

Euro-Collins 용액 또는 UW 용액에 단기간 냉장 보관된 개의 부분간을 이용한 이식에서 이식 후 관찰되는 간장 조직 손상의 비교

연세대학교 ¹장기이식 연구소 및 의과대학 ²외과학교실, 이화여자대학교 의과대학 ³외과학교실 및 ⁴병리학교실, ⁵연세대학교 원주의과대학 외과학교실

정구용^{1,3} · 김명수^{1,5} · 채윤석² · 이종훈² · 성순희⁴ · 최금자³ · 이우정² · 김유선^{1,2}

Liver Pathology after Transplantation of Short-Term Preserved Canine Liver with Euro-Collins or UW Solution

Ku Yong Chung, M.D.^{1,3}, Myoung Soo Kim, M.D.^{1,5}, Yoon Seok Chae, M.D.², Jong Hoon Lee, M.D.², Soon Hee Sung, M.D.⁴, Kum Ja Choi, M.D.³, Woo Jung Lee, M.D.² and Yu Seun Kim, M.D.^{1,2}

¹Research Institute for Transplantation, ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, Departments of ³Surgery and ⁴Pathology, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea, and ⁵Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Purpose: In living donor partial liver transplantation, the organ cold preservation time is relatively short, thereby, Euro-Collins (EC) solution could be used with comparable result to University of Wisconsin (UW) solution. **Methods:** About 70% partial liver was harvested and reimplanted after 3.5 hours of cold preservation with EC or UW solution in same mongrel dog weighing about 25 kg. In 5 cases EC solutions were used, and UW solutions were used in another 5 cases. Blood sample and liver biopsy specimens were taken just before donor hepatectomy, postreperfusion 1 hour, 7 days and 14 days after operation. Serum aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH) were monitored, and morphologic grading of liver injury was performed as Spiegel et al.

reported in 1999. **Results:** Total ischemic time was 4 hours and 27 minutes in average. At 1 hour after reperfusion, there were no significant differences in liver enzyme and morphological score between the UW solution group and the EC group. Survival rate was similar in two groups; 2 dogs were alive at postoperative 7th day, and 1 dog was alive at postoperative 14th day in each group. **Conclusion:** In living donor partial liver transplantation where both operations could be performed simultaneously with relatively short graft preservation time, EC solution could be used with comparable results to UW solution. (*J Korean Soc Transplant* 2001;15:134-138)

Key Words: Liver pathology, Experimental liver transplantation, Preservation solution, Euro-Collins solution, UW solution

중심 단어: 단기간 냉장, 간장이식, 간장조직손상

서 론

면역억제제의 개발 및 수술술기의 발전과 함께 장기 보존액의 사용과 발전은 현재의 간이식이 가능하게 되는데 크게 기여하였으나 이식실패를 야기하는 조기 무기능이식은 아직도 약 5~15%에서 발생하고 있으며, (1-3) 이러한 조기 무기능 이식의 가장 중요한 원인으로 냉허혈 보관 및 재관류 시에 발생하는 손상이 지목되어왔다. 또한 재관류 전에 시행한 조직 검사로는 이식간의 생존가능성 여부를 판단할 수 없다는 사실에서 냉보관 시기보다도 재관류 동안에 조직손상이 더 심하게 발생한다고 생각되며 (2) 이러한 손상을 줄이기 위한 방안이 연구되어지고 있다. Euro-Collins (EC) solution은 수년간 임상에서 유용하게 사용되어졌던 보존용액이었으나, 인체간을 보존할 수 있는 냉보존 시간이 4~10시간으로 짧아서 그 사용에 있어서 제한점이 많았다. 이어서 개발되어진 University of Wisconsin (U/W) solution은 장기 보존 시간을 크게 연장하여 약 20시간까지 냉보존할 수 있어 간이식을 응급수술에서

책임저자 : 김유선, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752
Tel: 02-361-5563, Fax: 02-313-8289
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 1994년도 연세대학교 학술 연구비(1994070)의 지원과 연세대학교 장기이식연구소의 보조금 지원으로 이루어졌음.

본 논문은 2001년 7월 국제간이식학회(ILTS, 베를린)와 2001년 6월 제26회 일본외과계연합학회 학술대회(JCS, 동경)에서 각각 발표되었음.

채윤석: 관동대학교 의과대학 외과학교실(현주소)

반계획적으로 여유 있는 수술이 되게 하였다.(4,5) 그러나 뇌사자 장기의 부족을 해결하는 방안으로 증가하기 시작한 생체 부분간 이식의 경우는 계획된 수술을 하게 되며 뇌사자 간이식과 같이 오랜 시간의 장기 보존 시간이 필요치 않다. 따라서 4시간 정도의 짧은 장기보존에는 좀더 저렴하고 점도가 낮아서 초기 관류가 용이한 EC solution을 사용하는 것이 가능한가 알아보기 위해, 본 저자들은 개의 생체 부분간을 이용한 이식에서 UW solution과 EC solution을 각각 보존용액으로 사용하여 그 결과를 이식 후 간 기능 검사와 조직 병리 소견으로 비교하였다.

방 법

1) 수술방법

15~25 kg의 잡종견을 구입하여 일반사료로 사육한 다음 수술 전 12시간 동안 금식 후 수술을 하였다. 요측 피

정맥을 통해 Pentothal sodium 정주로 마취 유도 후 기관 삽관하여 호흡기를 거치한 다음 Isoflurane 흡입으로 마취를 유지하였으며 주기적으로 Pancuronium을 주입하여 근육이완을 시켰다. Chevron 절개창으로 개복 후 간 문부를 노출하여 좌측 간엽(Left lobe)으로 가는 담도지를 분리 결찰 하고 절단한 후 polyethylene tube를 삽관하였다. 담낭 절제 후 간 문부에서 좌측 문맥을 충분한 길이로 확보하고 우간동맥을 결찰하여 총간 동맥을 분리한 다음, 중간 간 정맥을 결찰하였다. 간의 우 내측엽(right medial lobe)과 우 외측엽(right lateral lobe) 사이에 미상엽(caudate lobe)이 안장처럼 하대정맥(inferior vena cava)위에 위치하는데 이 부분의 간 실질을 절제, 분리해 놓음으로써 간의 우 내측엽, 방형엽(quadrate lobe), 좌 내측엽(left medial lobe) 및 좌 외측엽(left lateral lobe), 미상엽의 유두돌기(papillary process of caudate lobe)를 포함하는 약 70%의 간이 혈관으로만 연결된 채로 구득 준비가 완료되었다. 좌측 문맥에

Table 1. 간조직 손상정도에 따른 조직학적 등급 점수표(Spiegel et al.)

Phase of injury	Parameter	Score/degree of severity		
		Low	Medium	Extensive
Pre-preservation/harvesting	Portal cellular infiltration		1	2
	Kupffer cell reaction	1	1	1
	Intralobular necrosis	3	8	15
	Fatty degeneration	1	3	5
Cold preservation	Kupffer cell reaction			2
	Fatty degeneration	1	3	5
	Intralobular necrosis	3	8	15
	Interstitial edema	2	4	6
	Intracellular edema	2	4	6
	Sinusoidal alteration	2	4	6
	Kupffer cell reaction			5
Rewarming/reperfusion	Fatty degeneration	1	3	5
	Intralobular necrosis	3	8	15
	Interstitial edema	2	4	6
	Intracellular edema	2	4	6
	Sinusoidal alteration	2	4	6
	Hyperemia	2	8	15
	Intralobular necrosis	3	8	15
	Interstitial edema	2	4	6
	Intracellular edema	2	4	6
	Sinusoidal alteration	2	4	6
Late injury	Hyperemia	2	8	15
	Bile duct proliferation	3	6	9
	Cholestasis	1	2	3
	Cholangitis	2	4	6
	Vascular alteration	3	6	8
	Regeneration	-1	-5	-10

삼관하여 4°C 하트만 수액으로 관류를 시작하면서 총 간 동맥, 좌간정맥에 혈관감자를 거치한 후 절제하였다.(6) 체외로 배출된 부분간을 UW group은 UW solution 1 liter를, EC group은 EC solution 1 liter를 이용하여 각각 관류시킨 후 냉장 보관하였다. 절제된 부분간을 냉장보관 하는 동안 실험 전의 마취는 계속 유지되었다. 3시간 30분 동안 냉장 보관후 부분간을 원래 떼어낸 자리에 이식하였다. 문맥과 간정맥은 각각 Prolene 5-0를 사용하여 단단 문합한 후 혈관검자를 풀고 재관류를 시작하였다. 간동맥은 Prolene 8-0를 이용하여 3.5배 Loupe의 시야에서 처음 절단면에서 단단 문합한 후 혈류를 재개하였고 이후에 담도를 단단 문합하였다.

2) 간기능 검사 및 조직학적 비교, 통계

부분간 절제 직전 및 부분간 재관류 1시간 후 각각 고 동맥에서 채혈하여 aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), lactic dehydrogenase (LDH)를 측정하였고 같은 시간에 간 조직 생검을 실시하여 광학현미경 하에서 형태학적 점수화를 시도하였다. 간조직의 형태학적 반정량적(semi-quantitative) 점수화는 Spiegel 등(7)의 방법을 원용하여 이중 pre-preservation/harvesting, cold preservation, rewarming/reperfusion 점수를 각각 prepreservation score (prepre.), postpreservation score (postpre.)와 reperfusion 1 hour score (rep. 1 hr)로 이용하였다(Table 1). Kupffer cell reaction은 Low와 Medium은 1점씩, Extensive 한 경우는 2점을 주었다. 모든 조직표본은 8.75% buffered formalin에 고정시켰다가 파라핀 블록으로 만들어 표준적인 조직학적 과정을 거쳐 Hematoxylin-eosin 염색을 한 후 관찰하였다. 각 군사이의 비교는 SPSS 통계 패키지를 이용한 Independence Samples Student's T-test를 하였으며, 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

UW군과 EC군에서 각각 5마리 씩 부분간 자가이식을 완료하였다. 평균 총 허혈 시간은 각각 4시간 27분, 4시간 35분이었고 체중은 각각 23.7 kg, 22.8 kg으로 양군 사이에 차이가 없었다. UW군에서 수술 후 3일째 1마리, 5일째 2마리, 13일째 한 마리가 사망하였으며 EC군에서는 2일째, 4일째, 5일째, 8일째 각 한 마리씩 사망하였다. 나머지 생존 실험견은 수술 후 2주에 안락사 시켰다. UW군에서 1마리가 2일째 evisceration되어 재봉합 하였으나 사망하였으며, EC군에서 1마리가 2일째 외경정맥에 거치한 수액관을 물어뜯고 출혈 후 사망하였다. UW군의 이식간에 비해 EC군의 이식간이 외견상에도 부종이 심하여 쉽게 손상을 받는 것을 경험하였고 이때 손상 받은 부분이 재관류 후에 심한 출혈을 유발시키므로 특히 조심해야 했다.

EC군에서 fatty degeneration이 있었던 것으로 보아(Table 2) 수술 전 관리상 작은 문제가 있었을 것으로 판단된다

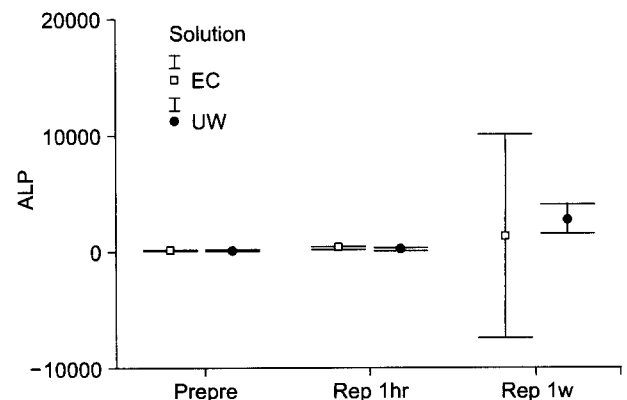


Fig. 2. ALP levels prepre: before donor hepatectomy, rep 1 hr: reperfusion 1 hour, rep 1w: reperfusion 1 week.

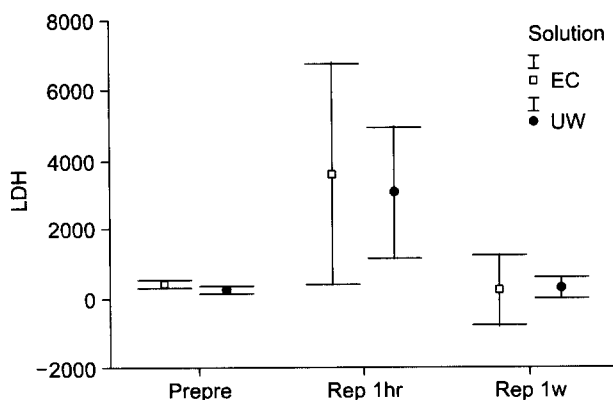


Fig. 1. AST levels prepre: before donor hepatectomy, rep 1 hr: reperfusion 1 hour.

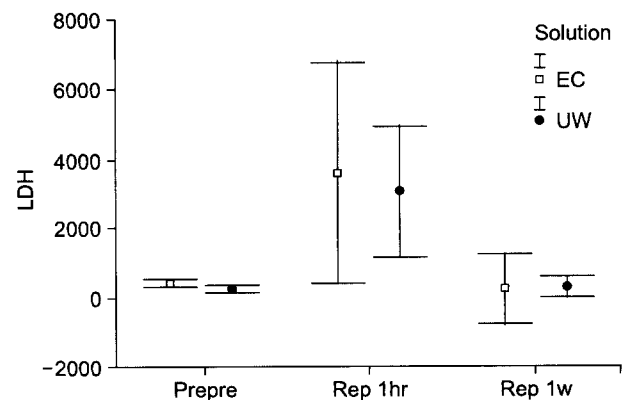


Fig. 3. LDH levels prepre: before donor hepatectomy, rep 1 hr: reperfusion 1 hour, rep 1w: reperfusion 1 week.

Table 2. 간구득전, 재관류 전 및 재관류 1시간후의 조직 검사 소견(EC/UW)

	Lob. N	Fat. Deg.*	K.R. [†]	Port. infiltr. [‡]	Int. ed. [§]	C. edema	Hyperemia	Sin alt. [¶]	Score
간구득 전	0/0	3/0	0/0	0/1					3/1
재관류 전	8/11	3/0	1/1	—	8/2	6/4		8/10	34/28
재관류 후	11/16	6/9	4/3	0/0	14/14	8/8	42/45	20/24	105/119

*Fat. Deg. (Fatty Degeneration); [†]K.R. (Kupffer cell Reaction); [‡]Port. infiltr. (Portal cellular infiltration); [§]Int. ed (Interstitial edema); ^{||}C. edema (Intracellular edema); [¶]Sin alt (Sinusoidal alteration).

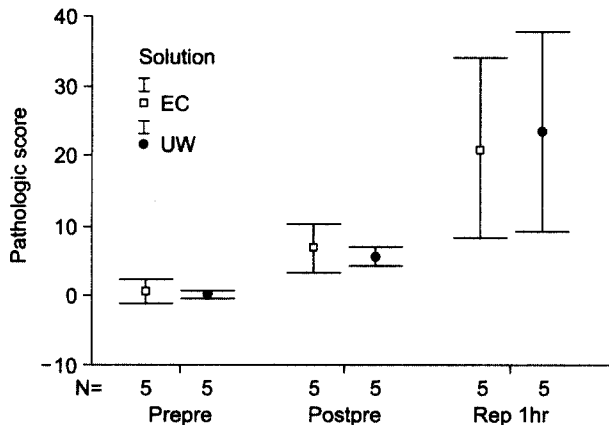


Fig. 4. Pathologic score: prepre=before donor hepatectomy, postpre=before reperfusion, Rep 1 hr=reperfusion 1 hour.

(Fig. 3, 4). 재관류 1시간 후 양군의 간기능 검사($p=0.3, 0.4, 0.7$) 및 조직검사 점수($p=0.7$)는 의미 있는 차이가 없었다(Fig. 1, 2, 3, 4). EC군에서 재관류 전 상대적으로 심했던 간질 및 세포부종은 재관류 1시간 후 UW군과 차이가 없을 정도로 회복됨을 확인할 수 있었다(Table 2). 재관류 1주 후 간기능 검사에서도 역시 의미 있는 차이를 발견할 수 없었으나($p=0.6, 0.2, 0.5$) 개체수가 적어 통계적인 의의는 없다고 본다.

고 찰

이식수술 후 일주일 이내에 많은 수의 실험견이 사망하여 2주 이상 생존한 예에서의 조직 검사 소견을 비교할 수 없었던 점은 본 연구에서 아쉬웠던 점이다. 자가이식이었기 때문에 수술 시 수혈을 한 파인트 이내로 거의 하지 않았던 점과 수술 후 3일째부터는 수술 후 관리가 어려웠던 사정 등이 장기 생존 예가 적었던 이유중의 하나였다. EC군에서 fatty degeneration이 있었던 예가 있었는데 수술 전 관리 중 바뀌어진 환경에 잘 적응하지 못했던 경우였다.

1999년 Spiegel 등(7)은 이식수술 후 다양한 시간대에 광

학현미경 시야에서 관찰할 수 있는 구조적 변화를 반 정량적으로 평가하는 scoring scale을 개발하여 발표하였다. 간이식 후 이식간의 기능회복 여부를 판단하는데 있어서 담즙의 생산과 AST, LDH 등 생화학적 검사가 중요한 근거가 되지만 허혈 및 재관류 손상의 연구에 있어서 광학현미경 조직검사상의 반 정량적 점수화는 향후 이 분야의 연구에 있어 기준이 될 수 있을 것으로 본다. Spiegel 등의 연구는 쥐의 간 이식 조직을 이용하였는데 본 연구에서는 이 scoring system중 간 구득 직전 과 재관류 전후의 점수를 같은 방식으로 이용하였다. 생화학적 검사와 조직학적 검사에서 모두 EC군과 UW군에서 의미 있는 차이를 발견할 수 없었는데, 이러한 사실이 꼭 이 정도의 냉허혈 시간 이면 EC solution을 사용하는 것이 유리함을 주장할 수 있는 배타적인 근거라고 할 수는 없지만 EC solution을 기본 용액으로 한 다양한 보존 용액을 개발하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 본 연구에 이용된 EC solution은 연세대학교 영동세브란스병원 약국에서 실험용으로 제조한 것을 사용하였다.

UW solution에서는 hepatocyte의 blebbing과 swelling이 EC solution에 비해 서서히 일어나며 육안 소견으로도 조직 부종이 현저히 적은 것을 알 수 있다. 그러나 hepatocyte의 blebbing과 swelling은 재관류 후 빠른 시간에 회복되는 것으로 보아 허혈 및 재관류에 의한 hepatocyte의 변화는 가역적인 변화로 생각되어진다.(8) 본 실험에서도 EC군의 이식간은 부종에 의해 쉽게 손상을 받고 곤혹스러운 출혈의 원인이 되기도 했지만 재관류 후의 조직검사 소견상 UW군에 비해 세포부종이나 간질 부종이 심하지 않음을 확인할 수 있었다.

Sinusoidal endothelial cell은 냉 보존 동안에 구형으로 변하면서 판모양으로 펼쳐졌던 세포질을 위축시키게 된다. 이러한 변화는 재관류 후 다시 정상으로 돌아오나 실패한 이식편의 경우사실상 모든 sinusoidal endothelial cell의 생명력이 소실되고 sinusoidal lining이 박탈되는 것을 볼 수 있다.(9) 쥐의 간에서는 이러한 변화를 EC solution 보관 시 8시간 후, UW solution 보관시 16시간 후에 확인할 수 있는데, 4시간여로 짧은 냉보존 시간을 거친 본 실험에서

는 EC solution과 UW solution 사이에 의미 있는 차이를 발견할 수 없었다.

본 연구의 결과로 4시간 여의 짧은 냉보존 기간 동안에는 EC solution을 보존 용액으로 사용하여 큰 무리가 없다고 생각되며 현재 다양하게 연구되고 있는 여러 가지 가능성 있는 물질들을 순차적으로 또는 동시에 사용함으로써 재관류 손상을 줄이는 여러 가지 시도가 필요하다고 생각한다.

결 론

생체 부분 간이식 같이 비교적 냉허혈 시간이 짧은 간이식에서 EC solution이 UW solution에 비교해서 나쁘지 않은 결과를 얻을 수 있는지 알아보고 이를 기본 용액으로 한 다양한 보존 용액의 개발에 도움이 될 수 있는지 알아보기 위해, 25 Kg 정도의 성견을 이용한 생체 부분간자가 이식 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 부분간 이식 후 재관류 1시간 및 재관류 1주 후에 실시한 간기능 검사(AST, ALP, LDH)에서 EC solution군과 UW solution군에서 의미 있는 차이를 발견할 수 없었다.

2) EC solution 사용군에서 재관류 전 조직 및 세포 부종이 심하였으며 이렇게 부종이 심한 이식간은 수술시 조작에 조심하지 않으면 심각한 출혈을 야기하는 손상을 줄 수 있다. 그러나 수술 후 1시간에 실시한 조직검사 소견에서 이러한 부종은 UW solution 사용군에 비해 더 심해지지 않는 것으로 확인되었다.

3) 이상의 결과로 4시간 이내의 짧은 냉보존이 필요한 경우 EC solution이 점도가 낮아 관류가 용이하며 저렴하여 충분히 시도해 볼 만하다고 생각되며, 국내에서도 자체 생산이 가능한 이 용액을 이용하여 다양한 보존 용액의 개발에 이용할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Kahn D, Esquivel CO, Makowka L, Machigal-Torres M, Yunis E, Iwatsuki S. Causes of death after liver transplantation in children treated with cyclosporine and steroids. *Clin Transplant* 1989;3:150-5.
- 2) Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E₁. *Transplantation* 1989;48:447-53.
- 3) Furukawa H, Todo S, Imventarza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti-Foglieni C, Broznick B, Bryant J, Day R, Starzl TE. Effect of cold ischemia time in the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 1991;51:1000-4.
- 4) Belzer FO, Southard JH. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45:673.
- 5) Momii S, Koga A. Time related morphological changes in cold stored rat livers: a comparison of Euro-Collins solution with UW solution. *Transplantation* 1990;50:745.
- 6) 정구용, 김명수, 김유선 등. 개의 부분간 자가이식 모델의 확립과 Prostaglandin I₂에 의한 허혈간 보호효과. *대한이식학회지* 1999;13(2):201.
- 7) 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.
- 8) Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemaster JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold, ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 1988;45:834-37.
- 9) McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-91.