

유리체강내액 저온법이 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향

이 성 철 · 권 오 웅

= 요 약 =

본 연구는 토끼에서 유리체강내액 저온법이 실험적으로 증식유리체망막병증의 발생을 감소시킬 수 있는가를 알아보려고 하였다. 관류액이 유리체강을 지나도록 하면서 30분간 유리체절제술을 시행하였으며 수술이 끝나면서 배양된 망막색소상피세포를 유리체강내로 주입하였다. 대조군은 실온의 관류액을 사용하였고 실험군은 6℃의 관류액을 사용하여 실험군이 대조군에 비하여 수술 후 염증반응이 적었으며 건인망막박리의 발생이 적었음을 관찰하였다. 아울러 망막색소상피세포를 서로 다른 온도에서 1시간 30분동안 처치한 후 증식의 정도를 조사하였는데 43℃에서 처리한 세포의 증식이 현저히 감소되었고 4℃에서 보관한 세포도 증식이 둔화되었다. 초자체절제술중에 저온의 관류액을 사용하면 증식유리체망막병증의 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다(한안지 36:1498~1502, 1995).

= Abstract =

The Effect of Intraocular Hypothermia on RPE Cell Proliferation

Sung Chul Lee, M.D., Oh Woong Kwon, M.D.

The effects of intraocular hypothermia on experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits were studied. Vitrectomy was performed for 30 minutes with irrigating balanced salt solution in rabbit eyes, and the cultured retinal pigment epithelial cells were injected into the vitreous cavity. The irrigating balanced salt solution was used at room temperature in control eyes and was cooled to 6℃ in experimental eyes. Experimental eyes showed less postoperative inflammation and demonstrated less occurrence of tractional

〈접수일 : 1995년 3월 21일, 심사통과일 : 1995년 7월 6일〉

연세대학교 의과대학 안과학교실

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

이 논문은 1994년 연세대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

retinal detachment compared with the control eyes. In vitro, the growth of cultured human retinal pigment epithelial cells was studied in the conditions of different temperatures. Significant suppression of cell growth was noted at 43°C and also at 4°C. The cooled irrigating solution may be used during vitrectomy procedure to decrease the occurrence of proliferative vitreoretinopathy (J Korean Ophthalmol Soc 36:1498~1502, 1995).

Key Words : Hypothermia, Proliferative vitreoretinopathy, Vitrectomy.

증식유리체망막병증은 망막박리수술의 가장 큰 실패원인으로 망막의 내층과 유리체에서 섬유성 막이 형성되어 발생하는 질환이다. 섬유성 막을 구성하는 주된 세포가 망막색소상피세포인 것을 생각하면 망막색소상피세포의 증식이 증식유리체망막병증을 일으키는 이유들중의 하나인 것을 알 수 있다^{1,2,3}.

망막색소상피세포는 증식하여 섬유성 막을 형성할 뿐 아니라 증식된 세포가 신경교세포나 섬유아세포의 이동을 촉진시키기 때문에 수술중에 망막 위아래로 흩어진 망막색소상피세포의 증식을 억제할 수 있다면 증식유리체망막병증의 중요한 단계를 차단하는 효과를 가져오게 된다. 실제로 fluorouracil⁴, colchicine⁵, doxorubicin 등⁶이 실험적 증식유리체망막병증에서 효과적으로 세포증식을 억제하는 것으로 증명되었지만 이들은 지속적으로 유리체에서 그 농도를 유지할 수 없고 있을지도 모를 안구내 독성작용이 임상에서의 사용을 주저하게 만든다⁷. 약물외에도 방사선치료^{8,9}와 고온법¹⁰ 등이 증식유리체망막병증의 발생을 줄이기 위하여 실험적으로 사용되었으나 임상에서 이용하기에는 간단하지 않다.

본 연구는 6°C로 낮은 배양액이 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향을 실험적으로 조사하고 실제로 낮은 온도에서 조절된 망막색소상피세포가 토끼의 유리체에서 증식유리체망막병증을 발생시킬 수 있는가를 관찰하여 저온의 유리체강주입관류액이 증식유리체망막병증의 발생을 감소시킬 수 있는가를 알아보고자 하였다.

연구내용 및 방법

망막색소상피세포의 배양 : 유색토끼를 희생시킨 직후 안구를 적출하였다. 적출안은 gentamicin에 적신 거어프로 싼 후 4°C 냉장고에서 12시간동안 보

관하여 망막과 망막색소상피세포의 강한 결합력이 감소하기를 기다렸다. 안구주위의 결체조직을 제거하고 안구를 절개하여 안구 전반부와 유리체를 제거하였다. 망막의 감각층을 해부현미경하에서 제거하고 노출된 망막색소상피세포를 0.25% trypsin 0.1cc에 적시었으며 1시간 후 Bruch막으로부터 떨어져 나오는 망막색소상피세포를 조심스럽게 pipetting하였다. 배양액은 DMEMc 15% FBS를 사용하며 37°C, 5% CO₂세포배양용 정온기에서 배양하였다. 배양접시가 망막색소상피세포로 채워졌을 때 계대배양을 하며 모든 실험에서 2차 계대배양세포를 사용하였다.

저온에서 망막색소상피세포의 증식 : 저온상태가 망막색소상피세포배양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 망막색소상피세포를 4개군으로 나누어서 1군은 실온에서, 2군은 4°C 저온에서, 3군은 -20°C 저온과 실온을 반복하면서 1시간 30분동안 보관하며 4군은 43°C 고온에서 1시간 30분동안 처치하였다. 각 실험군의 망막색소상피세포 10⁴ cell/ml를 6 well 배양 접시에 접종하였다. 세포증식의 정도는 coulter counter로 세포수를 측정하여 평가하였다.

실험적 증식유리체망막병증의 발생 : 2-3kg의 유색토끼를 10mg/kg entobar 로 정맥주사하고 5mg/kg ketamine으로 근육주사하여 마취하였다. 수술 1주일 전 유리체강내로 가스를 주입하여 초자체가 액화되도록 하며 수술전 동공을 산대시켰다. 8마리 토끼의 양안에서 주입관류액의 온도를 달리한 것을 제외하고는 같은 방법으로 수술하며 수술의 방법은 아래와 같다. 각공막윤부에서 2mm뒤쪽으로 2곳에 공막절개를 하고 한곳은 관류액을 위한 주입관을 고정하고 다른 한곳은 유리체절제술을 위한 기구를 삽입하였다. 콘택트렌즈의 도움으로 망막을 보면서 BSS 액하에 초자체절제술을 시행하였다. 우안 수술시 6°C

의 관류액을 사용하는데 이를 위하여 BSS액을 수술 전 냉동고에서 보관하고 관류액주입줄을 coil모양으로 둥글고 길게 감아서 얼음속에 담그어 BSS액을 통과시켰으며 좌안은 실온의 관류액을 사용하였다. 관류액주입줄은 안구로부터 60cm 높이에 매달고 약 30mmHg의 힘으로 흡입을 30분간 계속하였다. 수술이 끝날 무렵 약간의 망막출혈을 일으켰다. 수술이 끝나면 공막열창을 7-0 vicryl로 봉합하였다. 그 후 0.2ml 배양액속에 2차계대배양된 망막색소상피세포 5×10^4 개가 있도록 하여 tuberculin syringe의 27G 주사침으로 토끼눈의 유리체에 주입하고 증식 유리체망막병증과 유사한 소견을 발생시켰다. 즉 대조군에서는 실온의 관류액하에서 유리체절제술을 시행하고 30분간 실온에서 보관된 배양세포를 주입하며 실험군에서는 저온의 관류액하에서 유리체절제술을 시행하고 30분간 저온에서보관된 배양세포를 주입하였다. 망막의 변화는 간접검안경을 이용하여 세포주입후 7일마다 21일까지 관찰하였다. 발생한 증식유리체망막병증의 정도는 아무 변화가 없으면 정상안, 망막표면에 섬유피, 국소적인 견인이나 국소적인 망막박리가 있는 경우를 pucker안, 망막주름이나 1/4이상의 망막박리가 있는 경우를 견인망막박리안으로 하였다.

결 과

세포증식실험과 유리체접종시 사용한 2차계대배양된 망막색소상피세포의 모양은 세포분열이 계속되면서 처음의 다각형에서 방추형으로 다소 변형되었다 (Fig. 1).

망막색소상피세포의 증식은 저온에서보다 고온에서 뚜렷한 둔화내지는 감소현상을 보였다. 43℃에서 1시간 30분동안 처리한 세포는 평판배양효율이 실온에 있었던 세포에 비교하여 뚜렷하게 낮았으며 3일째 세포증식은 50%이하였고 12일째 세포증식도 실온과 비교하여 13%에 불과하였다. 저온에서는 고온에서보다 세포증식이 활발하여 실온과 비교하면 3일째 세포수는 83%, 12일째 88%였다. 저온과 실온을 되풀이한 경우 즉 세포를 얼리고 녹이는 것을 반복한 경우는 3일째 세포수가 50%, 12일째는 세포수가 28%에 불과하여 세포증식이 억제된 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

실온과 저온에서 유리체절제술을 시행하고 5×10^4 개의 세포를 토끼의 유리체에 주입한 실험에서 수술 중에 또는 수술이 끝난 후 수정체혼탁이나 망막박리와 같은 소견은 관찰할 수 없었다. 수술 후 염증반응은 일주일동안 계속되어 7일째 관찰에서 유리체혼

Fig. 1. Phase contrast microscopy of cultured retinal pigment epithelial cells.

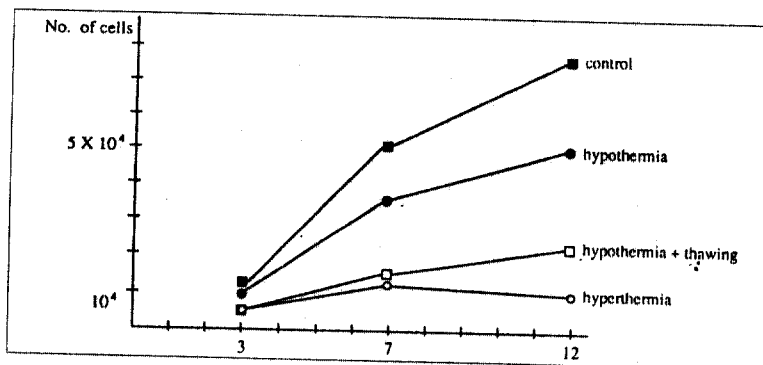


Fig. 2. Effect of local hypothermia on RPE cell cultures.

탁이 관찰되었으나 14일째는 맑아져 있었다. 7일째 관찰에서 망막을 자세히 관찰할 수 있는 부분적인 혼탁을 1, medullary ray의 경계를 관찰할 수 없으면 2, 망막을 자세히 관찰할 수 없는 경우를 3으로 하였을 때 대조군인 실온군에서는 평균 1.9의 혼탁이 있었던 반면 실험군인 저온군에서는 평균 1.5의 혼탁이 있었다. 실온군에서는 세포주입 1주일 후 4안(50%)에서 pucker stage, 나머지 4안에서는 견인망막박리가 발생하였으며 세포주입 3주일 후에는 8안(100%) 모두에서 견인망막박리가 발생하였다. 저온군에서는 세포주입 1주일 후 3안(38%)에서 pucker stage, 3안(38%)에서 견인망막박리가 있었으며 세포주입 3주일 후에도 4안(50%)에서만 견인망막박리가 발생하여 유리체강저온법이 증식유리체망막병증의 발생정도를 감소시킨 것을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Effects of hypothermic intravitreal fluid on progression of R.D. in rabbits injected with RPE cells

Stage		7 days	14 days	21 days
Normal	Control	0/8	0/8	0/8
	Hypothermia	2/8	1/8	1/8
Pucker	Control	4/8	0/8	0/8
	Hypothermia	3/8	3/8	3/8
Traction	Control	4/8	*8/8	*8/8
Detachment	Hypothermia	3/8	4/8	4/8

*Statistically significant differences between the control and hypothermia group ($p < 0.05$)

고 찰

증식유리체망막병증은 정상적으로 세포가 존재하지 않는 유리체로 망막색소상피세포가 이주하여 증식한 결과로 생각할 수 있으나 유리체의 무엇이 세포증식을 자극하며 주위조직에서 어떤 물질이 유리되어 세포증식에 관여하는지 알려진 것은 많지 않다. 액화된 유리체가 젤 상태의 유리체보다 망막색소상피세포의 증식을 자극하며¹¹⁾ 증식유리체망막병증이 발생한 환자에서 얻은 유리체가 다른 질환의

유리체에서보다 망막색소상피세포의 증식을 촉진하는 것으로 보고되어 있다. 유리체에 존재하는 고농도의 ascorbic acid나¹²⁾ 여러 성장인자들도 망막색소상피세포의 증식에 영향을 미칠 것이기 때문에 유리체환경의 변화는 증식유리체망막병증의 발생에 영향을 미칠 것이다.

저온법이 신체 여러부분에서 조직을 보호할 수 있다는 것은 알려진 사실이며^{13,14,15)} 국소적인 안구의 저온상태가 수술적 외상과 빛의 손상으로부터 안구를 보호할 것이라는 보고도 있다^{16,17,18)}. 국소적인 안구의 저온상태는 수술 후 염증반응을 감소시키고 출혈을 줄이는 효과가 있으며 섬유소생성을 억제하는 이점이 있다¹⁵⁾.

증식유리체망막병증의 기본적인 수술법인 유리체수술중에 유리체환경을 조절하면 증식유리체망막병증으로의 발생이 감소할 것으로 기대된다. 수술중에는 유리체강관류액이 유리체를 통과하게 되므로 유리체강관류액의 온도를 조절하여 안구내 온도를 낮추는 것은 어렵지 않다. 국소적으로 안구내 온도를 낮추면 효소작용이 늦게 나타나 섬유소생성이 감소하고 안구내 대사가 느려지는 것을 생각할 수 있으며 망막색소상피세포의 증식이 억제될 것이란 기대를 할 수 있다.

우리들의 결과는 유리체강내 저온법이 증식유리체망막병증으로의 발생을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주었는데 이는 단순히 저온의 관류액이 세포증식을 억제하였다기보다는 저온상태의 유리체가 안구내 대사를 둔화시키고 섬유소생성같은 효소의 활동력을 억제하였기때문으로 생각할 수 있다. 더우기 수술후 염증반응의 감소와 혈관수축, 혈류량의 감소등이 혈관으로부터 성장인자의 유리를 방해하였을 것으로 추측할 수 있다. 그러나 망막을 비롯한 주위조직에 손상을 입히지 않고 계속할 수 있는 저온상태의 정도와 시간에대한 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) Radtke ND, Tano Y, Chandier D, Machermer R : Stimulation of massive periretinal proliferation by autotransplantation of retinal pigment epithelial cells in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 91:76-87, 1981.

- 2) Machemer R, Horn DV, Aaberg TM : *Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol* 85:181-191, 1978.
- 3) Glaser BM, Cardin A, Biscoe B : *Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. Ophthalmology* 94:327-332, 1987.
- 4) Blumenkranz MS, Ophir A, Claflin AJ, and Hajek A : *Fluorouracil for the treatment of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol* 94:458, 1985.
- 5) Lemor M, de Bustros S, Glaser BM : *Low-dose colchicine inhibits astrocyte, fibroblast, and retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. Arch Ophthalmol* 104:1223-1225, 1986.
- 6) Sunalp M, Wiedemann P, Sorgente N, and Ryan SJ : *Effects of cytotoxic drugs on proliferative vitreoretinopathy in rabbit cell injection model. Curr Eye Res* 3:619, 1984.
- 7) Jarsu G, Blumenkranz M, Hernandez E, Succi N : *clearance of intravitreal fluorouracil. Ophthalmology* 92:91, 1985.
- 8) Chakravarthy U, Gardiner TA, Muguire CJF, Archer DB : *Localized gamma irradiation and experimental intraocular proliferation. Trans Ophthalmol Soc UK* 104:792, 1985.
- 9) Meredith TA, Ficker L, Stevens R, Olkowski Z, Anderson M, Hartmann J Crocker I : *Suppression of experimental traction retinal detachment by low-dose radiation therapy. Arch Ophthalmol* 106:673, 1988.
- 10) Yoshimura N, Kuriyama S, Ohuchi T, Tokemura M, Honda Y, Hiroaka M : *Hyperthermia reduces the occurrence of proliferative vitreoretinopathy in a rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:404-409, 1992.
- 11) 이성철, 권오용 : 초자체가 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향. *한안지* 34:299-303, 1993.
- 12) 이성철 : 초자체에서 Ascorbic acid의 세포증식 억제 효과에 대한 연구. *한안지* 35:508-513, 1994.
- 13) Yamaguchi M, Imai M, Ohashi H : *Enhanced myocardial protection by systemic deep hypothermia in children undergoing total correction of tetralogy of Fallot. Ann Thorac Surg* 41:639-646, 1986.
- 14) Robertson CS, Foltz R, Grossman RG, Goodman JC : *Protection against experimental ischemic spinal cord injury. Neurosurg* 64:633-642, 1986.
- 15) Prough DS, Stump DA, Roy RC : *Response of cerebral blood flow to changes in carbon dioxide tension during hypothermic cardiopulmonary bypass. Anesthesiology* 64:576-581, 1986.
- 16) Rinkoff I, Machemer R, Hida T, Chandier D : *Temperature-dependent light damage to the retina. Am J Ophthalmol* 102:452, 1986.
- 17) Jabbour NM, Schepens CL, Buzney SM : *Local ocular hypothermia in experimental intraocular surgery. Ophthalmology* 95:1687-1690, 1988.
- 18) Faberowski N, Stefansson E, Davidson RC : *Hypothermia protects the retina from ischemic damage. Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:2309, 1989.