

## 열소작술을 이용한 흰쥐 외안근 섬유화 모델

### A New Model of Extraocular Muscle Fibrosis by Thermal Cauterization in the Rats

최민규 · 문남주

Min Gyu Choi, MD, Nam Ju Moon, MD, PhD

중앙대학교 의과대학 중앙대학교병원 안과학교실

Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** To evaluate the effect of cauterization on extraocular muscle (EOM) fibrosis in rats, and to develop a novel EOM fibrosis model.

**Methods:** Twenty-four eyes of 12 Sprague Dawley rats were assigned randomly to two groups. We exposed the superior rectus muscle (SRM) and performed thermal injury 2 mm behind the insertion site of the SRM using a cautery device in the experimental group. The thermal injuries were performed twice for 1 second, for a total of 2 seconds. In the control group, the same procedures except the thermal injury were performed. Two weeks after surgery, all eyes were enucleated and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT).

**Results:** Staining with H&E and MT showed that thermal injury significantly increased inflammation and fibrosis in the experimental group ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ , respectively).

**Conclusions:** Thermal injury using cauterization effectively induced fibrosis of EOM in the rat model. This simple model was effective in inducing fibrosis of SRM and will be useful for studying postoperative fibrosis after strabismus surgery.

J Korean Ophthalmol Soc 2018;59(5):478-483

**Keywords:** Cauterization, Extraocular muscle, Fibrosis, Rat, Thermal injury

사시수술 후 창상의 회복은 안구운동의 정상적 기능 및 손상된 조직의 구조적 내구성 회복에 중요한 역할을 한다. 사시수술 후 수술 부위의 유착과 조직의 흉터 변화는 불만족스럽고, 예측하기 어려운 수술결과를 야기하며 안구 운동의 장애를 초래할 수 있다. 흉터 변화를 남기지 않고 수술 전 조직상태로 완벽하게 회복하는 것이 창상 치유의 목표지만 수술 부위의 염증과 섬유화가 이러한 목표의 걸림

돌이 된다.

5-fluorouracil<sup>1</sup>, mitomycin C<sup>2,3</sup>, pirfenidone<sup>4</sup>, seprafilm<sup>5</sup>, triamcinolone<sup>6</sup>, 양막<sup>7-9</sup>을 비롯한 다양한 재료들이 수술 후 유착형성을 억제하기 위해 연구되어 왔다. 각각의 새로운 재료 및 약물은 사람에게 사용되기 앞서 동물 모델에서 안전성과 효율성에 대한 평가가 필요하기 때문에, 일반적으로 토끼를 이용한 외안근 섬유화 모델이 이용되어 왔다. 뉴질랜드 흰토끼를 이용한 연구에서는 보통 외안근을 후전시킴으로써 섬유화를 유발하였다. 그러나 이러한 방법들은 충분한 정도의 섬유화를 유발시키지 못하는 제한점이 있어 다른 여러 연구에서는 외안근을 절제<sup>10</sup> 또는 공막절개술<sup>11</sup> 후 공막바다에 열소작을 추가함으로써 섬유화를 유발하였다.<sup>3</sup>

쥐의 작은 해부학적 구조 때문에 쥐에서의 사시수술은 수술 중 다양한 합병증을 일으킬 수 있어 쥐 모델을 이용한 외안근 섬유화에 대한 연구는 현재까지는 활발히 진행되지

■ Received: 2017. 12. 14.      ■ Revised: 2018. 2. 16.

■ Accepted: 2018. 4. 23.

■ Address reprint requests to **Nam Ju Moon, MD, PhD**  
Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Hospital,  
#102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea  
Tel: 82-2-6299-1666, Fax: 82-2-825-1666  
E-mail: njmoon@cau.ac.kr

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

© 2018 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.

않았다. 하지만 전기소작기를 이용한 열손상은 간편할 뿐만 아니라 사시수술에 비해 일정한 정도의 손상을 일으킬 수 있다.<sup>12</sup> 본 연구에서는 열소작술을 이용한 흰쥐의 외안근 섬유화 모델의 효용성을 평가하고자 한다.

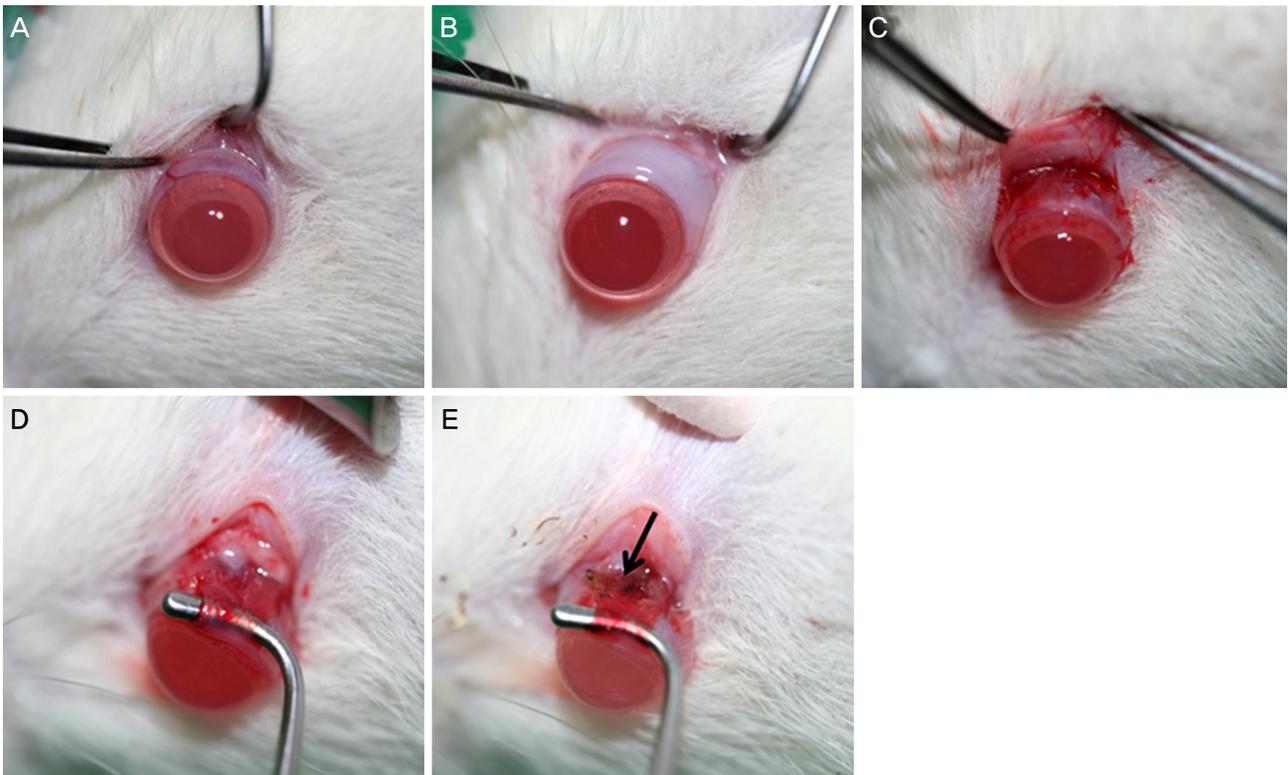
## 대상과 방법

본 연구는 연구윤리 심의위원회(Institutional review board of Chung-Ang University Hospital)로부터 승인을 받았으며, 외견상 외안부 질환이 없고 건강해 보이는 평균 체중 210-230 g, 평균 연령 7주의 Sprague Dawley 쥐 12마리가 이용되었고, 모두 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement의 권고사항을 준수하여 취급하였다.

모든 수술은 집도의 1명에 의해 쥐의 순서와 눈의 방향에 관한 정보는 알지 못한 채 진행하였다. Tiletamine hydrochloride와 zolazepam hydrochloride (Zoletil<sup>®</sup>, Virbac, Carros, France) 50 mg/kg와 Xylazine hydrochloride (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Korea, Seoul, Korea) 5 mg/kg을 혼합하여 근육 내 주사를 통해 전신마취를 유도하였다. 점안마취로는 Proparacaine hydroxychloride (Alcaine<sup>®</sup>, Alcon, Fort Worth, TX, USA)

를 사용하였다. 생리식염수 0.1 mL를 결막하에 주사하고 10시 방향에서 2시 방향으로 윤부 결막절개술을 시행하였다. 웨스콧 가위(Wescott scissors)와 면봉을 이용하여 상직근을 조심스럽게 박리해서 다른 조직들로부터 분리하였다. 상직근을 노출시킨 후에 후전술을 시행하지 않고 상직근의 부착부로부터 후방 2 mm 위치에 전기소작기로 최대세기(1,205°C)의 열손상을 1초씩 2회 가하였다(Fig. 1). 정확한 열손상을 위해 뾰족한 끝부분을 통해 일정하고 반복적으로 열을 가할 수 있는 소작기(Accu-Temp<sup>®</sup>, Beaver-Visitec, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 전기소작기를 이용한 열손상 후에 결막의 절개부는 재봉합하지 않았다. 대조군에서는 열손상을 제외하고 동일한 방법으로 수술 및 조작하였다. 수술 종료 시에는 levofloxacin (Cravit<sup>®</sup>, Santen, Osaka, Japan) 점안액을 투여하였다. 수술 후 levofloxacin 점안액을 하루 3회, 매일 각 눈에 투여하며 관찰하였다. 2주 경과 후 모든 쥐들은 수술 시와 동일한 방법으로 마취한 후 눈을 적출하고 밀폐실에서 이산화탄소 가스를 이용하여 희생하였다.

적출된 눈들의 상직근 부위를 표시하고 10% formaldehyde 완충용액에 고정한 후 파라핀에 함유 처리하였다. 적출한 안구 조직의 상직근 정중앙부위에서 시상면으로 단면을 잘라 1안당 총 3장의 조직학적 단면을 얻었다. 두 군



**Figure 1.** Demonstration of the operation procedure. (A) Exposure of the upper conjunctiva. (B) Subconjunctival injection of 0.1 mL of normal saline. (C) Limbal peritomy from 10 to 2 o'clock. (D) Isolation of the superior rectus muscle. (E) Thermal injury on superior rectus muscle (black arrow).

**Table 1.** Detailed description of grade of inflammation and fibrosis according to photomicrographic findings

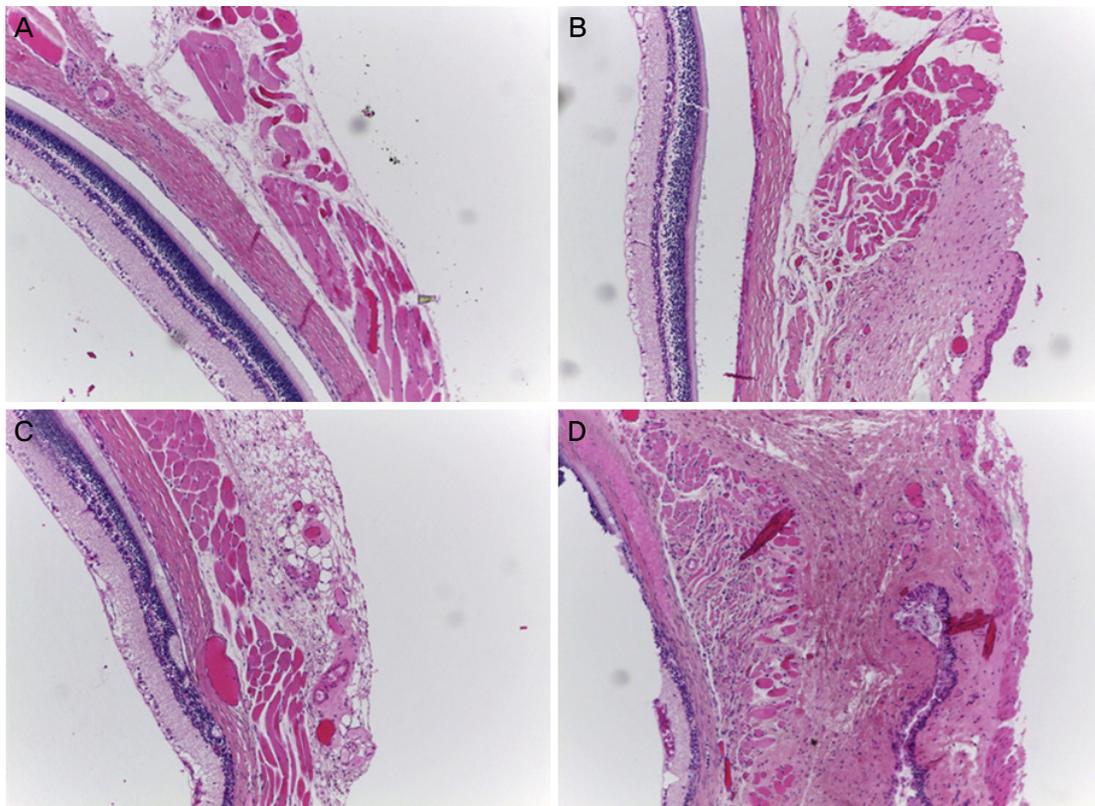
	Grades	Descriptions
Inflammation	0	Inflammatory infiltrate absent
	1	Mild inflammatory infiltrate (presence of lymphocytes)
	2	Moderate inflammatory infiltrate (presence of lymphocytes, plasmocytes, and scattered macrophages)
	3	Intense inflammatory infiltrate (presence of lymphocytes, plasmocytes, macrophages, and neutrophils)
Fibrosis	0	No fibrosis
	1	Mild perimuscular fibrotic reaction (stained collagen was detectable only in thin bands immediately adjacent to the muscle)
	2	Easily detected thick bands
	3	Well-developed, dense bands of collagen
	4	A severe fibrotic response replacing large areas

**Table 2.** The grades of inflammation and fibrosis in each group two weeks after surgery

	Control*	Cauterization*	p-value
Inflammation	0.75 ± 0.62	1.83 ± 0.52	0.002 <sup>†</sup>
Fibrosis	0.83 ± 0.58	2.42 ± 0.90	<0.001 <sup>†</sup>

Values are presented as mean ± SD unless otherwise indicated.

\*Standard deviation; <sup>†</sup>Kruskal-Wallis test.



**Figure 2.** Photomicrographs showing inflammation of the superior rectus muscle two weeks after surgery in the rat model (hematoxylin and eosin staining, ×100). (A) Grade 0. (B) Grade 1. (C) Grade 2. (D) Grade 3.

의 각 조직들은 Hematoxylin and eosin (H&E) 및 Masson's trichrome (MT) 염색 후 가장 심한 반응을 보인 단면에서 염증 및 섬유화 정도를 평가하였다.

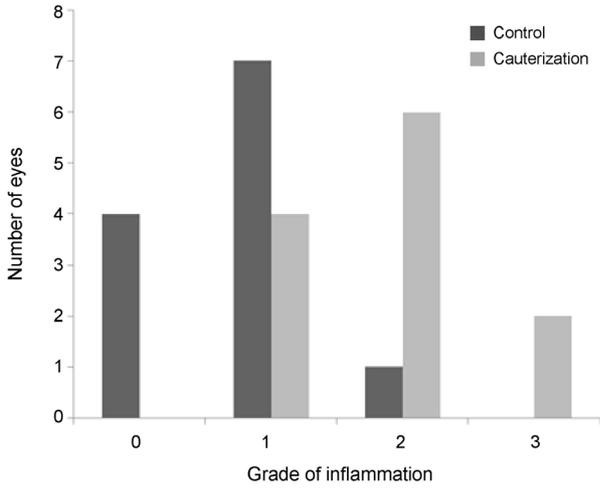
각 군에 대한 정보를 알지 못하는 병리학자가 광학현미경

(Leica DM750, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) 100, 200배율을 이용하여 눈 조직들의 염증의 정도를 평가하였다. 섬유화는 아교질 형성의 양과 형태에 따라 평가하였다.<sup>1</sup> 염증과 섬유화는 각각 4개, 5개 등급의 중증도로 나

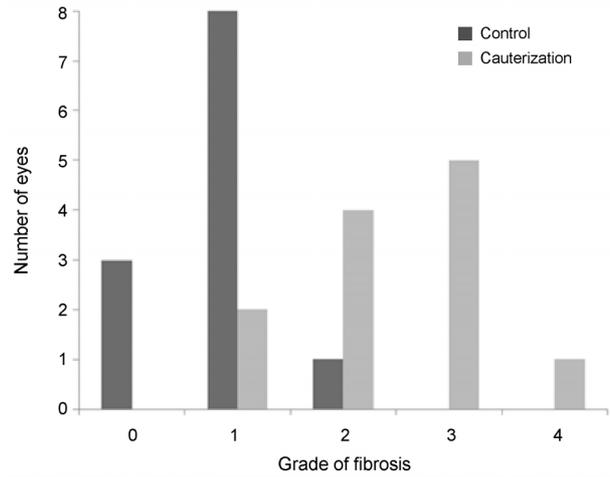
누었다(Table 1). 통계분석은 2개 군의 염증과 섬유화에 대한 차이를 확인하기 위해 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였고, 자료분석은 SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였으며 통계적 유의성은  $p$ -value<0.05로 정의하였다.

## 결 과

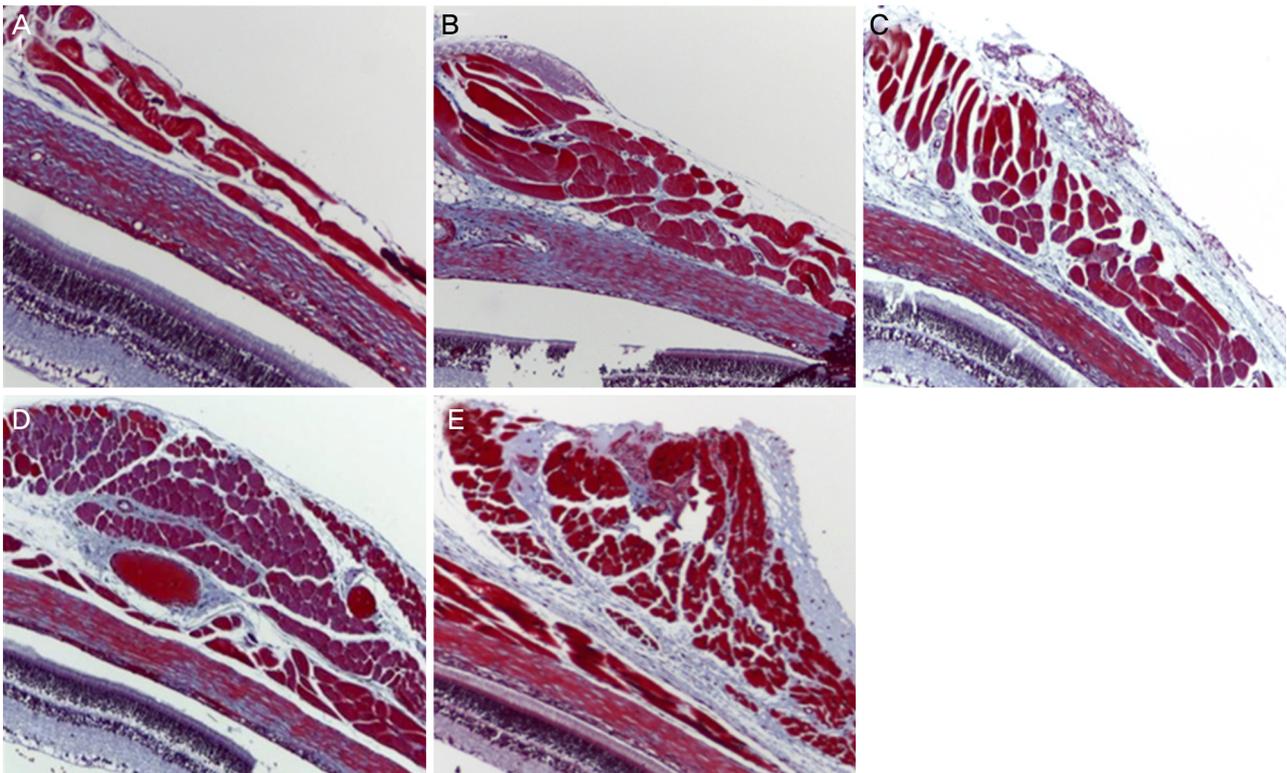
수술부위 정도의 결막충혈을 제외하고는 특이소견은 보이지 않았다. 수술 2주 경과 후 각 군의 수술 후 염증 및 섬유화의 정도는 표에 기술한 것과 같다(Table 2).



**Figure 3.** Bar graphs showing the degree of inflammation of superior rectus muscle two weeks after surgery. The grade of inflammation was statistically different between control and cauterization group ( $p = 0.002$ ).



**Figure 5.** Bar graphs showing the degree of fibrosis of superior rectus muscle two weeks after surgery. The grade of fibrosis was statistically different between control and cauterization group ( $p \leq 0.001$ ).



**Figure 4.** Photomicrographs showing fibrosis of the superior rectus muscle two weeks after surgery in the rat model (Masson's trichrome staining,  $\times 100$ ). (A) Grade 0. (B) Grade 1. (C) Grade 2. (D) Grade 3. (E) Grade 4.

모든 군에서 H&E 염색을 통해 상직근 및 주변조직으로의 염증성세포 침윤을 확인하였다(Fig. 2). 두 군 간의 염증 정도는 통계적으로 유의한 차이가 있었다( $p=0.002$ , Table 2, Fig. 3).

MT 염색을 통해 근육 및 결막조직 내 아교질 침착을 확인할 수 있었고, 이는 수술 2주 후 두 군 간의 유의한 차이가 있었다( $p<0.001$ , Table 2, Fig. 4). 실험군에서는 50%가 3-4등급의 섬유화를 보였으나 대조군에서는 100%가 0-2등급으로 확인되었다(Fig. 5). 전기소작기를 이용한 열손상만으로는 사시수술에서처럼 상직근과 공막 사이에 충분한 섬유화를 유발하기에는 한계가 있었다.

## 고 찰

사시수술에서 수술 부위의 유착은 중요한 문제이다. 이는 여러 번 수술을 한 경우에 더욱 심각한데 결막, 테논낭, 공막, 외안근을 포함하는 유착은 안구운동을 저하시켜 수술결과에 영향을 준다. 이러한 유착을 해결하는 것은 쉽지가 않은데, 수술적으로 유착된 외안근을 해리한다고 해도 그 유착이 완전히 제거가 되지 않을 수 있고, 심지어 새로운 유착이 발생할 수 있다.<sup>13</sup> 유착 방지를 위해 많은 재료 및 약물들이 사용되어 왔지만 효과가 일정하지 않고, 또 다른 합병증을 야기할 수 있으므로 여전히 어려움을 겪고 있다. 다양한 재료 및 약물들의 항섬유화 효과를 평가하기 위해서는 동물모델에서 간편하면서도 경제적으로 섬유화된 외안근 조직을 만들어내는 것이 중요하다. 뉴질랜드 흰토끼(New Zealand white rabbit)는 외안근 섬유화 모델에서 널리 이용되지만 이러한 모델을 사용하는 데 있어서 다음의 제한점들이 있다. 첫째, 실제 사시수술의 과정을 재현함으로써 섬유화를 유발하므로 1마리당 소요되는 시간이 길어 충분한 수의 동물로 실험을 진행하는 데 어려움이 있다. 둘째, 뉴질랜드 흰토끼는 몸집이 커서 실험 전반에 걸쳐 다루기가 어렵고, 그 비용이 비싸 경제적으로도 비효율적이다. 셋째, 술자마다 일정한 정도의 섬유화를 유발하는 데 한계가 있어 약제의 효과를 비교하는 데 무리가 있다. 이전의 연구에서 외안근 섬유화를 유발하는 방법으로 절제술, 조정술을 병행하는 후전술 또는 단독 후전술<sup>10</sup>, 공막바다의 소작술<sup>3</sup>, 원반칼(disc knife)을 이용한 공막절개술<sup>11</sup> 등을 포함한 다양한 방법들이 소개되었으나 일정한 외안근 섬유화를 유발하지는 못했다.

본 연구에서는 토끼 대신에 쥐에서 사시수술 대신에 열손상을 통하여 외안근의 섬유화를 유발시키는 모델을 설계하였다. 본 연구와 동일한 방법으로 섬유화의 등급을 나눈 이전의 세 연구에서는 섬유화의 평균값은 각각  $1.60 \pm 0.70$ ,

$1.14 \pm 0.37$ ,  $2.88 \pm 0.64$ 였고,<sup>4,5,13</sup> 본 연구에서는  $2.42 \pm 0.90$ 이었다. 쥐와 토끼 안구에서의 해부학적 구조의 차이 때문에 이전 연구들과 직접적인 비교는 어렵지만 외안근의 섬유화를 유발하는 데 있어 쥐 모델에서 열손상을 이용하는 것은 토끼 모델에서 사시수술을 시행하는 것에 비해 그 효과가 더 낮거나 비슷하다고 생각할 수 있다.

열소작술을 이용한 흰쥐 외안근 섬유화 모델은 이전의 토끼 모델과 비교하여 몇 가지 장점이 있다. 첫째, 열손상을 가하는 것이 간단하고 효율적이다. 상직근의 열소작술만으로도 충분한 섬유화를 일으킬 수 있고, 이는 숙련도를 필요로 하지 않아 집도의 개인의 기술적 역량에 좌우되지 않으므로 섬유화 유발의 효율성 또한 높일 수 있다. 둘째, 흰쥐는 몸집이 작아 다루기가 용이하여 실험 소요 시간이 적고, 그 비용 또한 상대적으로 저렴하여 보다 많은 개체수를 대상으로 진행할 수 있다. 셋째, 간단한 열손상만으로 섬유화가 가능하므로 토끼모델에서 흔히 발생할 수 있는 안구 천공과 같은 부작용이 드물다. 부작용이 발생한 동물은 연구에서 제외됨과 동시에 희생되므로 열손상을 이용한 쥐 모델은 동물연구의 윤리적 관점에 보다 적합하다.

본 연구의 제한점으로는 다음과 같은 것들이 있다. 첫째, 토끼 모델에서의 사시수술은 상직근과 공막 사이, 상직근과 결막 사이에 섬유화를 유발할 것으로 예상되지만, 쥐를 이용한 모델에서 상직근에 열손상을 가하는 것만으로는 상직근과 공막 사이에 섬유화 조직을 만들어내기는 어려웠다. 둘째, 병리학적 평가는 주관적인 기준에 의해서 이루어졌고, 임의로 수술 2주 경과 시점에서 진행되었다. 대조군과 실험군을 배정하는 데 관여하지 않은 병리학자에 의한 평가였으므로 객관성은 확보할 수 있었으나, 아교질 합성과 유착 형성을 완전히 종료했으리라 판단할 수 있는 시점에서 수술부위 및 주변조직에 대한 염증과 섬유화에 대한 평가가 추가로 필요하다.<sup>14</sup> 셋째, 수술적 손상에 의한 조직학적 변화는 손상 초기에 염증성 반응이 활발히 일어나면서 다형핵백혈구가 창상부위에서 구획을 형성하고 대식세포 또한 관찰할 수 있다. 창상 회복과정에서 후기로 진행될수록 염증성 반응은 줄어들면서 다형핵백혈구와 대식세포의 수는 감소하고 섬유아세포와 새롭게 형성되는 아교질이 증가한다.<sup>15</sup> 열손상에 의한 조직학적 변화는 손상의 정도에 따라 다양한 염증성 침윤을 보이며 손상 초기에는 중성구, 후기에는 대식세포와 림프구를 주로 관찰할 수 있다.<sup>16,17</sup> 회복된 조직 모두에서는 아교질 섬유 및 육아성 조직의 재배열을 확인할 수 있으나 손상 기전에 따른 조직학적 변화과정의 차이에 대한 고려가 필요하다.

결론적으로 쥐를 이용한 모델은 적어도 상직근의 섬유화를 유발하는 데 있어서는 토끼 모델만큼이나 효율적이고

수술을 행하는 데 있어 부작용의 발생률이 낮으며 시간 및 비용 측면에서도 경제적이다. 게다가 열소작술을 이용하는 것은 간단하고 재현 가능하므로 쥐를 이용한 열손상에 의한 외안근 섬유화 모델은 사시수술 후 유착발생을 예방하는 생체재료를 연구하는 데 있어 유용할 것이며, 상직근 섬유화 연구 모델의 표준으로 기능할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- 1) Mora JS, Sprunger DT, Helveston EM, Evan AP. Intraoperative sponge 5-fluorouracil to reduce postoperative scarring in strabismus surgery. *J AAPOS* 1997;1:92-7.
- 2) Cruz OA. Evaluation of mitomycin to limit postoperative adhesions in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1996;33:89-92.
- 3) Minguini N, Monteiro de Carvalho KM, Akaishi PM, De Luca IM. Histologic effect of mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3399-401.
- 4) Jung KI, Choi JS, Kim HK, Shin SY. Effects of an anti-transforming growth factor-beta agent (pirfenidone) on strabismus surgery in rabbits. *Curr Eye Res* 2012;37:770-6.
- 5) Ozkan SB, Kir E, Culhaci N, Dayanir V. The effect of Sefrafilm on adhesions in strabismus surgery-an experimental study. *J AAPOS* 2004;8:46-9.
- 6) de Carvalho LE, Alves MR, da Silva MA, Gaal Vadas MF. Experimental strabismus surgery using triamcinolone: outcomes and effects on inflammatory response. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70:209-15.
- 7) Frangouli O, Adams GG. The use of amniotic membrane for the management of fibrosis in complex strabismus surgery. *Strabismus* 2013;21:13-22.
- 8) Kirsch D, Lowen MS, Fialho Cronemberger MF, Sato EH. Amniotic membrane for reducing the formation of adhesions in strabismus surgery: experimental study in rabbits. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2014;51:341-7.
- 9) Kassem RR, Abdel-Hamid MA, Khodeir MM. Effect of lyophilized amniotic membrane on the development of adhesions and fibrosis after extraocular muscle surgery in rabbits. *Curr Eye Res* 2011;36:1020-7.
- 10) Lee MJ, Jin SE, Kim CK, et al. Effect of slow-releasing all-trans-retinoic acid in bioabsorbable polymer on delayed adjustable strabismus surgery in a rabbit model. *Am J Ophthalmol* 2009; 148:566-72.
- 11) Demirel S, Atilla H, Okcu Heper A, Erkam N. Effects of amniotic membrane on wound healing and adhesions in experimental strabismus surgery. *Eur J Ophthalmol* 2009;19:899-904.
- 12) Cai EZ, Ang CH, Raju A, et al. Creation of consistent burn wounds: a rat model. *Arch Plast Surg* 2014;41:317-24.
- 13) Yaacobi Y, Hamed LM, Kaul KS, Fanous MM. Reduction of post-operative adhesions secondary to strabismus surgery in rabbits. *Ophthalmic Surg* 1992;23:123-8.
- 14) Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528-42.
- 15) Vindinsky B, Gál P, Toporcer T, et al. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Vet Brno* 2006; 75:197-202.
- 16) Tarran S, Langlois NE, Dziewulski P, Sztynka T. Using the inflammatory cell infiltrate to estimate the age of human burn wounds: A review and immunohistochemical study. *Med Sci Law* 2006;46:115-26.
- 17) Gravante G, Palmieri MB, Delogu D, Montone A. Apoptotic cells in cutaneous adnexa of burned patients. *Burns* 2007;33:129-30.

## = 국문초록 =

# 열소작술을 이용한 흰쥐 외안근 섬유화 모델

**목적:** 쥐에서 외안근 섬유화를 유발하는 데 있어 열소작술을 이용한 열손상의 효과를 평가하고, 이상적인 외안근 섬유화 연구 모델을 설계하고자 하였다.

**대상과 방법:** Sprague Dawley 흰쥐 12마리의 24안들을 무작위로 2개의 군으로 나누었다. 실험군은 상직근을 노출시키고 상직근의 부착부로부터 후방으로 2 mm 떨어진 곳에 1초간의 열손상을 2번 가하였다. 대조군은 열손상을 제외하고 동일한 방법으로 조작하였다. 2주 경과 후, 24안 모두를 적출하였고 Hematoxylin and eosin (H&E) 및 Masson's trichrome (MT) 염색을 시행하였다.

**결과:** H&E 및 MT 염색을 통해 열소작술을 시행한 군에서 통계적으로 의미있게 염증반응과 섬유화가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (각각  $p=0.002$ ,  $p<0.001$ ).

**결론:** 조직학적 결과들을 통해서 쥐 모델에서의 열소작술이 효율적으로 외안근 섬유화를 유발할 수 있음을 확인하였다. 이 모델은 상직근 섬유화를 유발하는 데 있어 효과적이고 사시수술 후 섬유화 발생을 연구하는 데 유용할 것으로 생각된다.

(대한안과학회지 2018;59(5):478-483)