

돼지 만성 심근허혈 모델에서 경심근레이저혈류재건술 후 국소 심근 혈류량의 변화

박 계 현* · 안 혁**

= Abstract =

Change of Regional Myocardial Blood Flow After Transmyocardial Laser Revascularization in Porcine Model of Chronic Myocardial Ischemia

Kay-Hyun Park, M.D.*, Hyuk Ahn, M.D.**

Background: This study was aimed to assess improvement in myocardial perfusion after TMR by measuring regional myocardial blood flow(RMBF) in porcine model of chronic myocardial ischemia. **Material and Method:** Ameroid ring was placed around the proximal left circumflex coronary artery in fourteen pigs. After 4 weeks, the control group(7 pigs) underwent rethoracotomy only, and the TMR group(7 pigs) underwent Ho:YAG laser TMR at the circumflex territory. After another 4 weeks, the animals were sacrificed for the measurement of RMBF using colored microspheres. The ratio of RMBF between the circumflex territory and the interventricular septum was calculated and compared. **Result:** At 4 weeks after ameroid constriction, RMBF of the circumflex territory decreased to 46~89% of RMBF of the interventricular septum. In five of six animals in the TMR group, RMBF of the circumflex territory at 8 weeks after ameroid constriction was higher compared with RMBF at 4 weeks after ameroid constriction. However, the improvement was statistically significant only in two animals. In three of the four animals in the control group, RMBF of the circumflex territory also increased at 8 weeks compared with RMBF at 4 weeks. The degree of increase in RMBF was not different between the control and the TMR groups. **Conclusion:** In porcine model of chronic myocardial ischemia, the degree of increase in RMBF of the ischemic area after Ho:YAG TMR was not different from the increase by development of native collateral circulation. Perfusion of ischemic myocardium after TMR is

*성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

†본 연구는 삼성전자 부설 삼성생명과학연구소 연구비(C-98-043)의 일부 보조로 이루어졌음.

논문접수일 : 2001년 8월 2일 2001년 9월 11일

책임저자 : 박계현(135-710) 서울특별시 강남구 일원동 50번지, 삼성서울병원 흉부외과. (Tel) 02-3410-3489, (Fax) 02-3410-0089

E-mail : drkhpark@yahoo.co.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

not thought to improve to the degree that can be demonstrated by currently available method of assessment such as radioisotope myocardial scintigraphy.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2001;34:662-71)

Key words: 1. Coronary artery disease
2. Myocardial revascularization
3. Myocardial perfusion
4. Laser surgery

서 론

허혈성 심질환에 대한 치료 방법으로서 경피적 관상동맥 중재술(percutaneous coronary intervention)이나 관상동맥 우회 수술(coronary artery bypass grafting)의 유용성이 이미 입증되어 있지만 관상동맥 협착이 범발성으로 진행하여 기존의 심근 혈류 재건(myocardial revascularization) 방법들의 적용이 곤란한 허혈성 심질환 환자에게 대한 대안적인 치료 방법으로서 경심근 레이저 혈류재건술(transmyocardial laser revascularization, 이하 TMR)이 소개되어 주목을 받고 있다.^{1,2)}

TMR은 고에너지 laser를 이용하여 좌심실 외벽에서 심실 내강으로 관통하는 통로들을 만들어 좁으로써 심근 관류를 개선시킬 수 있다는 가설에 바탕을 두고 있다^{3,4)}. 지금까지의 TMR 임상 적용 결과들은 환자의 협심증 경감과 운동 기능 개선면에서는 뚜렷한 효과가 있다는 것을 보여 주었으나 동위원소를 이용한 심근 관류 검사나 심장 초음파 검사 등과 같은 객관적인 검사로 뚜렷한 호전을 입증하지는 못하고 있다⁵⁻⁹⁾. 또 몇몇 단편적인 관찰 예들^{1,10)}을 제외하고는 laser channel들의 개통성이 장기간 유지되는지 여부나 이 channel들이 심근 관류 개선에 직접적으로 기여하는지 여부를 임상적으로 규명한 연구는 없다. 부검 소견이 아닌 임상 환자에서 이 같은 사실을 규명하기는 불가능하고 심근 혈류량 증가 여부를 정량적으로 정확하게 측정하는 것도 인체를 대상으로는 불가능한 만큼 TMR의 효과에 기여하는 기전에 대한 연구는 동물 실험을 통하여 이루어질 수밖에 없다.

지금까지의 동물 실험 연구 결과들은 TMR의 효과에 대하여 상반되는 결론을 내리고 있다¹¹⁻¹⁷⁾. TMR이 심근 허혈 개선에 긍정적인 효과가 있다는 결론을 내린 연구들은 sonomicrometry나 심초음파 검사상의 심실 수축 기능 평가나 TTC 착색을 이용한 심근 경색 면적의 비교를 통한 것들이며 국소 심근 혈류량을 정량적으로 측정하는 연구는 없는 반면 국소 심근 혈류량의 정량적인 평가를 이용한 연구들은 대부분 TMR에 따른 심근 관류 개선 효과가 거의 없는 것으로 결론을 내리고 있지만 이들 모두 TMR 직후 급성 허혈 상태에서 혈류량을 측정하였다는 제한점이 있다. 그러나 이미 임상 관

찰을 통하여 TMR후 동위원소 심근 관류 검사상 호전이 관찰되기까지는 1~3개월의 기간이 필요하다는 사실이 밝혀져 있는 만큼⁶⁾ 국소 심근 혈류량의 정량적 평가는 TMR 시행 후 일정 기간이 지난 후에 이루어질 필요가 있다. 또한 TMR의 효과가 나타나는 기전으로 예상되는 측부혈관(collateral vessel)의 신생이 만성 심근 허혈의 유무에 따라 영향을 받을 수 있으므로¹⁸⁾ 급성 허혈이 아닌 만성 허혈이 성립되어 있는 상태에서 TMR의 효과를 규명할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 TMR이 심근 허혈 영역의 혈류량을 증가시키는지 여부를 확인하기 위하여 돼지의 관상동맥 주위에 ameroid constrictor를 거치하고 일정 기간을 경과시켜 인체의 관상동맥 협착과 유사한 만성 심근 허혈 모델을 조성한 다음 이들을 대상으로 TMR 시행 여부에 따른 국소 심근 혈류량의 변화 여부를 착색 미세구(colored microsphere)를 이용하여 정량적으로 측정, 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 개요

체중 20~25 kg의 돼지 14마리를 대상으로 1차 수술 시 좌회전지 관상동맥 근위부에 ameroid ring(Research Instruments, Corvallis, OR)을 거치한 다음 4주간 경과시켜 만성 심근 허혈 모델을 만들었다. 이들을 각 7마리씩 대조군(animal number 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13)과 실험군(TMR 치료군; animal number 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)으로 나누어 ameroid ring 거치 4주 후 TMR군에서는 Ho:YAG laser로 좌회전지 영역에 TMR을 시행하였고 대조군에서는 개흉 후 심낭내 유착만을 박리한 다음 다시 봉합하였다(2차 수술). 다시 4주가 경과한 다음 실험 동물을 희생시키고 심장을 적출하였으며(3차 수술) 이때 각 군당 2마리에서 좌측 경동맥을 통하여 카테터를 삽입, 관상동맥 조영검사를 시행한 다음 동물을 희생시켰다.

각 시기의 국소 심근 혈류량을 측정하기 위하여 3차에 이르는 수술 조작중 각 1회씩 착색 미세구(colored microsphere)를 좌심방에 주사하였다. 1차 수술 시에는 ameroid ring 거치 직후, 2차 수술 시에는 TMR 시술 직전(대조군에서는 개흉 및

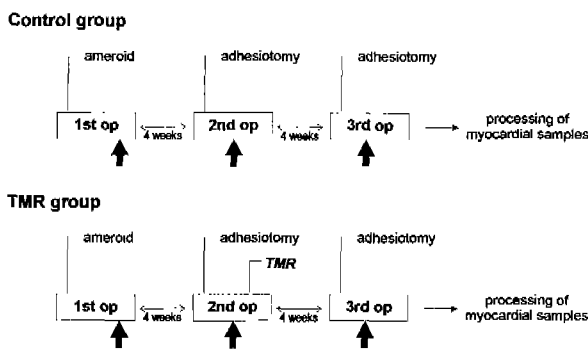


Fig. 1. Outline of experimental protocol; timing of injection of colored microspheres.

The black arrows indicate the timing of injection of colored microspheres that were done after 2 minutes of rapid atrial pacing.

TMR, transmyocardial laser revascularization

심낭내 유착 박리 후), 3차 수술 시에는 심낭내 유착을 박리하고 동물을 희생시키기 직전에 각각 다른 색의 미세구를 주사하였다. 매 주사 시마다 심근 부하(myocardial stress)시의 혈류량을 비교하기 위하여 인공 심박동기(Model 5375, Medtronic Co. Minneapolis, MN)를 이용하여 분당 180회의 속도로 심방을 인공 박동(temporary pacing)시켜 2분이 경과한 시점에서 미세구를 주사하였다. 심장을 적출한 다음에는 허혈 영역(좌회선지 영역)과 대조 영역(좌전하행지 영역, 심실중격)에서 각각 심근 절편을 채취하여 착색 미세구 함유량을 측정, 비교하였다(Fig. 1).

2. 마취 및 개흉 방법

실험 및 사육 과정중 모든 실험 동물들은 미국 국립보건원(National Institutes of Health)의 지침(NIH publication 85-23, 1985년)에 준하여 인도적인 관리를 받도록 하였다. 실험 동물용의 사육시설에서 2주간의 순화 및 관찰 기간을 거친 청결한 돼지를 ketamine(유한양행, Korea) 100 mg/kg 주사로 마취 유도후 기관 삽관하고 N₂O 및 halothane gas로 흡입 마취를 유지하는 가운데 대퇴동맥에 20 gauze 정맥주사용 카테타(동방의료기, Korea)를 삽입한 다음 중환자 감시용 모니터(HP model 54S, Hewlett Packard, U.S.A.)로 심전도와 동맥압을 지속적으로 감시하였다. 무균적인 방법으로 좌측부 개흉술을 시행하되 1차 수술 시에는 제4늑간을 통하여, 2차 및 3차 수술 시에는 제5늑간을 통하여 개흉함으로써 유착 박리 중의 폐 손상을 피하였다. 심낭을 절개하고 heparin 100 units/kg를 정맥 주사한 다음 5-0 polypropylene(US Surgical

Corp, Norwalk, CT) purse-string suture를 이용하여 좌심방이(left atrial appendage)에 18 gauze 정맥주사용 카테타(동방의료기, Korea)를 삽입하여 착색 미세구의 주입 통로로 이용하였다.

1차 수술 시 좌심방이 바로 아래의 근위부 좌회선지를 박리하여 2 mm 내경의 ameroid ring을 거치하였고 좌전하행 관상동맥의 대각지에서 좌회선지 영역으로 향하는 대각지가 발견되는 경우 첫번째 둔각지 근처에서 5-0 polypropylene으로 봉합, 결찰하였다. 2차 수술 시 제 1군에서는 심낭내 유착을 박리하는 과정만을 거쳤고 제2군에서는 TMR을 시행하였다. 3차 수술 시에도 심장 적출전 심낭내 유착을 전부 박리한 후 미세구를 주사하여 심장의 측부혈관(extracardiac collateral)으로부터의 혈류 공급 가능성을 최소화하였다. 수술 종료시 창상을 봉합할 때도 절개된 심낭을 봉합하여 폐와 심장을 격리시킴으로써 폐, 측 기관지 동맥(bronchial artery)으로부터 심근으로 측부혈관이 생성될 수 있는 가능성을 최소화시켰다. 수술 종료 후 흉관을 통한 배액은 시행하지 않은 대신 흉강내에 정맥 주사용 연결관(extension tube)을 삽입하여 누출 봉합 직후부터 음압을 걸어 흉강내 공기를 제거한 다음 창상 봉합 직후 제거하였다. 감염 예방을 위하여 개흉 직전 Cefazolin(종근당, Korea) 1.0gm을 정주하였고 수술 이후에는 다음날까지 Cefaclor(대도제약, Korca) 500mg을 1일 3회 사료에 섞어 경구 투약하였다.

각 수술 사이 실험 동물은 별도의 철제 우리에 격리 수용하면서 인도적인 관리를 받음과 동시에 수의사에 의하여 매일 창상 감염 여부 및 발육 상태 등을 점검받았다. 개흉 수술 후 첫 5일간은 매일 1회씩 수술 창상에 10% Povidone iodine 연고(Betadine oint[®], 현대약품, Korca)를 도포하여 감염 가능성을 최소화하였다.

3. TMR 시술

실험군의 TMR 시술에는 Coherent사(Palolo Alto, CA)의 Holmium:Yttrium-Aluminum-Garnet(Ho:YAG) 레이저 장비(VersaPulseTM)에 1mm 직경의 피복된 광섬유를 연결하여 사용하였다. 레이저는 2.0~2.5 joule/pulse의 power와 10Hz의 pulse frequency로 시행하였으며 심실벽을 완전히 관통하여 박동성 출혈이 있을 때까지는 8~10개의 pulse가 필요하여 심근 channel 한 개당 20~25watt 전후의 에너지가 소요되었다. 심근 channel은 좌회선지의 분지인 첫번째 둔각지부터 마지막 둔각지 사이에 있는 좌심실 측벽 중 기저부와 심첨부 각 1cm 구간을 제외한 부위(midventricular level)에 심근 영역 1 cm²당 1개의 밀도로 시행하여 각 동물당 평균 11개(8~14개)의 channel이 조성되었다.

4. 착색 미세구를 이용한 심근 혈류량 측정

심근 혈류량 측정이 필요한 각 시점에 좌심방이에 삽입된 catheter를 통하여 $2.0\sim 6.0\times 10^6$ 개의 착색 미세구(Dye-Trak[®]; Triton Technology Inc., San Diego, CA)가 들어 있는 0.01% Tween 80(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 생리 식염수 현탁액 10ml를 bolus injection하였다. 최종 수술을 완료하는 시점에 2M KCl 용액(중외제약, Korea) 20ml를 좌심방에 주사하여 실험 동물을 희생시킨 다음 심장을 적출하였다. 적출된 심장을 생리 식염수로 세척하여 혈액을 제거한 다음 좌심실만을 분리하여 심장 표면의 지방질과 판막 조직 등을 제거하고 허혈 영역(좌회선지 영역;좌심실 측벽)과 대조 영역(좌전하행지 영역; 심실 중격)의 중앙에서 무게 2~5gm의 심근 절편을 각각 4개와 3개씩(1마리당 7개) 취하여 다음과 같은 처리 과정을 거쳤다.

Tissue digestion

각 심근 절편을 유리 시험관에 넣고 4M KOH 용액(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 10ml를 가하여 실온에서 24시간 경과시켰다.

Filtration(separation of microspheres from the suspension)

digestion된 조직이 포함되어 있는 현탁액을 2% Tween 80 용액으로 rinsing하면서 vacuum suction에 연결된 filtration chamber에 통과시켜 여과지(pore size 10 m, Osmotics, Cat# 11078)에 착색 미세구만 남도록 하였다. 여과지를 수거하여 새 시험관에 옮긴 다음 labeling하였다.

Dye extraction

실온에서 여과지를 건조시킨 다음 1cc Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV)로 정확하게 측정된 100ul의 dimethylformamide(DMF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 용액을 여과지가 들어 있는 시험관에 첨가하고 vortex mix하여 미세구 표면에 착색되어 있는 dye를 용해시켰다. dye가 용해되어 있는 DMF 용액을 micropipette으로 1.5ml Eppendorf tube로 옮긴 다음 2000g에서 3분간 원심분리하였다.

Spectrophotometric measurement

위에서 얻어진 상층액(supernatant)을 quartz microplate (SPECTRAplate, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)로 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)에 넣고 absorbance를 측정하였다. Absorbance는 사용된 미세구의 색에 따라 백색(white)-370nm, 황색(yellow)-448nm, 적색(red)- 530nm, 자색(violet)-594nm, 청색(blue)-672nm의 파장에서 측정하였다. absorbance는 각 심근 절편 내에 들어 있던 미세구 수와 비례하므로 이를 각 절편의 무게로 나누어줌

으로써 심근 절편 1gm당 미세구 수를 계산하였다.

5. Data 분석

심근 혈류량의 절대치를 비교하는 경우 측정 시기마다 심박출량, 부하 조건, 관상동맥 저항 등의 변수에 따라 영향을 받을 수 있으므로 허혈 영역(좌회선지 영역)과 비허혈 영역(좌전하행지 영역)과의 혈류량 비(ratio)를 구함으로써 이를 보정하였다. 즉 좌회선지 영역의 혈류량/심실중격 혈류량의 비를 비교함으로써 심근 허혈의 유무 및 관류 개선의 유무를 판단하였다.

각 개체 내에서 심실 절편의 시간에 따른 혈류량 비의 비교에는 Windows용 SPSS version 9.0을 이용하여 Wilcoxon signed rank test를 적용하였다. 그러나 대조군과 실험군 간의 전체적 비교에는 각 군당 표본 수가 작고 ameroid ring 거치에 따라 생성된 허혈 심근의 면적이 차이가 났기 때문에 통계적 기법을 적용하는 것은 의미가 없다고 판단되어 관찰된 바를 순서대로 연구 결과에 기술하였다.

결 과

1. 실험 동물 생존률

대조군에서 두 마리(No. 5, 11), 실험군에서 한 마리(No. 8)가 ameroid ring 거치 후 2~14일 사이에 급사하여 11마리가 최종 수술에 이르러 심장의 적출 및 착색 미세구 함유량 측정이 가능하였다. 착색 미세구 함유량을 측정하여 최초 미세구 주사시, 즉 국소 심근 허혈이 없는 상태에서의 미세구 밀도가 7개 절편간에 큰 차이를 보인 경우(No. 7)는 조직 처리 및 측정 과정 중의 오차가 발생한 것으로 간주하여 분석대상에서 제외하였다.

2. Ameroid ring 거치 후 관상동맥 소견

각 군 각각에서 두 마리씩 최종 수술 시(ring 거치 후 8주째) 관상동맥 조영술을 시행한 결과 모두에서 좌회선지의 완전 폐쇄가 관찰되었고 측부혈관에 의하여 정상 관상동맥보다 뒤늦게 조영되는 소견을 보였다. 최종 수술 시 육안으로 확인한 결과 역시 전 동물에서 ameroid ring 내부의 팽창에 의하여 좌회선지는 완전 폐쇄되어 있었고 ring 거치 부위의 동맥 내부는 오래된 혈전 및 섬유성 조직으로 채워져 있었다. 한편 좌심실 측벽에서 좌회선지의 폐쇄에 따른 심근 경색 부위는 육안 식별이 가능한 정도의 크기는 발견할 수 없었다.

3. TMR에 따른 심근 육안 소견

심장 적출 후 육안으로 관찰하였을 때 TMR로 심근

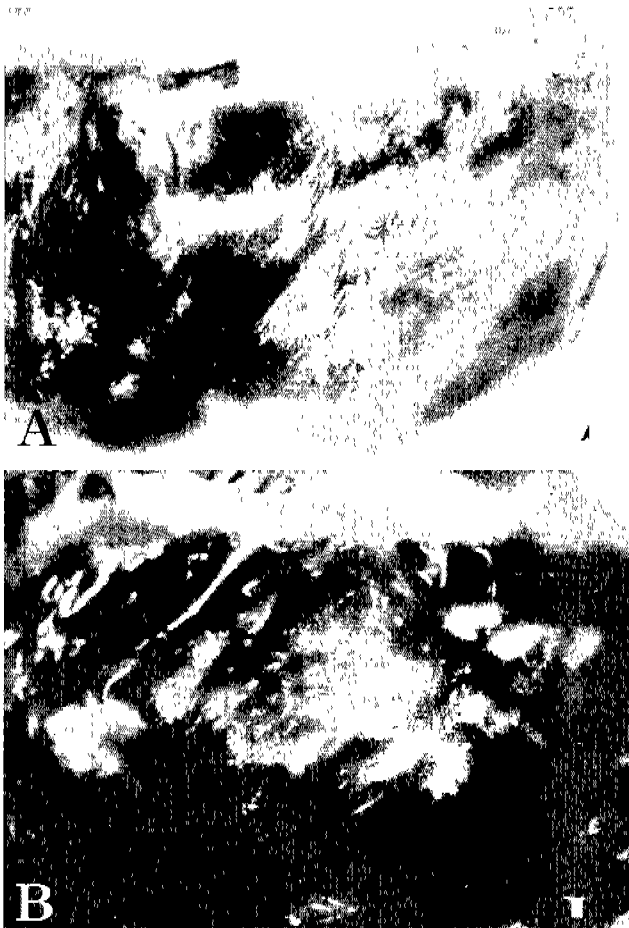


Fig. 2. Gross finding of the left ventricular myocardium 4 weeks after transmyocardial laser revascularization; A = epicardial surface, B = endocardial surface
From the external surface, only a few laser sites could be identified. On the contrary, it was possible to locate all of the previous laser openings from inside of the ventricular cavity. However, no patent transmyocardial channel or channel remnant was found. Instead, whitish fibrotic scar tissue of about 1cm in diameter was present around endomyocardial craters that correspond to the previous laser openings.

channel이 형성된 부위는 심실 외벽에서는 일부만이 확인 가능하였으나 심실 내벽에서는 전 channel의 위치를 확인할 수 있었다. Channel 형성 부위는 직경 1cm 내외의 백색 섬유성 반흔 조직의 소견을 보였으며 중앙의 laser 관통 부위는 완전 폐쇄되어 오목한 점(dimple or crater)의 형태로 흔적만이 남아 있었다(Fig. 2).

4. Ameroid ring 거치 4주 후의 국소 심근 혈류량

좌회선지에 ameroid ring을 거치한 4주째 주사한 착색 미세구 함유량으로 계산한 좌회선지 영역(좌심실 측벽)의 혈류량은 모든 동물에서 심실중격 혈류량에 비하여 감소되어 있었

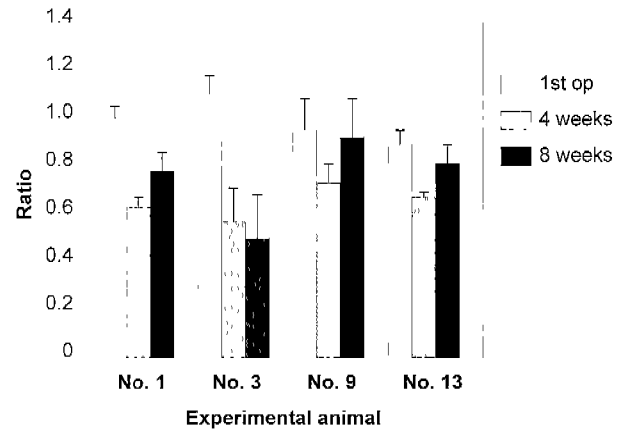


Fig. 3. Ratio of RMBF between LV lateral wall and ventricular septum in control group
At 4 weeks after ameroid constriction of the circumflex coronary artery, RMBF of the LV lateral wall decreased to 57 ~ 73% of RMBF of the ventricular septum. However, after 8 weeks, lateral wall perfusion increased to 78.0 ~ 91% of septal perfusion in three of the four animals despite of absence of any therapeutic intervention
RMBF, regional myocardial blood flow; LV, left ventricular

다. 그러나 그 비율은 최소 46%, 최대 89%로 동물에 따라 비교적 큰 변이를 보였고 세 마리(No. 4, 6, 14)에서는 혈류량의 감소가 통계적으로 유의한 정도가 되지 못하였다(Table 1 & 2, Fig. 3 & 4).

5. Ameroid ring 거치 8주 후의 국소 심근 혈류량 (TMR 여부에 따른 차이)

TMR을 시행하지 않은 대조군의 네 마리 중 세 마리에서 좌회선지 영역의 혈류량이 ameroid ring 거치 후 4주째에 비해 8주째에 15~20% 증가한 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 3). TMR을 시행한 치료군에서는 6마리 중 5마리에서 좌회선지 영역의 혈류량이 증가한 것으로 나타났으나 통계적 유의성이 인정된 경우는 두 마리 뿐이었다(Table 2, Fig. 4). 그러나 좌심실 측벽의 절편 4개의 평균치를 검토한 경우 통계적 유의성이 없던 경우에도 1마리(No. 4)에서는 4주째 혈류량이 유의하게 감소된 영역이 좌심실 측벽의 일부에 국한되어 있던 경우로 그 심근 절편에서는 TMR 8주 후 혈류량이 증가된 것으로 나타났다. 다른 2마리(No. 10, 12)에서는 좌회선지 영역 일부의 4주째 혈류량이 심실중격 혈류량의 30% 이하로 저하되어 국소적 심근 경색의 발생을 의심케 하였으며 이 부위를 제외한 나머지의 좌회선지 영역의 혈류량은 TMR 후 4주째에 증가된 것으로 인정되었다.

이상을 요약하면 ameroid ring 거치 4주째와 8주째의 좌회선지 영역의 혈류량이 증가하는 빈도는 대조군에서 75%,

고 찰

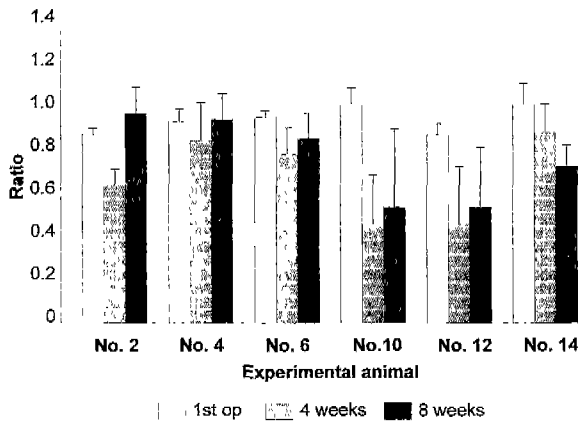


Fig. 4. Ratio of RMBF between LV lateral wall and ventricular septum in TMR group

As in the group I, RMBF of the LV lateral wall decreased to 46~89% of RMBF of the ventricular septum at 4 weeks after ameroid constriction of the circumflex coronary artery. However, the change was statistically significant only in the animal number 2, 10, and 12. This may suggest that ameroid constriction failed to yield a sufficient amount of ischemic myocardium in the remaining animals. At 4 weeks after TMR, lateral wall perfusion improved in five of the six animals. Statistical significance was present only in the animals number 2 and 6 in the remaining three. RMBF increased in part of the lateral wall segments.

RMBF, regional myocardial blood flow; LV left ventricular; TMR, transmyocardial laser revascularization

TMR 치료군에서 83%였으며 혈류량의 증가 정도는 TMR 치료군의 한 개체(No. 2)에서만 심실 중격 대비 30% 이상의 혈류량 증가가 관찰되었을 뿐 치료군의 나머지 개체와 대조군에서는 혈류량의 증가 정도가 20% 미만이었다.

경심근 레이저 혈류 재건술(TMR) 후 관찰되는 임상 증상의 개선을 설명하기 위하여 시행된 여러 동물 실험 연구들 중 TMR의 효과에 대하여 긍정적인 결론을 내린 초기의 연구들은 급성 심근 허혈 상태에서 심실 수축 기능을 평가하거나 심근 경색 면적을 비교한 것들이 대부분이다. 반면 가장 직접적이고 정확한 변수인 국소 심근 혈류량의 정량적인 평가를 이용한 연구들은 TMR에 따른 심근 관류 개선의 효과가 거의 없는 것으로 결론을 내리고 있다. 그러나 이들 모두 TMR 직후 급성 허혈 상태에서 혈류량을 측정하였다는 제한이 있다. 이런 제한을 극복하기 위하여 만성 심근 허혈 동물 모델에서 국소 심근 혈류량의 변화를 직접 측정한 본 연구 결과는 TMR 시행 4주 후 허혈 영역의 국소 심근 혈류량 증가 양상이 대조군과 유의할 만한 차이가 없음을 보여주었다. Ameroid ring 거치 후 4주와 8주 후 분당 180회의 심방 박동에 의한 심근 부하 상태에서 심근 혈류량을 비교하였을 때 4주째 TMR을 시행하여 8주째의 혈류량이 통계적으로 유의하게 증가하였다고 인정된 경우는 6마리 중 2마리 뿐이었고 혈류량의 증가 정도도 작았기 때문이다. 또한 TMR을 시행하지 않고 개흉만을 반복한 대조군 4마리 중 3마리에서도 비슷한 폭의 혈류량 증가가 관찰되었기 때문에 TMR이 혈류량 증가에 직접 기여하였을 가능성은 거의 없는 것으로 판단되었다.

TMR의 효과를 규명하기 위하여 적용된 다양한 실험적 연구 결과들을 종합하면 TMR의 작용 기전으로서 기대되었던 좌심실 내강으로부터의 직접적인 심근 관류의 가능성은 부정되는 대신 TMR channel 주위에 혈관 신생이 촉진되는 것으로 의견이 모아지고 있다^{16,17,19,20}. 그러나 이런 혈관 신생에 레이저의 사용이 필수적인지 여부와 함께 TMR에 따른 혈관

Table 1. Ratio of RMBF between LV lateral wall segments and ventricular septum in control group

location	No. 1			No. 3			No. 9			No. 13		
	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk
UL-B	1.00	0.65	0.85	1.10	0.74	0.56	0.90	0.62	0.68	0.92	0.69	0.86
UL-A	1.07	0.67	0.73	0.98	0.64	0.72	1.04	0.78	0.94	0.89	0.64	0.74
LL-B	0.99	0.61	0.85	0.96	0.48	0.39	1.07	0.81	1.08	0.94	0.69	0.90
LL-A	0.95	0.59	0.69	0.91	0.43	0.33	0.78	0.72	0.96	0.80	0.67	0.75
Mean	1.00	0.63	0.78	1.10	0.57	0.50	0.95	0.73	0.91	0.89	0.67	0.81
S.D.	0.05	0.04	0.08	0.08	0.14	0.18	0.13	0.08	0.17	0.06	0.02	0.08
P value	first vs. 4wk<0.001			first vs. 4wk<0.001			first vs. 4wk<0.027			first vs. 4wk<0.005		
	4wk vs. 8wk=0.038			4wk vs. 8wk=0.108			4wk vs. 8wk=0.034			4wk vs. 8wk=0.021		

RMBF, regional myocardial blood flow; LV, left ventricular; S.D., standard deviation; UL-B, basal side of upper lateral wall; UL-A, apical side of upper lateral wall; LL-B, basal side of lower lateral wall; LL-A, apical side of lower lateral wall

Table 2. Ratio of RMBF between LV lateral wall segments and ventricular septum in TMR group

location	No. 2			No. 4			No. 6		
	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk
UL-B	0.84	0.55	0.81	0.88	0.74	0.97	0.97	0.68	0.74
UL-A	0.87	0.73	1.01	1.01	0.66	0.77	0.98	0.69	0.75
LL-B	0.93	0.60	0.98	0.97	0.92	1.04	0.92	0.87	0.93
LL-A	0.89	0.68	1.12	0.90	1.06	1.02	0.97	0.92	1.00
Mean	0.88	0.64	0.98	0.94	0.85	0.95	0.96	0.79	0.86
S.D.	0.04	0.08	0.13	0.06	0.18	0.12	0.03	0.13	0.13
P value	first vs. 4wk<0.011 4wk vs. 8wk=0.004			first vs. 4wk<0.442 4wk vs. 8wk=0.150			first vs. 4wk<0.093 4wk vs. 8wk=0.001		

location	No. 10			No. 12			No. 14		
	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk	1 st op	4wk	8wk
UL-B	1.06	0.78	0.93	0.87	0.73	0.77	1.11	0.88	0.85
UL-A	0.98	0.48	0.78	0.86	0.44	0.56	0.87	0.71	0.61
LL-B	0.94	0.25	0.24	0.96	0.58	0.69	1.08	0.91	0.71
LL-A	1.11	0.33	0.22	0.82	0.11	0.13	1.03	1.03	0.76
Mean S.D.	1.02	0.46	0.54	0.88	0.46	0.54	1.02	0.89	0.73
S.D.	0.08	0.23	0.37	0.06	0.27	0.28	0.10	0.13	0.10
P value	first vs. 4wk<0.014 4wk vs. 8wk=0.441			first vs. 4wk<0.039 4wk vs. 8wk=0.053			first vs. 4wk<0.069 4wk vs. 8wk=0.065		

RMBF, regional myocardial blood flow; LV, left ventricular; S.D.=standard deviation; UL-B, basal side of upper lateral wall; UL-A, apical side of upper lateral wall; LL-B, basal side of lower lateral wall; LL-A, apical side of lower lateral wall

신생이 심근 허혈의 개선에 어느 정도 기여를 할 수 있는 것인지에 대해서는 아직도 상반되는 견해들이 존재한다.

본 연구의 목표는 가능한 한 임상 즉, 인체의 허혈성 심질환과 유사한 조건을 가진 만성 심근 허혈 동물 모델을 만들어 정량적인 분석이 가능한 지표를 관찰 변수로 삼아 TMR의 효과 유무를 검증함으로써 그 기전을 규명하는데 기여하고자 하였다. 이런 전제 하에 실험동물로는 심장 및 관상동맥의 해부학적 구조가 인체와 가장 유사한 것으로 알려진 돼지를 선택하였다^{21~23,24}. 특히 체중 20~25kg 인 생후 2개월 미만의 어린 돼지를 실험 동물로 하는 것은 사육상의 편리함 및 비용 절감의 장점도 있지만 성돈(adult pig)에 비하여 자연적인 관상동맥 측부혈관의 발달이 적고 생후 3세 이전까지는 측부혈관의 발달 양상이 비슷하게 유지된다는 기존의 연구 결과를 감안할 때 적절한 선택이라고 판단된다²⁵.

이미 임상에서 TMR이 급성 관상동맥 폐쇄 시에는 심근 생존을 유지시키지 못함이 알려져 있고 만성 협심증 환자에서만 효과가 인정됨이 알려져 있기 때문에 급성 허혈이 아닌 만성 허혈 모델을 대상으로 하는 것이 타당하다고 판단되었으며 만성 심근 허혈의 조성에는 가장 재현성이 우수한 방법으로 확립되어 있는 ameroid ring을 선택하였다^{26,27}. 각

실험 수술 간의 기간을 4주로 설정한 것은 ameroid ring 거치 시 3주가 경과하면 전 예에서 관상동맥이 폐쇄된다는 사실과 이후 12주 정도는 국소 심근 혈류량의 변화없이 안정된 상태를 유지한다는 선행 연구 결과들에 근거한 것이다^{22,24}. 또한 임상에서 TMR의 협심증 개선 효과가 나타나는데 1~2개월이 소요된다는 사실 역시 감안하였다.

비교 대상 변수로는 연속 변수로서 정량적인 분석이 간단하여 연구자의 선입견을 배제할 수 있으며 TMR의 유용성 유무, 즉 TMR이 허혈 심근의 관류를 개선시키는지 여부를 직접적으로 검증할 수 있는 국소 심근 혈류량을 선정하였다. 단 각 영역별로 심근 혈류량의 절대치를 구하여 비교한 다른 연구들^{15,17,19} 과 달리 비허혈 영역과 허혈 영역과의 혈류량 비를 구하여 분석함으로써 각 측정 시기마다 심박출량과 심근 부하 상태, 관상동맥 저항 등이 다른데 따른 교란을 피하고자 하였다. 이는 혈류량 절대치의 계산에 필요한 표준 혈류량(심박출량)을 구하기 위하여 매 수술 때마다 대동맥에 삽관하여 혈액을 채취하는 과정을 생략할 수 있다는 장점이 있다. 또한 임상에서 동위원소 심근 관류 촬영 시 적용되는 SPECT(single photon emission computed tomography)의 data 처리 시 이용되는 방법과 유사한 방법이기도 하다. 국소 심근

혈류량의 정량적인 측정을 위해서는 이미 표준적인 국소 혈류량 측정법으로 정립되어 있는 동위원소 부착 미세구(radioactive microspher)를 이용하는 방법이 주로 이용되어 왔지만 최근 착색 미세구를 이용하는 방법이 정립되었다²⁸⁾. 이는 이미 상용화되어 있는 다섯 가지 다른 색의 미세구를 이용할 수 있기 때문에 미세구 제작을 위한 시간 소모가 필요없는 등 시간과 비용 면에서 경제적이면서도 정확성에는 방사성 동위원소를 이용한 방법과 차이가 없는 것으로 밝혀져 있다.

전술한 바와 같이 미세구를 이용한 국소 심근 혈류량 측정을 통하여 실험한 연구들 중 초기의 연구들은 모두 TMR에 의한 관류 개선 효과를 증명하는데 실패하였다^{15,17,29,30)}. 그러나 이들은 모두 급성 심근 허혈 상태에서의 효과 유무를 검토한 연구들이고 본 연구에서와 같이 만성 심근 허혈 모델에서 실험한 연구자는 Mirhoseini³¹⁾와 Yamamoto 등¹⁹⁾과 Martin 등³²⁾이 있다. 돼지에서의 만성 심근 허혈 모델을 이용하여 실험한 Mirhoseini는 TMR이 국소 심근 혈류량 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 결론 내렸지만 그가 심근 혈류량 측정에 이용한 방법은 표준적인 정량적 측정법, 즉 미세구를 이용한 방법이 아니고 자기 공명 영상을 이용하는 방법이었기 때문에 그 해석상에서 주관적인 판단과 연구자의 선입견이 개입되었을 가능성을 배제할 수 없다. Yamamoto의 연구는 실험 동물이 잠전이라는 사실 이외에는 본 연구와 유사한 실험 design으로 시행되었으며 면역조직화학적 측정을 통하여 TMR 시행 2개월 후 해당 영역의 혈관 신생이 대조군보다 유의하게 많음을 보여 주었다. 국소 심근 혈류량을 측정된 결과는 안정 상태에서의 국소 심근 혈류량은 대조군과 유의한 차이가 없고 adenosine 주사에 의한 심근 부하 상태에서의 혈류량만 TMR군에서 대조군에 비해 약 40% 높은 것으로 보고하였으나 허혈 조성 2개월 후의 허혈 영역 국소 심근 혈류량이 대조군에서는 정상 영역의 약 50%, TMR군에서는 약 75%로 그 차이가 크지는 않았다.

한편 가장 최근에 보고된 Martin 등³²⁾의 연구는 돼지의 좌회전지 관상동맥에 ameroid ring을 거치하여 만성 심근 허혈 모델을 만들고 TMR 시행 후 동위원소 부착 미세구를 이용하여 국소 심근 혈류량을 측정하였다는 점에서 본 연구와 실험 방법이 가장 유사한 것이라 할 수 있다. 이들은 안정 상태에서 비교하였을 때에도 대조군에 비하여 TMR 치료군에서 허혈 영역의 심근 혈류량이 유의하게 높고 국소 심근 수축 기능도 개선되었음을 보여 주어 본 연구와 상반되는 결론을 내렸다. 이 연구와 본 연구간의 방법상의 차이는 ameroid ring 거치 후 TMR 시행까지의 시간 간격이 각각 6주와 4주로 다르고 국소 심근 혈류량의 호전 여부를 비교한 시점이 TMR후 각각 18주와 4주로 크게 차이가 난다는 점이다.

그러므로 Martin 등의 연구 방법과 비교하여 볼 때, 본 연구의 제한 사항이라 할 수 있는 점은 우선 만성 심근 허혈 조성, TMR 시행, 최종 혈류량 측정 사이의 시간 간격이 너무 짧았을 가능성이 있다는 점이다. Ameroid ring 거치 후 3~4주에 관상동맥이 완전 폐쇄된다는 기존의 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서도 4주라는 시점을 설정하였으나 실험 동물에 따라서는 좌회전지 관상동맥의 크기에 따라 4주 경과 시에도 관상동맥이 완전 폐쇄되지 않았을 가능성이 있다. 또한 모든 실험 동물에서 관상동맥 조영술을 시행하여 관상동맥 폐쇄를 확인하지 않았기 때문에 TMR이 시행된 시점에서 충분한 심근 허혈이 조성되어 있지 않았을 가능성을 배제할 수 없게 한다. TMR 시행 후 4주째에 심근 혈류량을 최종 비교한 점 역시 본 연구의 제한 점으로 지적될 수 있다. 이는 임상에서 TMR 시행 후 협심증의 호전을 보이는 환자들이 수술 후 4주면 대부분 현격한 개선을 보인다는 보고를 바탕으로 한 것이었으나 만약 2~3개월 이상 장기간 경과 후 측정하였을 때 상이한 결과가 나타났을 가능성을 배제할 수 없는 것이다.

또 다른 제한점은 이용된 실험 동물 수가 작고 동물에 따라서 ameroid ring 거치에 따라 형성된 허혈 심근의 면적 및 허혈 정도가 상당한 차이를 보였다는 점이다. 좌회전지 영역의 심근 중 가장 중앙에 위치한 심근 조직 일부만을 채취하여 분석하였음에도 불구하고 동물에 따라서는(No. 4, 6, 14) 4개의 절편 중 일부에서만 4주 째의 허혈 영역 혈류량이 정상 영역의 80% 이하로 감소되었기 때문에 전술한 바와 같이 TMR의 효과 유무를 검증할 만큼 충분한 허혈 영역이 조성되지 않았을 가능성을 배제할 수 없는 것이다. Ameroid ring 거치 시 육안 식별 가능한 대각지를 전부 결찰하였지만 심외막이 아닌 심근 내에 대각지가 있는 경우(intramyocardial collateral) 결찰되지 않은 분지들도 상당 수 있을 것이므로 이런 차이가 실험 동물마다 4주째에 좌회전지 영역의 혈류량 감소 정도가 차이를 보이게 한 것으로 해석할 수 있다.

이상을 종합하면, 심근 허혈의 조성 기간과 TMR 시행 후 측정 시점에 따라 관찰 결과가 달라질 수 있다는 제한이 있기는 하지만 본 연구 결과는 TMR 시행 후 객관적인 검사 방법으로 뚜렷한 심근 관류 개선을 입증할 수는 없음을 밝힌 기존의 임상 성적 보고들과 일치되는 소견을 동물 실험 모델에서도 보여 주었고 최소한 TMR 시행 후 4주 이내의 초기에는 관상동맥 우회수술 등 기존의 심근 혈류 재건 치료 방법과 같은 뚜렷한 관류 개선이 일어나지 않는 것으로 결론 내리게 하였다. 그러므로 비록 많은 연구들이 TMR 후 혈관 신생이 증가함을 증명하였으나 그런 혈관 신생이 현재 이용되는 임상적인 검사 방법으로 확연히 구별될 만큼의 관류 개선을 초래할 수 있는 가능성은 높지 않다고 사료된다.

결 론

이상을 요약하면 돼지의 좌회선지 관상동맥에 ameroid ring 을 거치 후 4주간 경과한 만성 심근 허혈 모델을 치료군과 실험군으로 나누어 TMR 시행에 따른 좌회선지 영역의 국소 심근 혈류량 증가 유무를 관찰한 결과 TMR 시행 4주 후의 국소 심근 혈류량 증가치가 대조군과 비교하여 큰 차이가 나지 않는 것으로 판단되었으나 실험 동물 수의 제한으로 통계적 유의성은 검증할 수 없었다. 따라서 향후 TMR이 심근 관류를 직접적으로 개선시키는지 여부를 규명하고 작용 기전을 이해하기 위해서는 더 많은 수의 동물을 대상으로 한 연구가 후속되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Mirhoseini M, Shelgikar S, Cayton MM. *New concepts in revascularization of the myocardium.* Ann Thorac Surg 1988;45:415-20.
2. Smith JA, Dunning JJ, Parry AJ, Large SR, Wallwork J. *Transmyocardial laser revascularization.* J Card Surg 1995;10:569-72.
3. Sen PK, Udwardia TE, Kinare SG, et al. *Transmyocardial acupuncture.* J Thorac Cardiovasc Surg 1965;50:181-9.
4. Walter P, Hundeshagen H, Borst HG. *Treatment of acute myocardial infarction by transmural blood supply from the ventricular cavity.* Eur Surg Res 1971;3:130-8.
5. Frazier OH, Cooley DA, Kadipasaoglu KA, et al. *Myocardial revascularization with laser: preliminary findings.* Circulation 1995;92[suppl III]:II-58-65.
6. Horvath KA, Mannting F, Cummings N, Shernan SK, Cohn LH. *Transmyocardial laser revascularization: operative techniques and clinical results at two years.* J Thorac Cardiovasc Surg 1996;111:1047-53.
7. Horvath KA, Cohn LH, Cooley DA, et al. *Transmyocardial laser revascularization: results of a multicenter trial with transmyocardial laser revascularization used as sole therapy for end-stage coronary artery disease.* J Thorac Cardiovasc Surg 1997;113:645-54.
8. Krabatsch T, Tambour L, Lieback E, Shaper F, Hetzer R. *Transmyocardial laser revascularization in the treatment of end-stage coronary artery disease.* Ann Thorac Cardiovasc Surg 1998;4:64-71.
9. Allen KB, Dowling RD, Fudge TL, et al. *Comparison of transmyocardial revascularization with medical therapy in patients with refractory angina.* N Engl J Med 1999; 341:1029-36.
10. Cooley DA, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Shannon RL, Angelini P. *Transmyocardial laser revascularization: anatomic evidence of long-term patency.* Texas Heart Institute Journal 1994;21:220-4.
11. Yano OJ, Bielefeld MR, Jeevanandam V, et al. *Prevention of acute regional ischemia with endocardial laser channels.* Ann Thorac Surg 1993;56:46-53.
12. Horvath KA, Smith WJ, Laurence RG, Schoen FJ, Appleyard RF, Cohn LH. *Recovery and viability of an acute myocardial infarct after transmyocardial laser revascularization.* J Am Coll Cardiol 1995;25:258-63.
13. Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Conger JL, et al. *Long- and short-term effects of transmyocardial laser revascularization in acute myocardial ischemia.* Lasers Surg Med 1997;20:6-14.
14. Whittaker P, Rakusan K, Kloner RA. *Transmural channels can protect ischemic tissue: assessment of long-term myocardial response to laser- and needle-made channels.* Circulation 1996;93:143-52.
15. Whittaker P, Kloner RA, Przyklenk K. *Laser-mediated transmural myocardial channels do not salvage acutely ischemic myocardium.* J Am Coll Cardiol 1993;22:302-9.
16. Kohmoto T, Fisher PE, Gu A, et al. *Physiology, histology, and 2-week morphology of acute transmyocardial channels made with a CO₂ laser.* Ann Thorac Surg 1997;63:1275-83.
17. Kohmoto T, Fisher PG, Gu A, et al. *Does blood flow through Holmium:YAG transmyocardial laser channels?* Ann Thorac Surg 1996;61:861-8.
18. Fujita M, Ohno A, Wada O, et al. *Collateral circulation as a marker of the presence of viable myocardium in patients with recent myocardial infarction.* Am Heart J 1991;122:409-14.
19. Yamamoto N, Kohmoto T, Gu A, DeRosa C, Smith CR, Burkhoff D. *Angiogenesis is enhanced in ischemic canine myocardium by transmyocardial laser revascularization.* J Am Coll Cardiol 1998;31:1426-33.
20. Chu VF, Giaid A, Kuang JQ, et al. *Angiogenesis in transmyocardial revascularization: comparison of laser versus mechanical punctures.* Ann Thorac Surg 1999; 68:301-8.
21. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. *Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction.* Cardiovasc Res 1987;21:737-46.
22. White FC, Carroll SM, Magnet A, Bloor CM. *Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion.* Circ Res 1992;71:1490-500.
23. Hearse DJ. *Models and problems in the study of myocardial ischemia and tissue protection.* Eur Heart J 1983;C:43-8.
24. White FC, Roth DM, Bloor CM. *The pig as a model for myocardial ischemia and exercise.* Lab Ani Sci 1986;36: 351-6.
25. Dobbs SL, Roth DM, Bloor CM, White FC. *Effects of age on coronary collateral development.* Cor Art Dis 1991;2:473-80.
26. O'Konski MS, White FC, Longhurst J, Roth D, Bloor CM. *Ameroid constriction of the proximal left circumflex*

coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation. *Am J Cardiovasc Path* 1987;1:69-77.

27. Tomoke H, Inou T, Watanabe K, Mizukami M, Kikuchi Y, Nakamura M. *Functional significance of collaterals during ameroid-induced coronary stenosis in conscious dogs. Interrelationships among regional shortening, regional flow and grade of coronary stenosis.* *Circulation* 1983;67:1001-8.

28. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. *Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres.* *Circulation* 1991;83:974-82.

29. Hardy RI, James FW, Millard RW, Kaplan S. *Regional myocardial blood flow and cardiac mechanics in dog hearts with CO₂ laser-induced intramyocardial revascularization.* *Basic Res Cardiol* 1990;85:179-97.

30. Lutter G, Yoshitake M, Takahashi N, et al. *Transmyocardial laser-revascularization: experimental studies on prolonged acute regional ischemia.* *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13:694-701.

31. Mirhoseini M, Cayton NM. *Transmyocardial laser revascularization: historical background and future directions.* *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:245-53.

32. Martin JS, Sayeed-Shah U, Byrne JG, et al. *Excimer versus carbon dioxide transmyocardial laser revascularization: effects on regional left ventricular function and perfusion.* *Ann Thorac Surg* 2000;69:1811-6.

=국문초록=

배경: 최근 레이저를 이용한 경심근 혈류 재건술(TMR)이 말기 협심증 환자에서 협심증의 개선에 효과가 있는 치료 방법으로 보고되고 있으나 여러 동물 실험 연구들에서는 상반되는 결과들이 발표되어 왔다. 본 연구에서는 돼지의 만성 심근 허혈 모델에서 국소 심근 혈류량의 측정을 통하여 TMR 후 심근 관류 개선 여부를 검증하고자 하였다. **대상 및 방법:** 14마리의 돼지에서 좌회선지 관상동맥에 ameroid ring을 거치하여 만성 심근 허혈을 조성한 후 4주 경과시 각 7마리씩 대조군과 실험군으로 나누어 대조군에서는 개흉과 심낭내 유착 박리만을 시행하였고 실험군에서는 Ho:YAG 레이저를 이용하여 좌회선지 영역에 TMR을 시행하였다. 이후 다시 4주가 지난 후 동물을 희생시키고 심장을 적출하여 각 수술 시마다 주사된 각각 다른 색의 착색 미세구를 이용, 국소 심근 혈류량을 측정하였다. 심근 절편 내의 미세구 함유량을 측정하여 회선지 영역과 심실 중격간의 혈류량 비를 비교함으로써 대조군과 실험군 사이의 혈류량 변화의 차이를 분석하였다. **결과:** Ameroid ring 거치 4주 후 좌회선지 영역의 심근 혈류량은 심실 중격 혈류량의 46~89%로 감소되었다. 8주 경과시의 좌회선지 영역 심근 혈류량은 대조군 4마리 중 3마리에서 4주 경과 시에 비해 유의하게 증가되었으며 증가 폭은 14~18%였다. 실험군 6마리 중에서는 2마리에서만 유의한 증가가 관찰되었으며 증가 폭은 7~34%였다. **결론:** 돼지 만성 심근 허혈 모델에서 Ho:YAG 레이저를 이용한 TMR 시행 4주후 허혈 영역의 국소 심근 혈류량 증가는 대조군과 비교하여 큰 차이가 나지 않는 것으로 판단되었다. 그러나 통계적 유의성을 검증하기 위해서는 더 많은 수의 동물을 대상으로 한 연구가 후속되어야 할 것으로 사료된다.

- 중심 단어:** 1. 관상동맥질환
2. 경심근레이저혈류재건술
3. 심근혈류량