

생체 조직의 광 투과도 개선을 위한
광 산란 감소 물질의 피부 전달 향상에
대한 연구

연세대학교 대학원

의공학과

윤 진 희

생체 조직의 광 투과도 개선을 위한
광 산란 감소 물질의 피부 전달 향상에
대한 연구

지도 정 병 조 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 6월

연세대학교 대학원
의공학과
윤 진 희

윤진희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2009년 6월

감 사 의 글

대학원에 입학한지 벌써 3년이라는 시간이 흘러갔네요. 길지는 않았지만, 참 다사다난했던 시간이었던 것 같습니다. 입학했던 때가 엇그제 같은데 벌써 졸업이 코앞이라고 하니, 시간이 참 쏜살같이 달려간다는 말이 실감이 납니다.

우선 2년 반 동안 저를 지도해주신 정병조 교수님께 진심으로 감사의 말을 전해드립니다. 교수님께서 주신 많은 가르침, 잊지 않겠습니다. 그리고 심사를 맡아 지도해 주신 서중범 교수님과 의과대학 피부과학교실의 최응호 교수님께도 감사드립니다.

대학원 생활을 하며 매일 얼굴을 맞대고 지내온 우리 연구실 멤버들, 박학다식한 용진이형, 랩장으로 많은 일을 하시는 슬러거 영우형, 늘 내 편이 되어준 친구 동연이, 우리 연구실의 인재 태윤이, 함께한 시간이 짧아 더 친해지지 못해 아쉬운 예일이형 그리고 졸업하신 병관이형, 연항이형 까지 모두 감사드립니다. 또한, 제게 많은 도움을 주신 성필이형, 재영이형, 연식이형에게도 고마움을 전합니다. 같이 실험을 하며 고생한 동희야, 고맙다.

힘든 일이 있을 때마다 늘 기대 설 수 있는 내 친구들 충섭이, 승돈이, 승덕이, 대학 생활 많은 추억을 함께한 대욱이형, 정환이, 형기, 상현이에게도 모두 고맙다는 말을 전합니다.

마지막으로, 늘 걱정만 끼쳐드리는 아들에게 변함없는 지지와 사랑을 주신 부모님과 멀리 떨어져 있지만 마음만은 함께인 하나 뿐인 형에게 진심으로 감사의 말을 전하며 이 글을 마칠까 합니다.

2009년 6월

윤진희 올림

차 례

차례	i
그림 차례	ii
국문 요약	iii
제 1장 서론	1
제 2장 배경 이론	4
2.1. 조직과 혈액의 굴절계수 (Refractive index of tissue and blood)	4
2.2. 광 산란 감소 효과 (Optical Clearing Effect)	6
2.3. 광 특성 측정 (Optical Property Measurement)	9
2.4. Inverse Adding-Doubling	11
2.5. 초음파를 이용한 약물 전달 (Sonophoresis)	13
제 3장 시스템 및 실험 방법	14
3.1. 시료 준비 (Sample Preparation)	14
3.2. 미세 침 방법 (Micro-needling Method)	15
3.3. 초음파 (Ultrasound Device)	17
3.4. Beam Profile Intensity 측정	19
3.5. 광 특성 측정 시스템 (Optical Property Measurement System)	20
3.6. 교차 편광 영상 시스템 (Cross-Polarization Imaging System)	21
3.7. 광 산란 감소 효과의 정량적인 분석 방법 (Quantitative Evaluation Method of Optical Clearing Effect)	24
3.8. In-vivo 실험	26
제 4장 결과	27
제 5장 고찰	33
제 6장 결론	37
참고 문헌	38
영문 요약	43

그림 차례

그림 1. Glycerol 도포 1시간 경과 후 및 saline 도포 1시간 경과 후의 파장에 따른 (a) 광 투과도와 (b) 감쇠 산란 계수	6
그림 2. 문신 치료 전과 후의 이미지. (a) 치료 전, (b) 치료 후, (c) 치료 1개월 후 (lane 1 : 대조군, lane 2 : 레이저 치료, lane 3 : PPG-PEG mixture도포 후 레이저 치료)	7
그림 3. 설치류의 진피층에 대한 glycerol의 효과. (a) glycerol 도포 전, (b) glycerol 도포 5분경과 후, (c) saline 도포 5분경과 후, (d) 투과 스펙트럼	8
그림 4. (a) reflectance spectra와 (b) transmittance spectra 측정을 위한 Integrating sphere	9
그림 5. 파장에 따른 integrating sphere의 reflectance 분포	10
그림 6. 두 개의 integrating sphere를 사용할 때 M_R , M_T 를 계산하기 위한 측정	11
그림 7. IAD header 파일 예시	12
그림 8. (a) 미세 침 롤러와 (b) 생성된 극소 통로의 광학 현미경(X40) 영상 및 (c) 미세 침 롤러 적용 전과 (d) 후의 OCT 영상	15
그림 9. (a)초음파 발생 장치(좌)와 트랜스 듀서(우) 및 (b) 온도 측정을 위한 thermal coupler(좌)와 측정된 온도(우) 그래프	17
그림 10. Beam profile intensity 측정을 위한 시스템 구성	19
그림 11. 광 특성 측정을 위한 시스템. (a) 할로겐 광원, (b) double integrating sphere와 스펙트로미터	20
그림 12. (a) 영상 장치(좌)와 영상장치의 광원부(상), 2 nd 선형편광필터(하) 및 영상 시스템(우) (b) LED 환영 광원 영상과 조도분포도	21
그림 13. Ex-vivo 실험을 위해 설계된 system schematic	23
그림 14. (a) 대조군과 (b) 실험군의 modulation transfer function 그래프	24
그림 15. 95%의 glycerol 도포 후 (a) 0분, (b) 30분, (c) 60분, (d) 90분 경과 후 시간에 따른 광 산란 감소 효과	27
그림 16. Relative contrast graph (No-treated vs needled)	28
그림 17. 50%~90% glycerol 도포 전(좌)과 1시간 경과 후(우)의 beam profile intensity 그래프. (a)-(b) 50%, (c)-(d) 60%, (e)-(f) 70%, (g)-(h) 80%, (i)-(j) 90%	29
그림 18. 표준화된 감쇠 산란 계수 그래프	31
그림 19. 70%의 glycerol 도포 후, 실험군과 대조군의 (a) 0분, (b) 20분, (c) 40분, (d) 60분 경과 후의 광 산란 감소 효과 (MTFT)	32
그림 20. Relative contrast graph (needled vs needled + ultrasound)	32

그림 21. 실험군과 대조군의 상대적 광 산란 감소 효과의 평균 값	· · 33
그림 22. In-vivo mouse 실험. (a) 0분, (b) 20분 경과 후	· · · · · 34

국 문 요 약

생체 조직의 광 투과도 개선을 위한 광 산란 감소 물질의 피부 전달 향상에 대한 연구

빛을 이용하는 진단이나 치료 시, 피부 조직의 산란 특성에 의한 빛의 얕은 투과 깊이로 인해 그 효과에 한계가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 현재 광 산란 감소 물질(optical clearing agent)이나 물리적인 방법들을 이용하여 빛의 투과도를 향상시키기 위한 연구가 해외를 중심으로 활발히 진행되고 있다. Glycerol, glucose, polyethylene glycol (PEG), dimethyl sulfoxide (DMSO), oleic acid 같은 화학 물질들이 optical skin clearing에 이용되고 있고, microneedle, laser ablation, 압력을 이용한 mechanical devices 등이 광 투과도를 증가시키기 위해 또는, 광 산란 감소 물질의 경피 전달을 향상시키기 위해 사용되고 있다. 선행 연구를 통해 미세 침 롤러가 광 산란 감소 물질의 피부 전달을 향상시켜 광 산란 감소 효과를 증대시킴을 입증하였다. 본 연구에서는 광 산란 감소 효과를 향상시키기 위하여 광 산란 감소 물질의 피부 전달 시간을 단축시키고자 하였다. 이를 위하여 미세 침 롤러와 초음파를 동시에 적용하고, 그 효과를 입증하였다. 피부 흡수를 위한 효율적인 농도를 결정하여, 70%의 glycerol solution을 사용하였고, 미세 침 롤러로 처리한 ex-vivo porcine skin sample에 glycerol을 도포 한 후, 초음파를 적용하였다. 광 산란 감소 효과는 ex-vivo porcine skin sample 밑에 놓여진 modulation transfer function target 영상의 contrast를 계산하여 정량적으로 분석하였다. 또한, in-vivo 실험을 통하여 광 산란 감소 효과를 검증하였다.

핵심 되는 말 : 광 산란 감소 물질, 초음파, 미세 침 롤러, 광 투과도, 글리세롤

제 1 장 서 론

최근 피부 질환이나 미용 및 관리에 대한 관심이 높아지면서, 색소성 피부 질환이나 문신 등에 빛이나 레이저를 이용한 치료가 각광을 받고 있다. 그러나 빛이나 레이저를 이용하는 진단이나 치료 시 주된 문제점은 피부 조직의 산란 특성에 의하여 빛 또는 레이저가 생체 조직의 심부층까지 전달되지 못하는 데에 있다. 얇은 투과율로 인하여 광 치료 시 만족할만한 결과를 얻지 못하게 되고, 피부 심부까지 광을 전달하기 위하여 높은 파워를 사용하게 되며, 이에 따른 화상이나 물집 등의 부작용이 동반되기도 한다. 최근에 이러한 한계를 극복하고 피부 조직에 대한 광 투과율을 향상시키기 위하여, 화학 약품 (chemical agent)을 사용하여 생체 조직의 광 산란 감소 효과 (optical clearing effect)를 입증한 연구 결과들이 꾸준히 보고되고 있다. Glycerol, glucose, polyethylene glycerol (PEG), PEG:PPG mixture, dimethyl sulfoxide (DMSO), oleic acid 같은 광 산란 감소 물질 (optical clearing agent)들이 광 산란 감소 효과를 위해 연구에 사용되고 있다. 이러한 광 산란 감소 물질은 조직의 산란 특성을 감소시키고, 이로 인하여 조직의 광학 선명도 (optical clarity)를 증가시킨다. 광 산란 감소 효과는 조사된 빛 (collimated light)이 피부 조직의 심부층까지 전달되도록 하여, 다양한 광학적 진단 및 치료의 효율을 향상시킬 수 있다. 광 산란 감소의 기전 (optical clearing mechanism)은 아직까지 명확하게 밝혀지진 않았지만, 일반적으로 피부 조직 성분의 탈수 (dehydration), 조직 및 세포 사이의 액 (interstitial fluid)의 광 산란 감소 물질의 흡수로 인한 대체, 콜라겐의 구조 변화 (structural modification) 및 분리 (dissociation)로 알려져 있다. 이와 같은 기전들은 주로 피부 조직의 산란 입자들의 굴절 계수 (refractive index)를 일정하게 맞춰주는 역할을 한다. [1-4]

Vargas는 glycerol을 이용한 광 산란 감소 효과를 1999년에 보고하였고, in-vivo hamster 피부에 glycerol을 도포 한 후, 혈관으로부터의 향상된 도플러 신호를 검출하였다. [5, 6] Glycerol은 생체에 적합하고 미국 식품의약품안전청 (Food and Drug Administration; FDA)에 의해 안전성을 검증받은 화학 약품이다.

[7] Misbah는 인체에 무해한 광 산란 감소 물질 (PPG:PEG mixture)을 문신이 새겨진 환자의 피부에 도포한 후 ruby laser ($\lambda=694\text{nm}$)를 이용하여 치료하였을 때, 아무런 처치도 없이 레이저로 치료한 부위보다 그 효과가 뛰어나고 피부의 열 안정성 (thermal stability)이 높아지기 때문에, 높은 레이저의 출력 에너지를 필요로 하는 어두운 피부의 환자에게 유용할 것이라고 보고하였다. [8] 그러나, 광 산란 감소 물질은 피부 표면의 각질층 (stratum corneum)에 의해 충분히 진피층 (dermis layer)으로 흡수되지 못한다는 한계가 있기 때문에, 물리적인 혹은 기계적인 장비를 이용하여 광 산란 감소 물질의 투과도를 향상시킴으로써 피부 조직의 깊은 부위까지 광 산란 감소 물질을 전달시켜 광 산란 감소 효과를 향상시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. McNichols는 광 산란 감소 물질을 직접 진피층으로 주사하여 유발된 광 산란 감소 효과를 보여주었지만, 피부 조직의 피사와 흉터도 함께 나타남을 보고하였다. [9] O. Stump는 in-vivo hamster 피부에 대한 glycerol의 투과율을 증가시키기 위하여 sandpaper를 이용하여 각질층을 제거하였다. 그 결과 제거된 각질층을 통해 glycerol의 피부 전달이 증가되었고, 그에 따른 향상된 광 산란 감소 효과를 관찰하였다. [10] 또한, 980nm의 다이오드 레이저에 의해 피부 표면에 생성된 극소 통로 (micro-channel)들이 도포된 glycerol의 피부 전달을 촉진시키고, 그에 의해 1,290nm의 Optical Coherence Tomography (OCT)신호가 in-vivo 설치류 피부 (rodent skin)에서 42% 더 깊이 측정되었음을 증명하였다. [11] Xiangqun Xu는 광 산란 감소 물질의 피부 침투율을 향상시키기 위하여 초음파를 사용하였고, 광 산란 감소 효과 개선을 위한 초음파의 가능성을 확인하였다. [12, 13] 피부 조직에 초음파를 적용하면 cavitation, thermal, mechanical 효과가 유발되고 그에 의해 피부 속으로의 약물 침투율이 증가한다. [14, 15] 선행 연구에서는 glycerol의 피부 전달을 향상시키기 위하여 미세 침 롤러를 이용하였고, 그 결과 광 산란 감소 효과가 향상됨을 보고하였다. [16]

본 연구는 glycerol의 피부 전달을 향상시켜 광 투과율을 개선하기 위하여 미세 침 롤러와 초음파를 동시에 적용하는 방법을 제시하였다. 미세 침 롤러를 사용하여 돼지 피부 샘플 (ex-vivo porcine skin)표면에 인공적인 극소 통로를 생성하고, 70%의 glycerol을 준비된 샘플위에 도포한 후, 마지막으로 glycerol이 도포된

샘플에 초음파를 적용하였다. 광 산란 감소 효과는 샘플 아래에 놓인, 실험실에서 제작된 modulation transfer function target의 contrast 계산을 통해 정량적으로 평가하였다. 또한, ex-vivo 실험을 통해 얻은 결과를 바탕으로 in-vivo 실험을 진행하여 그 효과를 검증하였다. 극소 통로를 형성하기 위한 미세 침 롤러, 확산 전달에 효과적인 농도의 glycerol, 그리고 초음파를 이용함으로써 광 산란 감소 효과를 최대한 빠른 시간 안에 극대화 할 수 있을 것으로 그 결과를 예상하였다.

제 2 장 배경 이론

2.1 조직과 혈액의 굴절계수 (Refractive index of tissue and blood)

연조직 (soft tissue)은 섬유 조직 망 (network)으로 둘러싸인 땀땀하게 배열된 세포의 그룹으로 구성되어 있다. 미시적인 관점 (microscopic scale)에서의 조직의 성분들은 뚜렷한 경계를 갖고 있지 않기 때문에, 연속적인 구조로 합쳐져 있는 것처럼 보인다. 평균적인 조직의 계수 (average background index)는 세포질 (cytoplasm)과 간질액 (interstitial fluid)의 굴절 계수들 (refractive indices)의 평균에 따른 Gladstone & Dale의 법칙에 의해 정의된다. [17-20]

$$n_o = f_{cp}n_{cp} + (1 - f_{cp})n_{is}, \quad (1)$$

n_{cp} 는 세포질, n_{is} 는 간질액의 굴절계수를 각각 나타내며, f_{cp} 는 세포를 포함하고 있는 조직안의 액 (fluid)의 부피분율 (volume fraction)을 나타낸다. n_{cp} 와 n_{is} 의 값은 각각 1,367, 1,355이다. f_{cp} 는 대략 60%이고, 이는 수식 (1)로부터 $n_o = 1.362$ 라는 값을 구해낼 수 있다. 하나의 산란 입자 (a scattering particle)의 굴절계수는 평균 조직의 계수와 계수 변화량의 합으로 정의할 수 있다.

$$n_s = n_o + \langle \Delta n \rangle, \quad (2)$$

$$\langle \Delta n \rangle = f_f(n_f - n_{is}) + f_{nc}(n_{nc} - n_{cp}) + f_{or}(n_{or} - n_{cp}), \quad (3)$$

f , is , nc , cp , or 은 계수 변화에 주요한 영향을 끼치는 요인으로 섬유질 (fibres), 간질액, 핵 (nuclei), 세포질, 세포소기관 (organelles)을 각각 의미한다. 섬유질의

굴절계수는 약 1.47이고, 이는 주요 성분인 콜라겐의 55% 수화 (hydration)된 값과 일치하는 값이다. 포유류의 세포핵과 미토콘드리아 (mitochondria)나 리보솜 (ribosomes)같은 비슷한 농도의 단백질과 핵산을 포함하는 세포소기관들은 상대적으로 좁은 범위 내의(1.38-1.41) 굴절계수를 가지고 있다. [20] 콜라겐과 엘라스틴 (elastin) 섬유는 진피 (dermis)의 무지방 건조중량 (fat-free dry weight)의 약 70%, 심장의 약 45%, 근육이 아닌 내장기관의 약 2-3%를 구성하고 있다. [17] 그러므로 조직의 타입에 따라, $f_f = 0.02 - 0.7$ 의 값을, 그에 따라 $< \Delta n > = 0.035 - 0.09$ 의 값을 갖는다.

적혈구 세포질의 굴절계수는 헤모글로빈 액 (hemoglobin solution)과 경계한 세포에 의해 정의되고, 다음의 식으로부터 구할 수 있다. [21, 22]

$$n_{ec} = n_w + \beta c_{Hb}, \quad (4)$$

n_w 는 물의 굴절계수, c_{Hb} 는 h/100ml 에서의 헤모글로빈의 농도이고, β 는 $\lambda = 580-800\text{nm}$ 일 때, 0.001942의 값을 갖는다. [22] $m = n_s/n_0$ 는 감쇠 산란 계수 (reduced scattering coefficient)를 결정한다. 예를 들면, 산란 부도체구(scattering dielectric spheres[Mie scattering])의 간단한 단순분산(monodisperse) 모델에서, [23]

$$\mu'_s = 3.28\pi a^2 \rho_s \left(\frac{2\pi a}{\lambda} \right)^{0.37} (m-1)^{2.09}, \quad (5)$$

이고, a 는 구의 반지름, ρ_s 는 구의 부피 밀도(volume density)이다. Mie scattering 에서 g (anisotropy scattering factor) >0.9 , $5 < 2\pi a/\lambda < 50$, $1 < m < 1.1$ 이다. 식(5)로부터 산란 입자들과(scatterers) 주변 매개물(surrounding medium)의 굴절계수 매칭은 산란 계수를 상당히 낮출 수 있다. [24]

2.2 광 산란 감소 효과 (Optical Clearing Effect)

광을 이용하는 진단이나 치료 시, 생체 조직의 산란 특성 때문에 광이 피부 깊숙이 침투하지 못한다는 한계가 있다. 빛과 조직의 상호작용 (light-tissue interaction)에 의해 빛의 투과 깊이는 광을 이용한 치료의 결과에 큰 영향을 준다. 생체 조직에 대한 광 투과 깊이는 조직의 OSP (optical scattering property)에 의해 조절이 가능하고, 이는 HCA (hyperosmotic chemical agent)에 의해 감소될 수 있다. 광 산란 감소를 위해 사용되는 약물로는 glucose, mannitol, glycerol, polypropylene glycol (PPG), polyethylene glycerol (PEG), dimethyl sulfoxide (DMSO)등이 있으며, 그 중 glycerol은 뛰어난 광 산란 감소 효과를 보여주며, 가격이 저렴하고, 생체에 적합하여 약물이나 화장품에 첨가되고 있다.

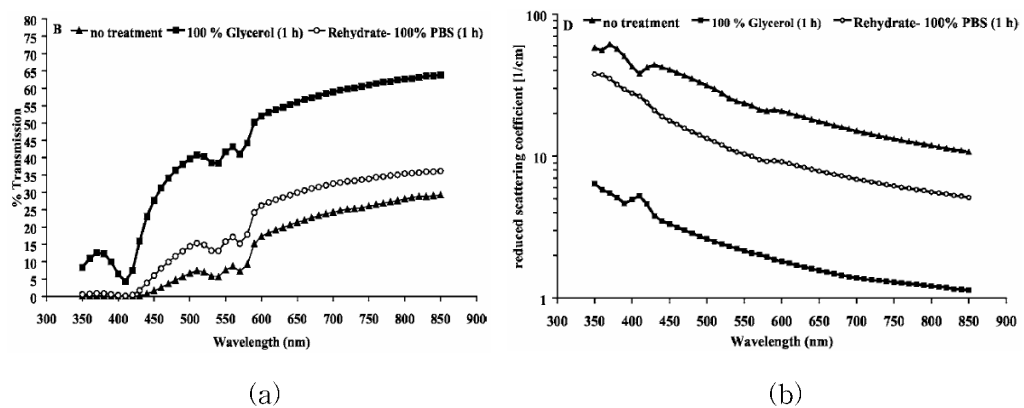


그림 1. Glycerol 도포 1시간 경과 후 및 saline 도포 1시간 경과 후의 파장에 따른 (a) 광 투과도와 (b) 감쇠 산란 계수

[출처 : Keesla Moulton et al., "Use of glycerol as an optical clearing agent for enhancing photonic transference and detection of Salmonella typhimurium through porcine skin", *Journal of Biomedical Optics*, 11(5), 054027 (2006)]

Glycerol과 같은 hyperosmotic agent가 피부에 도포됐을 경우, 광 투과도가 증가됨을 관찰할 수 있다. 이러한 광 산란 감소 효과 (optical clearing effect)는 레이저를 기반으로 하는 진단이나 치료와 밀접한 관계를 갖고 있다. 그림 1은 glycerol을 porcine skin에 도포 1시간 경과 후의 광 투과도와 감쇠 산란 계수를 보여주고 있다. 광 투과도는 확연히 증가하고, 감쇠 산란 계수도 눈에 띄게 감소함을 알 수 있다. 또한, 탈수 (dehydration)된 샘플에 다시 saline을 도포하여 rehydration 시켰을 경우, 1시간 경과 후 거의 원래 상태에 근접함을 확인할 수 있다. [25]

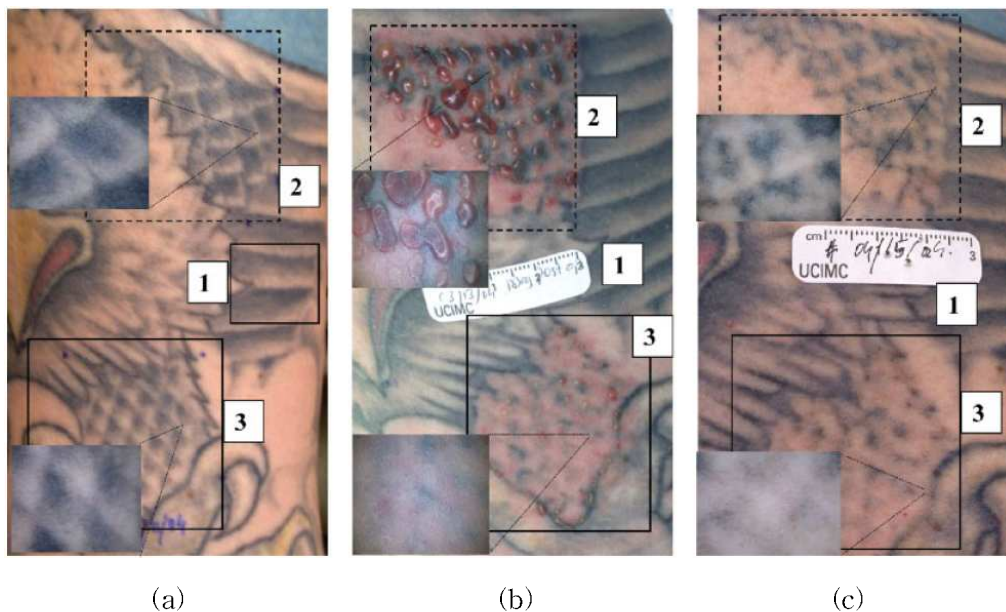


그림 2. 문신 치료 전과 후의 이미지. (a) 치료 전, (b) 치료 후, (c) 치료 1개월 후
(lane 1 : 대조군, lane 2 : 레이저 치료, lane 3 : PPG-PEG mixture와 레이저 치료)

[출처 : Misbah H. Khan et al., "Can topically applied optical clearing agents increase the epidermal damage threshold and enhance therapeutic efficacy?", *Lasers in Surgery and Medicine*, 35, 93-95 (2004)]

그림 2는 광 산란 감소 물질 (PPG:PEG mixture)도포 후 레이저 치료를 시행했을 경우와 아무런 처치 없이 레이저 치료를 했을 때의 결과의 차이를 보여주고 있다. 치료 직후 광 산란 감소 물질의 도포 없이 레이저 치료만을 시행한 부위에서 진물이 나오고 물질이 형성됨을 확인할 수 있는 반면 광 산란 감소 물질을 도포 한 부위에서는 이러한 부작용이 거의 없음을 알 수 있고, 치료 효과도 향상되었음을 확인할 수 있다. [8]

광 산란 감소 효과의 메카니즘은 콜라겐 조직의 변화나 조직 내의 부분적인 탈수와 수분이 glycerol에 의해 부분적 대체됨으로 인하여 콜라겐 ($n \sim 1.43$)과 주변의 매개물 (dermal medium) 사이의 굴절 계수의 불일치 정도를 감소시켜주는 것으로 알려져 있다.

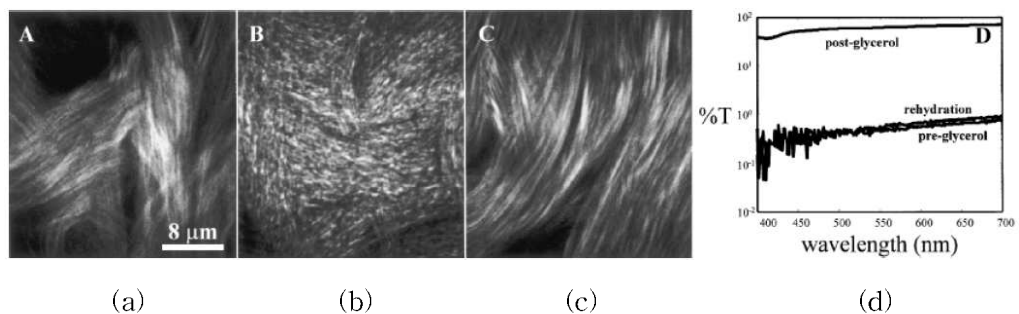


그림 3. 설치류의 진피층에 대한 glycerol의 효과. (a) glycerol 도포 전, (b) 도포 5 분경과 후, (c) saline 도포 5분경과 후, (d) 투과 스펙트럼

[출처 : Alvin T. Yeh et al., "Reversible Dissociation of Collagen in Tissues",
The Society for Investigative Dermatology, 121(6), 1332-1335 (2003)]

그림 3은 설치류의 진피층 (rodent dermis)에 glycerol을 도포하기 전과 후, 그리고 saline을 도포하였을 때의 콜라겐의 구조 변화를 MPM (multi-photon microscopy)로 촬영한 이미지이다. Glycerol 도포 후 5분 경과 후 콜라겐의 구조가 변하고, saline 도포 5분 경과 후 다시 원래의 상태로 돌아오는 것을 MPM 이미지와 광 투과 스펙트럼을 통해 확인할 수 있다. [4]

2.3 광 특성 측정 (Optical Property Measurement)

그림 4는 reflectance 와 transmittance spectra를 측정하기 위한 integrating sphere의 구조를 보여주고 있다. Integrating sphere의 내부는 전반사를 위한 물질로 코팅이 이루어져 있으며, 구 내부 전체에 균일하게 빛이 확산, 반사된다. Illumination port로 연결된 fiber를 통해 백색광 (white light)이 입사되며, 수직 반사되어 fiber로 빛이 돌아오는 것을 방지하기 위해 8° 의 기울기를 갖고 빛이 입사하게 된다. 입사된 빛은 sample port에 놓인 샘플에 조사되며, 샘플에 반사된 빛이 구 내부 전체에 균일하게 확산, 반사되어 reflectance spectra 측정을 위한 measurement port에 연결된 fiber를 통해 스펙트로미터로 들어가게 된다.

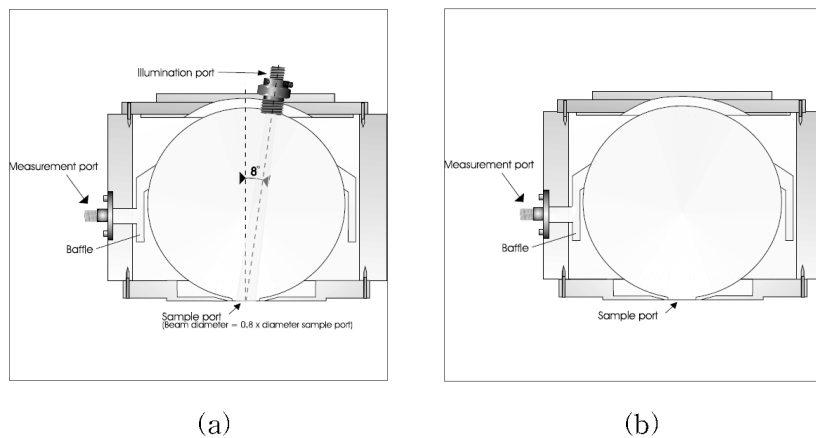


그림 4. (a) reflectance spectra 와 (b) transmittance spectra 측정을 위한 Integrating sphere

Illumination port를 통해 조사된 빛이 sample port에 놓인 샘플을 통과하게 되면, 빛은 transmittance spectra 측정을 위한 integrating sphere에서 다시 균일하게 확산, 반사되어 measurement port에 연결된 fiber를 통해 스펙트로미터로 들어가게 된다. Integrating sphere 내부의 반사율은 그림 5에 나타나 있다.

광원은 백색광의 할로겐 광원을 사용하였으며, reflectance와 transmittance

spectra 측정을 위한 스펙트로미터는 USB4000(Ocean optics, USA)을 사용하였다.

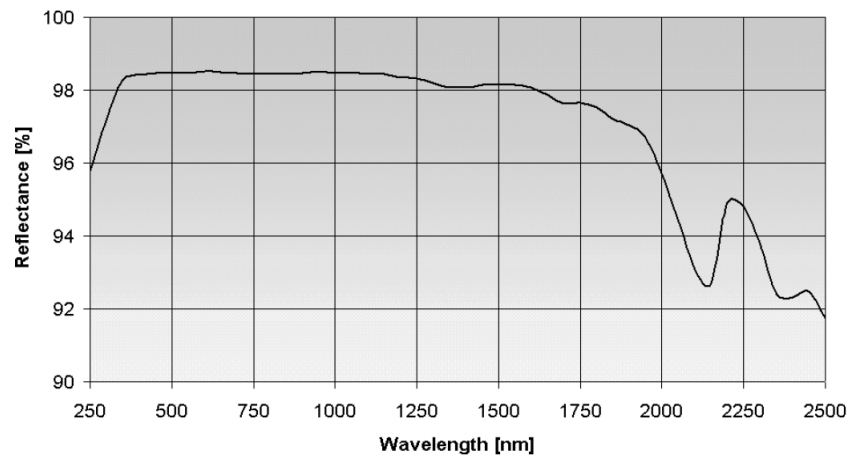


그림 5. 파장에 따른 Integrating sphere의 reflectance 분포

2.4 Inverse Adding-Doubling

Inverse adding-doubling은 매개물 (materials)의 광 산란, 흡수 특성을 일반화 시키기 위한 방법이다. 측정된 투과 및 반사 스펙트럼은 iad 프로그램을 통해 샘플의 광 특성으로 변환된다. 측정된 투과 및 반사 스펙트럼은 다음의 계산식에 의해 각각 M_R , M_T 값으로 계산된다.

$$M_R = r_{std} \cdot \frac{R_2(r_s^{direct}, r_s^{direct}, t_s, t_s) - R_2(0, 0, 0, 0)}{R_2(0, 0, 1, 1) - T_2(0, 0, 0, 0)} \quad (6)$$

$$M_T = \frac{T_2(r_s^{direct}, r_s, t_s^{direct}, t_s) - T_2(0, 0, 0, 0)}{T_2(0, 0, 1, 1) - T_2(0, 0, 0, 0)} \quad (7)$$

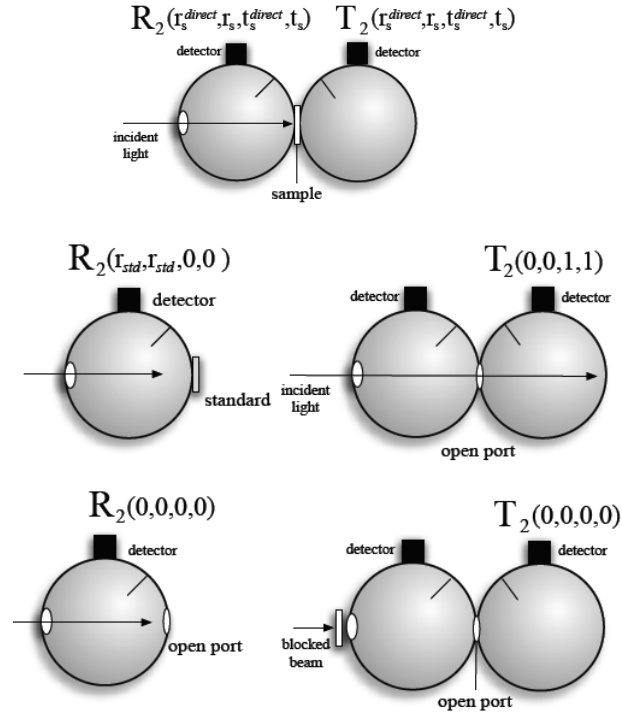


그림 6. 두 개의 integrating sphere를 사용할 때 M_R , M_T 를 계산하기 위한 측정

```

IAD1  # Must be first four characters

# Input Example with a single set of sphere coefficients
# The order of entries is important
# Anything after a '#' is ignored, blank lines are also ignored

1.34  # Index of refraction of the sample
1.50  # Index of refraction of the top and bottom slides
1.0   # [mm] Thickness of sample
1.0   # [mm] Thickness of slides
5.0   # [mm] Diameter of illumination beam
0.96  # Reflectance of the calibration standard

1     # Number of spheres used during each measurement

      # Properties of sphere used for reflectance measurements
203.2 # [mm] Sphere Diameter  (8 in * 25.4 mm/in)
25.4  # [mm] Sample Port Diameter
12.7  # [mm] Entrance Port Diameter
1.00  # [mm] Detector Port Diameter
0.96  # Reflectance of the sphere wall

      # Properties of sphere used for transmittance measurements
203.2 # [mm] Sphere Diameter  (8 in * 25.4 mm/in)
25.4  # [mm] Sample Port Diameter
12.7  # [mm] Entrance Port Diameter
1.00  # [mm] Detector Port Diameter
0.96  # Reflectance of the sphere wall

2     # Number of measurements, M_R, M_T

```

그림 7. IAD header 파일 예시

2.5 초음파를 이용한 약물 전달 (Sonophoresis)

경피 약물 전달 방법 (transdermal drug delivery)은 지속적인 약물의 투여가 가능하고, 안전하기 때문에, 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 약물의 경피 전달은 피부의 각질층에 방해받기 때문에 흡수가 느리다는 단점이 있고, 단순 확산에 의존하는 약물 전달은 낮은 분자량을 갖는 약물에 유리하기 때문에, 전달을 촉진시키기 위하여 화학투과촉진제 (chemical enhance)나 전류, 초음파 등이 사용된다.

초음파를 이용하는 약물 전달 (sonophoresis)은 피부를 교란시켜 약물의 흡수를 촉진시키거나, 초음파의 기계적 에너지 (mechanical energy)에 의해 피부를 가로질러 약물의 전달을 유도한다. 초음파를 이용한 약물의 각질층 투과는 세포막을 가로질러 통과하는 transcellular route와 세포 사이로 통과하는 intercellular route로 나뉘어 진다. 초음파를 이용한 약물 전달은 각질층이나 피부 조직의 손상이 거의 없고, 심부 투과성이 뛰어나다는 장점이 있다.

초음파를 이용한 약물 전달의 주 원리는 일반적으로 thermal과 non-thermal effect로 분류된다. Thermal effect는 기계적인 에너지 (vibrating pressure)가 피부 조직에서 열로 전환되고, 열에 의한 조직의 온도 상승은 약물 전달을 촉진하는 역할을 한다. 또 다른 원리는 cavitation/acoustic streaming effect등으로 알려져 있다. 기계적인 에너지에 의해 bubble이 생성, 진동, 파괴되며 이러한 현상을 cavitation이라 한다. 또한, 초음파는 전파하는 방향으로 acoustic radiation force (음향방사력)을 가하며, 이는 유체의 흐름 즉 acoustic streaming을 일으켜서 세포막에 대한 침투성을 증가시킬 수 있다.

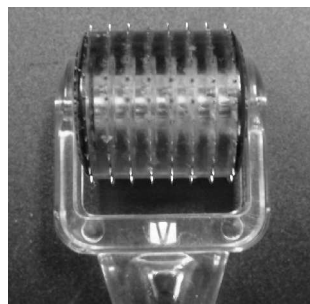
제 3 장 시스템 및 실험 방법

3.1 시료 준비 (Sample Preparation)

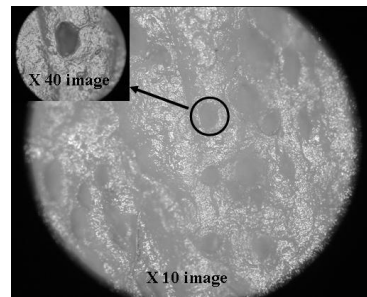
Ex-vivo 실험을 위하여 지방층이 제거된 돼지 피부 샘플 (porcine skin sample)을 준비하였고, 샘플들은 대조군과 실험군으로 분류하였다. 대조군의 평균 두께는 약 1.79mm이고, 미세 칩 롤러로만 처리하였다. 실험군은 약 1.82mm의 평균 두께를 갖고 있으며, 미세 칩 롤러와 초음파를 적용하였다. 두 그룹의 샘플을 실험실에서 제작된 modulation transfer function target (MTFT) 위에 놓고, 샘플 중앙 부분에 70% glycerol 을 0.1ml 도포하였다. 초음파의 트랜스듀서를 샘플 위에 없었을 경우 샘플 가장자리를 통해 밑으로 glycerol이 스며드는 것을 방지하기 위해, 샘플의 테두리는 테이핑처리를 하였다.

3.2 미세 침 방법 (Microneedling Method)

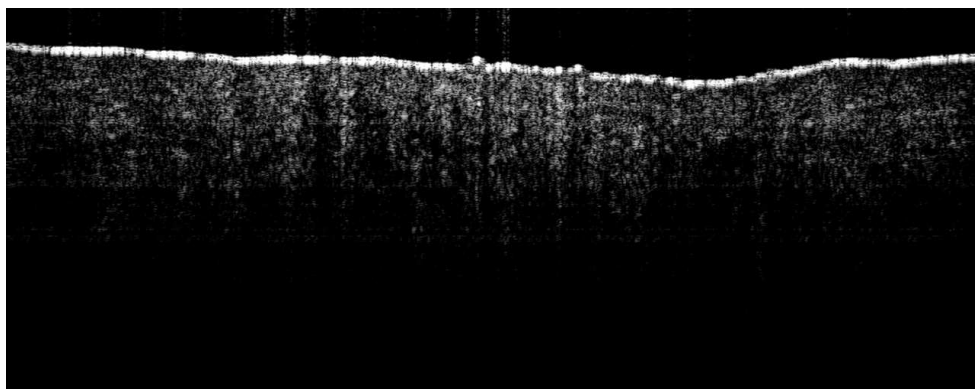
Glycerol의 피부 전달을 향상시키기 위하여, 본 실험에서는 그림 8(a)에 나타나 있는 미세 침 롤러를 사용하였다. 미세 침 롤러는 원기둥 형태의 롤러 (2cm X 2cm)에 한 열에 24개의 미세 침이 정렬되어 있으며, 이 열이 전체 원기둥에 8열로 배열되어 총 192개의 미세 침이 부착되어있다. 각각의 침은 70um의 직경과 500um의 높이를 갖고 있다. 일반적으로 피부의 관심 영역에 10~15회 롤링 시 약 240 channels/cm²의 극소 통로가 형성된다. 미세 침 롤러를 ex-vivo 돼지 피부 샘플에 적용한 후에 생성된 극소 통로는 광학 현미경과, OCT (Optical coherence tomography)로 촬영하였고, 그 영상은 그림 8(b), (c), (d)에 나타나 있다. 본 실험에서는 샘플의 가로, 세로 방향으로 50회씩 미세 침 롤러가 처리되었고, 롤링 시 샘플의 두께 변화를 방지하기 위해 최소한의 압력만을 가하였다.



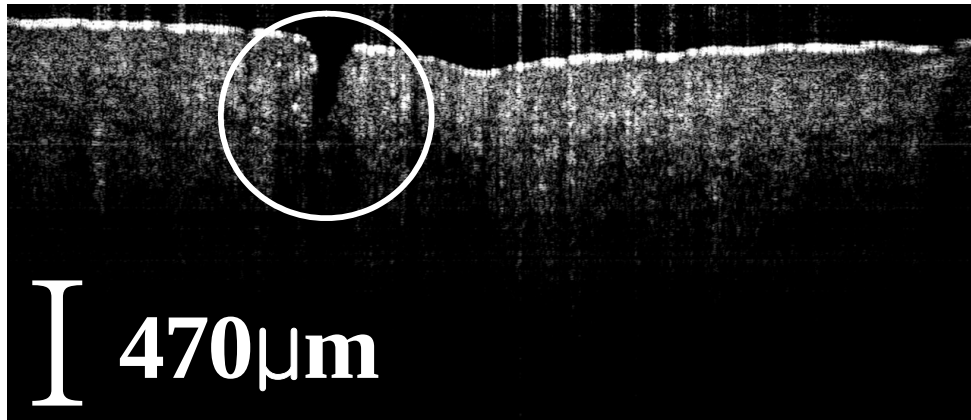
(a)



(b)



(c)



(d)

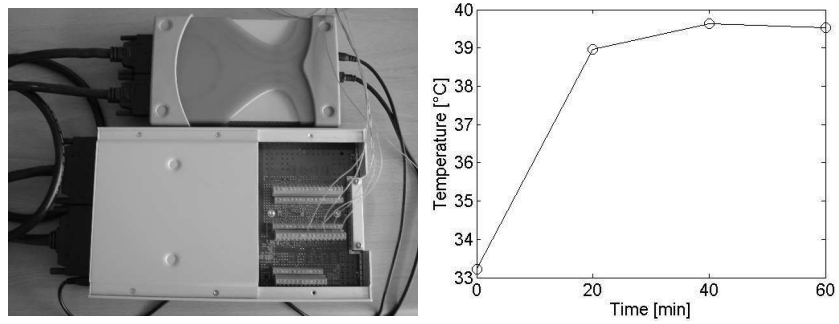
그림 8. (a) 미세 칩 롤러와 (b) 광학 현미경(X40)으로 촬영한 생성된 극소 통로
및 (c) 롤러 적용 전과 (d) 후의 OCT 영상

3.3 초음파 (Ultrasound Device)

본 연구에서는 실험군 시료에 도포된 glycerol의 피부 투과력을 향상시키기 위하여 초음파를 이용하였다. 그림 9(a)에 나타나 있는 초음파 장비(Daeyang, Korea)는 1MHz의 주파수를 갖고 있으며, 본 실험에서는 continuous mode를 사용하였다. 또한, 임상에 적용 시 피부의 온도가 상승하여 통증이나, 불쾌감을 주지 않도록 하기 위하여 트랜스듀서에 맞닿아 있는 시료 표면의 온도가 40℃를 넘지 않도록 파워를 조절하였으며, 평균 파워는 약 2W로 측정되었다. 샘플 표면의 온도는 thermal coupler(그림 9(b))로 5곳을 측정하여 평균값을 구하였다. 트랜스듀서를 준비된 샘플 위에 도포된 glycerol위에 놓고, 트랜스듀서와 도포된 glycerol은 충분히 접촉되어있는 상태로, 샘플과 트랜스듀서 사이에 미세한 간극을 유지한 상태로 실험을 진행하였다. 재연성 검증을 위하여 총 3회의 반복실험을 하였으며, 실험실의 온도는 24.5℃를 유지하였다.



(a)



(b)

그림 9. (a) 초음파 발생 장치(좌)와 트랜스듀서(우) 및 (b) 온도 측정을 위한 thermal coupler(좌)와 측정된 온도 그래프(우)

3.4 Beam Profile Intensity 측정

Glycerol의 농도에 따른 광 투과도를 확인하여, 50%~90%의 glycerol 중 피부 흡수에 가장 효율적인 농도를 구하기 위하여 beam profile intensity를 측정하기 위한 시스템을 그림 10과 같이 구성하였다. 샘플의 전면에 레이저를 조사함과 동시에 샘플의 후면에서 투과되는 광량의 정도를 측정하기 위한 방법으로, 미세 침을 적용한 ex-vivo 돼지 피부 샘플에 50%~90%의 glycerol을 0.1ml 도포하기 전과 도포 1시간 경과 후의 영상을 촬영하였다. 촬영된 영상은 matlab을 이용하여 분석하였다.

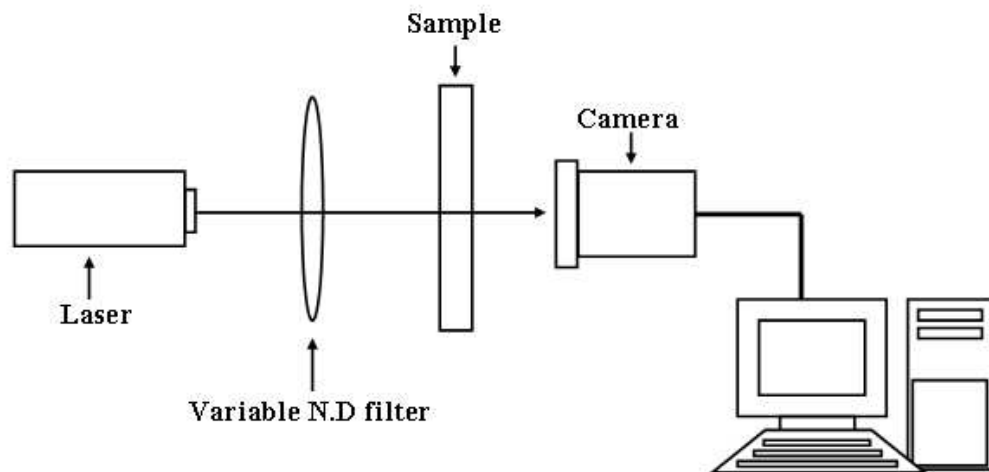


그림 10. Beam profile intensity 측정을 위한 시스템 구성

3.5 광 특성 측정 시스템 (Optical Property Measurement System)

준비된 돼지 피부 샘플의 감쇠 산란 계수 (reduced scattering coefficient)를 측정하기 위하여 double-integrating sphere 시스템을 설계하였다. 광 특성 측정 시스템은 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 glycerol 중 어느 농도의 glycerol이 ex-vivo 돼지 피부 샘플에서 경피 전달에 가장 유리한지를 결정하기 위해 설계하였다. 미세 칩 물리로만 처리한 시료에 glycerol을 도포하기 전과 도포 60분 경과 후의 투과, 반사 스펙트럼 (transmittance and reflection spectra)을 스펙트로미터를 이용하여 측정하였다. 광 특성 측정을 위한 전체 시스템은 그림 11과 같다. 측정된 결과는 Inverse-Adding Doubling program (Scott Prahl, Oregon Medical Center)으로 계산하였다.

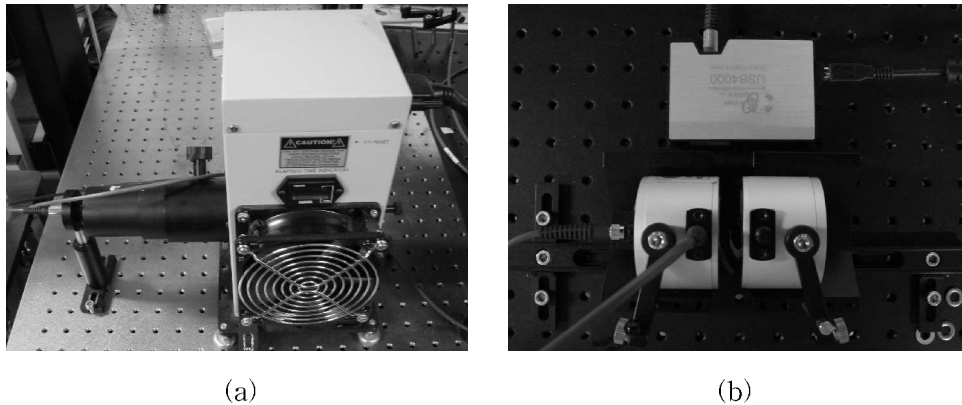


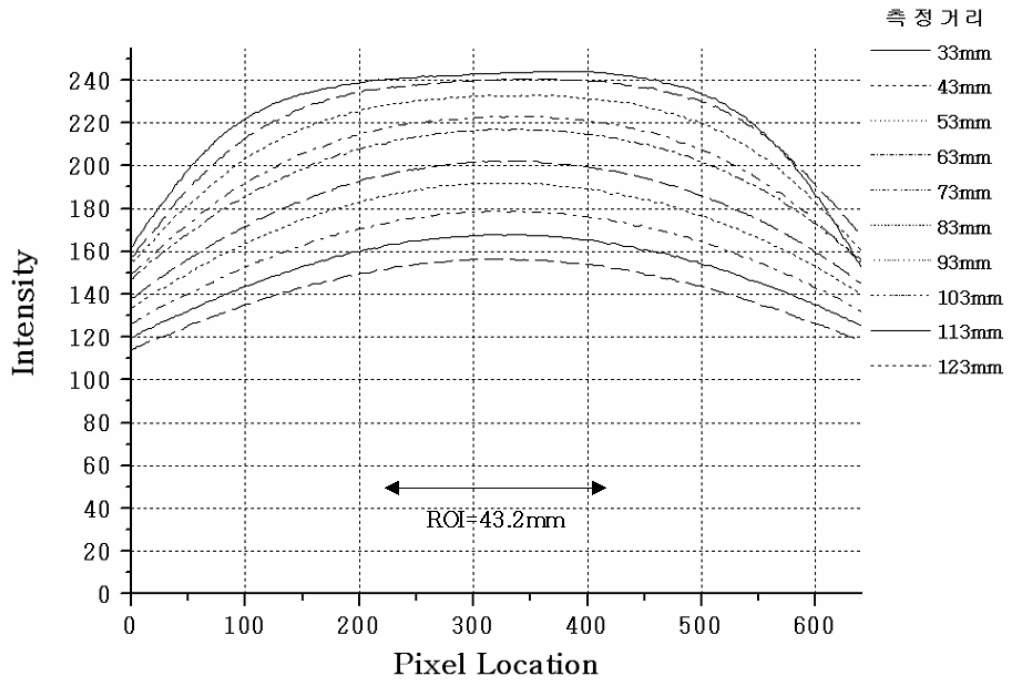
그림 11. 광 특성 측정을 위한 시스템. (a) 할로겐 광원, (b) double integrating sphere와 스펙트로미터

3.6 교차 편광 영상 시스템 (Cross-Polarization Imaging System)

그림 12(a)는 ex-vivo 돼지 피부 샘플의 diffuse reflectance 이미지를 얻기 위한 교차 편광 영상 시스템이다. 교차 편광 영상 시스템은 비간섭성(incoherent)의 빛을 1차 선형 편광판을 통해 입사시키고, 2차 편광판을 90° 교차시켜 피부 각 질층(stratum corneum)에서 발생하는 표면 반사에 의한 빛의 확산을 제거하여 진피층(dermis)의 영상만을 획득할 수 있다. 즉, 진피 유두층(papillary dermis)에 존재하는 콜라겐에 의해 산란되어 반사되는 빛을 이용하여 영상을 획득하는 것이다. 교차 편광 영상 시스템은 LED 환형 광원과 고정된 선형편광필터와 회전 가능한 선형편광필터, 그리고 CCD 카메라(Canon 350D, Canon, Japan)로 구성되어 있다. 그림 12(b)에 나타나있는 환형 광원은 총 16개의 백색 LED로 구성되어 있고, 2nd 선형편광필터는 $0^\circ \sim 90^\circ$ 의 선형적인 편광각을 제공한다. LED 환형 광원 설계 전 요구되는 시야와 측정거리 내에서 대상 표면에 균일한 조도분포를 보장하는 적정 LED 각(angle)을 결정하기 위한 실험이 진행되었고, 33mm부터 123mm의 측정거리 안에서 직경 43mm의 시야 내에서 상대적으로 균일하게 광원이 대상 표면에 분포하는 것을 알 수 있다. [26] 샘플의 영상은 10분 간격으로 총 60분 동안 획득하였으며, 본 연구의 전체 시스템은 그림 13에 나타내었다.



(a) 영상 장치(좌)와 영상장치의 광원부(상), 2nd 선형편광필터(하) 및 영상 시스템(우)



(b) LED 환영 광원과 조도분포도

그림 12. (a) 영상 장치(좌)와 영상장치의 광원부(상), 2nd 선형편광필터(하) 및 영상 시스템(우) (b) LED 환영 광원 영상과 조도분포도

[출처 Y. Bae and B. Jung, "Development of Multi-Purpose Variable Polarization Imaging System for Clinical Diagnosis," *J. Biomed. Eng. Res.* **28**, 265-270 (2007)]

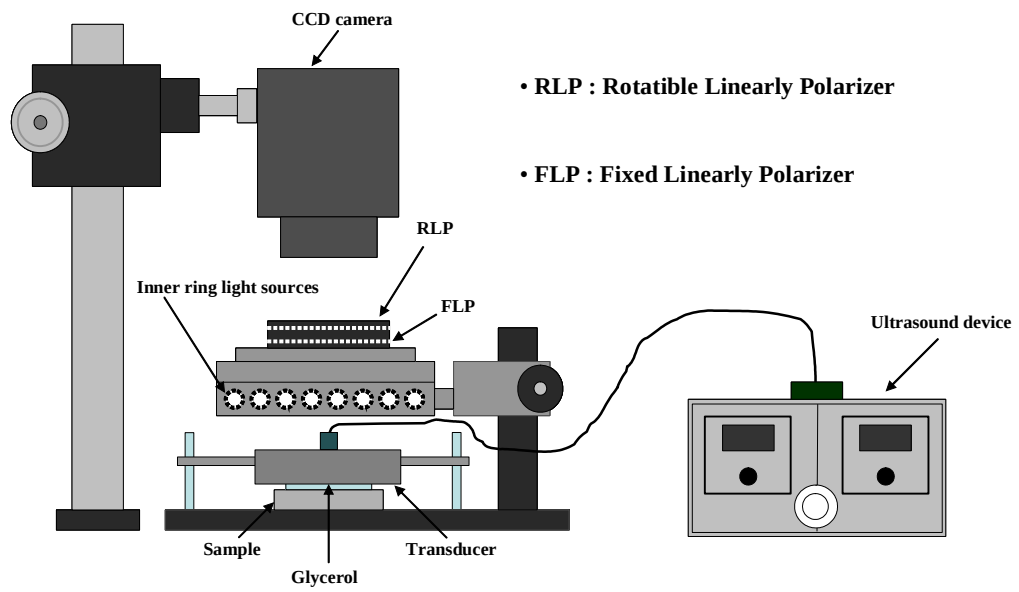


그림 13. Ex-vivo 실험을 위해 설계된 system schematic

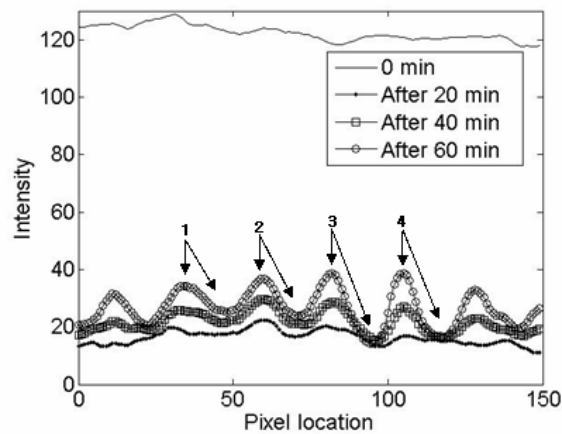
3.7 광 산란 감소 효과의 정량적인 분석 방법 (Quantitative Evaluation Method of Optical Skin Clearing Effect)

광 산란 감소 효과의 평가는 modulation transfer function (MTF)의 contrast와 relative contrast (RC)의 계산을 통하여 수행되었다. 돼지 피부 샘플의 관심영역의 150 X 150 pixel 을 추출하여 계산을 하였으며, contrast와 RC는 다음의 공식에 따라 계산되었다.

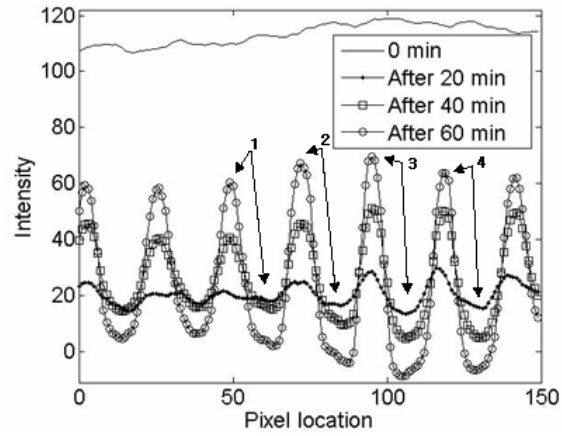
$$Contrast = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min}) \quad (6)$$

$$RC = (MC_t / MC_0) \quad (7)$$

MC_0 와 MC_t 는 각각 0분일 때, glycerol 도포 후 t 시간(min) 경과 후의 mean contrast를 나타낸다. MC는 다음과 같은 순서로 계산하였다. : 1) 추출된 관심 영역의 세로 pixels 값을 합산하고; 2) 그림 14에 나타난 네 지점에서의 MTF의 contrast의 평균값을 구한 후; 3) MTF에서 네 지점의 MC값을 계산한다.



(a)



(b)

그림 14. (a) 대조군과 (b) 실험군의 modulation transfer function 그래프

실험군과 대조군의 광 산란 감소 효과의 차이를 분석하기 위하여, 상대적인 광 산란 감소 효과 (relative optical clearing effect : %ROCE)를 계산하였다. $RC_{control}$ 과 RC_{test} 는 각각 대조군과 실험군의 RC 값을 나타낸다.

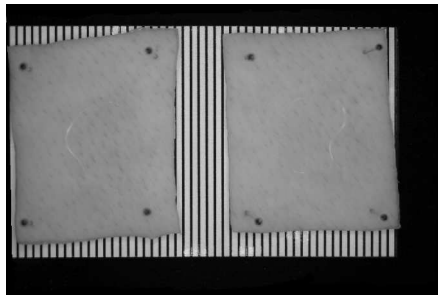
$$\%ROCE = [(RC_{test} - RC_{control}) / RC_{control}] \times 100 \quad (8)$$

3.8 In-vivo 실험

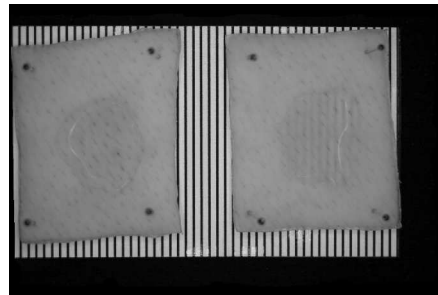
본 연구에서 제시된 방법의 임상 가능성을 시험하기 위하여 30~35g의 수컷 쥐(9주령)를 in-vivo 실험에 사용하였다. 실험은 마취를 한 상태로 진행하였고, 마취는 알파크로랄로즈 (Alpha , Sigma, 114mg/kg)를 사용하였다. 관심 영역은 대퇴부로 지정하여 제모 하였다. 관심 영역에 미세 칩을 가로, 세로 각 50회씩 적용하였고, 70%의 glycerol을 도포한 후 초음파를 적용, 20분 경과 후 영상을 획득하였다.

제 4 장 결 과

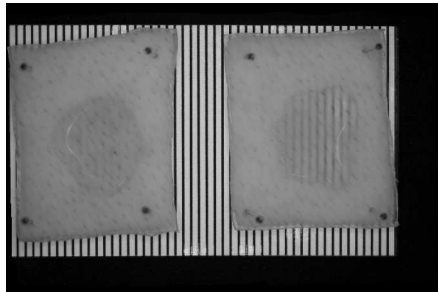
선행 실험으로 돼지 피부 샘플에 대한 광 산란 감소 물질의 경피 전달을 향상시키기 위한 미세 침 롤러의 효과를 검증하는 실험을 진행하였다. 샘플의 평균 두께는 약 1.82mm 이고, 실험군에 0.5mm의 미세 침을 가로, 세로, 양 대각선 방향으로 50회씩 적용한 후 95%의 glycerol을 0.1ml 도포하였다.



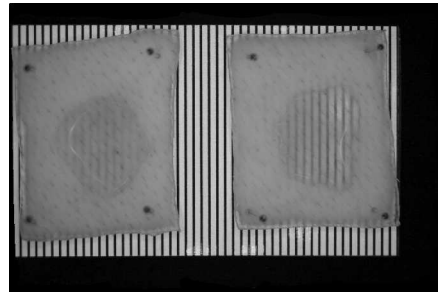
(a)



(b)



(c)



(d)

그림 15. 95%의 glycerol 도포 후 (a) 0분, (b) 30분, (c) 60분, (d) 90분 경과 후 시간에 따른 광 산란 감소 효과

그림 15는 glycerol 도포 후, 미세 침을 적용한 샘플(우)과 적용하지 않은 샘플(좌)의 시간에 따른 변화를 보여주고 있다. 시간이 경과함에 따라 대조군과 비교하여 실험군에서 더욱 효과적인 광 산란 감소 효과를 관찰 할 수 있다.

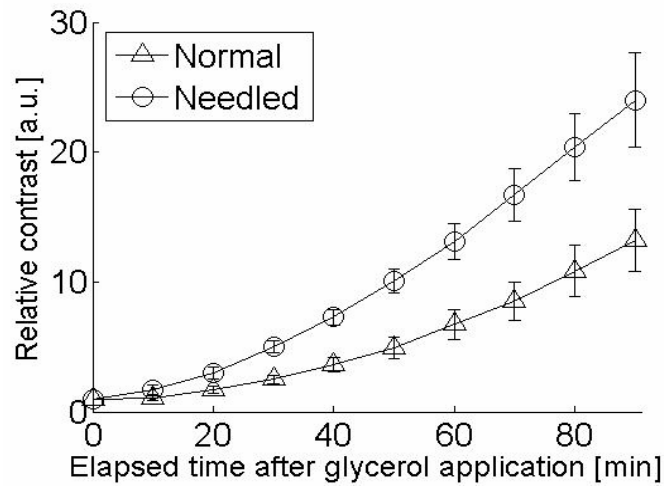
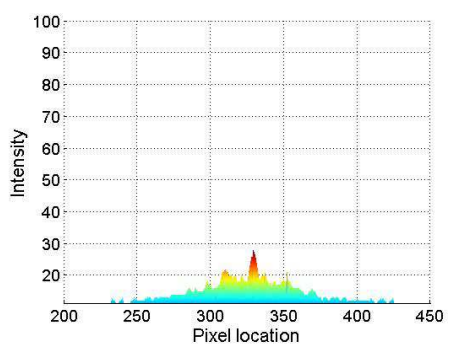


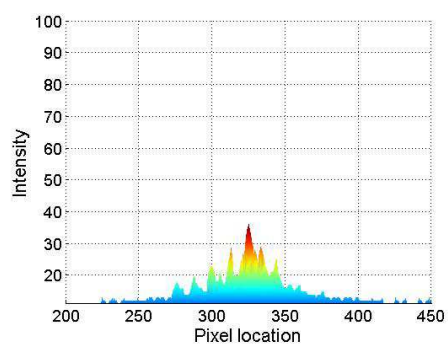
그림 16. Relative contrast graph (no treated vs needled)

그림 16은 그림 15의 양 샘플의 RC값을 계산하여 정량적으로 분석한 결과를 그래프로 분석하였다. Glycerol 도포 30, 60, 90분 경과 후 대조군은 2.5, 6.7, 13.2 배 RC값이 증가하였으며, 실험군은 5.0, 13.1, 24.0배 증가하였다.

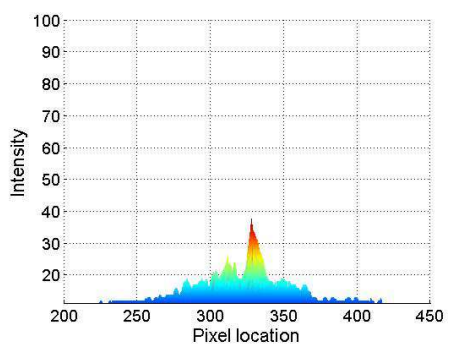
50%~90%의 농도를 갖는 glycerol 중 ex-vivo 돼지 피부 샘플에 대한 광 투과도 향상에 가장 효과적인 농도를 결정하기 위하여 glycerol 도포 전과 도포 1시간 경과 후에 beam profile intensity를 측정 한 후, MATLAB를 이용하여 그림 17에 그래프로 나타내었다. 70%의 glycerol이 ex-vivo 돼지 피부 샘플에 대한 광 투과도 향상에 가장 효과적임을 확인할 수 있다.



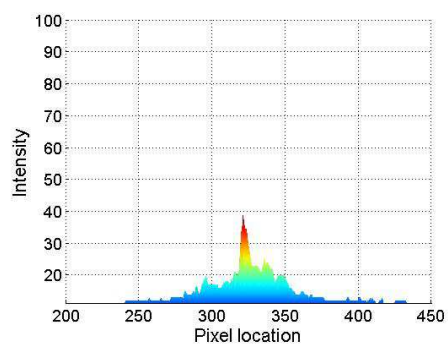
(a)



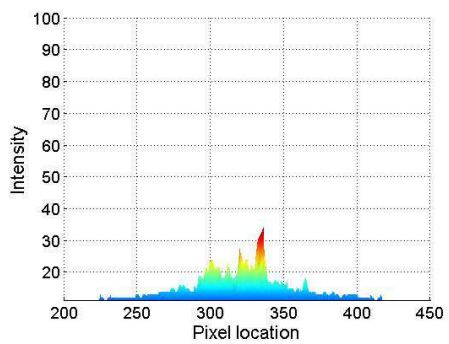
(b)



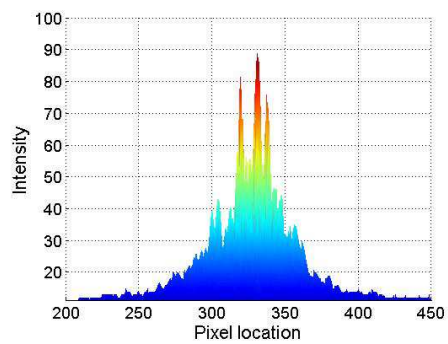
(c)



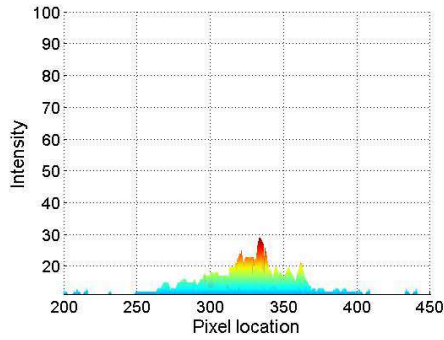
(d)



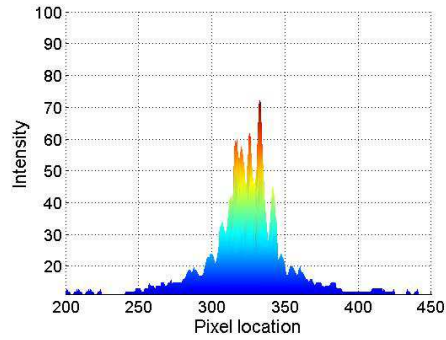
(e)



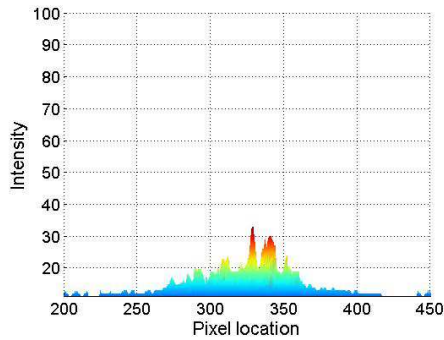
(f)



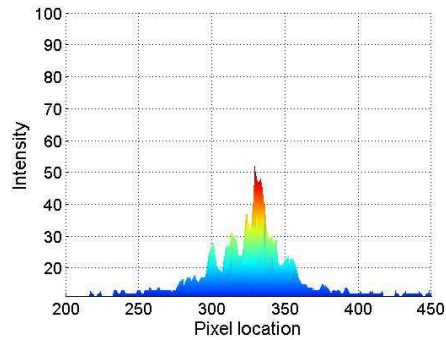
(g)



(h)



(i)



(j)

그림 17. 50%~90% glycerol 도포 전(좌)과 1시간 경과 후(우)의 beam profile intensity 그래프. (a)-(b) 50%, (c)-(d) 60%, (e)-(f) 70%, (g)-(h) 80%, (i)-(j) 90%

Glycerol의 농도 (50%~90%)에 따른 돼지 피부 샘플의 감쇠 산란 계수는 그림 18에 그래프로 나타내었다. Glycerol을 도포하기 전과 도포 60분 후에 각각 reflectance와 transmittance spectra를 측정하여 파장에 따른 스펙트럼 정보를 얻은 후, 657nm의 파장대에서의 감쇠 산란 계수를 Inverse Adding Doubling 프로그램을 통하여 계산하였다. 계산 결과는 표준화 (normalization)후 MATLAB을 이용하여 그래프로 나타내었다. Glycerol 도포 60분 경과 후, 표준화된 감쇠 산란 계수의 값들은 50%, 60%, 70%, 80%, 90%농도의 glycerol에서 각각 37.8%, 51.2%,

56.2%, 51.4%, 48%만큼 초기 측정값보다 감소하였다.

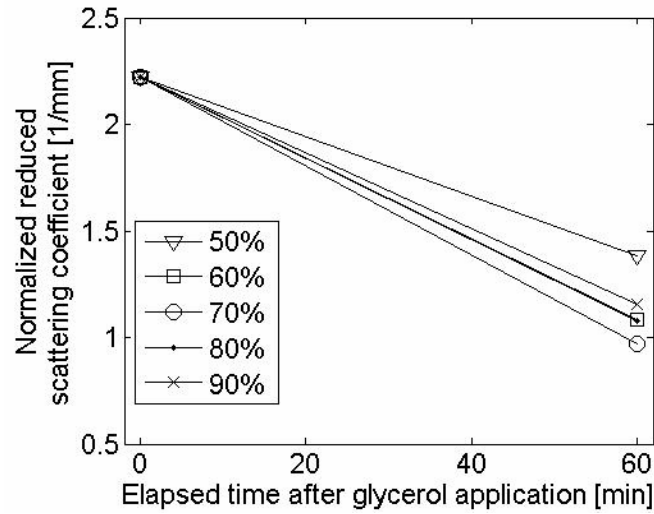


그림 18. 표준화된 감쇠 산란 계수 그래프

그림 19는 돼지 피부 샘플에 glycerol을 도포 한 후, 시간이 경과함에 따라 광 산란 감소 효과가 나타남을 보여주고 있다. 시간이 지남에 따라, 대조군과 실험군 샘플에서 모두 MTFT (modulation transfer function target)가 선명해짐을 확인할 수 있다. 그러나 실험군 샘플 (왼쪽)에 나타난 MTFT를 대조군 (오른쪽)에 나타난 MTFT와 비교하였을 때 같은 시간대에서 더욱 선명함을 관찰할 수 있다. 광 산란 감소 효과는 glycerol 도포 후, 실험군 샘플에서 약 40분 경과 후에 뚜렷하게 확인할 수 있다. 반면에, 대조군 샘플에서의 광 산란 감소 효과는 실험군과 비교하여 glycerol 도포 후 분 60분 경과 후에도 어느 정도 확인이 가능하다.

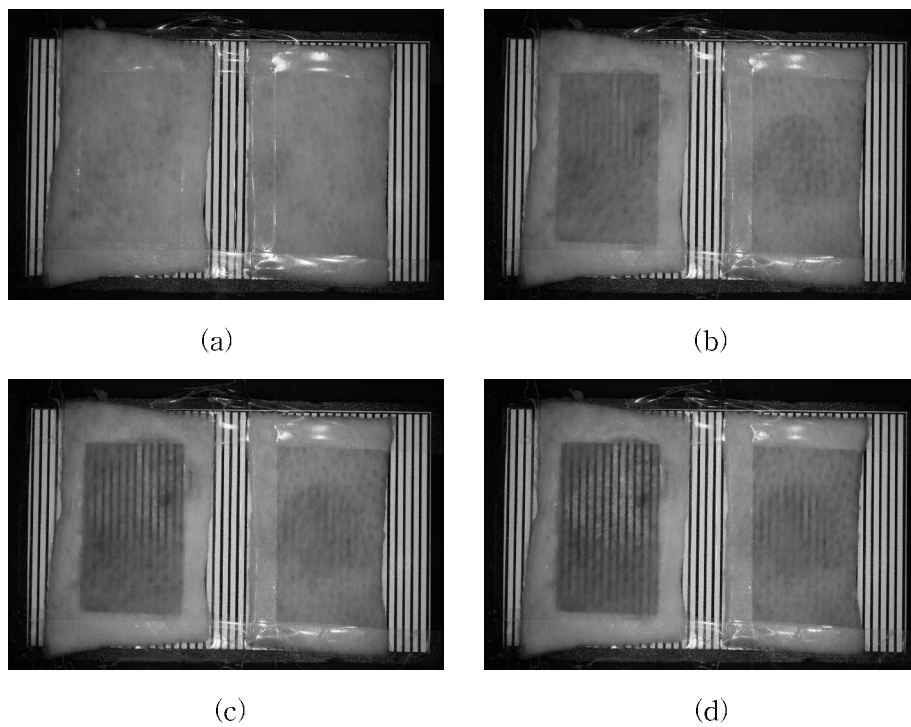


그림 19. 70%의 glycerol 도포 후, 실험군과 대조군의 (a) 0 분, (b) 20분, (c) 40 분, (d) 60분 경과 후의 광 산란 감소 효과 (MTFT)

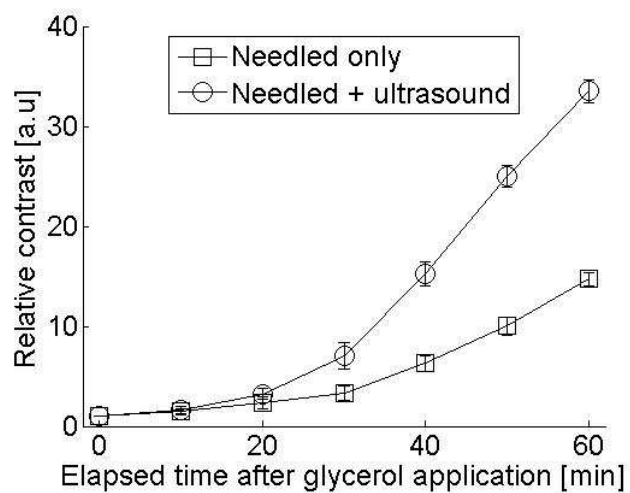


그림 20. Relative contrast graph (needled vs needled + ultrasound)

그림 20은 광 산란 감소 효과의 차이를 비교하기 위하여, 시간에 따른 대조군과 실험군의 RC값의 차이를 그래프로 나타내었다. RC 값은 양쪽의 샘플에서 시간이 지남에 따라 계속 증가하지만, 대조군보다 실험군의 상승폭이 더 크다는 것을 확인할 수 있다.

그림 21은 대조군과 실험군 샘플의 MTFT의 RC값을 계산하여 광 산란 감소 효과를 정량적으로 평가한 그래프를 보여주고 있다. 실험군 샘플의 RC값은 20분, 40분, 60분 경과 후 각각 3.3, 15.2, 33.6이고, 대조군 샘플의 값은 각각 2.3, 6.2, 14.7의 값을 나타내고 있다. %ROCE의 최대값은 glycerol 도포 후, 50분 경과 후에 관찰할 수 있다.

그림 22는 in-vivo mouse의 관심영역에 미세 침을 적용한 후 70%의 glycerol을 도포, 그리고 초음파를 20분 적용한 후의 영상이다. 초기에는 잘 보이지 않던 미세 혈관들이 비교적 선명히 보이는 것을 확인할 수 있다.

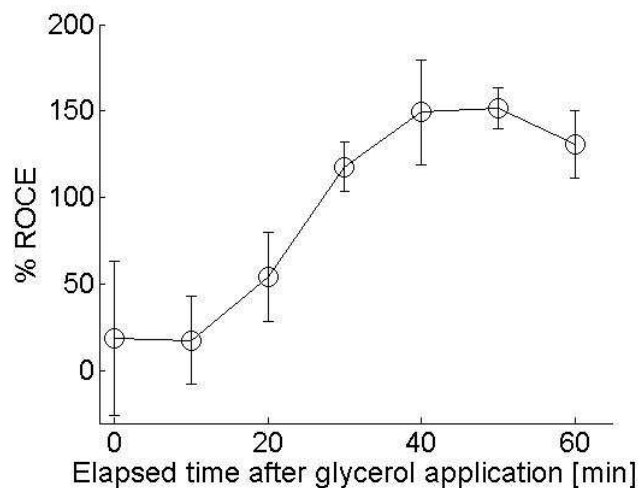
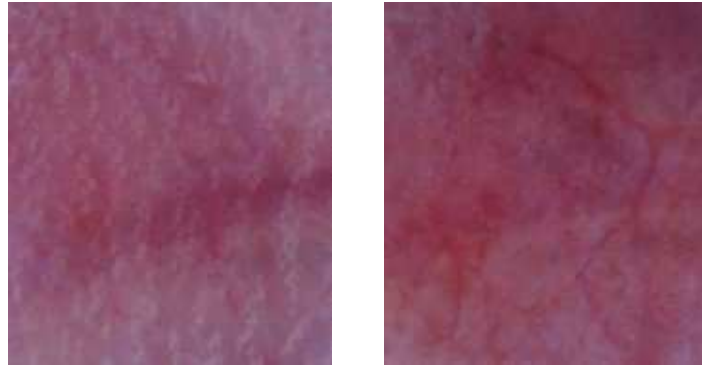


그림 21. 실험군과 대조군의 상대적 광 산란 감소 효과의 평균 값



(a)

(b)

그림 22. In-vivo mouse 실험. (a) 0 분, (b) 20분 경과 후

제 5 장 고 찰

생체 조직에 대한 빛의 투과 깊이를 증가시키기 위하여 기계적인 장치, 물리적인 방법, 화학적인 약품 등을 사용한 많은 연구들이 진행되고 있다. 현재 널리 이용되고 있는 방법은 미세 침, sand paper, 초음파, laser ablation, photo-thermal 등이 있다. [10-12, 16, 27, 28, 29] 이러한 방법들로 빛의 투과 깊이를 향상시키는데에는 효과가 있지만, 여전히 광 산란 감소 효과를 나타내는 시간이 길다는 문제점이 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여, 본 연구에서는 glycerol의 경피 전달을 더욱 가속화 시켜, 광 산란 감소 효과를 최대한 빠른 시간 안에 낼 수 있도록 하기 위해 미세 침 방법과 초음파를 동시에 적용하는 방법을 제안하였다. 피부 표면에 극소 통로를 형성하기 위하여 laser ablation을 이용하는 방법도 있으나, 레이저 장비는 고가이며 극소 통로를 형성하는데 시간이 상대적으로 오래 걸리는 단점을 갖고 있다. 반면에, 미세 침 물러는 다양한 크기를 갖고 있으며, 짧은 시간 내에 피부 표면에 손쉽게 극소 통로 (micro-channels)를 형성할 수 있다, 그리고 가격이 저렴하며, 통증이 거의 없다는 장점이 있다. 또한, Microfabricated microneedle에 의한 약물의 경피 전달은 아무런 처치도 하지 않은 피부에서의 단순 확산에 의한 경피 전달보다 약 10,000배 더 효율적이라는 연구 결과가 보고되어 있다. [30] 그리고, 초음파를 이용하여 다양한 약물의 경피 전달을 효율적으로 향상시켰다는 많은 연구 결과가 보고되었다. [14, 15, 31, 32, 33, 34] 그러나 경피 전달을 유발하는 초음파의 메카니즘은 완벽히 밝혀지지 않는다고, 현재 thermal과 non-thermal의 두 개의 특성으로 분류되는 것이 일반적이다. [14, 15, 32, 35] 초음파의 thermal 메카니즘은 vibrating pressure에 의한 waves에 의해 에너지가 전달되는 것으로부터 유도된다. 경피 전달에서 이러한 에너지는 피부에 흡수되고, 이는 피부의 온도 상승으로 이어진다. Non-thermal 메카니즘은 cavitation, acoustic streaming effect 등으로 알려져 있다. Pressure waves는 수백만의 microscopic bubble (cavities)을 형성하며, 생성된 bubble은 팽창, 진동 혹은, 강력하게 피부 안쪽으로 파열하게 되고, 이러한 cavitation과 acoustic streaming에 의

해 약물의 경피 전달을 촉진시킨다. 본 연구에서는 피부 조직에 어떠한 손상도 없을 정도의 열을 적용하기 위하여, 돼지 피부 조직의 표면 온도가 40℃를 넘지 않도록 초음파 장비의 파워를 조절하였으며, 온도는 thermal coupler를 이용하여 샘플의 5군데에서 표면 온도를 측정, 평균값을 계산하였다. 그러므로 본 실험에서는 초음파의 non-thermal 메커니즘이 glycerol의 경피 전달에 주요한 요인이라고 예상할 수 있다.

선행 연구의 결과인 그림 15는 미세 침을 적용한 샘플과 적용하지 않은 샘플에 95%의 glycerol을 도포 한 후 시간의 경과에 따른 광 산란 감소 효과를 보여주고 있다. 30분 경과 후 실험군에서 광 산란 감소 효과를 관찰 할 수 있고, 시간이 경과함에 따라 더욱 확실히 관찰 할 수 있다. 그러나 대조군에서는 실험군과 비교하여 동 시간대에 광 산란 감소 효과가 미미함을 알 수 있다. 이는 미세 침에 의해 생성된 샘플 표면의 극소 통로에 의해 glycerol의 피부 전달이 향상했음을 의미한다.

그림 16은 그림 15의 결과를 정량적으로 그래프로 분석한 결과를 보여주고 있다. 시간의 경과에 따라 양 샘플의 RC 값의 차이가 커짐을 확인할 수 있다. 30분 경과 후, 실험군의 RC값은 대조군의 약 두 배임을 확인할 수 있다.

하지만 고농도의 glycerol용액은 점도가 높기 때문에 피부 흡수에 영향을 줄 수 있고, 이는 glycerol의 경피 전달에 영향을 끼쳐 광 산란 감소 효과의 정도에 영향을 줄 수 있기 때문에, beam profile intensity와 광 특성 측정을 통하여 경피 전달에 적합한 농도를 결정하였다. 선행 연구에서 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 glycerol 중 70%의 glycerol 광 투과에 가장 효과적임을 보여준바 있다.[36] 그림 17과 18은 70%의 glycerol 용액이 ex-vivo 돼지 피부 샘플에서의 광 산란 감소 효과에 가장 효율적이라는 결과를 나타내고 있다. 70%의 glycerol 도포 60분 경과 후, 표준화된 감소 산란 계수 (normalized reduced scattering coefficient)의 값은 초기 상태와 비교하였을 때 약 56.2%가 감소하였다. 조직의 산란 특성은 피부 조직에 대한 광 투과도에 직접적인 영향을 미치므로, 샘플의 산란 계수의 감소는 피부 조직에 대한 광 투과도를 향상시킴을 알 수 있다.

그림 19는 돼지 피부 조직 샘플 밑에 놓인 MTFT의 시각화 정도에 따른 광 산

란 감소 효과의 차이를 보여주고 있다. 실험군에서의 광 산란 감소 효과는 glycerol 도포 20분 경과 후 확인할 수 있으며, 40분 경과 후에는 더욱 확실하게 광 산란 감소 효과를 관찰할 수 있다. 그러나 대조군에서는 실험군과 비교하였을 때, 같은 시간대에서 광 산란 감소 효과를 관찰하기 어렵다. 이러한 결과를 통해 미세 침 롤러에 의해 형성된 극소 통로가 glycerol의 경피 전달을 향상시키고, 초음파에 의해 glycerol의 경피 전달이 가속화되어 광 산란 감소 효과가 빠른 시간 안에 나타났음을 예상할 수 있다.

그림 19에 나타난 MTFT의 contrast를 계산하여, glycerol 도포 후 시간의 경과에 따른 광 산란 감소 효과를 정량적으로 평가하여 그림 20에 나타내었다. Glycerol 도포 20분 경과 후, 실험군과 대조군의 광 산란 감소 효과의 차이가 관찰되고, 광 산란 감소 효과의 차이는 시간이 경과함에 따라 점차 증가함을 확인할 수 있다. 실험군에서의 광 산란 감소 효과는 대조군보다 뛰어나고, glycerol 도포 60분 경과 후 실험군의 RC값은 대조군보다 약 2.3배 크다.

그림 21은 실험군과 대조군의 광 산란 감소 효과의 차이를 보여주고 있다. %ROCE는 glycerol 도포 10분 경과 후 점차 증가하기 시작하고, 50분 경과 후 대조군과 비교하였을 때, 실험군에서 약 152% 광 산란 감소 효과가 향상되었음을 알 수 있다. Glycerol을 도포한 후 50분이 지나면, 실험군에서의 RC값이 증가하지만 대조군의 RC값의 증가폭이 더 크기 때문에 %ROCE는 감소하기 시작한다. 위 그래프의 error bar는 준비된 돼지 피부 샘플 조직의 두께와, 지방층 제거의 균일함 그리고 미세 침 롤러에 의해 생성된 극소 통로 (micro-channels)의 수에 의해 발생된 오차로 예상된다.

Ex-vivo 실험의 결과를 in-vivo 마우스 실험을 통하여 검증한 결과는 그림 22에 나타나 있다. 아무런 처치도 하지 않은 상태에서는 혈관을 관찰하기 어렵고, glycerol만을 도포 한 후에도 glycerol이 마우스 피부 안으로 침투하지 못하여 혈관을 육안으로 확인하기가 힘들다. 그러나 미세 침 방법과 초음파를 적용하였을 경우, 약 20분 경과 후에 미세 혈관들이 비교적 뚜렷하게 관찰됨을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 레이저 임상 진단이나 색소성 피부 질환의 치료 특히, 동양인 같이 높은 레이저 파워를 요구하고, 피부 질환의 치료 효과가 떨어지는 환

자에게 적용 시 생체 적합한 광 산란 감소 물질이 적용된다면, 비교적 빠른 시간 내에 부작용이 적은 치료가 가능하고, 그 효과가 상당히 증대될 것으로 예상된다.

본 연구에서는 0.5mm의 미세 침 롤러를 사용하였지만, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2.2mm 등의 다양한 높이를 갖는 미세 침 롤러가 이용 가능하다. 다양한 미세 침 롤러를 사용한다면, 미세 침의 높이에 따라 형성되는 극소 통로의 깊이가 달라지기 때문에, 동일한 실험에 적용 시 광 산란 감소 효과의 차이를 보일 것으로 예상된다.

또한, ex-vivo 실험 시, 시간에 따른 샘플 조직의 탈수 (dehydration)가 실험의 결과에 영향을 줄 것으로 예상된다. 선행 연구에서 ex-vivo 돼지 피부 조직 샘플 표면의 평균 수분 함유량은 60분 경과 후 약 18.7%, 90분 경과 후, 약 21% 감소를 확인하였다. 하지만 동일한 조건에서 반복 실험이 진행되었기 때문에, 위의 요인은 데이터 고려하지 않고 데이터를 분석하였다.

향후 연구에서는 다른 종류의 광 산란 감소 물질을 이용하여 광 투과도를 향상시키는 실험과, 초음파의 파라미터에 따른 광 산란 감소 효과의 차이를 비교 또한, 동물 문신 모델을 개발하여 전 임상 실험을 진행 할 것이다.

제 6 장 결 론

본 연구는 광 산란 감소 물질을 이용한 광 투과도를 향상시키기 위하여, 초음파와 미세 침을 동시에 적용하는 방법을 제시하였고, 이로 인하여 광 산란 감소 물질의 경피 전달력이 크게 향상되어 기존 연구와 비교하였을 때, 광 산란 감소 효과를 나타내는 시간이 단축되어 그 효과가 뛰어난 것을 정량적으로 입증하였다. 또한, 본 실험의 결과를 바탕으로 향후 레이저를 이용한 피부 임상 치료에 적용 시, 치료 효과를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다.

참고문헌

- [1] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, A. A. Korobko, E. A. Zubkova, V. V. Tuchin, I. Yaroslavsky, and G. B. Altshuler, "Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin," *J. Biomed. Opt.* **13**(2), 021102 (2008).
- [2] C. G. Rylander, O. F. Stumpp, T. E. Milner, N. J. Kemp, J. M. Mendenhall, K. R. Diller, and A. J. Welch, "Dehydration mechanism of optical clearing in tissue," *J. Biomed. Opt.* **11**(4), 041117 (2006).
- [3] A. T. Yeh and J. Hirshburg, "Molecular interactions of exogenous chemical agents with collagen-implications for tissue optical clearing," *J. Biomed. Opt.* **11**(1), 014003 (2006).
- [4] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, "Reversible dissociation of collagen in tissues," *J. Invest. Dermatol.* **121**(6), 1332-1335 (2003).
- [5] G. Vargas, E. K. Chan, J. K. Barton, H. G. Rylander III, and A. J. Welch, "Use of an agent to reduce scattering in skin," *Lasers Surg. Med.* **24**, 133-141 (1999).
- [6] G. Vargas, A. Readinger, S. S. Dozier, and A. J. Welch, "Morphological Changes in Blood Vessels Produced by Hyperosmotic Agents and Measured by Optical Coherence Tomography," *Photochem. Photobiol.* **77**(5), 541-549 (2003).
- [7] J. Jiang, M. Boese, P. Turner, and R. K. Wang, "Penetration kinetics of dimethyl sulfoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging," *J. Biomed. Opt.* **13**(2), 021105 (2008).
- [8] M. H. Khan, S. Chess, B. Choi, K. M. Kelly, J. S. Nelson, "Can topically applied

- optical clearing agents increase the epidermal damage threshold and enhance therapeutic efficacy?," *Lasers Surg. Med.* **25**(2), 93-95 (2004).
- [9] R. J. McNichols, M. A. Fox, A. Gowda, S. Tuya, B. Bell, and M. Motamedi, "Temporary Dermal Scatter Reduction: Quantitative Assessment and Implications for Improved Laser Tattoo Removal," *Lasers Surg. Med.* **36**, 289-296 (2005).
- [10] O. Stumpp, B. Chen, and A. J. Welch, "Using sandpaper for noninvasive transdermal optical skin clearing agent delivery," *J. Biomed. Opt.* **11**(4), 041118 (2006).
- [11] O. F. Stumpp, A. J. Welch, T. E. Milner, and J. Neev, "Enhancement of Transepidermal Skin Clearing Agent Delivery Using a 980 nm Diode Laser," *Lasers Surg. Med.* **37**, 278-285 (2005).
- [12] X. Xu and Q. Zhu, "Feasibility of Sonophoretic Delivery for Effective Skin Optical Clearing," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **55**(4), 1432-1437 (2008).
- [13] X. Xu and Q. Zhu, "Sonophoretic delivery for contrast and depth improvement in skin optical coherence tomography," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **14**(1), 56-61 (2008).
- [14] I. Lavon and J. Kost, "Ultrasound and transdermal drug delivery," *Drug Discov. Today* **9**(15), 670-676 (2004).
- [15] S. Mitragotri, D. A. Edwards, D. Blankschtein, and R. Langer, "A mechanistic study of ultrasonically enhanced transdermal drug delivery," *J. Pharm. Sci.* **84**, 697-706 (1995).
- [16] J. Yoon, T. Son, E. H. Choi, B. Choi, J. S. Nelson and B. Jung, "Enhancement of optical skin clearing efficacy using a microneedle roller," *J. Biomed. Opt.* **13**(2), 021103 (2008).
- [17] M. Schmitt and G. Kumar, "Optical scattering properties of soft tissue : a discrete particle model," *Appl. Opt.* **37**, 2788-2797 (1988).
- [18] V. V. Tuchin, "Tissue optics : Light Scattering Methods and Instruments

- for Medical Diagnosis," *WA:SPIE Optical Engineering Press*, TT38 (2000).
- [19] N. G. Khlebtsov, I. L. Maksimova, V. V. Tuchin, and L. Wang, "Introduction to light scattering by biological objects : Handbook of Optical Biomedical Diagnostics vol PM107," chapter 1, 31-167 (2002).
- [20] R. Drezek, A. Dunn, and R. Richards-Kortum, "Light scattering from cells : finite-difference time-domain simulations and goniometric measurement," *Appl. Opt.* **38**, 3651-3661 (1999).
- [21] R. Barer, K. F. A Ross, and S. Tkaczyk, "Refractometry of living cells," *Nature*, **171**, 720-724 (1953).
- [22] A. Roggan, M. Friebel, K Dorschel, A. Hahn, and G. Mueller, "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500nm," *J. Biomed. Opt.* **4**, 36-46 (1999).
- [23] R. Graaff, "Reduced light scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations," *Appl. Opt.* **31**, 1370-1376 (1992).
- [24] V. V. Tuchin, "optical clearing of tissues and blood using the immersion method," *J. Phys. D.* **38**, 2497-2518 (2005).
- [25] K. Moulton, F. Lovell, E. Williams, P. Ryan, D. C. Lay. Jr, D. Jansen, and S. Willard, "Use of glycerol as an optical clearing agent for enhancing photonic transference and detection of Salmonella typhimurium through porcine skin," *J. Biomed. Opt.* **11**(5), 054027 (2006).
- [26] Y. Bae and B. Jung, "Development of Multi-Purpose Variable Polarization Imaging System for Clinical Diagnosis," *J. Biomed. Eng. Res.* **28**, 265-270 (2007)
- [27] C. G. Rylander, T. E. Milner, S. A. Baranov, and J. S. Nelson, "Mechanical Tissue Optical Clearing Devices: Enhancement of Light Penetration in Ex Vivo Porcine Skin and Adipose Tissue," *Lasers Surg.*

- Med.* **40**, 688694 (2008).
- [28] V. V. Tuchin, G. B. Altshuler, A. A. Gavrilova, A. B. Pravdin, D. Tabatadze, J. Childs, and I. Y. Yaroslavsky, "Optical clearing of skin using flashlamp-induced enhancement of epidermal permeability," *Lasers Surg. Med.* **38**, 824836 (2006).
 - [29] J. S. Nelson, J. L. McCullough, T. C. Glenn, W. H. Wright, L. H. Liaw, and S. L. Jacques, "Mid-infrared laser ablation of stratum corneum enhances in vitro percutaneous transport of drugs," *J. Invest. Dermatol.* **97**(5), 874879 (1991).
 - [30] S. Henry, D. V. McAllister, M. G. Allen, and M. R. Prausnitz, "Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery," *J. Pharm. Sci.* **87**(8), 922925 (1998).
 - [31] D. Levy, J. Kost, Y. Meshulam, and R. Langer, "Effect of ultrasound on transdermal drug delivery rat and guinea pigs," *J. Clin. Invest.* **83**, 2074-2078 (1989).
 - [32] D. Bommannan, G. K. Menon, H. Okuyama, P. M. Eliad, and E. H. Guy, "Sonophoresis. II. Examination of the Mechanism(s) of Ultrasound-Enhanced Transdermal Drug Delivery," *Pharm. Res.* **9**(8), 1043-1047 (1992).
 - [33] H. A. E. Benson, J. C. McElnay, R. Harland, and J. Hadgraft, "Influence of ultrasound on the percutaneous absorption of nicotinate esters," *Pharm. Res.* **8**(2), 204-209 (1991).
 - [34] S. Mitragotri, D. Blankschtein, and R. Langer, "Transdermal drug delivery using low frequency sonophoresis," *Pharm. Res.* **13**(3), 411-420 (1996).
 - [35] A. Tezel and S. Mitragotri, "Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis," *Biophys. J.* **85**, 35023512 (2003).
 - [36] J. Yoon, D. Park, T. Son, J. Seo, and B. Jung, "Enhancement of transdermal

delivery of glycerol by micro-needling method combined with sonophoresis," *Proc. SPIE* 7161, 716109 (2009).

ABSTRACT

Enhancement of light penetration depth on biological tissue by improvement of transdermal optical clearing agent delivery

Yoon, Jinhee

Dept. of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

The penetration depth of light is limited by skin tissue turbidity. Although the optical clearing agents such as glycerol, glucose, PEG, dimethyl sulfoxide (DMSO), and oleic acid can be used to enhance the penetration depth of light, stratum corneum prevent the diffusion of these agents into skin. To solve this problem, optical clearing methods including the hyperosmotic agents and mechanical tools have been widely studied for biomedical optics applications. Microneedle, laser ablation and mechanical devices using pressure have been also investigated to enhance transdermal delivery of the clearing agents. In previous study, we demonstrated a micro-needling method to enhance optical clearing effect against skin barrier and suggested a quantitative analysis method to evaluate the optical skin clearing effect. In this study, we introduce a new method using micro-needle roller combined with sonophoresis to enhance the optical skin clearing effect. 70% glycerol solution was determined as an optimal concentration by the experimental results. The optical skin clearing efficacy was quantitatively evaluated with the customized

modulation transfer function target under *ex-vivo* porcine skin samples. The experimental results indicate that a micro-needling method with sonophoresis enhance a nearly 2.3 fold increased optical skin clearing effect compared to than only micro-needling. Finally, new combined method was proved as effective on in-vivo mouse skin.

Key words : optical clearing agent, microneedle, glycerol, sonophoresis, transdermal delivery