

개의 생체 부분간 이식에서 공여간의 조직병리소견과 이식 후 간 기능의 상관관계: Desferrioxamine 투여 후의 변화

¹이화여자대학교 의과대학 외과학교실, ²연세대학교 장기이식 연구소 및 의과대학 외과학교실

정구용¹·정규영¹·김유선²

Pathologic Scoring and Postoperative Liver Function in Canine Partial Liver Transplantation: after Desferrioxamine Exposure

Ku-Yong Chung, M.D.¹, Gyou Young Jeong, M.D.¹ and Yu Seun Kim, M.D.²

¹Departments of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea, ²The Research Institute for Transplantation and Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Liver biopsy plays an important role in the histopathological evaluation of the transplanted liver, but till now pretransplant graft biopsy has limited role in predicting primary non function of the graft. Desferrioxamine (DFO), the iron chelating agent, has been known to be effective in reducing rat liver ischemia-reperfusion injury. We tried desferrioxamine in canine partial liver transplantation, and pathologic scores were compared. **Methods:** ~70% partial liver was harvested and reimplanted in same mongrel dog weighing about 25 kg. Desferrioxamine (20 mg/kg) was infused via splenic vein just from the beginning of reperfusion of the partial liver graft (n=5). Serum aspartate aminotransferase (AST) Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH) were checked and compared with the control group (n=5). Morphological liver injury score were compared to the control group. Statistical analysis was done with independent T-test. **Results:** Total ischemic time was 4 hours and 42 minutes in average. AST level was significantly lower in Desferrioxamine group at 1 hour and 48 hours after reperfusion, (P=0.4) ALP level was significantly lower

in desferrioxamine group at 48 hours after reperfusion (P=0.4). LDH level in desferrioxamine group was lower than that of control group but without statistical significance. The pathologic score at 1 hour after reperfusion showed a reduced degree of sinusoidal injury among the DFO group but the difference was not statistically significant. The pathologic score just before harvest of the graft showed no correlation with serum AST, ALP, LDH levels at that time or at 1 hour or 48 hours after reperfusion. Only the pathologic score at 1 hour after reperfusion had significant correlation with the serum LDH levels at 48 hours after reperfusion. **Conclusion:** In canine live donor partial liver transplantation, desferrioxamine infusion just before reperfusion might be an effective way of reducing ischemia-reperfusion injury. And the pathologic grading on samples obtained at 1 hour after reperfusion showed a significant correlation with subsequent liver function (J Korean Soc Transplant 2003;17:192-196)

Key Words: Canine partial liver transplantation, Graft biopsy, Desferrioxamine, Ischemia-reperfusion injury, Pathologic score

중심 단어: 개 부분간 이식, 이식간 조직검사, 데스페리옥사민, 허혈-재관류 손상, 이식간 병리조직점수

서 론

모든 고령 장기의 이식에는 길든 짧든 혈액순환의 차단에 따른 장기의 허혈이 불가피하고, 이식수술 완료 후 혈액이 재관류 됨에 따라 유발되는 세포의 대사와 기능의 변화가 이식장기의 조직손상을 유발하며 손상이 심하면 이식된 장기가 기능을 하지 못하게 된다. 간이식에서 이러한 이식장기의 초기 기능 부전은 곧 생명을 잃어버리는 결과로 귀결되기 때문에 이식하고자 하는 기증 장기의 이식 후 예후를 미리 짐작 할 수 있으면 이식장기의 사용 여부를 미리 결정할 수 있어서 수술여부를 결정하는데 큰 도움이 될 수 있으나 현재 이에 대한 만족할만한 방법이 없는 실정이다. 비록 장기 이식 전에 예후를 짐작할 수 있는 확실한 지침은 없지

책임저자 : 정구용, 서울시 종로구 종로 6가 70
이화여자대학교 의과대학 부속 동대문병원 외과, 110-126
Tel: 02-760-5124, Fax: 02-743-7297
E-mail: kuyong@ewha.ac.kr
본 연구는 2002년도 이화대학 동대문병원 교수 임상 연구비 지원에 의해 이루어졌다.

만 장기 이식 후 재관류 직후라도 조직검사 등을 통해 예후를 짐작 할 수 있다면 이에 대한 대비와 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

간 이식의 조기기능부전에 중요한 원인으로 생각되는 허혈-재관류 손상에서 산소 자유기(oxygen free radicals)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며, 간 이식전후에 이러한 산소 자유기의 발생을 감소시키는 방법을 찾아 적용함으로써 간의 허혈-재관류 손상을 막기 위해 많은 연구들이 시도되고 있다. Iron chelator인 Desferrioxamine (DFO)은 강력한 항 산화제이면서 또한 *in vitro*에서 cytomegalovirus에 대한 항 바이러스 작용과 면역 조절작용이 있는 것으로 알려졌다.(1) 그리고 이러한 iron chelator는 쥐 간에서 허혈-재관류 손상을 감소시킨다는 것을 malondialdehyde의 감소를 확인함으로써 밝혀졌으며 contrast-enhanced magnetic resonance imaging을 이용하여 허혈-재관류 손상에 의한 간 미세순환의 장애를 호전 시킨다는 것을 보고했다.(2,3) 저자들은 개 부분간 자가이식 모델(4)을 이용하여 이러한 DFO의 허혈 간 보호효과를 혈청 간 기능 검사와 Spiegel 등(5)에 의해 고안된 병리학적 점수를 통해 검증해 보고자 하였으며 또한 이렇게 DFO에 의한 이식간 보호 효과가 있다면 이러한 것들이 이식 전 또는 이식 초기의 조직검사와 어떠한 상관관계를 가지는지 여부를 확인해 보고자 하였다.

방법

이미 보고한 저자들의 개 부분간 이식 수술방법을 이용하였다.(4) 15~25 kg의 잡종견을 12시간 이상 금식시킨 후 Pentothal sodium 정맥투입으로 마취 유도하였다. Isofluran 흡입으로 마취를 유지하면서 간간이 pancuronium bromide로 근육이완을 하였다. 양측늑골하 절개를 겸상돌기까지 연장하여 개복하였다. 좌측 간판을 그 기시부에서 절단하

고 난 다음, 위십이지장동맥(gastroduodenal artery)을 결찰하고 잘랐다. 총간동맥(common hepatic artery)을 확인하여 정리하고 혈관루프로 분리해 놓았다. 문맥의 전면부를 노출시키고 문맥에서 양쪽 간엽으로 가지치는 부위의 미상엽으로 들어가는 2~3개의 작은 문맥가지를 결찰하고 잘랐다. 이렇게 함으로써 약 2 cm 이상 길이의 좌측 문맥을 확보하였다. 중간정맥(middle hepatic vein)을 분리하여 결찰하고 절단한 다음, 좌측 간정맥(left hepatic vein)을 정리하여 혈관루프로 분리하여 놓았다. 혈관루프를 좌측 간정맥 아래로 보내서 좌측 문맥 아래로 빼낸 다음 앞으로 들어 올림으로써 좌 우측 간을 연결하는 간 실질을 출혈 없이 편하게 절리해 나갈 수 있었다. 이렇게 하여 우내측 간엽, 방형엽, 좌 내측 및 외측 간엽, 미상엽의 유두상 돌기를 포함하는 좌측 부분간을 한 구역으로 구획하였다. 섭씨 4도의 냉 하트만 용액으로 그 자리에서 냉관류하고 난 다음 다시 섭씨 4도로 보관된 University of Wisconsin 용액(UW solution)으로 체외에서 재관류하여 냉장고에 보관하였다. 약 3시간 30분 정도의 냉장 보관 후에 이 부분간을 같은 위치에 재 이식하였다. 이식된 부분간을 재관류하기 바로 직전부터 비장 정맥을 통해 DFO (20 mg/kg) (Desferral®, Norvatis Pharma AG, Stein, Switzerland)을 약 1시간에 걸쳐 서서히 주입하였다(n=5). 대조군은 500 ml의 normal saline을 투여하였다(n=5). 공여간 구획 직전과 재관류 후 1시간 및 48시간에 혈액 및 간 생검조직을 채취하여 Serum aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), 그리고 lactate dehydrogenase (LDH)를 측정하였으며 간 조직의 형태학적 점수화는 Spiegel 등(5)의 방법에 따랐다. 통계의 유의성은 Kruskal-Wallis test와 Pearson's correlation coefficient로 검증하였다.

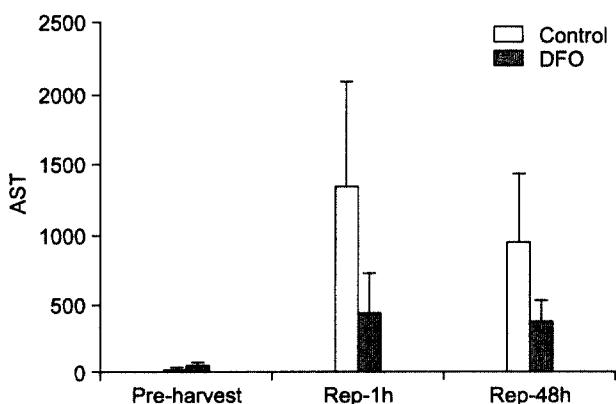


Fig. 1. Serum AST levels at pre-harvest ($P=0.06$) reperfusion 1 hour (Rep 1h, $P=0.02$) and reperfusion 48 hours (Rep 48h, $P=0.07$).

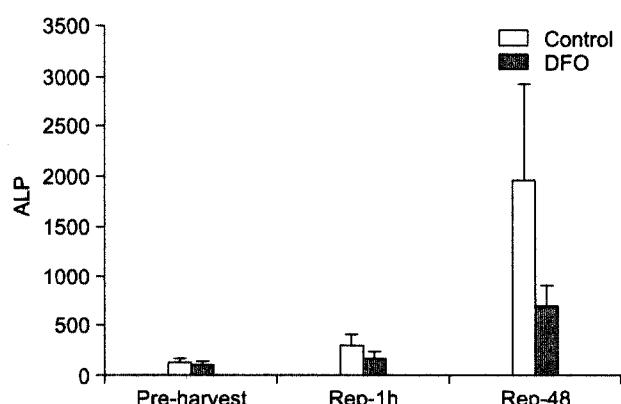


Fig. 2. Serum ALP levels at pre-harvest ($P=0.1$), reperfusion 1 hour (Rep 1h, $P=0.1$) and reperfusion 48 hours (Rep 48h, $P=0.07$).

결과

양군에서 체중(25.7 ± 2.7 kg vs. 23.8 ± 3.2 kg)과 전체 허혈 시간(280 ± 27 분 vs. 288 ± 35 분)에 차이가 없었다. DFO 군 중 한 예에서 DFO 투여 중에 심한 혈압강하가 있어서 잠시 투여를 중지하였다가 투여 속도를 조절하여 천천히 주입하였다. 재관류 후 1시간에서 AST 측정치가 DFO군에서 의미 있게 낮았으나 48시간 후에는 통계적인 의의는 없었다 ($P=0.02, 0.07$) (Fig. 1). ALP 측정치는 재관류 후 48시간의 DFO군에서 낮은 수치를 보였으나 통계적인 유의수준엔 도달하지 못했다($P=0.07$) (Fig. 2). DFO군에서 재관류 후 1시간에 LDH 측정치가 유의하게 낮게 나왔으나 재관류 48시간 후에는 양군에서 차이가 없었다($P=0.02$ at 1 hour, $P=0.3$ at 48 hours) (Fig. 3).

DFO군에서 재관류 1시간째에 병리조직학적 검사 상

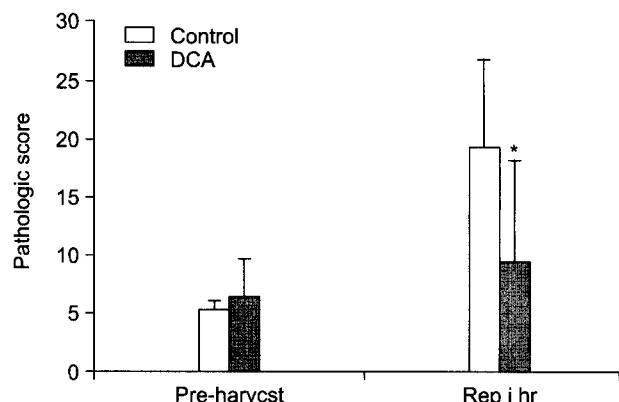


Fig. 4. Pathologic score at pre-harvest of the graft and 1 hour after reperfusion (* $P=0.07$). DFO: desferrioxamine infusion group.

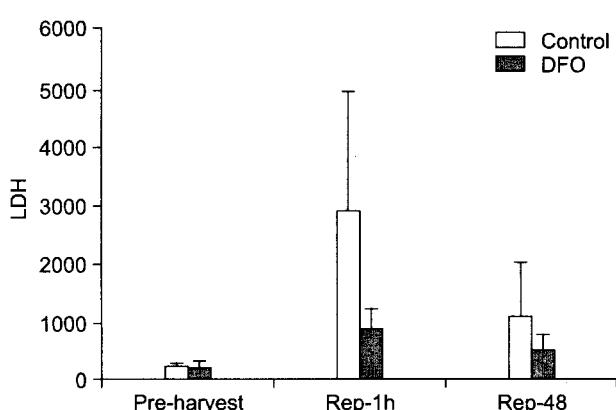


Fig. 3. Serum LDH levels at pre-harvest ($P=0.8$), reperfusion 1 hour (Rep 1h, $P=0.02$) and reperfusion 48 hours (Rep 48h, $P=0.3$).

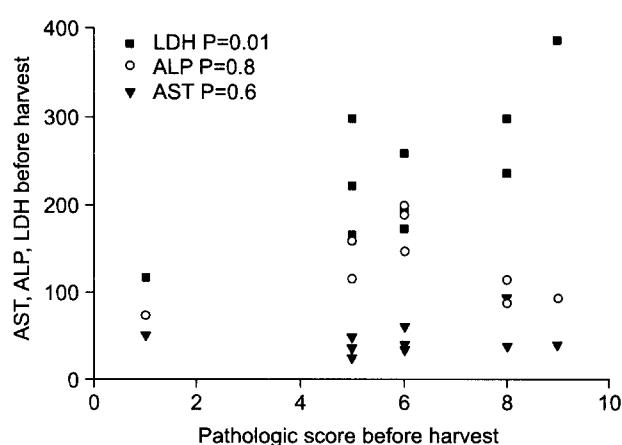


Fig. 5. Correlation between the pathologic score before harvest and Serum AST, ALP, LDH levels.

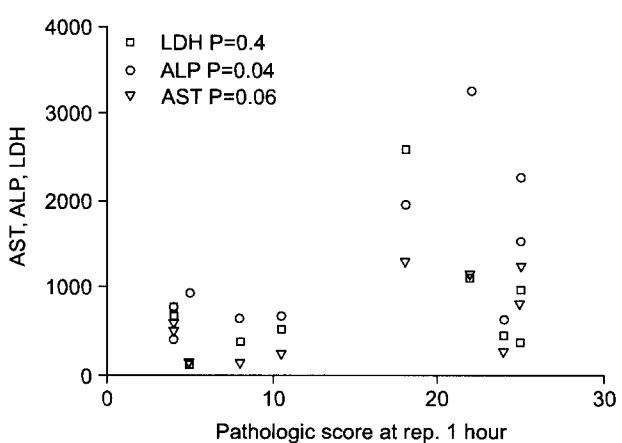
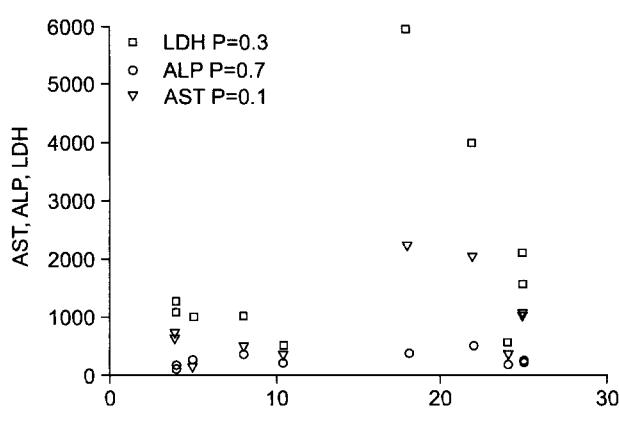


Fig. 6. Correlation between the pathologic score at reperfusion 1 hour and Serum AST, ALP, LDH levels.

sinusoid 손상이 적은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다($P=0.07$) (Fig. 4). 재판류 직전의 조직검사 결과는 재판류 1시간 및 48시간의 AST, ALP, LDH 혈청 농도와 병리 조직 검사 사이에만 유의한 연관이 있었다 ($P=0.01$) (Fig. 5). 재판류 1시간 후의 조직검사 결과와 재판류 후 48시간의 혈청 AST ($P=0.06$), ALP ($P=0.04$) 농도 사이에 어느 정도 연관이 있는 것으로 보였다(Fig. 6).

고찰

쥐의 간 이식에서 공여간 구득 전에 공여 간엽을 그 자리에서 잡아당기고 움직이고 조물락 거리는 조작을 하면 이식 후 생존율을 감소시킨다.(6) 그리고 개의 간 역시 손 조작에 매우 예민해서 소위 outflow block syndrome이 잘 발생하는데 이는 백혈구 이동, 혈소판 흡착 그리고 이에 따른 미세순환의 부전에 의한 것으로 생각된다.(7,8) 냉 또는 온 허혈 후의 재판류 간 조직에서 superoxide dismutase가 중성 백혈구의 집착을 억제하는 것으로 봐서 산소 자유기가 화학적 유도물질로 작용할 가능성이 있다.(9) 집착된 중성 백혈구에서 처음 생성되는 약한 독성의 산소 자유기가 혈관 내막세포나 간세포내의 철 이온과 반응하여 훨씬 독성이 강한 자유기가 생성된다.(10) 특히 하이드록실기(hydroxyl radical)가 그러한데 이렇게 생성된 자유기는 혈관 내막세포와 간세포에 손상을 주거나 세포 괴사를 유발시킨다. 이렇게 산소 자유기에 독성을 강화시키는 철 이온의 반응을 막는 iron chelator의 허혈 재판류 손상에 대한 예방 효과는, 쥐의 간 또는 심장에서 여러 가지 방법을 통해 긍정적으로 보고되었다.(11,12) 본 실험에서는 개의 부분간 자가 이식 모델을 이용해서 이러한 iron chelator인 DFO의 효과를 확인하였다. 개를 이용한 실험에서 DFO 투여는 10 mg/kg부터 75 mg/kg까지 다양하게 투여한 실험들이 있는데 본 연구에서는 비장정맥을 통해 직접 타겟 장기인 이식간으로 투여되는 점을 고려하여 20 mg/kg의 용량을 시도하였다.(13,14) 이번 실험에서 부분간 구득을 위한 간 조작과 약 3시간 30분 동안의 냉 보존에 의해 혈청 AST, ALP, 그리고 LDH의 측정치가 아주 급격하게 상승하는 것을 볼 수 있었으며 간 혈류가 재개 되는 순간에 비장정맥을 통해 DFO (20 mg/kg) 을 투여함으로써 재판류 48시간에 혈청 AST, ALP 농도가 대조 군에 비해 의미 있게 감소하였으며 비록 통계적으로 유의한 수준은 아니지만 혈청 LDH와 병리조직학적 소견도 DFO의 투여 군에서 양호한 결과를 보였다. 재판류 직전의 간 생검 조직은 장차 이식간의 조기 무기능 가능성을 예측해 내지 못했는데 이러한 결과들은 결국 재판류 직전의 조직 손상보다 재판류 이후의 조직손상이 무기능 이식으로 이어지는 중요한 단계임을 말하는 것이다. 아직은 지방간 만이 간이식 후 유병률과 사망률을 증가시키는 무기능 이식

과 연관되어 지는 인자라고 알려져 있다.(8) 이번 실험의 결과에서도 재판류 직전의 조직검사 결과는 재판류 1시간 및 48시간에서의 간기능 검사결과를 예측하는 인자로서 작용을 하지 못했다. 그러나 재판류 1시간 후에 채취한 이식간 조직의 검사 결과는 재판류 48시간의 간 기능 검사와 어느 정도 의미 있는 연관을 보여 주었다. 비록 실험 개체수가 적어 명확한 결론을 내리기는 어렵지만 이번결과로 개의 간에서도 DFO의 투여는 허혈-재판류 손상을 감소시키는데 효과적인 도움이 될 수 있을 것으로 판단되며 비록 재판류 전에 조직 검사로 이식 후 기능을 예측하는 건 어려웠지만 재판류 후 1시간에 채취한 간 조직의 조직병리 소견은 이후의 간 기능과 어느 정도 상관관계가 있는 것으로 생각되며 이것이 조기 무기능 이식의 예측지수와 바로 연결될 수는 없지만 향후 이러한 조직검사에 대한 연구에 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

70%의 부분간을 이용한 이번의 부분간 자가 이식모델에서 DFO 사용군은 재판류 48시간 후에 혈청 AST, ALP, LDH 농도가 어느 정도 감소하는 경향을 보여 주었으며, 재판류 1시간의 이식간 조직검사에서도 역시 통계적인 유의 수준엔 미치지 못했지만 DFO 투여 군에서 양호한 결과의 경향을 볼 수 있었다. 실험 개체수가 적어 명확히 결론짓기는 어렵지만 이러한 결과로 볼 때 개의 부분간 자가 이식에서 재판류 직전 비장 정맥을 통해 DFO를 투여하는 방법은 간의 허혈 재판류 손상을 감소 시키는데 있어 효과를 기대해 볼만하다고 판단된다. 재판류 직전에 냉 보존된 간의 조직검사로 이식 후 기능을 예측하는 건 어려웠지만 재판류 후 1시간에 채취한 간 조직의 조직병리 소견은 재판류 48시간 이후의 간 기능과 의미 있는 상관관계가 있음을 알 수 있었으며 이러한 결과가 조기 무기능 이식을 예측하는데 직접적인 증거로 활용될 수는 없지만 향후 이식간의 회복과 치료 과정에서 중요한 밀바탕 자료로 활용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Martelius T, Scholz M, Krogerus L, Hockerstedt K, Loginov R, Bruggeman C, Cinatl J Jr, Doerr HW, Lautenschlager I. Antiviral and immunomodulatory effects of desferrioxamine in cytomegalovirus-infected rat liver. *Transplantation* 1999;68: 1753-61.
- 2) Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989;30:510-4.
- 3) Colet JM, Cetiner E, Hedlund BE, Muller RN. Assessment of microvascular integrity in the isolated perfused rat liver by contrast-enhanced MRI. Attenuation of reperfusion injury by

- conjugated deferoxamine. *Magn Reson Med* 1996;36:753-7.
- 4) Chung KY, Kim MS, Lee JH, Kim YS, Choi KJ, Choi YM. Live donor partial liver harvest for canine liver transplantation: Development of an innovative technique for surgical training. *Surg Today* 2002;32:711-5.
 - 5) Spiegel HU, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, Kranz D. Organ preservation with EC, HTK, and UW, solution in orthotopic rat liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg* 1999;12(4):195-203.
 - 6) Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H, Thurman RG. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation* 1998;65(8):1015-20.
 - 7) Eiseman B, Knipe P, Koh Y, Normell L, Spencer FC. Factors affecting hepatic vascular resistance in the perfused liver. *Ann Surg* 1963;157:532-47.
 - 8) Aharinejad S, Nourani F, Egerbacher M, Larson EK, Miksovsky A, Bock P, Firbas W, McCuskey RS, Marks SC Jr. Sphincters of canine hepatic sublobular veins respond to eEndothelin-1 and -3. *Anat Embryol* 1997;196:299-309.
 - 9) Marzi I, Knee J, Buhren V, Menger M, Trentz O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 1992;111:90-7.
 - 10) Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1991;15:507-14.
 - 11) Amersi F, Dulkanchainun T, Nelson SK, Farmer DG, Kato H, Zaky J, Melinek J, Shaw GD, Kupiec-Weglinski JW, Horwitz LD, Horwitz MA, Busuttil RW. A novel iron chelator in combination with a P-selectin antagonist prevents ischemia/reperfusion injury in a rat liver model. *Transplantation* 2001; 71:112-8.
 - 12) Watanabe BI, Hicks GL Jr, Wang T. Deferoxamine given at reperfusion improves function of the cold-stored rat heart. *J Surg Res* 1994;57:164-9.
 - 13) Corcoran PC, Wang Y, Katz NM, Rajan SS, Analouei AR, Foegh ML, Wallace RB. Platelet activating factor antagonist enhances lung preservation in a canine model of single lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104(1):66-72.
 - 14) Lesnfsky EJ, Hedlund BE, Hallaway PE, Horwitz LD. High-dose iron-chelator therapy during reperfusion with deferoxamine-hydroxyethyl starch conjugate fails to reduce canine infarct size. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;16(4):523-8.