

## 보존된 사람 동종 복재정맥 이식편혈관 내피세포의 생활성에 관한 연구

지 현 근\* · 김 용 진\*\*

### Viability of Endothelial Cells in Preserved Human Saphenous Vein Allografts

Hyun Keun Chee, M.D.\*, Yong Jin Kim, M.D.\*\*

**Background:** Autogenous vein is the preferred vascular graft for patients who require coronary artery bypass surgery or peripheral arterial bypass surgery. When an autogenous vein is not available, an allograft saphenous vein can be used as an alternative conduit. Although arterial homograft has been under investigation since the beginning of this century, the viability of endothelial cells and the optimum mode of storage for the venous and arterial allografts is controversial. In addition, with the recently gained knowledge of vascular endothelial functions, such as the production of nitric oxide or thrombomodulin, the viability and antigenicity of endothelial cells are being studied again. The purpose of this study was to evaluate the viability of endothelial cells in the preserved human saphenous veins. **Material and Method:** The veins were stored in a 4°C RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 solution including 10% fetal calf serum, for one, three, five, seven or fourteen days. After the completion of the storage period, the veins were divided into two groups: Group I: studied immediately at 4°C (cold) storage (I-1, I-3, I-5, I-7, I-14), and Group II: studied after storage at -196°C liquid nitrogen tank (cryopreservation) in an RPMI 1640 solution containing 10% DMSO for two weeks (II-1, II-3, II-5, II-7, II-14). Light microscopy and scanning electron microscopy (SEM), trypan blue exclusion testing, and thrombomodulin immunohistochemistry were performed. **Result:** In a morphometric study using SEM, there was statistically significant increase in Gundry Score in Groups I-7, I-14, II-5, II-7, and II-14 and showed cellular destruction ( $p < 0.05$ ). In the thrombomodulin immunohistochemistry study, there was reactivity in Groups I-1, I-3, and I-5, but the cryopreserved group revealed decreased reactivity ( $p < 0.05$ ). The trypan blue exclusion testing also showed superior viability in cold storage Group I. **Conclusion:** Venous allografts preserved in a 4°C RPMI 1640 solution showed well preserved endothelial cellular integrity and thrombomodulin expression at up to seven days of preservation. Although cryopreservation of venous allografts stored in 10% DMSO -RPMI 1640 solution maintained the endothelial cellular structure on SEM, immunohistochemistry from the thrombomodulin and trypan blue exclusion testing showed decreased viability. It remains to be seen whether the decreased thrombomodulin reactivity could be restored, and what the nature to the relationship is between thrombomodulin and long-term patency of allografts.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:229-241)

**Key words:** 1. Allograft, vessel  
2. Endothelial cell  
3. Cold storage  
4. Cryopreservation  
5. Viability

\*한림대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Hallym University

\*\*서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine

논문접수일 : 2002년 11월 19일, 심사통과일 : 2003년 1월 27일

책임저자 : 지현근 (134-701) 서울특별시 강동구 길동 445, 한림대학교 강동성심병원 흉부외과

(Tel) 02-224-2243, (Fax) 02-473-8101, E-mail: cheehk@hallym.or.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

관상동맥 협착증에 있어서의 관상동맥 우회술이나 각종 말초 혈관 질환으로 인한 혈관 우회술 등에 있어서 자가 복재정맥은 동맥의 대용품으로 우선적으로 선택되는 혈관이다. 그러나 최근 들어 구미 선진국 등에서는 관상동맥 질환이나 말초 혈관 질환이 급속하게 증가하면서 관상동맥 우회술 및 말초 동맥 우회술, 또한 이들에 대한 재수술로 인하여 대체혈관이 부족한 경우가 발생하고 있다. 과거 구미에서는 1960년대부터 이미 자가 혈관의 대용품으로 동종 복재정맥을 이용한 수술이 시행되었으나<sup>1,2)</sup>, 장기간 보존에 따른 문제가 해결되지 못하고, 또한 합성도관을 이용한 수술에 비하여 장기 개통률도 탁월하지 못하여 사용을 반대하는 의견이 많았다<sup>3,4)</sup>.

그러나 동종 이식편의 보존 방법과 수술의 발달로, 냉동 보존된 동맥 판막을 이용한 개심술 성적이 매우 우수하며, 특히 이들 동종 이식편의 경우 생활성이 뛰어난 것으로 알려지고<sup>5)</sup>, cyclosporine과 같은 면역억제제가 동종 혈관 이식의 장기 개통률을 높인다는 보고가 나오는 등<sup>6)</sup>, 냉동 보존된 동종 동맥 및 동종 정맥에 대한 새로운 동물 실험 및 임상 연구가 이루어지고 있다<sup>7-9)</sup>. 또한 동종 이식편의 경우 말초 혈관 질환의 감염된 조직의 수술 등에서 자가 정맥의 대용품으로 합성도관보다 우수한 기능을 유지하는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 국내에서도 장기 이식이 본격적으로 이루어지기 시작한 이후 동종 동맥 판막을 이용한 수술은 비교적 활발하게 이루어지고 있으나<sup>11,12)</sup>, 아직까지 일부 동종 동맥 판막에 대한 동물 실험을 제외하면, 동종 동맥이나 특히 동종 정맥을 이용한 실험 및 임상은 미비한 실정이다.

혈관 내피세포는 혈액과 혈관 평활근 사이에 위치하면서 혈관 표면이 항혈전성을 유지하도록 하며, 지질단백의 대사, 혈관의 긴장도 조절 등에 직접 관여하는 일종의 기능성 장기(functional organ)로서 인정받고 있다<sup>13)</sup>. 따라서 이식된 동종 정맥이 자가 정맥과 비슷한 수준의 장기 개통률을 유지하려면 이들 동종 정맥의 혈관 내피세포의 생활성과 면역성이 매우 중요한 요소라고 할 수 있으며 동종 조직의 내구성은 이들 조직의 생활성에 직접 영향을 받는다고 하겠다<sup>7)</sup>. 세포의 생활성은 조직과 세포가 자기 기능을 유지하면서 재생할 수 있는 능력이 유지되는 상태를 말하는 것으로 동종 조직의 경우에는 적출 전후의 허혈 시간, 보존 방법, 멸균 처리 방법 등에 의해 영향을 받는다. 생활성의 평가 방법으로는 광학현미경이나 전자현

미경을 이용한 형태학적 방법, 세포나 조직의 특정 기능을 측정하는 기능적 측정 방법, 세포의 포도당 이용도 등을 검사하는 대사기능 분석법, 조직의 수축과 이완을 Organ Chamber 등을 이용하여 측정하는 기계적 분석법, 세포를 분리하여 배양하는 세포의 증식 측정 방법 등이 있을 수 있다<sup>14,15)</sup>. 동종 혈관의 이식을 위하여서는 적출한 동종 혈관의 생활성이 가장 좋을 것은 자명하나, 바로 이를 이용할 수 없을 경우 보존 처리를 하여야 하며 이를 위해 과거부터 많은 연구가 있어 왔다. 현재 비교적 좋은 임상 결과를 보이고 있는 동종 동맥 판막의 경우, 냉장 보존에서부터 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 에탄올, 냉동 건조, 글라이세롤 보존, 냉동 보존 등의 방법이 있었으며 현재 생활성과 기능성, 이용적 측면 등에서 -196°C 냉동 보존 방법이 가장 좋은 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 동종 동맥 판막의 냉동 보존 시 사용하는 용액으로는 생리식염수, 하트만 용액, Hank's balanced solution, plasmanate 등의 수액제나 M199 medium, RPMI1640, Dulbeccos' Modified Eagle Medium 등의 세포 배양액 등이 다양하게 이용되고 있다. 동종 정맥에 있어도 냉동 보존이 생활성을 유지하는데 가장 좋은 것으로 알려져 있으나<sup>7)</sup>, 연구자에 따라서는 냉동 보존 역시 혈관 내피세포의 생활성을 의심하게 하는 보고도 있다<sup>9)</sup>.

본 연구는 사람의 복재정맥을 획득하여 신선 상태에서 혈관 내피세포의 형태 및 기능을 기준으로 하여 이를 조직 배양액에 4°C 냉장 보존하였을 때 그 기간별 내피세포의 형태 및 생활성의 변화와 일정 기간 냉장 후 -196°C 냉동 보존하였을 때 그 변화를 비교 분석함으로써 냉동 보존된 동종 정맥을 이용한 혈관 우회술의 저조한 개통률의 원인을 분석하고 보존 방법에 따른 동종 정맥의 생활성을 판단하고자 하였다. 이를 위한 연구 도구로 광학현미경과 전자현미경을 이용한 조직학적 검사와 트리판 블루를 이용한 세포의 생존율 검사, 트롬보모듈린을 이용한 항응고 기능 검사 등을 시행하였다. 면역성과 관계가 깊은 혈관 내피세포의 생활성의 평가는 향후 동종 정맥편의 면역성에 대한 연구 및 임상 활용에 있어도 하나의 지침이 될 수 있을 것이다.

## 대상 및 방법

관상 동맥 협착증으로 관상동맥 우회술을 시행 받는 환자들의 복재정맥을 실험 대상으로 하였다. 관상동맥 우회술 시 6 cm의 복재정맥을 획득하여 이를 실온에서 5000

unit의 헤파린과 60 mg의 파파베린이 포함된 500 ml의 Hartman 용액에 보관하고 이 상태의 복재정맥을 대조군으로 삼았다. 실험군 복재정맥은 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, GIBCO BRL, MD, USA)에 10% 우태혈청이 포함된 4°C 조직배양액에 넣어 1일(24시간), 3일, 5일, 7일, 14일 동안 각각 8개의 6 cm의 복재정맥을 냉장 보존(cold storage)하였다. 기간별 냉장 보존이 끝나면 정맥을 반으로 나누어 이 상태의 정맥을 I군으로 정하고 이를 냉장 보존 기간별로 세분화하고(I-1, I-3, I-5, I-7, I-14), 냉장 상태에서 실험하였으며, 나머지는 RPMI 1640에 10% 우태혈청과 10% DMSO (dimethyl sulfoxide)가 포함된 용액에 넣고 Programmable Freezing System (Cryomed model 1010, Forma Scientific, USA)을 이용하여 -40°C까지는 분당 -1°C의 속도로 냉각시키고 이후 -196°C의 액화 질소 탱크(Cryomed model CMS-450A, Forma Scientific, USA)에서 2주간 냉동 보존하였다. 이후 보존된 정맥을 용기와 함께 37°C의 온수에서 급속 해동한 후 DMSO의 농도를 10%에서 7.5%, 5%, 2.5%, 0%로 낮추는 4단계 희석 과정을 거쳐 II군으로 정하고 I군과 마찬가지로 냉장 보존 기간에 따라 세분화(II-1, II-3, II-5, II-7, II-14)하여 실험하였다.

### 1) 광학현미경 검사

0.5 cm 길이의 복재정맥을 10% 포르말린 용액에 고정시킨 후 종단면과 횡단면 2개의 표본으로 제작하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시한 후 광학현미경으로 혈관 내피세포의 형태, 세포층의 탈락 여부, 손상 등을 관찰하였다.

### 2) 전자현미경 검사

0.5 cm 길이의 복재정맥 표본을 4% 글루타르알데하이드 용액으로 고정시킨 후 탈수 과정을 거쳐 주사 전자현미경(S2500, Hitachi, Japan)과 투과 전자현미경(EM109 model, Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

주사 전자현미경으로는 세포의 모양과 구조, 혈관 내피세포의 유무 및 형태, 내막의 손상 여부, 혈관 내피세포의 얇아진 정도, 세포 격리 정도, 기저막 등을 관찰하였고, 특히 혈관 내피세포의 손실(cell loss) 정도, 세포의 분리(cell separation) 정도, 기저막의 노출 정도와 교원질의 노출 정도 등 4개 부분에서의 손상된 정도에 따라 Gundry 등(1980)이 제시한 0~4 등급(scale)으로 세분화하여 정도화(grading)하였으며 이는 보존에 따른 내피세포의 손상을

평가하는 수 값으로 이용되었다<sup>16)</sup>.

손상 정도 0 : 손상이 없음

1 : 손상이 10% 미만에서 관찰됨

2 : 손상이 10~25%에서 관찰됨

3 : 손상이 25~50%에서 관찰됨

4 : 50% 이상의 손상이 있음

투과 전자현미경으로는 혈관 내피세포의 형태, 핵과 세포질의 온전한 정도를 관찰하였다.

### 3) 트롬보모듈린(Thrombomodulin)의 면역조직화학적 검사

트롬보모듈린은 트롬빈 수용체(thrombin receptor)로서, 트롬빈 형성을 억제하는 역할을 한다. 즉 단백질 C (protein C)의 활성화가 증가되고, 활성화된 단백질 C가 응고요소 Va와 VIII에 작용하여 트롬빈을 procoagulant에서 anticoagulant로 변화시켜 트롬빈 형성을 억제하게 된다. 따라서 트롬보모듈린의 면역조직화학 검사에 염색이 된다는 것은 내피가 항응고 기능을 한다는 것을 의미하는 것으로 생활성을 보유하고 있다고 판단된다<sup>17)</sup>.

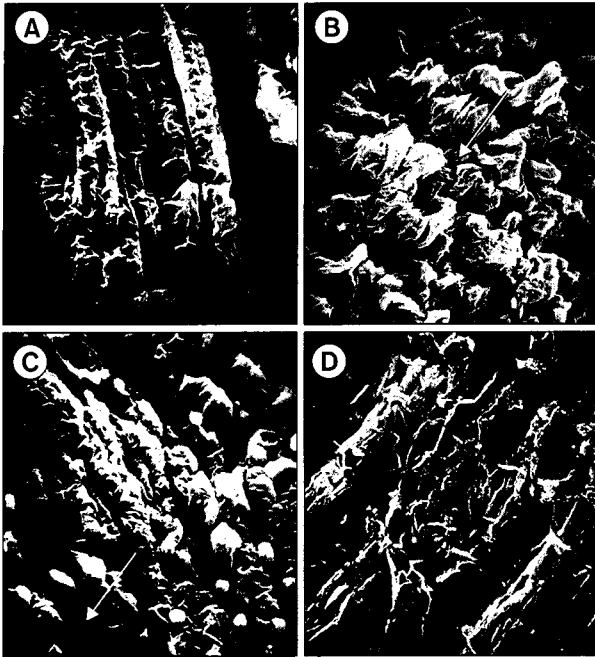
0.5 cm의 복재정맥 표본을 10% 증성 포르말린 용액에 고정시킨 후 24시간 이내에 파라핀에 포매시켰다. 파라핀 포매조직에서 5 μm 두께의 절편을 얻은 후, 60°C 건조기에서 60분간 말리고, xylene에 3분씩 4회 넣어 탈 파라핀 과정을 거친 후 알코올(absolute alcohol)에 2회, 90% 알코올에 2회, 80% 알코올에 1회, 70% 알코올에 1회씩, 각 2분간 처리하여 탈수시켰다. 증류수로 3번 씻은 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 15분간 두어 내인성 peroxidase의 작용을 억제시켰다. 정상 염소혈청으로 30분간 반응시켜 비특이성 반응을 없앤 후 1차 항체(monoclonal mouse anti-thrombomodulin antibody (DAKO patts, Glostrup, Denmark)를 작용시켜 4°C에서 24시간 두었다. 이후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)으로 5분 동안 세 번 씻고, 2차 항체인 peroxidase-labelled streptavidin anti-mouse immunoglobulin으로 30분간 반응시킨 후 PBS로 씻고, 3-DAB (3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색시켰다. 이후 수돗물로 씻고 Mayer Hematoxylin에서 1~2분간 대조 염색하였다.

관찰 결과는 염색되는 반응성 세포(reactive cell)들의 %로 Grade 0부터 Grade 3까지 아래와 같이 분류하였다.

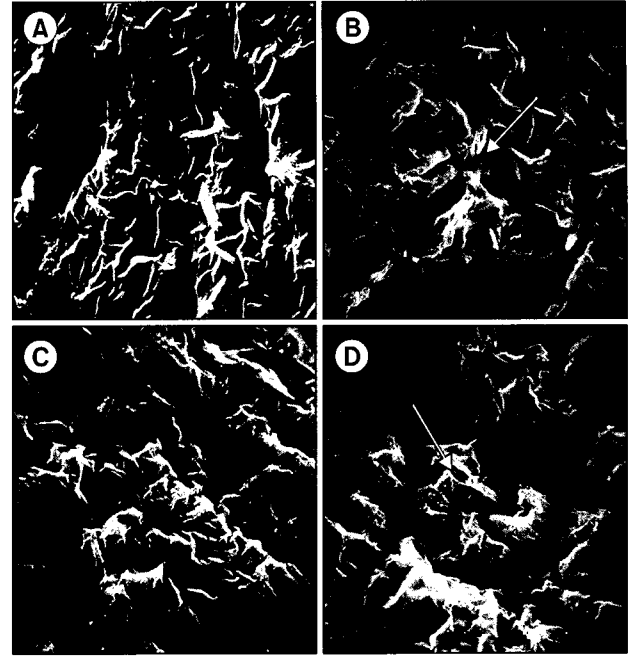
Grade 0 : 염색되는 반응성 세포가 전혀 없음

Grade 1 : 염색되는 반응성 세포가 10% 미만에서 관찰됨

Grade 2 : 염색되는 반응성 세포가 10% 이상



**Fig. 1.** Scanning electron microscopic findings of 4°C preserved veins (original magnification  $\times 2000$ ); A) Vein preserved for 5 days shows good maintenance of endothelial cells with intact intercellular connections; B) Vein preserved for 7 days shows mild cell separation and destruction; C) Vein preserved for 14 days shows increased areas of cell separation and destruction; D) Vein preserved for 21 days severe cellular destruction and exposed basement membranes and fibrillar collagen.



**Fig. 2.** Scanning electron microscopic findings of cryopreserved veins (original magnification  $\times 2000$ ); A) Vein of 1 day cold storage shows good maintenance of endothelial cells with intact intercellular connections; B) Vein of 5 days cold storage shows cellular destruction and exposed collagen fibers (arrow); C) Vein of 7 days cold storage shows increased areas of cell separation and destruction; D) Vein of 14 days cold storage shows increased area of endothelial loss and exposed basement membranes.

50% 미만에서 관찰됨

Grade 3 : 염색되는 반응성 세포가 50% 이상에서 관찰됨

#### 4) 트리판 블루 배제 검사(Trypan Blue Exclusion Test)

20 ml의 용기에 종으로 절개한 1.5 cm 길이의 복재정맥 표본을 넣고 294 u/ml의 Collagenase (CLS II, Worthington), 2 mg/ml의 bovine serum albumin (Fraction V, Sigma), 1 mg/ml의 soybean trypsin inhibitor (SI, Worthington), 0.4 mg/ml의 deoxyribonuclease I (Type IV, Sigma)가 포함된 2 ml의 분산 용액을 넣는다. 이 용기를 37°C 진탕 수조 (shaking water bath)에서 1시간 동안 가온시켜 분산층을 만든다. 최상층이 내피세포층이고 아래층은 근육 세포와 섬유아 세포층이 되어 최상층을 실험에 이용하였다<sup>9)</sup>. 살아있는 세포의 경우 세포막이 불투과성이므로 색소가 침투되지 않아 염색이 되지 않으나, 죽은 세포의 경우는 트리

판 블루에 푸른색으로 염색이 된다. 0.6% 트리판 블루 0.01 ml과 세포현탁액 0.01 ml을 1 : 1로 잘 혼합하여 3분간 기다렸다가 혈구계산판(Neubauer chamber)에 채우고 염색된 세포와 염색되지 않은 세포 수를 계산하였다. 세포 생존율은 전체 세포 수에 대한 살아있는 세포 수의 백분율로 표시하였다.

#### 5) 통계처리

냉장 보존군(I군)과 냉장 후 냉동 보존군(II군) 간 정도 비교를 위하여 Mann-Whitney U test 분석법을 사용하여 그룹별로 관찰하였다. 각 군 내에서 보존 기간별 정도의 비교는 Wilcoxon signed-rank test를 사용하였으며, 보존 기간과 세포 생존율과의 상관 관계는 Pearson Correlation을 사용하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 로 하였다.

**Table 1.** Damage scores by scanning electron microscopy in 4°C preserved group (group I)

Group I	Control	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	21 days
Endothelial separation	1.01±0.0	1.1±0.4	1.4±0.5	1.6±0.5	2.3±0.5	3.1±0.4	4.0±0.0
Endothelial loss	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.4	1.3±0.5	2.1±0.6	3.1±0.4	3.9±0.4
Exposed BM	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.4	1.1±0.6	2.0±0.0	3.8±0.4
Exposed collagen	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.4	0.8±0.5	1.0±0.0	0.8±0.5
Total scores	2.0±0.0	2.2±0.4	2.6±0.7	3.0±0.9	6.3±1.6	9.3±0.5	15.6±0.7
p value	NS	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05	

Damage score: 0=no change; 1=less than 10%; 2=10~25%; 3=26~50%; 4=more than 50% of vein involved.; control=fresh veins; "day" in the first row means the period of 4°C preservation

BM, basement membrane; NS, not significant

Wilcoxon signed-rank test was used for statistical analysis of total scores in the group.

**Table 2.** Damage scores by scanning electron microscopy in cryopreserved group (group II)

Group II	Control	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days
Endothelial separation	1.01±0.0	1.1±0.4	1.1±0.4	2.6±0.5	3.5±0.5	3.1±0.6
Endothelial loss	1.0±0.0	1.1±0.4	1.4±0.5	2.6±0.5	3.6±0.5	3.1±0.6
Exposed BM	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.5	1.4±0.5	2.3±0.5	3.0±0.6
Exposed collagen	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.5	2.1±0.4	2.8±0.9
Total scores	2.0±0.0	2.3±0.5	3.1±1.0	7.3±1.6	11.5±0.8	12.0±0.6
p value	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05	

Damage score: 0=no change, 1=less than 10%, 2=10~25%, 3=26~50%, 4=more than 50% of vein involved control=fresh veins

"day" in the first row means the period of 4°C preservation before cryopreservation

BM, basement membrane; NS, not significant

Wilcoxon signed-rank test was used for statistical analysis of total scores in the group.

## 결 과

### 1) 형태학적 검사

대조군의 경우 혈관 내피세포층이 잘 발달되어 있었으며 수술 중 손상으로 추정되는 일부분을 제외하고는 내피세포층이 떨어져 나간 곳이 거의 없었다. I군(냉장 보존군)의 경우 보존 7일까지 대조군과 비교하여 눈에 띄는 차이가 없었으며 보존 14일째부터는 광학현경상 내피세포가 없는 곳이 많았으며 보존 21일, 28일 째는 정맥 표면의 1/2 이상에서 내피세포가 존재하지 않았다. 또한 세포질 내의 공포(vacuole)가 자주 관찰되었다. II군(냉장 후 냉동 보존군) 역시 I군과 비슷한 정도로 정맥 내피층이 보존되어 있었으나 세포질 내의 공포가 좀 더 자주 관찰되었

다. 그러나 광학현미경상 두 군의 특별한 차이를 발견하기는 어려웠다.

### 2) 전자현미경 검사

주사 전자현미경으로 관찰한 대조군 혈관 내피세포는 난 원형의 모양으로 볼록 튀어나오는 듯한 모습으로 잘 유지되고 있었으며 내피세포 사이의 연결이 잘 유지되어 있고 교원질이나 기저막이 노출된 곳은 관찰할 수 없었다. 이에 반하여 예비 실험에서 관찰한 21일간 냉장 보존한 복재정맥의 경우에는 세포의 탈락, 교원질의 노출, 기저막의 노출 또는 파괴 등의 심한 세포 손상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-D).

Gundry 등<sup>16)</sup>이 제시한 방법으로 각 군의 보존 기간별 혈관 내피세포의 형태학적 차이(세포 손실, 세포 분리, 교

**Table 3.** Results of scanning electron microscopy, thrombomodulin immunohistochemistry and trypan blue exclusion test in 4°C preserved group (group I)

Group I	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	Control
SEM	2.2±0.4	2.6±0.7	3.0±0.9	6.3±1.6	9.3±0.5	2.0±0.0
TMI	2.5±0.8	2.3±0.9	2.6±0.7	1.4±0.7	0.8±0.5	2.9±0.4
TB (%)	80.6±8.4	72.7±4.9	59.4±7.4	42.4±6.3	28.9±9.0	84.3±6.8

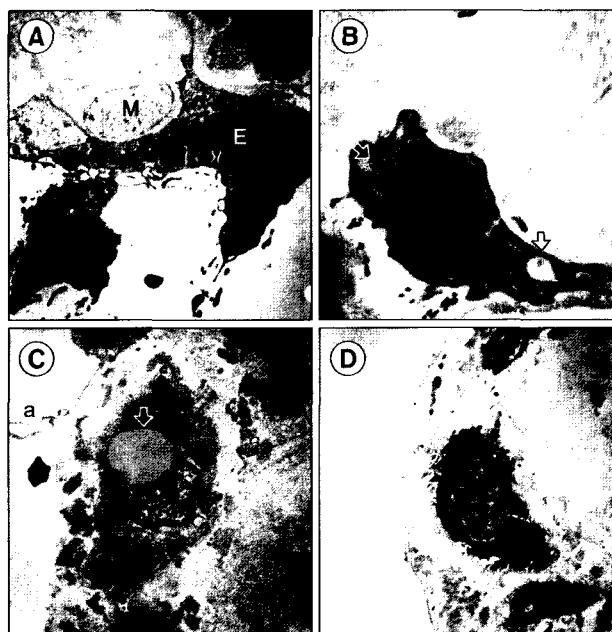
Control, fresh vein; SEM, scanning electron microscopic damaging scores (see Table 1); TMI, grading of thrombomodulin immunohistochemistry; Grade 1, less than 10%; Grade 2, 10~50%; Grade 3, more than 50% of reactive cells. TB (%), percent of survival cells by trypan blue exclusion test

원질 노출, 기저막 노출)를 관찰하고 이를 등급화하였다 (Table 1, 2, 3). I군(냉장 보존군)의 경우 대조군과 비교하여 보았을 때, 냉장 보존 1일부터 5일까지는 통계학적으로 유의한 변화 없이( $p>0.05$ ) 내피세포가 잘 보존되어 있었으나(Fig. 1-A), 냉장 보존 7일째부터는 통계학적으로 유의한 수준( $p\leq 0.039$ )의 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-B). 전체적으로 보존 기간 14일 까지 50% 이상의 내피세포의 손상은 보이지 않았으나, 21일간 냉장 보존한 정맥의 경우에는 상기한 대로 50% 이상의 심한 손상이 있었다(Table 1, Fig. 1-C, 1-D). 한편 II군(냉장 후 냉동 보존군)의 경우 냉장 1일, 3일 후 냉동 보존한 정맥의 내피 세포는 비교적 잘 보존되어 있었으나(Fig. 2-A), 5일간 냉장 후 냉동 보존한 II-5부터 형태학적 변화가 의미 있었다 (Fig. 2-B). 냉장 보존 기간이 길수록 냉동 시 더 많은 세포의 손상이 보였다(Table 2, Fig. 2-C, 2-D). I군과 II군을 비교하였을 때, 냉장 기간이 5일 이상 지난 경우 냉동 보존 시 통계학적으로 유의( $p\leq 0.0003$ )한 변화가 있었다(Table 3). 한편 II군의 경우 I군에 비해 냉동 및 해빙 과정에서 생긴 동결 crackle이 일부 정맥에서 보였다.

투과 전자현미경 검사에서 대조군에서 각개의 내피세포의 모양을 잘 관찰할 수 있으며 그 밑에 여러 층의 평활근 세포를 볼 수 있었다. 냉장 보존 7일째까지 Weibel-palade body 등의 미세 세포 구조 등이 잘 유지되고 있었으며 냉동 보존의 경우에는 냉동 및 해빙 과정의 손상으로 보이는 vacuole 등을 자주 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

### 3) 트롬보모듈린 면역조직화학검사

트롬보모듈린 면역조직화학검사서 I군의 경우 냉장 보존 5일군까지는 모두 grade 2 이상의 반응을 보여 항응고 기능이 유지됨을 알 수 있었다(Table 3, Fig. 4, 5). 그러나 II군의 경우에는 모든 정맥 내피세포가 10% 미만의 반



**Fig. 3.** Transmission electron microscopic findings of preserved veins; A) Control vein; well preserved endothelial cells and smooth muscle cells; B) 4°C preserved vein for 3 days shows typical Weibel-palade bodies in cytoplasm (black arrow); C) Cryopreserved vein of 7 days cold storage shows large vacuole in cytoplasm (arrow); D) This shows relatively well preserved endothelial cell of cryopreserved vein after 7 days cold storage (original magnification  $\times 7000$ ).

응성 세포를 나타내는 grade 1 이하였으며 그 반응 염색 정도도 미약하였다(Table 4, Fig. 6). 한편 맥관벽 혈관(vasa vasorum)의 경우에는 냉동 보존군에서도 일부 염색 반응이 나왔다.

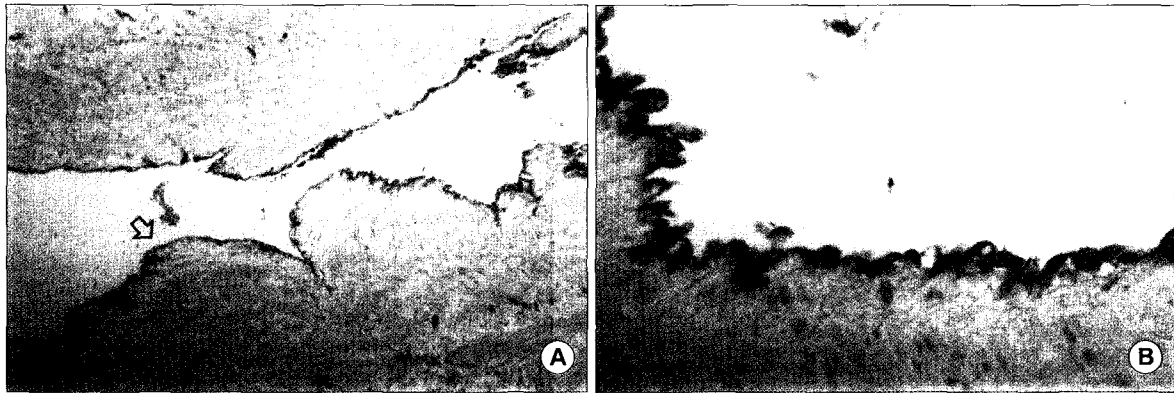


Fig. 4. Thrombomodulin immunohistochemical staining of 4°C preserved veins for 1 day; A) Endothelial cells are stained dark brown. White arrow shows small area of endothelial loss which are not stained (original magnification  $\times 100$ ); B) Endothelial cells are prominent and well stained with dark brown (original magnification  $\times 200$ ).

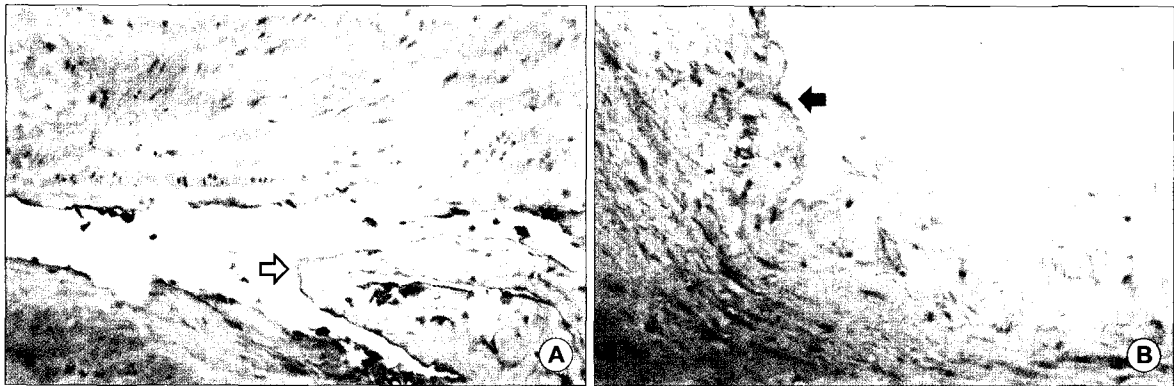


Fig. 5. Thrombomodulin immunohistochemical staining of 4°C preserved veins (original magnification  $\times 200$ ); A) Vein preserved for 3 days shows dark brown staining of endothelial cells and valvular endothelial cells (white arrow); B) Vein preserved for 14 days shows loss of endothelium. Scanty areas are stained brown (black arrow).

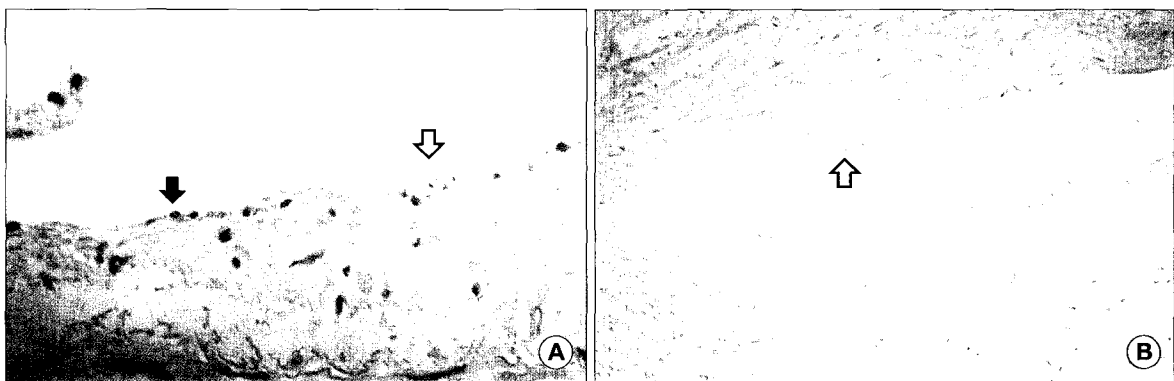


Fig. 6. Thrombomodulin immunohistochemical staining of cryopreserved vein; A) Vein cryopreserved after 3 day cold storage shows intact endothelial cells. But these endothelial cells are not stained for brown (black arrow). White arrow shows vacuole of damaged endothelium (original magnification  $\times 100$ ); B) Vein cryopreserved after 7 day cold storage shows decreased endothelial cell number. There are no area of brown stain (original magnification  $\times 200$ ).

**Table 4.** Results of scanning electron microscopy, thrombomodulin immunohistochemistry and trypan blue exclusion test in cryopreserved group (group II)

Group II	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	Control
SEM	2.3 ± 0.5*	3.1 ± 1.0*	7.3 ± 1.6	11.5 ± 0.8	12.0 ± 0.6	2.0 ± 0.0
TMI	0.8 ± 0.9	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.7	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.5	2.9 ± 0.4
TB (%)	23.7 ± 5.9	17.3 ± 2.1	13.8 ± 8.5	9.0 ± 6.1	3.8 ± 4.8	84.3 ± 6.8

SEM, scanning electron microscopic damaging scores (see Table 2); TMI, grading of thrombomodulin immunohistochemistry; Grade 1, less than 10%; Grade 2, 10~50%; Grade 3, more than 50% of reactive cells. TB (%), percent of survival cells by trypan blue exclusion test

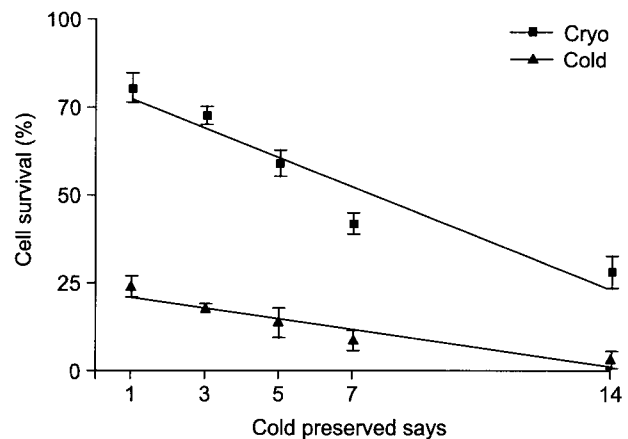
\*, No significant differences between group I and group II by Mann-Whitney U test.

#### 4) 트리판 블루 배제 검사

Collagenase 등의 효소를 이용하여 추출한 혈관 내피세포에 트리판 블루를 반응시켜 염색을 한 후 3분경에 혈구계산판에서 세포를 관찰하고 각 세포의 생활성을 보았다. 살아 있는 세포는 트리판 블루에 염색이 되지 않았으며, 죽은 세포들은 푸르게 염색이 되었다. I군의 경우에서 냉장 5일까지 평균 60% 이상의 생존율을 보였으나 7일째부터는 50% 미만으로 저하되었으며, II군에서의 세포 생존율은 냉장 1일째 냉동한 II-1만이 20% 이상의 생존율을 보였을 뿐 나머지는 모두 10%대의 저조한 생존율을 나타냈다(Table 3, 4). 이들 내피세포의 생존율을 냉장 보존 기간별로 correlation을 살펴보았을 때, I군의 경우에는 -0.9556, II군의 경우에는 -0.9486의 correlation이 있었다(Fig. 7).

### 고 찰

최근 국내에서도 급격히 증가하고 있는 관상동맥 질환으로 관상동맥 우회술이 해마다 늘어나고 있는 실정이다. 특히 서구화된 식생활과 흡연, 고혈압, 당뇨병 등 폐쇄성 혈관 질환의 위험 요소가 점차 증대됨으로써 환자들의 발병 연령도 점점 낮아지는 추세이고 이는 곧 고령에서의 재수술이 필요한 환자수의 증가와 연결될 것이다. 실제 미국에서는 폐쇄성 혈관 질환이나 관상동맥 질환으로 재수술을 받는 환자가 20% 정도를 차지한다고 한다. 재수술을 받는 환자의 경우 흔히 자가 혈관이 부족하게 되고 대체 이식편이 필요하게 된다. 20세기 초반부터 구미에서는 폐쇄성 혈관 질환의 치료에 있어서 동종 혈관을 대체 혈관으로 이용하고자 하는 노력이 이어져 왔다<sup>18)</sup>. 그러나 혈



**Fig. 7.** Endothelial cell survival rate along the 4°C preserved period in group I and group II. This graph shows decreasing tendency of cell survival along the cold preserved periods in both groups.

액 투석을 위한 동정맥류의 높은 개통률을 제외하면<sup>19)</sup>, 조기 폐쇄, 동맥류의 형성, 파열, 혈관 벽의 석회화 등 저조한 혈관 이식의 임상 성적으로 인하여 혈관 수술은 동종 이식보다는 합성도관으로 방향을 선회하게 하였다. 그러나 합성도관 역시 조기 폐쇄나 퇴행성 변화, 석회화 등의 문제에서 자유롭지 못하고 작은 내경의 혈관이나 감염된 조직에서의 사용에 제한이 있어 그 관심은 다시 동종 혈관으로 돌려지게 되었다.

O'Brien 등<sup>5)</sup>은 냉동 보존된 동종 동맥 판막을 이용하여 좋은 결과와 냉동 보존된 조직의 생활성을 강조한 바 있고, Brockbank 등<sup>7)</sup>은 냉동 보존된 동종 혈관 이식에서도 과거에 비해 높은 개통률과 조직의 생활성을 주장하면서 동종 혈관, 특히 동종 복재정맥에 대한 관심이 다시 증가



하게 되었다. 그러나 동종 혈관의 경우는 동종 동맥 판막과는 달리 혈관 내피세포의 존재 및 생활성, 면역성 등이 보다 중요한 의미를 갖는다. 동종 동맥 판막의 경우 냉동 보존 시에도 섬유아세포는 비교적 높은 생존율을 보이나, 내피세포의 경우 과거에는 냉동 보존시 생존율이 80% 이상 유지된다는 연구도 있었으나<sup>15)</sup> 최근의 연구 결과를 보면 단지 20% 내외의 저조한 생존율을 보고하고 있다<sup>20)</sup>. 즉 동종 동맥 판막의 경우에는 장기간 냉장 보존하거나 혹은 냉동 보존하더라도 섬유아세포의 생활성은 유지되고 내피세포의 생활성이 떨어지더라도 동맥 판막으로서의 기능 유지에 별다른 영향이 적다고 판단할 수 있다. 오히려 내피세포의 생활성 저하가 이들의 항원성 약화를 가져와 동맥 판막의 퇴행성 변화를 저하시키는 역할을 하고 섬유아세포가 조직의 내구성을 유지하는 데 도움을 줄 것이라는 보고도 있다<sup>21)</sup>. 그러나 동종 정맥의 경우에는 동맥 판막과는 그 조직 성분과 기능에 차이가 있어 혈관 내피세포의 생활성이 도관으로서의 기능-즉 항응고 기능이나 혈관 긴장도의 조절-등을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>13,22)</sup>.

동종 정맥의 장기적 개통률을 위하여 전제되는 가장 큰 조건은 혈관 내피세포를 포함한 조직의 생활성 유지와 어떻게 이들의 항원성을 억제하여 면역반응을 최소화하는가라는 문제일 것이다. 그러나 현재 각종 장기 이식이 활발해지고 cyclosporine과 같은 면역억제제가 사용되면서 면역반응의 억제는 실제로 많은 진전을 이루어 성공적인 장기 이식이 이루어지고 있다<sup>23)</sup>. 그러나 조직의 생활성 문제는 혈관 내피세포의 항응고 기능이나 손상된 조직의 회복 능력, 동맥류 형성의 방지, 섬유소 용해 기능, 감염된 조직에서의 내구성 등과 직접 관련되어 동종 정맥이 도관으로서 장기 개통과 밀접한 관계를 갖는 아주 중요한 요소이다. 실제로 이들의 대한 형태학적인 연구는 많았으나 연구마다 서로 다른 결과를 보이고 있으며 이들 이용에 대한 견해도 연구자마다 서로 다르게 보고되고 있어 이를 해석하는 데 많은 곤란을 주고 있다. 국내에서는 아직까지도 사체 훼손(毀損) 등의 이유로 장기이식에 대한 일반적인 부정적 인식이 많고 이식 자체가 시작 단계이지만 불과 6~7년 전에 시작된 동종판막의 임상이용이 현재 매우 활발하게 진행되는 등 현재 발달하고 있는 의학의 수준을 고려하면 비록 제한된 예이겠지만 동종혈관을 이용한 혈관우회수술도 임상 예가 나올 것이다. 앞에서 언급한 바와 같이 동종 혈관의 이용이 구미에서는 다시 늘어나고 있으며 특히 폐쇄성 말초 혈관 질환의 경우 과거에 비해

좋은 성적이 발표되고 있어<sup>23,24)</sup>, 이를 임상에 이용하기 위한 연구가 필요하다고 생각되었다. 국내에서는 송현에 의하여 한국산 잡견을 이용한 동종 동맥 및 동종정맥의 이식 실험을 시도한 것이 거의 첫 시도였으며 트롬보모듈린을 이용한 동종 이식편의 개통률 및 생활성 평가는 외국에서도 드문 상태여서 의미가 있으나<sup>8,17)</sup> 보존 방법 및 이식 기간별 실험군의 수가 너무 작고 이식편의 길이가 너무 짧아 일반화하는 데는 무리가 있다. 본 연구는 사람의 복재정맥을 사용하였으므로 연구 결과를 직접 임상에 적용할 수 있으리라 생각한다. 특히 단기간 냉장 보존된 동종 정맥과 장기간 냉장 보존된 동종 정맥 그리고 냉동 보존된 동종 정맥간의 형태학적, 기능적 차이나 생활성의 차이를 밝히고 이를 기왕에 연구된 동종 동맥 판막이나 동종 동맥 등의 생활성과 조직학적 특징과 비교 분석한다면 향후 관상동맥 우회술의 재수술 등과 같이 자가정맥이 부족한 경우 어떠한 도관을 선택할 것인지 결정할 때 유용하리라 생각되며, 또한 우리나라와 같이 상업적으로 냉동 보존된 동종 정맥이 없는 곳에서 살아있는 공여자의 정맥 이식을 시도하는 데 학문적 근거로 활용할 수 있으리라 생각한다.

본 연구결과를 살펴보면 보존 기간에 따른 혈관 내피세포의 형태학적 변화는 냉장군이나 냉장 후 냉동군에서 모두 50% 이상의 내피세포의 손상은 없어 14일 이상의 장기간의 냉장 보존만 피한다면 내피의 구조를 유지하는 데 큰 문제가 없어 보이며 이는 Weber 등<sup>25)</sup>이 동종 정맥의 보존에 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 처음 이용한 이래 액화 질소를 이용한 냉동 보존 방법이 신선 정맥이나 단기간의 냉장 보존 방법과 대등한 보존 방법이며 글루타알데하이드나  $-60^{\circ}\text{C}$  냉동 보존보다 훨씬 우수하다는 기존의 연구 결과와 일치한다<sup>7,14)</sup>. 그러나 전자현미경을 이용하여 좀 더 자세하게 내피세포의 구조와 손상을 세분하였을 때에는 각 보존군 및 보존 기간별로 의미 있는 차이를 발견할 수 있었는데 특히 7일 이상의 냉장 보존이나 5일 이상의 냉장 후 냉동 보존군에서 대조군과 비교하여 의미 있는 차이를 보였다. 혈관 내피세포의 형태학적 유지만으로 조직의 생활성을 평가할 수는 없다. 연구자에 따라서는 오히려 기저막과 교원질의 유지가 더 중요하며 혈관 내피세포가 없어져야 면역 반응이 없이 이식편의 장기 개통률이 유지될 수 있으므로 장기간 냉장 보존이 가장 우수하다고 주장하기도 하나<sup>22)</sup> 이는 일반적으로 받아들여지는 주장이라고 할 수 없다.

실제 면역 반응이 얼마나 장기 개통률과 관계가 있을

것인가는 동종 정맥 이식의 초기부터 계속 논란이 되어왔던 문제이다. 많은 동물 실험과 임상에서 혈관 내피세포의 항원성으로 인한 면역 반응이 증명되었으며<sup>4)</sup>, 동맥이 정맥에 비하여 강한 항원성을 보유하고 있다고 한다<sup>26)</sup>. 그러나 ABO 혈액형 일치나, azathioprine, cyclosporine 등 면역 반응을 억제하기 위한 노력이 이식 혈관의 개통률에 영향을 못 미친다는 주장과<sup>24,27,28)</sup>, 혈액형 일치가 중요하며 cyclosporine과 같은 면역 억제제의 사용으로 개통률이 증가하거나 이식 혈관의 구조적 유지에 좋은 영향을 미친다는 연구 결과가 상존한다<sup>3,6,29,30)</sup>. 그러나 da Gamma 등<sup>23)</sup>이 면역 억제제를 투여 받아야 하는 장기 이식 환자에서 냉동 보존된 동종 동맥을 이용하여 폐쇄성 혈관 질환에 이용한 연구를 보면 강력한 면역억제제의 사용이 이식혈관의 개통률에 영향을 미칠 것이라고 추론할 수 있겠다.

세포의 생활성을 직접 관찰하는 방법의 하나로 세포를 직접 배양하거나<sup>8,14)</sup>, 아니면 세포 하나 하나의 생존 여부를 보는 방법이 있다<sup>9)</sup>. 그러나 세포 배양의 경우 정량적 측정이 어렵고 2세대, 3세대 배양으로 갈수록 바이어스가 생기게 된다. 본 연구에서는 collagenase와 trypsin 등의 효소를 이용하여 혈관에서 내피세포를 추출하는 방법을 사용하였다<sup>29)</sup>. 이들 추출된 세포는 세포 배양을 위하여 사용 가능하나 본 연구에서는 세포 현탁액을 동량의 트리판 블루에 반응시키는 트리판 블루 배제 검사(trypsin blue exclusion test)를 이용하였다. 트리판 블루는 살아있는 세포막은 침투하지 못하므로 직접적인 세포 생존도를 알 수 있다. 이 검사에서 냉장 5일까지는 평균 60% 이상의 생존도를 보였으나 냉장 7일 이상 보존군과 냉장 후 냉동보존군은 40% 이하의 낮은 생존도를 보였다. 냉장 보존의 경우 냉장 보존기간이 길어짐에 따라 세포 생존도가 감소함을 알 수 있었고, 냉동 보존의 경우 상당한 세포의 생존도 감소를 볼 수 있었는데 이는 냉동과 해빙 과정을 거친 혈관 내피세포에 다시 한번 효소 분해라는 작용을 거치게 함으로써 그 결과가 확대 해석될 수 있음을 생각할 수 있다. 그러나 Bilfinger 등<sup>9)</sup>이 5%의 세포만이 트리판 블루에 염색되지 않는다고 한 결과는 본 연구와도 유사하다. 한편 이러한 세포의 추출은 향후 동종 정맥의 혈관 내피세포의 면역성에 관한 연구로도 이어질 수 있을 것이다.

혈관 내피세포의 기능이 점점 밝혀지면서 endothelin, laminin, E-selectin, prostacyclin, thrombomodulin, nitric oxide 등 여러 가지 물질이 분비됨이 밝혀지고 있으며<sup>31)</sup>, 조직 내 효소 활성도나, fibrinolytic activity, prostacyclin이나, nitric oxide 등을 측정하는 방법이 제시되었다<sup>9,31)</sup>. 이중 트

롬보모듈린(thrombomodulin)은 무게 75 kDa의 표면 당단백질로서 트롬빈 수용체(thrombin receptor) 역할을 한다. 즉 트롬빈(thrombin)이 수용체인 트롬보모듈린에 결합하면 단백질 C (protein C)의 활성화가 1000배 정도 증가되고, 활성화된 단백질 C는 응고요소 Va와 VIIIa에 작용하여 트롬빈 형성을 억제한다<sup>32)</sup>. 따라서 트롬보모듈린의 면역조직화학 검사에 염색이 된다는 것은 내피가 항응고 기능을 한다는 것을 의미하는 것으로 생활성을 보유하고 있다고 판단된다<sup>8,17)</sup>. 본 연구에서도 이와 같은 방법을 이용하여 내피세포의 생활성을 평가하는 한 방법으로 트롬보모듈린을 이용한 면역조직화학 검사를 이용하였다. 이 결과 형태학적으로 문제가 없어 보였던 냉동 보존한 동종정맥에서 그 활성도가 급격히 저하됨을 관찰할 수 있었다. 이는 물론 본 연구 결과로 이들 냉동 보존한 동종 정맥의 생활성이 영구히 없어진 것인지 아니면 냉동과 해빙 과정을 거치면서 일시적으로 기능이 저하된 것인지를 알 수는 없지만, 냉동 보존 후 이식한 혈관이 항응고 기능이 매우 저하되어 있으며 이것이 저조한 개통률에도 영향을 끼칠 수 있음을 시사하는 결과라고 할 것이다. 즉 혈관 내피세포의 손상과 트롬보모듈린 활성도의 저하는 혈관 내피 및 내피하 기질이 지속적인 친응고성 물질에 노출되고 결국 혈관 폐쇄에 결정적인 영향을 미치게 될 것이다. Bambang 등<sup>8)</sup>은 그들의 연구에서 신선 정맥에 비하여 냉동 보존한 정맥에서 내피세포의 수가 1/2로 줄었음을 관찰하였는데 이는 본 연구 결과와도 일치한다고 하겠다.

냉장 보존 방법은 획득과 보존이 비교적 용이하고 조직의 생활성과 구조적 유지, 감염된 부분에서도 사용 가능한 점 등이 장점이지만 내피세포의 항원성 문제 등으로 장기 개통률에서 의문이 제기되어왔다. 한편 냉동 보존 방법은 획득의 용이성과, 사용 전 조직적합성 여부의 확인, 세균 오염 여부의 사전 규명 등에서 냉장 보존 방법보다 유리하지만, 역시 항원성으로 인한 면역 반응과 장기 개통률에 있어서는 냉장 보존 방법과 다를 바 없고 세포의 구조적 유지에 비하여 생활성에 의문이 제기되고 있다. 현재도 많은 냉장 보존된 동종 혈관이나 냉동 보존된 혈관의 동종 이식이 이루어지고 있으며 건강한 정맥의 적출, 정맥의 적출이나 이식과정에서 섬세한 수술 술기, 안정된 혈관 보존 방법, cyclosporine 등의 면역 억제 요법, 아스피린 같은 항혈소판 제제 투여 등의 도움으로 동종 이식의 개통률은 점차 개선되고 있다<sup>6,7,28,29)</sup>. 그러나 냉동 보존된 동종 정맥의 생활성이 좀 더 정확히 파악되고 혈관 내피세포의 항원성 해결에 대한 노력이 계속 이루어져

야 할 것이다.

## 결 론

사람의 복재정맥을 4°C 냉장 보존 및 냉장 후 -196°C 냉동 보존의 두 가지 방법으로 보존하고 이를 다시 보존 기간별로 구분하여 동종 정맥의 혈관 내피세포에 대한 이식전(移植前) 생활성을 알아보았다. 4°C 냉장 보존한 I군의 경우 주사 전자현미경에서 7일째부터 혈관 내피세포에서 부분적 세포 파괴의 소견을 관찰할 수 있었으며 이를 Gundry 등<sup>16)</sup>이 제시한 등급으로 구분하였을 때에는 보존 7일째부터 통계학적 의미가 있었다. 혈관 내피세포의 항응고 기능을 평가하는 기능적 검사로서 시행한 트롬보모듈린 면역조직화학적 검사에서도 7일째에서 통계학적 의미가 있었다. 한편 일정 기간의 냉장 후 -196°C에 냉동 보존한 II군의 경우 냉장 5일 후 냉동 보존한 정맥에서 전자현미경상의 의미 있는 세포 손상을 볼 수 있었으나, 혈관내피의 트롬보모듈린 면역조직화학적 검사에서는 냉동 보존한 모든 정맥에서 반응이 저하되어 있었으며 이는 냉동 보존한 경우 혈관 내피세포의 항응고 기능이 저하된다는 것을 의미한다. 그러나 이러한 저하가 일시적인 것인지 아니면 영구적인 것인지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다. 트리판 블루를 이용한 세포의 생존도 검사에서 냉장 5일까지는 50% 이상의 생활성이 보존된다. 그러나 냉동 보존한 경우에는 20% 내외에서만 생활성이 보존되는 것으로 관찰되었다. 이는 7일 이내의 단기간 보존에는 냉장 보존 방법이 유리하며 14일 이상의 장기간 보존에는 냉동 보존 방법이 더 효과적인 것을 의미한다. 따라서 최적의 동종 정맥 이식을 위하여 적출된 정맥은 RPMI 1640 보존액에 4°C 냉장 상태에서 7일 이상의 보존은 피해야 할 것으로 보이며 7일 이상의 장기간 보존이 불가피한 경우에는 -196°C에 냉동 보존하는 방법이 우수할 것으로 판단된다. 또한 냉동 보존을 하여야 할 경우에도 냉장 보존 기간 5일 이내에 냉동 보존 방법으로 전환하여야 할 것으로 생각되며 이 경우 어느 정도의 혈관내피세포의 항응고 기능 저하는 감수하여야 할 것으로 판단된다. 그러나 이러한 생활성 및 항응고 기능의 저하가 일시적인 현상인지의 여부와 이러한 기능 저하가 이식 혈관의 장기 개통률에 미치는 영향에 대하여는 지속적 연구가 필요하다.

## 참 고 문 헌

1. Jackson DR. *Living homologous saphenous vein -A new graft conduit for use in arterial reconstruction.* *Angiology* 1969;21.
2. Bical O, Bachet J, Lauroan C. *Aortocoronary bypass with homologous saphenous vein: long-term results.* *Ann Thorac Surg* 1980;30:550-7.
3. Ochsner JL, Lawson JD, Eskind SJ, Mills NL, DeCamp PT. *Homologous veins as an arterial substitute: Long-term results.* *J Vasc Surg* 1984;1:306-13.
4. Barner HB. *Allogenic vein as a conduit for coronary artery bypass.* *Ann Thorac Surg* 1992;54:817.
5. O' Brien MF, Stratford EG, Gardner MAH. *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.
6. Miller VM, Bergman RT, Gloviczki P, Brockbank KGM. *Cryopreserved venous allografts: Effects of immunosuppression and antiplatelet therapy on patency and function.* *J Vasc Surg* 1993;18:216-26.
7. Brockbank KGM, McNally RT, Walsh KA. *Cryopreserved vein transplantation.* *J Card Surg* 1992;7:170-6.
8. Bambang LS, Mazzucotelli JP, Moczar M, Beaujean F, Loisanse D. *Effects of cryopreservation on the proliferation and anticoagulant activity of human saphenous vein endothelial cells.* *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:998-1004.
9. Bilfinger TV, Hartman AR, Liu Y, Magazine HI, Stefano GB. *Cryopreserved veins in myocardial revascularization: Possible mechanism for their increased failure.* *Ann Thorac Surg* 1997;63:1063-9.
10. van Reedt Dortland RW, van Leeuwen MS, Steijling JJ, Theodorides T, van Vroonhoven TJ. *Long-term results with vein homograft in femoro-distal arterial reconstructions.* *Eur J Vasc Surg* 1991;5:557-64.
11. 지현근, 김영태, 이정렬, 김용진, 노준량, 서경필. 선천성 복잡 심기형 환자의 외과적 교정술시 동종이식편의 적용에 관한 연구. *대흉외지* 1995;28:1038-44.
12. 오삼세, 지현근, 김용진, 이정렬, 노준량, 서경필. 복잡 심장기형 환자에서 우심실 유출로 재건술시 이첨판화 냉동 보존 동종이식편의 적용에 관한 연구. *대흉외지* 1997;30: 270-4.
13. Davies MG, Hagen P-O. *The vascular endothelium: A new horizon.* *Ann Surg* 1993;218:593-609.
14. Brockbank KGM, Donovan TJ, Ruby ST, Carpenter JF, Hagen P-O, Woodley MA. *Functional analysis of cryopreserved veins-preliminary report.* *J Vasc Surg* 1990;11:

- 94-102.
15. Bank HL, Schmehl MK, Brockbank KGM. *Endothelial and fibroblast viability assays for tissue allografts*. In: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC, Ross DN, Somerville J, Yacoub MH (eds). *Cardiac Valve Allografts* New York: Springer-Verlag, 1962-1987. 1987;43-51.
  16. Gundry SR, Jones M, Ishihara T, Ferrans VJ. *Intra-operative trauma to human saphenous veins: Scanning electron microscopic comparison of preparation techniques*. *Ann Thorac Surg* 1980;30:40-7.
  17. 송 현. 개에서 동맥과 정맥 동종 이식편의 냉장, 냉동 보존 방법에 따른 개존율 및 생활성에 관한 연구. 서울대학교 대학원 의학박사 학위논문 1999.
  18. Gross RE, Hewitt ES, Bill AH Jr, Pierce EC II. *Preliminary observation on the use of human arterial grafts in the treatment of certain cardiovascular defects*. *N Engl J Med* 1948;239:578-9.
  19. Piccone VA, Sika J, Ahmed N, LeVeen HH, DiScala V. *Preserved saphenous vein allografts for vascular access*. *Surg Gynec Obstet* 1978;147:385-90.
  20. Armiger LC. *Viability studies of human valves prepared for use as allografts*. *Ann Thorac Surg* 1995;60:s118-21.
  21. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. *Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves; comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:118-27.
  22. Davies AH, Parums DV. *Storage of donor long saphenous vein*. *J Cardiovasc Surg* 1992;33:92-7.
  23. da Gamma AD, Sarmiento C, Vieira T, do Carmo GX. *The use of arterial allografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation*. *J Vasc Surg* 1994;20:271-8.
  24. Magne J-L, Farah I, Roux J-J, Voirin L, Badra A, Durand M, Chichignoud B, Guidicelli H. *Below-knee bypass using fresh arterial allografts for limb salvage: Early results*. *Ann Vasc Surg* 1997;11:237-41.
  25. Weber TR, Dent TL, Lindenauer SM, Allen E, Weatherbee L, Spencer HH, Gleich P. *Viable vein graft preservation*. *J Surg Res* 1975;18:247-55.
  26. Thiede A, Engemann R, Korner H, Muller-Ruchholtz N. *Comparison of immunologic reactions of arterial transplants in the system and venous transplants in the venous system using inbred strains of rats*. *Transplants Proc* 1979;11:603-6.
  27. Carpenter JP, Tomaszewski JE. *Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: A prospective randomized trial*. *J Vasc Surg* 1997;26:32-42.
  28. Deaton DW, Stephens JK, Karp RB, et al. *Evaluation of cryopreserved allograft venous conduits in dogs*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:153-62.
  29. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R. *Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs-Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:1732-44.
  30. Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, et al. *Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment*. *J Surg Res* 1996;62:95-102.
  31. Blann AD and Taberner DD. *Annotation. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: Does it exist?* *Br J Haematology* 1995;90:244-8.
  32. Esmon CT. *The regulation of natural anticoagulant pathways*. *Science* 1987;235:1348-51.

=국문 초록=

배경: 관상동맥 우회술이나 말초 혈관 우회술 시 가장 많이 쓰이는 대체 혈관은 자가 복재정맥이나, 이러한 정맥을 사용할 수 없는 경우 동종 복재정맥이 이용되어 왔다. 1900년대 초부터 시작된 동종 정맥의 이식은 아직도 그 이용에 대하여 논란이 있으며 보존 방법에 따른 혈관 내피세포나 평활근의 생활성 평가에 있어도 큰 편차가 있다. 특히 혈관 내피세포의 항응고 기능이나 nitric oxide에 대한 연구가 이루어지면서 동종 정맥 이식에 있어도 이들의 생활성 및 항원성 여부에 관심이 모아지고 있다. 대상 및 방법: 본 연구는 사람의 복재정맥을 보존하였을 때 보존 방법 및 기간에 따른 혈관 내피세포의 생활성의 평가를 목적으로 하였다. 신선 복재정맥을 대조군으로 하였으며, 실험군 복재정맥은 RPMI (Roswell park memorial institute) 1640에 10% 우태혈청이 포함된 4°C 조직 배양액에 넣어 각각 1일(24시간), 3일, 5일, 7일, 14일간 냉장 보존(cold storage)하였다. 기간별 냉장 보존이 끝나면 반으로 나누어 이 상태의 정맥을 I군(I-1, I-3, I-5, I-7, I-14)으로 정하고 냉장 상태에서 실험하였으며, 나머지는 10% 우태혈청과 10% DMSO가 포함된 RPMI 1640 용액에 넣고 -196°C의 액화 질소 탱크에서 2주간 냉동 보존 후(cryopreservation), 37°C에서 급속 해동하여 냉장 보존된 기간에 따라 II군(II-1, II-3, II-5, II-7, II-14)으로 정하여 실험하였다. 각 군의 생활성을 알아보기 위하여 전자현미경을 이용한 내피세포의 관찰, 트롬보모듈린(thrombomodulin) 면역조직화학검사를 이용한 혈관 내피세포의 항응고 기능, 효소 소화에 의한 정맥에서의 혈관 내피세포 분리 후 트리판 블루(trypan blue)를 이용한 세포 생존을 검사 등을 시행하였다. 결과: 전자현미경을 통한 세포의 형태학적 검사에서 Groups I-7, I-14, II-5, II-7, 그리고 II-14정맥군들이 Gundry score의 의미 있는 증가( $p < 0.05$ )를 보이는 형태학적 변화가 나타났다. 트롬보모듈린을 이용한 면역조직화학검사와 트리판 블루를 이용한 세포 생존을 검사에서는 냉장군은 7일째 생활성 저하를 나타냈으나 냉동 보존군에서는 보존 기간에 상관없이 모두 생활성이 저하된 것으로 관찰되었다. 결론: 사람의 복재정맥을 우태혈청이 포함된 4°C의 RPMI 1640에 냉장 보존하였을 경우 냉장 7일째부터 형태학적, 기능적 생활성 저하를 관찰할 수 있었으나, -196°C에 냉동 보존한 경우에는 냉장 5일 후 냉동 보존한 정맥에서도 형태학적인 생활성 저하를 관찰할 수 있었으며 혈관 내피의 항응고 기능을 나타내는 트롬보모듈린 면역조직화학검사에서는 냉동 보존한 대부분 정맥에서 기능적 생활성이 저하된 것으로 관찰되었다. 그러나 이러한 생활성 및 항응고 기능의 저하가 일시적인 현상인지의 여부와 이러한 기능 저하가 이식 혈관의 장기 개통률에 미치는 영향에 대하여 지속적 연구가 필요하다.

- 중심 단어 : 1. 동종 정맥  
2. 혈관 내피세포  
3. 냉장 보존  
4. 냉동 보존  
5. 생활성