

## Experimental Cats Model for Research of the Blood Ocular Barrier

Byung-Rae Park<sup>†</sup>

Department of Radiological Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

Evaluate the triolein emulsion could disrupt the barriers and to suggest as an experimental model in blood-ocular barrier studies. Triolein emulsion was infused into the carotid artery in the experimental group ten cats. Normal saline was used in another the control group ten cats. Precontrast and postcontrast T1-weighted MR images were obtained at 30 minutes and 3 hours after embolization. Signal intensities were evaluated in the anterior, posterior chamber and in the vitreous qualitatively and quantitatively. Postembolization 30 minutes MR images were not different from those of the control group. Postembolization 3 hour MR images demonstrated delayed contrast enhancement in the anterior chamber of the ipsilateral and contralateral eyeballs and in the posterior chamber of the ipsilateral eyeball. Delayed contrast enhancement of the posterior chamber of the ipsilateral eyeball was statistically significant ( $P<0.05$ ). The present study demonstrated significant contrast enhancement in the posterior chamber with infusion of triolein emulsion and can be a model in blood-aqueous barrier studies.

**Key Words:** Magnetic resonance image, Fat embolism, Blood ocular barrier, MR orbit

### 서 론

안구 (orbit)에는 두 가지의 혈안장벽 (blood-ocular barrier)이 있는데 그 중 하나는 혈망막 (blood-retinal barrier) 및 혈방수 장벽 (blood-aqueous barrier)이 있다. 혈망막 장벽은 혈액으로부터 망막을 보호하고 일정한 환경을 유지하기 위하여 존재하는 장벽으로 망막 모세혈관 내피세포 (retinal capillary endothelial cells)의 복잡한 폐쇄막으로 이루어진 내혈망막 장벽과 망막 색소 외피세포 (retinal pigmented epithelial cells)로 이루어진 외혈망막 장벽으로 구성된다 (Stewart et al., 1994). 사람의 망막의 내측 3분의 2는 내혈망막 장벽의 모세혈관에 의해, 그리고 외측 3분의 1은 외혈망막 장벽의 맥락막 모세혈관에 의해 영양분이 공급된다 (Harris et al., 2001). 혈방수 장벽은 모양체 (ciliary body)의 색소 및 비색소 외피세포와 홍채 (iris)의 내피세포, 기저막 그리고 간질 (stroma)로 구성되어 방수와 혈장간의 화학 성분의 차이를 일정하게 유지한다. 이들 혈안장벽은 눈의 기능에 효과적이지만 망막, 홍채 등의 암에 대한 항암치료에는 오히려 장애가 될 수 있다. 성인에서 가장 많은 악성 종양인 포도막에 발생한 악성

흑색종의 경우 항암치료의 성적이 좋지 않아 수술적 제거나 방사선 요법이 쓰이고 있으나 여전히 높은 사망률을 보인다 (Munzenrider, 2001). 악성 뇌암에서는 혈뇌장벽을 인위적으로 1~2시간 정도 열고난 후 항암치료를 적용하여 보다 높은 치료율을 보이고 있다 (Kroll, 1998). 혈뇌장벽을 인위적으로 여는 시도는 다양하나 최근에 지방의 일종인 triolein emulsion을 이용하여 최장 1~3일 동안 가역적으로 혈뇌장벽을 여는 실험이 보고되었다 (Kim, 2002). 혈뇌장벽과 혈안장벽은 서로 비슷한 점과 또는 상이한 점도 가지고 있으리라 추정된다. 이에 이 본 실험연구에서는 triolein emulsion이 혈안장벽을 여는지에 대해 자기공명영상을 통해 알아보고 나아가 혈안장벽의 연구를 위한 기본 모델을 제시하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 뇌지방색전증의 동물 모델 및 실험모형

실험동물로는 특별한 이상이 없는 체중 2.9~3.8 kg (평균 3.2 kg)의 고양이를 사용하였으며 총 20마리를 대상으로 실험을 시작하였다. 케타민 (ketamine HCl, 유한양행, 서울, 한국) 2.5 mg/kg과 자일라진 (xylazine, 바이엘 코리아, 서울, 한국) 0.125 mg/kg을 근육내 주사하여 마취하였다. 우측대퇴골동맥을 찾아 18-게이지 도관 (Insyte: Becken Dickinson Vascular Access, Utah, USA)을 먼저 삽입하였고 3.0 F 미세도관 (Microferret-18 Infusion Catheter, William Cook Eroupe, Bjaeverskov, Denmark)을 앞서 삽입한 도관을 통과해서 일측 내

\*논문 접수: 2005년 10월 4일

수정재접수: 2005년 11월 23일

<sup>†</sup>교신저자: 박병래, (우) 609-757 부산시 금정구 부곡3동 9번지,

부산가톨릭대학교 보건과학대학 방사선학과

Tel: 051-510-0583, Fax: 051-510-0588

e-mail: brpark@cup.ac.kr

경동맥 내에 설치하였다. 사용한 triolein emulsion을 다음과 같은 방법으로 만들었다. 즉, triolein (neutral triglyceride triolein) (1, 2, 3-tri [cis-9-octadecenoyl] glycerol, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 ml를 1 ml 주사기에, 생리식염수 20 ml를 20 ml 주사기에 각각 채우고 3-way stopcock에 양측 주사기를 끼운 후 1 ml 주사기를 왕복으로 약 2분간 심하게 움직여 triolein과 생리식염수가 서로 섞이게 하여 triolein emulsion을 만들었다. 10마리의 고양이 (n=10, 실험군)에서 위와 같이 만든 triolein emulsion을 내경동맥에 설치된 미세도관으로 5분간 걸쳐 손으로 천천히 주입하였다. 대조군 (n=10)으로 상기한 동일한 방법으로 준비한 고양이에 triolein emulsion 대신에 생리식염수 20 ml를 주입하였다. 체온은 직장 온도계를 사용하여 측정하였으며 체온이 내려가면 전기패드나 백열등을 이용하여 34.5~36.5℃로 유지시켰다.

## 2. 안구 MR영상 획득

안구 자기공명영상은 양측 안구가 동시에 평행하게 나타나도록 축상 (axial)영상을 얻고자 하였다. 조영전 및 조영후 T1강조영상을 triolein emulsion 주입 후 30분과 3시간에 연속적으로 시행하였다. 이 때 고양이는 복와위 (prone)상태로 자기공명영상의 소아용 설치기에 고정시켰고 연성코일을 머리 위에 설치하여 촬영하였다. 모든 검사는 1.5-T MR scanner (Sonata, Siemens, Erlangen, Germany)를 사용하였다. 스페이코기법의 영상변수들은 T1강조영상의 반복시간 (repetition time) [TR] = 320 ms, 에코시간 (echo time) [TE] = 20 ms, 절편두께 (section thickness) 4 mm, 간격 (gap) 0.1 mm, 영상영역 70~75 mm, 영상수 3장, 2회의 영상 획득수, 획득 행렬수 210×256 혹은 210×180 등으로 설정하였다. 조영증강영상을 위해서 0.2 mmol/kg의 gadopentate dimeglumine (Magnevist, Schering, Germany)을 정맥 내 주사하였다.

혈망막 장벽의 손상을 보기 위해서는 초자체액 (vitreous humor)에서, 혈방수 장벽의 손상을 보기 위해서는 전방 (anterior chamber)과 후방 (posterior chamber)에서 각각 병변안과 정상안의 조영증강의 정도를 측정하였다. 병변안은 triolein emulsion을 넣은 일측 안구로, 대조군으로는 반대측 정상안으로 하였다. 원형의 관심영역 (round region of interest)을 선택하여 병변안과 정상안의 각각 상기 부위에서 측정하고 기록하였다. 측정을 시행한 영상은 렌즈가 가장 잘 나온 영상을 선택하였고 병변안과 정상안에서 측정된 관심영역의 크기와 위치는 각 개체마다 일정하게 하였다. 평균 관심영역의 크기는 전방에서 0.5~0.7 mm<sup>2</sup>, 후방에서 0.1~0.2 mm<sup>2</sup>, 초자체에서 0.25~0.30 mm<sup>2</sup>이었다.

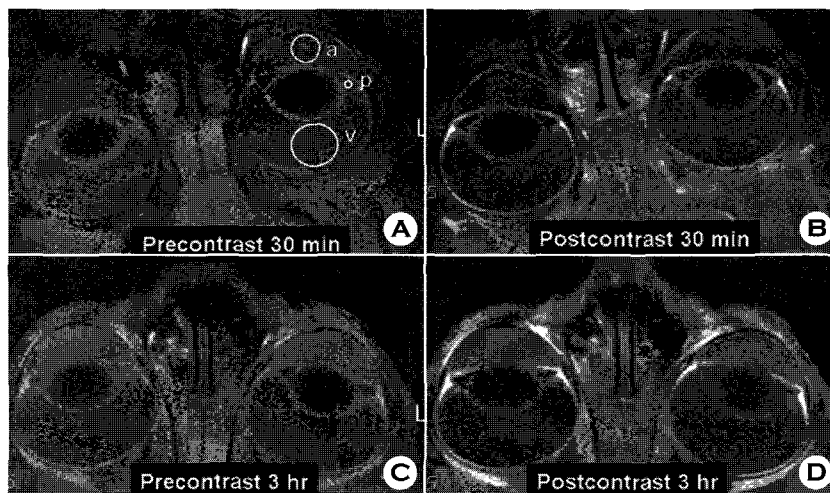
## 3. 영상 분석

안구의 각 부분에 나타난 조영증강 유무를 정성적으로 분석하였으며, 조영증강 정도에 대한 정량적 분석은 다음과 같이 시행하였다. 조영전과 조영후 영상에서 조영증강비 (contrast enhancement ratios, CER = [SI on postcontrast - SI on precontrast] / SI on precontrast)를 구한 후 30분과 3시간 영상에서 서로 비교하였다. 통계처리는 Kruskal Wallist test와 Dunn's Multiple Comparison test, 그리고 Wilcoxon signed rank test를 이용하였으며 P 값이 0.05 이하를 통계적으로 의미 있는 차이로 정하였다.

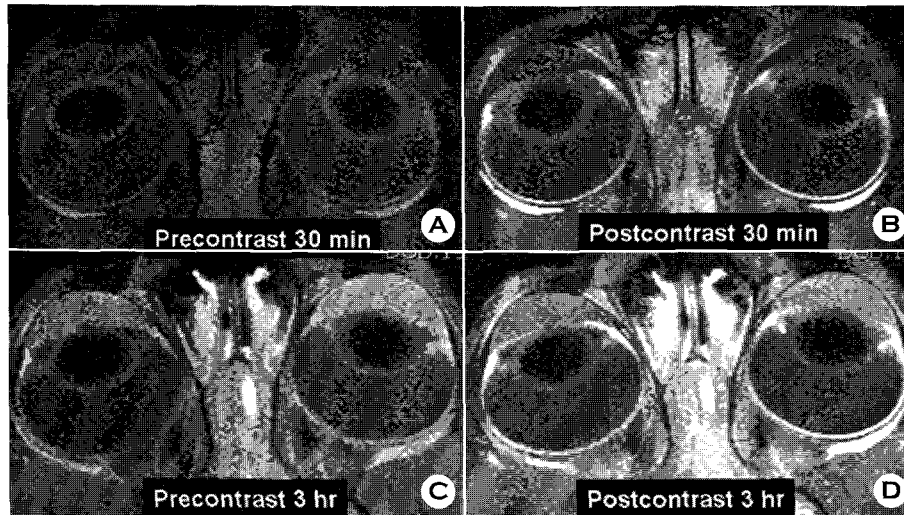
## 결 과

### 1. MR 영상의 정성적 분석

대조군의 모든 고양이에서 30분 조영전 T1강조영상에서 병변안 및 정상안의 전방, 후방 및 초자체는 물의 신호강도와 동일한 저신호강도를 모두 보였다. 30분 조영후 T1강조영



**Fig. 1.** T1-weighted (TR/TE/NEX = 320/20/2) axial images of a cat in the control group. 30 minutes after embolization (A: precontrast, B: postcontrast). The anterior chamber (a), posterior chamber (p) and the vitreous (v) of the embolized eye (right) with normal saline and the contralateral eye (left) show homogenous low signal intensity on precontrast image (A). Three chambers in both eyes reveal no contrast enhancement on postcontrast image (B). 3 hours after embolization (C: precontrast, D: postcontrast). The anterior and posterior chambers demonstrate delayed contrast enhancement on precontrast image (C). No further enhancement in each chamber is seen on postcontrast image (D).



**Fig. 2.** T1-weighted (320/20/2) axial images of a cat in the experimental group. 30 minutes after embolization (A: precontrast, B: postcontrast). The anterior, posterior chambers and the vitreus of the embolized eye (left) with triolein emulsion and the contralateral eye (right) show homogenous low signal intensity on precontrast image (A). Three chambers in both eyes reveal no contrast enhancement on postcontrast image (B). 3 hours after embolization (C: precontrast, D: postcontrast). The anterior and posterior chambers of the embolized eye reveal stronger delayed contrast enhancement than those of the contralateral eye on precontrast image (C). The vitreus shows no delayed contrast enhancement. Postcontrast enhancement (D) demonstrates no further enhancement in either chamber.

**Table 1.** Mean contrast enhancement ratios

		Contralateral eyeballs			Ipsilateral eyeball		
		Anterior chamber	Posterior chamber	Vitreus	Anterior chamber	Posterior chamber	Vitreus
Control	30 min.	0.09	0.10	0.00	0.05	0.10	0.00
Group (n=10)	3 h.	0.04	0.06	0.01	0.02	0.14	0.01
Experimental	30 min.	0.13	0.12	0.02	0.07	0.18	0.00
Group (n=10)	3 h.	0.02	0.17	0.03	0.01	0.37*	0.00

\*; In the experimental group, mean contrast enhancement ratios of the posterior chamber in the embolized eye in 3 hours MR images significantly increase compared with those in 30 minutes MR images by Wilcoxon signed rank test ( $P < 0.05$ )

상에서 병변안 및 정상안의 전방, 후방 및 초자체는 조영증강되지 않았다 (Fig. 1A, B). 대조군의 모든 고양이에서 3시간 조영전 T1강조영상에서 병변안 및 정상안의 전방은 고신호강도를 보였으며 이는 30분 영상획득 때 주입한 조영제의 지연 조영증강이었다. 병변안과 정상안의 후방에서는 약한 지연 조영증강을 보였다. 그러나 초자체는 병변안 및 정상안 모두에서 지연 조영증강을 보이지 않았다 (Fig. 1C, D).

실험군의 모든 고양이에서 triolein emulsion을 주입한 후 30분에 검사한 조영전 T1강조영상에서 병변안과 정상안의 전방, 후방 및 초자체는 물의 신호강도와 동일한 저신호강도를 보였으며 조영후 T1강조영상에서 각각 부위는 조영증강되지 않았다 (Fig. 2A, B). 실험군의 모든 고양이에서 3시간 조영전 T1강조영상에서 병변안과 정상안의 전방은 고신호강도를 보였으며 이는 30분 자기공명영상 획득 때 주입한 조영제의 지연 조영증강이었다. 병변안의 전방과 후방이 정상안의 동일한 부위와 비교하여 뚜렷한 지연 조영증강을 보였

으며 특히 후방에서 좀 더 뚜렷한 경향이었다. 초자체는 양안 모두에서 지연 조영증강을 보이지 않았다 (Fig. 2C). 3시간 조영후 T1강조영상에서 조영전 T1강조영상에 비해 각 부위에서 더 이상의 조영증강을 보이지는 않았다 (Fig. 2D).

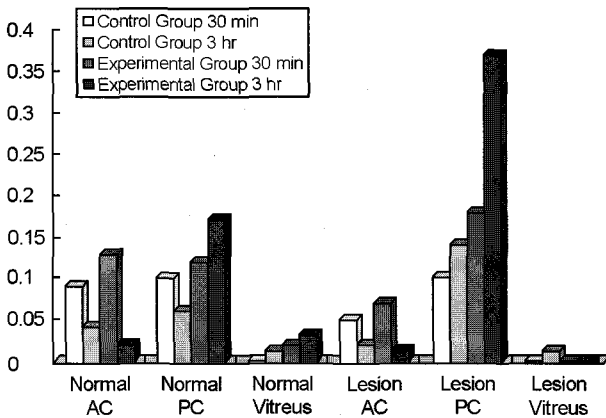
## 2. MR 영상의 정량적 분석

30분과 3시간의 자기공명영상에서 조영증강비를 구하여 Table 1에 나타내었다. 실험군의 후방에서 3시간 조영증강비가 37%로 가장 높았으며 나머지는 0~18%까지의 분포를 보였다. 각 시간대별로 전방, 후방 및 초자체의 조영증강비는 대조군과 실험군 즉 양군의 병변안과 정상안에서 차이가 없었으며 ( $P > 0.05$ ), 30분 영상에 대한 3시간의 영상에서의 조영증강비는 실험군의 병변안의 후방에서 의미 있는 증가를 보였으나 ( $P = 0.0371$  by Wilcoxon signed rank test) 다른 부위에서는 그렇지 않았다 ( $P > 0.05$ ). 이렇게 각 시간대에서 조영증강비가 낮은 것은 안구의 혈관에서 전방, 후방 혹은 초자

**Table 2.** Mean delayed contrast enhancement ratios

	Contralateral eyeballs			Ipsilateral eyeball		
	Anterior chamber	Posterior chamber	Vitreus	Anterior chamber	Posterior chamber	Vitreus
Control group (n=10)	0.84	0.15	0.05	0.79	0.21	0.07
Experimental group (n=10)	0.88	0.30	0.12	1.11	1.00*	0.17

\*; Mean delayed contrast enhancement ratios (= [signalintensity of postcontrast image of 3 hours / signalintensity of precontrast image of 30 minutes] / signalintensity of precontrast image of 30 minutes) of the posterior chamber in the embolized eye of the experimental group are significantly high compared with those of the embolized eye of the control group, contralateral normal eyes of the control or experimental group by Kruskal Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test ( $P<0.05$ )



**Fig. 3.** Three chambers in both eyes reveal postcontrast enhancement image. Axial images of a cat in the control group. 30 minutes and 3 hours after embolization.

체로 조영제가 천천히 새어 나가는 즉, 지연 조영증강 때문으로 생각되어 실제 조영증강비는 30분의 조영전 T1강조영상과 3시간 조영후 T1강조영상을 대상으로 한 지연 조영증강비가 정확할 것으로 예상되었으며 이를 각 군의 각 부위별로 측정하여 Table 2에 나타내었다. 양군 병변안 및 정상안의 전방이 높은 지연 조영증강을 보였다. 특히 실험군 병변안의 전방이 가장 높았으나 실험군의 정상안 및 대조군의 양안의 전방과 통계적으로는 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ). 실험군 병변안의 후방의 지연 조영증강율은 실험군의 정상안 및 대조군 양안의 후방과 비교하였을 때 통계적으로 의미있는 차이를 보이며 높았다 ( $P<0.05$ ). 초자체의 지연 조영증강율은 각 군의 각 눈에서 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ). 조영증강에 따른 병변안과 정상안의 전방, 후방 및 초자체의 조영증강비를 서로 비교하여 나타내었다 (Fig. 3).

### 고 찰

이번 실험의 중요한 결과를 살펴보면 첫째, 대조군의 양안 전방에 3시간 조영전 자기공명영상에서 지연 조영증강에 의한 고신호강도를 확인할 수 있었고 이는 정상적인 상황에서 조영제가 혈방수 장벽을 뚫고 전방으로 천천히 새어 나가

는 것을 의미한다. 둘째, triolein emulsion으로 embolization을 야기한 후 관찰한 자기공명영상에서 후방에서 지연 조영증강이 아주 뚜렷하였으며 정량 분석에서 다른 눈 (실험군의 정상안과 대조군의 양안)의 후방에 비해 통계적으로 의미 있는 조영증강을 보였다. 이는 triolein에 의해 혈방수 장벽이 손상되었으며 이로 인해 조영제가 후방으로 새어 나간다는 것을 뜻한다. 셋째, 대조군 뿐만 아니라 실험군의 초자체에서도 지연 조영증강은 나타나지 않아 혈망막 장벽은 이번 실험 방법으로는 손상되지 않았다는 것을 의미한다. 혈뇌장벽을 인위적으로 여는 시도는 다양하나 최근에 지방의 일종인 triolein emulsion을 이용하여 최장 1~3일 동안 가역적으로 혈뇌장벽을 여는 실험이 보고되었다 (Kim, 2002). 혈안장벽의 손상으로 인해 자기공명영상에서 지연 조영증강이 나타나는 것을 보고하였다 (Manfre et al., 1997). 그러나 이번 실험에서는 혈안장벽의 손상이 없는 정상안의 전방에서 지연 조영증강이 나타났으며 이는 모양체의 혈관이 분자량 590 달톤인 Gadolinium을 통과시킨다는 것을 의미한다. 특히 정상안의 전방이 후방에 비해 지연 조영증강이 강했는데 이는 조영제가 후방을 거치지 않고 모양체에서 바로 전방으로 빠진다는 것을 의미하며 단백질의 확산이 모양체에서 전방으로 향하며 후방으로 들어가지 않는다는 이론 (Kolodny et al., 1996)을 입증한다. 이 경로는 모양체 실질에서 합성되는 면역조절물질의 확산 기전과 모양체의 주주망상체의 기전 이해에 중요하다. 또한 이번 실험에서 실험군의 병변안 후방에서 관찰된 의미 있는 조영증강은 혈방수 장벽의 손상으로 초래된 조영제의 후방 유입을 의미하는 것으로 이번 실험이 혈방수 장벽의 실험 모델로서의 가치가 있음을 증명해 주는 것이라 하겠다. 조영제를 이용한 자기공명영상이 혈망막 및 혈방수 장벽의 변화를 정량적으로 정확하게 측정할 수 있다 (Kolodny et al., 2002). 자기공명영상의 좋은 공간능은 laser flowmetry와 같은 생체 실험 방법으로도 불가능한 후방의 관찰을 가능하게 해 준다 (Rankin et al., 2002). 이번 실험에서 triolein emulsion의 동맥주입으로 인해 혈관의 투과성이 증가한 것을 조영증강 자기공명영상으로 확인하였으며 정성 및 정량 분석이 가능했고 혈방수 장벽의 투과성에 대해 비침습적 생체실험으로 사용할 수 있었으며 계속 추가 검사를 할

수도 있다. 조영증강 자기공명영상을 이용한 혈망막 장벽의 연구가 많이 이루어지고 있다 (Arrindell et al., 1995; Trick et al., 2005). 그러나 혈방수 장벽의 연구에 대해서는 활발하지 않았으며 특히 혈망막 장벽과 혈방수 장벽의 보전력 (integrity)의 비교논문은 별로 없다. 이번 실험에서는 초자체에서의 조영증강이 실험군의 병변안에서 나타나지 않아 혈망막 장벽의 손상이 초래되지 않았음을 의미한다. 따라서 혈망막 장벽이 상대적으로 혈방수 장벽보다 튼튼함을 알 수 있었다. 혈망막 장벽의 손상을 위해서는 triolein emulsion 용량을 증가하던지 혹은 좀 더 독성이 있는 자유지방산을 사용하는 방법이 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 triolein emulsion을 고양이와 경동맥에 주입하여 자기공명영상을 이용하여 살펴 본 혈안장벽의 손상 유무에 대한 이번 실험에서 혈안장벽 중 혈방수 장벽 연구 모델은 높은 제작 성공률, 재현성, 객관성 및 비침습적인 방법임을 관찰하였다. 따라서 triolein emulsion 기법을 이용한 자기공명영상 모델은 혈방수 장벽의 연구 모델로서의 가치가 있음을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Arrindell EL, Wu JC, Wolf MD. High-resolution magnetic resonance imaging evaluation of blood-retinal barrier integrity following transscleral diode laser treatment. *Arch Ophthalmol.* 1995. 113: 96-102.
- Harris A, Bingaman DP, Ciulla TA. Retinal and choroidal blood flow in health and disease. In: *Retina 3rd Ed.* by Ryan SJ, Mosby, St. Louis. 2001. 68-88.
- Kim HJ, Lee JH, Lee CH, Lee SH, et al. Experimental cerebral fat embolism: embolic effects of triolein and oleic acid depicted by MR imaging and electron microscopy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002. 23: 1516-1523.
- Kolodny NH, Freddo TF, Lawrence BA. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging confirmation of an anterior protein pathway in normal rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996. 37: 1602-1607.
- Kolodny NH, Goode ST, Ryan W. Evaluation of therapeutic effectiveness using MR imaging in a rabbit model of anterior uveitis. *Exp Eye Res.* 2002. 74: 483-491.
- Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 1998. 42: 1083-1099.
- Manfre L, Midiri M, Giuffre G, Mangiameli A, et al. Blood-ocular barrier damage: use of contrast-enhanced MRI. *Eur Radiol.* 1997. 7: 110-114.
- Munzenrider JE. Uveal melanomas. Conservation treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001. 15: 389-402.
- Rankin AJ, Krohne SG, Glickman NW. Laser flaremetric evaluation of experimentally induced blood-aqueous barrier disruption in cats. *Am J Vet Res.* 2002. 63: 750-756.
- Stewart PA, Tuor UI. Blood-eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function. *J Comp Neurol.* 1994. 340: 566-576.
- Trick GL, Liggett J, Levy J. Dynamic contrast enhanced MRI in patients with diabetic macular edema: initial results. *Exp Eye Res.* 2005. 81: 97-102.