

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	促進角膜切口傷口癒合的原型交聯凝膠開發 ： Development of Prototype Crosslinking Gel for Promotion of Corneal Incision Wou
------------	---

報 告 類 別 ： 成果報告
執行計畫學生： 呂伶
學生計畫編號： MOST 110-2813-C-040-061-B
研 究 期 間 ： 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指 導 教 授 ： 陳伯易

處 理 方 式 ： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 ： 中山醫學大學視光學系(所)

中 華 民 國 111年02月14日

促進角膜切口傷口癒合的原型交聯凝膠開發

Development of Prototype Crosslinking Gel for Corneal Incision Wound Healing Promotion

專題生: 呂伶

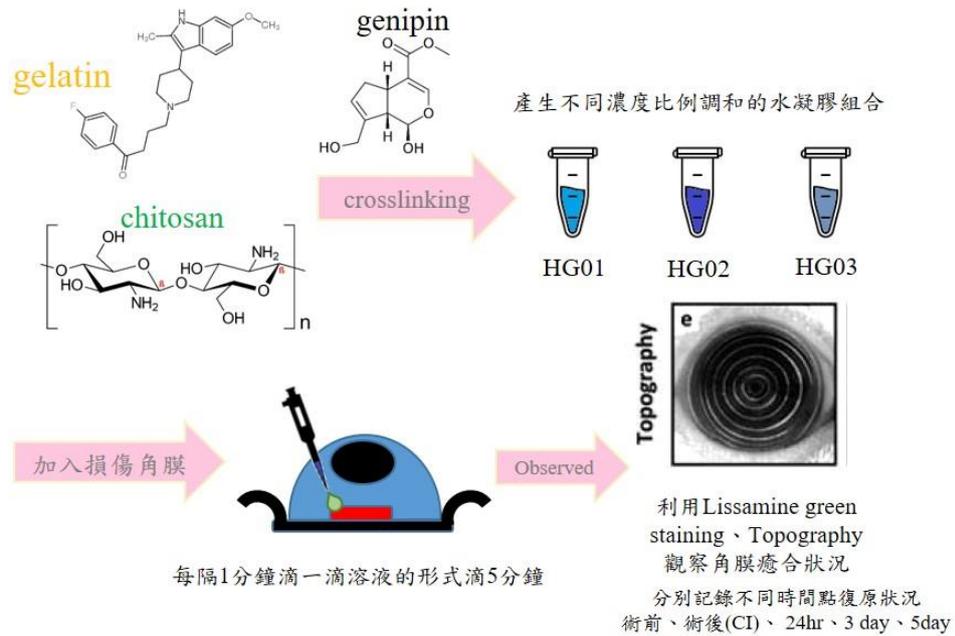
指導老師: 陳伯易 副教授

中文摘要

壹、緒論

白內障是目前全球造成失明以及視力障礙的主要原因，手術切除內囊狀硬核是目前唯一最直接處理的解決方法，然而不管是利用何種手術技巧，首先的共同點都會在角膜切出傷口，接著後續的手術操作目前多數醫生採取無縫線透明角膜切口技巧(clear corneal incisions/CCIs)，讓患者角膜自行癒合。然而一旦患者角膜癒合慢或癒合能力較差，可能使前房水增加或眼表液滲漏，或增加細菌感染的風險以及造成發炎反應。輕則可能使患者屈光改變、畏光、散光等，但嚴重可能引發虹膜脫垂或是急性眼內炎，而這些術後的發生的案例數是不容忽略。目前眼藥水的使用也無法直接強化手術切口的修復，另亦有報導認為長期使用眼藥水甚至可能抑制角膜復原。因此為了解決上訴問題，本研究想探討利用天然原型交聯劑 Genipin 組合 Chitosan、Gelatin 等活性載體組成不同性質的水凝膠，以動物模型來探討其是否可達到加速角膜的癒合速度的作用，開發**原型交聯凝膠雛型**用以減少術後造成的風險性。本研究利用小鼠模型模擬臨床白內障手術，參考目前最佳的白內障手術技巧，在小鼠角膜切長約 1.00 mm 左右的傷口比擬手術過程，術後在切口周圍加入相對應的凝膠(分成 HG01、HG02 以及 HG03 組) 驗證分析策略採取 Lissamine green staining、Topography 等表徵觀測技術在術前、術後(CI)、24hr、3 day、5day 等不同時間點紀錄小鼠角膜的復原狀況。預期實驗能達到計畫的核心目標，如：加速角膜癒合時間。待原型交聯凝膠雛型開發以及嘗試的試驗完成後，後續擬進行確認最佳水凝膠劑量，朝應用在臨床以減少醫療傷害的目標發展。

關鍵字：角膜小切口、角膜癒合、白內障手術、Genipin、Chitosan、Gelatin、水凝膠



第一節 研究背景與動機

眼表微創手術是現今眼睛疾病的治療方法，例如常見的白內障手術，然而在手術的過程中都會對角膜表面產生一定的傷痕，術後角膜上皮的傷口癒合，目前主要是靠病患周邊細胞自行補充，然而此方法可能會增加前房水增加或眼表液滲漏⁽¹⁾，甚至可能引發急性眼內炎，然而目前市售的眼藥水也無法解決上訴問題。據文獻了解 Genipin 為天然的生物組織固定交聯劑，Genipin 與 Chitosan、Gelatin 組成的混合水凝膠，目前也多方應用於其他生理部位的投藥以及組織細胞修復工程。

第二節 研究目的

角膜的癒合速度慢可能影響到會造成角膜細胞變性、細菌感染的炎性反應及角膜糜爛，常見的臨床表徵為表現為：創口處水腫、隆起、發炎性細胞浸潤等，嚴重都可能造成視力模糊、散光、畏光、疼痛甚至失明。故加速角膜癒合的速度有其必要性，因此本研究想探討由 Genipin 交聯的活性凝膠對受損角膜的修復速度，以動物模型探索是否有正向幫助。

第三節 研究假設

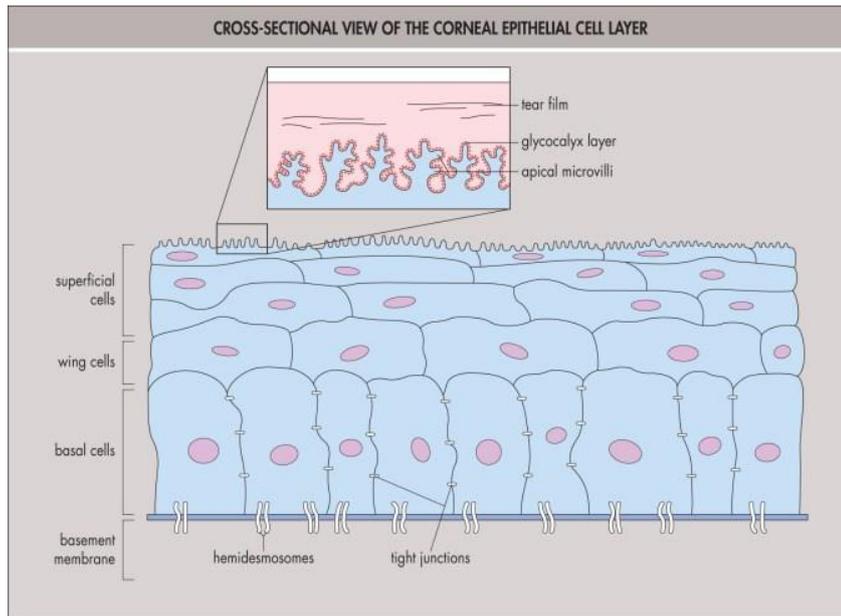
本研究利用小鼠模型，想探討以 Genipin 交聯不同的活性凝膠 Chitosan、Gelatin 對小鼠的角膜癒合的效果，以各類型觀測方法 Lissamine green staining、Topograph 評估術前、術後(CI)、24hr、3 day、5day 等不同時間點紀錄小鼠角膜的復原狀況。以動物實驗為基礎嘗試性的開發原型交聯凝膠離型。

貳、文獻探討

一、角膜

角膜(cornea)是位於眼表最外層的透明薄，健康成人的角膜厚度約 50.0~600 μ m，佔眼睛總屈光力約 70%。結構上由外而內依次分為五層：上皮細胞層、前彈力層(Bowman 層)、基質層、後彈力層(Descemet 膜)、內皮細胞層。上皮細胞層(Epithelium)為非角化鱗狀上皮，由表層到內層可以區分為表層細胞(superficial cells)、翼狀細胞(wing cells)、基底細胞(basal cells)如圖一。基質層佔角膜的 90%，主要由高度組織化的膠原蛋白製成，若有創傷或感染可能會導致角膜瘢痕形成。角膜上皮細胞受損可由基底細胞補充與骨橋蛋白(osteopontin)促進再生⁽²⁾，Descemet 膜則也可以再生，但 Bowman 層、基質層和內皮細胞層皆無再生能力。

白內障是當今全球致盲的首要原因⁽³⁾，目前唯一最有效的治療方式就是利用手術摘除，不管是何者手術方法，首先共同步驟便是會進行角膜小型切口來繼續後續操作。術後為了不增加更多的副作用以及成本考量，通常會採取無縫線透明角膜切口技巧(clear corneal incisions/CCIs)⁽⁴⁾，讓患者角膜自行復原，然而卻可能增加前房水增加或眼表液滲漏的風險，術後發生虹膜脫垂、急性眼內炎的案例也不可忽略。角膜的癒合速度影響到會可能會增加角膜細胞變性、各類細菌感染、炎性反應及角膜糜爛等風險性，在患者角膜可能表現出水腫、發炎性細胞浸潤的狀況，導致術後的屈光不足、散光、畏光、疼痛，甚至嚴重都可能造成失明⁽⁵⁾，然而目前市面上常使用的眼藥水成分，不但無法加速角膜癒合，長期使用甚至可能抑制角膜增生⁽⁶⁾；利用角膜縫合技術除了會增加病患的不適感，以及成本的提升，根據統計更可能並伴有嚴重的併發症，包括結膜下出血，且縫線因為可能改變傷口結構，使感染風險增加以及造成術後屈光的屈光問題。因此探討最適合的方法，以加速角膜癒合的速度，使術後角膜感染的風險降至最低，是有其必要性與利用價值。

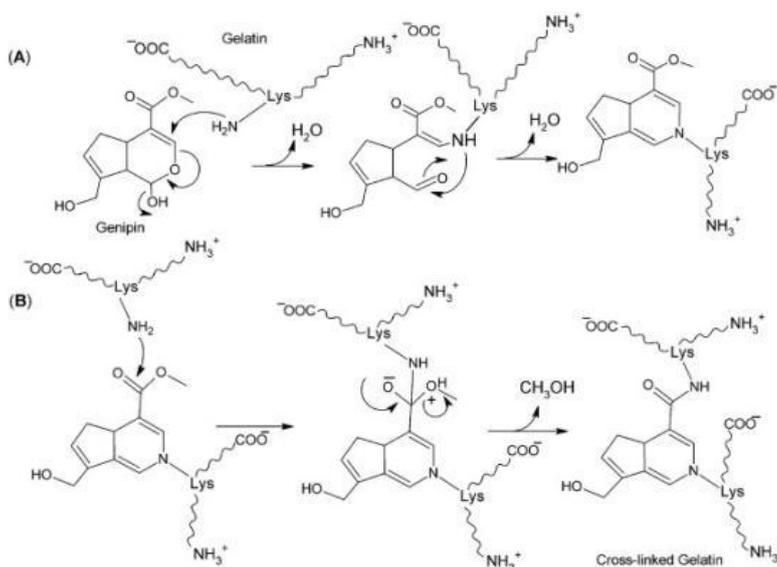


(圖一：<https://entokey.com/corneal-anatomy-physiology-and-wound-healing/>)

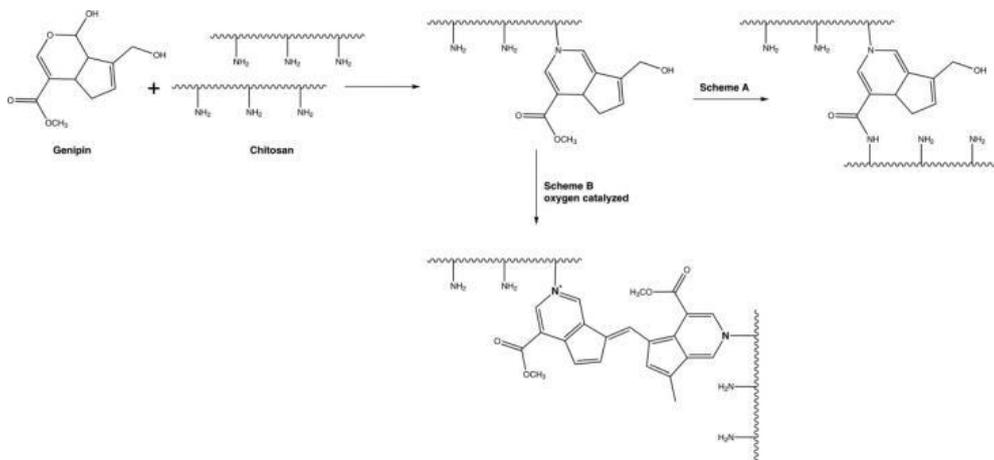
二、Genipin

Genipin 是一種在 *Genipa americana* fruit 發現的萃取物，也存在梔子花中，是來自 Geniposide 的糖苷配基。在傳統醫學中，已知其功用能當作抗癌藥、抗新生血管、抗氧化劑等，同時也是天然的交聯劑，其毒性也比戊二醛和其他常見的交聯劑低需多，目前常以 Genipin 搭配 Chitosan、Gelatin 等作為細胞修復的水凝膠載體^(7、8)。

Genipin 和 Gelatin、Chitosan 的交聯反應可以通過兩種不同的途徑發生，如圖二、三。第一種是 Gelatin、Chitosan 的氨基(—N)搶奪 Genipin 碳原子(C³)的電子，打開羰基(C=O)和 dihydropyran ring；另一種為 Gelatin、Chitosan 的氨基搶奪 Genipin 的羧基(—COOH)的電子，產生醯胺。



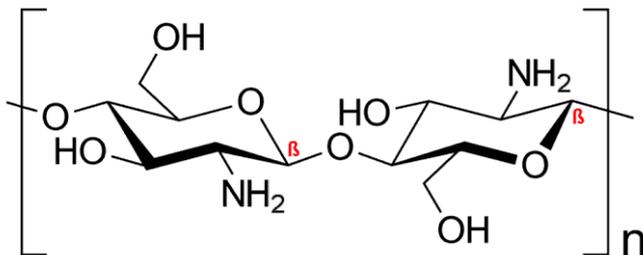
(圖二：<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.085>)



(圖三：<https://doi.org/10.1002/app.42256>)

三、Chitosan

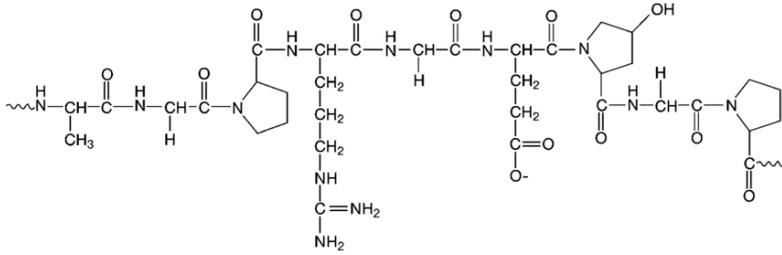
Chitosan 為生物活性多醣之一，在目前的醫療、工業、食品產業都是很重要也常見的活性聚合物。其功能包含了抗菌、無毒、易改性、生物相容性好，可生物降解和低致敏性等特性，使得能多性能應用。文獻指出，Chitosan 是目前具有前景的藥物輸送載體，在眼科與鼻科用藥已經廣泛利用⁽⁹⁾，且不同濃度的 Genipin 交聯修飾 Chitosan 對於角膜上皮細胞的修復也有良好的正向幫助⁽¹⁰⁾，具有更好的機械度以及更慢的降解速度。



(圖四：<https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>)

四、Gelatin

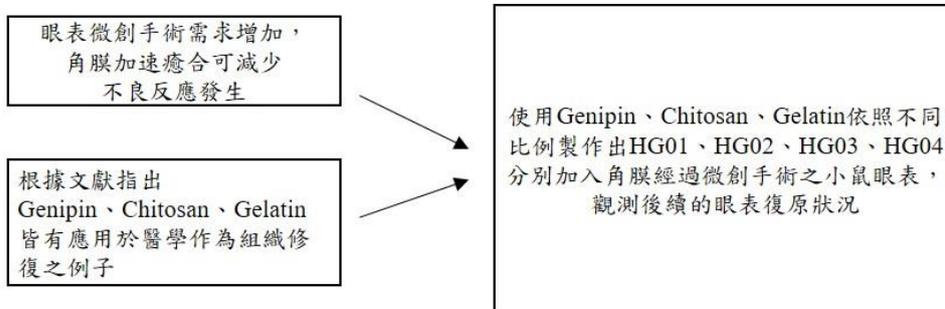
Gelatin 是由膠原水解得來的天然生物聚合物，也是有無毒、高生物相容性、可生物降解的特性，根據文獻研究，Gelatin 可以加速傷口的癒合與組織的修復，目前利用電紡得到的明膠奈米纖維技術，已經普及當作安全的傷口抗菌敷料應用⁽¹¹⁾。Gelatin 據研究也可以當作治療青光眼藥物的載體，可直接遞送至前房而無藥物傳輸障礙⁽¹²⁾。



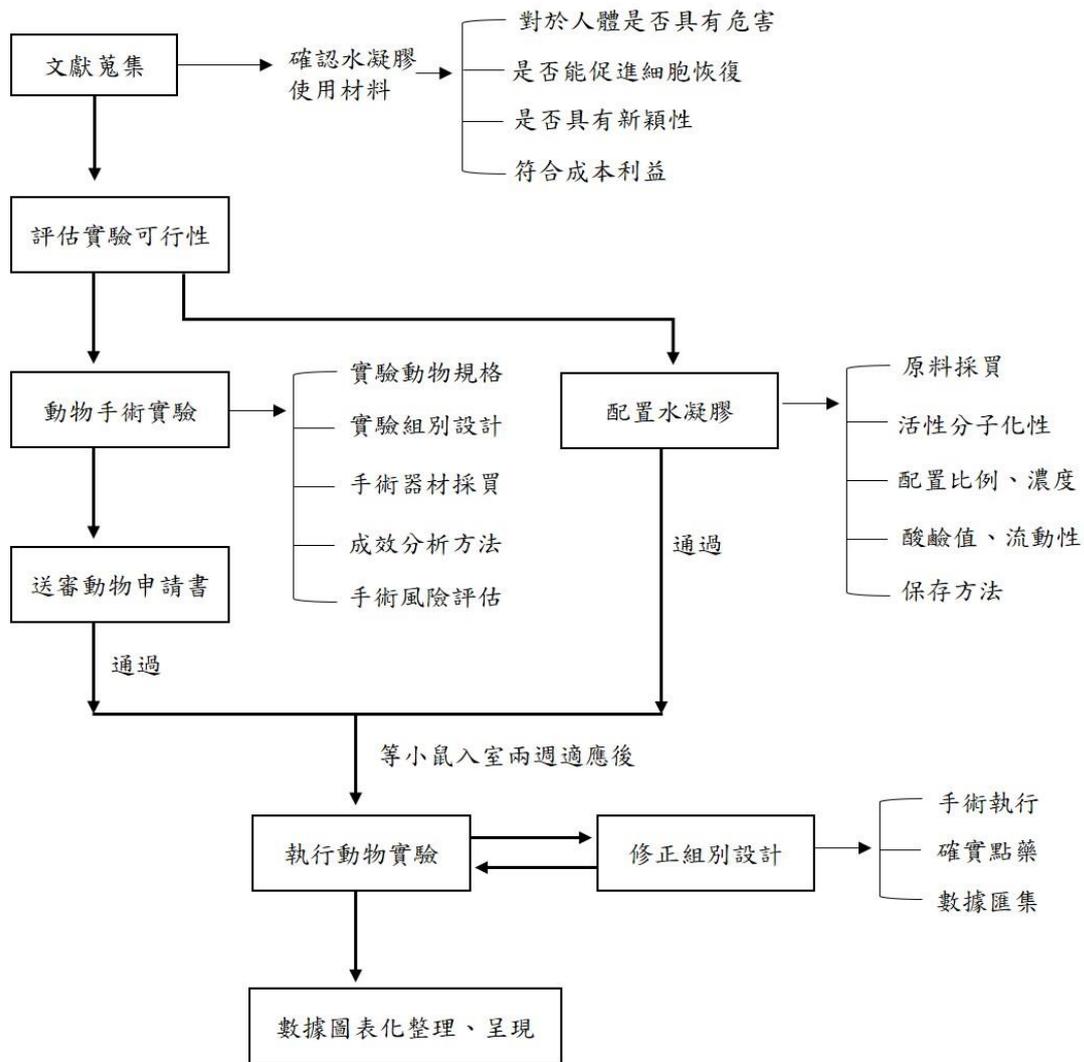
(圖五 https://www.researchgate.net/figure/Basic-chemical-structure-of-gelatin_fig3_228037349)

參、研究方法

第一節 研究步驟及研究架構



(圖六為研究架構圖)



(圖七為研究流程圖)

一、自變項

本實驗為探究利用不同成分、比例所配置而成水凝膠，對於角膜復原有無正向的幫助。實驗組為經過角膜微創手術後有點自製的活性水凝膠；控制組則為經過角膜微創手術後自行回復之組別。

二、控制變項

所有實驗小鼠皆為 ICR 品系雌性白鼠，實驗前皆入室兩週正常飼養，接受實驗小鼠的周齡控制在 7 週以後。需要點水凝膠組，為術後 30 分鐘內點上水凝膠，皆每隔 1 分鐘滴一滴溶液 (10-15 ul) (共 5 次)，共點一次。

第二節 研究對象

本實驗設計皆為 ICR 品系雌性白鼠小鼠，正式實驗前皆入室兩週正常飼養，接受實驗小鼠的周齡控制在 7 週以後，將小鼠分成兩個部分。

- 一、角膜手術動刀組：術後小鼠，會依照不同成分的的水凝膠組合，區分為 CI、CI+HG01、CI+HG02 以及 CI+HG03 組，術後 30 分鐘內點上水凝膠，CI 組則點上 PEG 400。藥水皆為每隔 1 分鐘滴一滴溶液 (10-15 ul) (共 5 次)，共點一組。
- 二、角膜手術對照組：此組為觀測水凝膠點在正常未動刀的小鼠角膜上有無不良反應，同樣依照不同成分的的水凝膠組合，區分為 Normal+HG01、Normal+HG02 以及 Normal+HG03 組，同上為組別為每隔 1 分鐘滴一滴溶液 (10-15 ul) (共 5 次)，共點一組。

第三節 研究工具

- 一、水凝膠備材：京尼平(梔子素) Genipin (GP)、明膠 Gelatin (GE)、殼聚糖 Chitosan (CS)、PEG 400、NaOH、acetic acid、pH meter
- 二、手術工具、藥品：ICR 品系小鼠、顯微鏡、1.0mm slit Knife、裂隙燈、1% Avertin、眼用抗發炎藥物 (紅力素眼藥膏)、愛爾卡因 0.5% 點眼液、Buprenorphine、鑷子
- 三、數據收集工具：Topography 耗材、Lissamine green staining 染劑。

第四節 資料處理及分析方法

一、調配水凝膠方法

1. 水凝膠備製

根據不同活性分子的化性，先將 50 mg GE、20 mg CS 溶解在醋酸中，形成 2 倍 Vehicle solution。接著使用 GP 經過 0.2 μ m sterile-EO 過濾器配置出 Stock solution。利用上述兩種 solution 組合成不同濃度的水凝膠樣品，中和過後經過流動性測試判斷是否符合本實驗需求，區分成 HG01、HG02、HG03 組。

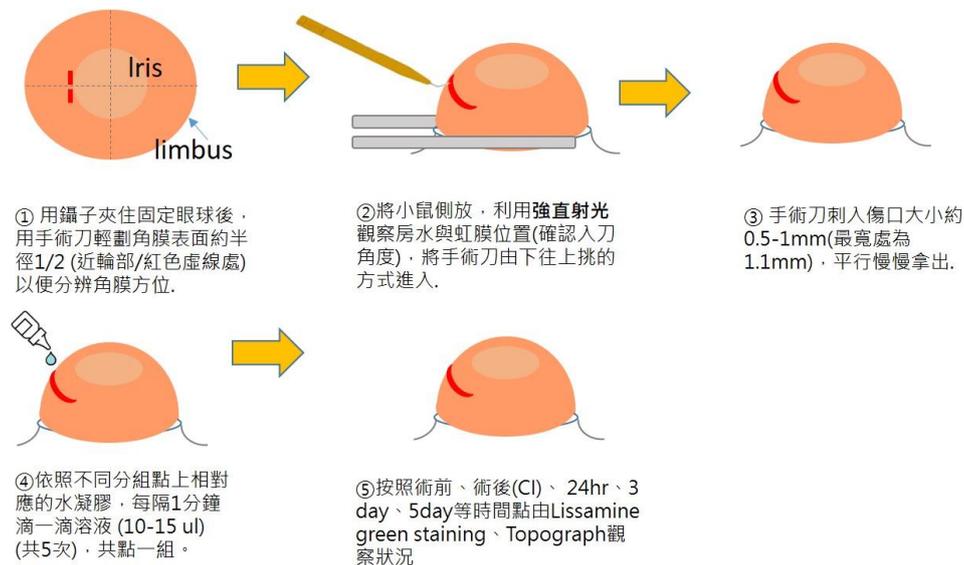
2. 流動性測定

經過不同溫度測試水凝膠凝結時間(Gelation time)，本實驗制定超過 30 分鐘以內皆未凝結，且凝結後有出現正常京尼平深藍色之濃度為符合本實驗需求。

二、手術執行

在小鼠腹腔注射 1% Avertin 進行全身性麻醉，以及點上眼睛局部性麻醉(0.5% Proparacaine hydrochloride ophthalmic solution)、散瞳劑(1% atropine sulfate,

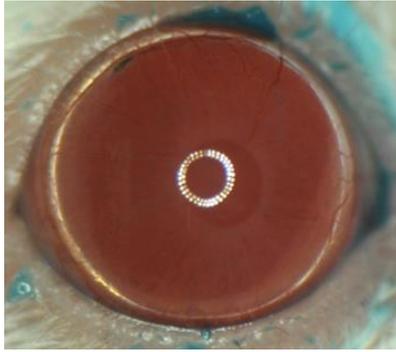
2.5% phenylephrine hydrochloride, and 0.5% proparacaine hydrochloride), 藉由眨眼反射及捏腳趾確定小鼠麻醉確實,術前點上紅力素軟膏以預防細菌感染。使用手術刀從角膜半徑 1/2(近輪部)切出約 0.1-0.15 cm 的傷口,術後兩天給予小鼠皮下注射止痛劑,並依照指定時間採集數據後犧牲。



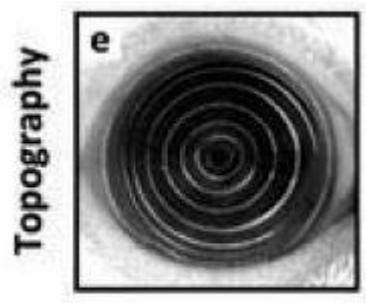
(圖八為術流程。)

三、數據分析方法

1. Lissamine green (Seidel) staining: 為一種常用的角膜染色方法,只會染色在受損的角膜上皮細胞,具有較好的耐受性與無毒性。滴入染劑 2-micro liter, 10 sec 後, washing 3 次,且在 washing 後皆做拍攝記錄,而本實驗取 washing 3 的照片為基準。根據本實驗目的「判斷角膜修復狀況」,利用 ImageJ 計算出總角膜面積與其染色所占的面積。此法可以用來追蹤觀察角膜術後癒合狀況⁽¹⁴⁾,如圖九 A。
2. Topography: 角膜地形圖分析藉由直接照射光或掃過角膜的反射光的投影進行分析,因此可以研究角膜的起伏和曲率,是追蹤角膜疾病不可忽略的測試之一。目前本實驗室以建立完整的評分標準。中心環(第一環)表示角膜的中心,一隻小鼠角膜包括 4 個圓弧(第二環到第五環)。根據本實驗目的為判斷角膜修復狀況,所以利用兩位獨立觀測員作分級評估,將斷裂的弧線得 1 分,最高分是 32 分⁽¹⁵⁾,再將兩位觀察員的評分取平均,為該角膜 Topography 得分。如圖九 B。



(圖九 A)



(圖九 B)

肆、研究結果

第一節 水凝膠備製成果

1. 調配水凝膠方法

(2X) Vehicle solution : [0.1% CS-0.04% GE- 0.2% 醋酸]

100 μ l 醋酸+ 50 mg CS + 20 mg GE + 加生理食鹽水至 50ml，儲存在 4°C。

1% Stock solution : 0.1 g/10 ml= 0.01g/ml= 1% w/v GP

Genipin 100mg +生理食鹽水加至 10ml，利用 0.2 μ m sterile-EO 過濾器備製，儲存在 4°C。

Working solution : 依照不同組別配置不同排列組合水凝膠濃度，利用 NaOH (1N)中和，區分成 HG01、HG02、HG03 組。

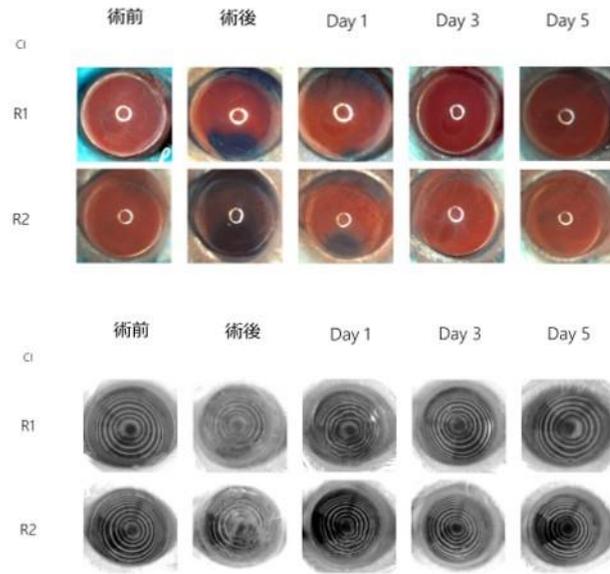
2. 流動性測定

經過不同溫度測試水凝膠凝結時間(Gelation time) (From 4 °C、25°C)，發現經過 40 分鐘後皆有良好的流動性，符合本實驗需求。

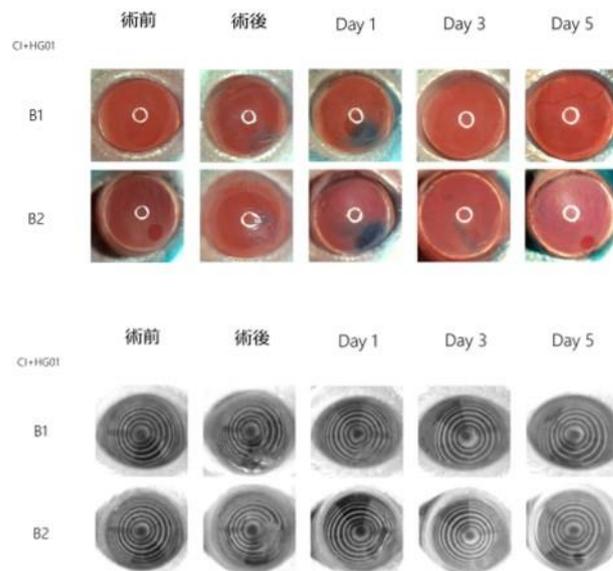
第二節 動物臨床結果

1. 角膜手術動刀組

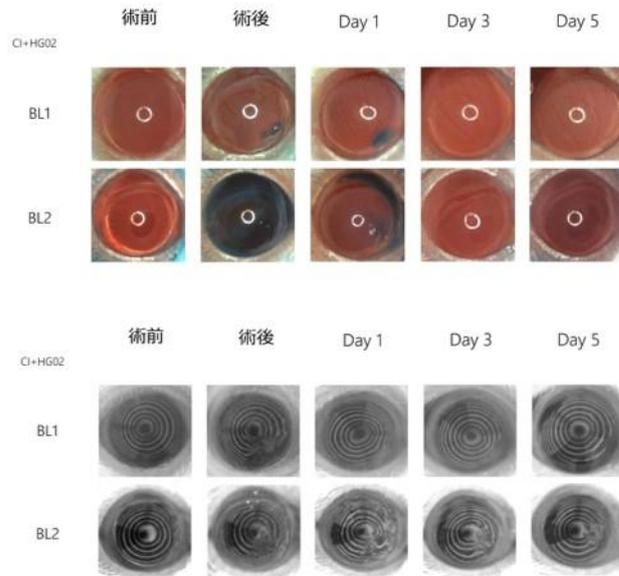
分成 CI、CI+HG01、CI+HG02、CI+HG03 組。經過角膜微創手術後，點上每組相對應的水凝膠，每隔 1 分鐘滴一滴溶液 (10-15 ul) (共 5 次)，共點一組。以下為經由 Lissamine green staining、Topography 匯集術前、術後(CI)、 24hr、3 day、5day 的資料。



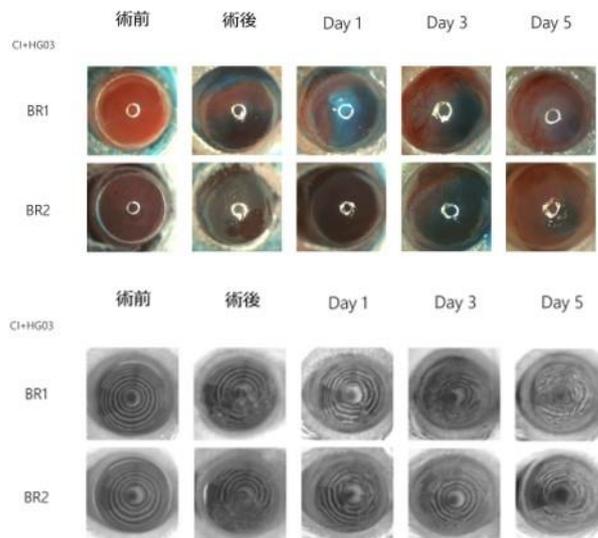
(圖十為 CI 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)



(圖十一為 CI+HG01 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)



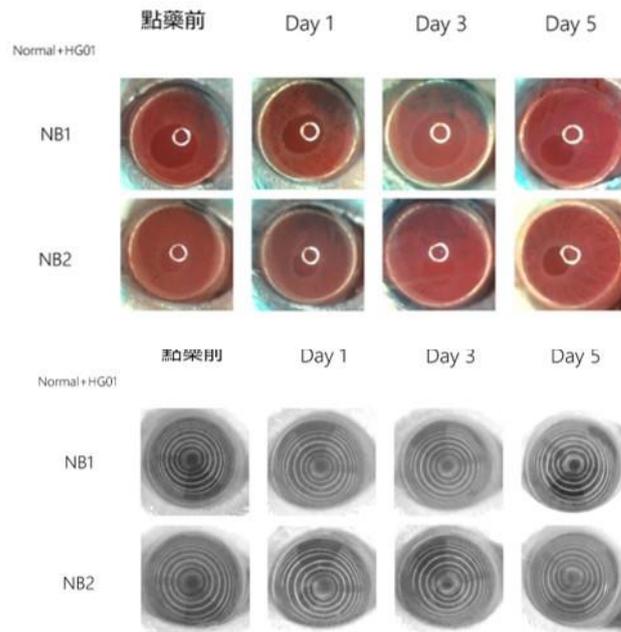
(圖十二為 CI+HG02 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)



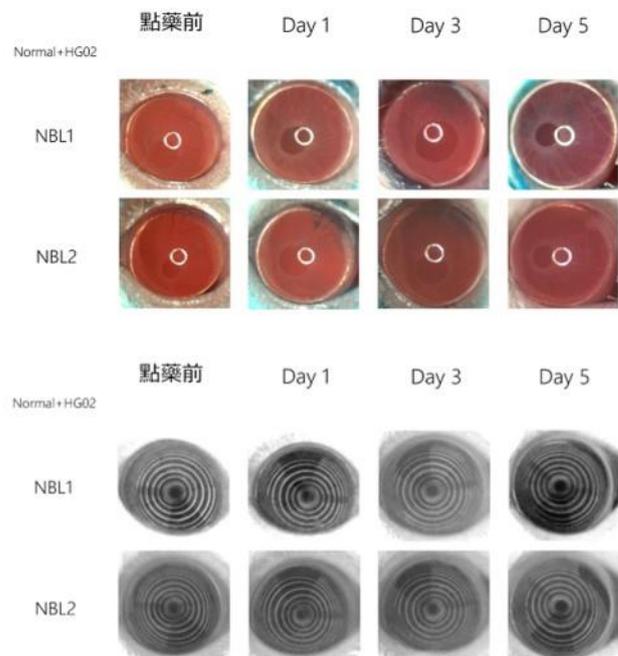
(圖十三為 CI+HG03 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)

2. 角膜手術對照組

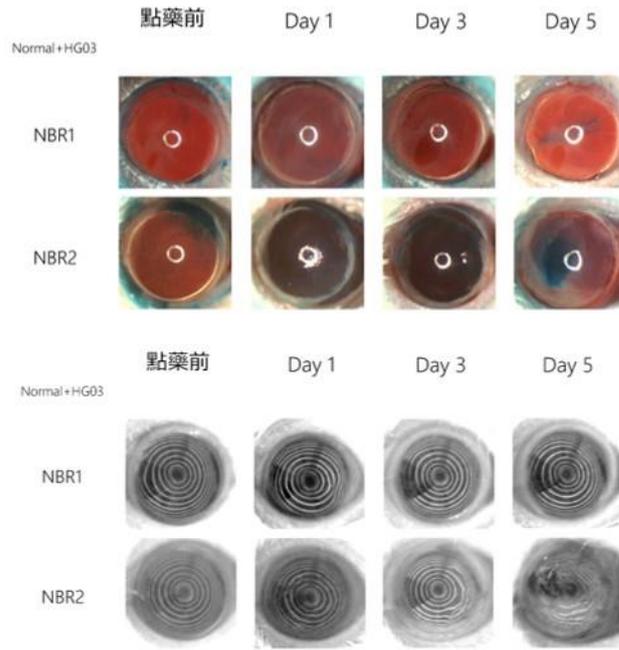
分成 Normal +HG01、Normal +HG02、Normal +HG03 組。不經過角膜微創手術，直接點上每組相對應的水凝膠，確認水凝膠對於正常角膜有無不良反應。每隔 1 分鐘滴一滴溶液 (10-15 ul) (共 5 次)，共點一組。以下為經由 Lissamine green staining、Topography 匯集點藥前、24hr、3 day、5day 的資料。



(圖十四為 Normal +HG01 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)



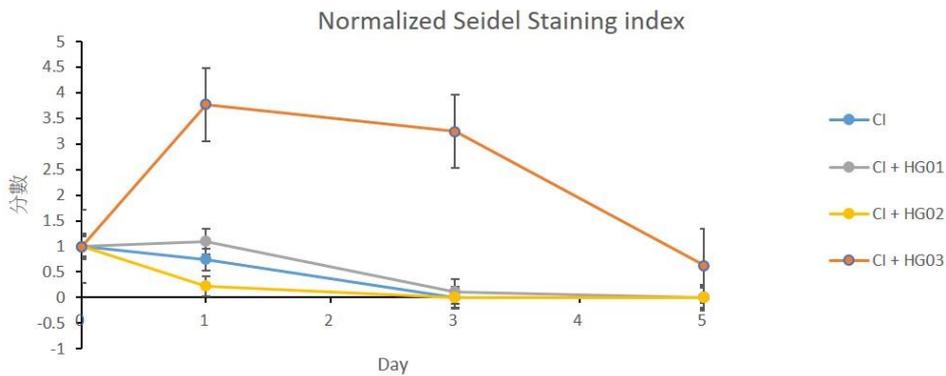
(圖十五為 Normal +HG02 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)



(圖十六為 Normal +HG03 組 Seidel Staining、Topography 追蹤)

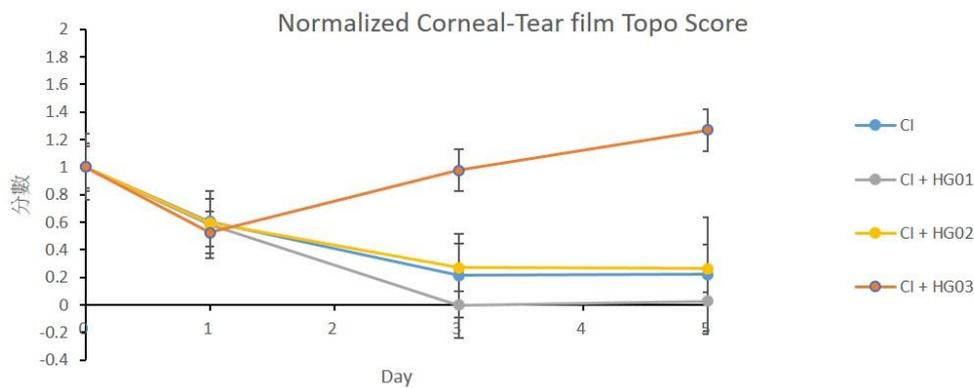
伍、結論與建議

根據以上 Seidel Staining、Topography 追蹤圖，根據本實驗主旨為觀測角膜微創手術造成的傷口，點上特定的水凝膠後修復的情況(比較術後與其餘天數的情況)為評分依據，並製成以下圖表。



(圖十七為經過 normalized Seidel Staining index)

根據上圖由 Seidel Staining 觀測並經過 Normalization 後，在 day1 時，CI+HG01 下降率(修復程度)較 CI 組不顯著。而 CI+HG02 組能看到明顯相較其他組別有較佳的控制角膜傷口癒合。CI+HG03 組角膜損傷程度卻是提高，暗示對於該濃度水凝膠對角膜修復並無有效的幫助。經過 day3、day5 除了 CI+HG03 組，傷口都有復合的跡象。



(圖十八為經過 normalized Corneal-Tear film Topo Score)

由 Corneal-Tear film Topo 觀測也同樣經過 Normalization 後，在 day1 時，CI+HG01 能看到明顯相較其他組別，topo 分數更好，說明該濃度的水凝膠在修復時對於維持穩定的角膜表面有更好的效果。而 CI+HG02 組下降率較 CI 組不顯著。同樣 CI+HG03 組 topo Score 卻是提高，代表對於該濃度水凝膠對角膜維持穩定並無有效的幫助。經過 day3、day5 除了 CI+HG03 都有比 day0 平整了不少，而其中 CI+HG01 效果更是良好。

由角膜對照組，也能看出 Normal+HG01 與 Normal+HG02 組對於正常角膜沒有危害，但是 Normal+HG03 卻有疑慮。

綜上所述，往後的研究方向應先排除 HG03，且可以向 HG01、HG02 增加小鼠的數量達到實驗的有效證明，或是綜合考量 HG01、HG02 的配方濃度斟酌調整，找到對於角膜癒合更有幫助的水凝膠雛形。

陸、研究限制

本實驗為初探性實驗，做為開發原型交聯凝膠雛型。目前只有做有關小鼠角膜表觀實驗，可以增加小鼠的數量，確認水凝膠是否穩定，以及細微修正調整凝膠的成分，或是添加更多不同對角膜健康有幫助的有機活性物。後續可以做小鼠角膜組織切片，觀察水凝膠對於角膜組織表面修復機轉。朝應用在臨床以減少醫療傷害的目標發展。

柒、參考文獻

- (1) Matossian, C., Makari, S., & Potvin, R. (2015). Cataract surgery and methods of wound closure: a review. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 9, 921–928.
- (2) Miyazaki, K., Okada, Y., Yamanaka, O., Kitano, A., Ikeda, K., Kon, S., Uede, T., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Kao, W. W., & Saika, S. (2008). Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(4), 1367–1375.
- (3) Pascolini, D., & Mariotti, S. P. (2012). Global estimates of visual impairment: 2010. *The British*

journal of ophthalmology, 96(5), 614–618.

- (4) Gogate P. M. (2009). Small incision cataract surgery: Complications and mini-review. *Indian journal of ophthalmology*, 57(1), 45–49.
- (5) Abdel-Naby, W., Cole, B., Liu, A., Liu, J., Wan, P., Schreiner, R., Infanger, D. W., Paulson, N. B., Lawrence, B. D., & Rosenblatt, M. I. (2017). Treatment with solubilized Silk-Derived Protein (SDP) enhances rabbit corneal epithelial wound healing. *PloS one*, 12(11), e0188154.
- (6) Fraunfelder F. W. (2006). Corneal toxicity from topical ocular and systemic medications. *Cornea*, 25(10), 1133–1138.
- (7) Shanmugam, M. K., Shen, H., Tang, F. R., Arfuso, F., Rajesh, M., Wang, L., Kumar, A. P., Bian, J., Goh, B. C., Bishayee, A., & Sethi, G. (2018). Potential role of genipin in cancer therapy. *Pharmacological research*, 133, 195–200.
- (8) Song, Y., Nagai, N., Saijo, S., Kaji, H., Nishizawa, M., & Abe, T. (2018). In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 88, 1–12.
- (9) Irimia, T., Dinu-Pîrvu, C. E., Ghica, M. V., Lupuleasa, D., Muntean, D. L., Udeanu, D. I., & Popa, L. (2018). Chitosan-Based In Situ Gels for Ocular Delivery of Therapeutics: A State-of-the-Art Review. *Marine drugs*, 16(10), 373.
- (10) Li, Y. H., Cheng, C. Y., Wang, N. K., Tan, H. Y., Tsai, Y. J., Hsiao, C. H., Ma, D. H., & Yeh, L. K. (2015). Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 126, 237–244
- (11) İnal, M., & Mülazımođlu, G. (2019). Production and characterization of bactericidal wound dressing material based on gelatin nanofiber. *International journal of biological macromolecules*, 137, 392–404.
- (12) Luo, L. J., & Lai, J. Y. (2019). Amination degree of gelatin is critical for establishing structure-property-function relationships of biodegradable thermogels as intracameral drug delivery systems. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 98, 897–909.
- (13) Campbell, T. D., & Gnugnoli, D. M. (2020). Seidel Test. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- (14) Bron, A. J., Argüeso, P., Irkeç, M., & Bright, F. V. (2015). Clinical staining of the ocular surface: mechanisms and interpretations. *Progress in retinal and eye research*, 44, 36–61.
- (15) Teng, M. C., Wu, P. C., Lin, S. P., Wu, C. Y., Wang, P. H., Chen, C. T., & Chen, B. Y. (2018). Danshensu Decreases UVB-Induced Corneal Inflammation in an Experimental Mouse Model via Oral Administration. *Current eye research*, 43(1), 27–34.