

요오드 아세트산으로 유도된 성묘 망막변성 모델에서의 망막전위도 변화

Electroretinography Changes in Feline Model of Iodoacetic Acid-induced Retinal Degeneration

김창주¹ · 이명신^{1,2} · 이승욱¹ · 이상준¹

Changzoo Kim, MD¹, Myungshin Lee, MD^{1,2}, Seung Uk Lee, MD, PhD¹, Sang Joon Lee, MD, PhD¹

고신대학교 의과대학 안과학교실¹, 인제대학교 의과대학 안과학교실²
Department of Ophthalmology, Kosin University College of Medicine¹, Busan, Korea
Department of Ophthalmology, Inje University College of Medicine², Busan, Korea

Purpose: We explored changes in photoreceptor function and histology in an iodoacetic acid (IAA)-induced model of feline retinal degeneration.

Methods: From January to October 2014, we studied 11 adult felines (22 eyes) over 2 years of age divided into two groups (two in a control and nine in an IAA group). The mean body weights of these two groups were 1.75 ± 0.35 and 1.61 ± 0.19 kg, and the male:female sex ratios 1:1 and 2:7, respectively. Electroretinograms (ERGs) were obtained before injection and at 1-4 week post-injection (20 mg/kg IAA). Standard paraffin retinal sections were stained with hematoxylin/eosin and other sections subjected to immunohistochemistry. We histologically evaluated the outer nuclear layer, and photoreceptor cone and rod cells.

Results: In ERGs of the IAA group, both the rod and cone mean b wave amplitudes decreased significantly from week 1 to week 4 after injection (27.43, 29.41, 64.17, and 56.03; and 61.04, 51.25, 131.36, and 136.68 μ V, respectively) compared to baseline (322.48 and 610.00 μ V respectively) ($p < 0.01$). Optical microscopy revealed a significant decrease in the cell count of the outer nuclear retinal layer (16.83 ± 0.89 in the control and 11.98 ± 3.55 in the IAA groups, $p < 0.01$). Fluorescence microscopy revealed a significant reduction in the mean area per unit length of the rod cell layer ($35,225.67 \pm 2,477.02$ and $14,903.62 \pm 2,319.65$ in the control and IAA groups, $p < 0.01$), but not in the cone cell count (26.16 ± 1.34 and 23.98 ± 6.16 in the control and IAA groups, $p = 0.075$).

Conclusions: ERGs revealed that functional b wave amplitudes fell after IAA-induce retinal degeneration in felines; histology showed that this was accompanied by reductions in the numbers of outer nuclear layers and rod cells. IAA induces photoreceptor degeneration in felines; further study is necessary.

J Korean Ophthalmol Soc 2019;60(12):1205-1215

Keywords: Animal model, Electroretinography, Iodoacetic acid, Retinal degeneration

■ Received: 2019. 7. 4. ■ Revised: 2019. 8. 9.
■ Accepted: 2019. 11. 29.

■ Address reprint requests to Sang Joon Lee, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Kosin University Gospel
Hospital, #262 Gamcheon-ro, Seo-gu, Busan 49267, Korea
Tel: 82-51-990-6140, Fax: 82-51-990-3026
E-mail: hhiatus@gmail.com

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

시각경로의 1차 뉴런인 광수용체는 빛을 전기 신호로 변환시킨다.¹ 포유류 망막의 광수용체는 막대세포와 원추세포로 구성되며 손상 시 시력 장애가 발생한다.² 광수용체가 파괴되는 망막변성질환의 대표적인 질환으로는 색소망막염(retinitis pigmentosa)이 있다.³ 색소망막염 환자의 유병률은 4,000명 당 1명으로 약 100만 명 이상의 인구가 이환되어 있을 것으로 추정하며, 우리나라는 1만 명 이상 있을 것

© 2019 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.

으로 생각된다.⁴ 색소망막염이란 막대세포와 원뿔세포의 변성이 특징인 다양한 유전질환군을 뜻한다.^{5,6} 증상으로는 야맹증과 주변시야 감소가 있으며 시간에 따라 중심시력도 감소한다.^{3,4} 현재까지 명확한 치료법이 없어 질병의 자연 경과에 따른 다양한 모델을 이용하여 새로운 치료 방법을 연구하고 있다.⁴

색소망막염과 같은 망막변성을 연구하기 위한 다양한 동물 모델의 연구가 있다.⁷⁻¹⁰ 동물 모델 중 성묘, 돼지와 같은 대형 동물은 해부학적, 조직학적으로 인간의 눈과 유사하다. 인간의 황반과 같이 광수용체가 집중되어 있는 중심 영역(area centralis)이 있고, 중심망막과 주변망막의 원추, 막대세포의 분포도 사람과 비슷하다.¹¹⁻¹³ 이러한 이유로 대형 동물은 요오드 아세트산(Iodoacetic acid, IAA)-유발 망막변성 모델로 사용되었다.¹⁴⁻¹⁹ IAA는 눈을 포함한 여러 장기의 세포에 작용하며, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 sulfhydryl group과 반응하여 혐기성 해당 작용(anaerobic glycolysis)을 억제한다.²⁰⁻²⁵ 이러한 기전으로 IAA는 대사가 가장 활발한 망막의 광수용체를 선택적으로 손상시킨다. 이 과정에서 광수용체는 손상되지만, 내측 망막은 보존되는 인간의 색소망막염 초기의 조직학적 특징을 보인다.²⁶ 이러한 특징적인 망막변성 소견을 이용하여 IAA 유발 망막변성 동물 모델이 연구되었고, 색소망막염 질환의 치료법 연구에 사용되고 있다.^{14,16,17}

연구 대상인 대형 동물 중 성묘는 중심 영역의 존재, 양안시를 하는 해부학적 구조, 안구의 크기가 커서 안내주사, 수술, 검사 등의 처치가 편리하다는 장점이 있다.^{11,15} 현재까지 발표된 성묘 망막변성 연구로 두 가지가 알려져 있다. Ofri et al²⁷의 상염색체 열성으로 유전되는 진행성 망막위축 벵갈성묘 연구와 Nan et al¹⁴의 IAA 유발 망막변성 성묘 연구이다. Ofri et al²⁷의 연구에서 유전적 진행성 망막위축성묘 모델은 상염색체 열성으로 유전되며, 생후 1년 이내에 변성을 보였다. 유전질환으로 일정 시간이 지나야 발현되는 변성을 일찍 확인할 수 있다는 점과, 자연 경과와 비슷한 관찰을 할 수 있다는 점에서 색소망막염의 모델로 적합하다. 다만 고려해야 할 점은 지속적인 분양을 통한 색소망막염의 동물 모델로서의 가능성을 제시하고 있지만, 긴 시간을 통한 교배와 육성이 현실적으로 쉽지 않다는 점이다. Nan et al¹⁴은 IAA를 정맥으로 주입하여 망막변성 성묘 모델을 만들었다. 변성을 위한 적정 용량의 IAA를 제시하였고, 성공적으로 변성을 일으켰다. 그렇지만 망막변성을 확인하기 위한 망막전위도 검사가 주사 전, 6개월 후 총 2회만 시행되어 기능적인 변성이 유도되는 시간을 확인하지 못했다는 점, 조직검사가 6개월 이후에 시행되어 외과립층의 소실만 확인되었다는 점, 원추세포와 막대세포의 면역

화학염색이 없어 광수용체의 변화를 구체적으로 확인하지 못했다는 점이 연구의 한계로 남았다.¹⁴ 저자들은 IAA를 이용하여 성묘에게 광수용체 변성을 일으키고, 그 과정에서 나타나는 기능적인 변화를 1주 간격으로 4주간 관찰하고, 조직학적 변화를 확인하여 그 결과를 광수용체 세포의 변화와 연결하여 연구하고자 한다.

대상과 방법

2014년 1월부터 10월까지 2살 이상의 특이 병력이 없는 성체 성묘 22안(11마리, 수컷 8마리, 암컷 3마리)을 대상으로 하였다. 동물실험윤리위원회의 승인(승인 번호: 고신 13-15)을 받고 실험을 시작하였다. 성묘는 국립경상대학교 수의과대학에서 검역 후 인수받았으며, 안과 및 시과학 연구회(Association for Research in Vision and Ophthalmology)에서 규정하고 있는 동물실험에 대한 지침을 준수하였다. 인수 후 양육은 본교 의과학교실에서 운영하는 동물실험실에서 진행하였다. 성체 성묘 22안(11마리)을 대조군 4안(2마리, 수컷 1마리, 암컷 1마리), 실험군 18안(9마리, 수컷 2마리, 암컷 7마리)으로 설정하였다. 망막전위도검사는 실험군을 대상으로 초기 검사를 기준치로 설정하여 동일 개체 내에서 검사 결과를 비교하였고, 조직검사 및 면역화학염색은 대조군과 실험군을 비교하였다.

성묘에게 티레타민염산염 졸라제팜염산염 복합제(Zoletil 50, Virbac SA, Carros, France) 10 mg/kg와 염산자일라진(Rompun, Bayer, Berlin, Germany) 3.5 mg/kg을 엉덩이 근육, 혹은 넓다리 뒤쪽 근육에 주사하여 마취하였다. 마취 후 체중계(JENIX, Seoul, Korea)를 사용하여 몸무게를 재고, 초음파 A-scan (Quantel medical, Courmon-d'Auvergne, France)를 이용한 안축장 측정을 하였다. 마취된 상태로 중심부 각막을 누르지 않으면서 각막 앞 표면에서 망막색소상피 층까지의 길이를 10회 측정 후 평균값을 구하였다.

성묘를 마취시킨 후 0.5% tropicamide and 0.5% phenylephrine (Mydrin-P, Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) 점안제를 사용해 산동시켰다. 이후 차광된 케이지에 넣어 30분간 암순응을 하였다. 망막전위도는 RETiport (Roland Consult, Brandenburg, Germany)를 사용하여 검사하였다. 검사 중의 체온 유지를 위해 보온 담요를 깔고, 각막에 표면전극을, 귀에는 기준전극을, 꼬리에는 접지전극을 부착하였다. 암반응은 0.01 cd·s/m²에서 1.0 cd·s/m²까지 각 세기마다 3회 이상의 검사를 시행하여 b wave의 평균 진폭값을 구하였다. 명반응은 5분간 명반응 후 30 cd·s/m²의 자극을 주면서 3회 이상의 검사를 시행하여 b wave의 평균 진폭값을 구하였다. 주사 전, IAA 주사 후 1주에서 4주째

까지 1주 간격으로 망막전위도를 측정하였다. 망막변성 유도 전 12시간 동안 성묘를 금식시킨 후 공복혈당을 측정하였다(Accu-check, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). 망막변성 유발 약물을 준비하기 위해 IAA (Iodoacetic acid, Merck, Buchs, Switzerland)를 phosphate buffered solution (PBS, Lonza, Walkersville, ME, USA) 10 mL에 녹이고 pH를 7.4로 조정하였다. PBS를 추가하여 총 20 mL가 되게 하여 50 mg/mL 농도로 제조한 뒤 0.2 µm 필터(Minisart, Sartorius stedim, Biotech GmbH, Nordost, Germany)로 걸렀다. 24G 바늘을 사용해서 준비된 20 mg/kg 용량의 IAA를 대퇴정맥으로 5분간 천천히 주사하였다.

이산화탄소를 사용하여 성묘를 희생시킨 후 안구를 적출하였다. 각막윤부(corneal limbus)를 따라 원형으로 절개한 후 망막에 손상을 주지 않으면서, 각막(cornea), 홍채(iris), 수정체(lens)와 유리체(vitreous body)를 분리하였다. 시신경을 바닥에 두고 투명대(tapetum lucidum)경계와 시신경의 아래 경계(inferior margin)를 따라 수평절개(horizontal incision)를 넣었다. 이 선을 기준으로 시신경의 내측 경계(medial margin)를 포함하여 90°의 수직절개(vertical incision)를 시행하였다. 시신경의 가장자리로부터 모양체 주

름부(pars plicata), 편평부(pars plana), 거상연(ora serrata)까지 각각의 해부학적 구조에 해당하는 길이를 측정하였다. 시신경을 포함하여 6 × 6 mm의 조직을 획득하였다(Table 1, Fig. 1). 조직을 10% 포르말린(BBC biochemical, Mt Vernon, WA, USA) 용액에 48시간 동안 고정시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척하고 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에틸알코올(EMSURE®, Merck)을 이용하여 각각 2시간 동안 탈수시켰다. 자일렌에 60분간 3회 넣어 투명화 작업을 하고, 파라핀을 2시간 동안 3회 침투시켰다. 파라핀 포매한 뒤 Microtome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Germany)으로 4 µm 두께의 절편을 만들고, 조직 슬라이드를 제작하였다.

파라핀 조직 절편을 자일렌으로 5분간 2회 처리하여 탈

Table 1. Gross anatomical lengths

Location	Length (mm)	Location	Length (mm)
A	2.75 ± 0.59	I	13.91 ± 0.39
B	2.33 ± 0.31	J	14.08 ± 0.18
C	2.79 ± 0.32	K	11.58 ± 0.44
D	2.54 ± 0.37	L	11.54 ± 0.37
E	2.07 ± 0.21	M	11.20 ± 0.32
F	2.50 ± 0.45	N	9.25 ± 0.38
G	2.25 ± 0.38	O	8.87 ± 0.46
H	2.58 ± 0.60		

Values are presented as mean ± standard deviation.

A = superiorly, the average distance between the pars plicata and pars plana; B = laterally, the average distance between the pars plicata and pars plana; C = inferiorly, the average distance between the pars plicata and pars plana; D = medially, the average distance between the pars plicata and pars plana; E = superiorly, the average distance between the pars plana and ora serrata; F = laterally, the average distance between the pars plana and ora serrata; G = inferiorly, the average distance between the pars plana and ora serrata; H = medially, the average distance between the pars plana and ora serrata; I = the average distance from the superior optic disc margin to the superior ora serrata; J = the average distance from the lateral optic disc margin to the lateral ora serrata; K = the average distance from the inferior optic disc margin to the inferior ora serrata; L = the average distance from the medial optic disc margin to the medial ora serrata; M = the average distance from the superior optic disc margin to the superior tapetum lucidum; N = the average distance from the lateral optic disc margin to the lateral tapetum lucidum; O = the average distance from the inferior optic disc margin to the inferior tapetum lucidum.

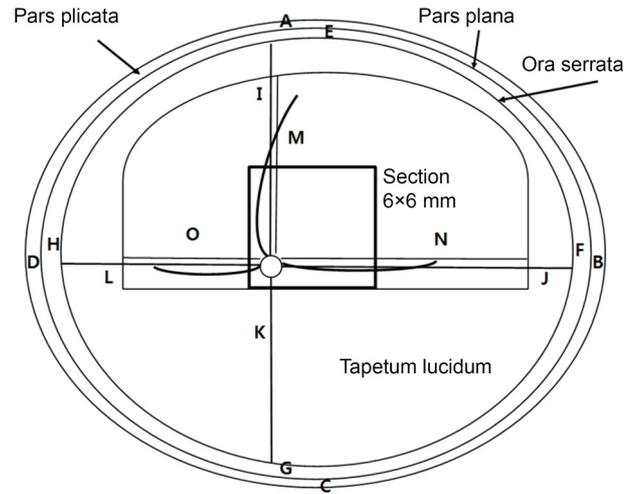


Figure 1. A schematic of the left-eye feline fundus showing the locations and sizes of histological tissue samples. A = superiorly, the average distance between the pars plicata and pars plana; B = laterally, the average distance between the pars plicata and pars plana; C = Inferiorly, the average distance between the pars plicata and pars plana; D = medially, the average distance between the pars plicata and pars plana; E = superiorly, the average distance between the pars plana and ora serrata; F = laterally, the average distance between the pars plana and ora serrata; G = inferiorly, the average distance between the pars plana and ora serrata; H = medially, the average distance between the pars plana and ora serrata; I = the average distance from the superior optic disc margin to the superior ora serrata; J = the average distance from the lateral optic disc margin to the lateral ora serrata; K = the average distance from the inferior optic disc margin to the inferior ora serrata; L = the average distance from the medial optic disc margin to the medial ora serrata; M = the average distance from the superior optic disc margin to the superior tapetum lucidum; N = the average distance from the lateral optic disc margin to the lateral tapetum lucidum; O = the average distance from the inferior optic disc margin to the inferior tapetum lucidum.

파라핀화시키고, 100% 에탄올로 5분간 2회, 95%, 80%, 70% 에탄올로 각각 5분간 1회 처리하여 수화시키고 PBS로 5분간 세척하였다. 5분간 헤마톡실린(Poly Scientific Research, Bay Shore, NY, USA)으로 염색하고 세척한 뒤에 에오신(Poly Scientific Research)으로 3분간 염색하고 70%, 80%, 95% 에탄올에 각각 2분간 1회, 100% 에탄올을 2분간 2회, 자일렌으로 5분간 2회 처리하여 슬라이드를 염색하였다.

탈파라핀화된 조직 슬라이드를 citrate buffer (10 mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0)에 잠기도록 담그고 전자레인지(Microwave)에서 2분간 가열하였다. 상온에서 30분 동안 냉각 후 PBS로 5분간 2회 세척하였다. 조직절편 주변으로 Immuno pen (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 원을 그렸다. 혈청차단제(0.5% Goat serum [sigma G9023], triton X 0.05%)로 조직절편을 1시간 동안 실온에서 차단시켰다. 이후 1차 항체 Opsin (1:500, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA), Rhodopsin (1:500, Chemicon International, Inc.)에 조직을 담그고 4°C 냉장실에 넣어 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 각 슬라이드를 TPBS (0.05% tween 20 + PBS)에 담근 후 shake plate (LaboShaker R100, LaboGene, Lillerød, Denmark)에서 5분씩 3회 씻은 후 2차 항체 L/M Opsin 1:500 (Alexa Fluor® 488, AAT Bioquest, Inc., Eugene, OR, USA), RHO 1:500 (Alexa Fluor® 546, AAT Bioquest, Inc.), DAPI 1:1000 (CHEMICON International Inc.)로 암실에서 1시간 동안 처리하였다. TPBS에 담근 후 shake plate에서 5분씩 3회 세척하였다. 조직이 건조되기 전 조직 고정을 위한 mounting solution을 뿌리고, cover glass (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany)로 덮어 슬라이드를 제작하였다.

H&E 염색한 후 광학현미경검사(Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan)를 시행하였다. 시신경유두 중심에서 2,000 µm 등쪽의 절편에서 망막 내과립층과 외과립층의 두께를 측정하였다. 200배 배율하에서 각 절편마다 내과립층과 외과립층의 경계선에 수직으로 가상의 선을 그었다. 가상의 선은 촬영된 절편 사진을 수평으로 4등분하는 3개의 평행한 선을 그었다. 각 선과 만나는 핵의 열 수를 계수하였으며, 각 눈 당 3개의 측정값을 구하고 평균을 구하였다.

원뿔세포(L/M Opsin+)는 400배율의 시야에서 촬영한 사진에서 opsin으로 염색된 모든 세포를 세었다. 막대세포(RHO+)는 Image J 프로그램(Version 1.47, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)으로 단위 길이(50 µm)당 염색된 면적을 측정하였다. 자동으로 눈금자가 표시되는 위치에 수직으로 위쪽에 위치한 면적을 측정하였고, 각 눈

당 3개 슬라이드의 평균 면적을 구하였다.

획득된 망막전위도 신호의 b wave 진폭, 조직검사의 외과립층의 두께, 면역화학염색하에서 막대세포의 단위 면적, 원뿔세포의 단위 길이당 개수를 SPSS 18.0 version (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)으로 Wilcoxon signed rank test를 사용해 통계를 시행하였다. $p < 0.05$ 일 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

성묘의 평균 체중은 1.61 ± 0.19 kg, 평균 안축장은 19.25 ± 0.67 mm, 주사 전 평균 공복혈당은 146.61 ± 25.02 mg/dL 였다(Table 2). 성묘의 안구 내 시신경의 가장자리에서 상측, 이측, 하측, 내측으로 모양체 주름부와 편평부 사이의 평균 간격(평균 ± 표준편차, mm 단위)은 각각 2.75 ± 0.59 , 2.33 ± 0.31 , 2.79 ± 0.32 , 2.54 ± 0.37 이었고, 편평부와 거상연 사이의 평균 간격은 동일 방향 순서대로 각각 2.07 ± 0.21 , 2.50 ± 0.45 , 2.25 ± 0.38 , 2.58 ± 0.60 이었다. 시신경의 상측부, 이측부, 하측부, 내측부 가장자리에서 거상연까지의 거리는 평균 13.91 ± 0.39 , 14.08 ± 0.18 , 11.58 ± 0.44 , 11.54 ± 0.37 로 각각 측정되었고, 시신경 상측, 이측, 내측부에서 투명대 경계까지의 평균거리는 각각 11.20 ± 0.32 , 9.25 ± 0.38 , 8.87 ± 0.46 로 측정되었다(Fig. 1).

망막전위도검사에서는 IAA 주사 후 1주부터 4주째 명반응과, 암반응검사에서 b wave 진폭이 유의하게 작아졌다. 주사 후 2주째 진폭이 가장 작았고, 이후 회복되는 양상을 보였다(Fig. 2, Table 3). $0.01 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 에서 $1.0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 까지 암반응과 명반응 b wave의 진폭이 주사 전에 비하여 유의하게 작았다(Table 3). 주사 후 3주부터 b wave의 진폭은 회복 양상을 보였으나, 주사 전보다 유의하게 작았다(Fig. 2). 잠복기는 초기 검사와 비교 시 $0.05 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 에서 2, 3, 4주차($p < 0.01$), $0.1 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 에서 2, 3, 4주차($p = 0.03$, $p < 0.01$, $p < 0.01$), $0.5 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 에서 2주차($p = 0.04$)에 잠복기의 유의한 지연 소견을 보였으나, 명반응에서는 나타나지 않았다(Table 4).

Table 2. Baseline characteristics of the felines

Baseline characteristic	Control group (n = 2)	IAA group (n = 9)
Weight (kg)	1.75 ± 0.35	1.61 ± 0.19
Sex (M/F)	1/1	2/7
Axial length (mm)	19.13 ± 0.31	19.25 ± 0.67
Fasting glucose level (mg/dL)	144.5 ± 4.95	146.61 ± 25.02

Values are presented as mean ± standard deviation unless otherwise indicated.

IAA = iodoacetic acid; M/F = male/female.

광학현미경검사상 내과립층의 핵개수는 대조군 5.51 ± 0.83 개, 실험군 5.01 ± 0.76 개로 유의한 변화를 보이지 않았고($p=0.11$), 외과립층의 핵개수는 대조군 16.83 ± 0.89 개,

실험군 11.98 ± 3.55 개로 유의하게 감소하였다($p<0.01$) (Fig. 3). 면역화학염색 후 시행한 형광현미경 검사상 L/M Opsin의 수가 대조군 26.16 ± 1.34 개에서 실험군 $23.04 \pm$

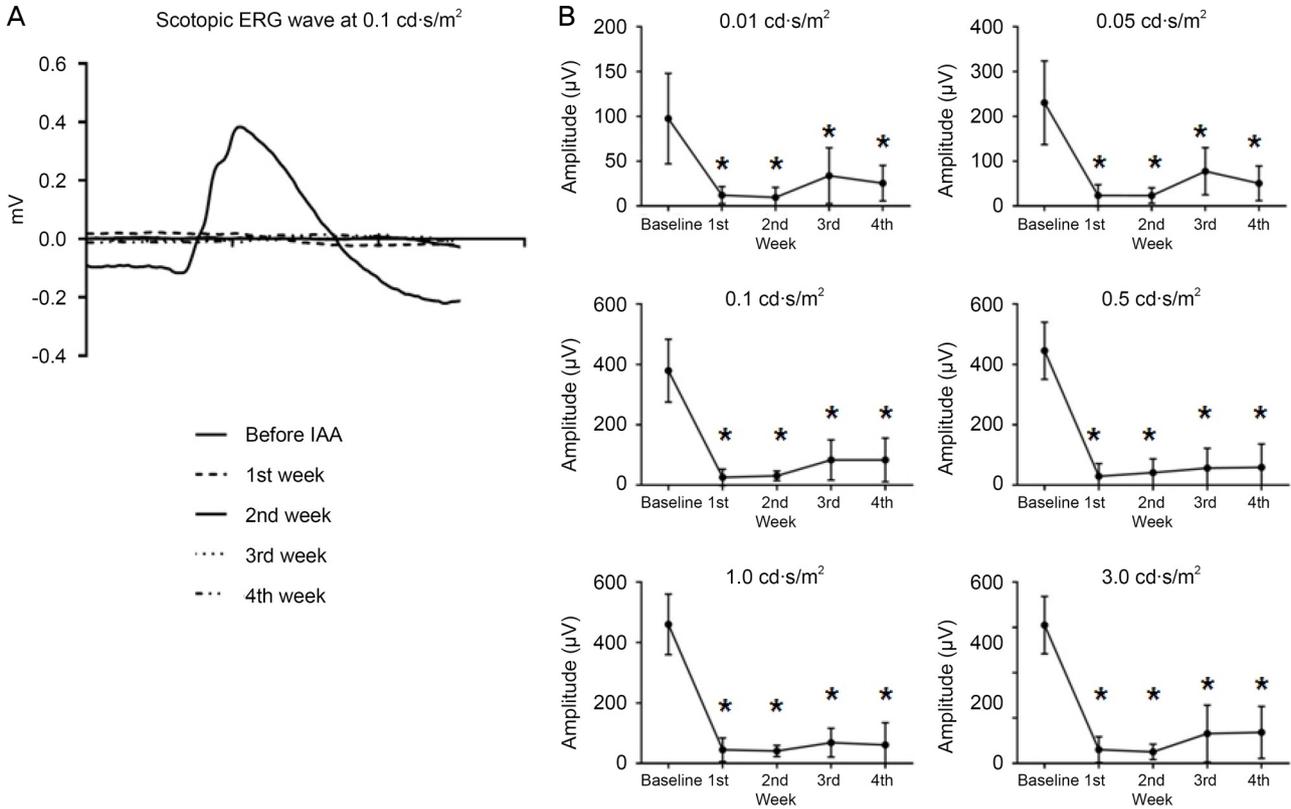


Figure 2. A representative electroretinogram (ERG) scotopic response at 0.1 cd-s/m^2 of feline #5 (right eye). (A) The scotopic ERG wave was below 0.1 cd-s/m^2 from baseline (before iodoacetic acid [IAA] injection) to 4th week after injection. The b wave disappeared at 1st week after injection, and did not reappear during the next 3 weeks. (B) Changes in the average b wave amplitude (cd-s/m^2) after IAA injection. The differences were statistically significant ($p < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test).

Table 3. Average ERG b wave amplitudes after iodoacetic acid injection

Stimulation intensity	Baseline (μV)	1 week (μV) [*]	2 weeks (μV) [*]	3 weeks (μV) [*]	4 weeks (μV) [*]
0.01 cd-s/m^2	$97.52 \pm 50.60^\dagger$ (100) [‡]	$12.13 \pm 9.62^\dagger$ (12.4) [‡]	$9.55 \pm 11.28^\dagger$ (9.7) [‡]	$33.81 \pm 31.22^\dagger$ (34.7) [‡]	$25.49 \pm 19.87^\dagger$ (26.1) [‡]
0.05 cd-s/m^2	$230.35 \pm 93.46^\dagger$ (100) [‡]	$23.53 \pm 24.44^\dagger$ (10.2) [‡]	$23.30 \pm 17.37^\dagger$ (10.1) [‡]	$77.46 \pm 52.69^\dagger$ (33.6) [‡]	$50.58 \pm 38.89^\dagger$ (21.9) [‡]
0.1 cd-s/m^2	$379.36 \pm 103.94^\dagger$ (100) [‡]	$26.35 \pm 27.63^\dagger$ (6.9) [‡]	$31.22 \pm 15.89^\dagger$ (8.2) [‡]	$83.68 \pm 66.53^\dagger$ (22.1) [‡]	$83.54 \pm 72.86^\dagger$ (22.0) [‡]
0.5 cd-s/m^2	$445.21 \pm 94.65^\dagger$ (100) [‡]	$29.85 \pm 42.63^\dagger$ (6.7) [‡]	$41.5 \pm 45.72^\dagger$ (9.3) [‡]	$56.94 \pm 66.17^\dagger$ (12.8) [‡]	$59.12 \pm 77.41^\dagger$ (13.3) [‡]
1.0 cd-s/m^2	$460.00 \pm 100.42^\dagger$ (100) [‡]	$45.28 \pm 39.11^\dagger$ (9.8) [‡]	$41.48 \pm 18.77^\dagger$ (9.0) [‡]	$68.94 \pm 47.82^\dagger$ (14.9) [‡]	$61.38 \pm 74.37^\dagger$ (13.3) [‡]
Photopic response [§]	$610.5 \pm 126.66^\dagger$ (100) [‡]	$61.04 \pm 56.79^\dagger$ (9.9) [‡]	$51.25 \pm 34.43^\dagger$ (8.4) [‡]	$131.36 \pm 125.82^\dagger$ (21.5) [‡]	$136.68 \pm 115.10^\dagger$ (22.4) [‡]

Values are presented as mean \pm standard deviation unless otherwise indicated.

ERG = electroretinogram.

^{*}Based on the Wilcoxon signed-rank test; [†]statistically significant ($p < 0.05$); [‡]baseline/weekly amplitude ratio (percentage); [§]intensity:photopic response = 3.0 cd-s/m^2 .

6.16개로 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.075$). Rhodopsin (RHO)의 단위 길이당 염색된 면적은 대조군 $35,225.67 \pm 2,477.02$, 실험군 $14,903.62 \pm 2,319.65$ 로 유의하게 감소하였다($p<0.01$) (Fig. 3, 4).

고 찰

본 연구에서는 성묘 망막변성 모델을 만들기 위해 IAA를 사용하였다. 20 mg/kg의 용량으로 광수용체의 변성을

유도한 후, 망막전위도와 면역화학염색을 시행하였다. 그 결과 b wave의 진폭 감소와 외과립층의 핵 개수 감소, 막대세포의 염색면적 감소를 통해 망막변성을 확인할 수 있었다.

망막변성을 일으키기 위한 IAA 주입 용량에 대한 연구에서 Noel et al¹⁷은 돼지를 대상으로 네 가지 농도(7.5 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 30 mg/kg)의 IAA를 주입하여 용량과 망막변성 효과가 비례한다고 하였다. Noell^{28,29}은 용량을 비교하면서 돼지에게 12 mg/kg의 IAA를 정맥 투여하면, 망

Table 4. Average ERG b wave latency after iodoacetic acid injection

Stimulation intensity	Baseline	1 week*	2 weeks*	3 weeks*	4 weeks*
0.01 cd·s/m ²	61.1 ± 7.73	53.1 ± 22.55	57.7 ± 15.80	64.9 ± 20.98	66.2 ± 11.74
0.05 cd·s/m ²	54.1 ± 6.52	49.2 ± 15.78	71.0 ± 14.02†	73.6 ± 16.25†	74.4 ± 14.06†
0.1 cd·s/m ²	48.8 ± 8.12	41.3 ± 8.58	67.3 ± 22.00†	70.3 ± 19.48†	69.9 ± 16.58†
0.5 cd·s/m ²	43.5 ± 5.59	40.0 ± 6.57	61.2 ± 21.19†	58.8 ± 21.70	56.0 ± 19.71
1.0 cd·s/m ²	39.6 ± 4.74	35.6 ± 5.78	56.9 ± 24.33	44.2 ± 19.80	51.1 ± 19.08
Photopic response*	34.2 ± 5.36	29.4 ± 7.25	37.3 ± 6.93	33.7 ± 5.80	34.3 ± 7.24

Values are presented as mean ± standard deviation.

ERG = electroretinogram.

*Based on the Wilcoxon signed-rank test; †statistically significant ($p < 0.05$); *intensity:photopic response = 3.0 cd·s/m².

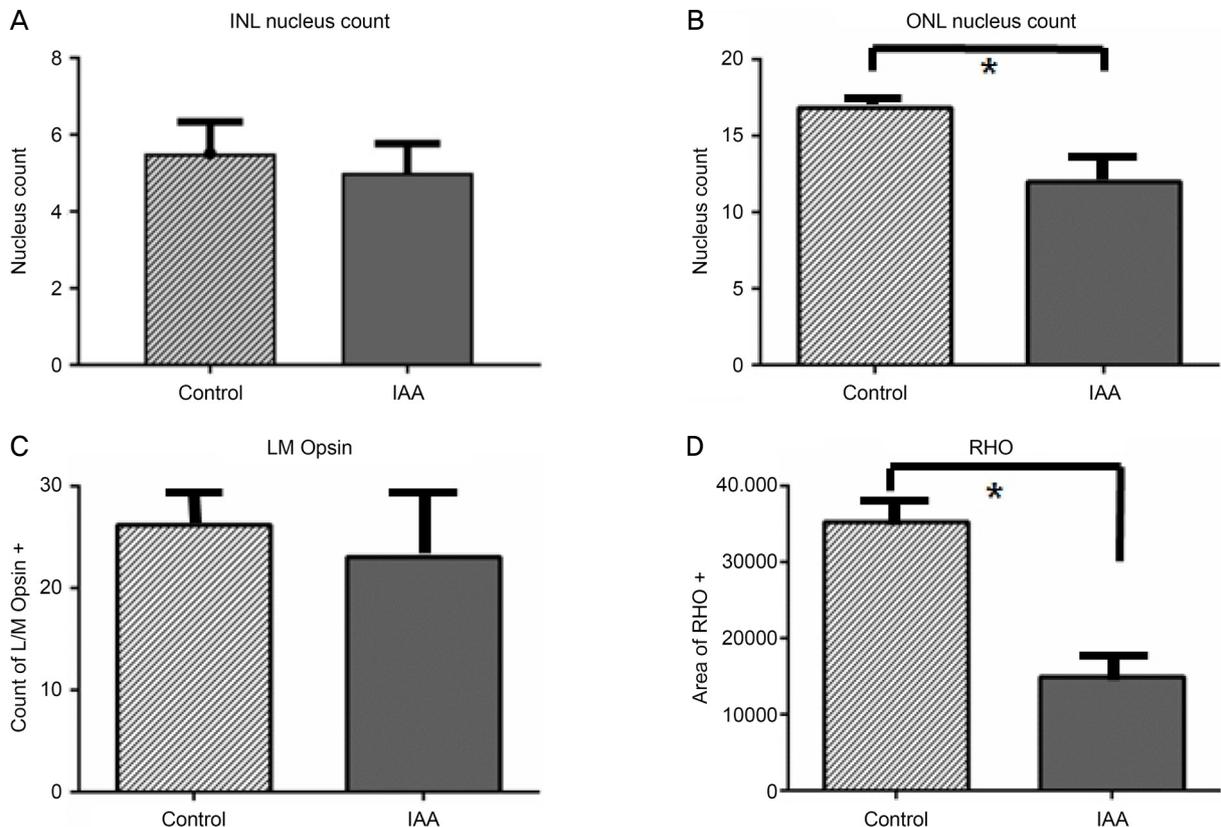


Figure 3. The mean ONL nuclear cell count and the mean RHO-stained area were significantly reduced after IAA injection; however, neither the INL nuclear cell count nor the L/M opsin cell count fell (A-D). INL = inner nuclear layer; IAA = iodoacetic acid; ONL = outer nuclear layer; L/M = anti-red/green; RHO = rhodopsin. * $p < 0.05$ Wilcoxon signed-rank test.

막전위도 b wave 진폭이 90초간의 감소 후 수분 내로 회복되고, 고용량인 22 mg/kg를 투여하면 6주 후 시각상실이 일어남을 보고하였다. Burke and Hayhow³⁰는 21-25 mg/kg의 IAA 정맥투여가 성묘의 망막변성 농도를 넘어선 치사량이라고 하였다. Wang et al¹⁶의 연구에서는 두 가지 농도 (7.5 mg/kg, 12 mg/kg)의 IAA를 돼지에게 주입하였고, IAA 용량이 늘어날수록 망막변성도 증가함을 보였다.

IAA의 투여 방법에 대해서는 Graymore and Tansley,^{31,32}

Rösch et al³³의 연구도 있다. 쥐의 정맥으로 투여한 IAA는 망막의 광수용체층에 대한 선택적 변성 효과를 보였다. 그렇지만 유리체 내 투여는 모든 망막층이 얇아져 외측 망막부의 변성에는 유용하지 않았다.^{31,33} Noel et al¹⁷은 다른 변성 유발 약물인 NaIO (Sodium Iodate)의 정맥 내 주입이 망막변성을 일으키지 못함을 밝혔다. Wang et al¹⁸은 광 독성을 이용한 토끼 망막변성 모델을 제안하였다. 그렇지만 빛을 이용한 망막변성은 광수용체층과 망막색소 상피층을 손

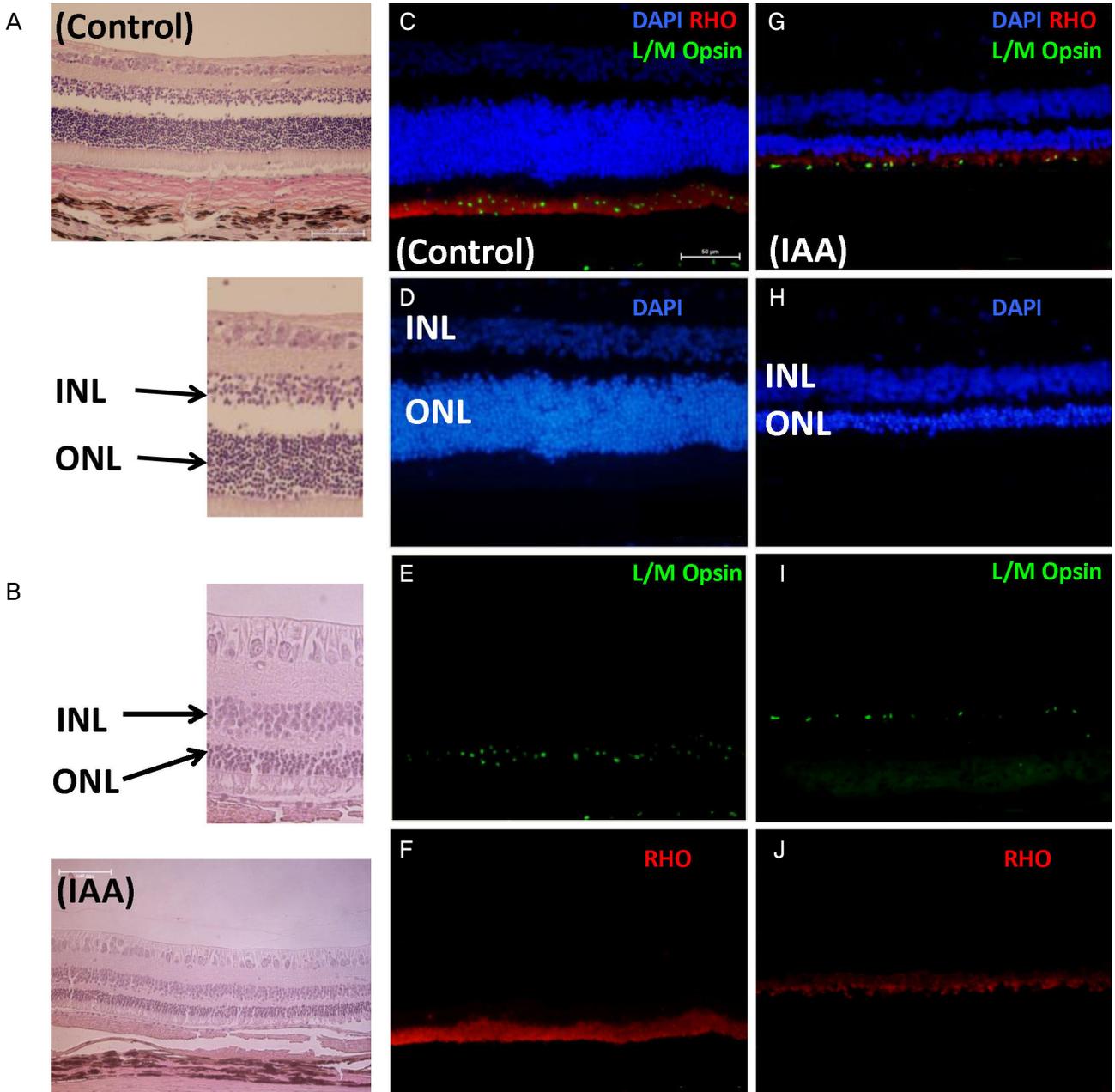


Figure 4. Iodoacetic acid (IAA) triggered loss of the outer but not the inner nuclear layer. (A, C-F) Control group histology (no IAA injection, [A], H&E staining, $\times 400$; [C-F], IHC staining, $\times 400$). (B, G-J) IAA group histology 4 weeks after IAA injection [B], H&E staining, [G-J], IHC staining, $\times 400$). Scale bar indicated 50 μm .

상시킬 수 있어 망막변성에 적합하지 않았다.¹⁸ Aplin et al¹⁹은 아데노신삼인산(adenosine triphosphate, ATP)의 유리체내 주사를 통한 망막변성 성묘 모델을 만들었다. 내측 망막을 보존하면서 광수용체의 변성을 성공적으로 유발하였지만, 일부에서 망막박리가 발생하였다. 이러한 아데노신삼인산(ATP)의 부작용은 생쥐를 대상으로 한 망막변성 실험에서도 보고되었다.^{19,34}

본 연구에서는 Nan et al¹⁴의 성묘 모델 보고를 참조하여 20 mg/kg의 IAA를 정맥으로 주입하였고, 시기능의 변화에 대한 평가를 위해 1주 간격으로 검사를 시행하였다. 백내장이나 망막박리와 같은 안구 내 합병증 없이 망막변성을 유도하였고, 면역화학염색을 통해 변성을 확인하였다.

다양한 망막손상 동물 모델에서 망막전위도가 시기능 평가에 사용되었다.^{25,27-30} IAA 유도 망막변성 동물 모델에서, 주사 후 망막전위도 b wave의 진폭이 줄어들었다.^{14,16,33} 성묘 모델에서는 IAA (20 mg/kg) 주사 전, 주사 6개월 후에 시행한 망막전위도검사에서, b wave의 진폭이 6개월째에는 주사 전에 비해 과형이 관찰되지 않을 정도로 작아졌다.¹⁴ 돼지 모델은 두 가지 용량(7.5 mg/kg, 12 mg/kg)으로 주사 후 12주까지 3주 간격으로 검사를 시행한 결과 용량에 비례한 진폭감쇄 효과와 주사 후 2주째 명반응, 암반응에서 가장 작은 b wave 진폭을 확인하였다. 이 연구에서 암반응의 b wave 진폭은 감소된 채로 유지되고, 명반응은 시간에 따라 회복되는 양상을 보였다.¹⁶ 본 모델에서도 IAA (20 mg/kg) 주사 전에 비해 암반응, 명반응 망막전위도검사상 유의하게 작은 b wave의 진폭을 보였다. Nan et al¹⁴의 보고에서는 주사 전과 주사 6개월 후에만 망막전위도가 시행되었기 때문에 IAA 투여 후 6개월간의 망막전위도 변화를 알 수 없었다. 본 연구는 IAA 주사 후 망막전위도 b wave의 진폭을 1주 간격으로 확인하였고, 망막변성의 효과를 추적하였다. 주사 후 2주째 명반응, 암반응에서 b wave의 진폭이 가장 작았고 이후 명반응만 회복 양상을 보였다. 주사 후 4주째 b wave의 진폭은 암반응 0.5, 1.0 cd·s/m²에서 주사 전에 비해 약 12.8%, 명반응은 약 21.8%로 감소된 진폭을 보였다. 본 연구에서 20 mg/kg 농도의 IAA를 투여했을 때 망막전위도 진폭은 모든 자극에 대해 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 광수용체 손상에 의한 망막변성의 특징을 보여주고 있다.

IAA 유발 망막변성의 조직 소견은 색소망막염과 비슷한 형태를 보인다.²⁶ 색소망막염환자들은 초기에 광수용체 바깥층이 먼저 소실되고, 이후 안쪽층, 핵의 소실이 진행된다.^{31,32} Hartong et al⁴은 색소망막염환자에서 막대세포의 변성이 원추세포보다 먼저 일어난다고 보고하였고, 이는 Wang et al¹⁶의 동물 모델 연구에서도 같은 결과였다. IAA

로 유도한 쥐 광수용체 변성 모델도 광수용체에 해당하는 막대세포와 외과립층의 소실이 나타났다.³¹ 돼지 광수용체 변성 모델은 광수용체 길이 및 외과립층의 두께가 얇아졌다.^{16,35} 성묘 광수용체 변성 모델은 IAA 주입 후 6개월째 시행한 면역화학염색에서 외과립층이 소실되었다.¹⁴ 본 연구에서도 여러 연구와 마찬가지로 초기 변화에 해당하는 유의한 외과립층의 두께 감소와 막대세포의 면적 감소가 나타났고, 원추세포 수의 유의한 감소는 관찰되지 않았다.

본 연구의 망막전위도와 면역화학염색 결과에서 막대세포와 원추세포의 변성은 차이를 보였다. IAA를 주입한 이후 막대세포의 경우 망막전위도의 b wave 진폭 감소와 함께 면역화학염색에서도 면적의 유의한 감소를 보였다. 반면 원추세포는 망막전위도 b wave의 진폭이 줄었다가 주사 2주 후부터 증가하는 형태를 보이며 면역화학염색에서도 유의한 감소가 없었다. 망막변성 유발 시 원추세포의 보존에 대한 여러 보고가 있다.^{16,21,32,36} Wang et al¹⁶은 IAA 유발 망막변성 연구에서 원추세포 보존과 관련하여 망막전위도검사상 원추세포의 진폭이 2주째 최소치로 감소했다가 5주째 다시 상승한 것에 대해 두 가지 기전을 제안하였다. 한 가지는 약물에 의한 당 분해 작용이 방해 후, 체내 농도가 낮아짐에 따라 GAPDH의 재합성되는 것, 다른 하나는 기존의 당 저장 작용에 의해 회복되는 것이다.¹⁶ 본 연구에서도 Wang et al¹⁶의 보고와 유사한 망막전위도, 면역화학염색의 결과를 얻었다. 다만 원추세포의 감소가 유의하지 않아도 망막전위도 진폭의 감소가 확인되었다는 점에 대해 다른 보고를 참조해 볼 필요가 있다. 망막전위도 진폭 감소와 원추세포의 연관성에 대하여 Alexander et al³⁷은 색소망막염환자에서 원추세포의 외절부 길이 감소와 함께 flicker ERG의 감소를 보고하였다. 그리고 Wang et al¹⁶은 IAA를 주입한 돼지에서 대조군에 비해 관찰된 원추세포 외절부 수가 중심망막은 80% 이상, 주변망막은 50%의 감소했다고 하였다. 본 연구에서 나타난 망막전위도 반응의 감소의 원인도 유의하게 줄어든 원추세포 외절부의 길이 때문으로 생각된다(Appendix 1). 본 연구의 의미 있는 결과로는 성묘 모델이 망막변성의 자연경과에서 나타나는 초기 막대세포의 소실, 원추세포의 보존 및 후기에 2차적 소실이 일어나는 형태와 유사하다는 점과, 성묘 동물 모델로서는 이전에 보고되지 않은 내용이라는 점이 있겠다.

성묘는 빠른 광수용체 변성 유도, 높은 비용대비 효율, 상대적으로 다루기 쉬워 대동물 망막변성 모델에 적합하다. 그렇지만 사람과의 생애 주기 차이로 인한 질병 유발의 적정기, IAA의 부작용으로 인한 상대적 짧은 수명, 원하는 변성을 얻기 위한 정확한 약물의 용량 등이 임상과 다르다는 단점이 있다. 또한 본 연구에서 실험의 대조군의 수가

적은 것도 제한적이다.

결론적으로 저자들은 대퇴정맥을 통해 성묘에게 주입한 IAA로 광수용체 변성을 성공적으로 유도하였다. 망막전위도검사를 통해 광수용체 변성의 기능적 변화를 확인하였고, 면역화학염색을 통해 기능적 변화와 연관된 해부학적 변화를 확증하였다. 본 연구를 통해 확인한 성묘의 광수용체 변성은 향후 망막변성의 치료와 연구에 도움이 될 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Narayan DS, Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Glucose metabolism in mammalian photoreceptor inner and outer segments. *Clin Exp Ophthalmol* 2017;45:730-41.
- 2) Borsch O, Santos-Ferreira T, Ader M. Photoreceptor transplantation into the degenerative retina. *Klin Monbl Augenheilkd* 2017;234:343-53.
- 3) Berson EL. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:1659-76.
- 4) Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006;368:1795-809.
- 5) Birch DG, Anderson JL, Fish GE. Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology* 1999;106:258-68.
- 6) Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, et al. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 2000;406:195-9.
- 7) Cheng YP, Ke CY, Kuo CC, Lee YJ. Effect of a complex lutein formula in an animal model for light-induced retinal degeneration. *Chin J Physiol* 2016;59:202-9.
- 8) Taylor L, Arnér K, Ghosh F. N-methyl-N-nitrosourea-induced neuronal cell death in a large animal model of retinal degeneration in vitro. *Exp Eye Res* 2016;148:55-64.
- 9) Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, et al. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration. *Neuroscience* 2009;160:517-29.
- 10) Yamauchi Y, Agawa T, Tsukahara R, et al. Correlation between high-resolution optical coherence tomography (OCT) images and histopathology in an iodoacetic acid-induced model of retinal degeneration in rabbits. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1157-60.
- 11) Rapaport DH, Stone J. The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *Neuroscience* 1984;11:289-301.
- 12) Chang B. Mouse models for studies of retinal degeneration and diseases. *Methods Mol Biol* 2013;935:27-39.
- 13) Ehrenberg M, Ehrenberg S, Schwob O, Benny O. Murine fundus fluorescein angiography: an alternative approach using a handheld camera. *Exp Eye Res* 2016;148:74-8.
- 14) Nan Y, Zhang Q, Ren C, et al. Functional evaluation of iodoacetic acid induced photoreceptor degeneration in the cat. *Sci China Life Sci* 2013;56:524-30.
- 15) Scott PA, Kaplan HJ, Sandell JH. Anatomical evidence of photoreceptor degeneration induced by iodoacetic acid in the porcine eye. *Exp Eye Res* 2011;93:513-27.
- 16) Wang W, Fernandez De Castro J, Vukmanic E, et al. Selective rod degeneration and partial cone inactivation characterize an iodoacetic acid model of Swine retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7917-23.
- 17) Noel JM, Fernandez De Castro JP, Demarco PJ Jr, et al. Iodoacetic acid, but not sodium iodate, creates an inducible swine model of photoreceptor damage. *Exp Eye Res* 2012;97:137-47.
- 18) Wang Y, Zhao L, Lu F, et al. A pathologic study of degeneration of the rod and cone populations of the rhodopsin Pro347Leu transgenic pigs. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997;95:467-79; discussion 479-83.
- 19) Aplin FP, Luu CD, Vessey KA, et al. ATP-induced photoreceptor death in a feline model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:8319-29.
- 20) Cibis PA, Noell WK. Cataract induced by iodoacetic acid; a preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1955;40:379-82.
- 21) Orzalesi N, Calabria GA, Grignolo A. Experimental degeneration of the rabbit retina induced by iodoacetic acid. A study of the ultrastructure, the rhodopsin cycle and the uptake of ¹⁴C-labeled iodoacetic acid. *Exp Eye Res* 1970;9:246-53.
- 22) Toda N. Calcium independent contraction induced by iodoacetic acid in isolated cerebral arteries. *Stroke* 1984;15:475-80.
- 23) Suna H, Arai M, Tsubotani Y, et al. Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *Bioorg Med Chem* 2009;17:3968-72.
- 24) Zhou X, Zhu L, Wang L, et al. Protective effect of edaravone in primary cerebellar granule neurons against iodoacetic acid-induced cell injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:606981.
- 25) Winkler BS, Sauer MW, Starnes CA. Modulation of the pasteur effect in retinal cells: implications for understanding compensatory metabolic mechanisms. *Exp Eye Res* 2003;76:715-23.
- 26) Noell WK. Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 1953;36:103-16.
- 27) Ofri R, Reilly CM, Maggs DJ, et al. Characterization of an early-onset, autosomal recessive, progressive retinal degeneration in Bengal cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:5299-308.
- 28) Noell WK. The effect of iodoacetate on the vertebrate retina. *J Cell Comp Physiol* 1951;37:283-307.
- 29) Noell WK. The impairment of visual cell structure by iodoacetate. *J Cell Comp Physiol* 1952;40:25-55.
- 30) Burke W, Hayhow WR. Disuse in the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Physiol* 1968;194:495-519.
- 31) Graymore C, Tansley K. Iodoacetate poisoning of the rat retina. I. Production of retinal degeneration. *Br J Ophthalmol* 1959;43:177-85.
- 32) Graymore C, Tansley K. Iodoacetate poisoning of the rat retina. II. Glycolysis in the poisoned retina. *Br J Ophthalmol* 1959;43:486-93.
- 33) Rösch S, Johnen S, Mazinani B, et al. The effects of iodoacetic acid on the mouse retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253:25-35.
- 34) Pennesi ME, Michaels KV, Magee SS, et al. Long-term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 mice using spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:4644-56.
- 35) Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, et al. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1993;111:761-72.
- 36) Liang L, Katagiri Y, Franco LM, et al. Long-term cellular and regional specificity of the photoreceptor toxin, iodoacetic acid (Iaa),

in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 2008;25:167-77.
37) Alexander KR, Barnes CS, Fishman GA. ON-pathway dysfunction-

and timing properties of the flicker ERG in carriers of X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4017-25.

= 국문초록 =

요오드 아세트산으로 유도된 성묘 망막변성 모델에서의 망막전위도 변화

목적: 요오드 아세트산(Iodoacetic acid, IAA)을 이용하여 성묘 망막변성을 일으키고, 기능적, 조직학적 광수용체 변성을 확인한다.
대상과 방법: 2014년 1월부터 10월까지 2세 이상의 성묘 11마리(22안)를 대상으로 하였다(대조군 2마리, 실험군 9마리). 평균 체중은 대조군, 실험군에서 각각 1.75 ± 0.35 , 1.61 ± 0.19 kg, 성별은 수컷:암컷이 1:1, 2:7이었다. 주사(IAA 20 mg/kg) 전후 1주 간격으로 4회 망막전위도(electroretinogram, ERG)를 시행하였다. 파라핀 절편 제작 후 hematoxylin-eosin (HE), immunohistochemistry (IHC) 염색을 하고, 외과립층, 원추세포, 막대세포를 관찰하였다.

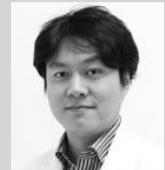
결과: 실험군에서 ERG 검사상 암반응과 명반응의 b wave 평균 진폭이 주사 전에 비해 주사 후 1주부터 4주까지 모두 유의하게 낮았다($p < 0.01$). 외과립층 세포핵의 개수는 실험군에서 유의하게 줄었고($p < 0.01$), 단위 길이당 염색된 막대세포층의 면적도 실험군에서 유의하게 감소했다($p < 0.01$). 그렇지만 원추세포의 개수는 유의한 감소가 없었다($p = 0.075$).

결론: IAA 20 mg/kg를 투여한 성묘는 기능적으로 ERG의 b wave 진폭의 감소, 조직학적으로 외과립층과 막대세포의 감소를 보였다. IAA 유발 성묘 모델은 광수용체변성의 모델로 추후 관련 연구에 사용될 수 있을 것이다.

<대한안과학회지 2019;60(12):1205-1215>

김창주 / Changzoo Kim

고신대학교 의과대학 안과학교실
Department of Ophthalmology,
Kosin University College of Medicine



Appendix 1. Anti-red/green (L/M) opsin data (A, B). The control cone cell outer segment unit length (26.11 ± 9.09 units) was significantly greater than that of the iodoacetic acid group (13.21 ± 4.32 units) ($p < 0.01$).

