J Vet Clin 24(3) : 358-366 (2007)

Journal of Veterinary Clinics
www.ksvc.or.kr

개의 표재성 각막 궤양에서 소의 양막을 이용한 치료에 대한 평가

최영민 · 김준영 · 박종임 · 정순욱[1]
건국대학교 수의과대학

(게재승인: 2007년 8월 30일)

Evaluation of Bovine Amniotic Membrane for the Treatment of Superficial Canine Corneal Ulcer

Young-Min Choi, Joon-Young Kim, Jong-Im Park and Soon-Wuk Jeong[1]

College of Veterinary Medicine, Konkuk University

Abstract : This study was performed to investigate the application of bovine amniotic membrane for canine corneal ulcer and to compare bovine amniotic membrane flap to nictitating membrane flap. Corneas were treated with 8.0 mm trephine and 100% ethanol was applied and corneal epithelium was removed. This experiment was divided into three groups; control group, nictitating membrane flap group and amniotic membrane + nictitating membrane flap group. To compare corneal healing, fluorescein dye test, histopathological examination and TUNEL assay were performed. The healing size of the corneal epithelium in was largest among groups and it was significantly different with the other groups ($P<0.05$). Also, inflammatory cell deposits and keratocyte apoptosis in amniotic membrane flap group were smallest, but the width of the corneal epithelium was thickest among groups. Therefore, we tentatively predicted that the amniotic membrane flap would be an alternative effective method for the treatment of superficial canine corneal ulcer.

Key words **:** Bovine amniotic membrane, corneal ulcer, TUNEL assay, dog

서 론

양막의 안과영역에서의 사용은 1940년 de Rotth가 결막결손에 대한 재건술로 융모막과 양막을 같이 사용한 것이 처음 보고 되었다(4). 이후 양막의 사용은 각막과 결막의 재건술에 임상적으로 좋은 효과를 낼 수 있다는 보고가 많이 발표 되고 있고 이에 대한 다양한 연구가 많이 진행되고 있다(9,10,13-15,20,23,25,26,28,30,31,33,34).

수의안과 영역에서의 양막의 이용은 1998년 Barros 등이 각막 천공에 적용한 것이 처음이었다(1). 이후 2005년에 들어 Barros 등에 의해 3 case에 적용한 증례가 있으며, 2005년과, 2006년 말의 각막 궤양과 각막과 윤부의 편평세포암종에서 양막을 적용한 논문이 있으나, 양막의 수의 안과영역에서의 사용에 대한 논문의 양이 그리 많지는 않다(2,19,24). 국내에서는 우 등이 토끼에서 양막을 이용하여 각막혼탁을 억제하는 효과를 확인한 적이 있으며, 또 우 등이 토끼에서 엑시머레이저 치료광각막절제술 후 양막이 창상치유에 미치는 효과에 대한 연구 결과가 있다(41,42). 실제 임상적으로 수의학에서 양막을 적용한 것은 2006년 강 등이 개에서 소의 양막을 적용한 증례가 있다(12). 하지만, 수의 안과 영역에서 양막의 이용은 아직은 활발히 이루어져 있지 않다고 하겠다.

개에서 각막궤양은 개의 안과 질환 중 가장 다발하는 질환 중 하나로 매우 중요한 안과 질환이라 할 수 있다(1,7). 각막궤양은 매우 강력하고, 빠르게 진행되어서 안구에 치명적인 결과를 초래 할 수 있기 때문에 이에 대한 적절하고 빠른 치료는 안구의 해부적인 구조와 생리적인 기능을 보전하기 위해 매우 중요하다고 할 수 있다(21). 이에 대한 치료방법으로 다양한 방법이 소개 되었지만, 대표적인 수술적인 치료법으로 좌멸괴사조직제거술(debridement), 각막절제술(punctuate or linear keratotomy), 순막판(nictitating flap)은 표층각막궤양(superficial corneal ulcer)에, 그리고 결막판이식(conjuctival graft), 각막판이식(corneal graft)은 심층각막궤양(deep corneal ulcer)에 적용할 수 있다(6,11,35).

이러한 치료 방법들은 대개의 경우 좋은 치료 결과를 내고 있지만, 각막의 투명도를 유지하고, 각막세포의 정상적인 기능 회복이라는 측면에서 종종 부적절한 결과가 나타나기도 한다. 이런 이유로 각막궤양의 치료에서 좀 더 다른 시술방법을 찾는 것은 수의안과영역에서 중요한 부분이 될 수 있

[1]Corresponding author.
E-mail : swjeong@konkuk.ac.kr

을 것이다. 이런 연구의 일환으로 각막궤양의 치료로써 양막의 사용은 새로운 대안이라고 할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 동결건조시킨 소의 양막을 사용하였는데, 이는 지금까지 발표한 논문들에서는 적용하지 않은 형태이고 더욱이 기존의 습성형태의 양막에 비하여 취급하기 용이한 장점이 있다.

본 연구는 개에서 각막상피의 소실에 있어서 기존에 알려져 있는 순막판 및 양막 상호간의 치료효과를 비교해 개의 표재성 각막궤양에 대한 양막의 효과를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

실험동물

이 연구를 위해 9마리의 건강한 시츄가 이용되었다. 모든 실험견은 신체검사, 혈액검사, 혈청검사, 방사선검사, 안구 검사를 통해 건강상에 이상이 없음을 확인하였다. 이 실험견들은 사육실에 도입한 이후에 일주일간 적응기간을 걸치면서, 건강상태를 확인 하였다. 이들의 평균(±표준편차) 나이는 3.4(±1.5) 연령이었고, 연령의 분포는 1연령에서 6연령까지였다. 체중은 평균(±표준편차) 5.1(±0.4) kg으로 4.5 kg에서 5.7 kg 사이였다.

군배치 및 각 군의 처치

시츄들은 3마리씩 모두 3개의 그룹으로 나누었는데, 대조군에는 각막에 상처를 낸 뒤 아무런 수술을 하지 않았고, 순막군에는 순막판을 실시 하였으며, 그리고 양막군에는 양막판 및 순막판을 병용실시하였다. 각 그룹은 3마리씩 총 6개의 눈이 사용되었다.

신체검사, 혈구 검사 (CBC), 혈청 화학검사, 방사선 검사

모든 실험견은 신체검사, 방사선 검사, 혈구검사 (CBC), 혈청 화학검사를 실시하여서 다른 전신적인 질병이 있는지를 확인하였다.

신체검사에서는 일반적인 시진과, 촉진, 그리고 청진을 통해 이상유무를 확인하였다. 혈구 검사를 위해 Hemavet 850® (Drew Co. Ltd., USA)를 이용하여 WBC, RBC, Hb, PLT, PCV를 확인 하였다. 혈청 화학 검사는, Comprehensive Diagnostic Profile(ALT, ALB, ALP, AMY, Ca^{2+}, CRE, Globlin, GLU, PHOS, K^{2+}, Na^{+}, TBIL, TP, and BUN) test (Abaxis, USA)를 VetScan®(Abaxis, USA)를 이용하여 실시하였다. 모든 실험견은 위의 검사에서 정상범위에 속한 개체만 이용하였다.

안과 검사

모든 실험견은 일반적인 안과 검사를 통하여 안구의 이상여부를 확인하였다. Schirmer tear test(STT) (Color Bar™, EagleVision, Inc., USA), applanation tonometry(Tono-pen®VET, Medtronic SOLAN, USA), 생체 세극등 현미경(slit lamp test, 303-V, TAKAGI MFG. CO., Japan)를 이용하여 안과 검사는 이루어졌다. 특히 각막의 손상 여부를 세밀히 관찰하였고, fluorescein test(Fluorets®, Chavvin, France)를 통해서 각막의 손상여부를 모두 확인 하였다. 모든 실험견은 위의 검사에서 정상인 개체들만 이용하였다.

양막의 준비

양막은 소의 양막으로 만든 제품인 Amnisite BA™ (Bioland, Korea)를 사용하였다. 이 양막의 생산방법은 다음과 같다.

젖소의 분만 후 나온 태반을 청결한 조건하에서 양막 부분을 물리적으로 분리한 후, 이 양막을 정제수로 세척 후 스크래퍼를 이용하여 양막의 모체쪽 기질층을 제거하였다. 기질이 제거된 양막을 정제수에서 세척 후 0.05% NaOCl (sodium hypochlorite solution, Aldrich사)에서 1시간 동안 소독하였다. 소독된 양막을 정제수에서 세척 후 0.05% typsin(Sigma)을 이용하여 37°C에서 1시간동안 180 rpm으로 흔들어서 소양막 유래 세포를 제거한 후 다시 식염수와 정제수를 이용하여 세척하였다. 세척이 완료된 양막을 동결건조 후 25 kGy 선량(Cobalt 60)으로 방사선 멸균을 하였다.

수술전 처치

마취가 이루어지기 30분 전에 항생 점안제 ofloxacin (Telbit Eye Drops, Daewoo Pharm. Co. Ltd., Korea)를 점안하였고, 동시에 cefazoline(CKD Cefazolin Inj. 0.5 g, Chong Kun Dang, Korea, 30 mg/kg, IV)을 주사 하였다. 그리고, 수술 15분 전에 atropine sulfate(Atropine Sulfate inj. Je Il Pharm. Co. Ltd., Korea, 0.03 mg/kg, SC)와 Butorphanol tartrate(Butophan® inj. 1 mg, Myungmoon Pharm. Co. Ltd., Korea, 0.4 mg/kg, IV)을 처방한 후 수액 (Hartmann's sol., Dai Han Pharm. Co. Ltd., Korea, 5 ml/kg/hr, IV)을 정맥주사 하였다.

마취유도, 마취유지 및 수술부위 준비

Thiopental sodium(Thionyl inj. Dai Han Pharm. Co. Ltd., Korea, 12 mg/kg, IV)으로 마취를 유도한 뒤에 intubation을 실시하였다. 마취의 유지를 위해 1-3% isoflurane (Isoflurane, Rhodia Organique Fine Ltd., UK)를 100% 산소(1-2 L/min)와 함께 투여하였다. 마취가 완전히 유도된 뒤에 실험견은 dorsal recumbency로 위치시켜서 머리를 vacuum pillow로 고정하였다. 눈 주위에 털을 hair clipper을 이용해서 조심이 제거하고, 각막, 결막의 표면을 0.2% povidone-iodine solution으로 모두 소독하였다. 그리고 안검주위의 피부는 2% povidone-iodine으로 소독을 하였다. 그 후 각막과 결막은 멸균생리 식염수로 주의 깊게 씻어 주었다. 수술부위는 drape를 실시해 완전히 무균적으로 수술부위를 준비하였다. 시술 전에 다시 ofloxacin 점안액을 투여하였다.

각막 상피의 제거

각막 상피의 제거는 trephine과 ethanol을 이용하여 각막 상피를 제거하는 방법을 이용하였다(22). 우선 각막 상피를

제거 하기 위해 8 mm 지름을 가진 Barron Radial Vacuum trephine(Katena Products, Inc., USA)과 100% ethanol을 사용하였다. Barron Radial Vacuum trephine은 360° 회전에 0.25 mm가 들어간다. 한편 개의 corneal epithelium은 25 μm에서 40 μm의 깊이를 가진다(27). 완벽하게 각막상피의 깊이를 제거하기 위해 trephine은 90°를 돌려서 62.5 μm의 깊이로 상처를 낸 뒤 trephine을 고정하고, trephine 안쪽에 100% ethanol을 조심해서 주입하였다. trephine을 이용해서 ethanol이 다른 곳으로 흘러 나가지 않게 하였다. ethanol을 1분간 적용하고 난 뒤 멸균 생리식염수로 ethanol을 완벽하게 제거하고 각막을 씻어 주었다. 이런 과정을 통해 8 mm 반경의 각막에 있는 corneal epithelial keratocyte를 완벽하게 사멸시켰다. 그리고 난 뒤 epithelium을 멸균된 Q-tip으로 모두 제거하여서 완벽하게 stroma층이 표면에 노출되도록 하였다.

각막 상피의 제거 후 각막의 형광 염색과 생체 세극등 현미경을 이용한 촬영

각막 상피를 제거한 후 Fluorescein test(Fluorets®, Chavvin, France)를 통하여서 상피가 제거된 8 mm 반경의 상처를 가진 각막에 형광 염색을 하였다. 그리고, 생체 극 현미경을 이용해서 5배의 배율로 cobalt blue light 하에서 촬영하여서 수술 전 각막 상태를 기록하여 두었다.

각 그룹별 수술 방법

모든 촬영이 끝 난 뒤에 다시 각막과 결막을 0.2% povidone-iodine을 세척하고, 2% povidone으로 안검주위의 피부를 소독하였고, ofloxacin을 점안하였다. 그리고 다시 drape를 해서 무균적으로 수술을 준비하였다.

대조군에 대한 처치

대조군은 소독과, ofloxacin 점안까지 하고 더 이상의 처치를 하지 않고 그냥 마취에서 회복시켰다.

순막군에 대한 처치

순막군에는 순막판을 Hedlund가 기술한 방법에 따라 실시하였다(8). 3-0 polyamid(dafilon®)를 이용해서 상안검의 피부에서 dorsolateral conjunctival fornix쪽으로 바늘을 통과시킨 다음, 3 안검의 외측면에서 3 안검의 연골을 확인하여 연골 주위로 관통시켜 연골의 crossbar가 실에 걸릴 수 있게 하였다. 수술용 실을 다시 상안검의 dorsolateral conjunctival fornix에서 피부쪽으로 관통시킨 다음 매듭을 지었다.

양막군에 대한 처치

Amniotic membrane patch의 flap을 실시하였다. 우선 bovine amniotic membrane(Amnisite-BA, Bioland, Korea)를 생리식염수에 담근 다음, 이를 다시 각막 위에 올려 놓았다. 다음, 각막 위에서 양막이 찢어지지 않게 생리식염수를 뿌려가면서 양막을 각막 위에서 조심스럽게 펼쳤다. limbus

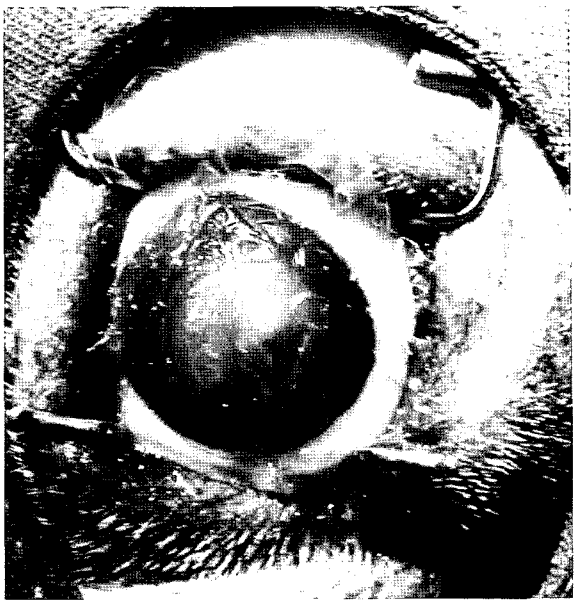

Fig 1. Bovine amniotic membrane patch flap on the cornea with 16 stitch suture using a 8-0 vicryl by a simple interrupted pattern.

에서 8-0 polyglactin 910(vicryl®)를 이용하여 단순결절봉합으로 16번 봉합하였다(Fig 1). 그리고 나서 순막판을 순막군에서 한 것과 같이 실시하여, 3 안검이 움직이면서 양막을 밀어내어 양막이 찢어지는 것을 방지하고 양막이 각막에 밀착되도록 유도하였다.

수술 후 처치

수술 후 멸균 생리 식염수로 수술부위를 완전히 세척한 뒤에 ofloxacin 점안액을 점안 하였다. 그 후 일반적인 사료만 섭취시켰으며, Elizabethan collar를 이용해서 수술 한 부위에 손상이 가지 않도록 보호 하였다. 그 외의 어떠한 약품도 처치 하지 않았다.

수술 2일 후 (48시간 후) 각막의 평가

수술 2일 후 다시 모든 실험견들을 마취 시킨 후 순막군은 순막판을 제거하였고, 양막군도 양막판을 각막에서 모두 제거하고 난 뒤 멸균생리식염수로 각막을 잘 세척하였다.

생체 세극등 현미경을 이용한 각막 상피의 재생 면적 측정

각막을 형광으로 염색하고, cobalt blue light 하에서 5배의 배율로 각막을 촬영하였다. 이를 토대로 하여 the image-pro® Plus program(The Proven Solution ™, Version 4.5.0.29 for window 98/NT/2000)를 이용하여 염색이 이루어진 곳의 면적을 상대적인 값으로 측정하였다. 이 상대적인 면적을 이용하여서 수술 전 사진에서의 염색된 면적(FSB)에서 수술 후 2일이 경과 뒤 사진에의 염색된 면적(FSA)을 빼어서 재생된 각막상피 표면의 상대적인 면적(ΔFS)을 구하였다.

$$\Delta FS = FSB - FSA$$

각막의 조직 검사

각막의 조직검사를 위해서, 마취하에서 KCl(KCL-40 inj. DAINHAN PHARM CO. LTD, Korea)을 정맥주입하여 안락사를 유도한 후, 각막만 안구에서 분리하여서 10% 포르말린에 고정하였다. 각막의 조직 절편을 만든 다음 H&E stain을 실시하여 현미경하에서 관찰 하였다.

Keratocyte의 apoptosis에 대한 검사

H&E stain을 실시하고 조직검사를 하고 난 뒤 같은 개체의 조직에 대해 keratocyte의 apoptosis에 대한 동정을 위해, terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling(TUNEL) assay를 실시하였다. 이것은 apoptosis나 necrosis가 된 세포에서 유리된 fragmented 된 DNA의 end를 Terminal transferase dUTP nick end labeling을 통해 detect 한 뒤에 여기에 형광염색으로 mark 하여서 apoptosis나 necrosis를 확인 하는 원리를 이용한 것이다.

이를 위해서 ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit(CHEMICON®, USA & Canada)를 사용하였다.

이를 위하여 각막 조직을 1% paraformaldehyde in PBS (50 mM sodium phosphate, ph 7.4, 200 mM NaCl) (methanol-free formaldehyde for tissue cryosections or cells)에서 상온에서 10분간 처리한 뒤에 PBS 용액으로 5분간 두 번 용액을 갈아가면서 수세를 한 뒤에 에탄올과 acetic acid가 2:1로 혼합된 용액에서 −20°C를 유지하면서 5분간 처리하였다. 다시 5분간 2번 수세를 하였다. 그리고 난 뒤 Equilibration Buffer를 적용하고 적어도 상온에서 10초 이상 두었다. TdT Enzyme을 가하고 습한 chamber

Table 1. The relative healing size of corneal epithelium

Group	ΔFS*	FSB	FSA
Control	40664.9±1578.4	51757.7±854.0	11092.8±1673.7
Nictitating	42722.4±1472.5	52601.8±1512.5	9879.3±2567.8
Amniotic	48507.8±1025.1	52014.3±452.3	3506.5±760.2

FSB = the fluorescein positive area of the cornea after cornea epithelium remove.
FSA = the fluorescein positive area of the cornea two days postoperatively
ΔFS = FSB-FSA
* The ΔFS was significantly different between amniotic and control groups, nictitating, respectively ($P<0.05$).

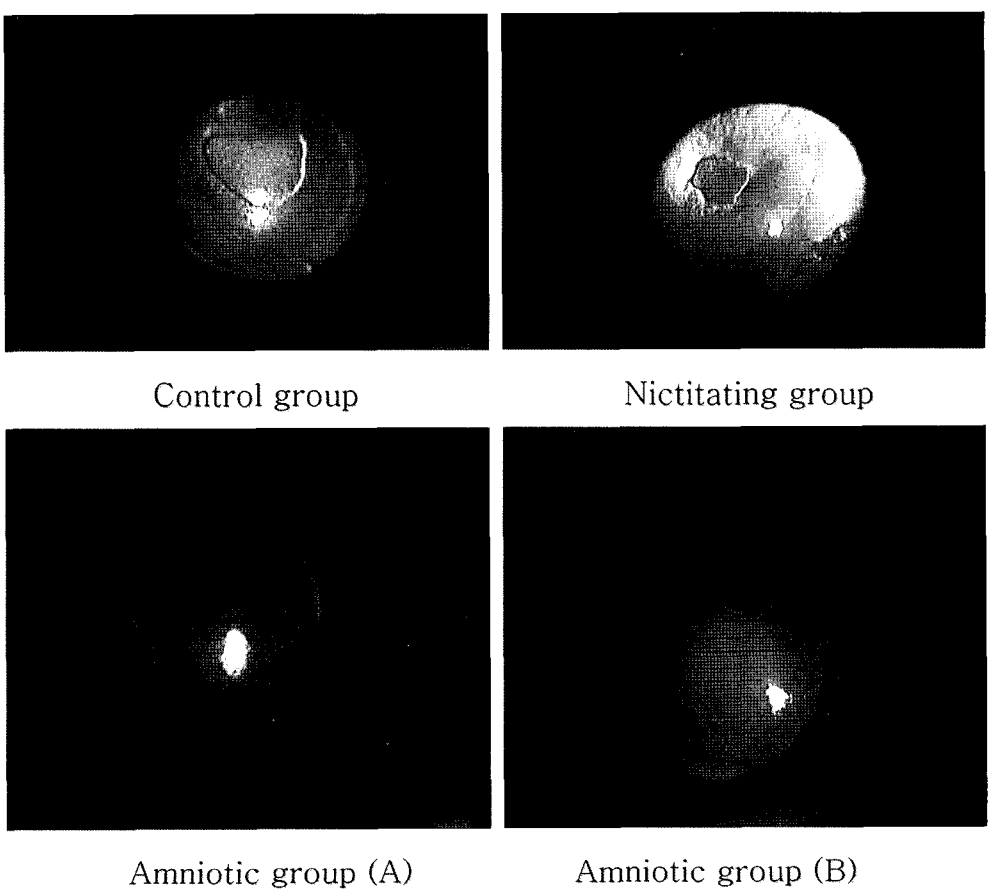

Fig 2. The comparison of the relative healing size of corneal epithelium after three different treatments. In control and nictitating groups, loss of corneal epithelium was still showed. In amniotic group, there was no any defect on the corneal surface (A, B). Some of false positive results were shown in the amniotic group (B).

들어가지 않게 하였다. 다시 Stop/Wash Buffer가 들어있는 곳에서 15초간 흔든 다음에 10분간 상온에 두었다. 이후 표본의 주위에 있는 과도한 물을 제거하고 주위에 더러운 얼룩 등을 제거하였다. 0.5-1.0 μg/ml의 Propidium Iodide가 들어있는 mounting medium을 적용한 후에 coverslip을 덮었다. 그 후에 fluorescence microscopy를 이용하여 관찰 하였다.

통계 분석

통계분석을 위하여 SPSS program {SPSS 12.0 KO for Windows, released on 12.0.1.(24 Mar. 2004), SPSS, Inc.}을 이용하였다.

각막상피의 재생된 면적값은 Kruskall-Wallis test를 통해서 유의성이 검정되었다. 이를 위해 3개의 그룹에 대한 재생된 면적값 (ΔFS)의 차이를 분석하였다. 사후검정을 위해 Mann-Whitney U test를 이용하였다.

모든 유의성 검정에 대해 $P<0.05$ 안에서 유의성을 인정하였다.

결 과

수술 후 재생된 면적에 대한 비교

수술 후, 각막 상피세포가 완전히 재생되어서 수술 전에는 염색이 되었으나, 수술 후 2일이 경과된 뒤에는 염색이 되지

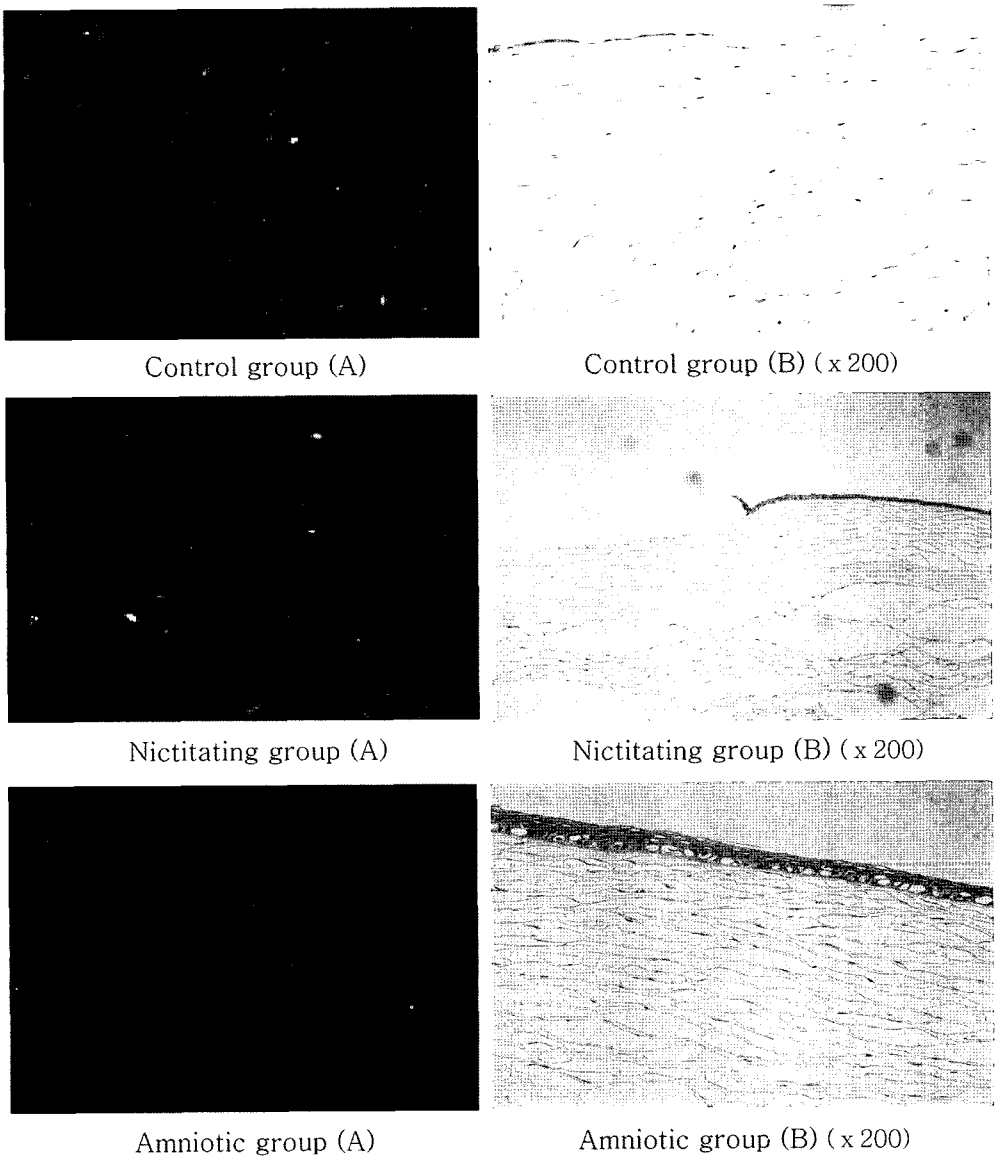

Fig 3. The microscope photograph of cornea section with the terminal deoxyribonucleotidyl trnaferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling (TUNEL) assay (A) and H & E stain (B).
The most tunel negative reaction showed on the cornea in the amniotic group (A). And the corneal epithelium of amniotic group was well reconstructed and PMN cell deposit was not seen however other groups had some defect of epithelial layer and PMN cells deposit in the cornea (B).

않는 면적, 즉 healing이 이루어진 면적(ΔFS)은 대조군이 40664.9±1578.4(mean±S.E.), Nictitating군이 42722.4±1472.5(mean±S.E.), 양막군이 48507.8±1025(mean±S.E.)이었다. 여기서 가장 healing 많이 이루어진 군은 위에서 언급한 것과 같이 양막군이었다(Table 1, Fig 2). 생체 세극등 현미경 상, 대조군이나 순막군은 명백하게 층을 이루는 defect가 확인이 되고, 이곳에 형광염색된 부분이 나타났다. 하지만, 양막군에서는 명백한 결손이 나타나는 곳은 존재하지 않았다. 하지만 몇몇의 경우에는 결손이 보이지는 않았지만, 염색이 되어지는 곳이 있는 것이 확인 되었다(Fig 2).

Healing이 이루어진 면적 (ΔFS)은 양막군이 대조군 및 순막군에 비하여 유의성 있게 높았고($P<0.05$), 양막군을 제외한 나머지 그룹간의 유의성은 없었다($P>0.05$).

수술 후 각막 조직에 대한 현미경적 검사

수술 2일 후 각막의 조직 사진을 비교해 본 결과, 양막군의 각막상피세포는 모두 재생되어 있었다. 그리고, 기질에 polymorphonuclear(PMN) cell의 침착이 가장 적게 보이고, 가장 깨끗하게 치유가 이루어지고 있었다. 또 상피세포의 재생도 가장 두텁게 이루어졌다(Fig 3).

대조군이 순막군보다는 PMN cell의 침착은 더 적게 이루어졌으나 상피세포의 재생에 있어서는 조직 사진 상 별다른 차이점이 보이지 않았다(Fig 3).

수술 후 각막 조직에 대한 TUNEL assay

수술 2일 후 각막조직의 각막세포의 apoptosis를 확인하기 위해 TUNEL assay를 실시하였다. 여기서 양막군이 다른 군보다 상대적으로 더 음성을 띄고 있었고, 순막군, 대조군의 순으로 음성을 나타내었다(Fig 3).

이를 볼 때 양막군에서 가장 적은 apoptosis가 일어나고, 순막군 그리고 대조군의 순으로 apoptosis가 일어난 것으로 확인 할 수 있었다(Fig 3).

고 찰

소의 태반유래 양막은 약 70 μm의 두께를 가지는 조직으로 두꺼운 기저막과 무혈관성의 기질로 구성되어 있다. 양막의 기저막은 type IV collagen, laminin, α6/β4 integrin으로 이루어져 있고, 간질은 주로 collagen I, III, hyaluronan, fibronectine, α5/β1 integrin으로 이루어져 있어 세포의 분열 및 이동을 촉진시킬 수 있다(43). 또 양막은 기저막으로써의 역할을 담당할 수 있어, 1990년대 후반부터 인의안과에서 다양하게 연구가 되어 왔다.

이번에 사용한 Amnisite-BA™ 은 소의 양막을 동결건조시킨 형태로 준비된 것으로 지금까지 동종 양막을 습성형태로 사용하던 것과는 다른 양막이었다. 본 실험에 사용한 Amnisite-BA™ 양막에서 세포를 모두 제거한 상태이므로 이종이식단계에서 생길 수 있는 면역독성을 나타내는 이종유래세포는 잘 제거가 된 상태였다. 이러한 세포의 제거처리는 이종이식에서 생길 수 있는 면역독성을 거의 나타나지 않게 할 수 있다(17). 여기서, 물론 세포가 제거 되면서 growth factor의 일부가 제거되는 것은 사실이다. 하지만, 생산자측(Bioland, Korea)의 자체검사에서 EGF의 정량검사를 해본 결과 에서 EGF는 약 50%가 감소되었다. 즉 나머지 50%는 여전히 가공후에도 남아 있었다. 또 type IV collagen은 거의 변화가 없어서 양막의 구조적인 변화도 거의 없는 것으로 여겨진다.

이를 근거로 본 양막이 개의 각막에서 이루어질 물리적, 화학적 기능들이 얼마나 효과적으로 각막궤양의 치료를 도울 수 있을지에 대해 확인하는 것을 목적으로 본 연구를 실시하여 보았다.

본 실험에서 사용된 개는 모두 시츄(Shih-Tzu)이었다. 이는 시츄종이 국내에서 가장 많이 사육되고 있는 품종 중 하나이며, 또한 단두종견의 특성상 각막질환이 가장 빈번히 발생되고 있는 품종이기 때문이다(16). 이는 단두종견이 nasal fold에 의한 첩모난생증과 안와의 형성이 비정상적으로 너무 얕게 형성되어서 거대안검열 증후군(macropalpebral fissure syndrome)이 빈번히 생기기 때문일 것이다(44). 또한 박 등은 시츄에서 표층각막절제술과 3 안검 플랩을 병용하여 유피종을 치료하기도 하였다(45). 이런 이유로 시츄종의 개들을 실험견으로 사용하였다.

우선 완벽하게 각막의 상피세포를 제거하기 위해 trephine을 이용해, 8.0 mm의 동일한 지름의 원으로 상처를 낸 뒤에 100% ethanol을 적용하였다. Ethanol은 각막 상피세포에만 독성을 가지므로, 이 방법은 각막의 상피만을 제거하는데 매우 좋은 방법이라고 할 수 있겠다(22). Ethanol 처리 후, 모두 죽어버린 각막 상피세포를 Q-tip으로 제거하여서 완벽하게 상피세포를 제거하여서 완전히 상피세포가 각막 윤부에서 재생되어 이동 되어 나오는 정도를 확인하였다. 각막 상피 세포는 오직 각막 윤부에서만 stem cell을 가지므로 각막 상피 세포를 재생하기 위해서는 각막 윤부에서 재생되어 들어올 수 밖에 없다(3,29,32). 이런 이유로 수술 후 2일째 생체 세극등 현미경을 통한 각막의 검사에서는 아직 치유가 안된 각막의 상피 부위는 중심부위에 집중되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 양막판을 실시한 군에서는 양막이 각각의 기저막으로 사용 되어서인지 손상이 되었던 각막의 전면에 걸쳐 상피의 결손은 매우 미약하게 확인이 되었다.

순막판을 한 군과 아무것도 처리하지 않은 대조군은 둘 사이에 큰 차이점을 찾아 보기 힘들 정도로 치료되는 정도가 비슷하였다. 하지만, 조직학적으로 순막군이 대조군보다 재생된 상피세포의 두께가 더 두꺼웠고, PMN cells의 침착 또한 좀 더 적은 것으로 보였다.

양막은 어느 정도 치료가 된 뒤에도 각막에 훌륭하게 남아서 기저막의 역할을 하고 있었을 뿐 아니라 각막의 치유되는 속도도 다른 어느 군보다도 좋았다. 이는 통계적으로 유의성이 인정되었다.

각막이 치료되는 과정에서 기질층의 각막세포의 apoptosis가 가장 적게 일어나게 하고, PMNs의 침착이 적게 이루어

지게 하는 것은 각막에 반흔 조직을 최대한 적게 남기고, 적절히 치료가 될 수 있게 하는 방법이라 할 수 있겠다. 각막세포의 apoptosis는 손상받은 각막세포가 TGF-β와 IL-1을 분비하여서, 주변의 각막세포가 섬유아세포로 변하게 하여 각막의 재구성이 이루어지게 할 뿐 아니라, 주변조직의 apoptosis을 일으켜 더 이상의 염증이 파급되는 것을 막는 역할을 한다. 하지만, 일반적으로 apoptosis가 많이 일어난 각막 일수록 PMN cell의 침착을 과도하게 유도하고, 활성화된 섬유아세포가 과도하게 형성되어 치료가 된 후에도 각막의 반흔화가 더욱 심하게 일어나므로 가능하면, apoptosis를 적게 일어나게 하는 것이 각막의 치유에 있어 중요한 부분이 될 수 있겠다. 여기에서 양막은 이러한 cytokine을 조절하고, 너무 과도하지 않게 억제하는 역할을 하여서 각막이 치유되는 동안 최대한 반흔이 남지 않고 잘 치료 될 수 있도록 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 각막의 치유에 있어 각막세포의 apoptosis를 동정하기 위해 지금까지 여러 연구에서 TUNEL assay를 이용하여서 DNA의 fragmentation을 확인하여 apoptosis의 정도를 확인하여 보았다(5,18,22,36-40).

본 연구에서는, 양막판을 실시한 군의 각막에서, TUNEL assay에 대해 가장 적은 양성를 보였고 또 H&E stain을 한 뒤 현미경상에서 검사해 본 결과에서는 양막판에서 가장 적은 염증세포(PMNs)의 침착이 확인되었다. 혈관이 분포하지 않는 각막은 지속적인 각막상피의 결손시 눈물에서 염증세포가 들어와서 침착하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 침착된 염증세포는 달리 사라질 수 있는 방법이 없기 때문에 각막에 주로 침착이 되어 버린다. 염증세포의 침착은 각막세포의 apoptosis을 유발하고 이러한 과정은 각막에 반흔을 남기게 되어, 각막의 투명도는 떨어뜨리는 역할을 하게 된다. 양막은 이런 염증세포를 흡착하고 각막세포의 apoptosis 최대한 억제시켜 반흔형성을 최소화하는 역할을 한다(43).

본 연구에서도 각막 조직 검사를 실시해 본 결과, 양막판을 한 군의 각막에는 PMNs의 침착이 매우 적게 보였다. 대조군과 순막군은 각막상피의 재생도 느릴 뿐 아니라, 염증세포의 침착도 왕성하게 일어나고 있어, 치료 뒤에서 각막의 투명도를 생각을 한다면, 별로 좋은 효과를 내지 못한다고 하겠다. 그리고, 치료과정에서 양막은 각막 상피가 재생되는 동안 훌륭하게 기저막으로써의 역할을 하였고, 또, 각막 상피층이 각막 실질층과 부착되는 정도 또한 양막군이 다른 어떠한 치료 방법보다 좋게 나타났다. 양막군은 양막판 후에 다시 순막판을 같이 시행 하여야 했다. 이유는 예비 실험에서 양막이 3 안검의 움직임에 의해 쉽게 찢어져 제거 되었기 때문이다.

현재의 양막은 그 탄성강도가 매우 약하기 때문에, 기계적인 자극에 대해 아직은 좋은 보호 역할을 하지는 않는 것으로 생각이 된다. 앞으로 collagen을 강화하여, 탄성강도를 더욱 높인 양막으로, 이러한 기계적인 자극에 대해 양막이 각막 치료에서 보호 역할을 단독으로 잘 수행 할 수 있을지에 관한 연구도 같이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

소의 양막을 개의 각막궤양의 치료에 적용하기 위해 그 치료 효과를 기존의 수술법인 순막판과 비교하였다. 각막을 8.0 mm의 trephine과 100% ethanol로 처리하여, 8.0 mm 지름의 corneal epithelium만 제거하고 난 뒤에 아무것도 처리하지 않은 대조군, 순막판을 한 순막군, 그리고 양막판 및 순막판을 병용처치 한 양막군을 서로 비교 평가하였다.

이 평가를 위해, 수술 전, 그리고 수술 후 2일이 경과 된 뒤에 각막에 fluorescein dye test를 하여서 각막의 치유된 면적을 구하여 보았고, 수술 후 2일이 경과 된 뒤에 조직절편을 만들어 현미경 상에서 각막의 조직을 확인하였으며, TUNEL assay를 하여서 각막세포의 apoptosis를 확인하였다. 여기서 각막의 치유된 면적은 양막군이 가장 많이 치유 되었으며, 이것은 통계학상 유의성이 있었다($P<0.05$). 양막군의 각막상피세포가 가장 잘 재구성 되었으며, PMNs의 침착이 거의 일어나지 않고 치유가 잘 되고 있었다. 그리고, TUNEL assay에서도 양막군이 가장 미미한 양성을 나타내어서 각막세포의 apoptosis가 가장 적게 일어나고 있었다.

이를 근거로 볼 때 양막판은 개의 표재성각막궤양에 있어 새로운 수술방법으로 사용 할 수 있을 뿐 아니라, 그 효과도 다른 기존의 수술 법보다 더 좋은 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Barros PSM, Garcia JA, Laus JL, Ferreira AL, Gomes S. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. Vet Ophthalmol 1998; 1: 119-1231.
2. Barros PSM, Safatle AMV, Godoy CA, Souza MSB, Barros LFM, Brooks DE. Amniotic membrane transplatation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. Vet Ophthamol 2005; 3: 189-192.
3. Chung J, Park Y, Paek S, Chong Y, Kim W. Effect of Na-hyaluronan on stromal and endothelial healing in experimental corneal alkali wounds. Ophthalmic Res 1999; 31: 432-439.
4. de Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. Arch Ophthalmol 1940; 23: 522-525.
5. Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, Stern ME. Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. Cornea 1997; 16: 200-208.
6. Gilger BC, Whitley RD. Surgery of the cornea and sclera. In: Veterinary Ophthalmology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott/ Williams & Wilkins. 1999; 675-700.
7. Hale G. Treatment of corneal ulcers in dogs. Vet Rec 2006; 158: 108.
8. Hedlund CS. Surgery of the Eye. In: Small Animal Surgery, 3rd ed. Missouri: Mosby. 2007; 260-288.
9. Hendrix DVH. Diseases and Surgery of the Canine Conjunctiva. In Veterinary Ophthalmology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins. 1999; 619-634.
10. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression:

evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. J Immunol 1995; 154: 5665-5674.
11. Hollingsworth SR. Corneal Surgical Techniques. Clin Tech Small Anim Pract 2003; 18: 161-167.
12. Kang MG, Choi YH, Kim JY, Jeong SW. Bovine Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Descemetocele in a Dog. J Vet Clin 2006; 23: 334-336.
13. Kim HS, Moon JI, Sah WJ, Kim YT, Kim JC, Hahn TW. Ocular penetration of topical ofloxacin in Rabbit eye with amniotic membrane transplantation. J Korean Ophthalmol Soc 2001; 42: 1315-1324.
14. Kim HC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 1995; 14: 473-484.
15. Kim JS, Park SW, Kim JH, Lee SI, Yang HN, Kim JC. Temporary amniotic membrane graft promotes healing and inhibits protease activity in corneal wound induced by alkali burns in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: S90.
16. Kim JY, Yoon HY, Han HJ, Jang HY, Lee BR, Won HJ, Na JK, Jeong SW. A Retrospective Study of Corneal Ulcer in 32 Dogs (2002-2004) (abstract). J Vet Clin 2004; 21 (2, Suppl.): 117.
17. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immuogenicity of Human Amniotic Membrane in Experimental Xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 1539-1546.
18. Kuo IC, Seitz B, LaBree L, McDonnell PJ. Can zinc prevent apoptosis of anterior keratocytes after superficial keratectomy?. Cornea 1997; 16: 550-555.
19. Lassaline ME, Brooks DE, Ollivier FJ, Komaromy AM, Kallberg ME, Gelatt KN. Equine amniotic membrane transplantation for corneal ulceration and keratomalacia in three horses. Vet Ophthalmol 2005; 8: 311-317.
20. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. Am. J Ophthalmol 1997; 123: 303-312.
21. Martin CL. Cornea and Sclera. In: Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine, London: Manson Publishing Ltd. 2005; 241-297.
22. Mohan RR, Hutcheon AEK, Choi R, Hong JW, Lee JS, Mohan RR, Ambrósio Jr R, Zieske JD, Wilson SE. Apoptosis, necrosis, proliferation, and nyofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. Experimental Eye Research 2003; 76: 71-87.
23. Na BK, Hwang JH, Shin EJ, Song CY, Jeong JM, Kim JC. Analysis human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development therapeutic agent of recalcitrant keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: S90.
24. Ollivier FJ, Kallberg ME, Plummer CE, Barrie KP, O'Reilly S, Taylor DP, Gelatt KN, Brooks DE. Amniotic membrane transplantation for corneal surface reconstruction after excision of corneolimbal squamous cell carcinomas in nine horses. Vet Ophthalmol 2006; 9: 404-413.
25. Park GS, Choi TH, Park WC, Kim JC. The Clinical Efficacy of Amniotic Membrane Transplantation and Limbal-Conjunctival Autograft in Patients with Recurrent Pterygium or Pseudopterygium. J Korean Ophthalmol Soc 2001; 42: 1143-1149.
26. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. Ophthalmology. 1997; 104: 974-985.
27. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: Veterinary Ophthalmology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins. 1999; 31-150.
28. 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: 235-240.
29. Thoft RA, Friend J. The X, T, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmo Vis Sci 1983: 24; 1442-1443.
30. 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: 325-335.
31. Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. Am. J Ophthalmol 1997; 124: 765-774.
32. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. Eye 1989; 3: 141-157.
33. Tseng SCG, Prabhasawat P, BartonK, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. Arch Ophthalmol 1998; 116: 431-441.
34. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Shinozaki N, Shimazaki J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. Am J Ophthalmol 1996; 122: 38-52.
35. Vanore M, Chahory S, Payen G, Clerc B. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. Vet Ophthalmol 2007; 10: 93-99.
36. Wang MX, Gray T, Park WC, Prabhasawat P, Culbertson W, Forster R, Hanna K. Reduction in Corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. J Cataract Refract Surg 2001; 27: 310-319.
37. Wilson SE. Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. Trans Am Ophthalmol Soc 2002; 100: 411-433.
38. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio Jr R, Hong JW, Lee JS. The Corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. Prog Retin Eye Res 2001; 20: 625-637.
39. Wilson SE, He YG, Weng J, Zieske JD, Jester JV, Schultz GS. Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. Exp Eye Res 1994; 59:665-678.
40. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 2544-2561.
41. Woo HW, Kim MS, Kweon OK. The Effect of Amniotic Membrane on Epithelial Wound Healing in Rabbit Cornea after Phototherapeutic Keratectomy. J Korean Ophthalmol

Soc 1999; 40: 1782-1792.
42. Woo HM, Kim MS, Kweon OK. The effect of Amniotic Membrane Graft on the Inhibition of Corneal Haze in Rabbit. J Korean Ophthalmol Soc 1999; 40: 2385-2394.
43. 김재찬, 김진국, 박우찬, 박정극, 양은경, 이형근, 최태훈. 양막의 안과적 이용. In: A practical guide to ocular surface disorders. 서울: 도서출판 내외학술. 2006; 41-131.
44. 김준영, 김경희, 이준섭, 장하영, 이보라, 최영민, 정순욱. 시츄견에서 거대 안검열 증후군 (macropalpebral fissure syndrome)의 수술적 치료의 1례 (abstract). J Vet Clin 2006; 23 (1, Suppl.): 196.
45. 박신애, 이나영, 정만복, 권도형, 김원태, 김현아, 박정환, 지향, 김대용, 남치주, 서강문. Shih Tzu의 각막에 발생한 유피종에 대한 표층 각막 절제술 1례. J Vet Clin 2005; 22: 268-270.