

동종 동맥관의 생육성 평가에 관한 연구 (I)

임창영* · 최영숙** · 홍은경*** · 김종배***

=Abstract=

Viability Assay of Cardiac Allograft (I)

Chang-Young Lim, M.D.* , Young Sook Choi, M.D.** , Eun Kyung Hong, M.S*** ,
Jong Bae Kim, Ph.D.***

Allograft cardiac valves have been used for over 30 years to replace diseased cardiac valves, reconstruct right or left ventricular outflow tract. With increasing its requirement, the establishment of allograft bank capable of maintaining the viability of graft over a prolonged period would be desirable.

The method for determining the viability of allograft by metabolic assay technique using radiolabeled aminoacids has been used recently.

An experimental study was done for evaluation of viability of cardiac allograft which was preserved for 14 days at 4°C in nutrient medium (fresh preservation) by metabolism assay technique using ³H-glycine. Also, the effectiveness of low concentration antibiotic solution (CLPV) for sterilization was evaluated.

The effectiveness of CLPV solution for sterilization of allograft was perfect. Pre-treatment cultured organisms were not cultured after treatment at all in every cases.

The viability of allograft after sterilization was reduced to 66.4% (aortic wall), 74.7% (pulmonary wall), 76.3% (aortic valve), 67.9% (aortic wall). And after the fresh preservation for 14 days, the viability was reduced to 14.7%, 18.5%, 17.7%, 19.0%, respectively.

In conclusion, viability of allograft was reduced to 71.3(66.4-76.3)% after sterilization and 17.5(14.7-19.0)% after fresh preservation. And sterilization effect of CLPV solution was satisfactory.

(Korean J Thoracic Cardiovas Surg 1994; 27:1-8)

Key words : 1. Transplantation, homologous
2. Heart valve prosthesis
3. Bioprosthesis

서론

대동맥판막질환에 대한 수술법중 한가지인 동종 대동맥

판 이식술은 사람의 사후에 적출한 대동맥판을 포함한 대동맥 근부나 폐동맥판을 포함한 폐동맥근부를 적절히 멸균 및 보존처리를 하였다가, 대상이 되는 환자에게 이식을

* 건국대학교 의과대학 흉부외과

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Medical College, Kon Kuk University

** 건국대학교 의과대학 임상병리과

** Department of Clinical Pathology, Medical College, Kon Kuk University

*** 건국대학교 동물자원 연구소

*** Animal Resources Research Center, Kon Kuk University

통신저자: 임창영, (133-130) 성동구 화양동 27-2, Tel. (02) 450-9563, Fax. (02) 457-2930

하는 방법이다. 이 방법은 수술후에 지속적으로 약물(항응고제)을 사용하지 않아도 되고 그의 내구성이 뛰어나며 특히 체내에서의 기능성이 완벽하여, 소아나 젊은 나이의 환자 또는 가입기의 여성들에게는 가장 이상적인 치료법이다. 이 동종 동맥판을 적절히 보존처리 할 경우, 비록 사후에 적출하였을 지라도 판막의 생육성 (tissue viability)이 보존되어 이식후에도 생육성을 가진 판막으로 작용하여 장기간에 걸친 완벽한 기능수행을 하는 이점이 있다.

동종판막의 보존과정은 동종판막의 획득, 멸균처리, 보존으로 이루어진다.

획득의 과정은 공여자에 대한 조사, 심장적출, 판막편 박리로 나뉘어지는데, 공여자 검사는 제공된 판막을 사용하는 데 문제가 없는지를 공여자의 병력과 제공시의 상태 등을 고려하여 판별하는 과정 (donor screening)이다. 심장적출은 초창기에는 사체안치소에서 오염된 상태로 심장을 적출하였으나, 요즘은 수술실에서 가능한 한 청결한 상태에서 적출함을 원칙으로 하고 warm ischemic time을 최소화 하는데 모든 노력을 기울여야 한다.

멸균처리과정은 동종판막의 보존처리과정중 가장 중요한 단계의 하나인 동시에 세포의 생육성이 가장 크게 손상되는 과정이기도 하다.

일반적으로 동종판막편은 사체에서 얻어지므로 아무리 청결한 조건에서 시행하더라도 무균상태라고 볼수는 없다. 따라서 무균상태의 동종이식을 위하여는 모든 병원균의 제거가 필요하며, 동시에 혈관내피세포를 제거함으로써 동종판막의 항원효과를 제거하는 효과를 얻을 수도 있다.

동종판막보존법은 1962년에 개발된 이래 수 많은 발전을 이루어, 저농도 항생제용액을 이용하여 멸균처리를 한 후 4°C의 보존액에서 냉장보관하는 방법 (fresh homograft) 과 멸균처리후 -1°C/min의 일정한 속도로 냉동시켜서 -196°C로 냉동보존하는 방법 (cryopreserved homograft) 이 보존방법의 주류를 이루어왔다. 특히 1980년대에 들어서 냉동보존법이 일반화되면서 세포의 생육성을 유지한 상태로 장기간에 걸쳐 보관이 가능하게 되면서 동종동맥판 이식술의 급격한 발전을 보게되었다.

이와같이 동종판막보존은 여러과정을 거쳐서 이루어 지는데, 각각의 단계가 모두 세포의 생육성을 감소시키는 요소를 갖고 있으므로 이 단계들이 생육성의 유지에 적절한지를 판단하기 위하여는 정확한 생육성의 판정방법이 필요하다. 생육성을 유지하는 방법은 크게 임상적인 방법과 실험적인 방법으로 나눌 수 있다. 임상적인 방법은 생체에 이식된 동종판막을 장기간에 걸쳐 추적 관찰하여 동종판

막의 장기적인 기능수행 능력을 평가하는 방법이며, 실험적인 방법은 이식되기 이전에 보존된 동종판막세포의 생육성을 실험실에서 물리화학적인 방법으로 평가하는 것이다.

실험적 생육성평가방법에는 1) 해부학적 평가 (morphological study), 2) 세포증식방법 (proliferation study), 3) 대사기능 측정법 (metabolism assay), 4) 기계적 측정법 (mechanical assay)이 있다.

해부학적 평가방법에는 광학현미경을 이용한 dye-exclusion assay방법과 전자현미경을 이용한 세포구조연구, 세포표면항체를 이용한 염색방법등이 있다. 세포증식방법은 판막조직으로부터 세포를 분리하여 세포배양액에서 증식시켜 세포의 재생능력을 평가하는 것이다. 대사기능 측정법은 동위원소를 이용한 단백질측정법을 사용하여 세포가 살아있다는 것을 정량적으로 알아보는 방법이며, 단백질측정 대신에 당질대사를 측정하기도 한다. 기계적 측정법은 판막조직의 탄력성 및 강도를 기계적인 방법으로 측정하여 살아있는 조직의 것 (stress-strain characteristics)과 비교하는 방법이다. 이상의 방법들 중에서 해부학적 평가법은 객관적인 정확도가 떨어지므로 실험연구의 1차적인 검색 (preliminary screening)에 많이 쓰이고있고, 세포증식법은 생육성을 나타내는 결과가 정량적이지 못하고 생육성을 갖는 세포가 반드시 증식하여야 한다는 조건을 갖지 않으므로 위음성을 나타낼 확률이 많다. 특히 섬유아세포 같은 stable cell 등이 그러하여 섬유아세포의 생육성 여부가 가장 중요한 동종판막의 검사에는 부적절한 것으로 평가되고 있다. 따라서 근년에는 많은 기관에서 대사기능 측정법을 사용하여 생육성을 판정하고 있다.

본 연구는 ³H-glycine을 이용한 대사기능 측정법을 확립함과 동시에 냉장보존된 동종판막의 생육성 보존효과를 ³H-glycine을 이용한 대사기능 측정법을 사용하여 판정하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상

실험대상으로 10마리의 성돈을 택하였다.

2. 심장의 적출

10마리의 돼지에서 사망직후에 대동맥궁과 폐동맥간을 포함한 심장을 가능한한 깨끗이 적출하였다. 적출한 심장에 대하여 touch swab을 하여 호기성균, 혐기성균, 진균, 결핵균에대한 배양검사를 하고 무균 생리식염수에 담가

실험실로 옮겼다.

적출하는 방법은, 정중절개후 대동맥궁혈관의 후위2-3cm 과 폐문부에 이르기까지 대동맥과 폐동맥을 박리한다. 상, 하공정맥을 절단하고 폐정맥을 각각 절단한다. 폐동맥을 폐문부에서 절단하고 대동맥궁혈관을 대동맥궁재건술에 사용할 수 있도록 충분히 남기면서 절단하여 심장적출을 한다. 청결을 유지하면서 생리적 용액이 담긴 용기에 담고 밀봉하여 보존과정에 들어갈 실험실로 보낸다. 이때 생리적 용액으로는 4°C의 냉각된 생리식염수를 사용하였다.

3. 동종동맥판 박리

심장을 옮기는데 사용된 용액에 대한 세균검사를 하였으며 박리는 무균상태에서 하였다. 대동맥근부와 주폐동맥을 박리하고 좌, 우관상동맥을 노출시킨 후 대동맥근부에 손상을 주지않도록 주의하면서 우심실유출로와 주폐동맥을 절제하였다. 이때 원위부는 좌, 우폐동맥의 기시부까지를 적출하였다. 좌, 우관상동맥을 약 1cm정도 남기고 자른후에 심근자락(myocardial cuff)과 승모판전첨(anterior leaflet of mitral valve)을 포함하여 대동맥근부를 적출해 낸다. 적출해낸 판막편을 잘 다듬고 관상동맥을 봉합 결찰한 후에 판막의 크기와 도관의 길이, 판막의 상태를 점검하고 기록하였다. 이같은 판막편에서 혈관벽과 판막, 심근으로부터 작은 절편을 각각 채취하여 이송액(transport media; RPMI 1640 with HEPES buffer, antibiotics)에 담아서 1단계 (vital allograft)의 생육성검사를 위하여 검사실로 이송하였다.

4. 보존처리

a. 멸균과정

나머지 판막편을 멸균액 (sterilization solution: RPMI 1640 with HEPES buffer, 10% FBS, antibiotics: Table 1)에 담가 4°C에 24시간동안 보관하였다.

24시간의 멸균을 마친 후에 판막편의 혈관벽과 판막, 심근에서 작은 절편을 각각 채취하여 이송액에 담가 2단계 (antibiotics treated allograft)의 생육성검사를 위하여 검사실로 이송하였다. 이와동시에 사용된 멸균액에 대하여 1단계에서와 같은 방법으로 세균검사를 실시하였다.

b. 보존처리 및 저장과정

나머지의 조직편을 무균상태에서 새 배양액으로 씻은 후 보존용액 (RPMI 1640 with HEPES buffer, 10% FBS, antibiotics)에 넣고 4°C에서 2주일간 냉장저장한다. 2주일간의 저장후 판막편의 혈관벽과 판막, 심근에서 작은 절편

Table 1. Composition of Sterilization solution

RPMI 1640 with sodium bicarbonate, HEPES buffer,
10% FCS
Cefoxitin 240 microgram/ml
Lincomycin 120 microgram/ml
Polymyxin 100 microgram/ml
Vancomycin 50 microgram/ml

을 각각 채취하여 이송액에 담가 3단계 (fresh preserved allograft)의 생육성검사를 위하여 검사실로 이송하였다. 동시에 사용된 멸균액에 대하여 같은 방법으로 세균검사를 실시하였다.

5. 미생물학적 검사

이동액 (심장적출후 운반에 사용한 생리식염수), 멸균액, 보존용액에 대한 세균검사는 다음과 같이 하였다. 액체에 대하여는 20 µm Seitz filter를 사용한 여과장치로 거른후에 여과지를 멸균면봉으로 touch swab하였다. 이 Touch swab에 대하여 호기성 배양, 혐기성 배양, 진균 배양, 결핵 균 배양을 각각 실시하였다.

호기성 배양은 Blood agar에 접종하여 CO₂ incubator에서 배양한 후 선택배지와 biochemical test를 이용하여 동정한다. 혐기성 배양은 Gaspak Pouch (BBL Co.)를 이용하였으며, 비선택배지로 PEBA (Phenylethyl Alcohol Blood Agar)와 Brucella배지를 사용하였다. 균이 자라면 호기성 균이 아님을 확인함과 동시에 증균배지 (enriched Thioglycollate broth: Thioglycollate with hemin, vitamin K1)에 증균시켜 혐기성세균임을 확인하였다. 혐기성세균의 동정을 위해서는 Thioglycollate medium without dextrose에 yeast extract (0.2%)와 BTB (0.001%)를 첨가한 것을 기초배지로 하여 생화학적 검사를 시행하였으며 경우에 따라 ATB 32A anaerobic ID (API system)도 병행하였다. 진균배양은 Saboraud agar에 직접 접종시켰으며 동정은 생화학적 방법과 API 20C를 병행하였다. 결핵균의 배양은 멸균병에서 NaOH를 이용해 contaminant를 제거한 후 Ogawa배지에 배양하는 방법을 사용하였다.

6. 생육성 판정검사

생육성 판정을 위한 검사방법으로는 ³H-glycine을 사용하여 대사기능의 유지정도를 알아보는 대사측정방법을 택하였다.

³H-glycine을 이용한 단백질측정을 하기 위하여 동맥벽

과 판막, 심근의 절편을 $4\mu\text{Ci } ^3\text{H-glycine}$ in $500\mu\text{l RPMI-1640}$ (with HEPES, NaHCO_3 , glutamin, PN+SM+GM+Fungizone)용액에 담가 37°C , 5% CO_2 하에서 48시간 배양시킨 후 phosphate-buffered saline solution에 4회 세척하여 건조하고 무게를 측정한다. 그 후 조직을 1M NaOH를 첨가한 물에 수화(rehydrates)시키고 60°C 에서 1시간동안 가온하고 20초간 고주파 분해(Sonication)를 한다. Homogenates를 원심분리한 후 상층액을 $200\mu\text{l}$ 를 취하여 발광매체 혼합액(Scintillation Cocktail 3ml:dioxone, POPOP, PPD, Naphthalein)과 혼합한 후 β -counter(Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA)로 측정한다. 결과는 cpm/mg tissue로 나타내었다.

7. 분석

각각의 단계에서 실시한 세균배양검사 결과를 배양 2, 7, 9일에 판독하였다.

생육성검사에 대하여는 1, 2, 3단계에 실시한 결과중 1단계의 결과를 생육성이 완벽히 보존되어 있는 기준값으로 하여 2단계와 3단계의 값을 비교하였다.

통계학적 의미를 알아보기 위하여 Student's t-test (Paired t-test)를 이용하여 p value가 0.05 미만인 경우를 의미 있는 차이로 인정하였다.

결 과

세균배양검사결과를 보면 1단계에서 배양되었던 균주는 Table 2와 같다. 2단계의 배양검사에서는 모든 경우에서 세균이 배양되지 않았으며 3단계의 배양검사역시 모든 레에서 세균이 검출되지 않았다.

생육성검사결과를 보면 대동맥벽에 관한 결과는 1단계 검사결과를 100으로 설정하여 기준값으로 볼 때 멸균처리 후의 2단계 검사결과를 평균 66.4 ± 9.4 였고, 2주일의 냉장보존 후 3단계의 검사결과는 14.7 ± 5.7 였다. 이 결과를 볼 때 멸균처리 후에 대동맥벽의 생육성이 66.4%가 유지되었고 2주일간의 냉장보존 후에는 14.7%의 생육성이 보존되었음을 알 수 있다($P < 0.05$). 폐동맥벽에 대한 검사결과는 1단계 검사결과를 100으로보고 기준값으로 할 때 멸균처리 후의 2단계 검사결과가 74.7 ± 13.7 였고 2주일의 냉장보존 후의 3단계의 검사결과가 18.5 ± 10.1 였다. 이와같은 결과는 대동맥벽에서의 결과와 유사하게 2단계, 3단계에서 각각 74.7%와 18.5%의 생육성이 보존되고 있음을 알 수 있다($P < 0.05$)(Fig. 1).

대동맥판에 대한 검사결과는 1단계 검사결과를 100으로

Table 2. Cultured organisms before sterilization

Aerobics	Enterobacter cloacae
	Staphylococcus aureus
	E. coli
	α -hemolytic streptococcus
	Coagulase (-) staphylococcus
	Proteus spp
Anaerobics	Peptococcus
	Bacterioides fragilis
	Clostridium barati
	Clostridium clostridiforme
	Clostridium paraputrificum
	Clostridium bifermentans
	Gemella morbillorum
	Bacterioides intermedius
	Eubacterium Aerofaciens
	Streptococcus magnus
	Anaerobic streptococcus
Fungus	Saccharomyces cerevisiae
	Candida albicans

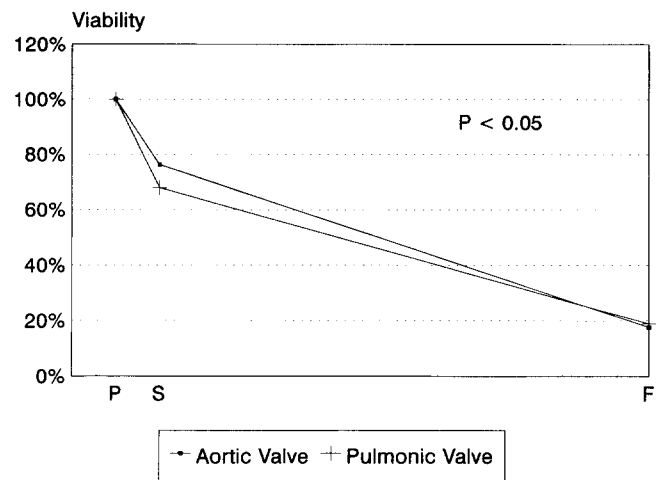


Fig. 1. Viability of fresh preserved aortic & pulmonic wall. P; Procurement, S; Sterilization, F; Fresh preservation for 14 days

볼 때 멸균처리 후의 1단계 검사결과가 76.3 ± 14.8 였고 2주일의 냉장보존 후의 3단계의 검사결과가 17.7 ± 8.5 였다. 또한 폐동맥판에 대한 검사결과는 1단계 검사결과를 100으로 기준할 때 멸균처리 후의 2단계 검사결과가 67.9 ± 21.7 였고 2주일의 냉장보존 후의 3단계의 검사결과가 19.0 ± 13.4 였다. 이와같은 결과는 동맥판막에서도 2단계

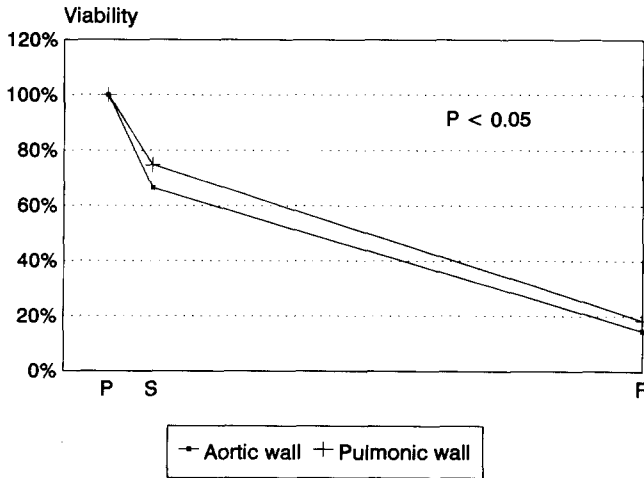


Fig. 2. Viability of fresh preserved Aortic, Pulmonic valve
P; Procurement, S; Sterilization, F; Fresh preservation for 14 days

에서 대동맥관과 폐동맥관이 각각 76.3%와 67.9%의 생육성이 보존되었고 3단계에서는 대동맥관에서는 17.7%, 폐동맥관에서는 19.0%의 생육성이 보존되었음을 알 수 있다($P < 0.05$)(Fig. 2).

상기와 같은 결과를 종합해 볼 때, 동맥벽과 동맥관에서 24시간의 멸균처리로 인하여 약 24~33%의 생육성손실이 일어나고 그 이후 2주일동안 4°C에서 보존액에 보관했을 때 약 81~85%의 생육성손실이 일어남을 알 수 있다($P < 0.05$)(Fig. 3).

고 찰

심장판막의 질환으로 인하여 판막치환수술을 할 때 사용되는 인공심장판막에는 크게 기계판막과 조직판막이 있다. 기계판막은 그 내구성이 우수하나 항구적인 항혈전제의 투약을 요하고, 조직판은 항혈전제의 투여없이도 낮은 혈전발생율을 갖지만 약 10년을 전후하여 판막의 손상에 의한 재수술율이 현저히 증가하는 내구성의 문제점을 갖는다.

1960년대에 사용되기 시작한 동종심장판막(Allograft Valve)은 그동안의 발전에 힘입어 기계판과 조직판의 이점을 고루갖춘 이상적인 인공심장판막으로 평가받기 시작하고 있다.

동종심장판막의 이점은 생체에서와 동일한 혈류(central, non obstructive flow)를 이루므로, 작은 내경일 때도 뛰어난 혈역학적 기능을 갖는다. 따라서 환자의 판류내경

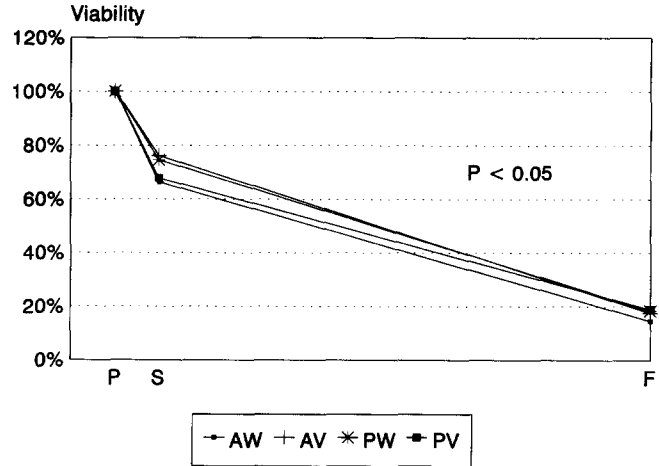


Fig. 3. Viability after fresh preservation of aortic and pulmonary valves, walls.
P; Procurement, S; Sterilization, F; Fresh preservation for 14 days, AW; Aortic wall, AV; Aortic valve, PW; Pulmonary wall, PV; Pulmonary valve.

이 작을 경우에 효과적인 크기의 판막이식이 가능하다. 또한 항혈전제를 쓰지 않아도 혈전발생의 위험이 없고 적혈구 용해율이 낮으며 심내막염에 대한 내구성이 강하다.

이와같은 장점 이외에 약 15년 이상의 내구성을 갖고 있음이 보고되고 있어서 대동맥관의 질환으로 인하여 대동맥판치환술을 요하는 환자중 연령이 낮은층과 가임기의 여성에게 사용할 수 있는 가장 이상적인 대체판막이라고 할 수 있다.

특히 선천성 심장질환으로 인하여 우심실유출로의 재건이나, 대동맥의 재건수술에 있어서 기존의 인조도관에 비하여 탁월한 이점을 갖는다.

동종심장판막은 1956년 Gordon Murray¹⁾가 대동맥판 폐쇄부전을 치료하고자 하행대동맥에 동종대동맥판을 이식한것이 사람에게 행한 최초의 임상례이다.

1962년 6월 24일 Donald N. Ross²⁾가 최초로 동종대동맥판을 사용하여 본래의 대동맥판륜 위치에 대동맥판치환술을 시행하였다. 같은해 8월에 Brian Barratt Boyes³⁾도 독자적으로 같은방법의 수술경험을 발표하였다. 이 당시의 심장판막 동종이식의 문제점은 첫째, Free hand Technique를 사용했을때 수술후 대동맥판 폐쇄부전의 빈도가 많아서 수술기법상의 어려움이 많았고 둘째, 장기공급에 문제가 있었다. 그 이후 1975년 O'Brien⁴⁾ 등이 단기간의 항생제를 사용하여 멸균후에 조직의 생육성을 보존한 채로 장기간 보존이 가능한 냉동보존(controlled rate freezing)방법을 표준화하는데 성공하여 냉동보존된 동종심장판막

Table 3. Classification of cells

Cell Type	Kind of Cells
Labile cells	· Lymphocytes, Hemopoietic cells, Spermatogonias Surface Epithelia
Stable Cells	· Galdular Epithelium, e.g., Liver, Kidney, Pancreas · Mesoderaml Cells, e.g., Fibroblast, Smooth muscles, Skeletal muscles, Osteoblast, Chondroblast, Vascular endothelium · Glial Cells
Permanent Cells	· Nerve Cells, Heart Muscle, Lens fibers

(cryopreserved aortic homograft)의 시대가 열렸다. 이 방법은 1981년에 Kirklin 등에 의하여 미국에 도입되었고, 1985년 Cryolife Co.에 의한 상업적 동종이식시대의 서막이 되었다.

이와같이 성공적인 냉동보존법이 개발되면서 장기공급이 손쉬워지고 판막은행의 실행이 가능하게 되었다. 또한 기존의 인공판막에서 내구성고 항응고제 사용이라는 문제점들이 해결되지 않고 있으며 동종판막 이식편의 장기적 내구성이 보고되면서 동종판막 이식에 대한 관심이 1980년대 중반에 들어서 고조되기 시작했다. 최근에 들어서 냉동보존방법의 개발과 함께 저농도 항생제, 여러가지 배양물질을 이용한 판막보존법등이 개발되면서 생육성을 유지하면서 판막을 장기간에 걸쳐 보존할 수 있게 되어 생육성이 극대화된 동종판막 이식의 시대가 열렸다.

생육성이 최대한 보존되는 동종판막의 보존방법이 나타나면서 이식후에도 생육성을 가지고 수혜자의 체내에서 장기간에 걸친 완벽한 기능의 수행을 기대할 수 있는 가장 이상적인 인공판막의 출현이 기대되고 있다. 이러한 생육성을 가진 판막의 출현은 특히 소아나 젊은 연령층의 환자에게 큰 도움이 될 것이다.

생육성은 세포나 조직이 정상기능을 유지하면서 스스로 생존할 수 있는 능력을 말한다. 동종판막의 생육성은 처리과정중의 여러가지 변수에 의하여 영향을 받는데 그것들은 사망에서 적출에 이르는 시간(warm ischemic time), 박리과정(procure trauma), 이송액의 구성과 온도와 시간, 보존액의 구성, 동결 및 해동방법 등이다. 그러므로 장기의 적출에서부터 보존과정을 거쳐 환자에게 이식될 때까지 여러가지의 과정과 여러종류의 보존물질들이 생육성에 미치는 영향을 객관적으로 판단할 수 있는 방법이 생육성측

정법이다.

심장판막은 세포성분과 무세포성분으로 이루어진다. 세포성분은 섬유아세포(fibroblast)와 내피세포(endothelial cell)인데 내피세포는 판막을 덮는 얇은 층을 이루고있고, 섬유아세포는 collagen, elastin, acidmucopollyssaccharide (proteoglycan) 등의 물질로 이루어진 무세포성 기질(acellular matrix)내에 존재한다. 그 중에서 내피세포는 적출 및 보존과정의 초기에서 거의 대부분이 벗겨져 나가기 때문에 보존된 판막조직의 생육성에는 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 섬유아세포가 심장판막기질(matrix)을 합성하여 유지하는 기본세포이므로 이 섬유아세포의 생육성에 대한 연구방법이 제시되고 있다5).

생육성을 측정하는 방법에는 1. 형태학적방법(morphologic study), 2. 세포증식방법(proliferation study), 3. 대사능 측정법(metabolism assay), 4. 기계적방법(mechanical assay)등이 있다. 첫째, 형태학적방법은 광학현미경에 의한 dye exclusion study로써 세포막의 보존여부를 관찰하여 세포의 사멸을 판단하는 방법이었고 전자현미경(SEM, TEM)을 이용하여 ultrastructural level의 세포손상을 판단하는 방법이었다. 그러나 dye exclusion방법은 고분자량의 냉해방지제를 사용하는 경우 죽은 세포를 살아있는 세포로 오인할 수 있다. 그 밖에 immunoglobulin staining technique을 이용하여 살아있는 세포를 염색함으로써 세포의 사멸을 판단하는 방법도 있다. 그러나 죽은 세포도 항원이 발견되며 항원이 없다고 해서 반드시 죽은 세포는 아니기 때문에 immunologic staining method도 그 정확성에 있어서 문제가 있다⁶⁾. 이와같이 형태학적인 연구방법은 정량적인 측면에서의 부정확성이라는 단점이 있지만 1차적인 검색방법으로는 흔히 쓰여지고 있다. 둘째, 세포증식방법은 collagenase나 catalase를 사용하여 기질로부터 세포(섬유아세포, 내피세포)를 분리하여 세포배양을 함으로써 세포의 재생능력을 보아 세포의 생육성을 판정하는 방법이다. 이 방법은 흔히 사용되고 있는 방법이지만 재생능력을 갖고있는 살아있는 섬유아세포가 전체판막의 얼마만큼을 접하고 있느냐는 평가할 수 없으므로 정량적(quantitative) 평가를 할 수 없는 단점을 갖는다. 또한 세포는 증식능력에 따라서 labile cell, stable cell, permanent cell로 나뉘는데 labile cell은 지속적으로 증식하는 세포이며, stable cell은 증식능력은 갖고 있지만 항상 증식을 하지는 않는 세포이고 permanent cell은 증식이 되지 않는 세포이다. 각각에 해당되는 세포의 분류는 Table 3과 같다.

따라서 stable cell인 섬유아세포가 증식이 되지 않는다고 해서 반드시 생육성을 갖지 않는다고는 볼 수 없으므로

이 방법에 의한 평가결과가 위음성으로 나타날 수 있다는 단점도 있다.

셋째, 대사능측정법 (metabolic function assess method) 으로, 방사능원소를 침착시킨 아미노산 (Methionine, Proline, glycine 등) 이나 Thymidine uptake를 측정하는 방법과 당질대사 (glucose metabolism)를 측정하는 방법이 있다. 먼저 Thymidine을 이용하는 방법은 H³-Thymidine이 DNA에 부착되는 것을 측정하는 것인데 thymidine uptake를 위하여는 활발한 세포분열에 따른 DNA 합성이 있어야 한다. 그러나 stable cell인 섬유아세포는 조직이 손상을 받았을 때의 복구를 위하여 만이 세포증식을 하고 그렇지 않은 경우는 증식을 하지 않는 채로 있기 때문에 thymidine을 이용한 방법은 적당치 않은 것으로 지적되고 있다^{7, 8)}. 그 반면에 Van der Kampo & Nuata 등이 주장한 방사성 아미노산 (radiolabeled amino acid)을 사용한 방법은 살아있는 세포가 세포구조를 유지하기 위하여 지속적으로 아미노산을 사용하고 있으므로 조직의 단백질에 흡착된 방사성 아미노산을 radioactivity counting이나 autoradiography를 사용하여 측정하는 방법으로 다른 방법에 비해 정량적 (quantitative)인 생육성평가를 할 수 있어 근자에는 많은 사람들이 이 방법을 쓰고 있는데^{5, 9)}, 방사성 아미노산으로는 반감기가 긴 Proline이나 Glycine을 주로 사용하고 있으며 radioactivity counting과 autoradiography를 병용하여서 죽은 세포와 대사능이 저하되어 있는 세포의 구별도 해낼 수 있다. 당질대사를 측정하는 방법은 살아있는 조직에 의해 소모된 당질의 양이 16 ng/dl/24 hr이상이 되면 생육성이 있다고 보는데 이 방법은 호주의 O'Brien 등에 의하여 간편화되어 있으며 정확한 방법으로 평가받고 있다^{10, 11)}.

넷째, 기계적 측정방법은 조직의 수축능 (contractility), 장력 (breaking strength), 탄력성 (elasticity) 등을 기계적으로 측정하는 방법이다.

이상과 같은 점들을 고려하여 저자는 세포의 생육성 판정법으로 대사능 측정법을 사용하였다. 대사능 측정법에는 상기한 것과 같은 여러가지 방법이 있는데 저자는 tritiated glycine을 이용한 방법을 사용하였다. 심장판막의 생화학적 구성을 보면 섬유성 단백질 (Fibrous protein)로 이루어진 collagen이 심장판막에서 가장 풍부한 단백질이다¹²⁾. 이 collagen (type I, IIIa)의 35%는 glycine이고 그 밖에 proline (25%), alanine (11%), lysine 등의 아미노산으로 구성되어 있다¹³⁾. 따라서 판막기질을 조성하는데 가장 많이 쓰이는 glycine을 측정하는 것이 섬유아세포의 대사기능 정도를 보는 가장 이상적인 방법이라고 생각한다.

결 론

저자는 동종대동맥판을 획득 및 보존처리하는 과정에서 저농도 항생제혼합액 (CLPV solution)을 사용한 멸균방법을 사용하였을 때의 멸균효과와, 4°C로 냉장보존하는 방법이 조직의 생육성에 미치는 효과를 객관적으로 평가하기 위하여 ³H-glycine을 이용한 대사능 측정법을 시행하였다.

CLPV용액의 동종동맥판에 대한 멸균효과는 모든 경우에서 완벽하였다. 즉 멸균전에 배양되었던 호기성균, 혐기성균, 진균등에 대하여 완벽한 멸균효과를 보여주었다. 그러나 4°C에서 24시간동안 멸균액에 노출됨으로 인하여 약 24~33%의 세포 생육성감소효과가 있었으며 2주일동안 4°C에서 보존된 동종동맥판이 약 15~19%의 생육성만이 보존되어 있었다. 이같은 결과는 2주일 이상 냉장보관된 신선보존 동종동맥판 (fresh allograft)이 생육성이 저하되어 있어서 장기간에 걸친 기능수행에 악영향을 미친다는 많은 학자들의 견해도 일치하는 것이다.

이상과 같은 사실을 종합해 볼 때 동종동맥판의 멸균과정에서 생기는 24~33%의 생육성손실을 최소화하기 위한 방법의 개선이 필요하며, 바이러스와 결핵균에 대한 멸균방법에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다. 또한 장기간에 걸친 생체내에서의 기능수행이 동종동맥판의 생육성을 유지하려는 궁극의 목적이므로 이에 대한 장기간에 걸친 추적평가가 병행되어야 하겠다.

References

1. Murray G. Homolous aortic valve segment transplant as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956;7:466-71
2. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962;2:487
3. Barratt-Boyes BG. A method for preparing and inserting a homograft aortic valve. *Br J Surg* 1965;52:847-56
4. Kirklin JW, Blackstone EH, Maehara T, et al. Intermediate-term fate of cryopreserved allograft and xenograft valved conduits. *Ann Thorac Surg* 1987;44:598-606
5. Van der Kamp AWM, Nauta J. Fibroblast function and the maintenance of the aortic-valve matrix. *Cardiovasc Res* 1979; 13:167-72
6. Brockbank K, Bank HL. Measurement of Postcryopreservation Viability. *J Cardiac Surg* 1987;2(suppl):145-51
7. Van der Kamp AWM, Visser WJ, Van Dongen JM, et al. Preservation of aortic heart valves with maintenance of cell vi-

- ability. J Surg Res 1981;30:47-56
8. Khan AA, Gonzalez-Lavin L. *Viability assessment of allograft valves by autoradiography.* Yale J Biol Med 1976;49:347-50
 9. Low RB, Hildebran JN, Absher PM, et al. *Comparison of the use of isotopic proline vs. leucine to measure protein synthesis in cultured fibroblasts.* Connect Tissue Res 1986;14:179-85
 10. Watts LK, Duffy P, Field RB, Stafford EG, O'Brien MF. *Establishment of a viable homograft cardiac valve Bank. A rapid method of determining homograft viability.* Ann Thorac Surg 1976;21:229-35
 11. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, et al. *A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies.* J Thorac Cardiovasc Surg 1987;94:812-23
 12. Wolfenbarger L Jr, Hopkins RA. *Biology of Heart Valve Cryopreservation.* In: Hopkins RA. *Cardiac Reconstructions with Allograft Valves.* New York:Springer-Verlag, 1989;21-33
 13. Lehninger. *Principles of Biochemistry.* New York:Worth Publishers INC. 1982;157-62
-