

가토 사체 보관 온도 및 안구 적출 시간에 따른 각막내피세포의 변화

김은철¹ · 이경택² · 김만수¹

가톨릭대학교 의과대학 안과 및 시과학교실¹, 이오스 안과²

목적 : 사체 보관 온도와 안구 적출 시간에 따른 가토 각막내피세포의 변화를 알아보고자 하였다.

대상과 방법 : 가토 8마리(16안)를 처사 후 -3°C 와 실온에서 10시간과 24시간 경과 후 안구를 적출하였다. 1군은 -3°C 10시간, 2군은 실온 10시간, 3군은 -3°C 24시간, 4군은 실온 24시간으로 나누었다. 각막절편을 Optisol-GS[®] (Chiron, U.S.A.)에 담근 뒤 4°C 에서 보관하고 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후에 경면현미경으로 각막내피세포 수와 각막두께를 측정하였다.

결과 : 적출 직후 각막내피세포 밀도와 각막 두께는 각 군 간에 유의한 차이는 없었다. 1군과 3군은 14일까지, 2군은 10일까지, 4군은 7일까지 각막이식에 적합한 각막내피세포 수(세포밀도) 2500 cells/mm^2 가 관찰되었다. 각막 보존 후 1일에서 7일 사이와 7일에서 14일 사이의 각막내피세포 밀도 감소는 -3°C 보관군에서 실온 보관군보다 유의하게 적었다($P<0.05$).

결론 : 가토에서 -3°C 로 사체를 보관하면 사 후 24시간 이내 안구를 적출해도 보존액에 2주 동안 각막을 보존할 수 있고, 안구 적출 시간보다는 사체 보관 온도가 각막내피세포 생존에 더 중요하게 작용한다.

〈한안지 49(2):309-318, 2008〉

각막은 상피세포, 보우만막, 기질, 데스메막, 내피세포로 이루어져 있으며, 각막의 투명도에 가장 큰 역할을 하는 것은 내피세포이다. 단층으로 이루어진 각막내피세포는 투과성 장벽으로서 친수성의 기질내로 물 또는 용질의 이동을 제한한다. 그러므로 내피세포가 잘 유지되어야 내피의 장벽도 기능을 잘하게 되고 각막의 투명도도 유지할 수 있다. 용액과 용질이 계속 기질로 들어가기 때문에 각막두께와 투명도의 유지는 간질내로 들어간 용액을 각막내피가 펌프기능을 통해 활발하게 제거하는데 달려있다.¹

각막이식에 필요한 안구는 사 후에 적출이 이루어지므로 이러한 각막내피세포의 기능은 사 후 시간이 경과하면서 다른 세포들과 마찬가지로 기능이 저하되기 때문에 사망과 안구 적출 후 각막 보존 사이의 간격은 짧

을수록 좋고, 사 후 상태는 사체의 온도를 0°C 정도까지 낮춤으로써 각막내피세포의 대사적 요구를 줄일 뿐 아니라 각막 상피를 통한 세균의 증식도 낮출 수 있다.²

안과 의사들은 각막이식에 적합한 사 후 안구 적출까지의 시간을 지금까지 6시간까지로 알고 있었다. 그러나 실험적으로 언제까지 안구 적출을 해야 이식 후 각막내피세포의 생존에 영향을 미치는지에 관하여 연구된 바가 없었다. 또한 영안실에 사체가 보관되어 있는 경우와 실온에 보관되어 있는 경우 각각 사 후 언제까지 안구 적출을 해야 하는지와 각막절편을 각막 보존액(Optisol-GS[®])에 보관한 후 언제까지 각막이식을 해야 하는지에 대해서도 정확한 연구 결과가 없는 실정이다.

본 실험은 가토에서 사 후 -3°C (영안실 온도)와 실온에서 각각 10시간, 24시간 경과한 다음 안구를 적출하고 분리한 각막 조직을 각막 보존액에 담가 4°C 에서 보관 후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일에 경면현미경(Specular microscopy)(Konan Co, Japan)을 통하여 각막내피세포의 수, 다형성, 다면성과 각막 두께를 측정하였다. 또 안구 적출 후와 각막 보존 후 시간이 경과함에 따른 각막내피의 기능 변화를 비교하여 각막이식에 적합한 사체 보관 온도와 안구 적출 시간과 각막 보존 시간을 알아보고자 하였다.

〈접수일 : 2007년 9월 7일, 심사통과일 : 2007년 12월 4일〉

통신저자 : 김 만 수

서울시 서초구 반포동 505

가톨릭대학교 강남성모병원 안과

Tel: 02-590-1382, Fax: 02-599-7405

E-mail: mskim@catholic.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제96회 추계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

대상과 방법

1. 실험동물 치사 후 -3℃와 실온에서 보관 후 안구 적출

가톨릭대학교 의과학원 동물실에서 기른 체중 2~2.5 kg의 흰색 뉴질랜드(New Zealand) 토끼 8마리(16안)를 사용하였다. Ketamine hydrochloride (50 mg/ml) 2.5 cc와 Xylazine hydrochloride (23.32 mg/10 ml) 2.5 cc를 섞은 주사액 5 cc를 토끼의 대퇴부에 주사하여 토끼를 마취시킨 다음, 귀 정맥에 20~30 cc의 공기를 주입하여 치사시킨 후 크게 두 군(각 군, 4마리)으로 나누어, 한 군은 -3℃에 보관하고 다른 군은 실온(room temperature)에 보관하였다. 각 군 2마리씩 각각 10시간 뒤와 24시간 뒤에 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 각각 4안씩 4개의 군으로 나누었다(1군은 -3℃ 10시간, 2군은 실온 10시간, 3군은 -3℃ 24시간, 4군은 실온 24시간).

적출한 가토 안구를 각막 윤부에서 2 mm 후방에 절개를 가하고 홍채가위로 각막윤부를 따라 절개하여 수정체와 홍채를 각막후면에서 조심스럽게 분리하였다. 분리된 각공막 절편을 Optisol-GS® (Chiron, U.S.A.) 용액에 각막내피세포가 밀을 향하도록 담근 후 각각의 각막에서 경면현미경(Konan Co, Japan)으로 각막내피세포의 수, 다면성(coefficiency of variation, polymegathism), 다형성(hexagonality, pleomorphism) 등을 관찰하고 각막 두께를 측정하였다.

본 논문은 동물실험 원칙인 3R, 즉 replacement, reduction, refinement의 원칙에 따라 실험을 시행하였다.

2. 각막 보존액(Optisol-GS®) 보관 시간에 따른 각막내피세포 검사

Optisol-GS® 용액에 보관된 가토의 각공막 절편을 4℃ 상태에서 보관하고 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후 경면현미경을 통하여 각막내피세포의 수, 다형성, 다면성 등을 측정하였다. Optisol-GS® 용액에 든 각공막 절편을 각막내피세포 쪽에서 촬영할 수 있는 비접촉성 경면현미경을 이용하여 경면현미경에 각막내피세포가 밀로 향하는 방향으로 Optisol-GS® 용액 용기를 올려놓고 각막 중심부에서 측정하였다.

3. 각막 보존액(Optisol-GS®) 보관 시간에 따른 각막 두께 측정

Optisol-GS® 용액에 보관된 가토의 각공막 절편을 4℃ 상태에서 보관하고 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후 각각의 각공막 절편에서 경면현미경을 통하여 각막 두께를 측정하였다. 각막 두께의 측정은 경면현미경에 각막내피세포가 밀로 향하게 Optisol-GS® 용액 용기를 올려놓고 중앙부 각막내피세포까지의 초점거리에서 상피세포까지의 초점거리를 뺀 값으로 3회 반복하여 구하였다.

4. 통계분석

경면현미경 소견 상 각막내피세포 수, 세포면적의 변이계수, 육각형 세포의 비율 및 각막 두께의 변화에 대한 통계적 분석은 반복 측정된 자료의 분산분석법(repeated measured ANOVA)을 이용하였고, 사체 보관 온도와 안구 적출 시간에 따른 각막내피세포의 감소는 이원분산분석법(two way ANOVA)을 이용하여 비교하였으며, P값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 해석하였다.

통계 프로그램은 SPSS 11.5 for Windows를 이용하였다.

결 과

가토 치사 직 후 사체 보관 온도(-3℃, 실온)와 사체 보관 시간(10시간, 24시간)을 달리하여 각막을 적출한 뒤 첫 날 측정된 경면현미경 검사 상 평균 각막내피세포 수는 각각 -3℃ 10시간 군(1군)은 3679.7 ± 224.65 cells/mm², 실온 10시간 군(2군)은 3696.3 ± 88.3^2 cells/mm², -3℃ 24시간 군(3군)은 3725.5 ± 108.24 cells/mm², 실온 24시간 군(4군)은 3690.5 ± 125.41 cells/mm²로 각막내피세포의 수에서 각 군 간의 유의한 차이는 없었다.

각막 두께는 각각 461.5 ± 4.53 μ m, 462.5 ± 7.01 μ m, 485.0 ± 9.92 μ m, 484.0 ± 5.65 μ m으로 3군과 4군이 1군과 2군에 비해 유의하게 두꺼웠다($P < 0.05$). 세포면적의 변이계수는 각 군 간 유의한 차이는 없었으나, 육각형세포의 비율을 말해주는 다형성은 네 군에서 각각 $85.3 \pm 10.03\%$, $76.2 \pm 3.17\%$, $66.5 \pm 4.95\%$, $53.6 \pm 5.54\%$ 로 3군과 4군이 1군과 2군에 비해 육각형 세포의 비율이 유의하게 낮았다($P < 0.05$) (Table 1).

1) 각막내피세포 밀도 변화

보존 기간에 따른 각막내피세포 밀도의 변화를 보면 각막이식에 적합한 각막내피세포의 수인 2500 cells/mm² 이상의 각막 상태가 1군과 3군은 14일까지

Table 1. Characteristics of rabbit corneas on postoperative 1 day

	Group 1 : -3°C (10hr)	Group 2 : room (10hr)	Group 3 : -3°C (24hr)	Group 4 : room (24hr)
Endothelial cell density (cells/mm ²)	3679.7±224.65	3696.3±88.32	3725.5±108.24	3690.5±125.41
Corneal thickness (μm)	461.5±4.53	462.5±7.01	485.0±9.92	484.0±5.65
Coefficient of variation	19.5±1.34	22.5±7.15	20.5±0.72	35.0±2.13
Hexagonality (%)	85.3±10.03	76.2±3.17	66.5±4.95	53.6±5.54

Data represents mean±standard deviation.

The density of corneal endothelial cell and thickness of each four group after enucleation showed no significant difference.

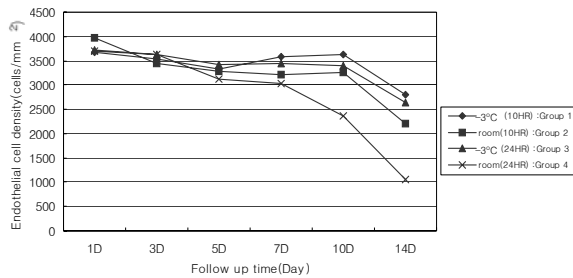


Figure 1. Changes of endothelial cell density according to preservation periods. Endothelial cells over 2500 cells/mm² is maintained upto 2 weeks in Group 1 and 3, but cells under 2500 cells/mm² is observed at 2 weeks in Group 2 and after 10 days in Group 4. During the preservation time, the decrease of endothelial cell density of between groups is statistically significant ($P<0.05$ by repeated measured ANOVA).

지 관찰되었고, 2군에서는 10일까지, 4군에서는 7일까지 관찰되었다. 1일째 관찰한 내피세포를 100%로 보았을 때 7일 후의 각막내피세포는 각각 1군이 96.5%, 2군이 86.3%, 3군이 93.2%, 4군이 80.5%였으며, 14일 후의 각막내피세포는 각각 1군이 71.8%, 2군이 55.7%, 3군이 71.0%, 4군이 23.4%로 점차 감소되었다. 각 시기별 변화량을 repeated measured ANOVA 검사법을 이용하여 검사하였을 때 1군과 3군은 2군과 4군에 비해 보존 기간에 따른 각막내피세포수의 감소 변화가 유의하게 적었다($P<0.05$) (Fig. 1).

각 군에서 1일에서 7일 사이의 각막내피세포 밀도 감소는 454.5 ± 311.53 cells/mm²로 7일에서 14일 사이의 각막내피세포 밀도 감소인 1137.3 ± 578.94 cells/mm²보다 유의하게 적었다($P<0.05$). 이원분산 분석법에 의한 사체 보존 온도와 안구 적출 시간 사이의 교호 작용은 없었다. 사체 보관 온도에 따른 변화를 보면 1일에서 7일 사이의 각막내피세포 밀도 감소와 7일에서 14일 사이의 각막내피세포 밀도 감소는 -3°C 보관군에서 실온 보관군보다 유의하게 적었다

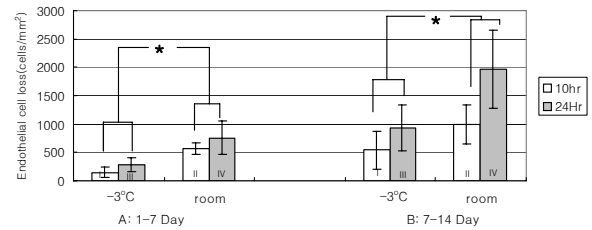


Figure 2. Endothelial cell loss after 7 and 14 days (A: 1-7 Day, B: 7-14 Day). The decrease of endothelial cell density of -3°C groups (group 1 and 3) was significantly less than that of room temperature groups (group 2 and 4) (* $P<0.05$ by two way ANOVA).

($P<0.05$) (Fig. 2). 안구 적출 시간에 따른 변화를 보면 1일에서 7일 사이와 7일에서 14일 사이의 각막내피세포 밀도 감소는 각각 사 후 10시간 지난 다음 적출했을 때가 사 후 24시간 경과 후 적출했을 때보다 적었으나 유의한 차이는 없었다.

2) 각막 두께 변화

안구 적출 직 후의 각막 두께는 4군이 가장 두꺼웠고 3군, 2군, 1군의 순이었으며, 1일째 관찰한 각막 두께를 100%로 보았을 때 7일 후의 두께는 각각 1군이 110.1%, 2군이 114.6%, 3군이 107.5%, 4군이 114.4%였다. 또 14일 후의 두께는 각각 1군이 119.3%, 2군이 121.4%, 3군이 123.8%, 4군이 132.9%로 점차 증가되었으나 각 시기별 변화량을 repeated measured ANOVA로 검사한 결과 각막 보존 기간에 따른 각 군간 각막 두께의 유의한 차이는 없었다 (Fig. 3).

3) 세포 면적의 변이 계수 변화

각막내피세포의 다면성을 나타내는 세포 면적의 변이 계수의 변화를 보면 2군이 1군보다, 4군이 3군보다 각각 변이 계수의 증가폭이 컸으나 통계적으로 유의하지 않았다. 1일째 관찰한 변이 계수를 100%로 보았을 때 7일 후의 변이 계수는 각각 1군이 156.5%, 2군이

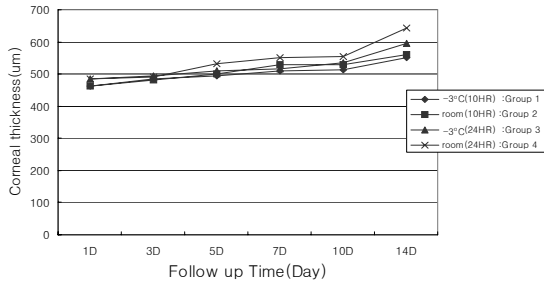


Figure 3. Changes of corneal thickness according to preservation periods. The corneal thickness of each groups is increased during preservation periods, but no significant change is observed between groups (repeated measured ANOVA).

169.7%, 3군이 175.3%, 4군이 131.5%였고, 14일 후의 변이계수는 각각 1군이 205.2%, 2군이 211.6%, 3군이 209.1%, 4군이 207.7%로 점차 증가 되었으나 각 시기별 변화량을 repeated measured ANOVA로 검사해보면 각막 보존 기간에 따른 각 군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 4). 7일째 변이 계수가 5일째보다 약간 호전되는 양상을 보였으나 유의하지는 않았다.

4) 육각형 세포의 비율 변화

각막내피세포의 다형성을 나타내는 역지수, 즉 육각형 세포의 비율(hexagonality)은 각막 적출 직후 측정하였을 때 1군이 가장 높았으며 다음으로 2군, 3군, 4군의 순서였다. 1일째 관찰한 육각형 세포의 비율을 100%로 보았을 때 7일 후는 각각 1군이 79.4%, 2군이 66.3%, 3군이 83.8%, 4군이 87.5%였고, 14일 후는 각각 1군이 40.1%, 2군이 34.3%, 3군이 53.2%, 4군이 45.3%로 점차 감소되었으나 각 시기별 변화량을 repeated measured ANOVA로 검사한 결과 각막 보존 기간에 따른 각 군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

5) 각막내피세포의 형태학적 변화

경면현미경으로 각막내피세포의 형태 변화를 보면 적출 첫날은 네 군 모두 각막내피세포 밀도의 차이는 크게 없었으나 1군과 2군에 비해 3군과 4군에서 육각형 세포의 비율이 적었다. 각막 보존 기간이 경과함에 따라 보존 7일째도 각 군의 각막내피세포 밀도는 큰 차이가 없었다. 1군과 3군은 경면현미경 관찰시 거의 모든 시야에 각막내피세포의 모습이 육각형으로 균일하게 관찰되고 세포의 소실 소견이 적은 반면, 2군과 4군에서는 관찰 시야의 일부에서 각막내피세포의 소실이 동반되는 소견을 보였다. 특히 2군은 3군보다 각막내피세포

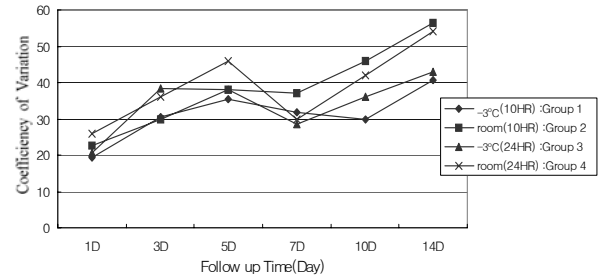


Figure 4. Changes of corneal endothelial polymegathism (coefficient of variation) according to preservation periods. The coefficient of variation of each groups is increased during preservation periods, but no significant change is observed between groups (repeated measured ANOVA).

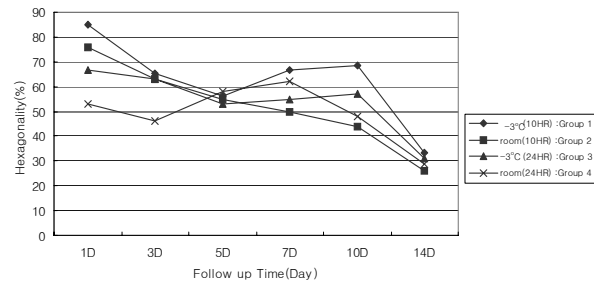


Figure 5. Changes of corneal endothelial pleomorphism (hexagonality) according to preservation periods. The hexagonality of each groups is decreased during preservation periods, but no significant change is observed between groups (repeated measured ANOVA).

포의 소실 부위가 더 광범위하게 나타났으며 평균 각막내피세포 밀도와 육각형 세포의 비율도 낮게 나타났다. 10일째 모든 군에서 경면현미경 관찰 시야의 30% 정도의 각막내피세포 소실이 관찰되었고, 1군과 3군에 비해 2군과 4군에서 각막내피세포 소실의 면적이 더 컸다. 2군에 비해 3군의 세포 소실 범위가 좁았으며 2군에서 정상의 두 배 이상 커진 각막내피세포가 3군보다 많이 관찰되었다. 4군에서 각막내피세포의 소실과 크기 증가 정도가 가장 심했다.

14일째 모든 군에서 경면현미경 관찰 시야의 50% 이상의 각막내피세포 소실이 관찰되었고 1군과 3군에 비해 2군과 4군에서 각막내피세포 소실의 면적이 10일째 보다 더 컸다. 특히 3군에 비해 2군이 각막내피세포의 평균면적이 더 컸으며 경면현미경 상 각막내피세포가 관찰되는 시야도 좁았다. 4군에서는 경면현미경 관찰이 불가능할 정도로 각막내피세포 밀도가 적었으며 세포의 소실이 전 시야에 걸쳐 진행되어 있었다(Fig. 6, 7).

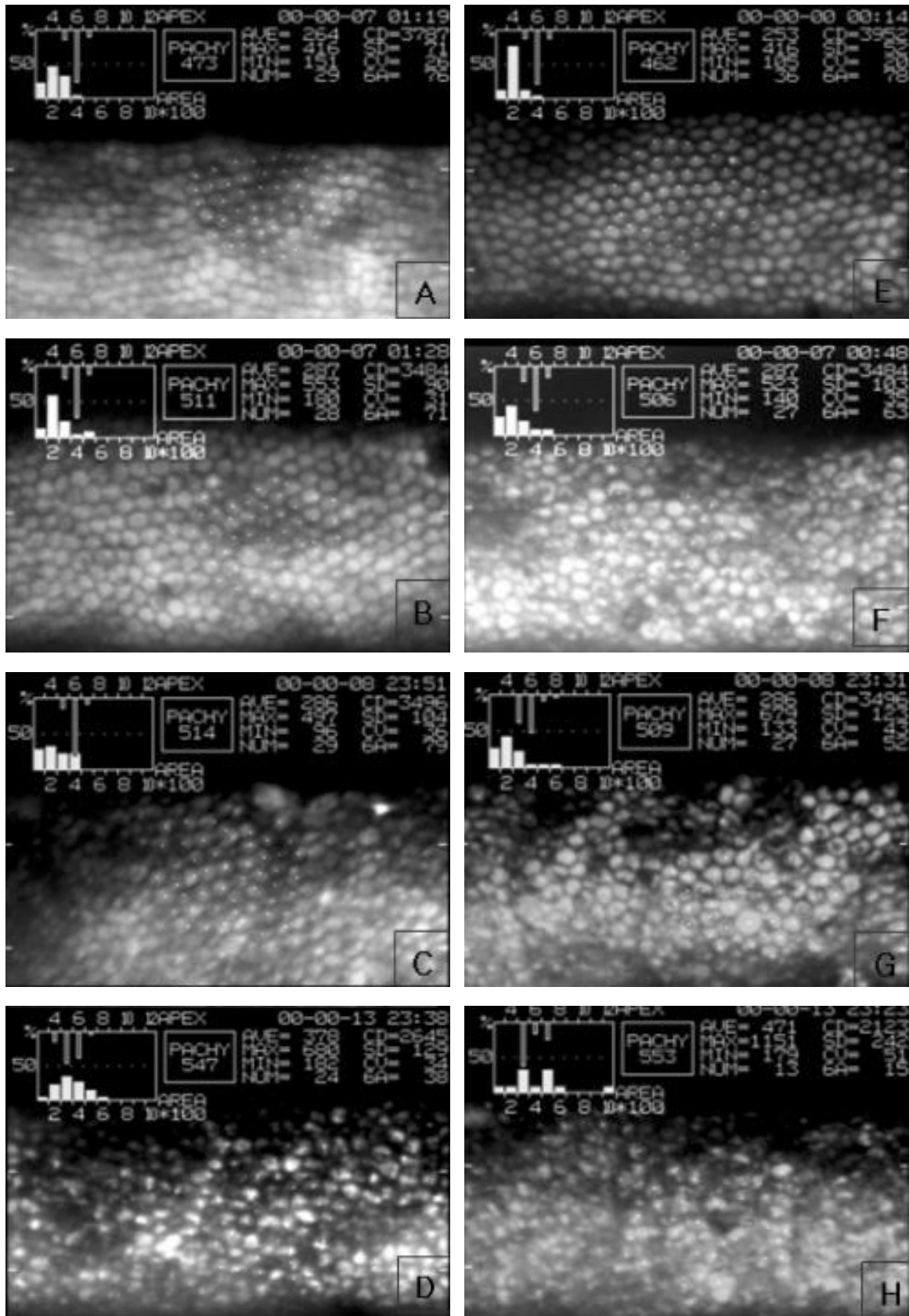


Figure 6. Corneal specular microscopic findings according to preservation periods. (Group 1: A-D ; A-1 Day, B-7 Day, C-10 Day, D-14 Day; Group 2: E-F; E-1 Day, F-7 Day, G-10 Day, H-14 Day)

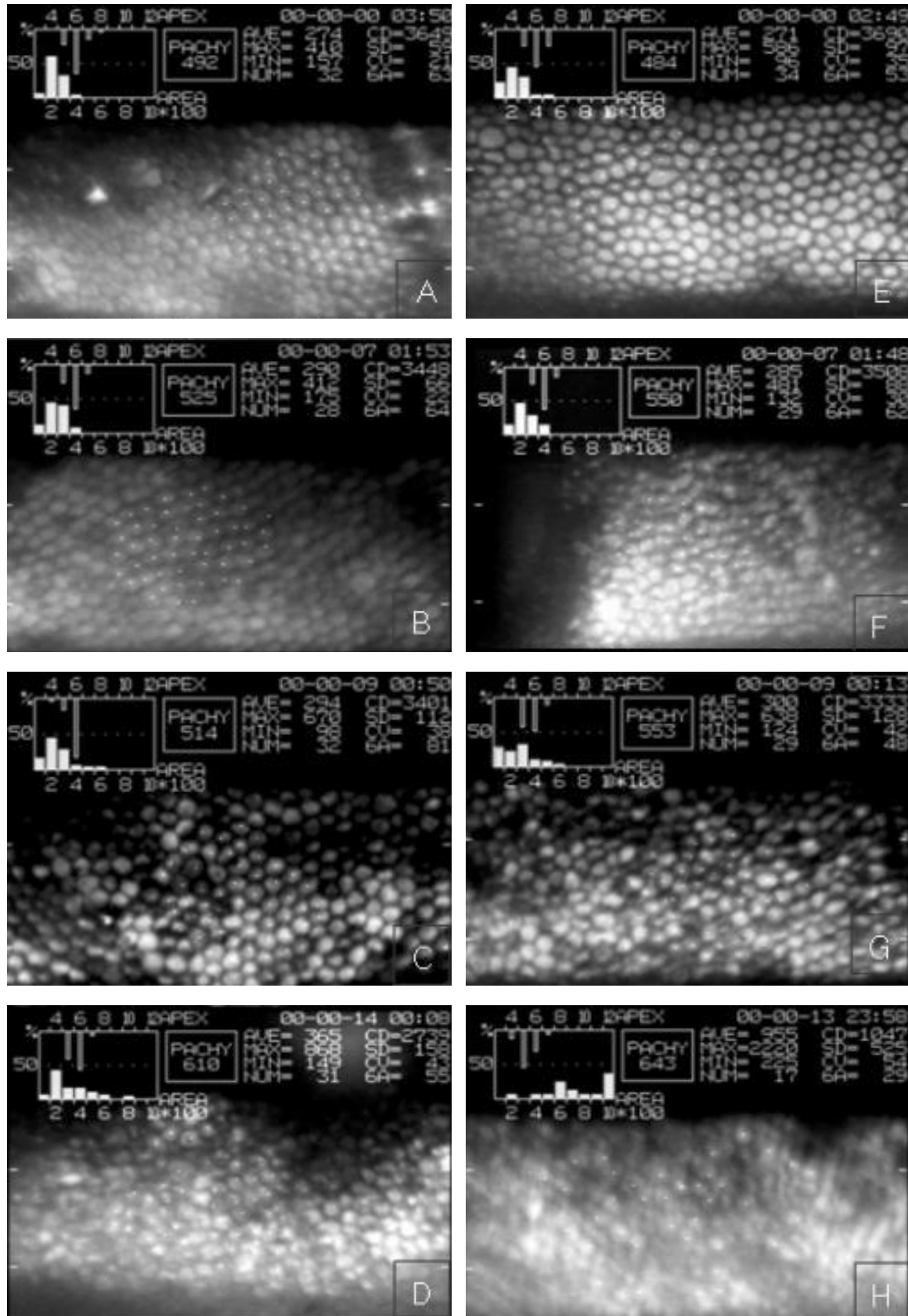


Figure 7. Corneal specular microscopic findings according to preservation periods.(Group 3: A-D; A-1 Day, B-7 Day, C-10 Day, D-14 Day; Group 4: E-F; E-1 Day, F-7 Day, G-10 Day, H-14 Day)

고 찰

이식에 적합한 각막을 얻기 위한 조건으로 지금까지는 사 후 6시간 이내에 안구를 적출하여야 각막이식에 적합한 각막내피세포를 얻을 수 있고, 각막 보존액에 보존할 경우 14일까지 보존하여도 각막이식에 지장이 없다고 대부분의 안과 의사들이 믿어 왔다.²⁻⁷ 그러나 실제로 각막이 각막 보존액에 보존된 상태에서 경면현미경으로 내피세포를 직접 관찰하여 얻은 정확한 자료는 없었다. 이러한 이유로 본 연구는 각막이식에 적합한 각막을 얻기 위한 사체 보관 온도, 안구 적출 시간 및 각막 보존 기간 등의 실험적 근거를 알아보기 위해 시행되었다.

우리나라의 경우 환자의 사 후 안구가 적출 되는 장소는 영안실이나 일반 병실 또는 가정집으로, 영안실의 경우 -3°C 에 보관하고 일반 병실 또는 가정집에서는 실온에서 사체를 보관한다. 따라서 연구자는 본 연구에 앞서 선행연구(pilot study)로 가토 치사 후 사체를 -3°C 와 실온에서 0시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 경과 후 안구를 적출하여 각막절편을 Optisol-GS[®]에 담근 후 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일에 경면현미경으로 각막내피세포 수와 각막 두께를 측정하였다. 가토 치사 전 각막내피세포를 측정하여 각 군의 안구 적출 전 기본 각막내피세포의 초기 정보를 얻는 것이 원칙이나, 치사 전 가토의 각막은 반사가 심하여 경면현미경 측정이 어려워 보존 후 경면현미경 측정치만을 구하였다. 선행연구의 결과는 사후 안구 적출은 24시간까지만 각막내피세포의 관찰이 가능하였으며, 관찰 가능한 군 중 24시간 실온 군은 7일까지, 나머지 군들은 14일까지 각막이식에 적합한 내피세포 수가 밀집되어 있는 것으로 관찰되었다(세포 밀도/2500 cells/mm²).⁷ 보존 기간에 따른 각막내피세포 감소율은 6시간 -3°C 군 이전의 군들에서 6시간 실온 군 이후의 군들보다 유의하게 낮았고, -3°C 군은 실온 군보다 각막내피세포의 감소율이 유의하게 적었다($P<0.05$). 선행연구로서 가토에서 사체는 영안실 온도인 -3°C 에 보관하고, 사후 6시간 이전에 안구를 적출하며, 보존 후 14일까지 각막이식을 해야 적절한 각막내피세포를 얻을 수 있다는 사실이 실험적으로 입증되었다.

본 연구의 관점은 우리나라의 현실(집에서 사망 후 사체를 실온에서 보관, 또는 병원에서 사망 후 영안실에 보관)을 감안하고 사 후 사체가 보관되어 있는 상태를 고려하여 사 후 6시간 이후에도 각막이식에 적합한 각막내피세포를 얻을 수 있는 가능한 안구 적출 시점을 통계적 분석을 통해 알아보는 것이었다.

각막이식에 적합한 안구 적출의 시점은 사 후 6시간 이내라고 알려져 있는데,² Taylor⁸는 사 후 10시간 이내에 안구 적출을 하면 M-K medium에서 4일까지 보존이 가능하다고 발표하였다. 그러나 사체 보관 온도에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 본 연구의 결과 가토에서 -3°C 에 사체가 보관될 경우 24시간이내에만 안구를 적출한다면 Optisol-GS[®]에서 4°C 로 2주간 보존 가능(각막이식에 필요한 각막내피세포 밀도를 유지)하다는 결론을 얻을 수 있었다. 그러나 실온에 방치된 사체는 10시간 실온 군에서는 10일, 24시간 실온 군에서는 7일까지 각막이식에 필요한 각막내피세포 수가 존재하는 것으로 관찰되었다. 또한 각막내피세포의 감소율과 각막내피세포 면적의 변이 계수의 변화도 -3°C 군들이 실온 군들보다 적출 시간에 관계없이 작았다. 또한 선행연구에서 알 수 있었듯이 가토에서 사 후 6시간 이전에 적출된 안구는 사체 보관 온도에 관계없이 Optisol-GS[®]에 4°C 에서 2주간 각막이식에 적합한 각막내피세포가 유지된 것으로 보아 온도에 관계없이 사 후 안구 적출의 가장 적합한 시간은 문헌에서처럼² 6시간으로 생각되며, 만약 가토에서 사체가 -3°C 로 유지된다면 24시간까지 적출하여도 각막이식에 적합한 각막내피세포를 얻을 수 있다고 사료된다.

안구 적출 후 각막이식까지의 보존 방법은 역사적으로 1970년대 초반까지 4°C 에서 whole globes moist chamber법이 이용되었으나,² 사 후 변화된 방수액에 대한 각막내피세포의 노출로 인한 손상으로 단시간 내(48시간 이내) 이식이 이루어져야 한다는 제약이 있었다.² 그 후 보존액을 이용한 각막보존법이 발달되어 M-K media에서 96시간까지 보존이 가능하였고,⁴ 이것은 K-Sol⁵에 의해 대체되어 약 2주간 보존이 가능하게 되었으나 실제로는 약 10일이 지난 경우 각막의 부종이 증가하고 세포의 생동력이 감소되었다. CSM(Corneal Storage Media)⁶이 1982년 미네소타 대학팀에 의해 개발되었으나 각막부종과 각막 실질내의 리소좀(lysosomal) 효소가 많이 나오는 단점으로 인해 광범위하게 사용되지는 못했다. 1989년 이후 Optisol-GS[®]이 개발되어 4°C 에서 약 2주간 각막 보존이 가능하게 되었다.^{7,9,10}

Yang et al¹¹은 가토 각막 적출 직 후 Optisol-GS[®]에 보관한 후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일에 각막내피세포를 전자현미경으로 측정한 결과, 보존 1일부터 육각형 세포가 불규칙한 다각형 모양으로 바뀌고 세포 표면의 미세융모(microvilli)가 소실되었다고 보고하였다. 또 보존 7일에는 불규칙한 세포 표면이 더욱 심화되었고, 보존 14일에는 세포의 크기가 더욱 증가하고 세포 간극 사이에 균열이 나타나서 일부에서는 데스메

막의 표면이 노출되었다고 보고하였다. 이는 현재 사용되고 있는 각막 보존액(Optisol-GS[®])에 각막을 보존하더라도 14일이 지나면 각막이식에 사용되기 어렵다는 등의 논문^{9,10}과 일치 한다. 안구 적출 시간과 보존기간에 관한 연구로는 Baumann 등¹²이 사 후 10시간 이전에 적출하였던 경우 Optisol-GS[®]에서 27일까지 68%이상 세포의 손실이 없는 각막내피세포가 관찰되었으나 형태상으로는 내피세포의 기능을 하지는 않아 보였다고 보고하였으나 사 후 사체 보관 온도에 따른 연구는 보고 한 바가 없었다. 본 연구에서는 사체가 -3℃에 보관되었을 때 사 후 24시간 후 안구 적출을 하여도 Optisol-GS[®]에서 2주까지 각막이식에 적합한 각막내피세포가 관찰되었고, 실온에서 사 후 10시간에 안구 적출을 했을 때는 Optisol-GS[®]에서 10일까지, 실온에서 사 후 24시간에 안구 적출을 했을 때는 Optisol-GS[®]에서 7일까지 각막이식에 적합한 각막내피세포가 관찰되었다. 본 실험에서 1일째 측정된 각막내피세포수를 100%로 동일하게 잡지 않은 이유는 각 군에서 각막이식의 기준이 되는 각막내피세포수인 2500 cells/mm²이하로 각막내피세포의 밀도가 감소하는 시기를 알아보기 위함이었다. 공여 각막의 각막내피세포 수 2500 cells/mm²을 기준으로 잡은 것은 2500 cells/mm²이상일 때 술 후 각막 내피세포의 감소가 적어 공여각막으로서 필요한 내피세포수의 역치를 2500 cells/mm²라 발표한 내용¹³을 토대로 하였다.

각막내피세포의 밀도 감소는 7일에서 14일 사이에서 1일에서 7일 사이보다 유의하게 많았고(P<0.05), 특히 1일에서 7일 사이의 각막내피세포 밀도 감소는 -3℃ 보관 시 실온 보관보다 유의하게 적었다(P<0.05). 따라서 사람에서도 사체를 사망 즉시 영안실에 보관하고 각막 보존 후 7일 내에 각막이식을 실시한다면 술 후 각막내피세포 생존에 더 좋은 결과를 가져올 수 있을 것이라 사료된다. 위의 결과는 사체의 부패정도는 보관 온도가 보관 기간보다 더 큰 영향을 미친다는 사실과 일치한다.^{14,15} 각막내피세포의 다면성은 세포가 파괴되면 파괴된 부분을 보충하기 위해서 세포의 이동이 있으며,^{1,16} 각막내피세포의 특성상 재생이 되지 않고 세포의 크기가 커지므로 나타나는 현상을 보여주는 지표이다.¹⁶ 본 실험에서 가토에서 -3℃군이 실온 군에 비해 세포 면적의 변이 계수의 증가 속도가 느린 것으로 보아 각막내피세포의 손실에 의한 각막내피세포의 다면성의 진행도 사체 보존 온도가 낮을수록 늦어져 각막이식에 적합한 각막내피세포가 오래 유지되는 것으로 생각된다. 본 실험에서 7일째 각 군의 변이 계수가 모두 감소되는 양상을 보이는 것은 당일 측정상의 오류이며 유의한 변화는 아닌 것으로 생각된다.

각막내피세포의 다형성은 세포가 손실되면 세포의 다면성이 증가하면서 초기에는 감소하는 경향이 있다.¹⁷ 각막내피세포는 육각형일 때 가장 안정화된 상태이므로 세포의 크기에 관계없이 항상 육각형을 만들려고 한다.¹⁷ 따라서 각막내피세포가 소실된 초기에는 다면성이 증가하고 다형성은 감소하지만, 세포가 안정화되면서 다형성은 점점 증가한다.¹⁷

보존 직 후 각막내피세포가 커지면서 육각형에서 다각형으로 변화하면서 7일째까지 다면성은 서서히 증가하고 다형성은 감소가 일어난다. 이러한 변화는 -3℃ 군보다 실온 군에서 손실된 면적이 넓어 더 크게 나타났다. 7일 이후부터 10일까지는 세포의 다각형화와 크기의 변화가 더 심화되며 -3℃군보다 실온 군에서 손실된 면적이 훨씬 더 넓게 나타나지만 세포는 각막 보존액 속에서 안정화 상태를 보여 다형성은 다소 증가하는 경향을 보였다. 14일째는 50%이상의 세포 손실이 나타나며 실온 군에서는 정상 기능을 가진 세포는 거의 남아있지 않았다.

이상의 결론으로 가토에서 사 후 안구 적출은 6시간 이내에 하는 것이 좋으며, 최대 안구 적출 가능 시간은 사 후 24시간까지로 여겨진다. 가토에서 사체 보관 온도는 실온보다 -3℃ 정도로 낮게 유지하는 것이 각막내피세포 생존에 좋으며 사 후 10시간에서 24시간까지 안구 적출을 할 때는 안구 적출 시간보다는 사 후 사체 보관 온도가 각막 보존 후 각막내피세포 생존에 더 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지며, 각막 보존 후 1주일 이내에 각막이식을 하는 것이 2주일 이내보다 건강한 각막내피세포를 더 많이 이식할 수 있음을 알 수 있었다.

이 연구의 결과를 사람에 직접적으로 적용시킬 수는 없겠지만, 사 후에 사체를 -3℃ 정도로 낮은 온도로 보관한다면 안구 적출 가능 시간은 연장될 수 있으며, 각막내피세포의 생존에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다. 이는 향후 사람에서 안구 적출 시간과 사체 보존 온도에 대한 연구를 하여 입증할 필요가 있을 것이라 생각된다.

본 연구의 보완점으로는 가토를 치사 즉시 냉장시켜 실험하였으므로 사망 후 냉장시까지의 시간(cadevar time)이 극히 짧아 -3℃군에서의 각막내피세포 생존이 실제보다 더 좋은 결과를 얻을 수 있었을 것이다. 사망 후 냉장시까지의 시간(cadevar time)도 실제 사람의 공여각막에서 중요한데, 실제로 사후에 지연될 가능성이 있는 cadevar time에 따른 각막내피세포의 변화에 대한 연구도 향후 필요할 것이다.

본 연구 결과는 실험동물의 개체 수와 고려하여야 할 요인의 수가 적어 보편적으로 적용될 자료로는 부족하

나, 향 후 더 많은 동물 개체 수와 다양한 요인을 고려하여 사람에서 적용될 자료를 수집하는 연구에 기초 자료로서 크게 소용될 것으로 기대한다.

참고문헌

- 1) Dikstein S, Maurice DM. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972;221:29-41.
- 2) Filatov VP. Transplantation of cornea from preserved cadaver eyes. *Lancet* 1937;1:1395.
- 3) Doughman DJ, Harris JE, Schmitt M. Penetrating keratoplasty using 37°C organ cultured cornea. *Trans Sect Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1976;81:778-93.
- 4) Van Horn DL, Schultz RO, De Bruin J. Endothelial survival in corneal tissue stored in M-K medium. *Am J Ophthalmol* 1975;80:642-7.
- 5) Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S, et al. K-Sol corneal preservation. *Am J Ophthalmol* 1985;100:299-304.
- 6) Lindstrom RL, Doughman DJ, Skelnik DL, et al. Minnesota system corneal preservation, *Br J Ophthalmol* 1986;70:47-54.
- 7) Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990;88:555-648.
- 8) Taylor MJ. Clinical cryobiology of tissues: preservation of corneas. *Cryobiology* 1986;23:323-53.
- 9) Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, et al. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 1992;114:345-56.
- 10) Kim IS, Kim MS. A Comparative Evaluation of 4°C Corneal Preservation Media, Optisol and Likorol. *J Korean Ophthalmol Soc* 1996;37:776-81.
- 11) Yang SW, Oh SJ, Kim KS, et al. Morphologic evaluation of cat corneal endothelium preserved in korean corneal storage medium. *J Korean Ophthalmol Soc* 2000;41:2652-62.
- 12) Baumann G, Fries U, Schnaudigel OE. Viability of corneal endothelium after long-term storage at +4 degrees C in Optisol. *Ophthalmology* 1994;91:624-7.
- 13) Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, et al. The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea*. 2005;24:576-82.
- 14) Oh YH, Lee SW. The change of the permeability of the rabbit corneal endothelium in various storage time. *J Korean Ophthalmol Soc* 1971;12:91-5.
- 15) Hagenah M, Simon B, Bohnke M. Experimental corneal cryopreservation: Impact of postmortem time on corneal endothelial cell survival. *Ophthalmic Res* 1993;25:210-5.
- 16) Waring Go, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium: Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982;92:531-90.
- 17) Green K. Corneal endothelial structure and function under normal and toxic conditions. *Cell Biol Rev* 1991;25:169-207.

=ABSTRACT=

The Changes of Corneal Endothelium in Rabbit according to Storage Temperature and Enucleation Time

Eun Chul Kim, M.D.¹, Kyung Taek Lee, M.D.², Man Soo Kim, M.D.¹

*Department of Ophthalmology and Visual Science, College of Medicine, The Catholic University of Korea¹, Seoul, Korea
EOS Eye Clinic², Seoul, Korea*

Purpose: To evaluate corneal endothelial cell changes in Optisol-GS[®] according to enucleation time at different storage temperatures after death.

Methods: Eight rabbit cadavers (16 eyes) were stored at -3°C and room temperature, and enucleation was performed 10 and 24 hours postmortem. The samples were divided into four groups (Group 1 was -3°C, 10 hours, Group 2 was room temperature, 10 hours, Group 3 was -3°C, 24 hours, and Group 4 was room temperature, 24 hours). The corneas were stored in Optisol-GS[®] at 4°C, and we measured corneal endothelial cell density and thickness by specular microscopy on days 1, 3, 5, 7, 10, and 14 of preservation.

Results: The densities and thicknesses of corneal endothelial cells of each of the four groups after enucleation showed no significant difference. Corneal endothelial cell density acceptable for penetrating keratoplasty ($CD > 2500$ cells/mm²) was found in groups 1 and 3 until 14 days, in group 2 until 10 days, and in group 4 until 7 days. In particular, eyes stored at -3°C had less corneal endothelial cell loss than at room temperature after 7 days and 14 days ($P < 0.05$).

Conclusions: This study demonstrated that when rabbit cadavers were stored at -3°C, corneas could be preserved in Optisol-GS[®] for 14 days, even if the eyeballs from which they were prepared were extracted within 24 hours postmortem. Within 24 hours postmortem, the storing temperature of the cadavers was found to be more important than the enucleation time for the survival of corneal endothelial cells.

J Korean Ophthalmol Soc 49(2):309-318, 2008

Key Words: Cadaver storage temperature, Corneal endothelial change, Enucleation time

Address reprint requests to **Man Soo Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology, Gangnam St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea

#505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

Tel: 82-2-590-1382, Fax: 82-2-599-7405, E-mail: mskim@catholic.ac.kr