

알카리 각막 화상에서 Hyaluronan의 효과

이화여자대학교 의과대학 의과학연구소 세포조직학부 및 안과학교실
정 장 현

= Abstract =

Effect of Na-Hyaluronan on Experimental Corneal Alkali Burns

Jang-Hyun Chung

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Division of Cell and Tissue Biology,
Ewha Medical Research Center Ewha Womans University

The effect of topically applied 1% sodium hyaluronate on the healing of a standardized corneal alkali wound was evaluated. Central corneal alkali wound was produced in one eye of 60 albino rabbits by applying a 5.5mm round filter paper, soaked in 1N NaOH, for 60 seconds. 1% sodium hyaluronate in the treatment group and PBS in the control group were instilled 4 times per day for 2 days, 1 week, and 3 weeks. Epithelial healing was assessed morphometrically from 1 week specimens. Stromal healing was evaluated by measuring the ratio of PMN and keratocyte in the areas of the central and marginal corneas. A positive healing influence was observed in the epithelium. The stromal PMN infiltration was suppressed, especially, in the central area, in the 1% sodium hyaluronate treated groups when compared with the control group.

서 론

각막 알카리 화상은 안과 영역에서 치료가 매우 힘든 질환중의 하나이다. 대부분의 경우 질환의 경과가 만성적이며 여러종류의 합병증을 초래하여 실명하는 수가 흔하다. 여러 종류의 치료 약제들이 시도되어 왔으나 그 효과는 미흡하며¹⁻⁶⁾, 각막 이식 수술의 성공률은 50%에도 미치지 못하는 실정이다. 안과 수술시 내피세포 보호제로 사용되는 점탄물질인 sod. hyaluronic acid(Na-HA)가 최근에는 여러가지 생물학적 기능을 가진 물질임이 연구 보고되고 있으며 이 물질은 세포보호 뿐만아니라 세포이동, 성장조절, 세포분화등에도 관여한다고 알려져있다^{7,8)}. Na-HA는 체내에 세포간 물질로써 미량이나마 광범위하

게 존재하며 이 물질의 국소점안후 알카리화상 치유효과에 대하여 이미 보고 되었으나⁹⁾ 그 작용기전은 규명되지 못하였다. 본 연구는 각막 알카리화상의 치유과정에 관여하는 상피세포, 다핵백혈구 및 실질세포를 정량분석하여 Na-HA의 간접적인 작용기전을 알아보고자 시행하였다.

대상 및 방법

60마리의 백색가토에서 편안만을 실험에 사용하였다. 각막화상은 저자가 개발한 실험모델을 사용하였으며 1N NaOH에 적신 5.5mm의 원형 filter paper를 각막 중앙부에 1분간 접촉시킨뒤 Balanced Salt Solution으로 2분간 세척하였다¹⁰⁾. 실험동물은 각군 30마리씩 2군으로 나누어서 치료군에는 1% Na-HA(M.W. 4×10^6 , Phar-

macia, Uppsala)를 1일 4회 점안하고 대조군에는 Phosphate Buffer Solution(PBS)를 1일 4회 점안하였다. 치료후 2, 7, 21일에 각군 10마리씩 phentobanbital 정맥주사후 희생시킨뒤 공막 rim을 따라 각막전부를 제거하여 10% 포르말린에 고정시킨후 조직표본을 만들었다. 4 μ m 두께로 절편을 자른 후 Haematoxylin과 Eosin으로 염색하여 광학 현미경을 이용하여 촬영하였다. 각 표본에서 전체각막을 100배 확대하여 촬영한 후 양측 화상주변부에서 각막실질의 점정과 retrocorneal membrane의 기저부를 기준점으로하여 기준선을 설정한 후 이 기준선에서 500 μ m의 평행선을 양측으로 연결하여 세포측정면적을 설정하고 양측 주변부 기준선을 이용하여 중앙부 세포측정면적을 결정하였다. 각 세포의 구분은 현미경하에서 400배로 확대하여 시행하였으며 상피세포는 1주 치료군에서 세포층의 수를 측정하였고 각막실에서는 백혈구수와 실질세포수를 측정하였다. 통계처리는 Wilcoxon's two sample rank test를 사용하였으며 P < 0.05에서 유의성을 검정하였다.

결 과

치료 2일군에서는 중앙부 각막실질에서 실질세포나 다핵백혈구가 발견되지 않았으며(0-5/unit area), 주변부 각막에서는 다핵백혈구와 실질세포의 비율이 Na-HA 치료군에서는 9.9 \pm 3.2%, 대조군에서는 15.5 \pm 3.9% 정도

Table 1. The number of keratocytes in the unit area of the central and marginal cornea

Area	Group	Days		
		2	7	21
Center	Treatment	0	238 \pm 96	735 \pm 157
	Control	0	208 \pm 114	692 \pm 297
Margin	Treatment	385 \pm 66*	355 \pm 99	531 \pm 124
	Control	316 \pm 58	359 \pm 85	496 \pm 107

* : P < 0.05 mean \pm S.D.

Table 2. The number of PMNs in the unit area of the central and marginal cornea

Area	Group	Days		
		2	7	21
Center	Treatment	0	60 \pm 19*	40 \pm 28
	Control	0	124 \pm 36	71 \pm 42
Margin	Treatment	35 \pm 16	19 \pm 11*	12 \pm 7
	Control	48 \pm 11	53 \pm 41	18 \pm 10

* : P < 0.05 mean \pm S.D.

를 차지하였다(Table 1, 2, 3). 치료후 1주군에서 상피세포층의 수를 각막중앙부에서 측정하였다. Na-HA 치료군에서는 3~5층으로 비교적 안정된 양상을 보였으며 대조군에서는 세포층이 0~6층으로 표본간의 차이가 매우 다양하였다(Table 5). 각막실질세포수는 중앙부와 주변부 양군에서 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 다핵백혈구수는 중앙부와 주변부 모두 치료군에서 매우 유의하게 감소되었다(Table 1, 2, 3, 4). 3주 치료군에서는 각막 중앙부와 주변부 모두에서 치료군과 대조군간의 유의한 차이가 없었다. 각막 실질세포는 시간이 경과함에 따라 그 숫자가 증가 하였으며 다핵백혈구는 현저히 감소하였다(Table 1, 2, 3, 4).

고 찰

본 연구에 이용된 각막 알카리화상 모델은 그 치유과정 이 2-phase, 즉 initial healing phase와 late long-term healing phase로 나누어진다¹⁰⁻¹³. 상피와 실질치유 과정에서 그 분기점은 각각 수상후 2일과 1주이며 late phase에서 3주째 상피결손과 실질손상이 가장 심하다. 따라서 본 연구에서는 2일, 7일, 21일을 그 관찰대상으로 하였다. Na-HA는 안과영역에서 안내수술시 각막 내피세포 손상을 방지하기 위한 세포보호제, 인공수정체 삽입을 용이하게 하기위해 충분한 공간을 확보하기 위한 공간확장제, 초자체 대용물질 혹은 지혈목적 등의 용도로 광범

Table 3. Comparison of the ratio of PMNs to keratocytes (%) in the marginal area

Group	2 days	7 days	21 days
Treatments	9.9 \pm 3.2*	5.2 \pm 2.0	2.2 \pm 1.4
Control	15.5 \pm 3.9	12.4 \pm 7.1	3.6 \pm 2.1

* : P < 0.05 mean \pm S.D.

Table 4. Comparison of the ratio of PMNs to keratocytes (%) in the central area

Group	7 days	21 days
Treatment	28.1 \pm 13.3*	5.3 \pm 3.4*
Control	53.9 \pm 7.9	10.1 \pm 3.4

* : P < 0.05 mean \pm S.D.

Table 5. Number of epithelial layers between two groups

Group	Specimens	Mean \pm S.D.
Treatment	3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 5, 5	3.8 \pm 0.92
Control	0, 0, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 4, 6	2.4 \pm 1.78

P < 0.05

위하게 사용되어왔다. 그러나 이 물질의 임상적용에 있어서의 기본원리는 이 물질 자체의 점탄성과 생물학적 작용이 없음을 기초를 두고 사용되어 왔으나 이후 각막 내피 세포에는 HA-receptor가 발견되었으며 이는 이 물질이 생물학적 작용이 있을 가능성을 시사하였다. 최근에는 이 물질의 생물학적 기능에 대해 많은 연구가 보고되었다. Na-HA는 정상적으로 각막실질의 세포간 물질로 존재하며 창상치유과정에서 세포간 확장에 관여하며 확장된 세포간 사이로 세포이동을 용이하게 해준다⁷⁾. 각막 알카리 화상에서도 이 물질의 상피세포를 보호하고 세포이동을 촉진하며 기저세포형성을 촉진시킨다고 보고되었다⁸⁾⁹⁾¹⁴⁾.¹⁵⁾ 각막 실질치유에 관여하는 효소로서 stromelysin, gelatinase, collagenase, 즉 matix metalloproteinase가 각막 알카리화상의 실질치유에 중요한 역할을 한다¹⁶⁾.¹⁷⁾ 다핵백혈구와 각막 실질세포가 단백질분해효소의 생성과 분비에 관여하고 있으며 특히 실질세포는 새로운 세포간 물질의 생성에 직접적인 역할을 하고있다. 따라서 각막 알카리화상후 이들 세포들의 세포간 물질파괴기능과 실질세포의 새로운 세포간 물질의 생성촉진의 균형을 유지하는 것이 이 질환의 치유에 매우 중요한 점이라 할 수 있다. 최근에 각막의 여러 형태의 병적 상태, 즉 dystrophies, keratoconus, infection, trauma등에서 각막 실질에 존재하는 endogenous HA가 측정되어 보고되었다¹⁸⁾. 뿐만아니라 각막 알카리화상후 4년된 조직 표본에서도 각막실질의 endogenous HA가 발견되었으며 심한 각막 실질세포 침윤이 관찰되었다. 본 연구에서는 국소점안한 Na-HA가 각막실질의 다핵백혈구 침윤을 억제하나 각막 실질세포 침윤에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 알카리화상 및 여러 종류의 상피세포 결손이 있는 각막에서 Na-HA를 투여 하였을때 상피세포 치유속도가 증가된다는 연구는 매우 활발히 진행되었다⁹⁾¹⁴⁾. 본 연구결과에서 Na-HA 투여군에서 상피세포층의 형성이 뚜렷이 안정화된 것을 관찰할 수 있었으며 Na-HA가 상피세포 치유속도 증가 뿐만아니라 치유된 상피세포의 안정화에도 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

결 론

각막 알카리화상 치유과정에서 국소점안한 Na-HA는 상피세포층의 안정화를 향상시키며 각막실질의 다핵백혈구 침윤을 억제하였다. 뿐만아니라 각막실질세포의 re-

population을 초기단계에는 증가시키는 효과를 나타내었다.

References

- 1) Paterson CA, Wells JG, Koklitis PA, Higgs GA and Docherty AJP : *Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppresses alkali-burn-induced corneal ulceration in rabbits. Invest. Ophthalmol Vis Sci 1994 : 35 : 677-84*
- 2) Schultz GS, Strelow S, Stern GA, Chegini N, Grant MB, Galardy RE, Grobelncy D, Rowsey JJ, Stonecipher K, Parmley V and Khaw PT : *Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. Invest. Ophthalmol Vis Sci 1992 : 35 : 3325-31*
- 3) Donshik PC, Berman MB, Dohlman CH, Gage J and Rose J : *Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali-burned cornea. Arch Ophthalmol 1978 : 96 : 2117-20*
- 4) Kenyon KR, Berman M, Rose J and Gage J : *Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1979 : 18 : 570-87*
- 5) Nirankari VS, Varma SD, lakhanpal V and Richards RD : *Superoxide radical scavenging agents in treatment of alkali burns : An experimental study. Arch Ophthalmol 1981 : 99 : 886-87*
- 6) Sing G and Foster CS : *Epidermal growth factor in alkali burned corneal epithelial wound healing. Am J Ophthalmol 1987 : 103 : 803-7*
- 7) Toole BP : "Morphogenetic role of glycosaminoglycans(acid mucopolysaccharides) in brain and other tissue".. In : *Neural recognition, (Ed. Baronders SH), New York, Plenum 1976 : 275-329*
- 8) Nishida T, Nakamura M, Mishima H and Otori T : *Hyaluronan stimulate corneal epithelial migration. Exp Eye Res 1991 : 53 : 753-8*
- 9) Chung JH, Fagerholm P and Lindstrom B : *Hyaluronate in healing of corneal alkali wound in the rabbit. Exp Eye Res 1989 : 48 : 569-76*
- 10) Chung JH, Fagerholm P and Lindstrom B : *The behaviour of corneal epithelium following a stan-*

- standardized alkali wound. Acta Ophthalmol* 1987 : 65 : 529-37
- 11) Chung JH and Fagerholm P : *Endothelial healing in rabbit corneal alkali wounds. Acta Ophthalmol* 1987 : 65 : 648-56
 - 12) Chung JH, Fagerholm P and Lindstrom B : *Dry mass and water content in the corneal epithelium and superficial stroma during healing of corneal alkali wounds. Exp Eye Res* 1988 : 46 : 705-15
 - 13) Chung JH and Fagerholm P : *Stromal reaction and repair after corneal alkali wound in the rabbit : a quantitative microradiographic study. Exp Eye Res* 1987 : 45 : 227-37
 - 14) Chung JH, Kim HJ, Tae JS and Cho BC : *Influence of topically applied Na-Hyaluronic acid on corneal epithelial healing : Clinical outcomes and experimental basal cell morphogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 : 36(suppl) : 572
 - 15) Reim M and Lenz V : *Behandlung von schweren Verätzungen mit hochpolymerer Hyaluronsäure (Healon). Fortschr Ophthalmol* 1984 : 81 : 323-5
 - 16) Brown D, Chwa M, Escobar M and Kenney MC : *Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme / Inhibitor complex. Exp Eye Res* 1991 : 52 : 5-16
 - 17) Chin JR, Murphy G and Werb Z : *Stromelysin, a connective tissue degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. J Biol Chem* 1985 : 264 : 12367-76
 - 18) Fitzsimmons TD, Molander N, Stenevi U, Fagerholm P, Schenholm M and von Malmberg A : *Endogenous hyaluronan in corneal disease. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994 : 35 : 2774-82