

돼지-염소 이종이식모델에서 냉동 및 무세포화 혈관이식편의 조직학적 비교분석

양 지 혁* · 성 기 익* · 김 원 곤**

Histological Comparison of Vascular Grafts in a Pig to Goat Xenotransplantation Model

Ji-Hyuk Yang, M.D.*, Kiick Sung, M.D.*, Won Gon Kim, M.D.**

Background: Current vascular prostheses are considered still inadequate for reconstruction of small-diameter vessels. To evaluate the potential use of xenograft vessels as small diameter arterial grafts, we implanted porcine vessels in goats. The grafts were treated with two different processes, freezing and acellularization, before implantation, and gross inspection as well as microscopic examination followed after a predetermined period. **Material and Method:** Bilateral porcine carotid arteries were harvested and immediately stored at -70°C within tissue preservation solution. One of them was designated as frozen xenograft vessel. The other one was put on acellularization process using NaCl-SDS solution and stored frozen until further use. Grafts were implanted in the place of carotid arteries of the same goat. The grafts have remained implanted for 1, 3, and 6 months in three animals, respectively. Periodic ultrasonographic examinations were performed during the observation period. After explantation, the grafts were analyzed grossly and histologically under light microscope. **Result:** All animals survived the experimental procedure without problems. Ultrasonographic examinations showed excellent patency of all the grafts during the observation period. Gross examination revealed nonthrombotic, patent lumens with smooth surfaces. Microscopic examinations of the explanted grafts showed cellular reconstruction at the 6-month stage in both grafts. Although more inflammatory responses were observed in the early phase of frozen xenografts, there was no evidence of significant rejection. **Conclusion:** These findings suggest that porcine xenograft vessels, regardless of pre-implantation processes of acellularization or freezing, can be acceptably implanted in goats, although short duration of observation in a small number of animals may limit this study.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:427-433)

- Key words:**
1. Bioprosthesis
 2. Transplantation, heterologous
 3. Blood vessel prosthesis
 4. Tissue engineerig

*성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Samsung Seoul Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교 의학연구원 심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Medical Research Center, Heart Research Institute

논문접수일 : 2006년 1월 3일, 심사통과일 : 2006년 3월 20일

책임저자 : 김원곤 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-2348, (Fax) 02-765-7117, E-mail: wongon@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

현재까지 개발된 인조혈관들은 직경이 큰 혈관에서는 장기 개통성이 우수하나 소구경 또는 말초의 혈관에서는 만족스러운 성적을 보이지 못하고 있다. 이러한 이유로 이상적인 소구경 인조혈관을 만들기 위하여 여러 연구가 진행되어 왔다[1-3].

최근 조직공학을 이용한 심장관막 개발의 새로운 개념으로 이종관막을 글루타르알데하이드에 고정하지 않고 무세포화(acellularization) 시키는 방법이 주목받고 있는데 [4-7], 이는 이식편의 면역원성 감소와 함께 성장의 가능성을 높이고 내구성을 증대시킬 것이라는 기대 하에 이루어지고 있다. 같은 가정 하에 무세포화한 이종혈관이식편은 이식 후 면역학적으로 수여동물의 조직에 적합할 수 있으며, 물리학적 성상이 기존 혈관과 유사하므로 유순도의 불일치로 인한 혈관이식편의 부전도 방지할 수 있을 것이다.

한편으로는, 돼지의 심장관막과 대혈관이 특별한 처치 없이도 이종이식에서 거부반응이 잘 일어나지 않으며 이는 α -1,3-galactose 발현이 없거나 상이함에 기인함에 의한 것이라 추론된 바 있다[8,9]. 만약 이러한 면역학적 특성이 사실로 밝혀진다면 이를 외과적으로 실용 가능한 소구경 혈관의 대안으로써 개발의 가능성이 매우 높다.

그러나 이러한 실용적 잠재력에도 불구하고 무세포화 또는 단순 이종혈관이식편에 대한 연구는 전무하다. 이러한 점에서 저자는 돼지에서 한 쌍의 이종혈관이식편을 채취, 하나는 냉동보관만 하고 다른 하나는 무세포화한 뒤 염소의 양측 경동맥에 이식하고 일정 기간 후 적출하여 그 육안적 소견과 현미경적 소견을 비교 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 무세포화 이종혈관이식편의 준비

30~40 kg 무게의 돼지의 양측 경동맥을 적출하고 바로 조직 보존액에 넣은 뒤 -70°C 냉동고에 보관하였다. 무세포화 이종 혈관이식편의 준비는 이전 연구내용을 기초로 하였는데[7], 적출한 경동맥을 인산염-완충 식염수액(Phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 세척한 뒤 1.5 M NaCl 용액 (37°C)에 옮겨 37°C 에서 하루 동안 보관하였다. 이어 이식편을 인산염-완충 식염수액으로 재세척하고 37°C 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 담겨 37°C 배양기에서 30분간

놓아두었다. 이렇게 NaCl-SDS 처리한 혈관들은 다시 인산염-완충 식염수액으로 충분히 세척한 뒤 7% Dextran-6% sucrose-1 mM EDTA 용액에 넣어 냉동한 뒤 사용할 때까지 -70°C 에서 보관하였다.

2) 혈관이식

앞에서 준비해 두었던 단순 냉동 혈관이식편과 무세포 처리한 혈관이식편을 한 쌍으로 동일한 염소의 양측 경동맥에 각각 이식하였고, 1, 3, 6개월간 사육 후 그 변화를 비교하고자 하였다.

25~35 kg 무게의 건강한 흑염소를 이용하였는데, 케타민(ketamine)을 근주하여 전신마취를 유도하였으며 기관삽관 후 1~1.5% isoflurane을 이용하여 마취를 유지하였다. 정맥에 삼관하고 링거액(lactated Ringer's)을 15 ml/kg/hour 속도로 마취 중 지속적으로 주입하였다. 목에서 정중절개 후 양측 경동맥을 박리하였으며 혈관 내 혈전 생성을 방지하기 위해 100 IU/kg의 헤파린을 정주하였다. 한 쪽 경동맥의 근위 및 원위부를 혈관경자로 차단 후 경동맥 일부를 절제해 내고 여기에 단순히 냉동보관만 했던 돼지의 혈관이식편을 삽입하였는데, 뒤쪽은 7-0 Prolene (Ethicon Sutures Ltd., Peterborough, Ontario, Canada)으로 연속봉합하였고 앞쪽은 단속봉합하여 단-단문합하였다. 반대쪽도 무세포화한 혈관이식편을 사용한 것 외에는 같은 방법으로 이식하였다. 수술시작 전 염소에게 Cefazolin (Yoohan Pharmaceuticals, Seoul, Korea) 20 mg/kg 정주하였으며 술 후 2일째까지 근주하였다. 그 외 특별한 식이제한이나 약물 투여 등은 하지 않았다. 정기적으로 컬러 도플러 초음파 검사(SA-8800, Medison Co. Ltd., Seoul, Korea)를 시행하여 적출 시까지 이식편의 개통성을 확인하였다.

3) 이식혈관의 적출 및 분석

이식편은 정해진 기간에 따라 1, 3, 6개월에 각각 적출하였다. 동물을 다시 마취하고 이식편을 찾아 박리한 뒤 헤파린을 5,000 IU 정주하였다. 경동맥을 근위부와 원위부에서 결찰한 뒤 이식편 및 이식편 문합부에서 위, 아래로 약 1 cm 길이의 동맥혈관을 더 포함하여 적출하였다. 적출한 검체를 종절개한 뒤 인산염-완충 식염수액(pH 7.4)으로 세척하였고 육안소견을 관찰하였다. 근위문합부, 원위문합부, 이식편의 중간에서 각각 분절을 만들어 현미경적 분석을 의뢰하였다. 검체는 2% 포르말데히드로 2시간 고정 후 동결건조하고 파라핀 블록에 포매한 뒤 세절기로 100 μm 두께의 절편을 만들었고 제작된 포본은 hemato-

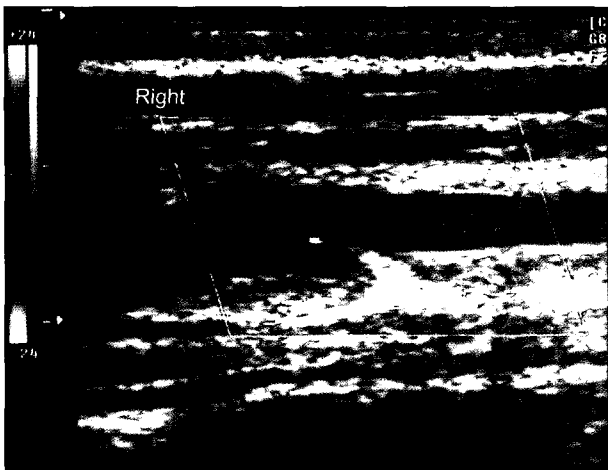


Fig. 1. Ultrasonogram showing good patency of implanted carotid artery grafts at 6 months postoperatively.

xylin-eosin으로 염색하였다.

결 과

3마리 동물 모두 술 후 별 다른 문제없이 회복하여 이식편의 적출 시까지 예정된 기간동안 사육하였다. 적출 직전 시행했던 초음파검사상 모든 실험동물에서 우수한 개통성을 확인하였다(Fig. 1). 관찰기간 동안 혈전, 색전증에 관련된 증상을 보인 동물은 없었으며, 적출한 단순냉동 또는 무세포화 혈관이식편 어느 쪽에서도 혈전은 관찰되지 않았다. 그러나, 1개월째와 6개월째 적출한 이식편에서는 냉동혈관과 무세포화혈관 모두에서 혈관벽이 원래 혈관에 비해 얇아져 있는 것이 관찰되었고, 3개월째 적출한 혈관들에서는 혈관내면은 매끈하나 그 바깥쪽 혈관벽의 두께는 균일하지 않았다. 혈관주위의 육아조직의 형성은 3개월째에 양쪽 모두에서 가장 두드러져 보였는데 냉동이식혈관의 경우에는 1개월째부터 관찰되었던 소견으로 6개월째에는 감소하는 양상이었다(Fig. 2, 3).

광학현미경 소견을 비교해 보았을 때 이식 후 1개월째 적출한 이식편 중 무세포화혈관의 중막에는 세포가 관찰되지 않았다. 반면, 단순냉동혈관에서는 더 많은 염증성 호중구의 침윤이 관찰되었고 중막의 두께는 감소하였으며 세포들이 관찰되었다(Fig. 4). 3개월째 적출한 혈관에서는 내막의 증식이 두 종류의 혈관에서 모두 관찰되었으며 그 양상은 큰 차이를 발견할 수 없었다. 단순냉동혈관에서는 1개월째 중막에 세포들이 관찰되었으나 3개월째에

는 세포들이 사라지며 세포핵의 잔해가 관찰되었다. 이는 3개월째의 무세포화혈관 중막에서는 세포가 관찰되지 않으면서도 그 층이 보존되어 있는 것과 비교된다(Fig. 5). 이식 후 6개월째의 혈관이식편에서는 양쪽 모두에서 전반적으로 혈관벽의 두께가 감소하며 증식되었던 내막도 3개월째에 비해 다소 감소하는 양상을 보였다. 내막과 중막 사이는 명확히 구분되지 않으며 세포들이 재배열을 이루는 소견이 관찰되었는데, 단순냉동혈관의 경우에는 염증성 육아종의 소견을 보였다(Fig. 6).

고 찰

본 연구는 돼지의 혈관을 단순냉동 및 무세포화의 두가지 다른 방법으로 처리한 뒤 염소의 경동맥에 이식하고, 이를 시간에 따라 육안적 및 현미경적으로 비교 분석하고자 하였다. 염소 대 돼지의 조합은 면역반응을 기준으로 한 분류에 따르면 일치(concordant)라 여겨지지만, 본 연구에서 사용한 돼지 대 염소 간의 조합은 두 종간의 계통발생학적 근접성에도 불구하고 불일치(discordant) 이종이식이라 분류된다[10,11].

3마리 동물 모두 실험기간 동안 혈전, 색전증의 합병증이 없었고 초음파를 이용한 추적관찰에서도 양측 혈관이식편 모두에서 좋은 개통성을 보였다. 이와 같이 우수한 임상성적은 적출한 혈관이식편의 육안소견으로 뒷받침되었는데 모든 혈관이식편의 내강이 혈전 없이 깨끗하고 매끄러운 표면을 유지하고 있었다. 이식 초기의 단순 냉동 혈관이식편에서는 무세포화혈관이식편보다 염증반응이 더 심한 것으로 관찰되었지만 유의한 거부반응의 소견이라 할 수 없는데, 3개월째 단순 냉동혈관이식편에서 관찰되었던 사멸핵의 잔해와 내막의 증식 등은 본 실험에서 임상결과에는 별다른 영향을 주지 않은 것 같다. 단순 냉동혈관이나 무세포화혈관 모두 어떠한 합성물질이나 별도의 제작과정을 필요로 하지 않는다는 공통의 장점을 가지면서도 결과에서 큰 차이가 없다고 볼 때 이러한 결과는 중요하다고 할 수 있는데, 결국 냉동 이종혈관이식편 만으로도 무세포화의 과정을 생략할 수 있으리라는 기대가 가능하다. 그러나, 전반적인 내막의 증식과 같은 소견으로 볼 때 더 작은 혈관에서도 개통성이 잘 유지될 수 있을지에 대해서는 확신할 수 없으며, 보다 장기적인 결과를 관찰하였다면 냉동이식편에서 보인 소견과 같은 이식 후 초기의 염증반응들이 장기적으로는 이식편의 손상(graft failure)으로 이어질 수도 있지 않았을까 하는 가능성

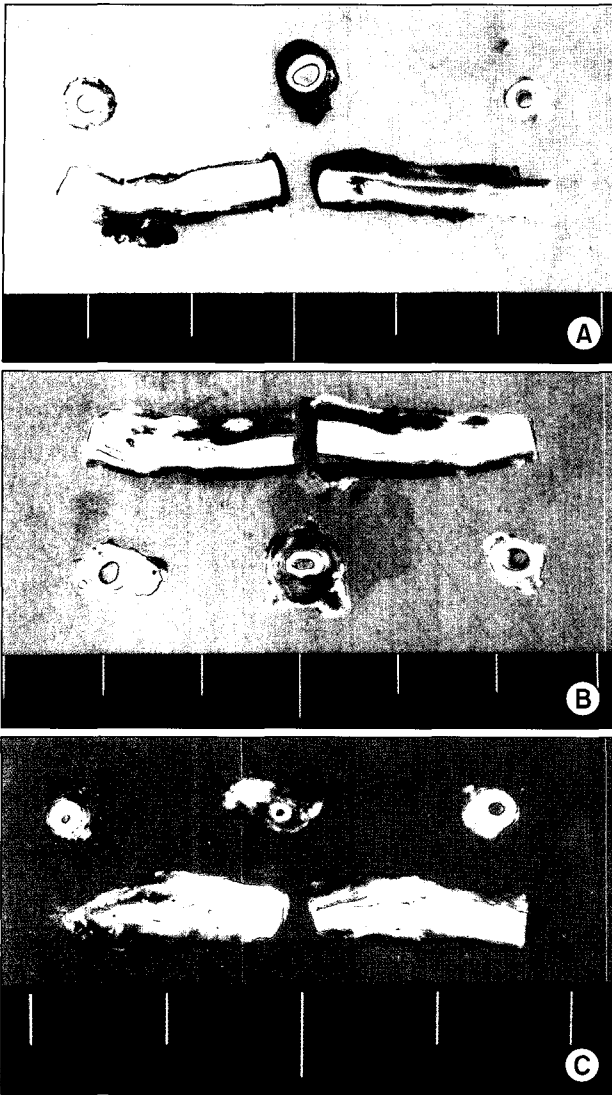


Fig. 2. Gross appearances of acellularized porcine vascular xenografts explanted at 1 month (A), 3 months (B), and 6 months (C) postoperatively.

을 완전히 배제할 수는 없다. 한 가지 제한점을 더 지적하자면 다른 종류의 이식편을 같은 동물에 동시에 이식하여 정해진 기간동안 사육 후 적출하였으므로 각각의 개체 안에서의 차이는 비교적 신뢰할 수 있지만, 3마리가 보인 소견의 차이가 각각의 이식편의 시간에 따른 소견이라고 일반화하기에는 다소 무리가 있다. 다시 말해 개체 간 차이를 보정할 수 있는 방법이 없었으므로 본 연구결과를 일반화하기 위해서는 더 많은 동물을 대상으로 한 실험이 추가되어야 할 것이다.

본 연구결과를 토대로 두 가지 사안이 의문으로 남는

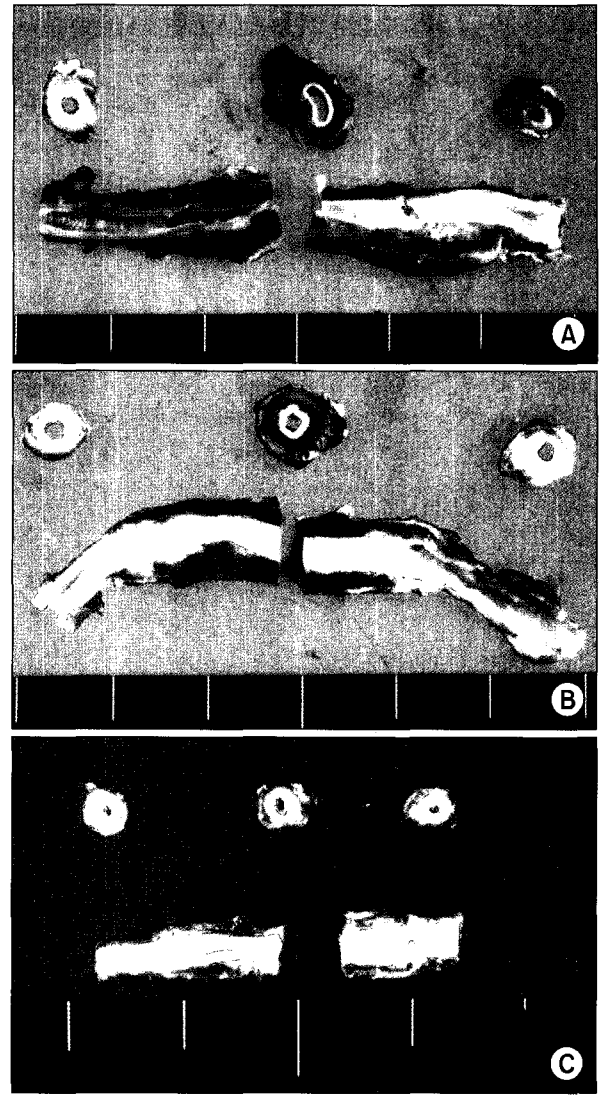


Fig. 3. Gross appearances of frozen porcine vascular xenografts explanted at 1 month (A), 3 months (B), and 6 months (C) postoperatively.

다. 첫째는 냉동 이종이식혈관에서 얻은 결과가 신선 이종이식혈관과 비교하면 어떨 것인가 하는 문제이다. 냉동 보관하는 동안 혈관이식편의 세포들이 그 생명력을 잃었을 가능성이 있고 이로 인해 무세포화의 과정을 거치는 것과 마찬가지로 결과를 초래했을 수 있으므로, 냉동혈관 이식편이 임상적으로 문제를 일으키지 않은 것이 돼지 대 염소의 이종혈관이식모델에서 거부반응 자체가 문제가 되지 않을 것이라 기대하기는 어렵다. 둘째는 이와 같은 실험결과가 돼지 대 사람 모델에도 적용될 수 있을까 하는 점이다. 돼지나 염소는 다른 하등동물들처럼 혈청 내

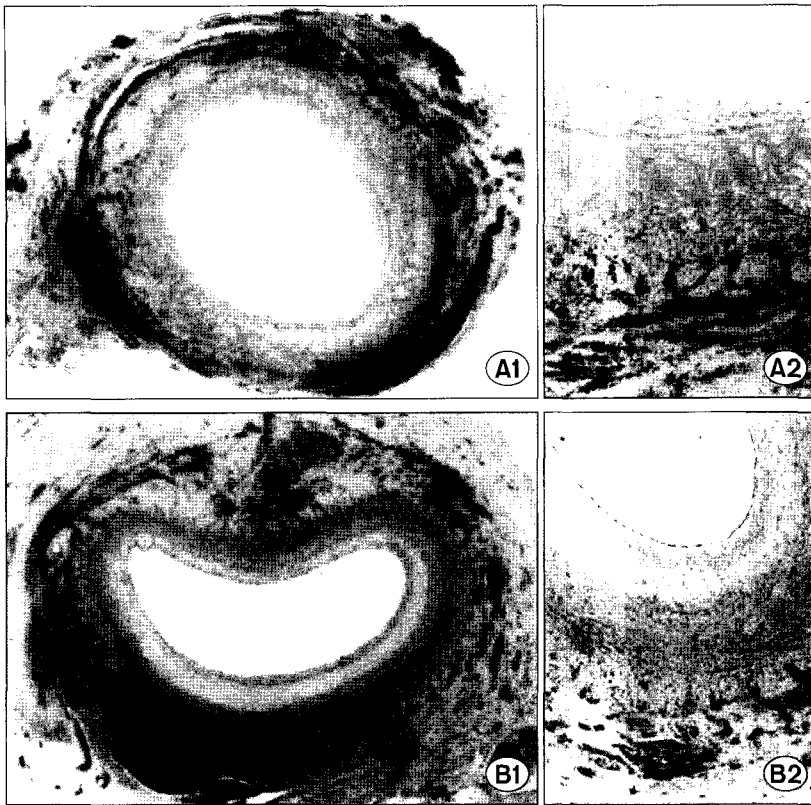


Fig. 4. An acellularized porcine vascular graft (A1 and A2) and a frozen porcine vascular graft (B1 and B2) explanted at 1 month post-operatively (A1 and B1: H&E \times 12.5, A2 and B2: H&E \times 40).

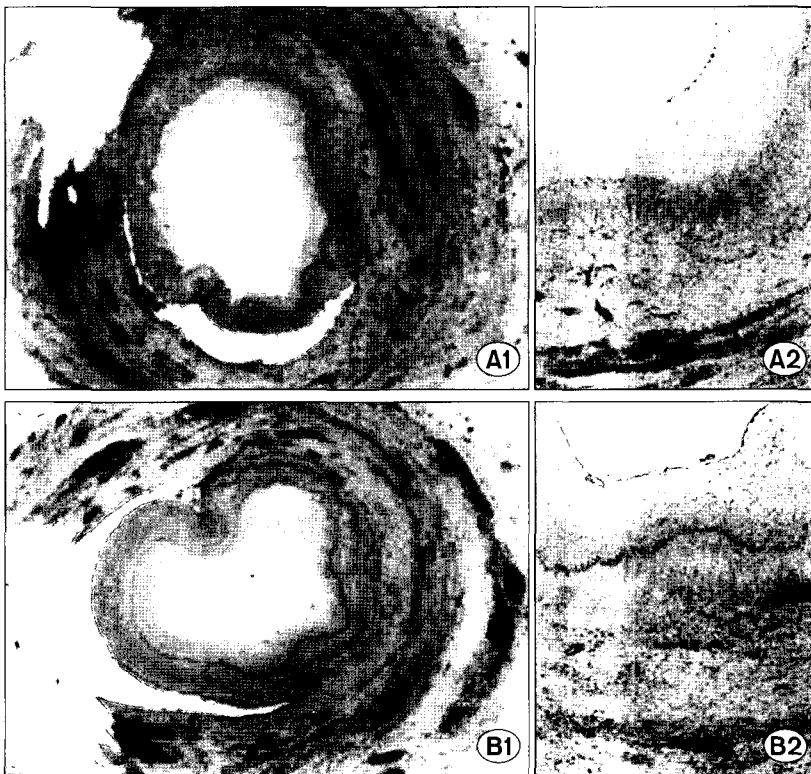


Fig. 5. An acellularized porcine vascular graft (A1 and A2) and a frozen porcine vascular graft (B1 and B2) explanted at 3 months postoperatively (A1 and B1: H&E \times 12.5, A2 and B2: H&E \times 40).

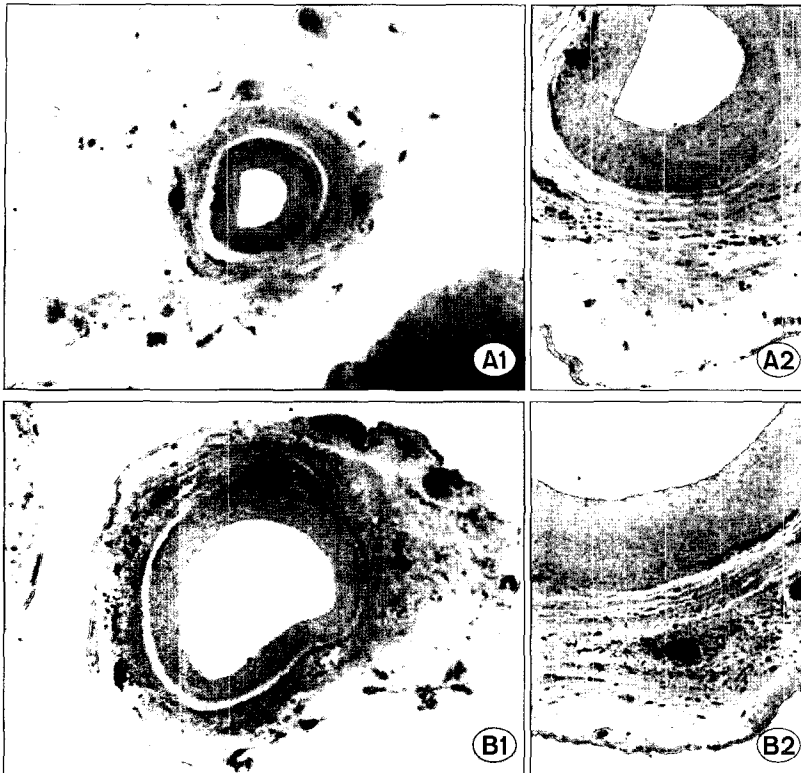


Fig. 6. An acellularized porcine vascular graft (A1 and A2) and a frozen porcine vascular graft (B1 and B2) explanted at 6 months postoperatively (A1 and B1: H&E \times 12.5, A2 and B2: H&E \times 40).

에 anti- α -Gal 자연항체를 가지고 있지 않으므로 초급성 거부반응이 극심하지 않을 것으로 예견되지만[10,12], 인지되지 않은 non- α -Gal related humoral factors도 초급성 거부반응을 유발할 수 있다는 증거도 있어[13] 이 결과만으로 사람에게 적용하기에는 무리가 따른다. 그러므로 돼지 대 영장류모델에 대한 유사한 연구가 진행되기 전까지 그 결론은 유보되어야 한다.

결 론

돼지의 경동맥을 무세포화나 단순냉동 두 가지 처치를 하여 동일한 염소의 경동맥에 이식하였을 때 이식 후 6개월까지는 임상적으로 별 차이 없이 좋은 개통성을 보였다. 이러한 결과는 같은 모델에서 무세포화의 과정없이 단순 냉동처리만으로도 이종이식혈관편으로 사용할 수 있으리라 기대해 볼 수 있게 한다. 그러나 현미경적 소견에서 관찰된 냉동혈관이식편 초기의 염증반응이 장기적으로 어떠한 결과를 초래할 것인지, 더 작은 혈관에서도 이러한 결과가 유효할 것인지에 대해서는 보다 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Schmedlen RH, Elbjairami WM, Gobin AS, West JL. *Tissue engineered small-diameter vascular grafts*. Clin Plast Surg 2003;30:507-17.
- Fields C, Cassano A, Allen C, et al. *Endothelial cell seeding of a 4-mm I.D. polyurethane vascular graft*. J Biomater Appl 2002;17:45-70.
- Farrar DJ. *Development of a prosthetic coronary artery bypass graft*. Heart Surg Forum 2000;3:36-40.
- Stock UA, Vacanti JP, Mayer JE Jr, Wahlers T. *Tissue engineering of heart valves-current aspects*. Thorac Cardiovasc Surg 2002;50:184-93.
- Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. *Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg 1998; 14:279-84.
- Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. *Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft*. Ann Thorac Surg 2000;70: 1962-9.
- Kim WG, Cho SK, Kang MC, Lee TY, Park JK. *Tissue-engineered heart valve leaflets: an animal study*. Int J Artif

- Organs 2001;24:642-8.
8. Chen RH, Mitchell RN, Kadner A, Adams DH. *Differential galactose alpha (1,3) galactose expression by porcine cardiac vascular endothelium.* Xenotransplantation 1999;6:169-72.
 9. Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Adams DH. *Fresh porcine cardiac valves are not rejected in primates.* J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:1216-20.
 10. Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, de Montpreville V, Wolf P, Darteville P. *Characterization of a pig-to-goat orthotopic lung xenotransplantation model to study beyond hyperacute rejection.* J Thorac Cardiovasc Surg 1999;118:805-14.
 11. Calne RY. *Organ transplantation between widely disparate species.* Transplant Proc 1970;2:550-6.
 12. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. *Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.* J Biol Chem 1988;263:17755-62.
 13. Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, et al. *Evidence of human non-alpha-galactosyl antibodies involved in the hyperacute rejection of pig lungs and their removal by pig organ perfusion.* J Thorac Cardiovasc Surg 1998;116:831-43.

=국문 초록=

배경: 현재까지 개발된 인조혈관들은 소구경 혈관에서는 개통성을 유지하기 어려워 사용에 제한이 따른다. 이에 저자는 이종혈관이식편이 소구경 혈관을 대신할 수 있는지 시험하고자 돼지의 혈관을 채취하여 냉동보관과 무세포화의 두 가지 방법으로 전처리한 뒤 이를 염소에게 이식하고 일정기간 동안 그 변화를 비교 분석하였다. 대상 및 방법: 돼지의 양측 경동맥을 적출한 뒤 하나는 바로 조직보관액에 담아 냉동 보관하였고 하나는 NaCl-SDS 용액을 이용하여 무세포화(acellularization)한 뒤 냉동 보관하였다. 동일한 염소의 양측 경동맥에 냉동보관만 했던 이식편과 무세포화한 이식편을 각각 삽입하였다. 3마리의 염소에게 이를 시행하였고 술 후 각각 1, 3, 6개월째에 이식편을 적출하였다. 관찰기간 동안 주기적으로 초음파검사를 시행하여 개통성 여부를 확인하였으며, 이식편의 적출 후에는 육안소견 및 광학현미경 소견을 비교 분석하였다. 결과: 3마리 실험동물 모두 혈전색전증과 같은 별다른 문제없이 예정된 적출시기까지 생존하였다. 초음파검사상 모든 혈관이식편에서 관찰기간 동안 우수한 개통성을 보였다. 육안소견상 이식편의 내강에서는 혈전의 생성없이 매끈한 표면을 관찰할 수 있었다. 현미경검사상 6개월째의 혈관이식편에서 세포가 재구성되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이식 후 초기였을 때 무세포화이식편보다 단순 냉동이식편에서 염증반응이 활발한 것으로 보였으나 유의한 거부반응의 증거는 관찰되지 않았다. 결론: 돼지-염소간의 이종이식모델에서 단순 냉동혈관이식편과 무세포화혈관이식편 사이에 이식 후 6개월까지는 임상적인 차이를 야기하지 않았다. 이는 동일한 모델의 혈관이식에 있어 무세포화의 과정을 생략할 수 있다는 가능성 때문에 고무적인 결과라 할 수 있으나, 관찰기간이 비교적 짧고, 실험동물의 수가 많지 않아 향후 추가적인 연구가 뒷받침되어야 하리라 생각된다.

중심 단어 : 1. 생체인공장기
2. 이종이식
3. 인조혈관
4. 조직공학