

당뇨병 미세혈관 합병증에서 생체 각막 공초점 현미경(*in vivo* Corneal Confocal Microscopy)과 신경성장인자(Nerve Growth Factor)의 의의

연세대학교 의과대학 내과학교실, 안과학교실¹

남지선, 조영재¹, 노태웅, 김철식, 박종숙, 조민호, 김혜진, 윤지은, 정한영, 강은석, 이유미, 이형근¹, 안철우, 차봉수, 이은직, 임승길, 김경래, 이현철

In vivo Corneal Confocal Microscopy and Nerve Growth Factor in Diabetic Microvascular Complications

Ji Sun Nam, Young Jae Cho¹, Tae Woong Noh, Chul Sik Kim, Jong Suk Park, Min ho Cho, Hai Jin Kim, Ji Eun Yoon, Han Young Jung, Eun Seok Kang, Yu Mie Rhee, Hyung Keun Lee¹, Chul Woo Ahn, Bong Soo Cha, Eun Jig Lee, Sung Kil Lim, Kyung Rae Kim, Hyun Chul Lee

Department of Internal Medicine, Department of Ophthalmology¹, Yonsei University College of Medicine

Abstract

Background: *In vivo* corneal confocal microscopy (IVCCM) is being recognized as a non-invasive, early diagnostic tool for diabetic neuropathy, for it provides a clear image of corneal subbasal nerve plexus in detail. Nerve growth factors (NGF) are believed to regulate peripheral and central nervous system, neuronal differentiation, and regeneration of damaged nerves, and their role in diabetic neuropathy is being emphasized these days. Moreover, NGFs and receptors are also expressed in retina and renal mesangial cells, suggesting their possible role in the common pathogenesis of diabetic microvascular complications. We plan to examine corneal structures of diabetic patients and compare IVCCM with conventional tools and analyze their serum and tear NGF levels.

Methods: IVCCM, nerve conduction velocity (NCV), and serum, urine, and tear samplings were done to 42 diabetic patients. From IVCCM, we measured corneal nerve density, branch, and tortuosity, total corneal/epithelial thickness, and the number of endothelial/keratocyte cells, and we checked patients' biochemical profiles and serum and tear NGF levels.

Results: Patients with more severe neuropathy had less corneal endothelial cells (3105 ± 218 vs. 2537 ± 142 vs. $2350 \pm 73/\text{mm}^3$ vs. $1914 \pm 465/\text{mm}^3$, $P = 0.02$), higher serum NGF (36 ± 15 vs. 60 ± 57.66 vs. 80 ± 57.63 vs. 109 ± 60.81 pg/mL, $P = 0.39$) and tear NGF levels (135.00 ± 11.94 vs. 304.29 ± 242.44 vs. 538.50 ± 251.92 vs. 719.50 ± 92.63 pg/mL, $P = 0.01$). There was a positive correlation between neuropathy and corneal nerve tortuosity ($r^2 = 0.479$, $P = 0.044$) and negative correlation between neuropathy and endothelial cell count ($r^2 = -0.709$, $P = 0.002$). Interestingly, similar changes were seen in other microvascular complications as well.

Conclusion: Our results provide a possibility of using novel tools, IVCCM and NGF, as common diagnostic tools for diabetic microvascular complications, but it should be followed by a large population study. (J Kor Diabetes Assoc 31:351~361, 2007)

Key Words: Diabetic microvascular complications, *In vivo* corneal confocal microscopy, Nerve growth factor

서 론

당뇨병성 미세혈관 합병증은 비외상성 사지 절단, 말기 신부전, 실명의 가장 흔한 원인으로 아직까지 근본적인 치료법이 없는 임상적으로 중요한 질환군이다^{1,2)}. 이들은 공통 기전과 각각 특이적인 경로를 통해 발병하는데, 정확한 조기 진단과 질환의 정량화를 통해 질환 발생 위험이 높은 환자군을 정의하고 질병악화를 예측하며, 새로운 치료법의 효과를 평가하는 것이 중요하다^{3,4)}. 그 중, 현재 사용되고 있는 당뇨병성 신경병증 진단 방법에는 신경생리학적 검사, 감각 정량화 방법, 피부조직검사 등이 있으나, 각각 제한점이 있고, 또 치료 효과를 평가하기에 부족한 점이 많으므로 새로운 평가방법이 필요하다^{4,6)}.

각막은 인체에서 가장 신경이 잘 발달된 부분으로서, 각막신경은 유수(myelinated) A δ 및 C 섬유로 이루어져 있으며^{7,8)}, 각막 구조와 기능을 유지하고, 각막을 손상시키는 요인들에 대해 방어적 기전을 제공하고, 각막 손상 후 회복하는데 가장 중요한 역할을 한다. 생체 각막 공초점 현미경은 각막 신경섬유를 간편하게, 비침습적으로, 재현성 있게 관찰할 수 있는 방법이다^{5,6)}. 당뇨병환자의 각막은 신경병증이 심해질수록 신경섬유의 밀도와 길이, 신경분지의 밀도가 감소하고, 각막신경 모양이 곧지 못하게 된다고 보고되어 있다^{5,6,9,10)}. 신경병증과 관련된 신경섬유 밀도의 감소는 신경의 퇴화와 연관이 있고, 분지의 감소는 신경의 재생능력의 저하와 관련 있다고 할 수 있겠다⁵⁾. 경증의 당뇨병성 신경병증을 가진 환자에서도 각막신경의 이상소견이 생체 각막 공초점 현미경을 통해 관찰되므로 이는 당뇨병성 신경병증을 조기에 진단할 수 있는 좋은 방법이라고 최근 밝혀지고 있다^{6,7,9)}. 본 연구에서는 한국인 당뇨병환자를 대상으로 신경병증의 정도에 따라 각막의 여러 구성요소들이 어떻게 변하는지 알아보고, 신경병증뿐 아니라 망막증, 신장병증과 어떠한 연관성이 있는지 알아보려고 하였다.

당뇨병성 신경병증은 다양하고 복잡한 기전을 통해 발병한다고 알려져 있는데, 대부분은 다른 당뇨병성 미세혈관 합병증의 기전과 겹쳐진다. 그 중 신경병증에서 말초 및 중추신경계의 기능, 신경원의 분화 및 손상된 신경의 재생에 관여하는 물질인 신경영양인자 및 수용체의 다양한 발현이 보고되고 있어, 당뇨병성 신경병증의 병인으로 그 중요성이 대두되고 있다¹¹⁾. 신경영양인자에는 뉴로트로핀, 인슐린양 성장인자(insulin like growth factor-I), 각종 싸이토카인 양 성장인자들이 포함되는데, 그 중 뉴로트로핀은 신경이 분포하는 장기가 손상을 받게 되면 이를 복구하기 위해 표적 장기에서 합성되어 역행적으로 신경체에 전달되는 단백질로서^{1,2,12,13)}, 말초 및 중추신경계의 기능, 신경원의 분화 및 재생에 관여하고 여러 신경전달물질의 발현을 촉진시키는 역할을 한다^{1,2,12-14)}. 사람의 뉴로트로핀에는 신경성장인자

(nerve growth factor, NGF), brain-derived neurotrophic factor, 뉴로트로핀 3, 뉴로트로핀4/5가 있다¹⁴⁾, 이 중, 신경성장인자에 대한 연구가 가장 많이 되어 있는데, 신경성장인자는 작은 섬유 감각신경절과 교감신경절의 신경원에 선택적으로 전달된다고 하며²⁾, 신경성장인자 생성의 장애는 주로 통증과 연관된 작은 섬유의 기능적 결함을 일으켜 대칭성 말초 다발신경병증의 병인으로 작용한다는 보고들이 여럿 있다^{1,2,13,15)}. 지금까지 연구 결과, 당뇨병성 신경병증 환자에서 다양한 정도의 뉴로트로핀 및 수용체의 발현이 관찰되었다^{2,11,16-19)}. 아직 정확한 기전이 밝혀지지는 않았지만, 뉴로트로핀 및 수용체의 합성의 감소, 뉴로트로핀과 수용체 결합의 결함, 또는 신경체로의 역행적 전달의 장애가 신경병증의 기전으로 생각되고 있다^{1,11,13,15,16,20)}.

뉴로트로핀은 당뇨병성 신경병증 환자뿐 아니라 photorefractive keratectomy (PKR) 및 laser in situ keratomiluesis (LASIK) 를 받은 환자에서도 연구가 되어왔는데, 이러한 수술은 각막 신경을 포함하여 정상 각막 조직을 파열시키며 수술 후 각막신경섬유가 서서히 재생된다²¹⁾. 이 때, 초기 누액 내 신경성장인자 수치가 높은 환자들에서 6개월 뒤 각막 손상이 적고 감각이 정상화되었다²¹⁾. 이것을 응용하여 당뇨병환자의 누액 내 신경성장인자가 당뇨병성 신경병증으로 인해 손상된 각막 신경을 복구시키기 위해 증가할 것이라는 가정을 세울 수 있게 되었다. 더 나아가, 신경성장인자의 발현이 고혈당 및 여러 스트레스와 연관된 싸이토카인에 의해 촉진되고^{14,22-24)}, 신경성장인자가 신장, 망막 조직에서도 발견된 보고들이 있어 신경성장인자와 나머지 당뇨병성 합병증과의 관계에 대해서도 알아보았다^{22,24-26)}.

본 연구의 목적은 생체 각막 공초점 현미경을 이용하여 당뇨병환자에서의 각막의 변화들을 관찰하고 누액 및 혈청 신경성장인자를 정량화하여 여러 당뇨병 미세혈관 합병증들과의 관계에 대해서 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

내과에서 당뇨병(2005 American Diabetes Association 진단기준)을 진단받고 추적관찰 중인 환자 중 2006년 5월부터 2006년 9월까지 당뇨병성 망막병증에 대한 검사를 위해 안과에 내원한 환자들 중 연구 참여를 서면상으로 동의한 사람들을 대상으로 하였다.

대상자 중에서 각막깨양 등 각막에 손상이 있는 사람은 제외하였다.

2. 연구 방법

1) 임상적 특징

환자들의 면접 및 의무기록 조사를 통하여 당뇨병의 유

병기간 및 합병증유무를 기록하고 신체계수(몸무게, 키)를 측정하였으며, 흡연력, 음주력, 가족력 및 현재 복용 중인 약물을 조사하였다. 환자들은 안과전문의가 시행한 안저검사결과에 따라 비증식성 당뇨병성 망막병증, 증식성 망막병증, 정상군으로 구분되었고, 24시간 소변 내 알부민양을 기준으로 30 mg/day 미만인 경우를 정상, 30부터 300 mg/day 미만인 경우를 미세알부민뇨, 300 mg/day 이상인 경우를 현성 신장병증군으로 정의하였다.

2) 생체 각막 공초점 현미경

NIDEK Confoscan 4 (Nidek, Greensboro, NC)를 이용하여 각막신경의 밀도, 분지, 굴곡의 정도, 각막의 총 두께, 각막외피세포의 두께, 각막내피세포의 수, 그리고 각질형성세포의 밀도를 분석하였다.

(1) 생체 각막 공초점 현미경 촬영

검사는 Patel 등²⁷⁾의 방법과 동일하게 진행되었다. 환자와 현미경 사이의 매개물질로 한 방울의 hydroxypropyl methylcellulose 2.5%(Novartis Ophthalmics, Hettlingen, Switzerland)를 대물렌즈의 끝에 올려놓고 렌즈가 환자의 각막 중심 표면에 닿을 때까지 조정하였다. 현미경 촬영은 각막내피세포부터 외피세포까지 1초에 78 μm 의 속도로 움직이는 초점평면(focal plane)을 통하여 이루어졌으며 연속적인 공초점 영상을 얻었다. 디지털 영상은 컴퓨터에 1초에 30개체씩 저장되었으며, 각각의 영상은 475 × 450 μm (가로 × 세로) 크기의 각막 관상면을 나타냈고 각각의 영상은 2.5 μm 간격으로 촬영하였다.

(2) 영상 분석

각막신경섬유의 밀도, 각막신경분지의 밀도, 각막신경의 굴곡을 측정하는 방법은 Calvillo 등²⁸⁾과 Oliveira-Soto 등⁷⁾, Malik 등⁵⁾의 방법을 참고하였다. 길이가 50 μm 이상인 신경들만을 포함시켰고²⁸⁾, 신경섬유의 밀도는 각막조직 mm² 당 각막신경의 개수⁵⁾, 신경분지의 밀도는 각막조직 mm² 당 주 신경에서 기원하는 가지의 수⁵⁾로 정의하였다. 신경의 굴곡은 곧음, 약간의 굴곡, 보통 정도의 굴곡, 심한 굴곡으로 구분하였다⁷⁾.

각막 각질형성세포의 밀도는 Erie 등²⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 전방 기질에서의 측정을 위해 subbasal 층으로부터 130 μm 깊이까지 15 μg 간격을 둔 영상들을 선택하였고, 후방 기질에서는 131 μm 부터 Decemet 막까지 30 μg 간격을 둔 영상들 중 각각 가장 흔들림이 적은 5개의 영상을 선택하였다. 각질형성세포의 핵과 유사한 밝은 물체의 수를 각각의 영상에서 세었다. 0.475 × 0.350 × 0.002 mm³의 기저층의 부피 당 세포수를 세었고, 이를 mm³ 당 각질형성세포의 밀도로 환산하였다.

각막의 총 두께, 각막 외피세포의 두께, 내피세포의 수는 Nidek Advanced Vision Information System (NAVIS,

Nidek, Greensboro, NC)을 사용하여 측정하였다. 모든 측정은 환자에 대한 정보를 알지 못하는 한 사람에 의해 이루어졌다.

3) 생화학적 지표

(1) 8시간 이상 공복 상태에서 채혈하였으며, 백혈구 및 혈색소를 검사하였고, 신기능 검사(BUN, Creatinine), 간기능 검사(AST, ALT, Alkaline phosphatase, total bilirubin, albumin), 지질대사검사(Total cholesterol, TG, HDL-C, LDL-C)를 시행하였으며, 전해질(Na, K, Cl, tCO₂)과 포도당, C-peptide, 인슐린, 당화혈색소 검사를 시행하였다. 또한 24시간 소변 내 알부민의 정량화 측정 및 1회 요화학검사를도 시행하였다. 혈당은 포도당 산화효소법(747 automatic analyzer, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 측정하였고, C-peptide와 인슐린은 chemiluminescent immunometric assay (RIA kit, Daiichi, Japan)로 각각 측정하였다.

(2) 혈청 및 누액 내 신경성장인자 검사

가. 누액 내 신경성장인자

Lee 등²¹⁾의 방법으로 누액을 채취하고 신경성장인자를 측정하였다. 2.00 × 10.00 mm 폴리에스터 섬유봉(Transorb Wicks, Filtrona, Richmond, Virginia)를 이용하여 누액을 채취하였고, 반사적 누액누출에 의한 회석을 방지하기 위해 0.5% proparacaine을 점안하였다. 2분 뒤, polyester 봉을 하부결막에 위치시키고, 3~5분 동안 누액을 흡입시키기 위해 기다렸다. 봉을 하부결막에서 제거한 뒤, 1.5 mL Eppendorf 튜브에 넣었고, 이 방법을 통해 약 50 μL 의 누액을 얻을 수 있었다. 누액을 함유하고 있는 봉을 지닌 튜브는 ELISA를 시행하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

누액 내 신경성장인자의 농도를 측정하기 위해 DuoSet ELISA development kit (R & D Systems Inc, Minneapolis, Minnesota)를 사용하였다⁴⁰⁾. Phosphate-buffered saline에 희석된 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 mouse antihuman β -NGF capture antibody를 준비하고, 96-well microplate의 각각의 well에 100 μL 씩 넣었다. Plate를 봉합시킨 뒤 상온에서 밤 사이 배양시킨 후 수 차례의 세척 후 각각의 well에 50 μL 의 sample, 100 μL detection antibody, 그리고 50 ng/mL biotinylated goat antihuman β -NGF를 넣고 plate를 2시간 동안 상온에서 배양하였다. Well을 흡입, 세척한 후 streptavidin-HRP를 첨가한 뒤 20분간 어두운 방의 실온에서 배양하였다. microplate reader를 이용하여 450 nm의 optical density에서 신경성장인자를 측정하였다.

나. 혈청 신경영양인자

누액 내 신경성장인자와 같은 방법으로 DuoSet ELISA development kit를 사용하여 측정하였다.

Table 1. Baseline characteristics of patients based on the severity of neuropathy

	Normal	Mild	Moderate	Severe	P-value
Gender (M:F)	2:2	0:7	1:5	1:1	NS
Age (yrs)	34.75 ± 22.85	60.43 ± 4.11	68.67 ± 18.40	48.5 ± 16.26	0.025
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 3.0	24.9 ± 7.2	25.5 ± 4.1	24.6 ± 6.1	NS
DM Duration (yrs)	14 ± 2.71	18.57 ± 3.74	22.83 ± 10.69	12.50 ± 10.61	NS
FBS (mg/dL)	114 ± 50.50	119 ± 32.77	124.5 ± 18.51	112 ± 26.87	NS
HbA1c (%)	8.5 ± 1.94	7.8 ± 2.30	8.1 ± 2.39	6.1 ± 0.14	NS
C-peptide (ng/mL)	0.33 ± 0.58	0.70 ± 0.23	2.02 ± 1.58	3.0 ± 0.00	NS
Insulin (uIL/mL)	2.23 ± 2.14	4.70 ± 2.77	7.00 ± 1.15	5.70 ± 0.00	NS
BUN (mg/dL)	14.6 ± 10.59	19.8 ± 6.38	27.2 ± 14.81	36.6 ± 3.68	NS
Creatinine (mg/dL)	1.0 ± 0.37	0.9 ± 0.34	1.5 ± 1.04	4.8 ± 4.67	0.038
TC (mg/dL)	167 ± 25.20	181 ± 15.24	182 ± 26.69	146 ± 52.33	NS
LDL-C (mg/dL)	100 ± 25.04	96 ± 21.43	103 ± 9.01	81 ± 19.09	NS
HDL-C (mg/dL)	115 ± 71.24	48 ± 12.31	51 ± 22.47	42 ± 14.14	NS
TG (mg/dL)	96 ± 66.49	144 ± 74.89	99 ± 78.36	117 ± 94.75	NS
DMN (nl/micro/overt)	2:1:0	6:0:0	0:3:2	0:1:1	≤ 0.001
DMR (none/NP/P)	3:1:0	2:3:2	0:3:3	0:0:2	≤ 0.001

Data are expressed by means ± SD, except for frequency data. BMI, body mass index; FBS, fasting blood glucose; TC, total cholesterol; LDL-C, Low density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, High density lipoprotein-cholesterol; TG, triglyceride; DMN, DM nephropathy; nl, normal; micro, microalbuminuria; overt, overt proteinuria; DMR, DM retinopathy; NP, non-proliferative; P, proliferative; NS, not significant.

Table 2. Confocal parameters according to theseverity of neuropathy

	NFD/image	NFB/image	Tortuosity*	Endothelial cell count /mm ²	Epithelial thickness (um)	Anterior keratocyte /mm ²	Posterior keratocyte /mm ²
Normal	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3105 ± 218	11 ± 0.00	73 ± 11.0	59 ± 11.0
Mild	1.43 ± 0.79	1.86 ± 1.22	0.57 ± 1.13	2537 ± 142	38 ± 0.00	69 ± 9.0	54 ± 11.0
Mod	1.33 ± 0.52	1.83 ± 1.75	0.83 ± 1.75	2350 ± 73	28 ± 0.00	64 ± 17.0	49 ± 10.0
Severe	1.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	1914 ± 465	11 ± 0.00	72 ± 0.0	59 ± 0.0
P-value	NS	NS	NS	0.020	NS	NS	NS

Data are expressed by means ± SD. P-value < 0.05 represents a significant difference in each confocal parameter among groups of different degrees of neuropathy. No, number; NFD, nerve fiber density; NFB, nerve fiber branch; Mod, moderate; NS, not significant.

4) 신경전도검사

Cadwell사의 Excel (Cadwell Laboratories, Kennewick, WA)을 사용하여 운동신경의 신경전도검사는 상지에서 정중신경과 척골신경을, 하지에서 비골신경과후경골신경을 구획별로 하였고, 감각신경검사는 상지에서 정중신경과 척골신경을 하지에서 비복신경을 하였다. 각 신경에서 Oh³⁰의 검사법으로 말단잡복기와 구획별 신경전달속도, 전압 및 잡복기를 측정하였다. 신경전도검사 결과의 판정은 본원 검사실 기준치³⁰⁾를 사용하였다. 본원에서 적용하고 있는 신경병증의 평가기준에 따라 2개의 구획에서 이상소견이 관찰된 경우를 약간의 신경병증, 3~4개의 이상소견이 관찰된 경우를 보통의 신경병증, 그리고 5개 이상의 이상 소견이 관찰된 경우를 심한 신경병증이라고 정의하였다.

3. 통계

모든 결과는 평균 ± 표준 편차로 나타내었다. 연속변수

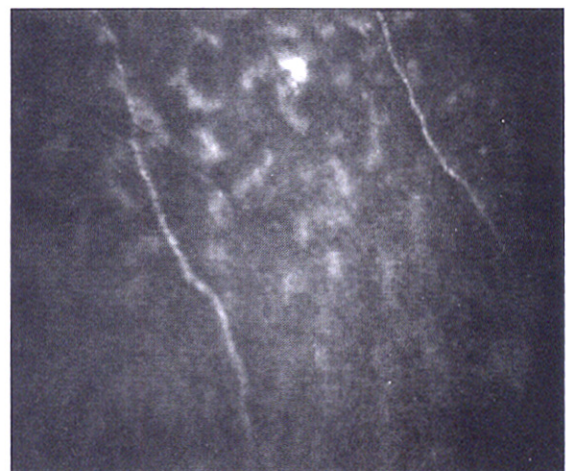


Fig. 1. Corneal subbasal nerve plexus of a patient with mild diabetic neuropathy by in vivo corneal confocal microscopy. Two nerve fibers are seen with no nerve fiber branching and mild tortuosity.

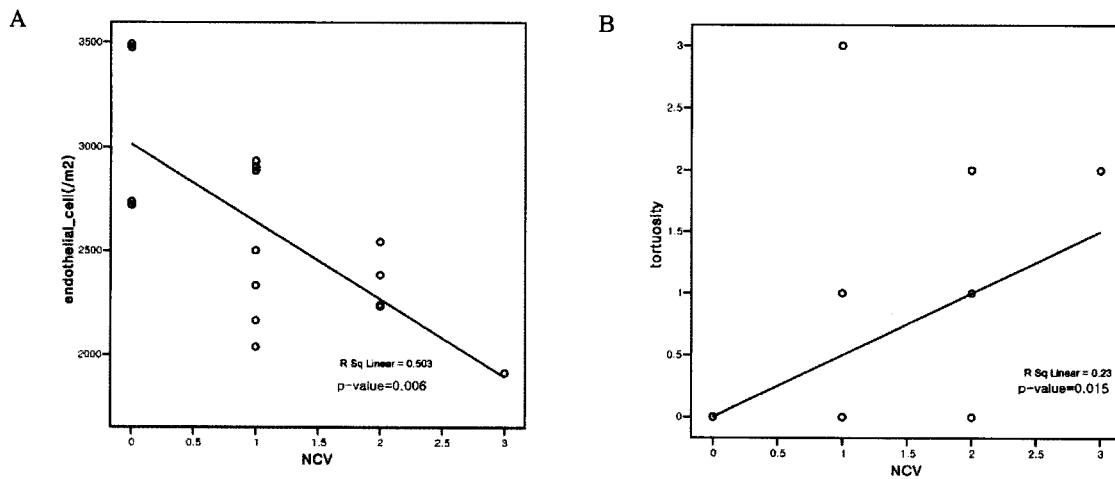


Fig. 2. Relationships between endothelial cell count (A) and tortuosity (B) and severity of neuropathy. There is a negative correlation between endothelial cell count and severity of neuropathy and a positive correlation between tortuosity and severity of neuropathy. NCV: 0, normal; 1, mild neuropathy; 2, moderate neuropathy; 3, severe neuropathy

Table 3. Serum and tear NGF levels according to the severity of neuropathy

	Serum NGF (pg/mL)	Tear NGF (pg/mL)
Normal	35.50 ± 15.00	135.00 ± 11.94
Mild neuropathy	59.86 ± 57.66	304.29 ± 242.22
Moderate neuropathy	79.67 ± 57.63	538.50 ± 251.92
Severe neuropathy	109.00 ± 60.81	719.50 ± 92.63
P-value	NS	0.01

Data are expressed by means ± SD, P-value < 0.05 represents a significant difference in serum or tear NGF levels among groups of different degrees of neuropathy. NS, not significant.

분석은 one way ANOVA test 및 logistic 회귀분석을 이용하였고 명목변수 분석은 chi-square test를 이용하여 분석하였으며, 단순상관분석은 피어슨 상관계수와 스피어만 상관계수를 사용하였다. 통계분석은 SPSS program for Windows version 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하였고, P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 평가하였다.

결 과

1. 대상자들의 임상적 특징

전체 대상자는 42명이었으며 남자가 17명, 여자가 25명이었고, 신경전도검사 결과에 따라 약간, 보통, 심한 신경병증이라고 정하였는데, 당뇨병성 신경병증이없는 정상군에 4명, 약간의 신경병증군에 7명, 보통의 신경병증군에 6명, 심한 신경병증군에 2명이 속하였고 나머지 23명은 신경전도검사를 시행하지 않았다. 각 군 간에 성별, 당뇨병 이환기간, 인슐린 사용 중인 환자의 비율, 지질대사수치 등의 혈청생화학검사 결과는 차이가 없었다(Table 1).

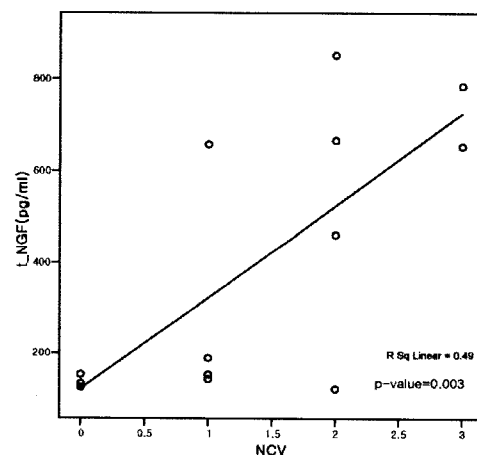


Fig. 3. Relationship between tear NGF level and neuropathy. There is a positive correlation between tear NGF level and neuropathy.

2. 당뇨병성 신경병증 환자에서 생체 각막 공초점 현미경 결과

신경전도검사에 근거하여 당뇨병성 신경병증의 정도에

Table 4. Relationship between confocal parameters and diabetic microvascular complications

		NFD/image	NFB/image	Tortuosity*	Endothelial cell count/mm ²
DM Retinopathy	r ²	0.443	0.401	0.365	-0.510
	P-value	0.006	0.014	0.029	0.002
	N	37	37	36	35
DM Nephropathy	r ²	0.531	0.523	0.419	-0.223
	P-value	0.004	0.005	0.033	0.274
	N	27	27	26	26

Data are expressed by means ± SD, P-value < 0.05 represents a significant correlation between each confocal parameter and the degree of DM retinopathy or nephropathy. r², Pearson correlation; NFD, nerve fiber density; NFB, nerve fiber branch.

Table 5. Confocal parameters and NGF levels according to diabetic retinopathy

	Normal (n = 7)	NPDR (n = 18)	PDR (n = 17)	P - value
Serum NGF (pg/mL)	32.57 ± 11.24	27.67 ± 9.80	116.07 ± 33.84	≤ 0.001
Tear NGF (pg/mL)	124.71 ± 19.82	227.69 ± 109.84	569.00 ± 189.42	≤ 0.001
NFD/image	0.17 ± 0.41	0.76 ± 0.75	1.29 ± 0.99	0.024
NFB/imgae	0.33 ± 0.82	1.24 ± 1.15	1.93 ± 1.59	0.049
Tortuosity	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.90	1.15 ± 1.14	0.051
Endothelial cell/mm ²	3051 ± 343	2660 ± 304	2453 ± 402	0.006
Ant keratocyte	78.00 ± 8.27	65.06 ± 12.25	73.31 ± 13.44	0.06
Pos keratocyte	63.17 ± 11.58	52.14 ± 11.31	55.15 ± 9.06	NS

Data are expressed by means ± SD. P-value < 0.05 represents a significant difference in confocal parameters or NGF levels among groups of different degrees of DM retinopathy. NPDR, non-proliferative DM retinopathy; PDR, proliferative DM retinopathy; NFD, nerve fiber density; NFB, nerve fiber branch; ant, anterior; pos, posterior; NS, not significant.

따라 환자를 나누어 생체 각막 공초점 현미경을 시행한 결과, 각막 내피세포의 수가 의미있게 감소하였다(3105 ± 218 vs. 2537 ± 142 vs. 2350 ± 73 vs. 1914 ± 465, P = 0.02). 각막신경의 밀도와 분지, 굴곡, 각막의 총 두께, 각막 외피 세포의 두께, 그리고 각막 각질형성세포의 밀도에는 의미있는 차이가 관찰되지 않았다(Table 2). 그러나, 이들의 상관관계를 분석해 보았을 때, 신경병증이 심해질 수록 내피세포의 수가 감소하고(Spearman correlation = -0.651, P = 0.006) 각막신경의 굴곡(Spearman correlation = 0.562, P = 0.015)은 심해졌다(Fig. 2).

3. 당뇨병 신경병증 환자에서 혈청 및 누액 신경성장인자

역시 신경전도 검사에 근거하여 당뇨병성 신경병증의 정도에 따라 환자를 나누어, 혈청 및 누액 신경성장인자를 분석한 결과, 신경병증이 심할수록, 누액 신경성장인자가 의미있게 증가하였고(135.00 ± 11.94 vs. 304.29 ± 242.22 vs. 538.50 ± 251.92 vs. 719.50 ± 92.63, P = 0.01), 혈청 신경성장인자도 증가하는 추세였으나 통계학적 의미는 없었다(35.50 ± 15.00 vs. 59.86 ± 57.66 vs. 79.67 ± 57.63 vs. 109.00 ± 60.81, P = 0.39) (Table 3). 또한, 누액 신경성장인자는 신경병증과 의미있는 양의 상관관계를 보였다(Fig. 3). 특히, 신경병증이 없는 군과 신경병증이 있는 군으로 나

누었을 때뿐 아니라, 신경병증이 없는 군과 약간의 신경병증이 있는 군으로 나누어 로지스틱 회귀분석을 하였을 때 누액 신경성장인자는 이 두 군을 구분짓는데 의미있는 영향을 주었다 (P = 0.028).

4. 기타 당뇨병성 미세혈관 합병증과 생체 각막 공초점 현미경 및 신경성장인자와의 관계

1) 당뇨병성 망막병증과의 관계

당뇨병성 망막병증과 생체 각막 공초점 현미경 변수들 간의 관계에 대해 조사해 본 결과, 당뇨병성 망막병증이 심한 군 일수록 각막신경의 밀도와 분지, 굴곡이 증가하였으며(r² = 0.443, P = 0.006: r² = 0.401, P = 0.014: r² = 0.365, P = 0.029: 순서대로) 각막내피세포의 수가 감소하였다(r² = -0.510, P = 0.002) (Table 4). 또, 당뇨병성 망막병증 별로 환자를 나누어 분석한 결과 정상 및 비증식성 망막병증 환자군 보다 증식성 망막병증 환자군에서 모두 각막신경의 밀도와 분지, 굴곡이 증가하고, 내피세포의 수는 감소하였다(Table 5).

그리고, 혈청 및 누액 신경성장인자도 당뇨병성 망막병증 별로 환자를 나누어 분석한 결과, 당뇨병 망막증이 심할수록 둘 다 증가하였고(r² = 0.569, P ≤ 0.001, r² = 0.594, P ≤ 0.001, 순서대로)(Fig. 4), 세부 분석 결과, 정상군과 비증

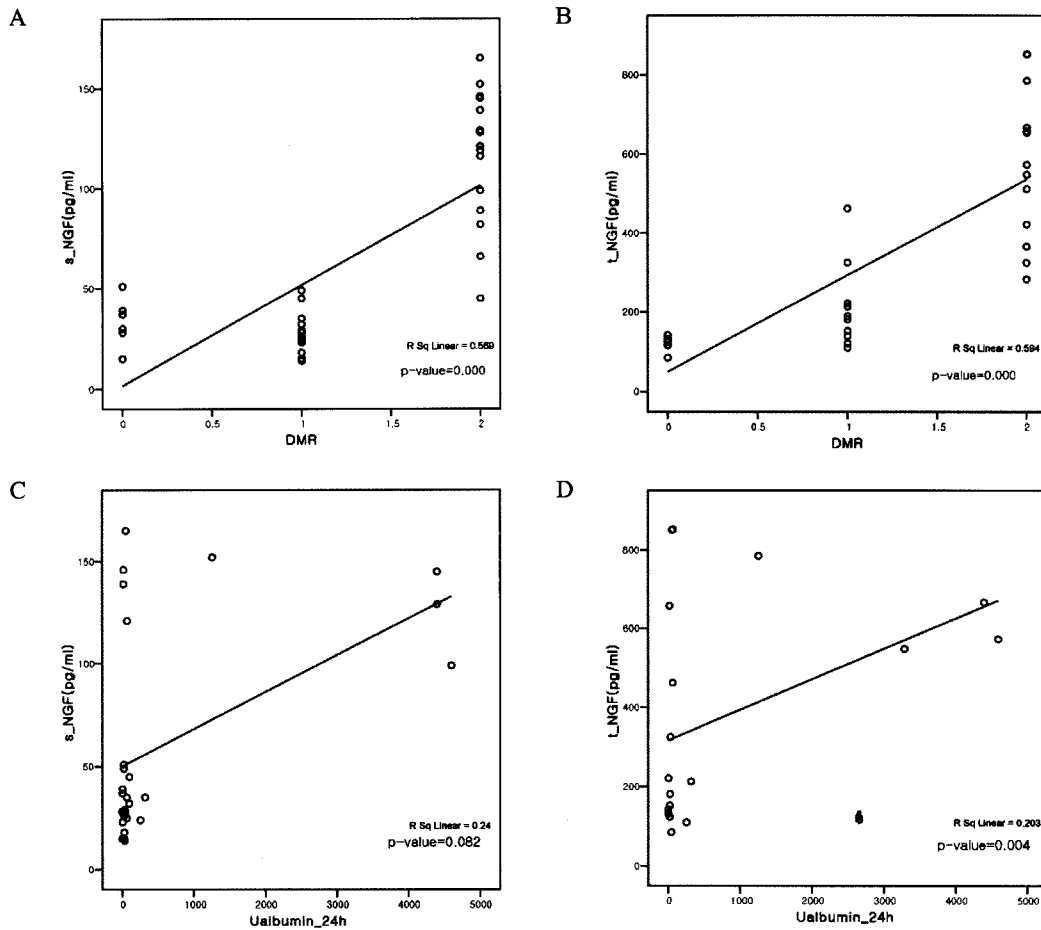


Fig. 4. Relationships between serum and tear NGF and other microvascular complications. (A, serum NGF vs. DMR; B, serum NGF vs. DMN; C, tear NGF vs. DMN; D, tear NGF vs. 24-hour albuminuria, DMR: O, normal, 1, non-proliferative retinopathy; 2, proliferative retinopathy)

Table 6. Confocal parameters and NGF levels according to diabetic nephropathy

	Normal (n = 13)	Microalb (n = 9)	Overt (n = 7)	P-value
Serum NGF (pg/mL)	47.23 ± 43.85	54.89 ± 51.81	97.33 ± 55.73	NS
Tear NGF (pg/mL)	238.15 ± 188.98	480.29 ± 283.06	509.00 ± 251.18	0.028
NFD/image	0.23 ± 0.44	0.71 ± 0.49	0.71 ± 0.76	0.017
NFB/imgae	0.69 ± 1.25	1.57 ± 1.13	2.29 ± 0.95	0.021
Tortuosity	0.54 ± 1.05	1.14 ± 0.90	1.50 ± 0.55	NS
Endothelial cell/mm ²	2770 ± 441	2667 ± 386	2540 ± 450	NS
Ant keratocyte	69.00 ± 11.46	69.29 ± 12.19	65.17 ± 16.34	NS
Pos keratocyte	57.62 ± 10.58	54.14 ± 10.31	49.50 ± 8.06	NS

Data are expressed by means ± SD. P-value < 0.05 represents a significant difference in confocal parameters or NGF levels among groups of different degrees of nephropathy. Microalb, microalbuminuria; Overt, overt proteinuria; NFD, nerve fiber density; NFB, nerve fiber branch; ant, anterior; pos, posterior; NS, not significant.

식성 망막병증 간에 차이는 없었으나, 비증식성 망막병증 군과 증식성 망막병증 군 간에 차이가 있었다(data not shown).

2) 당뇨병성 신장병증과의 관계

환자를 24시간 알부민 배설량에 따라 세 군으로 나누어

생체 각막 공초점 현미경 결과와 신경성장인자와의 관계를 살펴 본 결과, 각막신경의 밀도와 분지, 굴곡, 각막 내피세포의 수, 그리고 누액 신경성장인자에 있어서 각 군 간에 의미있는 차이가 있었다(Table 6). 또, 혈청 신경성장인자의 경우 통계적 의미는 없었으나, 24시간 알부민 배설량은 혈청 및 누액 신경성장인자와 양의 상관관계를 보였다($r^2 =$

Table 7. Relationship between confocal parameters and serum and tear NGF

		NFD/image	NFB/image	Endothelial cell/mm ²
Serum NGF (pg/mL)	r ²	0.397	0.335	-0.430
	P-value	0.017	0.046	0.011
	N	36	36	34
Tear NGF (pg/mL)	r ²	0.368	0.333	-0.485
	P-value	0.030	0.051	0.004
	N	35	35	33

P-value < 0.05 represents a significance in the correlation between each confocal parameters and serum or tear NGF levels. r², Pearson correlation; NFD, nerve fiber density; NFB, nerve fiber branch.

0.240, P = 0.082, r² = 0.203, P = 0.004, 순서대로) (Fig. 4).

5. 생체 각막 공초점 현미경과 신경성장인자 간의 관계

생체 각막 공초점 현미경 결과와 혈청 및 누액 신경성장인자 사이에 유의한 관계가 있었는데, 혈청 신경성장인자와 각막신경의 밀도 및 분지 사이에는 양의 상관관계가 있었고 (r² = 0.397, P = 0.017; r² = 0.335, P = 0.046, 순서대로), 각막 내피세포의수와는 음의 관계가 있었다(r² = -0.430, P = 0.011) (Table 7). 누액 신경성장인자도 비슷한 결과를 보였다.

고 찰

당뇨병의 치료 목적이 당뇨병으로 인한 합병증의 예방 및 관리라고 할 만큼 당뇨병성 합병증이 매우 중요하며 이에 대한 수많은 연구가 이루어지고 있다. 특히, 당뇨병성 신경병증, 신장병증, 망막병증 등 당뇨병성 미세혈관 합병증들은 공통 기전을 가지고 있어 이들 간의 관련성에 대한 연구도 많다⁹⁾. 본 연구에서는, 생체 각막 공초점 현미경을 통해 각막의 여러 변화와 신경병증뿐 아니라 나머지 당뇨병성 미세혈관 합병증 사이의 연관성을 발견할 수 있었고, 신경성장인자와 이들 합병증의 간의 관계에 대해서도 제시할 수 있게 되었다.

앞서 나온 대로, 최근 생체 각막 공초점 현미경이 당뇨병성 신경병증의 조기진단을 하는데 효과적이라는 많은 보고들이 발표되고 있다^{5,6,9,10)}. 본 연구에서 신경병증이 심해질수록 신경섬유의 굴곡이 심해졌는데 이는 서론에 서술된 여러 인자들의 영향을 받아 신경의 퇴화가 일어난 후 새로이 생긴 신경섬유를 의미한다고 할 수 있겠다¹⁰⁾. 또한, 당뇨병성 신경병증이 심한 환자일수록 각막 내피세포의 수가 의미있게 감소하였는데, 이전 연구들에 의하면 당뇨병환자에서 정상인보다 각막 내피세포의 수가 감소한다는 보고가 있고³²⁾, 세포 수에는 차이가 없으나, 세포의 모양과 크기가 다양하다는 보고가 있지만^{33,34)}, 아직까지 당뇨병성 신경병증과 연관되어 연구된 바는 없었다. 각막의 내피세포층의 변형이 각막의 보호작용 및 수술적 외상 후 회복되는 속도를 결

정짓는 요소라고 밝혀져 있다³⁵⁾. 현재, 각막 조직의 대사 작용, 세포간 결합, 상처의 치유 과정 등이 각막신경에 의한 영향을 받는다고는 알려져 있지만³⁵⁾, 당뇨병성 신경병증과 각막 내피세포와 어떤 기전에 의해 연관이 되어 있는지에 대해 앞으로 연구해 볼 가치가 있겠다. 또한, 본 연구 결과, 당뇨병성 망막병증이 심할수록 내피세포수가 감소하였는데, 10여 년 전 Larsson 등³⁵⁾과 Janiec 등³⁶⁾은 당뇨병성 망막병증은 각막 내피세포수에 영향을 주지 않는다고 하였고, 최근 Chang 등²⁵⁾도 이들과 같은 결과를 발표하였다. 10여 년 전 내피세포수를 측정하기 위해 사용한 contact specular microscope는 정확도가 생체 각막 공초점 현미경보다 낮을 것이라고 생각되지만 Chang 등²⁵⁾의 결과도 이들과 같기 때문에 이에 대해 추가 연구가 이루어져야 할 것이다. 또, 본 연구에서는각막 내피세포수가 당뇨병성 신장병증과도 연관이 있다는 결과를 얻음으로써, 각막 내피세포수가 당뇨병성 미세혈관 합병증 모두와 관계가 있다고 할 수 있겠다.

반면, 이전 연구들과 달리 당뇨병성 신경병증이 있는 환자에서 각막신경밀도 및 신경분지의 수가 의미있게 변화하는 소견은 보이지 않았는데, 이는 본 연구에 참여한 환자수가 충분하지 않았을 뿐 아니라, 본 연구에서 당뇨병 신경병증을 평가하는 지표로 사용된 신경생리학적 검사는 대칭성 말초 다발신경병증의 주 침범 신경인 Aδ 및 C 섬유유의 기능장애를 진단하는데 있어서 민감도가 매우 낮고, 사지의 체온 및 바늘의 위치 등 환경적 요인에 의해 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다³⁾. 그러므로, 비록 민감도와 재현율이 낮긴 하지만 크고 작은 섬유 신경병증을 모두 탐지할 수 있는 감각 정량화 방법⁴⁾ 혹은 표피 내 신경섬유밀도와 평균 수상돌기의 길이를 재서 작은 섬유 신경병증을 정확하고 재현성 높게 진단할 수 있는 피부 조직 검사를 시행하여⁴⁶⁾ 같이 비교하지 못한 것이 이번 연구의 제한점이라고 생각된다.

당뇨병성 신경병증과 신경성장인자와의 연관성을 알아보기 위해 혈청과 누액에서 신경성장인자를 측정해 보았다. 이에 대한 다양한 결과들이 있는데, 당뇨병성 신경병증의 환자의 피부에서 신경성장인자가 감소한다는 보고가 있는가 하면³⁷⁾, 이후 연구들에서는 피부 및 근육 내 신경성장인자 mRNA의 유의한 증가, 뉴로트로핀-3 농도의 증가, 그리고

정상인과 동일한 좌골신경 내 ciliary neurotrophic factor의 농도가 보고되었으며^{2,15,38,39}, 뉴로트로핀의 수용체인 tropomyosin-related kinase 계열의 수용체 발현의 증가가 당뇨병환자의 피부에서 보고된 바 있다⁴⁰. 혈중 신경성장인자 농도에 대한 보고는 많지 않은데, Ordonez 등⁹은 STZ-유발 당뇨쥐의 혈청 내인성 신경성장인자 농도가 낮았다고 하였고, 두 소규모 연구에서 당뇨병성 신경병증 환자에서 혈청 신경성장인자의 감소가 관찰되었다^{18,41}. 본 연구에서는 당뇨병성 신경병증이 심해질수록 혈청 신경성장인자가 증가하는 추세를 보였고 누액 신경성장인자는 통계학적으로 의미있게 증가하였는데, 누액 신경성장인자에서 더 확실한 증가를 보인 것은 누액 내 신경성장인자가 손상된 말초 장기, 즉 손상된 각막신경을 재생시키기 위한 보상작용으로 증가하고 혈청 신경성장인자보다 각막신경의 신경성장인자의 양을 더 잘 반영하기 때문이라고 할 수 있겠다. 누액 신경성장인자는 정상군과 신경병증 환자군 사이에서 뿐 아니라 정상군과 경한 신경병증군을 구분하는데 있어서 영향을 미치는 요소로 작용하였는데, 이는 당뇨병성 신경병증의 조기 진단 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

또한, 혈청 및 누액 신경성장인자의 증가는 당뇨병성 신장병증과 망막병증 환자에서도 통계학적으로 의미있게 나타났는데, Chang 등²⁵이 당뇨병성 망막병증 환자에서 각막신경의 밀도, 굴곡, 내피세포수가 각각 감소, 증가, 그리고 감소한다고 보고한 것은 망막병증이 각막신경의 변화와 연관성이 있으며, 더 나아가 누액 신경성장인자와도 관련이 있을 가능성을 제시한다. 또, 신장병증과 누액 신경성장인자는 직접적인 연관성은 없어 보이지만, 일종의 염증반응인 신장병증과 이에 의해 자극된 전신적인 신경성장인자에 의한 이차적인 현상이라고 할 수 있겠고 이들의 연관성에 대해서는 앞으로 연구해 보아야겠다.

신경성장인자를 비롯한 여러 뉴로트로핀들과 이들 수용체들이 염증반응이 있는 부위에 축적된다는 증거들이 나오고 있는데^{11,14,15}, 손상 받은 부위에 있는 IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 등의 염증 매개 물질들이 메산지움과 같은 말초 조직에서 신경성장인자의 합성을 증가시킨다고 보고되었^{23,42,43}, 망막세포에 신경성장인자와 Trk 수용체가 발현되어 있으며 신경성장인자가 주위세포의 사멸을 보호한다고 밝혀졌다²⁰. 당뇨병성 신장병증 환자에서는 고혈당에 의한 산화 스트레스로 인해 염증매개물질들에 의해 신경성장인자의 발현이 증가할 것이라고 가정할 수 있고, 이들 신경성장인자가 신장에서 염증성 사이토카인으로 작용하는 것인지, 방어기전의 일부로 작용하는지를 알기 위해 사이토카인-신경성장인자 경로에 대한 추가 연구가 필요하다²².

지금까지 여러 연구 결과에 따르면, 신경성장인자의 농도 혹은 활성도의 저하가 당뇨병성 신경병증의 기전에 의미있는 역할을 할 것이라고 생각되어 왔으나, 이것이 신경성장

인자의 전신 농도의 저하 때문인지, 해당 수용체를 활성화시키지 못해서 인지, 또는 수용체 결합 후 신호전달체계에 문제가 있어서인지 아직 밝혀지지 않았다⁴⁴. 본 연구에서는 당뇨병성 신경병증 환자에서 혈청 및 누액 신경성장인자의 농도가 증가하였으므로, 신경성장인자의 양적 부족 보다는 기능적 결함으로 인한 방어기전의 소실이 신경병증의 기전과 연관 있을 것이라고 생각되며, 동시에 손상 받은 신경에 대한 보상작용으로 증가한 신경성장인자가 염증성 사이토카인으로 작용할 가능성도 제시하였다. 본 연구 결과를 바탕으로, 신경성장인자는 당뇨병성 합병증으로 인해 손상된 신경섬유뿐 아니라, 망막, 그리고 신장세포에 염증 매개 물질들이 축적되어 그 농도가 증가한다고 생각할 수 있다. 앞으로 신경성장인자 이외에 brain-derived neurotrophic factor, 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4/5 등 다른 뉴로트로핀들에 대한 연구들을 통해 당뇨병성 미세혈관 합병증에서 뉴로트로핀의 역할에 대해 더 많은 연구가 되어야겠다.

마지막으로, 본 연구는, 생체 각막 공초점 현미경과 신경성장인자가 당뇨병성 신경병증을 비롯한 미세혈관 합병증을 진단하는데 사용될 수 있을 가능성을 제시하였으나, 앞으로 이에 대한 대규모 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

연구배경: 생체 각막 공초점 현미경은 신경종말의 밀도가 높은 각막의 구조를 정밀하게 비침습적으로 관찰할 수 있어, 당뇨병성 신경병증의 조기 진단 방법으로서의 가능성이 보고되고 있다. 또, 신경성장인자는 말초 및 중추신경계의 기능, 신경원의 분화 및 손상된 신경의 재생에 관여하여 신경병증의 병인에서 그 중요성이 대두되고 있다. 신경뿐 아니라 망막 및 신장조직에서도 이들이 발견되어 미세혈관 합병증의 공통 병인으로 작용할 가능성이 있다. 본 연구는 생체 각막 공초점 현미경을 이용해 당뇨병환자들의 각막의 구조를 관찰하여 기존의 신경병증의 진단방법들과 비교하고, 혈청 및 누액 내 신경성장인자의 양을 측정하여 당뇨병 미세혈관 합병증과의 연관성을 분석해 보고자 한다.

방법: 42명의 당뇨병환자들에서 생체 각막 공초점 현미경을 촬영하여 각막신경의 모양, 각막 전체 및 외피층의 두께, 각막내피/각질형성세포의 수를 측정하였고, 신경전도검사를 시행하였다. 또한, 이들에서 혈청 및 누액 내 신경성장인자를 측정하였다.

결과: 신경병증이 심한 군에서 각막내피세포수가 적고 (3105 ± 218 vs. 2537 ± 142 vs. 2350 ± 73 vs. $1914 \pm 465/\text{mm}^3$, $P = 0.02$), 혈청(35.50 ± 15.00 vs. 59.86 ± 57.66 vs. 79.67 ± 57.63 vs. 109.00 ± 60.81 pg/mL, $P = 0.39$) 및 누액(135.00 ± 11.94 vs. 304.29 ± 242.22 vs. 538.50 ± 251.92 vs. 719.50 ± 92.63 pg/mL, $P = 0.01$) 내 신경성장인

자가 많았다. 신경병증이 진행할수록 각막신경섬유의 굴곡이 심해지고($r^2 = 0.562, P = 0.015$) 내피세포수가 적어졌다($r^2 = -0.651, P = 0.006$). 당뇨병성 신장병증 및 망막병증이 심해 질수록 혈청 및 누액 내 신경성장인자가 역시 증가하였다.

결론: 생체 각막 공초점 현미경으로 측정된 여러 요소들과 신경전도검사, 망막검사, 단백뇨의 양과 비교한 결과, 생체 각막 공초점 현미경을 당뇨병성 미세혈관 합병증의 진단 방법으로 사용될 수 있을 가능성을 제시하였으며 앞으로 대규모 연구가 필요하리라 사료된다. 또한, 본 연구 결과는 혈청 및 누액 내 신경성장인자가 일종의 염증반응인 미세혈관 합병증에서 보상적으로 증가하여 이들의 공통 기전과 연관성이 있을 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Larson PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS: *Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. p.1540-55, Philadelphia, W.B. Saunders, 2003*
2. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AAF: *Diabetic Neuropathy: A continuing enigma. Diabetes Metab Res Rev 16:408-33, 2000*
3. Comblath DR: *Diabetic Neuropathy: Diagnostic methods. Adv Stud Med 4:S650-61, 2004*
4. Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI: *Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. Diabetes Care 27:1974-9, 2004*
5. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie C, Morgan P, Efron N, Boulton AJ: *Corneal Confocal Microscopy: A non-invasive surrogate of nerve fiber damage and repair in diabetic patients. Diabetologia 46:683-8, 2003*
6. Hossain P, Sachdev A, Malik RA: *Early detection of diabetic peripheral neuropathy with corneal confocal microscopy. Lancet 366:1340-3, 2005*
7. Oliveira-Soto L, Efron N: *Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. Cornea 20(4):374-84, 2001*
8. Muller LJ, Vrensen G, Pels L, Cardozo BN, Willkens B: *Architecture of human corneal nerves. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:985-94, 1997*
9. Rosenberg ME, Tervo T, Immonen IK, Muller LJ, Gronbagen-Riska C, Vesaluoma MH: *Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:2915-21, 2000*
10. Kallinikos P, Berbanu, O'Donnell C, Boulton A, Efron N, Malik R: *Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 45:418-22, 2004*
11. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL: *The role of growth factor in diabetic peripheral neuropathy. J Peripher Nerv Syst 9:76-83, 2004*
12. Apfel SC: *Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications. Brain Pathol 9:393-413, 1999*
13. Vinik AI: *Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. Am J Med 107:17S-26S, 1999*
14. Kurihara H, Shinohara H, Yoshino H, Takeda K, Shiba H: *Neutrophins in cultured cells from periodontal tissues. J Periodontol 74:76-84, 2003*
15. Dobrowsky RT, Rouen S, Yu C: *Altered neurotrophism in diabetic neuropathy: spelunking the caves of peripheral nerve. J Pharmacol Exp Ther 313:485-91, 2005*
16. Hellweg R, Hartung HD: *Endogenous levels of nerve growth factor(NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. J Neurosci Res 26:258-67, 1990*
17. Alfel SC: *Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. Eur Neurol 41(suppl 1):27-34, 1994*
18. Chilton L, Middlemas A, Gardiner N, Tomlinson DR: *The p75 neurotrophin receptor appears in plasma in diabetic rats: characterization of a potential early test for neuropathy. Diabetologia 47:1924-30, 2004*
19. Ordonez G, Gernandez A, Perez R, Sotelo J: *Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. A possible etiological element of diabetic neuropathy. J Neurol Sci 121:163-6, 1994*
20. Pittenger G, Vinik A: *Nerve growth factor and diabetic neuropathy. Exp Diabetes Res 4:271-85, 2003*
21. Lee HK, Lee KS, Kim HC, Lee SH, Kim EK: *Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs. laser in situ keratomileusis. Am J Ophthalmol 139:965-71, 2005*
22. Heese K, Beck KF, Behrens MH, Pluss K, Fierlbeck W, Huwiler A, Muhl H, Geiger H, Otten U, Pfeilschifter J: *Effects of high glucose on cytokine-induced nerve growth factor(NGF) expression in rat renal mesangial cells. Biochem Pharmacol 65:293-*

- 301, 2003
23. You L, Kruse FE, Volcker HE: *Neurotrophic factors in the human cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 987-94, 2000
 24. Dicou E, Nerrier V, Naud MC, deKozak Y: *NGF involvement in ocular inflammation: secretion by rat resident retinal cells. Neuroreport* 6:26-8, 1994
 25. Chang PY, Carrel H, Huang JS, Wang IK, Hou YC, Chen WL, Wang JY, Hu FR: *Decreased density of corneal basal epithelium and subbasal corneal nerve bundle changes in patients with diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol* 142:488-90, 2006
 26. Karlsson M, Mayordomo R, Reichardt LF, Catsicas S, Karten HJ, Hallbook F: *Nerve growth factor is expressed by postmitotic avian retinal horizontal cells and supports their survival during development in an autocrine mode of action. Development* 128:471-9, 2001
 27. Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM: *Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:333-9, 2001
 28. Calvillo MP, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM: *Corneal reinnervation after LASIK: prospective three-year longitudinal study. Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3991-6, 2004
 29. Erie JC, Patel SV, McLaren WJ, Hodge DO, Bourne WM: *Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. Arch Ophthalmol* 121: 770-6, 2003
 30. Oh SJ: *Clinical electromyography: nerve conduction studies. 2nd ed. p. 37-53, Baltimore, Williams & Wilkins, 1993*
 31. Lee KY, Kim WJ, Kwon SH, Cho TY, Lee SH, Cheong KH, Park KD, Kim SM, Sunwoo IN: *The usefulness of standardization of nerve conduction study in the diagnosis and follow-up of the demyelinating polyneuropathy. J Korean Neurol Assoc* 19:510-8, 1998
 32. McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM: *Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:3-17, 1998
 33. Kitzmann A, Winter EJ, Nau CB, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM: *Comparison of corneal endothelial cell images from a noncontact microscope and a scanning confocal microscope. Cornea* 24:980-4, 2005
 34. Pach JM, Brubaker RF: *Corneal endothelial changes in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Am J Ophthalmol* 98:401-10, 1984
 35. Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, Brubaker RF: *Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type 1 and type 2. Arch Ophthalmol* 114:9-14, 1996
 36. Janiec S, Rzendkowski M, Bolek S: *The relation between corneal autofluorescence, endothelial cell count and severity of the diabetic retinopathy. Int Ophthalmol* 18:205-9, 1995
 37. Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV: *The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy. Nat Med* 2:703-7, 1996
 38. Diemel LT, Cai F, Anand P, Warner G, Son DR: *Increased nerve growth factor mRNA in lateral calf skin biopsies from diabetic patients. Diabet Med* 16:113-8, 1999
 39. Lee DA, Gross L, Wittrock DA, Windebank AJ: *Localization and expression of ciliary neurotrophic factor(CNTF) in postmortem sciatic nerve from patients with motor neuron disease and diabetic neuropathy. J Neuropathol Exp Neurol* 55:915-23, 1996
 40. Terenghi G, Mann D, Kopelman PG, Anand P: *trkA and trkC expression is increased in human diabetic skin. Neurosci Lett* 228:33-6, 1997
 41. Faradji V, Sotelo J: *Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. Acta Neurol Scand* 81:402-6, 1990
 42. Steiner P, Pfeilschifter J, Boeckh C, Radeke H, Otten U: *Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. Am J Physiol* 261:792-8, 1991
 43. Alpers CE, Hudkins KL, Ferguson M, Johnson RJ, Schatteman GC, Bothwell M: *Nerve growth factor receptor expression in fetal, mature, and diseased human kidneys. Lab invest* 69:703-13, 1993
 44. Pittenger G, Vnik A: *Nerve growth factor and diabetic neuropathy. Exp Diab Res* 4:271-85, 2003