

An Animal Model of Tracheal Stenosis Induced by an Endotracheal Segmented Tube

Soo Jin Lim¹, Sung Won Kim², Kang Dae Lee², Seo Bin Kim², Seok Won Jeon²,
Chul-Ho Ok³, Min Jung Jung⁴, Chi Woo Hwang⁵, and Hyoung Shin Lee²

¹Kosin University College of Medicine, Busan; and ²Departments of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, ³Internal Medicine, ⁴Pathology, Kosin University College of Medicine, Busan; and ⁵Kosin University Graduate School of Public Health, Busan, Korea

분절된 튜브의 기도 내 삽입에 의한 기도협착 동물 모델

임수진¹ · 김성원² · 이강대² · 김서빈² · 전석원² · 옥철호³ · 정민정⁴ · 황치우⁵ · 이형신²

고신대학교 의과대학 의학과,¹ 고신대학교 의과대학 이비인후과학교실,² 내과학교실,³ 병리학교실,⁴ 고신대학교 보건대학원⁵

Received May 17, 2016

Revised June 21, 2016

Accepted July 1, 2016

Address for correspondence

Hyoung Shin Lee, MD
Department of Otolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Kosin University
College of Medicine,
262 Gamcheon-ro, Seo-gu,
Busan 49267, Korea
Tel +82-51-990-6470
Fax +82-51-245-8539
E-mail sego78@hanmail.net

Background and Objectives Various methods to induce tracheal stenosis in an animal model have been introduced. However, most methods use non-physiologic mechanical or chemical injury to tracheal mucosa or cartilage. In this study, we sought to develop an animal model of tracheal stenosis using a segmented endotracheal tube.

Materials and Method Nine New Zealand White Rabbits were included in this feasibility study. A segmented 1.5 cm LEVIN-Tube (16 French) was inserted into tracheal lumen via tracheotomy site and fixed with a nylon tape circumferentially tied around the trachea. The tube was removed transorally one week later and the tracheal lumen was observed with bronchoscopy every week. Rabbits were sacrificed two weeks after the tube removal and the trachea was evaluated with histologic image. Three rabbits underwent tracheotomy and closure only to evaluate possible impact of tracheotomy procedure to tracheal stenosis (sham surgery).

Results None of the 6 rabbits showed significant complications or death during the study. No significant change of tracheal lumen was identified in 3 sham models. The mean grade of stenosis was 57.2±9.9% (range, 43–70%). Histologic image showed thickening and fibrosis of lamina propria with relatively intact tracheal cartilage framework.

Conclusion We developed an animal model of tracheal stenosis using a segmented endotracheal tube fixed with a nylon tape. Since this model has similar pathophysiology to prolonged endotracheal intubation, it may be used in various studies related to tracheal stenosis.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2016;59(8):599-603

Key Words Animal model · Endotracheal intubation · Trachea · Tracheal stenosis.

서 론

기관 내 삽입(endotracheal intubation)은 호흡의 보조가 필요한 환자들에서 흔히 시행되는 시술이나 장기간 지속될 경우 튜브에 의한 손상으로 기관(trachea)에 협착(stenosis)이 유발되어 호흡곤란 등의 증상으로 환자의 삶의 질을 저하시키며 심한 경우 환자의 생명을 위협할 수 있다.¹⁾ 기도협착의 정도나 임상양상에 따라 다양한 치료방법들이 소개되어 왔

다.²⁻⁵⁾ 기도협착의 정도가 심하지 않은 경우에는 풍선 확장술 또는 레이저 등을 이용한 내시경적 치료를 하거나 T tube 또는 스텐트 삽입 등으로 치료가 가능하나,⁶⁾ 그 정도가 심하거나 보존적 치료가 실패한 경우에는 수술에 의한 재건이 필요하다.²⁾ 이 경우, 침습적인 수술방법 때문에 합병증 발생 가능성이 높으며 특히 내과적 질환이 동반된 환자의 경우 그 위험이 더욱 높아 치료법의 적용이 되지 않는 경우도 있다.⁷⁾ 따라서 기도협착에 대한 보다 효과적이고 근본적인 치료법 혹은

예방법이 요구되며, 이를 개발하고 그 효과를 평가하기 위해서는 적절한 기도협착 동물 모델이 필요하다.

동물에서 기도의 협착을 유발하는 방법으로 기관을 물리적으로 손상시키거나^{8,9)} 화학적 자극^{10,11)}을 주는 등의 다양한 방법들이 소개된 바 있다. 그러나, 이는 기도 내 삽관에 의한 기도협착과는 발생과정이 달라 임상에서의 기관협착과는 병태생리적으로 차이가 있을 수 있다. 최근 기도 내 삽관에 의한 기관협착을 유발하기 위해 동물 모델에 기도 삽관을 시행한 연구가 보고된 바 있다.¹²⁾ 그러나 호흡곤란에 이르는 기도협착을 유발하기 위해서는 6시간에 이르는 마취를 유지해야 하고 번거로운 실험과정을 포함하고 있어 쉽게 활용하기 어려운 면이 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위해 본 저자들은 분절된 기도 내 튜브 삽관 의한 기도협착 동물 모델을 개발하여 보고한 바 있다.¹³⁾ 그러나 이 연구에서는 튜브를 기관 내에 고정시키기 위해 Surgicel(Ethicon, Cincinnati, OH, USA)이라는 상품화된 지혈제에 감아서 함께 삽입해야 한다는 단점이 있었다. 본 연구에서는 분절된 튜브만 삽입한 후 외부에서 고정하는 방법으로 인체의 기도협착과 유사한 기관 협착이 동물 모델에서 발생 가능한지 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 디자인

본 연구에는 몸무게 3.0~3.7 kg 범위의 수컷 New Zealand White Rabbit 9마리를 사용하였다. 이 중 6마리에서는 기관 절개창을 통해 분절된 튜브를 삽입하여 기관협착 발생 여부 및 정도를 평가하였고 3마리에서는 기관 절개창만 시행한 후 곧바로 봉합하여 기관 절개에 따른 기관내 변화 여부를 평가하고자 했다. 본 실험은 본교 동물 연구 윤리위원회에 의해 승인되었으며, 실험동물에게 행해진 모든 처치는 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW publication NIH 85-23,

revised 2010, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD, USA)에 따라 시행되었다.

수술 방법

토끼는 케타민(ketamine) 35 mg/kg과 자일라진(xylazine) 5 mg/kg 근육주사로 마취 후 따뜻하게 데운 수술대에 양와위로 고정되었다. 수술 시 토끼의 직장온도는 39°C로 유지했으며 심박수와 호흡수 또한 모니터링 하였다. 수술방법은 최근 본 저자들이 발표한 분절된 튜브를 이용한 동물모델 연구¹³⁾에 쓰인 방법과 유사했으며, 튜브에 Surgicel을 감지 않고 튜브를 기도의 외부에서 나일론 테이프로 묶음으로써 고정해준다는 부분에서 차이가 있다. 절개부위인 토끼의 목 앞면은 면도 및 소독을 실시하였다. 절개부위에 1% 리도카인(lidocaine hydrochloride) 2 mL 피하주사 후 목의 중심선을 따라 수직으로 절개하여 기관과 후두를 노출시켰으며(Fig. 1A) 띠근육(strap muscle) 사이의 혈관이 없는 부위를 절개함으로써 출혈을 최소화하였다. 기관의 전면부(anterior wall)를 노출시킨 후 5번째와 6번째 기관연골고리 사이를 기관지름의 2/3만큼 수평으로 절개하였다. 대조군으로 사용된 3마리의 토끼는 기관 절개를 시행한 직후에 곧바로 절개창을 봉합하였다. 실험군인 6마리의 토끼는 기관 절개부위에 LEVIN-Tube(16 French; Sewoon Medical, Cheonan, Korea)를 1.5 cm 길이로 잘라 상방으로 삽입한 후 튜브 삽입 부위의 중간지점에 나일론 테이프(Nylon tape, 3 mm, Ethicon, Cincinnati, OH, USA)를 묶어 튜브를 고정한 후(Fig. 1B) 기관 절개부위를 봉합하였다(Fig. 1C). 기관을 박리하는 과정에서 반회후두신경 손상이 발생하지 않도록 주의하였다. 이후 기관은 본래의 해부학적 위치에 위치시키고, 띠근육과 피부는 4.0 실크(silk)로 봉합하였다.

기도협착의 평가

튜브는 삽입 1주일 후 경구강 기관 내시경(bronchoscopy)

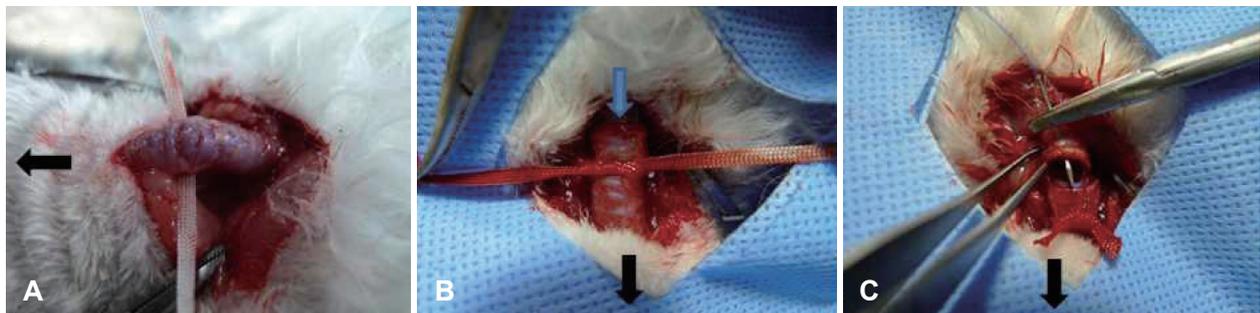


Fig. 1. Surgical procedure to induce tracheal stenosis. Trachea is dissected from surrounding tissues (A). A segmented tube is inserted upward into the tracheal lumen via tracheotomy site and externally fixed with a nylon tape (B). Tracheotomy site is closed (C). Black arrow indicates cranial direction and blue arrow indicates the inserted tube.

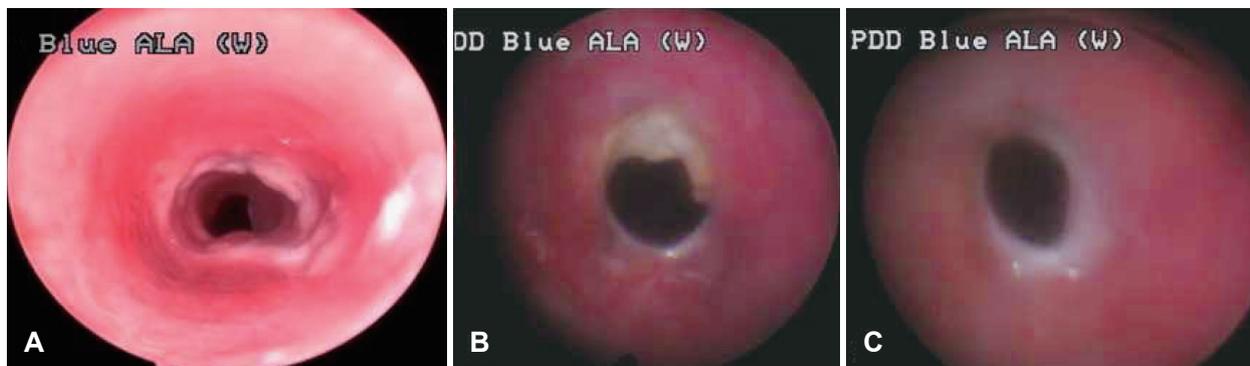


Fig. 2. Endoscopic view of tracheal lumen. On the day of tube removal (A). 1 week after tube removal (B). 2 weeks after tube removal (C).

Table 1. Degree of stenosis after insertion of the segmented endotracheal tube

Rabbit No.	Degree of tracheal stenosis (%)*			Final grade of tracheal stenosis†
	Day of tube removal	1st week	2nd week	
1	13	49	61	Grade II
2	15	36	51	Grade II
3	10	28	43	Grade I
4	13	44	53	Grade II
5	16	45	65	Grade II
6	18	52	70	Grade II

*degree of stenosis=(S-s)/S×100%, †grade of tracheal stenosis according to Myer-Cotton's grading system

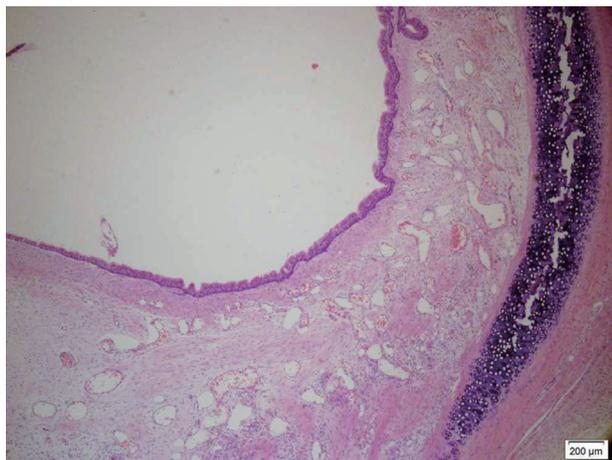


Fig. 3. Histologic image of tracheal stenosis. Thickening and fibrosis of lamina propria and neovascularization is identified, while the cartilage framework is relative intact (H&E, ×40).

과 미세점자(microforceps)를 이용하여 제거하였으며, 기도 협착의 정도는 기관 내시경을 이용해 튜브 제거 당일, 제거 1주 후, 제거 2주 후 경구강 내시경으로 평가되었다. 튜브 제거 2주 후 토끼들을 희생하여 협착부위를 절제하였다. 절제한 기관조직은 헤마톡실린-에오신염색(hematoxylin-eosin stain) 시행 후 현미경으로 관찰되었다. 대조군(sham surgery)으로 사용된 3마리의 토끼 또한 기관절개술 시행 3주 후 희생시킨 후 협착 부위를 조직학적으로 평가되었다. 협착의 정도는 기관 내시경으로 촬영한 사진 상에서 협착부위의 넓이를(1-s/

S)×100(s: 튜브 제거 후 기관의 단면적, S: 튜브 제거 전 5번째 기관연골고리의 상대적 단면적)으로 계산하여 평가되었다. 단면적의 넓이는 Adobe Photoshop CS3 Software(Adobe System Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 단면적의 픽셀 수를 기반으로 측정되었다.

결 과

기관절개를 통해 튜브를 삽입하고 튜브를 외부에서 나일론 테이프로 결찰하는 과정은 시간이 약 10분 소요되는 비교적 간단한 수술이었다. 실험 중 사망한 토끼는 없었으며, 6마리 모두에서 수술 후 기관협착 외 수술과 관련된 심각한 합병증은 관찰되지 않았다. 튜브 삽입 3주 후(튜브 제거 2주 후) 6마리 모두 안락사시켰다. 삽입된 튜브는 위치 변화 없이 수술 시 튜브를 고정한 위치에 그대로 자리하고 있었으며 내시경 영상을 보면서 미세점자를 이용하여 비교적 쉽게 구강을 통해 제거할 수 있었다. 대조군으로 사용된 토끼 3마리에서도 3주째 내시경 및 조직학적 소견상 기관절개로 인한 특별한 합병증 또는 기도 점막의 유의한 변화 소견은 관찰되지 않았다.

튜브 제거 직후 시행한 내시경에서는 튜브가 위치했던 기도점막의 전반적인 염증과 궤양이 확인되었다(Fig. 2A). 튜브제거 2주 후 시행된 기도의 조직학적 검사결과 점막 고유

층(lamina propria)이 두꺼워지고 섬유화된 것을 확인할 수 있었고, 또한 림프구를 포함한 염증세포의 침윤이 관찰되었다(Fig. 3). 기관의 연골부위는 큰 변형 없이 보존되어 있었다(Fig. 2B). 각 개체의 튜브 제거 직후, 1주 후, 2주 후 관찰된 기도협착 정도의 평균값(±표준편차)은 각각 14.2%(±2.8%), 42.3%(±8.9%), 57.2%(±9.9%)였으며 Table 1에 정리하였다. 튜브제거 2주 후 토끼의 기도 협착은 최소 43%에서 최대 70%까지 발생하였고(Fig. 2C), Myer-Cotton's tracheal stenosis grading system에 따르면 6마리 중 5마리가 grade II의 기도협착(51~70%)이 발생하였고 한 마리에서 grade I(43%)의 기도협착이 발생하였다.

고 찰

장기간의 기관 삽관 시 삽관된 튜브가 기도점막을 압박하여 허혈성 손상을 유발하고, 이로 인해 기도점막의 염증, 괴양, 괴사 등이 유발되는 것이 기도협착의 원리이다.¹⁴⁾ 지금까지 기도협착 동물 모델에 대한 여러 연구가 보고되었지만, 화학적 또는 물리적인 기도 내 손상을 통해 기도 협착을 유발한 모델들^{8-10,15)}은 임상에서 보게 되는 기도삽관에 의한 기도협착과는 병태생리적인 면에서 거리가 있었다. 이러한 한계점에 대한 대안으로 장기간 기관 내 삽관 상태를 동물 모델에서 구현한 연구가 발표되었지만,¹²⁾ 실험동물을 최대 6시간 동안 마취시켜야 하며 기관 튜브를 주기적으로 외부에서 조작하는 등 연구방법이 번거롭고 기도협착을 유발하기까지 12주가 걸린다는 단점이 있었다. 본 연구에서는 비교적 짧은 수술 시간과 간단한 수술방법으로 기관 내 삽관에 의해 수술 3주 후에 기도협착이 유발되는 동물 모델을 개발하였다.

최근 본 저자들이 발표한 분절된 튜브를 이용한 동물 모델¹³⁾의 경우 튜브에 Surgicel을 감아 토끼의 기관에 삽입하여 기도협착을 유발하였다. 이 연구에서는 기관 내 삽관으로 인한 기도 협착의 병태생리와 유사한 형태의 기도협착을 유발하였지만 튜브 자체보다는 Surgicel이라는 이물질이 기도점막에 영향을 줄 수 있다는 한계가 있었으며 동물 개체별 기관 크기에 따라 Surgicel의 양을 조절해야 한다는 등의 문제점이 있었다. 본 연구에서는 기관에 튜브를 직접 접촉하게 하였으므로 이전 연구에 비해 기관 삽관으로 인해 유발된 기도협착의 병태생리에 보다 더 근접하였다고 할 수 있다. 즉, Surgicel을 이용하여 튜브를 기관 내에 고정하던 방식을 기관 밖에서 나일론 테이프로 고정하는 방법으로 전환함으로써 튜브 자체가 기관 점막에 미치는 영향을 좀 더 직접적으로 구현했다고 판단된다. 나일론 테이프가 유발할 수 있는 이물 반응은 조직학적 검사상 기관 연골 및 연골피막이 비교적 잘 보존된 것

으로 보아 기관협착을 유발하는 데 필요한 3주 내의 단기간에는 의미 있게 발생하지 않는 것으로 판단되었다.

지금까지 이루어진 기도협착 동물 모델 연구 중 많은 수가 기도 협착을 지나치게 심하게 유발하여 실험동물의 스트레스를 증가시켰고, 이로 인해 실험 후 사망률이 높은 경우가 보고되고 있다.^{11,16,17)} Chen 등¹⁷⁾의 연구에서는 12마리의 실험동물 중 4마리가 사망하였고 2마리는 심한 수술 후 합병증으로 안락사되었으며 Simpson 등¹⁶⁾의 연구에서는 8마리의 실험동물 중 4마리가 사망하였다. 기존의 연구들과 비교했을 때 본 연구가 유발한 기도협착은 그 정도가 grade II에 머물러 실험동물의 사망을 유발하지 않았다. 다양한 정도의 기도협착 동물 모델이 요구될 수 있으나 grade II에 해당하는 기도협착 동물 모델은 협착의 병태생리와 치료 및 예방법을 비교적 안정적으로 연구할 수 있는 바탕이 될 수 있다고 판단된다. 또한 삽입한 스텐트가 본래 의도했던 위치를 벗어나는 문제점을 보인 기존 연구들^{8,19)}의 한계를 극복하는 방법으로 튜브가 삽입된 기관 부위를 외부에서 나일론 테이프로 고정하는 방법은 적어도 3주 내의 단기간에는 유효하다는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 기관 협착이 발생되기까지 수술 후 3주가 걸렸는데 이는 술을 이용하여 9일 만에 기도협착을 유발한 Nakagishi 등⁹⁾의 동물 모델과 비교하면 기관협착 발생 소요 기간이 길지만 기관 삽관을 동물 모델에서 구현하여 약 12주 만에 기도협착을 유발한 Kumar 등¹²⁾의 모델에 비하면 비교적 짧은 시간 내에 기도협착을 유발한 것으로 생각한다. 또한, 수술에 소요된 시간이 약 10분가량으로 비교적 짧으며 기관 절개술에 익숙한 이비인후과 의사가 시행할 경우 기술적으로도 큰 어려움 없이 시행할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구의 한계점은 다음과 같다. 우선 토끼의 개체수가 제한되어 추가적인 동물 실험을 통해 연구 방법의 재현성을 충분히 검증할 필요가 있다. 또한 튜브의 기도 삽입 및 제거 후 3주 이후에 이르는 중장기적인 조직학적 변화를 관찰함으로써 튜브 삽관에 의한 기관협착 발생 과정을 좀 더 구체적으로 규명할 필요가 있다. 더불어, 어느 정도의 장력으로 튜브를 고정하였는지는 각 동물에서 별도의 측정과정을 거치지 못했고 토끼의 기관 외부에서 튜브 삽입부를 나일론 테이프로 묶어 고정하는 방법이, 삽입된 튜브가 없는 경우에 기관에 미치는 영향은 실험으로 확인해 보지 못했다. 본 저자들이 최근 발표한 분절된 튜브를 이용한 동물 모델¹³⁾에서는 기도협착의 정도가 균일하지 못하다는(32~85%) 한계가 있었다. 이는 본 연구에서도 큰 차이를 보이지 않았다(43~70%). 이는 동물 개체별 기관의 크기에 따른 튜브의 기관 점막 손상 정도의 차이 및 점막에서의 개체별 염증 반응의 차이 등

이 원인일 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This study was supported by grants from National Research Foundation of Korea (2014R1A1A2059665, 2015R1C1A1A02036718). The funding source has no involvement in study design, analysis and interpretation of data.

REFERENCES

- 1) Chung MY, Song HK. Airway obstruction due to post intubation circumferential tracheal web formation: a case report. *Anesth Pain Med* 2011;6(4):349-52.
- 2) Baek CH, Hong BS, Chung YJ, Jeong HS, Son YI. Thyrotracheal end-to-end anastomosis for severe laryngotracheal stenosis. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2003;46(7):586-91.
- 3) Cho HH, Cho JS, Lim SC. Augmentation laryngotracheoplasty for laryngotracheal stenosis. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2003;46(9):775-9.
- 4) Han CJ, Kim YM, Cho JI, Kim MW, Sun K. Treatment of thoracic tracheal stenosis by sternotomy approach. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2001;44(7):758-62.
- 5) Choi HY, Ju EJ, Cho SH, Kwon SY, Yoo HK, Jun BS, et al. Thyrotracheal anastomosis for combined laryngotracheal stenosis: experience in 11 cases. *Korean J Otolaryngol* 1999;42(11):1441-6.
- 6) Yoo CK, Jung KY, Kwon SY, Jong HH. A case of tracheal stenosis treated by endotracheal stent. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2003;46(9):794-7.
- 7) Brigger MT, Boseley ME. Management of tracheal stenosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;20(6):491-6.
- 8) Steehler MK, Hesham HN, Wycherly BJ, Burke KM, Malekzadeh S. Induction of tracheal stenosis in a rabbit model-endoscopic versus open technique. *Laryngoscope* 2011;121(3):509-14.
- 9) Nakagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, Kikuchi M. Rabbit model of airway stenosis induced by scraping of the tracheal mucosa. *Laryngoscope* 2005;115(6):1087-92.
- 10) Lee SS, Shin JH, Woo CW, Hwang JC, Park CS, Kim HJ, et al. A new model of tracheal stenosis in dogs using combined bronchoscopic electrocautery and ethanol injection. *J Vasc Interv Radiol* 2008;19(5):764-9.
- 11) Tubbs KJ, Silva RC, Ramirez HE, Castleman WL, Collins WO. A comparison of two methods of endoscopic dilation of acute subglottic stenosis using a ferret model. *Laryngoscope* 2013;123(1):253-8.
- 12) Kumar SP, Ravikumar A, Thanka J. An animal model for laryngotracheal injuries: an experimental study. *Laryngoscope* 2015;125(1):E23-7.
- 13) Lee HS, Kim SW, Oak C, Ahn YC, Kang HW, Chun BK, et al. Rabbit model of tracheal stenosis induced by prolonged endotracheal intubation using a segmented tube. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015;79(12):2384-8.
- 14) Hillel AT, Namba D, Ding D, Pandian V, Elisseeff JH, Horton MR. An in situ, in vivo murine model for the study of laryngotracheal stenosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140(10):961-6.
- 15) Roh JL, Lee YW, Park HT. Subglottic wound healing in a new rabbit model of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(8):611-6.
- 16) Simpson CB, White S, McGuff HS. Anti-transforming growth factor beta as a treatment for laryngotracheal stenosis in a canine model. *Laryngoscope* 2008;118(3):546-51.
- 17) Chen Z, Luo J, Xu L, Ma R, Zhang N, Cui P. A model of canine tracheal stenosis induced by radiofrequency cauterization. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76(2):183-8.
- 18) Bicer YO, Koybasi S, Suslu AE, Kukner A, Tezcan E, Ulas N. Effect of heparin on inflammation: an animal model of tracheal stents. *Laryngoscope* 2014;124(9):E368-72.
- 19) Shin JH, Sung KB, Kim EY, Shin DH, Song HY. A rat tracheal model to investigate stent-induced tissue hyperplasia: a pilot study. *J Vasc Interv Radiol* 2010;21(12):1878-83.