

## 냉동 시 잠재용융열에 의한 피해를 최소화할 수 있는 이상냉동 곡선

박한기\* · 박영환\* · 윤웅섭\*\* · 김택수\*\* · 윤치순\*\*\* · 김시호\*\*\*\*  
 임상현\* · 김종훈\* · 광영태\* · 한동욱\* · 박종철\* · 조범구\*

### Ideal Freezing Curve Can Avoid the Damage by Latent Heat of Fusion During Freezing

Han-Ki Park\*, Young-Hwan Park\*, Woong-Sub Yoon\*\*, Taek-Soo Kim\*\*, Chee-Soon Yoon\*\*\*,  
 Shi-Ho Kim\*\*\*\*, Sang-Hyun Lim\*, Jong-Hoon Kim\*, Yong-Tae Kwak\*,  
 Dong-Wook Han\*, Jong-Chul Park\*, Bum-Koo Cho\*

**Background:** Liquid nitrogen freezing techniques have already met with widespread success in biology and medicine as a means of long-term storage for cells and tissues. The use of cryoprotectants such as glycerol and dimethylsulphoxide to prevent ice crystal formation, with carefully controlled rates of freezing and thawing, allows both structure and viability to be retained almost indefinitely. Cryopreservation of various tissues has various controlled rates of freezing. **Material and Method:** To find the optimal freezing curve and the chamber temperature, we approached the thermodynamic calculation of tissues in two ways. One is the direct calculation method. We should know the thermophysical characteristics of all components, latent heat of fusion, area, density and volume, etc. This kind of calculation is so sophisticated and some variables may not be determined. The other is the indirect calculation method. We performed the tissue freezing with already used freezing curve and we observed the actual freezing curve of that tissue. And we modified the freezing curve with several steps of calculation, polynomial regression analysis, time constant calculation, thermal response calculation and inverse calculation of chamber temperature. **Result:** We applied that freezing program on mesenchymal stem cell, chondrocyte, and osteoblast. The tissue temperature decreased according to the ideal freezing curve without temperature rising. We did not find any differences in survival. The reason is postulated to be that freezing material is too small and contains cellular components. We expect the significant difference in cellular viability if the freezing curve is applied on a large scale of tissues. **Conclusion:** This program would be helpful in finding the chamber temperature for the ideal freezing curve easily.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:219-228)

**Key words:** 1. Cryopreservation  
 2. Transplantation, homologous

\*연세대학교 의과대학 심장혈관센터연구소, 흉부외과학교실  
 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Yonsei Cardiovascular Research Institute, Cardiovascular Hospital, Yonsei University College of Medicine

\*\*연세대학교 공과대학 추진연소연구실  
 Yonsei Propulsion-Combustion Laboratory, Yonsei University College of Mechanical Engineering, Seoul

\*\*\*건양대학교 의과대학 흉부외과학교실  
 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Konyang University College of Medicine, Daejun

\*\*\*\*동아대학교 의과대학 흉부외과학교실  
 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Donga University College of Medicine, Busan, Korea

†이 연구는 1998년도 보건복지부의 선도기술의학공학기술연구개발사업(HMP-98-G-2-052)의 지원에 의한 결과임.

논문접수일 : 2002년 12월 13일, 심사통과일 : 2003년 1월 15일

책임저자 : 박영환 (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 심장혈관센터 흉부외과  
 (Tel) 02-361-7283, (Fax) 02-313-2992, E-mail: yhpark@yumc.yonsei.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

심장판막질환에서 판막이 파손되어 재생이 불가능할 때 가장 최선의 선택은 인간의 판막이다. 인간의 판막은 뇌사자나 사망한 직후 적출할 수 있지만 보관방법이 문제가 되었다. 화학약품을 처리하거나 방사선을 쬐거나 냉장하는 방법 등이 있었으나, 모두 보관기간에 한계가 있어 냉동하게 되었다. 냉동은 영하 80도가 되어도 냉장고 문을 열고 닫는 것만으로도 얼음결정이 작아지고 커지고를 반복하여 세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다. Angel 등은 1980년대부터 초저온냉동의 방법으로 보존 후 해동하여 사용하였다<sup>1)</sup>. O'Brien 등이 초저온냉동 후 이식한 판막을 검토하여 냉장보관보다 우수하다는 보고가 있는 후 널리 사용하게 되었다<sup>2,3)</sup>.

하지만 초저온 냉동이라도 냉동되는 시점에서 잠재용융열이 생겨 얼음결정이 생겼다 녹았다 하기 때문에 이것으로도 세포파괴가 일어난다<sup>4)</sup>. 또한 냉동속도도 세포손상에 미치는 영향이 크다<sup>5)</sup>. 세포손상을 최소화하기 위해 초저온냉동은 액체질소를 이용하여 컴퓨터조절방법을 쓴다. 인간의 대체장기들이 속속 더 많이 개발되고 있어 기존의 심장판막의 냉동곡선으로는 혈관이나 다른 장기의 냉동의 최적화가 불가능하게 되었다. 더욱이 각 장기종류마다 최적의 냉동곡선을 찾는 것은 매우 힘든 일이다. 따라서 컴퓨터계산방식을 이용하여 열역학적 방법으로 냉동하고자 하는 조직의 이상적인 냉동곡선을 찾아내고자 하였다.

## 대상 및 방법

컴퓨터 프로그래밍을 위해서는 냉동순간의 잠재용융열에 대한 이해가 필요하다.

### 1) 냉동과정

물질의 냉동 과정에서 일어나는 물리화학적 현상을 Fig. 1에서 보여 주고 있다. 순수한 물(pure water (ABCDE))과 수용액(aqueous solution (A'B'C'D'E'))의 경우 시간에 대한 온도의 변화를 보여주고 있다. 결정화(process of crystallization)가 일어나기 전에 빙점 이하로 온도가 떨어지는 현상을 볼 수 있다. 이것을 과냉각이라고 하는데 과냉각(Supercooling)현상은 불평형(non-equilibrium)의 준안정상태로 핵화과정(nucleation process)에서 활성화 에너지에 비유될 수 있다. 순수한 물의 경우 결정화가 되기 전에 몇 도 정도의 과냉각이 일어난다. 물이 냉각될 때 얼음결정이

생성되기 위해서는 핵으로 기포, 먼지, 혹은 거친 표면이 있어야 한다. 만약 이와 같은 것들이 없다면 물 자체에서 얼음결정이 생성될 때까지 어는점 이하로 과냉각되게 된다. 일단 얼음결정이 생성된 후에는 급격하게 결빙이 일어난다.

이러한 현상은 3.6 cc ampule의 냉각 곡선에서 발견되었으나 실제 냉동용액(freezing solution)을 사용한 냉각 곡선에서는 발견되지 않았다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 수용액의 경우에는 결정화가 시작되는 점(B')이 순수한 물의 경우(B)보다 온도가 높는데, 이것은 용액에 포함된 용질이 핵화과정을 유발시키기 때문이다. 냉동용액을 사용하여 냉각시킬 경우에는 수용액과 유사한 경향을 나타낼 것이며, 용액의 농도가 클 경우에는 과냉각 현상이 나타나지 않기 때문에, 실제 냉동용액을 사용하여 냉각시킬 경우에는 과냉각 현상이 나타나지 않을 것으로 생각한다.

수용액의 냉각과정에는 라울의 법칙(Raoult's Law)에 근거한 증기압 내림 현상 때문에 어는점의 내림이 일어난다. 위의 그림에서 초기 어는점이 순수한 물의 경우 보다 수용액의 경우에 더 낮아진 것을 볼 수 있다.

용액의 어는점 내림 현상은 용질의 종류에는 무관하고 용질의 양에 의해서만 결정된다. 이것을 용액의 총괄성이라고 한다.

$$\text{용액의 어는점 내림: } \Delta T_f = K_f \cdot m$$

$K_f$ : 어는점 내림 상수(water:  $1.86 \text{ K/mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

$m$ : 몰랄농도(molality), 용매 1 kg당 용질의 몰수

이와 같이 용액은 순수용매와는 달리 어는점이 내려가게 되고(증기압의 감소) 어는 과정 동안에도 온도의 변화가 생긴다. 용액 중의 용매의 양이 줄어들어 따라서 몰랄농도가 증가하게 되고 이에 따라 용액의 어는점도 지속적으로 내려가게 된다.

이상과 같은 계산은 용질의 정확한 질량과 분자량을 알고 있어야 가능한 계산이다. 그러나 본 냉동곡선 계산에 사용되는 냉동용액에 대해서는 그러한 양들을 알 수 없고 용질의 종류가 한 가지가 아니기 때문에 직접적인 계산은 불가능하다. 그래서 계산 프로그램에서는 실험데이터로부터 초기의 어는점 내림값을 알아내어(냉각곡선의 기울기 변화점) 용액의 몰랄농도를 역산하는 방식을 취하였다. 그리고 계로부터 방출되는 열유량에 따라서 용액의 농도가 증가한다고 간단하게 가정하고 상변화구간에서의 온도 변화를 계산하였다.

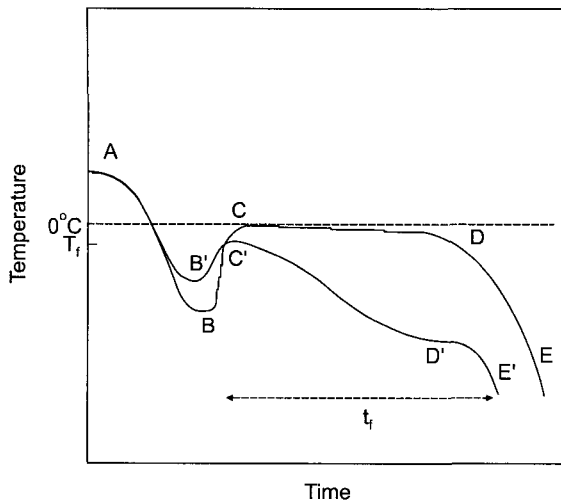


Fig. 1. Freezing Curve of pure water (ABCDE) and aqueous solution (A'B'C'D'E'). Before the process of crystallization, temperature drops below the freezing temperature (B, B'). Once crystallization initiates (C, C'), the system rapidly progresses to freezing process (CD, C'D'). Freezing time ( $t_f$ ) is the time interval during which the system starts crystallization process and releases the latent heat of the system.

Fig. 1에서 냉동시간(freezing time ( $t_f$ ))은 결정화가 시작 되는 점(C)부터 잠열(latent heat)을 완전히 방출한 점(D)까지의 시간인데, 냉각 곡선의 산출에서 모델링하기가 가장 어려운 구간이며 계산의 정확도가 비교적 떨어지는 구간이다. 이러한 시간구간을 정확하게 전산모사하기 위해서는 냉동용액의 조성파 열물성치, 그리고 냉동되는 조직의 열물성치를 정확히 알고 있어야 하며, 매우 복잡한 계산이 요구된다.

일단 결정화가 완료된 후에는 고체상태에서 열을 방출하면서 냉각이 된다.

수용액의 냉각과정에서는 냉동집중과정(freeze-concentration process)이 C'D'구간에서 일어난다. 이러한 과정은 수용액의 냉각온도를 지속적으로 떨어뜨리게 되는데, 냉각되지 않은 상(phase)의 점성(viscosity)을 증가시키고, 이로 인해 계의 확산 물성치를 감소시키고 결정화를 지연시키게 된다. 그리고 D'점에서 용질의 일부가 과포화상태가 되어 그것의 결정화 잠열(latent heat of crystallization)을 방출하게 되고 D'에서 E'구간에서 약간의 온도 증가를 유발한다. 이러한 점들을 공융점(Eutectic point)이라고 한다. 이와 같이 용매와 용질의 결정화가 동시에 일어날 수 있기 때문에 수용액의 냉동시간을 결정하는데 어려움이 따르게 된다. 그러나 계산의 편의를 위해 초기 어느점에서

어떤 정해진 온도 이하로 온도가 떨어지게 되면 결정화 과정이 끝난 것으로 간주하게 하였다.

## 2) 열역학적 모델링

집중열용량법(Lumped thermal capacity model)을 사용하여 다음과 같이 가정하였다.

(1) 계의 온도가 열전달 과정 중 어느 순간에 공간적으로 균일하다.

(2) 계의 온도 구배는 무시할 수 있다. 이를 위해서는 열전달에 대한 내부저항이 외부저항보다 작아야 한다. 즉, 계 내부에서는 열전달이 매우 잘 일어나야 한다.

(3) 계 내부의 열전달 과정에는 관심을 두지 않고 계와 주위기체 사이의 상호 작용에만 관심을 둔다.

Biot number를 정의하면

$$Bi = \frac{\text{Internal conduction resistance}}{\text{External convection resistance}} = \frac{\bar{h}_c L}{k_s}$$

여기서,  $\bar{h}_c$ 는 average convective heat transfer coefficient,  $L$ 은 특성길이,  $k_s$ 는 계의 thermal conductivity.

이 때  $Bi < 0.1$ 이면 계의 중심 온도와 표면 온도의 차이가 5% 이하이고 계가 균일한 온도를 가진다고 가정해도 무방하다.

※ average convective heat transfer coefficient (averaged over surf.)

Free convection, air : 3~25  $W/m^2K$

Forced convection, air : 15~100  $W/m^2K$

※ thermal conductivity (average value)

ice : 2.22  $W/m \cdot K$ , water : 0.6  $W/m \cdot K$

물을 대상으로 하였을 때, 부피가 커지게 되면 계 내부의 온도구배를 무시할 수 없을 것으로 생각한다. 그러나 계의 온도 구배를 고려하여 계산을 하려면 FEM (Finite Element Method)와 같은 기법을 이용해야 하며 1차원적인 계산은 불가능하게 된다. 따라서 본 냉각곡선의 산출에서는 평균온도를 취하여 열응답 계산을 수행하는 것이 효율적이라고 생각한다. 실제로 식품의 냉동저장에 관련된 계산에서도 평균온도를 취하여 계산하고 있다.

이번 직접계산에서는 냉동과정을 3부분으로 나누어 계산하였다(직접 계산).

(1) Cooling (above freezing)

(2) Freezing (phase change, freezing time)

(3) Cooling (below freezing)

프로그램에서는 전체의 시간범위(100분)를 1초씩 6000 등분하여 각각의 구간에서 열응답을 계산하였다.

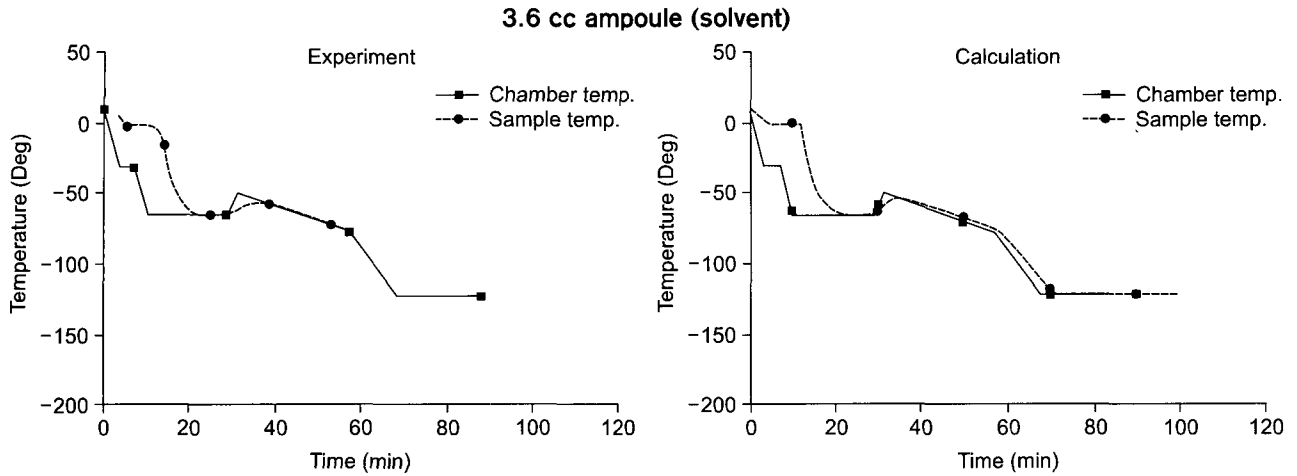


Fig. 2. Result of direct calculation for 3.6 cc ampoule. Left graph shows actual experiment data and right graph is calculated.

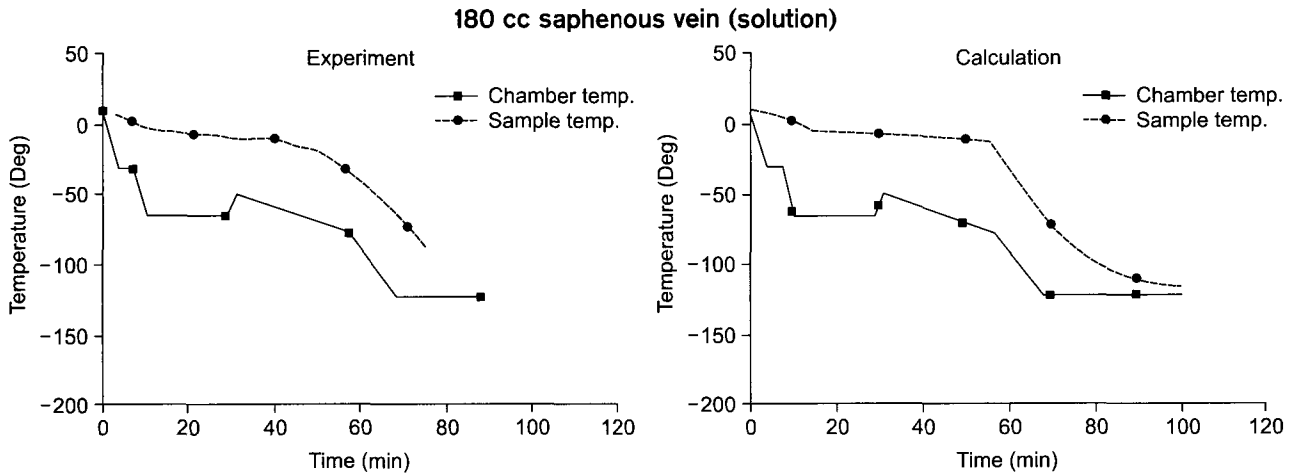


Fig. 3. Result of direct calculation for 180 cc saphenous vein. Left graph shows actual experiment data and right graph is calculated.

Cooling process 중에는 집중열용량법으로 계산을 하고 freezing process에서는 pure solvent의 경우에는 계의 온도가 용융열(heat of fusion)을 방출하는 동안 어느점으로 일정하고 용융열을 모두 방출하면 freezing process가 끝난 것으로 간주하였다. 이 때 방출되는 용융열은 각각의 time step에서 열유량을 계산하여 합하는 방식을 취하였다. 그러나 solution의 경우에는 용액의 총괄성을 적용하여 어느 점 내림을 계산하였다.

### 3) 이론적 공식화

Cooling Process  
energy equation :

$$\frac{dU}{dt} = \dot{Q} + \dot{Q}_v$$

여기서  $U$ : internal energy,  $\dot{Q}$ : heat transfer,  $\dot{Q}_v$ : heat generation

본 계산에서  $\dot{Q}_v$ 는 무시하였다(생체를 냉동시킬 경우에 heat of respiration을 방출하게 되고 이것은 냉동 부하로 작용하게 되지만 그 양이 극히 미비하고 이번 계산에서는 해당 사항이 없을 것으로 생각한다).

for fixed mass ( $\rho V$ )

$$dU = \rho V du, \quad du = C dT$$

$$\rho V C \frac{dT}{dt} = \dot{Q}$$

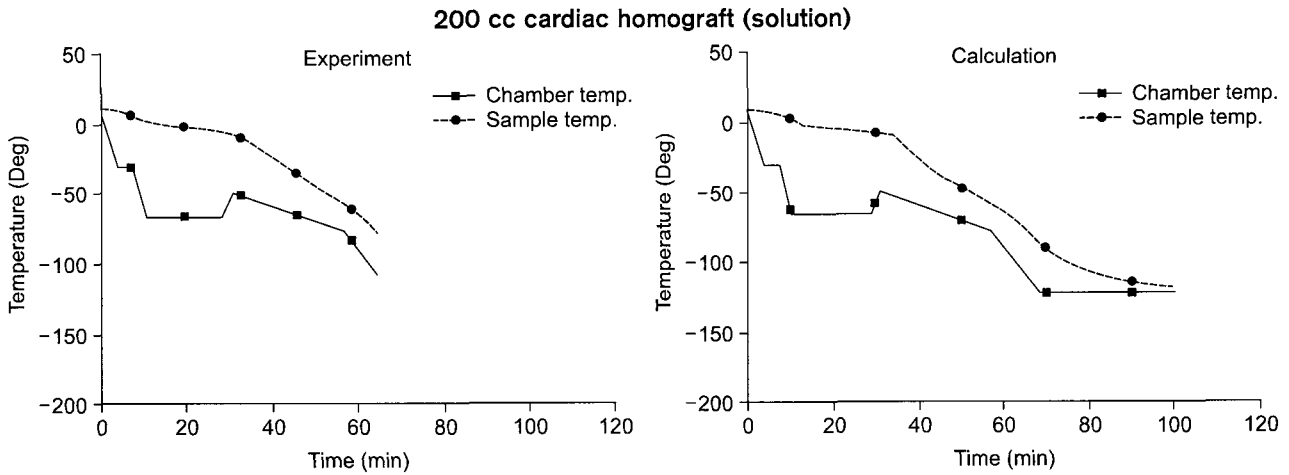


Fig. 4. Result of direct calculation for 200 cc cardiac homograft. Left graph shows actual experiment data and right graph is calculated.

$$\rho VC \frac{dT}{dt} = -\bar{h}_c A (T - T_e)$$

where,  $T_e$  : environment temperature.

열반응의 해석

(1) chamber는 충분히 크다.

(2)  $\bar{h}_c A / \rho VC$ 는 열과 관계없는 상수이다는 가정으로

$$\frac{T - T_e}{T_0 - T_e} = e^{-(\bar{h}_c / \rho VC)t} = e^{-t/t_c}$$

$t_c = \rho VC / \bar{h}_c A$  [sec] : time constant를 구한다.

#### 4) 직접계산

조직의 이상냉동곡선 계산 시에 조직과 냉동용액의 물리화학적 물성치들을 계산에 직접 적용하고, Cooling-Freezing-Cooling의 3단계로 열응답 특성을 계산한다. 계산에서 사용되는 물성치들은 밀도, 열용량, 융해열 등이 있다. 그리고 냉각되는 시스템의 부피와 질량, 표면적이 계산에 입력조건으로 들어간다.

#### 5) 간접계산

어떤 조직의 실험적인 냉동곡선으로부터 열응답 모델 관계식에서 열응답 특성을 결정하는 시간상수값들을 냉동되는 시스템의 온도에 따라 재배열을 하여 Chamber의 온도나 Sample의 온도조건이 바뀔 경우의 온도 응답 곡선을 계산하게 된다.

앞에서 기술한 이론적 근거를 바탕으로 냉동곡선을 구하는 프로그램을 개발하였다. 개발된 프로그램을 사용하여 증엽줄기세포, 연골세포, 골아세포를 기존의 냉동곡선

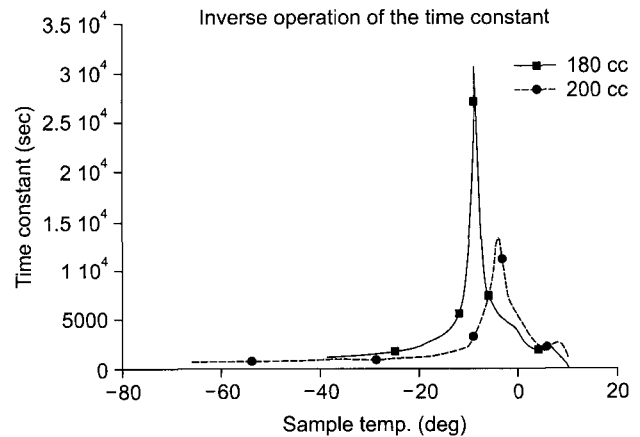
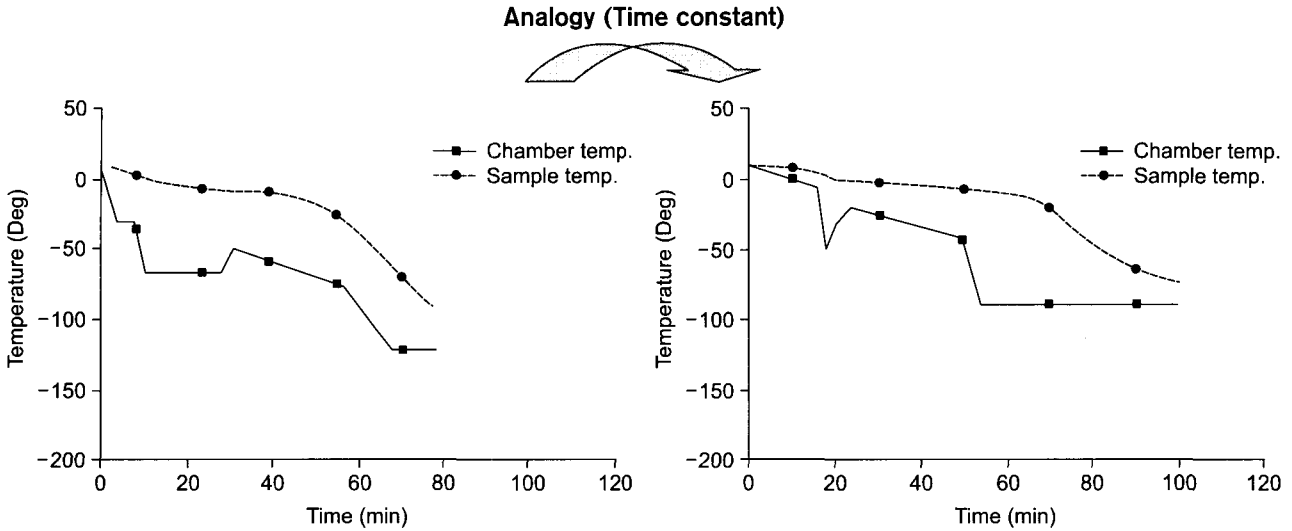


Fig. 5. Inverse operation of the time constant by indirect calculation method. This graph shows that the time constants from experimental data are different according to the size (volume) and the thermal properties of the tissues.

과 새로운 이상적인 냉동곡선으로 냉동시켜 생존율의 차이를 검토하였다.

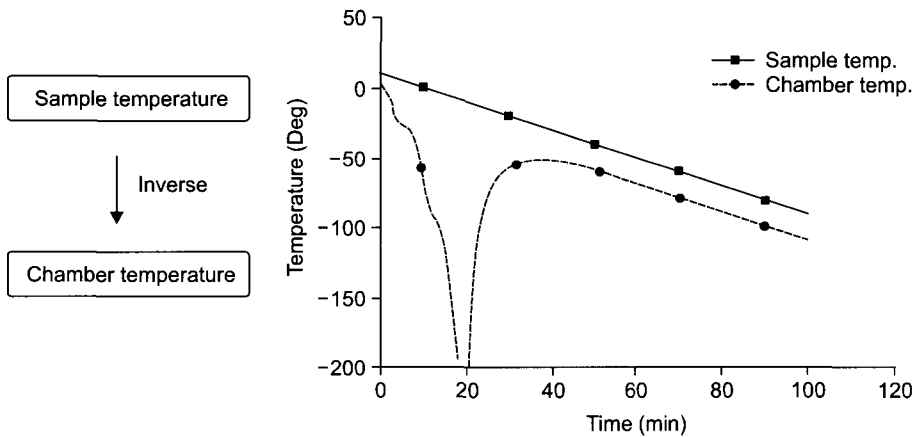
### 결 과

직접계산법으로 3.6 cc ampoule, 180 cc saphenous vein, 200 c cardiac valve homograft를 계산하였다(Fig. 2~4). 계산과 실체가 비슷하긴 하여도 자세히 보면 여러 군데가 다른 모습인 것을 알 수 있다. 이것은 우리가 너무 많은 가정을 하고 정확한 열역학계의 계산이 불가능하기 때문인 것으로 보인다.



**Fig. 6.** Example graph for showing analogy by time constant. Temperature change in the chamber with this time constant makes the temperature change of the sample tissue. So two graphes are same depending on time constant. In the left graph, the freezing curve is the cardiac homograft freezing curve. If the chamber temperature profile is changed like right graph, the sample temperature will follow as red line.

**Inverse calculation of the chamber temperature**



**Fig. 7.** Inverse calculation of the chamber temperature. For the linear temperature response of the sample tissue, the rate of change of the chamber temperature should be infinitely large.

간접계산법으로 180 cc saphenous vein과, 200 c cardiac valve homograft를 이용하여 시간상수(Time constant)를 구하였다. 이것은 각 온도에 도달하는 시간을 보는 것으로 180 cc와 200 cc가 서로 다른 것을 알 수 있다(Fig. 5). 시간 상수를 기반으로 하여 Chamber의 온도의 변화에 따른 Sample의 온도가 어떻게 따라서 변할 것인지 계산할 수 있다(Fig. 6). 쉽게 Sample 온도가 일직선상으로 변하기를 바라면서 Chamber 온도를 설정하려면 냉동되는 순간 거의 무한대의 열을 빼앗아야만 가능하다는 것을 알 수 있다(Fig. 7). 이것은 자연에서는 불가능하기 때문에 Sample

온도가 올라가지 않는 범위 내에서 Chamber 온도를 변화시키는 방법을 사용하게 되고 Fig. 8에서처럼 원하는 Sample 온도에 따라 적절한 Chamber 온도가 구해지게 되는 것이다. 이것을 컴퓨터 프로그래밍하여 곡선이 꺾이는 곳(Chamber 온도든 Sample 온도이든)을 여러 군데로 나누어 곡선을 수식화할 수 있다. 이 수식을 바탕으로 위에서 언급한 과정을 거쳐 새로운 이상적인 냉동곡선을 찾을 수 있게 된 것이다. Fig. 9는 saphenous vein의 냉동곡선을 찾은 것을 보여주고 있다.

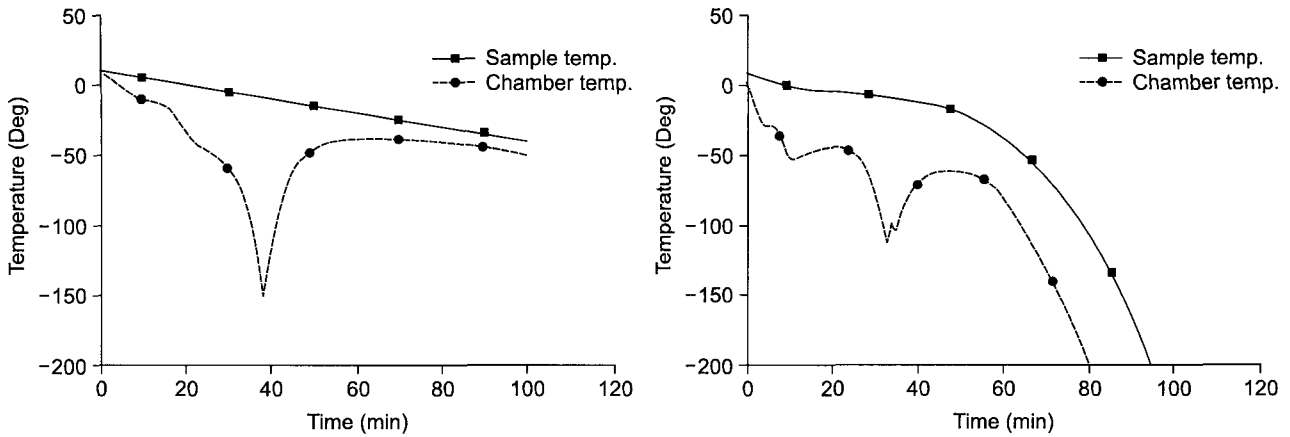


Fig. 8. End results of freezing curve. The right chamber temperature profile will prevent the latent heat damage and to reduce the fluctuation of the crystal size with the temperature variation.

위의 방법을 이용하여 조직공학적으로 생성된 bone chip 을 대상으로 새로운 이상적인 냉동곡선을 찾아 각각을 냉 동하였다. Fig. 10에서는 4가지의 bone chip을

- (1) PLGA 75:25 with hMCS (PLGA 75:25 scaffolds cultured with human mesenchymal stem cell)
- (2) hBone Chip with OBC(human bone chips cultured with osteoblastic cell derived from mesenchymal stem cell)
- (3) PLGA with Rb Chondrocyte (PLGA scaffolds cultured with rabbit chondrocyte)
- (4) Cap\_AtCol+PLLA with RCO (Carbonate apatite-atelocollagen+PLLA composites cultured with rat calvarial osteoblast)

로 만들었고 이들을 각각 냉동하지 않은 대조군, 단순냉동시킨 군과 이상적 냉동곡선에 의한 냉동군으로 나누어 실험하였다. 각각의 새로운 이상적 냉동곡선은 다음과 같았다(Fig. 10). 계산된 chamber의 온도곡선을 유지 함으로써 sample의 온도는 결정화 잠열에 의한 온도 상승 없이 이상적인 냉동곡선을 따라 감소하였다. 이상적인 냉 동곡선을 이용해 냉동한 경우 통계학적인 차이는 없었으나 대체로 단순냉동 시보다 좋은 세포생존율을 보였다 (Fig. 11).

## 고 찰

심장판막의 이상적인 냉동방법은 이미 초저온냉동법으로 잘 알려져 있다<sup>1)</sup>. 판막의 내구성을 높이기 위해서는 세포외기질의 섬유아세포(fibroblast)의 생존이 중요하다<sup>2,3)</sup>. 세포의 생존율을 높이 유지하기 위해서는 냉동뿐 아니라

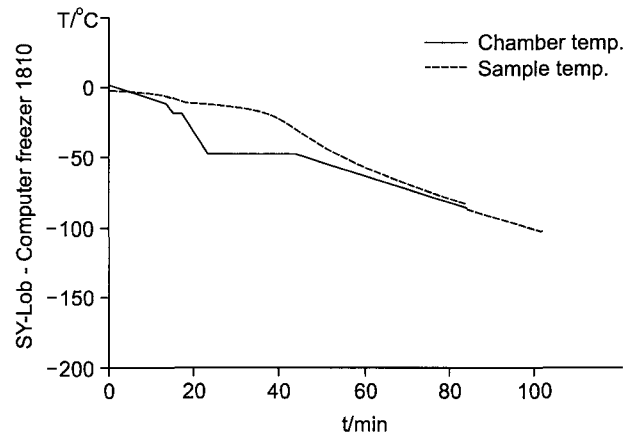
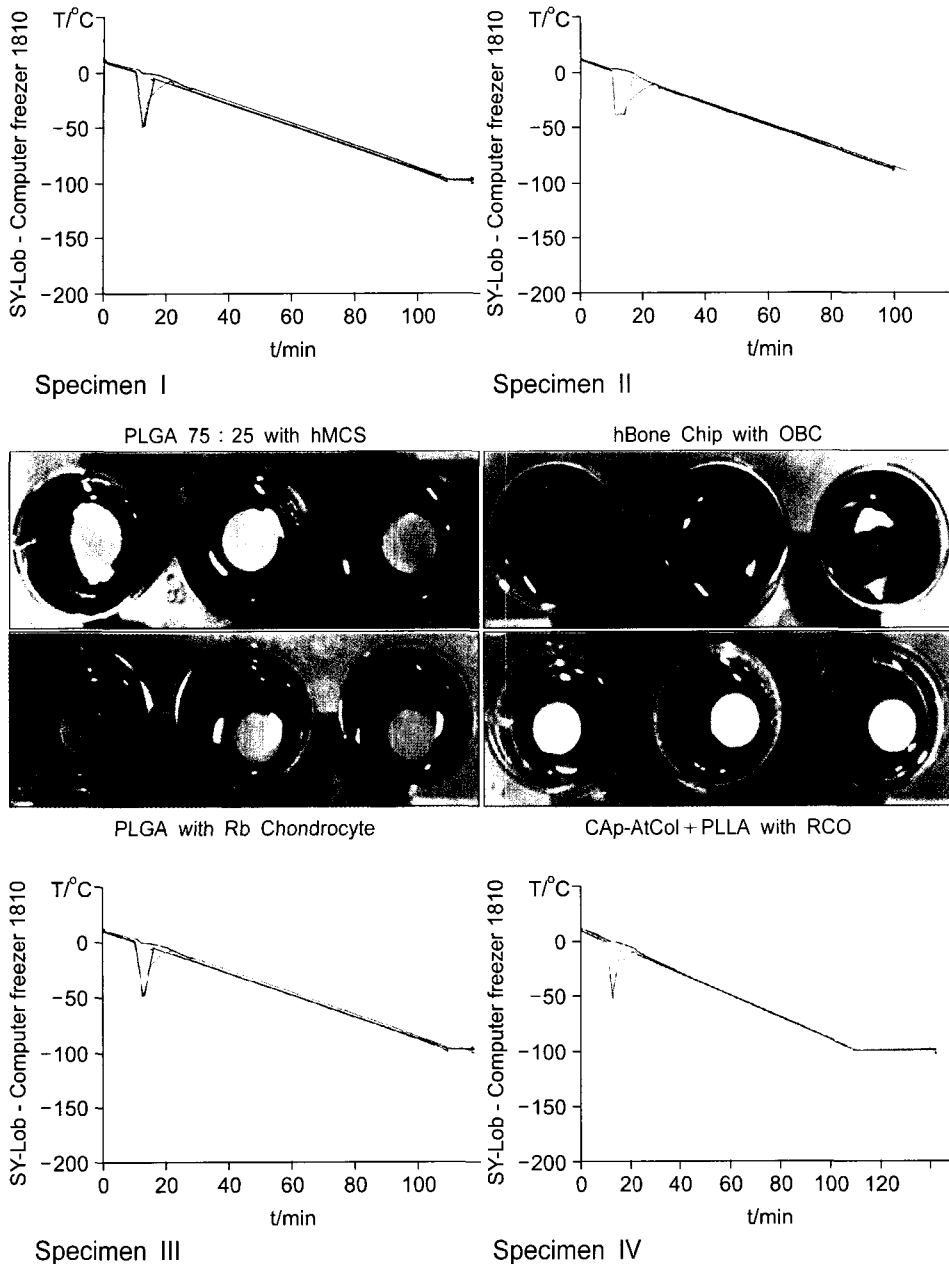


Fig. 9. After freezing of saphenous vein with cardiac homograft freezing curve, the program found new ideal freezing curve and this graph shows actual chamber and sample temperature curve by new program. (black line is the chamber temperature and blue line is the sample temperature.)

조직의 적출, 조작, 냉동, 보존, 해동 등 각 과정마다 최적의 상태를 유지해야 한다. 적출 후 온허혈 시간(warm ischemic time)을 줄여야 우선적으로 세포가 생존할 수 있고 조작 시 얼음 위에서 시행하거나 항생제 처리 시 온도와 시간도 생존율의 차이를 갖고 올 수 있는 중요한 요인이다. 해동방법은 액체질소에서 꺼내어 상온에 두었다가 신속하게 온수에 녹이는 방법이 좋은 것으로 알려져 있다. 이상과 같이 여러 조작에 생존율이 좌우되므로 조직은행은 각 조작에 있어 철저한 관리가 필수적이라 하겠다.



**Fig. 10.** New ideal freezing curve according to various tissue engineering product. Specimen I: PLGA 75:25 with hMCS (PLGA 75:25 scaffolds cultured with human mesenchymal stem cell), Specimen II: hBone Chip with OBC (human bone chips cultured with osteoblastic cell derived from MSC), Specimen III: PLGA with Rb Chondrocyte (PLGA scaffolds cultured with rabbit chondrocyte), Specimen IV: Cap-AtCol+PLLA with RCO (Carbonate apatite-atelocollagen +PLLA composites cultured with rat calvarial osteoblast).

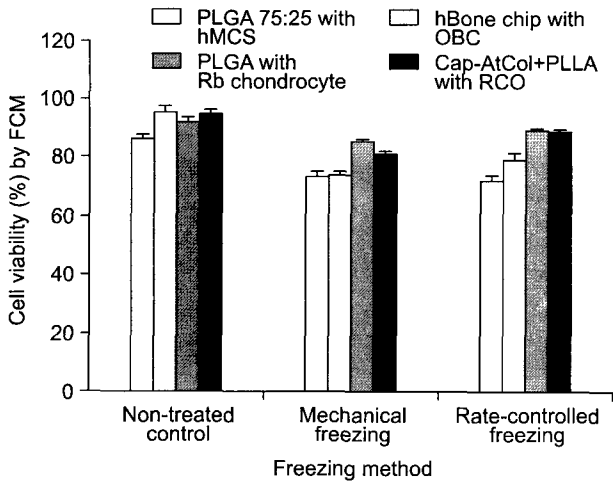
냉동하는 이유는 오랜 기간 보존 후에도 세포의 생존율을 높이기 위한 것이다. 냉동 시 세포의 대사가 급격히 감소하기 때문에 새롭게 에너지를 공급하지 않아도 유지된다. 그러나  $-15^{\circ}\text{C}$ 에서  $-60^{\circ}\text{C}$  사이에서는 냉동된 상태이지만 냉동과 해동이 내부에서 일어날 수 있다.  $-130^{\circ}\text{C}$  이하가 되면 액체상태의 물이 존재하지 않는 유리형태가 된다. 점도는 엄청나게 높아 움직이지 않게 되는 상태이다.  $-196^{\circ}\text{C}$  이하에서는 화학적 작용조차 멈추어 이론적으로는 3,000년이 반감기로 알려져 있다. 따라서 심장판막

등 이식조직의 냉동은  $-130^{\circ}\text{C}$ 가 넘는 액체질소 속에 저장하는 것이 유리하다.

현재 심장판막의 이상적인 냉동곡선은 많이 알려져 있고 대부분 병원에서 보편적으로 사용하고 있다. 최근 판막 이외의 조직에 대한 냉동보존이 시도되고 조직 공학적 산물에 대한 보존도 중요한 이슈로 떠오르고 있어 각 조직의 가장 이상적인 냉동곡선을 어떻게 하면 찾을 수 있을까 생각하여 연구를 진행하였다.

초창기 냉동은 인간의 난자, 정자로 시작하여 골수세포





**Fig. 11.** Viability of cells according to freezing methods. Mechanical freezing means freezing in  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer. In rate-controlled freezing, each samples are frozen by each ideal freezing curves. PLGA 75:25 with hMCS: PLGA 75:25 scaffolds cultured with human mesenchymal stem cell, hBone Chip with OBC: human bone chips cultured with osteoblastic cell derived from mesenchymal stem cell, PLGA with Rb Chondrocyte: PLGA scaffolds cultured with rabbit chondrocyte Cap\_AtCol+PLLA with RCO: Carbonate apatite-atelocollagen+PLLA composites cultured with rat calvarial osteoblast

등으로 확대되었다. 세포레벨에서 Mazur 등은 세포의 보존을 위해 냉동하고 녹일 때 가장 중요한 문제는 세포 내 얼음의 생성이라고 하였다. 냉동이 너무 빠르면 세포 내 물이 충분히 빠지지 않아 과냉각(supercooling)이 되기 쉽고 너무 늦어도 세포 밖의 물이 얼면서 농도가 올라가 세포의 물이 빠져 나와 쪼그라들게 되어 역시 파괴된다. 냉동 보존제로 DMSO (DimethylSulfoxide) 1 M을 사용하고 분당  $1^{\circ}\text{C}$ 로 냉동하였을 때, 세포 내 얼음 결정이 생기지 않는다고 하였다<sup>6)</sup>. 냉동 보존제는 서서히 냉동할 때 세포 내의 물이 빠져 나와 탈수현상이 생기는 것을 막기 위해 사용하지만, 급속히 냉동할 때는 오히려 세포막의 파괴를 일으킨다. Takamatsu 등은 얼음 현미경(cryomicroscope)으로 관찰하여, 냉동속도가 빨라 얼음결정이 생기면서 주위 조직을 압박하여 손상 받는 현상이 냉동 보존제를 사용하였을 때 더 많이 손상받는다고 보고하였다. 특히  $-1.8^{\circ}\text{C}$  부근에서 이러한 현상이 많이 나타난다고 하였다<sup>7)</sup>.

세포의 경우가 이렇다면 조직의 경우는 더욱 복잡한 과정을 거칠 것으로 생각하고 세포의 기질의 작용 또한 무시할 수 없다. Brockbank 등은 심장판막의 초저온냉동에

서 세포간 얼음 생성이 세포의 기질을 파괴하고 이것은 나중에 석회화를 일으키는 원인일 것으로 생각하였다<sup>8)</sup>. 총내경동맥의 경우 Song 등은 적절한 DMSO의 농도가 15% 이하이고 냉동속도는  $0.69^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 이 혈관의 기능을 가장 잘 유지하였다고 보고하였다. 얼음이 생성되는 과정을 보면 핵화(nucleation)와 결정성장(crystal growth)를 통해 생성된다<sup>9)</sup>. 어느 정도 크기의 핵화가 일어나야 핵으로 작용하여 얼음이 생성되고 이후 성장하게 된다. 그러기 때문에 이를 막기 위해서는 핵화가 생기는 가능성인 sample의 크기가 작고, 용액의 점성도가 높고 냉동속도가 엄청난 하강을 그리면 결정화되지 않고 유리고체(glassy solid)의 형태를 갖는 vitrification의 과정으로 넘어가 얼음 결정의 피해를 최소화할 수 있다<sup>9)</sup>. 최근에는 얼음 결정이 없이 냉동시키는 방법인 Vitrification을 사용하여 조직의 구성을 잘 유지할 뿐 아니라 내피세포와 평활근세포의 생존율도 높일 수 있다고 하였다<sup>10)</sup>. 해동하는 온도도 혈관을 골절시킬 수 있다고 Pegg 등은 관찰하면서  $-100^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 해동시켜야 골절되지 않을 것으로 주장하였다<sup>11)</sup>.

이상과 같이 각 조직에 대한 적절한 냉동에 대해서는 실험에 의해 구할 수밖에 없는데, 여러 조직을 처리하는 조직은행에서는 대단위 실험을 계속하기 곤란한 경우가 많고, 요즘은 활발히 연구가 진행되는 조직공학(Tissue engineering)적 방법에 의한 산물은 냉동 시 성분이 다르기 때문에 역시 많은 실험만이 적절한 냉동곡선을 구할 수 있다. 따라서 간접방법이긴 하지만 컴퓨터에 의한 가상실험을 우선 해 봄으로써 쉽게 최적의 냉동곡선을 찾을 수 있었다.

## 결 론

이번 실험에서는 냉동하려는 조직의 크기가 작아 큰 차이를 보이지 않았으나 조직의 크기가 클 경우 차이가 있을 것으로 예상되었다. 이러한 방법은 반복적인 실험으로 인한 시간과 인력의 낭비를 줄일 수 있고, 컴퓨터에 의한 가상실험을 어느 조직에나 실행해 봄으로써 적절한 냉동곡선을 쉽게 찾을 수 있음을 보여 주었다.

## 참 고 문 헌

1. Angel JD, Christopher BS, Hawtrey O, et al. *Fresh, viable human heart valve bank: Sterilization sterility test and cryogenic preservation.* Transplant Proc 1976;8(suppl 1):139.

2. O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, et al. *The viable cryopreserved allograft aortic valve*. J Cardiac Surg 1987;2(suppl): 153-67.
3. O'Brien MF, Johnston N, Stafford G, et al. *A study of the cells in the explanted viable cryopreserved allograft valve*. J Cardiac Surg 1988;3(suppl):279-87
4. Farrant J. *General observations on cell preservation*. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J Eds. *Low temperature preservation in medicine and biology*, Pitman medical limited, Kent, England p 1-18, 1980.
5. Nei T, Araki T, Matsusaka T. *Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of Escherichia Coli*. In Nei T Ed. *Freezing and Drying of Microorganisms*. University of Tokyo press, Tokyo, Japan, 1969
6. Mazur P. *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. Am J Physiol 1984;247:C125-42.
7. Takamatsu H, Rubinsky B. *Viability of deformed cells*. Cryobiology 1999;39:243-51.
8. Brockbank KG, Lightfoot FG, Song YC, Taylor MJ. *Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: a possible cause of tissue deterioration and calcification in vivo*. J Heart Valve Dis 2000;9:200-6.
9. Song YC, Pegg DE, Hunt CJ. *Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: optimization of dimethyl sulfoxide concentration and cooling rate*. Cryobiology 1995;32:405-21.
10. Song YC, Hagen PO, Lightfoot FG, Taylor MJ, Smith AC, Brockbank KG. *In vivo evaluation of the effects of a new ice-free cryopreservation process on autologous vascular grafts*. J Invest Surg 2000;13:279-88.
11. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. *Fractures in cryopreserved elastic arteries*. Cryobiology 1997;34:183-92.

=국문 초록=

배경: 액체질소에 의한 냉동방법은 생물학과 의학에서 세포와 조직의 장기보존으로는 성공적인 방법이다. 잘 조절된 냉동속도와 해동의 방법과 함께 글라이세롤이나 디메틸설폭사이드 같은 냉동보존제의 사용으로 얼음결정이 생기는 것을 방지하여 구조의 유지와 생존율을 모두 향상시킬 수 있으며 반 영구적으로 보존할 수 있다. 여러 조직의 초저온냉동에는 조직에 맞는 냉동속도가 있다. 대상 및 방법: 가장 적합한 냉동곡선과 이를 위한 냉동챔버온도를 찾기 위해서 우리들은 조직의 열역학적 계산을 두 가지 방법으로 하였다. 하나는 직접계산방법으로 모든 냉동 대상물의 열물리학적 특성, 잠재용 열, 면적, 농도와 체적을 알아야 계산할 수 있다. 이러한 방법은 매우 복잡하고 어떠한 경우에는 실제 값을 알 수 없다. 다른 방법은 간접계산방법으로 우선 기존의 냉동곡선으로 조직을 냉동시켜 조직의 실제 냉동곡선을 얻은 다음 시간상수로 냉동곡선을 분석한 다음 온도반응을 계산하고 적합한 x차 방정식을 대입시켜 냉동 시 온도상승을 막고 이것을 거꾸로 냉동챔버온도를 산출하는 방식이다. 결과: 이 냉동 프로그램을 중배엽줄기세포, 연골세포와 골아세포에 적용시켜 검사하였다. 조직의 온도는 온도상승과정 없이 이상적인 냉동곡선을 따라 감소하였다. 그러나 세포의 양과 수용액의 양이 적어 냉동곡선간의 생존력이 통계학적으로 차이가 있지는 않았다. 만약 더욱 부피가 큰 조직을 냉동시키거나 프로그램을 순차적으로 계속한다면 이상곡선에 더욱 근접하게 되어 차이가 있을 것으로 판단된다. 결론: 이 프로그램은 이상적인 냉동곡선으로 조직을 냉동시키기 위한 냉동챔버온도를 쉽게 찾을 수 있도록 도움이 될 것이다.

중심 단어 : 1. 초저온냉동(cryopreservation)  
2. 동종이식(transplantation, homologous)