

백서에서 L-Glutamic Acid에 의해  
유발된 망막신경절세포손상에 대한  
Estrogen의 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

김 성 수

백서에서 L-Glutamic Acid에 의해  
유발된 망막신경절세포손상에 대한  
Estrogen의 효과

지도 홍 영 재 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 성 수

# 김성수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 깊은 관심과 격려를 해주시고 저를 아껴주신 홍영재 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 많은 조언과 격려를 해주신 이병인 선생님, 이주화 선생님, 연동수 선생님, 성공제 선생님께 감사드립니다.

실험에 큰 도움을 주신 최철명 선생님께 감사드리며 실험을 진행하는 동안 수고를 아끼지 않은 이효 선생님을 비롯한 안과의국원 여러분께도 감사드립니다.

이 논문이 완성되기까지 항상 끝없는 격려와 사랑으로 헌신적인 도움을 아끼지 않으신 아버님과 어머님, 그리고 항상 사랑으로 곁을 지켜준 아내 연희와 아들 시연과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.

저 자 씀

# 차 례

그림 및 표 차례 .....	iii
국문요약 .....	1
<b>I. 서론</b> .....	3
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	5
1. 실험재료 .....	5
가. 실험동물 .....	5
나. 시료 .....	5
다. In situ cell death detection kit .....	5
2. 실험방법 .....	6
가. 실험 1 .....	6
(1) 마취 및 수술전 처치 .....	6
(2) 수술 .....	6
(3) $17\beta$ -estradiol 혈장농도의 분석 .....	8
나. 실험 2 .....	8
(1) 마취 및 수술전 처치 .....	8
(2) 수술 .....	9
다. 안구적출 및 망막조직의 처치(TUNEL 방법) .....	9
라. TUNEL 양성세포수의 측정 .....	10
3. 결과의 분석 .....	11
<b>III. 결과</b> .....	12
1. 실험 1 .....	12
가. 안내 estradiol cypionate 주입전후의 $17\beta$ -estradiol 혈장농도 .....	12
나. 안내 estradiol cypionate 주입 전후 관찰된 TUNEL 양성세포수 ...	12
다. 외안부 및 안저소견 .....	12

2. 실험 2 .....	14
가. 외안부 및 안저소견 .....	14
나. TUNEL 양성세포수 .....	14
다. 망막층의 광학현미경 소견 .....	16
<b>IV. 고찰</b> .....	18
<b>V. 결론</b> .....	22
참 고 문 헌 .....	24
영 문 요 약 .....	32

## 그림 차례

그림 1. 미세주사기 주사바늘을 백서의 유리체강으로 삽입하는 방법. .....	7
그림 2. 백서의 전체망막조직과 관찰시야. ....	10
그림 3. 백서의 유리체강에서 관찰되는 estradiol cypionate의 기름방울. ....	13
그림 4. 웅성백서에서 glutamate 안내주입으로 유발된 망막신경절세포의 TUNEL 양성 소견 .....	14
그림 5. TUNEL 양성세포수의 비교 .....	16
그림 6. 웅성백서의 정상망막조직과 광학현미경으로 비교관찰한 실험군과 대조군의 망막조직 .....	17

## 표 차례

표 1. 웅성백서에서 estradiol cypionate의 안내주입 전과 주입 후 4주 의 $17\beta$ -estradiol 혈장농도 .....	13
표 2. Glutamate를 안내주입한 웅성백서에서 estradiol cypionate의 안내주입에 따른 TUNEL 양성세포수의 차이 .....	15

## 국문요약

### 백서에서 L-glutamic acid에 의해 유발된 망막신경절세포손상에 대한 Estrogen의 효과

주요 실험원인인 녹내장은 신경축삭과 망막신경절세포손상을 일으키는 질환으로 망막신경절세포손상에는 glutamate가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이를 억제하는 신경보호치료에 관한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다. 성호르몬인 estrogen은 퇴행성 신경질환의 발생을 억제하는 신경보호물질이며, 광우각녹내장이 여성보다 남성에 호발하고 호발연령층이 폐경기 이후인 퇴행성시신경질환이라는 점에 착안하여 estrogen이 glutamate에 의한 망막신경절세포손상을 억제하는지 알아보고자 본 연구가 계획되었다.

대상동물로 250~300g의 웅성백서(Sprague-Dawley) 40마리를 이용하였으며, 이중 10마리는 안내주입된 estradiol cypionate가 전신적으로 흡수되는지 여부를 확인하기 위한 실험(실험 1)에, 30마리는 안내주입된 estradiol cypionate가 glutamate에 의한 망막신경절세포손상을 억제하는지 여부를 확인하는 실험(실험 2)에 이용되었다. 실험 1에서 대상동물의 우안에는 평형염액 5 $\mu$ l를 안내주입하고, 좌안에는 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 주입하였다. 대상동물의 정맥혈을 채취하여 17 $\beta$ -estradiol 혈장농도를 측정된 후 시료를 안내주입하였으며, 주입 후 4주에 대상동물을 희생시킨 후 정맥혈과 안구를 채취하여 혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도와 망막표본의 망막신경절세포손상을 관찰하였다. 실험 2에서는 대상동물의 양안에 0.2M monosodium L-glutamic acid 5 $\mu$ l를 안내주입한 직후 대조군인 우안에는 평형염액 5 $\mu$ l를, 실험군인 좌안에는 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 각각 주입하였다. 주입후 4주에 대상동물을 희생시켜 전체망막표본을 만들고 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick-end labeling



(TUNEL) 염색을 이용해 망막신경절세포손상을 관찰하였다.

Estradiol cypionate 안내주입전과 주입 후 4주의  $17\beta$ -estradiol의 혈장농도는 각각 평균  $28.4\pm 9.89$  pg/ml와 평균  $18.6\pm 7.46$  pg/ml로 측정되어 안내주입으로 인해  $17\beta$ -estradiol의 혈장농도는 증가하지 않았으며 평형염액만을 주사한 우안과 estradiol cypionate를 주입한 좌안 모두에서 TUNEL 양성세포는 관찰되지 않았다. 후 증가되지 않았다. 대상동물의 양안에 0.2M monosodium L-glutamic acid  $5\mu$ l를 안내주입 한 직후 평형염액  $5\mu$ l를 주입한 대조군에서는 평균 28개의 TUNEL 양성세포가 관찰되었으나, 0.013M estradiol cypionate  $5\mu$ l를 주입한 실험군에서는 평균 10.7개의 TUNEL 양성세포가 관찰되어 통계학적으로 의미있게 적은 수가 관찰되었다.( $p < 0.01$ ) 광학현미경으로 망막조직을 관찰한 결과 대조군에 비해 실험군에서 망막신경절세포 및 내망상층의 손상이 억제된 것이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 estradiol cypionate의 안내주입은 estrogen의 전신적인 영향을 피하면서 glutamate에 의한 망막신경절세포 및 망막조직의 손상을 억제하는 것을 알 수 있었으며 estrogen의 투여방법등을 개선한다면 녹내장에 의한 시신경손상을 억제하는 치료방법으로 임상에서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

---

핵심되는말 : 녹내장, glutamate, estrogen, estradiol, TUNEL

# 백서에서 L-glutamic acid에 의해 유발된 망막신경절세포손상에 대한 Estrogen의 효과

<지도교수 **홍 영 제** 교수>

연세대학교 대학원 의학과

**김 성 수**

## I. 서 론

녹내장은 안압 등의 여러 위험요인에 의해 발생하며 특징적인 시신경병증과 이에 따른 시야결손을 보이는 질환으로<sup>1</sup>, 결국에는 시야가 좁아져서 실명하게 된다.<sup>2</sup> 녹내장으로 인한 실명은 회복될 수 없으며 세계보건기구의 보고에 의하면 세계의 실명원인중 3위를 차지하는 중요한 실명원인이다.<sup>3</sup> 녹내장의 위험요인으로 안압과 혈류변화등이 제시되고 있으며, 녹내장은 여러 위험인자들이 같이 작용하여 망막신경절세포와 시신경축삭이 손상받아 발생한 결과로 생각되고 있다.<sup>4-6</sup> 망막신경절세포의 손상기전은 apoptosis에 의한 것이라고 알려져 있으며, 이는 높은 안압을 유발한 동물실험과 녹내장 환자에서 사후 획득된 망막조직에서 확인되었다.<sup>7-9</sup> 망막신경절세포의 apoptosis는 세포내 전해질이상이나 주변의 신경교세포들의 식세포작용, 흥분성 신경전달물질, 세포내 nitric oxide(NO), 자가면역기전, 미토콘드리아 기능이상, 세포생존과 관련된 유전자이상 등이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 glutamate의 신경세포독성이 망막신경절세포의 apoptosis에 중요한 역할을 하는

것으로 알려졌다.<sup>10-18</sup> Glutamate를 포함한 신경독소는 손상받은 신경세포의 apoptosis를 유발할 뿐 아니라 손상된 망막신경절세포에서 유리되어 그 주변의 건강한 망막신경절세포에 apoptosis를 유발시키는 이차변성을 유발하며, 이 과정이 안압이 조절되는 녹내장 환자에서 시신경손상이 진행되는 이유로 제시되고 있다.<sup>19</sup> 따라서 일차 원인인 안압을 조절하는 것만으로는 녹내장의 진행을 완전히 막을 수 없기 때문에 건강한 망막신경절세포를 보호하여 녹내장의 진행을 억제하려는 신경보호의 개념이 도입되고 있다.<sup>20</sup> 최근 다양한 신경보호물질들이 연구되고 있으나 녹내장에서는 calcium 길항제 정도가 임상적으로 이용되고 있으며 안압하강제로 사용되는 안약의 신경보호효과에 대해 보고되고 있다.<sup>21</sup>

최근 여성호르몬인 estrogen이 Alzheimer's disease나 뇌경색등에 의미있는 신경보호효과를 가지며 다양한 기전의 신경보호효과를 가진다고 알려졌다.<sup>22-24</sup> 일부 유병률 조사에 의하면 여성이 남성보다 녹내장 유병률이 낮으며 특히 광우각녹내장에서는 남성이 위험인자로 알려져 있다.<sup>25-28</sup> 또한 퇴행성망막질환인 노인성황반변성과 황반원공 등이 여성의 폐경과 관련있는 것으로 알려졌다.<sup>29-31</sup> 이런 고찰에 따라 일종의 퇴행성시신경질환인 녹내장이 성호르몬인 estrogen의 결핍과 관련있을 것으로 생각하여 본 연구가 계획되었다.

본 연구에서는 glutamate을 백서의 안구내에 주사하여 망막신경절세포의 손상을 유발하고 동시에 estrogen을 눈안에 주입할 경우 이를 억제하는지 확인하고자 하였다. 그리고 유리체강에 주입한 estrogen이 전신흡수없이 안구에만 국소적으로 작용하는지도 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 가. 실험동물

본 동물실험은 연세대학교 임상연구센터 실험동물위원회의 검토와 승인하에 이루어 졌으며 체중 250~300g의 웅성백서 Sprague Dawley계열을 이용하였다. 백서의 평균체온은 38~39℃로 사육은 22±2℃의 온도, 45~55%의 습도, 40~50 Phon이하의 소음, 150~300 Lux의조명이 12시간 명암 조명되는 환경하에서 이루어졌다. 대상 동물 모두에서 실험전 세극등 검사및 안저검사를 시행하여 전안부나 망막및 시신경에 이상이 있는 동물은 실험에서 제외시켰다.

#### 나. 시료

백서의 유리체강에 주입되는 시료로 L-glutamic acid monosodium salt monohydrate(G283-4, Aldrich chemical company, Milwaukee, WI, USA)와 estradiol cypionate(상품명 Depofemin주, 한독약품, 서울, 한국)를 이용하였다. 흰색분말형태인 L-glutamic acid monosodium salt monohydrate는 평형염액(상품명 BSS<sup>®</sup>, Alcon laboratories Inc., Fort Worth, TX, USA)에 희석하여 0.2M 농도의 용액(pH 7.4)으로 만들었으며 estradiol cypionate는 분자량이 396.6이며 5mg이 1ml에 포함된 0.013M 농도의 원액을 이용하였다.

#### 다. In situ cell death detection kit

망막신경절세포의 apoptosis를 측정하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick-end labeling (TUNEL) 염색을 이용하였다. TUNEL 염색은 손상되거나 절단된 DNA 조각에 biotin marker를 부착하고 terminal deoxynucleoytidyl transferase와

반응시켜 세포의 apoptosis를 확인하는 방법으로<sup>32</sup>, 본 연구에서는 in situ cell death detection POD kit(Roche molecular biochemicals, Mannheim, Germany)를 시약으로 이용하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 실험 1

웅성백서 10마리를 대상으로 estrogen을 한쪽 눈에만 안내주입할 경우 대상동물의 혈장  $17\beta$ -estradiol 농도를 높이는지 여부와 망막신경절세포손상을 유발하는지 여부를 확인하였다.

#### (1) 마취 및 수술전 처치

대상동물은 trichloroacetaldehyde hydrate(상품명 Chloral hydrate, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)를 생리식염수에 희석하여 체중kg당 400 mg을 복강내 주사하여 마취한 후 혈장  $17\beta$ -estradiol 의 혈장농도를 측정하기 위한 정맥혈액시료를 약 3ml 가량 채취하였다. 정맥혈을 채취한 후 동공산대를 위한 산동제인 1% cyclopentolate hydrochloride 점안액(상품명 Cyclopentolate hydrochloride ophthalmic solution USP, 1%, Bausch & Lomb Pharmaceuticals, Inc. Tampa, FL, USA)과 점안마취제인 0.5% proparacaine hydrochloride(상품명 0.5% Alcaine, Alcon-Couvreur, Puurs, Belgium)를 점안하고 전신상태를 확인한 후 수술을 시작하였다.

#### (2) 수술

대상동물에 마취 및 수술전처치를 시행하고 접촉자동안압측정기인 Tonopen<sup>TM</sup>XL(Mentor<sup>®</sup>, Norwell, MA, USA)을 이용하여 수술전 안압을 측정하고, 26 Gauge 주사바늘로 전방천자를 시행하여 시료주입 후의 안압상승을 방지

하였다. 점탄물질인 Hypromellose gel(상품명 Methocel 2%, CIBA vision Ltd., Hettlingen, Switzerland) 1ml를 백서의 눈에 점안한 후 커버글래스를 부착하고 수술현미경으로 안저를 관찰하면서 미세주사기(Hamilton microsyringe, Hamilton Company, Reno, NV, USA)의 26 Gauge 주사바늘을 각막윤부에서 약 1mm 가량 떨어진 위치를 통해 조심스럽게 유리체강으로 삽입하였다(그림 1).

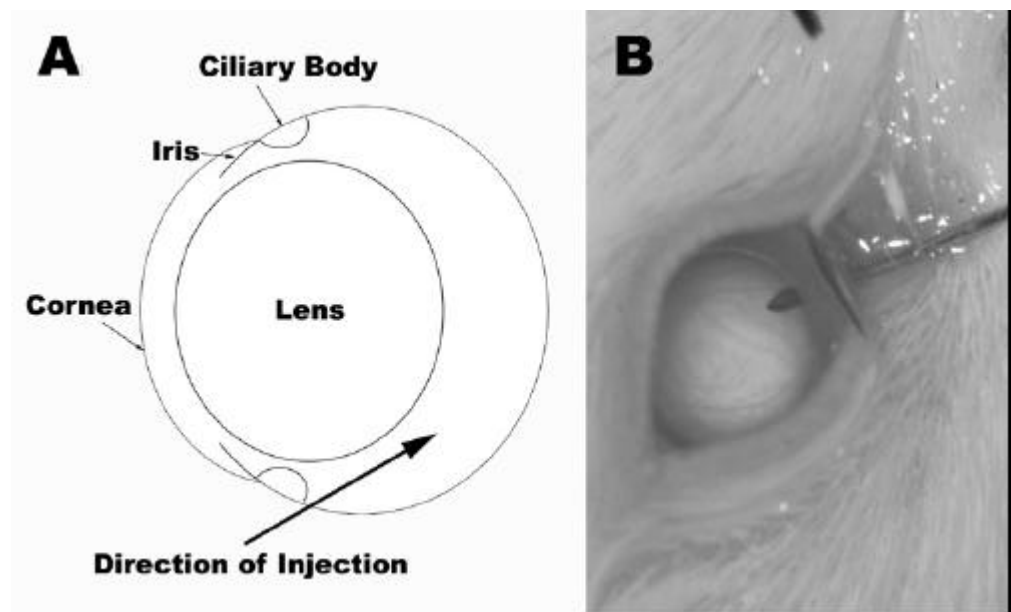


그림 1. 미세주사기 주사바늘을 백서의 유리체강으로 삽입하는 방법. 백서에서 안내시료주입시 이용되는 주입경로의 모식도(A)와 유리체강으로 26 Gauge 주사바늘이 삽입된 모습(B). 주사바늘은 각막윤부에서 이측으로 약 1mm 가량 떨어진 부위를 통해 수정체와 망막혈관의 손상을 피하며 유리체강으로 삽입된다.

수술현미경으로 주사바늘이 유리체강 안으로 안전하게 들어간 것을 확인한 후 우안에는 평형염액 5 $\mu$ l, 좌안에는 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 조심스럽게 주입하였다. 주입 중 출혈이나 수정체의 손상이 일어나는 경우와 시료주입 후 측정된 안압이 수술전에 비해 상승한 경우는 실험에서 제외하였다. 수술 후 감염을 막기 위해 눈에 항생제연고를 도포하였다.

### (3) 혈중 17 $\beta$ -estradiol 농도의 분석

수술진후 각각 채취된 정맥혈을 원심분리하여 300 $\mu$ l 이상의 혈장을 얻은 후 Radioimmunoassay Kit(Coated-A-Count<sup>®</sup> Estradiol, Diagnostic product corporation, Los Angeles, CA, USA)와 방사성동위원소 측정기(Cobra II Auto gamma, Packard instrument Co. Inc., Meriden, CT, USA)를 이용하여 혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도를 측정하였다.

## 나. 실험 2

대상동물 30마리의 양안 유리체강에 glutamate를 주입한 직후 대조군인 대상동물의 우안에는 평형염액을, 실험군인 좌안에는 estrogen을 안내주입하여 estrogen이 glutamate에 의한 망막신경절세포 손상을 억제하는지 여부를 확인하였다.

### (1) 마취 및 수술전 처치

대상동물은 생리식염수에 희석된 chloral hydrate<sup>®</sup>를 체중 kg당 400mg을 복강내주사하여 마취한 후 동공산대를 위한 산동제인 1% cyclopentolate hydrochloride 점안액과 점안마취제인 0.5% proparacaine HCl를 점안하고 수술을 시작하였다.

## (2) 수술

대상동물의 양안에 각각 평형염액에 희석한 0.2M L-glutamic acid 용액(pH 7.0) 5 $\mu$ l를 주입한 직후 대조군인 우안에 평형염액 5 $\mu$ l를, 실험군인 좌안에 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 안내주입하였다. 수술전 양안에 전방천자를 시행하였으며, 수술전후의 안압을 측정하여 수술후 안압이 수술전에 비해서 상승한 경우 실험대상에서 제외하였다.

### 다. 안구적출 및 망막조직의 처치(TUNEL 방법)

안내주입된 glutamate가 확실한 망막손상을 일으키는 시기로 알려진 시료주입 후 28일째에<sup>33</sup> 대상동물 모두를 pentobarbital을 체중 kg당 30mg가량 복강내 주사하여 희생시킨 후 안구적출을 시행하였다. 실험 1을 시행한 백서에서는 희생시키기 전에 정맥혈액을 채취하였다.

적출된 안구는 저배율 해부현미경(Olympus SZ-ST, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 각막과 수정체의 혼탁등 손상여부를 확인하고 각막윤부를 따라 절개하여 홍채조직과 수정체를 제거한 후 시신경을 중심으로 망막을 분리하였다. 광학현미경으로 망막조직을 관찰하기 위해 분리된 망막조직중 일부를 파라핀에 고정하여 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 시행하였다.

TUNEL 염색을 시행할 망막조직은 2~3군데 방사상으로 절개한 후 0.01% poly-L-lysine으로 전처리 된 슬라이드글래스(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 부착시켰다. 표본을 4% paraformaldehyde(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 30분동안 고정한 후 0.1M PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4)에 세척하였다. 조직표본을 Proteinase K 14g/ml(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)와 0.01M의 Tris HCl buffer 용액(Tris HCl 1M stock solution, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 혼합하여 만든 permeabilization 용액에 실온에서 1시간 동안 중탕하였다. Permeabilization 후 PBS로 2분간 3회 세척하여 반응을 종료시키고 조직표본에 In situ cell death



detection-POD 시약을 조직당 50 $\mu$ l씩 점적하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 반응시킨후 PBS로 2분씩 3회 세척하여 반응을 종료시켰다. 조직슬라이드를 건조시킨 후 prolong antifade kit(Molecular probes, Eugene, OR, USA)가 혼합된 Mounting media를 점적하고 커버글래스로 덮어 완성하였다.

#### 라. TUNEL 양성세포수의 측정

Olympus BH-2 fluorescent microscope(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 TUNEL 염색에 양성을 보이는 망막신경절세포를 관찰하고 그 수를 측정하였다. 형광현미경의 파장은 460~490nm이었으며 검출파장 515nm인 필터로 관찰하였다. 전체망막조직에서 시신경부착부위를 중심으로 48개의 400배 현미경시야에서 TUNEL 양성세포를 관찰하고 발견된 숫자를 비교하였다(그림 2). TUNEL 양성세포가 망막신경절세포인지 여부를 확인하기 위해 현미경배율을 400배와 1000배로 바꾸어가며 확인하였다.



그림 2. 백서의 전체망막조직과 관찰시야. 시신경유두부착부위(화살표, ONH)를 제외한 48개의 400배 현미경시야를 격자의 수순에 따라 관찰하였다.

### 3. 결과의 분석

통계분석을 위하여 컴퓨터 통계분석 프로그램인 Statistical Analysis System(SAS<sup>®</sup>, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) version 6.12를 이용하였다. 실험 1에서 측정된 수술전후의 혈장  $17\beta$ -estradiol 농도는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였으며 TUNEL 양성세포수는 Mann-Whitney u Test를 이용하여 분석하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 실험 1

##### 가. 안내 estradiol cypionate 주입전후의 혈장 $17\beta$ -estradiol 농도.

대상동물의 한쪽눈에만 0.013M estradiol cypionate  $5\mu\text{l}$ 를 주입하기 전 혈장  $17\beta$ -estradiol 농도는 16.43~44.93 pg/ml의 분포를 보였으며, 주입후 혈장  $17\beta$ -estradiol 농도는 11.37~31.74 pg/ml를 보였다. 각 대상동물에서 주입전에 비해 주입후 혈장  $17\beta$ -estradiol 농도가 증가한 경우는 없었다. 비모수분포에 따른 Wilcoxon signed rank test에서 p value=0.0195로 estrogen cypionate를 안내주입 후 혈장  $17\beta$ -estradiol의 농도는 증가하지 않은 것으로 측정되었다.(표 1)

##### 나. Estradiol cypionate 안내주입 4후 관찰된 TUNEL 양성세포수

평형염액과 estradiol cypionate를 안내주입한 경우 모두에서 TUNEL 양성소견은 관찰되지 않았다.

##### 다. 외안부 및 안저소견

모든 대상동물의 양안에서 백내장의 발생이나 안내감염등의 소견은 관찰되지 않았으며 망막 출혈이나 증식성유리체병증등의 수술 합병증도 관찰되지 않았다. 다만 estradiol cypionate를 주입한 경우 주입후 28일째에도 제제의 기름방울이 유리체강에 남아있는 것이 관찰되었다(그림 3).

**표 1.** 음성백서에서 estradiol cypionate의 안내주입 전과 주입 후 4주의 혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도<sup>1</sup>

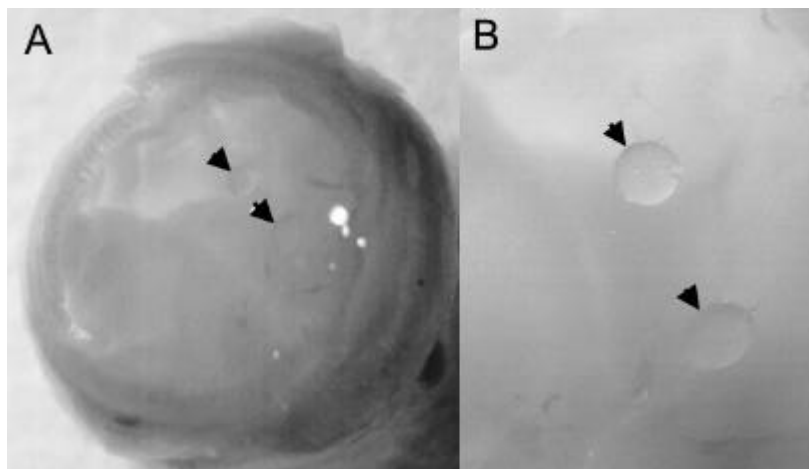
백서번호	혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도	
	주입전 <sup>2</sup>	주입후 <sup>3</sup> *
1	18.47	24.63
2	16.43	14.58
3	19.56	16.03
4	21.60	15.87
5	25.23	15.79
6	44.93	11.37
7	28.62	11.59
8	31.85	14.05
9	35.93	30.09
10	41.11	31.74

1. 단위는 pg/ml임.

2. 음성백서에서 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 좌안에 주입하기 전에 구간채혈을 하여 혈장을 분리하였음.

3. Estradiol cypionate의 안내주입후 4주에 구간채혈을 하여 혈장을 분리하였음.

\* 주입전에 비하여 통계학적으로 증가하지 않았음.(p=0.0195)



**그림 3.** 백서의 유리체강에서 관찰되는 estradiol cypionate의 기름방울. 각막과 수정체를 제거한 백서 안구(A)에서 estradiol cypionate를 안내주입한지 4주째에도 기름방울이 관찰된다.(B, 검은색 화살표머리)

## 2. 실험 2

### 가. 외안부 및 안저조건

모든 대상동물 양안에서 백내장의 발생이나 안내감염 및 특이 수술 합병 증은 관찰되지 않았다. Estradiol cypionate를 안내주입한 경우 주입후 28일째 에도 estradiol cypionate가 잔류되어 있는 것이 확인되었다.

### 나. TUNEL 양성세포수

0.2M의 L-glutamic acid  $5\mu\text{l}$ 와 평형염액  $5\mu\text{l}$ 를 안내주입한 대조군 30안에서는 48개의 연속된 400배 현미경시야에서 평균 28개의 TUNEL 양성세포가 관찰된 반면, 0.013M estradiol cypionate  $5\mu\text{l}$ 를 안내주입한 실험군 30안에서는 평균 10.7개가 관찰되었다. TUNEL 양성세포는 다양한 소견을 보였으며 정확한 식별이 필요한 경우는 1000배를 이용하여 확인하였다(그림 4).

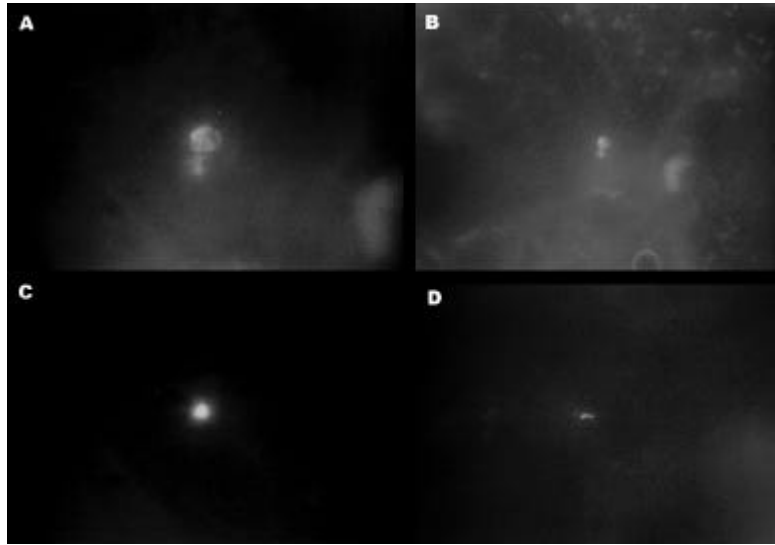


그림 4. 응성백서에서 glutamate 안내주입으로 유발된 망막신경절세포의 TUNEL 양성 소견. TUNEL 염색후 망막신경절세포의 핵주변의 형광이 1000배(A)와 400배(B)의 현미경배율에서 관찰되며 DNA가 압축됨에 따라 원형(C, 1000배)이나 과립형(D, 400배)으로 관찰된다.

대상동물 각각에서는 estradiol cypionate를 주입한 좌안 모두가 우안과 비교하여 적은 수의 TUNEL 양성세포가 관찰되었으며 비모수 검정인 Mann-Whitney u test로 검정한 결과 p value 0.0001로 매우 유의하였다.(표 2, 그림 5)

**표 2.** Glutamate를 안내주입한 용성백서에서 estradiol cypionate의 안내주입에 따른 TUNEL 양성세포수<sup>1</sup>의 차이

백서번호	TUNEL 양성세포수		백서번호	TUNEL 양성세포수	
	대조군 <sup>2</sup>	실험군 <sup>3</sup> *		대조군	실험군*
1	21	13	16	43	9
2	28	15	17	33	14
3	19	9	18	40	18
4	20	6	19	35	8
5	32	12	20	30	6
6	38	10	21	26	11
7	46	6	22	28	23
8	58	8	23	19	7
9	25	3	24	20	11
10	19	9	25	9	6
11	13	6	26	12	12
12	22	9	27	28	16
13	21	11	28	41	9
14	36	15	29	18	9
15	32	21	30	31	8

<sup>1</sup> 단위는 안내주입 후 4주에 얻어진 전체망막조직에서 48개의 400배 현미경시야에서 발견된 TUNEL 양성수임

<sup>2</sup> 각 대상동물의 우안으로 0.2M L-glutamic acid 용액 5 $\mu$ l과 평형염액 5 $\mu$ l가 안내주입된 군임

<sup>3</sup> 각 대상동물의 좌안으로 0.2M L-glutamic acid 용액 5 $\mu$ l과 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l가 안내주입된 군임

\* 대조군에 비해 실험군에서 TUNEL 양성세포수는 통계학적으로 매우 유의하게 적게 관찰됨(p=0.0001)

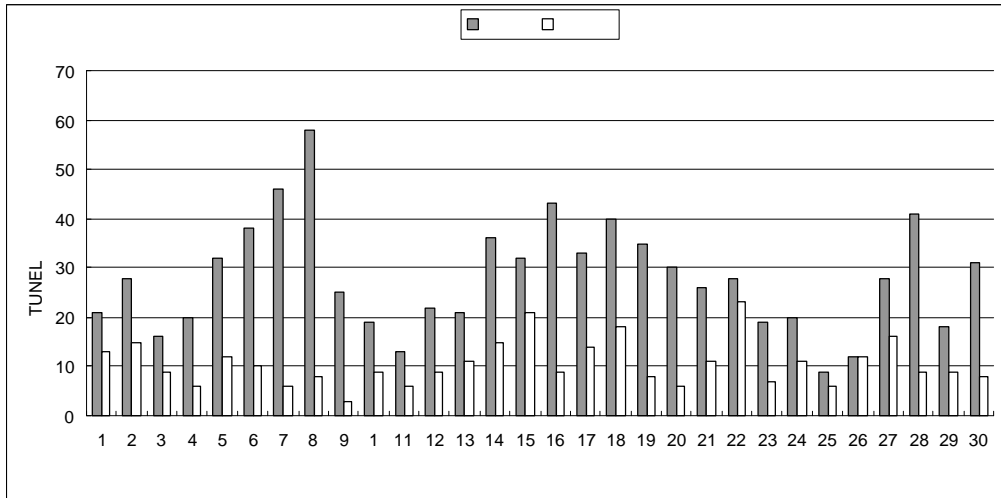


그림 5. TUNEL 양성세포수의 비교. 대조군은 0.2M L-glutamic acid 용액 5 $\mu$ l와 평형염액 5 $\mu$ l를 용성백서에 안내주입하고 4주에 얻어진 망막조직의 TUNEL 양성수이며 실험군은 0.2M L-glutamic acid 용액 5 $\mu$ l와 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 안내주입하고 4주에 얻어진 망막조직의 TUNEL 양성수이다. 대조군에 비해 실험군에서 TUNEL 양성이 많이 관찰된 경우는 없었다.

#### 다. 망막층의 광학현미경 소견

유리체강에 glutamate를 주입한 경우 정상망막조직에 비하여 망막신경절세포의 심한 수적인 감소와 세포질의 위축소견이 관찰되었으며 내망상층의 두께가 상대적으로 감소한 소견이 관찰되었다. 하지만 estradiol cypionate를 glutamate와 동시에 안내로 주입한 경우 glutamate를 안내주입한 경우에 비하여 내망상층 두께의 감소는 적었으며 망막신경절세포의 숫적 감소와 세포질 위축이 적게 나타나는 소견을 보였다.(그림 6.)

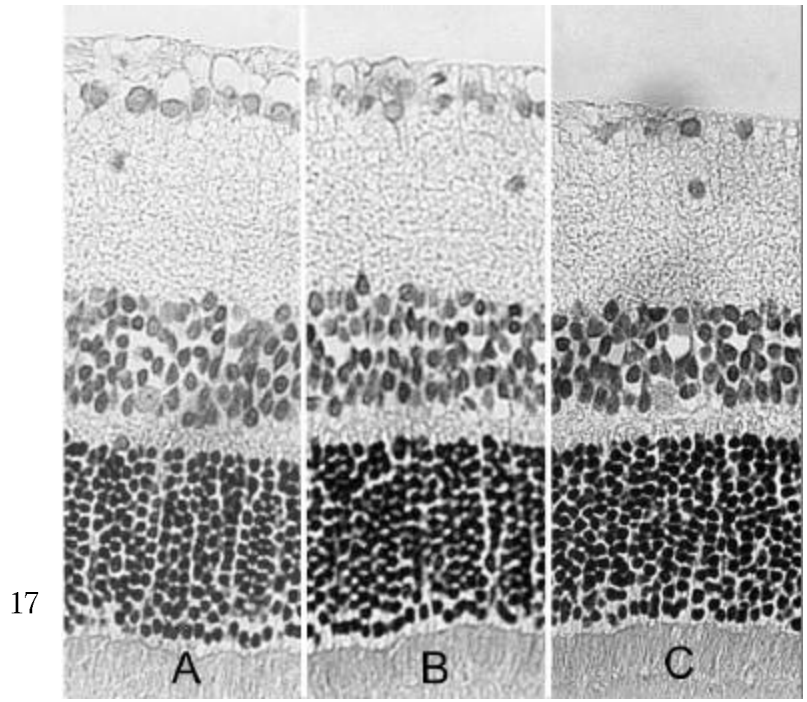


그림 6. 음성백서의 정상망막조직과 광학현미경으로 비교관찰한 실험군과 대조군의 망막조직. 대조군은 0.2M glutamate  $5\mu\text{l}$ 와 평형염액  $5\mu\text{l}$ 를 동시에 안내주입하였으며, 실험군은 0.2M glutamate  $5\mu\text{l}$ 와 0.013M estradiol cypionate  $5\mu\text{l}$ 를 동시에 안내주입하였다. 각군에서 시료의 안내주입후 4주에 얻어진 망막조직을 정상망막조직(A)과 광학현미경으로 비교관찰하였다. 대조군의 망막조직(C)은 정상망막조직에 비해 망막신경절세포의 수가 감소되고 내망상층의 두께가 줄어든 것이 관찰되었다. 실험군의 망막조직(B)은 대조군의 망막조직에 비해 망막신경절세포의 숫적감소가 적었으며 내망상층의 두께도 감소되지 않았다.(H-E 염색, X400)



## IV. 고 찰

녹내장은 망막신경절세포와 시신경축삭이 손상받아 비가역적인 시기능손상을 일으키는 질환이다. Neufeld는 녹내장이 발생한 눈에는 망막신경절세포가 정상인 상태, 병적인 상태, 퇴행 중인 상태, 죽은 상태가 함께 존재하며, 높은 안압등의 위험 요인과 이에 대한 감수성이 같이 작용하여 망막신경절세포가 손상받는 것으로 설명하고 있다.<sup>34</sup>

하지만 높은 안압이 조절되도 녹내장이 계속 진행되는 경우가 상당수 발견된다.<sup>35-38</sup> 따라서 안압을 조절하는 것만으로 녹내장의 진행을 완전히 억제할 수 없으며 이를 신경조직에서 관찰되는 이차변성의 과정으로 설명하고 있다. Yole등은 높은 안압이 조절되어도 시야손상은 계속 진행된다는 점과 진단 당시 시야손상이 심할수록 시야손상이 보다 빠르게 진행된다는 점을 녹내장의 진행이 이차퇴행과 관련된 증거로 제시하였다.<sup>39</sup> 따라서 망막신경절세포가 다양한 위험요인에 의해 일차손상을 입고 이에 따른 이차퇴행의 결과로 망막신경절세포의 수가 감소되어 가는 것이 녹내장이 진행되는 과정으로 생각되고 있으며, 이 과정은 apoptosis에 의한 것으로 알려졌다.<sup>40-42</sup>

망막신경절세포의 apoptosis에는 여러 요인이 관련되지만 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 중요성이 제시되고 있다. 녹내장 환자의 유리체에는 glutamate가 정상인에 비해 7배 높은 농도로 존재하여 망막신경절세포 손상을 유발하며, 녹내장의 중요한 위험요인으로 알려진 시신경유두의 허혈도 glutamate의 과도한 분비를 유발한다.<sup>43-46</sup> Glutamate는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor를 자극하여 calcium influx를 발생시키고 이에 따른 NO pathway의 활성화와 reactive oxygen의 유리를 유발하여 DNA의 nitrosylation, fragmentation등을 일으켜 신경세포의

apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>47</sup>

최근 망막신경절세포를 이차퇴행에 의한 손상으로부터 보호하여 녹내장의 진행을 억제하자는 신경보호치료의 개념이 제시되고 있다. 이차퇴행과 관련된 물질인 glutamate나 NO등을 억제하거나 신경세포의 apoptosis 자체를 억제하는 다양한 신경보호방법이 소개되고 있다.<sup>48-50</sup> 하지만 실제 이용가능한 약물은 극소수이며 그 부작용과 효과에 대한 연구가 진행중인 상태이다. 특히 녹내장에서 사용되는 약물은 calcium channel blocker 정도로 새로운 신경보호방법의 연구가 필요한 현실이다.

한편 난소호르몬인 estrogen은 1980년대 후반부터 Alzheimer's disease에 대한 신경보호효과가 보고되고 있다. 폐경기 이후의 estrogen 결핍은 인지능력장애와 신경세포손상을 유발하며, 폐경기 이후 호르몬 대체요법은 Alzheimer's disease의 발생을 억제한다고 보고된 바 있다.<sup>51,52</sup>

녹내장과 성호르몬과의 관련성은 아직 증명된 바 없으나 광우각녹내장은 여성보다 남성에서 호발하는 것으로 알려졌으며, 폐경기 이후인 60대 이후의 여성에서 폐경전인 40대보다 녹내장발병률이 2배 가까이 증가한다.<sup>53-55</sup> 또한 녹내장은 일종의 퇴행성중추신경질환으로 성호르몬인 estrogen과의 관련 가능성에 착안하여 본 연구가 시행되었다.

본 연구에서는 glutamate를 안내주입하여 녹내장과 유사한 망막신경절세포의 손상을 유발하고 동시에 estrogen을 안내주입할 경우 신경보호효과를 보이는지 확인하고자 시행되었다. 하지만 Estrogen은 녹내장치료를 위해 사용된 적 없는 약물로 투여방법이나 망막조직에 대한 독성등이 알려진 바 없다. 가능한 전신흡수를 줄이며 국소적으로 적용하기 위해 안내주입을 이용하였으며, 임상적으로 안전성이 확인된 시판 estradiol 제제인 estradiol cypionate를 이용하였다.

Estradiol cypionate는 인체에서 1회의 근육주사로 약 4주간의 지속효과를 가지는 약물로서 유리체강내로 주입된 경우 혈류를 통해 흡수되어 혈장

17 $\beta$ -estradiol 농도를 상승시킬지 여부를 확인할 필요가 있었다. 그리고 estradiol cypionate의 안내주입이 망막신경절세포에 손상을 일으키는지 여부를 확인하기 위하여 웅성백서 10마리(20안)을 이용한 실험(실험 1)이 시행되었다. 그 결과 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l의 안내주입은 혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도를 증가시키지 않으며 망막신경절세포와 수정체나 각막의 손상을 유발하지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 estradiol cypionate는 안내주입 4주 후에도 유리체강에 남아있는 것을 알수있었다.(그림 3)

안내주입된 estrogen이 glutamate에 의해 유발된 망막신경절세포의 손상을 억제하는지를 확인하기 위한 실험(실험 2)의 결과 0.2M L-glutamic acid 5 $\mu$ l와 평형염액 5 $\mu$ l를 안내주입한 대조군의 경우 48개의 연속된 400배 현미경시야에서 평균 28개의 TUNEL 양성세포가 관찰된 반면 0.2M L-glutamic acid 5 $\mu$ l와 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 안내주입한 실험군의 경우 평균 10.7개의 TUNEL 양성세포가 관찰되어 통계학적으로 유의하게 적은 수의 TUNEL 양성세포가 관찰되었다.(p<0.01) 대조군의 경우 TUNEL 양성세포가 9개에서 58개까지 분포하여 개체별 차이는 있었으나 대상동물 각각에서 실험군인 좌안 모두가 우안보다 적은 수의 TUNEL 양성세포가 관찰되었다.(그림 5) 대조군과 실험군의 망막조직을 광학현미경으로 관찰한 결과 대조군의 망막조직에서 estradiol cypionate가 안내주입된 실험군의 망막조직에 비하여 심한 망막신경절세포와 내망상층의 위축이 관찰되었다.(그림 6) 실험 1과 실험 2 모두에서 안내주입된 estradiol cypionate가 안내주입 4주경에도 유리체강에 지속적으로 남아있는 것이 확인되었으며, 이를 통해 최소 4주 동안은 완전히 흡수되지 않고 국소적으로 계속 작용하는 것을 알 수 있었다.(그림 3) 이와 같은 결과를 종합하여 백서에서 안내주입된 estradiol cypionate가 최소 4주 이상 국소적으로 작용하여 glutamate에 의한 망막신경절세포의 손상을 억제하는 것을 알 수 있었다.

최근 밝혀진 바에 따르면 estrogen은 신경세포에 독성을 가지는 amyloid

$\beta$ -protein precursor를 분비하지 못하게 하거나 glutamate등의 산화작용을 방지하는 등 다양한 기전의 신경보호효과를 가진 것으로 밝혀졌으며, 신경세포안에 존재하는 estrogen수용체와 결합하여 bcl-2와 bax유전자등을 조절하여 apoptosis를 억제하는 것이 알려졌다.<sup>56-61</sup> 안내주입된 estradiol cypionate가 glutamate에 의한 망막신경절세포의 손상을 억제하는 기전으로는 estradiol이 glutamate와 같이 유리체강내에 존재하면서 항산화작용을 통해 glutamate의 신경독성을 직접 억제했을 가능성과 4주간 망막조직에 작용하면서 신경세포의 유전자 조절을 통해 신경보호효과를 나타냈을 가능성을 생각할 수 있다. Estrogen은 glutamate에 의한 NMDA receptor의 활성을 직접 억제하는 항산화작용을 가지고 있으며, estrogen의 phenol구조에서 A ring의 C3위치에 부착된 hydroxyl group이 주된 작용을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>62-66</sup> 또 1주간 전신적인 estrogen 처치를 한 백서에 뇌경색을 유발할 경우 뇌조직에서 발생하는 bcl-2 유전자의 저하과정을 방지된다는 사실을 고려하면 최소 4주이상 유리체강에 남아있는 estrogen이 유전자를 조절했을 가능성을 완전히 배제하기 어렵다.

본 연구에서는 안압상승에 의한 망막신경절세포의 손상을 배제하고 직접 망막신경절세포를 손상시킨 실험모델에서 안내주입된 estrogen이 신경보호 효과를 가진다는 사실을 알수있었다. 이는 안압이 정상적으로 조절되어도 진행되는 녹내장의 치료에 적용될 수 있다고 생각되며, 안내주입된 estrogen이 4주 이상 유리체강에 존재하는 사실은 만성질환인 녹내장의 치료에 유리한 점이라고 생각된다. 안내주입된 estrogen이 전신흡수없이 신경보호효과를 가진다는 점은 남성이나 가임기여성에 사용할 수 있다는 것을 제시한다.

Estrogen은 녹내장의 신경보호치료에는 아직 연구된 적 없는 물질로서 정확한 작용기전을 밝히고 안전하게 임상적으로 사용할 수 있는 방법을 찾는 것이 앞으로 필수적인 연구분야라고 생각된다.

## V. 결 론

유리체강으로 주입된 estrogen이 glutamate에 의한 망막신경절세포손상을 억제하는지 알아보고자 웅성백서를 이용하여 실험하였다. 안내주입된 estrogen의 전신흡수와 안구독성을 확인하기 위해 웅성백서 10마리를 대상으로 수술전 정맥혈을 채취한 후 우안에 평형염액 5 $\mu$ l, 좌안에 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 주입하고 4주후 안구와 정맥혈을 채취하여 비교관찰하였으며, 웅성백서 30마리를 대상으로 양안에 0.2M L-glutamic acid 용액(pH 7.0) 5 $\mu$ l를 주입한 직후 우안에는 평형염액 5 $\mu$ l, 좌안에는 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 주입하고 4주에 얻어진 망막조직을 TUNEL 염색을 이용해서 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 한쪽 눈의 유리체강에 주입할 경우 대상동물의 혈장 17 $\beta$ -estradiol 농도를 높이지 않았다.
2. 유리체강으로 주입된 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l는 수정체 및 각막의 손상이나 망막신경절세포의 apoptosis를 유발하지 않았다.
3. 안내주입된 estradiol cypionate는 주입 4주에도 유리체강에서 존재를 확인할 수 있었다.
4. 0.2M L-glutamic acid 5 $\mu$ l와 평형염액 5 $\mu$ l를 유리체강으로 주입한 경우 48개의 연속된 400배 현미경시야에서 평균 28개의 TUNEL 양성세포가 관찰된 반면 0.2M L-glutamic acid 5 $\mu$ l와 0.013M estradiol cypionate 5 $\mu$ l를 같이 주입한 경우 평균 10.7개가 관찰되어 매우 유의하게 적은 수의 TUNEL

양성세포를 관찰할 수 있었다.( $p < 0.01$ )

4. 유리체강으로 주입된 estradiol cypionate는 glutamate에 의해 유발된 망막신경절세포와 내망상층의 손상을 억제하는 것이 망막조직의 광학현미경 소견에서 확인되었다.

이상의 결과로 백서의 유리체강으로 주입된 estradiol cypionate는 전신흡수되지 않고 최소 4주간 유리체강에 지속적으로 존재하며 glutamate에 의한 망막신경절세포손상을 억제함을 알 수 있었다. 따라서 estrogen의 유리체강내 주입이 녹내장에서 발생하는 망막신경절세포의 손상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Allingham RR ; Overview In : Albert DM, Jakobiec FA, editors. Principles and practice of Ophthalmology. Philadelphia : W.B.Sanders Co.;1994.
2. Quigley HA, Green WR. The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. Ophthalmology 1979;86:1803-30.
3. Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. Bull World Health Org 1995;73:115.
4. Armaly MF, Krueger DE, Maunder L, Becker B, Hetherington J Jr, Kolker AE, et al. Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defect. Arch Ophthalmol 1980;98: 2163-71.
5. Harris A, Sergott RG, Spaeth GL, Katz JL, Shoemaker JA, Martin BJ. Color Doppler Analysis for ocular blood velocity in normal tension glaucoma. Am J Ophthalmol 1994;118:642-9.
6. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. Am J Ophthalmol 1989;107:186-8.
7. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. Arch Ophthalmol 1981;99(4):635-49.

8. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:774-86.
9. Valenzuela EG, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 1996;61:33-44.
10. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957;58:193-201.
11. Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice: electron microscopy of acutely evolving lesion. *J neuropathol Exp Neurol* 1969;28:455-74.
12. Dandona L, Hendrickson A, Quigley HA. Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1593-98.
13. Bray GM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA, Aguayo AJ. Neuronal and non-neuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth and connectivity after axotomy. *Ann NY Acad Sci* 1991;633:214-28.
14. Thanos S, Mey J, Wild M. Treatment of the adult retina with microglial suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and changes axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci* 1993;13:455-66.
15. Levin LA, Schlamp CL, Spieldoch RL. Identification of the bcl-2 family genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2545-53.



16. Bonfoco E, Krainc D, Ankarercrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or NO/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162-6.
17. Lipton S. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists. *Trans Neurosci* 1993;16:527-32.
18. Rego AC, Santos MS, Oliveria CR. Oxidative stress, hypoxia, and ischemia-like conditions increase the release of endogenous amino acids by distinct mechanism in cultured retinal cells. *J Neurochem* 1996;66:2506-16.
19. Dreyer EB. A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 1998;7:62-7.
20. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75:364-7.
21. Kitazawa Y, Shirai H, Go FJ. The effect of  $Ca^{2+}$ -antagonist on visual field in low-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989;27:408-12.
22. Toung TJ, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* 1998;29:1666-70.
23. Behl C. Amyloid  $\beta$ -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 1997;290:471-80.
24. Sheltens P, van Gool WA. Emerging treatments in dementia. *Eur Neurol* 1997;38:184-9.

25. Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS, et al. The Framingham Eye Study. I. Outline and major prevalence findings. *Am J Epidemiol* 1977;106(1):17-32.
26. Kahn HA, Milton RC. Alternative definitions of open-angle glaucoma. Effect on prevalence and associations in the Framingham eye study. *Arch Ophthalmol* 1980;98:2172-7.
27. Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP. Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1995;113:918-24.
28. Richler M, Werner EB, Thomas D. Risk factors for progression of visual field defects in medically treated patients with glaucoma. *Can J Ophthalmol* 1982;17:245-8.
29. Klein BE, Klein R, Jensen SC, Ritter LL. Are sex hormones associated with age-related maculopathy in women? The Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:289-97.
30. The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for idiopathic macular holes. *Am J Ophthalmol* 1994;118:754-61.
31. Klein BE, Klein R, Lee KE. Incidence of age-related cataract: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1998;116:219-25.
32. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sason SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;11:493-501.
33. Sisk DR, Kuwabara T. Histologic changes in the inner retina of albinorats following intravitreal injection of monosodium L-Glutamate. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985;23:250-8

34. Neufeld AH. New conceptual approaches for pharmacological neuroprotection in glaucomatous neuronal degeneration. *J Glaucoma* 1998;7:434-8.
35. Mao LK, Stewart WC, Shields MB. Correlation between intraocular pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1991;111:51-5.
36. Araujo SV, Spaeth GL, Roth SM, Starita RJ. A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroid after trabeculectomy *Ophthalmol* 1995;102:1753-9.
37. Nouri-Mahdavi K, Brigatti L, Weitzmann M, Caprioli J. Outcome of trabeculectomy for primary open-angle glaucoma. *Ophthalmol* 1995;102:1760-9.
38. Jay JL, Alan D. The benefit of early trabeculectomy versus conventional management in primary open-angle glaucoma relative to severity of disease. *Eye* 1989;3:528-35.
39. Scharz M, Belkin M, Yole E, Solomon A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma* 1996;5:427-32.
40. Mckinnon SJ. Glaucoma, apoptosis, and neuroprotection. *Curr Ophthalmol* 1997;8:28-37.
41. Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J Glaucoma* 1996;5:345-56.
42. Nickells RW, Zack DJ. Apoptosis in ocular disease: a molecular review. *Ophthalmic Genet* 1996;17:145-165.

43. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996;114:299-305.
44. Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentrations in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997;58:864-7.
45. Dreyer EB. Amino acid abnormalities in the vitreous of the buphthalmic rabbit. *Vet Comp Ophthalmol* 1997;7:192-5.
46. Dreyer EB. The potential for neuroprotection in glaucoma. *Ophthalmol Clinic North Am* 1997;10:365-76.
47. Rego AC, Santos MS, Oliveria CR. Oxidative stress, hypoxia, and ischemia-like conditions increase the release of endogenous amino acids by distinct mechanism in cultured retinal cells. *J Neurochem* 1996;66:2506-16.
48. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 1995;26:503-13.
49. Chew SJ, Ritch R. Neuroprotection. The next breakthrough in glaucoma? Proceedings of the third annual optic nerve rescue and restoration think tank. *J Glaucoma* 1997;6:263-6.
50. Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JPM, Nash MS. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43[suppl 1]:S102-28.
51. Simpkins JW, Singh M, Bishop J. The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of the cognitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging Suppl* 1994;15:195-7.

52. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 1994;140:256-61.
53. Leske MC, Cornell AMS, Wu S-Y, Hyman LG, Schachat AP. Risk Factors for Open-angle Glaucoma: The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1995;113:918-24.
54. Wu S-Y, Leske CM. Associations with intraocular pressure in the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1572-6.
55. 이재범, 조용수, 최영주, 홍영재. 한국 성인에서의 녹내장 유병률. *한안지* 1993;34:65-9.
56. Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE. Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J Biol Chem* 1994;269:13065-8.
57. Toran-Allerand CD, Hashimoto K, Greenough WT, Saltarelli M. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. III. Effects of estrogen on dendritic differentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 1983;7:97-101.
58. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski. Antioxidant potential of specific estrogens and lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1095-7.
59. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. 17 $\alpha$ -estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 1997;17:511-5.
60. Clark JH, Peck EJ. female sex steroids, receptors and function. *Monogra Endocrinol* 1979;14:4-36.

61. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 1999;19:6385-93.
62. McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trend Pharmacol Sci* 1991;12:141-7.
63. Paul SM, Peck RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992;6:2311-22.
64. Subbiah R, Kessel MTB, Agrawal M, Rajan M, Abplanalp W, Rymaszewski Z. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1095-7.
65. Coyle JT, Puttfarcken. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689-95.
65. Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH.  $17\beta$ -estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Research* 1997;761:338-41.
66. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsber F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Mol Pharmacol.* 1997;51:535-41.

**Abstract**

**The Effect of estrogen on retinal ganglion cell damage induced  
by L-glutamic acid in rats**

**Sung Soo Kim**

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Jae Hong)

The loss of vision in glaucoma patients is a consequence of damage to optic nerve axons, with resulting death of their retinal ganglion cells (RGCs). In recent years it has been shown that RGCs die after axonal injury via a programmed cell death process called *apoptosis*. In particular, the amino acid glutamate has been shown to act as a neurotoxin and induce the apoptosis of RGCs. The term "*neuroprotection*," refers to the postinjury protection of partially damaged RGCs that continue to remain at risk. Many neuroprotective agents have been presented for degenerative neural disorders, but rare medications, e.g. calcium channel blockers, can be used for glaucomatous optic neuropathy. Recent studies suggest that estrogens have neuroprotective effects in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, and effects against oxidative stress which caused neuronal death.

This study was designed to investigate neuroprotection against glutamate-induced RGCs damage afforded by intravitreal estradiol. The study consisted of two experiments. Experiment 1 was planned to evaluate

systemic influence and ocular toxicity by intravitreal injection of estradiol, and experiment 2 was planned to evaluate neuroprotection of intravitreal estradiol against glutamate-induced apoptosis of RGCs. In experiment 1, twenty eyes of ten male Sprague-Dawley rats (250-300gm) were included, and divided into two groups. Before intravitreal injection, venous blood was acquired for evaluation of plasma  $17\beta$ -estradiol level. In group of 10 right eyes,  $5\mu\text{l}$  of Balanced salt solution(BSS<sup>®</sup>, Alcon, USA) was carefully injected with the aid of a Hamilton microsyringe, and in group of ten left eyes,  $5\mu\text{l}$  of 0.013M estradiol cypionate was injected. The injected eyes were examined for 4 weeks, and removed. Before sacrifice of the rats, blood samples were obtained for evaluating plasma  $17\beta$ -estradiol level after intravitreal injection of estradiol. The retinal whole mounts were prepared for terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick-end labeling(TUNEL), and the examination for apoptosis was done. No gross changes of ocular structure and apoptosis of RGCs were found in all eyes, and intravitreal injection of estradiol in one eye showed no effect on plasma  $17\beta$ -estradiol level. To evaluate neuroprotection by intravitreal estradiol, thirty rats were included for the study. With the aid of a Hamilton microsyringe,  $5\mu\text{l}$  of a 0.2M monosodium L-glutamate solution(pH7.0) was carefully injected into each eye of 30 rats. Following injection of glutamate,  $5\mu\text{l}$  of Balanced salt solution was injected into right eyes(control group), and  $5\mu\text{l}$  of 0.013M estradiol cypionate into left eyes(estradiol-treated Group). Four weeks after injection, rats were sacrificed and retinal whole mounts were prepared. TUNEL positive cells were significantly decreased in the retinal whole mount of the estradiol-treated group compared with control group.( $p < 0.01$ ) These findings indicated that the neuroprotection against glutamate-induced RGCs damage is afforded by intravitreal injection of estradiol. Intravitreal injection of estradiol may be a potential therapeutic modality used to prevent glaucomatous optic neuropathy without significant side effects of estrogen.

---

Key Words: Glutamate, estrogen, estradiol, apoptosis, glaucoma