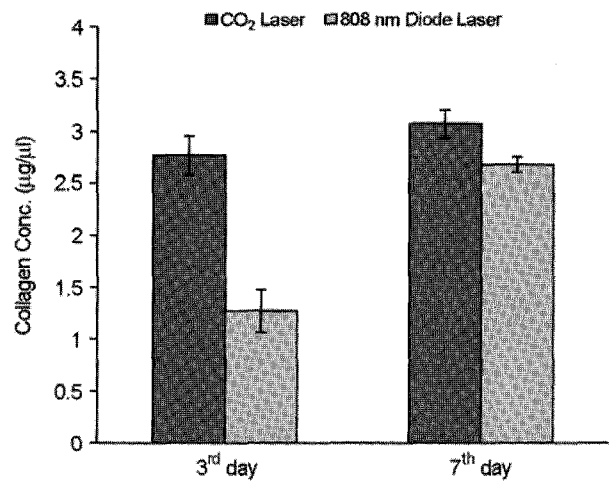


Fig. 5. Quantitative analysis of collagen in wound tissue of rat after CO₂ laser and 808 nm diode laser irradiation. The amount of collagen in CO₂ laser is higher than that of 808 nm diode laser.

레이저 조사 후 7일째에는 상피화가 완성되고 조직의 재생성이 마무리 되는 결과로 볼 때 같은 진피층까지 손상된 창상이지만 U자형으로 조직이 파괴되고 넓은 부종 부위를 가지는 808 nm diode 레이저에 의한 창상보다 V자형으로 좁고 적은 부종부위를 가지는 CO₂ 레이저에 의해 유도된 창상의 치유가 빨리 진행됨을 알 수 있었다 (Fig. 4).

또한 정량적으로 콜라겐의 축적되는 양상을 보면 레이저 조사 3일째, 7일째 CO₂ 레이저는 $2.77 \pm 0.19 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 와

3.07±0.13 µg/µl였고, 808 nm diode 레이저는 1.28±0.2 µg/µl와 2.69±0.07 µg/µl로 확인되었다. 808 nm diode 레이저보다 CO₂ 레이저에 의한 창상이 재생성 되었을 때 콜라겐이 조직에 넓게 축적되어 있음을 확인한 콜라겐 염색 결과와 더불어 콜라겐 정량실험에서도 CO₂ 레이저에 의한 창상이 재생성 되면서 합성되는 콜라겐 양이 많음을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 실험에서 수행한 레이저 조사에 의한 세기별 손상 정도는 조사되는 에너지 세기가 같았을 때 레이저 세기가 클수록 조직이 더 손상되고 있음을 확인 하였고, 지정된 레이저 세기에서는 레이저 조사시간이 길수록 나타나는 창상부위도 더 깊고, 넓어져 심각한 손상이 야기되는 것을 확인하였다. 또한, 같은 20 J의 에너지 세기를 조사하여 진피층까지 창상을 유도했을 때 808 nm diode 레이저에서는 U자형으로 조직이 파괴되고 넓은 부종부위가 나타나는 반면 CO₂ 레이저에 의해서는 V자형으로 좁고 적은 부종부위를 나타내었다. 대표적인 기체 레이저인 CO₂ 레이저는 10,600 nm의 긴 파장대의 빛을 방사하기 때문에 물이나 물을 많이 함유하고 있는 조직에서 높은 에너지 흡수율을 보이지만 상대적인 투과 깊이는 얇다. CO₂ 레이저는 파장이 길기 때문에 광섬유를 통과하기 어렵다는 단점이 있어 도파관 (wave-guide)를 사용해 광섬유로 CO₂ 레이저를 전달하는데 접힘팔 (articulated arm)을 부착한 mirror optics의 이용이 가장 좋은 방법으로 알려져 있다. 이와 같이 CO₂ 레이저는 물과 유기물질에 흡수되는 비율이 크기 때문에 인접한 다른 조직에는 큰 손상을 주지 않고, 또한 투과력이 낮아서 깊은 조직을 손상시키지도 않는 것으로 알려져 있다 (Jan Tuner and Lars Hode, 2006). CO₂ 레이저에 의한 V자형의 좁고 주변조직의 적은 부종부위를 나타낸 본 실험결과에서도 전형적인 CO₂ 레이저의 특성을 보이고 있음을 알 수 있었다.

Hwang 등은 마우스 피부에 808 nm diode 레이저, Nd:YAG 레이저, CO₂ 레이저를 조사하여 유발되는 창상의 조직변화를 실험하였는데 4 J의 레이저 조사에 의해 진피는 물론 기저부까지 열손상을 받아 부종이 생성되는 것을 확인하였다. 특히, CO₂ 레이저에 의해 유발된 창상의 경우 열손상에 의한 부종부위가 다른 레이저의 조사에 의한 창상부위와는 달리 좁고 매끄러운 모습을

나타내고 있었다고 보고한 바 있다 (Hwang et al., 2006). Hwang 등의 연구에서는 mouse의 피부조직을 이용하였는데 mouse의 평균 피부 두께는 0.7 mm로 표피층과 진피층은 수십 µm에 지나지 않았다. 사람 피부와 유사한 평균 피부 두께가 mouse 보다 2배 이상 두꺼운 rat을 이용하여 실험한 본 실험결과에서도 같은 양상을 보이는 것으로 같은 에너지 세기의 조사지만 레이저의 종류에 따라서 유발되는 창상의 모양이 다름을 확인할 수 있었다.

피부조직 내에서 콜라겐의 합성과 특정 부위에 대한 축적은 일반적으로 조직의 재생성을 의미하며, 콜라겐 합성의 촉진에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다 (Pinheiro et al., 2005). 본 실험에서는 CO₂ 레이저 조사에 의해 유발된 창상이 808 nm diode 레이저 조사에 의해 유발된 창상보다 치유되는 시간이 빨랐으며, CO₂ 레이저에 의한 창상의 경우 재생성된 조직에 콜라겐이 넓게 축적되어 있음을 조직학적 실험과 정량실험을 통해서 확인하였다. 주로 피부의 진피부위에 널리 분포되어 있으며 피부의 탄력과 인장강도를 유지하는 주요 지표인 콜라겐의 조직 내 축적 되는 분포와 양을 확인한 본 실험결과는 CO₂ 레이저에 의해 유발된 창상조직이 재생성 되었을 때 완벽한 정상조직의 기능과 형태를 취하지는 않지만 다른 레이저보다는 좀더 피부 탄력이나 인장강도가 클 것으로 사료된다.

결 론

808 nm diode 레이저와 CO₂ 레이저에 의해 생성되는 창상의 모양이 틀림을 확인하였고, CO₂ 레이저 조사에 의해 유발된 창상이 808 nm diode 레이저 조사에 의해 유발된 창상보다 치유되는 시간이 빨랐으며, CO₂ 레이저에 의한 창상의 경우 재생성된 조직에 콜라겐이 넓게 축적되어 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 단국대학교 의학레이저 의료기기 연구센터의 지원에 의해서 이루어진 것임.

REFERENCES

- Jan Tuner, Lars Hode. Laser Therapy Clinical Practice and Scientific Background. 2006. pp 27-35.
Hwang HJ, Ahn JC, Lee SH, Chang SY, Shin JI, Kwon PS, Kang

- JW, Chung PS. Comparative study of damage and wound healing on mouse skin by irradiation of CO₂, ND:YAG, 808 nm laser. *Kor Soc Laser Med Surg.* 2006. 10: 12-20.
- Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994. 14: 347-354.
- Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of lasers rays on wond healing. *Am J Surg.* 1971. 122: 532-535.
- Pinheiro ALB, Pozza DH, Oliveira MG, Weissmann R, Ramalho LMP. Polarized light (400~2000 nm) and nonablative laser (685 nm): A description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. *Photomed Laser Surg.* 2005. 23: 485-492.
- Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005. 31: 334-340.
- Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZA. The influence of low level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003. 17: 307-313.
- Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996. 41: 188-192.
-