

## 토끼 눈에서 플라스민과 히알루론산분해효소의 약리적 유리체용해능력 비교

김무상<sup>1</sup> · 문상웅<sup>2</sup> · 김응석<sup>3</sup> · 유승영<sup>1</sup> · 곽형우<sup>1</sup>

경희대학교 의과대학 안과학교실<sup>1</sup>, 인제대학교 의과대학 서울백병원 안과학교실<sup>2</sup>, 중앙대학교 의과대학 안과학교실<sup>3</sup>

**목적:** 플라스민, 히알루론산분해효소, 이들의 혼합물이 유리체를 용해시키는 능력을 알아보고자 한다.

**대상과 방법:** 36 마리의 토끼를 12마리씩 3군으로 나누고, 우안에 각각 플라스민, 히알루론산분해효소, 이들의 혼합물을 유리체강내 주사하고 좌안에 인산염완충생리식염수를 주사하여 대조안으로 삼았다. 전체 유리체 중 액화되지 않은 부피를 측정하여 대조안 및 각 군의 결과를 비교하였다.

**결과:** 대조군 36안에서 24시간 지난 후 겔 상태인 유리체 부피는 전체의  $74.7 \pm 2.4\%$ 였다. 플라스민을 주사한 군에서  $56.7 \pm 2.4\%$ , 히알루론산분해효소를 주사한 군에서  $56.1 \pm 2.0\%$ , 이들의 혼합액을 주사한 경우  $44.6 \pm 2.1\%$ 의 겔 상태 유리체가 남았다. 각 군 모두 대조안에 비해 유의하게 우수한 유리체용해능력이 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 플라스민과 히알루론산분해효소 각 군 간 비교에서 유리체용해능력은 유의한 차이를 보이지 않았으나 이들의 혼합물을 주입한 군에서 효소를 단독으로 주입한 군보다 유의하게 더 큰 유리체용해가 관찰되었다( $p < 0.05$ ).

**결론:** 토끼 눈에서 플라스민과 히알루론산분해효소는 유리체를 액화시키는 능력이 있을 것으로 생각된다.

(대한안과학회지 2009;50(6):911-918)

약리적 유리체용해(pharmacologic vitreolysis)는 유리체 망막질환에서 유리체 역할을 약물로 제거함으로써 질병의 경과를 호전시키는 새로운 치료의 개념이다.<sup>1</sup> 유리체 망막질환에서 유리체는 질병의 진행과 밀접한 연관이 있는데, 당뇨망막병증 등에서 발생하는 신생혈관은 망막에서 시작하여 유리체 후면을 따라 증식하게 되고 이러한 경우 유리체 제거는 치료에 도움을 줄 것으로 생각된다.<sup>2</sup> 또한 황반원공이나 유리체황반견인증후군(vitreomacular tractional disease)에서 유리체의 견인력을 제거하는 것 역시 치료의 중요한 과정이며, 당뇨황반부종이나 낭포황반부종에 있어서도 유리체의 제거는 치료에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.<sup>3-5</sup> 한편, 약리적 유리체용해는 유리체절제술의 보조수단으로도 사용이 가능하다. 특히, 젊은 환자의 유리체절제술 시 후유리체박리의 어려움이 예상되는 경우 후유리체박리를 유발할 수 있는 약물을 수술과 동시에 사용하면 많은 도움을 받을 수 있을 것이다.<sup>6,7</sup> 따라서 약리적 유리체용해는 보다 덜 침습적이고 값싸며 안전한 치료의

대안으로서 임상적 발전 가능성이 클 것으로 생각된다. 약물을 이용하여 후유리체박리를 유발하기 위해서는 두 가지의 과정을 구분하여 고려하여야 한다. 첫 번째 과정은 겔 상태의 유리체가 용해되어 일부는 액화되고 일부만이 겔 상태의 유리체로 남겨지는 과정, 즉 겔 상태의 유리체 부피가 감소되는 과정이다. 두 번째는 유리체가 망막으로부터 완전히 분리되는 과정이다.<sup>8-10</sup> 약물을 이용한 유리체 분리에서 이 두 가지의 과정은 반드시 동시에 일어나야 한다. 만약 유리체가 용해되어서 부피가 감소하였으나 유리체와 망막이 완전히 분리가 일어나지 않는다면, 망막에 가해지는 견인이 오히려 증가하여 망막열공 등의 심각한 합병증을 유발할 수 있을 것이다.<sup>1,2,10</sup>

따라서 약물을 임상적으로 사용하기 이전에 이들 약물의 유리체용해 능력과 유리체를 망막으로부터 분리시키는 능력의 정도를 농도와 시간에 따라서 면밀히 검사함이 필요하게 된다. 유리체를 액화시키는 효소로 가장 많이 알려진 것은 히알루론산분해효소(hyaluronidase)이며, 이들은 유리체의 중요한 구조물인 히알루론산(hyaluronic acid)을 분해한다.<sup>10,11</sup> 유리체를 망막으로부터 분리시킬 수 있을 것으로 생각되는 효소로서 가장 많이 연구된 것은 플라스민(plasmin)으로, 이들은 유리체-망막의 접착력에 중요한 라미닌(laminin)과 파이브로넥틴(fibronectin)을 쉽게 분해할 수 있다.<sup>12-14</sup> 최근 이상의 두 가지 효소를 단독으로 혹은 함께 사용하여 유리체 망막질환의 치료에 이용하고자 하는

■ 접수 일: 2008년 8월 25일 ■ 심사통과일: 2009년 3월 2일

■ 통신저자: 곽 형 우

서울시 동대문구 회기동  
경희대학교병원 안과  
Tel: 02-958-8455 Fax: 02-966-7340  
E-mail: hwkwak@khmc.or.kr

\* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제95회 춘계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

많은 연구가 시도되었다.<sup>15</sup> 그러나, 각각의 효소를 단독으로 혹은 혼합해서 안구에 주입하였을 경우 시간에 따라 유리체액화가 얼마만큼 진행되는가에 대한 정량적 연구는 시행된 바가 없었다.

이에 저자들은 유리체를 용해시킬 것으로 생각되는 히알루론산분해효소와 유리체와 망막을 분리시킬 것으로 생각되는 플라스민을 대상으로 이들이 실제로 유리체를 용해시킬 수 있는지에 대한 검증이 필요하다고 생각했다. 또한 이들 효소를 각각 혹은 혼합하여 주입 후 시간에 따른 유리체용해의 차이가 있는지를 검사해보기로 하였다. 이를 위해 토끼 눈을 이용하여 유리체액화 정도를 비교할 수 있는 방법을 알아보고, 각각의 약물을 유리체강에 주입하였을 경우 시간에 따라 유리체가 얼마나 액화되는 지를 검사해 보았다.

### 대상과 방법

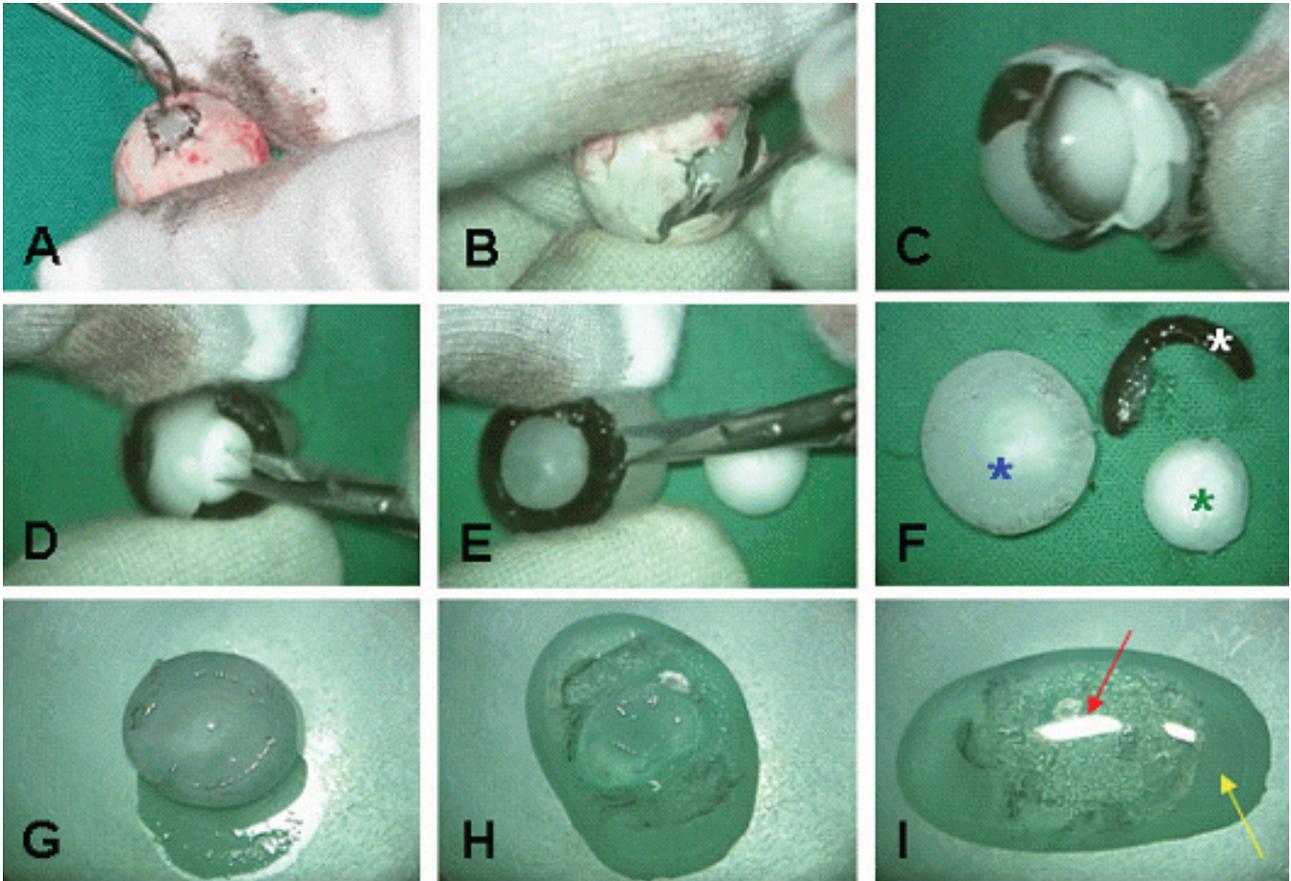
유색토끼 36마리(1.5 kg~2.0 kg)를 임의로 3군(A군 12마리, B군 12마리, C군 12마리)으로 나누고 1% cyclopentolate hydrochloride (Cyclogyl<sup>®</sup>, Alcon)와 2.5% phenylephrine hydrochloride (BAUSCH & LOMB)를 사용하여 양안을 산동시켰다. 플라스민(Lyophilized human plasmin, Calbiochem, La Jolla, CA)과 히알루론산분해효소(Lyophilized ovine testicular hyaluronidase, Calbiochem, La Jolla, CA)를 -20℃에서 보관하다가 평형염기용액(balanced salt solution (BSS))에 용해시켜 원하는 농도를 얻어 사용하였다. 모든 토끼의 오른눈에는 플라스민 또는 히알루론산분해효소를 주사하여 실험안으로 사용하였고, 왼눈에는 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 주사하여 대조안으로 삼았다. B군에는 플라스민 1U를 평형염기용액 0.1 mL에 용해하여 단독으로 주사하였고 C군은 히알루론산분해효소(10 U/0.1 mL)를 단독 주사하였다. A군은 향후이 두 효소의 혼합 사용 가능성을 평가해보기 위하여, 플라스민 1 U와 히알루론산분해효소 10 U를 인산염완충식염수 0.1 mL에 용해하여 주사하였다. 왼눈에는 대조안으로서 인산염완충식염수 0.1 mL를 유리체강내 주사하였다. 유리체강내 주사 전 모든 토끼는 케타민(ketamine) 150 mg을 근육주사하여 완전히 마취시킨 후, 개검기를 이용하여 눈을 벌리고 30계이지 바늘로 앞방천자를 시행하였다. 그 후, 각막윤부 2 mm 뒤쪽에 플라스민 및 히알루론산분해효소를 30계이지 바늘을 이용하여 유리체강내 주사하였다. 주사 후 항생제안약(Cravit<sup>®</sup>)을 점안하였다. 효소의 시간에 따른 유리체용해능력의 차이를 보기 위하여, 각 군의 12마리 가운데 6마리는 주사 1시간 후에 안구를 적출하였고 나머지 6마리는 24시간 후에 안구 적출을 시행하였다. 안구 내에서 유리체만

을 분리하기 위하여 액화질소를 이용하였다.<sup>16</sup> 즉, 적출한 안구는 즉시 -196℃ 액체질소(liquid nitrogen)에 약 30초간 넣어서 급속 냉동시킨 후, 얼린 조직이 녹기 전에 지체 없이 각막, 공막, 홍채, 수정체, 맥락막을 벗겨내어 순수한 유리체만을 분리할 수 있었다. 액화질소 용기에서 안구를 꺼낸 뒤 약 1분 후에 결빙되었던 조직들이 녹기 시작하므로 그 전에 유리체를 분리하여야 하였다. 결빙되어 분리된 유리체는 상온에서 결빙이 풀리면서 겔 상태와 액화된 상태의 유리체로 분리되었다. 이때 즉시 액화된 유리체와 겔 상태의 유리체를 따로 분리할 수 있었고, 각각의 부피를 마이크로 피펫을 이용하여 측정하였다(Fig. 1). 겔 상태의 유리체는 수술 현미경의 강한 조명 아래에서 10분 뒤에 완전한 액체로 액화되며 이를 마이크로 피펫을 이용하여 측정할 수 있었다. 이를 이용하여 전체 유리체의 부피에 대해 겔 상태로 남은 유리체의 백분율(remained volume of gel type vitreous)을 구할 수가 있었고 이를 통계의 지표로 사용하였다. 통계분석은 SPSS 11.0 for Windows를 이용하였고, 비교분석은 개체의 수가 작은 점을 고려하여 비모수적 방법인 Wilcoxon signed rank test 및 Kruskal-Wallis test를 이용하였으며 유의수준 0.05 미만을 유의한 의미가 있다고 보았다.

### 결 과

우선, 액화질소를 이용한 유리체 분리와 여기에서 겔 상태의 유리체와 액화된 상태의 유리체를 분리하는 방법의 유용성을 판단하기 위하여 아무런 처치도 하지 않은 4안의 유색가토의 안구를 적출하여 겔상의 유리체와 액화된 상태의 유리체의 부피를 측정하여 보았다. 결과 평균 80.7%의 겔 상태의 유리체를 분리할 수 있었으며, 나머지 19.3%는 이미 액화된 상태로 분리되었다.

플라스민을 단독으로 주사한 B군에서 1시간 후 안구 적출을 한 6안에서는 평균 60.3±2.1%, 24시간 후 적출한 6안에서는 평균 56.7±2.4%의 겔 상태의 유리체가 측정되었다. 히알루론산분해효소를 단독으로 주사한 C군에서는 1시간 후 적출한 눈에서 평균 59.2±3.6%, 24시간 후 적출한 눈에서 평균 56.1±2.0%의 남은 겔 상태의 유리체 부피가 측정되었다. 플라스민과 히알루론산분해효소의 혼합액을 주사한 A군에서 1시간 후 적출한 눈에서 평균 52.5±2.3%, 24시간 후 적출한 눈에서 평균 44.6±2.1%의 겔 상태의 유리체가 측정되었다. 한편 대조군으로 주사한 인산염완충식염수의 경우 주사 후 1시간에 적출한 18안에서는 평균 76.5±2.5%, 24시간 후에 적출한 18안에서는 평균 74.7±2.4% 정도의 겔 상태의 유리체 부피가 측정되었다(Table 1, 2).



**Figure 1.** Photographs of the experimental process. (A, B and C) Peeling the sclera, choroid, retina tissue of frozen rabbit eyeball. (D, E) Removal of the cornea, aqueous humor, iris and lens of frozen eyeball. (F) Separated frozen vitreous, lens and iris respectively (Blue asterisk: vitreous green asterisk: lens white asterisk: iris). (G, H and I) Melting the vitreous at room temperature (red arrow: gel type vitreous yellow arrow: fluid type vitreous).

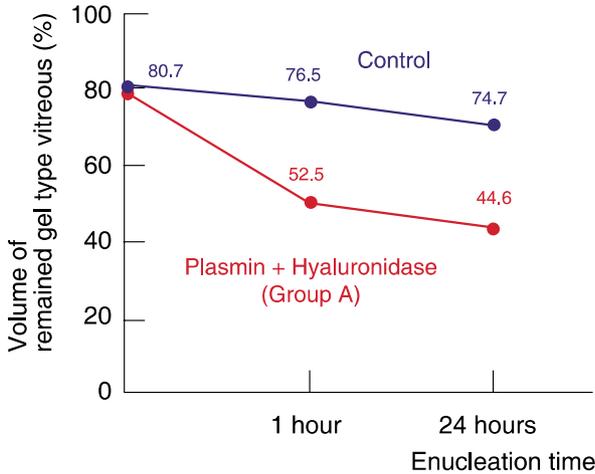
플라스민과 히알루론산분해효소의 혼합액을 주사한 A군 (Fig. 2)의 평균 남은 겔 상태의 유리체 부피는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 작았으며(1시간  $p=0.000$ , 24시간  $p=0.000$ ), 플라스민 단독으로 주사한 B군(Fig. 3)의 평균 남은 겔 상태의 유리체 부피 역시 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 부피가 작게 측정되었다(1시간  $p=0.000$ , 24시간  $p=0.000$ ). 히알루론산분해효소 단독으로 주사한 C군 (Fig. 4)도 대조군에 비해 유의하게 부피가 작게 측정되었다 (1시간  $p=0.000$ , 24시간  $p=0.000$ ). A군에서는 24시간 후

적출한 눈에서 1시간 후 적출한 눈보다 통계적으로 유의하게 남은 겔 상태의 유리체 부피가 작게 측정되었고( $p=0.018$ ), B군 역시 24시간 후 적출한 눈에서 통계적으로 유의하게 부피가 작았다( $p=0.000$ ). 그러나 히알루론산분해효소 단독으로 주사한 C군에서는 1시간과 24시간 후에 남은 겔 상태의 유리체 부피가 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다( $p=0.179$ )(Table 1). 남은 겔 상태의 유리체 부피는 플라스민과 히알루론산분해효소의 혼합액을 주사한 A군이 플라스민을 단독으로 주사한 B군이나 히알루론산분해효소

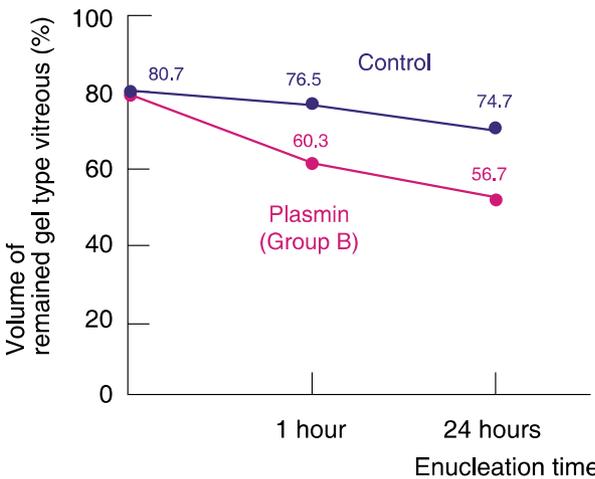
**Table 1.** The mean volume of remained gel type vitreous

	Mean volume of gel type vitreous		$p$ -value <sup>II</sup>
	I hour after enucleation	24 hours after enucleation	
Group A*	52.5±2.3%	44.6±2.1%	$p=0.018$
Group B <sup>†</sup>	60.3±2.1%	56.7±2.4%	$p=0.000$
Group C <sup>‡</sup>	59.2±3.6%	56.1±2.0%	$p=0.179$
Control <sup>§</sup>	76.5±2.5%	74.7±2.4%	

\* Group A=plasmin 1 U+hyaluronidase 10 U; <sup>†</sup> Group B=plasmin 1 U; <sup>‡</sup> Group C=hyaluronidase 10 U; <sup>§</sup> Control=phosphate buffered saline (PBS) 0.1 mL; <sup>II</sup> Comparison between 1 hour after injection and 24 hours after injection.

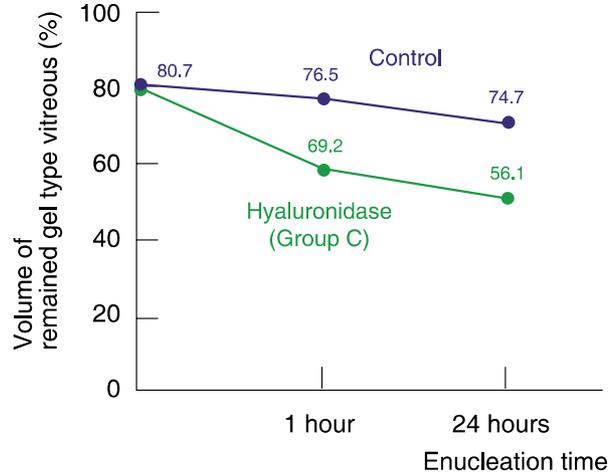


**Figure 2.** Comparison of the plasmin and hyaluronidase injection group with the control group. At 1 hour after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 52.5% and 76.5% in group A and the control group, respectively. At 24 hours after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 44.6% and 74.7%, respectively. Volume of gel type vitreous per whole vitreous showed statistically significant difference between group A and the control group (1 hour:  $p=0.000$ ; 24 hours:  $p=0.000$ ).



**Figure 3.** Comparison of the plasmin injection group with the control group. At 1 hour after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 60.3% and 76.5% in group B and the control group, respectively. At 24 hours after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 56.7% and 74.7%, respectively. Volume of gel type vitreous per whole vitreous showed statistically significant difference between group A and the control group (1 hour:  $p=0.000$ ; 24 hours:  $p=0.000$ ).

를 단독으로 주사한 C군에 비해 통계적으로 유의한 차이를



**Figure 4.** Comparison of the hyaluronidase injection group with the control group. At 1 hour after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 69.2% and 76.5% in group C and the control group, respectively. At 24 hours after enucleation, volume of gel type vitreous per whole vitreous was 56.1% and 74.7%, respectively. Volume of gel type vitreous per whole vitreous showed statistically significant difference between group A and the control group (1 hour:  $p=0.000$ ; 24 hours:  $p=0.000$ ).

보였으며 이는 주사 후 1시간에 적출한 경우( $p=0.000$ )와 24시간 후에 적출한 경우( $p=0.000$ )에서 모두 해당하였다. 플라스민을 단독으로 주사한 B군과 히알루론산분해효소를 단독으로 주사한 C군을 비교한 결과 유의한 차이를 보이지 않았다(1 hour:  $p=0.490$ ; 24 hours:  $p=0.647$ ). 이러한 결과를 바탕으로 각 물질들의 유리용해능력은 플라스민과 히알루론산분해효소의 혼합액이 가장 큰 유리용해능력을 가진 것으로 나타났으며, 플라스민과 히알루론산분해효소는 유의한 차이가 없었고, 대조군으로 사용한 인산염완충식염수가 가장 작은 것으로 나타났다(Table 2).

## 고 찰

실제로 약물을 이용한 유리체용해가 실용화되기 위해서는 약물에 의한 유리체의 부피 감소를 약물의 농도와 시간에 따라서 측정하여야 할 것으로 생각된다. 서론에서도 언급했듯이 망막과 유리체의 부착이 해결되지 않은 상태에서 과도한 유리체 부피의 감소는 오히려 망막의 견인을 증가시킬 위험이 있으며, 약물의 작용기전을 고찰하지 않은 상태에서 이를 사용함은 예기치 못한 위험성을 유발 할 수 있기 때문이다.<sup>8-10</sup> 플라스민에 의한 유리체와 망막의 분리 효과는 여러 연구에서 이미 증명된 바 있으므로 본 실험에서 저자들은 유리체강 내에 주입한 히알루론산분해효소와 플라스민이

**Table 2.** Comparison of the mean volume of remained gel type vitreous between groups (at 24 hours after injection)

		Mean volume of gel type vitreous (%)		<i>p</i> value
Group A*	Group B		56.7±2.4	0.000
	Group C	44.6±2.1	56.1±2.0	0.000
	Control <sup>§</sup>		74.7±2.4	0.000
Group B <sup>†</sup>	Group C	56.7±2.4	56.1±2.0	0.647
	Control		74.7±2.4	0.000
Group C <sup>‡</sup>	Control	56.1±2.0	74.7±2.4	0.000

\* Group A=plasmin 1 U+hyaluronidase 10 U; † Group B=plasmin 1 U; ‡ Group C=hyaluronidase 10 U; § Control=phosphate buffered saline (PBS) 0.1 mL.

유리체를 용해시키는 능력이 있음을 입증하고, 각 효소의 주입 후 시간에 따른 용해 정도를 측정하고자 하였다.<sup>8,9,17</sup> 이를 위해 유리체의 액화 정도를 정량적으로 측정하는 방법을 고안하여야 하였다. 현재까지 유리체의 액화 정도를 측정하는 몇 가지의 연구들이 시도된 바 있다. 우선, Tanaka and Qui<sup>9</sup>는 히알루론산분해효소를 주입한 안구의 유리체를 적출하여 이를 매달았을 때, 대조군보다 길게 늘어짐을 비교하여 유리체 액화가 진행하였음을 추정하였다. 이는 액화 정도를 대조군과 비교할 수는 있지만 정량적인 측정으로 보기 어려우며, 유리체 액화 정도를 다른 효소의 효과와 비교할 수는 없을 듯하다. Staubach et al<sup>14</sup>은 적출한 돼지 눈을 대상으로 히알루론산분해효소를 유리체강내 주사하고 1 port 유리체절제술을 시행할 경우, 일정한 시간에 대조군보다 더 많은 유리체가 제거됨을 이용하여 유리체 액화가 진행하였음을 추정하였다. 이는 간접적인 방법으로 유리체의 액화 정도를 평가할 수 있는 방법으로 생각되나, 전체적인 유리체 부피의 감소를 측정할 수 없다. 이에 저자들은 토끼의 유리체를 눈에서 분리하여 유리체 겔의 액화 정도를 부피로 비교하는 방법을 고안하고자 하였다. 즉, 액화질을 이용하여 안구를 급속히 얼린 후 유리체의 얼음조직만을 분리해낼 수 있었으며, 이들이 녹는 순간에 다시 겔 상태의 유리체와 액화된 상태의 유리체를 분리해 낼 수 있었다. 그러나 후유리체박리가 일어나지 않았던 어린 토끼의 눈에서 유리체를 분리해 본 결과 전체 부피의 80.7%만을 겔 형태로 얻을 수 있었고 나머지 19.3%는 이미 액화된 상태였다. 이러한 결과의 원인으로서 다음의 두 가지를 추측해 볼 수 있다. 첫 번째 원인은 급속 냉동하여 유리체만을 분리하였으나 유리체 얼음조각 주변부에 섬모체나 망막, 맥락막 조직들이 소량 붙어있는 경우가 있었다. 매우 미세한 조직들이지만 이런 조직에서 유출된 혈청 단백질분해효소가 실험

조작을 하는 사이에 유리체 액화를 진행시켰을 가능성이 있다.<sup>10,14</sup> 또 한 가지의 가능성으로는 급격한 냉동과 해동 등의 온도 변화에 의해 히알루론산 등의 유리체 구성 성분에 손상이 발생하고, 이로 인해 유리체의 액화가 진행하였을 가능성이 있다.<sup>10</sup> 이 경우는 효소에 의한 약리적 유리체용해라기보다는 유리체의 탈수 혹은 단순한 액화라고 말할 수 있을 것이다. 이처럼 유리체의 분리 시에 피할 수 없는 액화가 진행함은 효소를 이용하여 유리체용해의 정도를 정량적으로 비교하고자 하는 본 실험의 한계점으로 인정할 수밖에 없다. 그러나 유리체를 분리하는 과정에서 발생하는 유리체의 액화는 액화의 정도가 소량이며, 비교적 일정한 양을 보여서 위의 방법을 효소에 의한 유리체용해의 정도를 비교하는 본 실험에서 사용하기로 하였다.

본 실험에서 저자들은 플라스민과 히알루론산분해효소 등의 약물을 유리체강내 주사하고 1시간 후와 24시간 후에 안구를 적출하였다. 그 이유를 플라스민으로 예를 들어 설명하면, 플라스민을 유리체강 내에 주입하였을 경우 최대 작용시간은 주사 후 30분에서 1시간이며, 반감기는 주사 후 3시간이고, 24시간 뒤에는 소실된다.<sup>8,25</sup> 따라서 플라스민 등이 효소 고유의 작용으로 유리체를 액화시킬 수 있다면, 1시간 뒤의 적출한 눈에서 이미 대부분의 유리체가 액화될 것이다. 그렇지 않고, 플라스민 효소의 고유 작용 이외의 기전에 의해서 유리체가 액화된다면 24시간 뒤에 적출한 유리체에서 대부분의 유리체가 액화될 것으로 예상된다. 따라서 1시간 뒤에 가장 많은 유리체가 액화되었는지, 혹은 24시간 뒤에 가장 많은 유리체가 액화 되었는지를 관찰함은 각 효소의 작용 기전에 대한 고찰로서 의미가 있다.

히알루론산(hyaluronic acid)은 신체의 세포외바탕질(extracellular matrix)의 구성에 중요한 역할을 하는 다당류로서 글루쿠론산(glucuronic acid)과 글루코사민(glucosamin)의 반복된 결합으로 구성된다. 히알루론산은 세포외바탕질 내에서의 space filling network로서의 역할, 세포 등의 큰 조직들을 고정시키는 역할, 완충제로서의 역할 등을 수행한다. 유리체 내에서는 수분을 함유하는 고분자(macromolecule)를 형성하여 collagen fiber의 응집을 억제하는 역할도 수행하며, 결과적으로 유리체의 겔 형태를 유지하는 가장 중요한 미세구조로 생각되고 있다.<sup>10</sup> 히알루론산분해효소는 이러한 역할을 수행하는 히알루론산을 분해 혹은 변성시켜서 유리체의 액화를 유발할 수 있을 것으로 기대된다.<sup>18</sup> 그러나 동물 실험에서 유리체강 내에 주입한 소량의 히알루론산분해효소의 농도와 시간에 따르는 유리체 액화 정도를 측정할 실험은 아직 보고된 바 없다.<sup>11,18-20</sup> 저자들은 본 실험에서 살아있는 토끼의 유리체에 10 U의 히알루론산분해효소를 주사한 후 작용시간 1시간(*p*=0.000) 또는 24시간

후( $p=0.000$ )에 유리체를 분리하여 관찰한 결과, 대조군의 겔 부피에 비하여 유의하게 유리체 겔 부피가 감소됨을 증명하였다. 그러나 시간에 따른 유리체 액화 정도는 차이가 없었으며( $p=0.179$ ), 이는 뒤에 서술할 플라스민과 다른 결과이다(Table 1). 플라스민은 비특이적인 단백질분해효소로서 유리체-망막 경계면(vitreoretinal interface)에서 뒤 유리체피질과 내경계막을 결합시키는데 중요한 역할을 하는 라미닌과 파이브로넥틴을 분해하여 후유리체박리에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>21,22</sup> Verstraeten et al<sup>8</sup>은 토끼를 대상으로 한 실험에서 플라스민 1 U를 유리체강 내에 주입한 후 1시간 뒤에 유리체절제술을 실시하였으며, 대부분 후유리체박리가 일어나 있었음을 수술 도중 확인하여 보고하였다. 이는 플라스민이 유리체-망막의 접착력을 약화시킴으로써 얻어진 결과라고 추론할 수 있다. Gandorfer et al<sup>23,24</sup>은 적출한 돼지와 사람의 눈을 이용한 실험에서 다른 물리적인 조작 없이 플라스민 1 U만을 유리체강 내에 주사한 후에 1시간 뒤에 후유리체박리가 발생하였고, 플라스민 2 U를 주사한 경우에는 30분 뒤에 후유리체박리가 발생하였음을 보고하였다. 또한 마이크로플라스민(microplasmin)을 이용한 동물 실험에서 25  $\mu$ g의 마이크로플라스민을 주입한 후 1일 뒤에는 후유리체박리가 없었으나 3일이 경과한 후에 후유리체박리가 발생하였음을 보고하였다.<sup>25</sup> 이러한 Gandorfer의 실험들은 플라스민의 유리체강내 주사 이외에 다른 물리적인 조작 없이도 후유리체박리를 유발할 수 있음을 주장하고 있으며, 유리체강 내에 주사한 플라스민이 후유리체박리를 일으키는 효과가 주사한 효소의 양과 주사한 후의 시간에 비례한다는 사실을 보여준다. 또한 이러한 결과들은 플라스민이 유리체-망막 결합을 약화시킬 뿐 아니라 유리체를 액화시키는 능력이 있을 것이라는 추론을 가능하게 한다.<sup>23,24</sup> 유리체액화가 같이 진행하지 않는 상태에서 유리체-망막의 접착력 약화만으로 후유리체박리가 일어날 것이라고는 생각하기 어렵기 때문이다.<sup>1,2,10</sup> 또한, 유리체강 내에 주입한 플라스민이 최대로 활성화된 상태로 지속되는 시간은 1시간이며 24시간 뒤에는 효소의 활성이 소실된다. 그럼에도 불구하고 플라스민을 주입한 즉시에는 후유리체박리가 발생하지 않다가 시간이 지날수록(3일이 지난 후에) 후유리체박리가 발생한다는 사실은 기존에 알려진 플라스민의 작용 기전만으로는 설명할 수 없는 결과이다.<sup>25</sup>

이러한 이유에서 유리체강 내에 주입한 플라스민에 의해 유발될 수 있는 부수적인 작용 기전이 거론되어 왔다. 가장 가능성 있는 기전은 플라스민의 유리체강내 주입에 의한 matrix metalloproteinase (MMPs)의 활성화이다.<sup>25</sup> 최근의 연구 결과에 의하면 사람의 유리체에서 MMP-1, -2, -3, -9가 정상적으로 존재함이 밝혀졌으며<sup>26</sup>, 콜라겐을 분해할 수 있

는 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (Gelatinase B)의 활성화 과정에 플라스민이 참여한다는 사실이 보고된바 있다.<sup>27,28</sup> 유리체강 내에 주사한 플라스민이 콜라겐을 분해할 수 있는 MMP를 활성화시킬 수 있다면, 이러한 이차적인 효소의 활성화가 유리체의 액화에 관여할 수 있을 것이다. 따라서 플라스민의 유리체 주입 후 유리체의 액화가 진행되고, 시간이 지남에 따라서 후유리체박리가 더 잘 발생하는 결과를 설명할 수 있을 것이다.<sup>25</sup> 본 실험에서 플라스민을 주입한 후 1시간 뒤에 적출한 안구보다 24시간 후에 적출한 안구에서 의미 있게 유리체의 액화가 진행하였다( $p=0.00$ ). 히알루론산분해효소를 주입한 경우에는 1시간이 지난 경우와 24시간이 지난 경우에 유리체의 부피가 차이가 없었다( $p=0.179$ )는 점을 고려할 때, 플라스민의 경우에는 시간이 지나면서 계속하여 유리체의 액화를 진행시키는 다른 기전이 있을 수 있음을 시사한다고 생각된다.

한편, 최근에 유리체용해 물질(pharmacologic vitreolytic agent)에 대한 연구들이 진행되면서 각 약물의 장단점을 절충하기 위해서 두 가지 이상의 약물을 혼합해서 사용할 수 있을 것이라는 가능성이 Sebag<sup>1</sup>에 의해서 제안되었다. 히알루론산분해효소는 국소 마취 시 마취약의 조직내 이동을 돕는 점에서 국소마취제와 함께 사용되어 왔다. 히알루론산분해효소와 플라스민의 복합 주입은 각각의 약물 고유의 작용뿐만 아니라 히알루론산이 플라스민의 유리체강 내의 이동을 자유롭게 해 줄 수 있다는 점에서 약물의 효과를 더 크게 할 수 있는 가능성이 있다.<sup>10,18</sup> 이에 저자들은 이 두 가지의 약물을 혼합 주입하였을 경우 유리체의 상당 부분을 용해시킬 수 있을 것이라고 기대하였었다. 그러나 혼합 주입 후 24시간이 경과하였을 때 약 44.6%의 유리체 겔이 남아있음이 측정되었다.

저자들의 본 연구는 최근 활발히 진행되고 있는 약물을 이용한 후유리체박리에 관한 연구들의 고찰을 통해서, 논란이 되고 있는 작용 기전에 대한 의문점을 해결하기 위해 고안되고 실행되었다. 적출한 안구를 급속냉동시킨 후 녹는점의 차이를 이용하여 유리체액화 정도를 측정하는 방법을 통하여 저자들은 플라스민과 히알루론산분해효소의 혼합주입방식이 같은 시간 내에 플라스민과 히알루론산분해효소의 유리체강내 단독주사보다 더 많은 양의 유리체액화를 나타낸 것을 확인하였다. 향후 약물에 의한 유리체의 액화 정도를 측정하고, 겔 상태의 유리체 부피를 비교하는 과정에 있어서 좀더 정교한 연구가 필요하다고 생각되며, 이러한 결과를 바탕으로 약리적 유리체용해가 유리체절제술의 보조 수단으로서 임상적 사용에 도움을 줄 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- 1) Sebag J. Pharmacologic vitreolysis. *Retina* 1998;18:1-3.
- 2) Sebag J. Pharmacologic vitreolysis brewing? *Retina* 2002;22:1-3.
- 3) Hayreh SS, Jonas JB. Posterior Vitreous detachment: Clinical correlations. *Ophthalmologica* 2004;218:333-43.
- 4) Sebag J. Diabetic vitreopathy. *Ophthalmology* 1996;103:205-6.
- 5) Takahashi MK, Hikichi T, Akiba J, et al. Role of the vitreous and macular edema in branch retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers* 1997;28:294-9.
- 6) Sonoda K, Sakamoto T, Enaida H, et al. Residual vitreous cortex after surgical posterior vitreous separation visualized by intravitreal triamcinolone acetonide. *Ophthalmology* 2004;111:226-30.
- 7) Asami T, Terasaki H, Kachi S, et al. Ultrastructure of internal limiting membrane removed during plasmin assisted vitrectomy from eyes with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2004; 111:231-7.
- 8) Verstraeten TC, Chapman C, Hartzler M, et al. Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1993;111:849-54.
- 9) Tanaka M, Qui H. Pharmacological vitrectomy. *Semin Ophthalmol* 2000;15:51-61.
- 10) Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog-Retin Eye Res* 2000;19: 323-44.
- 11) Kuppermann BD, Thomas EL, de Smet MD, Grillone LR. Safety results of two phase III trials of an intravitreal injection of highly purified ovine hyaluronidase (Vitrace) for the management of vitreous hemorrhage. *Am J Ophthalmol* 2005;140:585-97.
- 12) Kim NJ, Yu HG, Yu YS, Chung H. Long term effect of plasmin on the vitreolysis in the rabbit eyes. *Korean J Ophthalmology* 2004;18:35-40.
- 13) Wang ZL, Zhang X, Xu X, et al. PVD following plasmin but no hyaluronidase: implication for combination pharmacologic vitreolysis. *Retina* 2005;25:38-43.
- 14) Staubach F, Nober V, Janknecht P. Enzyme-assisted vitrectomy in enucleated pig eyes: a comparison of hyaluronidase, chondroitinase, and plasmin. *Curr Eye Res* 2004;29:261-8.
- 15) Wang ZL, Zhang X, Xu X, et al. Pharmacologic vitreolysis combining the two enzymes plasmin and hyaluronidase. *Retina* 2005;25:674-5.
- 16) Howard M, Sen HA, Capoor S, et al. Measurement of adenosine concentration in aqueous and vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1942-6.
- 17) Kim DS, Moon SW, Yu SY, Kwak HW. The structure of the internal limiting membrane removed by vitrectomy using tissue plasminogen activator. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:917-24.
- 18) Gottlieb JL, Antoszyk AN, Hatchell DL, Saloupis P. The safety of intravitreal hyaluronidase. A clinical and histological study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2345-52.
- 19) Harooni M, McMillan T, Refojo M. Efficacy and safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of hyaluronidase. *Retina* 1998;18:16-22.
- 20) Kang SW, Hyung S, Choi MY, Lee J. Induction of vitreolysis and vitreous detachment with hyaluronidase and perfluoropropane gas. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:69-78.
- 21) Li X, Shi X, Fan J. Posterior vitreous detachment with plasmin in the isolated human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240:56-62.
- 22) Wang F, Wang Z, Sun X, et al. Safety and efficacy of dispase and plasmin in pharmacologic vitreolysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3286-90.
- 23) Gandorfer A, Putz E, Welge-Lussen U, et al. Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 2001;85:6-10.
- 24) Gandorfer A, priglinger S, Schebitz K, et al. Vitreoretinal morphology of plasmin-treated human eyes. *Am J Ophthalmol* 2001;133: 156-9.
- 25) Gandorfer A, Rohleder M, Sethi C, et al. Posterior vitreous detachment induced by microplasmin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:641-7.
- 26) Plantner JJ, Smine A, Quinn TA. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous. *Curr Eye Res* 1998;17:132-40.
- 27) Baramova EN, Bajou K, Remacle A, et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 1997;157:157-62.
- 28) Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999;274:13066-76.

=ABSTRACT=

## Comparison of Vitreolytic Effect in Rabbit Eyes: Plasmin, Hyaluronidase, and Their Mixtures

Moo Sang Kim, MD<sup>1</sup>, Sang Woong Moon, MD<sup>2</sup>, Eung Suk Kim, MD<sup>3</sup>,  
Seung Young Yu, MD<sup>1</sup>, Hyung Woo Kwak, MD<sup>1</sup>

Department of Ophthalmology, KyungHee University Hospital<sup>1</sup>, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Inje University College of Medicine, Seoul Paik Hospital<sup>2</sup>, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Chung-Ang University College of Medicine<sup>3</sup>, Seoul, Korea

**Purpose:** The aim of the present study was to quantify and compare the vitreolytic effect of plasmin, hyaluronidase, and a combination of the two.

**Methods:** Thirty-six rabbits were randomized into 3 groups: (A) twelve rabbits had an intravitreal injection of plasmin 1 U with hyaluronidase 10 U/0.1 mL into the right eye, (B) twelve rabbits had an injection of plasmin alone (1 U/0.1 mL), and (C) twelve rabbits had an injection of hyaluronidase alone (10 U/0.1 mL). The left eye of each rabbit was used as control, which was injected with 0.1 mL phosphate buffered saline (PBS). The eyes were enucleated 1 hour and 24 hours after injection. The volume of fluid-type vitreous and gel-type vitreous was measured with a micropipette using the melting point as the difference. Statistical analysis was performed and light microscopy was used to assess potential damage to the retinal tissue.

**Results:** The volume of remaining gel-type vitreous was measured as 52.5%, 60.3%, 59.2%, and 76.5% after 1 hour enucleation and as 44.6%, 56.7%, 56.1%, and 74.7%, after 24 hours enucleation in group A, B, C, and control group, respectively. Group A, B, and C showed statistically significant differences against the control group. Group A (plasmin with hyaluronidase) showed less remaining gel-type vitreous volume than a single injection of plasmin or hyaluronidase alone.

**Conclusions:** Intravitreal injection of plasmin with hyaluronidase showed more vitreolytic effect than a single injection of plasmin or hyaluronidase alone. The enzyme may be useful in liquefying the vitreous, and may be a useful biochemical adjunct to vitrectomy.

J Korean Ophthalmol Soc 2009;50(6):911-918

**Key Words:** Hyaluronidase, Intravitreal injection, Pharmacologic vitreolysis, Tissue plasminogen activator

---

Address reprint requests to **Hyung Woo Kwak, MD, PhD**  
Department of Ophthalmology, KyungHee University Hospital  
#1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-702, Korea  
Tel: 82-2-958-8455, Fax: 82-2-966-7340, E-mail: hwkwak@khmc.or.kr