



피부이식편을 보존하기 위한 양수 호능에 대한 고찰

김주현, 김성민, 오진실, 명훈, 이종호, 최진영*

서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실, 치학연구소

ABSTRACT

Review of Amniotic Fluid Effectiveness for the Preservation of Skin Graft

Ju-Hyun Kim, Soung-Min Kim, Jin Sil Oh, Hoon Myoung,
Jong-Ho Lee, Jin-Young Choi*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Research Institute,
School of Dentistry Seoul National University, Seoul, Korea*

Amniotic fluid is a complex and biological reservoir that provides mechanical cushioning and has many nutrients required for fetal growth and development.

During our main research works about the fetal surgery of congenital facial defects, we reviewed several recent articles about the effectiveness and composition of amniotic fluid. Among these review processes, amniotic fluid, as the convenient medium to store skin grafts, was focused especially for its growth factors and rich nutrients, and we summarized some experimental investigations of skin grafts stored in amniotic fluid in rats. We reviewed mainly the article, "Turhan-haktanir N, et al. Histological assessment of skin grafts in amniotic fluid and saline. J Plast Surg Hand Surg 2010;44:226-30."

Key words : Amniotic fluid, Fetal surgery, Reservoir, Skin graft

I. 서론

구강악안면외과 영역에서 피부 이식은 다양한 방법으로 동종간, 동계간 이식되어 왔고, 구강내 외의 여러 피부 및 점막 결손부를 재건하기 위해 점점 더 사용 영역이 확장되어 왔다. 기존에는 피부이식편을 보관하거나 저장하기 위해서 영양배지(nutrient media)와 함께 냉장하거나 글리세린(glycerin) 또는 디메틸설폭사이드(dimethylsul-

phoxide)와 함께 동결보존(cryopreservation)하는 방법과 동결건조(freeze drying) 후 실온에서 보관하는 방법 등이 시행되어 왔다¹⁻⁶⁾.

미국 및 몇몇 국가에서는 세포보호제로 전처리를 하지 않고 동결보존한 피부이식편을 선호하는 반면, 대부분의 임상가들은 이미 상용화되어 있고 상대적으로 비용이 저렴한 냉장보존법을 선호한다^{7,8)}. 식염수에 저장된 피부이식편의 생활력은 단시간 내에 감소되고 피판은 부풀게 되는데, 식염수는 단지

전해질만 함유하고 있어 이상적인 생리적 배지가 아니기 때문이다⁹⁾. 반면에 양수 (amniotic fluid)는 기계적인 완충 작용과 태아의 성장과 발육에 필요한 영양분 및 다른 여러 분자들을 제공하는 복합적이고 동적인 생물학적 저장고인데, 물, 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 지질, 호르몬들 및 여러 전해질을 포함하고 있다¹⁰⁾.

피부이식편의 보존 배지로서 양수에 대해 직접적으로 보고된 바는 많지 않았으나 2010년 Turhan-haktanir 등의 논문에서는 풍부한 성장인자와 영양분을 가진 양수가 피부이식편을 보관하기에 좋은 배지라는 가설을 세우고 백서에서 얻은 피부이식편을 각각 양수와 식염수에 보관한 경우로 나누어서 조직학적 특성을 조사하고 비교하였다¹¹⁾. 이에 이러한 보고를 중심으로 양수의 피부이식편의 보존 배지로서의 가능성과 이를 통한 태수술시 양수에 대한 성능과 작용을 간접적으로 확인해 보고자 본 논문을 준비하였다.

II. 연구 내용 및 결과

90일령의 체중 250~300g의 Sprague Dawley 백서 20마리를 군당 5마리씩, 4개 군으로 나누었다. 각 백서는 시술 전 60 mg/kg 용량의 케타민 (Eczacibasi, Istanbul, Turkey)을 근육 내 주사하여 마취하였는데, 모든 수술은 NIH 지침에 맞게 시행되고 실험 프로토콜은 동물실험 윤리위원회로부터 심의 및 승인을 받아 진행되었다. 마취된 백서의 등 부위에서 4×4 cm 크기의 전층 피부이식편을 수술도를 이용하여 채취하였는데, 때어낸 모든 이식편은 피하지방을 제거하고 진피만이 깨끗해지도록 만든 후, 미세가위를 사용하여 부분층으로 잘라내었다. 준비된 부분층 이식편은 식염수와 양수의 2군으로 나누어 사용하였으며,

시편은 Sterne 등이 기술¹²⁾한 바와 같이 진피표면이 서로 접촉된 상태로 둥글게 롤 형태로 말아서 보관하였다. 말려진 이식편은 5 ml의 식염수 또는 양수로 적신 거즈로 감싸서 무균 저장고에서 냉장보관하였고, 이들 이식편에 대한 조직학적 평가는 냉장보관을 시작한 당일과 7일, 14일, 21일 및 28일에 시행하였으며 당일에는 조직학적인 변화가 관찰되지 않았기 때문에 시편의 초기 특성을 기술하기 위한 대조군 검사로서 조직평가를 시행하였다.

양수는 양막이 터지기 이전의 무균적인 상태가 유지되었던 건강한 산모의 제왕절개시 그 절개선으로부터 채취하였다. 환자로부터는 구두로 동의를 받았고, 채취한 양수는 사용 전에 4℃에서 보관하였으며, 채취와 사용 사이의 시간간격은 24 시간을 넘지 않았다.

피부의 조직학적 손상 정도를 점수화하여 반정량적으로 평가하였는데, 맹검법으로 시행하였다. 피부 시편을 12~24시간 동안 10% 중성 완충 포르말린액에 넣어 고정하였고, 탈수 후에 시편을 파라핀 블록으로 제작하여 4 μm 두께로 잘라서 H&E (Hematoxylin and eosin) 염색을 시행하여 조직 슬라이드를 만들었다. 슬라이드는 광학현미경(Nicon microscope ECLIPSE E600W, Tokyo, Japan)으로 검사하고, 디지털 카메라(Microscope Digital Camera DP70, Tokyo, Japan)로 촬영하였다. 조직학적 평가는 세포 및 핵 부종, 핵의 이형성, 핵륜 형성, 핵농축, 진피-표피의 균열, 호산성, 기저세포층의 유사분열 유무, 그리고 콜라겐 조직의 구조적 변성을 확인하기 위해 진피 콜라겐의 변화를 조사하였다. 판단 기준은 시편의 염색 정도를 염색의 강도 및 확산 정도에 기준하여 0 에서 6+ 까지의 반정량적인 숫자로 나누어 표기하고, 각 절편에서 계산된 값을 모두 더해서 0 = 염색 안 됨, 1+ = 최소, 2+ = 낮음, 3+ = 중간, 4+ = 강함, 5+ = 더

Table 1. Comparison of histological mean (SD) scores of skin grafts stored in amniotic fluid and saline media¹¹⁾. (S : saline, A : Amniotic fluid, * <0.05)

		2nd week	3rd week	4th week
Cell swelling	S	2.8 (0.5)	4.4 (0.6)	5.2 (0.5)
	A	2.0	2.8 (0.5)	3.2 (0.5)
	p	0.014*	0.006*	0.005*
Nuclear swelling	S	3.0	4.8 (0.5)	5.6 (0.6)
	A	2.0	2.4	3.6 (0.6)
	p	0.003*	0.006*	0.007*
Nuclear pleomorphism	S	3.2 (0.5)	4.4 (0.6)	6.0 (0)
	A	2.0 (0)	3.0 (0)	3.0 (0)
	p	0.004*	0.005*	0.005*
Nuclear haloes	S	3.8 (0.5)	5.0	5.6 (0.6)
	A	2.8 (0.5)	2.6 (0.6)	4.0 (0)
	p	0.015*	0.005*	0.005*
Nuclear pyknosis	S	3.0 (0)	4.6 (0.6)	5.0 (0)
	A	2.0 (0)	3.0 (0)	3.0 (0)
	p	0.003*	0.005*	0.003*
Dermoepidermal clefting	S	3.0 (0)	5.0 (0)	6.0 (0)
	A	1.2 (1.1)	0	0
	p	0.005*	0.003*	0.003*
Eosinophilia and mitosis	S	3.0 (0)	4.8 (0.5)	5.2 (0.5)
	A	2.0 (0.0)	2.6 (0.6)	3.0 (0)
	p	0.003*	0.006*	0.004*
Dermal collagen	S	3.0 (0)	5.0 (0)	6.0 (0)
	A	2.0 (0)	2.0 (0)	3.0 (0)
	p	0.003*	0.003*	0.003*

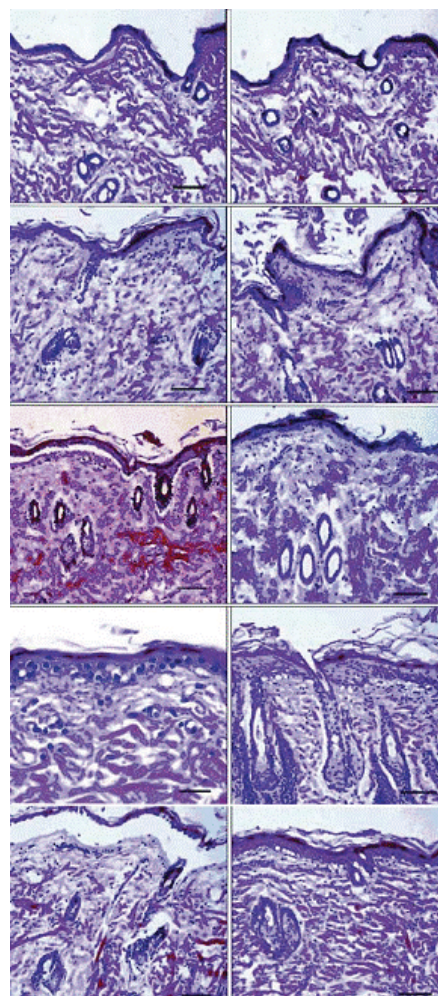


Figure 1.

Figure 1. Saline and amniotic fluid stored grafts by comparison: haematoxylin and eosin stained paraffin sections of rat skin graft (objective magnification x40 for all and x100 for lower image on left column) at 0 (uppermost), 7 (upper), 14 (middle), 21 (lower), and 28 (lowermost) days showing pronounced early cellular and nuclear swelling with pleomorphism and early formation of nuclear haloes in saline (left column) and amniotic fluid (right column) groups¹¹⁾.

Note the severe degree of dermoepidermal clefting in the saline group compared with the amniotic fluid group. Epidermal clefting was present in the amniotic fluid group, but no full-thickness epidermal separation was found (bottom images).

강함, 6+ = 최대로 염색됨 등과 같이 표현하였다.

데이터 분석을 위한 통계처리는 SPSS(SPSS, ver.13.0, SPSS Inc., Chicago, Ill, USA)를 사용하였다. 조직학적 다양성에 대한 각 군의 평균을 비교분석하기 위해 비모수적 Mann-Whitney U test와 유의수준 0.05미만을 적용하였다.

각 군에서 냉장보관 7일째는 조직학적 변화가 없었으나 14, 21, 28일째는 양수에 담갔던 군과 식염수에 담갔던 군에서 유의할 만한 조직학적 변화가 관찰되었는데($p < 0.05$), 식염수와 비교 시, 양수 쪽의 조직학적 변화에 대한 점수는 유의하게 낮았다(Table 1). 이처럼 손상 정도를 점수화하여 반정량적으로 평가한 결과 식염수와 비교하였을 때 양수에 저장된 피판의 조직학적 점수는 유의성을 보였으며, 14, 21, 28일의 p-value는 세포 부종에서 각각 0.014, 0.006, 0.005, 핵 이형성증에서 각각 0.004, 0.005, 0.003, 핵륜에서 각각 0.015, 0.005, 0.005, 핵농축에서 각각 0.003, 0.005, 0.003, 진피-상피 균열에서 각각 0.005, 0.003, 0.003, 호산성 및 유사분열에서 각각 0.003, 0.006, 0.004, 진피 콜라겐 지수에서 각각 0.003, 0.003, 0.003 등의 값을 보였다.

이처럼 식염수에 보존된 이식편은 냉장보관의 초기에 세포의 부종, 핵의 이형성을 동반한 부종, 핵륜의 형성이 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 표피 변화는 21일째에 감소되나, 전체 식염수군에서는 심한 표피와 진피의 균열이 발생하였다. 양수에 담긴 이식편 또한 초기에는 세포의 부종, 핵의 이형성을 동반한 부종, 핵륜의 형성이 뚜렷하게 나타났으나, 총 변화는 식염수군에서 보다 적었으며, 표피 균열 징후가 나타나기는 하였으나, 양수에 담갔던 어떤 군에서도 완전한 표피의 분리는 나타나지 않았다(Figure 1).

III. 고찰 및 결론

역동적인 영양분의 보고인 양수는 모체의 혈장, 태반의 분비물 그리고 성장해가는 태아의 요, 호르몬과 소화관 분비물로 만들어진다¹³⁾. 양수에 포함된 여러 성분 중 창상치유에 큰 역할을 하는 중요한 요소는 하이알루론산(hyaluronic acid)으로서 양수는 육아조직의 성장을 촉진하여 더 적합한 이식 수혜부를 만들어 주고¹⁴⁾, 전체 임신기간 동안 태아를 성장시키고 보호하는 이상적인 배지의 역할을 가진다. 또한, 양수는 항생작용을 지녀 미생물에 대한 방어 작용을 하고¹⁵⁾, 골과 건의 치유와 연골재생 시에 보호작용을 한다^{16,17)}. 이러한 기능을 가진 양수의 영양분, 항생 성분, 성장 촉진 물질은 본 연구진이 진행하고 있는 선천성 기형에 대한 태수술에서 필수적인 요소로서 본 논문에서는 생체조직을 보존하기 위한 양수의 기능을 찾는 과정에서 피부 이식편의 저장 배지로 양수의 효과에 대해 확인하고자 여러 문헌을 참조하였다. 이중 최근 논문 1편을 중심으로 저장된 피부이식편의 생활력을 평가하는 방법에 대해 방법론적인 것을 곁들여서 리뷰하고 정리해 보고자 하였다¹⁸⁻²¹⁾.

본 연구에서는 Sterne 등이 기술한 조직학적 평가법¹²⁾을 사용하였는데, 4주에 걸친 다양한 조건에서 4°C에 보관된 인간의 부분층 피부이식편에서의 세부적인 조직학적 변화를 평가하는 방법을 제시하였다. 연구 결과로 피부 이식편은 냉장보관 후에 특징적인 조직학적 변화를 보였으며 7일과 14일 후의 조기 변화로는 세포 부종과 핵의 이형성을 동반한 핵의 부종이 나타났으며, 부분적이긴 하여도 가역적이거나 최소한의 존속이 가능한 급성 손상의 결과로 사료되었다. 핵륜의 형성, 세포 수축, 핵농축 그리고 상피의 분리를 유발하는 세포 형성 등의 후속적인 변화는 생활력을 가진 각화세포 상실의 전조 현상으로서 관찰되었다. 조직

학적 평가는 피부이식편의 구조적 변화에 대한 정보를 제공하는데, 그 중에 상피의 분리는 각화세포 생활력에 대한 중요한 지표로서 본 주된 논문의 연구과정에서 나타난 양수와 식염수군의 가장 뚜렷한 차이는 진피와 상피의 균열 현상으로서 냉장보관 14일경에 나타난 조기변화 중 가역적인 급성손상을 의미하는 일부를 제외하고는 양수군에서는 상피의 분리현상은 발생하지 않았다. 그러나, 식염수군에서는 심한 진피-상피 균열이 발생하였는데(Figure 1), 이 결과로 보면 피부이식편의 보존에는 양수가 식염수보다 더 적합하다고 할 수 있었다.

피부 이식편을 생리식염수를 적신 거즈에 싸서 4℃에 보관하는 것은 피부이식편의 보존에 보편적으로 사용되는 배지나 기술은 아닌 낡은 기술임에도 불구하고²²⁾, 실용성과 비용적인 측면 때문에 임상가들 사이에 여전히 널리 사용되어 온 방법이다^{8,12,18)}. Mastuka 등은 각화세포의 생활력에 근거한 피부이식편의 다른 저장 방법을 보고하였는데¹⁸⁾, Eagle의 최소필수 영양배지와 RPMI에 보관된 상피의 활력을 비교함으로써 시편을 RPMI에 보존하는 것이 보다 좋으며, 제일 좋은 보존방법은 시편을 적당한 배지에 유화시키고 주기적으로 배지를 갈아주는 것이라고 보고하였다. 또한, Euro Collins 용액에서의 결과는 식염수를 적신 거즈를 사용한 결과와 크게 다르지 않았지만, 세포내액과 유사한 배지에 장기간 보존하는 것은 좋지 않았다고 보고하였다. Basaran 등은 RPMI가 다른 배지보다 우수하며²²⁾, 풍부한 아미노산에 의한 이 우수성이 세포보존을 증진시키는 데 도움을 준다고 설명하였다. RPMI가 피판을 단기간 보존하는 데는 가장 효과적이라고 하였으며 현재까지의 연구에서는 양수가 피부이식편의 단기간 보존 시 식염수보다 더 낫다고 알려져 있다.

양수는 풍부한 아미노산과 많은 펩타이드, 탄수

화물, 지질, 호르몬, 그리고 물을 함유하며¹⁰⁾, 이러한 양수 특유의 조성이 식염수보다 양수가 월등한 보존력을 나타낸 결과를 뒷받침해 준다. 본 주된 참조 논문에서의 연구내용에는 몇 가지 한계점은 지닌다. 첫째, 양수와 식염수 이외의 보다 좋다고 알려져 있을 수 있는 다른 배지를 비교하지는 않았는데, 식염수는 모든 외과의사들이 쉽게 사용할 수 있고 비용이 싸서 널리 쓰이기는 하지만, 다른 방법으로 시행한 양수와, 특히 RPMI와의 비교연구가 시행되었으면 보다 좋은 비교가 가능했을 것으로 생각된다. 둘째, 양수를 사용하는 점은 도덕적이고 법률적인 이유로 제한을 받을 수 있는데, 양수는 다른 세포, 조직과 마찬가지로 생물학적 기원이기 때문에 질병전파의 위험성이 있어서 유럽위원회(EC)는 인체의 세포, 조직의 암호와 처리, 보존, 저장, 분포에 대한 지침을 만들어서 이의 사용을 제한하고 있다²³⁾. 이러한 EC의 요구 조건은 유럽국가들에서 양수의 수집 및 사용을 더욱 어렵게 만들어 왔다. 셋째, 시편으로 인 간이 아닌 백서의 피부를 사용하는 것은 저장 물질로서 인간의 양수를 사용하는 기본적인 연구 계획의 한계가 될 수 있으므로 인간의 양수와 인간의 피부를 이용한 추가적인 연구가 향후 지속적으로 필요할 것이다. 또한, 양수의 기원도 오직 한 명의 산모에서 얻은 양수를 사용하였는데, 다양한 기증자의 양수를 사용해서 우연한 결과의 개연성을 극복하는 것도 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 양수는 피부이식편의 보존에 조직학적인 면에서 식염수보다 좋으며, 이 이유는 양수의 풍부한 성분들 때문인 것으로 사료되고, 향후 본 연구진에서 진행하고 있는 태수술에 있어서 이러한 양수의 보존적 성질을 잘 활용함으로써 산모 내에서의 태수술후 창상치유의 촉진과 치유된 조직의 원활한 보존을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Allgöwer M, Blocker TG Jr. Viability of skin in relation to various methods of storage. *Tex Rep Biol Med* 1952;10:3-21.
2. Perry VP. A review of skin preservation. *Cryobiology* 1966;3:109-130.
3. Fahmy FS, Navsaria HA, Frame JD, Jones CR, Leigh IM. Skin graft storage and keratinocyte viability. *Br J Plast Surg* 1993;46:292-295.
4. Billingham RE, Medawar PB. The freezing, drying and storing of mammalian skin. *J Exp Biol* 1952;29:454-468.
5. Hermans MH. Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. *Burns* 1989;15:57-59.
6. Ballantyne DL Jr, Converse JM. Structure and properties of skin and of its components from the point of view of preservation by freezing and freeze-drying. *Cryobiology* 1966;3:131-177.
7. Kearney JN. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clin Dermatol* 2005;23:357-364.
8. Titley OG, Cooper M, Thomas A, Hancock K. Stored skin -stored trouble? *Br J Plast Surg* 1994;47:24-29.
9. Hurst LN, Brown DH, Murray KA. Prolonged life and improved quality for stored skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:105-110.
10. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005;25:341-348.
11. Turhan-haktanir N, Sahin Oe, Yagmurca M, Koeken G, Demir Y, Cosar E. Histological assessment of skin grafts in amniotic fluid and saline. *J Plast Surg Hand Surg* 2010;44:226-230.
12. Sterne GD, Titley OG, Christie JL. A qualitative histological assessment of various storage conditions on short term preservation of human split skin grafts. *Br J Plast Surg* 2000;53:331-336.
13. Underwood MA, Sherman MP. Nutritional characteristics of amniotic fluid. *NeoReviews* 2006;7:e310-316.
14. Murashita T, Nakayama Y, Hirano T, Ohashi S. Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin. *Br J Plast Surg* 1996;49:58-63.
15. Akin A, Seyrekbasan B. İnsan amniyon sıvısının antimikrobiyal aktivitesi. Antimicrobial activity of human amniotic fluid (2). *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005;35:260-267.
16. Özgenel GY, Samli B, Özcan M. Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg* 2001;26A:332-339.
17. Özgenel GY. The influence of human amniotic fluid on the potential of rabbit ear perichondrial flaps to form cartilage tissue. *Br J Plast Surg* 2002;55:246-250.
18. Matsuka K, Hata Y, Yano K, Ito O, Matsuda H. Epidermal cell viability in

- rat skin preserved at 4°C. *Ann Plast Surg* 1993;31:358-363.
19. Lawrence JC. Storage and skin metabolism. *Br J Plast Surg* 1972;25:440-453.
20. Georgiade N, Peschel E, Georgiade R, Brown I. A clinical and experimental investigation of the preservation of skin. *Plast Reconstr Surg* 1956;17:267-275.
21. Hira M, Tajima S, Yamamoto Y. The metabolism of skin grafts stored with excess carbondioxide. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1122-1128.
22. Basaran O, Ozdemir H, Kut A, et al. Effects of different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat model. *Burns* 2006;32:423-429.
23. Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council, available via: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:294:0032:0050:EN:PDF>. Accessed 6 August 2009.

교신 저자

Jin-Young Choi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Research Institute,

School of Dentistry Seoul National University, Seoul, 110-768, Korea

Tel : +82-2-2072-3992 / Fax : +82-2-766-4948 / E-mail : jinychoi@snu.ac.kr

Acknowledgement

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology(2011-005030).

