

이식을 위한 심장의 장시간 보존에 관한 실험

노 중 기*·이 철 세*·이 길 노*

— Abstract —

Experimental Studies on the Cold Storage of the Rabbit Heart for Trasplantation

Joong Kee Noh, M.D.*, Chol Sae Lee, M.D.*, and Kihl Rho Lee, M.D.*

Donor availability is a major limiting factor in heart transplantation. Prolonging donor heart preservation would facilitate distant heart procurement. The setup used was the isolated retrograde perfused nonworking rabbit heart model and 4 hours of preservation at 2 °C. And the electron microscopic findings of the myocardium were evaluated after reperfusion for 5 minutes. The following three groups (each group, n=4) were prepared: Group I: the heart was arrested with the St. Thomas Hospital solution (STH) and stored in Ringer's lactate solution (RLS); Group II: the heart was arrested with STH and stored in Modified Collins-Sachs solution (MCS); Group III: the heart was arrested with and stored in MCS.

The result was the most severe myocardial injury in the Group III on electron microscopic study.

I. 서 론

최근 우리나라에서도 심장이식에 관한 관심이 점차로 고조되고 있으나, 서양에서는 이미 1905년 Carrel과 Guthrie¹⁾가 심장이식 실험을 처음 보고한 이래 1964년 Hardy²⁾ 등에 의해 임상적으로 처음 시도되었다. 그후 1980년 Cyclosporin의 등장으로 수술 생존율이 향상되어 4년 생존율이 70% 이상에 이르러 대중화 되고 있다³⁾. 문제는 심장을 제공하는 donor 심장이 적은데 있으며, 적절한 심장을 장시간 안전하게 보존하는 방법이다.

심장보존 방법에는 자가관류법, 지속적 심장보존액

관류법, 저온단순침적법이 있으나, 본 실험에서는 사용이 간편하고 운반이 용이한 저온단순침적법을 사용했다. 심장이식시에는 1) 심근마비에 의한 donor 심장의 심정지 2) 심장의 적출, 3) 적출심장의 보존, 4) 이식 조작중의 허혈, 5) 이식후 재관류로 5단계로 나눌 수 있으며, 각 단계에서 심장에 대한 손상을 방지해야한다. 본 교실에서는 우선 기초적으로 앞의 3단계까지의 심장보존에 관해 실험하였다. 특히 심근마비 유도액과 심장보존액의 조성을 세포외액과 세포내액을 각각 모방한 용액으로 달리 함에 따른 심근의 전자현미경학적 변화를 비교 관찰하였다.

II. 실험 재료 및 방법

본 실험에서는 암수 구별없이 2.0-2.5 Kg의 집토끼를 사용하였다. 실험 3분전에 Heparin 2000 unit를 정맥 주입하고 산소를 흡입시키면서 Ketamine 40 mg

* 순천향대학교 의과대학 흉부외과학교실
* Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, College of Medicine University of Soonchunhyang. 1989년 12월 19일 접수

을 정맥 주입하여 마취 한후 흉골 정중절개하여 심장과 폐장을 동시에 적출하였다. 적출한후 4℃ 생리 식염수에 담그면서 폐장을 분리한 후 대동맥 카놀라를 삽입하여 본교실에서 변형한 심장 순환기에 장치 하였다. 심장 순환기는 Shiley oxygenator S-070을 이용하여 Langendorff의 비박출성 역관류모형을 변형 하였다. 관류 용액은 Krebs-Henseleit buffer solution (Table. 1)을 사용하였다. 이때 관류액의 산소 분압은 600torr, 이산화탄소 분압은 30-40torr로 유지 했다.

Table 1. Composition of the Krebs-Henseleit buffer solution

Compound	Concentration(mmol/L)
NaCl	120.2
NaHCO ₃	25.0
KH ₂ PO ₄	1.1
KCl	4.7
MgSO ₄	1.2
CaCl ₂	2.5
Glucose	11.1

1) 실험과정

처음에는 비박출성 역관류를 100 cmH₂O의 압력으로 5분간 시행하여 관상류량과 심박동수를 측정하였으며, 이 때 심근온도는 37℃로 유지하였다. 심근마비액을 70 cmH₂O로 3분간 주입하여 심정지를 유도하였으며, 이 때 심근온도는 7-10℃였다. 이 후 정지된 심장을 실험장치에서 떼어내어 2℃ 심장보존액에 4시간 보존한 후 심장순환기에 다시 장치하여 재역관류를 37℃로 5분간 시행하였다. 이 때 5분간의 관상류량, Creatine Kinase 및 심박동수의 회복도를 측정하였다. 실험이 끝난 심장을 분리하여 심실중격에서 조직을 생검하고 심장의 무게를 재고, 36시간 120℃로 건조하여 건조 무게를 측정하였다(Fig. 1).

Control Retrograde Non-working Perfusion	Simple Im-mersion of Isolated Heart	Non-working Retrograde Reperfusion
5 min.(37℃)	240 min.(2℃)	5 min.(37℃)

↑
CP(3 min.)

Fig. 1. Experimental time course. CP: Infusion of cardioplegic solution

2) 실험군의 분류

각 군은 4마리씩 하였으며, 제1군은 세포외액을 모방한 St.Thomas Hospital solution(STH)으로 심정지를 유도하여 같은 세포외액을 모방한 2℃ Ringer's lactate solution(RLS)에 4시간 심장을 보존하였다. 제2군은 제1군과 같이 STH 용액으로 심정지를 유도하고, 세포내액을 모방한 Modified Collins-Sachs solution(MCS)에 4시간 보존하였다(Table 2). 제3군은 모두 MCS 용액으로 심정지 유도와 심장을 보존하였다(Table 3).

Table 2. Composition of Modified Collins-Sachs solution

K ₂ PO ₄ (gm/L)	7.4	<table border="1"> <tr> <td>pH</td> <td>7.2(26°C)</td> </tr> <tr> <td>Na(mEq/L)</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>K(mEq/L)</td> <td>114</td> </tr> <tr> <td>Osmolarity(mOsm)</td> <td>360</td> </tr> </table>	pH	7.2(26°C)	Na(mEq/L)	17	K(mEq/L)	114	Osmolarity(mOsm)	360
pH	7.2(26°C)									
Na(mEq/L)	17									
K(mEq/L)	114									
Osmolarity(mOsm)	360									
K ₂ HPO ₄ (gm/L)	4.76									
MgCl ₂ ·6H ₂ O(gm/L)	1.62									
NaHCO ₃ (gm/L)	1.26									
KHCO ₃ (gm/L)	1.0									
EDTA(gm/L)	0.075									
Glucose(gm/L)	25.0									

Table 3. 실험군의 분류

	제1군	제2군	제3군
심근 마비액	STH	STH	MCS
심장 보존액	RLS	MCS	MCS
온 도	2℃	2℃	2℃
시간	4 hrs	4 hrs	4 hrs

STH: St. Thomas Hospital solution
RLS: Ringer's lactate solution
MCS: Modified Collins-Sachs solution

III. 실험성적

1) 기본적인 심기능의 회복과 심근의 손상정도

실험 표본의 수가 적어서 통계학적 의미를 부여하기 어렵지만, 재관류시 심박동의 회복은 세군이 평균 37-43초로 비슷하게 돌아왔으나 제3군의 한 표본에서는 심실세동으로 심박동이 전혀 돌아오지 않았다. 또한 심박동수의 회복도는 제1군에서 심정지 전의 대조치 193회/분에 비해 139회/분으로 비교적 저하 되어 있다(Fig. 2) 재관류시 관상관류량은 타군에 비해 제3

心搏動數 (beats/min)

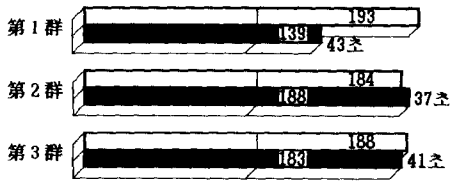


Fig. 2. 심박동수의 회복

冠狀灌流量 (ml/min/dry gm of heart)

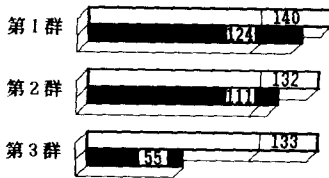


Fig. 3. 관상관류량의 회복

心筋의 浮腫程度

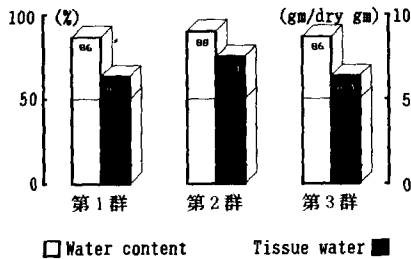


Fig. 4. 심근의 부종정도

군에서 심정지전의 대조치가 133 ml/min/dry gm에 비해 55 ml/min/dry gm으로 현저히 감소되었다(Fig. 3). 심근의 부종정도는 세군에서 별 차이가 없었다(Fig. 4). 또한 Creatine Kinase의 배출량도 세군에서 별 차이가 없었다(Fig. 5).

2) 전자현미경적 소견

심근손상의 정도의 기준은 UCLA의 Davtayan⁴⁾ 등에 의해 사용된 기준을 저희교실에서 약간 변형하여 제3도로 나누어 사용하였다(Table 4).

핵의 chromatin margination과 clumping은 제1, 2군에서는 모두 경하게 나타났으나, 제3군은 두 표본에서 중등도로 심하게 나타났다. mitochondria의

CREATINE KINASE 排出量 (IU/5 min)

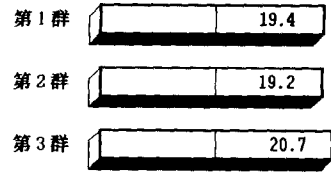


Fig. 5. Creatine Kinase 배출량

Table 4. 심근손상의 정도에 대한 전자현미경소견의 기준

Nucleus			
Margination & clumping of chromatin	Mild	Mild	Marked
Mitochondria			
Pleomorphism	Mild	Moderate	Marked
Broken cristae	Absent	Mild	Marked
Rupture of membrane	Absent	Absent	Present
Myofilament			
Lysis & contraction bands	Mild	Moderate	Marked
Vacuolation & lipid droplets	Mild	Moderate	Marked
Rupture of cell Membrane	Absent	Absent	Present

pleomorphism은 제1군에서는 한 표본을 제외한 나머지에서 모두 경미하였으나, 제2, 3군에서는 중등도로 심한 것이 각각 두 표본에서 나타났다. 또한 cristae의 손상은 제2군에서는 모두 경미하였으나 제1, 3군에서는 한 표본에서만 중등도로 심했다. 근원섬유의 band contraction은 제1, 2군에서는 한 표본만 제외하고 모두 경하게 나타났으나, 제3군에서는 세표본에서 중등도로 나타났다. 또한 근원섬유의 분해는 제1, 2군에서는 모두 경미했으나, 제3군만이 두표본에서 중등도로 심하게 나타났다. 세포막의 손실은 비가역적인 변성으로써 제1, 2군에서는 보이지 않았으나, 제3군만이 세표본에서 나타났다. 공포화는 제1, 2군은 한 표본을 제외하고 모두 경하게 나타났으나, 제3군은 모두 중등도로 심하게 나타났다. 세포내 부종은 제1, 2군은 모두 경했으나, 제3군만이 두표본에서 중등도로 심했다. 전체적으로 손상의 정도를 평가한 결과는 제1군에서 1도와 2도가 각각 두표본에서 보였고(Fig. 6), 제2군은 1도가 세표본, 2도가 한표본에서 나타났으며(Fig. 7), 제3군은 2도가 한표본, 나머지 모두 3도



Fig. 6. 전자현미경소견(제1군) : 핵의 모양이 약간 불규칙하고 색소침착이 있고, 미토콘드리아의 모양이 기형적이고 크리스타가 경하게 파열되었으며 근원섬유의 용해가 경하게 있고, 세포내부종이 있다. 제2도 심근손상(10500 배율)



Fig. 8. 전자현미경소견(제3군) : 미토콘드리아의 막이 파열되고 모양이 기형적이고, 세포내부종이 심하고 세포막이 파열되었다. 제3도의 심근손상(22500 배율)

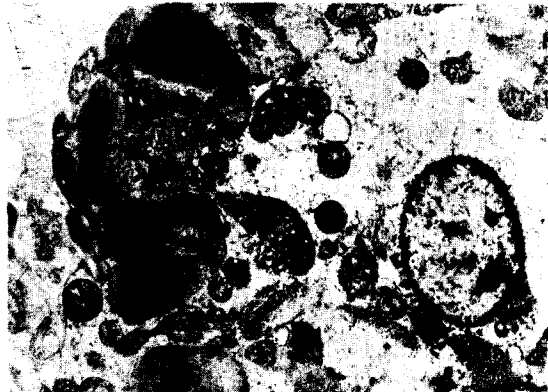


Fig. 7. 전자현미경소견(제2군) : 핵의 모양이 정상이고 경한 색소 침착이 있고, 미토콘드리아는 거의 정상이며 근원섬유의 경한용해와 경한 세포내 부종이 있다. 제1도의 심근 손상(7500 배율)

였다(Fig. 8)(Table 5).

IV. 고 찰

저온단순침적법에 의한 장시간 심장 보존방법은 1960년대 Lower, Shumway⁵⁾ 등에 의해 보고된 이래 심근의 에너지대사를 억제하여 심근의 viability를 보존하는 가장 간편한 방법으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 이 방법은 저온상태에서는 세포막 기능이 억제되기 때문에 이때 세포내 이온을 정상적으로 어떻게 잘 유지할 수 있을가가 문제로 남아 있다. 실제로 심장이식에 있어서는 앞서 밝힌바와 같이 각 단

계 별로 어떠한 용액이 적합한가를 알아보는 것이 본 실험의 목적인데, 1) 심장을 정지시킬 때 어떤 용액이 적합한가 2) 정지된 심장을 오랜 시간동안 저온에 저장할 때 어떤 용액이 효과적인가를 기초적으로 분석해 보았다. 이때 재관류시 필요한 문제는 제외되었다. 심장보존용액을 크게 나누면 고농도 K과 저농도 Na로 구성된 세포내 조성액과 저농도 K과 고농도 Na로 구성된 세포외 조성액으로 대별할 수 있다.

첫째로, 심정지 유도액은 본 실험에서는 세포외 조성액으로써 개심술에서 가장 많이 사용되는 심근마비액인 St. Thomas Hospital solution과 세포내 조성액인 Modified Collins-Sachs solution을 비교하였다. 전자용액은 K 16 mEq/L, Na 120 mEq/L이고, 후자 용액은 K 114 mEq/L, Na 17 mEq/L였다. 본 실험의 결과를 보면 MCS용액으로 심정지를 유도한 제3군에서 전자현미경소견상 제3도의 심한 변성을 보여 주었다. 세포내 조성액의 고농도 K과 저농도 Na이 심장에 직접적인 영향을 주어 심근의 이완긴장을 증가 시키고⁶⁾, 관상혈관의 평활근을 수축시켜 관상혈관 저항을 증가 시킨다⁷⁾. 실제 본실험에서도 통계학적 의의는 없어도 제3군에서 관상관류량이 현저하게 감소되었다. 또한 세포내로 Ca의 유입이 일어나는데, 이 기전을 보면 첫째로, 고농도 K이 세포막을 탈분극화 시켜 slow Ca channel을 활성화 시킨다⁸⁾. 둘째로, 저농도 Na으로 인해 세포내 Na의 유출이 일어나고 이로 인해 세포의 Ca의 유입이 일어난다⁹⁾. 따라서 심근의 에너지 소모과정과 빠르고 균등한 심근의 냉각 장애가 온다. 개심술의 발달로 실제로 임상에서 심근마비액

Table 5. 심근의 전자현미경조건

	Group I				Group II				Group III			
	N1	N2	N3	N4	N1	N2	N3	N4	N1	N2	N3	N4
Nucleus												
Chromatin margination & clumping	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+
Mitochondria												
Matrix light	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pleomorphism	+	+	++	+	++	+	++	+	++	++	+	+
Cristae broken	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+
Myofilament												
Band contraction	+	++	+	+	++	+	+	+	+	++	++	++
Myofibrillar lysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+
Cell Membrane												
Disruption	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Cell edema												
Intracellular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracellular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grade of injury	1	2	2	1	2	1	1	1	3	3	3	2

(-) Absent (+) slight degree (++) Moderate degree

이 이상적인 K의 농도는 10-40 mmol/L¹⁰⁾, Na은 최하 60 mmol/L 이상으로 입증되었다¹¹⁾. Kohno등¹²⁾의 실험에 의하면 K 20 mmol/L, Na 87 mmol/L인 심근마비액과 K 117 mmol/L, Na 10 mmol/L의 Collins 용액을 비교한 결과 심근마비액으로 심정지를 유도한 것이 우수하게 나타났다. 한편 Davtyan등⁴⁾의 UCLA 그룹의 신생심장의 저온 장시간 보존 연구에서는 K 126 mmol/L의 Sachs 용액으로 심근마비를 유도한 실험군도 좋은 결과를 나타냈다. 이 사람들은 저온에서 심장을 장시간 보존할 때는 세포내 농도에 가까운 고농도 K 용액이 심근마비액으로 적합하다고 주장했다.

둘째로, 적출된 심장의 장시간 보존액은 대표적인 세포외조성액인 Ringer's lactate 용액과 세포내조성액인 Modified Collins-Sachs 용액에 4시간 보존하여 비교 관찰했는데 후자 용액에 보존한 제2군에서 큰 차이는 없으나 전자 용액에 보존한 제1군 보다 경미한 심근의 손상을 보여주었다. RLS 용액은 장시간 심장 보존시 심근의 현저한 Na 축적과 K 저하가 일어나서 심근의 기능의 회복을 저하 시킨다. 심장이식전에 장시간 심장 보존의 목적은 세포내외의 이온의 이동을 방지하고, 재관류시 Transmembrane cationic gradi-

ent와 세포의 기능의 빠른 회복을 가능케 해주는데 있다¹³⁾. 따라서 고농도 K용액은 세포막을 탈분극시켜 신진대사의 억제제로 역할하여 세포내의 기능을 보존하고 세포막을 통과하는 이온의 이동을 억제한다¹⁴⁾. 또한 고농도 포도당 용액은 심근의 허혈시 에너지 대사를 개선하고 더높은 심근의 글리코겐치를 유지하게 한다¹⁵⁾. 본 실험에서도 Collins-Sachs 용액의 mannitol 대신 glucose를 첨가하여 변형시켰다. Kohno등¹²⁾과 Davtyan등⁴⁾의 실험 보고에서 보면 세포내 조성액인 Collins용액과 Sachs용액에 보존한 실험군에서 월등히 우수했다. 요즈음 심장의 저온 보존에서 좀 더 장시간 보존하는 용액의 개발에 많은 연구들을 하고 있는데 세포내조성액 보다 주로 K의 농도를 낮추고, Na, Ca, Mg을 더 첨가하여 고농도 K에 의한 심근장해¹⁶⁾, Mg의 미토콘드리아와 세포막 보호효과¹⁷⁾, K, Mg의 관상동맥에 미치는 영향¹⁸⁾, 무 Ca의 Calcium paradox의 발생등을 억제하는 것을 보고하고 있다¹⁹⁾. Saitoh등²⁰⁾은 Collins 용액이 3시간 동안 안전하게 보존할 수 있었던 반면, 위와 같이 변형한 modified Collins 용액은 6시간을 보존할 수 있었다. 또한 재관류시 심근손상을 적게하는 많은 논문들이 나오고 있다. 본 교실에서도 앞으로 이런 문제를 개선하는데

많은 실험을 할 예정이다.

전자현미경소견에 대한 관정의 기준은 UCLA⁴¹의 4등급 관정을 본 교실에서는 3등급으로 변형하여 사용하였다. 심근의 1도 손상은 핵의 모양이 약간 불규칙하고 경한 chromatin clumping이 있고, 미토콘드리아가 경하게 커져있고 비이상적인 모양을 보이고, 근원섬유의 용해가 경하게 있고, 세포내공포화 및 지방침착이 경하게 있을때를 말한다. 2도 손상은 1도 손상보다 미토콘드리아가 중정도로 기형적으로 커져있고 크리스타의 배열이 경하게 파괴되고, 근원섬유의 용해와 contraction band가 중등도로 보이고, 공포화와 지방침착이 중등도로 심한 것을 말한다. 3도 손상은 핵, 미토콘드리아, 근원섬유의 변성이 매우 심하고 특히 비가역적인 변성인 미토콘드리아의 막과 세포막이 과열되었을 때를 말한다.

V. 요 약

순천향대학 흉부외과학교실에서는 심장이식시 장시간 심장저온보존에 관해 실험을 했다. 실험 방법은 토끼의 적출심장을 이용한 langendorff의 역관류법을 사용하여 심정지 유도액으로 심근마비를 시킨 후 2℃로 4시간 동안 심장을 단순침적보존한 후 심근의 손상 여부를 전자현미경소견으로 판단하였다. 실험군은 제1군은 세포외 조성액인 STH 용액으로 심정지를 유도한 후 세포외 조성액인 RL 용액으로 심장을 보존했고, 제2군은 세포외 조성액인 STH 용액으로 심정지를 유도한 후 세포내 조성액인 MCS 용액으로 심장을 보존했으며, 제3군은 심정지 유도와 심장보존을 모두 세포내 조성액인 MCS 용액으로 했다 결과는 제3군에서 가장 심한 심근의 손상을 전자현미경소견에서 볼 수 있었다.

REFERENCES

1. Carrel A., Guthrie C.C.: *The transplantation of veins and organs. Am Med* 10:1101, 1905
2. Hardy J.D., Chavez C.M., Kurrus F.D., Neely W.A., Eraslan S., Turner M.D., Fabian L.W., and Labecki T.D.: *Heart transplantation in man, Developmental studies and report of a case. JAMA* 188: 1132-1140, 1964
3. Kaye M.P., Elcombe S.A., and O'Fallon W.M.: *The*

- international heart transplantation registry. The 1984 report. Heart Transplantation* 4:290-292, 1985
4. Davtayan H.G., Corno A.F., Laks H., Bhuta S., Flynn W.M., Laidig C.Cahng P., and Drinkwater D.: *Long-term neonatal heart preservation J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 96:44-53, 1988
5. Lower R.R., Stofer R.C., and Shumway N.E.: *Homovital transplantation of the heart. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 41: 196-204, 1961
6. Rich T.L., and Brady A.J.: *Potassium contracture and utilization of high-energy phosphates in rabbit heart. Am. J. Physiol.* 226:105-113, 1974
7. Chiavarelli M., Toscano M., Chiavarelli R., Carpi A., and Marino B.: *Effects of cardioplegic solutions on conductive coronary arteries. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 84:23-27, 1982
8. Reuter H.: *Properties of two inward membrane currents in the heart Ann. Rev. Physiol.* 41:413-424, 1979
9. Reuter H.: *Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium, Mechanisms and physiological significance. Circ. Res.* 34: 599-605, 1974
10. Hearse D.J., Braimbridge M.V., and Jynge p.: *Protection of the ischemic myocardium: cardioplegia. New York: Raven Pree.* 209-299, 1981
11. Kinoshta K., and Ehara T.: *Importance of sodium ions in the protective effects of high-potassium, high-glucose solution on electromechanical activities in the guinea-pig myocardium. J. Mol Cell Cardiol.* 16:405-419, 1984
12. Kohno H., Shiki K., Ueno Y., and Tokunaga K.: *Coldstorage of the rat heart for transplantation. Two types of solution required for optimal preservation. J.Thorac. Cardiovasc. Surg.* 93:86-94, 1987
13. Bayliss C.E., and Maloney J.V. Jr.: *Sehlf-storage of excised hearts by manipulation of transmembrane ionic gradients. Surg. Forum.* 21:194-196, 1979
14. Reitz B.A., Brody W.R., Hickey P.R., and Michaelis L.L.: *Protection of the heart for 24 hours with intracellular (high K) solution and hypothermia. Surg. Forum.* 25:149-151, 1974
15. Thomas F.T., Schatzki P.F., Hudson B.H., and Wolf J.S.: *Successful 24 hours ischemic cardiac preservation using a new hyperosmolar perfusate. Surg. Forum.* 26:253-255, 1975

16. Rich T.L., and Brady A.J.: *Potassium contracture and utilization of high energy phosphates in rabbit heartt. Am. J. Physiol.* 226:105-113, 1974
17. Sunamori M., Suzuki A., and Harrison C.E.Jr.: *Effect of magnesium in cardioplegic solution upon hypothermic ischemic myocardial mitochondria. Jpn. Circ. J.* 44:81-86, 1980
18. Shikano K., Nasu M., Miyamura K., Sakai T., Shomura S., Kusagawa M: and Hidaka H.: *A fundamental study on effects of composition of cardioplegic solutions on coronary arteries. Nippon Kyobugeka Gakkai Zasshi* 32:294-300, 1984
19. Zimmerman A.N.E., and Hülsmann W.C.: *Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. Nature* 211:646-647, 1966
20. Saitoh K., Imura M., Hattori R., Shikano K., Fukuyama M., Yada I., Yuasa H., and Kusagawa M.: *Experimental studies on the hypothermic preservation of the rat heart.* 34:2047-2054, 1986