사람 양막과 돼지 안구에서 분리한 망막조직편의 체외환경에서 조직유착과 양막의 망막색소상피세포 변성억제효과

연세대학교 대학원
의 학 과
이 문 신

사람 양막과 돼지 안구에서 분리한 망막조직편의 체외환경에서 조직유착과 양막의 망막색소상피세포 변성억제효과

지도 권 오 웅 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
이 문 신

이문신의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

논문을 완성하기까지 끊임없는 조언과 격려로 이끌어 주시고 지도와 지원을 아끼지 않으신 권오웅 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 논문을 심사해 주시고, 많은 관심과 지원 및 교정의 노고로 격려해 주신 경북대학교 안과학교실 김시열 교수님, 건양대학교 안과학교실 김순현 교수님, 산부인과학교실 김세광 교수님, 외과학교실 김유선 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 실험 과정에 많은 도움과 관심을 보내주신 실로암안과병원 김선태 목사님, 김홍복 원장님을 비롯한 임상과장들과 직원들, 세브란스병원 안과 의국원 여러분께 감사의 말씀을 드립니다.

오늘이 있기까지 끊임없는 보살핌과 기도로 후원해주신 양가 부모님, 사랑으로 응원해준 아내, 아들 성재, 딸 성원이와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

이 영광을 허락하신 하나님께 감사드립니다.

저 자 씀

차 례

표 차 례

그 림 차 례

국문요약

사람 양막과 돼지 안구에서 분리한 망막조직편의 체외환경에서 조직유착과 양막의 망막색소상피세포 변성억제효과

감각망막층의 결손 후 유리체로 유리된 세포에 의해 망막표면과 유리체에 섬유화가 발생하게 되고 섬유조직의 수축으로 망막을 견인하게 되어 증식유리체망막병증이 발생한다. 감각망막의 결손 부위를 양막으로 막을 수 있다면 증식유리체망막병증의 예방이 가능할 것으로 보인다.

본 연구에서 돼지 안구의 망막편과 사람 양막을 체외 배양하여 망막과 양막간의 조직유착 여부와 조직유착이 된 경우에 감각망막편과 망막색소상피편의 조직학적 변화를 확인하고자 하였다. 그리고 양막에 의해 망막색소상피세포의 변성이 억제되는지 알아보고자 하였다. 양막은 정상 제왕절개 산모의 태반에서 분리한 것을 사용하였고 돼지 안구에서 분리한 망막편을 사용하였다. 유리체면을 아래로 향하게 한 감각망막편과 망막색소상피세포편을 상피측 상향과 실질측 상향으로 구별하여 이미 위치시킨 양막에 각각 올려놓은 후 배양 1주부터 5주까지 1주 간격으로 부착 여부를 확인하였다. 감각망막편은 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 면역조직화학염색, 망막색소상피편은 Masson's trichrome 염색을 시행하여 조직학적 변화를 확인하였다. 양막의 망막색소상피세포에 대한 변성억제효과를 확인하기 위하여 투과전자현미경을 이용하여 검체를 관찰하였다. 실험 4주까지는 매주간 유착률에 거의 차이를 보이지 않았으나 5주째에는 이전에 비하여 유착률이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 양막 표면의 방향과 조직편의 종류에 따른 유착률은 양막상피면 접촉보다는 양막실질면 접촉이, 감각망막편보다는 망막색소상피세포편이 더 유착률이 높았다. 양막의 망막색소상피세포에 대한 변성억제효과는 양막의 부착면이 실질면일 때 더 높은 것이 관찰되었다.

본 연구의 결과로 양막은 감각망막 결손부위에 덮개 역할을 할 수 있을 것으로 보이며 기계장벽효과와 세포변성억제효과로 증식유리체망막병증을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 증식유리체망막병증, 양막, 감각망막, 망막색소상피세포, 조직유착, 변성억제

사람 양막과 돼지 안구에서 분리한 망막조직편의 체외환경에서 조직유착과 양막의 망막색소상피세포 변성억제효과

<지도교수 권 오 웅 >
연세대학교 대학원 의학과
이 문 신

I. 서 론

열공성망막박리, 거대망막열공, 외상으로 인한 감각망막층 손상, 수술중 불가피한 망막절개술로 인한 감각망막층의 소실 등으로 망막색소상피세포층이 유리체에 직접 노출된다. 망막색소상피세포의 노출과 안구혈액장벽의 붕괴로 인해 유리체 내로 망막색소상피세포, 교세포, 섬유모세포, 대식세포, 림프구 등의 세포가 유리되어 섬유막을 형성하게 된다.[1-4] 특히 망막색소상피에서 기원한 세포가 섬유막을 구성하는 주된 세포 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[5,6] 유리체와 망막표면에 섬유화가 발생하게 되고 섬유조직의 수축으로 망막을 견인하게 되어 견인성망막박리가 발생한다.[7] 이와 같은 과정은 과도한 창상치유과정으로 볼 수 있으며 다른 조직과 달리 투명성을 요구하는 망막에서 비정상적인 섬유조직의 발생과 수축으로 인해 실명으로 연결되는 심각한 질환이 발생하게 되는데 이것이 증식유리체망막병증이다.

이와 같은 증식유리체망막증은 기전을 완전히 이해하지 못하고 있으며 아직 뚜렷한 치료 및 예방법이 없는 상태이다. 현재까지의 연구는 유리체로 유리된 세포의 변형과 증식에 관여하는 세포외기질을 파악하고 화학적 예방법을 찾는 방향으로 진행되고 있다.[8,9]

증식유리체망막증은 감각망막의 결손이 발생할 경우 항상 잠재된 합병증으로 고려해야 하며 결손부위가 넓을 수록 위험성은 높아진다. 감각망막층의 결손이 있는 경우 망막상피세포가 유리체 내로 떨어져 나오지 못하게 하는 방법이 개발되면 증식유리체망막증을 예방할 수 있을 것이다.

인간의 양막은 태반으로부터 쉽게 분리되는 약 70μm 두께를 가지는 반투명 조직으로 혈관이 없고 세균에 대하여 강한 저항성을 가진다. 양막

은 상피세포, 기저막, 간질로 이루어져 있다. 양막은 창상에 봉합 시 물리적으로 창상의 해부학적인 복원에 도움이 되는 것 외에도 세포외기질에 포함되어 있는 많은 화학 물질 의하여 창상의 치유에 매우 효과적인 것으로 보고되고 있다. 양막상피세포에는 α1-chymotrypsin, lysosomal enzyme이 있고 기저막은 type IV collagen, laminin, α6/β4 integrin으로 이루어져 있으며 간질은 세포외기질, fibronectin, 여러 성장인자와 α5/β1 integrin으로 구성되어 있다.[10] 양막은 그 자체로 거의 면역불활성으로 이식거부 반응의 위험성이 없는 생체조직 적합성과 안전성이 뛰어난 성질을 가지고 있다.[11,12] 양막은 epidermal growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor β 등과 상호 작용으로 interleukin과 prostaglandin의 분비를 조절하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다.[13-16] 양막에는 성장인자가 많이 포함되어 있고 창상 부위에 존재하고 있는 섬유모세포에서 히아루론산 형성이 촉진되어 세포외기질의 재생과 증식을 증가시켜 창상 부위로의 세포의 이동을 증가시킨다고 알려져 있다.[17-20] 양막은 동물 실험을 통해서 상피재생을 촉진하고 염증을 감소시킨다는 사실이 보고되고 있다.[21,22] 창상치유과정에서 세포의 변성을 감소시키는 효과도 가지고 있음이 밝혀져 있으며 특히 상피에서 섬유모세포로의 변화를 억제하는 효과가 있다는 보고가 있다.[23]

현재 안과 영역에서 양막은 녹내장 수술[24], 익상편 수술[25,26], 각막상피결손 및 궤양 치료[27,28] 등에 사용되고 있다.

이러한 양막의 특성을 이용하여 양막으로 감각망막결손 부위를 덮는 방법을 고려할 수 있다. 기계적으로 망막색소상피세포를 비롯한 세포들이 유리체 내로 유리되는 것을 막을 수 있고 함유하고 있는 성장인자 조절로 양막에 덮인 주변 부분의 세포의 변성을 억제할 수 있을 것이라 기대된다. 그러나 아직까지 생체 혹은 실험실 조건에서 망막과 양막 간의 조직반응은 연구된 바가 전혀 없다.

본 연구의 목적은 체외 실험실 조건에서 망막조직편과 양막 간에 기계적이나 화학적 조작 없이 두 조직간 유착 발생 여부와 양막의 부착 표면 방향과 망막편의 종류에 따른 조직유착에 차이가 있는지 확인하고자 하였다. 조직유착이 발생한 경우 감각망막편과 망막색소상피편의 조직학적 변화를 확인하고자 하였으며 양막에 의한 망막색소상피세포의 변화를 비교하여 양막의 상피세포 변성억제 효과를 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

가. 양막

계획된 제왕절개를 받은 임신 36주에서 38주의 정상 산모의 태반에서 분리한 양막을 사용하였다.

나. 망막조직편

사망시킨 지 8시간 이내에 적출한 돼지 안구에서 분리한 것을 사용하였다. 돼지 안구는 외견상 병변이나 이상이 없는 것을 선택하였다.

2. 양막 채취

제왕 절개를 받은 산모의 태반을 수술실에서 즉시 혈병을 생리 식염수로 깨끗하게 세척한 후 6-0 silk 봉합사를 이용하여 양막상피측에 봉합 매듭이 드러나게 하여 대여섯 군데 봉합을 하였다. Blunt dissection하여 태반으로부터 양막을 분리하여 봉합 매듭을 포함한 대여섯 개의 양막을 얻었다. 얻은 양막을 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, St.Louis, MO, USA)이 담긴 튜브에 담아 clean bench로 옮겼다. 1000U/ml penicillin이 함유된 PBS(phosphate buffered solution, pH 7.2)로 3차례 세척 후 다시 DMEM이 담긴 petridish에 옮겼다. 봉합 매듭이 위로 오게 양막을 편평하게 편 후 20mm x 20mm 정도 크기로 절단을 한다. 이때 작은 크기로 만들어지는 양막의 가장자리로 예상되는 위치에 미리 6-0 silk 봉합사를 이용하여 봉합을 하여 위치를 확인하였다. 이와 같이 분리한 양막을 각 10개씩 DMEM과 glycerol이 포함된 튜브에 담아 영하 70℃에 냉동 보관하였다.[29]

3. 돼지 망막편 분리

돼지 사망후 8시간 내에 안구를 적출하고 안구의 외안근과 연성조직을 제거하였다. 70% alcohol에 5분간 담근 후 DMEM에 3차례 세척하였다. 11번 수술칼 (Paragon, UK)로 각막 윤부에서 약 2mm 후방 천자 후 Wescott tenotomy scissors (Katena, Denville, NJ, USA)를 이용하여 360° 절개하여 약간의 공막을 포함한 각막편을 제거하였다. Eye scissors (Katena, Denville, NJ, USA)를 이용하여 남은 안구를 세 시간 간격으로 절제부위부터 시신경 쪽으로 일직선으로 절개한 후 유리체 일부를 Wescott tenotomy scissors를 이용하여 제거하였다. Thorpe corneal forceps (Katena, Denville, NJ, USA)을 이용하여 나머지 유리체를 제거한 후 감각망막을 분리하여 조심스럽게 DMEM으로 세척 후 petridish의 DMEM에 담궜다. 감각망막을 완전히 제거한 안구에서 Wescott tenotomy scissors와 Thorpe corneal forceps를 이용하여 망막색소상피-맥락막편을 분리하여 DMEM에 담궜다. 망막조직편은 유리체 쪽이 위쪽을 향하게 위치시켰다.

4. 양막과 망막편의 배양

35mm 배양디스크에 penicillin과 10% fetal calf serum을 포함한 DMEM을 2cc 담았다. 양막을 양막상피측 상향과 양막실질측 상향을 봉합매듭의 위치로 구별하여 petridish에 접힌 부분이 없게 편평하게 폈다. 망막조직편을 유리체면이 아래로 가게 위치하여 이미 위치시킨 양막 위에 올려놓았다. 양막상피측 상향과 감각망막편을 1군, 양막실질측 상향과 감각망막편을 2군, 양막의 양막상피측 상향과 망막색소상피세포층편을 3군, 양막실질측 상향과 망막색소상피세포층을 4군으로 모두 네 군으로 구별하였다. 37℃ 5% CO_2 정온기에서 기관조직배양을 하였다.

5. 양막과 망막편의 유착 평가

배양 1주, 2주, 3주, 4주, 5주에 조직 유착 여부를 육안 확인하였다. 각각 grade 0,1,2 세 단계로 표시하였다. 조직유착의 평가를 두 단계로 시행

하였는데 우선 육안 확인하여 양막과 조직편의 분리 여부를 확인하였고 유착된 경우는 유착을 평가하기 위해서 배양디스크를 손으로 잡고 실험테이블에서 5cm 가량 든 채 좌우로 약 1cm 정도를 부드럽게 흔들면서 유착부분과 분리부분을 확인하였고 이때 가장 많이 유착된 조직편 가장자리를 포함하여 조직편을 4등분하여 각각 1/4 면의 유착을 확인하는 방법을 사용하여 평가하였다. 같은 방법으로 동일 실험자에 의해 3회 반복 검사하였다.

망막편이 양막에서 완전히 유리되어 떠다니는 상태를 grade 0, 양막에 망막편이 부착되어 있으나 배양접시를 가볍게 흔들 경우 두 조직이 50% 이상 부착되지 않은 상태로 확인되는 경우를 grade 1, 조직편이 완전히 양막에 부착되어 배양접시를 흔들어도 두 조직 분리가 전혀 없거나 50% 이하의 조직 분리를 보이는 상태를 grade 2로 분류하였다.

6. 조직 염색과 투과전자현미경 관찰

가. 염색 방법과 시기

감각망막에서는 교세포의 증식을 확인하기 위하여 glial fibrillary acidic protein(GFAP) 면역조직화학염색을 시행하였으며 망막색소상피세포편의 콜라겐 활성을 보기 위해 Masson's trichrome 염색을 시행하였다.

염색 및 검체 제작 시기는 양막 위에 망막편을 위치시키고 기관조직배양을 시행한 후 3주에 검체를 염색하였다.

양막과 유착된 망막색소상피세포의 변화를 확인하기 위하여 투과전자현미경을 이용하여 검체를 관찰하였다.

나. 감각망막편의 GFAP 면역조직화학염색

양막에 부착된 감각망막편과 자유유리 상태의 감각망막편을 xylen에 5분씩 3회 담궜다. Alcohol 100%, 90%, 70%에 순서대로 3분씩 담근 후 흐르는 일차증류수에 5분간 씻었다. 3%H_2O_2에 10분간 담근 후 잠시 일차증류수로 씻었다. 전자렌지에 citrate buffer을 넣고 90℃에서 100℃ 사이 온도로 25분간 가열하였다. 슬라이드를 식힌 후 GFAP을 2방울 정도 떨

어뜨리고 1시간에서 2시간 정도 실온에 놓아두었다. 결합항체를 2방울 정도 떨어뜨려 30분 실온에 놓아두었다. Streptavidin을 2방울 정도 떨어뜨린 후 다시 30분간 놓아두었다. 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) 발색제를 떨어뜨려 발색 여부를 확인하였다. Counter staining 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

다. 망막색소상피세포편의 Masson's trichrome 염색

검체를 탈 파라핀, 함수과정을 거친 후 수세하였다. Bouin 용액에 실온에서 하룻밤을 담가 놓은 후 일차증류수로 헹구었다. Weigert iron hematoxylin 용액에 10분간 염색 후 수세하고 Biebrich Scarlet acid fuchsin 용액에 10분간 담궜다. Phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액에 10분간 처리 후 aniline blue 용액에 5분간 염색하였다. 1% acetic acid 용액에 작용시킨 후 증류수로 세척하였다. 탈수시킨 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

라. 망막색소상피세포편의 투과전자현미경 관찰

검체는 우선 0.1M cacodylate buffer 완충액(pH 7.4)으로 조정한 Karnovsky 고정액 (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.5% $CaCl_2$)으로 6시간 이상 전고정 후 0.1M cacodylate buffer로 2시간 수세 후 1.33% OsO_4로 2시간 후고정하였다. 후고정된 검체는 0.1M cacodylate로 1시간 수세 후 저농도 alcohol에서 무수 alcolhol까지 탈수한 후 propylene oxide에 10분간 치환하였다. 이어서 EPON mixture (EPON 812, MNA, DDSA, DMP30)와 propylene oxide를 1:1로 혼합하여 약 18시간 포매하였다. Ultramicrotome을 이용하여 조직을 1㎛ 두께로 semithin section하여 1% toluenidin blue로 염색 후 광학현미경을 이용하여 전자현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 정하였다. 망막색소상피편은 부르크막을 포함한 망막색소상피층을 선택하였다. 선택한 부위를 0.5㎛ 두께로 thin section하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였다. 한 검체당 3부위 이상에서 thin section을 제작하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 관찰은 Transmission Electron Microscope

CM200(Phillips Electron Optics, Netherlands)으로 하였다.

7. 통계처리

양막과 망막편 배양의 기간에 따른 유착률의 변화와 양막의 표면 위치와 망막편의 종류에 따른 유착률에 대해 Pearson 카이제곱검정을 시행하였고 유의수준이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

단, 양막상피측면 상향과 감각망막층의 유착에 대한 평가는 3단계로 구별 시 통계를 위한 필요조건을 만족치 못하여 완전 유리와 부착, 두 단계로 다시 구별하여 검정을 실시하였다.

III. 결과

1. 양막과 망막편의 조직유착

가. 시간 경과에 따른 유착률

각 군이 63개 씩 모두 252개 검체를 기관조직 배양을 시작하였다. 배양 후 5주간 유착률을 평가할 때 오염으로 1군에서 1개, 2군에서 2개, 3군에서 2개 및 4군에서 3개로 모두 8개의 검체가 소실되어 5주까지 기관조직배양된 검체는 모두 244개였다.

(1) 1군 (양막상피측 상향과 감각망막편)

양막상피측 상향과 감각망막편의 기관조직 배양은 1주에는 grade 0의 자유유리상태는 50개(79.3%), grade 1의 부분유착상태는 10개(15.9%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 3개(4.8%)였다. 2주에는 grade 0의 자유유리상태는 51개(81.0%), grade 1의 부분유착상태는 10개(15.9%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 2개(3.1%)였다. 3주에

는 검체 1개가 소실되어 62개의 검체를 평가한 결과 grade 0의 자유유리상태는 50개(80.6%), grade 1의 부분유착상태는 9개(14.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 3개(4.9%)였다. 4주에는 grade 0의 자유유리상태는 51개(82.3%), grade 1의 부분유착상태는 10개(16.1%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 1개(1.6%)였다. 5주에는 grade 0의 자유유리상태는 56개(90.3%), grade 1의 부분유착상태는 5개(8.1%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 1개(1.6%)였다. (표 1)

3단계의 유착 등급은 통계를 위한 필요조건을 충족하지 못하기 때문에 grade 0를 유리, grade 1과 grade 2를 유착으로 재구분한 후 분석하였다. 5주간의 유착률의 변화를 검정한 결과 1주부터 5주까지의 유착 정도를 비교한 경우(유의확률 0.461), 1주에서 4주까지만 비교한 경우(유의확률 0.974), 4주와 5주째 유착 정도만 비교한 경우(유의확률 0.192) 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으나 1주에서 4주까지의 유착 정도의 차이에 비해 5주째는 통계적으로는 유의하지 않으나 상대적으로 많은 차이를 보이는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

표 1. 양막상피측 상향과 감각망막편 조직유착의 시간경과에 따른 변화

	기관조직배양기간				
유착정도	1주	2주	3주	4주	5주
Grade 0	50(79.3)	51(81.0)	50(80.6)	51(82.3)	56(90.3)
Grade 1	10(15.9)	10(15.9)	9(14.5)	10(16.1)	5(8.1)
Grade 2	3(4.8)	2(3.1)	3(4.9)	1(1.6)	1(1.6)
Total	63(100)	63(100)	62(100)	62(100)	62(100)

( ) 안은 퍼센트를 나타낸 것임

(2) 2군 (양막실질측 상향과 감각망막편)

양막실질측 상향과 감각망막편의 기관조직 배양은 1주에는 grade 0의 자유유리상태는 38개(60.3%), grade 1의 부분유착상태는 15개(23.8%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 10개(15.9%)였다. 2주에는 grade 0의 자유유리상태는 38개(60.3%), grade 1의 부분유착상태는 15개(23.8%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 10개(15.9%)였다. 3

주에는 grade 0의 자유유리상태는 39개(61.9%), grade 1의 부분유착상태는 14개(22.2%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 10개(15.9%)였다. 4주에는 grade 0의 자유유리상태는 39개(61.9%), grade 1의 부분유착상태는 14개(22.2%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 10개(15.9%)였다. 5주에는 2개의 검체가 소실되어 61개의 검체를 대상으로 하였으며 grade 0의 자유유리상태는 49개(80.3%), grade 1의 부분유착상태는 7개(11.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 5개(8.2)%)였다.(표 2)

5주간의 유착 정도의 변화를 분석한 결과 1주부터 5주까지의 유착 정도를 비교한 경우(유의확률 0.428), 1주에서 4주까지만 비교한 경우(유의확률 1.000), 4주와 5주 째 유착 정도만 비교한 경우(유의확률 0.078) 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으나 1주에서 4주까지의 유착 정도는 거의 차이가 나지 않는 것에 비하여 5주째는 통계적으로는 유의하지 않으나 이전까지의 유착 정도와는 현격히 많은 차이를 보이는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

표 2. 양막실질측 상향과 감각망막편 조직유착의 시간경과에 따른 변화

	기관조직배양기간				
유착정도	1주	2주	3주	4주	5주
Grade 0	38(60.3)	38(60.3)	39(61.9)	39(61.9)	49(80.3)
Grade 1	15(23.8)	15(23.8)	14(22.2)	14(22.2)	7(11.5)
Grade 2	10(15.9)	10(15.9)	10(15.9)	10(15.9)	5(8.2)
Total	63(100)	63(100)	63(100)	63(100)	61(100)

( ) 안은 퍼센트를 나타낸 것임

(3) 3군 (양막상피측 상향과 망막색소상피편)

양막상피측 상향과 망막색소상피편의 기관조직 배양 결과는 1주에는 grade 0의 자유유리상태는 17개(27.0%), grade 1의 부분유착상태는 28개(44.4%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 18개(28.6%)였다. 2주에는 grade 0의 자유유리상태는 17개(27.0%), grade 1의 부분유착상태는 28개(44.4%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 18개(28.6%)

였다. 3주에는 1개의 검체가 소실되어 모두 62개의 검체를 대상으로 하였으며 grade 0의 자유유리상태는 17개(27.4%), grade 1의 부분유착상태는 28개(45.2%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 17개(27.4%)였다. 4주에는 grade 0의 자유유리상태는 18개(29.1%), grade 1의 부분유착상태는 27개(43.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 17개(27.4%)였다. 5주에는 grade 0의 자유유리상태는 28개(45.9%), grade 1의 부분유착상태는 18개(29.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 15개(24.6%)였다.(표 3)

5주간의 유착 정도의 변화를 통계분석한 결과 1주부터 5주까지의 유착 정도를 비교한 경우(유의확률 0.414), 1주에서 4주까지만 비교한 경우(유의확률 1.000), 4주와 5주 째 유착 정도만 비교한 경우(유의확률 0.129) 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으나 1주에서 4주까지의 유착 정도는 거의 차이가 나지 않는 것에 비하여 5주째는 통계적으로는 유의하지 않으나 이전까지의 유착 정도와는 현격히 많은 차이를 보이는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

표 3. 양막상피측 상향과 망막색소상피편 조직유착의 시간경과에 따른 변화

	기관조직배양기간				
유착정도	1주	2주	3주	4주	5주
Grade 0	17(27.0)	17(27.0)	17(27.4)	18(29.1)	28(45.9)
Grade 1	28(44.4)	28(44.4)	28(45.2)	27(43.5)	18(29.5)
Grade 2	18(28.6)	18(28.6)	17(27.4)	17(27.4)	15(24.6)
Total	63(100)	63(100)	62(100)	62(100)	61(100)

( ) 안은 퍼센트를 나타낸 것임

(4) 4군 (양막실질측 상향과 망막색소상피편)

양막실질측 상향과 망막색소상피편의 기관조직 배양 결과는 1주에는 grade 0의 자유유리상태는 9개(14.3%), grade 1의 부분유착상태는 23개(36.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 31개(49.2%)였다. 2주에는 grade 0의 자유유리상태는 10개(15.9%), grade 1의 부분유착상태는 22개(34.9%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 31개(49.2%)

였다. 3주에는 grade 0의 자유유리상태는 10개(15.9%), grade 1의 부분유착상태는 22개(34.9%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 31개(49.2%)였다. 4주에는 1개의 검체가 소실되어 모두 62개의 검체를 대상으로 하였으며 grade 0의 자유유리상태는 10개(16.1%), grade 1의 부분유착상태는 23개(37.1%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 29개(46.8%)였다. 5주에는 2개의 검체가 더 소실되어 모두 60개의 검체를 대상으로 하였으며 grade 0의 자유유리상태는 22개(36.7%), grade 1의 부분유착상태는 14개(23.3%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 24개(40.0%)였다.(표 4)

5주간의 유착 정도의 변화를 분석한 결과 1주부터 5주까지의 유착 정도를 비교한 경우(유의확률 0.075), 1주에서 4주까지만 비교한 경우(유의확률 1.000)는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 4주와 5주 째 유착 정도만 비교한 경우(유의확률 0.028) 통계적으로 유의한 차이를 보여 5주 째 유착 정도를 평가한 수치는 이전의 수치와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 4. 양막실질측 상향과 망막색소상피편 조직유착의 시간경과에 따른 변화

	기관조직배양기간				
유착정도	1주	2주	3주	4주	5주
Grade 0	9(14.3)	10(15.9)	10(15.9)	10(16.1)	22(36.7)
Grade 1	23(36.5)	22(34.9)	22(34.9)	23(37.1)	14(23.3)
Grade 2	31(49.2)	31(49.2)	31(49.2)	29(46.8)	24(40.0)
Total	63(100)	63(100)	63(100)	62(100)	60(100)

( ) 안은 퍼센트를 나타낸 것임

나. 양막의 표면 방향과 망막편의 종류에 따른 유착 정도 평가

4주까지 시간 경과에 따른 유착의 변화가 거의 없기 때문에 3주 배양한 후의 검체를 대상으로 유착 상태를 비교, 평가하였다. 1군이 62개, 2군이 63개, 3군이 62개, 4군이 63개로 모두 250개의 검체를 관찰하였다. 1군은 grade 0의 자유유리상태는 50개(80.7%), grade 1의 부분유착상태는 9개(14.5%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 3개(4.8%)였다. 2

군은 grade 0의 자유유리상태는 39개(61.9%), grade 1의 부분유착상태는 14개(22.2%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 10개(15.9%)였다. 3군은 grade 0의 자유유리상태는 17개(27.4%), grade 1의 부분유착상태는 28개(45.2%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 17개(27.4%)였다. 4군은 grade 0의 자유유리상태는 10개(15.9%), grade 1의 부분유착상태는 22개(34.9%), grade 2의 완전유착 혹은 부분유리상태는 31개(49.2%)였다. (표5. 그림 1)

각 군에 대한 통계분석 결과 양막 표면의 방향 및 조직편의 종류에 따라 유착률에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다.(유의확률 0.000) 양막상피측 상향보다는 양막실질측 상향이, 감각망막편보다는 망막색소상피세포편이 더 유착률이 높다는 것을 알 수 있었고 양막실질측 상향과 망막색소상피편의 기관조직배양이 가장 높은 유착률을 나타냄을 알 수 있었다.

표 5. 양막의 표면 방향을 달리한 망막편의 유착률[1]

유착정도	기관조직배양군			
	1군	2군	3군	4군
Grade 0	50(80.7)[2]	39(61.9)	17(27.4)	10(15.9)
Grade 1	9(14.5)	14(22.2)	28(45.2)	22(34.9)
Grade 2	3(4.8)	10(15.9)	17(27.4)	31(49.2)
Total	62(100)	63(100)	62(100)	63(100)

1. 기관조직배양 3주째 시행한 유착률로 비교,평가

2. ( ) 안은 퍼센트

1군: 양막상피측 상향과 감각망막편. 2군: 양막실질측 상향과 감각망막편. 3군: 양막상피측 상향과 망막색소상피편. 4군: 양막실질측 상향과 망막색소상피편

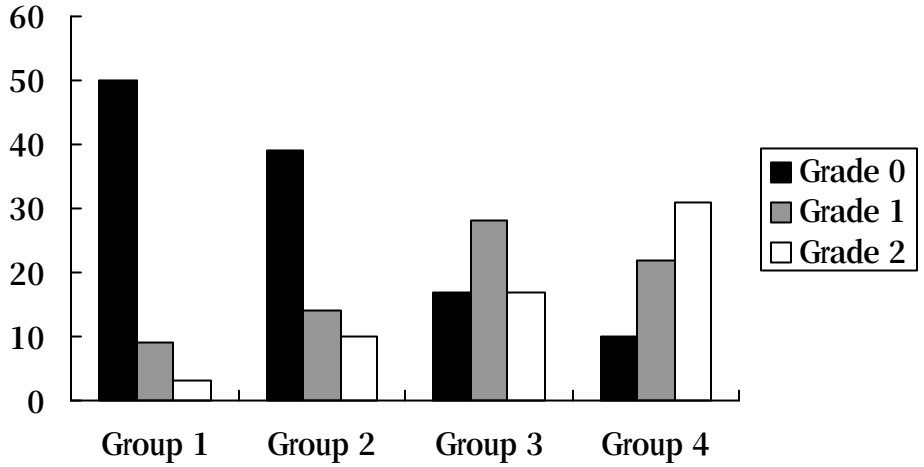

그림 1. 양막의 표면 방향을 달리하여 위치시킨 망막편을 기관조직배양 3주에 평가한 유착 정도.

2. 양막과 조직유착 시 망막편에 발생하는 변화

가. 감각망막층 (GFAP 면역조직화학염색)

대조를 위해 돼지안구에서 분리한 후 즉시 염색한 감각망막의 경우 감각망막의 조직 형태가 잘 유지되고 있는 것을 볼 수 있으며 GFAP 면역조직화학염색반응은 음성이었다.(그림 2-A) 양막과 자유 유리된 상태의 감각망막층은 망막층의 구조가 많이 손상되어 기존의 형태를 제대로 유지하지 못하고 있는 상태였으며 GFAP 면역조직화학염색반응에서 전체적으로 강한 양성을 나타내었다.(그림 2-B) 반면 양막과 유착된 감각망막층의 경우 양막상피측 상향과 양막실질측 상향으로 위치시킨 두 경우 모두 GFAP 면역조직화학염색반응은 부분적인 약한 양성을 보였다. 양막실질측 상향으로 위치시킨 경우에 비하여 양막상피측 상향으로 위치시킨 경우 감각망막의 형태는 유지하고 있으나 상대적으로 조직 구조의 손상이 많은 것을 관찰할 수 있었다. 반면 양막실질측 상향으로 위치시킨 경우는 비교적 안정된 조직의 형태를 보이고 있었다.(그림 2-C,D)

나. 망막색소상피세포층 (Masson' s trichrome 염색)

양막상피측 상향으로 위치시킨 망막색소상피세포편은 양막상피와 사이에 존재하는 콜라젠이 관찰되었다. 관찰된 콜라젠의 위치는 망막색소상피세포의 표층에 존재하였으며 망막색소상피세포 표면에 밀착하여 넓은 범위에서 퍼져있는 것을 볼 수 있었다. 또한 방추형의 가로로 놓인 세포가 관찰되었는데 이들 세포의 핵은 활성 상태로 관찰되었고 콜라젠에 바로 인접하거나 콜라젠층 내부에서 관찰되었다. 또한 일부 방추형의 세포의 세포질은 색소로 충만한 것을 관찰할 수 있었다.(그림 3 - A,B) 양막실질측 상향으로 위치시킨 망막색소상피세포편은 양막의 실질부도 콜라젠 염색에 양성이므로 망막색소상피세포층 표면에 존재하는 콜라젠의 형태만으로는 명확하게 구별되어 보이지는 않았다. 그러나 망막색소상피세포층 표면 중 부분적으로 양막의 실질부와 구별되어 보이는 콜라젠 덩어리가 관찰되며 활성상태의 핵형을 보이는 방추형 세포가 동일 부위에서 관찰되었다. 그러나 상피상향으로 위치시킨 검체와 비교하였을 때 상대적으로 적은 수의 활성상태의 방추형 세포를 볼 수 있었다. 또한 콜라젠이 염색된 것도 상피 상향으로 위치시킨 경우에서는 보다 광범위하게 염색이 된 것에 반하여 실질상향으로 위치시킨 경우에는 상대적으로 국소적으로 제한된 망막색소상피층 표면의 콜라젠을 관찰할 수 있었다. (그림 3 - C,D)

3. 유착여부와 기간에 따른 망막색소상피세포의 투과전자현미경 소견

가. 자유유리 상태

(1) 1주

망막색소상피세포가 부르크막에서 분리되어 특유의 긴 원주세포의 형태를 잃어버리고 둥근 형태의 세포막 모양을 보이며 망막색소상피세포 - 맥락막편 표면에 존재하는 것을 관찰할 수 있었다. 바로 인접하여 활성의 섬유모세포가 같이 존재하는 것을 볼 수 있었다. 섬유모세포의 세포질에는 색소 과립이 관찰되지는 않았다. (그림 4 - A)

(2) 3주

실질에 부착되지 않은 유리 상태로 존재하는 세포질 내에 색소 과립을 함유하고 있는 섬유모세포를 관찰할 수 있었다. 세포질 내의 색소과립은 소화된 형태를 보이는 것도 있으나 대부분 안정된 형태를 취하고 있는 것으로 보아 원래 세포질 내에 존재하던 것으로 보였다. 주변에 배열이 일정치 않은 콜라젠 섬유가 같이 관찰되고 있는 것을 볼 수 있었으나 섬유모세포의 기질을 구성하고 있지는 않은 것으로 보였다. (그림 4 - B)

나. 양막상피측 상향과 망막색소상피편의 조직유착 상태

(1) 1주

망막색소상피세포층이 구조와 형태를 잘 유지하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 표면에는 일부 가로 주행을 하는 세포의 세포질이 같이 관찰되고 있었으며 세포질 내부에는 많은 소포체가 존재하는 것을 볼 수 있었다. 또한 연접하여 형태가 분명치 않은 조직이 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.(그림 5 - A)

(2) 3주

전반적으로 구조를 유지하고 있는 망막색소상피세포층의 표면에 과량의 색소 과립을 포함하고 있는 섬유모세포를 관찰할 수 있었다. 포함된 색소과립이 소화되는 형태가 아니라 세포질 내에 안정적으로 존재하는 것으로 미루어 망막색소상피세포에서 섬유모세포로 변형된 것으로 보였다. 관찰된 섬유모세포에 바로 연접하여서는 제 위치에서 탈락하여 형태가 변형된 망막색소상피세포가 같이 있는 것을 볼 수 있었다. (그림 5 - B)

다. 양막실질측 상향과 망막색소상피편의 조직유착 상태

(1) 1주

긴 원주세포와 다량의 색소과립을 포함하고 있는 망막색소상피세포 특유의 세포형태를 잘 유지하고 있는 것이 관찰되었으며 인접한 망막색소상피세포와 안정된 구조를 유지하고 있었다. 망막색소상피세포 표면에 주행이 균일하지 않은 약간의 섬유소가 관찰되고 있었다. 망막색소상피세포 표면에 특별한 형태를 갖지 않는 조직이 연접하여 있는 것이 관찰되었다. (그림 6 - A)

(2) 3주

손상되지 않은 부르크막을 유지하고 있는 망막색소상피세포가 관찰되었다. 형태는 온전한 형태의 망막색소상피를 유지하는 것도 있지만 한쪽 끝이 수평으로 길어지면서 방추형에 가까운 모양으로 변하는 세포가 관찰되고 있었다. 이 세포는 망막색소상피세포 특유의 긴 원주세포의 모양이 많이 손상된 세포 모양을 보이나 세포질 내의 다량의 색소과립이 있으며 소포체가 적은 점으로 미루어 섬유모세포의 성질을 갖지는 않은 것으로 보인다. (그림 6 - B)

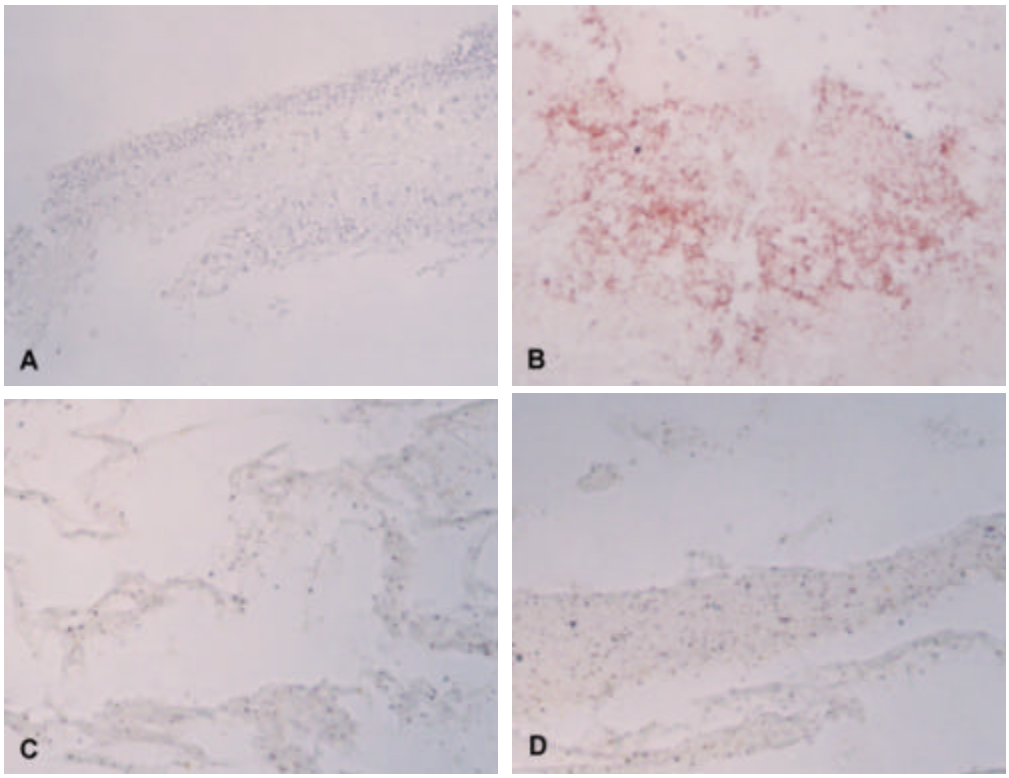

그림 2. 감각망막편을 양막상피측 상향과 양막실질측 상향으로 위치시켜 3주 기관조직배양 후 시행한 GFAP 면역조직화학염색 소견. A: 돼지안구에서 분리한 직후 감각망막편. GFAP 염색에 음성 반응을 보인다. (×100) B: 자유 유리된 상태의 감각망막층. 감각망막 조직의 손상이 많으며 GFAP 염색반응은 강한 양성을 나타낸다. (×100) C: 양막상피측 상향으로 위치시킨 감각망막편. 조직 손상이 있으나 감각망막편의 형태는 유지하고 있으며 GFAP 염색반응에 부분적인 약한 양성을 보인다. (×100) D: 양막실질측 상향으로 위치시킨 감각망막편. 조직의 형태가 비교적 잘 유지되고 있으며 GFAP 염색반응에 부분적인 약한 양성을 보인다. (×100)

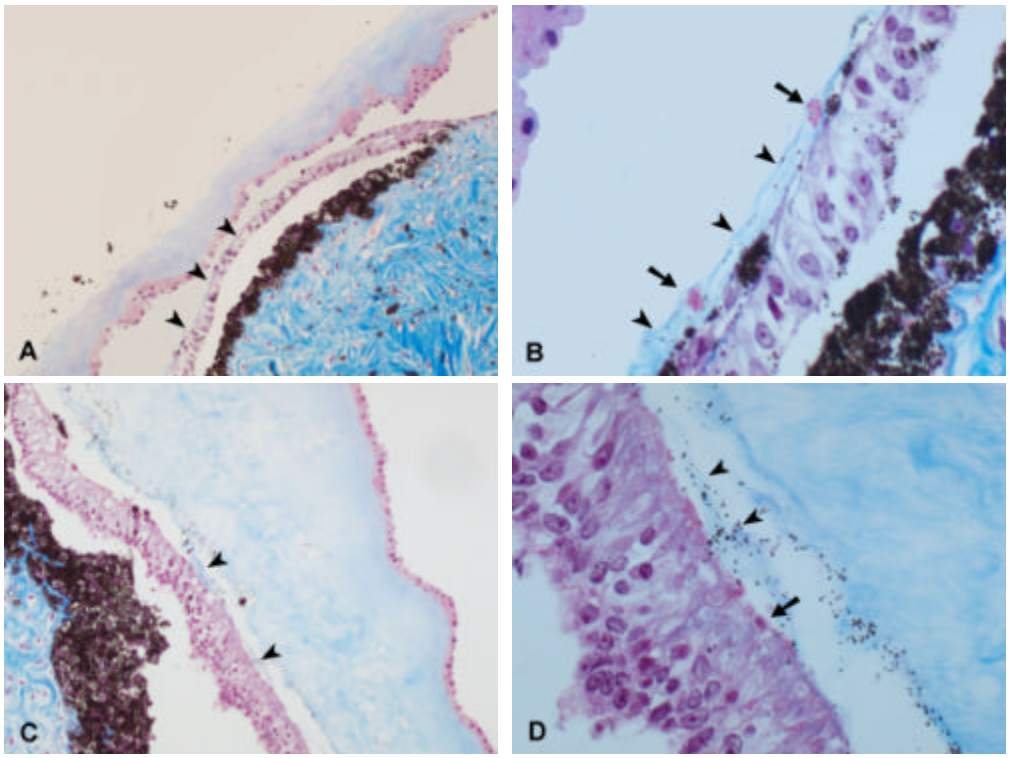

그림 3. 망막색소상피세포편을 양막상피측 상향과 양막실질측 상향으로 위치시켜 3주 기관조직배양 후 시행한 Masson's trichrome 염색 소견. A: 양막상피측 상향으로 위치시킨 망막색소상피세포편. 양막상피와 사이에 존재하는 콜라젠(화살표머리)을 관찰할 수 있다. (×100) B: 콜라젠(화살표머리)과 함께 활성 핵형의 방추형 세포(화살표)가 관찰되고 있으며 일부는 세포질에 다량의 색소체가 포함되어 있음을 볼 수 있다. (×400) C: 양막실질측 상향으로 위치시킨 망막색소상피세포편. 국소적으로 양막의 실질부와 구별되어 보이는 콜라젠 덩어리가 관찰된다. (×100) D: 콜라젠 덩어리(화살표머리)와 활성 핵형이 방추형 세포(화살표)가 관찰이 되나 상피상향의 경우보다 상대적으로 적고 국소적인 배치를 보인다. (×400)

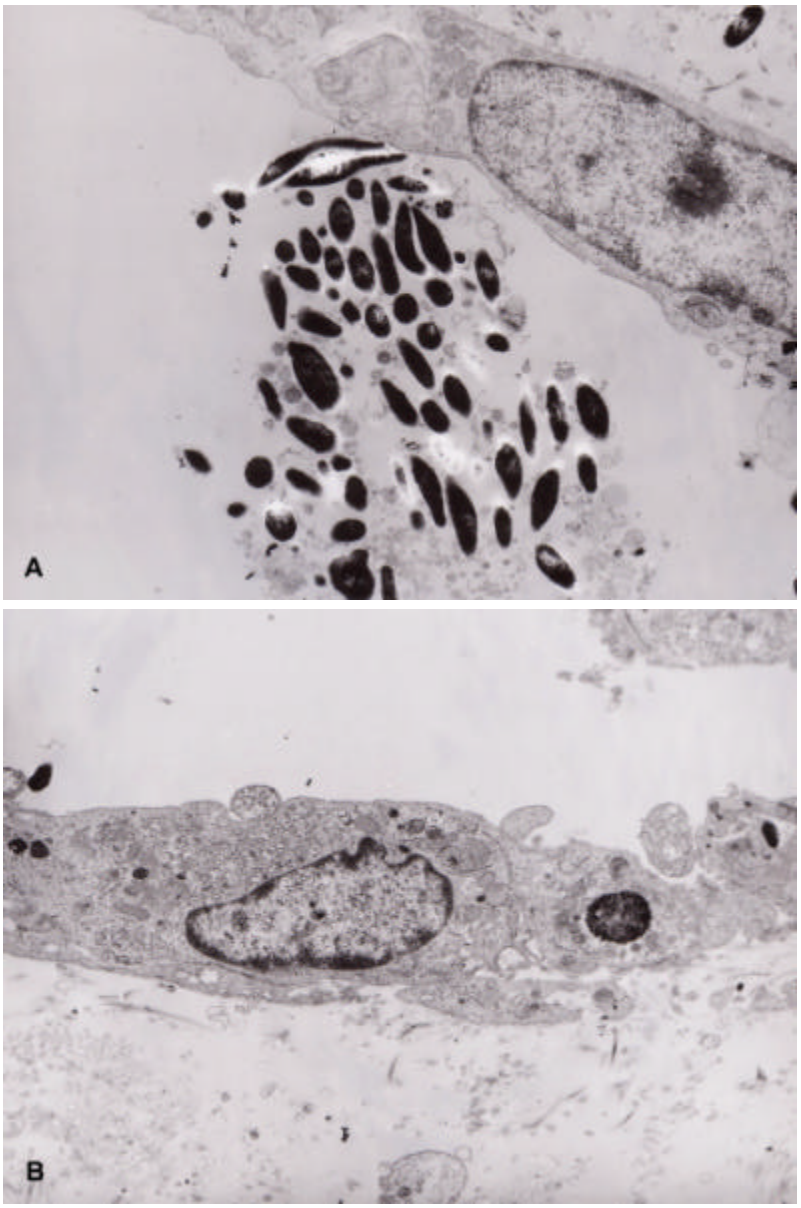

그림 4. 자유유리 상태인 망막색소상피편의 투과전자현미경 소견. A: 1주 소견. 아래쪽의 유리된 형태의 망막색소상피세포와 위쪽의 섬유모세포. (×10400) B: 3주 소견. 세포질 내에 색소과립을 포함한 섬유모세포와 주변의 콜라젠 섬유. (×7800)

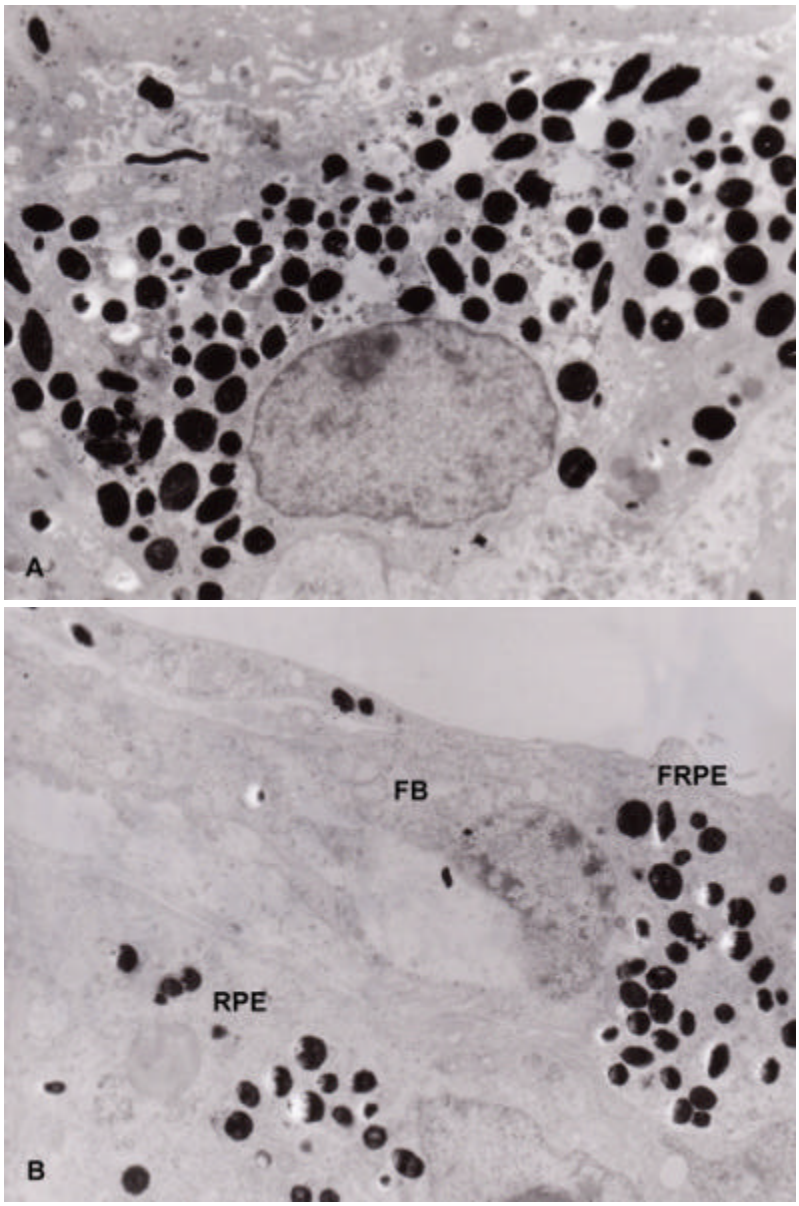

그림 5. 양막상피측 상향으로 기관조직 배양한 망막색소상피세포편의 투과 전자현미경 소견. A: 1주 소견. 구조를 잘 유지하고 있는 망막색소상피세포층. (×7800) B: 3주 소견. 아래쪽 망막색소상피층(RPE)의 표면에 존재하는 유리 형태의 망막색소상피세포(FRPE)와 섬유모세포(FB). (×7800)

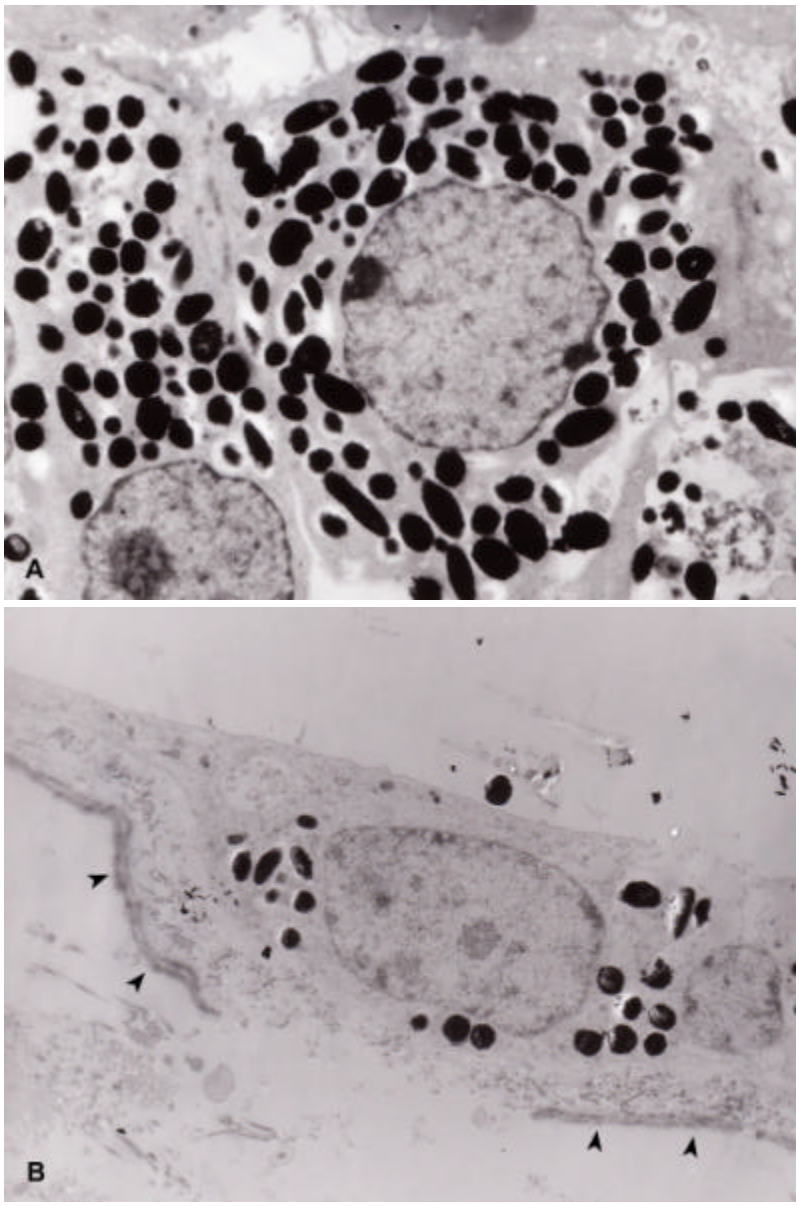

그림 6. 양막실질측 상향으로 기관조직 배양한 망막색소상피세포편의 투과전자현미경 소견. A: 1주 소견. 구조를 잘 유지하고 있는 망막색소상피세포층. (×7800) B: 3주 소견. 부르크막(화살표머리)에 부착되어 방추형의 세포질을 보이는 망막색소상피세포. (×7800)

Ⅳ. 고찰

증식유리체망막병증은 망막박리에서 치료나 예방에 많은 어려움이 있으며 시력 및 수술 예후를 불량하게 하는 심각한 합병증이다. 증식유리체망막병증의 병태생리가 비정상적이고 과도한 창상치유라는 가설이 있으며[30] 이때 관여하는 세포들은 제 위치에서 탈락하여 유리체로 유리된 세포들이라는 사실이 알려져 있다.[1-4] 이런 병태생리를 고려할 때 예방법으로 망막색소상피세포나 교세포가 제 위치를 탈락하지 않게 기계적인 방어를 하여 유리체 내로 세포의 유리를 막아보는 것을 고려할 수 있을 것이다. 또한 세포의 증식과 변형을 화학적으로 조절하여 증식막의 발생과 수축을 억제하여 과도한 창상치유 발생을 방지하는 방법도 하나의 방법으로 생각할 수 있다. 이와 같은 두 가지 목적을 모두 만족시킬 수 있는 성질을 가지고 있는 양막은 증식유리체망막병증 예방의 유력한 재료로 생각된다.

본 실험에서 동종의 양막과 안구를 사용하지 않고 이종의 것을 사용하였는데 이는 양막의 면역학적 불활성으로 인하여 양막이 이종간 이식에서도 거부반응이 없는 구조임이 입증되어 있기 때문이다.[11,12]

현재 양막과 망막조직 유착에 연구가 되어있지 않아 체외 기관조직배양의 방법을 선택하였다.[31] 조직유착평가와 조직변화검사를 위한 적절한 배양기간을 선택하기 위해 기관조직배양 시 얼마 정도의 기간까지 배양조직이 체외에서 생존가능한지를 먼저 확인하였다. 확인한 바 4주까지는 조직의 체외생존에 큰 장애가 없었으나 5주부터는 체외생존이 급격히 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 양막은 체외 배양환경에서 2-3주에 50-90%의 생존률을 보이는 것으로 알려져 있다.[32] 그러나 이러한 양막의 생존은 양막 상피세포의 생존을 의미하며 실질은 상피세포의 생존과 관계없이 체외에 적용이 되며 실제로 상피세포의 탈락 시켜 상피세포가 없는 실질막 자체만 사용하기도 한다.[33] 토끼안구표면에 양막을 적용시킨 실험에서는 3개월까지 양막이 유지되는 것이 보고된 바 있다.[11] 감각망막은 혈관에 의해 지속적인 혈액공급을 받는 조직이므로 체외환경에서 생존력이 유지되는 데는 한계가 있다. 망막색소상피세포편의 경우는 망막색소상피세포자체로는 세포 생존에 충분한 조건만 형성이 되면 계속 분화를 하면서 생존이 가능하다.[34,35] 그러나 조직편은 기술상의 문제로 불가피하게 맥락막 조직이 포함될 수 밖에 없으므로 맥락막 조직의 체외생존에 따라 조직

편 생존기간이 제한되며 망막색소상피층이라는 조직 구조도 체외생존을 제한하는 요소이다. 배양기간에 따른 유착률의 변화는 망막편의 생체외 기관조직배양 환경에서 조직의 생존력의 한계와 연관이 있는 것으로 생각되었다. 이 결과를 이용하여 유착률 평가와 유착과 관계된 조직염색의 시기를 기관조직배양 3주에 시행하였다.

양막상피면에 망막편을 접촉시켜 기관조직배양을 한 경우 양막상피세포가 세포간 부착을 방해하는 것으로 보인다.[36] 이와 같은 이유로 양막상피면과 접촉한 경우보다는 양막실질면과 접촉한 경우 유착률이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 외안부에서 보이는 것과는 다른 의미를 가진다. 외안부, 특히 각막 질환에서 사용하는 경우 일시적 생물학적 붕대나 생체형 렌즈로 사용하는 경우 양막상피면이 각막에 대응되게 위치시켜 양막 아래로 각막상피세포 혹은 결막상피세포가 증식하여 결손 부분을 덮게끔 유도한다. 그리고 다 덮인 후에는 양막이 자연탈락되도록 한다.[21] 그러나 기저막의 대용으로 완전 이식을 목적으로 할 경우는 앙막실질면이 각막상피세포결손부위에 부착되게 위치시킨다. 이때는 양막이 결손된 각막기저막의 역할을 대신하게 하여 부착된 양막의 표면으로 각막세포가 자라는 것을 유도하는 것이다.[37] 양막과 망막세포편과의 대응은 덮인 양막 아래로 세포를 증식시키는 것이나 기저막 대용으로 사용하는 것이 아니라 양막과 조직의 직접 유착을 유도하는 것이 목적이다. 생존하는 세포 혹은 지방성분의 세포막이 주종인 양막상피편은 세포로 구성된 조직과의 유착률이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

감각망막편은 유리체측이 망막의 구조교세포인 뮐러씨세포의 기저막인 내경계막이 가장 외측에 있게 된다.[38] 이와 같은 조직학적 특성으로 인하여 감각망막과 양막의 세포성 조직유착이 감각망막편의 유리체측 표면에서 내경계막을 뚫고 발생할 수는 없다. 감각망막의 경우 세포성 조직유착은 감각망막편의 절단부의 감각망막세포층이 노출 된 부분에 국한되어 발생할 것으로 추정되었고 감각망막내의 교세포가 주된 역할을 할 것으로 생각되었다. 그러나 조직염색의 결과는 감각망막 내 교세포의 활성이 증가하기는 하였으나 부분적으로 발생하였고 오히려 자유유리된 감각망막편에서 교세포 활성이 현격하게 증가한 것이 관찰되었다. 관찰의 결과로 양막이 교세포의 활성을 억제하여 조직편의 세포를 안정시키는 효과로 인하여 교세포의 활성, 증식, 변성에 의한 조직유착이 저하되는 것을 추정할 수 있었다.

감각망막편의 유착률이 망막색소상피편의 유착률보다 현저히 적은 것은 감각망막편의 조직학적 특징과 양막의 교세포 안정효과와 관계가 있는 것으로 생각된다.

망막색소상피세포는 맥락막과는 부르크막으로 경계되어 있다.[39] 증식유리체망막병증에서 가장 주된 세포이며 유리체로 유리된 경우 쉽게 변형되어 섬유모세포로 변형되는 것으로 알려져 있다.[5,6] 조직염색에서 망막색소상피세포층의 표면에 존재하는 섬유모세포는 내부의 색소로 망막색소상피세포에서 분화한 것으로 추정되며 이 섬유모세포가 생성한 콜라젠에 의해 망막층과 유착되는 것이 관찰되었다. 제 위치에서 탈락한 세포들이 양막으로 인해 국소위치에 제한되어 섬유모세포로 변형되어 조직유착에 주된 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나 탈락된 세포들이 양막에 위치시키기 전 조직처치 시 유리된 것인지 기관조직배양과정에서 변형 혹은 탈락된 것인지 완전히 구별할 방법은 없다. 비록 Masson's trichrome 염색에서 세포접촉억제의 가능성이 있는 양막상피측에 대응한 경우 망막색소상피층 표면에 전체적으로 비교적 균일하게 섬유모세포와 콜라젠 섬유가 관찰되는 것으로 보아서는 배양과정에서 변형된 세포라는 추정을 할 수 있으나 확실한 결론을 내리기는 부족하다. 추후 조직처치 과정과 검사법의 개발로 실험과정에 발생할 수 있는 오류를 최소화 시키고 조절할 필요가 있다. 조직처치 시 망막색소상피세포 탈락은 감각망막편의 조직유착에도 관련이 있는 내용이다. 감각망막편의 채취 시 일부에서는 육안으로도 확인될 정도의 망막색소상피세포의 오염이 관찰되었다. 이러한 조직편은 실험에 사용하지 않고 폐기하였으며 모든 감각망막편은 채취 직후와 양막 위에 위치시키기 전에 DMEM에 충분히 세척을 하였지만 망막색소상피세포 현미경적 오염을 완전히 배제할 수는 없으며 이러한 망막색소상피세포 오염이 감각망막편의 조직유착에 관여하여 기관조직 배양 시 유착률을 보다 증가시킬 가능성이 있다. 이런 가능성을 고려할 때 실제 조직편의 유착률은 실험결과보다 더 낮을 수 있다는 점을 염두에 두어야 할 것이다.

양막은 각종 세포외기질을 포함하고 있으며 cytokine을 조절하여 상피세포를 증식시키고 변형을 억제하는 효과가 있다.[13-16,23] 이러한 효과는 망막색소상피세포에도 나타난다. 증식유리체망막병증에서 망막색소상피세포는 유리체 내에서 섬유모세포로 변성되어 섬유막을 형성시킨다. 변성 초기에는 세포질 내에 색소과립을 포함하고 있으나 시간이 지나면서 색소가

소실되는 탈 분화를 보여 후기에는 조직 변화를 형태학적으로 관찰하는데 제한이 따른다.[40-43] 본 연구에서는 1주와 3주에 투과전자현미경 관찰을 한 결과 자유유리 검체에서 세포질 내에 색소과립을 함유하고 있는 섬유모세포를 관찰할 수 있었고 색소과립은 손상되지 않은 형태로 포식소체의 형태가 아닌 것으로 미루어 망막색소상피세포에서 변형된 것으로 추정할 수 있었다. 배양 3주에는 탈분화가 완성되기 전으로 생각되며 이 시기에는 형태학적 관찰로도 섬유모세포의 기원을 추정할 수 있을 것으로 생각된다. 양막과 부착이 된 경우도 망막색소상피세포 표면에 섬유모세포 혹은 섬유모세포로 변형되어가는 것으로 추정되는 세포가 관찰이 되는데 이는 망막색소상피편의 Masson's trichrome 콜라젠 염색 결과와도 일치하는 소견이다. 이 소견은 양막이 부착되는 기전에 섬유모세포에서 생성되는 콜라젠이 관여하는 것을 알려주는 것이다. 양막과 부착된 망막색소상피세포편의 과도하지 않은 섬유모세포화로 인해 양막과의 부착에는 오히려 도움이 되는 것을 관찰할 수 있었고 상대적으로 세포가 안정되는 것으로 보아 양막에 의한 망막색소상피세포의 안정화 효과가 있음을 알 수 있었다. 관찰되는 변성된 섬유모세포가 근섬유모세포로 변형된 것은 관찰되지 않았으나 이는 체외환경의 기관조직배양의 한계가 4주인 점을 보아서 생체 내에 양막을 적용시켜 더 장기간 실험을 하여 근섬유모세포로 변형을 억제하는지 확인할 필요가 있다.[28]

본 실험에서 양막이 증식유리체망막병증의 억제와 예방의 가능성을 확인할 수 있었다. 실험 결과에서 양막을 안구 내 망막과 대응할 때 양막의 표면 위치와 부착 위치에 대한 기술적 문제에 대한 해답이 될 것으로 보인다. 또한 양막을 감각망막 결손 부위에 위치시킬 때 조직유착이 발생하여 특별한 추후 조치 없이 양막을 고정시킬 수 있는 것으로 보인다. 이렇게 위치시킨 양막은 연접한 망막색소상피세포와 감각망막의 교세포를 안정시켜 증식유리체망막병증을 억제할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

체외환경에서 양막이 망막조직과 유착이 발생하며 망막색소상피세포의 변성을 억제하는 효과가 있다는 것을 확인하였으므로 추후 양막의 생체 내 적용 시 효과와 기술적 문제 등에 대한 후속 연구가 진행되어야 할 것이다.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 첫째, 체외 실험실 조건에서 돼지 안구에서 분리한 망막층과 인간의 양막 간에 특별한 조작 없이 조직유착이 가능한지와 이때 양막의 표면의 방향과 망막편의 종류에 따른 차이가 있는지 확인하고자 하였으며 둘째, 조직유착이 된 경우에 감각망막편과 망막색소상피편의 조직학적 변화를 확인하고자 하였으며, 셋째, 양막의 망막색소상피의 세포안정화 효과를 알아보기 위하여 조직유착된 경우와 유착되지 않은 경우의 망막색소상피세포의 변화를 형태학적으로 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 기관조직배양시 4주까지는 기간에 따른 유착률에 거의 차이를 보이지 않았으나 5주째에는 이전에 비하여 유착률이 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 4군에서는 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 기간에 따른 유착률의 차이는 망막조직의 체외생존기간과 관계가 있는 것으로 생각된다.

2. 기관조직배양 3주에 평가한 결과 양막 표면의 방향과 망막편의 종류에 따른 유착률이 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 양막상피면 접촉보다는 양막실질면 접촉이, 감각망막편보다는 망막색소상피세포편이 더 유착률이 높았다. 양막을 망막에 접촉시킬 때 양막의 부착표면를 양막실질면으로 하여야 조직유착 발생이 용이하다는 것을 알게 해준다.

3. 양막과 망막편의 조직유착 시 감각망막편의 교세포에 의한 유착효과는 주된 역할을 하지 못하는 것으로 생각되며 망막색소상피세포가 주된 역할을 하는 것으로 생각된다.

4. 양막의 망막색소상피세포 변성억제 효과는 투과전자현미경 관찰로 확인이 되었다. 양막의 부착면이 실질측일 때 상피측인 경우에 비해 세포변성억제 효과가 높은 것이 관찰되었다.

참고 문헌

1. Van Horn DL, Aaberg TM, Machemer R, Fenzl R. Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 1977; 84: 383 - 93.
2. Clarkson JG, Green WR, Massof D : A histologic review of 168 cases of preretinal membranes. Am J Ophthalmol 1977; 84: 1 - 17.
3. Newsome DA, Rodrigues MM, Machemer R. Human massive periretinal proliferation. In vitro characteristics of cellular components. Arch Ophthalmol 1981; 99: 873 - 80.
4. Vinores SA, Campochiaro PA, McGehee R, Orman W, Hackett SF, Hjelmeland LM. Ultrastructural and immunocytochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia, and fibroblasts in vitreous culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990; 31: 2529 - 45.
5. 김태연, 권오웅, 이성철. 망막내면과 외면에 발생한 증식성 막의 형태에 관한 전자현미경적 연구. 대한안과학회지 1989; 30: 225 - 34.
6. Lee SC, Kwon OW, Kim CY. The effect of vitreous on proliferation of retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34(suppl): 949.
7. Wiedemann P, Weller M. The pathophysiology of proliferative vitreoretiopathy. Acta Ophthalmol 1988; 189: 7 - 15.
8. Raymond L, Jacobson B. Isolation and identification of stimulatory and inhibitory cell growth factors in bovine vitreous. Exp Eye Res 1982; 34: 267 - 86.
9. 이성철, 권오웅, 김순현. 증식초자체망막병증에서 망막색소상피세포의 콜라젠합성에 관한 연구. 대한안과학회지 1998; 39: 1801 - 7.
10. Van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membrane; a light microscopic, transmission, and scanning microscopic study. Am J Obstet Gynecol 1978; 131: 872 - 80.
11. 이우재, 김재찬. 양막의 생체조직적합성과 양막 이식이 각막 신생혈관 억제에 미치는 효과. 대한안과학회지 1997; 38: 1097 - 104.

12.Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001; 42: 1539 - 46.
13.Kniss DA, Zimmerman PD, Fertel RH, Iams JD. Transforming growth factor - beta potentiates epidermal growth factor - induced prostaglandin E2 production in amnion cell. Prostaglandins 1993; 45: 27 - 33.
14.Korte K, Casey ML. Vanadate, epidermal growth factor and prostaglandin E2 prodiction in human amnion cell. Clin Exp Obstet Cynecol. 1993; 20: 159 - 62.
15.Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin - 1 beta and interleukin - 6) in amniochorionic membrane. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 493 - 500.
16.Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin - 6 and Interleukin - 8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccaride. Bio Reprod 1997; 57: 1438 - 44.
17.Ashworth MF, Morton KE, Dewhurst J, Lilford RJ, Bates RG. Vaginoplasty using amnion. Obstet Gynecol 1986; 67: 443 - 6.
18.Barlas M, Gokcora H, Erekul S, Dindar H, Yucesan S. Human amniotic membrane as an intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. J Pediatr Surg 1992; 27: 597 - 601.
19.Tulandi T. Prevention of postoperative intra - abdominal adhesions. Curr Opin Obstet Gynecol 1990; 2: 287 - 90.
20.Arora M, Jaroudi KA, Hamilton CJ, Dayle F. Controlled comparison of interceed and amniotic membrane graft in the prevention of postoperative adhesions in the rabbit uterine horn model. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1994; 55: 179 - 82.
21.우홍명, 김만수, 권오경. 가토에서 엑시머레이저 치료광각막절제술 후 양막이 창상치유에 미치는 효과. 대한안과학회지 1999; 40: 1782 - 92.
22.Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory

effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. Cornea 2001; 20: 408 - 14.
23.Choi TH, Tseng SC. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell - induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. Cornea 2001; 20: 197 - 204.
24.Fujishima H, Shimajaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. Ophthalmic Surg Lasers 1998; 29: 428 - 31.
25.Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. Ophthalmology 1997; 104: 974 - 85.
26.Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. Br J Ophthalmol 1998; 82: 235 - 40.
27.Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 1995; 14:473 - 84.
28.Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor - beta isoforms, TGF - beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. J Cell Physiol 1999; 179: 325 - 35.
29.Chang CJ, Yang JY. Frozen preservation of human amnion and its use as a burn wound dressing. Changgeng Yi Xue Za Zhi 1994; 17: 316 - 24.
30.Aaberg TM. Management of anterior and posterior proliferative vitreoretinopathy. XLV. Edward Jackson memorial lecture. Am J Ophthalmol 1988; 106: 519 - 32.
31.Mertsch K, Hanisch UK, Kettenmann H, Schnitzer J. Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. J Comp Neurol 2001; 431: 217 - 27.
32.Burgos H, Faulk WP. The maintenance of human amniotic

membranes in culture. Br J Obstet Gynaecol 1981; 88: 294 - 300.
33.Tyszkiewicz JT, Uhrynowska - Tyszkiewicz IA, Kaminski A, Dziedzic - Goclawska A. Amnion allografts prepared in the Central Tissue Bank in Warsaw. Ann Transplant 1999; 4: 85 - 90.
34.김수원, 임혜빈, 허원. 소 망막색소상피 세포배양에 의한 국소현태 및 증식율의 비교. 대한안과학회지 1998; 39: 2673 - 78.
35.진희승, 김순현, 권오웅, 오중협. Poly lactic - co - glycolic acid를 이용한 배양 망막색소상피세포의 판형 이식. 대한안과학회지 2000; 41: 1845 - 52.
36.Rodesch F. Differentiation, contact inhibition and intercellular communication in retinal pigment cells. Exp Cell Res 1973; 76: 55 - 62.
37.Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. Am J Ophthalmol 2001; 131:324 - 31.
38.Green WR. Vitreoretinal junction. In: Ryan SJ. Retina. 2nd ed. St Louis: Mosby; 1994. p. 1869 - 930.
39.Hewitt AT, Adler R. The retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: structure and specialized functions. In: Ryan SJ. Retina. 2nd ed. St Louis: Mosby; 1994. p. 58 - 71.
40.Jaing DY, Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Growth and contractility of cells form fibrocellular epiretinal membranes in primary tissue culture. Br J Ophthalmol 1988; 72: 116.
41.Laqua H, Machemer R. Clinico - pathological correlation in massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 1975; 80: 913 - 29.
42.Machemer R, Laqua H. Pigment epithelim proliferation in retinal deatchment. Am J Ophthalmol 1975; 80: 1 - 23.
43.Mandelcorn M, Machemer R, Fineberg E, Hersch S. Proliferation and metaplasia of intravitreal retinal pigment epithelial cell autotransplant. Am J Ophthalmol 1975; 80: 227 - 37.

= Abstract =

Tissue adhesion between human amniotic membrane and porcine retinal tissue flap *in vitro* and inhibition effect of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell transformation

Moon Shin Lee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Oh Woong Kwon)

Cells spreading through vitreous after sensory retinal defect are known to be transformed and produce the collagen. The collagen fibers form fibrous membranes in vitreous and on retinal surface, thereafter membranes contract and pull sensory retina. Ultimately tractional retinal detachment will develop and proliferative vitreoretinopathy will occur. The amniotic membrane can be used as a candidate limiting the spreading of cells and covering the defect of sensory retinal area.

In this study, tissue adhesion rate between the human amniotic membrane and the porcine retinal tissue was evaluated, and histological change of the sensory retina and the retinal pigment epithelium was studied. And the inhibition effect of amniotic membrane in retinal pigment epithelial cell transformation was evaluated.

The amniotic membrane from normal human placenta and the retinal tissue flap from normal pig were used. The sensory retinal and the retinal pigment epithelial flap were placed on the amniotic membrane in culture disk. Tissue adhesion was evaluated and graded at 1,2,3,4 and 5 weeks after the organotissue culture. Glial fibrillary acidic protein immunohistochemical staining of the sensory retina and Masson's

trichrome staining of the retinal pigment epithelial flap were performed to find histological changes of the retinal flaps. Transmitted electron microscope examination was performed to study the stabilization effects of amniotic membrane to retinal pigment epithelium.

In the result, tissue adhesion rates between the amniotic membrane and the retinal tissue flap showed no significant interval change until 4th week, but tend to decrease in 5th week of organotissue culture. Tissue adhesion rate was higher in the chorion-side culture than in the amnion-side, and the retinal pigment epithelial flap than the sensory retinal flap. Retinal pigment epithelial cell stabilization effect of amniotic membrane was confirmed by ultrastructural examination. The inhibition of cell transformation was higher in the chorion-side culture than amnion-side.

In view of above findings, it is expected that the amniotic membrane play a role in covering the defected sensory retinal area. Amniotic membrane can be used for prevention of proliferative vitreoretinopathy by mechanical barrier and chemical stability effect to retinal pigment epithelium.

Key words: proliferative vitreoretinopathy, amniotic membrane, sensory retina, retinal pigment epithelium, tissue adhesion, inhibition of cell transformation.