

신생 흰쥐 난형낭의 조직 배양 모델에서 저출력 레이저의 Gentamicin 이독성 예방과 치료 효과

단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,¹ 의학레이저연구센터,² 상쾌한 이비인후과³
김정범¹ · 정재윤¹ · 안진철² · 이정구^{1,2} · 오양희³

Preventive and Therapeutic Effects of Low Level Laser Irradiation on Gentamicin-Induced Vestibulotoxicity in Rat Utricles

Jeong-Beom Kim, MD¹, Jae Yun Jung, MD¹, Jin-Chul Ahn, PhD²,
Chung Ku Rhee, MD^{1,2} and Yang-Hee Oh, MD³

¹Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery; ²Medical Laser Research Center, College of Medicine, Dankook University, Cheonan; and ³Sangquehan ENT Clinic, Namyangju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The purpose of this study was to investigate the effects of low level laser for the prevention and treatment of aminoglycoside-induced vestibular ototoxicity. **Materials and Method** : An organotypic culture of 2 to 4 days old rat utricular maculae was established. Rats were divided into 6 groups according to the treatment of the utricles : G (gentamicin-treated), L (laser-irradiated), LG (laser-irradiated and gentamicin-treated), GL (gentamicin-treated and laser-irradiated), LGL (gentamicin-treated during laser-irradiated) and C (control). After organotypic culture, the utricles of 6 groups were examined by confocal laser scanning electron microscope and scanning electron microscope. The results of each group were compared with each other by statistical methods. **Results** : The number of vestibular hair cells of the group G was smaller compared to that of the group C. The group L had no difference compared with the group C. The groups LG and GL showed more vestibular hair cells compared with the group G. The group LG showed more vestibular hair cells than the group GL. The group LGL showed most vestibular hair cells compared to that of the groups G, LG, and GL. **Conclusion** : The most effective treatment of aminoglycoside-induced vestibular ototoxicity is the irradiation of low level laser before and after the insult of the aminoglycoside. Further clinical studies using low level laser were needed to prevent aminoglycoside-induced ototoxicity and to promote the regeneration of vestibular hair cells. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:19-28)

KEY WORDS : Gentamicin · Ototoxicity · Low level laser.

서 론

Aminoglycoside 항생제는 현재까지 널리 쓰이는 효과적인 살균 작용을 나타내는 항생제이다. 그러나 aminoglycoside는 이독성과 신독성의 부작용을 가지고 있어 그 사용이 제한적이다. 특히, 신독성은 가역적이거나 이독성은 비가역적으로 영구적인 청력 및 전정 기능의 손실을 초래하는 경우가 많다. 이독성 중 와우 독성은 약 0.6~33%로 보고되고 있고, 전정 독성은 약 15%로 보고되고 있다.^{1,2)}

논문접수일 : 2008년 6월 27일 / 심사완료일 : 2008년 10월 13일
교신저자 : 정재윤, 330-715 충남 천안시 안서동 산16-5
단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실
전화 : (041) 550-3973 · 전송 : (041) 556-1090
E-mail : jjking@dankook.ac.kr

Aminoglycoside 이독성의 기전은 크게 3가지로 미토콘드리아 내 단백질 합성의 교란, NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체의 과활성화, 그리고 free radical의 형성이다.³⁾

저출력 레이저는 생물학적 활성 효과는 포피린(porphyrin), 사이토크롬(cytochromes), 미토콘드리아 효소 등이 저출력 레이저를 흡수하여 자극되면 singlet oxygen의 생성 및 미토콘드리아에서 칼슘이 유리되며, ATP 생산을 자극하여 DNA와 RNA의 합성을 가속시킴으로써 세포 활성이 증가하는 것이다.^{4,5)}

또한 교감 신경에 작용하여 vascular smooth muscle cell의 확장, cGMP 생산을 증가시켜 혈관의 확장을 가져옴으로써 항염증 작용 및 진통 효과를 나타내고, 창상 치유

를 증가시키며,^{4,5)} 피부, 신경, 뼈, 골격근 조직에서의 재생 능력을 증가시킨다.⁶⁾

따라서 본 연구에서는 이러한 저출력 레이저의 효과를 이용해 전정 유모 세포의 이독성 손상을 치료하고 더 나아가서 이독성이 예측이 된다면 미리 예방하는 역할도 가능할지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 조직 배양

조직 배양에 이용된 난형낭반 조직은 생후 2~4일령(p 2~4)의 흰쥐(Sprague-Dawley rat, Orient, Seongnam, Korea)로부터 얻어졌으며 총 6군에서 각 군당 7귀, 총 42귀를 사용하였다. FM1-43 {N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4-(dibutylamono)-styryl) pyridinium dibromide} (Molecular Probe, USA) 형광 염색을 통한 유모 세포 수의 확인에 사용된 난형낭반은 군별로 3개였으며, Phalloidin-FITC (Sigma, USA) 형광 염색과 주사 전자 현미경을 통한 유모 세포의 형태를 확인한 난형낭반은 군별로 각각 2개씩 총 4개였다. 신생 흰쥐의 마취는 ketamine hydrochloride (30 mg/kg)를 근육주사하여 시행하였다. 신생 흰쥐를 75% 에탄올로 소독한 후 경부를 절단하여 두부를 좌우로 분리하고 두피와 뇌 조직을 제거한 뒤 상온의 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)가 담긴 petri dish에서 입체현미경 (stereomicroscope, OLYMPUS LG-PS2) 하에서 난형낭을 분리하였다. 상반 고리관과 가측반고리관의 팽대부를 미세 가위 및 미세 칼로 제거하고 전정 유모 세포의 섬모를 온전히 보존하기 위해 이석막을 조심스럽게 제거하였다. 조직 배양 중 다른 추가적인 조작 없이 공초점 레이저 주사 현미경으로 직접 관찰할 수 있도록 바닥이 cover glass로 되어있는 culture dish (FluoroDish, World Precision Instrument, Inc, USA)를 사용하였고 분리된 조직을 4.5 g/L 농도의 glucose, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 μ L/10 mL 농도의 N-1 supplement (Sigma, USA) 그리고 100 U/mL의 penicillin 등이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배양액이 담긴 culture dish로 옮긴 후 배양을 시작하였다. 조직을 옮기기 전에 조직이 culture dish의 바닥면에 쉽게 부착될 수 있도록 gelatin layer coating을 시행하였다. 5%의 탄산가스과 95%의 공기가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되는 배양기 (Thermo Forma, USA)에서 배양하였으며 2일 간격으로 배양액을 교체하였다.

실험군 및 대조군 설정

실험군은 G군, L군, LG군, GL군, LGL군으로 설정하였고, 대조군은 C군으로 설정하였다. 모든 군은 난형낭반 조직이 culture dish의 바닥면에 안정되게 부착될 수 있도록 24시간 동안 배양 후 실험을 시행하였다.

G군은 1일 동안 아무 처리 없이 조직 배양 후, 배양 1일째 (1 Day In Vitro (1 DIV))부터 3일째 (3 DIV)까지 1 mM의 gentamicin (Sigma, USA)을 이용하여 이독성을 유발한 군으로 하였다.

L군은 1일 동안 아무 처리 없이 조직 배양 후, 배양 1일째 (1 DIV)부터 배양 14일째 (14 DIV)까지 매일 하루에 60분간 670 nm Diode 레이저 3.0 mW/cm² (16.3 J/cm²)를 조사한 군으로 정하였다.

LG군은 1일 동안 아무 처리 없이 조직 배양 후, 배양 1일째 (1 DIV)부터 배양 3일째 (3 DIV)까지 2일 동안 하루 60분간 670 nm Diode 레이저 3.0 mW/cm² (16.3 J/cm²)를 조사한 후, 배양 3일째 (3 DIV)부터 배양 5일째 (5 DIV)까지 1 mM의 gentamicin을 48시간 동안 처리하여 이독성을 유발한 군으로 하였다.

GL군은 1일 동안 아무 처리 없이 조직 배양 후, 배양 1일째 (1 DIV)부터 배양 3일째 (3 DIV)까지 1 mM의 gentamicin을 48시간 동안 처리한 후, 배양 3일째 (3 DIV)부터 배양 14일째 (14 DIV)까지 하루 60분간 670 nm Diode 레이저 3.0 mW/cm² (16.3 J/cm²)를 조사한 군으로 하였다.

LGL군은 1일 동안 아무 처리 없이 조직 배양 후, 배양 1일째 (1 DIV)부터 배양 14일째 (14 DIV)까지 하루 60분간 670 nm Diode 레이저 3.0 mW/cm² (16.3 J/cm²)를 조사한 군으로 배양 3일째 (3 DIV)부터 배양 5일째 (5 DIV)까지 1 mM의 gentamicin을 48시간 동안 처리한 군으로 하였다. 따라서 LGL군은 gentamicin 이독성 전에 2일간 저출력 레이저로 예방 처리하였고 그 후 gentamicin 이독성 후에도 계속해서 치료 차원에서 저출력 레이저를 매일 조사하였다. 또한 아무런 처리 과정 없이 배양 14일째 (14 DIV)까지 배양만 시킨 군을 대조군 C (control)로 정하였다 (Fig. 1).

이독성 및 저출력 레이저 조사

난형낭의 전정 유모 세포의 이독성 유발을 위해 aminoglycoside 계열의 항생제인 gentamicin을 사용하였다.

각 군에서 레이저를 조사할 때는 670 nm Diode 레이저를 3.0 mW/cm² (16.3 J/cm²)의 조사량으로 optic fiber를 통해 각각의 culture dish에 동일량의 레이저가 조사될 수

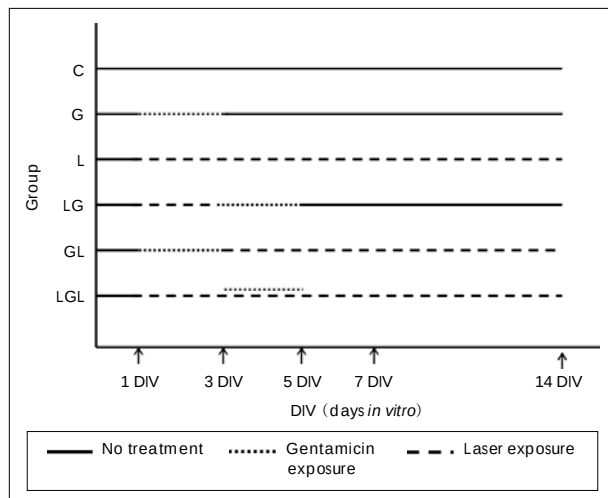


Fig. 1. Schema of experimental paradigms. C : control, G : gentamicin-treated, L : laser-irradiated, LG : laser-irradiated and gentamicin-treated, GL : gentamicin-treated and laser-irradiated, LGL : gentamicin-treated during laser-irradiated.

있도록 고안된 metal box 안에서 culture dish의 덮개가 닫힌 상태에서 레이저를 조사하였다(Fig. 2).

형광 염색 및 주사전자현미경

FM1-43 형광 염색

FM1-43은 본 연구에서 공초점 레이저 주사 현미경으로 각 군의 유모 세포의 수와 형태 등의 변화를 관찰하기 위한 형광 염색 시약으로 사용하였다. 형광 염색 시약의 투여는 마이크로 피펫을 이용하여 난형낭반의 움직임이 없게 유지하며 배지에 직접 투여하는 방법으로 하였으며, 형광 염색을 위해 3 μM 의 FM1-43으로 10분간 처리하였고 배양한지 1일째 되는 날(1 DIV)부터 매일 난형낭 유모 세포를 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, LSM 510 META, Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV)에 배양 중인 모든 전정 유모 세포에서 FM1-43 형광 염색을 시행하여 각 군별로 평균 전정 유모 세포의 수를 계산하고 통계학적 분석을 시행하였다. 유모 세포의 수 평가는 400배 확대한 영상(30,000 μm^2)에서 정상적인 형태를 유지하며 유모 세포가 가장 많이 관찰되는 3곳을 정하여 유모 세포의 수를 셀 후 평균값으로 하였다.

Phalloidin-FITC 형광 염색

배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV)에 phalloidin-FITC 형광 염색 후, 공초점 레이저 주사 현미경을 통해 정

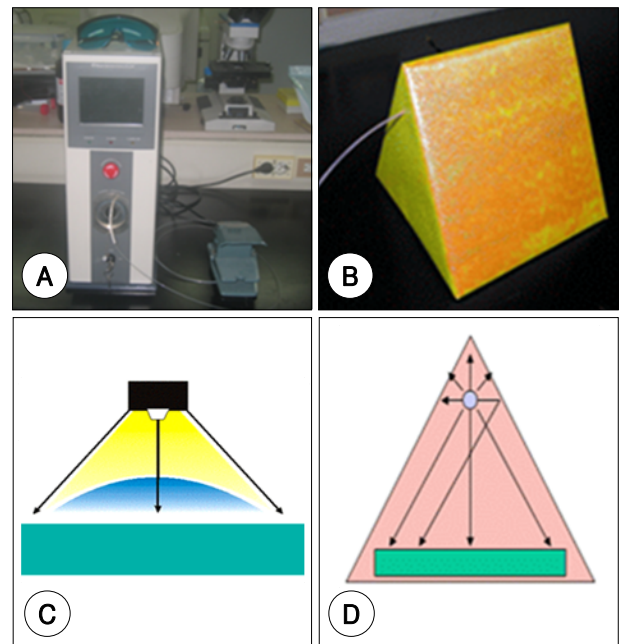


Fig. 2. Method of low level laser irradiation. A : 670-nm Diode laser. B : Laser irradiation on culture dish placed inside the metal box. C : Laser intensity across culture dishes creates a parabolic effect. D : Metal box is designed to distribute laser more evenly & efficiently by delivering laser by a optic fiber inserted at the ceiling of the box.

확한 난형낭 유모 세포의 형태를 관찰하였다. Phalloidin-FITC 형광 염색을 위해 난형낭은 4% paraformaldehyde (Sigma, USA)에 1시간 동안 고정하였고 0.1 M phosphate buffer saline으로 세척한 후 5분간 0.25% Triton X-100 (Sigma, USA)을 처리하였다. 그 후 phalloidin-FITC를 40분간 처리한 후 0.1 M phosphate buffer saline으로 3번 세척한 후 글리세린이 포함된 fluoromount (Difco, USA)을 이용해 봉입한 후 공초점 레이저 주사 현미경을 이용해 난형낭을 관찰하였다.

공초점 레이저 주사 현미경은 조직을 수평 단면으로 절단하여 영상을 얻기 때문에 세포의 밀도가 가장 높은 부분의 영상을 택하여 400배 확대한(30,000 μm^2) 상태에서 형광 염색된 유모 세포를 관찰하였다.

주사 전자 현미경(Scanning electron microscope)

주사 전자 현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, S-4300, HITACHI, Japan)을 통한 형태학적 관찰을 위해 배양 14일째(14 DIV)에 4% paraformaldehyde로 4°C에서 12시간 동안 1차 고정 후 1 M PBS로 20분간 2회 세척하였다. 1% osmium tetroxide에서 1시간 동안 2차 고정한 다음 다시 같은 방법으로 세척하고 70%, 80%, 90%, 99% 알코올을 이용한 탈수과정을 거쳐

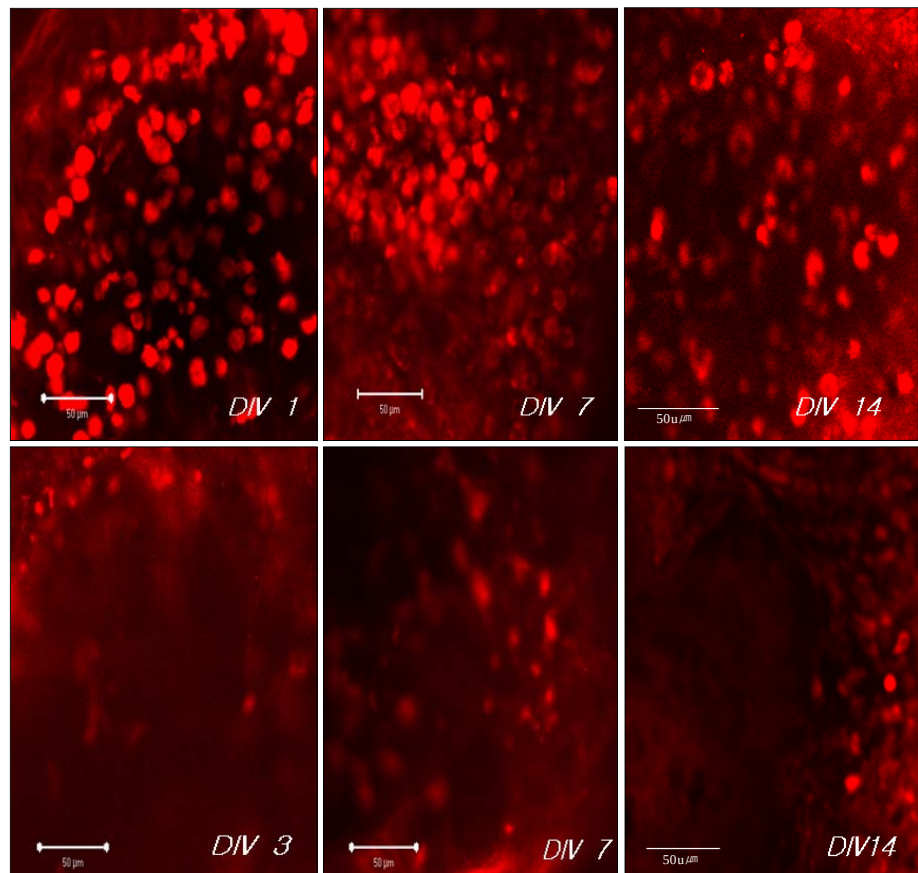


Fig. 3. The findings of cultured hair cells of rat utricles stain with FM 1-43 at specific times (DIV 1 or 3, DIV 7, DIV 14) in group C & G by CLSM (upper row : group C, lower row : group G). The number of hair cells is numerous in group C. The number of hair cells is much decreased compared with group C in group G. CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*.

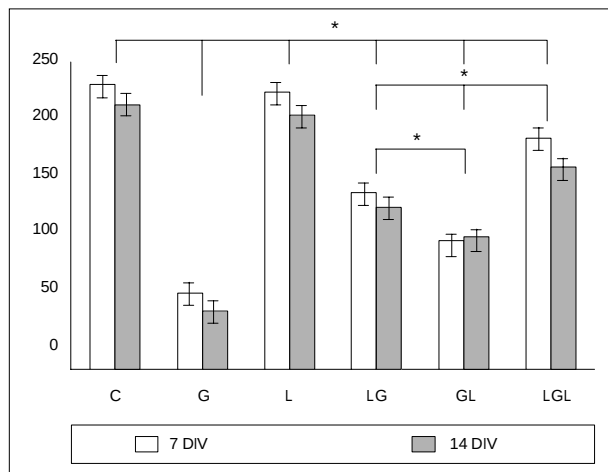


Fig. 4. The mean number of hair cells/30,000 μm^2 field of CLSM. There are statistical differences among all groups (* $p < 0.05$) except between control and L by Mann-Whitney U test. CLSM : confocal laser scanning microscope.

조직을 건조시킨 후 백금으로 코팅하였으며 모든 군에서 10 kV의 세기로 촬영하였다.

통계는 SPSS 13.0 프로그램을 이용하여 각 군 간의 결과를 Mann-Whitney U test로 정량적으로 분석하여 95% ($p < 0.05$) 유의수준에서 검증하였다.

결 과

이독성 평가(C, G군)

이독성 평가를 위해 배양한지 1일째 되는 날(1 DIV)부터 대조군인 C군과 G군의 난형낭 전정 유모 세포의 수를 확인하였다. 각 군별 평균 전정 유모 세포 수의 확인은 배양 7일째(7 DIV), 14일째(14 DIV)에 FM1-43 형광 염색 후 공초점 레이저 주사 현미경으로 전정 유모 세포의 수를 세어 확인하였다. 7일째 C군과 G군의 전정 유모 세포의 수는 $231.0(\pm 15.7)$ 개와 $62.3(\pm 14.9)$ 개였다. 14일째에는 C군이 $214.3(\pm 19.6)$ 개와 G군이 $47.7(\pm 8.3)$ 개였다(Fig. 3). 배양 7, 14일째에 확인한 G군의 전정 유모 세포의 수는 C군보다 통계학적으로 의미있게 낮은 값을 보였다($p = 0.002$) (Fig. 4).

전정 유모 세포의 세밀한 형태를 확인하기 위해 시행한 phalloidin-FITC를 이용한 형광 염색과(Fig. 5) 주사 전자 현미경 소견에서(Fig. 6) C군과 G군의 차이를 확인할 수 있었다. Phalloidin-FITC 형광 염색 관찰 소견에서 G군의 전정 유모 세포의 수는 FM1-43에서와 마찬가지로 확연하게 감소된 양상을 보였다(Fig. 5). 이러한 유모 세포

Fig. 5. Photomicrographs showing utricular organotypic cultures labeled phalloidin-FITC by CLSM in DIV 14 (scale bar : 20 μ m). A : Utricular hair cells of group C. B : Utricular hair cells of group G. C : Utricular hair cells of group L. D : Utricular hair cells of group LG. E : Utricular hair cells of group GL. F : Utricular hair cells of group LGL. The number and morphology of hair cells in group LGL are well preserved compared with group G, LG, and GL. CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*.

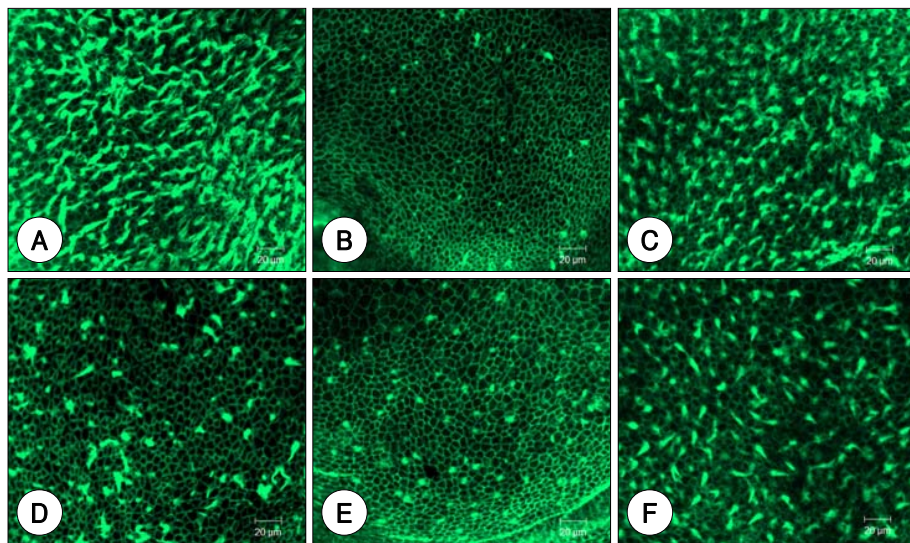
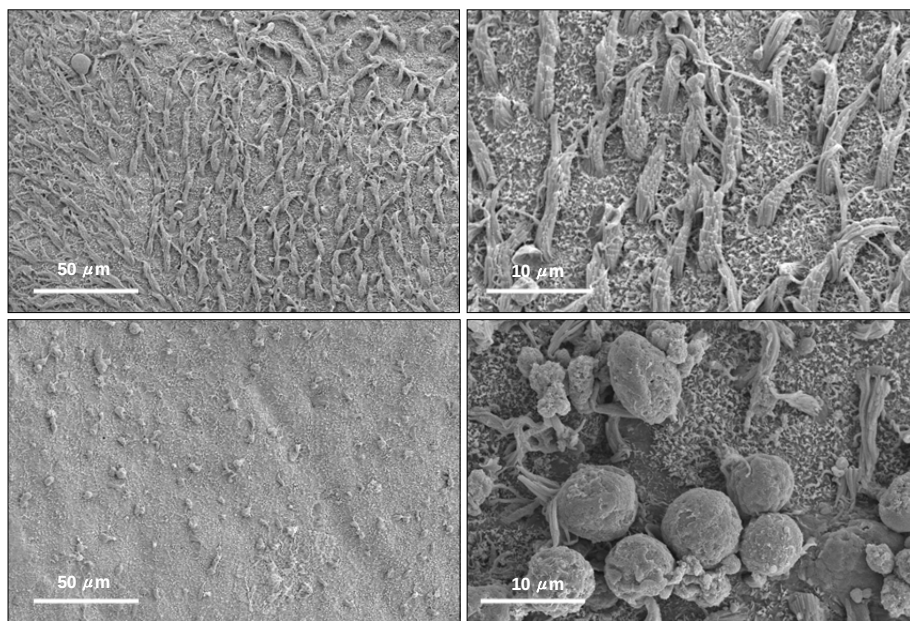


Fig. 6. The morphologic findings of group C & G by SEM (upper row ; group C, low row ; group G). Left : Utricular hair cells (10 kV, scale bar 50 μ m). Right : Utricular hair cells (10 kV, scale bar 10 μ m). The morphology of utricular hair cell is normal and well preserved in group C. There are morphologic changes of vestibular hair cells such as blebbing, cell-to-matrix adhesion and cell-to-cell aggregation in group G. SEM : scanning electron microscope.



탈락 소견은 striola 부위가 현저하였으며 striola 부위에서 난형낭 말초 부위로 갈수록 striola 부위에 비하여 유모 세포가 비교적 잘 유지되었다.

Gentamicin에 의한 이독성 손상은 주사 전자 현미경 소견에서 잘 확인되었다. 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과 이독성 손상을 받은 유모 세포의 형태학적 변화는 먼저 절대적인 세포 수의 감소가 눈에 띄며 수포화, 세포간의 응집 그리고 세포와 주변 기질간의 유착 등으로 요약할 수 있었다(Fig. 6).

저출력 레이저 조사(L군)

배양 기간 동안 배지액 교체 및 레이저 조사만을 시행한

L군의 FM1-43 형광 염색을 통한 공초점 레이저 주사 현미경 소견은 C군과 유사한 양상을 보였다(Fig. 7).

배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV)에 확인한 L군의 전정 유모 세포의 수는 각각 224.3($\pm$ 11.2)개와 206.3($\pm$ 9.9)개였다. 이것은 C군의 전정 유모 세포의 수와 비교하였을 때 통계학적으로 차이가 없는 결과이다($p=0.669$) (Fig. 4).

또한 phalloidin-FITC 형광 염색을 통한 공초점 레이저 주사 현미경 소견과(Fig. 5) 주사 전자 현미경 소견에서도(Fig. 7) C군과 유사한 소견을 보였다. 난형낭반의 전정 유모 세포의 수도 C군과 비슷하게 유지하고 있었으며 뚜렷한 유모 세포의 형태학적 변화 양상도 관찰되지 않았다.

저출력 레이저의 이독성 예방 효과(LG군)

저출력 레이저 조사 후 gentamicin으로 이독성을 유발한 LG군에서 FM1-43 형광 염색 후 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한 결과, 배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV)의 평균 전정 유모 세포의 수는 각각 $143.3(\pm 13.9)$

와 $131.3(\pm 15.1)$ 개였다(Fig. 8). 이러한 결과는 저출력 레이저의 전처리 효과가 없었던 G군에 비하여 통계적으로 유의하게 유모 세포의 수가 많은 것이며($p=0.002$)(Fig. 4), 대조군인 C군과 비교하였을 때는 유의하게 난형낭반의 유모 세포가 감소된 것이다.

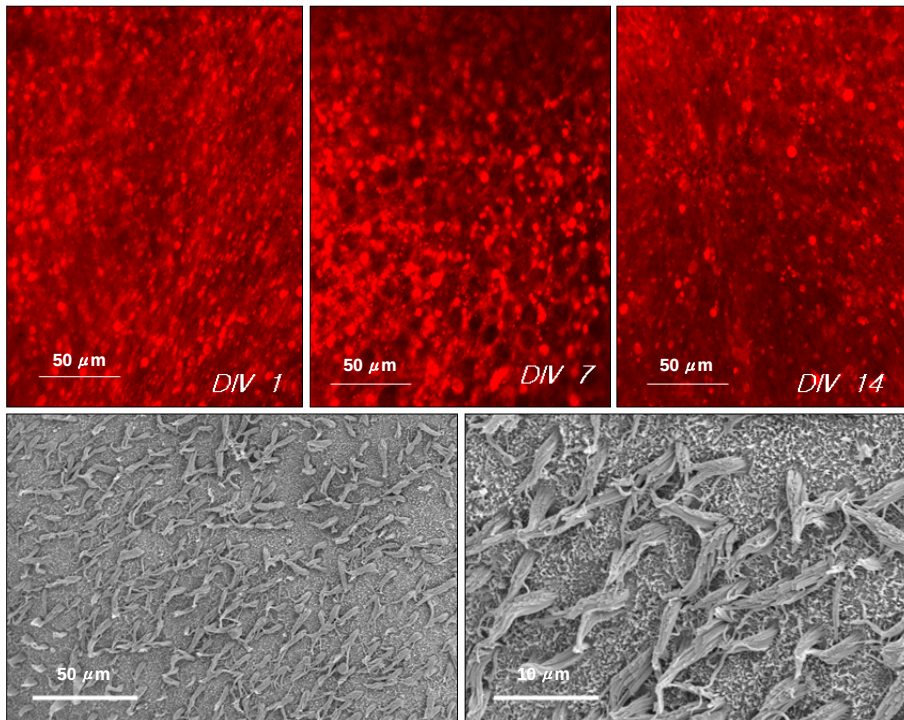


Fig. 7. The findings of cultured hair cells of rat utricles stained with FM 1-43 at specific times (DIV 1, DIV 7, DIV 14) in group L by CLSM (upper row). The number of hair cells is similar to that of group C. The morphologic changes of hair cells are not observed compared with group C in group L (low row). CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*, SEM : scanning electron microscope.

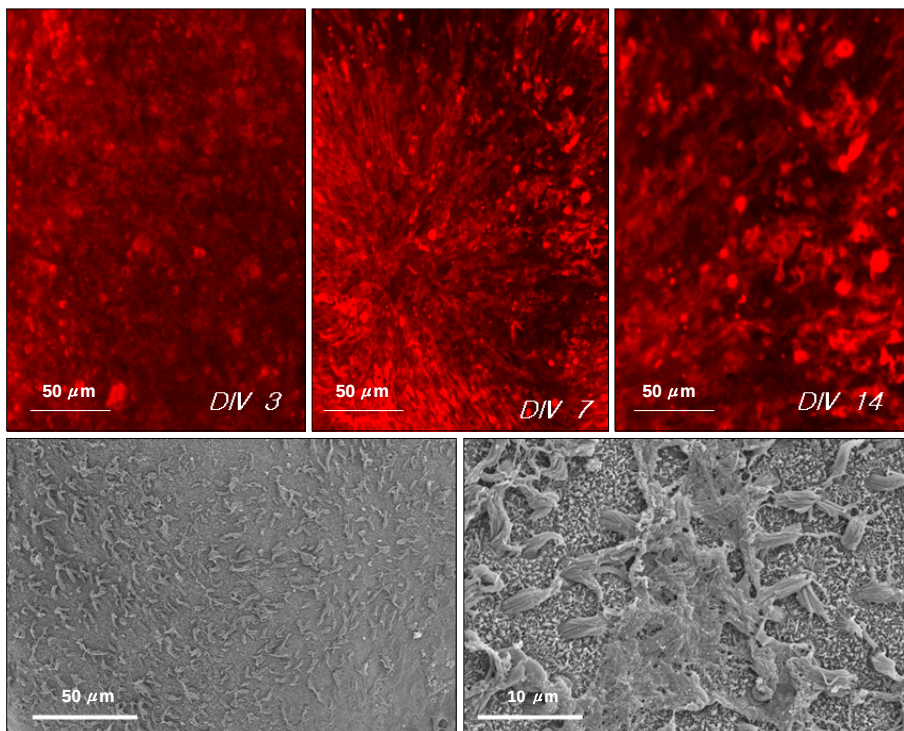


Fig. 8. The findings of cultured hair cells of rat utricles stained with FM 1-43 at specific times (DIV 3, DIV 7, DIV 14) in group LG by CLSM (upper row). There is significant difference in numbers of hair cells between group LG and group G. The numbers of hair cells are statistically more than that of group G. The morphology of hair cells is relatively preserved compared with group G in group LG (low row). CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*, SEM : scanning electron microscope.

Phalloidin-FITC 형광 염색을 통한 공초점 레이저 주사 현미경 소견과(Fig. 5) 주사 전자 현미경 소견에서도(Fig. 8) C군과 비교하였을 때 유모 세포가 적은 소견이 보였으며, G군과 비교하였을 때는 유모 세포가 많은 소견이 보였다. 또한 주사 전자 현미경으로 살펴본 전정 유모 세포의 형태학적 소견에서는 G군에 비하여 전정 유모 세포의 형태가 비교적 잘 유지되었다(Fig. 8).

이독성 유발 후 저출력 레이저 처리 효과(GL군)

배양 후 1일째(1 DIV)부터 gentamicin을 이용하여 48시간 동안 이독성을 유발한 후 배양 3일째(3 DIV)부터 배양 14일째(14 DIV)까지 저출력 레이저 처리를 시행한 GL군에서 배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV)에 FM1-43 형광 염색 후 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한 결과, 평균 난형낭반 유모 세포 수는 각각 $104.0(\pm 6.6)$ 와 $107.7(\pm 7.9)$ 개였다(Fig. 9). GL군은 gentamicin으로 이독성을 유발한 G군에 비하여 통계적으로 유의하게 많은 유모 세포의 수가 관찰되었으나($p=0.002$) (Fig. 4), 저출력 레이저 조사 후 gentamicin으로 이독성을 유발한 LG군보다는 더 많은 유모 세포의 감소 소견을 보였다($p=0.004$) (Fig. 4).

또한 배양 7일째와 14일째를 비교하였을 때($104.0(\pm 6.6)$, $107.7(\pm 7.9)$), 레이저 처리의 기간이 길어지면 미세

한 정도로 유모 세포의 증가 양상이 보였으나 통계학적으로 유의한 것은 아니었다($p=0.756$).

Phalloidin-FITC 형광 염색 소견에서 LG군과 마찬가지로 C군보다는 적은 유모 세포 소견을 보였으며, G군과 비교하였을 때는 유모 세포가 많은 소견이 보였다(Fig. 5). 또한 주사 전자 현미경으로 살펴본 전정 유모 세포의 형태학적 소견에서는 G군에 비하여 전정 유모 세포의 형태가 비교적 잘 유지되었다(Fig. 9).

저출력 레이저의 이독성 예방과 치료의 동시 효과(LGL군)

24시간 동안 아무런 처리 없이 배양한 후 배양 1일째(1 DIV)부터 배양 14일째(14 DIV)까지 지속적으로 저출력 레이저 처리를 받으면서 배양 3일째(3 DIV)부터 5일째(5 DIV)까지 48시간 동안 gentamicin으로 이독성 자극을 주어, gentamicin 처리 전 2일 동안 미리 저출력 레이저로 예방 처리를 하고 gentamicin 이독성 후에도 매일 지속적으로 치료 차원에서 저출력 레이저 처리를 한 LGL군의 배양 결과는 다음과 같다. LGL군을 FM1-43 형광 염색 후 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한 결과 배양 7일째(7 DIV)와 14일째(14 DIV) 전정 유모 세포의 수는 각각 $187.2(\pm 20.5)$ 와 $163.7(\pm 15.3)$ 개였다(Fig. 10). 이는 C군의 전정 유모 세포 수와 비교하였을 때 통계적으로 의미 있게 낮은 값이었으나 5개의 실험군들 중 L군 다음으로 두 번

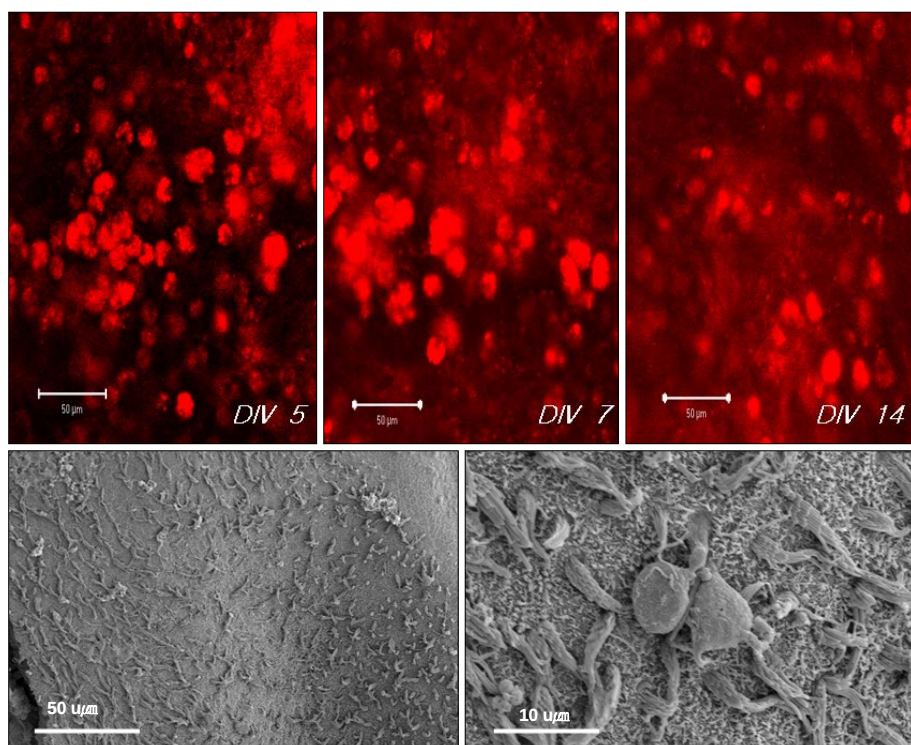


Fig. 9. The findings of cultured hair cells of rat utricles stained with FM1-43 at specific times (DIV 5, DIV 7, DIV 14) in group GL by CLSM. There is significant difference in numbers of hair cells between group GL and group G (upper row). The numbers of hair cells are statistically more than that of group G. The morphology of hair cells is relatively preserved compared with group G in group GL (low row). CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*, SEM : scanning electron microscope.

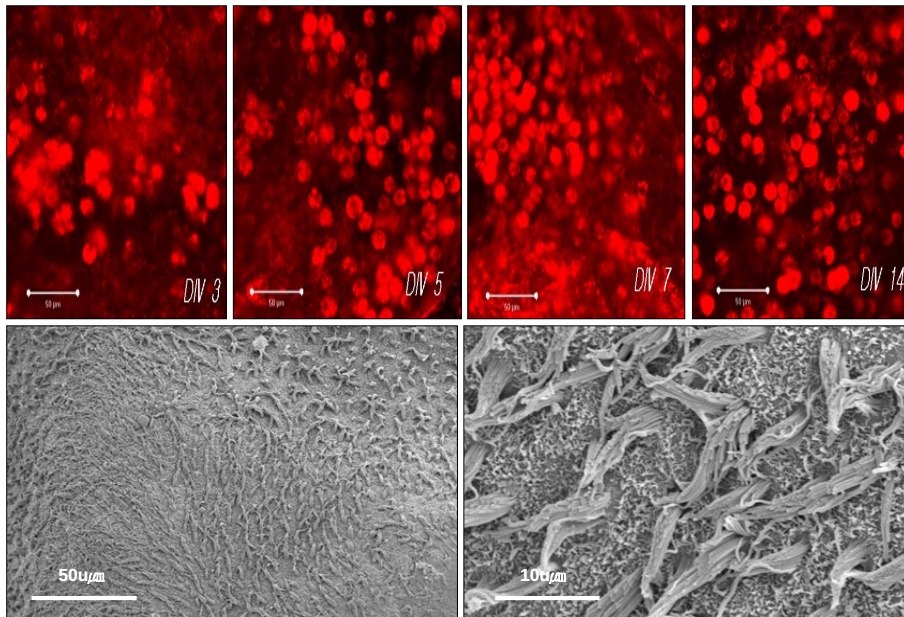


Fig. 10. The findings of cultured hair cells of rat utricles stained with FM 1-43 at specific times (DIV 3, DIV 5, DIV 7, DIV 14) in group LGL by CLSM (upper row). The numbers of hair cells are statistically more than that of group G, LG, GL. The morphology of hair cells is most well preserved compared with group G, LG, and GL in group LGL (low row). CLSM : confocal laser scanning microscope, DIV : days *in vitro*, SEM : scanning electron microscope.

세포 많은 난형낭반 유모 세포의 수였으며, LG군과 GL군과 비교하였을 때는 통계적으로 유의하게 많은 값이었다 ($p=0.007$, $p=0.004$) (Fig. 4).

Phalloidin-FITC 형광 염색 소견과(Fig. 5) 주사 전자 현미경 소견에서도(Fig. 10) LG군, GL군과 비교하였을 때 많은 유모 세포가 관찰되었으며, 주사 전자 현미경으로 살펴본 전정 유모 세포의 형태학적 소견에서는 전정 유모 세포의 형태가 LG군, GL군보다 C군과 가장 유사한 양상을 보였다.

고 찰

Aminoglycoside의 이독성은 잘 알려져 있으며 그 기전에 대한 다양한 연구 결과가 보고되면서 aminoglycoside 이독성을 치료하고 더 나아가 사전에 이독성이 예측이 되면 미리 적극적으로 예방하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

인간을 비롯한 포유류의 내이 유모 세포는 임신 초기에 분화가 완료되어 출생 당시 완전히 분화된 상태이므로 출생 이후에 손상이 가해지면, 재생(regeneration)되지 않아 영구적이고 비가역적인 청각이나 전정 장애를 일으킨다고 알려져 왔다. 그러나 포유류의 내이 유모 세포와는 달리 어류, 양서류, 조류에서는 이독성 손상 후에도 내이 유모 세포가 재생된다는 사실이 보고되면서,⁷⁾ 포유류에서도 내이 유모 세포가 재생되는지에 대한 많은 연구가 있어 왔고, 최근의 연구들은 성숙한 포유류 동물에서 aminoglycoside 이독성 후에도 전정 유모 세포가 어느 정도 재생된다고 보

고하였다.⁸⁾

본 연구에서는 난형낭의 조직 배양을 통해 실험을 진행하였다. 이러한 내이 기관의 조직 배양은 이독성 예방 및 손상 후 재생이나 회복에 대한 연구를 위한 기초적인 연구로서의 의의를 가진다. 성공적인 조직 배양을 위해 모든 과정은 소독된 시설에서 소독된 기구를 이용하여 시행하였고, 배양액은 Berggren 등의 조직 배양에 사용된 배양액을 참고하여 배양을 유지하였다.⁹⁾

연구에 사용된 styryl pyridinium계열의 형광 염색제인 FM1-43은 척추 동물의 내이 감각 유모 세포에 염색이 되며 주로 세포내이입(endocytosis) 및 세포외유출(exocytosis)과 같은 synaptic vesicle recycling을 관찰하는데 이용되고 유모 세포의 세포질까지 빠른 시간 내에 염색이 되지만 주위의 지지 세포에는 세포막만 염색이 되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ Fukuda 등은 장기간의 와우의 조직 배양에서 FM1-43에 염색된 유모 세포가 추가적인 영양 요소 공급 없이도 2주 이상 생존하는 것을 관찰하였고 배지에 aminoglycoside 항생제를 첨가한 후에는 염색된 유모 세포의 수가 현격히 줄어드는 것을 보고 생존하는 유모 세포에만 염색이 되는 특성을 가진다고 보고하였다.¹¹⁾ 그러므로 이독성 예방 및 손상된 유모 세포의 재생 과정을 장기간 관찰하기에는 상당히 효율적이며 조직의 고정도 불필요해 일관되고 연속적인 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

레이저는 그 출력에 따라 고출력(high-power)과 저출력(low-power) 레이저로 구분이 되는데, 의학적인 분야에 있어서 고출력 레이저는 3,000~10,000 mW 정도로, 주로

외과적인 수술 과정에서 조직을 절개하는데 사용되며 그 과정에서 열을 방출한다. 저출력 레이저는 1,000 mW 미만의 레이저를 말하고, 주로 세포를 자극하는 효과를 나타내며, 열을 발생하지 않는 상태에서 주로 광에너지(photo energy)를 이용한다. 고출력 레이저와 저출력 레이저의 가장 중요한 차이는 열효과(thermal effect)이다. 고출력 레이저는 열을 발생시켜 대부분 세포에 있는 수분을 증발시킴으로써 결국 세포나 조직을 태워버리는 효과를 가져오게 되나, 저출력 레이저는 열이 발생하지 않아 그 작용이 세포 내 분자 생물학적으로 영향을 준다.

저출력 레이저 광선을 흡수한 세포들은 광에너지(photo energy)를 세포의 손상을 치유할 수 있는 화학적인 에너지로 전환시켜, 이를 통해 손상된 부위의 항염증 효과(anti-inflammatory effect), 면역 억제 효과(immunosuppressive effect), 혈관 확장, 혈행 촉진, 통증 완화, 항부종 효과, 살균 및 상처 치유, 신경 재생 및 발달 효과 등을 나타내게 되는데, 이러한 현상을 총체적으로 생체 촉진 효과(bio-stimulation effect)라고 한다.^{12,13)}

저출력 레이저의 조사량은 Anders 등의 연구 모델을 참고하였고 균일한 레이저의 조사를 위해 본 실험실에서 고안된 삼각기둥 모양의 metal box 안에서 레이저 조사가 이루어졌으며 또한 diffuser tip을 사용함으로써 여러 방향의 레이저 빔이 반사판을 통해 균일한 반사가 이루어지게 하였다.¹⁴⁾ 이러한 특수 디자인된 metal box는 향후 저출력 레이저 조사 연구에 유용하게 적용하여 사용될 수 있다.

본 연구에서는 조직 배양을 통해 gentamicin 이독성 후 전정 유모 세포를 치료하고 이독성 전에 예방하는 인자로서 저출력 레이저의 임상적 활용 가능성을 알아보고자 하였다. 이미 저출력 레이저가 피부, 신경, 뼈, 골격근 조직에서의 재생 능력을 증가시키는 연구 결과와 섬유 모세포주, 인간 후두암 세포주 등에서 세포 활성도를 증가 시킨다는 것이 보고 되었다.^{6,15)}

난형낭의 조직 배양을 유지하면서 G, L, LG, GL, LGL, C 군으로 나누어 실험한 결과, G군에 비해서 LG군과 GL군, LGL군에서 배양 7일, 14일째 모두 전정 유모 세포의 수가 많았다. 이것은 저출력 레이저가 gentamicin 이독성을 예방하고 동시에 이독성을 치료하는 역할을 함을 알 수 있으며, 저출력 레이저가 어떠한 기전을 통해 이독성을 예방하고 치료하는지에 대해서는 앞으로 생화학적, 분자 생물학적 연구 등이 더 진행되어야 할 것이다.

Aminoglycoside 이독성 후 치료를 하지 않아도 포유류에서 전정 유모 세포가 어느 정도 자발 재생을 한다고 알려져 있다.⁸⁾ 본 연구에서 이독성 후 저출력 레이저를 조사했

을 때(GL군) 전정 유모 세포 수가 G군에 비해서 유의하게 증가한 것은, 저출력 레이저가 이독성 후 전정 유모 세포의 자발 재생 과정을 촉진했거나, 가역적으로 손상된 전정 유모 세포의 자발적인 치유를 촉진하여 전정 유모 세포의 수를 증가시켰으리라 추론해 볼 수 있다.

또한 본 연구에서 저출력 레이저를 전처리하여 조사 후 이독성을 유발한 군(LG군)에서 G군에 비해 유의하게 전정 유모 세포 수가 많은 것은, 저출력 레이저가 이독성으로부터 전정 유모 세포를 보호하는 예방 효과가 있음을 보여준다. 이는 저출력 레이저가 신경 조직을 보호하는 효과가 있다고 알려진 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 growth-associated-protein-43(GAP-43) 등의 합성을 촉진하고 반대로 신경 독성의 효과를 지닌 nitric oxide(NO)의 활성도를 억제하며,¹⁶⁾ 항세포고사 단백질인 BCL-2를 증가시키고, 세포 고사 단백질인 BAX를 감소시켜 세포 고사(apoptosis)를 억제시키기 때문이다.¹⁷⁾ 또한 최근에는 저출력 레이저가 mitochondrial respiratory chain activity를 증가시키는데 그 중 cytochrome C complex IX와 complex II 활성을 증가시켜 세포 재생을 촉진한다는 보고도 있다.¹⁸⁾

본 연구에서 저출력 레이저를 이독성 전과 후에 병합으로 조사한 군(LGL군)에서 G군, LG군, GL군에 비해 유의하게 전정 유모 세포 수가 가장 많았다는 것은, 저출력 레이저를 이독성이 예측되는 상황에서 미리 예방 요법으로 사용하고 이독성 후에도 지속적으로 사용하면 이독성을 예방하고 동시에 치료할 수 있는 시너지 효과를 볼 수 있음을 보여준다. 또한 aminoglycoside 이독성을 예방하고 치료하는 기존의 시도들은 대개 또 다른 약물을 투여하는 방법이지만, 저출력 레이저는 새로운 약물 투여에 대한 부담 없이 이독성이 예측되는 환자에서 간편하고, 안전하게 외이도를 통하여 조사할 수 있는 방법이라는 장점을 가진다.

결 론

본 연구는 저출력 레이저가 aminoglycoside에 의한 전정 이독성을 예방하고 치료하는 결과를 보여 주었고, gentamicin 이독성 전에 저출력 레이저를 전처리하여 조사하는 것이 이독성 후 저출력 레이저를 후처리하여 조사하는 것보다 전정 유모 세포 치료의 효과가 더 컸으며, 저출력 레이저의 효과를 극대화하기 위해서는 저출력 레이저를 이독성 유발 전과 후에 병합 요법으로 사용하는 것이 가장 효과적임을 보여 주었다.

향후 *in vivo* 실험을 통하여 이러한 저출력 레이저의 장점

들을 생체 내에서의 효과를 확인해야 할 것이다.

중심 단어 : 겐타마이신 · 이독성 · 저출력 레이저.

REFERENCES

- 1) Fausti SA, Henry JA, Helt WJ, Phillips DS, Frey RH, Noffsinger D, et al. An individualized sensitive frequency range for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 1999;20 (6):497-505.
- 2) Fee WE Jr. Aminoglycoside ototoxicity in the human. *Laryngoscope* 1980;90:1-19.
- 3) Strupp M, Arbusow V. Acute vestibulopathy. *Curr Opin Neurol* 2001; 14 (1):11-20.
- 4) Pinheiro AL, Cavalcanti ET, Pinheiro TI, Alves MJ, Manzi CT. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15 (4):181-3.
- 5) Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111 (5):525-32.
- 6) Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996;23 (5):492-6.
- 7) Balak KJ, Corwin JT, Jones JE. Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: Evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *J Neurosci* 1990;10 (8):2502-12.
- 8) Forge A, Li L, Corwin JT, Nevill G. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 1993;259 (5101):1616-9.
- 9) Berggren D, Liu W, Frenz D, Van De Water T. Spontaneous hair-cell renewal following gentamicin exposure in postnatal rat utricular explants. *Hear Res* 2003;180 (1-2):114-25.
- 10) Betz WJ, Mao F, Smith CB. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6 (3):365-71.
- 11) Fukuda J, Ishimine H, Tokunaga M. Identification of live hair cells in rat cochlear sections in culture with FM1-43 fluorescent dye. *Neurosci Lett* 2004;355 (1-2):141-5.
- 12) Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Miner Metab* 2003; 21 (2):67-73.
- 13) Tang XM, Chai BP. Effect of CO₂ laser irradiation on experimental fracture healing: A transmission electron microscopic study. *Laser Surg Med* 1986;6 (3):346-52.
- 14) Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res* 2004;26 (2):233-9.
- 15) 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;476 (2): 205-12.
- 16) Schacht J. Antioxidant therapy attenuates aminoglycoside-induced hearing loss. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:125-30.
- 17) Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J cell Sci* 2002;115 (pt 7):1461-9.
- 18) Silveira PC, Streck EL, Rinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 2007;86 (3):279-82.