대한안과학회지 2008년 제 49 권 제 9 호
J Korean Ophthalmol Soc 2008;49(9):1515-1524
DOI : 10.3341/jkos.2008.49.9.1515

가토에서 버테포르핀을 이용한 각막신생혈관의 광역학치료시 재치료의 효과

전은정[1] · 노영정[2] · 김영훈[1] · 정성근[2]

가톨릭대학교 의과대학 성바오로병원 안과학교실[1], 가톨릭대학교 의과대학 성모병원 안과학교실[2]

목적: 버테포르핀을 이용한 광역학치료를 각막신생혈관치료에 적용하여 재치료의 효과와 안전성을 알아보고자 하였다.
대상과 방법: 가토 24마리(48안)에 대해 각막신생혈관을 유도하여 4마리는 치료 전에 조직을 관찰하였으며, 10마리에서 버테포르핀을 주사한 후 한 쪽 안은 대조군, 다른 한 쪽 안에 50 J/cm^{2}의 레이저를 신생혈관 부위에 조사하였다. 나머지 10마리에서는 버테포르핀을 주사한 후 먼저 양안 모두에 150 J/cm^{2}을 신생혈관 부위에 직접 조사하고, 한 쪽 안에 대해서만 1주 경과 후에 150 J/cm^{2}을 다시 조사하였다. 1주, 2주째에 신생혈관의 면적변화와 조직학적 소견을 관찰하였다.
결과: 신생혈관의 면적은 150 J/cm^{2}로 1주 간격으로 재치료 한 군에서 가장 많이 감소하였으며, 한 번 치료한 군과 비교시에도 유의한 감소를 보였다(P=0.040). 광학현미경 소견에서는 각막기질 내의 신생혈관이 재치료한 군에서 가장 감소하였다. 전자현미경 소견에서는 혈전의 생성, 혈관내피세포의 파괴, 핵분절(nuclear fragmentation) 및 일부 혈관벽이 소실된 양상을 보였다.
결론: 버테포르핀을 이용한 각막신생혈관의 광역학 치료시에 재치료가 안전하며, 다른 군에 비해 더 유의한 신생혈관 감소 효과를 보였다.
〈대한안과학회지 2008;49(9):1515-1524〉

신생혈관은 맥락막 뿐 아니라 각막에도 생기는데, 장기간의 연성 콘택트렌즈 착용, 감염, 면역질환, 퇴행성 질환 등에서 각막신생혈관이 발생하고,[1] 일반 안과환자의 4.1%가 이 질환을 가지고 있다고 한다.[2] 각막신생혈관은 기질부종, 지질침착, 각막염, 혼탁 등을 동반하여 시력을 저하시킬 수 있음[3]은 물론이고, 각막이식 시에도 거부반응을 일으키게 하는 요인으로 작용할 수 있다.[4] 이러한 이유로 각막신생혈관형성의 억제[5,6]에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 이미 형성된 각막신생혈관에 대해서는 약물치료와,[7-9] 레이저광응고술[10] 등이 시도되었으나 약물치료는 효과가 적거나 장기간 사용 시 부작용이 있을 수 있으며 또한, 레이저광응고술은 광응고술 부위의 주위각막조직에 열손상을 일으킬 가능성이 있어 안전하지 못하다.

〈접수일 : 2007년 10월 11일, 심사통과일 : 2008년 5월 20일〉

통신저자 : 정 성 근
서울 영등포구 여의도동 62
가톨릭대학교 성모병원 안과
Tel: 02-3779-1243, Fax: 02-761-6869
E-mail: eyedoc@catholic.ac.kr

광역학요법은 원래 종양의 치료에 이용하다가 최근에 신생혈관 등의 치료에 그 적응증을 확대하고 있는데 정상조직에는 영향을 주지 않고, 병변이 있는 부위만 치료하는 특징을 가지고 있다. 광역학치료에 쓰이는 광감작물질은 지금까지 여러 가지가 개발되었는데 1세대 광감작물질로는 hematoporphyrin derivative (HPD)와 purified hematoporphyrin derivative인 photofrin이 이용되었고, 그 후 개발된 2세대 광감작물질에는 phthalocyanine, tin-ethyl etiopurpurine과 버테포르핀(verteporfin) 등이 있다.[11,12]

버테포르핀은 유일하게 미국 식품의약국(FDA)에서 공인된 광감작물질이다. 버테포르핀을 정맥 내에 주사하면, 혈청 내에서 내인성 저밀도 지방단백질(low density lipoprotein, LDL)과 결합한 후에 저밀도 지방단백질 수용체(LDL receptor)가 많이 분포하는 종양과 신생혈관의 내피세포에 선택적으로 결합하여, 레이저 조사 후 singlet oxygen과 free radical이 발생하는데 이것이 신생혈관에 혈전증을 유발해 결국 신생혈관의 폐쇄를 일으킨다.[13,14] 안과에서는 황반하 맥락막신생혈관의 치료에 버테포르핀을 이용한 광역학치료가 이용되고 있는데,[15,16] 6 mg/m^{2}의 용량을 30

ml 주사액에 희석하여 10분간에 걸쳐 정맥 내 주입한 후, 15분 시점에서 비열성레이저 689 nm로 600 mW/cm^{2}를 83초간 병변 부위에 조사하여 50 J/cm^{2}이 되도록 하여 약물을 광활성화시킨다.[14,17] 이렇게 치료한 맥락막 신생혈관은 이전보다 신생혈관의 누출크기는 줄어들지만 재누출로 인하여 주기적인 재치료가 필요한 경우가 많다. 이러한 이유로 최근의 연구 결과에서는 전체 전형적 맥락막신생혈관 병변이 있는 대상안의 경우에서 첫 1년간 평균 3.4회의 치료를 시행하였다고 한다.[18]

각막신생혈관에도 버테포르핀을 이용한 광역학치료가 연구되고 있는데, 실험동물을 이용한 각막신생혈관에서 광역학치료의 효과에 대한 문헌보고와[19,20] 사람의 경우 신생혈관에 동반된 각막혼탁정도가 아주 심한, 제한적인 경우에서 광역학치료의 효과에 대한 증례보고가[21-23] 있었으나, 각 예에서 서로 다른 레이저 지표를 사용하고 있는 등, 실제로 각막신생혈관의 광역학치료에 대한 레이저 지표는 아직까지 확립되지 않았다. 따라서 각막신생혈관에 대한 광역학 치료의 지표와 이에 따른 안전성을 확인하는 것이 중요할 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 가토 각막에 신생혈관을 유도하여, 임의로 군을 분류하여 맥락막신생혈관에 이용되는 에너지 지표와 동일하게 치료하고, 다른 군에 대해서는 에너지 지표를 달리하여 치료해 보기로 하였다. 또한, 맥락막신생혈관의 재치료 효과를 각막에도 적용하여 각막에 대해 재치료를 하게 될 경우 어떤 효과가 있으며, 재치료가 신생혈관외의 다른 각막 조직에 대해서 안전한가를 확인하고자 하였다. 따라서 동일한 개체에 대해 한쪽 눈에는 1회만 치료하고, 반대쪽 눈에는 같은 에너지로 일주일 간격으로 2회 치료를 하여 경과관찰을 하였으며, 치료 후에는 현미경을 이용하여 각막신생혈관 부위를 관찰하고, 1주 및 2주째에 일정 배율로 사진을 찍어 면적변화를 분석하고, 시기별로 안구를 적출하여 광학현미경 및 전자현미경을 통해 조직을 관찰하였다.

대상과 방법

실험동물

본 연구에 대해 본원 동물실험위원회의 사전 승인을 받았으며, 모든 생체 실험 과정은 안과학 및 시기능 연구에서의 동물사용에 대한 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 규정을 준수하였다. 가토(New Zealand white rabbit, 2~2.5 kg, Samtako, O San, Kyung Gi, Korea) 24마리를 사용하였으며, 모든 가토에 대해 시술 전 각막이상 여부를 조사하여 정상임을 확인하였다.

각막신생혈관의 유도

마취는 tiletamine, zolazepam의 혼합제인 Volatile® (Virbac, Carros, France)을 0.2 mg/kg 용량으로 근주하여 전신마취를 하고, 국소적으로는 proparacaine (Alcaine®, Alcon, Fort Worth, TX, U.S.A.)으로 점안마취를 하였다. 가토 24마리(48안)에 7-0 black silk (Sofsilk®, Syneture, Quebec, Canada)를 사용하여 12시 방향에 각막봉합을 시행하였으며, 이 때 전방이 천공되지 않도록 주의하였다. 각막봉합 후에는 감염이 되지 않도록 ofloxacin (Ocuflox®, Samil, Seoul, Korea) 점안액을 점안하였고, 1주 후 신생혈관이 충분히 형성된 것을 확인한 후 봉합사를 제거하였다. 신생혈관을 유도한 가토 중 유도된 각막 신생혈관의 조직검사 및 실험군의 조직변화와 비교 관찰을 위해 4마리의 가토를 희생시켰으며, 그 중 2마리의 각막조직은 광학현미경 관찰에 이용하고, 나머지는 전자현미경 관찰에 이용하였다.

버테포르핀을 이용한 광역학 치료

20마리 중 임의로 10마리를 선택하여 한쪽 안은 특별한 치료 없이 경과관찰을 하여 대조군으로 이용하고, 반대쪽 안에 대해 0.5 mg/kg의 버테포르핀(Visudyne®, Novartis Ophthalmics AG, Hettingen, Switzerland)을 5% 포도당 용액 4 ml에 희석하여 귀정맥에 3 ml/min의 속도로 80초 동안 주사하였다. 주사하기 시작한 지 15분 시점에서 직경 5 mm의 크기로 신생혈관 범위가 모두 포함되도록 하여 689 nm 파장의 비열성 레이저(OPAL laser®, Coherent Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.)로 600 mW/cm^{2}를 조사하여 50 J/cm^{2}이 되도록 하였다. 나머지 가토 10마리에 대해서는 양 안에 0.5 mg/kg의 버테포르핀 (Visudyne®, Novartis)을 5% 포도당 용액 4 ml에 희석하여 귀정맥에 3 ml/min의 속도로 80초 동안 주사하였고, 주사하기 시작한 지 15분 시점에서 직경 5 mm의 크기로 신생혈관 범위가 모두 포함되도록 하여 689 nm 파장의 비열성 레이저(OPAL laser®, Coherent Inc.)로 600 mW/cm^{2}를 조사하여 150 J/cm^{2}이 되도록 1차 치료하였다. 그리고 1주 경과 후, 이 중 한 쪽 안에 대해서만 위와 동일한 방법으로 버테포르핀을 주입한 후에 150 J/cm^2 에너지로 재치료하였다.

신생혈관 면적의 분석 및 조직학적 관찰

각 실험군의 각막을 치료 전 그리고 치료 후 1주째와

2주째, 현미경(S21 Carl Zeiss, Jena, Germany)에 부착된 카메라(Contax D-7, Stutgart, Germany)를 이용하여 25배의 배율로 사진촬영을 한 후 Axiovision AC (Carl Zeiss imaging system) 소프트웨어 프로그램을 이용하여 신생혈관의 면적을 측정하였다. 면적계산은 치료 전, 후 사진을 비교하여 각막 부분의 신생혈관을 대상으로 하였는데, 치료 전 면적을 1로 하여 감소정도를 상대적으로 계산하여 비교 분석하였다. 치료 후 1주째 사진촬영을 마친 후 조직 변화를 보기 위해 한 쪽 안은 대조군, 반대 쪽 안은 50 J/cm^{2}로 치료한 가토 4마리와, 양안 모두 150 J/cm^{2}로 치료한 가토 2마리를 희생시켰으며, 2주째에 사진촬영을 마친 후 나머지 14마리의 가토로부터 양안을 적출한 후 각막조직을 얻었다. hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경(BX-50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰을 하였고, 전자현미경 관찰을 위해 각막절편을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 완충된 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde에 4시간 전고정하고, 2% osmium tetroxide에 1시간 후 고정하였다. 이어서 탈수 및 포매과정을 거쳐 조직을 ultramicrotome으로 1 μm 두께로 박절편을 작성하고 1% toluidine blue로 염색한 후 관찰하여 광학현미경하에서 신생혈관이 형성된 특정 부위를 정한다음, 이 부위를 다시 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 투과전자현미경(JEM-1200EX, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

통계학적 분석

면적변화에 대한 통계학적 분석은 Mann-Whitney U test (statistical package for social science version 11.0 program)를 이용하였으며, *P*값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

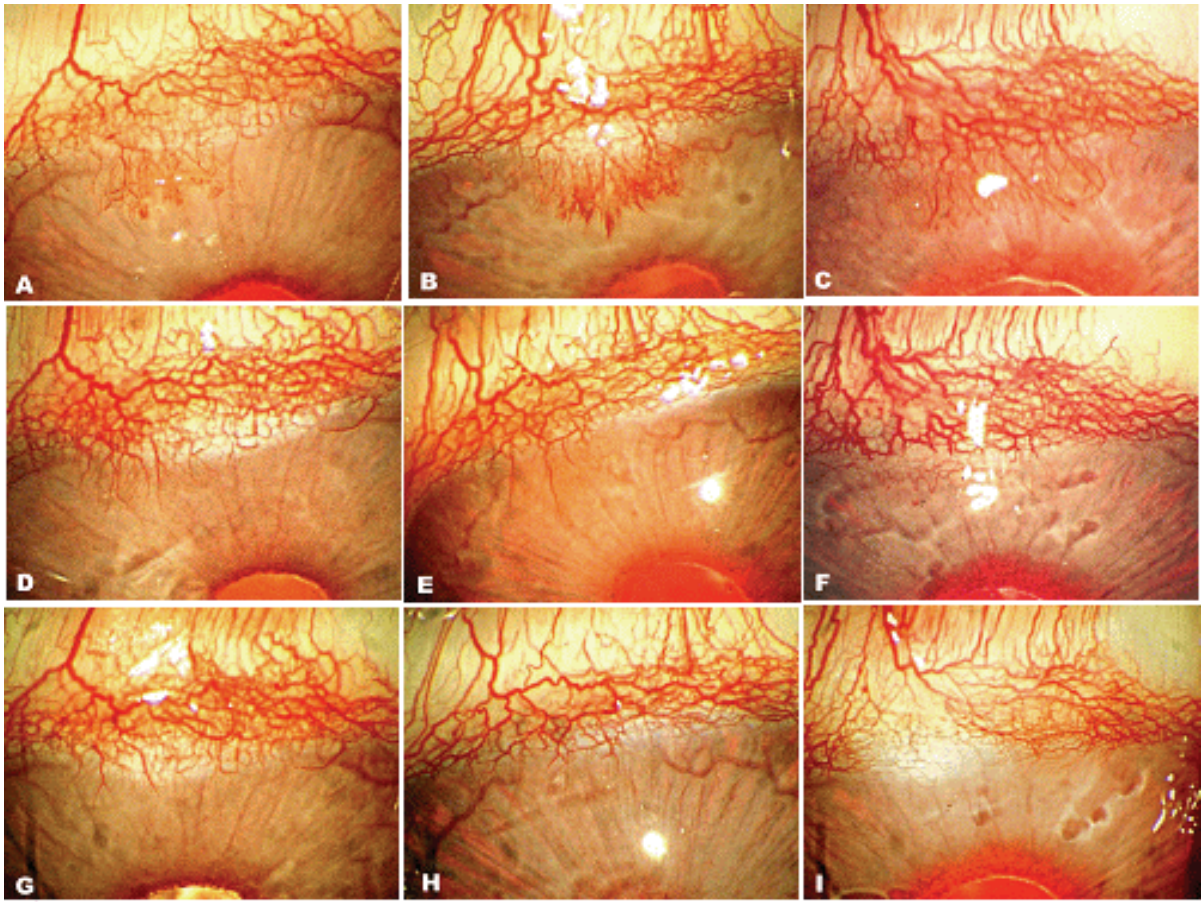

Figure 1. Microscopic examination of the neovascularized area in the cornea after photodynamic therapy (PDT). Initially induced corneal neovascularization was observed before performing PDT (A, B, C). One week after PDT, the neovascularized area of the cornea was smaller in the 150 J/cm^2 group (E, F) than in the 50 J/cm^2 group (D). The same finding was observed in the corneas two weeks after PDT (G, H, I). The neovascularized area was smaller in the 150 J/cm^2 group (H) than in the 50 J/cm^2 group (G), and the smallest level of neovascularization was observed in the retreated group (I).

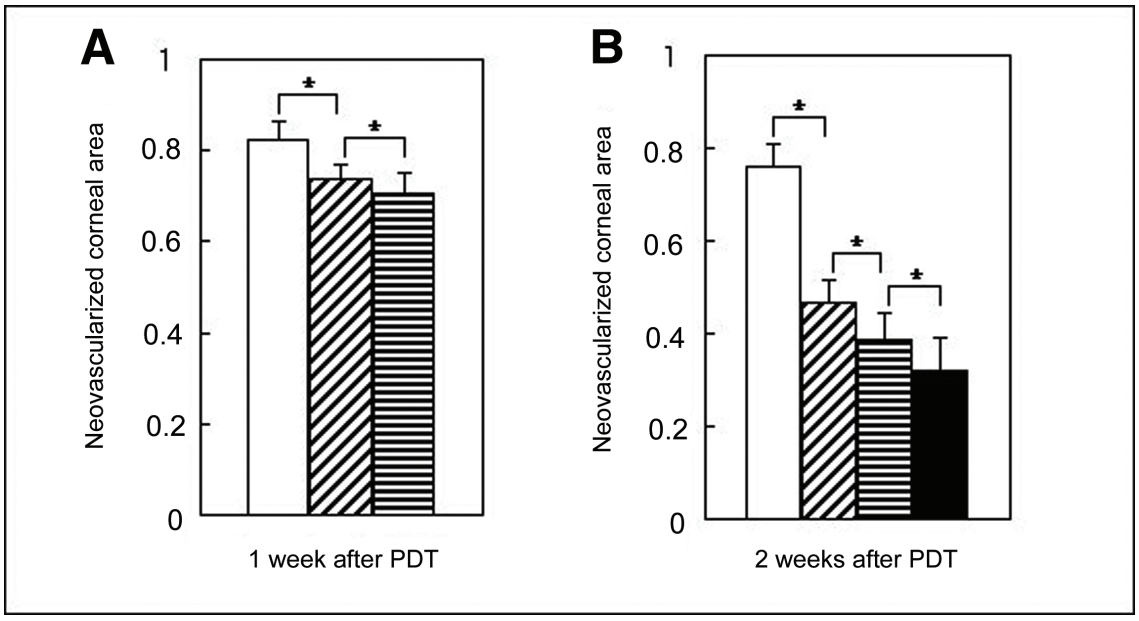

Figure 2. Comparison of the mean neovascular area in each group after PDT. The corneal neovascular area was standardized to the neovascularized corneal area before performing PDT. (A) One week after PDT, the area of neovascularization was significantly lower in the 50 J/cm^2 group (▨) than in the control group (□) and neovascularization was much lower in the 150 J/cm^2 group (▤) than in the 50 J/cm^2 group. B. Two weeks after PDT, the area of neovascularization was significantly decreased by the PDT, and the lowest level was observed in the retreated group (■). (*P<0.05)

결 과

각막신생혈관의 면적 분석

각막봉합을 한 후 각막윤부로부터 신생혈관이 형성되기 시작하여, 1주 후 각막신생혈관이 충분히 형성된 것을 확인한 후 봉합을 제거하였으며, 감염으로 인한 염증은 없었다. 현미경을 이용하여 각막신생혈관부위의 확대사진을 찍어서 광역학치료 전과 치료 후 1주째와 2주째에 각각 비교하여 보았다(Fig. 1). 각 군의 신생혈관 면적은 치료 전의 면적을 1로 하였을 때의 상대적 면적을 수치로 나타내었고, 이를 비교 분석한 결과 광역학치료 1주 경과 후, 150 J/cm^{2}로 치료한 군의 평균면적이 0.705±0.046으로 가장 많이 감소하였고, 50 J/cm^{2}로 치료한 군의 평균면적과 비교 시에도 유의하게 감소하였다(P=0.027). 50 J/cm^{2}로 치료한 군의 평균면적은 0.737±0.034로 대조군의 평균면적 0.822±0.042보다 유의하게 감소하였다(P<0.001). 광역학치료 2주 경과 후, 신생혈관의 면적은 150 J/cm^{2}로 재치료한 군이 0.321±0.068로 가장 많이 감소하였으며, 150 J/cm^{2}로 한 번 치료한 군과 비교 시에도 유의한 감소를 보였다(P=0.040). 또한, 150 J/cm^{2}로 치료한 군의 면적은 0.387±0.058로 50 J/cm^{2}로 치료한 군에 비해 유의하게 감소하였고(P=0.022), 50 J/cm^{2}로 치료한 군에서도 대조군보다 유의한 면적감소가 있었다(P=0.002)(Fig. 2).

광학현미경을 이용한 조직 비교

각 실험군에서 hematoxylin-eosin 염색을 한 각막조직의 광학현미경 소견에서 치료 후 시간이 경과함에 따라 각막기질 내의 신생혈관이 감소하였으며, 150 J/cm^{2}로 치료한 군의 신생혈관이 50 J/cm^{2}로 치료한 군보다 더 감소하였고, 재치료한 군에서 가장 현저한 감소를 보였다(Fig. 3). 그 밖에 각막 상피나 실질, 내피 등에는 특별한 변화가 관찰되지 않았다.

전자현미경으로 본 신생혈관의 파괴 과정

전자현미경 소견으로 각 실험군에서 신생혈관의 퇴화 현상을 관찰할 수 있었다. 각막기질의 신생혈관 내에 혈전이 형성되고, 혈관내피세포의 핵은 염색질이 치밀해지면서 덩어리를 이루어 핵막을 따라 위치하며, 세포에 따라서 더욱 진행되어 핵이 조각나는 핵분절(nuclear fragmentation)현상이 일어나 있기도 하였다. 세포질에 다수의 리소좀(lysosome)이 분포하였고, 공포화(vacuolization)되는 변화를 보였으며, 일부 혈관에서는 혈관내피세포가 파괴되어 혈관벽이 소실

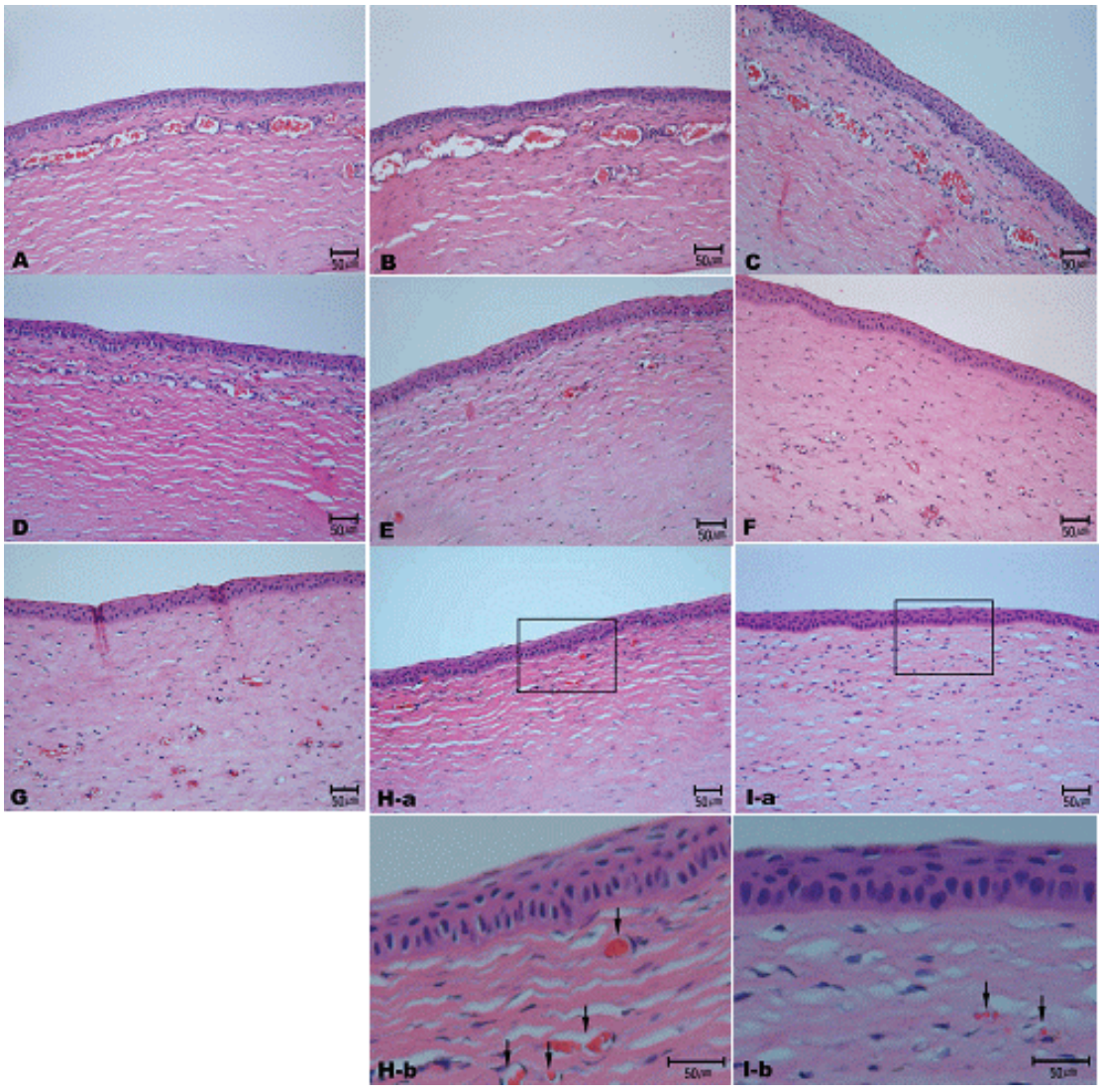

Figure 3. Light microscopic examination of a cornea with hematoxylin-eosin staining. New vessels in the cornea were induced experimentally in each group, followed by PDT. New stromal vessels in the cornea could be seen before performing PDT (A, B, C). One week after PDT, the new vessels of the corneal stroma were more regressed in the 150 J/cm^2 group (E, F) than in the 50 J/cm^2 group (D). The same finding was observed in the 2 -week PDT sections. The new vessels of the corneal stroma were more regressed in the 150 J/cm^2 group (H-a) than in the 50 J/cm^2 group (G), and they were markedly regressed in the retreated group (arrows, I-a, I-b) compared with the 150 J/cm^2 group (arrows, H-a, H-b). H-b and I-b show the magnification view of the boxed area of H-a and I-a, respectively.

된 양상이 관찰되었다(Fig. 4). 신생혈관 외의 다른 각막 부위를 모두 관찰하였으나 재치료를 한 군에서도 특이 소견을 발견할 수는 없었다.

고 찰

각막은 여러 가지 면역학적 특혜(immune privilege)를 가지고 있는데, 그 중 하나가 혈관과 림프관이 없어서 각막이식 시에 다른 기관에 비해 이식거부반응이 적은 것이다.[24] 그러나 각막이 염증이나 감염, 퇴행성 질환, 면역질환, 외상 등의 자극을 받게 되면, 각막에서 fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 같은 혈관형성인자와 angiostatin, endostatin, pigment epithelium derived factor (PEDF) 등의 혈관형성억제인자 간의 균형이 깨지면, matrix metalloproteinases (MMPs) 같은 단백용해효소들의 영향에 의해 혈관형성인자가 자극되어 각막 내에 새로운 혈관이 형성되게 된다.[1,5,6,25]

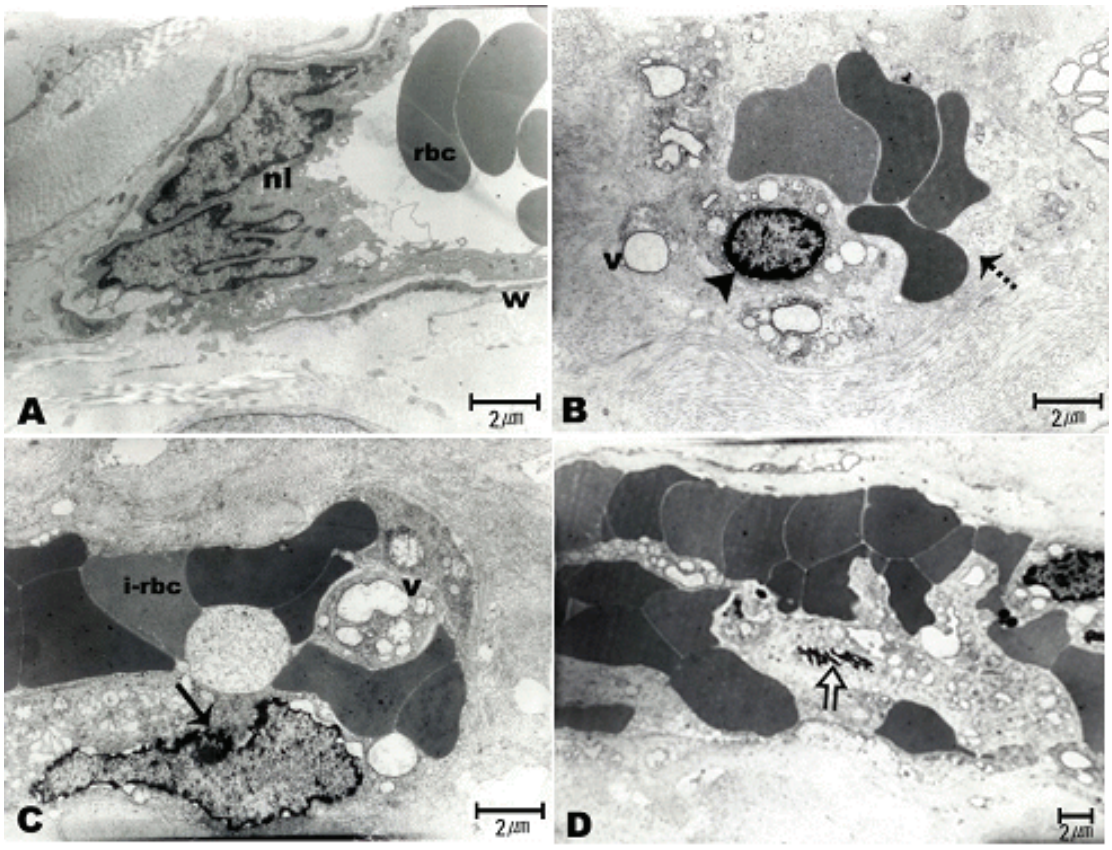

Figure 4. Electron microphotographs showing endothelial cellular changes in the new corneal vessels after PDT. (A) Before performing PDT, new vessels in the corneal stroma with a normal vascular endothelial cell structure (nl), vessel wall lining (w) and discoid red blood cells (rbc) were noted. (B) and (C) One week after PDT, condensed chromatin (arrow head) was observed adjacent to the nuclear envelope and an electron dense clump (arrow) was observed. There was no vessel wall lining (dotted arrow). The cytoplasm was vacuolized (v), and there were irregular red blood cells (i-rbc) suggesting thrombosis. (D) Two weeks after PDT, the nucleus of a vascular endothelial cell was fragmented (open arrow).

각막신생혈관형성을 억제시키기 위한 연구를 살펴보면, Phillips et al[7]은 토끼 각막에 기계적 손상을 입힌 후 prednisolone을 점안하여 신생혈관을 억제시킬 수 있었다고 하였으나, 상처치유를 지연시키고, 장기간 사용 시 안압을 증가시킬 수 있고, 감염을 일으킬 수 있는 위험이 있다고 하였다. 그 밖에도 angiostatin[5]과 PEDF[6] 등을 이용하여 각막신생혈관형성을 억제할 수 있다는 보고가 있으며, 토끼 각막에 신생혈관을 유발한 후에 methotrexate를 점안하여 신생혈관이 퇴화되었다[8]는 보고 등이 있으나, 현재 임상적으로 보편화되어 있지는 않다. 각막신생혈관은 지질침착 및 각막혼탁 등을 초래하여 시력을 저하시킬 수 있으며, 수여각막에 신생혈관이 있을 경우 그 존재의 정도가 이식거부반응의 발생을 좌우할 수가 있다.[4] 따라서 각막신생혈관의 억제 및 치료에 대해 임상에서 일반적으로 사용할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요할 것이다.

광역학치료는 1995년 미국 식품 의약국에서 암치료로 인정되어 현재 폐, 식도, 방광 및 피부암의 치료에 이용되고 있으며 소화기종류의 암에도 적용되어 비교적 좋은 치료결과를 보이고 있다.[26] 각막신생혈관에도 여러 가지 광감작제를 이용하여 다양한 방법으로 광역학치료를 시도한 보고들이 있다. Pallikaris et al[27]은 phthalocyanine을 광감작제로 한 675 nm의 다이오드레이저 치료가 각막신생혈관의 폐쇄에 효과가 있었다고 하였고, Schmidt-Erfurth et al[28]은 benzoporpyrin derivative를 광감작제로 한 692 nm의 아르곤 펌프 레이저치료가 10 J/cm^{2}의 적은 에너지로도 혈관 폐쇄에 효과가 있었다고 하였다. Joussen et al[29]은 광감작제를 polyethylene-glycol이나 amino-erythrosis 같은 고분자와 결합시켜 체내 순환시간을 길게 하여 568 nm의 아르곤/크립톤 레이저로 치료하여 각막신생혈관을 치료하였으며, Primbs et al[12]은 tin-ethyl etiopurpurin을 사용한 664 nm의 다이오드 레이저 치료가 신생혈관에 효과가 있었

다고 보고하였다. 그러나 이들 연구는 실험동물에 제한적으로 행해졌으며, 광감작제의 안전성이 확립되지 않아 인간에게 보편적으로 적용되어 사용되지는 못하였다.

최근 개발된 2세대 광감작제 중 하나인 버테포르핀은 benzoporpyrin derivative monoacid ring A로 유일하게 미국 식품 의약국에서 공인되었고, 그 기전에 대해서는 문헌에 보고된 바[13,14]와 같이 본 연구에서도 전자현미경 관찰을 통하여, 신생혈관내피세포의 파괴, 신생혈관 내의 혈전 형성, 혈관 폐쇄 등 선택적으로 신생혈관에 작용하지만, 신생혈관 외의 다른 각막 부위에는 영향을 미치지 않는 것이 확인되었다. 버테포르핀의 흔한 부작용으로는 시력 저하나 주사부위에 출혈이나 부종, 섬유화, 알러지반응 등이 올 수 있고, 피부에 광과민반응 등이 올 수 있는데,[14] 본 연구에서는 이러한 부작용은 찾아볼 수 없었다.

안과에서는 1999년경부터 맥락막신생혈관에 버테포르핀을 이용한 광역학치료를 적용하려는 시도가 지속되어 왔고,[15,16] 현재 임상에서 황반하맥락막신생혈관에 대해서 이를 이용한 치료가 이루어지고 있다. 그 밖에 맥락막혈관종,[30,31] 맥락막흑색종[32]같은 종양치료에도 적용되고 있고, 최근 신생혈관녹내장[33]이나, 군날개(pterygium)[34]에도 광역학치료를 시도하려는 연구가 계속되고 있다. Holzer et al[19]이 이를 토끼 각막에 시행하는 데 있어서 1.5 mg/kg 용량의 버테포르핀을 정맥 내에 주사한 후 에너지 크기를 17, 50, 150 J/cm^{2}로 각각 달리하여 신생혈관 퇴화정도를 살펴본 결과 각각 30, 50, 56%의 신생혈관감소를 보였고, 150 J/cm^{2}로 치료한 군에서 신생혈관의 재발이 적었다고 하였다. 그러나 토끼 4안에 대한 경과관찰만을 언급하였고, 각 군의 비교에 있어서 통계적 유의성을 검증하지는 못하였다. 한편 이를 사람에 적용하여 증례 보고한 바에 의하면 버테포르핀 용량을 3.64 mg/m^{2}로, 레이저 에너지를 4.5 J/cm^{2}로 하여서 맥락막신생혈관에 대한 치료 지표보다 낮추어서 시행한 보고[22]가 있고, 맥락막신생혈관에 대한 치료 지표와 동일하게 버테포르핀 용량을 6 mg/m^{2}로, 레이저 에너지를 50 J/cm^{2}로 치료하였다고 하는 보고[23]도 있다. 이처럼 치료방법이 각기 다른 이유는 각막에 대한 레이저 지표가 정해져 있지 않고, 재치료를 하게 될 경우에 있어서도 각막에 대한 안전성을 확신할 수가 없기 때문일 것으로 생각된다.

본 연구의 예비 실험에서 1.5 mg/kg 용량의 버테포르핀을 사용 시에 토끼의 각막에 부종이 생겨 회복되지 않았으며, 200 J/cm^2 에너지로 치료하였을 때에도 각막부종과 결막하 출혈이 발생하였다. 어떠한 기전에 의해 각막부종이 발생하는지에 대해 밝혀진 바가 없으나, 신생혈관은 혈관벽에서의 누출(leakage)이 일어날 수 있으므로 그로 인할 가능성을 추측해 볼 수 있겠고, 각막내피세포에 있는 저밀도지방단백질 수용체[35]에 대한 약제의 작용으로 인할 가능성도 전혀 배제할 수는 없을 것이다. 그러나 버테포르핀의 용량이나 레이저 에너지를 과다하게 높이지 않는다면, 이러한 부작용은 드물 것이다. 실제로 버테포르핀의 실험동물모델에 대한 연구에서는 0.25~1 mg/kg 용량을 적용한[14] 것을 참고로 하여, 본 실험에서는 0.5 mg/kg 용량의 버테포르핀을 토끼 정맥 내에 주사하였다. 맥락막신생혈관에 적용되는 동일한 에너지 크기인 50 J/cm^{2}과 맥락막 신생혈관 치료 시에 망막혈관의 폐쇄를 일으키지 않는 최대에너지양(maximal tolerated light dose)인 150 J/cm^{2}을 14, 36, 37 기준으로 하여 에너지 세기를 다르게 하였고, 양안을 150 J/cm^{2}로 치료한 동일 개체의 한 쪽 안에 일주일 후 150 J/cm^{2}로 재치료를 하여, 신생혈관의 퇴화정도를 관찰하였다. 재치료의 시기의 결정에 있어서, 각막신생혈관에 대한 광역학 치료 후 4일 정도는 광과민반응이 일어날 수 있는 시기[14]이고, 일시적으로 나타나는 혈관 울혈이 일주일 정도 지나면 없어지는 것을 고려하여, 일주일 후에 시행하였다. 그 결과, 재치료한 군이 한 번 치료한 군보다 통계적으로 유의한 신생혈관 감소효과를 보였다. Yoon et al[38] 도 토끼 각막에 대해 버테포르핀을 사용한 광역학 치료 결과를 발표하였는데 이에 의하면, 재치료한 군과 한 번 치료한 군의 비교에 있어서 신생혈관감소에 대한 통계적 유의성은 없다고 하여 본 연구결과와 차이를 보였다. 그리고 그들의 실험에서는 재치료한 군과 한 번 치료한 군이 동일 개체에 대한 비교가 아닌 서로 다른 개체 간의 비교라는 점을 고려할 때, 신생혈관의 형성정도나 퇴화정도가 각 개체마다 조금씩은 차이를 보일 수 있으므로, 동일 개체의 양안을 비교하는 것이 더 바람직하다고 할 수 있을 것이다.

각막신생혈관의 광역학 치료시에는 버테포르핀의 용량 결정에 있어서 현재 망막치료에 사용되는 용량이상을 고려할 때는 신중을 기해야 할 것이다. 또한 에너지를 너무 크게 할 경우 또는 신생혈관의 범위가 각막의 절반이상을 차지해 두 부위 이상으로 나누어 치료하여야 하는 경우, 조준하는 레이저 넓이가 서로 겹쳐지는 부분이 생겨서 그 부분에 과다한 에너지가 조사된다면, 정상 각막조직에 손상을 줄 가능성이 있다는 점을 유념하여야 할 것이다. 따라서 각막 신생혈관의 범위가 한 번의 레이저 조사로 가능한 경우에는 150 J/cm^{2}로 치료하는 것이 그보다 낮은 에너지로 치료하는 것에 비해 더 좋은 효과가 있을 것이며, 여러 부위로 나누어서 치료해야만 하는 경우 겹쳐지는 부분에 대한 레이저에너지가 150 J/cm^{2}을 초과하지 않도록 하고, 이런 경우에

는 에너지를 낮추어서 일정한 시간 간격을 두고 재치료를 하는 것이 바람직할 것으로 생각된다. 본 연구에서 일 주 간격의 재치료에도 불구하고 각막신생혈관 외의 다른 각막조직이 안전함을 확인하였으므로 실제로 임상에서 적용 시에 일 주 이상의 간격을 둔다면, 재치료를 시도할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 망막과 달리 각막조직은 투명하기 때문에 각막신생혈관을 치료 시에 신생혈관의 관찰이 용이하여, 재치료의 시기를 일찍 결정할 수 있는데, 이런 경우에는 재치료를 빨리 하여도 안전하고 효과가 있을 것으로 생각된다. 각막에 대한 광역학요법에 있어서 재치료가 한 번의 광역학 치료로 끝나는 경우보다 추가적인 신생혈관감소의 효과가 있었으며 본 실험에서는 치료 후에 신생혈관이 재발하지는 않았으나, 이에 대한 지속적 연구 및 장기적인 경과관찰이 필요할 것으로 보인다. 그러나 본 실험의 결과를 참고로 하여 1회 치료만으로 각막의 신생혈관 감소 효과가 적게 나타나는 경우에 있어서 재치료를 통하여 그보다 나은 치료효과를 가져올 수 있으리라 생각된다.

결론적으로, 버테포르핀을 이용한 각막신생혈관의 치료 시에 한 번 치료하는 경우보다 재치료가 신생혈관 감소효과가 유의하게 좋았고 또한 안전하였으므로 향후 각막에 대한 레이저 지표 결정에 도움을 줄 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로, 각막신생혈관에 대한 광역학치료가 실제로 임상에서 보편화 된다면 감염, 화학적 손상 등의 원인으로 인한 각막염의 상처회복 과정에서 신생혈관을 억제하고, 각막이식에 대한 이식생존률을 높여서[39] 임상에서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1) Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. Curr Opin Ophthalmol 2001;12:242-9.
2) Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. Surv Ophthalmol 1998;43:245-69.
3) Peyman GA, Kazi AA, Riazi-Esfahani M, et al. The effect of combinations of flubiprofen, low molecular weight heparin, and doxycycline on the inhibition of corneal neovascularization. Cornea 2006;25:582-5.
4) Thompson RW Jr, Price Mo, Bowers PJ, Price FW Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. Ophthalmology 2003;110:1396-1402.
5) Ambati BK, Joussen AM, Ambati J, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. Arch Ophthalmol 2002;120:1063-8.
6) Shao C, Sima J, Zhang SX, et al. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:1758-62.
7) Phillips K, Arffa R, Cintron C, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. Arch Ophthalmol 1983;101:640-3.
8) Joussen AM, Kruse FE, Volcker HE, Kirchhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1999;237:920-7.
9) Murata M, Shimizu S, Houriuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2006;244:205-9.
10) Mendelsohn AD, Lo GG, Stock EL, Schneck GL. Laser photocoagulation of feeder vessels in lipid keratopathy. Ophthalmic Surg 1986;17:502-8.
11) Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. Photochem Photobiol 1991;54:1093-1107.
12) Primbs GB, Casey R, Wamser K, et al. Photodynamic therapy for corneal neovascualrization. Ophthalmic Surg Lasers 1998;29:832-8.
13) Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Neovascular (Exudative) age-related macular degeneration. In : Ryan SJ, Retina, 4th. ed. St Louis, London, Philadelphia, Toronto, Sydney: Mosby, Inc., 2005: v. 2. chap. 61.
14) Scott LJ, Goa KL. Verteporfin. Drug Aging 2000;16:139-46.
15) Miller JW, Schmidt-Erfurth U, Sickenberg M, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a single treatment in a phase 1 and 2 study. Arch Ophthalmol 1999;117:1161-73.
16) Harding S. Photodynamic therapy in the treatment subfoveal choroidal neovascularization. Eye 2001;15:407-12.
17) Verteporfin in photodynamic therapy study group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia with verteporfin 1-year results of a randomized clinical trial-VIP report no.1. Ophthalmology 2001;108:841-52.
18) Blumenkranz MS, Bressler NM, Bressler SB, et al. Verteporfin therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: three-year results of an open-label extension of 2 randomized clinical trials-TAP Report no. 5. Arch Ophthalmol 2002;120:1307-14.
19) Holzer MP, Solomon KD, Vroman DT, et al. Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of corneal neovacularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:2954-8.
20) Nah HJ, Yoon KC, Im WB, et al. Animal study of photodynamic therapy with verteporfin in corneal neovascualrization. J Korean Ophthalmol Soc 2005;46:707-15.
21) Yoon KC, Im SK, Oh HJ, Park YK. Two cases of photodynamic therapy with verteporfin in patients with corneal neovascularization. J Korean Ophthalmol Soc 2006;47:13-8.
22) Brooks BJ, Ambati BK, Marcus DM, Ratanasit A. Photodynamic therapy for corneal neovascularization and lipid degeneration. Br J Ophthalmol 2004;88:840.
23) Fossarello M, Peiretti E, Zucca I, Serra A. Photodynamic therapy of corneal neovascularization with verteporfin. Cornea 2003;22:485-8.

24) Streilein JW. New thoughts on the immunology of corneal transplantation. Eye 2003;17:943-8.
25) Wu PC, Liu CC, Chen CH et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2003;241:63-9.
26) Selvasekar CR, Birbeck N, McMillan T. Review article: Photodynamic therapy and the alimentary tract. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:899-915.
27) Pallikaris IG, Tslimbaris MK, IIiaki OE, et al. Effectiveness of corneal neovascularization photothrombosis using phthalocyanine and a diode laser (675 nm). Lasers Surg Med 1993;13: 197-203.
28) Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Schomacker K, et al. In vivo uptake of liposomal benzoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneal neovascularization. Lasers Surg Med 1995;17:178-88.
29) Joussen AM, Kruse FE, Sinn H, Voelcker HE. Photothrombosis of corneal neovascularization with photosensitizers coupled to macromolecules. Lasers and Light 1998;8:211-9.
30) Porrini G, Giovannini A, Amato G, Ioni A. Photodynamic therapy of circumscribed choroidal haemangioma. Ophthalmology 2003;110:674-80.
31) Singh AD, Kaiser PK, Sears JE, et al. Photodynamic therapy of circumscribed choroidal haemangioma. Br J Ophthalmol 2004;88:1414-8.
32) Barbazetto IA, Lee TC, Rollins IS, et al. Treatment of choroidal melanoma using photodynamic therapy. Am J Ophthalmol 2003;135:898-9.
33) Parodi MB, Iacono P. Photodynamic therapy with verteporfin for anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma. Am J Ophthalmol 2004;138:157-8.
34) Fossarello M, Peiretti E, Zucca I, et al. Photodynamic therapy of pterygium with verteporfin. Cornea 2004;23:330-8.
35) Elner SG, Elner VM, Pavilack MA, et al. Human and monkey corneal endothelium expression of low-density lipoprotein receptors. Am J Ophthalmol 1991;111:84-91.
36) Schmidt-Erfurth U, Miller JW, Sickenberg M, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a retreatments in a phase 1 and 2 study. Arch Ophthalmol 1999;117:1177-87.
37) Sickenberg M, Schmidt-Erfurth U, Miller JW, et al. A preliminary study of photodynamic therapy using verteporfin for choroidal neovascularization in pathologic myopia, ocular histoplasmosis syndrome, angioid streaks, and idiopathic causes. Arch Ophthalmol 2000;118:327-36.
38) Yoon KC, Ahn KY, Lee SE, et al. Experimental inhibition of corneal neovascularization by photodynamic therapy with verteporfin. Curr Eye Res 2006;31:215-24.
39) Corrent G, Roussel TJ, Tseng SC, Watson BD. Promotion of graft survival by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization. Arch Ophthalmol 1989;107:1501-6.

=ABSTRACT=

The Effect of Photodynamic Therapy with Verteporfin Retreatment on Corneal Neovascularization in Rabbits

Eun Jung Jun, M.D.[1], Young Jung Rho, M.D.[2], Yeong Hoon Kim, M.D.[1], Sung Kun Chung, M.D.[2]

Department of Ophthalmology, St. Paul's Hospital[1], The Catholic University of Korea, Seoul, Korea
Department of Ophthalmology, St. Mary's Hospital[2], The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: This study evaluated the effect and safety of photodynamic therapy (PDT) with verteporfin retreatment on patients with corneal neovascularization.

Methods: Corneal neovascularization was induced with a silk suture of the corneal stroma in 24 white rabbits (48 eyes). Four rabbits were examined histologically before performing PDT. Ten rabbits were chosen randomly, one eye from each rabbit was treated with PDT at 50 J/cm^2, and the other eye was used as a control. Both eyes of the remaining 10 rabbits were treated with PDT at 150 J/cm^2. One week later, one eye was further retreated with PDT at the same intensity. The area of corneal neovascularization was measured and evaluated histologically using light and electron microscopies.

Results: The least neovascularized area was observed in the retreated group (P=0.04). The histologic examination revealed fewer new corneal vessels in the retreated group, but the corneal epithelium, stroma, and endothelium showed a normal appearance. Results from electron microscopic examination demonstrated thrombi as well as destruction and nuclear fragmentation of the vascular endothelial cells. However, there were no other changes in the cornea except for vascular endothelial cells, even in the retreated group.

Conclusions: In conclusion, these results suggest that PDT with verteporfin retreatment appears to be safe and significantly more effective in patients with regression of corneal neovascularization.
J Korean Ophthalmol Soc 2008;49(9):1515-1524

Key Words: Cornea, Neovascularization, Photodynamic therapy (PDT), Retreatment, Verteporfin

Address reprint requests to **Sung Kun Chung, M.D.**
Department of Ophthalmology, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea
#62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-713, Korea
Tel: 82-2-3779-1243, Fax: 82-2-761-6869, E-mail: eyedoc@catholic.ac.kr