

## 실험동물 잡견 기도의 장기간 보존을 위한 냉동보관법의 효과\*

성 속 환\*\* · 박 성 희\*\*\*

— Abstract —

### The Effect of Cryopreservation to Maintain Long-term Storage on Canine Trachea\*

Sook Whan Sung, M.D.<sup>1)</sup>, Seong Heo Park, M.D.<sup>2)</sup>

This study was designed to evaluate the viability of canine trachea after cryopreservation for two months. Eight cervical tracheal rings were resected in three dogs and both ends were anastomosed. The resected tracheal segments were cryopreserved and stored in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  for two months.

Two months later, the cryopreserved segments were thawed. Half of each segment was implanted into the abdomen of its donor animal and the other half was cultured in tissue media. Two weeks later, the animal was sacrificed. The native cervical trachea was removed to serve as a control and the abdominally implanted trachea was removed for study. At that time, both specimens were also cultured in tissue media. Tracheal epithelial viability was assessed histologically by using an inverted microscope. The epithelial cells were confirmed immunohistochemically using monoclonal antibodies against cytokeratin and epithelial membrane antigen.

Control and cryopreserved segments showed good, viable epithelial cells, but the implanted segments showed slightly depressed viability. We conclude that canine tracheal epithelium can survive after cryopreservation for two months, but the implanted trachea will be slightly damaged by ischemia before revascularization, even if omental wrapping is used.

## 서 론

새로운 면역억제제 사이클로스포린<sup>1)</sup> 개발이후 장기

이식에 대한 관심이 고조되고 있으며, 각 장기의 질환이 난치성이고 말기인 경우의 치료법으로는 이식술이 최선의 방법으로 되어있다. 현재 신장, 심장, 간, 폐, 췌장, 소장, 뼈, 각막 등 수 많은 신체부분에 대해 장기이식이 활발하게 실시되고 있다.

기도(trachea)의 질환은 대부분 국한되어 있어 병변을 절제후 그릴로<sup>2)</sup> 등에 의한 직접문합방법으로 치료될 수 있다. 그러나 손상부위 길이가 전체 기도의 반 이상, 약 6cm이상인 경우는 대용물을 사용해야한다. 임상에서 이러한 경우는 흔하지 않으나 가끔 종양 혹은 선천성 질환 혹은 염증성 질환으로 상당한 부분

\* 본 논문은 1989년도 문교부지원 학술진흥재단의 신진교수 학술연구 조성비 일부 보조로 연구되었음

\*\*서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

\*\*\*서울대학교 의과대학 병리과학교실

\*\*\*Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University  
1991년 5월 20일 접수

의 기도 절제가 필요한 경우에 부딪히게 된다.

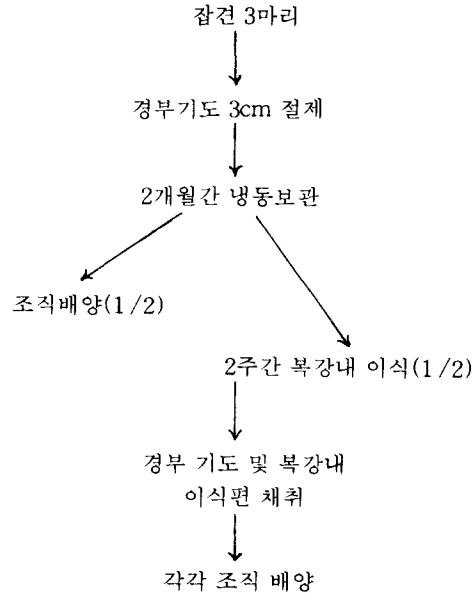
기도 대용물로는 인조물질(prosthesis)과 조직편(tissue graft) 두 가지를 생각할 수 있다. 인조물질<sup>3)</sup>은 염증, 폐쇄, 주위 혈관손상 등의 심한 합병증때문에 좋은 대체기관이 될 수 없다. 조직편 즉 장기이식은 일반 타 장기의 이식술 보편화에 힘입어 세계적으로 연구가 진행되고 있으며 좋은 결과를 보여주고 있다. 기도 이식술이 현실화되어 임상 적용이 가능하게 되면 타 장기이식과 마찬가지로 공여장기 숫자의 절대 부족으로 한계에 도달하게 된다<sup>4)</sup>. 이를 타개하기 위한 한 가지 방법은 장기를 오랫동안 보존하는 것이다. 저자는 타 조직에 사용하고 있는 장기간 보존이 가능한 냉동보관법<sup>5)</sup>이 실험동물 기도 조직편에 어떠한 영향을 미치는가를 조직배양법을 이용하여 연구하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 대상 및 수술

전신적 건강상태가 양호한 생후 2개월가량된 잡견 3마리를 케타민 10mg/kg 근주로 진정을 유도하고 펜토탈 25mg/kg를 정주하여 마취시켰다. 기도내 삽관은 실시하지 않고 자가호흡을 유지시켜며 멸균기법으로 수술하였다.

일차 수술로 경부기도(cervical trachea)를 3cm가량(8개 연골고리) 절제하여 생리식염수로 잘 씻은 다음 냉동보관액에 담귀 냉동시켰다. 양측 절단된 기도는 5-0 prolene 봉합사로 단단문합하였다. 창상 감염방지를 위해 술후 5일까지 항생제를 투여하였고 2개월가량 계속 사육하였다. 제 이차 수술은 2개월 경과된 후 같은 방법으로 전신마취하여 실시하였다. 냉동보관된 기도 조직편을 녹여서 반은 같은 공여동물 복강내 심어서 조직이 살아있는가 조사하였다. 이때 혈액공급 재개를 도와주기 위해 대망막으로 기도 조직편을 둘러쌌다. 나머지 반은 냉동보관군으로 조직배양하여 생명력을 관찰하였다. 모든 동물은 이차수술후 2주 지난 다음 희생시켜 경부 정상 기도 일부와 복강내 이식했던 기도 조직편을 채취하여 각각 정상군, 이식군으로 명칭하고 냉동보관군과 같은 방법으로 조직배양하였다(도식 1).



도식 1. 냉동보관 효과를 조사하기 위한 실험 과정 요약

### 2. 냉동보관법 및 조직배양

#### 배지(media)

10% 우태혈청(fetal calf serum, GIBCO)과 페니실린 100 µg/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml 그리고 글루타민 300 µg/ml이 포함된 RPMI 1640(GIBCO) 배지를 섞어 조직배양액으로 사용하였다. 냉동보관액은 우태혈청 50%, RPMI 1640 배지 40% 그리고 냉동보호액(cryoprotectant)인 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 10%되게 혼합된 용액을 사용하였다.

#### 냉동보관법(cryopreservation) 및 녹힘(thawing)

절제한 기도 조직편을 10% DMSO가 포함된 냉동보관액에 넣은후 분당 약 1℃씩 감온될 수 있도록 4℃ 냉장고에 1시간, -20℃, 냉동고에 1시간 그리고 -70℃ deep freezer(Foma Scientific)에 밤새 보관하여 냉동시키고 그 다음날 -196℃ 액체질소통에 옮겨 2개월간 보관하였다.

냉동보관되었던 조직의 녹힘은 용기체로 37℃ 생리식염수에 담구어 급속히 녹인다. 기도 조직편에 남아있는 DMSO 제거를 위해 처음 DMSO가 5%인 배지용액에, 다음은 DMSO가 없는 배지용액에 각각 5분가량 씻어서 제거하였다.

### 배양조직의 분리

Coleman<sup>6)</sup>, Welsh<sup>7)</sup> 및 Schumann<sup>8)</sup> 등이 사용한 방법을 기본으로 사용하였다. 기도의 내면을 세로로 길게 칼로 자르고 양쪽끝을 검자로 잡은후 내면 조직을 연골에서 박리하였다. 얻어진 상피조각을 3×3mm 정도되게 잘게 자른후 지름 10cm의 페트리접시에 넣어 부착시켰다. 이때 배양액은 극소량인 상태로하여 실온에 4시간 방치하여 조직을 충분히 부착시킨후 배양액을 첨가하였다. 연골을 포함한 전체조직을 잘게 잘라서 마찬가지로 배양하였다.

### 일차배양(primary culture)<sup>9)</sup>

작은 절편으로 페트리접시에 부착된 조직들을 5ml의 배양액이 첨가된 상태로 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 유지되는 배양기에 보관하여 배양시켰다. 도립현미경(inverted microscope)으로 배양되는 정도를 자주 관찰하였다. 48시간 경과후 비부착세포 및 조직을 제거하였고 신선한 배양액을 다시 첨가하였다. 이후 일주일에 2회정도 배양액을 교환하여 주었다.

### 3. 면역조직화학염색(immunohistochemical stain)

배양된 세포가 상피세포임을 확인하기 위해 면역조직화학염색법<sup>10)</sup>을 사용하였다. 기본적으로 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)에 의한 immunoperoxidase 염색법을 이용하였다. 일차배양된 세포들을 0.25% trypsin/EDTA 용액과 처리하여 유리시켰다. 원심분리법을 이용하여 PBS용액(phosphate buffered saline)으로 2회 수세하였다. 세포들을 원심분리법인 Cytospin(Shandon)을 이용하여 알부민이 덮혀진 유리슬라이드에 부착시켰다. -20℃의 냉 아세톤용액으로 3분간 고정시키고 4℃ PBS용액으로 신속히 수세하며 공기중에서 건조시켰다.

일차항체로 1/50비율로 희석된 Cytokeratin 및 epithelial membrane antigen에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)를 4℃에서 1시간동안 반응시켰다. 냉 PBS용액으로 3회 수세했다. 다음 이차항체로 biotinylated goat anti-mouse IgG(BioGenex)를 사용 30분간 실온에서 반응시키고 냉 PBS로 3회 수세했다. Peroxidase labeled streptavidin(BioGenex)를 20분간 처리한후 다시 냉 PBS로 3회 수세했다. 이후 기질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aminoethylcarbazole(AEC, Zymed Lab) 용액을 도포한후 20분간 반응시키고 PBS로 수세했다. Mayer's hemotoxylin을 10분간 처리하여 대

조염색을 시행한후 80% glycerol gelatin 으로 염색부분을 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

기도 조직의 냉동보관법에 대한 생존력(viability)을 확인하는 방법으로 기도상피세포(tracheal epithelial cell)의 생존력을 기준으로 기도조직을 일차배양하여 살펴보았다. 실험동물 3마리중 1마리는 일차수술후 사육도중 영양상태 불량으로 죽어 나머지 2마리의 기도 조직편으로 연구하였다. I 군은 정상기도, II 군은 2개월간 냉동보관된 기도조직, III 군은 2개월간 냉동보관후 복강내 2주간 이식되었던 기도조직으로 삼았고 각 군당 2개씩 기도조직을 대상으로 하였다.

### 육안소견

2개월간 냉동보관후 복강내 대망막으로 둘러싸 2주간 이식한 III 군의 2개 기도조직은 정상 기도조직과 비슷한 등그스런 형태를 유지하였으나, 일부는 찌그러져 있어서 일부분의 연골 흡수(absorbtion)현상을 의심케 하였다.

### 일차배양

I 군(정상 기도조직) 및 II 군(냉동보관 기도조직)의 일차배양 결과는 II 군의 기관상피세포의 성장속도가 조금 늦어진 점을 제외하면 거의 차이를 발견할 수 없었다. 부착된 조직의 가장자리에서 48시간 경과후부터 다각형 및 원형의 밀접히 달라붙어있는 세포군의 증식이 관찰되기 시작하였으며(그림 1), 7일경에 이르

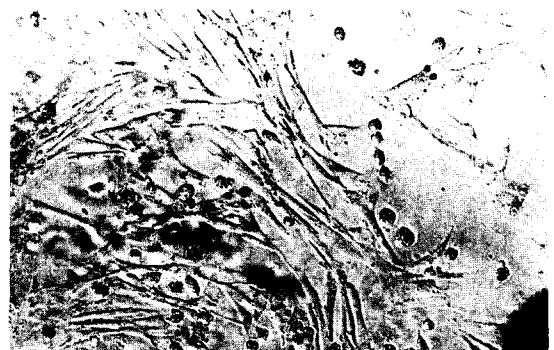


그림 1. 기도 상피세포의 일차배양한 48시간후 Phase contrast 현미경 사진, 다각형 및 원형의 세포군 증식이 관찰되기 시작한다(×100).

러서는 조직편의 주위를 완전히 둘러싸는 모자이크 양상 혹은 조약돌 양상을 나타내었다(그림 2). 일부의 세포에서는 섬모(cilia)로 생각되는 구조물이 관찰되었고 점액(mucin)을 생성하는 세포로 생각되는 거품을 품고있는 세포들이 현저히 밀집된 부위도 있었다(그림 3). 10일경부터는 방추형의 섬유아세포 증식이 곳곳에서 관찰되었으며(그림 4), 이들의 증식속도는 상피세포들보다 월등히 빨라서 14일경의 단층세포층이 다덮고 있을때는 이미 방추형세포의 비율이 40%에 육박하였다.

Ⅲ군 복강내 이식되었던 기도조직편은 일차배양초기부터 다각형의 세포보다는 방추형의 세포가 훨씬 많이 관찰되었고 7일경에는 대부분 방추형세포로 단층세포층을 형성하였다(그림 5). 또한 배양시 배양액상층에 기름방울이 관찰되었으며 이는 계대배양때에도 마찬가지였으며 대망막세포가 일부 배양된 것으로 생각되었다.

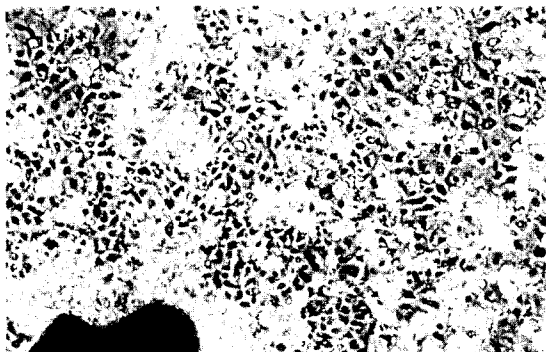


그림 2. 일차 배양 7일경으로 모자이크 양상 혹은 조약돌 양상을 보인다(×100).

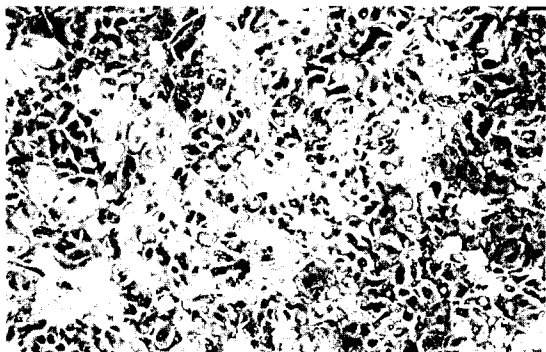


그림 3. 거품을 품고있는 커다란 상피세포와 혼합된 기도 상피세포의 밀집된 단층세포층을 이루었다(×200).

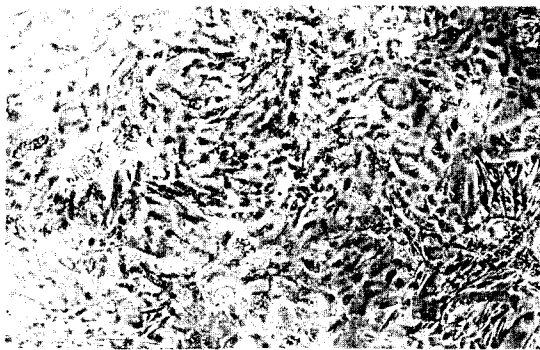


그림 4. 밀차배양 10일경으로, 밀집된 단층세포층에 방추형 섬유아세포 증식이 두 군데 보인다(×100).

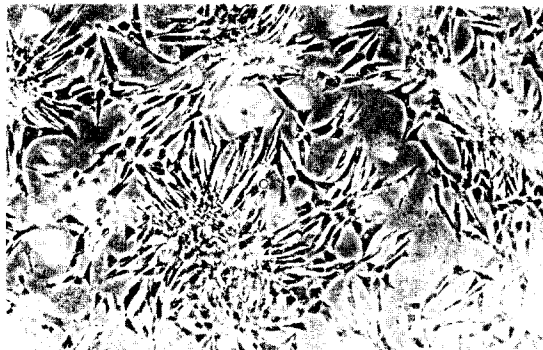


그림 5. 복강내 이식된 기도조직의 일차배양 7일경으로, 대부분 방추형세포로 단층세포층이 형성되었다(×100).

#### 상피세포의 확인

조직배양때 보이는 모자이크 양상 혹은 조약돌 양상 세포가 상피세포임을 확인하기위해, 일반적 상피세포에 상존하는 cytoskeleton인 cytokeraton과 epithelial membrane antigen에 대한 단일클론항체를 이용하여 immunoperoxidase염색을 시행하여 상피세포임을 증명하였다. 염색이 되지 않은 세포는 섬유아세포로 해석하였다. 일차 배양에 있어서는 I, II군에서 두가지 방법 모두 90%이상의 양성율을 보였다. Ⅲ군은 60%정도의 양성율을 나타내었다.

#### 기 타

상피조직편이 아닌 연골이 포함된 전체 조직편을 이용하여 일차배양을 시도하였는데 상피세포의 비율은 초기에 비슷하였으나 섬유아세포의 증식이 상피조직편을 이용한 경우보다 일찍 나타났다. 연골세포(chon-

ndrocyte)의 증식은 일상의 일차배양에서는 관찰되지 않았다.

## 고 안

기도질환의 외과적 치료법은 1946년 Gebauer<sup>11)</sup>가 처음으로 임상적 기관지 절제 수술에 성공하였으며 Grillo<sup>12)</sup> 등에 의해 절제수술 기법 및 치료원칙이 정립되었다. 그러나 기관지 절제후 직접 단단문합술은 그 길이가 한정되어 기도 전체 길이의 반 정도, 약 6.4cm 까지만 허용되어, 그보다 기도가 더 길게 침범된 경우 적절한 대용물이 없어 고식적인 치료법에 의존하고 있다. 대용물로는 인조물질과 조직 두 가지가 있으며 현재까지 어느쪽도 좋은 결과를 얻을 수 없어 이에 대한 연구가 절실히 요구된다.

인조물질로는 Belsey<sup>12)</sup>가 1950년 처음 fascia lata를 입힌 steel wire ring으로 시도한 뒤 여러가지 인조물질에 대해 연구가 있었다. 그 중 결과가 제일 나은 것은 Neville<sup>3)</sup>이 고안한 것으로 생체에 반응이 비교적 적은 silastic 원통을 만들어 기도대체수술을 환자에 실시하였다. 일부 환자는 장기간 생존하였으나 대부분 이종물질에 대한 합병증으로 실패하였다. 나열하면 육안종에 의한 협착, 주위 혈관 손상, 위치변동 등이었다. 따라서 Neville의 인조기도물질 또한 만족한 대체물질이라 할 수 없다.

다른 기도 대용물인 조직편에 대한 연구는 타 장기처럼 요구성이 절박하지 않아 활발하지는 않았다. 과거의 실험들의 성적은 좋지 않았는데 그 이유는 거부반응과 혈액공급에 대해 별로 관심을 기울이지 않았기 때문이다. 기도 조직은 중요한 조직부적합성(histoincompatibility)이 있어도 거부반응이 미약하다는 보고<sup>13)</sup>도 있지만 상반된 보고<sup>14,15)</sup>가 더 많이 있어, 이식후 타 장기와 마찬가지로 면역억제제를 사용하여야 된다. 근대 강력한 약제들의 사용으로 거부반응 빈도가 줄어들고 정도도 약해지리라 생각된다.

혈액공급재개 측면에서 보면 Morgan<sup>16)</sup>, Moriyama<sup>17)</sup>, Date<sup>24)</sup> 등은 대망막으로 기도조직을 감싸줌으로 부행혈류를 빠른시일내에 재개시켜 이식후 허혈성 변성을 방지할 수 있었다. 물론 Balderman<sup>18)</sup> 등의 부정적 견해도 있다.

이러한 측면에서 기도조직의 장기간 보존 가능성을 알아보기 위해, 현재 판막, 혈관, 각막, 정자, 피부, 부

갑상선등에 실시되고 있는 냉동보관법을 기도조직에 적용해볼 적절한 시기라 생각된다.

본 연구에서 실시한 냉동보관법의 자세한 방법은 일반적으로 사용하는 방법을 따랐다<sup>19)</sup>. 냉동보관법에 있어서 중요한 요인은 세가지로 냉동보호액 주입과 제거, 냉동속도 그리고 녹힘속도이다. 냉동보호액(cryoprotectant)으로는 glycerol과 DMSO 두 종류가 있는데 후자를 더 많이 선호하며 농도는 10%로 사용하고 있다. 냉동속도는 세포마다 적절한 범위가 있는데 그 차이가 약 1000배나 된다. 이것은 각 세포의 물에 대한 투과계수와 세포크기에 좌우된다. 조직 및 장기는 수 많은 세포들의 집합체이므로 각 세포들의 적합한 냉동속도를 고려해야되며, 수분의 이동 및 열 발산이 인접해있는 세포나 혈관을 통하므로 냉동속도를 훨씬 더 낮추어야 된다. 지금까지 시행된 연구결과 분당 0.5℃에서 2℃정도 감온시키는 것이 제일 좋은 결과<sup>20)</sup>를 나타냈다. 본 연구에서는 분당 1℃정도 감온되게 냉동온도가 다른 냉동고를 단계별로 사용해 조절하였다.

조직의 생명력 측정방법은 여러가지가 있다. 세포구조물의 형태유지 여부로 가늠하는 광학현미경과 전자현미경검사가 있고, 살아있는 상태에서 측정 가능한 섬모운동 횟수 측정<sup>21)</sup>, 이물질 이동속도, 조직배양이 있으며, 조직을 생체내 이식하여 본래기능을 유지하는가로 단별하는 방법 등이 있다.

본 연구에서는 냉동보관후 생명력을 측정하기 위해 조직배양법을 실시하였고 또한 기도 이식술의 전단계라 할 수 있는 복강내 이식을 한 뒤 다시 조직배양하여 생명력을 이식후에도 계속 유지할 수 있는가 살펴 보았다. 실험결과 냉동보관 기도조직은 정상 기도조직과 비슷한 배양정도를 나타내 냉동보관법 자체가 기도 상피세포의 생명력에 크게 영향을 주지 않으리라 생각된다. 그러나 냉동조직을 녹혀서 같은 동물의 복강내 대망막으로 덮어 이식한 기도조직은 현격히 배양양성율이 감소되어 조직이 그동안 손상받은 것을 입증하였는데, 이는 대망막으로부터 부행혈류가 완성되기 전까지 허혈성 손상을 받았을 것으로 간주된다. Morgan<sup>16)</sup>은 기도조직을 대망막으로 둘러싸 부행혈류 생성시기를 살펴보았는데 이식후 3-4일이 소요되었다. 이는 본 연구 결과를 뒷받침해준다.

기도조직의 형태를 유지시켜 공기의 유출입에 장애가 없도록하는 연골세포의 생사가 기도조직 보존의 중

요한 성분임은 자명하다. 본 연구에서 연골세포가 배양되지 않았는데 두가지 가능성이 있다. 첫번째로, 통상적인 상피세포 배양법으로는 연골세포를 배양하기 어려워 본 실험에서 연골세포가 배양되지 않았을 것으로 생각할 수 있다<sup>9)</sup>. 이는 Bifano<sup>22)</sup>, Sarcha<sup>23)</sup> 등이 동물관절을 냉동보관시킨 뒤 연골세포를 확인한 결과로 유추할 수 있다. 둘째로, 실제로 연골세포가 죽었을 가능성이 있다. 이는 본 실험에서 냉동보관후 복강내 이식된 기도조직의 형태가 조금 변화되었는 것과, Deschamps<sup>21)</sup> 등의 연구 즉 기도조직을 냉동보관한 후 연골이 손상받았음을 보여준 결과로 추정할 수 있다. 따라서 연골세포의 생사여부에 관해서 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

급변 실험의 단기간 성적은 희망적이지만 이것으로 기도조직의 냉동보관법에 대한 효과를 최종적으로 결론짓지 못할 것 같다. 앞으로 장기간 복강내 이식, 연골세포 생명력 확인, 냉동보관후 동종이식실험 등의 단계를 거쳐야 된 것으로 생각된다.

## 결 론

잡견의 경부 기도조직을 2개월간 냉동보관 및 냉동보관후 녹여 복강내 이식후 조직의 생명력을 조직배양 및 면역조직화학염색법으로 조사하였다.

1. 냉동보관법으로 잡견의 기도 상피 세포는 생명력을 계속 유지하였으며 장기간 보존이 가능하였다.
2. 냉동조직을 녹여 복강내 이식한 경우 조직이 허혈성 손상을 조금 받았다.

## REFERENCES

1. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, et al : Cyclosporin ; A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Int Med*, 101:667-82, 1984
2. Grillo HC, Dignan EF, Miura T : Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft : an anatomical study in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 48 : 741-9, 1964
3. Neville WE : Replacement of the trachea. In : Grillo HC, Eschappasse H, eds. *International trends in general thoracic surgery, Vol II*. Philadelphia : WB Saunders, 138-46, 1986

4. Grebenik CR, Hinds CJ. *Management of the multiple organ donor*. *Br J Hosp Med*, 38:62-5, 1987
5. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, 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* 94 : 812-23, 1987
6. Coleman DL, Tuet IK, Widdicombe JH. Electrical properties of dog tracheal epithelial cells grown in monolayer culture. *Am J Physiol* 246 : C355-9, 1984
7. Welsh MJ. Ion transport by primary cultures of canine tracheal epithelium : Methodology, Morphology, and Electrophysiology. *J Membr Biol* 88 : 149-63, 1985
8. Schumann BL, Cody TE, Miller ML, Leikauf GD. Isolation, characterization, and long-term culture of fetal bovine tracheal epithelial cells. In *Vitro Cell Dev Biol* 24 : 211-6, 1988
9. Freshney RI. *Culture of animal cells*. New York : Alan R Liss Inc 1983
10. Chen K, Demetris AJ, Van Thiel DH, Whiteside TL. Double immunoenzyme staining method for analysis of tissue and blood lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Lab Invest* 56 : 114-9, 1987
11. Gebauer PW. Plastic reconstruction of tuberculous bronchostenosis with dermal graft. *J Thorac Surg* 19 : 604-28, 1950
12. Belsey R. Resection and reconstruction of intrathoracic trachea. *Br J Surg* 38 : 200-5, 1950
13. Spinazzole AJ, Graziona JL, Neville WE. Experimental reconstruction of the tracheal carina. *J Thorac Cardiovasc Surg* 58 : 1-13, 1969
14. Biegel A, Muller-Ruchholtz W. Tracheal transplantation : II. Influence of genetic difference and degree of sensitization on reactions to the tracheal transplant. *Arch Otorhinolaryngol* 240 : 217-25, 1984
15. Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Tracheal transplantation : Demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 110 : 149-54, 1990
16. Morgan E, Lime O, Goldberg M, et al : Improved bronchial healing in canine left lung rei-

- mplantation using omental pedicle wrap. J Thorac Cardiovasc Surg 85: 134-9, 1983*
17. Moriyama S, Shimizu N, Teramoto S. *Experimental tracheal allotransplantation using omentopexy. Transplant Proc 21: 2596-600, 1989*
  18. Belderman SC, Weinblatt G, *Tracheal autograft revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg 94: 434-41, 1987*
  19. Groscurth P, Erni M, Balzar M, Peter H, Haselbacher G : *Cryopreservation of human fetal organs. Anat Embryol, 174: 105-13, 1986*
  20. Mazur P. Fundamental cryobiology and the preservationin of organs by freezing. In : *Karrow A Jr, Pegg DE. Organ preservation for transplantation. New York: Marcel Dekker Inc, 143-75, 1981*
  21. Deschamps C, Trastek VF, Ferguson, JL, et al : *Cryopreservation of canine trachea: Functional and histological changes. Ann Thorac Surg, 47: 208-12, 1989*
  22. Bifano CA, Grellner T, Houston G, et al : *Cryogenically preserved adult and juvenile goat mandibular condylar transplantation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 69: 291-8, 1990*
  23. Schachar NS, Mogann LE. : *Investigation of low-temperature storage of articular cartilage for transplantation. Clin Orthop 208: 146-50, 1986*
  24. Date M. *Experimental studies on canine tracheal preservation. Nippon Gaka Gakkai Zasshi, 91: 1740-8, 1990*