

저출력 레이저 자극이 근육세포의 증식 및 유전자 발현에 미치는 효과

곽지현¹, 전옥희¹, 강동연¹, 유현희², 김경환¹, 정병조¹, 김지현¹

¹연세대학교 보건과학대학 의공학과

²한국 한의학 연구원 체질 생물학 의공학 연구센터

Effect of Low-Energy Laser Irradiation on the Proliferation and Gene Expression of Myoblast Cells

J. H. Kwag¹, O. H. Jeon¹, D. Y. Kang¹, H. H. Ryu², K. H. Kim¹, B. J. Jung¹, C. H. Kim¹

¹Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, Wonju, Korea

²Constitutional Biology and Medical Engineering Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea

(Received November 4, 2009. Accepted January 27, 2010)

Abstract

Laser irradiation is known to affect various tissues such as skin, bone, nerve, and skeletal muscle. Laser irradiation promotes ATP synthesis, facilitates wound healing, and stimulates cell proliferation and angiogenesis. In skeletal muscle, laser irradiation is related to the proliferation of skeletal muscle satellite cells. Normal skeletal muscle contains remodeling capacity from myogenic cells that are derived from mononuclear satellite cells. Their processes are activated by the expression of genes related with myogenesis such as muscle-specific transcription factors (MyoD and Myf5) and VEGF (vascular endothelial growth factor). In this study, we hypothesized that laser irradiation would enhance and regulate muscle cell proliferation and regeneration through modulation of the gene expressions related with the differentiation of skeletal muscle satellite cells. C₂C₁₂ myoblastic cells were exposed to continuous/non-continuous laser irradiation (660nm/808nm) for 10 minutes daily for either 1 day or 5 days. After laser irradiation, cell proliferation and gene expression (MyoD, Myf5, VEGF) were quantified. Continuous 660nm laser irradiation significantly increased cell proliferation and gene expression compared to control, continuous 808nm laser irradiation, and non-continuous 660nm laser irradiation groups. These results indicate that continuous 660nm laser irradiation can be applied to the treatment and regeneration of skeletal muscle tissue.

Key words : Low-energy laser irradiation, myoblast, cell proliferation, MyoD, Myf5, VEGF

1. 서론

성인의 골근육(skeletal muscle)은 리모델링(remodeling)의 능력이 있는 매우 안정된 조직이며, 후분열근육섬유(post-mitotic muscle fibers)를 가지고 있다. 리모델링은 근섬유의 기저막 아래에 누어있는 정지한 단핵위성세포(quiescent mononuclear satellite cells)에서 유래된 근원세포(myogenic cell)에 의해 일어난다[1].

근육이 물리적인 활동, 외상 또는 특이한 질병에 의해 근 손상을

입었을 경우, 근육은 스스로 손상된 부분의 회복(regeneration)을 시작한다. 골근육의 회복은 근육세포의 분화(differentiation)와 증식(proliferation)에 의존하며 그와 관련된 주요 전사인자(transcription factor)로는 myogenic differentiation (MyoD), myogenic factor 5 (Myf5), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이 있다[2]. MyoD와 Myf5는 근육특이전사인자(muscle-specific transcription factor)로서 근육세포로의 분화와 증식에 관여하며, VEGF는 회복과 통증 그리고 혈관 생성에 관여하는 유전자로 알려져 있다[3]. 이들 유전자의 증가는 곧바로 근육조직의 증가 및 회복을 의미한다.

최근에는 저출력 레이저(low-energy laser irradiation, LELI)를 이용한 연조직(soft tissue) 재생의 가능성이 대두되고 있다. 저출력 레이저의 광은 비교적 넓은 스펙터(specter)로 분포되어 광

Corresponding Author : 김지현

강원도 원주시 흥업면 매지리 234번지 연세대학교 보건과학대학 의공학과

Tel : +82-33-760-2785 / Fax : +82-33-760-2898

E-mail : chihyun@yonsei.ac.kr

본 연구는 지식경제부 차세대기술개발사업 중 지능형 인방콘텐츠 개발 (10028438)의 지원에 의해 이루어진 것임 (This work was supported by the Korea Ministry of Knowledge Economy (10028438)).

은 파장의 파를 포함하고 있기 때문에 조직 내의 서로 다른 고유파장을 지닌 각종 세포를 비교적 고르게 자극시킬 수 있다. 이러한 저출력 레이저를 이용한 세포단위의 연구에 의하면, fibroblast, keratinocyte, osteoblast, mesenchymal stem cell 등의 세포 증식을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 저출력 레이저는 가열된 열로 인한 조직세포의 손상을 방지하고 fibroblast growth factor (FGF) 분비를 증가시켜 혈관화의 증가 및 염증반응을 일으켜 손상된 조직을 빠르게 회복시킨다[4,5]. 뿐만 아니라 저출력 레이저는 피부[6], 뼈[7], 신경[8], 그리고 골근육[9] 등의 다양한 조직에서 연구되고 있으며, 다양한 생물학적인 과정을 조절한다[6,10]. 이에 대한 예로는 미토콘드리아의 증가와 ATP합성에 관여하며 [11,12], 혈관생성(angiogenesis)을 촉진하는 것으로 알려졌다. 쥐와 두꺼비에서 손상된 limb muscle에 저출력 레이저를 가했을 때 각각 2배, 8배의 근육섬유 형성이 일어난다[13]. 더 나아가 저출력 레이저는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)를 자극하고 염증반응을 감소시키며, 세포증식에 효과적이다[9].

다양한 저출력 레이저가 섬유아 세포 및 근육세포 등에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만 실험에 적용된 레이저 파장대의 범위가 매우 광범위하여 고정된 저출력 파장대에서의 적절한 노출시간 및 기간 등의 파라미터에 관한 연구가 부족하였다. 또한 저출력 레이저가 근육세포에 미치는 영향에 대해 가장 근본적인 유전자 단위인 MyoD, Myf5, VEGF의 유전자 발현 단위에서의 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 고정된 저출력 (660nm/808nm) 레이저가 근육세포의 MyoD, Myf5, VEGF의 유전자 발현을 통해 확인하므로 적절한 레이저 자극의 파라미터를 찾고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 세포배양 및 레이저 자극

본 연구에서는 C₂C₁₂ myoblast세포(Riken BRC Cell Bank, Japan)를 tissue culture dish에 배양하였다. 실험은 크게 1일 레이

저 자극과 5일 레이저 자극으로 구분되었다. 1일 레이저 자극은 control군, 660nm 레이저 자극군, 808nm 레이저 자극군의 3개 그룹으로 구성되었다. 5일간 진행된 실험에서는 레이저의 연속 자극과 불연속자극의 영향을 추가로 보기 위하여 control군, 660nm 레이저 자극군, 808nm 레이저 자극군을 각각 연속자극 및 불연속 자극으로 나누어 총 6개 그룹으로 구성하였다. 모든 세포는 DMEM, 10% FBS, 1% P/S (Lonza, USA) 인 배지에 넣고 5% CO₂, 37℃의 인큐베이터 조건에서 배양하였다. 세포부착 3시간 뒤, 저출력 레이저에 1일 또는 5일간 노출시켰으며 배지는 3일에 한 번 갈아주었다. 세포부착 3시간 뒤, 저출력 레이저에 1일 또는 5일간 노출시켰으며 배지는 3일에 한 번 갈아주었다.

레이저 노출은 이전 연구에 의해 세포 분화, 증식 및 상처 치유와 관련된 레이저 파장으로 알려진 660nm와 808nm를 적용하였다. 실험방법은 연속적으로 10분 노출한 그룹(1일, 5일)과 불연속적으로 2분씩 5회로 총 10분간 레이저에 노출시킨 그룹(1일, 5일)으로 나누었다. 세포가 부착된 후에 660nm, 808nm 레이저 노출한 다음 바로 결과를 확인(1일)하고, 부착된 세포를 5일간 레이저 노출시킨 후 결과(5일)를 확인하는 실험을 진행하였다(Fig. 1). 레이저 노출은 ambient light에서 진행되었다. 레이저 자극이 끝난 후 즉시 cell counting과 mRNA 추출이 이루어졌고, 노출된 레이저는 660nm/808nm로 하였으며, average power output은 10mW 이었다. 또한 spot size는 4.2cm, 노출시간은 10분, power density는 0.000723W/cm², 그리고 energy density는 0.43J/cm²이었다.

B. mRNA 추출과 유전자 발현

레이저 자극이 완료된 후, tissue culture dish에 부착된 모든 그룹의 세포를 인산염완충액(PBS)으로 세척한 뒤 Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, USA)를 사용해 총 mRNA를 세포에서 추출해 내었다. cDNA 합성을 위해 TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 pre-cDNA 샘플을 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler에 의해 합성시켰다. cDNA 샘플을 Taqman® Universal PCR Master



그림 1. 연속적, 비연속적 660nm/808nm 레이저 자극 시스템. (A: 저출력 레이저 방출 부분, B: 세포가 부착된 dish의 위치)
 Fig. 1. Continuous, non-continuous 660nm/808nm laser irradiation system. (A: low laser exposure position, B: the position of dish attached cells)

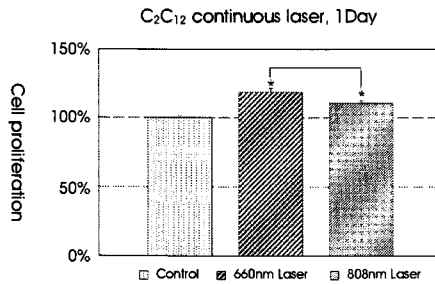


그림 2. 연속적인 660nm/808nm 레이저에 1일 노출된 C₂C₁₂ 세포 증식을. (p < 0.05 / control과 660nm 또는 808nm 레이저 그룹의 비교^[*], 레이저 그룹간의 비교 [□] / N=3)

Fig. 2. C₂C₁₂ Cell growth rate exposed by continuous 660nm/808nm laser irradiation at 1 day. (p < 0.05 / control compared to 660nm(or 808nm) laser group^[*], between laser groups [□] / N=3)

Mix 및 20X primer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system으로 MyoD, Myf5, 그리고 VEGF 유전자 발현량을 Relative Quantitation (RQ) study software를 통해 확인하였으며, 이를 18s house keeping gene로 normalization하였다.

C. 통계학적 분석

통계학적인 유의성 분석을 위하여 ANOVA의 post hoc Fisher's least significant difference test를 진행하였으며 significance level은 0.05를 적용하였다.

III. 결과

A. 연속적인 저출력 레이저에 1일 노출된 근육세포의 세포증식

세포배양 1일째 되는 날에 연속적으로 레이저를 10분 노출시킨 후 바로 근육세포의 증식을 확인하기 위해서 cell counting을 시행하였다. 그 결과, 레이저를 가한 그룹을 control 그룹과 비교했을

때 660nm에서는 18% 증가하였으며, 808nm에서는 11% 증가하였다(Fig. 2). 또한, 660nm 레이저가 808nm 레이저에 비해 근육세포의 증식을 증가시켰다 (p < 0.05). 따라서 연속적인 저출력 레이저를 1일 가하였을 때 660nm 레이저에서 가장 긍정적인 효과를 보였다. 그러나 1일 세포 증가율만의 변화를 가지고 레이저의 효과를 정확히 판단하기 어려우므로 근육세포 분화와 관련된 유전자의 변화를 확인하였다.

B. 저출력 레이저에 1일 노출된 근육세포의 유전자 발현

레이저 노출 후, C₂C₁₂의 MyoD, Myf5, VEGF의 유전자 발현량의 변화를 확인하기 위하여 real time RT-PCR을 시행하여 결과를 확인하였다. 연속적인 660nm 레이저에 1일 노출된 C₂C₁₂의 유전자 발현 결과에 따르면 control과 비교했을 때, MyoD에서 71%(Fig. 3A), Myf5에서는 183%(Fig. 3B), VEGF에서는 38%(Fig. 3C) 증가함을 보였다. 그러나, 808nm 레이저에 1일 노출하였을 때는 control과 비교하여 MyoD, VEGF에서는 변화를 확인할 수 없었으며 Myf5에서만 66% 증가됨을 보였다. 뿐만 아니라, 660nm 와 808nm 레이저 그룹 간 비교하였을 때, 660nm 레

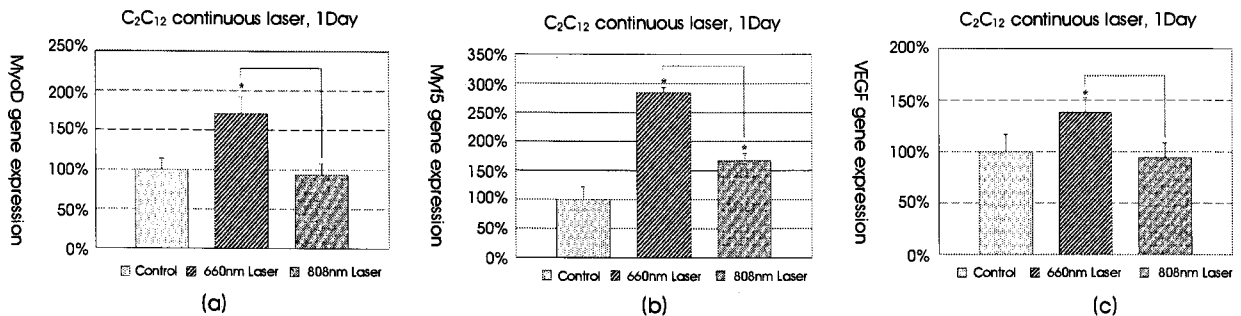


그림 3. 연속적인 660nm/808nm 레이저에 1일 노출된 C₂C₁₂ 세포의 (A) MyoD, (B) Myf5, 그리고 (C) VEGF 유전자 발현. (p < 0.05 / control과 660nm 또는 808nm 레이저 그룹의 비교^[*], 레이저 그룹간의 비교 [□] ; N=3)

Fig. 3. The (A) MyoD, (B) Myf5 and (C) VEGF gene expression of C₂C₁₂ cells exposed by continuous 660nm/808nm laser irradiation at 1 day. (p < 0.05 / control compared to 660nm(or 808nm) laser groups^[*], between laser groups [□] ; N=3)

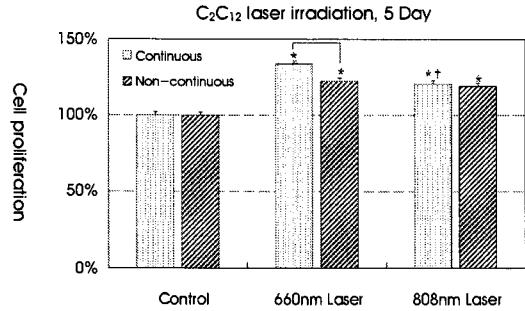


그림 4. 연속적, 비연속적 660nm/808nm레이저에 5일 노출된 C₂C₁₂ 세포 증식을. (p < 0.05 / control과 660nm 또는 808nm 레이저 그룹의 비교[*], 같은 조건하의 레이저 그룹간의 비교[†], 연속적, 비연속적 레이저 그룹간의 비교 [□]; N=3)

Fig. 4. C₂C₁₂ Cell growth rate exposed by continuous, non-continuous 660nm/808nm laser irradiation during 5 days. (p < 0.05 / control compared to 660nm(or 808nm) laser group[*], between laser groups under same condition[†], between laser groups [□] / N=3)

이러 자극이 MyoD 유전자를 70%, Myf5 유전자를 117%, VEGF 유전자를 42% 증가시켰다(Fig. 3). 즉, 연속적인 660nm 레이저에 1일 노출시켰을 때 세포 분화가 808nm보다 더욱 활발히 일어나 세포 증식에 적잖은 영향을 주었음을 확인하였다. 이를 통해 저출력 레이저가 (특히 단기간에서는 660nm 레이저 자극이) 근육세포에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였으나 더욱 정확한 근육세포의 반응을 연구하기 위하여 보다 긴 시간에 따른 변화(5일 노출) 및 레이저의 연속/불연속적인 노출 변화에 대한 실험을 진행하였다.

808nm레이저를 비교했을 때는 660nm에서 12% 세포증식이 증가하였으나 불연속적인 레이저 자극에서는 660nm와 808nm 간의 차이가 없었다. 동일한 레이저 파장대에서 연속적인 자극과 불연속적인 자극을 비교한 결과, 660nm에서는 연속적인 자극이 11% 세포증식을 증가시켰으나, 808nm에서는 연속적인 자극과 불연속적인 자극 간의 차이가 없었다(Fig. 4). 따라서 연속적인 660nm를 5일간 노출하였을 때 가장 긍정적인 효과를 나타내었다. 그러나 더욱 정확한 결과 확인을 위하여 MyoD, Myf5 그리고 VEGF 유전자 발현을 확인하였다.

C. 연속적/불연속적인 저출력 레이저에 5일 노출된 근육세포의 세포증식

연속적/불연속적인 레이저에 5일간 노출 시킨 후 세포증식을 확인하였다. 연속적인 레이저에 노출된 근육세포를 control과 비교했을 때 660nm에서는 33%, 808nm에서는 21% 증가됨을 보였으며, 불연속적인 레이저에 노출 되었을 때는 660nm에서는 22%, 808nm에서는 19% 증가됨을 보였다. 또한, 연속적인 660nm와

D. 연속적/불연속적인 저출력 레이저에 5일 노출된 근육세포의 유전자 발현

연속적/불연속적인 레이저에 5일간 노출시킨 후 MyoD, Myf5, VEGF 유전자 발현량을 확인하였다. 그 결과, 5일간 연속적인 660nm 레이저에 노출된 근육세포를 control과 비교했을 때 MyoD는 84%(Fig. 5A), Myf5는 172%(Fig. 5B), VEGF는 91%(Fig. 5C)의 유전자 발현량이 증가하였다. 또한, 5일간 연속

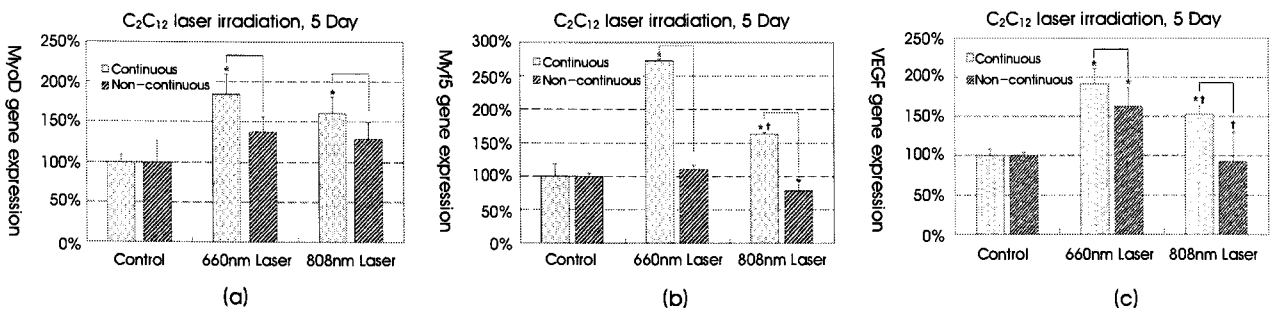


그림 5. 연속적, 비연속적 660nm/808nm 레이저에 5일 노출된 C₂C₁₂ 세포의 (A) MyoD, (B) Myf5, and (C) VEGF 유전자 발현. (p < 0.05 / control과 660nm 또는 808nm 레이저 그룹의 비교[*], 같은 조건하의 레이저 그룹간의 비교[†], 연속적, 비연속적 레이저 그룹간의 비교 [□]; N=3)

Fig. 5. The (A) MyoD, (B) Myf5 and (C) VEGF gene expression of C₂C₁₂ cells exposed by continuous 660nm/808nm laser irradiation during 5 days. (p < 0.05 / control compared to 660nm(or 808nm) laser groups[*], between laser groups under same condition[†], between laser groups [□]; N=3)

적인 808nm 레이저에 노출된 근육세포는 control과 비교했을 때 MyoD는 60%, Myf5는 63%, VEGF는 52%의 유전자 발현량이 증가하였다. 이와는 달리 불연속적인 660nm 레이저에 노출된 근육세포를 control과 비교하였을 때, MyoD, Myf5에서는 큰 변화를 볼 수 없었으며 VEGF에서만 62% 증가함을 보였다. 불연속적인 808nm 레이저에 노출되었을 때는 MyoD, VEGF에서는 큰 변화를 볼 수 없었으며, Myf5는 약 20% 감소하였다.

연속적인 660nm 레이저는 연속적인 808nm 레이저에 비해 Myf5와 VEGF 유전자 발현을 각각 110%, 40% 증가시켰다(Fig. 5B, C). 또한, 불연속적인 660nm 레이저 자극과 불연속적인 808nm 레이저 자극을 비교하였을 때는 VEGF에서만 660nm가 808nm 보다 유전자 발현량을 증가시켰다(Fig. 5).

동일 파장대에서 연속적 레이저와 불연속적인 레이저를 비교한 결과, 모든 660nm와 808nm 레이저 자극에서 동일하게 모든 유전자에 대하여 연속적인 레이저 자극이 불연속적인 레이저 자극보다 유전자 발현량을 증가시켰다.

IV. 고찰

본 연구에서는 저출력 레이저 치료기의 효과를 검증하기 위하여 근육의 세포증식과 MyoD, Myf5, 그리고 VEGF의 유전자 발현량 변화를 확인하였다. 수행된 실험 결과에 의하면 660nm 레이저 노출은 세포증식과 관련하여 기간에 따른 노출에 따라 1일군과 5일군에서 808nm 레이저 노출 시켰을 때와는 달리 모두 증가되었으며 이와 더불어 연속적 레이저와 불연속 레이저 노출을 비교하였을 때, 연속적인 660nm 레이저 노출에서 세포의 증가율이 더욱 효과적임을 확인할 수 있었다.

그러나 이는 단순히 세포증식율로만 확인한 결과이기에 정확한 변화분석을 위해서 근육세포의 기능을 조절하는데 가장 근본적인 분화, 증식, 그리고 회복에 관련된 MyoD, Myf5, VEGF 유전자 발현량 변화를 통해 정확한 레이저 노출의 영향을 확인하였다. 1일 레이저에 노출된 유전자 발현량 결과에 의하면 각 실험군의 MyoD, Myf5, VEGF 유전자 발현량이 control군과 비교했을 때, 660nm 레이저에서 큰 차이로 증가됨을 확인하였으나 808nm 레이저에서는 Myf5의 증가를 제외하고는 큰 변화를 확인할 수 없었다. 기간에 따른 변화를 확인하기 위한 노출 5일군의 연속적인 660nm에서 MyoD, Myf5, VEGF 유전자 발현량이 모두 증가됨을 보였으며, 808nm에서는 연속적인 레이저 노출에서는 660nm보다는 덜 증가됨을 확인할 수 있었다.

연구에 의하면 저출력 레이저에 노출되었을 때 세포증식이 증가 되는 것은 growth factor(VEGF)와 interleukins(IL-2, IL-6 등)의 분비가 촉진됨으로 알려져 있다. 본 실험에서 660nm/808nm 연속/불연속 레이저를 1일, 5일간 노출했을 때 다른 군보다 5일 660nm 연속 레이저군에서 MyoD, Myf5, VEGF 유전자 발현의 증가로 뚜렷한 차이를 보였다. 특히 VEGF는 growth factor의 증가를 촉

진하였을 것으로 예측된다. 따라서, 연속적인 660nm가 근육세포의 분화초기 단계에서 나타나는 MyoD, Myf5의 유전자 발현 증가로 근육세포 분화 유도를 증가시키고, VEGF의 발현 증가로 세포의 증식을 촉진했을 것으로 생각된다.

660nm 노출군이 808nm 노출군보다 세포증식 및 유전자 결과에서 매우 긍정적인 역할을 하였으나, 808nm의 노출 또한 control과 비교하였을 때 효과가 있었음을 확인할 수 있었다. 5일간 연속/불연속 노출군의 세포증식 및 유전자 결과를 보면 control과 비교하였을 때 세포의 증식이 모두 증가하였고, 유전자 발현 결과에서도 Myf5의 불연속 결과에서의 감소를 제외하고는 연속적인 부분에서는 control 보다 증가되었으며, 불연속에서는 큰 차이를 볼 수 없었다. Myf5에서의 불연속군의 감소는 660nm의 불연속 결과와 마찬가지로 시간적 가중에 의한 광 흡수력이 연속적인 그룹에서보다 효과적이지 못한 것으로 사료된다. 이는 808nm 레이저 또한 연속적인 자극을 주었을 때 치료적 효과가 있는 파장대로 생각되어 지나, 시간적 가중에 따른 자극의 세기가 660nm보다는 덜 효과적 인 것으로 생각된다. 이와 더불어 세포의 특성에 따른 적절한 파장대 영역에 대한 차이도 생각해 볼 수 있다. 결과적으로 근육세포에서는 660nm 파장대가 가장 긍정적인 효과를 볼 수 있는 파장대로 사료된다.

뿐만 아니라 연속적, 불연속적인 레이저 노출은 유전자 발현 변화에서 큰 차이를 보였다. 본 실험에서 레이저 노출시간은 동일하였으나 노출방식의 차이에 따른 효과가 매우 다르게 나타났다. 이는 근육세포가 연속적으로 레이저에 노출되었을 때의 광 흡수력이 불연속보다 효과적이었음을 시사한다. 흡수력에 대한 차이는 세포 증식 및 유전자 발현에서 control과 비교했을 때 뚜렷이 나타남으로 확인할 수 있었다. 다시 말해 레이저 자극이 연속적으로 가해졌을 때 시간적인 가중에 의해 자극의 강도를 극대화 시켰을 것으로 추측된다.

결과적으로, 연속적인 660nm 레이저 자극을 단기간 받은 근육 세포는 유전자 발현량이 증가되면서 세포의 분화 및 증가 더 나아가 근육조직의 회복과 같은 치료효과를 보이리라 예상된다.

본 연구를 통하여 저출력 레이저에 노출된 근육세포의 반응을 세포증식곡선 및 유전자 발현량으로 확인하면서 기초의학 및 재생 의학에 적용되어 유익한 결과를 나타낼 수 있는 가능성을 확인하였다. 위의 결과들을 토대로 조직공학 또는 더 나아가 생체 내 실험까지 진행할 필요성이 있음을 시사한다. 근육의 기초의학 및 재생 의학에서 저출력 레이저 치료기는 흥미로운 새로운 기술이며, 치료 시 큰 외상이 없이 근육과 관련된 질병들을 근본적으로 치료하는데 매우 효과적인 기기로써 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다. 결론적으로, 본 생체 외 연구를 통하여 연속적인 660nm 저출력 레이저 치료의 단시간 내 근육세포 증식 및 회복의 효과를 검증할 수 있었다.

참고문헌

- [1] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961 Feb;9:493-5.
- [2] Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004 Apr;12(3-4):311-9.
- [3] Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* 2005 Aug-Oct;16(4-5):575-84.
- [4] Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res* 1992;4(1):25-44.
- [5] Nemeth GG, Bolander ME, Martin GR. Growth factors and their role in wound and fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 1988;266:1-17.
- [6] Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996 May;23(5):492-6.
- [7] Yaakobi T, Maltz L, Oron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcif Tissue Int* 1996 Oct;59(4):297-300.
- [8] Assia E, Rosner M, Belkin M, Solomon A, Schwartz M. Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve. *Brain Res* 1989 Jan 9;476(2):205-12.
- [9] Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat Rec* 1993 Mar;235(3):374-80.
- [10] Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999 Mar;49(1):1-17.
- [11] Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers Surg Med* 1994;15(2):191-9.
- [12] Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol* 1997 Dec;66(6):866-71.
- [13] Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)* 1992 Oct;186(5):497-503.