가토의 녹내장 모델에서 국소적 안구 표면냉각의 망막신경절세포 손상에 대한 보호 호과

연세대학교 대학원

의 학 과

최 철 명

가토의 녹내장 모델에서 국소적 안구 표면냉각의 망막신경절세포 손상에 대한 보호 호과

지도 홍 영 재 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 철 명

최철명의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 각별한 지도와 격려를 배풀어 주신 홍영재 교수님께 진심으로 감사를 드리며 논문 준비과정 동안 자상한 충고와 가르침으로 이끌어주신 백남호 교수님, 안영수 교수님, 김원호 교수님, 성공제 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 연구 진행과정에 필요할 때마다 도움을 아끼지 않으신 김응권 교수님, 고형준 교수님, 김찬윤 교수님, 김성수 선생님과 안과 의국원들게 감사를 드립니다.

그리고 끝없는 사랑으로 저를 물심양면으로 뒷받침하여 주신 아버님, 어머님과 항상 곁에서 사랑으로 응원해준 아내 혜영이와 딸 지원이와 함께 이 기쁨을 나누고싶습니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문요약

가토의 녹내장 모델에서 국소적 안구 표면냉각의 망막신경절세포 손상에 대한 보호 효과

목적 : 가토에서 국소적 안구 표면냉각이 망막 온도 변화에 미치는 영향과 안압을 상승시킨 가역적 급성녹내장 모델에서 망막신경절세포 손상에 대한 안구 표면냉각의 신경보호효과를 알아 보고자 하였다.

방법 : 국소적 안구 표면냉각이 망막온도변화에 미치는 영향을 보기 위하여 백색가토의 양안에 thermocouple probe를 모양체 평면부를 통해 삽입하여 망막 표면에 위치시켰다. 한쪽 눈은 평형염액(Balanced salt solution)수액병에 26G 주사침을 연결한 후 전방천자를 하여 안압을 상승시켰고(고안압안), 반대 안은 안압을 상승시키지 않았다(정상안압안). 양안 안구 표면에 얼음을 대어 국소냉각 시키면서 망막온도를 1시간동안 측정하였다.

고안압으로 야기된 망막신경절세포 손상에 대한 저체온의 보호효과를 보고자 양안 안압을 동일한 방법으로 상승시킨 후 한쪽 눈은 1시간 동안 냉각을 시키고(냉각안), 다른 쪽은 냉각을 시키지않았다(비냉각안). 실험 후 24, 48, 72시간째에 안구를 적출하고 각막천공기를 이용해 직경 7㎜ 크기의 원형 망막조직을 얻어 TUNEL(Tdt-mediated fluorescein-dUDP nick-end labeling) 염색을 하고 형광현미경 하에서 TUNEL 양성 세포수를 측정하였다. 시신경 상부 망막조직 hematoxylin-eosin stain을 시행하고 광학현미경으로

정상 망막신경절세포수를 관찰하였다.

결과 : 실험 전 망막온도의 평균은 정상안압안이 38.7℃, 고안압안이 38.5℃였으며($p>0.05$) 1 시간 동안 냉각시킨 후 망막 온도는 정상안압안과 고안압안이 각각 37.3℃, 32.7℃로 고안압안에서 온도감소 효과가 유의하게 컸다($p<0.05$). 안압을 상승시킨 녹내장 모델에서 평균 TUNEL 양성세포수는 비냉각안과 냉각안에서 각각 24 시간째 83.7, 32.3($p<0.05$), 48 시간째 194.8, 81.0($p<0.05$), 72 시간째 359.9, 89.9(개, $p<0.05$)로 비냉각안에 비해 냉각안에서 통계학적으로 의의있게 적었다. 그러나 정상망막신경절 세포수는 비냉각안과 냉각안에서 각각 24 시간째 3.1, 3.6($p>0.05$), 48 시간째 2.8, 3.4($p>0.05$), 72 시간째 2.4, 3.3($p<0.05$)로 72 시간째에만 유의한 차이를 보였다.

결론 : 안구의 국소냉각은 고안압 상태에서는 망막온도를 유의하게 하강 시켜 경도의 저체온 (망막 저온) 상태를 유도할 수 있었으며, 또한 가역적으로 고안압를 유도한 급성 녹내장 모델에서 안구의 국소적 표면 냉각으로 망막신경절세포손상을 줄일 수 있었다.

핵심되는말 : 녹내장, 저체온, TUNEL, 신경보호, apoptosis

가토의 녹내장 모델에서 국소적 안구 표면냉각의 망막신경절세포 손상에 대한 보호 효과

<지도 홍 영 재 교수>

연세대학교 대학원 의학과

최 철 명

I. 서론

녹내장은 실명에 이르는 대표적 질환 중 하나로 [1] 시신경의 특징적인 변화 및 시야 결손을 동반한다. 녹내장에서 시력의 소실은 시신경 축삭의 손상과 망막신경절세포사(retinal ganglion cell death)가 주된 원인으로 생각되며 [2,3] 망막신경절세포사는 녹내장으로 인한 시력 소실의 공통적인 경로라고 생각 되고 있다.[4] 녹내장에서 망막신경절세포의 손상이 일어나는 기전은 크게 두 가지 접근 방향에서 제시 되고있다. Mechanical hypothesis 는 시신경 유두의 사상판 부위에서 결체조직 배열의 변화로 망막신경절세포 축삭의 rapid-phase axonal transport 의 장애가 생겨 망막신경절세포이 손상되는 것이라고 설명하고 있다.[5] Vascular hypothesis 는 안압 상승과 동반된 허혈이 신경절세포의 사인이라는 것이다.[6,7] 녹내장성 망막신경절세포사에서 apoptosis 의 역할이 [8] 부각 되고있으며, 이는 녹내장의 동물실험 모델

로 안압을 인위적으로 상승시킨 경우 apoptosis 가 확인 되었고,[3,9] 녹내장 환자의 사후 부검시 획득한 망막에서도 apoptosis 가 관찰된 바 있다.[10] 녹내장에서 apoptosis 의 세부기전으로 orthograde 및 retrograde 축삭이동 장애,[2,11-13] neurotrophic factor (neurotropin) deprivation,[14-17] excitotoxin[18,19] 과 NO(산화질소) 경로의 관련성이 [20,21] 거론되고 있으며 망막신경절세포를 보호하기 위해 이러한 기전들을 조절하려는 신경보호 개념이 거론되고 있다.[4,22-24]

저체온(hypothermia)은 허혈성/저산소 상태에서 신경보호의 한 방법으로 50 년대 말부터 [25] 대두 되었으며 최근에 경도의 체온 저하로도 신경보호 효과가 보고되어 [26-31] 그 가치가 재조명이 되고 있으며, apoptosis 의 억제 효과도 보고 되고 있다.[32,33] 뇌에서 저체온에 의한 신경보호 효과의 기전으로는 대사율의 감소, 혈류의 회복, 뇌혈관장벽의 보존등이 알려져 있고 그 외에 신경전달물질(glutamate) 유리억제, 신경내 calcium mobilization 억제, glutamate 수용체 활성 지속 억제, 미세아교세포 증식억제, superoxide anion 과 NO 생성 억제, protein kinase 활성도의 변화, cellular repair protein 의 재합성 [34,35] 등의 가능성도 거론되고 있다.

안구에서 저체온의 효과를 보기위해 전신적 저체온을 유도하는 것은 부작용의 위험으로 인하여 임상응용에 제한 점이 되기 때문에 국소적 냉각으로 안구의 저체온을 유도하는 방법을 고려해 볼 수 있다. 안구표면 냉각이 안구 내부 온도에 미치는 영향에 대해서는 Stiehl 등이 보고한 바 있으며,

이들은 고양이 눈의 표면 냉각으로 결막 온도를 6℃로 낮추었을 때 전방과 수정체의 온도저하는 외부온도 변화에 영향을 받지만 망막온도 변화는 미미하다고 하였다.[36] 따라서 안구의 국소적 표면 냉각만으로 실제 안구 후방의 망막 온도 변화를 유발할 수 있느냐가 문제가 된다. 정상상태의 안구는 표면 냉각 시 망막온도 변화가 거의 없으나 혈관 수축제를 후구 부위에 투여하면 망막온도가 저하된다고 알려져 있다. 실험적으로 안압을 상승 시키면 망막 및 맥락막 혈류의 장애가 오기 때문에 표면 냉각만으로도 망막온도의 저하를 야기 시킬 수 있을 것이라는 가정 하에 연구를 진행하였다.

본 연구에서 선택한 동물실험 모델은 안압 상승과 허혈이 모두 나타나는 환경을 제공하며 가역적으로 안압 상승을 조절할 수 있는 Adachi 등의 방법을 따르기로 하였다.[37] 이 방법은 시신경에서 중심망막 동맥만 결찰 하는 경우나[38] 부분적 시신경 절제를 한 경우[3,39] 보다는 안구내 환경이 녹내장에 가깝다고 볼 수 있다. 안구에서 망막신경절세포 손상에 대한 실험적 저체온의 효과를 판정하기위해 망막신경절세포층의 두께를 측정하는 방법,[37] 조직학적으로 pyknotic nuclei 를 관찰하는 방법,[38] ERG 측정[40] 등이 시도 된바 있다. 본 연구에서는 망막신경절세포의 손상을 정량적으로 비교하기 위해 동일 면적, 동일 부위의 망막 조직에 대해 TUNEL 방법을[3,41] 이용한 apoptosis 측정과 광학현미경하 망막신경절세포의 조직학적인 소견을 종합하여 저체온의 신경보호 효과를 판정하였다.

안구표면을 국소적으로 냉각시켰을 때 안구내부의 망막 온도 변화를 살

펴봄으로써 망막부위의 저 체온을 유도하는 것이 가능한지를 알아보고, 망막의 국소적 저 체온이 유도되면 안압 상승으로 인한 망막신경절세포 손상에 대해 어느 정도의 보호 효과를 나타내는지를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

동물실험은 연세대학교 임상연구센터 실험동물위원회의 검토와 승인 하에 이루어졌으며 33 마리의 2~4kg성인 백색 가토를 사용하였다. 가토의 평균 체온(rectal temperature)은 38.5 ~ 39.5℃였고 사육은 22 ±2℃의 온도, 50 ±10%의 습도, 40~50Phon이하의 소음, 12 시간 명/암의 조명 하에 이루어졌다. 실험 1 시간 전에 동공산대를 위해 1% cyclopentolate hydrochloride를 양안에 점안하여 망막 관찰이 용이하도록 하였다.

1. 안구 표면의 국소냉각이 망막온도에 미치는 영향

안구 표면의 국소냉각이 망막온도 변화에 대한 영향을 보기위해 8마리의 가토를 사용하였다. Xylazine 0.1ml/kg 정맥주사와 ketamine 1ml/kg 근육주사로 마취한 후 양안에 각막 윤부에서 1.5㎜ 떨어진 공막 부위에 sharp blade 로 0.8㎜ 의 절개를 넣은 후 도상 검안경 관찰 하에 직경 0.8㎜ 의 needle microprobe(PGC scientifics, Frederick, MD, USA)를 삽입하여 시신경 유두 하방 1 유두직경 거리의 망막 부위에 위치시킨 후 고정하였다. 두개의 probe 를 dual input thermocouple thermometer (PGC Scientifics, Frederick, MD, USA)에 연결한 후 동시에 양안의 망막 온도를 실시간으로 측정하였다. 우안(정상안압안)은 얼음으로 표면냉각만 시키고 좌안(고안압안)은 녹내장 모델을 만들기 위해 26G 주사침을 각막 윤부를 통해 전방 천

자를 실시하고 평형염액(balanced salt solution, Alcon, Fort Worth, TX, USA) 수액병에 연결 100㎝ 높이에서 주입하여 안압을 상승시킨 후 우안과 동일하게 표면냉각을 실시하였다. 표면 냉각 전 망막온도를 측정한 다음 1 시간동안 표면 냉각을 하면서 5 분 간격으로 망막 온도를 기록하였으며 실험 전후로 Tonopen XL(Mentor,Norwell, MA, USA)로 안압을 측정하였다. 표면 냉각용 얼음은 증류수를 10㎖ 주사기에 넣어 얼린 것을 사용하였다.

2. 녹내장 모델에서 저체온의 망막신경절세포에 대한 보호효과

녹내장 모델에서 국소냉각의 망막신경절세포사에 대한 보호효과를 보기 위해 22 마리의 가토를 사용하였다. 마취를 한 후 우안(비냉각안)은 표면 냉각 없이 안압만 상승 시키고 좌안(냉각안)은 안압 상승 및 얼음으로 표면 냉각을 실시하였다. 실험 전후로 안압을 측정하였으며, 1 시간 후 안구에 삽입한 수액셑을 제거하고 수술현미경으로 주사침 삽입부위 각막에서의 방수 누출을 확인한 후 필요한 경우 10-0 nylon 으로 봉합하였다. 감염 방지를 위해 항생제 안약을 1 일 4 회 국소 점안하고 24, 48, 72 시간 경과 후 과량의 마취제 주사로 토끼를 사망 시킨 후 양측 안구를 적출하였다. 실험을 하지 않은 가토 3 마리의 6 안을 적출하여 비교 하였다. 적출 안구는 저배율 해부현미경(Olympus SZ-ST, Olympus, Tokyo, Japan)하에 안구를 적도면에 따라 반으로 절개한 후 유리체를 망막으로부터 완전히 분리하고 7.0㎜ trephine 으로 원형 망막조직을 얻은 후 poly-L-lysine 0.01% aqueous

solution 으로 전처리 한 슬라이드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 조직을 붙였다. 4% paraformaldehyde(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 30 분동안 고정한후 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 세척하였다. DNA nick end labeling 은 TUNEL 방법에 준하여 [3,41] 시행하였다. Proteinase K 14~20μg/ml(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 실온에서 1 시간 permeabilization 시킨 후 PBS 로 2 분간 3 회 세척하였다. In situ cell death detection kit - POD(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 사용 37℃ 배양기에서 1 시간 동안 반응을 시켰다. PBS 로 세척하고 건조한 다음 mounting media 로 prolong antifade kit(Molecular probes, Eugene, OR, USA)를 사용한 후 apoptosis 의 정량적 측정을 위해 Olympus BH-2 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 한 슬라이드당 망막신경절세포층의 TUNEL 양성세포를 측정하였다. 형광현미경의 excitation 파장은 460~490nm, detection은 515nm 파장의 필터를 사용하였다. 광학 현미경 관찰은 시신경유두에 수직으로 10x3mm 의 크기로 공막이 부착된 상태의 망막조직을 분리하여 파라핀에 넣어 3μm 의 두께로 잘라 hematoxylin-eosin(H-E) stain 후 망막신경절세포수를 광학현미경 하에서 시신경유두 경계 부위부터 400 배의 배율에서 10 필드를 센 후 평균을 내어 1 필드 당 세포수를 측정하였다.

III. 결과

1. 안구 표면의 국소냉각이 망막온도에 미치는 영향

실험실 온도는 23~24℃ 였으며 실험전 안압은 13.3 ±3.5㎜Hg 였고 안압을 상승시킨 경우 안압은 53.7 ±1.7㎜Hg 였다. 냉각전 망막온도의 평균은 정상안압안이 38.7℃, 고안압안이 38.5℃로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$, Wilcoxon Signed Ranks Test). 양안에 국소적 표면 냉각을 한 경우 안압을 상승시키지않은 군(정상안압안)은 망막온도가 20 분 경과 후 36.8℃, 60 분 경과 시 37.3℃로 온도 저하가 별로 없었던 반면 안압을 상승시킨군(고안압안)에서는 20 분에서 33.3℃까지 급격히 떨어지다가 60 분에서는 32.7℃로 고안압안에서 망막온도가 유의하게 낮았다($p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks Test)(그림 1).

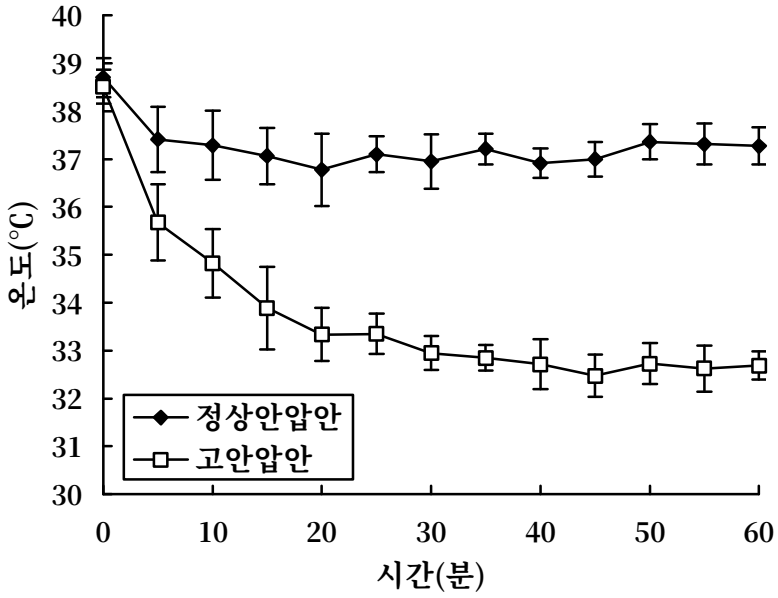

그림 1. 정상 및 고안압안에서 안구표면 냉각이 망막온도에 미치는 영향. 망막온도를 5 분 간격으로 측정하여 평균 ±표준편차로 표시함. 정상안압안과 고안압안은 20 분에 36.8℃와 33.3℃ 였으며 60 분에는 37.3℃와 32.7℃로 냉각 전 망막온도를 제외한 나머지에서 고안압안의 망막온도가 유의하게 낮았다($p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks Test).

2. 녹내장 모델에서 저체온의 망막신경절세포에 대한 보호효과

실험 전 평균 안압은 비냉각안과 냉각안에서 각각 13.2㎜Hg, 13.6㎜Hg 이었으며 안압을 상승 시킨 경우 53.9㎜Hg, 54.1㎜Hg 로 안압이 상승 했다. 실험 후 안압은 4.4㎜Hg, 4.0㎜Hg 로 실험전과 비교하여 감소하였으며 비냉

각안과 냉각안간의 안압은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(표 1). 1 마리를 제외하고는 실험 후 전방깊이가 잘 유지되어 전방 천자부위의 봉합이 필요하지는 않았다.

표 1. 가토에서 녹내장 모델을 유도한 후 냉각여부에 따른 안압[1]변화

	비냉각안	냉각안
실험전[2]	13.2 ±4.0	13.6 ±3.9
고안압유도후[2]	53.9 ±1.9	54.1 ±2.0
실험종료[2]	4.4 ±2.4	4.0 ±2.1

[1] 단위는 mmHg 이고 값은 평균 ±표준편차로 나타냄

[2] $p > 0.05$ (Wilcoxon Signed Ranks Test)

저체온의 망막신경절세포에 대한 보호효과를 보기 위하여 TUNEL 염색 후 형광으로 표식 된 핵을 망막신경절세포층에서 관찰하였다. Apoptotic cell 에서 DNA fragmentation 이 핵의 주변부부터 시작되어 강한 형광을 보였으며 apoptosis 가 진행된 경우 핵은 더욱 수축되거나 다양한 크기의 granular bodies 를 보이기도 하였다(그림 2). TUNEL 양성을 보이는 세포수를 측정하기 위해 400 배에서 형광 현미경으로 관찰 하였으며 정확한 식별이 필요한 경우는 1000 배를 이용하기도 하였다.

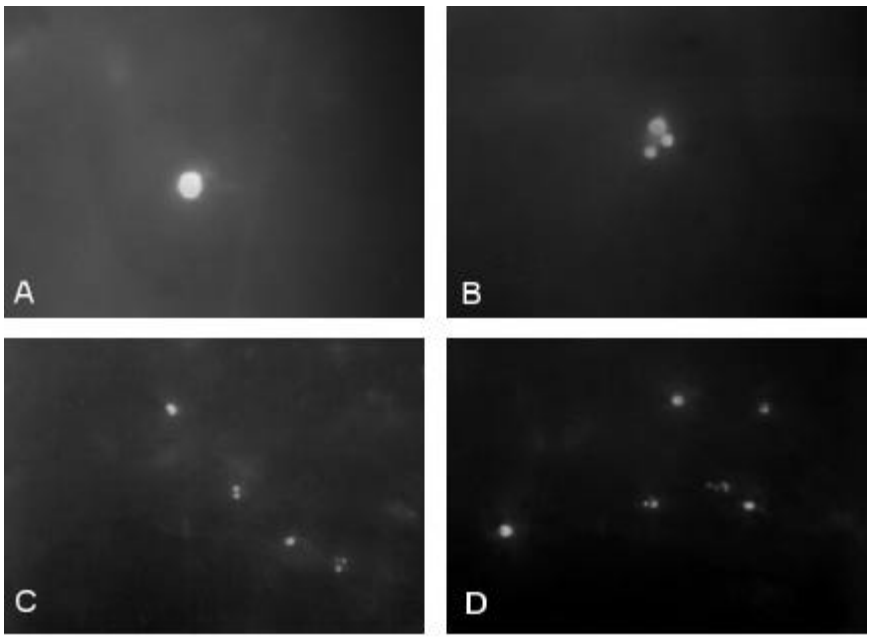

그림 2. TUNEL 염색후 형광으로 표식된 망막신경절세포층. 핵의 주변 부위에 강한 형광을 보이는 경우(A, x1000)와 여러 조각의 apoptotic body 가 관찰되는 경우 TUNEL 양성세포로 간주 하였다(B, x1000). TUNEL 양성 세포수의 측정은 x400 에서 주로 하였으며 정확한 식별이 필요한 경우는 x1000 를 사용하였다(C,D, x400).

정상토끼 3 마리의 6 안에서는 TUNEL 양성 세포수가 0~6개(평균 2.0 개)가 관찰 되었다. 안압을 상승시킨 녹내장 모델에서 평균 TUNEL 양성세포수는 비냉각안과 냉각안에서 각각 24 시간째 83.7, 32.3 ($p<0.05$), 48 시간째 194.8, 81.0($p<0.05$), 72 시간째 359.9, 89.9(개, $p<0.05$)로 같은 시간대에서 비냉각안에 비해 냉각안에서 통계학적으로 의의 있게 적었다(Wilcoxon signed ranks test)(그림 3). 안구 적출 시기에 따라 비냉각안의 경우는 TUNEL 양성이 점차 증가하였으며 냉각안의 경우는 48 시간까지는 증가하다가 72 시간에서는

48 시간과 비슷한 양상을 보였다.

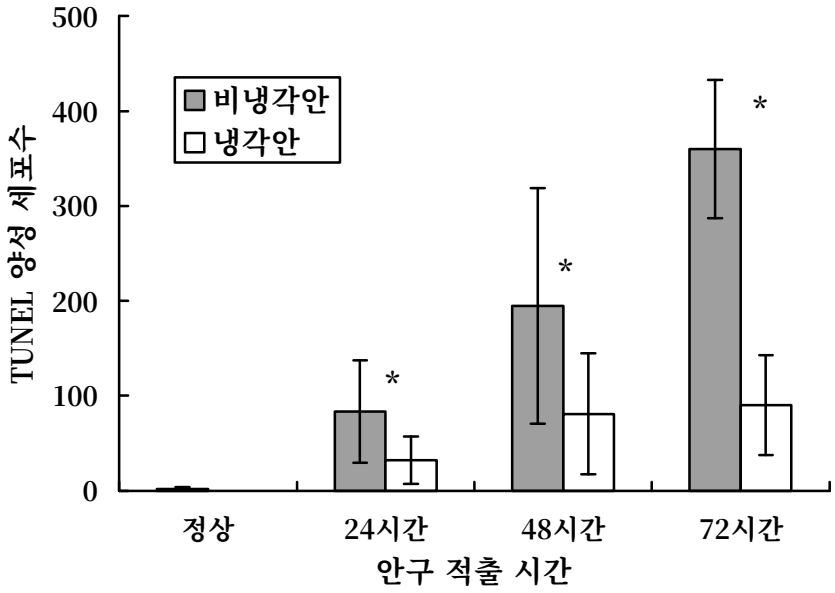

그림 3. 가토의 녹내장모델에서 안구적출시간에 따른 비냉각안과 냉각안의 TUNEL 양성 세포수. TUNEL 양성 세포수를 평균 ±표준편차로 표시하였으며 24 시간(n=6), 48 시간(n=8), 72 시간(n=8) 모두에서 양안의 유의한 차이(*$p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks Test)를 보이며 비냉각안의 경우 점차 증가하는 양상을 보였다.

녹내장 모델에서 저체온의 망막신경절세포에 대한 보호효과를 보기 위하여 H-E stain 후 광학현미경으로 관찰하였다. 내과립층에서 vacuolated space 가 나타나는 망막부종의 소견은 냉각여부에 관계없이 나타났으나 72 시간째 적출한 안구에서 망막부종이 좀더 심해보였고 신경섬유층의 두께도 72 시간째가 24 시간에 비해 더 얇아진 것이 관찰되었다. 망막신경절 세포층

에서 핵이 dense 하게 수축된 pyknotic cell 들이 비냉각안에서 더 많이 관찰 되었으며 24 시간 보다는 72 시간째 적출한 안구에서 더 빈번하게 관찰되었다(그림 4).

그러나 pyknotic 한 망막신경절세포와 일부 아교세포의 구별이 어려운 경우가 있어 정상 망막신경절 세포수를 측정하여 정량적인 비교를 하였다.

광학현미경으로 관찰한 망막 부위는 시신경의 경계부위에서부터 상부 망막쪽으로 400 배 배율로 10 필드 범위였으며 하나의 안구에서 6 개의 슬라이드 즉 60 개의 필드에서 망막 신경절 세포의 수를 세어 하나의 필드당 세포수로 평균을 하였다. 정상토끼 3 마리의 6 안에서도 동일한 방법으로 세포수를 측정하였다(그림 5). 정상 망막신경절 세포수는 비냉각안과 냉각안에서 각각 24 시간째 3.1, 3.6 ($p>0.05$), 48 시간째 2.8, 3.4 ($p>0.05$), 72 시간째 2.4, 3.3 ($p<0.05$)로 72 시간째에만 유의한 차이를 보였다(Wilcoxon signed ranks test). 안구적출 시간에 따라 세포수는 감소하는 양상을 보였으나 비냉각안의 경우는 유의한 차이가 없었으며($p=0.479$, Kruskal-Wallis Test) 냉각안은 24 시간과 72 시간 사이에만 유의한 차이를 보였다($p=0.013$, Mann-Whitney test). 시간대에 관계없이 정상안은 냉각안과는 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$) 비냉각안과는 유의한 차이를 보였다($p<0.05$, Mann-Whitney Test).

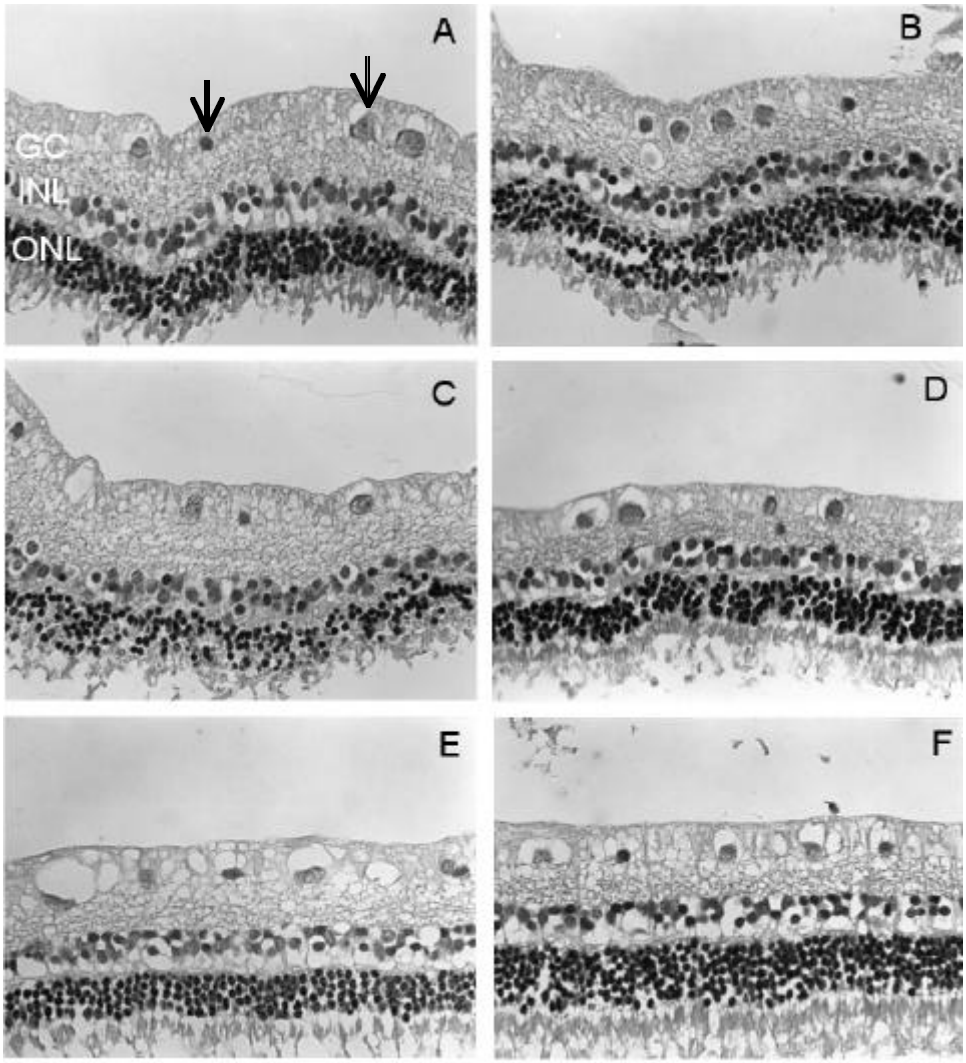

그림 4 . 가토의 녹내장모델에서 안구적출 시간에 따른 비냉각안과 냉각안의 망막 조직학적 소견. 망막신경절세포층의 정상(⇓)과 pyknotic(↓)한 망막신경절 세포들을 볼수 있으며 내과립층의 부종도 관찰되고 신경섬유층의 두께가 감소된 소견을 보인다. (A) 24 시간 비냉각안.(B) 24 시간 냉각안. (C) 48 시간 비냉각안. (D) 48 시간 냉각안. (E)72 시간 비냉각안. (F)72 시간 냉각안. (GC: 망막신경절세포층, INL: 내과립층, ONL: 외과립층) (x400)

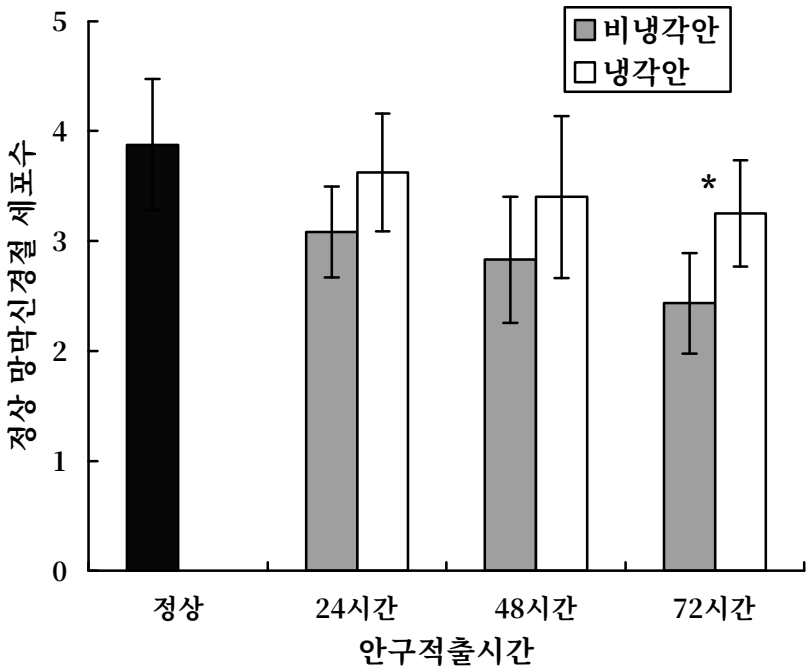

그림 5. 가토의 녹내장 모델에서 안구적출시간에 따른 비냉각안과 냉각안의 망막신경절세포수. 안구적출시간에 따른 비냉각안과 냉각안의 망막신경절세포수를 평균 ±표준편차로 표시함(세포수는 400 배에서 한 필드의 평균치). 72 시간에서 냉각안이 비냉각안에 비해 정상 망막신경절 세포수가 유의하게 많았다(*p=0.013, Wilcoxon Signed Ranks Test).

Ⅳ. 고찰

녹내장은 실명에 이르는 원인중 두번째이며 2000 년에 세계적으로는 녹내장 환자가 약 6670 만명이 그리고 이중 670 만명이 양안 실명 상태인 것으로 추산된다.[42] Caucasians 에서는 녹내장의 75~95%가 원발성 광우각녹내장이지만 에스키모에서는 80~90%가 폐쇄각녹내장이며 한국과 일본등 아시아인에서 폐쇄각녹내장은 그 중간정도의 유병률을 나타낸다.[43] 급성 폐쇄각녹내장은 서양에 비해 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동양인에게 많이 나타나는 질환으로 안압의 갑작스러운 상승으로 안구 통증 및 시력 저하를 가져온다. 응급처치를 필요로 하며 치료 시기에 따라 예후가 달라지고 고안압 상태가 오래되면 시신경 손상으로 시력회복이 안되는 경우도 있다. 치료로 안압하강제의 정맥주사 및 경구약물, 점안약을 사용하고 안압이 떨어지지 않는 경우는 레이저 홍채절개술이나 섬유주절제술을 시행해야 되는 경우도 있는데 일부 환자에서는 이러한 치료에 반응을 하지않아 시력을 잃게 된다.

녹내장 연구에서 사용된 동물 모델은 여러 가지가 있는데 본 연구에서 사용한 녹내장 모델은 급격한 안압상승을 가역적으로 시행한 점에서 급성 폐쇄각녹내장의 환경과 유사한 조건을 만들었다. 수액병의 높이가 100㎝ 이므로 이론적으로는 약 74㎜Hg 의 압력이 되어야 하나 실제로 측정한 안압은 52~56㎜Hg밖에 되지 않았다. 이러한 차이는 Tonopen 이 고안압에서 낮게 측정되는 특성 [44] 과 전방천자부위에서 미세한 누수로 인한 것이라고 생각된

다.

저체온의 효과 연구는 전신적 저체온을 유도하는 방법을 사용하는 것이 대부분으로 안구에 대해서는 일부 국소적 저체온을 유도하는 방법이 시도되기도 하였으나 전방에 냉각된 수액의 관류[45]나 유리체 절제술후 안구후방으로 냉각된 수액을 관류시키는[46] 침습적인 방법들이어서 실제 임상에 응용하는데 제한 점이 많아 안구표면에 얼음을 이용한 냉각방법을 사용하였다. 안구표면의 국소적 냉각만으로는 망막온도의 변화가 약 1.5~2℃ 정도 밖에 하강 하지 않았지만 인위적으로 안압을 상승시킨 눈에서는 망막 온도가 약 6℃ 하강하는 효과를 보였다. 이는 안구 표면냉각과 함께 혈관 수축제를 후구 부위에 주사하였을 때는 망막온도의 저하를 관찰한 경우[36]와 동일한 기전으로 추정 되며 인위적 안압 상승 시 망막 및 맥락막의 혈류장애가 생기므로 혈관 수축제를 사용하였을 때와 마찬가지로 표면 냉각 효과가 안구 후방의 망막까지 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다. 전신적 저체온의 위험성을 줄이기 위한 3~6℃의 온도저하만 유도하는 경도 저체온으로 신경보호 효과가 있음이 실험적으로 입증이 되고 있으며[32,33,37,47] 안구에 국소적으로 저체온을 유도하려는 시도도 있다.[38,40] 본 실험으로 안압이 올라간 환경에서 국소적 표면 냉각만으로 약 6℃의 망막온도 하강효과가 있으며 망막에서 경도의 저체온을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

저체온의 허혈이나 외상에 대한 작용 기전은 정확히 알 수 없으나 여러 실험결과를 보면 NMDA receptor activity 의 저하,[48] glutamate 유리 억

제 ,[49-54] 허혈 후 단백 합성 회복시간 단축,[55] 재관류기에 NO 증가 억제,[50,56-58] Nitrite, cGMP, NOS(Nitric oxide synthase)의 증가 억제 [59] 등으로 다양하고 비특이적인 여러 기전이 관여한다고 알려져 있다. 국소냉각으로 저체온을 유도한 냉각안에서 TUNEL 양성 세포수가 비냉각안에 비해 안구적출 시간에 관계없이 유의하게 적게 나타난 것으로 보아 저체온이 apoptosis 를 억제한 것으로 생각된다. 비냉각안에서는 시간이 경과할수록 TUNEL 양성 세포수가 증가하는 양상을 보인 반면 냉각안에서는 48 시간이후에는 더 이상 증가하지 않았으며 정상 망막신경절세포수는 72 시간째부터 냉각안과 비냉각안의 차이가 나타났다. 이는 고안압 환경 당시의 망막신경절세포손상이외에 안압이 정상화된 후에도 추가적인 손상이 계속되고 있음을 알 수 있고 비냉각안에서는 apoptosis 의 증가와도 관련이 있는 것으로 보인다. 신생 돼지의 뇌에서 허혈에 대한 실험에서 전신적 저체온이 허혈과 관련된 necrosis 보다는 apoptosis 에 영향을 미친다는 보고가 있으며 [33] 본 연구에서도 안구를 냉각했을 때 apoptosis 가 더 적게 나타나고 망막신경절세포수의 차이가 72 시간째부터 나타나는 것은 저체온이 고안압으로 인한 초기 손상 및 이후에 발생하는 apoptosis 로 추정되는 지연된 세포손상에 대한 보호기능이 있음을 알 수 있었다.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 안구표면의 국소적 냉각이 안압 상승에 의한 망막신경절세포 손상을 줄일 수 있는지를 알아보기 위해 먼저 가토의 안구 표면 냉각시 실제 망막의 온도변화를 측정하였고 고안압을 유도한 녹내장 모델에서 안구 냉각으로 유도한 망막 저체온이 실제 망막신경절세포손상을 줄일 수 있는지를 알아 보기위해 TUNEL 염색 및 광학현미경으로 정상 망막신경절세포수를 측정하였다.

고안압을 유도한 녹내장 모델에서 안구의 표면냉각만으로도 망막온도를 약 6℃ 저하시킬 수 있었다. 그러나 정상 안압의 가토에서는 안구표면의 국소냉각으로는 망막온도를 효과적으로 저하시키지 못했다. 양안 녹내장 모델의 가토에서는 안구 냉각이 apoptosis 를 효과적으로 줄일 수 있었으며, 안압이 정상화된 후 지연 세포손상을 감소시키는 효과를 보였다. 이상의 결과로 급성 폐쇄각 녹내장 환자 및 갑자기 안압이 증가하는 녹내장에서 약물치료에 반응하지 않는 경우에 레이저나 다른 수술적 처치를 준비하는 동안 안구표면 냉각을 통해 망막신경절세포의 손상을 줄일 수 있는 보조적 요법으로 활용할 가치가 있다고 판단하며 이에 대한 임상 실험이 필요하다고 생각한다.

참고문헌

1. Leske MC. The epidemiology of open angle glaucoma. Am J Epidemiol 1983;118:116-91.
2. 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;99:635-49.
3. 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.
4. McKinnon SJ. Glaucoma, apoptosis, and neuroprotection. Curr Opin Ophthalmol 1997;8;28-37.
5. Quigley HQ, Guy J, Anderson DR. Blockage of rapid axonal transport. Effect of intraocular pressure elevation in primate optic nerve. Arch Ophthalmol 1979;97:525-31.
6. Radius RL, Blade B. Pressure-induced optic nerve axonal transport interruption in cat eyes. Arch Ophthalmol 1981;99:2163-5.
7. Radius RL. Distribution of pressure-induced fast axonal transport abnormalities in primate optic nerve. An autoradiographic study. Arch Ophthalmol 1981;99:1253-7.

8. Nickells RW. Renital ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. J Glaucoma 1996;5:345-56.

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. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. Arch Ophthalmol 1997;115:1031-35.

11. Anderson DR, Hendrickson A. Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol 1974;13:771-83.

12. Quigley HA, Anderson DR. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. Invest Ophthalmol 1976;15:606-16.

13. Minckler DS, Bunt AH, Johanson GW. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 1977;16:426-41.

14. Johnson JE, Barde Y-A, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. J Neurosci 1986;6:3031-8.

15. Cohen-Cory S, Fraser SE. BDNF in the development of the visual system of Xenopus. Neuron 1994;12:747-61.

16. Rodriguez-Tebar A, Jeffrey PL, Thoenen H, Barde YA. The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. Dev Biol 1989;136:296-303.

17. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1632-6.

18. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. Arch Ophthalmol 1996;114:299-305.

19. Dreyer EB, Pan ZH, Storm S, Lipton SA. Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. Neuroreport 1994;5:629-31.

20. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6368-71.

21. Dawson VL, Dawson TM, Barley DA, Uhl GR, Snyder SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J Neurosci 1993;13:2651-61.

22. Cotlier E, Weinreb R. Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. Surv Ophthalmol 1988;42:367-72.

23. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. Acta Ophthalmol Scand 1997;75:364-7.

24. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. Stroke 1995;26:503-13.

25. Rosomoff HL. Hypothermia and cerebral vascular lesions. I. Experimental interruption of the middle cerebral artery during hypothermia. J Neurosurg 1956;13:332-43.

26. Busto R, Dietrich WD, Globus MYT, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small deifferences in intraischemia brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. J Cereb Blood Flow Metab 1987;7:729-38.

27. Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjo BK. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. J Cereb Blood Flow Metab 1990;10:365-74.

28. Leonov Y, Strez F, Safar P, Radovsky A, Oku K, Tisherman S, et al. Mild cerebral hypothermia during and after cardiac arrest improves neurological outcome in dogs. J Cereb Blood Flow Metab 1990;10:57-70.

29. Shuaib A, Sochocka E, Ishaqzay R, Hertz L, Code WE. Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures. Neurochem Res 1993;18:663-5.

30. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Hypothermia, metabolic stress, and NMDA-mediated excitotoxicity. J Neurochem 1993;61:1445-53.

31. Bruno VM, Goldberg MP, Dugan LL, Giffard RG, Choi DW. Neuroprotective effect of hypothermia in cortical cultures exposed to oxygen-glucose deprivation or excitatory amino acids. J Neurochem 1994;63:1398-406.

32. Maier CM, Ahern Kv, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. Stroke 1998;29:2171-80.

33. Edwards AD, Yue X, Squier MV, Thoresen M, Cady EB, Penrice J, et al. Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia. Biochem Biophys Res Commun 1995;217:1193-9.

34. Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY-T, Dietrich WD, Busto R. Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1992;4:189-225.

35. Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia--a revived countermeasure against ischemic neuronal damages. Neurosci Res 1998;32:103-17.

36. Stiehl WL, Gonzalez-Lima F, Carrera A, Cuebas LM, Diaz RE. Active defence of retinal temperature during hypothermia of the eye in cats. J Physiol (Paris) 1986;81:26-33.

37. Adachi K, Fujita Y, Morizane C, Akaike A, Ueda M, Satoh M, et al. Inhibition of NMDA receptors and nitric oxide synthase reduces ischemic injury of the retina. Eur J Pharmacol 1998;350:53-7.

38. Faberowski N, Stefansson E, Davidson RC. Local hypothermia protects the retina from ischemia. A quantitative study in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30:2309-13.

39. Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. J Neurobiol 1993;25:431-8.

40. Tamai K, Toumoto E, Majima A. Local hypothermia protects the retina from ischaemic injury in vitrectomy. Br J Ophthalmol 1997;81:789-94.

41. 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.

42. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. Br J Ophthalmol 1996;80:389-93.

43. Congdon N, Wang F, Tielsch JM. Issues in the epidemiology and population-based screening of primary angle-closure glaucoma. Surv Ophthalmol 1992;36:411-23.

44. Moore CG, Milne ST, Morrison JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993;34:363-9.

45. May DR, Freedland RJ, Charles S, Wang C, Bakos J. Ocular hypothermia : anterior chamber perfusion. Br J Ophthalmol 1983;67:808-13.

46. Tamai K, Toumoto E, Majima A. Local hypothermia protects the retina from ischaemic injury in vitrectomy. Br J Ophthalmol 1997;81:789-94.

47. Kader A, Brisman MH, Maraire N, Huh JT, Solomon RA. The effect of mild hypothermia on permanent focal ischemia in the rat. Neurosurgery 1992;31:1056-61.

48. Gray AT, Buck LT, Feiner JR, Bickler PE. Interactive effects of pH and temperature on N-methyl-D-aspartate receptor activity in rat cortical brain slices. J Neurosurg Anesthesiol 1997;9:180-7.

49. Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Yamamoto T. Mechanisms of excitatory amino acid release in contused brain tissue: effects of hypothermia and in situ administration of Co2+ on extracellular levels of glutamate. J Neurotrauma 1998;15:655-64.

50. Thoresen M, Satas S, Puka-Sundvall M, Whitelaw A, Hallstrom A, Loberg EM, et al. Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. Neuroreport 1997;8:3359-62.

51. Wakamatsu H, Matsumoto M, Nakakimura K, Sakabe T. The effects of moderate hypothermia and intrathecal tetracaine on glutamate concentrations of intrathecal dialysate and neurologic and histopathologic outcome in transient spinal cord ischemia in rabbits. Anesth Analg 1999;88:56-62.

52. Mori K, Maeda M, Miyazaki M, Iwase H. Effects of mild (33°C) and moderate (29°C) hypothermia on cerebral blood flow and metabolism, lactate, and extracellular glutamate in experimental head injury. Neurol Res 1998;20:719-26.

53. Mori K, Maeda M, Miyazaki M, Iwase H. Effects of mild and moderate hypothermia on cerebral metabolism and glutamate in an experimental head injury. Acta Neurochir Suppl (Wien) 1998;71:222-4.

54. Zhao H, Asai S, Kanematsu K, Kunimatsu T, Kohno T, Ishikawa K. Real-time monitoring of the effects of normothermia and hypothermia on extracellular glutamate re-uptake in the rat following global brain ischemia. Neuroreport 1997;8:2389-93.

55. Widmann R, Miyazawa T, Hossmann KA. Protective effect of hypothermia on hippocampal injury after 30 minutes of forebrain ischemia in rats is mediated by postischemic recovery of protein synthesis. J Neurochem 1993;61:200-9.

56. Sugimura T, Sako K, Tohyama Y, Yonemasu Y. Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. Brain Res 1998;808:313-6.

57. Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. Neuroscience 1997;81:223-9.

58. Sakamoto KI, Fujisawa H, Koizumi H, Tsuchida E, Ito H, Sadamitsu D, et al. Effects of mild hypothermia on nitric oxide synthesis following contusion trauma in the rat. J Neurotrauma 1997;14:349-53.

59. Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. Neurosurgery 1994;35:272-7.

Abstract

The effect of local hypothermia on retinal ganglion cell death in experimental glaucoma

Chul-Myong Choe

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Jae Hong)

Purpose : The objects of this study are to determine the influence of local ocular surface cooling on the temperature of retina surface and to access the neuroprotective effect of hypothermia on retinal ganglion cell death in a transient acute glaucoma model of a rabbit.

Methods : To determine the influence of local cooling we inserted thermocouple probes through the pars plana of albino rabbit eyes and tips were placed at the retinal surface. The intraocular pressure(IOP) of one eye in each rabbit was elevated by anterior chamber paracentesis with a 26G needle connected to a balanced salt solution(high IOP eye) and no IOP elevation to the other eye(normal IOP eye). Both eyes of each rabbits were cooled locally by direct contact of ice to the corneal surface and retinal temperature of both eyes were monitored for 1 hour.

With the result of above study, we examined the neuroprotective effect of hypothermia from acute IOP elevation. IOP of both eyes were elevated with the same procedure as above. One eye in each rabbit was cooled locally(Cooling eye) and the other eye was not cooled(Noncooling eye). The procedure lasted 1 hour and eyes were enucleated after 24, 48 and 72 hours. To obtain equal amount of retina area we used a 7mm trephine to punch out the retina specimen. Specimens were flat mounted and TUNEL(Tdt-mediated fluorescein-dUDP nick-end labeling) was performed. The results were examined with fluorescent microscope. We also performed Hematoxylin-Eosin stain and retinal ganglion cell count was done under light microscope.

Results : Initial retinal temperature of normal and high IOP eye was 38.7℃ and 38.5℃, respectively($p>0.05$). After 1 hour of local cooling the mean retinal temperature of normal and high IOP eye decreased to 37.3℃ and 32.7℃, respectively($p<0.05$). In the glaucoma model with high IOP the cooling eye showed significantly lower positive TUNEL counts. Positive tunnel count of noncooling and cooling eye were 83.7, 32.3 at 24 hours($p<0.05$),194.8, 81.0 at 48 hours($p<0.05$), and 359.9, 89.9 at 72 hours($p<0.05$), respectively. Normal retinal ganglion cell count per high power field in noncooling and cooling eye were 3.1, 3.6 at 24 hours($p>0.05$), 2.8, 3,4 at 48 hours($p>0.05$), 2.4, 3.3 at 72 hours($p<0.05$), respectively. Normal retinal ganglion cell count was significantly higher in the cooling eye at 72hr.

Conclusion : Local cooling of the eye can effectively lower the retinal surface temperature to the mild hypothermic range in conditions of high IOP. Mild hypothermia induced by topical cooling reduces ganglion cell deaths in acute glaucoma model with transient IOP elevation.

Key Words : glaucoma, hypothermia, TUNEL, neuroprotection, apoptosis