

가토에서 굴절교정 레이저각막절제술 (photorefractive keratectomy) 후 각막내피세포의 F-actin 변화

강신정 · 김응권 · 김종화 · 김홍복

= 요약 =

고도근시안에서 시행되는 각막절삭가공성형술에서 이차절제를 엑시머레이저를 이용하면 이론적으로 굴절교정레이저각막절제술보다는 각막흔락이 줄고, 각막절삭술보다는 교정이 더 정확할 것으로 예상되어 임상적으로 시도되고 있다. 일반적으로 6 디오퍼터 이하의 엑시머 레이저 조사는 각막내피세포에 영향을 미치지 않는다고 알려져 있으나, 130 μ m의 절편을 제거한 후 각막실질의 심층부에 10~15 디오퍼터 교정을 위한 엑시머 레이저를 조사했을 때 각막내피세포의 손상에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 이에 저자들은 각막심층부까지 굴절교정레이저각막절제술을 시행한 뒤 각막내피세포에 미치는 영향을 F-actin 염색을 통해 알아보고자 하였다. 가토 8마리 16안을 두 군으로 나누어 6, 9, 12, 15 디오퍼터에 해당되도록 한 군은 단단계 절제방식으로, 다른 군은 다단계 절제방식으로 굴절교정레이저각막절제술(VISX 사, 160 mj/cm²/pulse, 5Hz)을 시행하였다. 술 후 7일째 안구를 적출하여 각막내피세포의 F-actin를 관찰하였다. 다단계 절제방식으로 시행한 군에서는 F-actin의 변화가 관찰되지 않았고, 단단계 절제방식으로 시행한 군 중 12, 15 디오퍼터에서는 각막내피세포의 pleomorphism과 polymegathism이 증가한 소견을 보였다. 엑시머 레이저를 이용하여 가토 각막심층부에 각막절제술을 시행하면 각막내피세포에 손상을 줄 수 있으며 따라서 인체에서 엑시머 레이저를 각막절삭가공성형술의 이차 절제술로 사용할 때에는 각막내피세포의 손상여부를 세밀히 관찰하여야 할 것으로 생각된다(한안지 36:2108~2113, 1995).

= Abstract =

Corneal Endothelial F-actin Changes after Deep Photorefractive Keratectomy (PRK) in Rabbit

Shin Jeong Kang, M.D., Eung Kweon Kim, M.D.,
Jong Hoa Kim, M.D., Hong Bok Kim, M.D.

〈접수일 : 1995년 7월 31일, 심사통과일 : 1995년 11월 4일〉

연세대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

본 논문의 요지는 1995년 4월 22일 용평에서 개최된 대한안과학회 제74회 학술대회에서 구연 발표되었음.

본 논문은 1994년 연세대학교 의과대학 일반과제(강사) 연구비의 보조로 이루어짐.

Laser-assisted in situ keratomileusis(LASIK) theoretically provide less corneal haze and more accurate correction. In the LASIK, however, photorefractive keratectomy(PRK) will be done on the stromal surface exposed after removal of the 130 μ m thick lenticule. Deep stromal ablation after removal of 130 μ m thick lenticule may result in endothelial damage. We observed endothelial cytoskeletal changes after deep PRK to evaluate the endothelial safety in rabbit.

PRK was performed on the rabbit cornea without removing the epithelium with VISX 20/20(160mj/cm²/pulse, 5Hz) to correct 6, 9, 12, and 15 diopters of myopia by single or multiple zone. Seven days after ablation, the rabbit was euthanized, corneas excised and endothelial F-actin was stained with NBD-phalloidin to demonstrate any cytoskeletal changes.

No F-actin changes were observed in corneas after either single zone, 6 or 9 diopter correction, and multiple zone ablation. However, 12 diopters or higher correction in a single zone resulted in pleomorphism and polymegethism on focal areas.

In the LASIK procedure, the endothelium might be damaged and further investigation for the endothelial preservation during the procedure is needed in human(J Korean Ophthalmol Soc 36:2108~2113, 1995).

Key Words : Corneal endothelium, F-actin, Photorefractive keratectomy.

수술적 방법으로 굴절이상을 교정하려는 연구는 안과에서 가장 활발한 분야의 하나이다. 특히 엑시머레이저를 이용한 굴절교정레이저각막절제술(photorefractive keratectomy)은 그 정확도와 높은 예측성으로 중등도 이하의 근시에서 효과적이라는 많은 보고들이 있다¹⁾. 그러나 10 디옵터 이상의 고도근시환자에서는 절제량이 많아짐에 따라 초래되는 각막의 혼탁으로 인해 다른 방법들이 고려되는데, 이 경우에는 각막절삭가공성형술(Keratomileusis)이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 1987년 Ruiz가 비냉동본체각막절삭가공성형술(Keratomileusis in situ)를 소개하였으며⁴⁾, 수술방법이 간단해지고 수술의 안정성이 입증되었으나 이차절제량이 일정하지 않음으로써 그 정확도가 다소 떨어지는 것으로 보고되고 있다⁵⁾. 최근에는 비냉동본체각막절삭가공성형술의 정확도를 높히려는 노력의 일환으로 이차절제를 엑시머레이저를 이용하여 시행하는 Laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK) 방법이 소개되었다^{6,7)}. 그러나, 130~150 μ m 두께의 각막절편을 절제한 후에 엑시머레이저를 조사하게 되면 각막의 보다 깊은 부위에 레이저를 조사하게 되는데, 이 때의 각막내피세포에 대한 안정성

에 대하여서는 아직 알려져 있지 않다.

F-actin은 세포의 세포골격을 이루는 중요한 요소의 하나로, 정상내피세포에서는 세포연을 따라 육각형을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 세포가 적은 양의 stress 또는 손상을 받는 경우에도 세포내 F-actin의 수가 증가하는 등 배열상태가 변화하여 각막내피세포가 stress를 받는 경우의 세포변화를 관찰하는데 유용하다고 알려져 있다⁸⁾. 이에 본 연구에서는 엑시머레이저로 각막 심층부를 조사하였을 때 각막내피세포의 손상유무 및 손상정도를 F-actin 염색을 통하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 굴절교정레이저각막절제술

실험동물로는 체중 2~3kg의 백색가토 8마리 16안을 사용하였다. 실험동물을 sodium pentobarbital (Entobar[®])을 100mg/kg 용량으로 정맥주사하여 전신마취시킨 후 ultrasonic pachymeter(DGH-1000, DGH Technology, Inc., San Diego, CA)로 각막두께를 측정하고, VISX 20/20(160mj/cm²/pulse, 5Hz)을 이용하여 6, 9, 12, 15 디옵터의

근시에 해당되도록 굴절교정레이저각막절제술을 시행하였다. 무작위로 2군으로 나누어 한 군은 단단계 절제방식(single zone)으로, 다른 군은 다단계 절제방식(multiple zone)으로 해당 디옵터에 각 2안씩 nomogram에 따라 각막절제술을 시행하였다. 단단계 절제방식을 시행한 군은 6mm 크기로 예상깊이를 전부 절제하였는데 그 깊이는 각각 80, 119, 158, 196 μ m였다. 다단계 절제방식을 시행한 군은 전체 예상깊이의 50%는 4.5mm 크기로, 30%는 5mm 크기로, 20%는 6mm 크기로 절제하였는데 3 단계로 절제한 깊이의 합은 각각 60, 73, 93, 113 μ m였다.

2. F-actin 염색

실험 7일 후에 안구를 적출하여 공막이 2~3mm 정도 포함되도록 각막을 절제하여 90분간 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 각막중앙부를 8mm크기로 절제하고, 현미경하에서 forceps으로 일부 후층의 실질을 포함하여 각막내피세포와 Descemet 막을 제거하였다. 각막을 편평하게 하기 위하여 각막내피세포와 Descemet 막 주변부에 8개의 방사상 절개를 하였다. 1.64×10^{-4} mol/l 농도의 nitrobenzoxadiazole-phallicidine(Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon)으로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 염색하였다. 0.01M 농도의 인산완충용액(phosphate-buffered saline solution ; PBS, pH 7.2)으로 세척하고, 조직은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합한 용액 내에서 비형광성 유리 슬라이드 위에 표본을 만든 후, Filter DM 510(excitation, 450~490 nm, barrier, 520nm)의 Olympus형광현미경으로 촬영하였다.

결 과

실험가토에서 각막상피세포층이 포함된 각막의 평균 두께는 $406.5 \pm 10.1 \mu$ m였다. 단단계 절제방식으로 굴절교정레이저각막절제술을 시행한 군에서 F-actin 염색을 시행하였을 때 6 디옵터와 9 디옵터를 절제한 경우 각막내피의 F-actin은 정상적인 분포, 즉 세포막을 따라서 나란히 분포하고 있는 정렬된 육각형의 배열을 보였다(Fig. 1, 2). 다단계 절제방식으로 절제한 경우 모든 디옵터에서 F-actin이 정

Fig. 1. Nitrobenzoxadiazole(NBD)-phalloidin stained F-actin fibers of the normal rabbit corneal endothelium(original magnification $\times 125$). No F-actin changes are observed in corneas after single zone, 6 or 9 diopter correction and in corneas after multiple zone, 6~15 diopter correction.

Fig. 2. Higher magnification of Fig. 1(original magnification $\times 250$). F-actin fibers are located adjacent to the cell border only. F-actin fibers are rarely noted in the cytoplasm.

상적인 육각형의 배열을 보였다. 그러나, 12 디옵터를 단단계 절제방식으로 절제한 경우에는 부분적으로 정상적인 육각형의 배열이 소실되고 pleomorphism과 polymegethism을 보이고 있었으며(Fig. 3, black arrow), 세포질 내 F-actin 이 증가되어

Fig. 3. Fig. 3 NBD-phalloidin stained F-actin fibers of the rabbit corneal endothelium after 12 diopter correction by single zone ablation (original magnification, $\times 125$). Focal areas of increased pleomorphism and polymegethism are noted (black arrow).

Fig. 5. NBD-phalloidin stained F-actin fibers of the rabbit corneal endothelium after 15 diopter correction by single zone ablation (original magnification $\times 125$). Areas of pleomorphism and polymegethism are noted more diffusely.

Fig. 4. Higher magnification of Fig. 3 (original magnification $\times 250$). Hexagonal pattern of F-actin arrangement is disturbed in a few cells. Increased F-actins are also noted in some cells (black arrow).

Fig. 6. Higher magnification of Fig. 5 (original magnification $\times 250$). Severe pleomorphism and polymegethism are observed in many cell (black arrow).

있는 곳도 관찰되었다(Fig. 4, black arrow). 15 디옵터를 단단계 절제방식으로 절제한 경우에 12 디옵터와 비교하여 정도가 더 심한 pleomorphism과 polymegethism이 보다 넓은 부위에 나타나고 있었다(Fig. 5, 6, black arrow).

엑시머레이저를 이용하여 표층각막을 절제해 내었을 때 주변 조직의 반응에 대하여서는 잘 알려져 있으나^{9,10}, 각막의 심층부에 시행하였을 경우 주변조직, 특히 각막내피세포에 미치는 영향에 대해서는

고 찰

아직 명확하게 알려져 있지 않다. Dehm 등¹¹⁾과 Koch 등¹²⁾은 193nm 파장의 엑시머레이저를 이용하여 각막 두께의 90%를 절개하고 각막내피세포를 관찰하였을 때 diamond knife를 사용하여 동일한 깊이를 절개하였을 때와 동일한 소견을 보였다고 하였으며, Amano와 Shimizu¹³⁾도 근시 환자에서 평균 37.8 μ m 깊이로 엑시머레이저를 조사하였을 때 수술 전에 비해 각막내피세포에 특별한 변화가 없는 것으로 보고하였다. Carones 등¹⁴⁾과 Cennamo 등¹⁵⁾도 근시 환자에서 굴절교정레이저각막절제술을 시행하였을 때에 각막내피세포에는 아무런 변화가 없었다고 하였고 엑시머레이저의 각막내피세포에 대한 안정성을 보고하였다. 그러나 Özler 등은 여러 종류의 엑시머레이저 주파수를 사용한 결과 80Hz 이상의 레이저로 깊이 조사할 경우에는 각막내피세포가 파괴되는 것을 보고하였다¹⁶⁾.

1989년 Pallikaris에 의해 처음 소개된 LASIK은 기존의 방법에 비해 높은 정확도, 빠른 시력의 회복과 수술 후 초기에 부족교정된 양을 재교정하기 쉽다는 장점들로 인해 많은 관심들이 집중되고 있지만, 이 경우에는 약 130~150 μ m의 각막절편을 제거한 후 엑시머레이저를 조사하여야 하므로 처음부터 엑시머레이저로만 교정한 경우보다 레이저가 도달하는 깊이가 깊어지게 되어 레이저의 조사면과 각막내피세포간의 거리가 사람의 정상각막두께인 약 550에서 400~420 μ m으로 줄어들게 된다.

정상가토의 각막두께는 약 300~400 μ m으로 알려져 있으나¹⁷⁾, 본 연구에 사용된 가토의 경우 각막상피를 포함한 각막의 평균 두께는 406.5 \pm 10.1 μ m으로 LASIK을 위해 절편을 절제하고 남아있는 각막실질의 두께와 비슷하게 하기위하여 이 연구에서는 각막 상피를 벗기지 않았다. 각막상피의 pulse당 절제정도는 각막실질과 아주 일치하지는 않으나 비슷하므로 이 연구에서는 그 차이는 무시하였다. 단단계 절제방식으로 절제한 모든 디오퍼터들과 단단계 절제방식으로 6 디오퍼터와 9 디오퍼터를 절제한 경우 각막내피세포의 F-actin은 정상적인 분포를 보여주고 있었다. 이들의 최대 절제깊이는 119 μ m이었다. 그러나 단단계 절제방식으로 12 디오퍼터와 15 디오퍼터를 절제한 경우, 즉 158 μ m 이상의 깊이에서는 정상적인 육각형의 배열이 소실되고 pleomorphism과 poly-

megethism을 보이고 있었으며, 세포질 내 F-actin이 증가되어 있는 곳도 관찰되었다. 따라서 레이저로 인한 각막실질의 절제두께가 깊어지면 각막내피세포가 영향을 받아서 손상을 입게 될 것으로 생각된다. 현재 LASIK이 일부에서 인체에 행하여지고 있는 바 아직 레이저 조사 nomogram이 알려져 있지 않다. 어떤 술자는 각막절삭가공성형술의 nomogram을 기계적으로 엑시머레이저 nomogram으로 환산하여 사용하기도 하고 다른 술자는 엑시머레이저 multizone nomogram 그 자체를 그대로 LASIK에 적용하기도 하는 등 동일 디오퍼터의 교정에 있어서도 서로 다른 교정량이 이용되고 있는 상태이다.

일반적으로 가토에 비해 사람의 각막내피세포가 외부의 stress에 저항력이 더 큰 것으로 알려져 있지만, 인체에서도 엑시머레이저의 조사 깊이가 깊어짐에 따라 각막내피세포가 손상을 입을 가능성이 있을 것으로 생각되며 따라서 LASIK 시행시 각막내피세포의 안정성을 고려하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Waring GO III : *Laser corneal surgery*. *Trans Am Ophthalmol Soc* 82:854-983, 1990.
- 2) Swinger CA, Barker BA : *Prospective evaluation of myopic keratomileusis*. *Ophthalmology* 9:785-792, 1984.
- 3) Nordan LT, Maxwell WA : *Keratomileusis*. In Schwab IR, ed. *Refractive keratoplasty*. New York, Churchill Livingstone, 1987, pp. 41-68.
- 4) El-Maghraby MA, Vitero E, Ruiz L : *Keratomileusis in situ to correct high myopia*. *Ophthalmology* 95(Suppl):145, 1988.
- 5) Bas AM, Nano HD : *In situ myopic keratomileusis : results in 30 eyes at 15 months*. *Refract Corneal Surg* 7:223-231, 1991.
- 6) Pallikaris IG, Paptzanake ME, Stathi EZ, Frenschok O, Georgiadis A : *Laser in situ keratomileusis*. *Lasers Surg Med* 10:463-468, 1990.
- 7) Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Siganos DS, Tsilimbaris MK : *A corneal flap technique for laser in situ keratomileusis*. *Arch Ophthalmol*

- 109:1699-1702, 1991.
- 8) Kim EK, Geroski DH, Holley GP, Urken SI, Edelhauser HF : *Corneal endothelial cytoskeletal changes in F-actin with aging, diabetes, and after cytochalasin exposure. Am J Ophthalmol* 114:329-335, 1992.
- 9) Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO III, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, Menasche M : *Corneal stromal wound healing in rabbits after 193 nm excimer laser surface ablation. Arch Ophthalmol* 107:895-901, 1989.
- 10) Fantes FE, Hanna KD, Waring GO III, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M : *Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. Arch Ophthalmol* 108:665-675, 1990.
- 11) Dehm EJ, Puliafito CA, Adler CM, Steinert RF : *Corneal endothelial injury in rabbits following excimer laser ablation at 193 and 248 nm. Arch Ophthalmol* 104:1364-1368, 1986.
- 12) Koch JW, Lang GK, Naumann GOH : *Endothelial reaction to perforating and non-perforating excimer laser excisions in rabbits. Refract Corneal Surg* 7:214-222, 1991.
- 13) Amano S, Shimizu K : *Corneal endothelial changes after excimer laser photorefractive keratectomy. Am J Ophthalmol* 116:692-694, 1993.
- 14) Carones F, Brancato R, Venturi E, Morico A : *The corneal endothelium after myopic excimer laser photorefractive keratectomy. Arch Ophthalmol* 112:920-924, 1994.
- 15) Cennamo G, Rosa N, Guida E, Del Prete A, Sebastiani A : *Evaluation of corneal thickness and endothelial cells before and after excimer laser photorefractive keratectomy. J Refract Corneal Surg* 10:137-141, 1994.
- 16) Özler SA, Liaw LL, Raney D, Berns MW : *Acute ultrastructural changes of cornea after excimer laser ablation. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:540-546, 1992.
- 17) Prince JH : *The rabbit in eye research. Springfield, Charles C Thomas, 1964, pp. 86-126.*