처리방법에 따른 혈소판 혈장의 농축도에 관한 연구

민승기 · 김형주 · 차수련
원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

STUDY ON PLATELET RICH PLASMA CONCENTRATION ACCORDING TO PROCESSING METHOD

Seung-Ki Min, Hyung-Ju Kim, Soo-Ryen Cha
Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University

Recently, Platelet rich plasma(PRP) is commonly used because it is now well known that platelets have many functions beyond that of simple hemostasis in aspect of containing autogenous source of several growth factors. It could be responsible for increasing cell mitosis, increasing collagen production, recruiting other cells to the site of injury, initiating vascular ingrowth, and inducing cell differentiation, enhancing bone formation capacity and easily handling to clinician. However, in spite of these clinical advantages, still the theory behind the use of PRP is compelling.

This study was to determine preparation techniques used to increase the concentration of platelets and growth factors are all crucial steps in early wound healing of bone graft which may lead to a more rapid and denser bone regenerate. 200 volunteers were sampled and PRP were prepared according to each evaluation item in this study.

Higher concentration of platelets have been gained in double centrifugation. 2000 and 2500 rpm showed proper concentration of platelets at first centrifugation and 5000 rpm in second. Timing for 2 minutes was showed good concentration of platelets in high and low centrifugation speed. It was better concentration of platelets in 20 or 30 ml volume during centrifugation. In histomorphologic findings, degrnulated and high concentraion of platelets were found in low centrifugation speed.

Key words : PRP, Centrifugation, Concentration of platelets

Ⅰ. 서 론

발치 후 보다 많은 치조골을 유지하기 위해 최근 각종 다양한 성장인자를 개발, 정제하여 이를 임상에 이용한 치료법의 우수성에 대해 밝혀지고 있는데 이러한 골 형성을 촉진하는 물질로는 골유도 단백(bone morphogenetic protein:BMP), 혈소판 유래 성장 인자, 다양한 골 형성 기질 등을 들 수 있다. 그 중에서도 혈소판 농축 혈장은 현재 임상적으로 가장 쉽게 성장인자를 얻을 수 있는 방법인 동시에 질환의 감염이나 면역학적 부작용을 배제시킬 수 있고 이식골의 경화와 무기질화를 촉진시킨다고 보고 되고 있다[1-6].

악안면 영역에서 혈소판 농축 혈장을 사용한 골 이식술에 대한 보고는 1997년 Whitman[1]에 의해서 처음보고 되었으며 이후, Marx[2]는 혈소판 농축 혈장을 이용한 골이식술 시 이식골의 초기 합병(consolidation)과 광화(mineralization)가 우수하고 방사선학적으로 성숙도가 1.62~2.16배 정도 더 우수하였으며, 또한 골 구조에서의 밀도가 15~30%가 개선되었다고 보고하였다. 또한 조직학적으로는 혈

※ 본 논문은 2002년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어짐.

소판 풍부혈장을 사용한 경우의 골 밀도 (74.0%±11%)가 혈소판 풍부 혈장을 사용하지 않은 경우 (55.1%±8%)보다 높았다고 보고하였다. 그 이외에도 많은 저자들에 의해, 혈소판 풍부 혈장은 여러 성장 인자 함유로 인한 이식된 골의 치유 반응 시 혈액 공급 상태를 좋게 하는 한편, 골 이식재의 초기 치유 속도를 촉진시키고 골 신생 촉진 효과, 혈관 신생 능력, 골 전도 능력, 지혈 효과 및 항 감염 효과 등이 있으며, 골 이식 시 형태 형성 및 조작성의 용이, 골 이식재 수용부의 안정성을 높여 골 이식술의 성공률을 높일 수 있는 것으로 알려지고 있다[4-7]. 또한, 다양한 자가 성장 인자의 공급원으로서 혈소판 농축 혈장을 연구하였는데 이에 대한 분석에 의하면 혈소판 유래 성장인자(PDGF, 전환성장인자 베타-12(TGF-β1, 2) 등 최소 3개의 중요한 성장인자가 분리된 혈소판 내의 α-입자에 존재한다고 알려져 있으며, 몇몇 연구에서는 인슐린유사성장인자-I(Insulin-like growth factor-I)도 존재한다고 보고 되고 있다. 혈소판 농축 혈장 내에 있는 이들 성장인자의 역할은 골재생시 세포 활성을 자극시키고 초기 골 형성을 촉진시키고 재생될 골의 성숙에 영향을 미친다고 볼 수 있다[8-12]. 근래에 혈소판 농축 혈장에 관심이 더 집중되고, 다양한 연구가 진행되는 데에는 골 조직이 더 빨리 기능할 수 있게 하며, 더 빨리 임플란트와 숙주골과의 골 접촉(osseointegration)을 위치시키게 하는 데에 있다[11,13].

그러나 아직까지도 혈소판 농축 혈장의 제작 방법 역시 술자마다 매우 다양한 상태이며, 이로 인해 그 효과에 대한 논쟁이 활발히 진행되고 있다[16-17]. 일반적으로 원심분리를 통해 모집된 혈소판 농축 혈장은 탈 과립화의 과정에 의해 작용이 시작되므로, 수집 과정에서 적절한 양의 항응고제에 의해 응고되지 않은 상태를 유지해야 하고, 가능한 낮은 회전 속도와 짧은 시간으로 혈소판 농축 혈장을 제작하여, 포함된 혈소판이 손상이나 용해 없이, 정확하고 적절한 고농도로 응집된 상태로 분리되어야 한다[17]. 이를 위해서 현재까지 혈소판 농축 혈장의 제작을 위해 FDA에서 정식으로 공인된 장비는 Smart PreP(Harvest Technologies Inc, Plymouth, MA)와 Platelet Concentration Collection System(PCCS; 3i innovations, Inc, West Palm Beach, FL) 2가지 밖에 없는 상태이며, 장비의 가격이 고가이고, 매 시술마다 고가의 수집용 백(collecting bag)을 교체해 주어야 만하며, 이에 비해 얻어지는 혈소판의 함유량과 성장인자의 양은 기저 혈소판 양의 320%에서 400% 정도로 불과하다[18,19]. 본 연구의 목적은 이러한 고가의 장비를 사용하지 않고, 일반적인 원심 분리 장비를 이용하여, 혈소판 농축 혈장의 농축도를 최대한 높이면서, 응집된 혈소판의 손상이나 용해를 최소화하기 위해서 원심 분리의 방법 및 제작 과정을 평가하여, 보다 효율적인 임상적 지침을 확보하고자 본 연구를 시행하였다.

Ⅱ. 실험 대상 및 방법

1. 실험 대상

19세에서 38세까지(평균 연령 25.3세)의 200명의 지원자(남자 134명, 여자 66명)를 대상으로 본 연구의 목적을 충분히 설명하고 동의한 상태에서 혈액을 채취하였다. 술전 모든 대상자는 전신질환이 없고 항생제 치료를 받지 않는 건강한 상태였다. 혈소판 농축 혈장 제작 과정의 질적 수준의 객관성을 유지하기 위해 충분한 임상적 경험을 지닌 1명의 숙련된 연구가에 의해 처리되었다.

2. 실험 방법

먼저 주사기를 이용하여, 상지의 표층 정맥에서 실험 목적에 따라 52cc의 혈액을 채취하였다. 혈액을 citric acid가 함유된 50cc의 placon tube에 넣고, 제작 과정의 평가 항목에 따라 PRP를 제작하여, 각각 CBC를 시행하여, PRP 내의 혈소판 함유량 등을 평가하였으며, 기저 혈액의 농축 지수(%)를 구하였다. 평가 항목을 제외하고 모든 제작 과정은 Whitman(1997)[1]과 Marx(1998)[2]의 방법을 수정하여 다음과 같이 사용하였다.

1. 혈액응고를 막기 위하여 채취된 혈액 양의 1/10에 해당되게 citric acid나 헤파린이 함유된 용기에 넣고 채취된 혈액과 같이 가볍게 흔든다.
2. 1차 원심 분리는 저울로 무게를 측정하여 대칭으로 동일한 무게가 되게 하여 원심 분리기에 용기를 넣은 후, 3000 rpm으로 3분간 원심 분리를 시행한다.
3. 적혈구를 제외한 상부의 무색 형태를 띤 혈소판 비 함유 혈장(platelet poor plasma)과 적혈구 상방 경계층에 있는 회색의 응괴 덩어리인 buffy coat를 주사기 또는 pipet으로 분리한다. 이때 적혈구가 빨려나오지 않게 최대한 주의를 가한다.
4. 1차 원심 분리에서 분리된 용액을 다른 용기로 옮긴 후, 1차와 같이 대칭으로 동일 무게가 되게 원심 분리기에 용기를 넣은 후, 5000 rpm으로 5분간 원심 분리를 시행한다.
5. 2차 원심 분리 후, 하방에 미소량의 함유된 적혈구와 그 상방으로 얇은 혈소판 농축층, 그리고 대다수를 이루는 혈소판 비 함유 혈장 층으로 분리가 이뤄진다. 이 용액에서 하방 1/10만 남겨두고 나머지의 혈소판 비 함유 혈장층은 제거한다.
6, 남아 있는 1cc의 용액을 1시간 동안 실온에 보관하면, 하방에 고농도로 농축된 혈소판 농축 혈장이 선홍색의 색상을 띠며, 지속적으로 풀려나오게 한다.

3. 임상 병리학적 평가 항목

(1) 원심분리 속도에 따른 혈소판 함유량

1) 1차 원심 분리 속도 차이에 따른 분석

30명의 지원자를 대상으로 5명씩 6군으로 나누어 첫 번째 회전 속도만을 각각 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 rpm으로 달리하여, 통법에 따라 PRP를 제작한 후 평가하였다.

2) 2차 원심 분리 속도 차이에 따른 분석

20명의 지원자를 대상으로 5명씩 4군으로 나누어, 두 번째 회전 속도만을 각각 3000, 4000, 5000, 6000 rpm으로 달리하여, 통법에 따라 PRP를 제작한 후 평가하였다.

(2) 원심 분리 시간에 따른 혈소판 함유량

1) 1차 원심 분리 시간에 따른 분석

25명의 지원자를 대상으로 5명씩 5군으로 나누어, 첫 번째 회전 시간만을 1분, 2분, 3분, 5분, 7분으로 나누어 통법에 따라 PRP를 제작한 후 평가하였다.

2) 2차 원심 분리 시간에 따른 분석

25명의 지원자를 대상으로 5명씩 5군으로 나누어, 두 번째 회전 시간만을 1분, 2분, 3분, 5분, 7분으로 나누어 통법에 따라 PRP를 제작한 후 평가하였다.

(3) 원심 분리 회수에 따른 혈소판 함유량

25명의 지원자를 대상으로 5명씩 5군으로 나누어, 원심 분리 회수에 따라 저속 원심 분리1회, 고속 원심 분리 1회, 2회(저속 후 고속), 2회(고속 후 저속), 3회(저속 2회 후 고속) 등으로 구별하여 통법에 따른 PRP를 제작한 후 평가하였다.

(4) 용기에 채워진 혈액량에 따른 혈소판 함유량

20명의 지원자를 대상으로 5명씩 4군으로 나누어 50cc 튜브에 10ml, 20ml, 30ml, 50ml씩 채취한 혈액을 각각 채우고, 위의 혈소판 농축 혈장 제작 방법에 따라 PRP를 제작한 후 평가하였다.

(5) 혈액 도말 검사 및 조직 계측학적 평가

각각의 제작된 혈소판 농축 혈장을 통법에 따라, Wright Giemsa 염색을 실시하여, 광학 현미경(Multi-viewing microscope, Olympus, Japan)의 고배율상(×1000)으로 검사하였으며 디지털 카메라로 20 시야 이상을 관찰 및 동일시야 크기로 영상을 채득한 후, 단위 크기 당 함유된 혈소판의 수와 탈 과립된 비율을 계산하여, 평균값을 구하였다. 그 후 각각의 영상에서 채득된 결과를 one way ANOVA(Multitab Inc.,USA)를 이용하여 신뢰 수준 95%에서 각각의 결과를 비교하여 군들 간의 유의성을 평가하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. 원심분리 속도에 따른 혈소판 함유량

혈소판 농축 혈장의 제작 시 첫 번째 원심 분리 회전 속도가 2000 rpm인 경우에 혈소판함유도가 기저혈액에 비해 평균 917%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 2500 rpm이 892%, 3000 rpm이 788% 순서를 보였다(Table 1).

또한 혈소판 농축 혈장의 제작 시 두 번째 원심 분리 회전 속도가 5000 rpm 일 때 혈소판 함유도가 기저 혈액에 비해 평균 897%로 가장 높게 나타났다(Table 2).

2. 원심 분리 시간에 따른 혈소판 함유량

혈소판 농축 혈장의 제작 시 첫 번째 원심 분리에서 분리 시간이 2분인 경우에 혈소판함유도가 기저혈액에 비해 평균 946%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 3분이 937%, 5분이 852%의 순서로 높게 나타났다(Table 3).

Table 1. Platelet Concentration for 1st Centrifugation Speed (mean)

1st Centrifugation Speed(rpm)	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
1000	940	411
1500	1,749	543
2000	2,847	917
2500	3,011	892
3000	2,541	788
4000	2,230	729

Table 2. Platelet Concentration for 2nd Centrifugation Speed (mean)

2nd Centrifugation Speed(rpm)	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
3,000	540	411
4,000	1,640	543
5,000	2,898	897
5,800	1,921	582

Table 3. Platelet Concentration for 1st Centrifugation Time(mean)

1st Centrifugation Time(rpm)	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
1	1,349	422
2	2,740	946
3	2,805	937
5	2,314	852
7	2,043	781

Table 4. Platelet Concentration for 2nd Centrifugation Time(mean)

2nd Centrifugation Time(rpm)	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
2	3,023	943
3	3,047	917
5	3,011	892
7	2,541	788

Table 5. Platelet Concentration at Centrifugation Times(mean)

Centrifugation	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
Single (Low speed)	923	267
Single (High speed)	1,547	417
Double (High to low)	1,411	392
Double (Low to high)	2,544	748
Triple (Low ×2 to high)	3,213	832

Table 6. Platelet Concentration at Containing Volume (mean)

Volume of Containing Blood (ml)	Platelet	
	Gained platelet number (unit:1000)	Increase above baseline(%)
10	2,230	634
20	3,088	816
30	2,980	822
50	1,984	453

Table 7. Histomorphogenetic Analysis at 1st Centrifugation Speed

1st Centrifugation Speed	Platelet	
	platelet number	Degraulation Ratio(%)
1000	8 *	0.5 *
1500	71 *	2.3 *
2000	435 *	5.7 *
2500	327 *	13.2 *
3000	123 *	87.3 *
4000	-	-

* P 〈0.05

혈소판 농축 혈장의 제작 시 두 번째 원심 분리에서 분리 시간이 2분인 경우에 혈소판함유도가 기저혈액에 비해 평균 943%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 3분이 917%, 5분이 892%의 순서로 높게 나타났다(Table 4).

3. 원심 분리 회수에 따른 혈소판 함유량

혈소판 농축 혈장의 제작 시 원심 분리 회수가 3회 시행한 경우(낮은 rpm 2회 후 높은 rpm으로 원심분리)에 혈소판 함유도가 기저 혈액에 비해 평균 832 %로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 낮은 rpm에서 높은 rpm으로 2회 시행한 경우가 평균 748%의 순서로 높게 나타났으나, Marx 등이 사용한 높은 rpm에서 낮은 rpm으로 처리한 경우에는 평균 392%의 낮은 혈소판 함유도를 보였다(Table 5).

4. 용기에 채워진 혈액량에 따른 혈소판 함유량

혈소판 농축 혈장의 제작 시 50 cc의 용기에 채워진 혈액량에 따라 20 cc와 30 cc를 채운 상태로 제작했을 때, 820% 정도로 높게 나타났으며, 다음으로 낮은 rpm에서 높은 rpm으로 2회 시행한 경우가 평균 748%의 순서로 높게 나타났다(Table 6).

5. 조직계측학적 평가

조직학적인 계측 결과 첫 번째 원심 분리 속도가 2000 rpm인 경우에 한 사진 당 평균 435개의 혈소판이 발견되었으며, 탈 과립 비율은 5.7%였으며, 다음으로 2500 rpm인 경우에는 평균 327개의 혈소판이 발견되었으며, 13.2%의 탈 과립 비율을 보였다. 그러나, 4000 rpm의 속도로 원심분리한 경우에는 대부분의 경우에 혈소판이 발견되지 않았다(Table 7).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

최근 각종 다양한 성장인자를 개발, 정제하여 이를 악안면 영역의 임상에 이용한 치료법의 우수성에 대해 많은 연구들이 이뤄지고 있다[1-8]. 이러한 골 형성을 촉진하는 물질로는 골유도 단백(bone morphogenetic protein: BMP), 혈소판 유래 성장 인자, 다양한 골 형성 기질 등을 들 수 있으며, 그 중에서도 혈소판 농축 혈장은 현재 임상적으로 가장 쉽게 성장인자를 얻을 수 있는 방법인 동시에 질환의 감염이나 면역학적 부작용을 배제시킬 수 있고 이식골의 경화와 무기질화를 촉진시킨다고 알려져 있다. 혈소판 농축 혈장의 임상적 적용 시 각광 받고 있는 가장 큰 이유는 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor: PDGF) 및 베타 전환 성장 인자(transforming growth factor beta: TGF-β), 이외의 많은 여러 가지 자가 성장 인자들을 포함하고 있기 때문이며, 이 성장 인자들은 이식골 치유 과정에서 신생 혈관 형성 및, 세포 화학 주성유도(chemotaxis), 세포 분열 촉진(mitosis), 간세포(stem cell) 증식유도 등을 도와주며 농축 혈소판 물리적 특성인 높은 점조도로 인하여 골 이식 시 골편 간 긴밀한 결합력 제공 및 혈류망 유지 등으로 인하여 초기 골 재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[2,15].

일반적으로 혈소판 농축 혈장의 임상적 응용은 피브린 접착제(Fibrin adhesive)의 임상적 적용의 역사와 그 기원을 같이한다. Bergel(1909)[20]이 최초로 피브린 분말을 이용하여 모세혈관의 유착 과정을 촉진시켰다는 보고 이래로, 초기에 피브린 접착제는 간이나 신장 뇌와 같은 장기에서 조절하기 어려운 출혈이나 기존의 감염, 화상(burn), 이식체의 수용부에서 지혈제나 외과적 조직 접착제로서 사용될 필요성에 의해 여러 석학들의 수십 년간의 연구에 의해 개발되었다. 이러한 여러 가지 방법들을 Cronkite와 Tidrick & Warner[21]등 (1944)이 체계화 하여, 조직 접착제라는 용어로 명명하였으며, 조직 치유와 창상 폐쇄를 촉진시키는 밀폐와 지혈의 특성을 가진 성분으로 기술하였다. 그러나 초기에는 낮은 피부리노겐 농도 때문에 최소한의 조직 접착 및 지혈작용 효과만을 지녀, 임상에서 혈소판 농축 혈장의 기본적 응용이 잘 적용되지 못하다가 1980년 Martas 등[22]이 피브리노겐의 농도를 증가시켜 골과 연조직 지혈, 경막 폐쇄, 유리이식편 고정, 미세혈관 및 신경 문합 등 다양한 임상적 활용의 길을 열어, 그 사용 범위가 크게 확장되었다. 이후 Martas와 공동 연구자들에 의해 유럽에서 Tissucol(Immuno AG, Vienna, Austria)이 상품화 되었고, 이외에도 Hemacure, Hemaseel, Tisseel, Tissucol, Fibrin Sealant (Immuno AG, Vienna, Austria) 등과 같은 이와 유사한 상품들이 시장에 소개되어 광범위하게 사용되었다. 악안면 영역에서도 1980년대 중반부터 미세신경접합술 및 피부이식술에 사용되었고 골 이식 후의 골 세편의 고정, 봉합후의 지지도모, 연조직들의 지혈 작용, 발치후의 출혈 반지, 술 후 혈관종의 방지 등 광범위하게 사용되고 있었다[23]. 이것은 유럽, 캐나다, 일본 등에서 여러 해 동안, 많은 외과적 적용 시에 사용되었고, 많은 저널에서 효과에 대한 논쟁이 발생하였다. 논쟁의 쟁점은 함유된 fibrinogen이 동종의 한 사람, 또는 여러 사람의 공여자로부터 채득되었기 때문이며, 미국 식품의약품안정청(FDA)에서는 C형 간염이나, HIV 감염과 관련된 잠재적 위험 때문에 사용이 금지되었다. 또한 Fibrin glue의 처리 과정에서 사용되는 thrombin 역시 bovine origin으로서 매우 가능성은 희박하지만 광우병(bovine spongiform encephalopathy) 등의 전이 가능성을 배제하기 어렵다는 견해를 제시되고 있고, 또한 이종의 thrombin으로 인해 anti-thrombin antibody가 체내에 만들어져 면역 반응에 의한 위험성이 보고 되었다. 이러한 동종 또는 이종 공여자에서 기원한 성분에서 기원한 논쟁의 일련의 결과로서, 환자 자신으로부터 자가 피브리노겐을 채취하여, 질환의 이환 가능성을 배제하려는 시도가 계속되어 왔다. 초창기 시도로서, 수술 며칠 전에 혈액의 채취 및 Cryoprecipitation, ammonium sulfate와 함께 precipitation하는 방법 등 처리 과정을 통해 높은농도의 자가 피부리노겐이 분리하려는 시도가 있었으며, 이후, 혈장원심분리(plasmophresis)를 통해 수술하기 수분 전에 혈소판 농축 혈장(platelet rich plasma)을 얻는 방법이 개발되어, Hartmann(1992), Tawes(1994), Whitemann (1997), Marx(1998) 등이 그 성공적인 효과에 대해 보고하면서 활발한 임상적 적용이 시작되었다[1,2,3,24]. 하지만, 이러한 방법들은 400-500 cc의 많은 혈액을 채취하여, 일상적인 외래 진료에 사용하기에는 적합하지 않으며, 처리 과정에서 술자마다 서로 다른 protocol과 비싼 고가의 장비가 채택됨에도 불구하고, 혈소판의 함유량과 성장인자의 양은 기저 혈소판 양의 404%와 324%로서 높지 않으며, 각각의 protocol에 대한 명확한 검증이 없음으로 인해 그 효과에 대한 논쟁이 아직까지도 활발히 진행되고 있다. 현재까지 혈소판 농축 혈장의 제작을 위해 FDA에서 정식으로 공인된 장비는 Smart PreP(Harvest Technologies Inc, Plymouth, MA)와 Platelet Concentration Collection System(PCCS; 3i innovations, Inc, West Palm Beach, FL) 2가지 정도 밖에 없는 상태이며, 장비의 가격이 매우 고가이고, 매 시술마다 고가의 수집용 백(collecting bag)을 교체해 주어야하는 어려움이 있다. 일반적으로 원심분리를 통해 모집된 혈소판 농축 혈장은 탈 과립화의 과정에 의해 작용이 시작되므로, 수집 과정에서 적절한 양의 항응고제에 의해 응고되지 않은 상태를 유지해야 하고, 가능한 낮은 회전 속도와 적은 회전 시간으로 혈소판이 손상이나 용해 없이, 매우 정밀하게, 적절한 고농도로 응집된

상태로 분리되어야 한다. 본 연구에서는 이러한 고가의 장비를 사용하지 않고, 일반적인 원심 분리 장비를 이용하여, 혈소판 농축 혈장의 농축 도를 최대한 높이면서, 응집된 혈소판의 손상이나 용해를 최소화한 상태의 혈소판 농축 혈장을 확보하기 위해 혈소판 농축 혈장 제작 과정에 수반되는 원심 분리 속도, 회전 시간, 분리 회수, 용기에 채워진 혈액의 양에 따라 혈소판 함유 도에 대한 객관적 평가를 시행하였으며, 이외에도 Buffy coat의 함유 여부, 농축 비율, 항응고제 함유 비율 등에 따라, 임상 병리학적 검사와 혈액 도말 검사를 시행하였다. 이전에 Marx 등이 사용한 방법은 높은 5600 rpm/min의 높은 회전속도로 원심 분리를 시행한 후에 적혈구 부위를 환자에게 되돌리고 나서, 다시 낮은 2400 rpm의 속도로 원심 분리를 시행하는 방법으로서 본 연구에서도 먼저 높은 속도로 1차 원심 분리 시행 후 낮은 속도의 2차 원심 분리를 시행한 결과 그들이 보고한 338%와 유사한 평균 392%의 혈소판 농도를 보였다. 최근에는 이와 반대로, 낮은 회전 속도를 이용하여, Platelet Poor Plasma와 분리시 결손되는 혈소판의 비율을 줄이기 위해 비교적 넓은 면적을 갖는 Platelet Rich Plasma를 먼저 분리해 낸 후, 두 번째에 높은 회전 속도를 이용하여 보다 더 얇고, 집중된 혈소판 농축 층을 얻는 방식을 일반적으로 사용하고 있다. 본 연구를 통한 분석 결과, 첫 번째 원심 분리 시에 2000 rpm과 2500 rpm에서 혈소판 함유량이 기저 혈액에 비해 평균 917%와 892%로 공인된 장비를 사용한 경우보다 혈소판 함유량이 훨씬 높게 나타났으며, 조직학적 계측에서도 혈소판 수가 높으면서도 탈 과립된 비율이 5.7%와 13.2%로 낮게 나타나 저속의 원심 분리 후 고속의 원심 분리를 시행하는 것이 우수한 혈소판 농축 혈장을 얻는데 효과적임을 확인할 수 있었다. 그러나, 2000 rpm 이하로 원심 분리하는 경우에는 분리가 잘 이뤄지지 않으며, 3000 rpm 이상으로 1차 원심 분리를 시행하는 경우에는 조직 계측학적으로 손상되거나 탈 과립화된 상태의 혈소판과 응혈된 적혈구의 비율이 80%이상이었다. 2차 원심 분리 속도는 최소한 5000 rpm의 속도가 이뤄질 때만 육안적으로 혈소판이 하방으로 고농도로 농축되어 혈장과 분리된 층을 형성하였으며, 4000 rpm까지는 이러한 층의 분리가 분명하게 일어나지 않았다. 원심 분리를 시행한 시간은 저속 및 고속 모두 2분 정도에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 특히 고속 원심 분리 시간을 길게 한 경우 거의 모든 혈소판과 적혈구가 파괴되거나, 응혈된 형태의 조직학적 소견을 띠었으며, 2분 정도로 짧게 하는 경우에, 육안적으로 층의 분리가 확실히 이뤄지면서도, 조직학적으로 손상되거나, 탈 과립된 혈소판의 비율이 현저히 낮게 나타났다. 결손되는 혈소판의 비율을 줄이기 위해서, 3회의 원심 분리(저속의 원심 분리를 2회 시행하고, 고속의 원심 분리를 시행)한 경우에 함유된 혈소판의 함유도가 2회의 원심 분리를 시행한 경우보다 다소 높은 결과를 보였으나, 832%와 748%로 유의할 만한 차이를 보이지는 않았다. 그러나, 용기에 채워진 혈액량에 따라 이와 같은 결과는 차이가 있을 수 있다. 실제로, 본 실험에서 사용한 50 ml의 용기에 가득 혈액을 채우고 원심 분리를 시행한 경우에는 낮은 속도와 짧은 시간의 처리로는 원심 분리가 잘 이루어지지 않았으며, 혈소판 함유량도 일반 혈액의 453% 수준이었으나, 20ml와 30ml씩을 채우고 원심 분리한 경우에는 임상적으로도 낮은 속도와 짧은 처리 시간만으로도 816%와 822%의 높은 혈소판 함유도를 보였다. 이는 양측 상악동을 거상해야 하는 경우와 같이 많은 혈소판 농축 혈장을 필요로 하는 경우에 50 cc의 많은 혈액을 단일 용기에 담는 것보다는 이를 1/2씩 분할하여, 원심 분리를 시행하는 것이 더 유용한 방법이 될 수 있음을 시사해준다. Buffy coat의 함유량에 따라서는 함유한 경우가 856%로서 함유하지 않은 경우의 201%보다 현저하게 높은 혈소판 함유도를 보여주었다. 농축 비율에 따라서는 채취한 혈액량의 1/5에 해당하는 PRP를 제작한 경우에는 평균 372%, 1/10에 해당하는 PRP를 제작한 경우에는 917%, 1/20에 해당하는 PRP를 제작한 경우에는 1490%의 혈소판 함유도를 보였다. 따라서 Marx 등이 제시한 기저 혈액의 4-5배에 해당하는 치료 농도의 조건을 만족하기 위해서는 1/10 이상의 농축을 시행하는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 혈소판의 탈과립과 손상을 막기 위한 항응고제의 적절한 함유량은 Marx가 제시한 채취한 혈액량의 1/7.5인 경우에서 816%, 1/10 경우에서 832%의 혈소판 함유도를 보였다. 이상의 결과가 혈소판 농축 혈장의 제작 과정에 적용될 경우, 고가의 장비를 사용하지 않고, 일반적인 원심 분리 장비를 이용하여, 혈소판 농축 혈장의 농축도를 최대한 높이면서, 응집된 혈소판의 손상이나 용해를 최소화한 상태의 혈소판 농축 혈장을 확보할 수 있는 유의할 만한 임상적 지침이 될 것으로 사료되며, 생체 및 임상적 적용을 통한 부가적인 연구를 통해 혈소판 농축 혈장의 효과를 극대화할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서, 다양한 자가 성장 인자을 가진 것으로 알려진 혈소판 농축 혈장을 제작 과정에 따른 임상 병리학적, 조직계측학적 평가를 통하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2회 이상의 원심 분리가 단일 원심 분리에 비해 높은 혈소판 함유도를 보였으며, 1단계 원심분리에서는 원심분리 속도가 2000 rpm이나 2500 rpm에서, 2단계 원심분리에서는 5000 rpm 속도에서 혈소판 농도가 높았다.
2. 원심 분리 시간은 저속과 고속 모두에서 2분인 경우 혈소판 함유도가 가장 높게 나타났다.

3. 50ml 용기에 채워진 혈액량이 20ml 또는 30ml를 채운 경우가 50ml를 채운 경우보다 높은 혈소판 함유도를 보였다.
4. 조직계측학적으로 2000 rpm의 저속 원심 분리 시 높은 혈소판 함유도 및 낮은 탈 과립 비율을 보였다.

결론적으로 혈소판 농축 혈장의 농축도는 50cc 용기에 채워진 20cc 혈액양에서, 1단계 원심분리에서는 2000 rpm으로 2분간 원심 분리시키고 2단계에서 5000 rpm 속도로 2분간 원심분리 시킨 경우가 현저히 높은 혈소판 함유도 및 낮은 탈 과립 비율을 보였다.

참고문헌

1. Whitman DH, Berry RL, Green DM : Platelet Gel : An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 55 : 1294, 1997.
2. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR : Platelet-rich plasma : Growth factor enhancement for bone grafts. Oral surg Med Oral Pathol 85 : 836, 1998.
3. Regina M, Landesberg R : Qualification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg 58 : 297, 2000.
4. Schaberg SJ, Petri WH, Gregory FW, Auclair PL and Jacob E : A comparison of freeze dried allogenic and fresh autogenous vascularized rib graft in dog radial discontinuity defects. J Oral Maxillofacial Surg 43 : 932, 1985.
5. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF : The biology of platelet- derived growth factor. Cell 46 : 155, 1986.
6. Antoniades HN, Williams LT : Human platelet derived growth factor. Cell 46 : 155, 1986.
7. Canalis E, McCarthy TL, and Cetrella M : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in Vitro. J Cell Physiol 140 : 530, 1989.
8. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A : Role of platelet-derived growth factor in wound healing. J Cell Biochem 45 : 319, 1991.
9. Miyazano K, Ten-Dijke P, Ichiyo H, Heldin CH : Receptors for transforming growth factor beta. Adv Immunol 55 : 181, 1994.
10. Canalis E, Centrella M, Busch W, McCarthy TL : Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone culture. J Clin Invest 83 : 60, 1989.
11. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA : Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft : case series. J Periodontol 71 : 1654, 2000.
12. Roberts AB, Spron MB : Physiologic actions and clinical applications of transforming growth factor beta(TGF-beta). Growth factor beta(TGF-beta). Growth Factors 8 : 1, 1993.
13. Candan E, Yasein DA, Selda E : A modified method for preparing platelet rich plasma; An experimental Study. J Oral Maxillofac Surg 62(11) : 1403, 2004.
14. Anitua E : Plasma Rich in Growth Factors : Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. J Oral Maxillofac Implants 14 : 529, 1999.
15. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monterio CB, Arceo-Diaz LY : Autologous fibrin adhesive in mandibular recon-struction with particulate cancellous bone and marrow. J Oral Maxillofac Surg 52 : 161, 1994.
16. Freymiller EG, Aghaloo TL : Platelet rich plasma: ready or not? J Oral Maxillofac Surg 62 : 484, 2004.
17. Robert EM: Platelet rich plasma; Evidence to support Its use. J Oral Maxillofac Surg 62 : 489, 2004.
18. Weibrich G, Kleis WKG : Curasan PRP kit vs PCCS PRP system: Collection efficiency and platelet counts of two different method for the platelet rich plasma. Clin Oral Implant Res 13 : 437, 2002.
19. Kevy S, Jacobson M : Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. Proceedings of the 27th Annual Meeting of Service Biomaterials. April 2001.
20. Bergel S : Uber Wirkungen des Fibrins. Dtsch Med Wochenschr 35 : 633, 1909.
21. Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM : Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. JAMA 124 : 976, 1944.
22. Matras H, Dinges HP, Lassmann H, Mamoli B : Zur nahtlosen iterfaszikularen nerven transplantation im Tierexperiment. Wien Med Wochenschr 122 : 517, 1972.
23. Aell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark P-I : A15-year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. J Oral Surg 10 : 387.
24. Symposium and Training of contemporary bone formation technique. Korea tissue bank 1999.
25. Linch SE : Tissue engineering, Quintessence 1999;p71.

저자 연락처
우편번호 570-711
전라북도 익산시 신룡동 344-2
원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
민 승 기

Reprint Requests
Seung-Ki Min
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Wonkwang Univ.
344-2 Shinyong-Dong, Iksan City, Chunbuk, 570-711, Korea
Tel. 82-63-850-1921 Fax. 82-63-857-4939
E-mail : omsmin@wonkwang.ac.kr

원고 접수일 2004년 6월 15일
게재 확정일 2004년 10월 29일

Paper received 15 June 2004
Paper accepted 29 October 2004

FIGURES

Fig. 1. At 1st centrifugation at 1000 rpm for 2 minutes, Very few platelet were found.

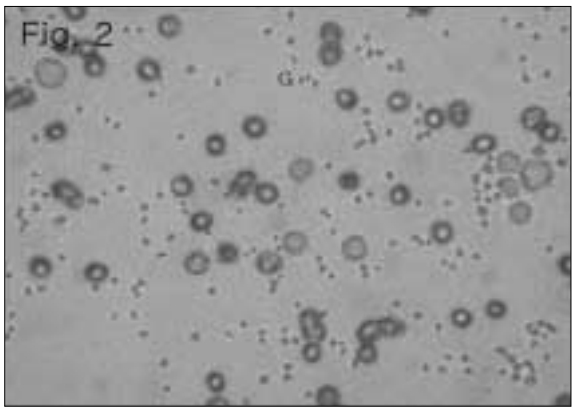

Fig. 2. At 1st centrifugation at 2000 rpm for 2 minutes, Several hundred platelets, mostly undegranulated, were concentrated.

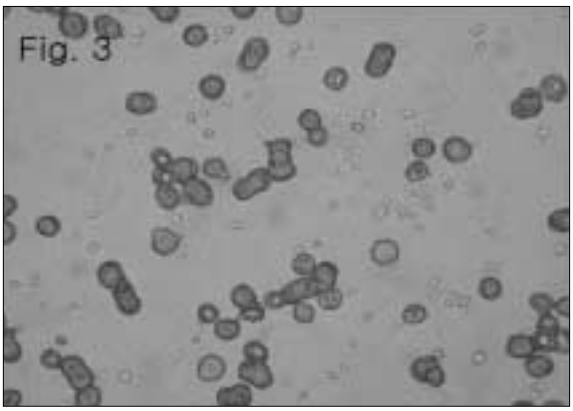

Fig. 3. At 1st centrifugation at 2500 rpm for 2 minutes, Several hundred platelets, partially degranulated, were concentrated.

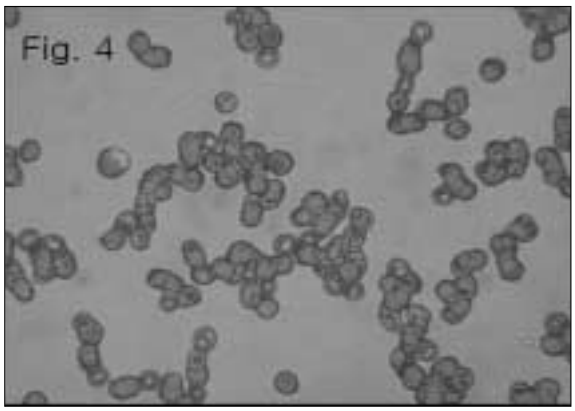

Fig. 4. At 1st centrifugation at 3000 rpm for 2 minutes, Several hundred red blood cell, mostly coagulated, were founded.

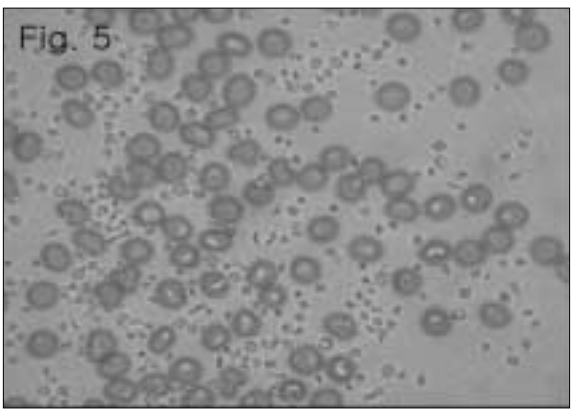

Fig. 5. At 1st centrifugation with 20 cc volume at 2000 rpm for 2 minutes, several hundred platelets, mostly undegranulated, were concentrated.

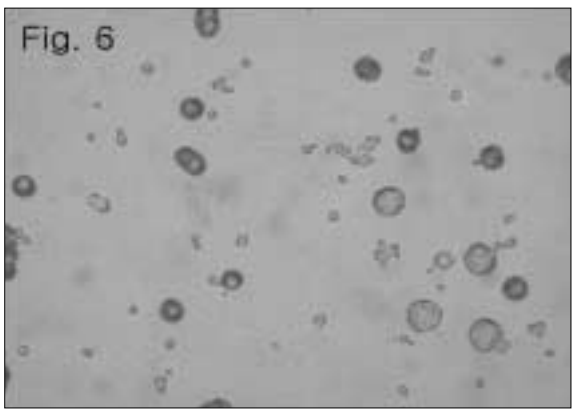

Fig. 6. At 1st centrifugation with 50 cc volume at 2000 rpm for 2 minutes, half hundred platelets, mostly undegranulated, were found.