

온혈허혈시간과 냉동보존온도와 보존액 조성에 따른 기관의 생육성 비교

사영조* · 박재길* · 심성보* · 진 웅* · 문영규* · 이선희* · 조건현*

The Effects of the Warm Ischemic Time, the Preserving Temperature and the Cryopreservation Solution on the Viability of Tracheas

Young Jo Sa, M.D.*, Jae Kil Park, M.D.*, Sung Bo Sim, M.D.*, Ung Jin, M.D.*,
Young Kyu Moon, M.D.*, Sun Hee Lee, M.D.*, Kuhn Hyun Jo, M.D.*

Background: Tracheal reconstruction after extended tracheal resection still remains as a major surgical challenge because good clinical outcomes are usually correlated with limited tracheal resection. Recent investigations with a using cryopreserved trachea for the reconstruction of a trachea have been carried out to overcome this problem. In this study, we analyzed viability of tracheas, which is an important determining factor for the success of transplanting a cryopreserved trachea and the development of post-transplantation tracheal stenosis, according to three different experimental factors: 1) the warm-ischemic time, 2) the cryopreservation solution and 3) the preserving temperature, to determine a better cryopreservation protocol and a better composition of the cryopreservation solution. **Material and Method:** Rats tracheas were harvested for different warm-ischemic times (0 hr, 12 hrs, 24 hrs). The tracheas were treated with recombinant insulin growth factor-1 (IGF-1) and they were stored at three different temperatures (4°C, -80°C, -196°C) for two weeks. After two weeks, we thawed the stored trachea and isolated the cells of the tracheas with using type II collagenase. We cultured the cells for seven days and then we compared the cellular viability by the MTT reduction assay. **Result:** Though cryopreservation is required to preserve a trachea for a longer time period, the viability of the tracheas stored at -80°C and -196°C was significantly reduced compared to that of the tracheas stored at 4°C. The viability of the tracheas with warm-ischemic times of 12 hrs and 24 hrs was also reduced in comparison to the tracheas with a warm-ischemic time of 0 hrs. Our data showed that the warm ischemic time and the parameters of cryopreservation negatively affect on trachea viability. However, a cryopresrvation solution containing IGF-1 improved the cellular viability better than the existing cryopreservation solution. For the warm ischemic time group of 0 hr, the addition of IGF-1 improved the viability of trachea at all the preserving temperatures. **Conclusion:** These experiments demonstrate that the viability of a cryopreserved trachea can be improved by modifying the components of the cryopreservation solution with the addition of IGF-1 and reducing the warm-ischemic time.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:283-291)

- Key words:**
1. Trachea
 2. Viability
 3. Cryopreservation
 4. Temperature

*가톨릭대학교 의과대학 성모병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine

논문접수일 : 2008년 12월 16일, 심사통과일 : 2009년 2월 20일

책임저자 : 박재길 (150-713) 서울시 영등포구 여의도동 62, 성모병원 흉부외과
(Tel) 02-3779-1182, (Fax) 02-3779-1181, E-mail: jaekpark@catholic.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

협착과 종양, 외상, 그리고 선천성 질환과 같은 기관 병변의 치료에는 종종 기관의 재건이 필요하며, 일반적으로 재건은 기관 절제 후 단단 문합의 방법으로 시행되어 왔다. 이러한 단단 문합의 방법은 성인에서 결손의 범위가 50%를 넘지 않고[1-3] 소아에서는 전체길이의 1/3을 넘지 않을 때[2-5] 가능하여, 그 이상을 넘는 결손은 단단 문합술이 아닌 기관성형술 등의 보존적인 방법으로 치료해 왔다.

한편, 인체의 조직을 냉동 보존하여 필요한 시점에 이식하여 사용할 수 있도록 조직은행이 설립되어 있어, 기관 이외의 여러 장기에서는 냉동 보존 기술이 상당 수준으로 발달되어 있으며, 이를 이용한 이식수술도 현재 활발히 시행되고 있다[6-8]. 그러나 기관은 외부 환경에 직접 노출되어 있어 감염에 민감하며 이식한 기관의 혈액 순환 문제 등으로, 타 장기에 비해 냉동 이식 수술에 불리하여, 활발히 시행되고 있지 못한 상황이다[9].

이에 저자들은 이식의 성공과 이식 후의 기관협착 발생에 중요한 결정인자인 기관의 생육성을 향상시키기 위하여, 온혈허혈시간과 냉동 보존액 조성에 따른 영향을 비교 검토해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 연구 재료 및 연구군의 분류

기관의 공여 동물로는 몸무게가 200~220 gm인 9주령의 SD rat 수컷을 이용하였다. 연구군은 기관의 보존 온도와 온혈허혈시간(Warm ischemic time, 0시간(WIT 0), 12시간(WIT 12), 24시간(WIT 24))과 recombinant insulin growth factor-1 (IGF-1, Sigma, St. Luis, MO, USA) 처리 여부에 따라 다음과 같이 분류하였고 각각의 연구군은 학습효과를 배제하기 위해 비순차적인 순서로 실험을 진행하였다.

I군(대조군): 보존도, 아무 처리도 하지 않은 기관을 사용한 군

II군(노출군): 냉동이나 해동, 보존은 하지 않고 동해 방지제(cryoprotective agent)인 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Luis, MO, USA)에 순차적으로 첨가하였다가 순차적으로 제거한 군 (0%-2.5%-5%-7.5%-10%-7.5%-5%-2.5%-0%)

III군(4°C군): 온혈허혈시간 및 IGF-1 처리 후 4°C에 보관한 군

III-WIT(-)군: 온혈허혈시간 후 IGF-1 없이 4°C에 보관

Table 1. Design of experiment

Group I (Control)		Group II (DMSO exposure)		
		WIT 0	WIT 12	WIT 24
Group III (4°C)	IGF-1(+)	III-0(+)	III-12(+)	III-24(+)
	IGF-1(-)	III-0(-)	III-12(-)	III-24(-)
Group IV (-80°C)	IGF-1(+)	IV-0(+)	IV-12(+)	IV-24(+)
	IGF-1(-)	IV-0(-)	IV-12(-)	IV-24(-)
Group V (-196°C)	IGF-1(+)	V-0(+)	V-12(+)	V-24(+)
	IGF-1(-)	V-0(-)	V-12(-)	V-24(-)

*=Tracheal segments in each experimental group; N=5. WIT= Warm ischemic time; IGF-1=Recombinant insulin growth factor-1.

III-WIT-(+)군: 온혈허혈시간 후 IGF-1 첨가 후 4°C에 보관

IV군(-80°C군): 온혈허혈시간 및 IGF-1 처리 후 -80°C에 보관한 군

IV-WIT(-)군: 온혈허혈시간 후 IGF-1 없이 -80°C에 보관

IV-WIT-(+)군: 온혈허혈시간 및 IGF-1 첨가 후 -80°C에 보관

V군(-196°C군): 온혈허혈시간 및 IGF-1 처리 후 -196°C에 보관한 군

V-WIT(-)군: 온혈허혈시간 및 IGF-1 없이 -196°C에 보관

V-WIT-(+)군: 온혈허혈시간 및 IGF-1 첨가 후 -196°C에 보관

2) 온혈허혈시간 및 기관 획득

SD rat에 과량의 졸레틸(Zoletil® 50, Virbac Lab, France)을 근육 주사하여 희생시킨 뒤 실온에 놓아두었다. 온혈허혈시간이란 심정지부터 보존까지의 시간으로 미리 정해놓은 온혈허혈시간인 0시간, 12시간, 24시간이 지난 뒤 각각 기관 획득을 진행하였다. 수술은 흉골 정중 절개를 한 뒤, 피부 절개를 턱까지 연장하여 성대 부위부터 기관 분지까지 전체 기관을 절제하였다. 기관을 획득한 뒤 육안으로 보이는 기관 주변 혈관 및 섬유조직은 제거하고 항생제인 Penicillin-streptomycin (WelGENE Inc., Daegu, South Korea)과 항진균제 Fungizone (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)이 섞인 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, WelGENE Inc., Daegu, South Korea)으로 수 차례 세척한

Table 2. Comparison of the absorbance of MTT assay for each of the groups

Group I (control)		1.85±0.01		
		WIT 0 hr*	WIT 12 hr*	WIT 24 hr*
Group III* (4°C)	IGF-1(+)* [†]	1.50±0.13	1.42±0.06	1.41±0.14
	IGF-1(-)*	0.79±0.06	0.95±0.08	0.79±0.04
Group IV* [†] (-80°C)	IGF-1(+)* [†]	0.94±0.05	0.06±0.00	0.07±0.00
	IGF-1(-)*	0.20±0.04	0.06±0.01	0.07±0.01
Group V* [†] (-196°C)	IGF-1(+)* [†]	0.91±0.08	0.10±0.02	0.08±0.04
	IGF-1(-)*	0.40±0.06	0.07±0.01	0.06±0.01

Mean±Standard deviation. Group II=Data was not shown. WIT=Warm ischemic time; IGF-1=Recombinant insulin growth factor-1. *p<0.05 compared with control values; [†]p<0.05 compared with Group III; [‡]p<0.05 compared with IGF-1(-).

후 10~12개의 기관 연골을 포함한 1 cm 가량의 기관 절편을 만들었다. 온혈허혈시간과 보존 온도, IGF-1 처리 유무에 따라 분류한 실험군은 다음과 같았고 각각의 실험군에 포함된 기관의 절편 수는 5개씩이었다(Table 1).

3) IGF-1 처리 및 보존 온도, 보관 기간

대조군(I군)과 동해방지제 노출군(II군)은 별도의 보존 기간과 IGF-1 처리 없이 실험을 진행하였고 실험군 중 IGF-1 처리가 필요한 IGF-1(+) 군은 IGF-1을 100 ng/mL의 농도로 냉동 보존액에 같이 첨가한 뒤 각각의 보존 온도인 4°C, -80°C, -196°C에서 보존하였다. 4°C군은 IGF-1 처리 실험 후 바로 4°C에서 보관하였고 -80°C군과 -196°C군은 동해 방지제가 들어가는 냉동 보존 처리가 필요하여 DMSO에 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 최종 보관 농도인 10%까지 각각 10분 동안 순차적으로 DMSO의 농도를 높인 뒤 IGF-1 처리 후 programmed freezer에서 1°C/min씩 -80°C까지 낮춘 뒤 -80°C군은 -80°C에 보존하였고 -196°C군은 액체질소에 보존하였다. 대조군과 노출군을 제외한, 실험군의 보존 기간은 2주였다.

4) 해동

해동은 보관 온도에 상관없이 37°C water bath에서 급속 해동하였다. 해동 후 냉동 보존군인 -80°C군과 -196°C군은 냉동시의 역순으로 DMSO를 제거하였다.

5) 기관을 구성하고 있는 세포(기관 세포)의 채취 및 배양

해동된 기관을 잘게 부순 뒤 type II collagenase (422 unit/mg, Sigma, St. Luis, MO, USA) 1 mg/mL의 농도로 혼합된 배지에서 담고 간간이 흔들어 주며 6시간 동안 37°C,

5% CO₂에서 효소 분해하여 채취하였다. 짧은 원심분리로 각각의 세포를 모은 뒤 10% FBS와 50 µg/mL의 streptomycin과 50 units/mL의 penicillin, 1 µL/mL의 Fungizone을 섞은 DMEM으로 재부양시켜 세포배양용기에 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

6) 세포 생육성 평가

배양 7일 날에 세포 생육성을 MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, St. Luis, MO, USA) reduction assay를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 연구 결과의 처리

각 군의 흡광도는 평균값±표준편차로 표시하였다. 각 군의 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 T-test를 이용하였으며, 사후검정(Tukey's multiple comparison test)을 통해 군 사이 분석을 하였다. 유의확률 0.05 미만일 때 통계적으로 의미 있는 것으로 해석하였다.

결 과

대조군과 실험군의 측정된 흡광도는 다음과 같았다 (Table 2).

먼저 실험군 분류의 기준이 되었던 기관의 보존 온도, 온혈허혈시간과 recombinant insulin growth factor-1 (IGF-1) 처리여부에 따른 전체적인 결과를 살펴 보고 나중에 각각의 실험 요소에 따른 결과를 구체적으로 비교하여 보았다.

1) 기관 세포의 생육성에 대한 동해방지제의 영향

아무 처리를 하지 않은 I군(대조군)의 MTT reduction as-

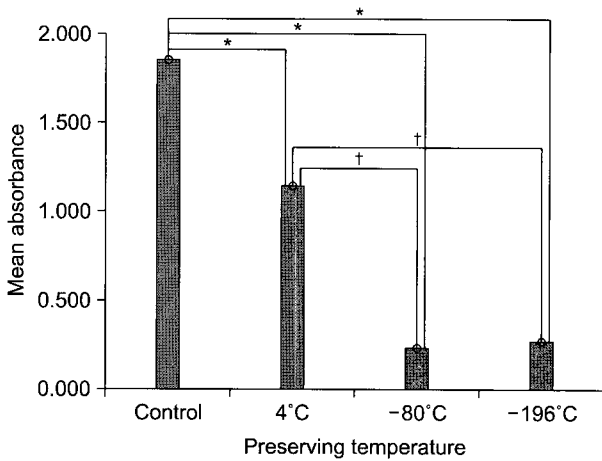


Fig. 1. Effects of preserving temperature (Group III: 4°C, Group IV: -80°C, Group V: -196°C) on trachea viability. Tracheas were preserved for 2 weeks at different temperatures (4°C, -80°C, -196°C). Tracheas were thawed, isolated and cultured for 1 week. Then the viability was analyzed by MTT reduction assay. There were statistical significances among the 3 experimental groups. * $p < 0.05$ compared with control values; † $p < 0.05$ compared with Group III. Mean±Standard deviation; one-way ANOVA statistics.

say의 흡광도는 평균 1.85 ± 0.01 로 측정되었고 동해방지제 노출군인 II군은 1.78 ± 0.06 로 대조군 보다는 낮은 흡광도를 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

2) 기관 세포의 생육성에 대한 보존 온도의 영향

모든 보존 온도에서 기관 세포의 흡광도는 대조군(I군)과 비교하였을 때 낮게 관찰되었으며 III군(4°C 보존군)은 IV군(-80°C 보존군)과 V군(-196°C 보존군)에 비해 전반적으로 높은 흡광도를 보였다. 통계적으로도 대조군과 보존 온도로 구분한 군들 간의 유의한 차이를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 사후검정에서는 4°C 보존군인 III군이 IV군($p=0.00$)과 V군($p=0.00$)에 비해 통계적으로 유의할 정도로 높은 흡광도 수치를 유지하여 더 나은 생육성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었으나 -80°C 보존군과 -196°C 보존군의 흡광도는 비슷한 수치로 차이가 없었다($p > 0.05$) (Fig. 1).

3) 기관 세포의 생육성에 대한 온혈허혈시간의 영향

각각의 온혈허혈시간에 따른 기관 세포의 흡광도는 온혈허혈시간이 긴 군에서 낮게 관찰되었다. 대조군과 비교하였을 시에는 모든 온혈허혈시간군에서 통계적으로 유의할 정도로 낮은 생육성이 관찰되었다($p < 0.05$). 또 온혈

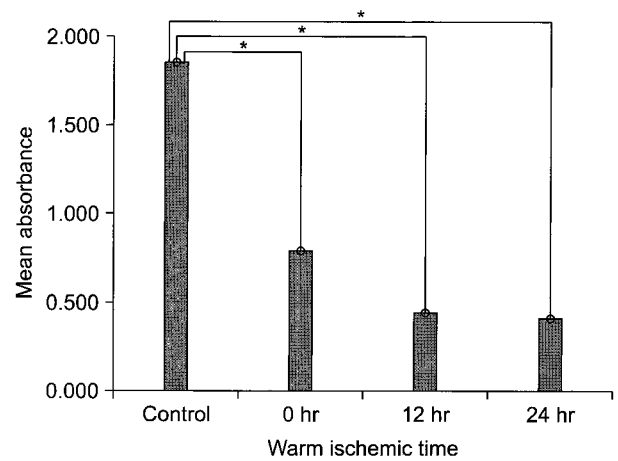


Fig. 2. Effects of warm ischemic time (WIT) on trachea viability. Absorbance was low at the long warm ischemic time group. The difference among the groups of warm ischemic time was not significant. * $p < 0.05$ compared with control group.

허혈시간이 12시간이 넘는 군에서는 기관 세포의 생육성이 급격히 감소하여 매우 낮은 수치로 관찰되었으나 온혈허혈시간이 0시간인 군과 온혈허혈시간이 12시간인 군, 24시간인 군 간에는 통계적으로도 유의한 차이가 관찰되지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 2).

4) 기관 세포의 생육성에 대한 보존액 조성의 영향

일반적으로 이용하고 있는 냉동 보존액과 다르게 보존액에 IGF-1을 첨가하여 변화를 준 군은 대조군에 비해 낮은 생육성을 보였으나($p=0.004$) IGF-1이 첨가되지 않은 냉동 보존액보다는 높은 흡광도를 보여 생육성이 향상된 것을 관찰할 수 있었고 그 결과는 t-test에서도 $p < 0.05$ 로 통계적으로 유의하였다(Fig. 3).

5) 온혈허혈시간 0시간군 내에서 기관 세포의 생육성 비교

일정한 온혈허혈시간 0시간내에서의 기관 세포들의 생육성을 살펴 보았을 때, 보존온도에 상관없이 IGF-1을 첨가하여 보존액의 조성에 변화를 준 군이 변화를 주지 않은 군에 비해 통계학적으로 유의할 정도의 높은 생육성을 보였다($p=0.00$) (Fig. 4).

6) 온혈허혈시간 12시간군 내에서 기관 세포의 생육성 비교

온혈허혈시간 0시간 군의 결과와는 다르게, 온혈허혈시

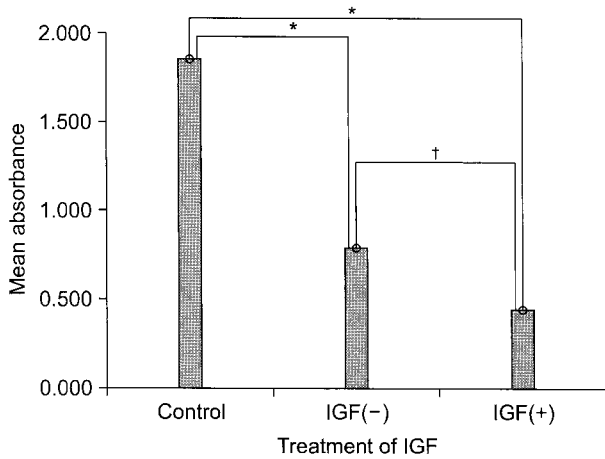


Fig. 3. Cryopreservation solution markedly influences viability of trachea during cryopreservation. Tracheas were stored in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)+fetal bovine serum (FBS)+DMSO with IGF (IGF(+)) or without IGF (IGF(-)). Data presented as mean absorbance at 550 nm. The viability of IGF-1 (+) group is better than IGF-1(-) group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ compared with control group; † $p < 0.05$ compared with IGF-1(-).

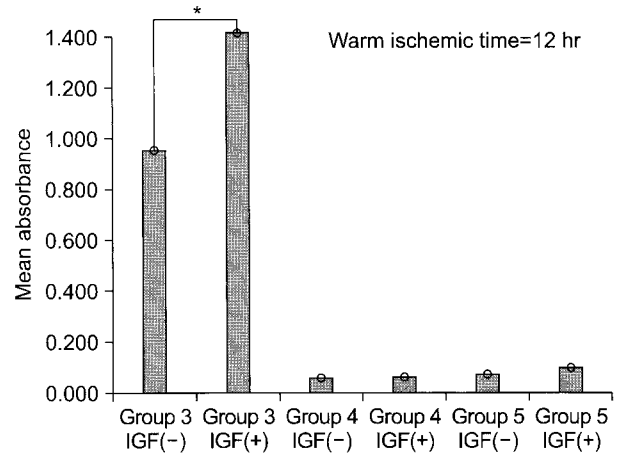


Fig. 5. Comparison of mean absorbance within the group III, IV & V at warm ischemic time 12 hr. Only in the 4°C preserving temperature group (group III), the viability of IGF-1(+) group is better than IGF-1(-) group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ compared with IGF-1(-) group at each preserving temperature.

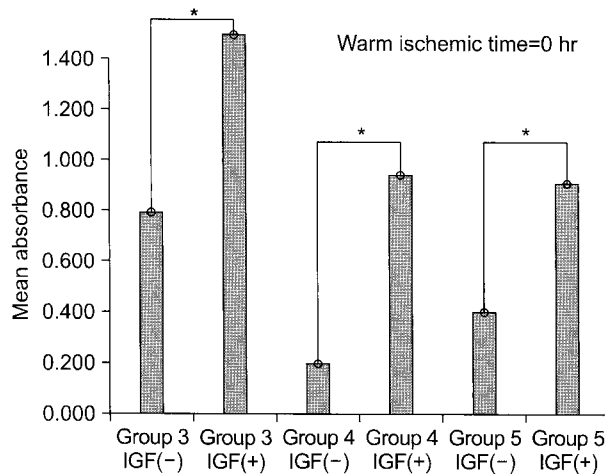


Fig. 4. Comparison of mean absorbance within the group III, IV & V at warm ischemic time 0 hr. Regardless of preserving temperature, the viability of IGF-1(+) group is better than IGF-1(-) group ($p = 0.00$). * $p < 0.05$ compared with IGF-1(-) group at each preserving temperature.

간 12시간인 군에서는 보존온도가 4°C인 군에서만 IGF-1 (+)군이 IGF-1(-)군보다 향상된 생육성이 관찰되었다 ($p = 0.00$). 결과를 명시하지는 않았지만 온혈허혈시간 24시간인 군도 12시간인 군과 마찬가지로 4°C 보존군에서만 IGF-1에 따른 생육성 차이가 관찰되었다(Fig. 5).

7) 4°C 보존군 내에서 기관 세포의 생육성 비교

4°C 보존군에서는 모든 온혈허혈시간군에서 IGF-1을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 좋은 생육성이 보였고 그 결과는 통계적으로도 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 6).

8) -196°C 보존군 내에서 기관 세포의 생육성 비교

-196°C 보존군 내에서 기관 세포의 생육성은 온혈허혈시간이 0시간인 군에서만 IGF-1 첨가에 따른 생육성의 차이가 통계학적으로 유의할 정도로 관찰되었고($p < 0.05$) 나머지 온혈허혈시간 군에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. -80°C 보존군의 결과는 명시하지는 않았지만 -196°C 보존군과 같은 소견을 보였다(Fig. 7).

고 찰

기관절제 및 단단문합술은 기관수술에서 가장 일반적으로 사용되는 방법[10]이나, 종양이나 외상, 또는 선천적인 질환으로 6 cm 이상의 긴 구역의 절제가 필요한 경우에는 곤란하다[11,12]. 이처럼 재건이 필요한 부위가 광범위한 경우에 슬라이딩 기법[13]이나 연골[14] 혹은 심낭[15] 등의 이식 편을 이용하거나 인공기관[16] 등의 방법으로 기관을 재건하여 왔으나, 이식에 이용한 인공 물질이나 조직 편들은 그 자체의 견고성이나 육아조직의 과잉형성,

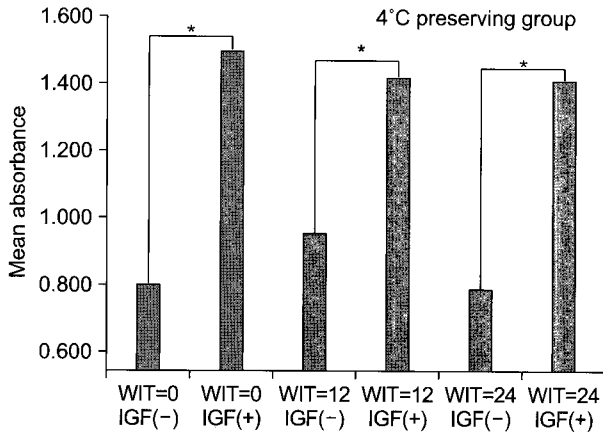


Fig. 6. The viability of trachea at the 4°C preserving group. Regardless of warm ischemic time, the viability of IGF-1(+) group is better than IGF-1(-) group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ compared with IGF-1(-) group at each warm ischemic time.

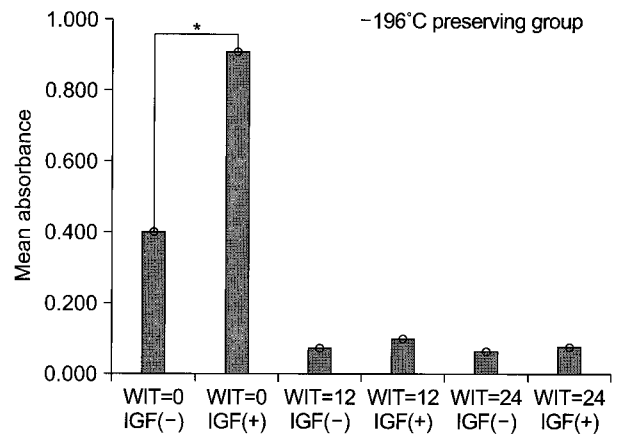


Fig. 7. The viability of trachea at the -196°C preserving group. Only in the group of warm ischemic time 0 hr, the viability of IGF-1(+) group is better than IGF-1(-) group ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ compared with IGF-1(-) group at each warm ischemic time.

위치 이동, 혹은 이식한 기관 조직편의 허혈성 변형 등으로 성공적인 결과를 얻지 못해 왔다[10].

이에 여러 연구자들은 기관의 동종이식을 대안으로 생각하였으나, 무처리 기관 이식편(fresh allograft)은 급성 이식편의 거부 반응에 의한 기도 협착과 폐쇄로 번번이 실패하였다[12]. 따라서 이를 해결하기 위하여 면역 억제제 [17]를 사용하여 급성 이식편의 거부 반응을 줄이고자 하였으며, 또한 이식 전 방사선조사[18]로 이식의 성공률을 높일 수 있었다. 그러나 불행하게도 기관 이식이 필요한 대부분의 대상자들은 악성종양을 가지고 있는 경우가 많아 수술 후 면역 억제제를 사용할 수가 없어 기관 이식은 활발히 이용될 수 없었다. 그 후 많은 연구들[19,20]에서 냉동보존이 동종이식편의 항원성을 감소시킨다는 보고가 다른 장기들의 냉동보존에서 밝혀져 기관이식에 적용하게 되었다.

냉동보존방법은 생체 적합 물질을 어느 정도의 기간 동안 액체질소에 보관하기에 앞서 일정한 농도의 동해방지제와 온도를 통제하는 과정으로 얼려 보존하는 방법[21]으로, 이 기술의 발달로 오랜 기간 장기를 보존할 수 있게 되었고, 또한 이식편의 항원성도 충분히 낮출 수 있게 되어[12] 이제는 냉동보존된 조직의 내구성과 기능에 관심을 가지게 되었다. 일반적으로 기관의 냉동보존은 동해방지제로 Dimethyl sulfoxide (DMSO)나 glycerol을 이용하여 분당 1~5°C의 속도로 -80~-100°C까지 서서히 온도를 내리는 방법을 이용하는데, Lange와 Hopkins는 분당 1°C의 속도로 온도를 낮추는 것이 냉동과정에서 발생할 수 있는

잠열의 결정형성을 피할 수 있는 가장 적당한 속도라 제안하였었다[22]. 이에 의거하여 본 연구에서도 분당 1°C의 속도로 냉동과정을 진행하여 결정 형성[23]을 최대한 피하였고, 동해방지제로 DMSO를 이용하였다. 동해방지를 막기 위해 이용되는 동해방지제 또한 세포의 생육성을 감소시키는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

냉동보존 동안에 발생하는 조직의 손상은 냉동과정과 조직 사용 전 해동하는 과정에서의 탈수와 세포내 얼음 결정 형성(intracellular ice crystallization)으로 일어나며, 대부분의 손상이 0~-60°C 사이에서 발생하여 이 온도구간을 “the risky temperature range”라고 부른다[21]. 본 연구에서는 기관 조직의 보관 온도를 “risky temperature”의 영향을 받지 않는 4°C와 그 구간의 영향을 받는 -80°C, 그리고 -196°C의 세 가지 온도로 나누어 그 결과를 비교해 보았는데, “risky temperature”를 통과하여 보존했던 -80°C군과 -196°C군에서 그 구간을 통과하지 않은 4°C 보존군보다 더 낮은 생육성이 관찰되어 냉동과 해동과정에서 손상에 인한 것으로 생각되었으며, 이로 인한 세포 손상으로 인해 4°C 보존군에서는 관찰되었던 IGF-1 효과가 -80°C군과 -196°C군의 온혈허혈시간 12시간과 24시간군에서는 관찰되지 않았던 것으로 생각되었다.

기관 이식편의 기능과 내구성에 영향을 주는 것은 냉동보존된 기관의 생육성[24]으로 기관 조직의 생육성에 관여하는 요소는 많지만, 그 중 기관의 연골세포가 기관의

동종이식 시 가장 중요한 부분이라고 밝히고 있다[25]. 기관의 생육성을 확인할 수 있는 방법에는 광학현미경을 이용하여 병리조직학 소견을 관찰하는 방법과 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 동위원소 편입을 이용하는 방법[26], 그리고 apoptosis를 확인하는 TUNEL 방법[27] 등이 있는데, 본 연구에서는 이미 여러 세포들의 생육성과 연관된, 많은 실험에서 이용되었고 또 여러 가지 세포들의 세포독성을 확인하는데도 널리 이용되는 MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) reduction assay[28]를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTT reduction assay는 활발하게 활동하는 세포들에 의해서, 노란색을 띠는 수용성의 tetrazolium salt가 보라색을 띠는 MTT formazan으로 변화되며 MTT가 감소하는 것을 측정하는 방법으로, 분광광도계에 의해 감지된 formazan의 양은 사립체(mitochondria)의 수를 반영하여 이것은 곧 살아있는 세포의 수를 반영하게 되어 분광광도계에서 측정된 수치의 차이는 곧 세포숫자가 차이를 의미하므로 쉽고 빠르게 주관적인 결과 해석으로 인한 오류를 줄일 수 있는 장점을 가지고 있어, 동위원소를 이용하기 때문에 과정이 어렵고 복잡한 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 동위원소 편입 방법과 주관적인 해석이 포함될 수 있는 TUNEL 방법, 그리고 광학현미경을 통한 병리조직학적 소견을 관찰하는 방법보다 유리하다고 생각되었다.

비록 연구들마다 그 결과는 차이가 매우 크지만 기관 생육성에 가장 중요한 부분인 연골세포의 생육성은 냉동 보존 기간이 길수록 감소하며, 그 감소 속도는 보존액의 조성에 영향을 받아 보다 좋은 영양물질을 가지고 있는 배양액에서는 연골의 생육성이 좋아지는 것으로 알려져 있다[29]. 일반적으로 기관 조직의 냉동 보존액은 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)이나 RPMI1640에 fetal bovine serum (FBS), 동해방지제인 DMSO를 첨가하여 보존액으로 사용하고 있다. 이에 본 저자들은 기관을 이루는 여러 세포들 중 하나인 연골세포의 생육성을 향상시켜 기관 전체의 생육성을 향상시키고자 recombinant insulin growth factor-1 (IGF-1)을 배양액에 첨가하였다. 냉동 보존액에 첨가한 IGF-1은 정상 연골세포에서 만들어지는 강력한 연골간질합성의 활성제[30]로, 동화작용을 관여하는 주 인자이며 또한 연골세포의 programmed cell death를 금지시켜 연골세포의 사망을 줄이는 물질로 알려진 매력적인 물질[29]로, 이미 정형외과 분야에서는 골연골 이식편의 생육성을 높이기 위해 이용되고 있다.

본 연구에서 IGF-1은 기관 세포들 중 연골세포의 생육성을 향상시켜 기존의 보존액보다 좋은 생육성의 결과를

얻었으며, 이 결과는 영양물질이 풍부한 배양액에서는 세포의 생육성이 좋아진다는 연구 결과와 일치하는 결과이었다. 기존 연구에서 관찰되었듯이 4°C 보존군에서는 모든 실험 온혈허혈시간에서 유의할 정도의 생육성 향상을 보였고, -80°C 보존군과 -196°C 보존군에서는 온혈허혈시간이 0시간인 군에서만 IGF-1의 효과가 관찰되었다. 그 동안의 여러 연구에서는 4°C 보존시의 결과만 존재하였는데 -80°C와 -196°C에서도 IGF-1가 연골 생육성을 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

또 다른 실험 인자였던 온혈허혈시간은 4°C 보존군을 제외한, -80°C 보존군과 -196°C 보존군에서 기관 세포의 생육성을 감소시켰다. 발표되었던 여러 논문들에서는 온혈허혈시간이 기관의 생육성에 많은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 통계적인 유의성을 얻지 못하였고 4°C 보존군에서는 온혈허혈시간에 따른 온혈허혈손상도 관찰되지 않았다. -80°C 보존군과 -196°C 보존군에서는 온혈허혈시간 12시간과 24시간에서 생육성이 급격하게 감소되는 것이 관찰되었는데, 이는 기존 연구들에서 관찰된 소견과 비슷한 결과였다. 급격한 변화가 일어나는 것으로 생각되는 온혈허혈시간 0시간에서부터 12시간까지의 변화와 다른 연구와 다르게 4°C 보존군에서는 온혈허혈손상이 관찰되지 않은 것에 대해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구는 사람의 기관이 아닌, 쥐의 기관을 이용하여 기관을 구성하고 있는 세포의 기능을 배제한 채 세포의 생육성만을 확인한 한계를 가지고 있지만, 오랜 기간의 보존을 위한 냉동보존과 심정지로부터 냉동보존까지의 온혈허혈시간이 기관 세포의 생육성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 한편으로는 이렇게 감소될 수 밖에 없는 기관 세포들의 생육성을 IGF-1을 보존액에 첨가하여 조성을 변화시킴으로써, 4°C 보존군 뿐만 아니라 -80°C, -196°C 보존군에서도 더 나은 생육성을 유지할 수 있다는 것을 새롭게 확인할 수 있어, 냉동 보존된 기관의 임상적 적용에 기여할 수 있을 것으로 생각되었다.

결 론

기관 이식을 위해 기관 채취 및 보존과정에서 발생하는 온혈허혈시간과 냉동보존은 기관 세포들의 생육성을 감소시켰고 IGF-1을 첨가한 냉동 보존액은 온혈허혈시간이 0시간일 때와 4°C 보존군에서 기관 세포들의 생육성을 향상시킴을 관찰할 수 있었다. 그러나 이번 실험은 단기간

의 보존 후 관찰된 결과로 장기간의 보존 후에는 어떠한 영향을 미칠지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. *Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction*. Ann Thorac Surg 2001;72:577-91.
2. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, et al. *Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: Experiment in dogs*. Ann Thorac Surg 1998;66:209-13.
3. Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville PH. *Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method*. Eur J Cardiothorac Surg 1993;7:648-52.
4. Sakata J, Vacanti CA, Schloo B, Healy GB, Langer R, Vacanti JP. *Tracheal composites tissue engineered from chondrocytes, tracheal epithelial cells, and synthetic degradable scaffolding*. Transplantation Proc 1994;26:3309-10.
5. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Neju K, Kawachi K, Kitamura S. *Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation: Canine experiment*. Transplantation Proc 1996;28:1814-5.
6. Kirklin JK, Smith D, Novick W, et al. *Long-term function of cryopreserved aortic homografts: a ten-year study*. J Thorac Cardiovasc Surg 1993;106:154-66.
7. Herman DB, Koudstaal J. *The fate of meniscus cartilage after transplantation of cryopreserved non-tissue-antigen-matched allograft: a case report*. Clin Orthop 1991;266:145-51.
8. Hartog JM, Slavin AB, Kline SN. *Reconstruction of the temporomandibular joint with cryopreserved cartilage and freeze-dried dura: a preliminary report*. J Oral Maxillofac Surg 1990;48:919-25.
9. Yokomise H, Inui K, Wada H, Hasegawa S, Ohno N, Hitomi S. *Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution*. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:382-5.
10. Aoki T, Yamato Y, Tsuchida M, et al. *Successful tracheal transplantation using cryopreserved allografts in a rat model*. Eur J Cardiothorac Surg 1999;16:169-73.
11. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, et al. *Experimental study of tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1998;116:262-6.
12. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. *Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts*. Ann Thorac Surg 2000;69:1701-6.
13. Lang FJ, Humi M, Monnier P. *Long segment congenital tracheal stenosis: treatment by slide tracheoplasty*. J Pediatr Surg 1999;34:1216-22.
14. deLorimier AA, Harrison MR, Hardy K, Howell LJ, Adzick NS. *Tracheobronchial obstruction in infants and children. Experience with 45 cases*. Ann Surg 1990;212:277-89.
15. Bando K, Turrentine MW, Sun K, et al. *Anterior pericardial tracheoplasty for congenital tracheal stenosis: intermediate to long-term outcomes*. Ann Thorac Surg 1996;62:981-9.
16. Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. *Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage*. J Pediatr Surg 1994;29:201-5.
17. Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. *Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression*. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;121:241-8.
18. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. *High-dose irradiation prevents rejection of canine tracheal allografts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1994;107:1391-7.
19. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. *Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability*. J Thorac Cardiovasc Surg 1996;111:930-4.
20. Ingham E, Matthews JB, Kearney JN, Gowland G. *The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin grafts*. Cryobiology 1993;30:443-58.
21. Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, et al. *Cryopreserved tracheal grafts: a review of the literature*. J Invest Surg 2006;19:125-35.
22. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. *Maximal period of cryopreservation with the bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117:1070-6.
23. Mabrut JY, Adham M, Bourgeot J, et al. *Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: An opportunity for tracheal tissue banking*. Transplantation Proc 2001;33:609-11.
24. Kushibe K, Takahama M, Nezu K, Tanicuchi S. *Assessment of cartilage viability in long-term cryopreserved tracheal allografts*. Transplantation Proc 2001;33:625-6.
25. Lim CY, Hong EK. *Flow cytometric analysis of endothelial cell viability in arterial allograft*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1997;30:553-8.
26. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, et al. *Assessment of cartilage viability in the cryopreserved tracheal allograft by measurement of $Na_2^{35}SO_4$ incorporation*. Transplantation Proc 2000;32:1655-6.
27. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, et al. *In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: Improvement and evaluation on cell preparations*. J Histochem Cytochem 1996;44:959-68.
28. Aziz DM. *Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay*. Anim Reprod Sci 2006;92:1-8.
29. Teng MS, Yuen AS, Kim HT. *Enhancing osteochondral allograft viability: effects of storage media composition*. Clin Orthop Relat Res 2008;466:1804-9.

30. Carlos AA, Inigo I, Purificacion R, Francisco F. *Cell viability and protein composition in cryopreserved cartilage.*

Clin Orthop Relat Res 2007;460:234-9.

=국문 초록=

배경: 기관재건술은 제한된 경우에서만 뚜렷한 효과를 얻을 수 있어 광범위한 기관절제술 후의 기관 재건술은 아직 의학적으로 해결되지 못하고 있는 난제들 중의 하나로 남아 있다. 이 어려운 문제를 해결하기 위한 방법으로 냉동 보존된 기관을 이용하여 기관을 재건하려는 노력이 이루어지고 있다. 냉동 보존된 기관을 이용한 재건에서는 수술의 성공 여부에 가장 중요한 결정인자가 바로 기관의 생육성이다. 이에 저자들은 기관의 냉동 보존 시 냉동 보존액의 조성 및 온혈허혈시간의 정도에 따른 차이, 그리고 보존온도의 정도에 따른 차이로 기관연골의 생육성의 차이를 비교 검토하여, 보다 나은 냉동 보존방법을 알아보려고 하였다. 대상 및 방법: 정해진 온혈허혈시간(0시간, 12시간, 24시간)의 경과 후 쥐의 기관을 채취하여, recombinant insulin growth factor-1 (IGF-1)을 처리하고 3가지의 보존 온도(4°C, -80°C, -196°C)에서 2주간 보존하였다. 보존 후 해동하여 type II collagenase 효소를 이용하여 기관의 세포를 채취하였다. 채취한 세포를 7일간 배양한 뒤 MTT reduction assay를 이용하여 각 군의 기관 세포의 생육성을 비교하였다. 결과: 기관을 오랜 기간 보존하기 위해서는 냉동 보존은 필요하지만, -80°C와 -196°C에서의 냉동 보존은 대조군과 4°C 보존군에 비해 통계적으로 유의할 정도로 기관의 생육성을 감소시키는 것으로 관찰되었고, 12시간과 24시간의 온혈허혈시간도 온혈허혈시간 0시간 군에 비해 기관의 생육성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. IGF-1을 첨가한 냉동 보존액은 기존의 냉동 보존액보다 기관의 생육성을 향상시키는 것을 확인할 수 있었고, IGF-1로 인한 생육성 향상은 4°C 보존군에서는 모든 온혈허혈시간에서, 온혈허혈시간 0시간 군에서는 모든 보존온도에서 관찰되었다. 결론: 온혈허혈시간을 최대한 줄이며 냉동 보존액에 IGF-1을 첨가하여 보존액의 조성을 조정함으로써, 냉동 보존 시 보다 나은 기관의 생육성을 유지할 수 있을 것으로 판단되었다.

- 중심 단어 : 1. 기관
2. 생육성
3. 냉동 보존
4. 온도