

개에서 동맥과 정맥 동종 이식편의 냉장, 냉동 보존 방법에 따른 개존율 및 생육성에 관한 연구

송 현* · 강신광** · 유양기* · 김용진***

Comparison of Patency and Viability in Fresh and Cryopreserved Arterial and Venous Allograft Conduits in Dogs

Hyun Song, M.D.*, Shin-Kwang Kang, M.D.**, Yang-Gi Ryu, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.***

Background: With increasing coronary bypass and peripheral vascular surgeries, the demand for homologous vascular or synthetic conduits has continued to grow, but wide-spread application has been limited by dismal patency rates. Although cryopreserved allograft valves may provide a suitable alternative, current viability or patency of implanted allograft vascular conduits has been unsatisfactory. **Material and Method:** We serially analyzed the outcomes of canine femoral artery and saphenous vein allograft implants after storage in either 4°C or -170°C. **Result:** There were no differences in graft flow rate (patency) ($p=0.264$), rate of thrombosis ($p=0.264$), presence of endothelium ($p=0.587$), or immunohistochemical staining for thrombomodulin ($p=0.657$) were detected between grafts stored in 4°C and -170°C. Greater flow occurred in the arterial grafts versus the venous grafts ($p=0.030$), irrespective of the preservation method, with a significantly lower incidence of thrombosis ($p=0.030$) in arterial allografts. There was a correlation coefficient of -0.654 between thrombosis and positive immunohistochemical staining for thrombomodulin ($p=0.006$) and a correlation coefficient of 0.520 ($p=0.0049$) between the endothelial presence and positive immunohistochemical staining for thrombomodulin. The relationship between the presence of endothelium and thrombomodulin expression failed to show any correlation within the first 2 weeks ($p=0.306$). However, a strong correlation was seen after 1 month ($p=0.0008$). **Conclusion:** Tissue storage in either 4°C or -170°C in 10% DMSO/RPMI-1640 preservation solution preserved grafts equally well. In terms of thrombosis and graft patency, arterial grafts were superior to venous grafts. Considering the poor correlation between thrombomodulin expression and the presence of an endothelium in the implanted graft within the first two weeks, grafts in this period would not be thromboresistant.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:149-159)

Key words: 1. Allograft
2. Cryopreservation
3. Vascular prosthesis

*울산대학교 의과대학 서울아산병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine

**충남대학교 의과대학 부속병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chungnam National University

***서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

논문접수일 : 2007년 3월 31일, 심사통과일 : 2007년 12월 11일

책임저자 : 송 현 (138-736) 서울시 송파구 풍납 2동 388-1, 서울아산병원 흉부외과

(Tel) 02-3010-3580, (Fax) 02-3010-6966, E-mail: hyunsong@amc.seoul.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

폐쇄성 혈관 질환의 치료에 있어서 현존하는 가장 이상적인 혈관 대체 물질은 자가 이식편임이 틀림없다. 그러나, 우회하여야 할 혈관의 숫자, 혈관 병변의 존재, 가용 혈관의 부재 등으로 대체 혈관이 필요한 경우가 있기 마련이다.

미국에서 관상동맥 우회술은 1997년 192,543예, 2000년 146,384예, 2005년 153,005예가 시행되었고, 이 중에 약 6만 명이 재수술 환자였다. 하지만 1/5인 12,000명이 재수술시 적절한 이식편의 부족으로 완전한 혈관 재관류(complete revascularization)가 이루어지지 않았다[1,2]. 말초 동맥 혈관 재건술 또한 미국에서는 연간 약 12만 건이 시행되고 있고, 이 중에서 약 2만 건이 재수술에 해당되어, 가용할 자가 동맥 혹은 정맥 이식편의 부재로 인한 대체 이식편이 필요하다. 이렇게 많은 대체 이식편의 수요는 여러 학자들로 하여금 합성도관(synthetic graft), 동종이식에 대한 관심을 갖게 하였다[1,2]. 서구와 달리 우리나라에서는 폐쇄성 혈관 질환이 빈발하는 것은 아니나, 최근에 식생활과 체형이 서구화됨에 따라 발생 빈도가 증가되고 있다. 관상동맥 우회술의 경우 우리나라에서는 1994년 520예, 1996년 1,036예, 2004년 2,681예, 2005년 2,680예로 빠른 증가 속도를 보이고 있어 우리나라에서도 대체 혈관 이식편에 대한 관심과 연구가 필요한 실정이다[3].

문헌상으로 가장 오래된 혈관의 동종이식은 1907년 개의 대동맥에서 이루어졌고[4], 사람에서의 사용은 1949년에 이루어졌으나[5], 술후 폐쇄로 성공적이라고 할 수는 없었다. 현재까지의 최장기 생존율을 보이고 있는 혈관의 동종이식은 액와 동맥과 상완 동맥을 이용한 신선상태의 동종 이식으로 40년의 생존율을 보여 주었다[6]. 다양한 저장 방법을 통해 사용되었던 동종혈관 이식 후 조영술로 확인된 생존율은 6개월에서 12개월에 15%, 1개월에서 77개월에 50%, 1개월에서 68개월에 47%로 합성도관과 크게 다를 바 없다[7-10]. 동종 이식 혈관의 생존율이 나쁜 원인은 내피의 항원성에 의한 거부반응에 의해서 내피가 제대로 기능을 못하기 때문인데 아직 정립된 기전이나 학설은 없다[11]. 냉동보존법이 혈관 내피의 항원성을 변화시키는가에 대해서도 논란이 많은데, 항원성을 변화시키거나 시키지 않거나, 이식된 혈관의 내피는 시간이 지날수록 수여자(recipient)의 내피로 전환된다는 것이다[12,13]. 임상적으로 동종 혈관 이식편을 사용

할 때, 허혈 시간에 의한 조직손상을 최대한 줄이는 것이 중요한데, 혈관의 생육성(viability) 관점에서 보면 신선 혈관이 가장 좋으나 환자 혹은 이식편이 항상 대기 상태에 있지 않다는 것이 문제이다. 현재까지 사용된 혈관의 보존 및 고정 방법으로는 글루타알데하이드, 에탄올, 냉동건조, 글라이세롤 등이 사용되었으나 생육성 소실이 문제였다[14-17]. 생육성을 보존하면서 장기간 보존을 할 수 있는 방법은 동종 판막의 냉동보존 기술이 발전되면서 가능하게 되었는데, 혈관의 보존에서도 동종판막의 냉동보존 방법인 DMSO (Dimethyl sulfoxide)가 포함된 RPMI (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO BRL, MD, USA)용액에 -120°C 보존이 적용되었고, 다른 보존법보다 좋은 1년 생존율 86%를 보이고 있다[18,19].

동종 혈관 이식편은 손쉽게 충분한 길이를 얻을 수 있는 장점 때문에 주로 대복재 정맥을 이용하여 동종이식에 대한 연구 및 임상 사용이 이루어지고 있으나, 관상동맥 우회술 시에 사용되는 내흉동맥이 대복재정맥보다 장기 생존율이 우수하다는 것은 이미 널리 알려진 바이다. 그러나 실제로 보존된 동종 동맥, 정맥 이식편의 생존율 및 이식 혈관의 내피세포의 생육성에 따른 기능을 평가하기 위한 트롬보모듈린의 면역조직화학적 비교 연구는 시행된 바 없다. 이에 본 연구는 다음과 같이 진행하였다.

(1) -170°C 의 냉동보존법과 4°C 냉장보존법에 따른 이식편의 생존율, 조직학적 변화 및 내피 세포의 보존 정도의 차이를 비교하였다.

(2) 시간대 별로 동맥 이식편과 정맥 이식편의 혈류량, 혈전의 발생 정도를 비교하였다.

(3) 동종이식 후 각각의 시간대 별로 내피의 존재 유무와 트롬보모듈린의 면역조직화학 검사에 의한 염색의 정도를 비교 관찰하고, 동시에 전자 현미경적 검사를 실시하여 생육성 유지에 따른 내피의 항응고 기능과 형태학적인 관계를 보았다.

대상 및 방법

1) 공여견 및 이식편의 준비(Table 1)

실험동물은 아산재단 생명과학 동물실험 연구소에서 일괄 구입한 체중 20 kg인 한국산 잡견 4마리를 공여견으로 사용하였다. 수술 하루 전 금식을 시키고 수술 당일 케타민 200 mg을 근육 주사 후 기관 삽관 후 할로탄으로 전신마취를 하였다. 양측 서혜부를 절개하여 대퇴

Table 1. Methods of graft preparation

	Fresh graft	Cryopreserved graft
Length	5 cm	5 cm
Media	RPMI-1640 100 cc	RPMI-1640 90 cc +DMSO 10 cc
Temperature	4°C	-170°C
Duration of preservation	3 days	2 weeks
Numbers of arterial graft	8 (6)	8 (6)
Numbers of venous graft	8 (6)	8 (6)

()=Number of implanted grafts. RPMI=Roswell park memorial institute solution (GIBCO BRL, MD, USA); DMSO=Dimethyl sulfoxide.

동맥과 대복재 정맥을 각각 10 cm씩 박리하여 5 cm씩 잘라서, 1마리 당 동맥 이식편 4개, 정맥 이식편 4개를 채취하여 총 16개씩 준비하였다. 채취한 이식편은 곧바로 생리식염수로 깨끗이 씻고, 배양액 RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, GIBCO BRL, MD, USA, L-glutamine과 25 mM의 buffer가 포함되어 있음)에 담근 후, 한 그룹은 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) · RPMI-1640 100 cc에 넣어 -170°C의 액화질소 탱크에 냉동보존하고, 다른 그룹은 DMSO 없이 RPMI-1640 100 cc에 담가서 4°C로 냉장보존 하였다. 냉동보존은 microcomputer 1010 (Cryo Med, Maryland, USA)의 모델을 이용하여 -40°C까지는 1분에 1도 이상 온도가 떨어지지 않게 유지하였으며, 냉동보존된 이식편의 해동은 37°C 수조(water bath)에서 3 분간 담근 후 보존액에서 제거하고, 정상 온도에서 RPMI 용액 50 cc에 씻고, 다시 헤파린 1,000 unit가 섞인 생리식염수 100 cc에 세척한 다음 이식준비를 하였다.

2) 이식편의 적합성 여부 판정

냉장보존 그룹과 냉동보존 그룹에서 동맥 2개와 정맥 2개를 냉장보존 3일째 및 6일째와, 냉동보존 2주일 째 및 1개월 째 한 개씩 채취하여, 내피의 항응고 기능 검사인 트롬보모듈린의 면역조직화학 염색을 시행하여, 전 부 양성 반응을 확인한 후, 냉장보존 및 냉동보존 이식편에서 이식 실험 전 내피의 손상이 없는 것으로 가정하고 실험을 진행하였다.

3) 수여건의 준비

수여건은 체중 20 kg인 잡견 12마리를 사용하여 공여

견과 같은 방법으로 전신마취하고 양측 서혜부를 박리하여 대퇴동맥을 노출시킨 후, 좌측은 동맥 이식편을, 우측은 정맥 이식편을 이식하였다. 이식편 5 cm 중, 공여견의 이식편 적출과정에서 손상 가능성이 있었으므로 양끝의 1 cm를 잘라서 제거하고 Prolene 7-0을 이용하여 연속 문합법으로 3 cm 길이로 단단 문합하였다. 이때 헤파린 2,000 unit와 항생제 Cefalosporin 500 mg을 대퇴동맥을 겹자(clamp)하기 5분 전에 정맥주사 하였다. 실험 동물 중 6마리는 4°C 냉장보존을 3일간 거친 동맥과 정맥이식편을, 다른 6마리는 2주간 -170°C에서 냉동보존한 동맥과 정맥이식편을 양측 대퇴 동맥에 이식하고, 피부 봉합 후 마취를 깨웠다. 수술 당일은 금식시키고, 술 후 2일째부터 정상 식이로 사육하였다. 수술 후에 항응고제, 항생제, 면역억제제 등의 모든 약제는 사용하지 않았고, 아산재단 생명과학 동물실험 연구소에서 정한 환경 기준(실내온도 섭씨 25도, 습도 40~60%, 환기횟수 15회, 기류속도 15 cm/초, 조명 200 Lux, 암모니아 농도 20 ppm 이하, 소음 60 dB 이하)에 의하여 사육하였다. 수여건은 술 후 각 그룹별로 3일, 1주일, 2주일, 1개월, 2개월, 3개월이 되었을 때, 전신마취하에 헤파린 2,000 unit를 정맥 주사하고, 이식편을 박리하여 적출한 후, 육안, 광학 현미경, 전자 현미경, 면역조직화학 검사를 실시하였다.

4) 적출된 이식편의 염색 방법

적출한 이식편은 문합 부위의 오차를 제거하기 위해 양끝 0.5 cm씩을 잘라서 제거하고, 나머지를 횡으로 각 3등분하여 근위부(proximal), 중간부위(middle), 원위부(distal)로 구분하였다. 근위부와 원위부는 다시 횡으로 2등분하여 각각 Hematoxylin-Eosin-Saffron 염색, 트롬보모듈린의 면역조직화학적 염색을 위한 고정액에 담고, 중간부위는 횡으로 4등분하여 각각 Hematoxylin-Eosin-Saffron 염색, 면역조직화학 염색, 주사 전자 현미경, 투과 전자 현미경을 위한 고정액에 담았다. 따라서, 각 이식편의 부위별 3개씩의 면역조직화학 염색 슬라이드(slide)와 Hematoxylin-Eosin-Saffron 염색 슬라이드를 준비하였고, 주사 현미경과 투과 전자 현미경을 위해서는 중간부위에서 한 개씩의 이식편 조각을 준비하였다.

5) 육안적 평가 방법

(1) 혈류량의 평가: 수여건의 평균 혈압이 70~80 mmHg일 때 이식편의 원위부에서 동맥을 절단하여 1분

간의 혈류량을 측정하여 0 (혈류가 통하지 않음), 1 (20 cc 미만의 혈류), 2 (20 cc 이상의 혈류)로 점수화하였다.

(2) 혈관 외막 주위의 유착정도를 정도화하여 평가하여 0 (유착 없음), 1 (약간의 유착), 2 (박리가 필요할 정도의 강한 유착)로 점수화하였다.

6) 병리조직학적 평가 방법

(1) 혈전의 정도를 평가하여 0 (혈전의 증거 없음), 1 (섬유소 응집이 흩어져서 관찰됨), 2 (큰 혈전이 관찰됨)로 점수화하였다.

(2) 죽전의 발생빈도를 평가하여 0 (3개의 슬라이드 중 죽전 없음), 1 (3개의 슬라이드 중 1개에서 죽전이 관찰됨), 2 (3개의 슬라이드 중 2개에서 죽전이 관찰됨), 3 (3개의 슬라이드 중 3개에서 죽전이 관찰됨)으로 점수화하였다.

(3) 내피의 유무를 관찰하여 0 (3개의 슬라이드 모두에서 전체 면적의 1/2 이하의 내피가 관찰됨), 1 (전체 면적의 1/2 이상의 내피를 보이는 슬라이드가 1개 관찰됨), 2 (전체 면적의 1/2 이상의 내피를 보이는 슬라이드가 2개 관찰됨), 3 (전체 면적의 1/2 이상의 내피를 보이는 슬라이드가 3개 관찰됨)으로 점수화하였다.

(4) 내막의 비후 정도를 관찰하여 0 (3개의 슬라이드에서 전부 내막의 비후 증거가 없음), 1 (1개의 슬라이드에서 조금이라도 내막의 비후가 관찰됨), 2 (2개의 슬라이드에서 조금이라도 내막의 비후가 관찰됨), 3 (3개의 슬라이드에서 조금이라도 내막의 비후가 관찰됨)으로 점수화하였다.

(5) 내막의 반흔(Scar) 정도를 관찰하여 0 (3개의 슬라이드 모두에서 관찰되지 않음), 1 (1개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 2 (2개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 3 (3개의 슬라이드에서 관찰됨)으로 점수화하였다.

(6) 중막의 반흔 정도를 관찰하여 0 (3개의 슬라이드 모두에서 중막의 반흔 없음), 1 (1개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 2 (2개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 3 (3개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨)으로 점수화하였다.

(7) 염증 세포의 침윤 정도를 관찰하여 0 (3개의 슬라이드에서 전부 염증세포의 침윤이 없음), 1 (1개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 2 (2개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨), 3 (3개의 슬라이드에서 조금이라도 관찰됨)으로 점수화하였다.

7) 트롬보모듈린(thrombomodulin)의 면역조직화학적 염색에 대한 평가 방법

신선표본을 10% 중성 포르말린 용액에 고정시킨 후 24시간 이내에 파라핀에 포매시켜서 5 μ m 두께의 절편을 얻은 후, 60°C 건조기에서 60분간 말리고, xylene에 3분씩 4회 넣어 탈파라핀 과정을 거친 후 알코올(absolute alcohol)에 2회, 90% 알코올에 2회, 80% 알코올에 1회, 70% 알코올에 1회씩, 각 2분간 처리하여 흡수시켰다. 증류수로 3번 씻은 후 0.3% H₂O₂에 15분간 두어 내인성 peroxidase의 작용을 억제시켰다. 정상 염소혈청으로 30분간 반응시켜 비 특이성 반응을 없앤 후 1차 항체(monoclonal mouse anti-thrombomodulin antibody, DAKOpatts, Glostrup, Denmark)를 작용시켜 4°C에서 24시간 두었다. 이후 찬 phosphate-buffered saline (PBS)으로 5분 동안 세 번 씻고, peroxidase-labelled streptavidin anti-mouse immunoglobulin으로 30분간 반응시킨 후 PBS로 씻고, 3-DAB (3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색시켰다. 이후 수돗물로 씻고 Mayer Hematoxylin에서 1~2분간 대조 염색하여 0 (염색되는 반응 세포(reactive cell)들이 3장의 슬라이드에서 전부 관찰되지 않음), 1 (50% 이하의 염색되는 반응세포를 1장 이상의 슬라이드에서 관찰됨), 2 (50% 이상의 염색되는 반응세포를 3장의 슬라이드에서 전부 관찰됨)로 점수화하였다.

8) 투과 전자 현미경의 평가 방법

내피세포의 형태, 즉 내피의 핵과 세포질이 풍부하게 분포되었는가의 여부와 내막의 섬유화와 기저막의 노출 정도를 관찰하였다.

9) 주사 전자 현미경의 평가 방법

내피층의 온전함 여부와 세포의 분리(cell separation) 정도, 기저막의 노출 정도와 세포의 정돈(cell alignment) 상태를 관찰하였다.

10) 통계처리

순위의 정도로 비교하기 위하여 Ridit (relative to an identified distribution) 분석법을 사용하여 그룹별로 관찰하였고, 상관관계를 보기 위해서는 비모수적 상관 계수인 Kendall Tau b correlation coefficient를 구하였다. 통계적 유의성은 p<0.05로 하였다.

Table 2. Blood flow

Grade	Arterial grafts	Venous grafts	Grafts Preserved at 4°C	Grafts Preserved at -170°C
0	2 (16.7%)	7 (58.3%)	3 (25.0%)	6 (50.0%)
1	6 (50.0%)	4 (33.3%)	6 (50.0%)	4 (33.3%)
2	4 (33.3%)	1 (8.3%)	3 (25.0%)	2 (16.7%)
Total	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)

p-value between arterial and venous grafts: 0.030 (by Ridit test). p-value between grafts preserved at 4°C and -170°C: 0.264 (by Ridit test).

Table 3. Degree of thrombosis

Degree	Arterial grafts	Venous grafts	Grafts preserved at 4°C	Grafts preserved at -170°C
0	4 (33.3%)	1 (8.3%)	3 (25.0%)	2 (16.7%)
1	6 (50.0%)	4 (33.3%)	6 (50.0%)	4 (33.3%)
2	2 (16.7%)	7 (58.3%)	3 (25.0%)	6 (50.0%)
Total	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)

p-value between arterial and venous grafts: 0.030 (by Ridit test). p-value between grafts preserved at 4°C and -170°C: 0.264 (by Ridit test).

결 과

1) 육안적 소견(Table 2)

(1) 보존 방법에 관계없이 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 혈류가 높았다(p=0.030). 냉장보존이 냉동보존보다 혈류량이 좋았으나, 통계적 차이는 없었다(p=0.264). 동맥 및 정맥 이식편에 대한 냉장보존 및 냉동보존에 대한 혈류량을 따로 비교하였을 때 통계적 차이는 없었다(p>0.2).

(2) 이식편 유착 정도는 보존방법 간에 차이가 없었고, 동맥과 정맥 간에 차이가 없었다(p>0.2).

2) 광학 현미경적 소견(Table 3)

(1) 혈전의 정도: 보존 방법에 관계없이 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 혈전의 발생 정도가 유의하게 낮았다(p=0.030). 냉장보존과 냉동보존을 비교하였을 때 냉장보존이 냉동보존보다 혈전이 적게 발생된 양상을 보였으나 통계적 차이는 없었다(p=0.264). 동맥 및 정맥 이식편에 대한 냉장보존 및 냉동보존을 비교하였을 때 유의한 차이는 없었다(p>0.2).

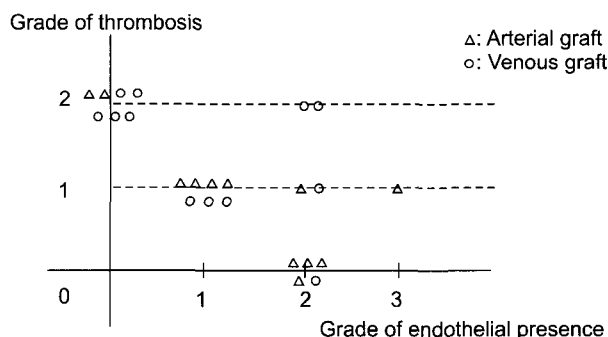


Fig. 1. Correlation between endothelial presence and thrombosis. Kendall Tau b correlation coefficient: -0.657 (p=0.0003).

(2) 내피의 유무 정도: 내피의 존재 유무는 동맥과 정맥 이식편 상호간에 차이는 없었고(p=0.165), 냉장보존과 냉동보존의 차이도 없었다(p=0.587). 내피의 유무와 혈전의 정도에 따른 상관관계 계수는 -0.657이었다(p=0.0003)(Fig. 1).

(3) 죽전(atheroma)의 발생: 죽전은 3개월 때 적출한 내강이 유지되고 있었던 이식편에서만 발생하였다(Fig. 2A, Fig. 3A).

(4) 내막의 비후 정도: 동맥 이식편과 정맥 이식편의

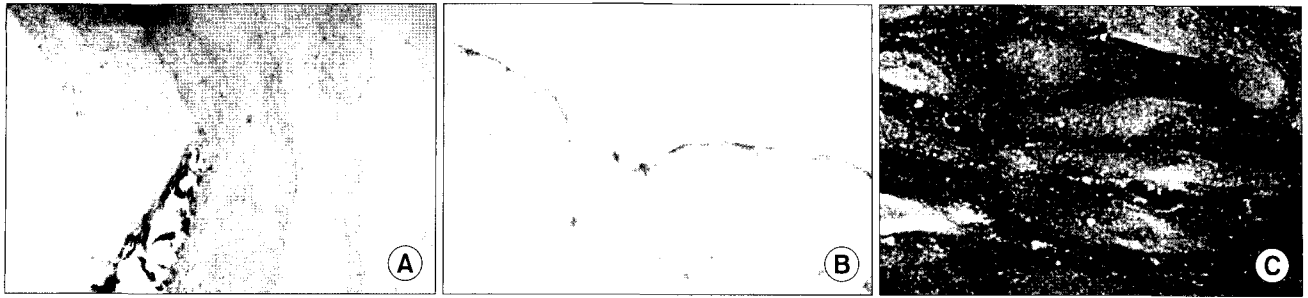


Fig. 2. Arterial homograft preserved at -170°C explanted 3 months after implantation. (A) Light microscopic finding (original magnification, $\times 100$): endothelial cells and an atheroma can be seen. (B) Immunohistochemical staining (original magnification, $\times 400$): endothelial cells are stained dark brown. (C) Scanning electronmicroscopic finding: endothelial cells are marked by the presence of elongated cells with good alignment. There is no evidence of cellular separation and prominent cell junction can be seen.



Fig. 3. Venous homograft preserved at 4°C explanted 1 week after implantation. (A) Light microscopic finding (original magnification, $\times 100$): endothelial cells can be seen. (B) Immunohistochemical staining (original magnification, $\times 200$): endothelial cells are not staining for brown. (C) Scanning electronmicroscopic finding: collagen fibers are exposed and the presence of endothelial cells are marked by the appearance of discrete rounded cells.

차이는 없었고, 냉장보존과 냉동보존의 차이도 없었다. 내막의 비후와 혈전의 발생과도 상관관계가 없었다.

(5) 내막의 반흔 정도: 동맥 이식편과 정맥 이식편의 차이는 없었고, 냉장 보관과 냉동보존의 차이도 없었다. 내막의 반흔과 혈전의 발생과도 상관관계가 없었다.

(6) 중막의 반흔 정도: 동맥 이식편과 정맥 이식편의 차이는 없었고, 냉장 보관과 냉동보존의 차이도 없었다. 중막의 반흔과 혈전의 발생과도 상관관계가 없었다.

(7) 세포의 침윤 정도: 동맥 이식편과 정맥 이식편의 차이는 없었고, 냉장보존과 냉동보존의 차이도 없었다. 세포의 침윤 정도와 혈전의 발생과도 상관관계가 없었다.

3) 트롬보모듈린의 면역조직화학적 검사(Fig. 2B, Fig. 3B)

동맥 이식편과 정맥 이식편의 차이는 없었고($p=0.268$), 냉장보존과 냉동보존의 차이도 없었다($p=0.657$). 혈전의

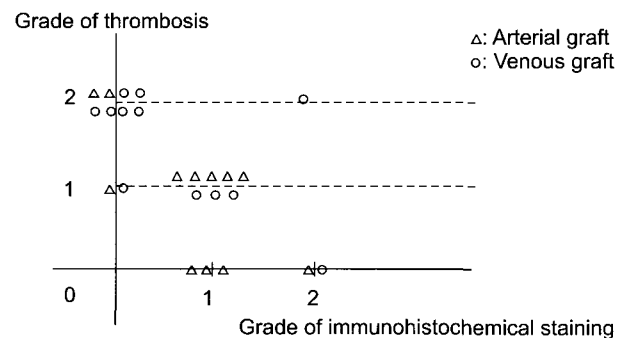


Fig. 4. Correlation between immunohistochemical staining and thrombosis. Kendall Tau b correlation coefficient: -0.0654 ($p=0.006$).

정도와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 -0.654 이었다($p=0.006$)(Fig. 4). 내피의 존재와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 0.520 이었다($p=$

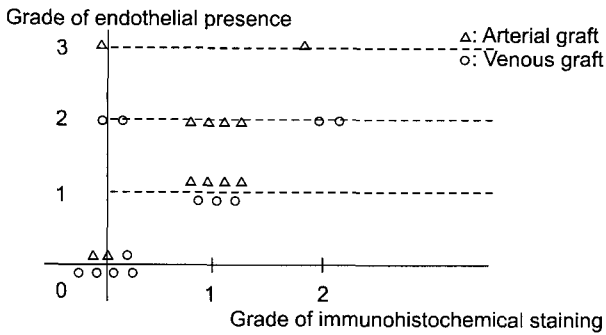


Fig. 5. Correlation between immunohistochemical staining and endothelial presence. Kendall Tau b correlation coefficient: 0.520 (p=0.0049).

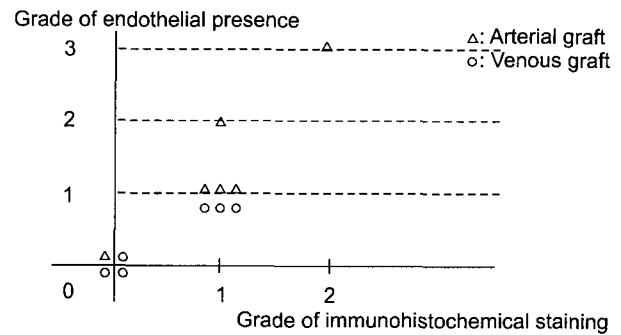


Fig. 7. Correlation between immunohistochemical staining and endothelial presence (more than 1 month). Kendall Tau b correlation coefficient: 0.931 (p=0.0008).

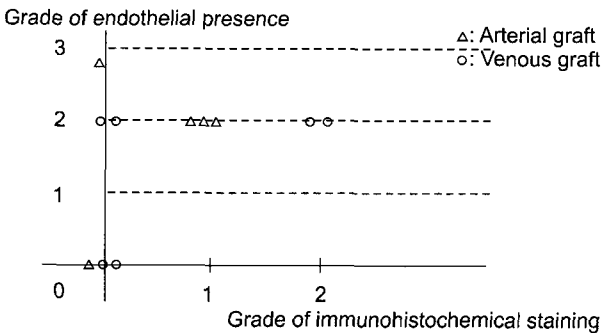


Fig. 6. Correlation between immunohistochemical staining and endothelial presence (less than 2 weeks). There is no correlation (p=0.306).

조직화학 검사에서 염색이 되는 적출된 이식편의 경우는 세포가 잘 정돈되어 있고, 내피가 활성화(endothelial activation)되어 있으나(Fig. 2C), 트롬보모듈린의 면역조직화학 검사에 염색이 안 되는 경우는 세포의 분리 및 기저막이 노출되어 있었다(Fig. 3C).

고 찰

역사적으로 실험적 정맥 동종이식은 1900년대 초부터 시작되었고[4], 임상적 적용은 1950년대부터 이루어져 왔다[6]. 최근에 관상동맥 협착증 환자가 더욱 빈발해짐에 따라 관상동맥 우회술의 재수술 환자가 증가하면서 그 사용 가능한 이식편의 부족으로 인하여 동종 이식편 혹은 합성 도관의 관심이 증가되고 있으나, 아직 장기 개존율의 문제로 널리 사용되고 있지는 못하다. 합성 도관으로 가장 좋은 성적을 보이고 있는 polytetrafluoroethylene (PTFE)도관은 2년 개존율이 12%에서 52%의 성적을 보이고 있으며[20], 동종이식 이식편의 개존율도 10%에서 50%로 만족스럽지 못하다[7,9]. 하지만 이식편이 꼭 필요한 환자들의 수요에 비롯되어 선진국에서는 CADVEIN (Cryolife Cardiovascular Inc. Marietta, GA, USA)이라는 상품화된 냉동보존 정맥을 임상 적용하고 있으나, 그 성적 또한 1년 개존율이 약 60%로 만족스럽지 못하다[21]. 이러한 동종 이식 혈관의 좋지 않은 성적의 원인은 거부반응에 의한 면역적 손상, 허혈성 손상, 재관류 손상에 의해서 동종 이식편의 내피가 손상 당하기 때문이라 생각하지만, 아직 그 기전에 대해서는 확실하게 밝혀지지 않고 있다.

Brockbank 등[19]은 주의 깊게 정맥을 적출해도 20%의

0.0049) (Fig. 5). 이식편을 수여전에 이식 후, 적출된 이식편을 기간별로 2주 전과 1개월 후로 나누어서 내피의 존재 여부와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계를 살펴보았을 때, 2주일 전에는 상관관계가 없었고(p=0.306), 1개월 후에는 상관관계 계수가 0.931 (p=0.0008)이었다(Fig. 6, 7).

4) 투과 전자 현미경의 결과

혈전의 정도가 1 이하인 경우에서 핵이 분명히 관찰되며, 세포질이 풍부하고, 세포간극이 잘 유지되었으나(Fig. 8A), 혈전이 2 이상이거나 내피가 존재하지 않는 경우는 핵이 관찰되지 않거나 핵이 위축되어 있고, 세포질이 빈약하고, 세포질 내에 소립자(granule)가 잘 관찰되지 않았다(Fig. 8B).

5) 주사 전자 현미경의 결과

혈전의 정도가 1 이하인 경우에 트롬보모듈린의 면역

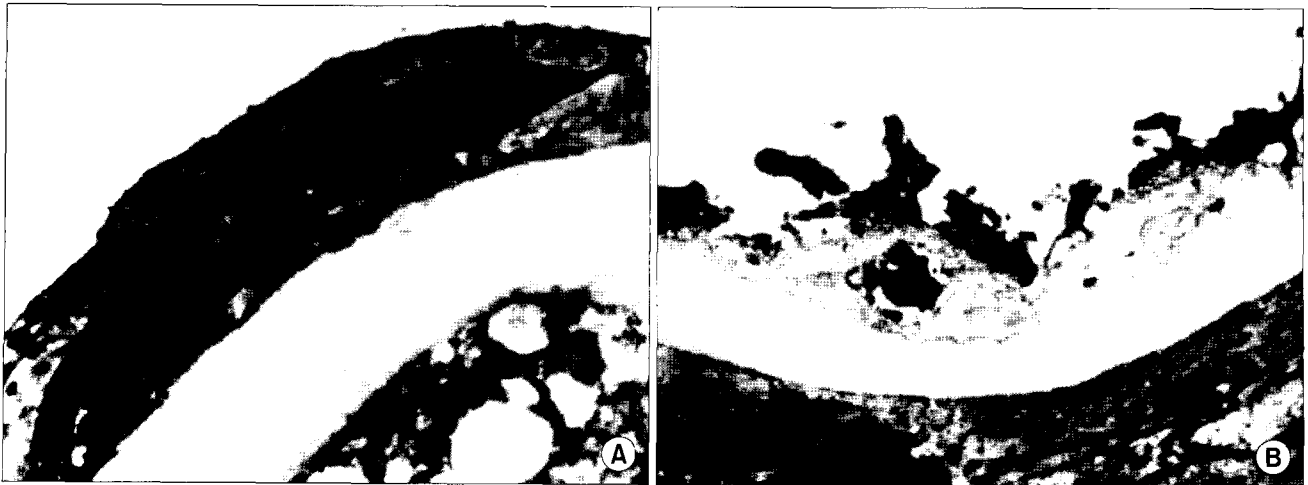


Fig. 8. Transmission electronmicroscopic findings. (A) Arterial homograft specimen preserved at -170°C with no thrombus which was explanted 3 days after implantation shows abundant cytoplasm and definite nucleus. (B) Arterial homograft specimen preserved at 4°C with thrombus formation which was explanted 2 weeks after implantation shows absence of nucleus and sparse cytoplasm.

내피의 구조(endothelial integrity)가 손상된다고 보고하였고 첫 2주 만에 손상된 내피가 복원된다고 하였다. 냉동보존 및 냉장보존된 내피가 언제 복원되는지에 대해서는 뚜렷이 알려진 바가 없고, 또한 동종 이식이 시행되었을 때, 항원성의 여부 때문에, 더욱 더 그 해부학적, 기능적 복원에 대해서는 복잡한 결과를 예상할 수 있다. 본 연구에서 관찰된 바와 같이 내피의 존재 정도와 트롬보모듈린의 염색 정도의 상관관계가 2주 전에는 없었고, 1개월 후에는 있었다(Kendall's Tau b correlation coefficient=0.931, $p=0.0008$). 즉, 2주 전에는 형태적으로는 내피가 존재하나 항응고 기능은 제대로 못하는 것을 알 수 있었고, 이때, 주사 현미경상으로는 광학 현미경적으로 보인 내피가 뚜렷하지 않고, 활성화되어 있지 않으면서 기저막이 노출된 것을 알 수 있었다(Fig. 7, 8). 다시 말하면 이식편이 수여전에서 2주 전에는 기능적 형태학적으로도 복원이 안되었다는 것을 의미한다.

이식된 혈관의 거부반응에 대한 결과에 대해서 논란이 있으나, 이식된 혈관의 장기 개존율이 나쁜 원인은 만성 거부반응(chronic rejection)이 내막의 비후(intimal thickening)와 외막의 섬유증식증(fibroblastic reaction)을 초래하여 혈전이 형성되기 때문이라고 한다[22]. 하지만 현재 흔히 사용되는 냉동보존된 동종 혈관의 만성 거부반응은 어떤 형태로 발현되는지에 대하여는 뚜렷하지 않다. 본 연구에서는 만성 거부반응을 관찰하기에는 실험 기간이 짧았으나, 이식 후 3개월째 개존되었던 동맥이식편에서

죽전이 관찰된 것으로 보아(Fig. 7A), 거부반응 혹은 조직 손상에 대한 만성반응의 한 부분으로 생각되었다.

이식된 내피가 공여 혈관의 내피인지 수여 혈관의 내피인지에 대하여 논란이 많으나 현재까지는 이식된 혈관의 내피가 수여 혈관의 내피로 시간이 진행함에 따라 전환된다고 보고 있다[23]. 따라서 이식된 공여 혈관의 내피가 없어지고, 수여 혈관의 내피로 재생되는 중요한 시점이 있게 되는데, 이 시점에서 혈류량이 감소되면 혈전이 형성되고, 개존율에 영향을 주는 것이다. 공여견과 수여견의 암수를 달리하여 실험한 결과에 의하면 30일째 Barr body의 출현은 50%에서 나타나고 있다[24]. 즉, 50%의 내피가 30일 내에 수여견의 내피로 전환되었다고 볼 수 있다. 하지만 남아있는 이식된 내피든, 재생된 수여견의 내피든 간에 항응고 기능을 실제로 하고 있는가는 또 다른 문제인 것이다. 본 연구에서도 나타난 바와 같이 트롬보모듈린의 면역조직화학적 검사와 내피의 존재(endothelial presence)여부 및 혈전(thrombus)의 발생 정도는 매우 밀접한 관계가 있었으나, 2주 전에 적출된 이식편에서의 트롬보모듈린 면역조직화학적 염색 검사와 내피의 존재 여부가 상관관계가 없는 바, 2주 전에는 내피가 존재하더라도 기능적으로는 복원이 안되어 있는 상태라고 가정할 수 있다. 이는 수술 후 초기에 항응고 요법 및 면역 억제제 등의 사용으로 내피의 복원시기를 도와줄 수 있다면 개존율에 있어서 장기 성적으로 갈 수 있는 가능성을 시사하는 것이라고 할 수 있다.

혈관의 장기 성적에 있어서 일반적으로 동맥 이식편인 내유동맥, 우위대망동맥, 요골동맥 등이 장기 개방성에 있어서 대복재 정맥보다 우수한 것으로 알려져 있다[25]. 이는 조직학적으로 동맥이 정맥보다 유순도 등에 유리한 구조를 하고 있고, 동맥 경화의 발생률이 적기 때문이다. “arterialized vein”은 동맥에 비하여 불안정한 구조를 갖게 되는데, 내층에 내피세포가 풍부하더라도 지속적으로 증식을 하여 내층에 비후가 초래되고, 이 부위에서 평활근(smooth muscle)도 증식이 이루어지는 것으로 사람에서는 주로 6개월에서 12개월에 이루어진다. 정맥 내층의 지속적인 증식을 하는 이유는 아직 분명하지는 않지만, 정맥의 내피가 동맥 혈류량 및 압력에서는 제대로 매개체로서의 역할을 못하기 때문이다. 예를 들어 동맥화된 정맥이식편(arterialized vein graft)은 동맥이식편(arterial graft)에 비하여 prostacyclin의 분비가 감소되어 있고, thromboxane A₂의 생성이 증가되어 있다. 이런 두 가지 현상은 혈관의 긴장도(vascular tone)를 감소시키고, 평활근(smooth muscle) 세포의 증식을 증가시킨다[26]. 냉동보존된 동종 정맥 이식편은 소위 “arterialization”의 경과를 밟기 때문에 혈관의 내층 및 중층에 동축성 비후(concentric hypertrophy)를 초래하게 되어 내강의 협착을 초래하게 되지만 동맥 이식편은 이러한 협착 경과를 보이지 않을 가능성이 있다. 따라서, 개존율 및 조직학적 결과에 있어서 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 좋으리라 추측된다. 본 연구에서 혈류 및 혈전의 발생 빈도는 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 우수한 것을 보이고 있는데(p=0.030), 이는 “arterialization”의 경과에 의한 성적 결과라기 보다는 동맥과 정맥의 크기 불합치(size discrepancy), 혹은 유순도(compliance) 등에 영향을 받아 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 좋은 결과를 보였다고 생각할 수 있다. 동맥보다는 정맥이 손쉽게 이식편을 얻을 수 있는 장점이 있어서 정맥의 임상 사용 빈도가 높으나, 단기 및 장기 개존율에 있어서, 동맥 이식편의 우수성을 생각하면, 향후에 동맥 이식편의 연구가 더욱 활발히 이루어져야 함을 알 수 있었다.

냉동보존을 얼마나 오랫동안 하여도 혈관 이식편의 손상이 없는가에 대하여는 아직 확립되지 않았지만, 개의 경우 3개월부터 냉동보존한 혈관 이식편의 혈관벽에 생화학적 변화가 온다는 보고가 있다[27]. 본 연구에서는 2주일간 냉동보존을 하였으므로, 심각한 혈관벽의 생화학적 변화는 없으리라 가정하였지만, 향후에 냉동보존의 안전한 보존기간에 대한 연구가 진행되어야 한다고 생

각한다. 냉동에 관한 처리는 내피의 기능 및 형태 유지에 매우 중요한데, 동종이식편막의 냉동 처리 기술의 개발로 냉동에 대한 보존방법이 진일보하게 되었다. 본 연구에서도 3일간의 4°C 냉장보존과 2주간의 -170°C의 냉동보존을 시행하고 이식한 결과, 양 그룹간의 차이는 없어서 -170°C의 냉동보존에 대한 안전성을 입증할 수 있었지만, 비교적 2주라는 짧은 기간 동안의 냉동보존이었으므로, 2주 이상의 장기 냉동보존에 대해서 형태적, 기능적인 안전성 여부에 대해서 더 많은 연구가 있어야 될 것이다.

결 론

10% DMSO · RPMI-1640을 배양액으로 하는 4°C 냉장보존법과 -170°C의 냉동보존법은 혈류량(개존율)에 있어서 차이가 없었고(p=0.264), 혈전의 발생 정도도 차이가 없었으며(p=0.264), 내피의 존재 여부도 차이가 없었고(p=0.587), 내피의 항응고 기능을 반영하는 트롬보모듈린(thrombomodulin)의 면역조직화학적 염색에도 차이가 없어서(p=0.657), 최소한 같은 정도의 혈관 보존능을 가진다고 할 수 있었다.

동맥 이식편과 정맥 이식편은 보존방법에 관계없이 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 혈류가 좋았고(p=0.030), 혈전의 발생전도가 유의하게 낮아서(p=0.030), 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 좋은 대체 이식편임을 알 수 있었다.

혈전의 정도 및 내피의 존재 유무와 트롬보모듈린의 면역조직 화학적 염색 정도와의 상관관계를 보았을 때, 혈전의 정도와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 -0.654였으며(p=0.006), 내피의 존재와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 0.520이었고(p=0.0049), 이식 후 이식편을 적출할 때까지의 기간을 2주전과 1개월 후로 나누어서 내피의 존재 여부와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계를 살펴보았을 때, 2주일 전에는 상관관계가 없었고(p=0.306), 1개월 후에는 상관관계 계수가 0.931이었다(p=0.0008). 따라서 2주일 전의 이식편은 내피가 광학현미경적으로 증명되더라도 트롬보모듈린의 면역조직화학적 염색이 안되고, 주사 전자현미경적으로도 불분명하고, 비활성화되어 되어있는, 즉, 기능적, 형태적으로 불완전한 내피임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Iaffaldano RA, Lewis BE, Johnson SA, Piffare R, McKiernan TL. *Patency of cryopreserved saphenous vein grafts as conduits for coronary artery bypass surgery*. Chest 1995;108:725-9.
2. STS Database 2006.
3. The Korean journal of thoracic and cardiovascular surgery. Database.
4. Carrel A. *Ultimate results of aortic transplantation*. J Exp Med 1912;15:389-94.
5. Gross RE, Bill AH, Pierce EC. *Methods for preserving transplantation of arterial grafts*. Surg Gynecol Obstet 1949;88: 689-701.
6. Hardaway RM. *A Long term follow-up of one of the first arterial homograft*. J Cardiovasc Surg 1995;36:491-2.
7. Gelbfish J, Jacobowitz IJ, Rose DM, et al. *Cryopreserved homologous saphenous vein: early and late patency in coronary artery bypass surgical procedures*. Ann Thorac Surg 1986;42:70-3.
8. Ochsner JL, Lawson JD, Eskin SJ, Mills NL, DeCamp PT. *Homologous veins as an arterial substitute: long-term results*. J Vasc Surg 1984;1:306-13.
9. Bical O, Bachet J, Laurian C, Camilleri JP, Goudot B, Menu P. *Aortocoronary bypass with homologous saphenous vein: long-term results*. Ann Thorac Surg 1980;30:550-7.
10. Sitzmann JV, Imbembo AL, Ricotta JJ, McManama GP 3rd, Hutchins GM. *Dimethylsulfoxide-treated, cryopreserved venous allografts in the arterial and venous systems*. Surgery 1984;95:154-9.
11. Barner HB. *Allogenic vein as a conduit for coronary artery bypass*. Ann Thorac Surg 1992;54:826-31.
12. Stevens SL, Tyler JD, Freeman MB, et al. *Factors affecting patency of venous allografts in miniature swine*. J Vasc Surg 1990;12:361-6.
13. Bogats G, Kertesz E, Katona M, Toszeg A, Kovacs GS. *Modified Blalock-Taussig shunt using allograft saphenous vein: six years experience*. Ann Thorac Surg 1996;61:58-62.
14. Dardik HD, Ibrahim IM, Sprayregen S, Dardik II. *Clinical experience with modified human umbilical cord vein for arterial bypass*. Surgery 1976;61:8-24.
15. Mindich B, Silverman M, Elguezabel A, Flores L, Sheka RP, Levowitz BS. *Human umbilical cord vein for vascular replacement. Preliminary report and observations*. Surgery 1977;81:152-60.
16. Chow SP, So YC, Chan CW. *Experimental microarterial grafts: freeze-dried allografts versus autografts*. Br J Plast Surg 1983;36:345-7.
17. Bishop AJ, Glasby MA, Houlton JE. *A morphological assessment of vein allografts preserved in glycerol and used for arterial replacement*. J Cardiovasc Surg 1987;28:491-7.
18. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, McGiffin DC. *A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies*. J Thorac Cardiovasc Surg 1987;94: 812-23.
19. Brockbank KG, Donovan TJ, Ruby ST, Carpenter JF, Hagen PO, Woodley MA. *Functional analysis of cryopreserved veins. preliminary report*. J Vasc Surg 1990;11:94-102.
20. Taylor RS, Loh A, McFarland RJ. *Improved technique for polytetrafluoroethylene bypass grafting: long-term results using anastomotic vein patches*. Br J Surg 1992;79:348-54.
21. Posner MP, Makhoul RG, Altman M, et al. *Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression*. J Am Coll Surg 1996;183:208-16.
22. Williams GM, ter Haar A, Krajewski C, Parks LC, Roth J. *Rejection and repair of endothelium in major vessel transplants*. Surgery 1975;78:694-706.
23. Boren CH, Roon AJ, Moore WS. *Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation*. Surgery 1978;83:392-91.
24. Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, et al. *Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment*. J Surg Res 1996;62:95-102.
25. Aris A, Barras X, Ramino J. *Patency of internal mammary artery grafts in no-flow situation*. J Cardiovasc Surg 1987; 93:62-4.
26. Alaire E, Clowes AW. *The intimal hyperplastic response*. Ann Thorac Surg 1997;64:538-46.
27. Muller-Schweinitzer E, Tapparelli C. *Pharmacological studies on frozen stored canine saphenous veins and basilar arteries*. Arch Pharmacol 1986;332:74-8.

=국문 초록=

배경: 최근 관상동맥우회술 및 말초 혈관 수술의 증가로 동종 이식편 혹은 합성 도관의 필요성이 제기되고 있으나, 만족스럽지 못한 장기 보존율로 널리 사용되지 못하고 있다. 최근 냉동보존된 동종 판막의 생육성 유지의 잠재력이 밝혀지면서, 냉장보존 및 냉동보존된 동종 동맥 혹은 정맥이식편의 실험적인 연구와 임상 적용이 시도되고 있다. 대상 및 방법: 4°C 냉장보존과 -170°C 냉동보존된 한국 산 잡견의 대퇴 동맥 및 대복재 정맥을 수여견의 대퇴 동맥에 이식하여, 냉장보존 및 냉동보존된 동맥과 정맥의 보존율의 차이와 생육성에 따른 내피세포의 기능을 시간대별로 관찰하였다. 결과: RPMI-1640을 배양액으로 하는 3일간의 4°C 냉장보존법과 10% DMSO · RPMI-1640을 배양액으로 하는 2주간의 -170°C의 냉동보존법은 혈류량(개존율)($p=0.264$), 혈전의 발생 정도($p=0.264$)와 내피의 존재 정도($p=0.587$), 트롬보모듈린(thrombomodulin) 면역조직화학 염색에도 차이가 없었다($p=0.657$). 동맥 이식편과 정맥 이식편은 보존방법에 관계없이 동맥 이식편이 정맥 이식편보다 혈류가 좋았고($p=0.030$), 혈전의 발생 정도가 낮았다($p=0.030$). 혈전의 정도 및 내피의 존재 유무와 트롬보모듈린의 면역조직화학적 염색의 상관관계를 보았을 때, 혈전의 정도와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 -0.654 였으며($p=0.006$), 내피의 존재와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계 계수는 0.520 이었다($p=0.0049$). 이식편을 수여견에 이식 후 적출한 이식편을 기간별로 내피의 존재 여부와 면역조직화학적 염색 정도와의 상관관계를 살펴보면 2주일 전에는 상관관계가 없었으나($p=0.306$), 1개월 후에는 상관관계 계수가 0.931 이었다($p=0.0008$). 결론: RPMI를 배양액으로 하는 3일간의 4°C 냉장보존과 10% DMSO · RPMI-1640을 배양액으로 하는 2주간의 -170°C의 냉동보존은 최소한 같은 정도의 생육성이 유지된 혈관 보존을 할 수 있었다. 보존방법에 관계없이 동맥 이식편은 정맥 이식편보다 혈전의 발생률이 적었으며, 혈류량으로 평가한 보존율이 우수하였다. 트롬보모듈린의 역할을 고려할 때, 이식 후 2주일 전에 적출된 이식편에는 내피가 존재하더라도 광학현미경상의 형태만 갖고 있고, 항응고 기능은 없었으나, 이식 후 1개월 이후에 적출된 이식편에서는 내피가 존재하는 경우 항응고 기능이 있는 것을 알 수 있었다.

- 중심 단어 : 1. 동종이식
2. 냉동보존
3. 인조혈관