

엑시머레이저 각막 절제술 후 각막내피세포의 손상

김 근 태 · 김 기 산

= 요약 =

최근 엑시머레이저 근시교정술의 보급과 심한 고도근시의 교정을 위해 Excimer Laser In Situ Keratomileusis(LASIK)가 소개되고 있다. 이에 저자들은 엑시머레이저를 이용한 각막절제술이 각막내피세포에 주는 영향과 또한 얼마만큼의 깊이까지 각막내피세포에 손상을 주지않고 각막을 연마할 수 있는가를 알아볼 목적으로 백색 가토 25마리(50안)에서 엑시머레이저 각막절제술을 시행하여 다양한 잔여두께(90~250 μ m)의 각막을 만든 후 술후 3일째에 각막내피세포를 Alizarin red S(pH 4.2)용액으로 염색하여 computer assisted digitizer를 이용하여 형태학적 특성을 분석하였다.

Regression analysis상 잔여각막두께가 적을수록 각막내피세포의 shape factor의 감소, pleomorphism을 나타내는 hexagonality의 감소, polymegathism을 나타내는 coefficient of variation of the cell area(CV)의 증가가 관찰되었으며($p<0.01$), 특히 그 잔여각막두께가 약 200 μ m이하인 경우 손상이 관찰되었으며 잔여각막두께가 150 μ m이하인 경우에는 심하였고, 200 μ m이상인 경우에는 거의 정상소견을 보였다.

위의 결과로 미루어 보아 엑시머레이저를 이용하여 각막내피세포에 약 200 μ m이하로 가까이 가야할 정도로 많은 양의 각막 실질을 연마 한다면 LASIK과 같이 각막간질의 심층부를 절삭해야 하는 경우에는 각막내피세포손상의 가능성을 염두에 두어야 할 것으로 사료된다(한안지 37:1111~1119, 1996).

= Abstract =

Corneal Endothelial Damage after Deep Excimer Laser Ablation

Keun Tae Kim, M.D., Ki-San Kim, M.D.

〈접수일 : 1996년 4월 12일, 심사통과일 : 1996년 6월 18일〉

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

본 논문의 요지는 1995년 제 74차 대한안과학회 춘계학술대회 및 1995년 5월 15일 ARVO Annual Meeting에서 발표된 바 있음.

본 연구는 계명대학교 의학연구소의 일부보조로 이루어진 것임.

To investigate the effect of deep excimer laser ablation on the corneal endothelium, excimer laser photorefractive keratectomy (PRK) with different ablation depths were performed to obtain various residual corneal thickness (range: 90-250 μ m) in white rabbit corneas (N=50). Corneal endothelium was stained with Alizarin red S (pH 4.2) for 2 minutes three days after excimer laser ablation and was analyzed morphometrically using digitizer the morphometric parameters according to residual corneal thickness.

In the corneas of residual corneal thickness (RT) over 200 μ m and untreated controls (N=6), endothelial damages were rarely seen. With the decrease of residual corneal thickness, hexagonality and shape factor decreased, and coefficient of variation of the cell area (CV) increased ($p < 0.01$). In corneas of RT less than 200 μ m, endothelial damages were found and become more severe in corneas of RT between 90~149 μ m. Hexagonal shaped cells were rarely observed, and the shapes of most cells were changed.

Deep excimer laser PRK might affect corneal endothelial cells if the RT is less than 200 μ m, and these findings suggest that care is recommended when doing deep excimer laser corneal ablation, especially excimer laser assisted in situ keratomileusis (J Korean Ophthalmol Soc 37:1111~1119, 1996).

Key Words : Alizarin Red S, Corneal endothelium, Endothelial morphology, Excimer laser PRK.

Argon-fluoride 193nm 엑시머레이저를 이용한 근시교정수술은 예측성, 효율성, 안정성면에서 이전의 근시교정수술보다 월등한 결과를 보여왔으며¹⁻³⁾, 그 이용은 갈수록 증가하고 있는 추세이다. 엑시머레이저 근시교정술은 각막실질의 상층부를 연마하므로 각막내피세포에 미치는 영향은 무시되어도 괜찮다고 생각되어져 왔고, 이제까지 대부분의 부작용에 대한 관심은 상피세포와 기질의 조직학적 변화와 이에 따른 각막혼탁과 굴절력변화, 상피세포의 투과성 변화 등에 대한 것이 주였으며⁴⁻⁷⁾, 소수의 연구에서 엑시머레이저 근시교정수술은 각막내피세포에 별다른 손상을 주지 않았다고 보고하고 있다^{1,8-10)}. 그러나 충격과 등과 같은 아직 밝혀지지 않은 기전에 의한 각막내피세포의 손상가능성은 여전히 존재하며¹¹⁾, 또한 최근 다단계 엑시머레이저절제방법을 이용한 고도근시의 교정이나, 아주 심한 고도근시교정을 위한 Excimer Laser Assisted In Situ Keratomileusis (LASIK) 등의 방법들이 도입되면서, 레이저연마면과 각막내피세포와의 거리가 가까워지는 경우가 점차로 많아지고 있고, 이에 따라 각막내피세포의 손상가능성은 증가하고 있으나 이에 대한 연구

는 아직 미미한 상태이다.

이에 저자들은 엑시머레이저 조사에 의한 각막내피세포의 손상여부와, 각막내피세포의 손상없이 얼마나 깊이 각막간질을 연마할 수 있는지를 알아보기 위해 백색토끼를 대상으로 다양한 깊이의 엑시머레이저 근시교정수술을 시행한 후 각막내피세포의 형태를 분석하여 잔여각막두께와의 상관성을 알아보았다.

재료 및 방법

백색 토끼 (2~3kg) 25마리를 ketamine hydrochloride (20mg/kg)와 xylazine (Rumpun, 7mg/kg)을 근육주사하여 마취한 후 소아용 개검기를 결막원개에 삽입하여 안검을 벌린 후, 0.5% proparacaine hydrochloride를 점안하여 국소마취를 시행하였다. 이후 pachymetry를 각막중심부에 3회 시행하여 평균 각막두께를 측정 한 후 엑시머레이저에 의한 연마를 시행하였다 (Excimed UV200, LA, Summit Technology, Waltham, MA, U.S.A). 엑시머레이저의 조사직경은 5mm로 하였고 반복율은 10Hz, 에너지밀도는 180mJ/cm², 박동간격은

Fig. 1. Normal rabbit corneal endothelium(A). Rabbit corneal endothelium after excimer laser ablation(residual thickness: 210 μ m)(B). Normal shaped corneal endothelium was observed(Alizarin red S stain, $\times 100$).

Fig. 2. Rabbit corneal endothelium after excimer laser ablation(residual thickness: 190 μ m(A), 180 μ m(B), 162 μ m(C), 150 μ m(D)). Multinucleated giant cells and abnormal shaped cells were increased with decreased residual thickness(Alizarin red S stain, $\times 100$).

10nsec, 한번 조사시 가능한 최대 교정량은 -6.0D 였고 이때 절삭된 각막두께는 62 μ m였다. 각막상피의 절제율이 각막간질과 똑같지는 않았지만 잔여각막두께의 계산을 위해 각막상피를 벗기지 않고 조사하였다. 필요한 절제량을 계산하여 PRK방식으로 엑시머레이저를 조사하여 잔여각막두께가 90~250 μ m가 되게 하였다. 수술후 즉시 항생제 안연고를 점안하고, 3일간 항생제 안약을 1일 4~6회 점안하였다. 술후 3일째에, sodium pentobarbital을 정맥주사하여(80mg/kg) 가토를 희생시킨후 안구를 적출하고 8mm trephine으로 각막을 절제한 후, 각막내피세포를 1% Alizarin red S (pH 4.2)용액에 2분간 염색하였다. 염색후 BSS(Balanced salt solution)를 이용하여 염색액을 부드럽게 세척한 후 즉시 현미경 하에서 각막내피세포를 사진촬영하였다. 촬영은 Kodak Ectachrome 칼라 필름을 사용했으며, 중심부의 각막내피세포를 적어도 5군데 이상 촬영하였으며, 촬영한 필름은 3배 크기로 확대 인화하였다. 3배로 확대 인화된 각막내피세포사진은 computer assisted digitizer(SAC사, 미국)와 image analysis program(Bio-optics사, 미국)을 이용하여 적어도 100개 이상의 각막내피세포의 형태를 분석하였다. 정상가토(N=6)의 각막내피세포도 같은 방법으로 염색하고 형태학적 분석을 하였다. 단위면적당 각막내피세포의 수인 밀도(density), 세포면적(area), 세포면적의 표준편차를 평균 세포면적으로 나눈 즉, 세포면적의 다양성(polymegathism)을 나타내는 양적 지침인 변이계수(coefficient of variation, 이하 CV), 원을 1.00으로 하여 계산된 shape factor, 세포형태의 다양성을 나타내는 즉, 6각형모양의 세포의 백분율인 육각형세포비율(pleomorphism) 등을 분석하여 잔여각막두께에 따른 각 변수들의 변화를 회귀분석으로 분석하였다.

결 과

실험에 사용한 토끼의 평균각막두께는 334.8 \pm 23.6 μ m였고 엑시머레이저를 이용한 평균연마깊이는 173.1 \pm 51.1 μ m(range 62~248 μ m)였다. 엑시머레이저를 조사한 후 잔여각막두께가 200 μ m이상인 경우는 정상과 비슷한 육각형모양의 균일한 세포크기를

보였다(Fig. 1). 그러나 잔여각막두께가 170 μ m~200 μ m인 경우에는 다핵거대세포나 세포면적이 증가하거나 비정상적인 모양을 한 각막내피세포들이 관찰되었고 잔여각막두께가 150 μ m~170 μ m인 경우에는 형태학적 분석이 가능하였으나 군데 군데 세포경계가 소실된 부위가 관찰되었으며 polymegathism의 지표인 평균 변이계수는 증가되었고, pleomorphism의 지표인 육각형세포비율은 감소되었다($p<0.01$) (Fig. 2).

잔여각막두께가 90 μ m~150 μ m인 경우에는 각막내피세포의 손상이 매우 심하여 대부분 형태학적 분석이 불가능한 경우가 많았다. 정상적인 육각형모양의 세포는 매우 드물었으며, 막대모양으로 길어지거나 아주 작아진 세포들이 많이 보이고 둥근모양 또는 rosette-like 세포들이 다수 발견되었으며 잔여각막두께가 얇을수록 그 정도는 증가하였다($p<0.01$) (Fig. 3).

형태학적 분석이 가능한 사진에서 얻은 결과를 보면 세포밀도는 잔여각막두께에 따른 변화가 없었다($p>0.1$) (Fig. 4). 이는 세포손상에 따른 세포분열에 의해 면적이 작은 세포들이 많이 생겼기 때문이라고 생각되며 세포면적 역시 잔여각막두께에 따른 변화가 거의 없었다($p>0.1$) (Fig. 5). 그러나 육각형세포비율과 shape factor는 잔여각막두께가 약 200 μ m이하에서부터 감소하는 경향을 나타내었으며 잔여각막두께가 얇을수록 심한 변화를 보였고($p<0.01$) (Fig. 6, 7), polymegathism을 나타내는 CV는 잔여각막두께가 약 200 μ m이하에서부터 급격히 증가하는 경향을 보였다($p<0.01$) (Fig. 8). 이는 잔여각막두께가 200 μ m이하가 될때 엑시머레이저에 의한 각막내피세포 손상의 가능성을 시사하는 것이라 생각된다.

고 찰

과거에는 굴절이상을 교정하기 위해 다이아몬드 칼을 이용한 방사상각막절개술이나 난시교정각막절개술 또는 생체각막이식술 등이 시도되어 왔으나 예측성이나 정확성 또는 술후 시력의 질적인 면에서 불충분하였다^{8,12}. 그러나 최근 엑시머레이저를 이용한 근시교정수술이 개발되었고 이 방법은 예측성,

Fig. 3. Rabbit corneal endothelium after excimer laser ablation(residual thickness: 141 μ m(A), 130 μ m(B), 115 μ m(C), 92 μ m(D)). Hexagonal shaped cells were rarely observed. Many elongated or round and small or rosette-like cells were found that was hard to analyze with digitizer(Alizarin red S stain, $\times 100$).

효율성, 안정성면에서 타 수술보다 월등한 결과를 보여왔다^{1,2,13,14}. Excimer laser photorefractive keratectomy(PRK)는 Argon-Fluoride의 원적외선 스펙트럼에서 나오는 193nm의 파장을 지닌 엑시머레이저를 이용하여 각막의 중심부를 연마하여 각막의 곡률반경을 증가시켜 각막의 굴절력을 감소시킴으로써 근시를 교정하는 수술방법이다. 특히 엑시머레이저는 각막에 조사되어 분자간 결합에 직접적으로 작용하여 분자결합만 끊어지게 하고 주위조직에는 아무런 영향을 끼치지 않는다고 알려져 왔다¹⁵. 특히 각막의 상층부만을 연마하므로 각막내피세포의 손상은 없다고 생각해 왔다.

각막내피세포는 각막간질의 수화(hydration)와 각막두께, 투명성 유지에 중요한 역할을 한다. 그러나 인간에서는 각막내피세포의 재생이 이루어지지 않으며 세포손상은 이웃 세포의 이동과 확대에 의해 회복된다¹⁶. 이러한 각막내피세포의 심한 손상이나 손실이 있는 경우 각막부종과 함께 시력저하가 발생된다. 이러한 중요한 기능을 하는 각막내피세포가 엑시머레이저 PRK에 의해 손상이 일어나는지에 관한 여러 보고가 있어왔다. Hanna 등¹⁰과 Fantes 등⁵은 사람과 원숭이를 대상으로 PRK를 실시한 후 각막내피세포의 저명한 변화는 없었다고 보고하였으며, Amano와 Shimizu는 -2.75~-10.50 diopter

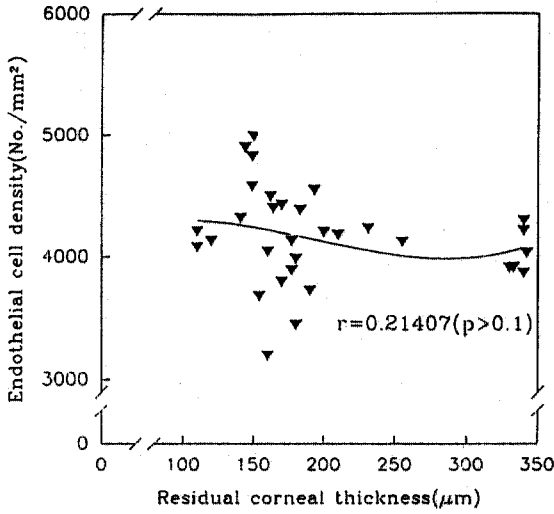


Fig. 4. Scattergram displays endothelial cell density by different residual corneal thickness ($p>0.1$).

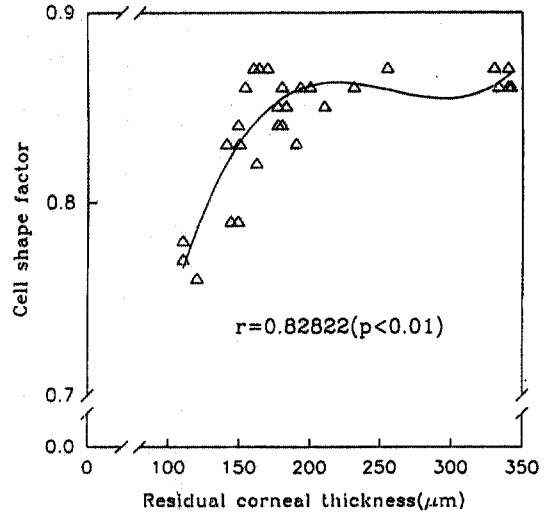


Fig. 6. Scattergram displays endothelial cell shape factor by different residual corneal thickness ($p<0.01$).

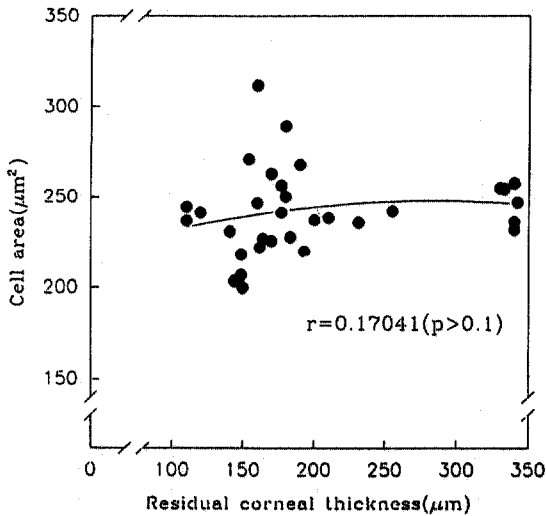


Fig. 5. Scattergram displays endothelial cell area by different residual corneal thickness ($p>0.1$).

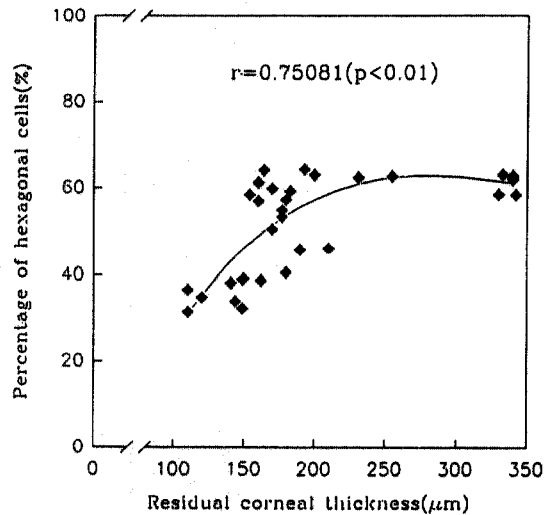


Fig. 7. Scattergram displays percentage of hexagonal cell by different residual corneal thickness ($p>0.01$).

의 굴절이상을 가진 20명을 대상으로 PRK를 시행한 후 1년간 각막내피세포를 관찰한 결과 세포밀도, CV는 수술전과 별 변화가 없었다고 보고하였다¹⁷. Cennamo 등은 115명의 환자를 대상으로 -5.00~-17.00 diopter 의 범위에서 PRK를 시행한 결과

세포밀도와 pleomorphic index에 의미있는 변화가 없었다고 보고하였고¹⁸, Carones 등¹⁹과 Perez-santonja 등³도 최고 -13.50 diopter까지의 근시안에 PRK를 시행한 결과 역시 각막내피세포의 저명한 변화를 발견할 수 없었다고 발표하였다.

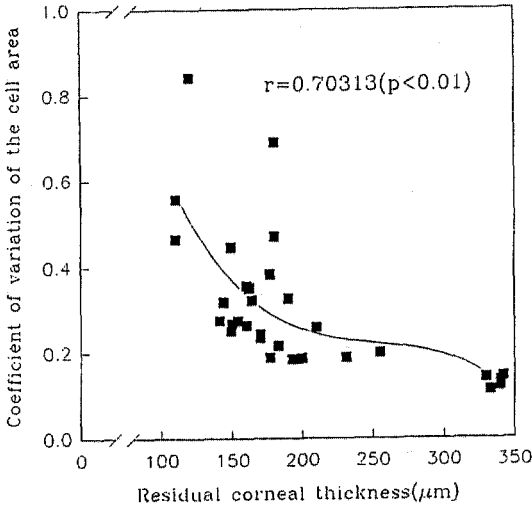


Fig. 8. Scattergram displays coefficient of variation of the cell area by different residual corneal thickness ($p < 0.01$)

엑시머레이저가 각막내피세포층에 얼마나 가까이 갈때 손상이 있는가를 보고한 몇몇 레를 보면 Marshall 등은 193nm 엑시머레이저를 이용한 각막 절개에서 절개창의 기저부가 Descemet막으로 부터 겨우 40 μ m 이내에 있는 경우에는 각막내피세포의 손상이 있었다고 보고하였고²⁰⁾, Dehm 등은 엑시머레이저를 이용하여 각막전체두께의 90%에 해당되는 깊이의 절개창을 만든 경우, 193nm의 엑시머레이저를 이용한 경우에는 각막내피세포의 손실은 없었으나 세포의 부종은 있었고, 248nm의 엑시머레이저를 이용한 경우에는 각막내피세포의 손실이 있었다고 보고하였으며⁸⁾, Koch 등도 193nm의 엑시머레이저를 이용하여 각막전체두께의 90%에 해당되는 깊이의 절개창을 만든 경우에는 경미한 세포간결합의 변화와 저명한 한개의 세포손상이 있었다고 보고하였다²¹⁾. 이러한 경우에는 모두 PRK방식이 아닌 절개방식에 의한 것으로 엑시머레이저 에너지가 전달되는 전체량이 적어서 각막내피세포의 손상이 적었다고 생각된다.

엑시머레이저 근시교정수술에 의한 각막내피세포 손상의 기전은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았으나 여러가지 주장이 있다. Cennamo 등은 입사전자체와 이것의 산란으로 형성되는 형광은 보다 긴 파

장의 복사선을 만들고, 이는 각막의 심층에 보다 잘 흡수되며 이는 내피세포에 손상을 줄 수 있다고 하였고¹⁸⁾, Olson 등은 극히 짧은 펄스에너지에 의해 음파 또는 충격파가 형성되며 또한 주기적인 펄스는 각막후면부에 공명을 일으키며, 이러한 것들이 각막내피세포에 영향을 끼칠 수 있다고 보고하였다¹⁵⁾. Zabel 등은 음파 또는 충격파에 의해 각막 후면부에 전달되는 압력이 약 100atm이었다고 보고하였고²²⁾, Ozler 등은 고주파 펄스(80Hz)의 엑시머레이저가 각막내피세포와 Descemet막에 손상을 주었다고 보고하였다²³⁾.

본 실험은, 현재 가장 많이 사용되며, 각막내피세포에 가장 안전하다고 생각되어지는 193nm파장의 엑시머레이저를 조사한 후 각막내피세포를 Alizarin red S 용액으로 세포경계부위를 염색하여 computer assisted digitizer와 image analysis program을 이용하여 각막내피세포의 형태학적특성 즉 세포의 밀도, 면적, 변이계수, shape factor, 육각형세포비율 등을 비교분석함으로써 손상정도를 파악하였다. 잔여각막두께가 약 200 μ m이하에서 부터 얇아질수록 세포 면적이 커지거나 세포경계의 불분명, 세포모양의 기형화 등이 심해지고 비록 통계학적 의의는 없었지만 각막내피세포의 밀도와 면적은 잔여두께가 얇아질수록 수치가 다양해지는 경향을 보였는데 이는 그만큼 밀도 및 면적이 고르지 못하다는 것을 의미한다. Shape factor와 육각형세포비율은 잔여각막두께가 200 μ m이하부터는 급격히 감소하였고 세포면적의 변이계수는 증가하였다. 이들 변화는 잔여각막두께가 얇아질수록 많은 변화를 보였는데 이것은 주위조직에 거의 손상을 주지 않는다는 엑시머레이저라 할지라도 반복되는 펄스로 내피세포에 가깝게 조사할때는 각막내피세포에 충분히 손상을 일으킬 수 있다는 것을 보여준다. 그러므로 엑시머레이저 근시교정수술은 잔여 각막두께가 200 μ m이하가 될 때는 각막내피세포에 손상을 줄 수 있다고 생각된다. 그러나 잔여각막두께가 200 μ m이상일 때라도 각막내피세포의 형태에는 변화를 일으키지 않더라도 그 기능에는 손상을 줄 수도 있으므로 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이상으로 보아 엑시머레이저를 이용하여 많은 양의 각막간질을 연마한다면든지 LASIK과 같이 각막간질의 심층부를 절삭해

야 하는 경우에는 각막내피세포손상이 우려되므로
보다 세심한 주의가 필요한 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Gartry DS, Kerr Muir MG, Marshall J : Photorefractive keratectomy with an argon fluoride excimer laser: a clinical study. *Refract Corneal Surg* 7:420-435, 1991.
- 2) Sher NA, Barak M, Daya S : Excimer laser photorefractive keratectomy in high myopia: a multicenter study. *Arch Ophthalmol* 110: 935-943, 1992.
- 3) Perez-Santonja JJ, Mera J, Moreno E, Garacia-Hernandez MR, Zato MA : Short term corneal endothelial changes after PRK. *Refract Corneal Surg* 10(suppl):194-198, 1994.
- 4) Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger RR : A comparative study of corneal incisions induced by diamond and steel knives and two ultraviolet radiations from an excimer laser. *Br J Ophthalmol* 70:482-501, 1986.
- 5) Fantes FE, Hanna KD, Savoldelli, Waring GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M : Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 108:665-675, 1990.
- 6) SunderRaj N, Geiss MJ III, Fantes F : Healing of excimer laser ablated monkey corneas: an immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol* 108:1604-1610, 1990.
- 7) Kim K, Lee J, Edelhauser HF : Corneal epithelial permeability after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci(Suppl)* 35:2014, 1994.
- 8) Dehm EJ, Puliafito CA, Adler CM, Steinert F : Corneal endothelial injury in rabbits following excimer laser ablation at 193nm & 248nm. *Arch Ophthalmol* 104:1364-1368, 1986.
- 9) Werblin TP : Lamellar refractive surgery: where have we been and where are we going? *Refract Corneal Surg* 5:167-178, 1989.
- 10) Seiler T, Wollensak J : Myopic photorefractive keratectomy with the excimer laser. *Ophthalmology* 98:1156-1163, 1991.
- 11) Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, Menasche M : Corneal stromal wound healing in rabbits after 193nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 107:895-901, 1989.
- 12) Waring GO III, Lynn MJ, Culbertson W : Three-year results of the Prospective Evaluation of Radial Keratotomy(PERK) study. *Ophthalmology* 94:1339-1354, 1987.
- 13) Gartry DS, Kerr-Muir MG, Marshall J : Excimer laser photorefractive keratectomy. 18 month follow-up. *Ophthalmology* 99:1209-1215, 1992.
- 14) Brancato R, Tavola A, Carones F : Excimer laser photorefractive keratectomy for myopia: results in 1165 eyes. *Refract Corneal Surg* 9: 95-104, 1993.
- 15) Olson LE, Marshall J, Rice NSC, Andrews R : Effects of ultrasound on the corneal endothelium. I. The Acute Lesion. *Br J Ophthalmol* 62:134-145, 1978.
- 16) Mishima S : Clinical investigations on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 93:1-9, 1982.
- 17) Amano S, Shimizu S : Corneal endothelial changes after eximer laser photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol* 116:692-694, 1993.
- 18) Cennamo G, Rosa N, Guida E, Prete AD, Sebastiani A : Evaluation of corneal thickness and endothelial cells before and after excimer laser photorefractive keratectomy. *Refract Corneal Surg* 10:137-141, 1994.
- 19) Carones F, Brancato R, Venturi E, Morico A : The corneal endothelium after myopic excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 112:920-924, 1994.
- 20) Marshall J, Trokel S, Rothery S, Schubert H : An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193nm. *Ophthalmology* 92:749-758, 1985.
- 21) Koch JW, Lang GK, Naumann GOH : Endothelial reaction to perforating and non-perforating excimer laser excision in rabbit. *Refract Corneal Surg* 7:214-222, 1991.
- 22) Zabel R, Tuft S, Marshall J : Excimer laser photorefractive keratectomy: Endothelial mor-

phology following area ablation of the cornea.
Invest Ophthalmol Vis Sci 29:390-402, 1988.

23) Ozler SA, Liaw LL, Neev J, Raney D, Berns

MW : *Acute ultrastructural changes of cornea*
after excimer laser ablation. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:540-546, 1992.