

역기하렌즈와 RGP렌즈 착용 후 가토각막에서 상피세포의 이동과 재분포에 관한 고찰

정용진 · 이하범 · 박성표

한림대학교 의과대학 강동성심병원 안과학교실

목적: 역기하렌즈의 착용이 가토각막에서 상피세포의 이동에 의한 재분포를 일으킨다는 가설을 검증해보고자 하였다.

대상과 방법: 가토 30마리 중 15마리의 우안은 RGP (rigid gas permeable)렌즈를, 나머지 15마리의 우안은 역기하렌즈를 착용시키고 좌안을 대조안으로 하여 렌즈 착용 후 1, 3, 7, 10, 14일에 각각 3마리씩 희생하였다. Hematoxylin-Eosin 염색 후 각막의 중심부와 주변부의 상피세포층과 실질의 두께를 측정하였고, 각막상피세포의 이동과 관련된 표지자인 7-nitrobenz-2-ox-1,3-diazolylphalloidin을 이용하여 면역형광염색 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

결과: 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용한 가토안의 각막 중심부와 주변부에서는 일관적인 두께 변화가 관찰되지 않았다. 면역형광염색 결과 역기하렌즈를 착용한 가토안에서 RGP렌즈를 착용한 가토안이나 대조안보다 형광반응이 각막 전체에서 더 뚜렷하게 관찰되었고, 역기하렌즈를 착용한 가토안에서는 3일째, RGP렌즈를 착용한 가토안에서는 7일째 가장 강한 형광을 나타낸 뒤 점차 감소하는 경향이 나타났다.

결론: 이 연구의 동물실험에서 면역형광염색의 결과는 역기하렌즈를 착용하였을 경우 각막상피세포의 이동에 의한 재분포가 실제로 이루어지고 있음을 시사한다.

〈대한안과학회지 2014;55(1):110-118〉

각막굴절교정학(Orthokeratology)은 일시적으로 각막의 형태를 변화시켜 근시와 난시의 정도를 감소시키거나 진행을 조정하는 임상적 방법으로 이의 목적은 굴절 이상 환자로 하여금 안경 등의 광학 보조장치의 도움없이 일상생활을 영위하게 하는데 있다.¹ 1962년 Jessen이 orthofocus라는 방법으로 경성콘택트렌즈를 이용하여 각막을 편평하게 변화시켜 근시를 감소시킨다는 이론이 도입된 이후, 과거의 각막굴절교정학은 각막의 만곡도보다 더 편평한 렌즈를 착용시키는 것에 중점을 두었으나 최근에는 제조공법의 발달로 각막 형태를 신속하게 변화시킬 수 있는 역기하렌즈(RGL, reverse geometry contact lens)를 사용하게 되었으며 RGP (rigid gas permeable)렌즈의 등장과 함께 이의 재질을 이용한 overnight orthokeratology까지 발전하였다. 현재 사용되고 있는 역기하렌즈는 RGP렌즈의 일종이지만 렌즈 중심부 만곡이 각막 중심부 만곡보다 더 편평하고 렌즈 주변부 만곡이 각막의 기본 만곡보다 더 가파르게 제작

되어 착용하였을 경우 일시적으로 각막의 형태를 변화시킨다. 이러한 역기하렌즈는 주로 어린이들을 대상으로 한 근시 교정뿐만 아니라 굴절교정수술 후에 발생한 부정형 난시 환자의 시력향상을 얻기 위해서도 많이 사용되고 있다.

이렇게 각막의 형태를 변화시켜 시력 교정 효과를 얻는 각막굴절교정학을 임상적으로 적용하기 위해서는 렌즈 착용 시 각막의 반응과 상태 변화에 대한 이론적 고찰이 선행되어야 함은 자명한 일이다. 현재까지 사람을 대상으로 한 연구에서 역기하렌즈의 착용이 각막지형도나 시력, 대비감도(contrast sensitivity), 굴절 상태에 미치는 영향에 관한 많은 연구가 있었으며,^{2,3} 역기하렌즈의 시력 교정 효과와 안정성은 여러 논문들에서 효과적인 것으로 발표되었다.⁴⁻⁶

역기하렌즈의 착용에 따른 각막의 변화는, Swarbrick et al⁷은 중심각막두께는 얇아지고 중간주변부각막의 두께는 두꺼워진다고 보고하였다. 이와 달리 Nichols et al⁸은 역기하렌즈의 착용 시 중심각막의 두께는 감소하지만 중간주변부각막에서는 변화가 없다고 보고하였는데, 이들은 중심각막에서 주변부로 각막상피세포의 재분포가 이러한 두께 변화의 차이를 가져오며 굴절변화를 일으키는 주요한 원인이라고 하였다. Nieto-Bona et al⁹은 역기하렌즈 착용 후 중심각막의 상피세포에서 형태와 크기 변화가 나타나지만 각막 실질과 내피세포에는 영향이 없으며 주변부각막의 두께가 증가하는 것을 보고하여, 각막의 상피세포층이 역기하렌

■ Received: 2013. 6. 8. ■ Revised: 2013. 7. 31.
■ Accepted: 2013. 12. 7.
■ Address reprint requests to Sung Pyo Park, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Hallym University Kangdong
Sacred Heart Hospital, #150 Seongan-ro, Gangdong-gu, Seoul
134-701, Korea
Tel: 82-2-2224-2274, Fax: 82-2-470-2088
E-mail: sungpyo@hanafos.com

즈에 의해 유발되는 물리적인 영향을 받는 주요 구조임을 주장하였다. 또한 여러 연구에서 동물실험을 통해 역기하렌즈 착용이 각막상피세포층과 기질, 내피세포층에 미치는 영향을 분석하여 렌즈 착용 후의 각막 두께 변화를 설명하고자 하였다.^{10,11} 그러나 이에 대해서는 확실한 근거가 밝혀져 있지는 않으며 추가적인 연구가 필요한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 역기하렌즈의 착용이 각막 상피세포층과 실질에 일으키는 변화를 조직학적으로 알아보고자 하였다. 역기하렌즈의 착용으로 중심부의 각막상피세포가 주변부로 재분포 된다는 연구 결과에 근거하여 가토안에 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용시킨 후 각막 중심부와 주변부의 상피와 기질의 두께를 실제로 측정하고 면역형광염색을 통해 각막상피세포의 이동에 중요한 근거가 되는 Filamentous actin (F-actin)의 반응을 알아보아 이를 실험적으로 검증해 보고자 하였다.

대상과 방법

1. 실험동물

2-4 kg의 뉴질랜드산 백색 가토 30마리를 암수 구별 없이 구입하여 실온 18 ± 2°C, 습도 60 ± 10%의 조건 하에서 수도물과 일반사료를 공급하면서 사육하였다. 15마리씩 A, B 두 군으로 나누고 A군의 우안에는 역기하렌즈를 착용시키고 나머지 15마리 B군의 우안에는 RGP렌즈를 착용시켰으며 두 군의 좌안은 대조군으로서 렌즈를 착용시키지 않았다. 모든 실험은 본원의 동물윤리위원회의 규정을 준수하였다.

2. 가토의 역기하렌즈와 RGP렌즈의 제작

렌즈제작을 위하여 ketamine chloride와 pentobarbital을 이용하여 가토를 마취한 후 가토안의 제3의 눈꺼풀인 순막(nictitating membrane)을 제거하였다. 그 후 각막지형도 검사와 자동 굴절 검사를 시행하여 측정한 각막곡률치, 편심률(corneal eccentricity)을 바탕으로 역기하렌즈와 RGP렌즈를 제작하였다(Table 1). 역기하렌즈의 기본커브(central base curve)는 정렬커브(alignment curve)보다 +0.75 디옵터 더 편평하게 제작되었다. 렌즈를 착용한 우안에는 하루 3회 항생제와 인공누액을 점안하였다.

3. 각막의 추출 및 Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색 후 각막의 두께 측정

렌즈 착용 1, 3, 7, 10, 14일 후 각군에서 3마리씩 가토를 희생시켜 양안을 적출하고 각막 윤부에서 1.0 mm 후방의 공막 절개를 시행하여 공막을 포함한 각막의 조직표본을 획득하였다. 각막 표본의 중심을 갈라 이등분하여 절반의 조직은 포르말린에 고정하여 H&E 염색을 하였으며, H&E 염색한 조직은 현미경하에서 100 또는 200배 확대하여 각막의 중심부와 중심에서 3.0 mm 떨어진 주변부에서 상피와 실질의 가장 두꺼운 부분의 두께를 격자를 이용하여 측정하였다. 또한 각각의 가토안 사이에 각막 두께의 편차가 존재함을 고려하여 렌즈를 끼지 않은 좌안도 우안과 같은 방법으로 두께를 측정하고 우안과 좌안의 두께의 비를 구하여 시간에 따라 우안의 각막 중심부와 주변부의 상피와 기질의 두께 비율이 어떻게 변하는지 알아보았다.

4. NBD phalloidin을 이용한 면역형광염색

나머지 절반의 조직은 액체질소에 얼린 후 -60°C의 냉장고에 보관하고 NBD phalloidin (7-nitrobenz-2-ox-1,3-diaz-olylphalloidin, Molecular Probes Inc., USA)을 이용한 면역형광염색을 하였다. 면역형광염색을 위하여 절반의 조직 중 일부를 무작위로 채취하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 세척한 후 PBS의 3.7% 포르말린에 실온에서 10 분간 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 이후에 PBS의 0.1% Triton X-100에 3분에서 5분까지 담근 후 다시 PBS로 3회 세척하고 NBD phalloidin을 떨어뜨려 실온에서 20분간 반응하도록 하였으며, PBS로 3회 세척한 후 4°C의 암실에 보관 후, 형광현미경(MRC-1024, BioRad Co., USA)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. 가토각막 두께의 변화

가토를 이용한 동물실험에서 역기하렌즈를 착용한 A군과 RGP렌즈를 착용 시킨 B군에서 1일, 3일, 7일, 10일, 14일에 각각 3마리를 희생시켰다. 희생시킬 당시 우안에 렌즈

Table 1. Characteristics of the reverse geometry lens and the rigid gas permeable lens

	DK value*	DK/L†	Center thickness (mm)	Water absorption (%)	Diameter (mm)
RGP lens	64	64	0.1	<1.10	10.0
RGL	140	70	0.2	4.9	10.0

*Oxygen permeability coefficient (cm/sec) · (mL O₂ / mL · mm Hg) · 10⁻¹¹; †Oxygen transmissibility coefficient (cm/mL O₂) · (sec · mL · mm Hg) · 10⁻⁹.

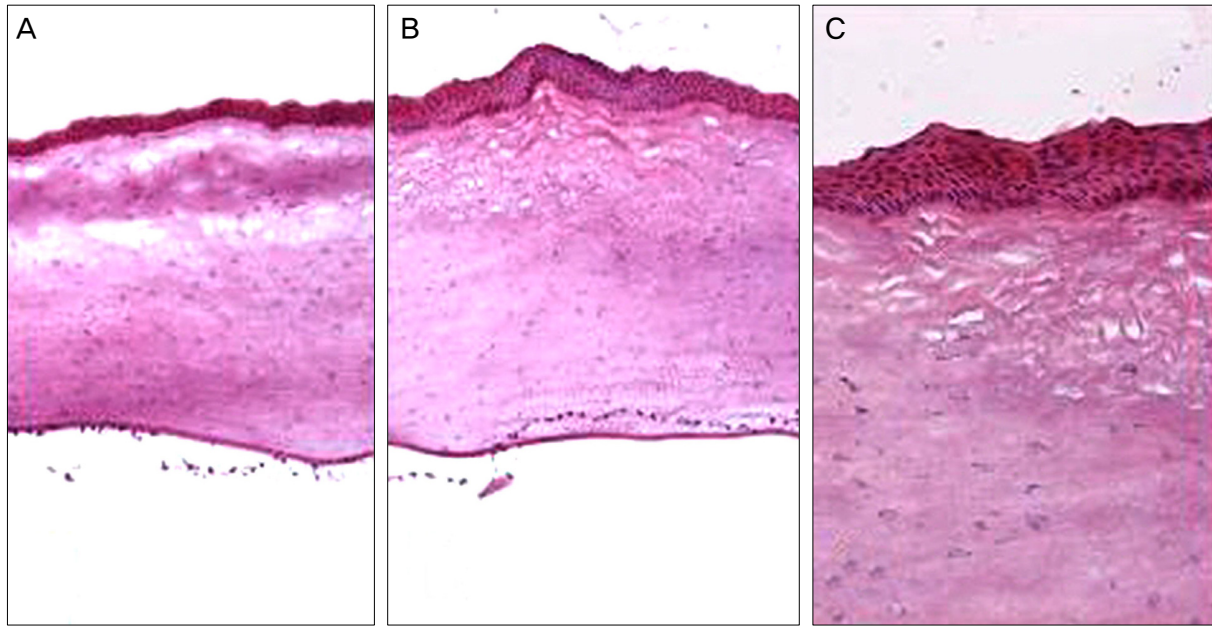


Figure 1. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of the central cornea (A) and peripheral cornea (B, C) in reverse geometry lens-wearing rabbit at 10 days (A, B: $\times 100$; C: $\times 200$).

Table 2. Thickness of epithelium and stroma of central and peripheral cornea fitted with reverse geometry lens

D-N	Right/Left	Thickness (μm)			
		Central epithelium	Peripheral epithelium	Central stroma	Peripheral stroma
1-1	R	27.5	31.5	386	404
	L	30.5	32.0	391	365.5
1-2	R	29.5	46	445	409
	L	36	39	349.5	329
1-3	R	29.5	42	400.5	444
	L	40.5	37.5	350.5	399.5
3-1	R	36.5	41	371	329.5
	L	36.5	37	309.5	342.5
3-2	R	39	19	329	324
	L	35	44	336	362
3-3	R	37.5	43.5	391	381
	L	41	43.5	347	341
7-1	R	29	49	322.5	251
	L	31	43.5	352.5	351
7-2	R	55	42.5	366	358.5
	L	24	37.5	454	426
10-1	R	34	29.5	363.5	353.5
	L	19.5	30.5	402.5	394
10-2	R	25.5	34.5	304	300.5
	L	39.5	23.5	407	308.5
14-2	R	49	36.5	386	322.5
	L	29.5	30.5	334.5	332.5

D-N = the day of sacrifice - the number of rabbit.

가 착용되어있음을 확인하였는데 7일, 10일째 희생된 가토의 A군과 B군에서 우안에 렌즈가 착용되어있지 않은 가토가 각각 1마리씩 발견되어 이들은 실험에서 제외하였다. 희생된 가토에서 안구를 적출하고 윤부를 포함시켜 각막을 적출하여 각막 중심부를 잘라 이등분하였는데, 최대한 조직

에 손상이 가지 않도록 주의하였으며 두께를 측정하기 위한 조직은 최대한의 변형을 줄이기 위하여 신속히 포르말린에 고정한 후 H&E 염색을 하였다(Fig. 1). 그러나 염색이 완료된 조직을 현미경을 이용하여 관찰해본 결과, 각막을 이등분할 때와 조직을 고정하고 염색을 할 당시에 조직

Table 3. Thickness of the epithelium and stroma of the central and peripheral cornea fitted with rigid gas permeable lenses

D-N	Right/Left	Thickness (μm)			
		Central epithelium	Peripheral epithelium	Central stroma	Peripheral stroma
1-1	R	37	34.5	323.5	311.5
	L	37	26	384.5	326.5
3-1	R	41	62	322	336
	L	36	49	332	309
3-2	R	47	47.5	348.5	350.5
	L	46	47	407	348.5
7-1	R	41	50.5	367	394
	L	32	38.5	401	462
7-2	R	34	35.5	507	362
	L	47	45.5	498.5	401.5
7-3	R	30.5	36	296.5	297
	L	34	39	394.5	400.5
14-1	R	51	37	412.5	399
	L	34	31	296	321.5
14-2	R	74	59	424.5	442.5
	L	39.5	37.5	309	329
14-3	R	55.5	28	362	565.5
	L	28	56	408.5	537

D-N = the day of sacrifice - the number of rabbit.

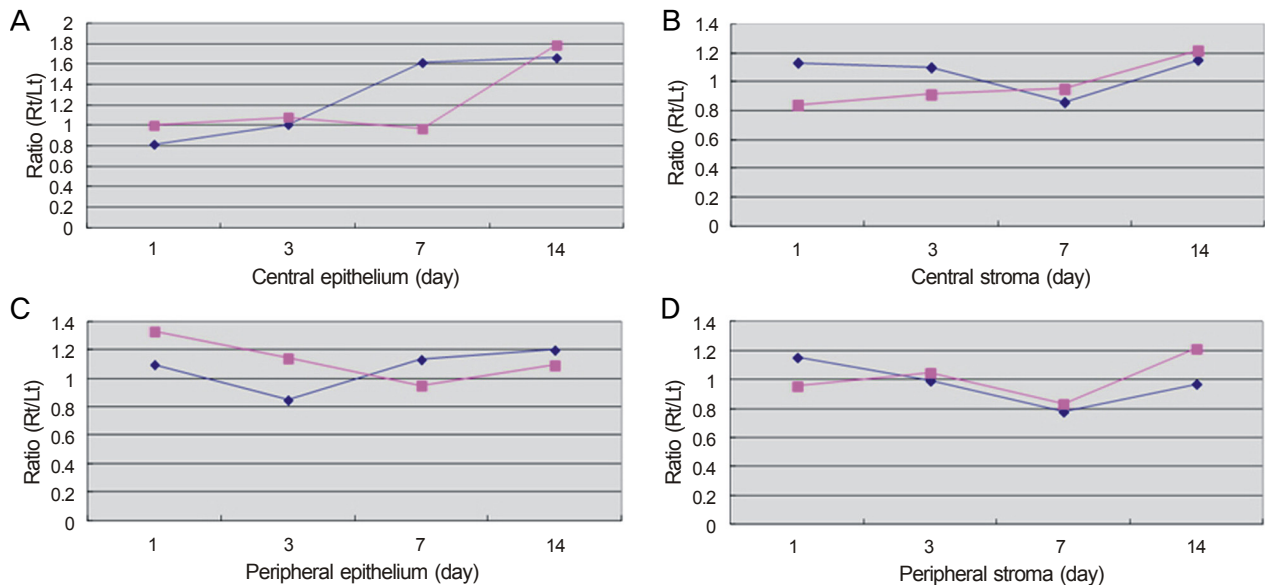


Figure 2. Thickness ratio of each measurement to control in RGL group and RGP group. (A) Central epithelium. (B) Central stroma. (C) Peripheral epithelium. (D) Peripheral stroma.

에 각막찰과상 등의 손상이 가해졌거나 변형이 심한 조직이 있었으며, 정상적으로 각막의 두께를 잴 수 없다고 판단되는 경우 실험대상에서 제외하였다. 또한 동일 가토 양안의 조직에서 한 쪽의 조직이 제외된 경우에는 양안의 비교를 통한 결과를 알아볼 수 없으므로 양안 모두가 제외되었다. 이중 B군에서 10일째 희생된 가토 3마리 모두가 실험대상에서 제외되어 A군의 10일째 희생된 가토도 실험대상에서 제외시켰다. 결과적으로 실험대상이 될 수 있었던 가

토는 A군에서 1일째 3마리, 3일째 3마리, 7일째 2마리, 10일째 0마리, 14일째 1마리였으며, B군에서 1일째 1마리, 3일째 2마리, 7일째 3마리, 10일째 0마리, 14일째 3마리였다(Table 2, 3).

각각의 가토는 각막 두께의 편차가 있음을 고려하여 렌즈를 착용한 우안과 렌즈를 착용하지 않은 좌안의 두께의 비율을 구하였으나, 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용한 가토안의 각막의 중심부와 주변부에서 대조안과의 두께 비율에

일관적인 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 그러나 역기하렌즈를 착용한 각막의 중심부에서는 대조안과 큰 차이를 보이지 않았으나 주변부에서는 중심부에 비해 대조안보다 전반적으로 더 두껍게 측정되었다.

2. Filamentous actin (F-actin)의 형광 분석

NBD phalloidin을 이용한 면역형광염색 후 Filamentous

actin (F-actin)에 대한 양성반응을 측정하여 비교한 결과, 렌즈를 착용하지 않은 좌안에서는 F-actin의 형광반응이 거의 나타나지 않았다. 그러나 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용한 우안에서는 F-actin의 양성반응이 관찰되었으며, 역기하렌즈를 착용한 가토안에서 RGP렌즈를 착용한 가토안보다 강한 양성반응이 나타났고, 특히 3일째 희생시킨 가토안에서 가장 강한 양성반응이 나타난 후, 점차 약화되는 경향을 보였다(Fig. 3).

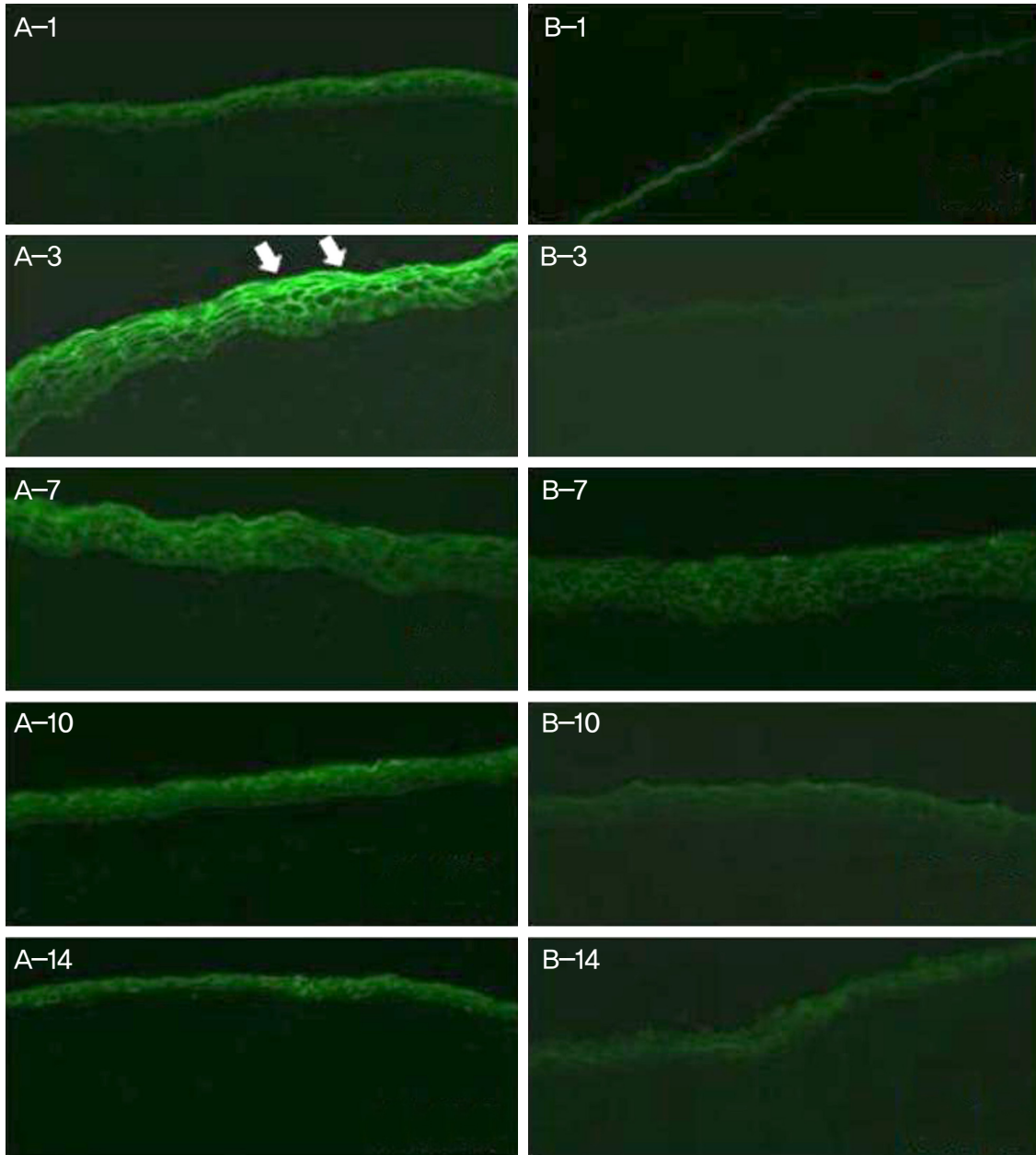


Figure 3. A positive NBD phalloidin fluorescence of the corneal epithelial cells in each group according to the day of sacrifice after lens fitting. The rabbit in group A was fitted with reverse geometry lens (RGL) and the rabbit in group B was fitted with rigid gas permeable lens (RGP). The photographs show marked increase of NBD phalloidin fluorescence in the corneal epithelial cells in the eyes fitted with RGL. The most increased fluorescence is observed in eyes with RGL at day 3 (arrows). A, B = group; Number = the day of sacrifice.

고 찰

역기하렌즈의 지속적인 개선과 발전에도 불구하고 역기하렌즈가 각막의 조직에 어떻게 영향을 미치는지는 잘 알려져 있지 않다. Swarbrick et al⁷은 역기하렌즈를 착용하였을 때 각막의 중심부와 주변부의 두께가 달라져서 각막 표면의 곡률반경이 변하며 근시교정효과가 나타날 것이라고 가정하고, 각막의 상피와 기질부의 두께를 분리하여 측정할 수 있는 Holden-Payor optical microphacometer를 사용하여 이를 측정하였다. 이를 통해 역기하렌즈를 착용한 각막은 각막 중심부는 얇아지고 주변부는 두꺼워지는 것을 관찰하였는데, 이는 중심부의 기질 두께에는 변화가 없으나 상피가 얇아지기 때문이고, 주변부의 경우 상피 두께에는 변화가 없으나 기질의 두께가 두꺼워지기 때문이라고 설명하였으며, 이러한 두께의 변화가 각막 만곡도의 변화보다 굴절 변화의 가장 중요한 원인이라고 발표하였다. Zhong et al¹²도 5년간의 긴 기간 동안 역기하렌즈를 착용한 후 발생하는 각막의 변화에 관한 연구에서 이와 비슷하게 중심각막의 상피세포층이 얇아지고 중간주변부 각막이 두꺼워지는 것을 보고하였고, 중심각막의 상피세포층이 얇아지는 것이 기저세포의 감소와 관련이 있을 수 있다고 발표하였다. 반면 Nichols et al⁸은 역기하렌즈의 착용 시 중심각막의 두께는 감소하지만 변연부의 중앙에서는 변화가 없다고 보고하였으며, 이는 중심 각막에서 주변부로 각막상피세포의 재분포가 굴절변화를 일으키는 원인이라고 하였다. 이 후 여러 연구에서 Nichols et al⁸의 발표를 뒷받침하는 결과를 보고하였는데, Shin et al^{10,11,13}은 가토안을 이용한 동물실험 연구에서 역기하렌즈의 착용이 각막 중간주변부에서 상피세포의 증식률을 높이지 않았다고 하였고 상피세포의 증식률과 탈락 및 고사율(apoptosis rate)에 영향을 미쳐 이에 따른 이차적인 변화로 설명하기도 하였다.

본 연구는 위와 같은 연구 결과를 바탕으로 이를 실제 조직학적 표본을 통해 입증하려 한 것으로서, 조직의 두께를 직접 측정하고, 각막 조직의 이동과 재분포가 일어남을 입증하고자 하였다. 그러나 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용한 가토안의 각막 중심부와 주변부에서 일관적인 두께 변화는 보이지 않았는데 이는 가토를 이용한 조직학적 실험이 실제와는 차이가 있었기 때문으로 생각된다. 실제 역기하렌즈는 수면시간동안 착용하고 낮에는 렌즈를 빼고 활동하지만, 가토를 이용한 실험에서는 렌즈를 처음 착용 시킨 뒤 지속적으로 렌즈를 착용시켰으므로, 이로 인한 각막 부종이 심하게 발생했기 때문이다. 또한 가토의 각막은 사람의 각막보다 직경이 크고, 가파른 곡률반경을 가지게 되므로 각막 형태검사 및 각막곡률반경을 측정하여 이를 바탕으로 렌즈

를 제작하였더라도 렌즈중심이탈이 빈번하게 발생하여 조직을 절단할 당시 렌즈 착용으로 인하여 변형된 각막의 중심부를 정확히 절단할 수 없었다. 마지막으로 절단한 조직을 포르말린에 고정하고 H&E 염색을 하는 과정에서 조직의 변형을 최대한 줄이려고 노력하였으나 많은 조직에 손상이 있어 실제 실험대상에서 제외되었으며, 나머지 정상적인 모습을 보이는 조직들도 조직의 변형이 있을 것이라고 가정할 수 있다. 이와 같은 이유들로 인해 Nichols et al⁸이 발표한 결과를 조직학적인 방법으로 검증하기가 어려웠다.

따라서 본 연구에서는 각막상피세포의 재분포와 관련하여 추가적인 실험적 연구를 진행하였다. Actin은 세포내 골격을 유지하는 중요한 단백질로서 unpolymerized actin (G-actin)과 filamentous actin (F-actin) 두 가지 상태로 존재하며,¹⁴ 세포이동뿐만 아니라 세포내이입, 세포외유출 그리고 세포형태유지에 관여한다.¹⁵ 그 중 각막상피세포의 이동에 있어서 F-actin이 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌으며, 이 때 세포 내 F-actin의 재분포가 일어나게 된다.^{16,17} F-actin을 관찰하기 위해서는 NBD phalloidin (7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazolylphalloidin)을 이용한 면역형광염색법이 필요한데, NBD phalloidin은 Amantia phalloides 버섯에서 추출한 형광 독소로서 F-actin에 특이반응을 보여 그것의 분포형태를 관찰할 수 있으며,¹⁸ Jester and Rodrigues¹⁹는 NBD-phalloidin을 이용하여 F-actin이 정상 각막상피세포에서는 표면상피세포(superficial epithelial cell)와 날개상피세포(wing epithelial cell)에 국소적으로 분포하는 반면 각막열상과 같이 상처 회복(wound healing)이 활발히 일어나는 조직에서는 형광이 매우 증가하는 것으로 보고하였고 이는 전자현미경으로 관찰한 결과와도 일치한다고 하였다. 또한 이들은 정상 각막상피세포에 비하여 이동중인 각막상피세포에서 NBD phalloidin의 형광이 증가됨을 증명하였다. 이에 근거하여 본 연구에서는 가토안에서 각막상피층을 NBD phalloidin으로 면역형광염색한 후 역기하렌즈와 RGP렌즈를 착용시킨 우안과 렌즈를 착용시키지 않은 좌안에서 F-actin이 발현되는 차이를 비교하였다. 그 결과 렌즈를 착용하지 않은 가토의 좌안에서는 표면상피세포에서 국소적으로 약한 형광이 관찰되었지만 RGP렌즈나 역기하 렌즈를 착용한 가토안에서는 각막상피세포 전층에 걸쳐 형광을 나타내었다. RGP렌즈를 착용한 가토안과 역기하렌즈를 착용한 가토안을 비교해 보면, RGP렌즈를 착용한 가토안은 약한 형광을 나타내는데 비해 역기하렌즈를 착용한 가토안에서 전반적으로 훨씬 더 강한 형광이 나타났다. 또한 RGP렌즈를 착용한 가토안은 7일째에 가장 강한 형광을 나타내었고 이후 점차 약화되는 경향을 나타내는 반면 역기하렌즈를 착용한 가토안은 3일째에

가장 강한 형광을 나타낸 후 점차 형광이 약해지는 경향을 보여주었다.

이렇게 역기하렌즈를 착용하였을 경우 NBD phalloidin에 의한 형광이 강하게 관찰된 것은 각막상피세포의 이동에 의한 재분포가 실제로 이루어지고 있음을 시사한다. 역기하렌즈를 착용하였을 때 가장 강한 형광이 나타난 점과 본 연구에서 사용된 RGP렌즈와 역기하렌즈의 산소투과도에 차이가 없었으며 각막 중심부의 물리적 압박 정도에만 차이가 있었다는 점을 감안하면, 역기하렌즈의 물리적인 힘이 각막상피세포의 재분포를 일으키는 가장 중요한 인자임을 유추해볼 수 있다. 또한 역기하렌즈의 경우 3일째에 가장 강한 형광을 나타낸 후 점차 형광이 감소하는 것은 렌즈 착용 초기에 각막상피세포의 재분포가 일어나며 그 이후에는 세포의 이동이 줄어들어 각막이 안정화 상태에 적응되는 것을 시사하는 소견이라 할 수 있다. 이는 실제 임상에서 역기하렌즈 착용 시, 발표된 논문에서 차이가 있으나 초기에 해당되는 1주일에서 1개월 후에 시력 및 구면렌즈 대응치의 주요한 변화를 보인다는 기존 연구결과와도 상응하는 부분이라 할 수 있겠다.^{7,20,21}

앞서 언급했듯이 NBD phalloidin을 이용하여 각막의 창상 치유의 기전과 관련된 물질을 밝힌 연구에서 각막에 인위적인 찰과상 또는 관통상을 가하는 등의 기계적 손상을 주는 경우 F-actin이 다량 발현되면서 각막의 재생피화가 이루어지는 것으로 보고되었다.^{17,19,22} 이는 조직 절편 제작과정에서 손상이 가해졌거나 가토가 역기하렌즈 혹은 RGP렌즈를 착용하면서 각막찰과상이 발생한 경우, NBD phalloidin에 의한 형광이 온전히 역기하렌즈 혹은 RGP렌즈 착용에 의한 것만이 아니라 창상 치유 과정에서 발생한 것도 포함할 가능성이 있음을 나타낸다. 본 연구에서는 조직절편 과정에서 기계적 손상이 많이 가해진 경우나 각막찰과상이 있는 경우 실험대상에서 제외하여 이에 의한 영향을 최소화하고자 하였다. 또한 가토각막의 형태가 비구면이기 때문에 조직표본을 편평하게 하기 위해 네 귀퉁이의 각막에 각각 3 mm 크기의 절개를 가했는데, 이 때 절개를 가한 창상의 가장자리가 우리가 얻고자 하는 표본에서 최대한 떨어지게 하여 창상 치유와 관련된 형광이 발생하지 않도록 주의하였다.

이 연구에서는 NBD phalloidin을 이용한 면역형광염색의 결과를 정량적으로 평가하지 못한 점이 한계점으로 지적될 수 있다. 그리고 면역형광염색을 위한 조직의 채취 과정이 무작위로 이루어져 각막 중심부나 중간주변부 그리고 주변부의 구분이 되지 않아 상피세포 이동의 방향이 중심부에서 주변부로 이루어지는지 알 수 없기 때문에, 각막에서의 위치에 따라 상피세포층의 형광정도를 평가하는 실험

이 필요할 것으로 생각된다. 또한 각막상피세포의 이동이 단순히 각막을 누르는 물리적인 압력에 의해 발생하는 것인지 물리적인 압력에 의해 이차적으로 각막상피세포의 증식률이나 고사율에 영향을 미쳐 세포의 이동과정에서 추진력(driving force)을 발생시키는 등의 어떤 특정한 기전이 관여하는지에 대해서도 연구가 필요할 것으로 생각된다.^{9,11}

한편 빛간섭단층촬영기를 이용할 경우 각막정점(corneal apex)에서부터의 거리에 따라 각막 전체와 각막상피층 및 실질의 두께를 구할 수 있을 뿐만 아니라 상피층의 두께 변화 상태를 정량적으로 측정할 수 있다.^{23,24} 예를 들어 Nieto-Bona et al⁹은 빛간섭단층촬영기를 이용하여 각막중심부와 중간주변부의 상피층과 실질의 두께를 측정하였다. 또한 각막을 정점에서의 거리에 따라 네 영역으로 나누고 각 영역의 사분역 지점에서의 두께의 평균을 그 영역의 각막의 두께로 하여 서로 다른 영역의 두께를 역기하렌즈의 착용시간에 따라 비교하였다. 이들은 중심부의 두께는 착용시간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 보이는 반면 각막정점에서부터 5 mm에서 10 mm 떨어진 영역은 두께가 증가하는 경향이 있음을 밝혀내었다. 본 연구에서도 역기하렌즈 혹은 RGP렌즈를 착용한 후 조직표본을 얻기 전에 각막지형도 검사를 시행하고 빛간섭단층촬영기를 이용하여 각막상피층과 실질의 두께를 측정한 후 조직 표본에서 측정한 두께와 비교 및 상응관계를 통계적으로 분석하였다면 각막상피층의 재분포라는 가설을 검증하는데 도움이 되었으리라 생각된다.

본 연구는 역기하렌즈 착용 후 각막의 해부조직학적 변화를 관찰함으로써 역기하렌즈가 각막상피와 실질에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. 앞서 기술한 한계점에도 불구하고, 이 연구는 NBD phalloidin을 이용하여 F-actin에 대한 반응을 관찰함으로써 실제로 각막상피세포의 이동이 일어남을 확인한 것에 의의가 있다고 할 수 있다. 역기하렌즈를 착용한 가토안에서 RGP렌즈를 착용한 가토안과 대조안에 비하여 형광반응이 더 뚜렷하게 관찰되었고 이는 역기하렌즈 착용 시 각막상피세포의 재분포가 일어나는 것을 뒷받침하는 결과라 생각된다.

REFERENCES

- 1) Swarbrick HA. Orthokeratology review and update. Clin Exp Optom 2006;89:124-43.
- 2) Hiraoka T, Okamoto F, Kaji Y, Oshika T. Optical quality of the cornea after overnight orthokeratology. Cornea 2006;25(10 Suppl 1):S59-63.
- 3) Stillitano I, Schor P, Lipener C, Hoffling-Lima AL. Long-term follow-up of orthokeratology corneal reshaping using wavefront aberrometry and contrast sensitivity. Eye Contact Lens 2008;34:140-5.
- 4) Villa-Collar C, González-Méjome JM, Queirós A, Jorge J. Short-

- term corneal response to corneal refractive therapy for different refractive targets. *Cornea* 2009;28:311-6.
- 5) Barr JT, Rah MJ, Jackson JM, Jones LA. Orthokeratology and corneal refractive therapy: a review and recent findings. *Eye Contact Lens* 2003;29(1 Suppl):S49-53.
- 6) Hiraoka T, Okamoto C, Ishii Y, et al. Time course of changes in ocular higher-order aberrations and contrast sensitivity after overnight orthokeratology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4314-20.
- 7) Swarbrick HA, Wong G, O'leary DJ. Corneal response to orthokeratology. *Optom Vis Sci* 1998;75:791-9.
- 8) Nichols JJ, Marsich MM, Nguyen M, et al. Overnight orthokeratology. *Optom Vis Sci* 2000;77:252-9.
- 9) Nieto-Bona A, González-Mesa A, Nieto-Bona MP, et al. Short-term effects of overnight orthokeratology on corneal cell morphology and corneal thickness. *Cornea* 2011;30:646-54.
- 10) Shin DB, Kim JC, Kim MK, et al. The effect of RGP lens and reverse geometry lens on apoptosis in rabbit cornea. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:1649-61.
- 11) Shin DB, Lee YW, Kim MK, et al. The effect of RGP lens and reverse geometry lens on corneal epithelial proliferation rate in rabbit. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:655-67.
- 12) Zhong X, Chen X, Xie RZ, et al. Differences between overnight and long-term wear of orthokeratology contact lenses in corneal contour, thickness, and cell density. *Cornea* 2009;28:271-9.
- 13) Shin DB, Yang KM, Lee SB, et al. Effect of reverse geometry lens on correction of moderate-degree myopia and cornea. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:1748-56.
- 14) Pollard TD, Aebi U, Cooper JA, et al. Actin structure, polymerization, and gelation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1982;46 Pt 2:513-24.
- 15) Pollard TD. Cytoskeletal functions of cytoplasmic contractile proteins. *J Supramol Struct* 1976;5:317-34.
- 16) Gipson IK, Westcott MJ, Brooksby NG. Effects of cytochalasins B and D and colchicine on migration of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:633-42.
- 17) Anderson RA. Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:161-6.
- 18) Barak LS, Yocum RR, Nothnagel EA, Webb WW. Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:980-4.
- 19) Jester JV, Rodrigues MM. Actin filament localization in normal and migrating rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1984;3:955-60.
- 20) Chang JW, Choi TH, Lee HB. The efficacy and safety of reverse geometry lenses. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:908-12.
- 21) Soni PS, Nguyen TT, Bonanno JA. Overnight orthokeratology: visual and corneal changes. *Eye Contact Lens* 2003;29:137-45.
- 22) Jester JV, Rodrigues MM, Sun TT. Change in epithelial keratin expression during healing of rabbit corneal wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:828-37.
- 23) Feng Y, Varikooty J, Simpson TL. Diurnal variation of corneal and corneal epithelial thickness measured using optical coherence tomography. *Cornea* 2001;20:480-3.
- 24) Wang J, Fonn D, Simpson TL, Jones L. Relation between optical coherence tomography and optical pachymetry measurements of corneal swelling induced by hypoxia. *Am J Ophthalmol* 2002;134:93-8.

=ABSTRACT=

The Effect of RGP Lens and Reverse Geometry Lens on Redistribution of Corneal Epithelial Cell in Rabbit

Yong Jin Jeong, MD, Ha Bum Lee, MD, Sung Pyo Park, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the migration and redistribution of rabbit corneal epithelial cells when wearing reverse geometry lens (RGL) or rigid gas permeable lens (RGP).

Methods: In 30 rabbits, the right eyes were fitted with either RGL or RGP and the left eyes were untreated to serve as controls. The rabbits were sacrificed at 1, 3, 7, 10 and 14 days after lens fitting. The central and peripheral corneal thicknesses were measured by microscope and the ratio of right to left corneal thickness was calculated to evaluate the characteristics of change over time. By using the molecular probe 7-nitrobenz-2-ox-1,3-diazolylphallacidin (NBD phallacidin), the samples were examined with light microscope to determine the migration and redistribution of epithelial cells in the rabbit cornea.

Results: No consistent changes in the thickness of both central and peripheral corneal epithelium were found. The corneal epithelial cells of both eyes with RGL and RGP reacted positively to NBD phallacidin. The fluorescence was most increased at day 3 of sacrifice in RGL cases and at day 7 in RGP cases, and then decreased in both cases. The corneal epithelium of eyes with RGL exhibited marked increase in the intensity of fluorescence compared to the eyes with RGP.

Conclusions: The corneal epithelium with RGL showed the strongest intensity of NBD phallacidin fluorescence. This result suggests that wearing RGL may induce the migration and redistribution of corneal epithelial cells.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(1):110-118

Key Words: Corneal epithelial cell, Redistribution, Reverse geometry lens, 7-nitrobenz-2-ox-1,3-diazolylphallacidin (NBD phallacidin)

Address reprint requests to **Sung Pyo Park, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Hallym University Kangdong Sacred Heart Hospital

#150 Seongan-ro, Gangdong-gu, Seoul 134-701, Korea

Tel: 82-2-2224-2274, Fax: 82-2-470-2088, E-mail: sungpyo@hanafos.com