

토끼의 대동맥 및 폐동맥 판막 동종이식편의 냉장 및 냉동 보존후 생육성 평가(I)

홍종면* · 노윤우* · 이조한* · 안재호* · 홍장수* · 안혁**

=Abstract=

Viability Assay after 4°C Cold Preservation & Cryopreservation of Aortic & Pulmonic Allograft Valves in Rabbits

Jong Myeon Hong, M.D.*, Yoon Woo Noh, M.D.*, Jo Han Rhee, M.D.*,
Jae Ho Ahn, M.D.*, Jang Soo Hong, M.D.*, Hyuk Ahn, M.D.**

Cardiac valve allografts have been used as replacements for diseased valves and right ventricular outflow tract reconstruction, the long term follow-up of which has been reported satisfactory. For a good long-term result, it is essential that the allograft be viable at implantation.

In this study, we aimed at preparing the cardiac valve allografts aseptically, preserving them at cold- and cryo-conditions, and testing the viability of the allografts after preservation by four methods.

We tested the viability of the cardiac valve allografts preserved in cold refrigerated state(4°C in nutrient media) & in liquid nitrogen tank(cryopreservation under -149°C) for pre-planned time periods. The testing methods were 1) glucose utility test, 2) tissue culture, 3) thymidine uptake test and 4) histologic evidence by light microscopy. We observed no differences in the viability between cold- & cryo-groups and similar results among the methods for testing the viability.

In conclusion, there was no difference in the viability between cold- and cryopreserved-allografts at least for 14 days of preservation. And glucose utility test and thymidine uptake test were satisfactory in the evaluation of the allograft viability, since they were easy and rapid with relatively quantitative results.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 28: 731-41)

Key words : 1. Allograft, heart valve

* 충북대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chungbuk National University Hospital, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju, Korea

** 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

논문접수일: 95년 2월 3일 심사통과일: 95년 4월 4일

통신저자: 홍종면, (360-763) 충북 청주시 개신동 산 62, Tel. (0431) 69-6126, Fax. (0431) 69-6387

서 론

인공 심폐기를 이용한 개심술의 발달과 더불어 인공 판막의 많은 발전에도 불구하고 아직까지 이상적인 대체 판막이 개발되지 못한 상태이다. 그동안 이종 판막을 이용한 조직 판막이나 여러종류의 기계 판막이 사용되어져 왔으나 아직까지는 내구성이나 심내막염, 혈전 등의 여러 문제점들을 갖고 있다.

1956년 Murray가 대동맥 동종이식편을 사람에게서 처음으로 이용한 이래 현재까지 이를 이용한 많은 수술이 이루어져 왔으며 다른 대체 판막을 이용한 수술에 비해 뒤떨어지지 않는 장기 성적들이 보고되고 있다¹⁻⁴⁾. 그동안 동종이식편의 보존 방법과 수술 기법에 있어 많은 발전이 이루어져 왔으며 특히 장기 결과에 있어 가장 중요한 요소인 동종 이식 조직의 생육성 유지 방법에 있어 많은 관심이 집중되어 왔다.

본 연구에서는 토끼를 이용하여 대동맥과 폐동맥 판막 동종이식편을 일정 기간동안 각각 냉장 및 냉동 보관후 동종이식편의 생육성 정도를 파악하여 향후 임상으로의 활용에 도움이 되고자 한다.

연구 목적

동종 이식 판막을 이용한 개심술은 이미 세계적으로 널리 사용되고 있으며 좋은 성적을 얻고 있다. 아직 국내에서는 초보적인 단계에 있으나 최근 심장 이식의 성공으로 조만간 동종이식편을 이용한 수술이 활발해 지리라 예상된다. 이에 토끼를 이용한 심장 판막 동종이식편을 멸균적으로 준비하는 과정과 일정 기간 냉장 및 냉동 보관 후 보관 방법과 보존 기간의 차이에 따른 이들 조직의 생육성 정도의 변화를 네가지 방법으로 조사하여 향후 임상으로의 이용에 대비하고자 한다.

연구대상 및 방법

체중 1Kg 전후의 30마리의 토끼를 이용하여 세군으로 나누어 시행하였다.

I군(5마리 토끼)은 동종이식편 박리 직후의 신선 판막 조직(fresh valve tissue)으로 II, III군과 비교할 대조군이 며,

II군(15마리 토끼)은 동종이식편을 4℃에서 냉장 보관 하였으며, 이를 다시 3일 보관한 군(II-a, 5마리)과 7일 보관한 군(II-b, 5마리), 그리고 14일 보관한 군(II-c, 5마리)

Table 1. Composition of nutrient media containing antibiotics

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, GIBCO Lab.)
Bovine calf serum, 10%
Antibiotics: Penicillin 50IU/dl
Streptomycin 50ug/ml

으로 나누었다.

III군(10마리 토끼)은 영하 149℃하에서 냉동 보관(Cropreservation)하였으며, 이를 7일 보관한 군(III-a, 5마리)과 4주 보관한 군(III-b, 5마리)으로 나누었다.

I, II, III군 모두에서 각각 대동맥과 폐동맥 판막을 심근과 혈관을 포함하여 박리하였으며, 일정기간 보관후 보관액의 일부를 bacteria(aerobic & anaerobic), fungus, tuberculosis에 대하여 smear & culture를 시행하였으며, 보관된 판막 이식편에 대한 생육성 평가를 시행하였다.

동종이식편에 대한 생육성 여부에 대한 평가는 다음과 같은 방법을 이용하였다.

- 1) Histologic evidence by light microscopy
- 2) 조직 배양 검사
- 3) 포도당 이용도 여부 (glucose utility test)
- 4) ³H-Thymidine uptake test

1. 심장 적출 및 동종이식편 박리

전신마취전 Ketamin 25 mg/kg im하여 토끼를 진정시킨 후 귀의 연변정맥을 통하여 Thiopental 20mg/kg과 Ketamin 3mg/kg을 정주하여 전신마취를 유도하였다. 좌측 개흉술을 통하여 무균적으로 좌우폐동맥을 포함하여 적출한 심장을 생리식염수로 깨끗이 씻어낸후, 대동맥을 근부까지 박리하여 폐동맥과 분리한 후 폐동맥 판막 하부의 심근을 포함하여 폐동맥을 분리한다. 대동맥 판막 아래의 심실중격 일부를 포함한 대동맥근부 심근과 전측 이첨 판막(anterior mitral valve leaflet)을 포함하여 대동맥 동종이식편을 준비한 후, 이를 다시 modified Hanks' 용액으로 씻어낸다.

2. 멸균 처리

준비된 동종이식편을 항생제가 포함된 배양액 (Table 1, 각 용기당 15 ml)에 담가 37℃에서 24시간 보관하였다.

3. 보존 과정

멸균 과정을 거친 동종이식편중 II군에 해당하는 것들

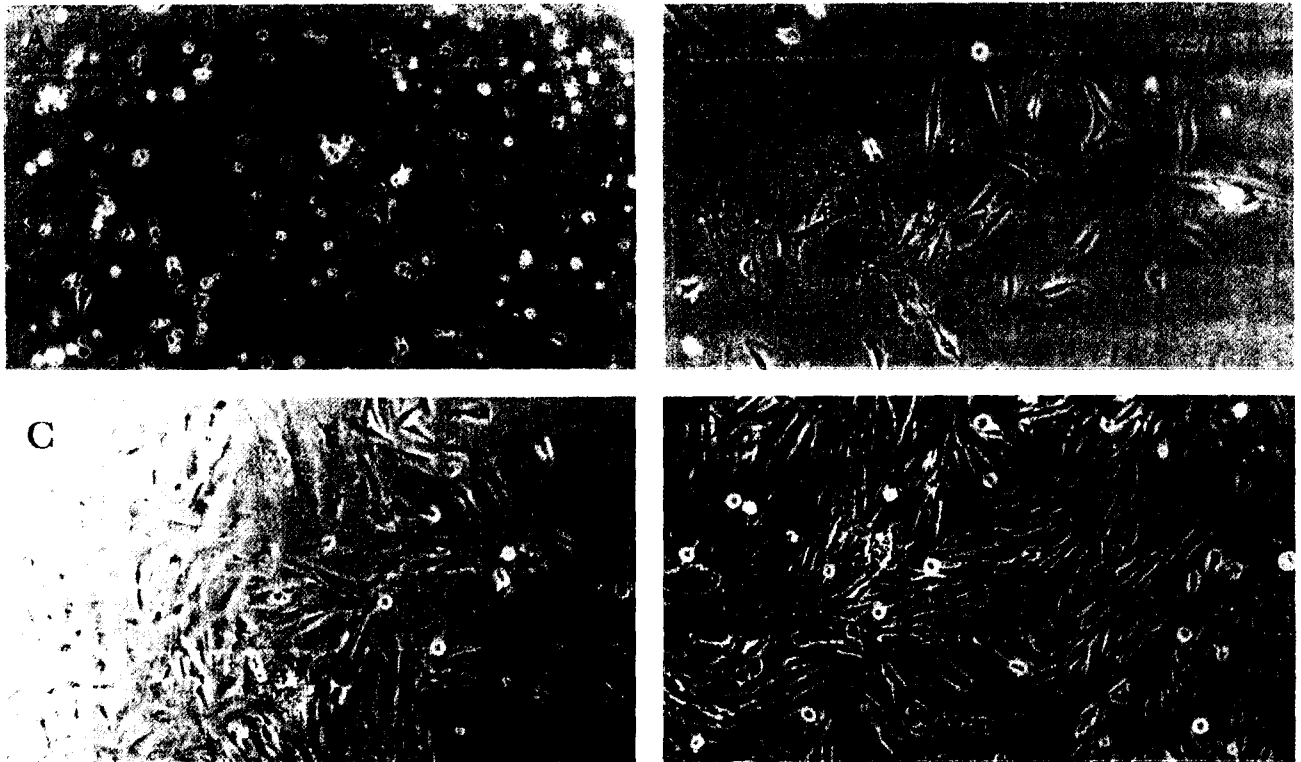


Fig. 1. Grading of tissue culture: according to the degree of the fibroblast growth, we divided into 4 groups at the 7th day of incubation.

A: +, B: ++, C: +++, D: ++++

은 10%의 우태혈청 (bovine calf serum)이 포함된 RPMI-1640 배양액에 각각 담아 4°C에서 냉장 보관하였다.

III군에 해당하는 동종이식편들은 50%의 우태혈청과 10%의 DMSO(Dimethyl sulphoxide)가 포함된 RPMI-1640 배양액에 넣어 -149°C의 액화 질소 탱크에 냉동 보관하였다.

4. 미생물학적 검사

계획된 기간 동안의 보존 과정을 거친 동종이식편은 포도당 이용도를 알아보기 위하여 10%의 우태혈청이 포함된 RPMI-1640 배양액에 담아 37°C에서 24시간 보관한 뒤, 이 배양액을 이용하여 호기성 및 혐기성 세균과 진균 및 결핵 검사를 시행하였다. 호기성 세균은 Blood agar plate와 Macconkey agar plate를 사용하여 7일간 배양하였으며, 혐기성 세균에 대하여는 Brucella agar plate에서 2일간 배양하였다. 진균 검사는 6.10% Sabouraud agar plate로 3일간 배양하였으며 결핵균 배양은 Ogawa배지에서 4주간 배양하였다.

5. 생육성 여부 판정

1) 포도당 이용도 검사(Glucose Utility Test)

일정기간의 보존과정을 거친 동종이식편을 10% 우태혈청을 포함한 10m RPMI-1640 배양액에 37°C에서 24시간 보관한 후 배양액의 포도당 농도(Kodak Ektachem DT-60을 이용하여 Glucose oxydase method로 측정)와 pH의 변화를 관찰하였다. pH의 감소와 함께 포도당 농도가 16mg/dl/24hrs 이상 감소시에 생육성이 있는 것으로 판정하였다.

2) 조직 배양 검사(Tissue Culture)

포도당 이용도 검사를 위해 24시간 보관되었던 동종이식편을 일부는 광학현미경 관찰을 위해 10% 포르말린 용액에 고정하고, 나머지는 25% 우태혈청 (bovine calf serum, GIBCO Laboratories)과 100 IU/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신이 포함된 RPMI-1640 조직 배양액을 사용하여 조직 배양용 페트리디쉬(Petri dish, FALCON)에서 배양하였다. 적절한 산성도를 유지시켜주기 위

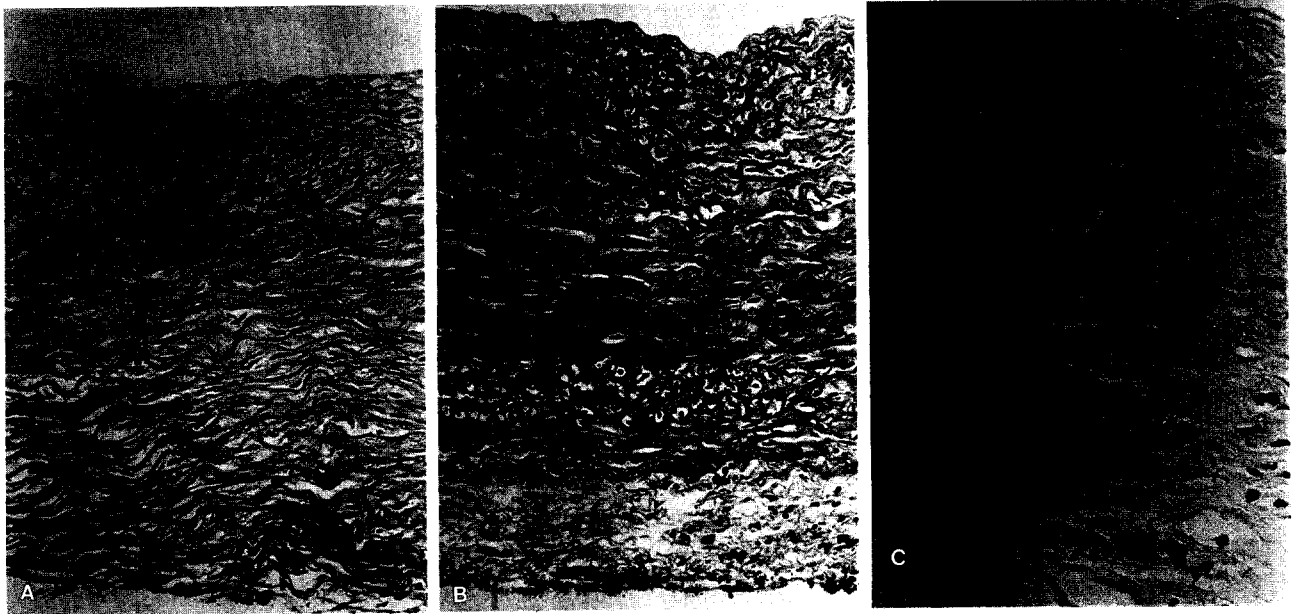


Fig. 2. Microscopic findings of the allograft valve tissues: **A.** fresh allograft(*AV, $\times 200$), **B.** 4°C preserved allograft(*AV, $\times 200$) for 2 weeks, **C.** cryopreserved allograft(*AV, $\times 400$) for 4 weeks. In all of them, their cell components were well preserved. In cold preserved(**B**) cryopreserved allografts(**C**), there was no difference in microscopic findings in comparison with fresh allografts.

*Aortic valve

하여 5% CO₂ 대기농도가 유지되는 CO₂ 배양기를 사용하였다. 조직 배양 판정은 배양후 7일을 기준으로 하였으며 -, +, ++, +++ , ++++ 로 구분하였다(Fig. 1).

3) Thymidine uptake test

각각의 조건에서 일정기간 동안 보존된 조직을 단일 세포가 되도록 절편화한 다음 현미경하에서 Haemocytometer로 생존 세포의 수를 세고 각 조직의 세포수를 일정하게 맞춘 후 96 well U form plate(NUNC)에 분배시킨다. 세포가 들어있지 않은 세포성장배지를 대조군으로 하고 0.5mCi/well 농도로 ³H-thymidine 을 넣어준 후 16시간동안 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 이 세포들을 세포수확기(cell harvester, SKATRON)에 넣고 여과지(filtermat, SKATRON)에 수확하고 베타계수기(β -counter)를 이용하여 결과를 판독한다.

4) 광학현미경 관찰(Histologic evidence by light microscopy)

10% 포르말린 용액에 16시간 고정된 조직을 흐르는 물로 수세한 후 자동침투기(Autotechnicon)에 넣어 조직내의 수분을 제거하고 탈알콜 과정을 거쳐 파라핀을 침투시

킨다. 파라핀에 포매된 조직을 6mm로 얇게 박절하여 일 반염색(hematoxylin & eosin staining)을 시행한 다음 봉입제로 봉입하고 광학현미경으로 판독한다.

6. 통계적 분석

통계 분석은 통계 package SAS(version 6.04)를 이용하였다. 포도당 감소의 유의성 검증은 비모수적 검정법인 Wilcoxon signed rank test 를 이용하였으며, 세군이상 비교에는 Kruskal-Wallis 방법을 사용하였고, P value가 0.05 미만인 경우를 의미있는 차이로 판정하였다.

연구 결과

생육성 검사 결과를 보면 광학 현미경을 이용한 조직 소견은 II, III군 모두에서 I군의 신선 조직과 다름없이 세포의 모양이나 구조(cell morphology & structural integrity)가 잘 유지되어 있었으며 멸균 처리하기 전의 조직 조건과 차이가 없었다(Fig. 2).

포도당 이용도 결과는(Table 2~5, Fig. 3~6) 신선 조직 군인 I군에서는 대동맥 판막 조직편에서의 24시간 보관후의 포도당의 감소는 43.2 ± 4.1 mg/dl/24hrs(mean \pm stan-

Table 2. Results of the viability test(mean ± S.E.)

	Glucose (mg/dl)	control-sample (glucose, mg/dl)	pH	Thymidine uptake (CPM)	Tissue culture
Fresh					
Control	165		7.54	104	
aortic *V.	121.8 ± 4.1	43.2 ± 0.1	7.27 ± 0.014	253.3 ± 27.0	+++
Pulmonary V.	134.0 ± 2.2	31.0 ± 2.2	7.31 ± 0.005	376.6 ± 66.0	+++
4°C preservation					
for 3 days					
Control	165		7.67	96	
Aortic V.	96.0 ± 9.2	68.8 ± 9.2	7.39 ± 0.047	317.6 ± 71.2	+++
Pulmonary V.	122.2 ± 4.7	42.8 ± 4.7	7.53 ± 0.010	186.0 ± 32.6	+++
for 7 days					
Control	165		7.67	150	
Aortic V.	93.6 ± 4.2	71.4 ± 4.2	7.38 ± 0.020	454.4 ± 104.1	+++
Pulmonary V.	127.4 ± 1.0	37.6 ± 1.0	7.58 ± 0.011	340.8 ± 55.5	+++
for 14 days					
Control	180		7.77	104	
Aortic V.	146.7 ± 4.1	33.3 ± 4.1	7.61 ± 0.026	328.0 ± 60.2	+++
Pulmonary V.	150.3 ± 3.2	19.2 ± 3.2	7.67 ± 0.017	356.3 ± 97.3	+++
Cryopreservation					
for 7 days					
Control	180		7.67	116	
Aortic V.	137.6 ± 2.5	42.5 ± 2.5	7.10 ± 0.021	332.0 ± 38.7	+++
Pulmonary V.	159.8 ± 1.9	20.2 ± 1.9	7.29 ± 0.016	229.6 ± 42.7	+++
for 4 weeks					
Control	175		7.61	144	
Aortic V.	148.2 ± 3.5	26.8 ± 3.5	7.50 ± 0.014	370.0 ± 83.3	+++
Pulmonary V.	153.6 ± 2.1	21.4 ± 2.1	7.56 ± 0.011	419.6 ± 112.2	+++

* V: Valve

dard error)였으며 폐동맥 판막 조직편에서는 31 ± 2.2 mg/dl/24hrs로 모든 조직에서 16 mg/dl/24hrs 이상의 포도당 감소를 보여 생육성이 유지되었으며 (p < 0.05), 4°C 냉장 보존한 II군의 결과는 3일, 7일, 14일 보존한 군에서 대동맥 판막 조직에서의 포도당 감소는 각각 68.8 ± 9.2 mg/dl/24hrs, 71.4 ± 4.2 mg/dl/24hrs, 33.3 ± 4.1 mg/dl/24hrs 이었고 폐동맥 판막 조직에서는 각각 42.8 ± 4.4 mg/dl/24hrs, 37.6 ± 1.0 mg/dl/24hrs, 29.7 ± 3.2 mg/dl/24hrs로 역시 모든 조직에서 생육성이 유지되었다 (p < 0.05). 보관 시간에 따른 포도당 감소 수치에 대한 회귀 분석 (Regression analysis)을 실시한 결과 대동맥 판막에서는 통계적 유의성을 보이지 않았으나, 폐동맥 판막에서는 존 기간이 경과할수록 포도당 감소 수치가 유의하게 감소하여 생육성 정도가 감소하는 것으로 나타났다 (F 8.199: 자유도 1, 18: p < 0.

05).

냉동 보관한 III군의 결과는 7일과 4주 보관후 대동맥 판막 조직에서 각각 42.4 ± 2.5, 20.2 ± 1.9 (mg/dl/24hrs)이었으며 폐동맥 판막 조직에서는 각각 20.2 ± 1.9, 21.4 ± 2.1 (mg/dl)로 폐동맥 조직에서 7일과 4주 보존에서 각각 한조직씩이 16 mg/dl/24hrs 이하였으나 나머지 조직은 생육성이 유지되어 있는 것으로 판정되었다 (p < 0.05). pH의 변화는 I, II, III군 모두에서 포도당의 감소와 함께 의미있는 감소 소견을 나타내었다 (p < 0.05).

Thymidine uptake test는 I군에서 비교치와/대동맥 및/폐동맥 판막조직이 각각 104/ 253.3 ± 27.4/ 376.7 ± 66.0 (CPM, count per minute)으로 의미있는 증가를 보였으며 II군에서는 3일 보존시 96/ 317.6 ± 71.2/ 186 ± 32.6 CPM, 7일 보존한 군에서는 150/ 454.4 ± 104.1/ 340.8 ±

Table 3. Result of the viability test (fresh)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	165		7.54	104	
*I-A1	107	58	7.21	186	+++
I-A2	133	32	7.31	328	+++
I-A3	129	36	7.29	340	+++
I-A4	129	36	7.30	190	+++
I-A5	118	47	7.27	252	+++
**I-P1	129	36	7.31	292	+++
I-P2	142	23	7.33	270	+++
I-P3	139	26	7.33	642	+++
I-P4	129	36	7.30	498	+++
I-P5	131	34	7.31	342	+++

* Aortic valve allografts
** Pulmonary valve allografts

Table 4-1. Result of the viability test (4°C cold preservation for 3 days)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	165		7.67	96	
*II-a-A1	123	42	7.55	298	+++
II-a-A2	79	86	7.31	216	+++
II-a-A3	114	51	7.46	124	+++
II-a-A4	82	83	7.34	126	+++
II-a-A5	83	82	7.31	166	+++
**II-a-P1	108	57	7.49	580	+++
II-a-P2	130	35	7.54	282	+++
II-a-P3	128	37	7.55	234	+++
II-a-P4	129	36	7.54	162	+++
II-a-P5	116	49	7.52	330	+++

* Aortic valve allografts
** Pulmonary valve allografts

55.5 CPM, 14일 보관한 군에서는 104/ 328 + 60.3/ 356.3 + 97.3 CPM으로 II군 모두에서 의미있는 증가가 있었으며, 냉동 보관한 III군에서는 7일 보존시 116/ 332 ± 4.7/ 229.6 ± 42.7 CPM 였으며 4주 보존시는 144/ 370 ± 83.3/ 419.6 ± 112.2 CPM 로 모두 의미있는 증가 소견을 보였다 (p < 0.05).

조직 배양 검사는 I, II, III군 모두에서 조직이 자라기 시작하는 날짜는 하루 이틀 차이가 났으나 배양 7일 후에는 모두 +++ 이상의 배양 소견을 보였다.

세균 배양 검사는 II, III군 모두에서 호기성 및 혐기성, 진균, 결핵균 배양 음성으로 보고되었다.

고 찰

1956년 Murray에 의해 처음으로 사람에게 동종 대동맥 판막 이식편이 하행대동맥에 사용된 이래 1962년 영국의 Ross와 뉴질랜드의 Barratt-Boyes가 동종 대동맥판막을 이용한 대동맥판막치환술을 각각 독자적으로 발표하여 동종이식편에 대한 관심을 집중시켰다. 이후 미국에서도 활발한 연구와 함께 임상에 응용되었으나 70년대 중반에 발표된 만족치 못한 중간 결과로 인하여 미국내에서는 동종 이식편을 이용한 수술이 외면시 되었으나 후에 이는 동종 이식편의 처리 과정에서의 문제점으로 밝혀졌으며 1980년 Ross와 Barratt-Boyes가 만족할만한 장기 결과를 발표

Table 4-2. Result of the viability test (4°C cold preservation for 7 days)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	165		7.67	150	
*II-b-A1	95	70	7.41	856	+++
II-b-A2	94	71	7.37	298	+++
II-b-A3	108	57	7.43	458	+++
II-b-A4	83	82	7.31	326	+++
II-b-A5	88	77	7.37	334	+++
**II-b-P1	127	38	7.60	418	+++
II-b-P2	125	40	7.54	308	+++
II-b-P3	131	34	7.60	318	+++
II-b-P4	128	37	7.59	166	+++
II-b-P5	126	39	7.58	494	+++

* Aortic valve allografts

** Pulmonary valve allografts

Table 4-3. Result of the viability test (4°C cold preservation for 14 days)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	180		7.77	104	
*II-c-A1	141	39	7.62	232	+++
II-c-A2	161	19	7.70	538	+++
II-c-A3	149	31	7.65	486	+++
II-c-A4	142	38	7.56	198	+++
II-c-A5	154	26	7.64	214	+++
**II-c-P1	160	20	7.70	246	+++
II-c-P2	163	17	7.69	144	+++
II-c-P3	168	12	7.71	258	+++
II-c-P4	158	22	7.68	374	+++
II-c-P5	155	25	7.65	298	+++

* Aortic valve allografts

** Pulmonary valve allografts

함으로 다시 전 세계적으로 각광을 받기 시작했다. 국내에서는 아직 법적 제한과 전통적인 사체에 대한 금기 개념으로 인한 저조한 부검율 및 장기 기증율로 아직까지는 동종 이식 판막을 이용한 수술이 초보적인 단계이나^{5,6)} 최근 10여 차례의 성공적인 심장 이식으로 인한 여론의 관심과 이해로 조만간 동종이식편을 이용한 수술들이 활발해 지리라 기대된다.

동종 판막 이식편의 내구성 및 장기 성적에 있어 가장 중요한 요소가 조직의 생육성을 얼마나 유지할 수 있는가에 달려있다는 것은 이미 잘 알려진 바이다. 생육성이란 세포나 조직이 자기 기능을 유지하면서 재생할 수 있는 능

력이 유지되는 상태를 말하는 것으로 동종이식편의 보존에 있어 가장 중요한 요소이다. 동종이식편 보존에 있어 생육성 유지에 영향을 미치는 것으로는 1) 심정지로부터 심장 추출시까지의 시간(warm ischemic time), 2) 멸균 처리 방법, 3) 보존 방법 등이 있다. 심정지로부터 심장 추출 시까지의 시간은 가능한 짧을수록 좋으며 일반적으로 48시간 이상이 경과하면 생육성 보존이 어렵다. 동종 심판막 이식편의 멸균 처리 방법은 판막 치환술의 변천을 통하여 다양한 방법들이 소개되어 왔다. 그중 대표적인 것으로 Formaldehyde, Chlorhexidine, Beta-propiolactone, Ethylene oxide 등 화학적 멸균 처리에 의한 방법들과 방사선 처

Table 5-1. Result of the viability test (cryopreservation for 7 days)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	180		7.69	116	
*III-a-A1	128	52	7.06	290	+++
III-a-A2	140	40	7.06	357	+++
III-a-A3	143	37	7.17	472	+++
III-a-A4	139	41	7.13	256	+++
III-a-A5	138	42	7.10	285	+++
**III-a-P1	157	23	7.25	164	+++
III-a-P2	159	21	7.27	230	+++
III-a-P3	166	14	7.34	190	+++
III-a-P4	162	18	7.32	170	+++
III-a-P5	155	25	7.30	394	+++

* Aortic valve allografts

** Pulmonary valve allografts

Table 5-2. Result of the viability test (cryopreservation for 28 days)

Allografts	Glucose (mg/dl)	control-sample	pH	Thymidine uptake	Tissue culture
control	175		7.61	144	
*III-b-A1	137	38	7.46	187	+++
III-b-A2	155	20	7.54	528	+++
III-b-A3	148	27	7.52	605	+++
III-b-A4	145	30	7.51	303	+++
III-b-A5	156	19	7.48	227	+++
**III-b-P1	148	27	7.53	272	+++
III-b-P2	161	14	7.58	264	+++
III-b-P3	153	22	7.56	304	+++
III-b-P4	152	23	7.58	400	+++
III-b-P5	154	21	7.53	858	+++

* Aortic valve allografts

** Pulmonary valve allografts

리방법이 이용되었으나 이러한 동종이식편은 non-viable 했으며 이식된 판막들은 판막의 석회화와 파열로 인한 판막 기능 부전으로 높은 재수술율을 나타내었다. 현재 가장 많이 이용되는 방법으로는 여러종류의 항생제를 이용한 멸균 처리 방법으로, 항생제의 종류와 농도, 처리 시간 및 온도 등에 의해 생육성 유지 정도가 결정된다. 가장 보편적으로 이용되는 방법으로는 Cefoxitin, Lincomycin, Polymyxin B 와 Vancomycin 을 함께 이용하는 방법⁷⁾과 Streptomycin, Penicillin 과 Vancomycin 을 사용하는 방법이 있으며, 최근에는 가능하면 무균적으로 심장을 추출하여 낮은 항생제 농도하에서 짧은 시간동안 동종이식편을 처리

하여 생육성 정도를 높이는 방법을 택하는 추세이다. 이번 실험에서는 Streptomycin 과 Penicillin 만을 이용하여 37℃에서 24시간 동안 멸균 처리하는 방법을 사용하였다. 동종이식편의 보존 방법으로는 보존용액에 넣어 4℃에서 냉장 보관하는 방법과 액화 질소 탱크내에서 -196℃로 냉동 보관하는 방법이 이용되고 있으나, 냉장 보관은 4일 이내의 단기간 보관시에는 보존 방법이 간단하고 생육성이 유지되므로 이용할 수 있으나 그 이상 장기간 보관시에는 냉동 보관법 (cryopreservation)을 이용한다. 심장 판막의 냉동 보관법은 1963년 Frank Gerbode와 함께 O'Brien이 시작하여 1970년대에 Angell에 의해 개발되었으며 현재 미

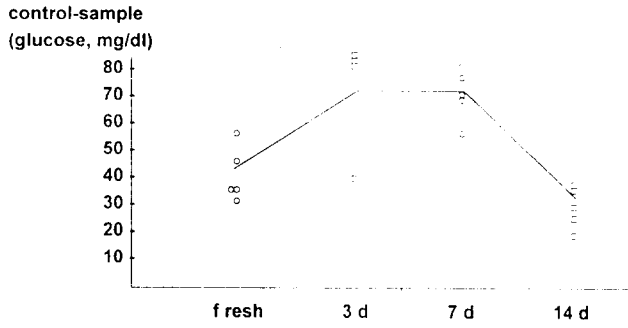


Fig. 3. Result of the glucose utility test(*AV, after cold preservation)

AV: aortic valve

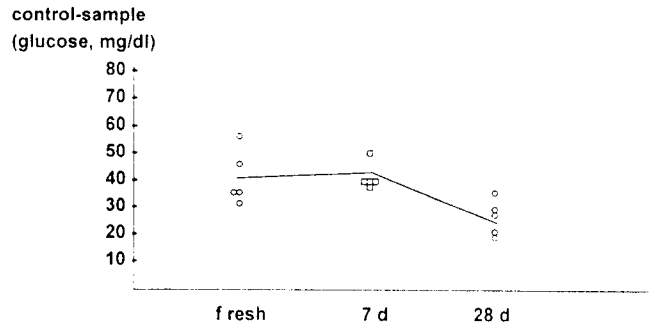


Fig. 5. Result of the glucose utility test(AV, after cryopreservation)

AV: aortic valve

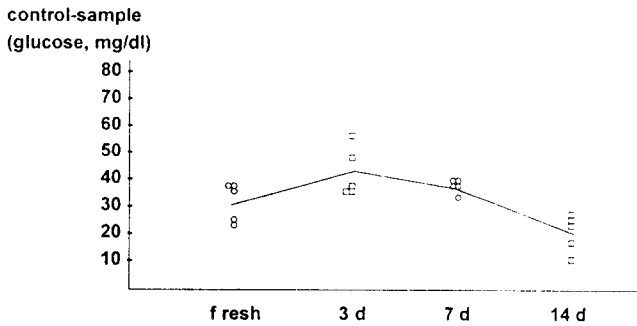


Fig. 4. Result of the glucose utility test(PV, after cold preservation)

PV: pulmonic valve

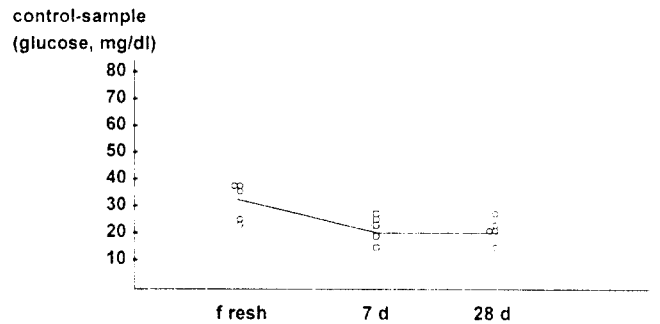


Fig. 6. Result of the glucose utility test(PV, after cryopreservation)

PV: pulmonic valve

국의 Cryolife 등의 여러 장기 은행에서 이 방법을 이용하여 동종 판막 이식편을 보관하고 있다. 냉동 보관시 조직의 생육성 유지에 영향을 줄 수 있는 요소로는 온도 하강 속도 및 어느 정도까지 온도를 낮출 것인지의 여부와 이에 따른 세포 결정화(crystallization)의 방지, 그리고 사용시 냉동 조직의 해동 방법 등이 있으며, 현재까지 알려진 바로는 우태 혈청이 포함된 보존 용액에 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide, cryoprotectant)를 혼합하여 세포의 결정화를 방지하며 영하 80℃까지는 1℃/min로 하강 속도를 조절하며 그 후는 원하는 온도의 액화 질소 탱크내에서 보관하며 -130℃ 이하에서는 원하는 기간동안 생육성을 유지하면서 보관할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 조직의 해동은 42℃의 생리 식염수를 이용하여 빨리 녹이는 방법이 이용되며 이때 DMSO의 농도를 점차적으로 희석시켜 생육성을 최대한 유지한다.

조직의 생육성 여부를 측정하는 방법에는 다음과 같은

4가지 방법이 이용되고 있다.

- 1) 형태학적 방법(Morphologic study)
- 2) 세포의 증식 측정법(Proliferation study)
- 3) 대사 기능 분석법(Metabolic function assay)
- 4) 기계적 분석법(Mechanical assay)

형태학적 방법으로는 광학 현미경을 이용하여 세포의 사활 여부를 관찰하는 방법과 살아있는 세포의 표면 항원을 이용하여 감별하는 방법, 전자 현미경이나 Scanning microscopy로 세포 손상을 판단하는 방법들이 있으나 정량적인 면에서의 부정확성으로 인해 일차적 검색 방법으로 이용되고 있다.

세포의 증식 측정법은 조직으로부터 세포를 분리하여 이를 배양하여 재생능력 여부에 의해 생육성을 판단하는 방법으로 많이 사용되어지고 있으나 정량적 평가를 할 수 없는 점과 세포에 따라 지속적으로 증식을 하는 세포와 살아있지만 증식을 하지 않는 세포에서의 차이를 구별할 수

없는 단점이 있다. 본 연구에서 시행한 조직 배양에 있어서도 자라기 시작하는 날짜는 차이가 났으나 7일을 기준으로 했을 때 모든 조직에서 +++ 이상으로 배양이 되어 신선 조직과의 차이를 볼 수 없었다. 대사기능 분석법으로는 방사성 원소를 침착시킨 아미노산(radiolabeled amino acid)이나 ^3H -Thymidine uptake를 이용하는 방법과 포도당 이용도를 측정하는 방법(glucose utility test)이 이용되고 있다. 방사성 아미노산을 이용하는 방법은 살아있는 세포에서 그 구조를 유지하기 위해 사용되는 아미노산에 방사성 원소를 침착시켜 이를 radioactivity counting이나 autoradiography를 이용하여 측정하는 것으로 반감기가 긴 Proline이나 Glycine이 주로 사용되고 있다. Thymidine uptake를 이용하는 방법은 ^3H -Thymidine이 세포의 DNA에 부착되는 것을 측정하는 것으로 이번 실험에서는 일정 기간동안 보존된 동종이식편의 일부를 단일 세포가 되도록 절편화한 다음 현미경하에서 Haemocytometer로 세포의 수를 일정하게 맞추어 96 well U form plate(NUNC)에 담아 0.5 uCi/well 농도로 ^3H -Thymidine을 넣은 후 16시간 5% CO_2 배양기에서 보관한 후 이를 베타 계수기로 판독하는 방법을 이용하였다. Brockbank⁸⁾ 등이 지적한 바와 같이 심장 판막의 섬유아 세포는 재생 능력이 활발치 않기 때문에(stable cell) DNA의 증식을 이용 Thymidine uptake test가 적절치 않다고 했으나 이번 실험에서는 다른 검사들과 비교적 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 포도당 이용도 검사는 살아있는 세포만이 포도당을 소모할 수 있다는 원리를 응용한 방법으로 포도당의 양이 16 mg/dl/24hrs 이상 감소시 세포가 살아있다고 판정하며 간편하고 비파괴적이며 빨리 결과를 알 수 있는 객관적인 방법으로 인정받고 있다. 본 실험에서는 Thymidine uptake test와 포도당 이용도 검사를 이용하여 비교적 빠르고 객관적인 결과를 얻을 수 있었다.

기계적 분석법은 조직의 수축 능력(contractility), 장력(breaking strength)이나 탄력성(elasticity) 등을 기계적으로 측정하는 방법으로, 9개월간 보존 용액에 보관한 판막의 탄력성이 조직 탄성(tissue compliance)변화에 따라 큰 차이가 없다는 보고가 있으며⁹⁾, Van der Kamp¹⁰⁾ 등은 항생제를 이용한 멸균 처리와 냉동 과정을 거친 대동맥 조직에서 조직 탄성(stress-strain) 특성에 큰 차이가 없다고 발표하고 있다.

동종 판막 이식편의 사용이 가장 활발한 병원중의 하나인 The Prince Charles Hospital의 O'Brien은 조직의 생육성 여부를 다음과 같은 간편하고 객관적인 방법을 이용하고 있다. 1) 조직 배양 검사, 2) 포도당 이용도 여

부(16mg/dl/24hours 이상 감소시 생육성이 있다고 판정), 3) 조직학적으로 광학 현미경 소견상 살아있는 세포의 존재 여부로 생육성을 판단하며, 이들의 연구에 의하면 동종 이식 조직이 공여자 사망후 3일 이전에 이용되거나 냉동 보존이 된 경우와 4°C로 냉장 보관시 4일 이내에 이식이 이루어진 경우에 생육성이 있다고 보고하고 있다^{11~13)}. 하지만 Cornell대학의 Lang¹⁴⁾ 등은 3주까지의 냉장보관에서는 신선 조직이나 냉동 보존된 조직과 생육성의 정도에 차이가 없다고 보고하고 있으며 본 연구에서도 2주까지 냉장 보관되었던 조직의 생육성은 신선 조직이나 냉동 보관 조직과 차이가 없었다.

결 론

이번 연구는 토끼의 대동맥 및 폐동맥 판막 조직을 일정 기간동안 냉장 및 냉동 보관후, 조직의 생육성 정도의 변화를 알아보기 위하여 1) 포도당 이용도 검사, 2) 조직 배양 검사, 3) Thymidine uptake test, 4) 광학 현미경 관찰 등 네가지 생육성 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

대동맥 및 폐동맥 동종이식편을 무균적으로 준비하여 4°C 냉장 보관 및 -149°C에서의 냉동 보존 과정상의 문제는 없었으며, 냉장 보관한 조직에서의 생육성 정도는 2주까지 보관한 조직에서는 신선 조직이나 냉동 보존 조직과 차이가 없어 이 기간이내에 사용할 조직의 보존은 냉동 보관법에 비해 간편한 냉장 보관 방법을 이용할 수 있다는 결론을 얻었으며, 2주 이상의 냉장 보관후의 생육성 변화에 대하여는 향후 연구가 더 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 생육성 평가 방법으로 이용한 조직 배양 검사와 광학 현미경을 이용한 조직 소견 관찰, 간편하고 빠르며 조직에 손상을 주지 않는 포도당 이용도 검사법과 그리고 Thymidine uptake test 등의 네가지 방법들이 서로 유사한 결과를 보여주었으며, 그중에서 포도당 이용도 검사와 Thymidine uptake test는 생육성 정도를 양적으로 비교할 수 있어 향후 임상에서의 동종이식편의 활용에서도 긴요하게 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Kirklin JW, Blackstone EH, Maehara T, et al. Intermediate fate of cryopreserved allograft and xenograft valved conduits. *Ann Thorac Surg* 1987;44:598-606
2. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, Pohlner PG, McGiffin DC, Kirklin JW. *A comparison of aortic valve re-*

- placement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:812-23
3. McGiffin DC, O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohliner PG. Long-term results of the viable cryopreserved allograft aortic valve: Continuing evidence for superior valve durability. *J Cardiac Surg* 1988;3(suppl):289-96
 4. Ross D. Pulmonary valve autotransplantation. *J Cardiac Surg* 1988;3(suppl):313-9
 5. 송명근. 대동맥 동종이식. *세종의학* 1987;4:44-7
 6. 임창영, 최영숙, 홍은경, 김종배. 동종 동맥판의 생육성 평가에 관한 연구(I). *대흉외지* 1994;27:1-8
 7. Stricett MG, Barratt-Boyes BG, MacCulloch D. Disinfection of human heart valve allografts with antibiotics in low concentration. *Pathology* 1983;15:457-62
 8. Blockbank KGM, Bank HL. Measurement of postcryopreservation viability. *J Cardiac Surg* 1987;2(suppl):145-51
 9. Ng YL, Wright JEC. Effect of preservation on the elasticity of human aortic valve homografts. *Thorax* 1975;30:266-
 10. Van der Kamp AWM, Visser WJ, van Dongen JM, et al. Preservation of aortic heart valves with maintenance of cell viability. *J Surg Res* 1981;30:47-
 11. Watts LK, Duffy PMB, Field RB, Stafford EG, O'Brien MF. Establishment of a viable homograft cardiac valve bank: a rapid method of determining homograft viability. *Ann Thorac Surg* 1975;21:230-6
 12. O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, et al. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Cardiac Surg* 1987;2(suppl):153-67
 13. 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
 14. Lang SJ, Giordano MS, Cardon-Cardo C, Summers BS, Staiano-Cico L, Hajjar DP. Biochemical and cellular characterization of cardiac valve tissue after cryopreservation or antibiotic preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:63-7