

## 올로파타딘이 토끼 결막세포에 미치는 독성 비교

### Comparison of the Toxicity of Olopatadine Anti-allergic Ophthalmic Agents on Rabbit Conjunctival Cells

정영환<sup>1</sup> · 장수경<sup>1,2</sup> · 이종수<sup>1,2</sup>

Young Hwan Jeong, MD<sup>1</sup>, Su Gyeong Jang, MD<sup>1,2</sup>, Jong Soo Lee, MD, PhD<sup>1,2</sup>

부산대학교 의과대학 안과학교실<sup>1</sup>, 부산대학교병원 의생명연구원<sup>2</sup>

Department of Ophthalmology, Pusan National University College of Medicine<sup>1</sup>, Busan, Korea  
BioMedical Research Institute of Pusan National University Hospital<sup>2</sup>, Busan, Korea

**Purpose:** To compare the *in vitro* toxicity of commercial olopatadine anti-allergic ophthalmic agents on cultured rabbit's conjunctival cells according to concentrations and exposure times.

**Methods:** Rabbit conjunctival cells were exposed to anti-allergic olopatadine ophthalmic agents, (Patanol<sup>®</sup> [0.1% olopatadine hydrochloride; Alcon, Fort Worth, TX, USA], Pataday<sup>®</sup> [0.2% olopatadine hydrochloride; Alcon], and Pazeo<sup>®</sup> [0.7% olopatadine hydrochloride; Alcon]) at concentrations of 5%, 10%, and 15% for periods of 30 minutes, 1, 2, 3, and 6 hours, respectively. Cell proliferation and injury assays were performed using the methylthiazoltetrazolium and lactate dehydrogenase (LDH) leakage assays. We checked the composition of the three anti-allergic agents, and performed light and transmission electron microscopy to compare the morphological changes in cells.

**Results:** The conjunctival cell proliferation was inhibited after 1 hour exposure to each olopatadine ophthalmic agent, with significant cell proliferation inhibited using 15% of each drug. The proliferation of conjunctival cells was inhibited during 6 hours of drug exposure at all concentrations of Pataday<sup>®</sup> and Pazeo<sup>®</sup>. The titer of LDH increased from 3 hours after drug exposure, but 15% Pazeo<sup>®</sup> significantly increased the LDH titer at 2 hours after drug exposure. As the concentration of the drug increased, the LDH titer also significantly increased. The cellular morphological changes of conjunctival cells were in the increasing order of Pazeo<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, and Patanol<sup>®</sup> with a high concentration of olopatadine hydrochloride.

**Conclusions:** Among the anti-allergic olopatadine ophthalmic agents, higher olopatadine concentrations in the increasing order of Pazeo<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, and Patanol<sup>®</sup> resulted in cytoplasmic damage of conjunctival cells, but there was no severe damage to the cytoplasmic or the nuclear membranes.

J Korean Ophthalmol Soc 2019;60(12):1176-1184

**Keywords:** Allergy, Conjunctivitis, Olopatadine hydrochloride, Toxicity

■ Received: 2019. 7. 26.

■ Revised: 2019. 8. 27.

■ Accepted: 2019. 12. 6.

■ 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: 82-51-240-7326, Fax: 82-51-242-7341  
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

\* This research was supported by a grant from University Research Park Project of Busan National University funded by Busan Innovation Institute of Industry, Science & Technology Planning.

\* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

알레르기결막염의 약물치료제는 혈관수축제, 항히스타민제, 비만세포 안정제, 비스테로이드성 염증억제제, 스테로이드제 등 다양하지만,<sup>1,2</sup> 최근에는 항히스타민 작용과 비만세포 안정화 작용을 함께 가지고 있는 olopatadine 제제를 이용한 다작용 점안 약제가 많이 사용되고 있다. Olopatadine hydrochloride은 히스타민 수용체에 작용하여 히스타민의 작용을 억제하고,<sup>3,4</sup> 동시에 비만세포의 탈과립(degranulation)을 억제하여 결막의 비만세포를 안정화하여

히스타민의 분비를 억제함으로써 알레르기결막염의 증상을 완화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>5-7</sup>

2000년 3월 미국에서 olopatadine은 알레르기결막염 치료를 위해 승인을 받았고, 비만세포를 안정화시키는 선택적인 H1-수용체 길항제로 약효가 좋아서 12시간의 작용시간으로 하루에 두 번 점안하는 Patanol® (olopatadine hydrochloride 0.1%; Alcon, Fort Worth, TX, USA)이 처음으로 출시되었다. 그러나 하루에 두 번의 점안보다는 하루 한 번의 점안으로 항알레르기 효과를 내는 Pataday® (olopatadine hydrochloride 0.2%; Alcon)가 임상에 추가로 사용되면서, 최근에는 항알레르기 효과의 증강을 위해서 olopatadine 농도가 훨씬 높은 Pazeo® (olopatadine hydrochloride 0.7%; Alcon)가 출시되어 하루에 한 번 점안으로 임상에 사용되고 있다.

임상적으로 다양한 olopatadine 제제가 널리 사용되고 있으나, 이들 약제 간의 농도나 노출 시간에 따른 결막세포에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 없다. 이에 저자들은 항알레르기점안약인 Pazeo®, Pataday®, Patanol®에 의한 약제의 농도 및 노출 시간에 따른 결막세포의 변화와 손상 정도를 관찰하고자 배양된 결막세포를 이용하여 methylthiazolotetrazolium (MTT) 분석법, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 시행하였으며, 광학 및 전자현미경을 이용하여 세포의 형태학적 변화 또한 비교 관찰하고자 하였다.

## 대상과 방법

### 토끼의 결막세포 배양

본 연구는 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care Use Committee) 승인(IACUC No: 2019-154)하에 토끼의 결막조직을 채취하여 transfer media에 담아 실험실로 옮긴 후 25 cm<sup>2</sup> flask에 배양시켰다. 결막세포를 2 × 2 mm의 크기로 결막조직을 절제한 후 배양접시에 외이식법으로 배양하였는데, 배양액으로는 10% 송아지 혈청(Gibco, Rockville, MD, USA)을 첨가한 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Gibco)을 사용하였고, 감염예방을 위해 50 µg/mL gentamicin, 2 µg/mL fungizone을 첨가하였다. 37°C 온도에서 5% CO<sub>2</sub> - 95% air의 보육기(NAPCO model 5100; Napco Industries, Minneapolis, MN, USA)에서 결막세포를 3일간 배양하였다. 배양 중인 조직에서 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS; Cat. 21600-051; Gibco)로 1회 세척한 후 0.25% trypsin - 0.02% Ethylenediaminetetraacetic acid를 처리하여 조직으로부터 결막세포를 분리하고, Coulter counter로 세포 수를 측정한 후 96 well plate에 4 × 10<sup>3</sup> cells/mL

가 되도록 배지의 양을 200 µL씩을 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> - 95% air의 보육기에서 배양하였다. 이때 세포 수가 너무 많아 밀집된 경우에는 세포에 대한 항알레르기 약제의 효과가 미미할 수 있으므로, 배지에서 세포들이 80-90% 정도 성장할 때까지 배양하였다.<sup>8</sup>

### MTT 분석법을 사용한 세포의 대사 활성도 측정

세포의 대사능력을 측정하기 위해 MTT solution (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용한 분석법을 사용하였는데, 노란색의 tetrazolium salt가 세포 내 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것으로, 생존하고 있는 세포 즉 대사작용이 왕성한 세포를 흡광도를 이용해서 측정하는 방법이다.<sup>9</sup>

Subconfluence에 도달한 결막 세포를 D-PBS로 1회 세척한 후 각 알레르기 약제를 전체 배지의 5%, 10%, 15%가 되도록 첨가하여 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 동안 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어주었다. 약물 처리 후 24시간 정도 세포 배양기에 넣어 배양한 다음 MTT 분석법을 실시하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로는 배지 자체에 아무 처리를 하지 않은 것으로 하였고, DMEM 배지를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 세포를 배양하여 세포대사능력을 측정하였다.

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; Cat. D-5869; Sigma)를 100 µL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이러한 과정들을 3회 반복하여 각 농도와 노출 시간별로 측정된 흡광도의 평균을 구하여 각 세포의 생존율을 구하였는데, 세포 생존율은 각 칸의 흡광도 수치를 대조군 칸의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 세포의 생존율(%) = 각 칸의 흡광도 / 대조군칸의 흡광도 × 100으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩 시도하여 각 군과의 통계학적 유의성을 비교하였다(student's *t*-test, *p*<0.05).<sup>10</sup>

### 약제의 농도 및 노출 시간에 따른 LDH 분석법

LDH 분석법은 세포막의 손상으로 인해 세포배지로 유출된 lactate dehydrogenase를 측정하는 방법으로, 적은 개수의 세포라도 손상 정도를 정량화하여 측정할 수 있다. 3가

지 종류의 olopatadine 항알레르기 점안약을 96 well 배지의 전체의 양 200  $\mu$ L에서 각각 5%, 10%, 15% 농도가 되도록 넣은 후 결막세포에 각각 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH 양을 37°C 온도의 암순응 상태에서 ELISA reader (Molecular Devices)를 이용하여 측정하였고, 대조군으로는 평형염액(balanced salt solution)을 처리하여 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출 시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다. 모든 실험군과 대조군은 각각 10개의 배양된 결막세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 유의수준은 95% 수준이었고, analysis of variance 검사법을 사용하였다.

#### 약제의 농도 및 노출 시간에 따른 세포의 형태학적 비교

세 가지 항알레르기 약제의 10% 농도에서 3시간 노출 시의 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 배양액에 결막세포를 각각  $5 \times 10^3$  cell/mL가 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500  $\mu$ L 씩 seeding한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> - 95% air의 배양기에서 배양하였다. Subconfluence에 도달한 세포를 3가지 약제에 따라 각각 접촉시킨 후 역상광학 현미경(inverted phase contrast light microscope)으로 세포의 형태를 관찰하였다. 나아가 결막세포의 미세구조를 관찰하기 위해서 배지를 제거한 후 세포들을 0.1M sodium cacodylate buffer로 씻고 약 2시간 동안 Karnosky fixative (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1M sodium cacodylate buffer)에 고정시킨 후 0.1M sodium cacodylate

buffer로 3회에 걸쳐 세척한 후 세포를 osmium tetroxide에 고정시키고 계열 ethanol 용액으로 탈수한 후 Epon으로 포매하였다. 60-80 nm의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색시켜 투과전자현미경(JEOL, 1200 EX; JEOL, Tokyo, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.<sup>10</sup>

#### 약물 간의 구성 성분 비교

세 가지 점안약제의 분석은 약제의 성분인 전해질 조성, pH, 삼투압 및 보존제를 각각 조사하여 약물 간의 차이를 확인하였다. 점안약을 sample tube에 담은 후 전해질 조성은 LX-20 (Beckman coulter, Brea, CA, USA), 삼투압은 Micro sample Osmometer (Fiske Associates, Uxbridge, MA, USA) 이용하여 측정하였으며, pH는 Metrohn 780 (Metrohn, Herisau, Switzerland)을 사용하였다.

## 결 과

#### 약물 간의 구성 성분 비교

Patanol<sup>®</sup> (0.1% olopatadine)은 olopatanol hydrochloride 1.11 mg/mL가 포함되어 있으며, Pataday<sup>®</sup> (0.2% olopatadine)는 2.22 mg/mL, Pazeo<sup>®</sup> (0.7% olopatadine)는 7.76 mg/mL가 존재하고 있다. Patanol<sup>®</sup>과 Pataday<sup>®</sup> 약제는 모두 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>을 함유하고 있으나 Pazeo<sup>®</sup>는 전해질의 농도가 측정되지 않았다. 세 가지 약제의 pH는 7.1-7.2로 중성을 나타내었으며 보존제로 Benzalkonium chloride가 0.1 mg/mL로 동일하게 함유되어 있었다. 삼투압은 Patanol<sup>®</sup> 302 mosm/kg, Pataday<sup>®</sup> 300 mosm/kg, Pazeo<sup>®</sup> 300 mosm/kg로 세 점안액

**Table 1.** The ingredient, electrolyte composition, pH, osmolality and preservatives of the three olopatadine agents

Anti-allergic agents	Chief ingredient (mg/mL)	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	pH	Osmolality (mosm/kg)	Preservatives (mg/mL)	Additives
Patanol <sup>®</sup>	Olopatadine hydrochloride (1.11)	172.7	0.35	100.6	7.2	302	BAC 0.1	Sodium hydrogen phosphate Hydrochloric acid Sodium hydroxide
Pataday <sup>®</sup>	Olopatadine hydrochloride (2.22)	178.4	0.32	108.4	7.1	300	BAC 0.1	Disodium edetate Povidone Sodium phosphate Sodium hydroxide Hydrochloric acid
Pazeo <sup>®</sup>	Olopatadine hydrochloride (7.76)	(-)	(-)	(-)	7.2	300	BAC 0.1	Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin Povidone Polyethylene glycol Hypromellose Mannitol Boric acid Sodium hydroxide Hydrochloric acid

BAC = Benzalkonium chloride.

모두 유사한 수치가 관찰되었다(Table 1).

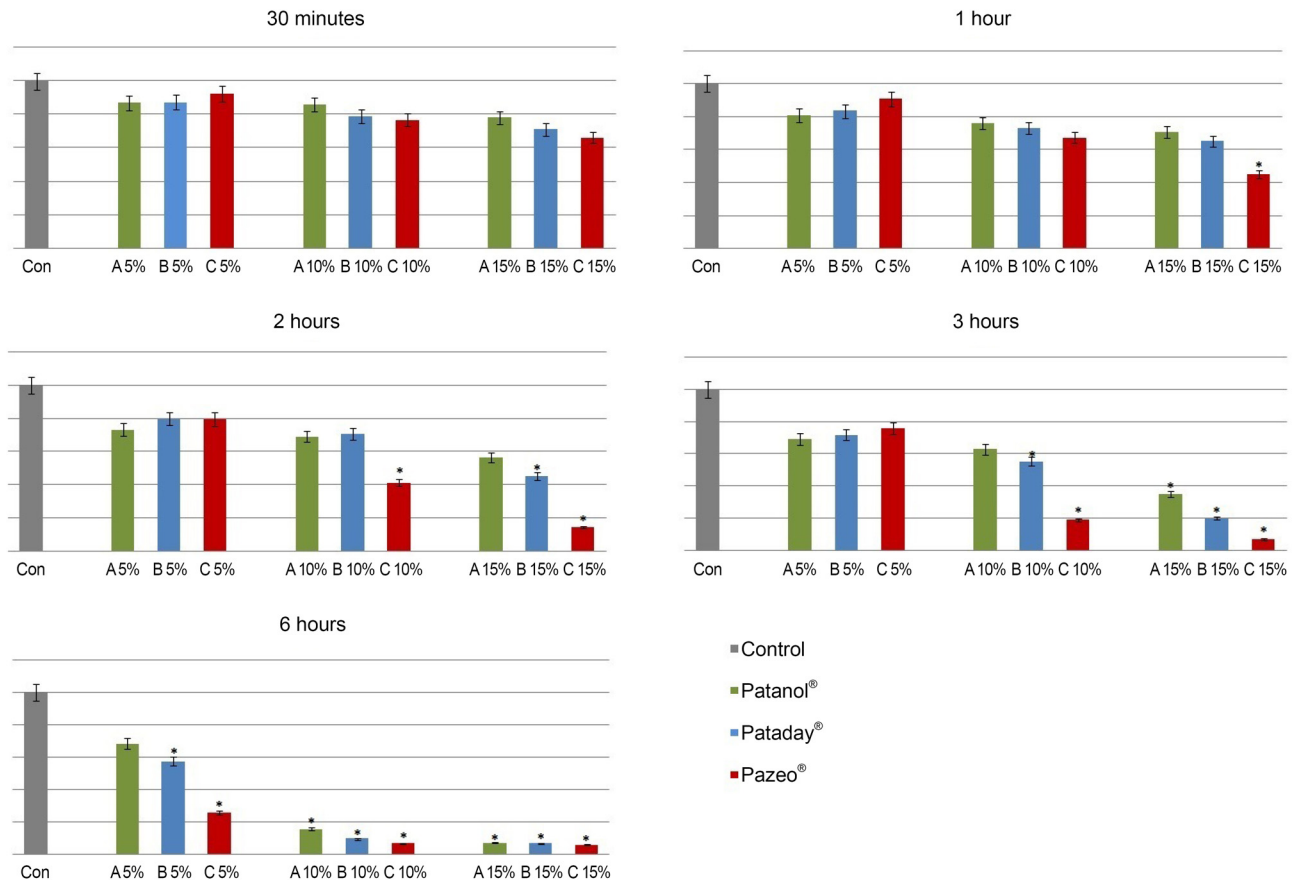
#### MTT 분석법

실험 결과 Patanol<sup>®</sup> 5%에서 생존율은 30분에서 86.8%, 1시간에서 80.8%, 2시간에서 73.3%, 3시간에서 69.3%, 6시간에서 68.3%였으며, Patanol<sup>®</sup> 10%에서 생존율은 30분에서 85.9%, 1시간에서 76.1%, 2시간에서 69.2%, 3시간에서 63.0%, 6시간에서 15.6%였고, Patanol<sup>®</sup> 15%에서 생존율은 30분에서 78.1%, 1시간에서 70.7%, 2시간에서 56.6%, 3시간에서 35.1%, 6시간에서 6.9%였다.

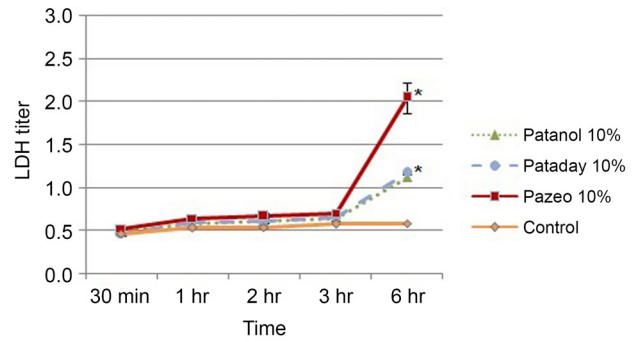
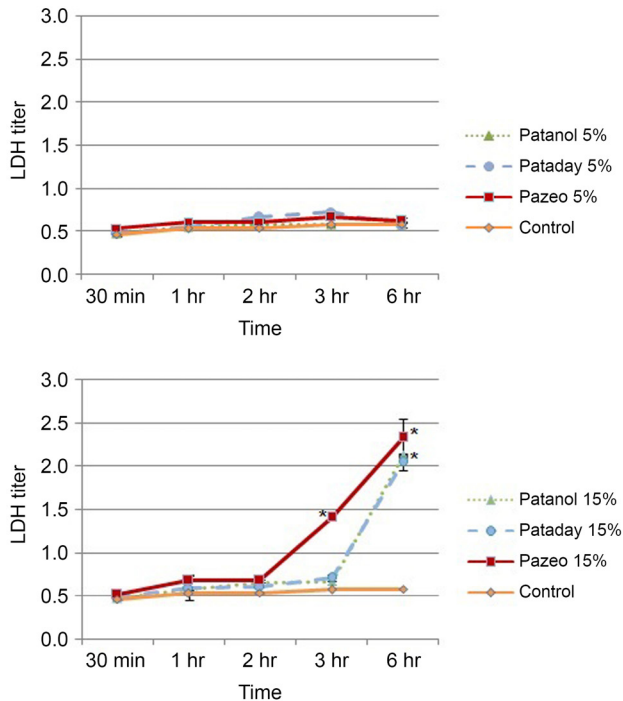
Pataday<sup>®</sup> 5%에서 생존율은 30분에서 87.2%, 1시간에서 83.3%, 2시간에서 79.9%, 3시간에서 72.0%, 6시간에서 57.5%였으며, Pataday<sup>®</sup> 10%에서 생존율은 30분에서 78.8%, 1시간에서 73.1%, 2시간에서 70.7%, 3시간에서 55.5%, 6시간에서 9.5%였고, Pataday<sup>®</sup> 15%에서 생존율은 30분에서 71.0%, 1시간에서 64.8%, 2시간에서 45.4%, 3시간에서 20.2%, 6시간에서 6.8%였다.

Pazeo<sup>®</sup> 5%에서 생존율은 30분에서 92.2%, 1시간에서 90.9%, 2시간에서 79.7%, 3시간에서 76.0%, 6시간에서 25.7%였으며, Pazeo<sup>®</sup> 10%에서 생존율은 30분에서 76.6%, 1시간에서 67.4%, 2시간에서 41.3%, 3시간에서 19.3%, 6시간에서 6.6%였고, Pazeo<sup>®</sup> 15%에서 생존율은 30분에서 66.2%, 1시간에서 45.2%, 2시간에서 14.5%, 3시간에서 7.3%, 6시간에서 5.7%였다.

세 가지 약제에 각각 노출되어 배양된 결막세포에서는 접촉 후 1시간째부터 세포의 증식 억제가 현저하게 관찰되었다(Fig. 1). Patanol<sup>®</sup>의 경우는 3시간째까지 세포증식의 변화가 없었으나, 15% 농도에서는 3시간째부터 현저한 세포증식의 억제가 관찰되었다( $p < 0.05$ ). Pataday<sup>®</sup>의 경우는 10% 농도에서는 약제 노출 3시간째부터 세포의 억제가 현저하게 나타났고( $p < 0.05$ ), 15% 농도에서는 2시간째부터 현저한 세포의 증식 억제력이 나타났다. Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 노출 후 15% 농도에서는 1시간째부터 현저한 세포의 증식 억제력이 나타났고( $p < 0.05$ ), 10% 농도에서는 2시간째부터 현



**Figure 1.** Metabolic activities of rabbit's epithelial cells as determined by Methylthiazoltetrazolium assay after 30 minutes or 1, 2, 3 or 6 hours of treatment with Patanol<sup>®</sup> (0.1% olopatadine; Alcon, Fort Worth, TX, USA), Pataday<sup>®</sup> (0.2% olopatadine; Alcon) or Pazeo<sup>®</sup> (0.7% olopatadine; Alcon) in concentrations of 5, 10 and 15%. \* $p < 0.05$  by student's *t*-test.



저한 세포의 억제 효과가 나타났다( $p < 0.05$ ). 특히 Pataday®, Pazeo®의 경우, 약제 노출 6시간째는 10%, 15% 농도에서 현저한 세포의 증식 억제가 관찰되었다( $p < 0.05$ ).

#### LDH 분석법

Patanol® 5%에서 LDH 농도는 30분에서 0.477, 1시간에서 0.548, 2시간에서 0.584, 3시간에서 0.577, 6시간에서 0.575였으며, Patanol® 10%에서 LDH 농도는 30분에서 0.491, 1시간에서 0.578, 2시간에서 0.606, 3시간에서 0.633, 6시간에서 1.122였고, Patanol® 15%에서 LDH 농도는 30분에서 0.470, 1시간에서 0.580, 2시간에서 0.653, 3시간에서 0.676, 6시간에서 2.123이었다.

Pataday® 5%에서 LDH 농도는 30분에서 0.481, 1시간에서 0.552, 2시간에서 0.664, 3시간에서 0.734, 6시간에서 0.570이었으며, Pataday® 10%에서 LDH 농도는 30분에서 0.457, 1시간에서 0.589, 2시간에서 0.611, 3시간에서 0.655, 6시간에서 1.172였고, Pataday® 15%에서 LDH 농도는 30분에서 0.483, 1시간에서 0.598, 2시간에서 0.612, 3시간에서 0.715, 6시간에서 2.049였다.

Pazeo® 5%에서 LDH 농도는 30분에서 0.542, 1시간에서 0.615, 2시간에서 0.612, 3시간에서 0.668, 6시간에서 0.624였으며, Pazeo® 10%에서 LDH 농도는 30분에서 0.524, 1시간에서 0.645, 2시간에서 0.667, 3시간에서 0.701, 6시간에서 2.048이었고, Pazeo® 15%에서 LDH 농도는 30분에서 0.520, 1시간에서 0.677, 2시간에서 0.682, 3시간에서 1.406, 6시간

**Figure 2.** LDH levels started to increase rapidly after 3 hours in groups exposed to 5%, 10% and 15% Patanol® (0.1% olopatadine; Alcon, Fort Worth, TX, USA), Pataday® (0.2% olopatadine; Alcon) or Pazeo® (0.7% olopatadine; Alcon). Only 15% concentration of Pazeo® increased LDH titer after 2 hours. LDH = lactate dehydrogenase. \*  $p < 0.05$  by analysis of variance.

에서 2.331이었다.

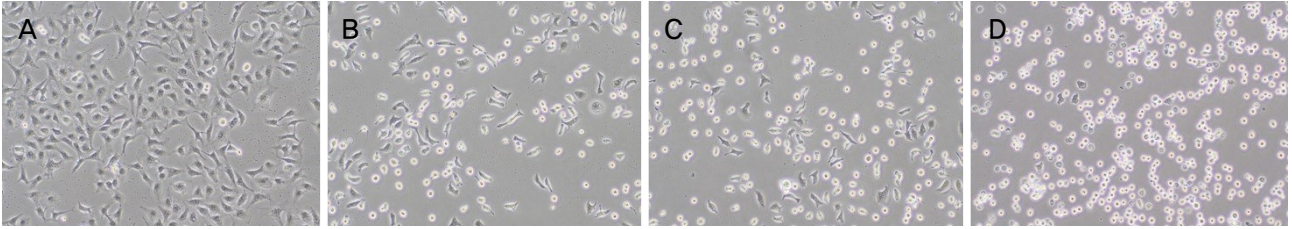
세 가지 약제의 5% 농도에서는 시간에 따른 변화가 거의 없었으나, 10% 이상의 농도에서는 결막세포에서 3시간째부터 세포외로 유리된 LDH 수치가 급격히 증가하였고, 약제의 농도가 15%로 높아질수록 LDH 수치는 유의하게 증가하였다. Pazeo®의 경우는 10% 농도에서는 LDH 증가가 3시간부터 일어났으나, 약제 15% 농도에서 약제 노출 2시간째부터 급격하게 수치가 증가하여 세포의 손상을 초래하였다(Fig. 2).

#### 결막세포의 형태학적 비교

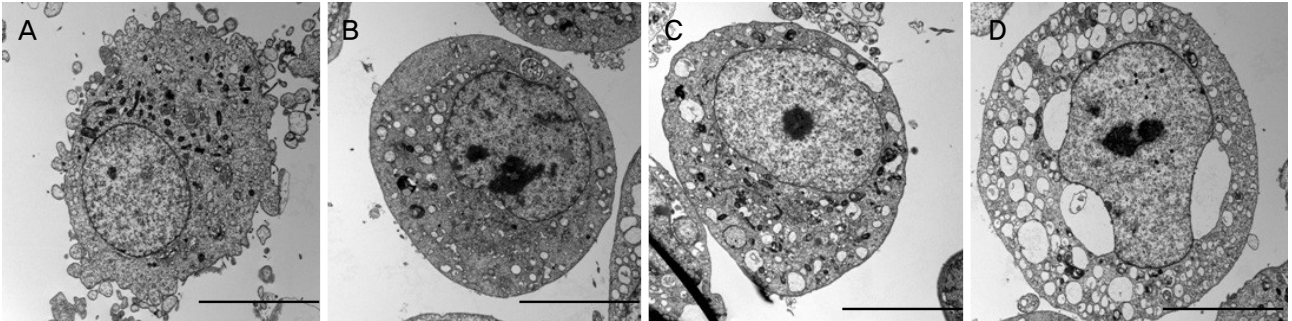
역상광학현미경으로 관찰한 결막세포는 대조군의 경우, 원주 혹은 입방형으로 핵은 뚜렷하지 않지만 수가 많아 뾰뾰한 양상을 나타내었으나(Fig. 3A), Patanol®, Pataday®, Pazeo® 점안약에 3시간 동안 접촉한 결막세포들은 LDH 수치가 높아지면서 세포의 모양은 둥글어지고 그 수가 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 3B-D).

결막세포의 전자현미경 소견은 대조군에서는 원형질막에 미세융모가 있으면서 세포질과 핵질의 형태가 균일하게 관찰되었고(Fig. 4A), 세 약제의 10% 농도에서 3시간 접촉하였을 때는 Patanol® (Fig. 4B), Pataday® (Fig. 4C), Pazeo® (Fig. 4D) 점안약의 순서로 세포질 내 세포소공들이 관찰되었지만, 세포질막이나 핵막의 심각한 손상은 관찰되지 않았다.





**Figure 3.** Inverted light microscopy of rabbit conjunctival cells taken after 3 hours of exposure to three agents at 10% concentration ( $\times 200$ ). (A) Control, (B) 10% Patanol<sup>®</sup> (Alcon, Fort Worth, TX, USA), (C) 10% Pataday<sup>®</sup> (Alcon), (D) 10% Pazeo<sup>®</sup> (Alcon). Conjunctival cells of control maintained elongated, spindle-shaped appearance. But the number of cells in (B) and (C) was decreased, and (D) showed even less.



**Figure 4.** Transmission electron micrography of rabbit conjunctival cells taken after 3 hours of exposure to three agents at 10% concentration (bar length 2  $\mu$ m, original magnification,  $\times 8,000$ ). (A) Control, (B) 10% Patanol<sup>®</sup> (Alcon, Fort Worth, TX, USA), (C) 10% Pataday<sup>®</sup> (Alcon), (D) 10% Pazeo<sup>®</sup> (Alcon). Conjunctival cells exposed to olopatadine showed loss of microvilli, vacuole formation, and disrupted nuclear membrane.

## 고 찰

최근 알레르기결막염의 치료에는 olopatadine 점안약제가 흔히 사용되고 있는데, 항알레르기 점안약제가 각막 및 결막세포에 손상을 일으킨다는 많은 보고가 있으며, 이에 본 연구에서도 항알레르기 약제인 Patanol<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, Pazeo<sup>®</sup> 점안약이 결막세포에 미치는 영향을 비교 분석하고자 하였다.

임상적으로 흔히 사용되는 항알레르기 점안약인 olopatadine 점안약제를 결막세포에 접촉한 후 세포의 증식억제력을 관찰한 결과, Patanol<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, Pazeo<sup>®</sup> 약제에 각각 노출되어 배양된 결막세포에서는 접촉 후 1시간째부터 세포의 증식 억제가 관찰되면서, Pataday<sup>®</sup>와 Pazeo<sup>®</sup>의 경우 3시간째부터 세포의 억제가 현저하게 나타났고, Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 15% 농도에서는 2시간째부터 현저한 세포증식의 억제가 관찰되었다. Pazeo<sup>®</sup> 점안액에 노출 후 2시간째부터 현저한 세포의 증식 억제력이 나타난 것은 내포하고 있는 olopatanol hydrochloride 농도가 높은 데서 기인한 것으로 설명된다. 뿐만 아니라 Pataday<sup>®</sup>, Pazeo<sup>®</sup>의 경우, 약제에 노출된 지 6시간이 지나면 세가지 농도 5%, 10%, 15% 농도

모두에서 현저한 세포의 증식 억제가 관찰되어 노출 시간이 오래될수록 세포의 증식이 억제됨을 알 수 있다.

이전에 발표된 항알레르기 점안액과 LDH의 농도에 대한 Byon et al<sup>8</sup>의 연구 결과를 살펴보면 10%, 20% Patanol<sup>®</sup>에 노출된 토끼 결막세포의 LDH는 지속적으로 1.5 이하로 유지되다가 30% 농도에서는 4시간째 2.0 이상의 최고치를 보였는데, 이에 Byon et al<sup>8</sup>은 Patanol<sup>®</sup> 약제의 농도가 높을수록, 노출 시간이 오래될수록 LDH 수치가 증가하는 양상을 보이는 반면, 노출 시간이 24시간 내인 경우 핵막의 손상은 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 결막세포가 Patanol<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, Pazeo<sup>®</sup> 세 약제에 각각 5%, 10%, 15% 농도로 노출되었고, 5% 농도에서는 세 약제 모두 LDH 수치가 의미 있는 변화를 보이지 않았다. 그러나 10% 농도에 노출된 후 3시간째부터 세포 외로 유리된 LDH 수치가 급격히 증가하였고, 특히 15% 농도의 Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 노출 2시간째부터 급격하게 수치가 증가하여 약제의 농도가 높을수록, 노출 시간이 오래될수록 세포의 심한 손상을 초래한 것과 유사한 결과치를 보여주고 있다. 또한, 본 연구의 전자현미경 소견에서 olopatadine 계열의 약제 모두에서 세포질 내의 소공이나 변화는 관찰되지만 세

포질막과 핵막의 손상은 관찰되지 않았는데, Byon et al<sup>8</sup>의 연구에 의하면, 결막세포가 Azelastine hydrochloride 0.05% (Azelan<sup>®</sup>; Taejoon, Seoul, Korea)와 Ketotifen fumarate 0.025% (Zaditen<sup>®</sup>; Novartis, Basel, Switzerland)의 약제에 24시간 내 노출될 경우 세포질막이나 핵막의 손상이 관찰되는 반면, olopatadine 약제는 세포질막이나 핵막의 심한 손상은 관찰되지 않아 본 연구의 결과와 일치하는 결과를 얻었다. 전자현미경에서 세포의 독성에 관한 형태학적인 손상이 적다는 의미는, 노출된 약제의 농도가 낮거나 혹은 약제의 노출 시간이 짧아 세포의 형태학적 변화가 적거나 혹은 세포의 형태학적 변화가 확연하게 나타나기 이전의 경우로 생각해 볼 수 있다. 본 연구는 LDH 측정실험에서 3시간 이상 노출된 시점부터 LDH 수치가 급격히 증가하는 것으로 보아, 3시간이 지난 시점부터 직접적인 형태학적 세포막의 손상이 일어날 것으로 생각되어, 향후 이 시점이 지난 노출 시간에서 전자현미경 검사가 필요할 수 있을 것이다.

임상적으로 사용되는 점안약이 안구에 영향을 미치는 요인에는 약제의 농도, 전해질 구성, pH, 삼투압, 비중 및 보존제의 성분 등이 있다. 본 연구에 사용된 점안약의 경우 olopatadine hydrochloride 약제가 Patanol<sup>®</sup> 점안액은 1.11 mg/mL, Pataday<sup>®</sup> 점안액은 2.22 mg/mL, Pazeo<sup>®</sup> 점안액은 7.76 mg/mL 내포되어 있어, 약제의 농도에 의한 차이가 결막세포에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 본 연구에서 olopatanol hydrochloride 농도가 높을수록, 노출 시간이 길수록 결막세포에 미치는 영향력이 크다는 결과는 이미 국내에 발표된 연구 보고와도 일치함을 알 수 있다.<sup>8,10</sup>

약제의 구성 성분 중 특히 삼투압과 전해질의 불균형도 세포손상에 많은 영향을 주며,<sup>11</sup> 세포의 생존유지에 관여하는 세포외액의 전해질 조성은 Na<sup>+</sup>의 경우는 142.0-152.7 mEq/L, K<sup>+</sup> 경우는 4.3-4.6 mEq/L, Cl<sup>-</sup> 경우는 104.0-117.4 mEq/L로 알려져 있다.<sup>12</sup> Patanol<sup>®</sup>에서는 Na<sup>+</sup>이 172.7 mEq/L, K<sup>+</sup>이 0.35 mEq/L, Cl<sup>-</sup>가 100.6 mEq/L였으며, Pataday<sup>®</sup>는 Na<sup>+</sup>가 178.4 mEq/L, K<sup>+</sup>이 0.32 mEq/L, Cl<sup>-</sup>가 108.4 mEq/L로 세포외액의 조성에 비해 Na<sup>+</sup>값은 높고 K<sup>+</sup>값은 낮은 것으로 나타났다. 이런 농도의 차이가 미치는 세포의 영향에 관한 연구는 없기에 이와 연관된 연구의 필요성은 존재하나 두 약제 간의 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 전해질 측정이 되지 않았는데, 약제 자체의 농도가 Patanol<sup>®</sup>이나 Pataday<sup>®</sup>보다 훨씬 높아 측정 기계의 민감성으로 전해질의 농도 측정이 불가능하다고 생각된다. 그리고 세포외액의 pH는 7.0-7.7 범위일 때 세포의 생명 현상이 유지되는 것으로 알려져 있으며,<sup>13</sup> 세 가지 약제의 경우 모두 7.1-7.2로 유사한 범위에 속해 있어 차이는 없었다. 삼투

압의 불균형도 심한 세포손상을 야기할 수 있는데, 일반적으로 세포에 손상을 주지 않는 삼투압은 260-320 mosm/kg이며,<sup>14</sup> 본 연구에서 Patanol<sup>®</sup>의 경우는 302 mosm/kg, Pataday<sup>®</sup>는 300 mosm/kg, Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 300 mosm/kg으로 모두 유사한 수치를 보였다.

그리고 점안약에 보존제를 첨가하게 되는데, 이 성분이 세포손상을 유발하는 주요한 원인으로 간주된다.<sup>15,16</sup> 세포손상을 일으키는 대표적인 보존제로 Benzalkonium chloride가 있는데, 장기간 사용하는 경우에 각막의 내피세포에 심한 변성이 발생할 수 있다는 보고가 있다.<sup>17</sup> 임상적으로 사용되는 용량은 0.0001-0.0125%이며, 작용기전은 세포막에서 친지질성 성분으로 존재하면서 전해질이 세포 내로 들어갈 수 있도록 세포막의 성질을 바꾸어 세포 내의 전해질 농도에 변화를 초래하여 세포의 손상을 초래한다.<sup>18</sup> 임상적으로 사용되는 0.002-0.004%의 적은 농도에서도 상피세포의 손상을 일으킬 수 있다고 보고하고 있어,<sup>19</sup> 이런 보존제가 함유된 점안약을 장기간 사용할 경우 약제의 선택에 매우 신중을 기해야 한다. 본 연구에서는 세 약제 모두 Benzalkonium chloride 0.1 mg/mL가 첨가되어 있어 약제간의 세포에 미치는 형태 차이는 비교할 수 없을 것으로 생각한다.

대조군의 결막세포는 광학현미경 소견에서 시간의 경과에 따른 변화 없이 길쭉한 모양의 세포가 밀집된 양상으로 관찰되고, 전자현미경에서는 뚜렷한 원형질막의 미세융기와 균질한 세포질과 세포 내 미세기관, 핵질 등을 관찰할 수 있다. 항알레르기 점안약에 접촉하여 세포의 변형이 유발되는 경우는 시간의 경과에 따라 세포의 수가 감소되면서 세포부종과 함께 세포의 형태가 둥근 모양으로 변화를 동반한다. 전자현미경의 소견은 약제의 독성이 심할수록 원형질막의 미세융모가 소실되고 세포질 내 소공이나 미세기관의 확장 및 원형질막의 손상, 나아가 핵막의 손상 등이 관찰된다. 본 연구의 결과에서 Pazeo<sup>®</sup> 10% 농도에서 3시간 노출 시 LDH 수치의 급격한 증가와 더불어 원형질막의 미세융모 소실, 세포질 내 소공이나 기관의 확장이 가장 심하게 관찰되었지만, 세포질막이나 핵막의 손상은 관찰되지 않아 항히스타민과 비만세포 안정화 작용을 가지고 있는 다른 다작용 점안약제인 Azelan<sup>®</sup>, Zaditen<sup>®</sup>보다 세포의 변화가 적게 나타나 비교적 안전성이 인정되기도 한다.<sup>8</sup>

Olopatadine 계열의 항알레르기 약제는 임상에서 널리 사용되며, 환자의 필요에 의해 종종 장기간 사용하기도 한다. 이에 대표적인 olopatadine 약제 3가지가 토끼의 결막세포에 미치는 형태학적 변화와 독성을 농도와 노출 시간에 따라 비교해보았다. 세 가지 약제에서 가장 큰 차이는 olopatadine hydrochloride 자체의 농도이며, 그 외 pH의 변

화, 삼투압, 보존제 등은 유의한 차이가 없었다. Patanol<sup>®</sup>과 Pataday<sup>®</sup>의 전해질 농도에도 유의한 차이는 없었으나 Pazeo<sup>®</sup>의 경우는 고농도 약제로 인한 측정기계의 민감성으로 전해질 측정이 되지 않아 전해질 비교에 한계성이 있었다. 또한 세 약제 모두 첨가제의 종류가 상이하여 첨가제를 배제한 조건에서의 연구도 필요할 것으로 생각된다. 일련의 실험 결과, 고농도 약제인 Pazeo<sup>®</sup>는 물론, Patanol<sup>®</sup>이나 Pataday<sup>®</sup> 또한 장기간 노출될 경우 세포 독성을 나타내었다. 따라서 항알레르기 점안액 사용 시 반드시 점안 주기를 지키고 지나치게 자주 점안하지 않도록 교육시켜야 할 것이다. 항알레르기 약제 외에 인공누액을 같이 사용하는 것도 도움이 될 것으로 생각된다. 그러나 토끼에 비해 인체에 서의 결막이나 각막의 경우 약제에 대한 반응의 정도 차이가 있기에 실제 임상 적용을 위해서는 향후 점안약의 주성분이나 약제의 성상, pH 등에 의한 직접적인 연구도 필요하다고 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:805-16.
- 2) Bielory L. Therapeutic targets in allergic eye disease. *Allergy Asthma Proc* 2001;22:25-8.
- 3) Kidd M, McKenzie S, Steven I, et al. Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1206-11.
- 4) Abelson MB, Ferzola NJ, McWhirter CL, Crampton HJ. Efficacy and safety of single- and multiple-dose ketotifen fumarate 0.025% ophthalmic solution in a pediatric population. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:551-7.
- 5) Kempuraj D, Asadi S, Zhang B, et al. Mercury induces inflammatory mediator release from human mast cells. *J Neuroinflammation* 2010;7:20.
- 6) Yamaguchi M, Azuma H, Fujihara M, et al. Generation of a considerable number of functional mast cells with a high basal level of FcεRI expression from cord blood CD34+ cells by co-culturing them with bone marrow stromal cell line under serum-free conditions. *Scand J Immunol* 2007;65:581-8.
- 7) Yanni JM, Miller ST, Gamache DA, et al. Comparative effects of topical ocular anti-allergy drugs on human conjunctival mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79:541-5.
- 8) Byon IS, Park JS, Lee JE, Lee JS. The effects of anti-allergic ophthalmic agents on the cultured rabbit conjunctival cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2006;47:1340-8.
- 9) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 10) Kim SJ, Yoon TJ, Lee JE, Lee JS. Comparison of the efficacy of topical antihistamine/mast cell stabilizers in vitro. *J Korean Ophthalmol Soc* 2010;51:406-17.
- 11) Wee WR, Wang XW, McDonnell PJ. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. *Cornea* 1995;14:273-9.
- 12) Park Y. Physiology of body fluid. In: Kang DH, ed. *Physiology*, 5th ed. Seoul: Sin-Kwang Publishing & Printing, 2000; chap. 5.
- 13) Kim K. Acid-base balance. In: Sung HK, KIM KH, eds. *Physiology*, 5th ed. Seoul: Eui-hak Publishing & Printing, 1996; 326-7.
- 14) Freshney R. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: Freshney R, ed. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 3rd ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1994; 71.
- 15) Burstein NL, Klyce SD. Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:899-911.
- 16) Pfister RR, Burstein N. The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol* 1976;15:246-59.
- 17) Lemp MA, Zimmerman LE. Toxic endothelial degeneration in ocular surface disease treated with topical medications containing benzalkonium chloride. *Am J Ophthalmol* 1988;105:670-3.
- 18) Green K, Tonjum A. Influence of various agents on corneal permeability. *Am J Ophthalmol* 1971;72:897-905.
- 19) Lee JS, Oum BS, Kim CD. Cytotoxicity of benzalkonium chloride on the corneal epithelial cell of rabbit. *J Korean Ophthalmol Soc* 1998;39:1326-33.



= 국문초록 =

## 올로파타딘이 토끼 결막세포에 미치는 독성 비교

**목적:** 임상에 사용되는 항알레르기 약제인 올로파타딘의 농도 및 노출 시간에 따라 토끼 결막세포에 독성을 얼마나 미치는지에 대해 비교하고자 하였다.

**대상과 방법:** 배양된 토끼의 결막세포에 Patanol<sup>®</sup> (0.1% olopatadine hydrochloride; Alcon, Fort Worth, TX, USA), Pataday<sup>®</sup> (0.2% olopatadine hydrochloride; Alcon), Pazeo<sup>®</sup> (0.7% olopatadine hydrochloride; Alcon)를 사용하여 각각 5%, 10%, 15% 농도별로 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 접촉시킨 후 비교하였다. Methylthiazoltetrazolium, lactate dehydrogenase를 측정하였으며, 약제의 구성 성분과 더불어 광학 및 전자현미경을 사용하여 세포의 형태학적인 변화를 비교 관찰하였다.

**결과:** 세 약제 모두 15% 농도에서 현저한 세포증식 억제를 나타냈고, Pataday<sup>®</sup>, Pazeo<sup>®</sup>는 10% 농도에서도 노출 6시간이 지나면 세포의 증식을 현저히 억제하였다. 젖산탈수소효소 수치는 약제 노출 3시간째부터 증가하였는데, 15% pazeo<sup>®</sup>는 2시간째부터 젖산탈수소 효소 수치가 증가하였다. Olopatadine hydrochloride 농도가 높은 Pazeo<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, Patanol<sup>®</sup> 순으로 결막세포의 형태적 변성이 나타났다.

**결론:** 올로파타딘 계열의 약제 중 농도가 높은 Pazeo<sup>®</sup>, Pataday<sup>®</sup>, Patanol<sup>®</sup> 순으로 결막세포의 손상이 초래되었지만, 심각한 손상인 세포질막이나 핵막의 손상은 없었다.

〈대한안과학회지 2019;60(12):1176-1184〉

정영환 / Young Hwan Jeong

부산대학교 의과전문대학원 안과학교실  
Department of Ophthalmology,  
Pusan National School of Medicine

