

Er:YAG 레이저와 Er,Cr:YSGG 레이저가 염증유발 마우스조직에 미치는 영향

박태일 · 이형석 · 이희종 · 채창훈¹ · 이영주² · 변광섭² · 홍순민² · 최미라³ · 박준우²

한림대학교 의학과 대학원생, ¹한림대학교 임상치의학 대학원,
한림대학교 의과대학 강동성심병원 ²구강악안면외과, ³보철과

Abstract

The Effect of ER:YAG Laser & ER,CR:YSGG Laser on the Tissue of the Inflammation-Induced Mouse

Tae-Il Park, Hyung-Seok Lee, Hee-Jong Lee, Chang Hoon Chae¹, Young-Joo Lee²,
Kwang-Seob Byeon², Soon-Min Hong², Mee-Ra Choi³, Jun-Woo Park²

Graduate student of Hallym University, ¹Graduate school of clinical dentistry, Hallym University,
²Department of Oral & Maxillofacial Surgery, ³Department of Prosthodontics, Kang-dong Sacred Heart Hospital,
College of Medicine, Hallym University

Purpose: This study was performed to find out the effects of the Er:YAG laser (Key Laser) & Er,Cr:YSGG laser (Water Laser) on inflammatory tissues .

Materials and Methods: It was performed on about 20 g, 6 weeks male ICR mice. They were grouped into the control (negative), the inflammation induced 'control' (positive), Er,Cr:YSGG laser exposed group after inducing inflammation, Er:YAG laser exposed group after inducing inflammation each 15 mice. The mice were applied 0.5% DNFB 1 cc on ear skin twice a day for 4 days until symptom expression. After laser exposure, ear tissues were extracted and defined gene expression by RT-PCR. Then, tissue staining, lymphocytes observation, electromicroscopic laboratory were carried out.

Results: Interleukin-1 β was expressed much less in the A-laser exposed group. Interleukin-1 β & Tumor Necrosis Factor- α were expressed 7 times lesser in the A-laser exposed group. The number of Lymphocytes related to inflammation was decreased rapidly in the A-laser exposed group *in vivo*. The number of cavity recovered normal was a little bigger in the A-laser exposed group after 5 days.

Conclusion: The expression of IL-1 β & TNF- α , histologic change, observation with electron microscope shows that Erbium laser exposure causes lesser inflammation with A-laser rather than B-laser.

Key words: Laser therapy, IL-1 β & TNF- α , Mice, Electron microscope

서론

잇몸에 발생하는 대표적인 염증성 질환들로는 치은염 및 치주염 등을 들 수 있다.¹⁾ 2000년대 이전에는 curette과 같은 외과적기구들을 이용하여 이러한 염증조직들을 제거하였다. 그러나 2000년대 들어 임플란트가 보편화된 진료가 되면서 임플란트 주위염 등이 생겼을 때 이것을 치료하기 위한 새로운 패러다임으로 Erbium 계열의 레이저가 소개되었다. 상용화된 Erbium 계열의 레이저가 고가의 장비임에

도 불구하고 일반 개원가에 보급되어 이러한 임플란트주위염 치료 등에 레이저를 이용하면서 레이저치료가 치과계에 진료 영역의 한 분야로서 많은 논란과 관심의 대상이 되고 있다.

치과 영역에서의 레이저는 이전에 사용되던 금속기구들인 blade나 치아를 절삭할 때 사용하는 bur 그리고 curette 등의 기존 기구들을 대신하여 치과 영역의 진료에 사용될 대체품인 것만은 확실하다. 치과용 레이저는 통증, 출혈, 조직손상은 물론 드릴로 인한 소음과 진동이 거의 없어 소아,

임산부, 만성 질환자, 노인 시술에서 유용하게 사용할 수 있다. 또한 레이저는 살균작용으로 각종 병원균을 제거함으로써 2차감염을 억제하는 동시에 항생제 투여의 필요성을 감소시키고, 환부에 대한 생체자극 효과로 자연스럽게 신속한 치유를 가능하게 한다고 알려져 있다.²⁾

그러나 기존의 Nd:YAG, Ho:YAG, CO₂ 레이저 등은 대부분 열을 발생시켜 임플란트 주위염과 같은 염증을 치료할 때 임플란트 표면을 변경시키거나 손상을 주어서 사용하기에 부적절^{3,4)}하여 2002년도부터 상용화된 Erbium 계통의 레이저가 임플란트 주위염 치료에 사용되기 시작했다. Erbium 계통의 레이저는 조직에 직접 에너지를 조사하는 통상적인 원리의 Er:YAG 레이저와 hydrokinetic energy라는 특수한 폭발적 힘을 이용하는 원리를 가진 Er,Cr:YSGG 레이저(물방울레이저) 두 종류로 나눌 수 있다. Er:YAG (Erbium, Yttrium, Aluminum, Garnet) 레이저는 2940 nm의 파장을 지니며 조직에 직접 조사해도 조직의 수분에 대한 흡수율이 높아 최소한의 열성효과를 보인다고 보고되고⁵⁻⁷⁾ 있다. Er,Cr:YSGG (Erbium, Chromium, Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet)라는 복합 매질을 사용하는 물방울레이저는 물 분자와 결합력이 강한 2780 nm의 고유 파장을 가지고 있으며 분사되는 물과 에너지의 결합에서 나오는 hydrokinetic energy라고 명명되어진 힘을 이용하여 조직을 한 꺼풀씩 벗겨냄으로써 열이 발생되지 않는다고 보고되고^{8,9)} 있다.

이 두 가지 서로 다른 레이저가 임플란트 주위염과 같은 염증의 치료에 사용되고 있지만 염증조직에 레이저 광원을 직접 조사하는 Er:YAG 레이저와 hydrokinetic 에너지를 조사하는 물방울레이저가 연조직 반응에 있어서 어떠한 차이를 나타내는지에 대해 지금까지 보고된 바 없다.

본 연구에서는 현재 임플란트 주위염과 같은 연조직 염증의 치료에 사용되고 있는 레이저중 대표적인 Er:YAG 레이저(Key Laser)와 Er,Cr:YSGG 레이저(Water Laser)의 차이점을 마우스 실험을 통하여 알아보고자 했다. 두 종류의 레이저를 염증이 유발된 마우스의 귀 조직에 조사했을 때 염증 전구물질로 알려진 interleukin-1 β 및 tumor necrosis factor- α 의 mRNA 발현량을 비교해보고 조직검사, 전기영동 RT-PCR, Real-Time RT-PCR 및 전자현미경검사를 통하여 두 종류의 레이저 조사에 따르는 조직 반응의 차이점을 알아보고자 했다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

20 g 내외 6주령 수컷 ICR mouse (샘타코, 청주, 한국)를 구입하여 실험기간 중 고형사료와 물은 자유롭게 공급하

였고 사육실은 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50 \pm 5%로 유지하였으며 일정한 조도와 광주기 및 암주기를 12시간으로 조절하여 생활주기에 맞추어 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각각의 실험군은 아무것도 처리하지 않은 control군(negative), 염증을 유발한 control군(positive), 염증유발 후 Er,Cr:YSGG 레이저(A 레이저) 조사군, 염증유발 후 Er:YAG 레이저(B 레이저) 조사군 등 4군으로 나누어 각 군마다 15마리씩 실험하였다

본 실험에 사용한 시험처리 물질은 TRI Reagent Total RNA Extraction Kit (Promega, CA, USA), chloroform, isopropanol alcohol, ethanol, acetone (MERCK Inc., HA, Germany), oligonucleotide (Genotech, Daejeon, Korea), 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, CA, U.S.A), diethyl pyrocarbonate (Sigma, CA, USA), Maxime RT-PCR PreMix kit (InTron biotechnology, Seoul, Korea), agarose (BIO-RAD, SPIAN), TAE buffer (Tris-Acetic-EDTA buffer)를 사용하였고 L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma, USA), DNFB (2,4-dinitrofluoro benzene, St. Louis, MO, USA)와 같은 재료를 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

1) 마우스 염증 유발

실험동물은 체중이 약 20-25 g 인 6주령 ICR 마우스를 물과 고형사료를 충분히 공급하면서 7일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 6주령의 ICR 마우스에게 0.5%의 DNFB (2,4-dinitrofluoro benzene, St. Louis, MO, USA) 1 cc를 마우스 귀 피부에 도포하였다. 증상이 나타나기 전 4일 동안 하루에 두 번씩 총 8회 귀에 도포하며, 증상이 나타나도록 했다. 각 실험 군에서 귀 부종(ear swelling)과 귀의 조직학적 형태변화를 측정하고 관찰하고 캘리퍼스를 이용하여 귀 두께를 측정했다.

2) 레이저 조사

염증이 유발된 마우스 군은 Table 1과 같이 나누어 실험을 진행하였다. 염증이 유발된 군 별로 레이저 A (Er,Cr:YSGG), 레이저 B (Er:YAG)를 각 제품의 연조직 염증치 작동 지시서에 따라 염증부위에 조사하였다.

Er,Cr:YSGG 레이저는 0.75Watt, Air: 15%, Water: 15% 주파수 30 Hz로 염증부위에 조사하였으며 Er:YAG 레이저는 120 mJ, 주파수 10 Hz, 주수최대로 조사하였다. 두 시스템의 레이저 조사는 3초간 시행하였다.

조사 후 1일째, 3일째, 5일째 되는 날 경추 탈골하여 마우스를 희생시킨 후 귀 조직을 채취하였다. 조직을 고정하기 위하여 praformaldehyde 4 g을 DDW 100 ml 넣어 중탕

시커 40 μm cell strainer (Falcon, U.S.A)를 이용하여 여과 후 사용하였다. 만들어진 4% paraformaldehyde에 채취한 각각의 귀 조직을 고정시킨 후 4℃에서 보관하였다.

3) RNA 추출

경추 탈골법으로 희생시킨 마우스의 귀 조직을 채취하여 액화질소에 넣어 동결시킨 후 막자사발에서 powder 형태로 만들어 tube에 보관했다. 채취한 귀 조직에 TRI Reagent 800 μl를 첨가하여 잘 혼합한 다음 여기에 chloroform 100μl를 추가하여 넣고 11,000 rpm에서 20분 동안 원심분리를 실시했다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣은 후 inverting을 실시한 후 실온에 10분간 두었다. 10분 후 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시한 후 pellet외에 상층액은 버렸다. 70% DEPC 에탄올 1 mL를 첨가하여 잘 혼합하여 씻어준 다음 10,000 rpm에서 10분간 washing하고 실온에서 건조시킨 후 DEPC 증류수를 100 μl 넣어 RNA pellet을 녹였다. 녹인 RNA sample은 각각 새 tube에서 RNA농도를 측정하기 위하여 Spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 확인했다. 본 연구에서 사용된 RNA 표본들은 260/280 nm ratio가 1.8이상 이었다. RNA의 농도 및 순도 등은 formaldehyde 포함된 아가로로스 전기영동을 사용하여 100 voltage에서 밴드를 측정하였다.

4) RT-PCR을 이용한 유전자 발현 확인

Maxime RT-PCR PreMix tubes (InTron biotechnology Inc., Seoul, Korea)에 total RNA 주형과 Interleukin-1β primer (Table 1)를 넣었다. Maxime RT-PCR PreMix tube 별로 RNA 농도가 1 μl이 되도록 DW와

RNA sample을 넣은 후 Interleukin-1β primer 2 μl를 넣어 총 24 μl를 만들었다. 만든 것을 Table 3과 같은 조건으로 PCR machine (Hybaid, CA, USA)를 사용하여 반응시켰다. RT-PCR이 끝난 후 1.5% agarose gel에 loading을 시행한 후 UV illuminate 램프로 IL-1β의 발현을 확인했다. 전기영동은 100 voltage에서 20분 동안 진행하였으며, 전기영동이 끝난 agarose gel은 ethidium bromide 염색을 실시하여 UV illuminate (Bio-RAD, CA, USA)를 이용하여 밴드를 확인하였다. 밴드는 Image-Processing & Analysis in Java (NIH, Maryland, USA) 프로그램을 이용하여 DNA의 정량 값을 얻었고, 또한 각 그룹별로 5 번씩 실험을 진행하여 평균값을 얻었으며, 이에 대한 평균값은 SigmaPlot (Systat Software, Inc. CA, USA) 프로그램을 이용하여 얻었다.

5) Real-Time RT-PCR을 이용한 유전자 발현 확인

Real-Time RT-PCR은 SYBR Green I이라는 형광물질을 사용하여 각각의 사이클마다 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링 할 수 있는 방법으로 정확한 정량이 가능하다. SYBR Green I 형광 물질은 PCR 과정 중에서 DNA의 Double strand DNA에 결합하여 형광빛을 나타내는 물질로서 Real-Time RT-PCR 장치는 이러한 형광이 결합된 DNA의 형광강도를 검출하여 증폭산물의 생성량을 정량적으로 표시한다. 이러한 방법을 사용하기 위하여 조직으로부터 얻은 RNA 추출물을 template total RNA로 사용하고, interleukin-1β, tumor-necrosis factor-α의 제조된 프라이머, SYBR Green I이 결합되어있는 TaqMan probe를 각각의 제조사의 방법대로 잘 혼합한 후 PCR 반응을 Real-Time RT-PCR machine (Perkin-Elmer, CA, USA)을 사용하여 계측하였다(Table 2).

Table 1. Primers and expected sizes of PCR products with each primer pair

Gene	Primer	Size (bp)
GAPDH	sense 5'-tatcaacggattggccgtattggc-3'	286
	antisense 5'-gaagacgccagtagactccacgac-3'	
TNF-α	sense 5'-caatgctgacgacctac-3'	414
	antisense 5'-cagttagccttgctttgttc-3'	
IL-1β	sense 5'-ggaaggcagtgctcactcattgtgg-3'	245
	antisense 5'-cagctcacatgggtcagacagcac-3'	

Table 2. RT-PCR setting

RT-PCR cycle	Temp.	Time
1 Cycles	Reverse transcription reaction	45℃ 30 min
	Inactivation of RTase	94℃ 5 min
30 Cycles	Denaturation	94℃ 30 sec
	Annealing	68℃ 30 sec
	Extension	72℃ 1 min
Final extension	72℃	10 min

6) 조직염색 및 lymphocytes 관찰

경추탈골법으로 희생시킨 마우스의 귀조직을 4% paraformaldehyde에 고정한다. 파라핀 블록을 만드는 과정은 간단하게 탈수-투명-침투-포매-삭정-박절로 이루어지며 현미경 관찰을 위한 빛이 투과할 수 있는 얇은 절편(박절두께-5 μ)을 만들기 위해 특수한 매질(포매제)을 조직 속에 침투시켜 조직의 구조를 유지하면서 고형화시키고 얇게 박절하는 방법이다. 맨 처음 조직에 탈수전처리 과정을 시행한다. 탈수는 고정에 사용된 조직 내의 고정제를 제거하기 위해 물 또는 70-100% 알콜로 씻어낸다. 그 후 탈수처리 과정은 조직을 최소한으로 변화시키기 위하여 저농도의 알콜-고농도의 알콜로 1시간씩 처리하고 완전탈수는 조직내 3-4% 수분이 남은 상태를 말한다. 탈수처리가 끝난 후 투명처리를 하며, 이는 탈수과정에서 남은 alcohol의 제거, 즉 알콜 대신 투명제가 치환되어 침투제인 paraffin과 잘 혼합될 수 있도록 하는 것을 말한다. 침투과정은 침투제를 조직 공간에 침투시켜 박절을 용이하게 한다. 박절시킨 paraffin block을 삭정과정을 거친다. 삭정은 paraffin block을 cutting하기 위해 정돈하는 과정이다. 마지막으로 박절 과정을 거쳐 조직을 microtome (EYELA, CA, USA)을 사용하였다. 얻어진 조직 슬라이드의 lymphocytes의 형태 및 개수를 count하기 위하여 현미경을 이용하여 $\times 40$ 배율에서 각각의 조직 슬라이드에서 lymphocytes의 개수를 확인하였다. 오차를 줄이기 위하여 임의적으로 각각 다른 세 군락을 선택하여 lymphocytes의 수를 count하였다.

7) 전자현미경 실험

전자현미경(JEM-100S, JEOL, Tokyo, Japan)은 아주 큰 전자빔을 이용하여 아주 작은 크기의 물체를 분석하는 기기로서 물체를 구성하는 미세구조 및 입자들의 형상과 크기 등의 세포내 소기관에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있는 유용한 측정장비이다. 조직을 전자현미경으로 관찰하기 위하여 마우스를 희생한 후 바로 조직을 얻었다. 얻어진 조직을 마이크로톰을 이용하여 4 μ m이하로 절편한 후 Aceton : chloroform 50 : 50의 비율의 고정액에 1시간 동안 고정하였다. 고정 후 실온에서 건조하였으며 전자현미경 관찰을 하기 위하여 ion coated 장비를 이용하여 골드 코팅을 2분 동안 실시하였다. 고정된 샘플을 20.0(Kv), 1.0K에서 조직의 피사 및 염증 부위에 대한 관찰을 실시하였다.

연구 결과

1. Interleukin-1 β 의 RT-PCR 발현량 분석

Erbium 계통의 레이저조사에 의한 마우스 염증조직에서의 Interleukin-1 β 의 발현이 염증의 생성 및 변화와 상관성

이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 Interleukin-1 β 의 전사 수준에서의 발현을 RT-PCR로 조사하였다. RT-PCR의 결과에 의한 염증발현 표지자인 interleukin-1 β 의 mRNA 발현량은 A레이저가 B레이저 보다는 상대적으로 적게 발현되는 것을 보여주고 있다. 레이저 조사 후 A레이저조사군의 mRNA 발현량은 5일후까지 지속적으로 감소하는 것을 보이고 있으나 B레이저 조사군의 mRNA 발현량은 조사 3일후까지 발현량의 변화가 없다가 5일째에는 감소되어 있음을 보여주고 있다(Fig. 1).

2. Real-Time RT-PCR 분석

Erbium 계통의 레이저조사에 의한 마우스 염증조직에서의 Interleukin-1 β 및 Tumor-Necrosis Factor- α 의 유전자 발현량을 정량적으로 분석함으로써 분자수준에서의 현상을 확인 할 수 있었다. 또한 Interleukin-1 β 및 Tumor-Necrosis Factor- α 는 염증 기전에서 중요한 사이토카인으로 알려져 있기에 이러한 사이토카인의 발현량의 분석은 중요하다고 할 수 있다. Real-Time RT-PCR의 결과에 의한 염증전구물질인 Interleukin-1 β 및 Tumor-Necrosis Factor- α 의 발현은 3일째부터 A레이저 조사군의 발현이 급격하게 감소하여 5일째에도 소량 감소되면서 Interleukin-1 β 및 Tumor-Necrosis Factor- α 의 발현이 상대적으로 B레이저 조사군보다 감소된 결과를 보이고 있었다. B레이저 조사군은 3일째 및 5일째 발현이 상대적으로 A레이저 조사군보다 증가된 상태의 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

3. 조직검사

마우스 조직에 대한 염증 반응을 H&E방법을 사용하여 검사하였다. 외부 형태적인 부종 및 염증에 의한 괴사와 같은 형태학적인 차이점을 검사하였다. 또한 조직내에 존재하는 lymphocytes의 개수를 count함으로써 염증관련 lymphocytes의 수치를 정량화 하였다. 1일째 검사결과 아무것도 처리하지 않은 negative 조직은 lymphocytes의 과 발현이 없는 것을 볼 수 있었다. 마우스의 조직에 인위적으로 염증을 유발시킨 뒤 아무것도 처리하지 않은 positive군 조직사진의 경우 lymphocytes가 과발현된 것을 확인할 수 있었다. A레이저 조사군은 lymphocytes의 개수가 69개를 나타내었으며, 상대적으로 B레이저 조사군은 213개의 lymphocytes개수를 확인할 수 있었다. 3일째 A레이저 조사군은 lymphocytes의 개수가 54개로서 1일째 보다 감소한 것을 볼 수 있으며, B레이저 조사군은 297개의 lymphocytes 개수로서 1일째 보다 증가한 것을 볼 수 있었다. 5일째 A레이저 조사군은 lymphocytes의 개수가 25개로 정상과 같은 개수이며, 상대적으로 B레이저 조사군은 160개의 개수가

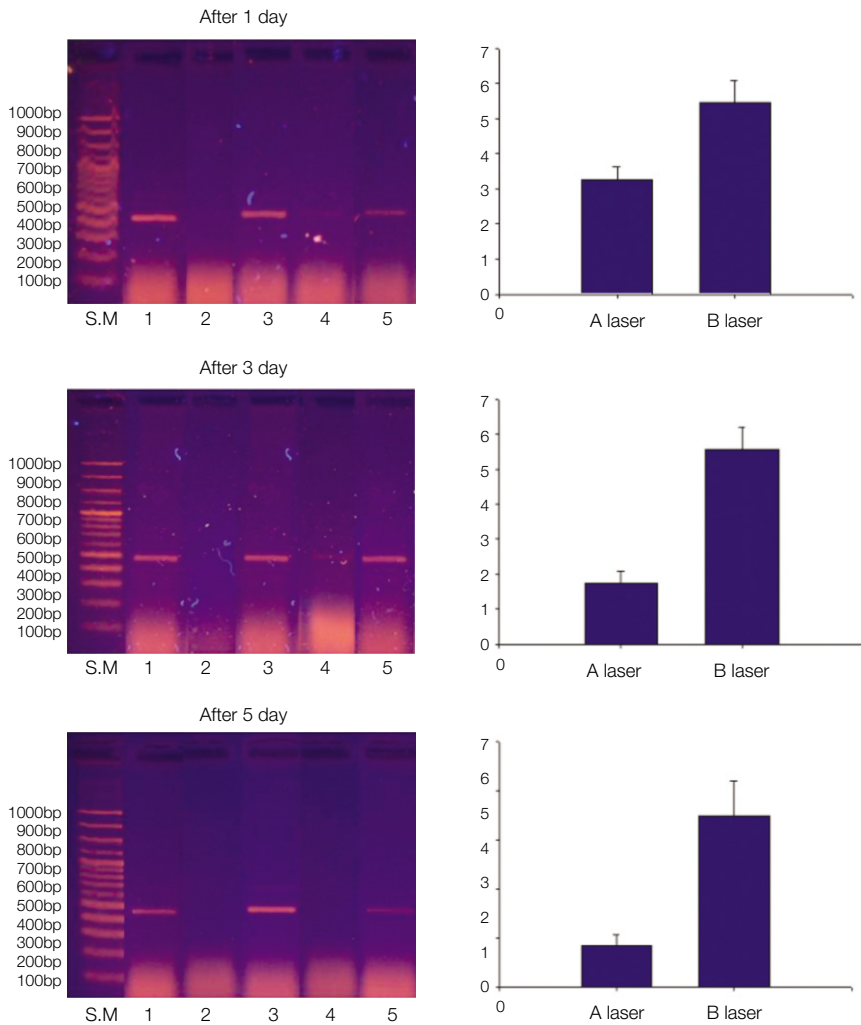


Fig. 1. mRNA expression, relative ratio of IL-1 β 1 day, 3 days, 5 days after laser exposure. S.M: size marker (base pair). 1: GAPDH (house keeping gene). 2: control (not treated). 3: positive control (induced inflammation). 4: A laser (treated after induced inflammation). 5: B laser (treated after induced inflammation).

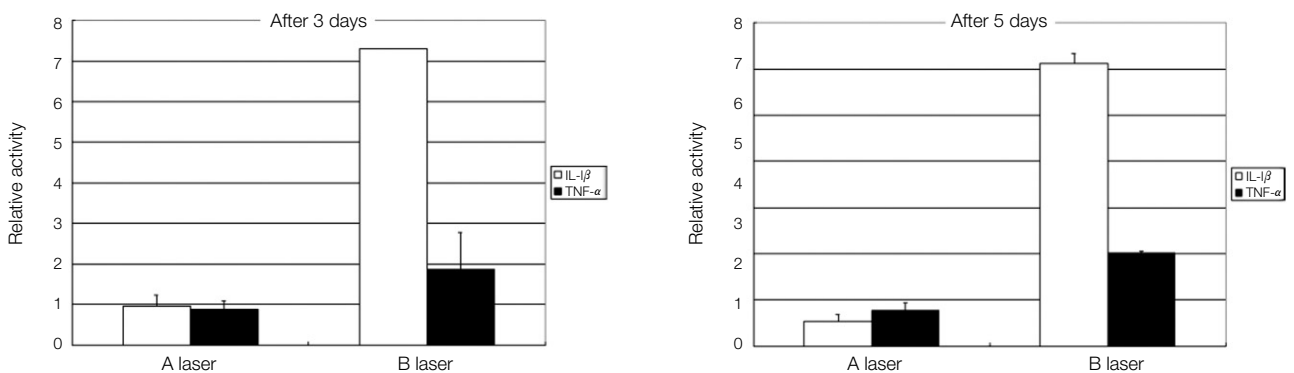


Fig. 2. Real-time RT-PCR (3, 5 days after laser exposure). Relative activity of IL-1 β and TNF- α .

나왔다. lymphocytes의 개수에 의한 염증관련 조직 검사는 *in vivo*에서 가장 먼저 확인할 수 있는 방법이며 실제적인 조직검사라 할 수 있다. 이와 같은 검사결과 A레이저 조사군은 시간이 지남에 따라 lymphocytes의 개수가 감소되는

일정한 패턴을 보여주고 있었다. 반면에 B레이저 조사군은 3일째 심한 염증현상을 보이는 것으로 확인 되었으며, 3일이 지남에 따라 lymphocytes의 개수가 감소되어 5일째는 1일째 보다 더 감소되어 진 것을 볼 수 있었다. 전반적으로

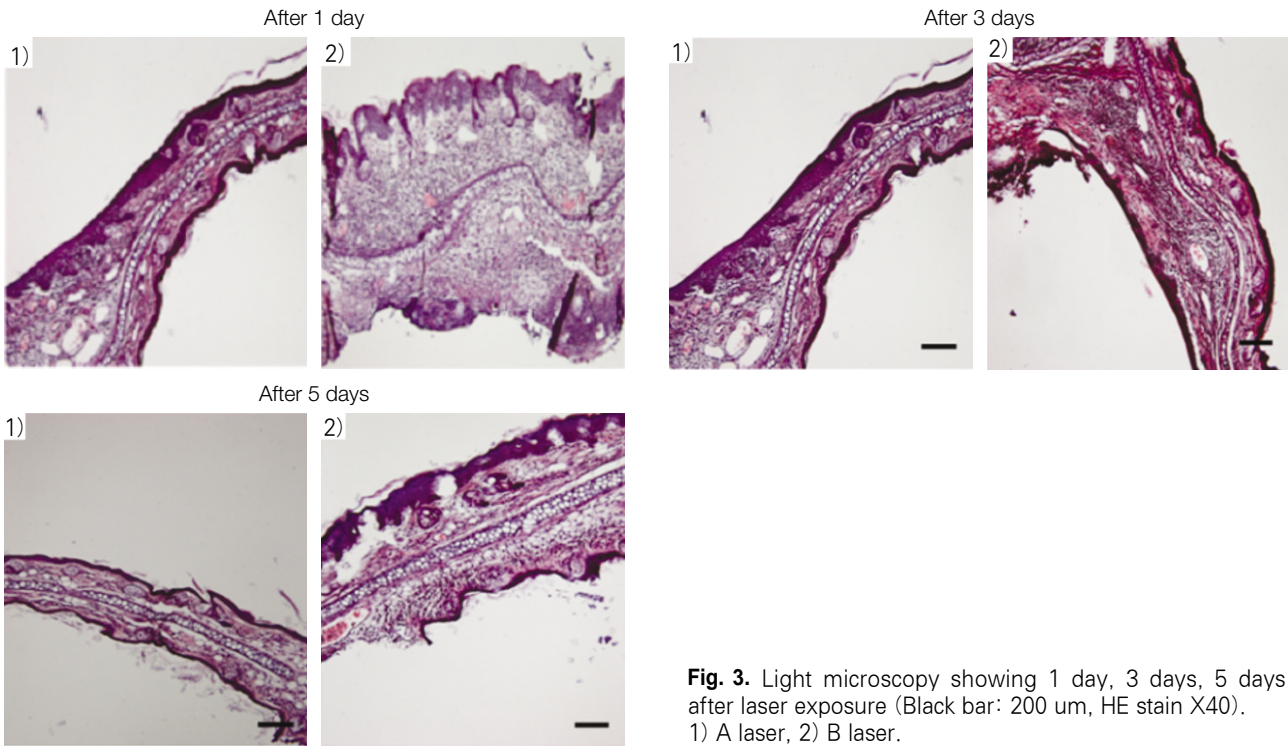


Fig. 3. Light microscopy showing 1 day, 3 days, 5 days after laser exposure (Black bar: 200 μ m, HE stain X40). 1) A laser, 2) B laser.

lymphocytes의 현미경 조직 검사방법으로 B레이저조사군 보다 A레이저 조사군에서 시간적으로 감소되는 일정한 양상을 보이면서 염증의 감소가 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3, 4).

4. 전자현미경 관찰

1) 조사 1일후

정상조직은 연골조직이 벌집상으로 된 와동이 비교적 균일한 구성을 보이고 있으나 염증만 유발된 군에서는 불규칙한 조직의 과잉성장이 보이며 와동사이의 벽 두께에서도 염증으로 인한 불규칙한 성장을 보이고 있다. 반면에 A 레이저 조사군이나 B 레이저 조사군은 모두 인접 조직들 간의 연결이 불규칙하게 되었으며 와동이 파괴된 양상을 보여주고 있다.

2) 조사 3일후

A레이저 조사군이나 B레이저조사군 모두 인접 조직들 간의 연결이 되기 시작하는 것을 보여주고 있으며 연골세포가 들어있던 와동이 균일한 조직으로 되돌아오고 있음이 관찰되었다 반면에 염증만 유발한 positive군에서는 조직의 과도한 성장으로 연골이 들어있던 조직이 거의 보이지 않고 있다

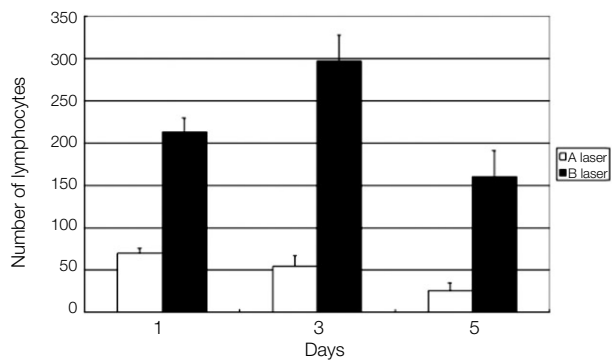


Fig. 4. The number of lymphocytes was counted in the represented pictures which was taken under x200 magnification (Three pictures from the same group were used for the exam).

3) 조사 5일후

염증만 유발한 positive군에서는 불규칙한 조직이 염증반응으로 완전히 연속성을 상실하고 파괴되었음을 보이고 있다. 반면에 A레이저 조사군이나 B레이저 조사군 모두 주위 조직들 간의 연결이 긴밀하게 연결되기 시작하는 양상을 보이고 있고 연골세포가 들어있던 와동도 정상조직과 비슷하게 회복됨을 보여주고 있으며 A레이저 조사군이 B레이저 조사군 보다 약간 많은 수의 와동이 정상적으로 회복됨이 관찰되었다(Fig. 5).

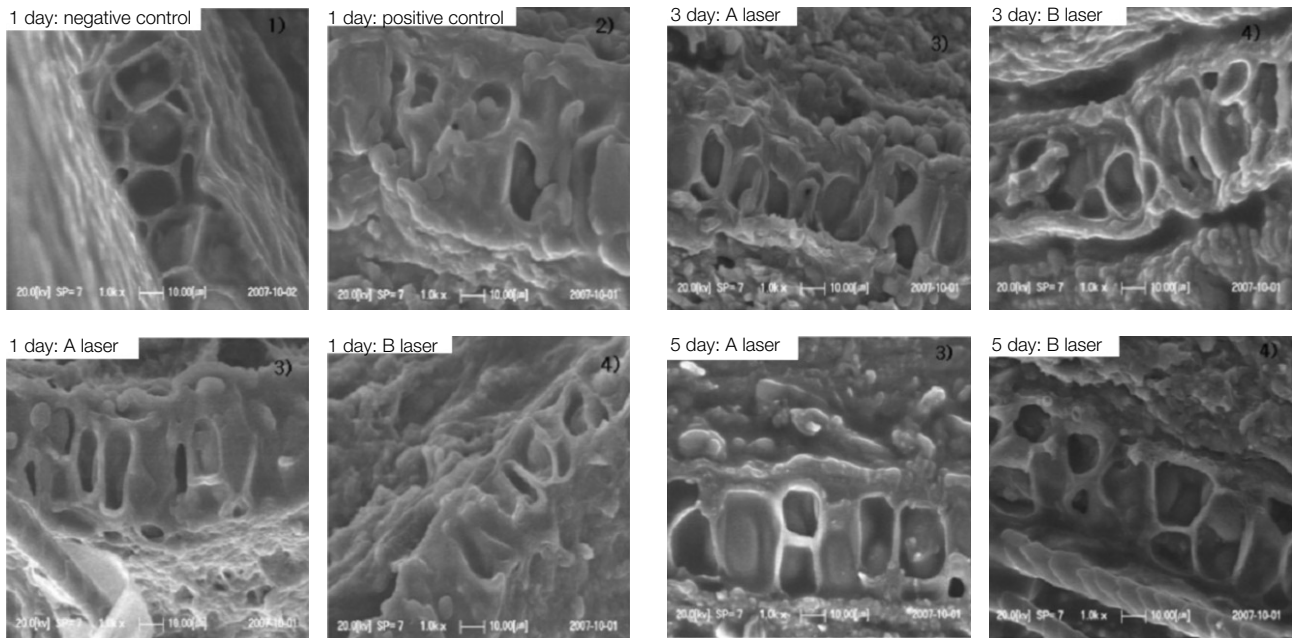


Fig. 5. Light microscopy showing 1 day, 3 days, 5 days after laser exposure (Black bar: 200 um, HE stain X40).

고 찰

2000년대 들어 임플란트 시술이 보편화되면서 임플란트와 조직간 결합에 대한 연구가 진행되고 거친 표면이나 생체 활성 표면을 가진 임플란트가 소개되면서 성공률이 95%를 넘는 것으로 보고되고 있다.¹⁰⁾ 그러나 이러한 높은 성공률에도 불구하고 아직도 많은 임플란트가 연조직이나 경조직 문제를 야기하고 효과적인 방법으로 치료하지 못한 경우에는 실패의 길로 들어설 수 밖에 없다.

이러한 임플란트 주위염을 치료하기 위해서 지금까지 외과적인 치료방법은 기계적인 치료와 화학적인 표면치료였다.¹¹⁻¹⁷⁾ 기계적인 치료의 경우는 임플란트 표면의 변화를 가져와서 골의 재생장을 지연시키거나 방해할 수 있었다.^{12,17)} 세균 균락과 내독소의 불완전한 제거는 이식의 실패를 가져오고 다시 결손부가 발생하도록 한다.

Tetracycline을 이용한 화학적인 표면치료 방법도 Titanium 표면에만 국한하여 사용하여야 하며 HA 표면의 임플란트에 사용이 되면 골의 Ca-P결합을 방해하여 치유를 지연시킬 수 있다. Tetracycline을 임플란트를 소독하는데 사용할 수는 있으나 임플란트 표면으로부터 세균 내독소(Bacterial endotoxin)을 제거하는 데는 효과적이지 않다.¹⁸⁾ Citric acid의 사용은 연조직과 경조직의 화학적인 화상을 초래하고 치유를 지연시킨다. Citric acid는 기본적으로 HA표면을 세척할 수 있으나, crystalline 표면을 변경시켜 이식 후에 파괴되도록 한다.¹⁹⁾

임플란트 주위염 치료를 위한 새로운 패러다임은 Laser의 사용이다.

1960년 Goldman이 치아 상아질에 레이저를 이용했다는 기록²⁰⁾ 이후 CO₂, Nd:YAG 등 여러 가지 레이저들이 개발되어 치과 임상에 쓰여 왔다. 구강 연조직에 대한 레이저 시술의 장점은 충분한 지혈 효과로 인해 시야 확보가 용이하여 수술의 정밀도를 높여주고, 주변 조직에 대한 손상이 적으므로 향후 조직의 괴사나 퇴축이 적으며, 수술을 위한 마취의 필요성을 줄일 수 있다. 또한 레이저 조사부에 멸균 효과가 있으므로 수술 후 감염이나 균혈증에 대한 예방 효과를 기대할 수 있다.

레이저의 기본 원리는 아인슈타인이 발표한 복사유도 방출론을 근거로 발전하였다. 물체를 구성하고 있는 원자나 분자는 띄엄띄엄한 값으로 에너지를 가지고 있다. 이것들은 에너지가 높은 상태 E2에서 낮은 상태인 E1로 환원될 때 방출한다. 이 때의 주파수 ν 의 빛을 흡수하면 E1의 상태에서 E2의 상태로 야기되어 에너지가 높은 상태가 된다. 이와 같이 여기된 상태에서부터의 이동이 우발적으로 발생한 경우, 빛은 불규칙하게 방출된다. 이에 비해 여기상태에 있는 원자 또는 분자에 $E2 - E1 = h\nu$ 로 결정되는 주파수 ν 의 빛이 작용하면 입사와 같은 주파수, 같은 위상의 입사광선에 비례하여 빛이 방출된다. 이 빛이 레이저 광선이다.

레이저를 임상에서 사용하는 경우, 레이저 조사에 의해 발생하는 열이나 응력을 이용한다. 레이저를 사용하여 치료 효과를 올리려면 필요한 작용만을 유기시키고, 필요 없는

열이나 기계적인 손상 등의 부작용을 최소한으로 억제할 필요가 있다.

레이저 광을 생체조직에 조사하면 일부는 표면에서 반사되고, 나머지는 생체 내에서 흡수 및 산란에 의해 쇠퇴한다. 반사광과 산란광은 상호작용 광으로 생체에 영향을 미치지 않는 빛이고, 입사광의 손실로 생각해도 된다. 따라서 생체 내에 흡수되는 빛만이 생체에 대해 상호작용을 일으킨다.

레이저 조직 상호작용을 결정하는 기본 원리의 대부분은 비교적 간단하다. '생물 구조에 대한 레이저 조사의 효과는 물체와 조사 광 에너지가 반응할 때 무엇이 일어나는가?' 라는 점에 의해 어느 정도까지 평가할 수 있다. 레이저 광에 대한 조직의 다른 반응은 생물학적 및 생리학적 과정에 관련해서 그것들은 본질에서 보다 복잡하며, 보다 복잡한 상관관계를 반영하는 것이다. 따라서 조직의 생물학적 과정과 레이저 광의 물리적인 특성에 대한 실제적인 지식이 광범위한 임상 응용에서의 레이저 치료의 성과를 이해하고 제어하는 능력을 치과의사들에게 부여한다.

레이저와 조직의 상호작용에 영향을 주는 생물학적 요소는 보다 광범위하다. 이들에 포함된 것은 광 에너지와 조직 속의 특정 분자와 화학적 성분의 반응 스타일을 지배하는 다양한 조직 성분의 광학적 특성이다. 조직 성분의 광학적 특성이 레이저 빔의 흡수, 투과, 반사와 산란 과정을 통한 조직 반응의 본질과 범위를 결정한다(Dederich, 1991). 다른 요소는 조직의 에너지 변환의 결과로 생기는 생리학적, 물리학 과정의 다양한 유형을 포함하고 있다. 이들은 조직 덩어리 속의 열전달과 확산, 유해한 자극에 대한 조직의 염증 반응, 조직 맥관 질, 그리고 수복 기전을 포함하고 있다.

조직에 대한 레이저 광의 상호작용의 범위는 일반적으로 두 가지 변동 요소에 의해 결정된다. 즉, 레이저 방사의 특정 파장과 특정 목표 조직의 광학적 특성(Dederich, 1991)이다. 임상 치과 의사가 고려해야 할 요소에 적용되는 파워(파워 밀도), 주어진 표면적에 조사되는 총 에너지(에너지 밀도 또는 유속), 조사율과 지속시간(펄스 반복율, 펄스 지속시간과 목표 조직에 대한 에너지의 출력 모드, 즉 연속파와 펄스나 접촉과 비접촉)이 있다. 이들 4가지 변동 요소(파워 출력, spot size, 유속 또는 총 광선양, 그리고 작업 모드)의 조합은 특정 조직에 대해 적절한 파장을 선택할 수 있으며, 희망하는 조직 작용을 달성하기 위한 임상 설정 중 시술자가 레이저를 정확하게 제어할 수 있도록 한다.

레이저의 특성은 어떠한 매질을 그 에너지원으로 쓰느냐에 따라서 달라지고, 또 매질도 서로 섞여서 여러 가지 다른 특성을 나타낼 수 있다.

1998년 Keller와 Hibist가 처음으로 파장 2.94 μm 의 Erbium-YAG 레이저를 사용해서 치아의 경조직을 열에 의한 영향 없이 제거할 수 있다는 것을 보고했다.

Er:YAG 레이저(파장 2,900 nm)는 물과 수산화인회석

(hydroxyapatite)에 강하게 흡수되므로 구강내 연조직과 법랑질과 상아질의 경조직에서 유용하여, 치과영역에서 사용이 증가되고 있다. 즉 수분을 방출하면서 조사할 수 있다는 특징을 가지며, 중-장파장 영역이기 때문에 열을 발생시키기 어려운 레이저로서 조사 직후부터 온도의 하강이 급속하게 시작되어 심층부에서는 거의 온도 변화를 볼 수 없는 것으로 보고되고 있다. 경조직에 응용되어 치아와 골을 삭제할 수 있는 레이저이기도 하다.

물방울 레이저는 Er, Cr, YSGG (Erbium, Chromium, Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet) 라는 여러 가지 매질이 섞인 에너지원을 이용함으로써 독특한 특성을 가지고 있으며 기존의 레이저와 크게 구별짓게 한다.

물방울 레이저는 1989년 프랑스 치과 의사 Dr. Guy Levy에 의해 처음으로 개발되었다. Dr. Levy는 2780 nm 파장의 레이저와 물방울의 결합에서 나오는 물방울의 폭발적 에너지를 Hydrokinetic energy 라고 명명하고 이 에너지는 기존의 세포에 직접 레이저를 조사하는 방식과 확연하게 다르다고 주장하였다. 즉, 직접 조사하는 레이저는 필연적으로 열에 의한 조직 손상과 통증을 유발하지만 물방울 레이저는 레이저 빛을 받은 물분자가 가속되면서 물분자에 의한 kinetic energy가 발생하여 세포 조직을 한결 한결씩 제거하여 레이저에 의한 열 손상이 발생하지 않는다고 하였으며 이는 많은 보고된 논문²¹⁻²³⁾들에서 입증되었다.

이러한 Erbium계통의 레이저가 임플란트 주위염에 대한 처치 수단으로 아주 믿음직한 예후를 보여주고 있어 2000년대 들어 각광을 받고 있다.

하지만, 레이저의 부적절한 사용은 오히려 임플란트의 성공률을 저하시킬 뿐 아니라 골유착에 도움을 주는 임플란트 표면 구조를 파괴시킬 수 있으므로 적절한 레이저의 사용에 대한 연구 및 숙지가 필요하다. 임플란트 표면의 파괴로 인하여 발생할 수 있는 증상으로는 상악 전치부의 경우의 잇몸에 금속색갈이 나타날 가능성과 함께 골유착의 실패의 가능성이 무엇보다 높아진다는 부작용이 있다.

한편, Albrektsson와 Isidor (1994)가 임플란트 주위염(peri-implantitis)의 개념을 정립한 이후로 치주염과 마찬가지로 미생물의 집적은 임플란트가 실패하는데 주요 병인으로 이해되었으며(Becker 1990) 적절히 치료되지 않으면 골유착의 실패를 야기할 수 있으므로 임플란트 주위염의 치료 방법에 관한 논의가 활발하게 이루어져 왔으나, 예지성 있는 특정 치료 방법은 아직 확립되지 않은 상황이다. 선택적으로 물리적 혹은 화학적인 방법 등이 이러한 문제를 해결하기 위하여 추천되었다.⁶⁻¹²⁾ 물리적 방법으로는 타이타늄보다 단단하지 않은 재료(plastic cures, polishing with rubber cups)를 사용하여 임플란트 표면을 물리적으로 세정하는 방법이 보고되었으나,^{7,12)} 물리적인 방법만으로는 제거가 완벽하지 않았기 때문에 추가적인 화학적인 방법

(국소적인 소독제를 사용한 주수, 국소적 및 전신적인 항생제 처치) 등이 임상적으로 보고되었고 치유에 효과가 있음이 증명되었다.^{8,10,11)} 하지만, 전신적 항생제의 필요성에 의문이 제기되었고, 공기-분말 주수는 기종형성 등의 위험성이 있기 때문에 그 사용이 제한적이라고 보고되었다.¹³⁾ 따라서 전통적인 방법 외에 레이저를 치주 질환에 대한 치료법으로 사용하기 위한 연구가 진행되었으며, 1997년 Yamaguchi 등은 Er:YAG 레이저가 감염된 치근 표면에서 lipopolysaccharide를 제거한다고 보고 하여 레이저를 이용한 치주 내지 임플란트 주위염 치료의 가능성을 제시하였다. 이후 2002년 Matthias 등은 그의 Er:YAG 레이저의 살균 능력에 대한 연구에서 Er:YAG 레이저가 세균의 세포막에 에너지를 축적시켜 세균을 사멸시키며, 이에 따른 살균 능력은 임상적으로 사용할 만한 가치가 있음을 보고하였다. 그는 또한 2004년 그의 발표를 통하여 Er:YAG 레이저는 임플란트 표면의 변화 없이, 세포독성 물질들을 효과적으로 임플란트 표면으로부터 제거 할 수 있다고 보고하였다.

레이저에 대한 임플란트 표면의 반응에 대한 연구는 오래전부터 이루어져 왔으며, Walsh, Block, Chu 등은 Nd:YAG 레이저를 이용하여 임플란트 표면을 처리 하였을 때, 임플란트 표면의 변화 뿐 아니라 골유착을 저해하는 임플란트의 온도 변화가 있음을 확인하고 Nd:YAG 레이저의 임플란트 표면에 대한 사용은 금기증임을 보고 하였다.

또한, CO₂ 레이저를 이용한 mouhyi 등의 연구에서 임플란트 표면에 CO₂ 레이저를 조사하는 경우 임플란트 표면 온도의 3도 미만이며, 임플란트 표면에 레이저가 흡수 되지 않고 반사되기 때문에 표면의 변화도 없다고 보고 하였다. 하지만 임상적으로는 온도의 변화에 대한 가능성이 있으므로 사용을 권장하지는 않는다.

2002년 Mattias 등은 Nd:YAG 레이저를 임플란트 표면에 120 mJ로 60초간 조사 하였을 때, 골의 생활력을 저해하는 온도인 47도를 넘어서지는 않는다고 보고 하였으며, 또한 그의 다른 연구에서 Nd:YAG, Ho:Yag Er:YAG, CO₂ 레이저를 임플란트 표면에 조사하여 관찰하였으며, 결론적으로 임플란트 표면 변화에 있어서, 예전의 연구들과 같이 Nd:YAG 레이저와 Ho:YAG 레이저의 사용은 비적응증이며, Er:YAG 레이저와 CO₂ 레이저의 사용 시에는 출력을 적절히 조절 하여야 한다고 보고 하였다.

본 연구에서는 적절히 조절된 Er:YAG 레이저와 Er,Cr:YSGG 레이저가 염증 조절에 미치는 영향을 유전자 수준에서 관찰하였으며 치주염의 원인이 내독소의 자극에 의한 단핵구의 TNF- α 및 IL-1 β 분비와 관련이 있다고 알려져 있는 바(Shapira 1996), PCR을 이용해 상기 사이토카인의 발현율을 관찰하였다. TNF- α 는 중증 외상이나 감염증에서 중요한 작용을 하는 세포 분비 물질로서 거식세포

및 임파구, 호중구, 그리고 혈관 내피세포가 합성한다. 세균의 내독소에 의해 거식세포나 임파구가 자극되어 다량의 TNF- α 가 분비되며 90-120분에 혈중 최고치를 보인다. 분비된 TNF- α 는 거식세포와 호중구를 활성화시켜 산소기와 같은 산화제, 단백질 분해효소, IL-1, IL-6, TNF- α 등을 더욱 분비하게 한다(Molly 1993). 또한, 염증 반응시 면역세포인 큰 포식세포(macrophage)는 interleukin-1 β (IL-1 β)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine 류 또는 nitric oxide (NO)나 prostaglandin (PG) 등의 다른 염증조절물질(inflammatory mediator)을 생산함으로써 반응 진행과정에서 중요한 역할을 수행한다. 따라서 TNF- α , IL-1 β 의 차단은 염증 억제 효과가 있다고 알려져 있으며 본 연구에서 적절히 조절된 레이저의 사용이 이러한 효과가 있음을 증명하였다.

현재까지도 임플란트 주위염과 다양한 임플란트 표면에 대한 Er:YAG 레이저 조사가 미치는 영향에 대하여 추가적으로 연구가 진행되어야 하며, 성분변화에 주목한 성분 분석 연구도 이루어져야 할 것이다.

결론

Erbium 계통의 레이저 조사가 염증 유발된 마우스 조직에 미치는 영향에 관한 연구 결과, 다음과 같은 결론을 얻게 되었다.

각 군에서 mRNA 수준의 Interleukin-1 β 및 Tumor Necrosis Factor- α 의 별현량 비교, 조직검사 및 전자현미경 검사결과를 종합하였을 때 Erbium 계통의 레이저 조사가 염증조직에 있어서 A레이저가 B레이저 보다 우수하게 염증을 생성을 억제하고 빠른 감소를 가져 오는 것을 알 수 있었다.

이상의 실험결과들은 서로 다른 원리를 가진 Erbium 계통의 두 종류의 레이저 조사가 염증조직에 미치는 영향을 이해하는 중요한 결과가 될 것 이라고 확신한다. 또한 향후 개발되는 레이저의 평가지표로서 유용한 가치를 가질 것이라고 사료된다.

References

1. Mahmoud Rouabhia-Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status. *Can J Infect Dis.* 2002 Jan-Feb; 13(1): 47-51.
2. Kim SN, Lee KJ, Park JW *et al* : Laser assisted dental therapy, 1st ed. Seoul, MyeongMun, 2006.
3. Kreisler M, Gotz H, Deuschner H. *et al* : Effects of Nd:YAG, Ho:YAG, CO₂, and GaAlAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 : 202. 2002.
4. Romanos GE, Everts H, Nentwig GH : Effects of diode

- and Nd:YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. *J Periodontol* 66 : 1017, 1995.
5. Kreisler M, Kohnen W, Marinello C *et al* : Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implant surfaces: an *in vitro* study. *J Periodontol* 73 : 1292, 1996.
 6. Schwarz F, Sculean A, Berakdar : *In vivo* and *in vitro* effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planning on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. *Lasers Surg Med* 32 : 359, 2003.
 7. Eberhard J, Ehlers H, Falk W *et al* : Efficiency of subgingival calculus removal with Er:YAG laser compared to mechanical debridement: an *in situ* study. *J Clin Periodontol* 30 : 511, 2003.
 8. Eversole LR, Rizoju IM : Preliminary investigations on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *J Calif Dent Assoc* 23 : 41, 1995.
 9. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y *et al* : Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *J Clin Laser Med Surg* 17 : 155, 1999.
 10. Ericsson LG, Berglundh T, Edlund T *et al* : The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 7 : 320, 1996.
 11. Parham PL, Jr, Cobb CM, French AA *et al* : Effects of an air-powder abrasive system in plasma-sprayed titanium implant surface: an *in vitro* evaluation. *J Oral Implantol* 5 : 78, 1989.
 12. Fox SC, Moriarty JD, Kusy RP: The effects of scaling a titanium implants surface with metal and plastic instruments: an *in vitro* study, *J periodontol* 61 : 485, 1990.
 13. Mombelli A, Lang NP : Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clin Oral Implants Res* 3 : 162, 1992.
 14. Ruhling A, Kocher T, Kreuzsch J *et al* : Treatment of subgingival implant surfaces with Teflon-coated sonic ultrasonic scaler tips and various implant currettes. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res* 5 : 19, 1994.
 15. Ericsson LG, Berglundh T, Edlund T *et al* : The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 7 : 320, 1996.
 16. Schenk G, Flemming TF, Betx T *et al* : Controlled local delivery of tetracyclin HCL in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series. *Clin Oral Implants Res* 8 : 427, 1997.
 17. Augthun M, Tinschert J, Huber A : *In vitro* studies on the effect of cleansing method on different implants surface. *J Periodontol* 69 : 857, 1998.
 18. Dennison DK, Heurzel MB, Quinones C *et al* : Contaminated implant surfaces: An *in vitro* comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol* 65 : 942, 1994.
 19. Misch CE : *Contemporary Implant Dentistry*. 2nd ed. St. Louis, Mosby Yearbook, 1993, p.735.
 20. Maiman TH : Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 187 : 493, 1960.
 21. Eversole Lr, Rizoju I, Kimmel AI : Pulpal responses to cavity preparatio by an erbium, chromium: YSGG laser-powered hydrokinetic system. *Journal of American Dental Association*, 128, 1099, 1997.
 22. Rizoju I, Kohanghadosh F, Kimmel AI *et al* : pulpal thermal responses to an erbium chromium: YSGG pulsed laser hydrokinetic system. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 86, 220, 1998.
 23. Robert J, Miller : Treatment of the contaminated implant surface using the Er,Cr:YSGG laser. *Implant Dentistry* 13 : 2, 2004.

저자 연락처

우편번호 134-010
 서울특별시 강동구 길동 445
 한림대학교 강동성심병원 구강악안면외과
 박준우

원고 접수일 2010년 05월 24일
 게재 확정일 2010년 08월 14일

Reprint Requests

Jun-Woo Park
 Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
 College of Medicine, Hallym University
 Gil-dong 445, Gangdong-gu, Seoul, 134-010, Korea
 Tel: +82-2-2224-2333 Fax: +82-2-483-9647
 E-mail: Junpark@hanafos.com

Paper received 24 May 2010
 Paper accepted 14 August 2010