

## 무보존제 히알루론산나트륨 점안이 각막상피세포에 미치는 장기적 영향

### Long-Term Effect of Preservative-Free Sodium Hyaluronate Eye Drop on Human Corneal Epithelial Cell

이종수<sup>1,2</sup> · 박재성<sup>3</sup> · 김호윤<sup>1</sup>

Jong Soo Lee, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Jae Sung Park, MD<sup>3</sup>, Ho Yun Kim, MD<sup>1</sup>

부산대학교병원 안과학교실<sup>1</sup>, 부산대학교 의학전문대학원 안과학교실<sup>2</sup>, 부산 이안과의원<sup>3</sup>

Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital<sup>1</sup>, Busan, Korea

Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine<sup>2</sup>, Busan, Korea

Lee Eye Clinic<sup>3</sup>, Busan, Korea

**Purpose:** To investigate the biological effects of preservative-free artificial tear drops on cultured human corneal epithelial cells *in vitro*.

**Methods:** The effects of the preservative-free artificial tear drops (Kynex<sup>®</sup> 0.1%, Kynex II<sup>®</sup> 0.18% [Alcon, Seoul, Korea] and Hyaluni eye drops<sup>®</sup> 0.15%, 0.3% [Taejun, Seoul, Korea]) on the human corneal epithelial cells were evaluated. A methyl thiazolyl tetrazolium (MTT)-based colorimetric assay was performed to assess the cellular metabolic activity and a lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay was used to determine cellular toxicity. The eye drop ingredients were analyzed for electrolyte composition, pH, and osmolarity. We performed a scratch assay and cellular morphology test using electronic microscopy.

**Results:** The metabolic activity of corneal epithelial cells was higher than controls at 24 hours after exposure and then decreased at 48 and 72 hours after exposure ( $p < 0.05$ ). The LDH titers of the 4 eye drops were higher compared with controls ( $p < 0.05$ ). Sodium hyaluronate 0.18% contained lower concentrations of Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> and showed lower osmolarity values compared with the other eye drops. The cellular migration based on the scratch assay was more delayed and cellular damage such as loss of microvilli, rough endothelial reticulum (RER), and mitochondria dilatation was greater than controls based on electron microscopy.

**Conclusions:** Long-term exposure to preservative-free sodium hyaluronate eye drops may induce decreased metabolic activity and cellular damage. Thus, preservative-free artificial tears should be used carefully to prevent cellular toxicity.

J Korean Ophthalmol Soc 2015;56(12):1945-1952

**Key Words:** Artificial tear, Cornea, Epithelium, Hyaluronate, Keratocyte

히알루론산나트륨(sodium hyaluronate)은 세포의 기질에 존재하는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 각

막상피세포를 보호하기 위하여 안구건조증 환자에 많이 사용되며,<sup>1</sup> 2007년 Dry Eye Workshop (DEWS)에서 건성안 분류 1단계부터 히알루론산나트륨 인공누액의 사용을 권장하고 있다.<sup>2</sup> 안건조증의 초기단계에 사용되는 히알루론산나트륨의 multi-dose는 약제의 수명연장 및 세균오염을 방지하기 위해 benzalkonium chloride, Chlorobutanol, parahydroxybenzoate 등이 포함되어 제조되고 있다.<sup>3</sup> 그러나 여러 연구에서 이러한 약제의 보존제가 각막상피세포에 독성

■ Received: 2015. 5. 8.                    ■ Revised: 2015. 6. 22.

■ Accepted: 2015. 10. 16.

■ Address reprint requests to **Jong Soo Lee, MD, PhD**  
Department of Ophthalmology, Pusan National University  
Hospital, #179 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 49241, Korea  
Tel: 82-51-240-7321, Fax: 82-51-242-7341  
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

© 2015 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 보이고 상피세포의 재생을 지연한다는 보고가 있어,<sup>4,5</sup> 현재에는 각막상피층의 손상이 동반되는 경우는 보존제를 첨가하지 않은 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액이 임상에서 많이 사용되고 있다.

제품화된 히알루론산나트륨 인공누액 제제에는 다양한 농도의 히알루론산나트륨을 함유하고 있을 뿐 아니라 여러 가지 전해질이 함유되어 있어 각막상피세포에 접촉할 경우 각막상피세포에 미치는 영향에 관한 연구들은 주로 24시간 전후로 국한되어 있고, 24시간 이상의 장시간 노출 시 각막상피세포에 미치는 영향이나 독성에 관한 연구는 국내외로 매우 드물다. 그리고 임상에서 인공누액의 사용은 건성안 초기단계부터 사용하며 장기간 사용이 허용되고 있지만, 경과관찰이 안과의사들에 의하여 이루어지는 경우는 점차 줄어들고 일반인들의 의식에는 장기간 다량의 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액을 사용하는 것이 당연시되는 현상까지 생겼다. 따라서 본 연구는 현재 국내에 시판 중인 농도가 다른 4종류의 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액 제재인 Sodium Hyaluronate 0.1% (Kynex<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), Sodium Hyaluronate 0.15% (Hyaluni eye drops 0.15%<sup>®</sup>, Taejoon, Seoul, Korea), Sodium Hyaluronate 0.18% (Kynex II<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), Sodium Hyaluronate 0.3% (Hyaluni eye drops<sup>®</sup> 0.3%, Taejoon, Seoul, Korea)를 이용하여 24시간, 48시간, 72시간 장기간 접촉할 경우 약제에 의한 인체의 각막상피세포에 미치는 세포 독성에 대해 알아보고자 한다.

## 대상과 방법

### 세포배양과 처지

본원에서 각막이식을 시행하고 남은 주변부 각막조직을 이용하여 endothelium-free explant method를 이용하여 계대배양을 시행하였다. 각막상피와 실질을  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 가 함유되지 않은 1 unit/mL Dispase II (Boehringer, Mannheim, Germany)에 넣어 37°C 배양기에 1시간 동안 처리하여 각막상피세포를 분리한 후 5분간 1,000분당 회전 수(revolutions per minute, rpm)로 원심분리를 시행하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)로 옮겨 95% air-5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 일차배양을 시행하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 ng/mL epidermal growth factor (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 100 units/mL penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD,

USA) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 첨가한 세포배양액을 2-3일 간격으로 교체하고 세포가 합류(confluent growth)되었을 때 배양배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)으로 1회 세척하고 0.25% trypsin-0.002% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA)를 처리하여 세포를 분리하였다. 세포가 배양접시에서 완전히 이탈되면, 새로운 조직배양접시에 분리된 세포가 포함된 배양액을 약 1 mL 넣고 신선한 배양액을 약 2 mL 첨가시켜 세포를 재배양시켰다. Coulter counter로 세포 수를 측정하여 배양액에 각막상피세포 5×10<sup>3</sup> cell/mL가 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 µL씩 심은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰다. 세포 수가 너무 뺄뺄할 경우 각 약물에 의한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 각막상피세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 4-5일 정도 배양시켰다.

### MTT 분석법을 사용한 세포의 대사능력 비교

Subconfluence에 도달한 cell을 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)으로 1회 세척한 후 50%로 희석시킨 무방부제 인공누액 4가지 및 대조군으로 DMEM을 24시간, 48시간, 72시간 동안 각막상피세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지에 넣어 주었다. 약물처리 후 24시간 정도 세포배양기에 넣어 배양한 다음 MTT assay를 실시하였다. 세포의 흡광도를 측정하기 위해 5 mg의 MTT solution을 PBS 1 mL에 녹인 후 0.2 µL syringe filter로 거른 다음 DMEM 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배양액을 140 µL 정도 제거한 후 MTT solution을 100 µL 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층액을 110 µL 제거한 후 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 100 µL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 약제 독성 비교

50%로 희석시킨 무방부제 인공누액 4가지 및 대조군으로 DMEM을 96 well 배지의 전체 양 200 µL에서 100% 농도가 되도록 배지액에 넣은 후 각각 24시간, 48시간, 72시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH의 양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader

(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였는데, 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출 시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다.

### 인공누액의 구성성분 비교

4가지 인공누액의 구성성분 분석은 약제의 성분인 전해질 조성, pH, 삼투압 및 보존제를 각각 조사하여 약물 간의 차이를 확인하고자 하였다. 점안약을 sample tube에 담은 후 전해질의 조성은 LX-20 (Beckman coulter, Brea, CA, USA), 삼투압은 Microsample Osmometer (Fiske Associates, Norwood, MA, USA)를 이용하여 측정하였으며, pH는 Metrohn 780 (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland)을 사용하였다.

### 약제에 따른 각막상피세포의 창상 회복 정도 검사

인공누액에 노출 시 세포의 창상 회복 정도를 관찰하기 위해서 배양액에 각막상피세포를 각각  $5 \times 10^3$  cell/well이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500  $\mu$ L씩 심은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air의 배양기에서 4-5일 정도 배양하였다. Subconfluence에 도달한 배지에 100  $\mu$ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 후, 상층의 배지를 제거하고, 50%로 희석시킨 무방부제 인공누액 4가지 및 대조군으로 DMEM을 접촉시킨 후 역상 광학 현미경(inverted-contrast light microscope)으로 24, 48, 72시간 후 세포가 스크래치 모서리 부분으로 자라 들어오는 정도를 관찰하였다.

### 세포의 형태학적 변화

약제에 따른 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 50%로 희석시킨 무방부제 인공누액 4가지 및 대조군으로 DMEM을 24시간과 72시간 노출 후 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 방법은 배양액에 각막상피세포가  $5 \times 10^3$  cell/mL가 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500  $\mu$ L씩 seeding한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air의 배양기에서 4-5일 정도 배양하였다. 배지에서 성장한 세포를 세 가지 약제에 24, 72시간 노출시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색시켜 투과전자현미경(JEOL 1200EX, JEOL, Tokyo, Japan)으로 세포의 미세 구조를 관찰하였다.

### 통계학적 분석

각 실험 과정들을 3회 반복하여 시행하였고, 약제 간의 통계학적 유의성 비교를 위해 kruskal-wallis test를 시행하였으며 통계학적 신뢰도를 95%로 정하였다.

## 결 과

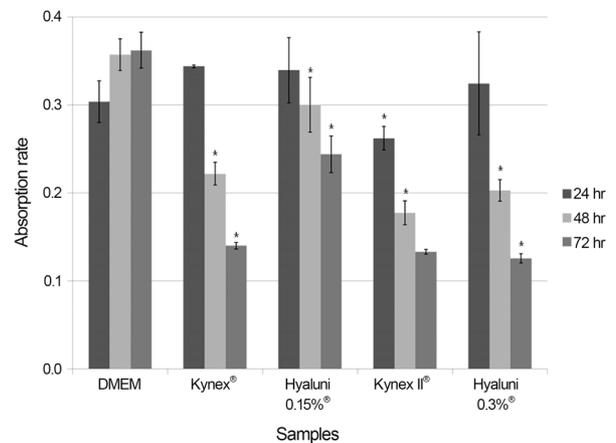
### MTT 분석법을 사용한 세포의 대사능력 비교

약제노출 24시간째 4가지 약제 간 농도에 따른 MTT 결과치의 유의한 차이는 발견되지 않았다( $p > 0.05$ ). 그러나 Sodium Hyaluronate 0.1%, Sodium Hyaluronate 0.15%, Sodium Hyaluronate 0.3%가 대조군에 비하여 높은 MTT 결과치를 보인 반면 Sodium Hyaluronate 0.18%는 다소 낮은 MTT 결과치가 관찰되었다( $p > 0.05$ ).

약제노출 48시간째 네 약제는 모두 대조군에 비하여 낮은 MTT 결과치를 보였으며( $p > 0.05$ ), 특히, Sodium Hyaluronate 0.18%에서 낮은 세포대사력이 나타났고( $p < 0.05$ ), 4가지 약제 간 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ). 약제노출 72시간째는 대조군에 비해 현저한 세포의 대사력 감소를 보여 유의한 통계학적인 감소를 보였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

### 젖산탈수소효소(LDH) 분석법을 이용한 약제 독성 비교

LDH 분석법을 이용하여 LDH 누출량을 측정할 결과, 노출 24시간 이후 모든 시간대에서 대조군에 비하여 4가지 약제 모두 높은 LDH 누출이 관찰되었고( $p < 0.05$ ), 시간이 지나면서 대조군의 LDH 누출량에 대한 각 점안제의 LDH 누출량 비가 점차 증가하였다. 대조군 및 4가지 약제의 LDH 누출량은 시간이 지나며 점차 감소되었으며, 약제 간 LDH 누출량의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2).



**Figure 1.** The absorption rate of the water insoluble formazan dye in corneal epithelial cell exposed in four preseervative-free sodium hyaluronate artificial tear drops-Kynex®, Hyaluni® 0.15%, Kynex II®, Hyaluni® 0.3%, and control is Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)—by scanning spectrometer (ELISA reader). There were significantly differences between control and eye drops at 48 hours and 72 hours after exposure. hr = hours.  $p < 0.05$ .

인공누액의 구성성분 비교

약제의 전해질 및 pH, 삼투압을 분석하였는데, 전해질의 구성성분 중 Na<sup>+</sup>는 Sodium Hyaluronate 0.15%가 155.7 mEq/L로 가장 높았고 Sodium Hyaluronate 0.18%는 59.9 mEq/L로 가장 낮았다. K<sup>+</sup>는 Sodium Hyaluronate 0.1%, Sodium Hyaluronate 0.18%, Sodium Hyaluronate 0.3%에서 각각 16.38 mEq/L, 17.21 mEq/L, 15.43 mEq/L로 유사하였으나 Sodium Hyaluronate 0.15%는 0.27 mEq/L로 가장 낮았다. Cl<sup>-</sup>는 Sodium Hyaluronate 0.1%, Sodium Hyaluronate 0.15%, Sodium Hyaluronate 0.3%에서 각각 133.6 mEq/L, 156.3 mEq/L, 131.9 mEq/L로 측정되었으나, Sodium Hyaluronate 0.18%는 54.9 mEq/L로 가장 낮았다. pH는 네 약제 모두 대조군에 비하여 약산성을 띠었으며 Sodium Hyaluronate 0.1%, Sodium Hyaluronate 0.3%에서 특히 더 높은 산성을 보였다. 삼투압은 Sodium Hyaluronate 0.1%, Sodium Hyaluronate 0.15%, Sodium Hyaluronate 0.3%는 대조군과 비슷하거나 유사하였으나, Sodium Hyaluronate 0.18%는 144 mosm/kg으로 저삼투압을 보였다(Table 1).

약제에 따른 각막상피세포의 창상 회복 정도 검사

대조군의 경우 24시간 이후 창상부위로 각막상피세포의 이주가 이루어져 48시간, 72시간째에 증가된 각막상피세포의 이주가 관찰되었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

그러나 4가지 농도의 히알루론산나트륨 제제 인공누액의 경우 노출 24시간째에도 대조군에 비해 저하된 각막상피세포 이주가 관찰되며, 48시간 및 72시간 노출 이후에도 대조군에 비하여 현저하게 낮은 각막상피세포 이주가 관찰되었다.

세포의 형태학적 변화

히알루론산나트륨 4가지 농도의 약제와 대조군 모두에서 약제에 24시간째와 72시간째 노출되었을 경우 미세용모의 소실, 공포의 형성과 미토콘드리아의 확장이 관찰되었으며, 24시간 노출에 비해 장시간 노출된 72시간 노출의 경우 그 변화가 더 현저하였다. 대조군에 비하여 히알루론산나트륨 네 약제에 노출되었을 경우 세포의 변화가 더욱 현저하게 나타났다. 그러나 세포질의 변화와 핵막 손상은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

안구건조증은 눈물 부족과 과도한 눈물 증발로 인하여 발생하는 눈물층의 질환으로 안구 불편감, 건조감, 안구표면 손상 등을 야기한다.<sup>2</sup> 현재 인공누액은 안구건조증 치료의 주된 치료로 사용되고 있으며, 경한 안구건조증의 경우 하루 2-4회 사용이 권장되고 있으나 중한 안구건조증의 경우 6회 이상 점안이 권유되고 있다. 인공누액은 안구 표면 습윤화를 통한 물리적 특성에 초점을 맞추어 제작되며, 눈감박임 동안 윤활 작용을 도울 수 있게 친수성 물질을 포함한다.<sup>6</sup> 현재 임상에서 히알루론나트륨을 주성분으로 하는 인공누액의 사용이 증가되고 있는데, 히알루론산나트륨은 N-acetyl-glucosamine과 glucuronate가 곧은 사슬 모양으로 반복된 형태를 띠어 물과 결합하는 능력이 매우 크며 탈수에도 저항을 띠는 반면 각막상피세포의 증식 능력도 촉진한다.<sup>7</sup>

현재 임상에서 많이 사용 중인 인공누액의 주성분인 히알루론산나트륨의 인공누액은 안구건조증이나 건성안증후군에서 객관적이고 주관적인 증상의 호전을 보고하고 있지

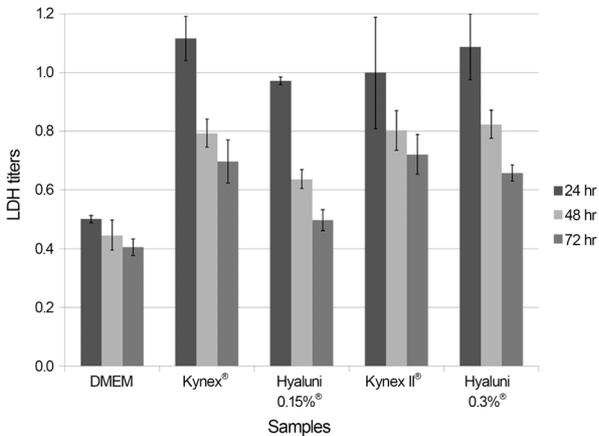
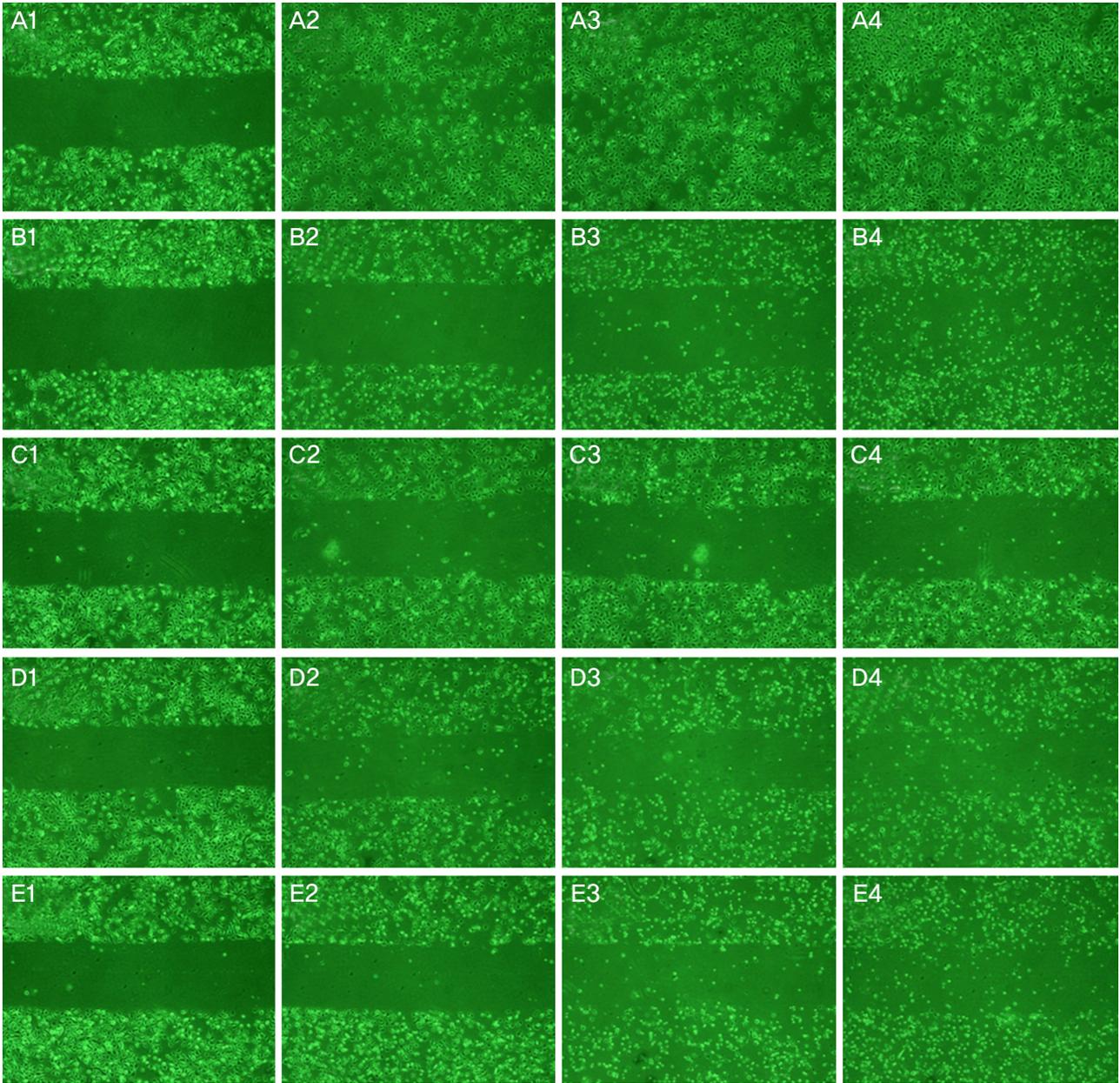


Figure 2. Mean LDH titer of cultured corneal epithelial cell exposed four preservative free hyalunate eye drops-Kynex<sup>®</sup>, Hyaluni eye drops<sup>®</sup> 0.15%, Kynex II<sup>®</sup>, Hyaluni eye drops<sup>®</sup> 0.3% and DMEM. There were significantly differences between control and eye drops all the times. LDH = lactate dehydrogenase; DMEM = Dulbecco Modified Eagle Medium; hr = hours.

Table 1. The ingredient, electrolyte composition, pH and osmolarity of the three commercial preservative-free artificial tear

Eye drops	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Cl <sup>-</sup> (mEq/L)	pH	Osmolarity (mosm/kg)
Kynex <sup>®</sup>	129.4	16.38	133.6	5.5	284
Hyaluni <sup>®</sup> 0.15%	155.7	0.27	156.3	6.5	301
Kynex II <sup>®</sup>	59.9	17.21	54.9	7.0	144
Hyaluni <sup>®</sup> 0.3%	133.6	15.43	131.9	5.5	284
Tear	120-170	5-20	100-140	5.0-8.35	305

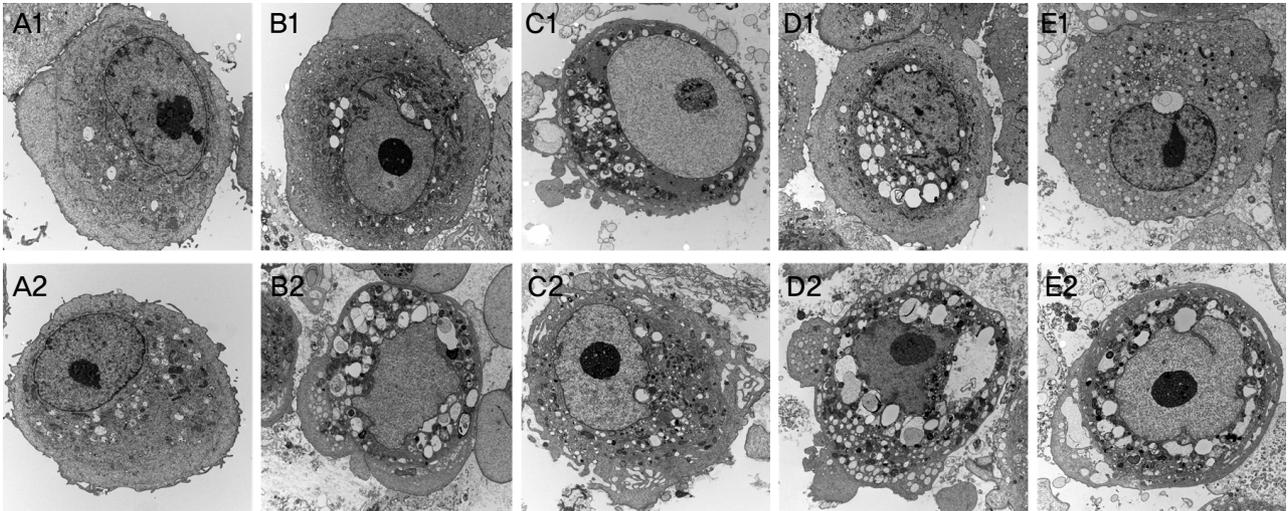


**Figure 3.** Scratch assay of corneal epithelial cells after exposure to (A) DMEM as control, (B) Kynex®, (C) Hyaluni® 0.15%, (D) Kynex II®, and (E) Hyaluni® 0.3%. Row 1 are result immediately after exposure, Row 2 are after 24 hours, Row 3 are after 48 hours, Row 4 are after 72 hours. The wound closure after exposure of sodium hyaluronate artificial tear were less prominent than control all the time. DMEM = Dulbecco Modified Eagle Medium.

만,<sup>6,8-10</sup> Yokoi et al<sup>11</sup>은 각막이식 후 히알루론산나트륨의 사용이 각막상피의 손상을 유발한다고 상반된 결과를 보고 하였다. 이런 상반된 연구의 결과는 생체 외 실험에서도 보고되고 있다. Inoue and Katakami<sup>12</sup>는 히알루론산나트륨을 사용한 이후 각막상피세포의 증식이 증가됨을 보고한 반면, Gomes et al<sup>13</sup>은 증식에 미치는 영향이 미미하다고 보고하였다. 저자들은 배양된 인체의 각막상피세포를 이용한 실험에서 각막상피세포에 히알루론산나트륨을 24시간 이하로 노출시켰을 때 각막상피세포의 증식이 증가됨을 보고한

바 있다.<sup>14</sup> 본 연구에서도 MTT 흡광도를 이용하여 각막상피세포의 세포대사력과 증식력을 측정된 결과 노출 24시간째 Sodium Hyaluronate 0.18%를 제외한 세 가지 약제는 대조군에 비하여 높은 증식력을 보였다. 그러나 24시간 이후부터는 급격한 세포의 증식력 감소를 보여 네 가지 약제 모두 대조군에 비해 낮은 증식력이 관찰되며 노출 시간 72시간째는 세포의 대사력이 더욱 감소하는 양상이 관찰되었다.

Camillieri et al<sup>15</sup>은 토끼의 각막상피세포를 이용한 연구에서 히알루론산나트륨의 농도가 높아질수록 각막 상피세



**Figure 4.** Transmission electron micrographs of corneal epithelial cells ( $\times 8,000$ ). First line were appeared after 24-hours exposure and second lines were after 72-hours exposure to (A) control (DMEM), (B) Kynex®, (C) hyaluni eye drops® 0.15%, (D) Kynex II®, (E) hyaluni eye drops 0.3%. DMEM = Dulbecco Modified Eagle Medium.

포의 이주가 증가하며 0.4%에서 가장 높은 각막상피세포의 이주가 관찰되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 대조군의 경우 24시간째 이후 창상 회복이 뚜렷하게 관찰되어 48시간, 72시간째는 각막상피세포의 이주가 훨씬 많이 이루어져 창상부위가 거의 회복되는 양상을 보인 반면, 네 가지 농도의 히알루론산나트륨 제제에서는 대조군에 비해 현저하게 저하된 각막상피세포의 이주가 관찰되었다. 즉, 세포의 증식력을 증가하는 효능이 있는 히알루론산나트륨의 인공누액이지만 약제의 노출 시간이 길어질수록 각막상피세포의 증식이나 이주능력이 저하되는 현상을 확인할 수 있었다.

인공누액에 의한 세포손상은 주로 세포자멸사 혹은 세포막의 투과성의 변화에 의하여 이루어진다고 하는데,<sup>16</sup> 본 연구에서 세포손상의 정도를 알아보기 위하여 LDH 분석과 세포의 형태학적 변화를 전자현미경을 통하여 수치로 측정하고 관찰하였다.

LDH 역가 분석 결과 대조군에 비해 네 가지 히알루론산나트륨 용액 모두에서 LDH 역가의 증가가 관찰되었다. 그리고 시간이 지남에 따라 노출 48시간 및 72시간에 LDH 역가의 감소가 관찰되었다. 24시간째 이후 LDH 역가의 감소는 초기 약제 노출에 비해 약제 노출 시간이 증가할수록 세포의 손상으로 생존 세포의 수가 감소함에 따라 LDH 유리가 감소한 것으로 생각된다. 이런 세포의 손상은 약제노출 24시간째와 72시간째에 시행한 전자현미경 소견에서 세포의 형태학적인 소견을 관찰함으로써 확인되었다. 약제노출 24시간째에 대조군에 비해 네 약제에서 미세용모 소실, 공포 형성과 미토콘드리아의 확장이 현저히 관찰되었고, 이러한 현상은 약제에 72시간 노출되었을 경우 더 심화되

는 양상이었다. 즉, 본 연구에서는 히알루론산나트륨의 약제 노출 기간이 24시간보다는 72시간째 장기간 접촉으로 세포의 손상이 초래됨을 알 수 있었고, 안전하다고 알려진 무보존제의 인공누액이라 하더라도 48시간 이상의 접촉이 장기화될수록 각막상피세포의 손상이나 각막상피층의 병변을 악화시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

일반적으로 점안약제의 경우 장기간 사용하거나 과량 사용할 경우 안구 표면 독성을 야기할 수 있으며, 특히 전해질과 삼투압이 세포 기능이상을 초래하는 주 요인으로 설명된다.<sup>3,17</sup> Lee et al<sup>18</sup>은 비스테로이드성 항염증제에 포함된 낮은 농도의  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Cl}^-$ 가 각막실질세포에 영향을 준다고 보고하였으며, Wang et al<sup>19</sup>은 높은  $\text{K}^+$ 가 세포의 자멸사를 유도한다고 보고하였다.

본 연구에서 Sodium Hyaluronate 0.18% 점안제의 경우  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Cl}^-$ 가 눈물에 비해 낮은 결과를 보였으며, Sodium Hyaluronate 0.15% 점안제는  $\text{K}^+$ 가 다른 점안제 및 눈물에 비해 낮았다. Sodium Hyaluronate 0.1% 점안제와 Sodium Hyaluronate 0.3% 점안제도 차이는 적지만  $\text{Na}^+$ 와 pH가 낮았고  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ 는 높았다. 삼투압은 일반적으로 260-320 mmol/kg의 범위에서 세포에 손상을 주지 않는 것으로 알려져 있으며, 눈물층의 삼투압은 305 mosm/kg으로 보고된다. 본 연구에서 저삼투압성을 특징으로 하는 Sodium Hyaluronate 0.18% 점안제의 경우 삼투압이 144 mmol/kg으로 가장 낮았으며, 그 외 점안제의 경우 눈물층과 비슷하거나 약간 낮은 삼투압을 나타내었다. 각막상피세포가 DMEM에 노출되었을 때에 비하여 히알루론산나트륨에 노출되었을 경우 각막상피세포의 손상이 더욱 심하게 관찰되었음에 비추어 보면 인공누액에 포함된 여러 전해질, 수소가

온농도 및 각 점안제의 삼투압이 각막상피세포에 영향을 미치며 각막상피세포의 손상을 초래하게 됨을 확인할 수 있다.

무보존제의 히알루론산나트륨 일회용 점안제의 경우는 각막상피세포의 증식과 이주를 증가시켜 안구표면질환의 호전에 도움을 준다고 알려져 있다. 그러나 이러한 각막상피세포에 대한 긍정적인 요인은 단기간으로 무방부제 히알루론산나트륨 인공누액을 각막상피세포에 노출하여 얻은 결과로 장기간 사용에 의한 각막상피세포에 미치는 영향력에 관한 연구는 드물다. 제품화된 무방부제 히알루론산 인공누액의 구성성분은 히알루론산나트륨 이외에 수분 및 다수의 전해질 농도, pH, 삼투압 등이 함유되어 있어 장기간 사용 시 이로 인한 전해질 이상, 세포막의 이동 및 삼투압의 불균형으로 인한 각막상피세포에 미치는 악영향이 발생할 수 있다. 안과적인 점안제로 사용하는 것 외에 미용적 목적으로 피부하에 주입하는 필러의 주성분으로도 히알루론산나트륨이 사용되는데, 이때도 필러에 포함된 히알루론산나트륨이 세포에 미치는 영향은 장기간 히알루론산나트륨이 피부하에 존재하면서 지연성 반응으로 인해 내 염증 반응에 의한 염증세포의 침윤과 이상면역반응에 의한 육아종의 부작용이 보고되기도 한다.<sup>20-22</sup> 이런 부정적인 측면이 존재하는데도 불구하고, 최근에는 보존제가 첨가되지 않은 일회용 히알루론산나트륨 점안약제가 각막상피세포에 미치는 독성이 거의 없는 것으로 일반인들에게 인식되어 무분별하게 임상에 사용되는 경향이 만연되고 있는 실정기에 이 부분에 대한 정확한 정보와 인식이 필요하다.

본 연구에 따르면 48시간 이상 장기간 히알루론산나트륨 인공누액에 각막상피세포가 노출되었을 경우 각막상피세포의 대사력과 이주능력이 감소되면서 각막상피세포의 손상이 초래됨을 확인할 수 있었다. 안구건조증의 경우 무보존제 히알루론산나트륨 일회용 인공누액이라 할지라도 장기간 사용하거나 다량으로 안구에 점안하게 되며 이로 인하여 각막상피세포의 손상이 초래될 수 있음을 인식하여 일반인을 대상으로 정기적인 안검진의 필요성과 안건강에 관한 인공누액의 올바른 사용에 관한 적극적인 홍보가 필요할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Sand BB, Marnier K, Norn MS. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. A double masked clinical trial. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989;67:181-3.
- 2) The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.
- 3) Ayaki M, Yaguchi S, Iwasawa A, Koide R. Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36:553-9.
- 4) Lee JK, Ryu YH. The effect of antiglaucoma medication on cultured human conjunctival epithelial cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2006;47:1811-8.
- 5) Roh YR, Lee SM, Han YK, et al. Changes in clinical manifestations of dry eye syndrome after cataract surgery and the affecting factors. *J Korean Ophthalmol Soc* 2011;52:1030-8.
- 6) Lemp MA. Artificial tear solutions. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:221-9.
- 7) Nakamura M, Hikida M, Nakano T, et al. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* 1993;12:433-6.
- 8) Papa V, Aragona P, Russo S, et al. Comparison of hypotonic and isotonic solutions containing sodium hyaluronate on the symptomatic treatment of dry eye patients. *Ophthalmologica* 2001;215:124-7.
- 9) Aragona P, Papa V, Micali A, et al. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol* 2002;86:181-4.
- 10) Brignole F, Pisella PJ, Dupas B, et al. Efficacy and safety of 0.18% sodium hyaluronate in patients with moderate dry eye syndrome and superficial keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:531-8.
- 11) Yokoi N, Yamada J, Nishida K, Kinoshita S. Effect of sodium hyaluronate on diffuse epithelial keratitis after penetrating keratoplasty. *Transplant Proc* 1995;27:1412-3.
- 12) Inoue M, Katakami C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2313-5.
- 13) Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88:821-5.
- 14) Kim HY, Park YM, Lee JS. Effect of preservative-free healon eye drop on human corneal epithelial cell in vitro. *J Korean Ophthalmol Soc* 2014;55:1698-705.
- 15) Camillieri G, Bucolo C, Rossi S, Drago F. Hyaluronan-induced stimulation of corneal wound healing is a pure pharmacological effect. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20:548-53.
- 16) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
- 17) Wee WR, Wang XW, McDonnell PJ. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. *Cornea* 1995;14:273-9.
- 18) Lee JE, Han HJ, Lee JS, Oum BS. Effect of tranilast on the proliferation of human corneal keratocytes in vitro. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:510-20.
- 19) Wang L, Li T, Lu L. UV-induced corneal epithelial cell death by activation of potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5095-101.
- 20) Huang-Lee LL, Wu JH, Nimmi ME. Effects of hyaluronan on collagen fibrillar matrix contraction by fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1994;28:123-32.
- 21) Mummert ME. Immunologic roles of hyaluronan. *Immunol Res* 2005;31:189-206.
- 22) Sidwell RU, Dhillon AP, Butler PE, Rustin MH. Localized granulomatous reaction to a semi-permanent hyaluronic acid and acrylic hydrogel cosmetic filler. *Clin Exp Dermatol* 2004;29:630-2.

= 국문초록 =

## 무보존제 히알루론산나트륨 점안이 각막상피세포에 미치는 장기적 영향

**목적:** 임상에서 사용되는 다양한 농도의 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액이 각막상피세포에 장기간 접촉 시에 생길 수 있는 영향을 알아보려고 한다.

**대상과 방법:** 농도가 다른 4가지 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액을 사용하여 배양된 인체 각막상피세포에 미치는 영향을 연구하였다. 각막상피세포에 인공누액을 24, 48, 72시간 동안 접촉시켜 MTT 분석과 젖산탈수효소(lactate dehydrogenase, LDH)의 역가를 측정하였다. 인공누액의 구성성분을 각각 측정하고, 각막상피층의 창상 회복 정도와 세포의 형태학적인 변화를 관찰하였다.

**결과:** 네 약제 간 MTT는 유의한 차이가 없었고( $p>0.05$ ), 약제 노출 24시간에 대조군에 비해 methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) 수치가 높게 나타났으나 48시간 이후 낮게 측정되었다( $p<0.05$ ). LDH 누출량은 4가지 약제에서 대조군에 비하여 높게 측정되었다( $p<0.05$ ). Sodium Hyaluronate 0.18%의 경우  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ 가 낮게 포함되어 있었고 삼투압도 다른 약제에 비해 낮았다. 창상 회복 검사에서 4가지 약제 모두 대조군에 비해 각막상피세포의 이주가 저하되었고, 약제 간 유의한 차이는 없었다( $p>0.05$ ). 약제에 72시간 노출되었을 경우 미세융모의 소실, 공포의 형성과 미토콘드리아의 확장이 대조군에 비해 현저하게 나타났다.

**결론:** 농도가 다른, 제품화된 4가지 무보존제 히알루론산나트륨에 각막상피세포가 장기 노출되었을 경우 각막상피세포의 대사력이 저하되면서, 세포독성이 관찰되었다. 따라서 무보존제 히알루론산나트륨 인공누액이라도 장기간 사용할 경우 각막상피세포에 미치는 영향을 고려하여 주의 깊게 사용함이 필요하다.

(대한안과학회지 2015;56(12):1945-1952)