

냉동 보존된 대동맥의 해동방법

오영민* · 심성보** · 사영조** · 박재길** · 곽문섭** · 이선희**

Comparison of Different Thawing Methods on Cryopreserved Aorta

Young Min Oh, M.D.*, Sung Bo Sim, M.D.**, Young Jo Sa, M.D.**, Jae Kil Park, M.D.**,
Moon Sub Kwack, M.D.**, Sun Hee Lee, M.D.**

Background: The studies on cryopreserved arterial allograft have been focused on cooling methods, pre-treatment, cryoprotectant agents, and preservation temperature. But recently, several studies have reported that thawing methods also play an important role in the occurrence of macroscopic and microscopic cracks. This study was designed to investigate the cell injury after thawing, using a rabbit model to clarify the effect of thawing methods on cryopreserved arteries. **Material and Method:** Segments of the rabbit aorta were obtained and divided into 3 groups (n=60) according to whether the specimens were fresh (control, n=20), cryopreserved and rapidly thawed (RT) at 37°C (n=20), or cryopreserved and subjected to controlled, automated slow thawing (ST)(n=20). Cell damage was established using the TUNEL method and the morphological changes were also evaluated. **Result:** In the group that was rapidly thawed, the expression of TUNEL (+) cells increased significantly more than in the slowly thawed group. In addition, the endothelial denudation, microvesicles and edema were significant in the rapidly thawed group compared with those changes in the slowly thawed group. **Conclusion:** Our study suggests that the rapid thawing method may be one of the major causes of cellular damage and delayed rupture in cryopreserved arterial allografts. The expression of TUNEL (+) cells and structural changes were significantly low in the slowly thawed group, which might have contributed to the improvement of graft failure after transplantation.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:113-118)

Key words: 1. Cryopreservation
2. Allograft
3. Cell Injuries

서 론

혈관재건술에 사용되는 적절한 동맥대체물은 현재까지 계속되는 연구의 대상이다. 동맥대체물로 지금까지 사용되어 왔던 인조혈관과 자가동맥은 많은 유용성에도 불구하고 실제로 재건술을 시행함에 있어서 많은 제약을 안고 있다. 최근의 냉동 보존된 동종동맥편을 이용하는 방법은

혈관재건술의 영역에서 점점 관심이 증가되고 있는 분야이며, 특히 감염성 질환이나 인조삽입물을 가지고 있는 환자에게 유용한 방법으로, cryoprotectant agent의 사용과 보존방법의 발전에 따라 냉동 보존된 동종동맥편을 이식하여 좋은 성과를 보이고 있지만, 냉동 보존된 이식편에서 발견되는 육안적, 현미경적 균열과 생육성의 감소 등은 수술 후의 예후에 영향을 미치며 지금까지 조직의 냉

*가톨릭대학교 의과대학 성모병원 응급의학과학교실

Department of Emergency, St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**가톨릭대학교 의과대학 성모병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, Seoul, Korea

논문접수일 : 2003년 9월 19일, 심사통과일 : 2003년 10월 29일

책임저자 : 이선희 (150-713) 서울특별시 영등포구 여의도동 62번지, 성모병원 흉부외과

(Tel) 02-3779-1020, (Fax) 02-789-3677, E-mail: shleemd@catholic.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

동 보존 후에 발생하는 이러한 문제들에 대해 여러 연구가 진행되어 왔다. 이에 대한 연구로는 획득과 멸균 등 보존처리과정의 초기에 주로 생육성의 소실이 일어난다는 보고[1]와 냉동 보존온도를 높여주면 균열이 발생하지 않는다고 보고[2]도 있었다.

최근에는 해동과정이 균열의 발생에 주요한 인자가 된다고 보는 연구들이 진행되어, 냉동 보존 후에 이식편을 담는 용기내부의 thermal stress에 의해 균열이 발생한다는 견해[3]와 냉동 보존 후에 -100°C 까지 완속 해동하는 방법으로 균열을 예방할 수 있다는 결과[4]도 있었다. Pascual 등[5]은 완속 해동하는 방법을 통해 냉동 보존한 혈관조직의 생육성과 구조적 특성이 더 잘 보존될 수 있다고 보고하였다.

이에 저자들은 동일한 방법으로 냉동 보존된 대동맥편을 이용하여 서로 다른 두 가지의 해동방법(급속/완속 해동)을 적용한 뒤 두 군 간의 조직학적 비교와 DNA 절편 발생정도를 비교해서 해동방법이 이식편에 미치는 영향을 알아보려고 했다.

대상 및 방법

1) 실험동물

약 2,500 g의 수토끼(New Zealand White Rabbit)에게 thiopental (2 mg/kg)을 정주하고 기관삽관하여 전신마취를 유도하였다. Sodium thiopental, pancuronium bromide, phenthanilum chloride를 정주하여 마취를 유지하고, 정중절개를 시행하여 심장을 노출시킨 후 대동맥편을 획득하였다. 획득한 동맥편은 4°C 의 minimal essential medium (MEM)에 담았다.

2) 실험군

획득한 대동맥편은 임의로 3군으로 나누어 서로 다른 방법으로 처리하였다. 먼저 4°C 의 MEM으로 이동시켰다가 MEM+10% dimethylsulphoxide (DMSO) 용액에서 1시간 동안 보관한 군을 대조군(C, n=20)으로 하고 4°C 의 MEM으로 이동시켰다가 MEM+10% DMSO 용액에서 -196°C 로 보관한 후 급속 해동한 군(RT군, n=20)과 4°C 의 MEM으로 이동시켰다가 MEM+10% DMSO 용액에서 -196°C 로 보관한 후 완속 해동한 군(ST군, n=20)을 비교대상으로 했다.

3) 실험방법

MEM에 담긴 동맥편을 MEM과 DMSO가 9 : 1로 혼합

되어있는 cryotube에 넣었다. 독성을 감소시키기 위해 DMSO 농도를 5분 간격으로 2.5, 5, 7.5, 10%로 점진적으로 증가시켜 cryoprotectant를 첨가하였다. 그런 다음 각각의 조직을 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 -120°C 에 도달할 때까지 programmable freezer (85~1.7p, Scientemp, Adrian, MI, U.S.A.)를 이용하여 냉동하였다. 하루가 지난 후 다시 -196°C 의 액체질소에서 7일간 보존하였다. 보존기간이 지난 후 RT군은 37°C 의 수조에서 5분간 해동하고 ST군은 programmable freezer를 이용하여 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 37°C 까지 온도를 높여 해동하였다.

4) 조직학적 분석

각 군마다 20개의 동맥편을 10% formaldehyde에 고정시킨 후 절편하여 H-E staining하여 200배율의 광학현미경으로 관찰하였다.

5) DNA 절편의 측정

TUNEL 염색방법을 이용하여 잘려진 염색질의 3'-OH기에 표지된 nucleotide를 붙여서 절편화된 DNA가 있는 세포를 200배율의 광학현미경(Axioskop 40[®], Carl Zeiss, Jena, Germany)하에서 직접 확인하여 해동방법에 따른 각 군에서의 세포의 손상정도를 비교했다. 염색에는 TUNEL kit (ApopTag[®], S7100, Peroxidase kit, Oncor, Gaithersberg, MD, U.S.A.)를 사용하였다. 자세히 기술하면 파라핀 조직블럭을 xylene과 ethanol로 세척하여 파라핀을 제거하고 단백질을 분해효소로 반응시킨 후 3.0% H₂O₂로 억제시키고 Tdt enzyme (55 $\mu\text{L}/5\text{ cm}^2$)을 가하여 반응시켰다. Anti-digoxin peroxidase conjugate (65 $\mu\text{L}/5\text{ cm}^2$)를 가한 후 실온에서 반응시키고 peroxidase substrate (75 $\mu\text{L}/5\text{ cm}^2$)를 가하여 5분간 염색하였다. 0.5% methyl green으로 3분간 대조염색하였다. 고정 후의 슬라이드 표본에서 갈색으로 염색된 세포를 TUNEL (+)로 판정하고 표본조직 내 전체 세포 중의 TUNEL (+) 비율로 각 군별 세포손상 정도의 비교지표로 삼았다. TUNEL (+) 세포의 백분율은 한 개의 동맥편당 각각 고배율 시야에서 12시, 3시, 6시, 9시 방향에서 사진을 찍어 총 세포수 중의 TUNEL (+) 세포의 백분율로 표현하였다.

6) 통계

각 군의 TUNEL (+) 세포의 백분율은 평균값 \pm 표준편차로 표시하였다. 해동방법에 따른 두 군의 차이를 Mann Whitney U test를 이용하여 비교하였다. 통계학적 의의

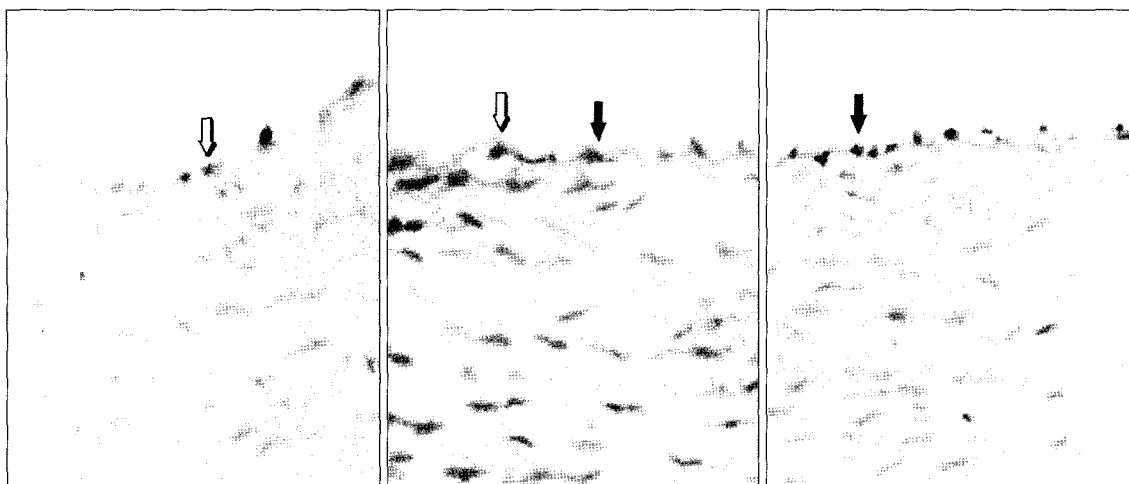


Fig. 1. Light microscopic findings of aortic wall from rabbit illustrating TUNEL staining. Open arrows indicate counter-stained TUNEL (-) endothelial cells. And, arrows indicate TUNEL (+) endothelial cells. Figures are taken in order of control, slowly thawed and rapidly thawed specimen. Original magnification: $\times 200$.

95% 신뢰구간을 적용하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) TUNEL (+) 세포의 비율로 본 apoptosis 발생

TUNEL 염색을 시행한 결과 같은 고배율 시야에서 ST군에 비해 RT군에서 더 많은 TUNEL (+) 세포의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 각 군에서의 TUNEL (+) 세포의 발현은 대조군, ST군, 그리고 RT군에서 각각 $2.6 \pm 1.0\%$, $25.2 \pm 6.8\%$, $38.8 \pm 7.9\%$ 였으며, ST군에 비해 RT군에서 TUNEL (+) 세포의 발현이 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다(Fig. 2).

2) 광학현미경으로 본 세포의 형태학적 변화

RT군에서는 세포부종과 소수포 형성, 이형성세포의 출현, 내피층의 박탈 등의 소견과 같은 세포의 형태학적 손상이 대부분의 표본에서 관찰된 반면, ST군에서는 세포부종과 소수포 형성 등의 소견이 주로 관찰되었지만 이형성세포의 출현이나 내피층의 박탈 등은 관찰되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

조직의 보관방법으로 냉동 보존이 널리 이용됨에 따라 혈관재건술의 영역에서 동맥의 대체물로 사용되어온 냉

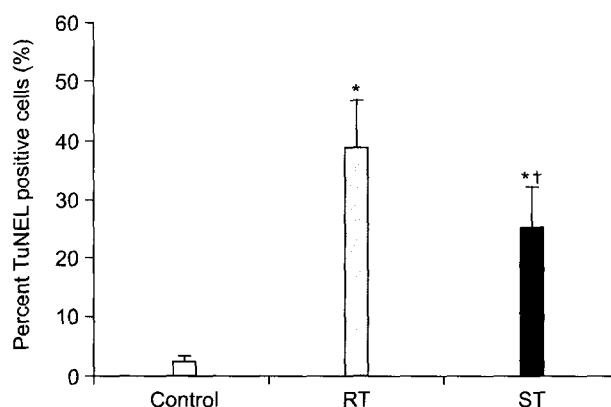


Fig. 2. Percentage of TUNEL (+) cells in the three groups. The expression of TUNEL (+) cells after thawing in two different manners was increased significantly more than that of control group ($*p < 0.05$). In the specimen that was rapidly thawed, the expression of TUNEL (+) cells increased significantly more than in the slowly thawed specimen ($^{\dagger}p < 0.05$).

동 보존된 동종동맥편은 인조혈관 및 자가동맥에 비하여 많은 장점을 가지고 있음에도 불구하고 해동 후에 발견된 육안적 균열로 이식수술에 부적합함을 뒤늦게 알게 되는 경우가 많고 또는 육안적으로 확인되지 않는 현미경적 균열과 이식편 내피세포의 이식 후 생육성 감소로 인해 수술 후의 예후를 향상시키는 데에는 한계가 있었다. 지금까지 이러한 문제의 원인이 되는 인자가 무엇인가를 밝히기 위한 연구와 냉동 보존된 동종동맥편의 이식 후에 예후를 개선시킬 수 있는 방법에 대해서 많은 연구가 진행

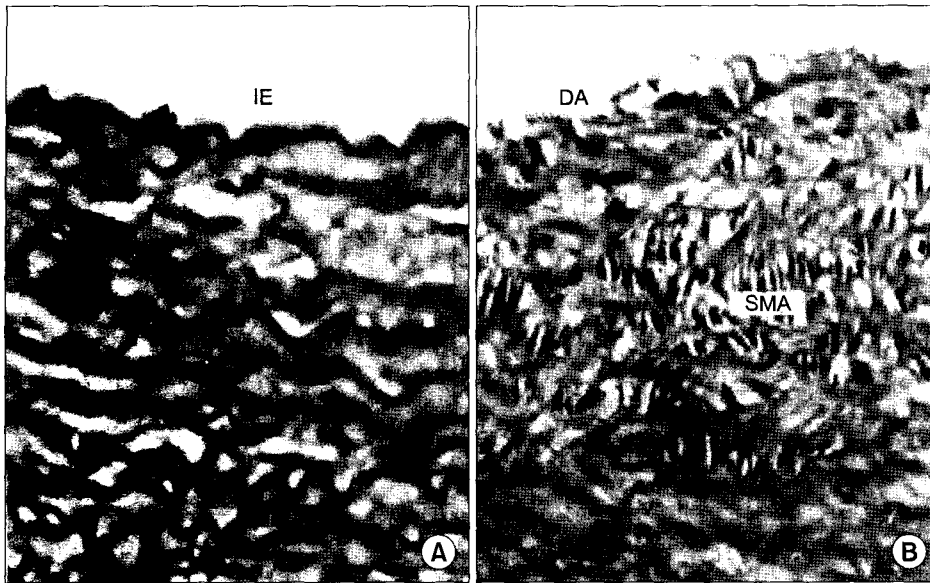


Fig. 3. Light microscopic findings of aortic wall from rabbit illustrating H-E staining. (A) Slowly thawed specimen showed minimal endothelial swelling and vesicle formation. Endothelial lining remained intact (IE=Intact endothelium). (B) Rapidly thawed specimen showed disrupted internal elastic lamina and the loss of endothelial layer creating denuded area (DA=Denuded area). In addition, there was anisocytosis of smooth muscle cells (SMA=Smooth muscle anisocytosis) as well as edema in the medial layer. Original magnification : $\times 200$.

되었는데 이러한 연구들은 주로 조직을 냉동하기 전의 처치와 냉동방법, 그리고 냉동 보존하는 온도에 주로 초점이 맞추어져 왔다.

Rosset 등[6,7]과 Pukacki 등[8]은 냉동 보존 후에도 동맥편의 조직학적인 변화가 없으며 점성 및 탄성도 보존된다고 보았다. 다른 연구에서는 냉동 시의 온도변화에 관심을 두고 컴퓨터 프로그램화된 냉동 보존방법의 중요성을 강조한 예도 있었으며[9], 새로운 냉동 보존액의 사용과 기존의 방법보다 천천히 냉동시키는 방법으로 이식실패를 예방할 수 있다고 하였다[10]. Hunt 등[2]은 냉동 보존액으로 dimethyl sulfoxide를 사용하고, 서서히 냉동하며, -160°C 미만의 온도에서 저장하고, 급속 해동하는 일반적인 방법을 따르면 75%에서 육안적인 균열이 일어나며, 만일 냉동 보존온도를 -80°C 에서 유지한다면 온도차에 의한 물리적 스트레스를 줄여줌으로써 균열이 발생하지 않았다고 보고했다. 마찬가지로 Wassenaar 등[3]은 온도차에 의한 물리적 스트레스가 균열 발생의 주요한 인자가 되며 이 같은 스트레스가 이식편을 담는 용기내부에서 발생한다고 보았다. 임 등[1]은 혈관내피의 생육성 감소는 냉동 및 해동과정에서 발생하는 것이 아니라 조직획득과 멸균과정 등 주로 보존처리과정 초기에 일어난다고 보았다.

한편 해동과정이 균열의 발생에 중요한 인자가 된다는 연구는 Pegg 등[4]이 처음으로 제시하였다. 이들 역시 온도차에 의한 스트레스를 균열의 주요한 원인으로 보았으며 냉동 시의 온도변화를 달리해도 보존 중의 균열 발생에는 영향이 없었으며 단지 해동 시의 온도 변화가 균열

의 주된 원인이 된다고 보았다. 또한 냉동 보존 후의 급속 해동이 혈관투과성의 증가를 초래하여 혈관의 약화에 기여하며 이식 실패의 주요한 요인이 된다는 연구결과도 있었다[11].

냉동 보존된 혈관조직이 해동 후에도 냉동 이전의 조직 특성을 갖고 있는지에 관한 연구는 여러 가지 방법으로 평가되었다. 그중에는 육안적 관찰로 혈관조직에 발생한 균열을 알아내려는 시도도 있었고, 물리적 특성을 직접 평가하거나, 생체 밖 모델에서 해동된 조직을 순환회로에 포함시켜서 균열과 파열의 발생을 예측하려는 시도도 있었다[5]. 그러나 이러한 방법들은 조직의 물리적 특성의 상실과 균열의 발생 전까지는 확인되지 않으므로, 냉동 혈관조직과 같이 물리적 특성과 생육성이 수술 예후에 직접적인 관련이 있는 조직의 평가에는 세포손상의 정도를 정량화하는 TUNEL 염색과 같은 방법이 더 객관적인 지표가 될 것이라고 생각한다. TUNEL 염색은 세포사멸의 한 특징인 DNA 분절화를 면역화학적인 방법으로 검출하는 방법으로, 세포괴사와 DNA 복원과정까지도 양성으로 측정하게 되어 검사의 특이도에 대한 논란이 있긴 하지만, 전체 세포 중에서 세포사멸이 일어난 분획을 빠르게 정량화하는 최선의 방법이다[12].

본 실험에서 RT군에서 ST군에 비해 현저하게 많은 TUNEL (+) 세포가 관찰된 결과를 토대로 냉동 보존된 조직을 해동할 때에는 조직의 생육성 보존이나 합병증 예방을 위해 완속 해동하는 방법을 고려해야 할 것이다. 그러나 대조군과 ST군 사이에 큰 차이가 없을 것이라는 예

상과는 달리 대조군과 ST군 사이에 유의한 차이가 존재한다는 점은 냉동된 조직의 손상에 기여하는 인자가 해동방법 이외에도 존재한다는 점을 암시한다. 그것은 여러 연구에서 언급되었듯이 냉동 전처리, 냉동과정, 냉동온도 및 기간의 모든 과정이 각각 조직손상을 유발하는 것일 수도 있다. 그러나 본 연구 결과에서와 같이 동일한 조건으로 냉동과 보존과정을 거친 동맥편이 해동방법에 따라 조직학적 특성에서 차이를 보이고 TUNEL 염색을 통해 알아본 세포손상의 정도도 달랐던 것으로 미루어 볼 때, 역시 냉동 보존된 혈관 조직의 이식 후 예후에는 해동과정도 많은 영향을 주었다고 보아야 할 것이다.

혈관 조직, 그중에서도 특히 냉동 보존된 동맥편의 경우에 혈액과 혈관 평활근 사이의 조절인자 역할을 하는 혈관 내피세포는 이식 후 혈관의 생육성과 예후에 가장 중요한 역할을 하므로, 냉동된 이식편의 해동 후에 관찰되는 혈관 내피층 상실의 유발 인자에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 보인다. 뿐만 아니라 여러 연구에서 밝혔듯이 급속 해동한 혈관조직에서 공통적으로 발생하는 얼음결정에 의한 내피 손상과 중막의 부종, 평활근세포의 감소, 평활근 핵주변의 소수포 형성 등도 조기 혹은 지연성으로 이식실패를 가져오는 원인이 되므로 계속 연구의 대상이 되어야 할 것으로 보인다.

결 론

냉동 보존된 토끼의 대동맥편에 대한 해동방법의 차이에서, 완속 해동방법이 급속 해동방법에 비해 세포 손상을 덜 일으키는 것으로 생각된다. 따라서 향후 냉동된 조직, 특히 냉동 보존된 동맥편을 이용함에 있어서 완속 해동하는 방법을 사용하는 것이 바람직할 것으로 보이며, 혈관조직 이외의 다른 조직을 냉동 보존할 때에도, 이식 후의 생육성을 최대화하고 이식 실패를 줄이기 위해 완속 해동 방법을 고려해볼 필요가 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Lim CY, Hong EK. *Flow cytometric analysis of endometrial cell viability in arterial allograft*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1997;30:553-8.
2. Hunt CJ, Song YC, Bateson EAJ, Pegg DE. *Fractures in cryopreserved arteries*. Cryobiology 1994;31:506-15.
3. Wassenaar C, Wijsmuller EG, Herwerden LAV, et al. *Cracks in cryopreserved aortic allograft and rapid thawing*. Ann Thorac Surg 1995;60:S165-7.
4. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. *Fractures in cryopreserved elastic arteries*. Cryobiology 1997;34:183-92.
5. Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Rodriguez M, Turegano F, Bujan J. *Effect of the thawing process on cryopreserved arteries*. Ann Vasc Surg 2001;15:619-27.
6. Rosset E, Friggi A, Rieu R, et al. *Mechanical properties of the arteries. Effects of cryopreservation*. Chirurgie 1996; 121:285-97.
7. Rosset E, Friggi A, Novakovitch G, et al. *Effects of cryopreservation on the viscoelastic properties of human arteries*. Ann Vasc Surg 1996;10:262-72.
8. Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, Oszkini G, Krasinski Z, Zapalski S. *The mechanical properties of fresh and cryopreserved arterial homografts*. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;20:21-4.
9. Rigol M, Heras M, Martinez A, et al. *Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries*. J Vasc Surg 2000; 31:1018-25.
10. Lehalle B, Geschier C, Fieve G, Stoltz JF. *Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts*. J Vasc Surg 1997;25:751-2.
11. Bujan J, Pascual G, Garcia-Honduvilla N, et al. *Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall*. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;20:13-20.
12. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, et al. *In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations*. J Histochem Cytochem 1996;44:959-68.

=국문 초록=

배경: 혈관재건술에 사용되는 냉동 보존된 동종동맥편에 대한 지금까지의 연구는 주로 냉동방법, 냉동전처리, 보존온도에 관심이 집중되어 있었으나, 최근에 해동방법이 균열발생의 중요한 인자가 된다는 연구가 있었다. 이에 저자들은, 같은 조건으로 냉동 보존된 대동맥조직을 서로 다른 두 가지 방법으로 해동시켜, 조직손상 정도를 비교함으로써 이상적인 조직의 해동방법을 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 2,500 g의 토끼에서 대동맥편을 획득한 후, 일반적인 방법에 따라 냉동 보존한 뒤 37°C의 온수에 급속 해동한 군(RT)과 1°C/min의 속도로 완속 해동시킨 군(ST)으로 나누고, 각 군에서 apoptosis 발생을 평가하기 위해 각 군의 전체 세포 중 TUNEL (+) 세포의 비를 비교하였고, 광학현미경하에서 해동된 조직편의 조직학적 특성을 비교 관찰하였다. **결과:** 1. TUNEL test상, RT군에서 ST군에 비해 TUNEL (+) 세포의 비가 유의하게 높았다. 2. 광학현미경하 조직소견상, RT군에서 세포부종과 혈관 내피층의 박탈, 소수포 형성, 그리고 이형성세포 등의 소견이 ST군에 비해 더 많이 관찰되었다. **결론:** 냉동 보존된 토끼의 대동맥조직에 대한 해동방법의 차이에서, 완속 해동방법이 조직의 형태학적 손상과 apoptosis 발생을 감소시켰다. 따라서, 향후 냉동조직을 이용한 이식술에서 술 후 합병증의 발생을 감소시키고 예후를 개선하기 위해서는 기존의 급속 해동하는 방법보다 완속 해동하는 방법의 사용을 고려해야 할 것이다.

- 중심 단어 :** 1. 냉동 보존
2. 동종동맥편
3. 세포손상