

초저온 냉동보관법을 이용한 동종판막 이식술에 대한 연구

송 명 근* · 이 동 순**

— Abstract —

Aortic and Pulmonic Homograft Transplantation Utilizing Cryopreservation

Meong-Gun Song, M.D.* and Dong-Soon Lee, M.D.**

The use of aortic valve homograft has been developed since 1962 when Ross and Barratt-Boyes independently replaced a diseased aortic valve with an orthotopically inserted homograft valve. And also surgical treatment of complex congenital cardiac malformations utilizing homograft extracardiac conduit has been tried with better result than any other prosthetic material. The present study was undertaken to clarify the safety tissue viability, sterility, after following our protocol of procurement of heart, dissection of aortic and pulmonic homograft, sterilization, cryopreservation, thawing and dilution, and transplantation on experimental animal, sheep. Tissue viability of valve and great artery was assessed by tissue culture.

Sterility was evaluated by bacterial and fungal culture. The method used was proven no deleterious effect on the integrity of the valve.

Tissue culture of valve tissue before, and after cryopreservation process resulted that active fibroblast growth was observed from homograft sterilized with antibiotics. And culture of the transplanted homograft from sacrificed animal showed active fibroblast growth. Pathologic examination of implanted valve tissue from sacrificed sheep showed mild calcification and minor change, but there were moderate and severe calcification of wall of great arteries.

I. 서 론

심장외과의 급속한 발전에 따라 과거에 난치, 또는

불치라고 생각되던 많은 심장질환들이 최근들어 외과적 치료의 혜택을 입게되었다. 특히, 이미 심장의 일부 또는 전부의 기능이 비가역적으로 소실되거나, 또는 심한 선천성기형으로 인한 발육및 형성이 되지 않거나 기능의 심한 결손을 보이는 경우 이에 대한 장기이식술도 심장외과의 한 치료법으로 자리를 잡게 되었다.

그러나, 사체의 손상을 금기시하는 사회적 관습과 뇌사가 사망으로 인정되지 않는 국내의 특수한 사정으로 인하여 국내에서는 심, 혈관외과에서 장기이식 분야의 발전은 초보적인 단계에 있는 것이 사실이다.

* 울산대학교 의과대학 흉부외과교실, 서울중앙병원 흉부외과

* Department of Cardiothoracic Surgery, College of Medicine, Ulsan University, Asan Medical Center

** 부천 세종병원 임상병리과

** Department of Clinical Pathology, Sejong General Hospital

*** 본 논문은 과학기술처 연구비 보조로 이루어진 것임.
1990년 6월 30일 접수

1988년 2월 명모군의 부모가 환자의 사후 심장을 기증하고 본 연구자가 그 심장을 공여받아 동종판막 이식술을 성공하였으며²⁷⁾, 그 후 2예의 동종판막 이식술을 추가 시행하여 동종판막 및 대혈관의 이식술이 국내에서 보편화를 위한 첫걸음을 걷게 되었다^{26,27)}.

그러나, 이런 방법이 미국, 영국 등을 비롯한 선진 외국에서는 약 25년의 역사를 갖고 시행하였으나 국내에 이와 연관된 연구는 거의 전무한 상태에서 본 저자들은 현재까지 임상에 사용해온 방법들을 재평가하고, 문제점 및 안전성 등의 기본적인 문제를 재검토하는 연구에 관심을 갖게 되었다.

사체에서 대동맥 및 대동맥판막을 획득하여 인체에 이식하려는 시도는 약 25년전으로 거슬러 올라간다. 1962년 영국에서는 Ross¹⁹⁾, 뉴질랜드에서는 Barratt-Boyes가^{5,6)} 각각 독립적으로 대동맥판막 질환을 가진 환자의 사체에서 떼어낸 건강한 대동맥판막을 이식하는 수술을 성공적으로 시행하였음을 발표하였고, 그 후 1966년 Ross와 Somerville은 폐동맥발육부전증에서 대동맥판막 동종이식의 성공적인 결과를 보고함으로써 대동맥의 동종이식술은 많은 심장외과의사의 주목을 받게 되었다. 특히 이즈음 개발되기 시작한 각종 인공판막과 조직판막과 아울러 그 장기 추시 결과 등에 많은 이목이 집중되었다²²⁾.

이에 힘입어 1970년대 초에서는 미국에서도 Mayo Clinic과 알라바마 주립대학에서 대동맥 동종이식술이 활발히 연구되어 임상에 이용되었으나, 1975년 Mayo Clinic의 심장외과 과장으로 있던 Mc Goon의 대동맥 동종이식술의 불량한 장기추시 결과가 발표됨으로써, 1975년을 계기로 미국에서는 대동맥 동종이식술이 거의 외면되고 오히려 인공 또는 조직판막이 외과의사들 사이에 널리 이용되었다¹²⁾. 그러나, 후에 밝혀졌듯이 미국에서 대동맥 동종이식술의 실패이유는 대동맥 동종이식술 자체에 있지 않고, 소위 Mayo Clinic방법이라고 일컫는 화학적 처리방법과 방사선조사법에 그 결합이 있다는 사실이 밝혀지면서, 영국 및 뉴질랜드 등에서는 계속 대동맥 동종이식 연구가 진행되어 장기 추시결과가 대단히 만족스러운 것으로 1980년 Ross와 Baratt-Boyes에 의해 보고되었으며, 특히 혈액학적 측면, 면역학적인 측면 내구성 및 혈전발생을 등판막의 우수성을 평가하는 주요 특징에서 다른 모든 조직판막을 훨씬 능가하는 우수성을 입증하였다. 따라서 1980년초 미국을 비롯한 북아메리카에서 대동맥

동종이식에 대한 관심이 고조되었고, 다시 대동맥동종 이식술이 부활되고 있다^{11,12)}.

국내에서는 이런 연구가 시작되는 것이 다소 때늦은 감이 있으나 꼭 필요한 연구과제라 생각되는 연구를 시작하게 되었다. 본 연구에서는 실험동물 면양을 사용하여, 대동맥 및 판막, 폐동맥 및 판막을 채취하고 멸균, 냉동보관한 후 해동시켜 이식하는 과정을 실시하고 각 과정에서 세균배양 등으로 안전성과 세포의 생육성을 점검하고, 이식된 양의 장기 생존후에 희생시켜 이식된 판막과 혈관을 채취하여 조직검사를 시행하여, 변성을 발견하고 이를 토대로 임상적인 보관법, 치료법등을 발전시키는데 진일보 기여할 수 있으리라는 기대에서 이 연구를 시행하게 되었다.

II. 연구목적

본 연구에서는 실험동물 면양을 대상으로하여 동종 판막 및 혈관의 채취, 멸균, 냉동보관, 해동등의 과정의 방법을 설정하고 이 방법의 안전성을 검사하기위해 세균배양검사 등을 실시하고 채취, 멸균, 냉동보관 해동과정을 통한 세포의 생육성을 확인하기 위한 조직배양 검사를 시행하며, 장기생존한 실험동물을 희생시켜 이식된 혈관과 판막을 채취하여, 병리학적 검사를 시행하여, 변성의 정도를 평가하고자 한다.

III. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

체중 20-30kg의 실험동물 면양(코리데일) 40마리를 암수구별없이 20마리씩 A군과 B군으로 나누어 A군은 Donor로 사용하고 B군은 Recipient로 하였다. A군은 마취하에서 심장을 채취하여, 이중 대동맥과 판막, 폐동맥과 판막등을 박리하여, 멸균, 냉동보관 과정을 거쳐 일정기간 보관후 해동시켜 Recipient군에 이식하기로 하였다. 이식을 받은 B군중 장기생존된 14마리를 희생시켜 각각 이식된 조직을 채취하여 병리학적 검사와 아울러 이식된 혈관 및 판막의 조직배양을 실시하였다.

2. 연구방법

연구의 과정을 8가지 과정으로 분리하여 각 과정을

검토하였다. 각 과정은 심장의 채취, 동종판막의 절제, 멸균, 냉동준비 포장, Cryopreservation 냉동, 해동, 이식, 장기사육후 조직배양 및 병리검사로 명명하였다(Table 1).

Table 1. Cardiovascular Homograft Protocol

1. Procurement
2. Dissection
3. Sterilization
4. Packaging
5. Cryopreservation
6. Thawing and Diluting
7. Transplantation of Homograft
8. Tissue Culture of Implanted Homograft
9. Pathologic Examination of Implanted Homograft

가. 심장의 채취

실험동물 면양(코리테일) 40마리를 암수구별없이 20마리씩 A군과 B군으로 나누어 A군은 Donor군으로 하여 심장을 공여하는 대상으로 하였다. 면양은 pentobarbital sodium을 30mg/1kg씩 혈관 주입한후 기관삽입을 하여 전신마취하에서 인공호흡을 시키면서 우측 4번째 늑간을통해 전우측개흉술을 시행하였다. 우측의 내유선동맥을 절찰한 후 절제하였다. 심낭을 종으로 대동맥기시부부터 횡격막 부위까지 절개하여 심장을 완전노출 시켰다. 상공정맥과 하공정맥은 심방 밖에서 완전히 노출시켜 제대용tape(이후 u-tape)을 사용하여 계제(snare)하고 상행대동맥을 노출시켜 전대동맥과 복부로 향하는 대동맥의 대부분지가 나올때까지 노출한 후 제대용 tape을 이용하여 계제하였다. 주폐동맥및 좌우폐동맥은 기관지폐동맥이 노출될때까지 박리하여 노출하였다. 향후 개심수술에 사용키위해 우심방에 정맥캐뉴라를 꽂고 혈액을 채취하였다. 혈액채취는 ACD채혈백을 이용하여 보통 2pint정도 채혈하였다. 채혈후 상하공정맥을 절찰한 후 각각 절제하였다. 다음 심장을 심낭부로부터 들어올려 폐정맥을 노출시킨 후에, 폐정맥을 절제하였다. 이때에는 폐정맥

을 둘러싸고 있는 심낭을 절제하는데 있어 식도손상을 막기위해 유의하였다. 폐정맥을 절제한후 심장을 심낭속으로 다시 넣은후에 폐동맥을 박리 하였다. 좌우 폐동맥은 첫번째 분지가 나타날때까지 박리하여 절찰한 후 절제하였다. 다음 대동맥은 전대동맥및 하행 대동맥까지 7cm 이상을 박리한 후 절찰후 절제하였다. 이때 대동맥 절제부위이하의 혈관내막의 손상을 피하기 위해 유의하였다. 절제된 심장은 4℃의 Ringer solution을 넣은 basin에 넣고 흔들면서 혈전과 혈액을 제거하였다(Table 2).

나. 대동맥 및 판막과 폐동맥및 판막의 절제

절제된 심장에서 대동맥과 판막, 폐동맥과 판막을 다시 절제해낸 후 멸균과정을 거쳤다. 절제된 심장을 심침부가 수술자에서 먼쪽에, 대동맥이 수술자쪽에, 우심방이 오른쪽에 위치하도록 놓는다. 심낭의 reflection은 전부절제한 후, 그 귀퉁이를 hemostat을 이용하여 4귀퉁이를 고정한다. 우관상동맥을 기시부부터 conal branch의 기시부까지 절제한 후 그 바로위에서 자른다. 우관상동맥동은 우심실의 경계부위까지 박리해낸다. 대동맥에 있는 심낭의 reflection은 같이 제거한다. 이 절제과정은 대동맥주위로 무관상동맥동에서 시작하여 좌관상동맥동까지 계속하였다.

우심실의 유출로의 제거는 폐동맥 판막륜의 분리를 쉽게 만드므로 우심실 출로부위는 폐동맥 판막륜에서 2cm 떨어져서 우심실의 전벽을 분리해내고 심실중격부위에서 적절한 깊이로 절제 해낸다. 폐동맥뒤에서 좌하행동맥이 나타나면 그 기시부까지 추적해 나간다. 좌측 관상동맥은 좌하행동맥과 좌측회귀선동맥이 분리되는 부분 직전에서 절제한 후 좌측관상동맥동을 박리하였다. 다음 대동맥동종판막을 우심실 우심방, 좌심방으로부터 분리하였다. 좌심실을 종으로 절개하고 좌심방을 연 후 승모판막의 전엽에 붙어있는 chorda를 절제하고 전엽을 좌심방쪽으로 당기고 좌심실쪽에서 대동맥의 판막륜을 확인한 후, 좌심실의 중격을 판막륜에서 6mm 직하부위에서 4mm의 두께로 절제해

Table 2. Procurement of Heart

- At experimental Animal operating room Cardiotomy via Right Thoracotomy with sterile procedure
- Rinse of the heart with Ringer's lactate to remove blood from cardiac chamber
- The heart and 200ml of Ringer's lactate are placed sequentially in two intestinal bags
- The intestinal bag is placed into the ice filled chest (4C)
- Transport to cryopreservation laboratory where edgard laminar flow set

냈다. 다음에 왼쪽 검지를 좌심실을 통해 넣고 남아있는 심근 덩어리를 잘라내어 4mm의 두께로 절제 하였다. 각 관상동맥을 2-0 silk로 결찰하였다(Table 3).

다. 판막의 크기, 길이 측정

채취된 판막은 대혈관의 길이를 saline 등을 뿌리거나 하여, 마르지 않도록 유의하면서 sizer를 이용하여 판막자체의 크기와 길이를 측정 하였다. 이 판막은 검체 용기에 판막쪽에 먼저 넣었으며 동종판막이 충분히 잠길 수 있도록 항생제 용액을 넣었다. 폐동맥 동종판막도 같은 방법으로 보관하였다. 이 검체 용기는 다시 500ml Jar에 뚜껑을 닫았다. 이 jar는 4℃의 냉장고에 보관하였다. 검체용기에 넣기전에 일부조직을 떼내어 9조각으로 나눈후 이 중 3조각은 후에 대동맥판막을 담은 용액과 함께 세균검사실로 보내어 세균배양및 smear를 실시하였다. 나머지 6조각은 대동맥과 함께 넣어 보관하였다.

라. 멸균(Sterilization)

대동맥 및 판막이 완전히 분리 절제된후 RPMI 1640조직배양과 항생제를 섞은 용액에 넣는다. 4℃에서 24시간 보관한 후 새로 준비된 같은 용액에 24시간 더 보존한다. 이때의 조작은 laminar flow설비가 있는 임상병리과에서 시행하고 완전히 무균조작을 시행한다. 두번째로 4℃의 항생제및 RPMI 1640 조직배양액 (Table 4,5)에 보관한 후 대동맥은 영구보존할 준비가 완료되었다. 이때에 대동맥과 함께 준비된 조직편 3개를 임상병리과로 보내서 세균배양을 시행하였다

Table 3. Dissection of Aortic and pulmonic conduit

- At cryopreservation laboratory where laminar flow set
- Operator should don his sterile attire(Cap, mask and gloves)
- Harvesting aortic homograft
- Harvesting pulmonic homograft
- Measuring of the size and length of the specimen
- Placement of homograft in the specimen container with RPMI 1640 media and antibiotic solution

Table 4. Tissue Culture Media, RPMI 1640

- RPMI 1640 is a balanced, buffered salt solution which supplements amino acids, vitamins and glucose.
- Three distinct purposes of employing RPMI 1640.
 1. Sterilization
 2. Freezing
 3. Thawing
- All media are routinely cultured at the time prepared and when utilized.

(Fig. 1). 이때에 사용하는 배양 media는 Thioglycolate broth와 Sabour and dextrose broth를 사용한다. 현재 우리가 사용하고 있는 항생제는 Amphotericin B 25ug /ml of media, Cefoxitin 240ug /ml of media, Lincomycin 120ug /ml of media, Polymyxin B 100ug /ml of media 및 Vancomycin 50ug /ml of media이다(Table 6).

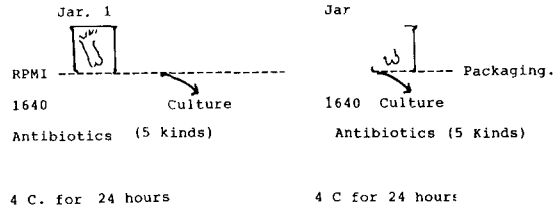


Fig. 1. Sterilization of Homograft conduit

마. 냉동준비 포장(Packaging)

영구보존할 준비가 되어 있는 대동맥조직을, 항생제가 섞여 있는 배양액 RPMI 1640에 DMSO(Dimethyl Sulfo-oxide)와 calf serum이 각각 10%의 농도가 되도록 추가 혼합하여 100cc를 투명한 scotch pak pouch에 넣고, 가능한 공기를 제거하고 열을 가하여 봉한 후 foil sotch pak pouch에 넣어 다시 봉한다. 완전히 포장된 대동맥조직을 4℃냉장고에 넣고 곁에 필요한 내용을 기록하여 부착시킨다(Table 7).

바. 냉동보관(Cryopreservation)

냉동보관용 기구는 Cryo Med 1010A microcom-

Table 5. Component of RPMI 1640.

Component	
INORGANIC SALTS	
Ca(NO ₃) ₂ MH ₂ O	
KCl	
MgSO ₄ (anhydrous)	
NaCl	
NaHCO ₃	
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	
OTHER COMPONENTS	
Glucose	
Glutathione(reduced)	
AMINO ACIDS	
L-Argine(troo baso)	200.00
L-Asparagine(anhydrous)	50.00
L-Aspartic Acid	20.00
L-Cystine 2HCl	65.2
L-Glutamic Acid	20.00
L-Glutamine	300.00
Glycine	10.00
L-Hiatdine(free base)	15.00
Hydro L-Proline	20.00
L-Isoleucine	50.00
VITAMINS	
p-Aminobenzoic Acid	1.00
d-Biotin	0.20
O-CaPantothenate	0.25
Cheline Chloride	3.00
Folic Acid	1.00
Nicotinamids	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamin B	0.005
L-Leucine	50.00
L-Lysine HCL	40.00
Methyonine	15.00
Phenylalanine	15.00
Proline	20.00
L-Saning	30.00
L-Threonine	20.00
L-Tryptophan	5.00
L-Tyrosine	20.00
L-Valine	20.00

puter, Model 2700 freezing chamber Linder's LS-160 질소탱크, D-500 Strip chart recorder이다 (Table 8). 이 기구에 의하면 냉동보관에 소요되는 시간은 보통 55분 정도인데 컴퓨터에서 모든 경고음을 작동시켜 놓아 냉동과정에서 이상이 발생할 경우, 즉

Table 6. Antibiotics for Sterilization of Homograft

Amphotericin B	25 ug /ml of media
Cefoxitin	240 ug /ml of media
Lincomycin	120 ug /ml of media
Polymyxin B	100 ug /ml of media
Vancomycin	50 ug /ml of media

Table 7. Packaging of Homograft for Cryopreservation

- RPMI 1640+FCS at Scotch Pouch. +Antibiotics
- Foiling the Schotch Pak Pouch.
- Labeling
- Filling up the inventory sheet.
- Routine culture the specimen

Table 8. Equipment Cryopreservation

CryoMed 1010 microcomputer.
Model 2700 Freezing chamber.
D-5000 strip chart recorder.
LR 310 nitrogen refrigerator.

시 확인할 수 있도록 하였다. 보통 냉각은 -40℃까지 분당 1℃씩 온도를 낮춘후 -40℃에서 동종판막조직을 액체 질소탱크로 옮긴다. 이 탱크 내의 온도는 최하 -196℃까지 냉각되며 우리가 사용하는 Model은 LS-160이다. 질소의 최고압은 24PSI를 넘지 않았으며 22PSI가 적절하다고 판단하였다. 또한, 14PSI이하의 질소압력은 냉각을 비효과적으로 시키므로 유의하였다(Table 9).

사. 해동과 희석(Thawing and Dilution)

냉동보관된 대동맥 동종판막을 이식할 경우, 필요한 크기를 선택하여 냉동실로 연락하여 냉동실에서는 재고일람표에서 가장 오래된 것을 선택하여 크기 및 각종 특징을 확인한 후 액체 질소탱크에서 제거하여 scotch pak pouch에 담겨 있는 채로 동물수술장으로 옮겼다. 옮겨진 대동맥조직편의 DMSO를 희석시키기 위해 다음과 같은 조작을 하였다. 수술장에는 4개의 basin을 준비하여 각각 basin(가), basin(나), basin(다), basin(라)라고 칭하고 basin(가)와 (나)에는 각각 250ml의 Fetal calf serum(FCS)(10%)를 준비한다. 얼어있는 조직은 매우 잘 부서지므로 취급에 각별히 유의하였다. 동종판막조직을 basin(나)로 옮긴다.

Table 9. Proceures of Cryopreservation

- Place the specimen in the freezing chamber
- When cryocycle is completed to -180°C at freezing chamber, remove the preserved tissue package
- Place them in their appropriate position in LR 310 nitrogen refrigerator

Table 10. Thawing and Diluting

- Check the inventory list using the oldest valve of appropriate specification first
- Transport the package to OR and warming by placing into sterile saline warmed to $0-50^{\circ}\text{C}$
- Dilution with RPMI 1640+10% FCS
- Send the small picese of tissue culture lab the specimen

보통 basin(나)에서 3-4분이면 완전히 해빙되고, 이때 scotch pak pouch를 개봉하여 대동맥조직과 함께 담겨진 용액 100cc를 basin(다)에 넣은 후, basin(라)에 준비하였던 용액 50cc를 넣어 약 1분간 흔들어 준다. 다시 basin(라)에서 50cc를 basin(다)로 옮긴 뒤 1분간 더 흔들어 주고, basin(다)에서 100cc의 용액을 basin(가)로 옮긴뒤 다시 basin(라)로 옮긴뒤 다시 basin(라)에서 100cc의 용액을 basin(다)로 옮겨 다시 1분간 다시 흔들어준다. 이 과정이 끝나면 대동맥조직을 basin(다)에서 RPMI1640과 FCS의 혼합물 50cc가 담겨있는 basin(라)로 옮긴다. 이때 이 대동맥판막은 이식의 준비가 완료되었다. 이제 함께 조직편을 세균검사실로 보내서 세균과 진균에 대한 배양검사를 시행하였다(Table 10).

아. 이식과정(transplantation)

한국산 면양을 B Group 20마리를 대상으로 하여 Pentobarbital Sodium을 체중 1kg당 30mg씩 현관주입한 후 전신마취하에서 기관삽입을 하며, 인공호흡을 시키면서 좌측양와위하에 4번째 늑간을 통해 우측개흉술을 시행하였다. 흉골우측의 내유동맥을 통해 삽관을 하여 수술동안 혈압을 측정하였으며 내경정맥을 통해 삽관하여 정맥압을 측정하였다. 실험면양의 4예에서는, 심폐기를 체외순환을 이용하여 우심실과 폐동맥 사이에 동종판막을 이용하였다. 16예에서는 심폐기의 가동없이 폐동맥과 우심실 또는 우폐동맥과 주폐동맥 사이에 이식하였다(Table 11).

자. 수술후 처리

이식된 양은 48시간동안 동물수술실 집중관리한 후, 사육사로 옮겨 장기사육하였다. 평균 수술후 인공호흡기 가동시간은 4시간이 소요되었다. 수술후 혈액검사

Table 11. Homograft Fibroblast culture 결과

Sample No.	부위	Valve 부분	Wall 부분
1		실시하지 못했음	Growth(+)
2		G (+)	G (+)
3		G (+)	G (+)
4		No growth	G (+)*
5		G (+)*	(+)*
6		G (+)*	(+)*
7		G (+)*	(+)*
8		No growth**	G (+)*
9		No growth	G (+)
10		G (\pm)***	G (+)
11		G (+)*	G (+)
12		No growth**	G (+)*
13		G (+)	No growth
14		실시하지 못했음	G (+)*

* : 2주후에 very active monolayer 형성.

** : 초기에 blast form은 형성하였으나 성숙한 fibroblast로 진행하지 못하고 degeneration.

*** : 초기에 blast form을 관찰할 수 있었으나 contamination으로 계속 관찰이 불가능했던 경우.

전해질검사, 동맥혈검사를 시행하여 술후 관리를 하였다(Table 12).

차. 장기사육

수술에 성공한 양은 장기 사육사로 옮겨 7일간 분리 사육한후 일주일 후 부터는 정상적인 양과 함께 사육하였다. 사육에 관한 일반적인 사항은 사료, 감염방지, 위생사항 보존등은 다른 양들과 같이 하였다.

카. 장기사육양의 희생

장기 사육된 양은 계획에 따라 일정기간 후 희생시켜, 정상적인 판막과 아울러 이식된 판막을 획득하여

Table 12. Profile of Implantation of Cryopreserved HoMoGRAFT

ID No	Table 11 Graft A/P	Implanted Site	보관방법	보관기간	이식후 사육기간	Cause of Death	Preop But	이식당시 But	Cardiopulmonic Bypass	
a	A	RV-PA	Cryo	2Wks	수술사망	마취중	32	a	C-PB	
b	A	RV-PA	Cryo	4Wks	수술사망	마취중	34	b	CPB	
c	P	RV-PA	Cryo	3Wks	수술사망	부정맥	32	c	CPB	
d	A	RV-PA	fresh	5Wks	수술사망	마취중	28	d	CPB	
e	A	RV-PA	fresh	12Wks	수술사망	출혈	26	f	CPB	
f=15	P	RV-PA	Cryo	4Wks	6개월사육 중사망	위장관 이상	26	f	CPB	
1	A	RV-PA	Cryo	6Wks	1 Yr		32	53	1	CPB
2	P	RV-PA	Cryo	4Wks	1 Yr		34	55	2	-
3	P	RV-PA	Cryo	8Wks	1 Yr		36	58	3	-
4	P	RV-PA	Cryo	3Wks	4 Mo		31	37	4	-
5	P	pPA-dPA	Cryo	4Wks	4 Mo		30	38	5	-
6	A	pPA-dPA	Cryo	2Wks	3 Mo		32	39	6	-
7	P	pPA-dPA	Cryo	6Wks	3 Mo		29	35	7	-
8	P	pPA-dPA	Cryo	4Wks	3 Mo		38	44	8	-
9	P	pPA-dPA	Cryo	2Wks	2 Mo		42	50	9	-
10	A	pPA-dPA	Cryo	10Wks	2 Mo		40	45	10	-
11	P	pPA-dPA	Cryo	2Wks	2 Mo		26	28	11	-
12	P	pPA-dPA	Cryo	3Wks	2 Mo		25	28	12	-
13	P	pPA-dPA	Cryo	7Wks	2 Mo		20	22	13	-
14	P	pPA-dPA	Cryo	4Wks	1 Mo		22	23	14	-

* 생존한 실험동물에는 No를 부여하였고, 사망한 양에게는 알파벳 소문자를 부여하였다.

RV : Right ventricle PA : Pulmonic Artery

dPA : distal pulmonary Artery pPA proximal pulmonary artery

조직배양된 병리조직학적 검사를 실시하였다(Table 11).

타. 세균 및 진균배양

- 1) 양에서 떼어낸 혈관조직을 일부 떼어 thioglycollate 배지에 넣어 증균시킨 후, 세균 및 진균배양을 실시하였다.
- 2) 48시간의 멸균과정을 거친 후 동결보존과정에 들어가기 직전에 조직일부 및 담겨져 있던 조직 배양 용액을 다시 세균 및 진균배양을 실시하였다.
- 3) 동결보존과정을 거쳐 -196℃에서 보관되었던 조직을 다시 녹여 이식하기 전에 조직일부를 떼어 역시 세균 및 진균배양을 실시하였다.

파. 세포배양

세포배양은 무균상태로 떼어진 조직을 라미나 후드

안에 잘라서 angled neck flask(25cm, Bellco T/C culture flask)에 부착시키고 조직이 살짝 잠길만큼의 배양액을 넣었다(약3ml). 배양액은 RPMI 1640 배지에 glutamine 및 glucose(Gibco, tissue grade)를 첨가한 후에 성장 촉진 인자로는 20% 우혈청(Gibco, Mycoplasma free)을 넣어 37c, 5%CO 상태를 유지하였다. 세포배양에 들어간 조직의 종류는 다음과 같다.

첫째, 정상양에서 떼어낸 폐동맥과 대동맥혈관 조직의 조직세포배양을 실시하였다(Group 1,5례).

둘째, 동결과정을 거쳐 보관중이던 혈관조직을 급속 해동시켜 조직세포배양을 실시하였다(Group 2,3례).

셋째, 녹인 혈관조직을 다른 양에 이식수술하여 2개월 내지 12개월간 생존하였던 양을 희생시켜, 이식된 부분을 떼어 다시 조직세포 배양을 실시하였다(Group 3,13례).

넷째, 반복적으로 일주일 간격으로 3회 계속 동결 및

Table 13. Evaluation of changes of Implanted nomograft conduit

No	Great vs		Valve		Conduit ass.				Valve Leaflet assessment			
	Calcification	Patency	Contour	Calcification	Calcification	Loss of muscle cell	Intimal Proliferation	Lymphocytic proliferation	Cellularity	Endothelium	Thrombus	Architectural integrity
1	+	+	-	-								
2	-	+	-	+	+	++++	+	-				
3	+	-	-	+	++++	++++	-	-				
4	+	-	-	+	++++	++++	+	+	++	-	-	-
5	+	-	-	+	+++	++	++	+				
6	+	+	+	-	+++	++	-	+++	-	-	++++	-
7	-	+	+	-	+	++++	++++	-	-	-	++++	-
8	-	+	+	-	+++	++	-	+	-	++	+	++
9	+	+	+	-	+	+	+	+++	-	++	-	++
10	+	+	+	-	+	++++	-	+	++	-	-	-
11	-	+	+	-	++++	++	-	+	-	+++	-	-
12	-	+	+	-	+++	++	++++	++++	+	+	-	-
13	-	+	+	-	-	++	+++	+++	+	+	+	-
14	-	+	+	+	++	+++	+	+	-	-	++++	-

해동과정을 실험적으로 반복한 후 혈관조직을 일부 떼어 조직세포배양을 실시하였다.

하. 세포배양의 관찰

첫 3일 이후 세포배양의 교환은 매5일 내지 7일 간격으로 교환하였다. 세포배양 형태는 매일 도립현미경 (inverted microscope)으로 관찰하였다. 이번 논문에서는 생존한 양의 생존기간 및 보존기관에 관계없이 섬유아세포의 성장유무를 관찰하였다. 또 혈관벽 및 판막에서 자라는 섬유아세포의 배양과정에서 형태변화를 시간별로 관찰하였다.

거. 병리조직학적 방법

1. 각 심장의 정상대동맥 또는 폐동맥과 정상판막을 대조군으로 삼았다.

2. Conduit portion은 육안적으로 석회화된 부위와 비석회화 부위(soft) area의 절편을 얻었고, 석회화된 부분은 5% 질산용액에 넣어 탈석회작업을 하였다.
3. 이식된 판막은 적어도 2개이상 절편을 만들어 관찰하였음.
4. 각 병리학적 판단은 R.A. Jonas등이 잡은 Table (J. Thorac Cardiovascular Surgery 1988:96: 747)에 기준하였다.

IV. 연구성적

1) 수술성적

20마리의 이식례에서 초기 사망을 5례를 제외하고

는 15례가 장기 생존하였으나, 1례에서 6개월만에, 위 장관문제로 사망하였다. 초기사망은 이식술 자체에 따른 사망이라기 보다는 마취과정의 문제(3), 수술중에 심장손상(1), 부정맥(1)등으로 동종판막 자체가 사망의 원인이 되었다고 생각되는 예는 없었다.

2) 세균 및 진균배양

보관과정에서 떼어낸 조직에서 세균및 진균배양결과는 전예에서 음성으로 나타나 이식가능한 것으로 판정하였다.

3) 조직배양

조직배양에 있어 초기에는 적혈구가 많이 섞여서 이들을 섬유아세포의 초기세포와 혼동하기 쉬우므로 주의하였다. 관찰중 아세포만 형성한후 세포질 내는 성숙한 섬유아세포로 진행하지 않는 경우는 생육성이 없는 경우로 판정하였다. 또 각 조직을 잘게 잘라 조직세포배양을 할 때에는 조직마다 매회 새로운 칼로 바꾸어서 시행하여 칼에 묻은 섬유아세포가 이동하여 생육성판정에 혼란을 줄 위험을 배제하였다. 신선한 동종판막은 2일간의 멸균과정을 거쳐 세포배양이 실시 되었으므로 Group 3보다 성장속도가 떨어지는 것으로 생각된다. 5례 모두에서 섬유아세포의 성장이 관찰 되었으며 이들이 flask전체를 균일하게 덮는 단일층 형성을 하는 기간은 약 10주 정도 소요되었고 초기의 성장변화 상태는 본 연구소의 장비비교로 관찰하지 못했다(Fig. 2).

동결보존하여 녹인 조직(Group 2)의 경우 신선동종판막 비교하여 성장속도가 매우 느리지만 2례에서

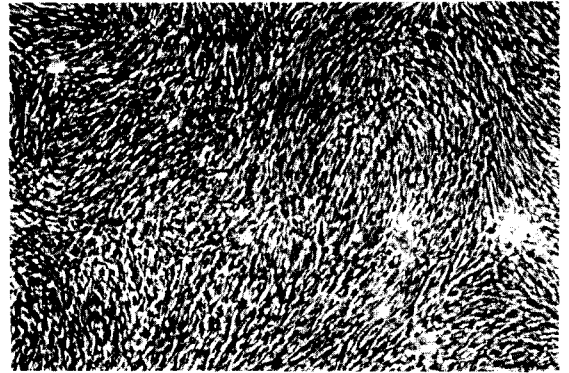


Fig. 2-1. F : broblast forming monolayer after 10 weeks of culture from fresh homograft. Invertea Microscope x50.

섬유아세포 단일층을 형성하였고 1례에서는 blast form만을 형성하다가 성숙된 섬유아세포를 진행하지 못하는 것도 있었다. 동종판막 이식후 2개월 내지 12개월 동안 생존한 양을 희생하여 이식된 부분의 조직배양(Group 3)을 실시한 결과 13례중 11례에서 모두 왕성한 섬유아세포의 성장과 증식을 관찰할 수 있었으며 2례에서는 아세포형만을 보이다가 더 이상의 성숙을 보이지 않았다. 생존양을 희생하여 이식된 조직부분을 떼어 세포배양을 한 경우는 성장속도가 매우 빨라 7일째면 벌써 섬유아세포의 단일층이 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다.

배양기간에 따른 섬유아세포의 형태변화를 보면, 잘게 자른 조직으로부터 직경 15-17u 크기의 세포가 배양 1일-2일째부터 관찰되었는데 이 세포는 세포질이 거의 없었고 원형의 핵을 가지고 있었다. 4일경부터 세포질이 풍부해지고 핵이 작아지면서 일부세포는 세

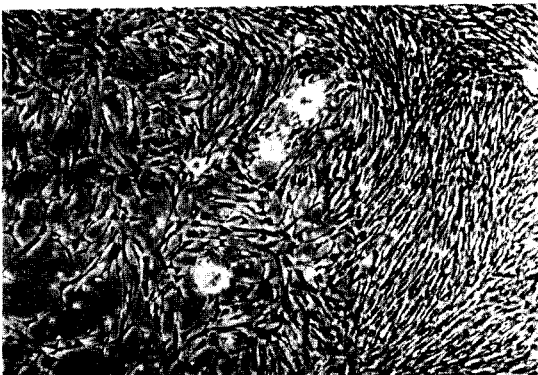


Fig. 2. Fibroblasts forming monolayer after 8 weeks of culture from fresh homograft (Inverted microscope, x40)

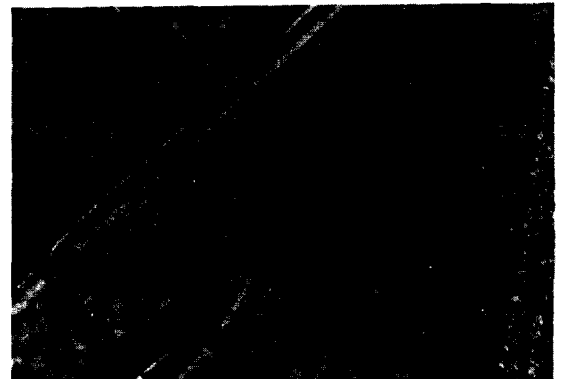


Fig. 3. Early blast forms of fibroblasts after 3 days of culture from sacrificed sheep. (Inverted microscope, Wright stain, x200)

포질분자를 형성하기 시작하였고(Fig. 3,4,5), 7일경에는 이미 100배 현미경 시야를 덮는 완전히 단일층을

형성한 조직도 관찰되었다(Fig. 6,7).

수술시간과 조직배양시간 사이의 지체요인이 그 가장 큰 차이 요인이라고 생각된다. 실험적으로는 3회 이상 동결, 해동과정을 반복한 경우(Group 4)에도 섬유

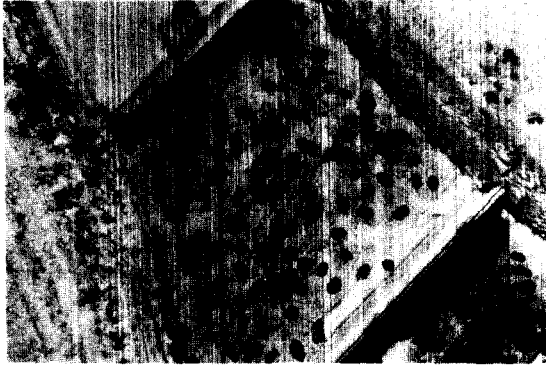


Fig. 3-1. F : broblast showing gong blast forms after 4 days of culture from Sacinified sheep (Iaverted Microscope Wrigwt stain x200)

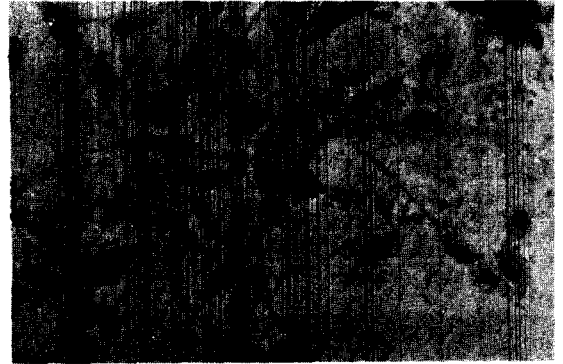


Fig. 6. Mature fibroblasts after 7 days of culture from sacrificed sheep. (Inverted microscope, Wright stain, x200)

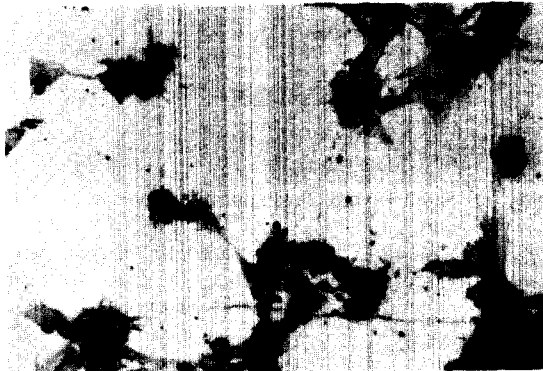


Fig. 4. Early blast form of fibroblasts after 4 days of culture from implanted homograft of sacrificed sheep. (Inverted microscope, Wright strain, x100)



Fig. 6-1. F : broblast forming a ctive monolayer after 10 days of culture from fresh homoquft (Invertea Microscope x100)



Fig. 5. Fibroblasts showing cytoplasmic branch after 5 days of culture from sacrificed sheep (Inverted microscope, Wright, x200)

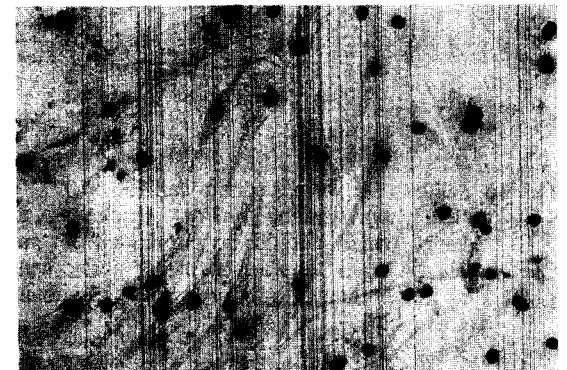


Fig. 7. Fully mature fibroblasts (Inverted microscope, Wright stain, x200)



Fig. 8. Sheep No.2 The transplanted pulmonic arterial conduit, valvular area HE x40. The proximal portion of conduit shows localized calcification mainly in media, which changed to bone metaplasia.

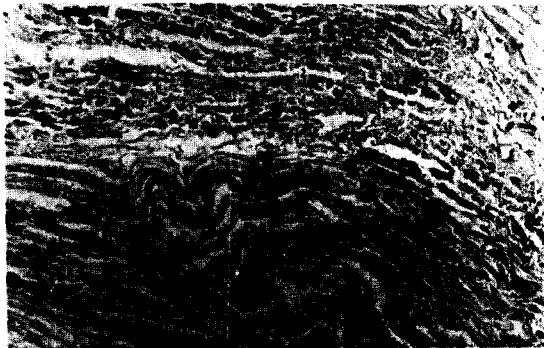
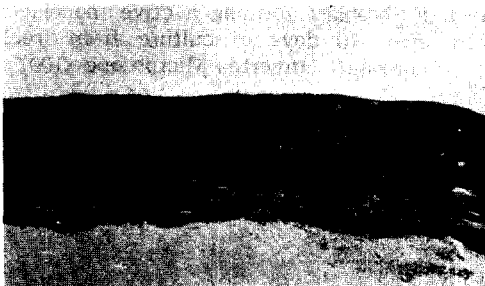


Fig. 9. Sheep No.4 The transplanted pulmonic arterial conduit HE x200. The calcifications are continuous in media in addition to the involving of elastic fibers. The calcifications are extended to adventitia in areas.



Internal elastic layer

Fig. 10. (Sheep 5) Normal aortic wall HE x10. The approximate intimal thickness is seen, which should be confirmed as the elastic stain. The adventitia of aortic wall is not attached by fibroadipose tissue in sheeps.

아세포가 자라나는 것을 관찰할 수 있었으며 이를 시행해본 목적은 한번 해동시켜 준비되었던 귀중한 조직

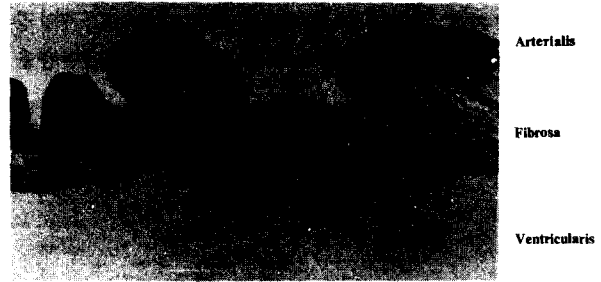


Fig. 11. (Sheep 6) Normal pulmonic valve HE x100. The close-up view, showing ventricular, fibrous, and dense and corrugated arterial layers.



Fig. 12. Sgeep No.6 Transplanted pulmonic valve x40. The valve shows loss of normal architecture and no cellularity. But intracusp organizing thrombus is observed.

을 수술 사정상 혹은 적응증이 안되는 경우 다시 동결 보존시켜 보관하는 것이 의미가 있는가를 판단하기 위해서였다. 단 한개의 조직으로 한 실험이므로 많은 숫자의 실험과 술후 추적이 필요하겠지만 몇번의 동결, 해동과정후에도 세포의 생육성이 관찰된다는 것은 상당히 고무적인 일이라 하겠다. 일단 해동시킨 조직을 RPMI배지에 옮겨 4℃ 상태로 일주일간 보관후 세포 배양을 시행해 본 결과 자라나오는 아세포가 있었으나 성숙된 섬유아세포로 진행되지 못하고 단일층도 형성하지 못했다.

4) 병리학적 검사

장기 생존한 14예의 대혈관과 판막은 육안적으로 석회화의 유무를 판정한 뒤 석회화된 부위와 비석회화된 부위에서 절편을 얻어, 5% 질산 용액에 넣어 탈석회화 작업을 한후 Hematoxylin-Eosin염색을 하였다. 대혈관은 14예중의 7예에서의 석회화를 보였으나



Fig. 13. (Sheep 7) Normal pulmonic artery HE x40.
The intima is normally corrugated in pulmonic artery, which is not observed in aorta. Fibro-adipose tissue is characteristically found in adventitia of normal pulmonic artery of sheep.

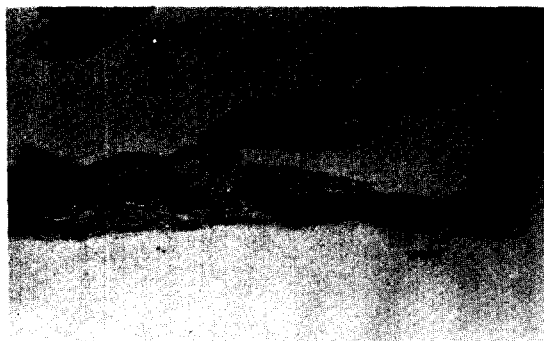


Fig. 15. Sheep No.8 Transplanted pulmonic valve HE x10.
The lower power view of transplanted pulmonic valve, showing thickened appearance in mid-portion.



Fig. 16. Sheep No.9 The transplanted pulmonic valve HE x40.
The homogeneously acellular valve contains full of intracuspal fibrinous thrombus. The suspicious endothelia in arterial side are RBCs. The opposite ventricular surface is also confronted by fibrinous thrombus.



Fig. 14. Sheep No.7 Transplanted pulmonic valve HE x40.
The bluntly protruded valve shows loss of cellularity and normal architecture. Amorphous intracuspal fibrinous thrombus is seen beneath the shortened valve.

11예에서의 혈류소통을 보였다. 판막은 14예중 5예에서의 석회화를 보였으나 대개다 심한 정도는 아니었다 (Fig. 8~23).

V. 고 찰

이 연구는 사체에서 심장의 판막과 대혈관을 채취하여 냉동보관한 후에 이식한 후 일정시간후에 채취하여 채취, 냉동, 보관, 이식과정의 방법설정 및 안전성, 냉

동보관후 세포의 생육성, 이식된 판막과 혈관의 이식 후의 변화를 규명하고자 시도한 논문이다.

우선, 이런 연구가 이루어지게 된 배경과 이유에 대해 살펴보기로 하자. 장기이식술의 급속한 발전으로 심장과외과 분야의 난치 또는 분치로 생각되던 많은 심장질환에 외과의사의 손길이 미치게 되었다. 특히, 심장판막의 동종이식분야는 서유럽과 북미대륙에서는 약 4반세기의 역사를 갖고 있으며 특히, 80년대 초반 부터는 보편화되어가고 있는 추세이다. 그러나 국내적으로는 사체손상을 금기로하는 사회관습에 따라 이에 대한 연구경험이나 임상경험이 거의 전무한 상태이다.

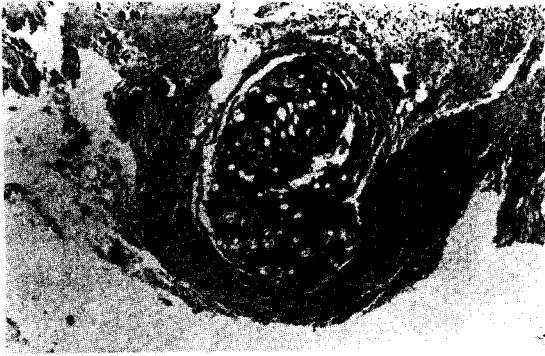


Fig. 17. Sheep No.9 The transplanted pulmonic arterial conduit HE x40.
Suture granuloma composed of vacuoles and foreign body giant cells is observed in adventitia, which is surrounded by loose fibro-adipose tissue.



Fig. 19. Sheep No.11 The transplanted pulmonic valve and proximal portion of pulmonary arterial conduit HE x10.
Normally corrugated arterial side of valve is seen. But intracuspal thrombus is absent. Suture granulomas are observed in the adventitia of proximal conduit.



Fig. 18. Sheep No.10 The transplanted pulmonic valve HE x10.
The 3 layers of valve is faintly observable. Endothelial cells are discontinuously maintained. Marked intracuspal thrombus is noted, which is charged to fibrous organization.

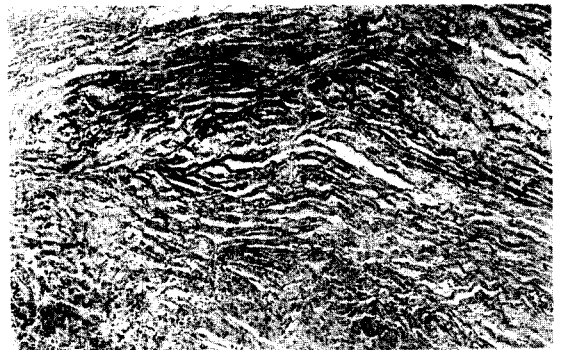


Fig. 20. Sheep No.12 The transplanted pulmonary conduit, showing linear calcifications on the elastic fibers(HE x40).

특히, 최근들어 국내에서도 장기이식 분야의 연구가 활성화되고, 뇌사문제가 법제화될 움직임을 보임에 따라 본 저자도 이에 대한 준비로서 이에 대한 연구를 시작하게 되었다.

다음은 실험방법 설정과 검사법의 채택과정을 검토해 보기로 하자.

저자는 이 실험을 위한 대상을 한국산 면양(코리테일) 40마리를 암수구별없이 선택하였다. 처음에는 실험동물로서 구하기 쉬운 개, 토끼, 양 등을 고려하였다. 그러나 이식실험과정의 전과정이 임상에서의 적용을 생각하여, 가능하면 큰 크기의 심장을 가진 동물이 적합하고 둘째, 잦은 채혈검사와 수술후 처치등을 고



Fig. 21. Sheep No.12 The transplanted pulmonic valve, showing irregular corugation on arterial side. Loose fibrous tissue is noted on ventricular side, which is extended from host(receipient) ventricle. Focal endothelial main-taining c sparse inflammatory cells is observed. HE x 40.



Fig. 22. Sheep No.13 The transplanted pulmonic valve, showing intracuspal thrombus HE x10.



Fig. 23. Sheep No.14 The transplanted pulmonic valve, showing large intracuspal recent thrombus HE x10.

려하면 온순한 동물이 편리하고 세제, 조직형태 및 세포내 구성물이 사람과 유사한 동물이 적합하다고 판단되었다. 이와같은 사실을 토대로 한국산 잡견과 면양이 최종 고려되었으며 장기관리의 쉬운 점을 생각하여 면양이 선택되었다.

심장의 채취방법은 심장외과에서의 임상경험과 부검경험을 살리고 본인이 외국에서 연구방법에 의해 경쟁없이 최선의 방법이라고 생각되는 방법을 선택하였다. 1962년 이후 대동맥 판막동종이식에 사용되는 조직은 냉동법, 건조법, 화학처리법, 조직배양법, 냉장고 보관법 등의 여러가지 방법의 멸균과정 및 보관과정을 거쳐왔다^{13,14,15,16}. 최초의 동종판막은 4℃ 냉장고에서 몇일-몇주간 보관되었다고 보고되었다. 그러나, 이런 방법으로는 장기보관이 어렵고 1960년대에 수요가 증가함으로써 여러가지 다른 방법이 적용되었다.

이런 방법들로서는 판막을 무균적인 조치없이 그냥 채취한후 화학적인 방법이나 방사선조사법을 이용하

여 멸균하는 방법등이 있으나 이런 방법들은 살아있지 않는 심장판막을 만들게 된다. 화학적 처리방법으로는 formaldehyde 고정, chlorhexidine, B-Propiolacton 및 ethylene oxide등을 사용하는 방법등이 보고되었고, 냉건조법은 조직을 약 -70℃까지 냉각시킨 후 진공에서 조직을 건조시키는 방법이다. 대부분의 심장판막은 항생제를 이용하여 멸균되었고 4℃에 일정기간 보관되었다. 방사선조사나 화학물질을 이용한 멸균 등은 판막의 변성 및 파열을 잘 일으키는 경향이 있었는데 1968년 항생제와 영양배지를 사용하여 판막 조직을 멸균시키는 방법이 도입되었다^{5,6,7,17}. 이어서 이 방법을 이용하여 1969년에 Prince Charles대학에서 첫 대동맥 판막이식을 성공시켰다. 1969년 Barratt 등은 화학물질 및 방사선 처리한 대동맥 동종판막이식 101례를 시행, 추적하여 이 중 27명(26.7%)에서 판막부전증이 발생하여 그 중 17명은 재수술을 시행하였고, 판막부전의 원인으로는 불완전한 봉합선으로부터 누출, 판막파열, 세균성판막염, 판막석회화, 판막이 올바른 제 위치에 이식되지 않은 경우 등이라고 보고하였다¹³. 이는 매우 불량한 결과로, 멸균방법으로 화학물질 및 방사선처리한 동종판막이 좋지 않음을 입증하였다. Barratt 등은 8례의 환자에서 화학물질 및 방사선 처리를 하지 않은 판막을 사용한 결과 석회화 및 판막파열이 없었다고 보고하며 항생제로 멸균처리후 동결 보존하는 것이 좋은 방법이라고 결론지었다. 1977년 Barratt 등은 다시 항생제를 이용하여 멸균시킨 대동맥동종판막을 이식수술 121례를 분석, 4년에서 6년간 추적한 결과 90%에서 판막부전이 발전되어 재수술을 하였다고 보고하였다. 반면 Cryopreservation의 방법은 1949년 Polge 등이 소의 정액을 glycerol을 이용해 Cryopreservation하면서 최초로 시작되었다. 그후, Lovelock과 Bishop 등이 1959년 살아있는 세포에 냉동손상을 막는 방법으로 DMSO(Dimethyl-sulfoxide)의 효과를 기술하였다. 이와같이 glycerol이나 DMSO처럼 세포에 침투하는 permeating cryoprotective agents와 함께 소위 nonpermeating cryoprotective agent가 발견되었다. 이런 Nonpermeating cryoprotective agent로는 polyvinylpyrrolidone, hydroxyethyl starch, sugars, alcohol 등이 발견되었다.

이와같은 permeating cryoprotective agents는 세포내의 수분함량을 감소 시키고, 냉동중에 생성되는

얼음의 양을 감소시켰다. 뿐만아니라, cryoprotectant 는 세포막에 직접 작용한다. 이 기전은 현재까지 확실히 밝혀지지는 않고 있지만, 이온사이의 상호작용에 의해 이는 colloidal 삼투압에 변화를 초래하고, 세포막과 연관된 수분의 움직임의 변화에 기인한다고 생각된다.

과거 30년동안 세포와 조직의 냉동손상의 2가지 기전이 강조되어 왔다.

첫째는, 세포내외의 얼음조각형성에 의한 기계적 손상이고, 둘째는 삼투압의 차이에 의한 탈수현상이다. 최근의 cryopreservation technology는 이 두가지 형태의 손상중에서 균형을 유지하려고 노력하는 것이다. 근본적으로 급속냉각이 이루어질 경우에는, 세포내외로 얼음결정이 형성되는 경향이 있다. 그러나, 냉각이 서서히 이루어질 경우에는, 얼음결정이 세포내외에 먼저 이루어지고, 세포외에 얼음이 형성됨으로써 세포는 고삼투압환경에 노출되게 된다. 이는 얼음결정의 형성이 증가할수록 세포외의 수분은 적어지기 때문이다. 따라서, 세포의 용매 농도의 증가에 의해 삼투압의 불균형에 의해 세포의 수분이 세포밖으로 빠져나와 위축된다.

결과적으로, 이상적인 감온속도와 cryoprotective agent의 결과로 얻을수있는 소량만이 얼음으로 바뀌고, 삼투압에 의한 세포의 탈수는 제한적으로 이루어지게 된다.

Cryopreservation의 과정을 발전시키는데는 몇단계가 있다. 몇종류의 조직에 대해서는 특히, 필요한 cryoprotectant 농도가 1M을 넘으면 세포의 삼투압에 의한 손상을 최소화하기 위하여 단계적으로 추가되어야 한다. 이 cryoprotectant의 추가는 저온(4℃ 또는 이하)에서 이루어지는 것이 보통이다. 이것은 cryopreservation에 필요한 농도의 cryoprotectant가 조직에 독성을 나타내기 때문이다. 일단, 조직에 대한 이상적인 cryopreservation에 상태가 선택되고 조직이 액체질소 온도까지 내려가면 조직은 영구히 보관된다. 액체질소의 온도에서 일어나는 유일한 변화는 subatomic particle의 상호작용이며, 이것은 이론적으로 초냉동보관된 조직의 수명이 수천년에 이른다고 생각된다.

Mermet등은 1970년 판막의 냉동보관을 보고하였다. 그 이후 몇몇의 cryopreservation방법을 이용한 판막보관이 보고되었고, 가장 최근것으로는 1989년 O'

Brien등이 냉장보관된 동종판막의 16년 추시와 cryopreservation의 11년 추시결과를 보고 하였고^{17,18)}, 1984년 Mochter등은 cryopreservation valve의 높은 세포생존에 대조적으로 2주이상 냉장보관된 판막은 nonviable 한 것으로 간주하였다¹⁶⁾. 이와같은 time frame에 따르면 23명의 nonviable 냉장보관된 판막은 판막엽의 파열등으로 재수술을 받았고, cryopreserved된 조직은 이런 합병증이 전혀 없었다. 또한, 이 식후 10년후의 판막과 관련된 합병증이 없는 비율은 (acutoreal freedom at 10 years post-transplantation) 재수술, 혈관증, 심내막염등을 포함하여 viable cryopreserved allograft에게는 92%였고, nonviable 4℃ 냉장보관된 동종이식에는 73%였다.

이에 따라 본저자는 이론적으로 또 임상적으로도 Cryopreservation 방법이 가장 이상적인 조직 보존법이라고 생각하여, 본 Protocol에서는 Cryopreservation을 정례적인 방법으로 채택하였다.

다음으로 고려할 사항은 면역학적인 문제가 있다. 심장판막은 mismatched allogenic recipients에게 이식되었을때 면역학적 변화가 거의없는 조직이다. 이런 면역학적인 특권을 갖는 기전은 혈관조직으로부터 유리되어 있기때문이다. 이런 조직으로는 1) 심장판막, 2) 각막, 3) 연골등이 있다. 심장판막조직은 현재까지 mismatched된 Donor-Recipient 사이에 면역학적인 반응을 유발한 것이 보고되지 않았다. 이는 2가지 요인이 있을 것으로 생각되는데 첫째는, 심장판막을 둘러싸는 내막이 Class II antigens의 주요 source인데 이것이 획득과정, 냉동과정, 이식과정중에 제거되기 때문으로 생각되고 둘째는, 심장판막의 결합조직에는 혈관분포가 매우 나쁘기 때문에 host lymphocyte와 Donor fibroblast 사이에 접촉할 기회가 거의 없기 때문으로 생각된다. 이런 면역학적인 반응이 없음에도 불구하고 몇몇 학자는 심장판막을 이식하기전에 Donor-Recipient간에 혈액형을 맞추고 있다.

그러나 보고에 의하면 ABO혈액형 및 Rh 혈액형은 조직의 판막이식술 성공여부와는 무관하다는 것이 발표되었었다. 1975년 Balch등은 대동맥동종판막이식술 46례를 분석하여 동종판막 이식에 있어서 면역학적인 손상이 주요한 역할을 하기는 하지만 ABO 및 Rh식 혈액형 불일치가 판막이식술의 성공여부와는 무관하다는 것을 발표하였다.

조직의 해동은 보통 37-42℃의 water bath에서 시

행된다. 이 온도는 조직에 치명적인 온도에 도달하지 않으면서 가능한한 빨리 녹이는 목적이다. 이것의 급속증온은 냉각중에 생긴 얼음결정의 증가를 방지하는 것이다. 조직에 따라서는 급속 증온에 민감하게 반응하기도 한다. 이는 일시적인 삼투압의 변화에 따른 쇼크에 기인한다. 이 삼투쇼크의 기전은 얼음이 녹고 그것이 삼투압에 균형을 유지하기 위해 세포가 재급수되면서 세포는 세포밖의 고삼투압용액에 노출되기 때문이다. 해동(Thawing)과정이 끝나면 cryoprotectant 용액은 제거되어야 한다. 이 과정은 보통 삼투쇼크와 cryoprotectant의 독성의 효과를 줄이기 위해 4℃에서 서서히 시행된다. 이 시점에서는 조직의 생존을 평가하는 방법의 선택이 중요하다. 생존(Viability)이란 세포나 조직이 자신의 형태를 유지하고, 주의와 정상적으로 상호작용하는 능력을 말한다. 적절한 생존평가 검사는 조직의 특성에 따라, 조직내의 세포의 형태나 기능에 의존한다. 따라서 적절한 생존의 평가는 proliferative 또는 metabolic assay를 이용하고 형태적인 방법을 이용하는 경우는 보통 조직검사 표면항원의 Localization, Transmission electron microscopy 또는 Scanning electron microscopy등을 이용하여 일차적으로 cryopreservation과정을 평가하는데 사용된다.

지금까지 사용된 판막조직의 생육성 여부의 판단기준은 당소모율, 섬유아세포배양, 조직절편의 H & E 염색상, 전자현미경 검사등으로 세포의 생존유무를 관찰하였다. O'Brien등은 대동맥판막을 4℃ 상태로 영양배지에 보관한 군(Group I)과 동결보존시켜 보관한 군(Group II)과의 생존을 및 합병증을 비교추적하여 보고하였다. 그의 보고에 의하면 수술후 첫 10년간 Group I에서 판막의 변성으로 재수술이 많았다고 한다. 이는 신선한 상태에서 판막을 보관하였다가 시간이 지남에 따라 생육성이 점점 없어지게 되므로 자연스럽게 수일 지난 판막을 이식하였을 경우에는 생육성이 떨어진 조직이 이식되고, 따라서 판막의 변성이 쉽게 오리라고 추측된다. 또 이는 판막조직의 생육성은 판막이 내구성과도 직결된다고 생각할 수 있는 증거이다. 또 보관방법과는 무관하게 동종판막이식은 초기의 판막감염에 특별한 저항을 가졌다고 생각된다. 이는 동종판막이식의 경우 초기 합병증이 거의 없다는 것이 입증해 준다. 동종판막이식 수술의 경우 혈전색전증은 비교적 매우 낮는데, 발생할 경우 오히려 수술직후에

많으며 이는 공기, 칼슘, 봉합선에서 발생하는 작은 혈전등에 의한 것으로 생각된다.

국내에서 섬유아세포의 형태를 관찰하여 보고한 논문으로는 1988년 홍주남등이 결절성 경화증에서 관찰되는 섬유아세포의 형태를 관찰, 5종류의 유형을 가진 섬유아 세포가 보인다고 보고하였다²⁸⁾.

저자는 본 실험에서 배양기간에 따른 섬유아세포의 형태변화는 관찰할 수 있었지만 단일층을 형성하도록 성숙한 뒤에는 세포의 형태가 균일하였다. 이번 실험에서 초기배양시 자라나는 세포중 혈관 내피세포가 섞여 자랄지도 모른다는 추측을 하였으나 필요한 시약을 구하지 못하여 증명해 보지 못했다. 앞으로는 섬유아세포 성장억제 물질과 혈관내피세포 성장촉진인자를 배지에 첨가하여 첨가하여 혈관내피세포의 성장유무를 관찰해 볼 예정이다. 심장판막과 대혈관벽의 경우 혈관벽은 vasa vasorum을 통해 영양을 공급받지만 심장판막은 직접혈류와 접촉하는 면으로부터만 영양을 공급받고 있으므로 실제 동결과정중에서도 생체내와 거의 유사한 영양상태를 유지할 수 있다고 생각되고 혈관벽보다 훨씬 우수한 성적으로 생육성이 유지될 수 있다고 기대된다.

실제로 혈관벽의 경우도 혈관벽이 얇은 폐동맥벽이 두꺼운 대동맥벽보다 석회화가 없이 훨씬 보존상태가 좋은 것을 관찰할 수 있다. 주의할 점은 동결보존처리 과정도중 조직이 찌그러지거나 배지와 접촉면이 없는 곳이 없도록 유의하여야 한다. 동결 실내에서 얼면서 혈관조직의 모양이 찌그러지는 경우가 있어 보관용기를 주의하여 선택하여야 한다.

다음은 판막의 변성과 석회화에 대하여 살펴보자.

Ross는(1987) 이런 판막들은 약 7년후면 임상적으로 변성(deterioration)을 나타내기 시작한다고 보고하였으나, 정확한 빈도는 보고되지 않았다. 그러나, 변성의 속도가 대단히 느려서 판막과 관련된 사망률은 매우 드물다.

이와같이 환자의 생존은 판막의 생존보다 훨씬 좋으며, Ross는 소아에서 동족이식후의 생존율이 이종이식때보다 훨씬 좋다는 것을 알게 되었다. 판막의 이종이식은 화학적으로 고정된 돼지판막을 사용하는데, 이런 판막들은 칼슘침착으로 급히 변성을 가져온다고 보고되어있다. 이런 칼슘의 침착은 판막엽의 움직임의 기능 손상을 가져온다. 그러나, 동족이식에서는 약간의 석회침착이 있을 수 있으나 판막엽기능을 방해하지

는 않는다.

따라서 이런 칼슘침착의 차이때문에 동종이식이 소아에서 보다 흔히 사용된다. 이 동종이식은 인조판막 보다는 몇가지 큰장점을 가지고 있다. 이런 장점들로 는, 혈전증, 항응고제의 사용에 따른 출혈, 인조판막 의 사용에 따른 용혈등의 혈액에서의 변화, 임신의 급기로부터 해방, 또 급사의 위험이 없다는 점등을 들 수 있겠다.

VI. 결 론

1. 본 연구에서 사용된 모든 동종판막이식 protocol 은 안전하게 시행될 수 있다.
2. 본 연구의 protocol에 따라 cryopreservation된 동종판막은 조직배양결과 fibroblast의 세포 생육성(cell viability)이 증명되었다.
3. 장기생존한 면양에서 채취한 동종이식은 혈관에는 상당한 석회화가 나타나나 판막자체에는 비교적 경한정도의 석회화만이 나타난다.

REFERENCES

1. Bailey et al. : *Late Results with Synthetic Valved External Conduits from venous Ventricle to pulmonary Arteries. Supp. 2 Cirulation* 56:3. 1977.
2. Balch CM & Karp RB : *Blood group compatibility and aortic valve allotransplantation in man. J Thorac Cardiovasc Surg*, 91:807, 1986.
3. Balderman, S. C. et al : *Preparation of venous allografts. Ann. Surg.* 200:117-130, 1984.
4. Bank HL et al : *Basic principle of cryobiology J. Cardiac Surg. 2, (Suppl) : 137-143, 1987.*
5. Barratt-Boyes BCT et al : *A long-term follow-up of an initial series of 101 patient Circulation* 40:763-775, 1969.
6. Barrett-Boyes BG, et al : *Six year review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilized homograft valve*
7. Barrett-Boyes BG, et al : *Aortic homograft valve replacement A long term follow up of an initial series of 101 patients. Circulation XL:763, 1969.*
8. Blakstone EH et al : *Death and other time related events after valve replacement Circulation,* 72:753, 1985.
9. Fontran, F et al : *Aortic Valve homografts in the sugical treatment of complex cardiac malformations. J. Thorac Cardiovasc Surg* 87:649-657, 1984.
10. Grahon LM et al : *Immediate seeding of enzymatically derived endothelium in Dacron vascular grafts. Early experimental studies with autologous canine cells, Arch. Surg.* 115:1289-1294, 1980.
11. Kamp AW et al : *Preservation of aortic heart valves with maintenance of cell viability. J. Surg. Res* 30:47-56, 1981.
12. Kirklin JK et al : *Homograft Replacement of the Aortic Valve Cardiology Clinics* 3:3, 1985.
13. Lokey E et al : *A method of sterilizing and preserving fresh allograft heart valves, Thorax* 27:398. 1972.
14. Locky E : *A method of sterilizing and preserving fresh allograft heart valves. Thorax* 27:398, 1972.
15. Mermet B et al : *Viable heart graft. Preservation in the frozen state. Surg. Forum* 21:156-157, 1970.
16. Mochtar B et al : *Cell survival in canine aortic heart valves stored in nutrient medium Cardiovasc. Res* 18:4497-501, 1984.
17. O'Brien MF et al : *The viable cryopreserved allograft aortic valve. J. Cardiac Surg. 2(Suppl) : 153-167, 1987.*
18. O'Brien MF, et al : *A Comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. J Thorac Cardiovasc Surg*, 94:812-833, 1987.
19. Ross, D : *Application of Homografts in clinical surgery J. Cardiac Surg. 2(Suppl) : 175-182, 1987.*
20. Sachs SM et al : *Endothelial integrity after venous cryo preservation J. Surg. Res.* 32:218-227, 1982.
21. Saravalli O : *Calcification of aortic homografts used for reconstruction if the right ventricular outflow tract. J. Thorac Cardiovasc Surg* 80:909-920, 1980.
22. Shabbo FD et al : *Right Ventricular outflow Reconstruction with Aortic Homograft Conduit. Thorac Cardiovasc Surgeon* 28:21-25, 1980.

23. Somerville J & D. Ross : *Homograft replacement of aortic root with reimplantation of coronary arteries Br. Heart J.* 47:473-82 1982.
24. Watkins MT et al : *Adult human saphenous vein endothelial cells : Assessment of their reproductive capacity for use in endothelial seeding of vascular prosthesis. J. Surg. Res.* 36:588-596, 1984.
25. Yacoub M : *Sterilization of valve homografts by antibiotic solution. Circulation, XLL(Suppl),* 1970.
26. 송명근 : 대동맥 동종이식. *세종의학*, 4:44, 1987.
27. 송명근외 5인 : 대혈관 및 판막의 동종이식치험 3예 보고. *세종의학*, 5:219, 1988.
28. 홍주남 : 결정성 경화증에서 볼 수 있는 비상피성 세포의 형태학적 관찰. 지방공사 인천병원 논문집. 3:35, 1988.