

# 폐관류, 보존 및 재관류 과정이 폐이식에 미치는 영향에 관한 광학 및 전자현미경적 연구

계명대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>생리학교실 및 <sup>2</sup>흉부외과학교실

권건영 · 임영근 · 배재훈<sup>1</sup> · 박창권<sup>2</sup>

## Flush Perfusion, Preservation and Reperfusion Effects in Lung Transplantation: Light Microscopic and Ultrastructural Study

Kun Young Kwon, Young Keun Lim, Jae Hoon Bae<sup>1</sup>, and Chang Kwon Park<sup>2</sup>

Departments of Pathology, <sup>1</sup>Physiology and <sup>2</sup>Thoracic and Cardiovascular Surgery, Keimyung University School of Medicine, Taegu 700-712, Korea

This study was undertaken to investigate the morphologic changes following flushing, preservation and reperfusion procedures in a canine lung allotransplantation model. Donor lungs were flushed with modified Euro-Collins (MEC) solution, low potassium dextran glucose (LPDG) solution or University of Wisconsin (UW) solution, then stored at 10°C for 20 hours. Light microscopic and electron microscopic features of the lungs were examined after flushing, preservation and 2 hours after reperfusion. After flushing light microscopy showed focal mild alveolar collapse and interstitial edema. After preservation the lung tissue showed multiple foci of alveolar collapse, consolidation, and alveolar epithelial cell damage. After reperfusion the lung tissue showed diffuse alveolar collapse, consolidation and many destroyed cellular debris in the alveolar lumina. After flushing electron microscopy showed focal alveolar collapse and mild swelling of type I epithelial cells. After preservation both type I epithelial cells and endothelial cells were swollen and destroyed focally. Some type I epithelial cells were detached from the basal lamina. The endothelial cells showed luminal protrusion of tactile-like structure and vacuoles of the cytoplasm. After reperfusion the lung tissue showed fibrin material in the alveoli, prominent type I epithelial cell swelling with fragmented cytoplasmic debris and marked endothelial cell swelling with vacuoles or tactile-like projections. The alveolar macrophages showed active phagocytosis. After preservation scanning electron microscopic examination of the pulmonary arteries showed multiple patchy areas of swelling or conglomerated lesions in the inner surface of the pulmonary arteries. In conclusion, the ultrastructural changes associated with flushing were mild in severity, the donor lungs were injured during the preservation, and further damage occurred during the reperfusion. (**Korean J Pathol 1998; 32: 967 ~ 977**)

**Key Words:** Lung transplantation, Flush perfusion, Preservation, Reperfusion, Electron microscopy

### 서 론

인체 장기의 이식수술은 전세계적으로 매년 증가하

고 있으며 이식후 발생하는 조직거부반응에 대한 다양한 치료법이 개발되어 이식 받은 환자의 예후가 좋아지고 있다.<sup>1,2</sup> 국내에서도 신, 간, 골수 및 심장 등에 대한 이식술이 임상에 적용한 지 오래되어 이식 성공률도 매년 높아지고 있다.<sup>3~5</sup> 폐이식은 난치성 질환인 폐기종, 본태성 폐고혈압, 낭성섬유증과 만성 간질성섬유증 등을 가진 말기 환자의 마지막 치료 방법으로 시도하고 있다.<sup>6</sup> 그 동안 많은 임상 증례들이 문헌에 보고되고 있으며 폐이식 관련 연구를 수행하는 연구자들이 폐이식

접 수: 1998년 7월 20일, 게재승인: 1998년 9월 8일  
주 소: 대구광역시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-712  
계명대학교 의과대학 병리학교실, 권건영

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1995년 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

성공률을 높이기 위해 기초 및 임상연구를 활발히 진행하여 왔다.<sup>2,7-9</sup>

폐이식은 Demikhov<sup>10</sup>가 최초로 성견을 대상으로 폐엽 이식 실험을 실시한 후, Metra<sup>11</sup>가 성견 폐의 자가이식술을 성공시켰으며, Juvenelle<sup>12</sup>도 폐자가이식술에 관한 연구를 발표하였다. 이들 초기 연구들에서 이식후 공여폐에서 조직거부 반응이 나타남을 관찰하였다. Cooley<sup>6</sup>은 최초로 인체에 심폐이식을 실시하였으며, 그 후 심폐이식 수가 증가하여 국제 심폐이식학회 (International Society for Heart and Lung Transplantation)의 통계에 의하면 1995년도를 기준으로 심폐이식 수가 1,708예, 일측 폐이식이 2,465예였으며 양측 폐이식은 1,344예이었다.<sup>2</sup> 국내에서는 1996년 7월 연세의대에서 특발성 폐섬유증을 가진 52세 남자 환자에게 처음으로 일측 폐이식을 실시한 후 몇 기관에서 임상 환자를 대상으로 폐이식을 실시하였다. 최근 국내 여러 의료기관에서는 폐이식 성공을 목표로 주로 실험 동물을 대상으로 폐이식술을 실시하여 폐이식 과정에서 일어날 수 있는 제반 문제점등을 파악하고 필요한 정보를 수집하려는 연구를 활발히 시도하고 있다.<sup>13-15</sup>

폐이식 전 후 발생할 수 있는 조직손상으로는 이식 전 공여폐 (donor lung)의 관류 (flushing) 및 보존 (preservation)과정에서 초래되는 허혈성 손상과 이식 직후 재관류 (reperfusion)과정에서 발생하는 조직손상 및 폐이식후 야기되는 급성 및 만성 거부반응과 폐감염을 들 수 있다.<sup>16-19</sup> 폐이식의 성공을 위해서는 이들 폐조직 손상을 일으키는 각 요소들을 최소화하거나 예방하는 것이 필요하다.

특히 폐이식 전에 공여폐가 미리 제공될 경우 공여자로 부터 적출한 후 이식때 까지 공여폐를 잘 보존하는 것이 폐이식의 성공률을 높이기 위해서 꼭 필요하다. 따라서 폐이식을 많이 수행하는 의료기관이나 의학연구소에서는 공여폐에서 발생하는 허혈 상태를 최대한 줄이면서 신선하게 공여폐를 보존하는 것에 중점을 두어 각종 폐 보존액 개발과 보존방법 개선에 힘쓰고 있다.<sup>18,20,21</sup> 최근 폐관류와 보존 용액으로 고칼륨 성분의 세포내액성 보존액인 University of Wisconsin (UW) 용액 및 Euro-Collins용액과 세포외액성 용액인 low potassium dextran glucose (LPDG) 용액을 사용하여 성공적인 폐이식을 실시한 증례들이 보고되면서 공여폐의 보존 상태를 잘 유지하려는 연구가 계속되고 있다.<sup>19,22,23</sup> 상기한 연구들은 폐이식에 관한 임상적 측면에서 주로 실시한 연구들이며 공여폐의 보존과정을 전후해서 폐조직의 초미형태학적 변화에 관한 연구보고는 국내외적으로 극히 제한되어 있다.

따라서 본 연구에서는 공여폐에 폐관류를 시킨 후 폐조직의 형태학적 변화와, 폐보존 과정을 거치면서 발생하는 폐조직 손상과, 폐이식 직후 재관류를 시행한 후 초래되는 폐조직 손상을 광학 및 전자현미경적으로 검색하였다. 그리고 폐보존액 선택에 따른 조직의 초미형

태학적 변화를 관찰하여 폐이식 전후 각 과정에서 초래되는 형태학적 변화가 폐이식 성공에 미칠 수 있는 영향을 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물로는 암수 구분 없이 체중이 20~25 kg되는 한국산 잡종 성견 50마리를 사용하였으며 형태학적 검색이 가능하였던 46마리를 대상으로 2마리씩을 선택하여 공여견과 수용견으로 나누어 23회에 걸쳐 폐이식을 실시하였다. 폐이식 전 실험견에게 정상먹이를 주었다. 공여폐에는 관류와 보존액으로 modified Euro-Collins (MEC) (n=9), LPDG (n=13) 및 UW (n=1)용액을 각각 사용하였고 첨가제로는 prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)과 verapamil (VP)을 투여하였다 (Table 1).

### 2. 연구방법

실험견을 공여견과 수용견으로 나누고, 공여견에게 halothane으로 전신 마취를 한 후 폐동맥을 통해 헤파린 (500 U/kg)을 주입한 후 카테타를 삽입하여 40 cm 높이에서 4°C LPDG, MEC 또는 UW 용액으로 폐관류를 실시하였다. 첨가제 투여 군에서는 폐관류를 하기 전에 체중 1 kg당 20 µg의 PGE<sub>1</sub>을 폐동맥 내로 60초 동안 서서히 주입하였으며, VP는 20 mMol/L를 폐동맥 내로 주입하였다. 심폐 블록을 적출하여 폐관류액과 동일한 용액을 담은 3겹의 비닐주머니에 넣은 다음 냉장고에 보관하였다. 공여폐의 총 허혈 시간은 공여견에 혈류 차단 후부터 관류, 냉장 보존 및 이식 후 2시간 경과 한 후 혈류 재개통 (재관류)까지 시간으로 정하였다. 공여폐의 허혈시간은 예비실험을 거쳐서 적절하다고 판단된 약 20시간으로 하였다. 수용견의 좌측 전폐를 절제 한 후 공여견의 심폐 블록에서 좌측 폐를 박리 하여 좌 폐이식을 실시하였고 2시간이 지나 공여폐에 재관류를 하였다. 형태학적 검색을 위하여 대조군으로는 수용견

Table 1. Preservation solution and perfused case (n=23)

Preservation solution	Case No.
MEC	1
MEC + VP	2
MEC + VP + PGE <sub>1</sub>	6
LPDG	7
LPDG + VP	1
LPDG + VP + PGE <sub>1</sub>	5
UW + PGE <sub>1</sub>	1

MEC: modified Euro-Collins, LPDG: low potassium dextran glucose, UW: University of Wisconsin, VP: verapamil, PGE<sub>1</sub>: prostaglandin E<sub>1</sub>

의 좌측 폐를 선택하였다. 실험군으로는 관류과정 직후와 보존과정 후 우측 공여폐를 선택하였고, 재관류 시작 후 2시간째에 좌측 공여폐를 선택하였다. 실험군의 각 과정에서 선택한 폐의 전엽을 포함하는 가장 넓은 면으로 시상 절단 (sagittal section)을 하여, 투과 및 주사 전자현미경 관찰을 위한 폐조직을 채취하고, 나머지는 모두 광학현미경용 조직 재료로 사용하였다.

1) 광학현미경 관찰: 적출한 폐장조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열 에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투와 파라핀 포매 과정을 거쳐서 4  $\mu$ m의 박절편을 만들어 H&E, Masson trichrome과 Verhoeff elastic염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 투과전자현미경 관찰: 투과전자현미경용으로 제공된 폐장조직을 1 mm<sup>3</sup> 크기로 세절하여 폐포내 공기를 탈기방법으로 제거하였다. 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액에서 2시간 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척한 후 계열 에탄올로 탈수를 하였다.<sup>24</sup> Propylene oxide로 치환한 후, Luft방법<sup>25</sup>에 의한 epon 혼합물로 포매 하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1  $\mu$ m 두께로 박절하여 toluidine blue 단염색을하고 광학현미경상에서 관찰 부위를 결정하였다. 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에서 diamond 칼을 부착하여 40~60 nm의 회백색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson<sup>26</sup> 및 Reynolds<sup>27</sup> 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

3) 보존액 선택과 첨가제의 사용에 따른 폐조직의 초기형태학적 관찰: 본 실험에서 각종 폐보존액과 첨가제의 사용에 따른 폐조직의 초기형태학적 변화의 검색이 가능하였던 10예를 대상으로 폐보존후 폐조직을 각각 채취하여 투과전자현미경 관찰을 실시하였다. 폐포의 형태 변화, 폐포 상피세포와 폐포 모세혈관 내피세포의 변화를 관찰하고, 대식세포의 수적 증가 및 탐식 정도와 폐간질 부위의 변화를 관찰하였다. 초기형태학적 변화가 거의 없는 경우를 (-), 부분적으로 경한 변화를 보이면 (+), 중등도의 변화를 관찰할 수 있으면 (++) , 미만성으로 뚜렷한 변화를 관찰할 경우 (+++)로 구분하여 관찰하였다.

#### 4) 주사전자현미경 관찰:

(1) 폐동맥 내막 표면 관찰: LPDG 또는 MEC 용액을 보존액으로 사용한 실험견에서 폐이식을 실시하기 전 폐동맥의 일부분을 채취한 후 절개하여 폐동맥 내면을 코르크 판에 편편하게 펼친 후 압핀으로 시료를 고정하였다. 폐동맥 내면을 생리식염수로 점적하여 깨끗이 씻었다. 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 용액으로 전고정을 한 후 0.1 M 인산염 완충액으로 다시 세척하여 2% 탄닌산으로 12시간 침투시킨 다

음 완충 용액으로 세척하였다. 1% OsO<sub>4</sub> 용액으로 전도 염색을 실시하고 계열 에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로 침투를 시킨 후 Hitachi HCP-2형 임계점 건조기로서 이산화탄소를 사용하여 임계점 건조를 실시하였다.<sup>28</sup> 건조된 시료를 시료대에 부착한 후 이온증착기 (IB-3 Ion-coater, Eiko Co., Japan)를 사용하여 Pt-Pd로 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

(2) 폐실질 조직 관찰: 폐조직을 1×1×4 mm정도 크기로 세절한 후 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde 고정액에 넣어 1일간 더 고정한 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액으로 2시간동안 후고정을 하고 0.1 M 인산염 완충 용액으로 수세하였다. 25% dimethyl sulfoxide (DMSO)와, 50% DMSO에 30분씩 담근 다음 액체질소로 동결하고 조직을 할단 (cracking)하였다. 할단된 조직을 50% DMSO에 녹여 수세한 후 2% 탄닌산에 12시간 침투시킨 다음 완충 용액으로 세척하였다. 폐동맥 내막의 표면 관찰을 위한 시료제작 방법과 동일한 과정을 거쳐서 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

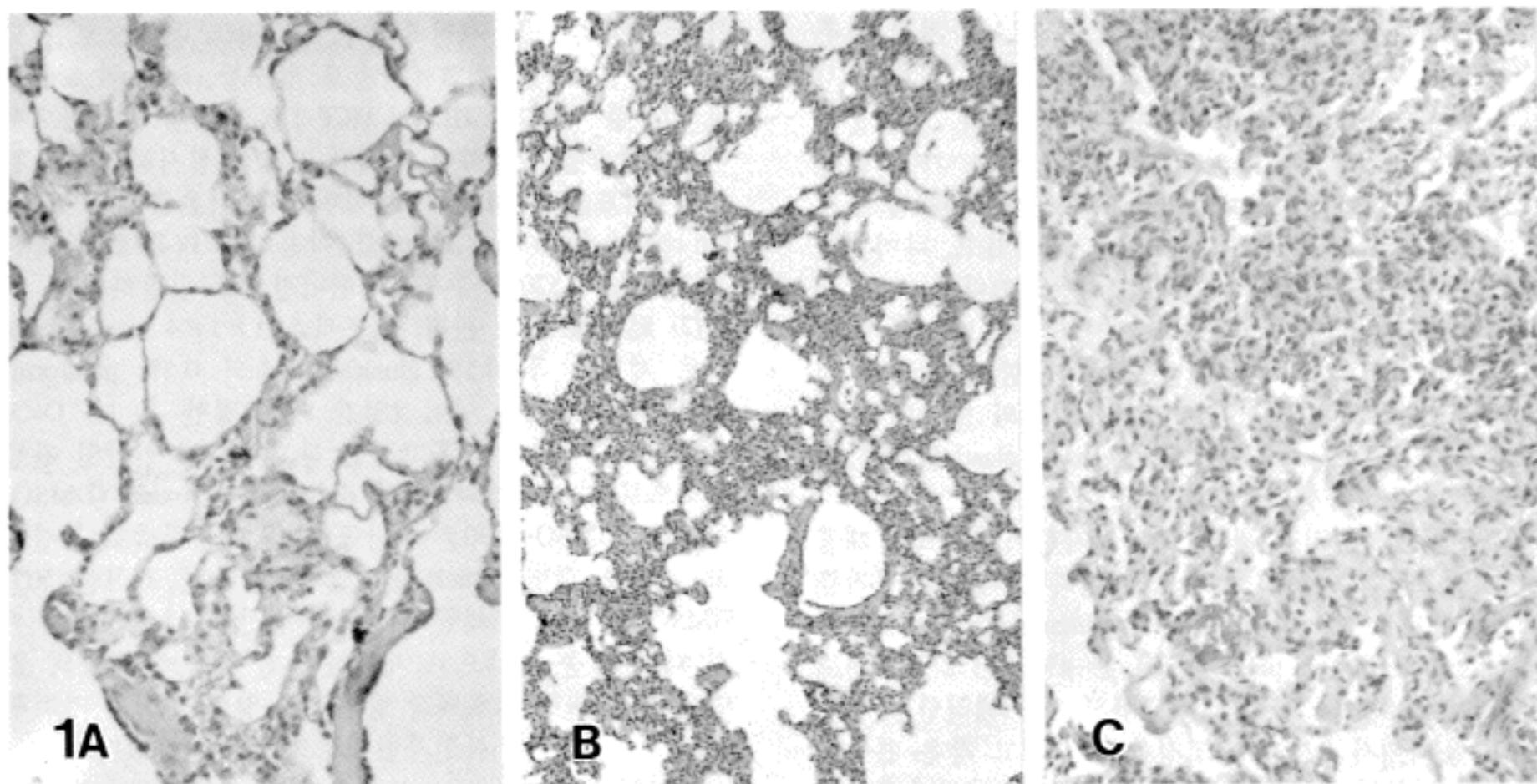
### 1. 광학현미경 소견

관류과정후 채취한 폐조직은 저배율에서 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었으며 고배율에서 국소적인 폐포 허탈 (collapse)과 경한 간질 내 부종이 보였다 (Fig. 1A). 보존과정후 폐조직에서는 다발성의 폐포 허탈을 보였으며 고배율에서 폐포벽의 부종을 보였고 국소적으로 폐포상피세포의 손상을 동반하였다 (Fig. 1B). 재관류를 한 후 폐조직에서는 미만성으로 폐실질의 허탈과 경화를 보였으며 고배율에서 간질의 부종과 비후가 관찰되었고 폐포상피세포의 손상과 폐포강 내에 세포 잔해물 (cell debris)을 흔히 볼 수 있었다 (Fig. 1C).

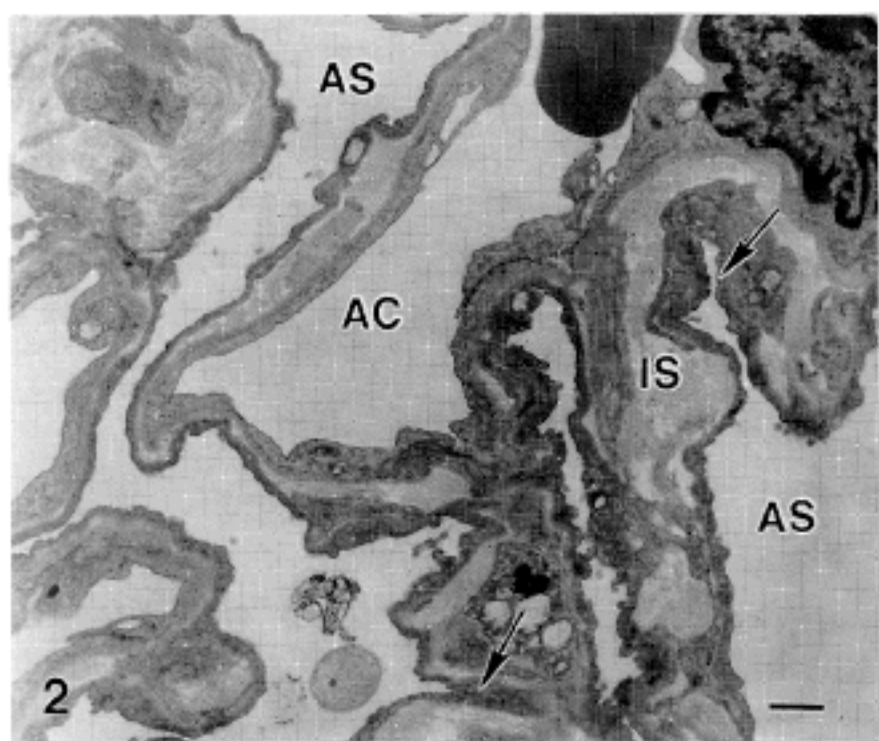
### 2. 투과전자현미경 소견

관류를 한 후 폐조직에서는 국소적으로 폐포 허탈이 보이면서 폐포 상피세포의 종창과 간질의 경한 부종을 보였다. 폐포 모세혈관들은 형태가 불규칙하였으나 혈관 내피세포의 종창은 뚜렷하지 않았고 폐쇄막 (tight junction)도 잘 유지되었다 (Fig. 2). 보존 과정 후에는 관류과정 후의 초기형태학적 변화보다 더욱 뚜렷한 변화를 보였다. 폐포벽이 비후 되면서 폐포 구조의 형태가 불규칙해지고 다발성으로 폐포 허탈을 보이면서 폐포 상피세포와 모세혈관 내피세포의 손상을 동반하였다. I형 폐포 상피세포에서 종창 및 파괴를 보이면서 기저막으로부터 박리 되었고 때때로 세포 잔해물이 폐포내에 유리되었다 (Fig. 3). 폐포내에는 대식세포의 수가 증가하여 유리된 세포 잔해물을 탐식하였다. 폐포 모세혈관은 전반적으로 배열이 불규칙하고 내피세포에는 종창, 수포형성, 파괴 및 촉각모양 (tactile-like)의 구조를 보이면서 혈관 내로 돌출하였다. 재관류 후 채취한 폐조직

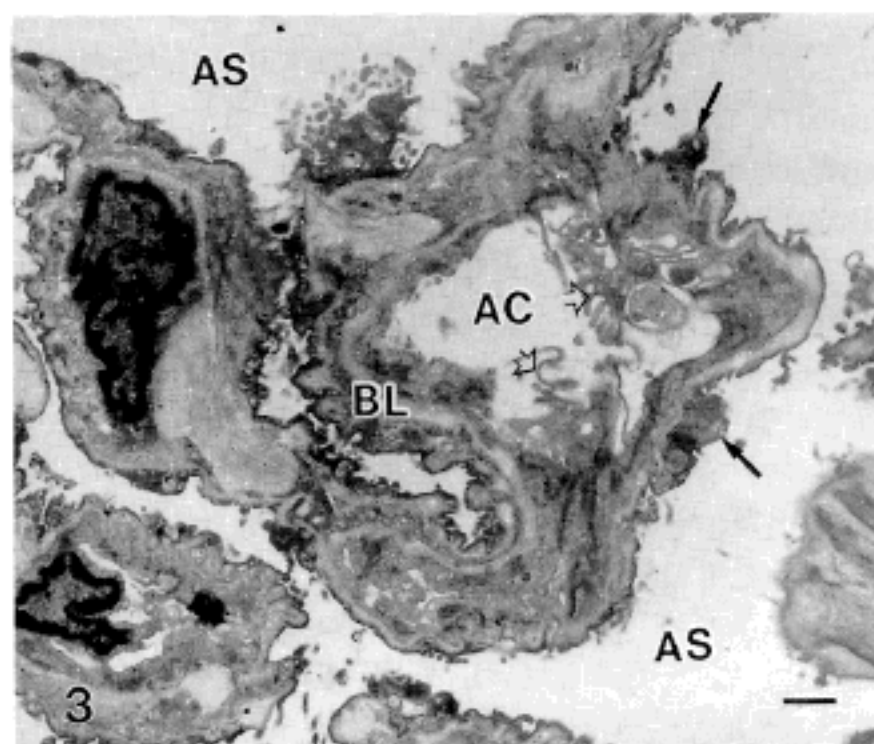




**Fig. 1. A:** Light micrograph following flushing perfusion in donor lung. The lung parenchyma shows focal alveolar collapse and mild edematous interstitial thickening. **B:** Donor lung tissue following preservation. It shows multiple patchy areas of alveolar collapse, consolidation and edematous interstitial thickening. **C:** Donor lung tissue following reperfusion. There is diffuse alveolar collapse and consolidation.



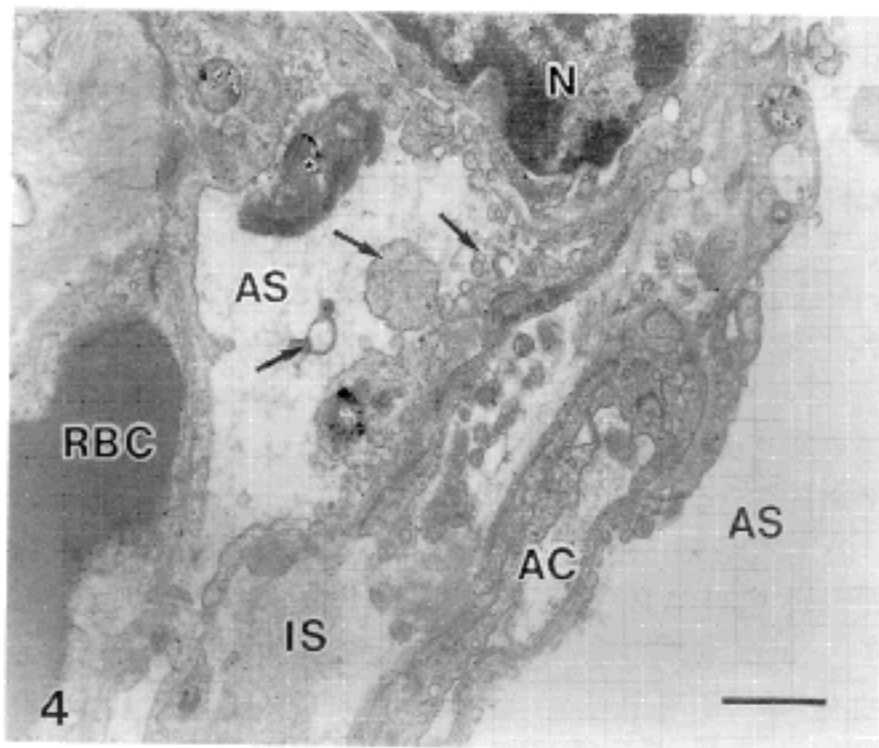
**Fig. 2.** Transmission electron micrograph following flushing perfusion in donor lung. The lung parenchyma shows focal alveolar collapse (arrows), mild interstitial edema and irregularly shaped alveolar capillary. ( $\times 8,500$ )



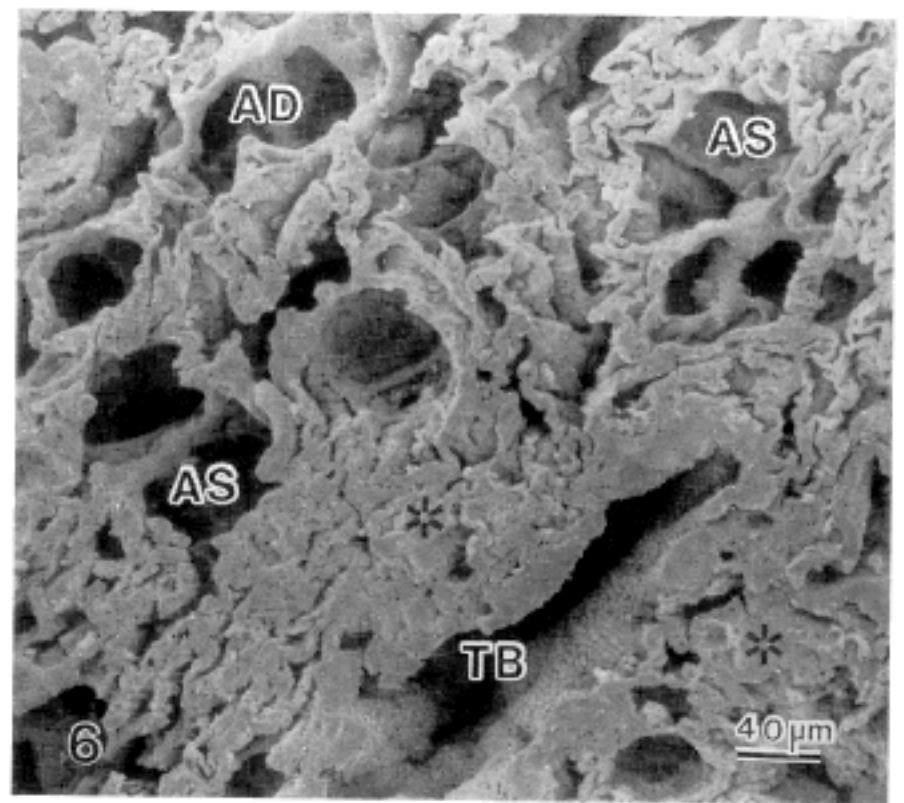
**Fig. 3.** Transmission electron micrograph following preservation in donor lung. Note more prominent alveolar wall thickening, irregularly arranged basal lamina, partially destroyed type I epithelial cells (arrows) and markedly changed endothelial cell with tactile-like projection into the lumina (open arrows). ( $\times 8,500$ )

**Key for Abbreviations**

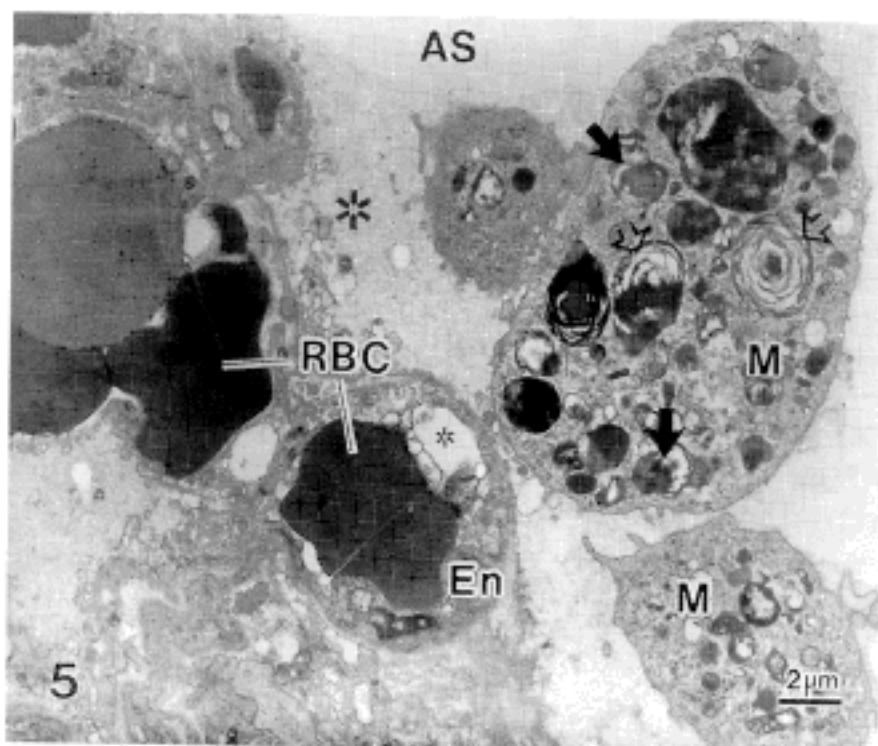
AC: Alveolar capillary, AD: Alveolar duct, AS: Alveolar space, BL: Basal lamina, En: Endothelial cell, IS: Interstitium, M: Macrophage, N: Nucleus, PV: Pulmonary venule, RBC: Red blood cell, TB: Terminal bronchiole



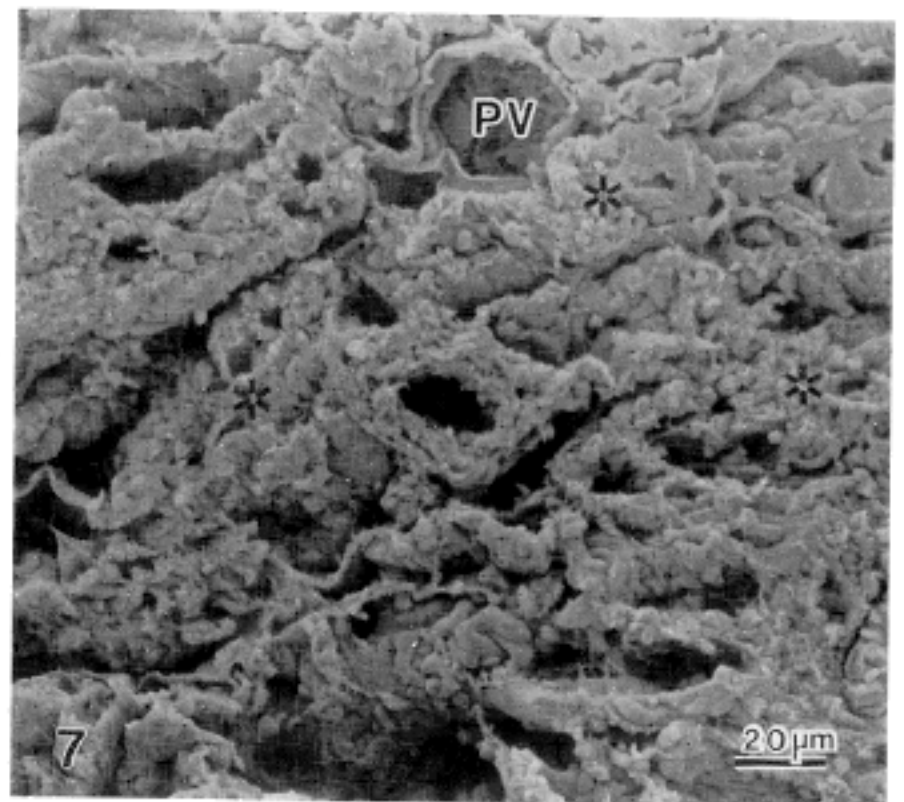
**Fig. 4.** Transmission electron micrograph following reperfusion in donor lung. Note fibrin material (asterisk) within alveolar space, cellular debris (arrows) associated with type I cell destruction, and markedly edematous interstitial thickening. ( $\times 17,000$ )



**Fig. 6.** Scanning electron micrograph of donor lung following preservation. There is prominent alveolar collapse around the terminal bronchiole (asterisks), associated with mild alveolar wall thickening. ( $\times 300$ )



**Fig. 5.** Transmission electron micrograph following reperfusion in donor lung. In the alveolar space, there are abundant amorphous material (large asterisk), alveolar macrophage containing many destroyed cellular debris (arrows) and multilamellar bodies (open arrows). The endothelial cells of alveolar capillaries show marked swelling and vacuole formation (small asterisk). ( $\times 5,000$ )



**Fig. 7.** Scanning electron micrograph of transplanted lung following reperfusion. The lung parenchyma shows diffuse alveolar collapse and consolidation (asterisks) with only a few visible alveolar lumina. ( $\times 690$ )

에서는 폐포내에 섬유소를 포함한 세포 잔해물이 다수 보였고 폐포 상피세포의 심한 파괴를 동반하였다. II형 폐포 상피세포 내에는 다층판체의 수가 감소하고 내용물은 비어 있었다. 폐포 모세혈관 내피세포에서는 현저한 종창, 수포형성 및 축각 모양 돌기를 관찰 할 수 있

었다 (Fig. 4). 폐간질은 부종성 비후를 보였고, 폐포내에는 폐포 대식세포가 흔히 유리된 세포잔해물을 탐식 하였다 (Fig. 5). 재관류후 초래된 폐조직의 형태학적 변화는 보존과정후 나타난 조직 손상에 비하여 더욱 심한 손상을 보였다.



### 3. 주사전자현미경 소견

주사전자현미경 소견은 전반적으로 광학현미경 소견과 잘 부합하면서 광학현미경에서 관찰하기 어려운 폐조직의 3차원적 구조 변화를 볼 수 있었다. 관류과정 후에는 폐실질의 폐포가 국소적으로 허탈을 보였으며 대체로 정상적인 폐포 배열과 형태를 유지하였다. 보존과정 후에는 저배율에서 다발성으로 폐포 허탈과 폐포벽 및 폐간질 부위에 비후를 볼 수 있었으며 부분적으로 폐포내에 파괴된 물질을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 재관류후에는 미만성으로 폐실질 경화를 볼 수 있었다. 고배율에서 폐포강 내에는 폐포 상피세포의 파괴물로 채워져 있으며, 폐포벽에 심한 비후로 폐포 구조가 흐트러진 채 불분명한 형태를 보였다 (Fig. 7).

### 4. 보존액의 선택과 첨가제의 사용에 따른 폐조직 손상 비교

1) LPDG, MEC 및 UW용액의 선택에 따른 보존 효과: LPDG용액을 단독으로 관류와 보존용액으로 사용한 군에서는 산발적으로 폐포 허탈, 폐포 상피세포의 종창, 파괴, 불규칙한 기저막 배열과 비후가 뚜렷하였다. 그리고 폐포 모세혈관의 배열은 불규칙하고 수포형성과 축각모양의 돌기를 보였다. 폐간질에는 비후를 볼 수 있었고 폐포내에는 대식세포가 이물질을 탐식하는 소견을 볼 수 있었다. LPDG용액에 첨가제인 VP와 PGE<sub>1</sub>을

함께 사용하였을 때는 폐조직에 나타난 폐포 상피세포, 폐포 모세혈관 내피세포 및 간질 내의 초미형태학적 변화가 첨가제를 사용하지 않은 군에 비해서 다소 경미하였다 (Table 2, Fig. 8). MEC 용액에 VP만을 함께 사용한 군에서는 폐조직의 형태학적 변화가 MEC 용액에 VP 및 PGE<sub>1</sub>을 함께 사용한 군이나 LPDG용액만을 사용한 군에 비하여 경미하였다. MEC용액에 VP와 PGE<sub>1</sub>을 모두 사용한 군에서는 폐포 상피세포와 폐포 모세혈관 내피세포의 변화가 LPDG용액에 VP 및 PGE<sub>1</sub>을 사용한 군에 비하여 더욱 심하였다 (Fig. 9).

2) LPDG와 MEC용액 선택에 따른 폐동맥 내막의 형태학적 변화: VP 및 PGE<sub>1</sub> 첨가제를 사용하지 않고 LPDG 또는 MEC용액만을 관류 및 보존 용액으로 사용한 군에서 주사전자현미경 검색을 실시하였을 때 LPDG와 MEC군 모두 폐동맥 내막은 미만성으로 둥글거나, 타원형을 나타내는 내피세포의 종창이 보였다. 부분적으로는 종창된 내피세포가 모여 덩어리 (conglomeration)를 만들며 혈관 내강으로 돌출 하는 소견을 볼 수 있었다 (Fig. 10). LPDG용액을 사용한 군에서는 미만성으로 내피세포의 종창과 불규칙한 배열을 보인 반면 MEC 용액을 사용한 군에서는 비교적 경한 손상을 보인 부위부터 더욱 심한 변화를 보인 부위까지 다양한 형태학적 변화를 볼 수 있었다.

Table 2. Comparison of ultrastructural changes of lungs in preservation using LPDG, MEC or UW Solution (n=10)

Ultrastructural changes	LPDG (n=2)	LPDG +VP (n=1)	LPDG+ VP+PGE <sub>1</sub> (n=1)	MEC +VP (n=2)	MEC+ VP+PGE <sub>1</sub> (n=3)	UW +PGE <sub>1</sub> (n=1)
Alveolar collapse	+ / + +	+ +	+	+	+ + / + + +	+ + / + + +
Epithelial changes						
cell debris	- / + +	+	+	- / +	+ / + + +	+ / + +
swelling	+ / + +	+	+ +	- / +	+ / + +	+
irregular BL	+ / + +	+ +	+	+	+ / + +	+ +
II cells	- / +	+ +	- / +	- / +	+ / + +	+
Capillary change						
irregularity	+	+ / + +	- / +	+	+ / + +	+
microvesicles, blebs	+ / + +	+ +	+ +	+	+ +	+
tactile projection	+ / + +	+ +	+	+ / + + +	+ +	+ +
tight junction	WP	WP	WP	WP	WP	WP
Macrophage activity	- / + +	+	-	- / +	- / +	+
Interstitium						
edematous thickening	- / + +	+ / + +	+	+	+ / + +	+ / + +
collagen deposition	+ / + +	+ / + +	+	- / +	+ / + +	+

-: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe, LPDG: low potassium dextran glucose, MEC: modified Euro-Collins, UW: University of Wisconsin, VP: verapamil, PGE<sub>1</sub>: prostaglandin E<sub>1</sub>, BL: basal lamina, WP: well preserved

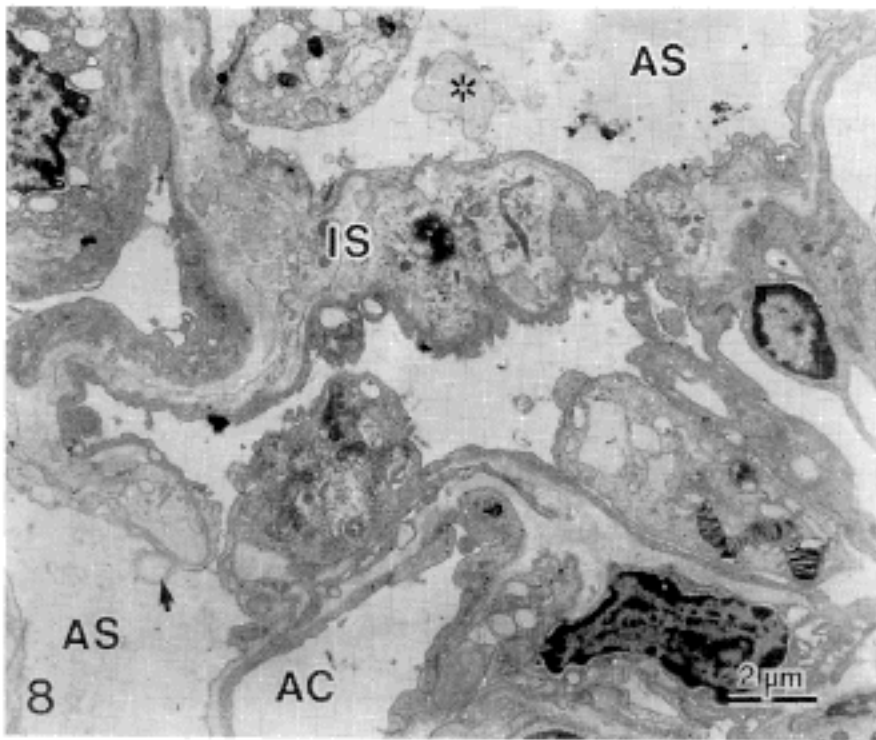


Fig. 8. Transmission electron micrograph of donor lung following preservation using LPDG solution with additional administration of VP and PGE<sub>1</sub>. The alveolar epithelial cells show mild to moderate swelling, bleb or vacuolization (arrow) and desquamated cell debris (asterisk) into the alveolar lumina. The alveolar walls show mild to moderate edematous thickening. (× 6,800)

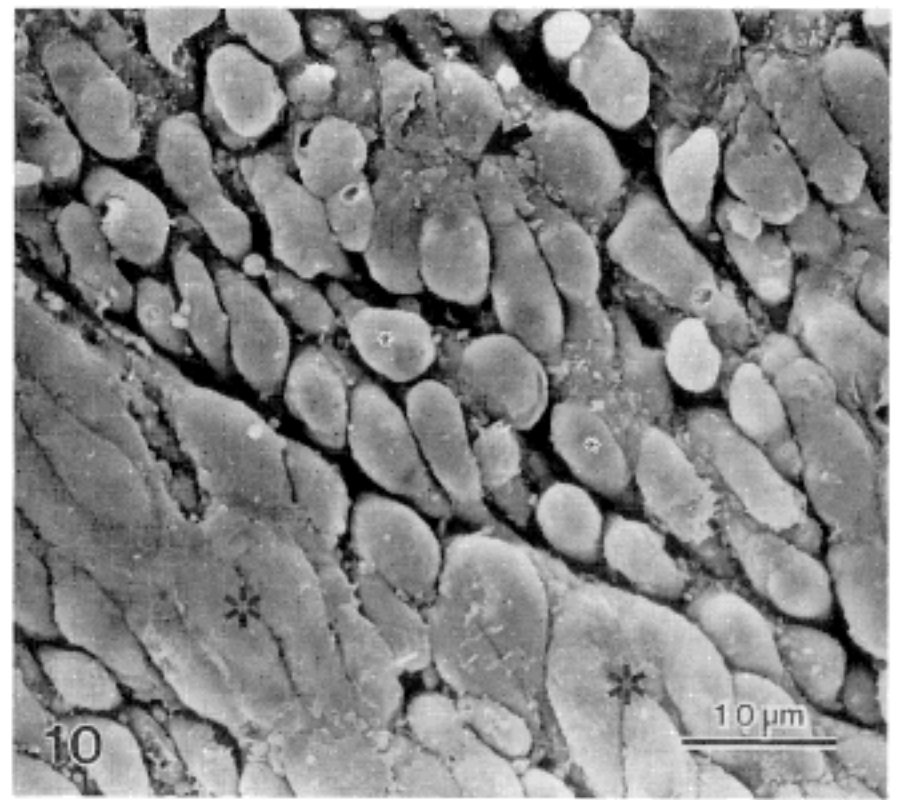


Fig. 10. Scanning electron micrograph of pulmonary artery following preservation using LPDG solution. Note individual swelling of endothelial cell (small asterisks) or focal destruction (arrows), and conglomerated endothelial cell lesion (large asterisks). (× 2,300)

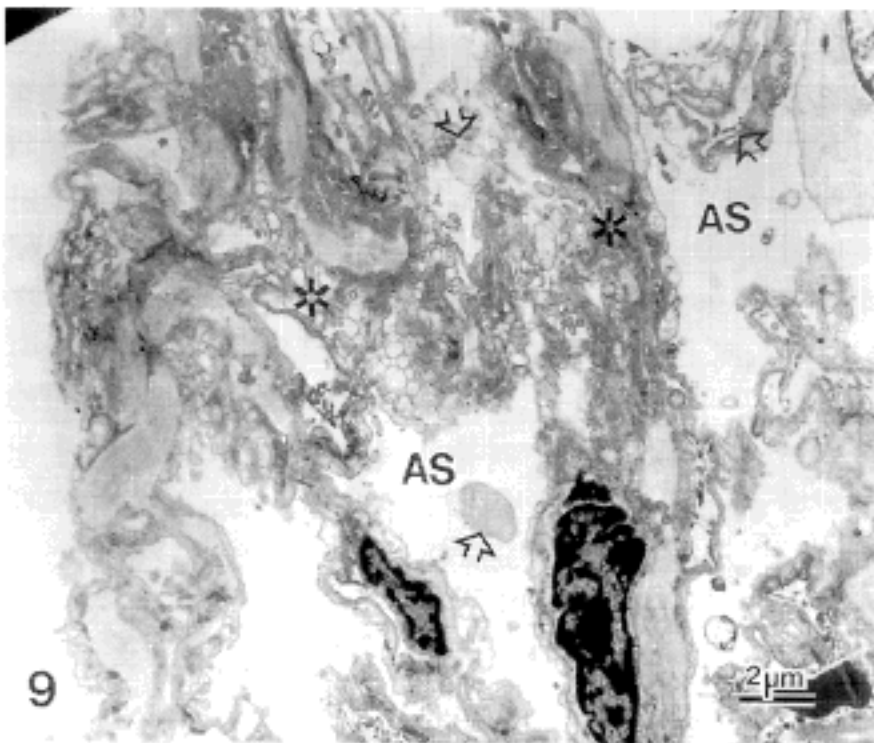


Fig. 9. Transmission electron micrograph of donor lung following preservation using MEC solution with additional administration of VP and PGE<sub>1</sub>. The alveolar epithelial cells show marked destruction or vacuolization (asterisks), and abundant cellular debris in the alveolar lumina. (× 6,000)

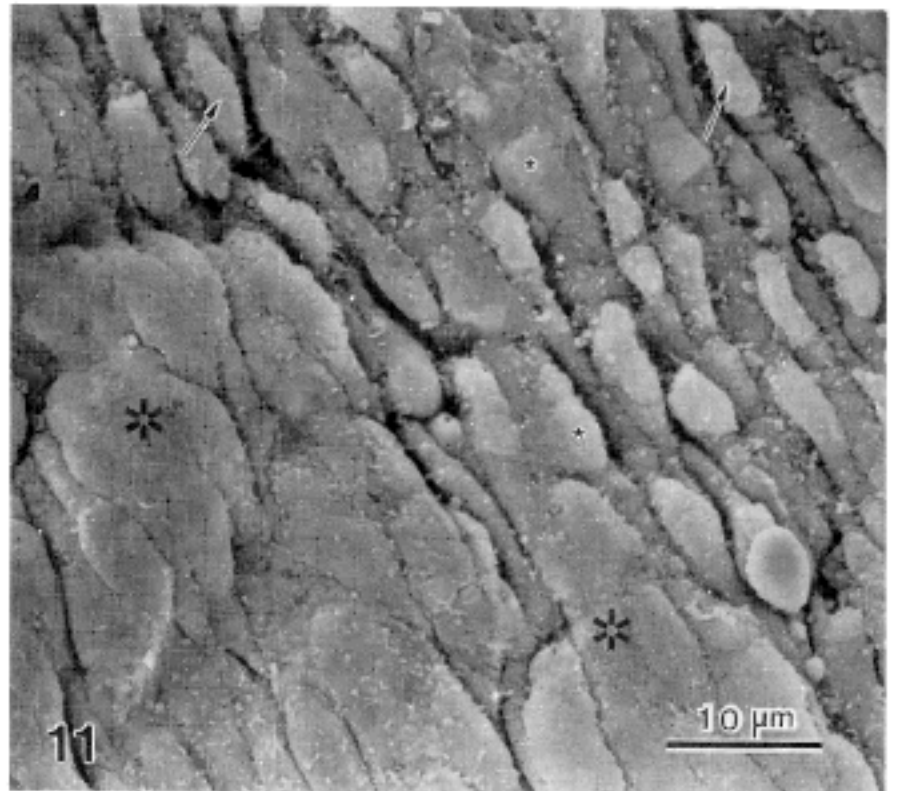


Fig. 11. Scanning electron micrograph of pulmonary artery following preservation using MEC solution. There are patchy areas of conglomerated endothelial cells, swelling and protrusion (small asterisks) and focally papillary projection (arrows) of endothelial cells. (× 2,300)

## 고 찰

심폐이식, 양측 폐이식 및 일측 폐이식은 말기 폐혈관 및 폐실질 질환을 가진 환자들에게 중요한 치료적 수단으로 이용되고 있다.<sup>7,16</sup> 임상 환자에서 처음으로 폐

이식을 시도한 것은 Hardy 등<sup>29</sup>에 의해 시도되었으며 초기의 많은 실패에도 불구하고 폐이식은 활발하게 시행되어 왔다. 그 동안 이식 술기의 발달, 엄격한 공여폐 및 환자의 선택과 거부 반응에 대한 cyclosporine 등 치료제 개발로 해마다 폐이식의 성공률이 높아지고 있

다.<sup>16</sup> 최근 폐이식 분야는 세계적으로 공여폐의 선택, 보존 및 이식술 후 합병증 감소에 대한 관심이 크며, 이 방면에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>19,30</sup> 그러나 급성 및 만성 거부 반응에 대한 적절한 처치와 공여폐 보존 시간 연장 및 보존 방법 개선 그리고 보존액 개발 등 해결해야 할 많은 과제들이 남아 있다.<sup>31</sup>

폐이식에 관한 활발한 연구에도 불구하고 공여폐의 보존 과정에 관한 연구 결과는 타 이식 장기에 비해서 그 보존 효과가 그다지 높지 못하였다. 이는 폐장이 이 중적인 혈류 공급체계를 가지며, 기도에 의해 대기와 직접 연결되어 있는 구조적인 특성과 폐포-모세혈관계가 허혈성 손상에 매우 민감한 것에 기인된다.<sup>32</sup> 따라서 폐이식의 성공률을 높이기 위해서는 폐조직에 초래되는 허혈성 손상을 최소화하는 공여폐 보존 방법의 개선이 중요하다.<sup>33</sup> 공여폐의 보존이 적절하지 못할 경우 허혈성 손상에 의해 폐포 모세혈관의 투과성이 증가되어 폐부종이 잘 발생하며, 이식 직후 급성 폐기능부전을 초래할 수 있다.<sup>34</sup> 최근에는 공여폐가 제공될 경우 이식 때까지 공여폐를 최적의 조건하에서 보존함으로써 허혈로 인한 조직 손상을 최소화하는 연구에 연구자들의 관심이 높아지고 있다.<sup>31</sup> 공여폐는 관류 및 보존 과정을 거치면서 흔히 허혈성 손상을 받으며, 이식 후 혈관 재관류 때도 호중구의 침윤과 함께 산소유리기 (oxygen free radical)가 생성되어 조직에 더욱 심한 손상을 초래한다.<sup>33,35</sup>

혈관 내피세포의 변화는 관류 및 보존 과정에서 초래되며, 혈류 차단과 저온으로 혈관이 수축되어 허혈 상태가 발생할 수 있다.<sup>33,36</sup> Pickford 등<sup>20</sup>은 흰쥐 폐를 48시간 동안 냉장 보존하여 혈관 내피세포의 팽창, 소실, 수포형성 및 기저막으로부터 내피세포 탈락 등 내피세포의 손상이 뚜렷함을 보고하였다. 그리고 간질 내 부종 소견은 폐보존액에 의해 초래되든지 혈관 내피세포의 투과성 증가로 유발된다.<sup>17</sup> 본 실험에서는 20시간 보존 과정 후 채취한 폐조직에서 폐포 모세혈관의 형태가 불규칙하면서 내피세포의 종창, 수포형성, 파괴 및 축삭모양 돌기 형성을 볼 수 있었다. 폐포 상피에서는 I형 폐포 상피세포의 종창과 파괴를 볼 수 있었고 가끔 기저막으로부터 박리 되면서 파괴된 I형 폐포 상피세포를 포함한 세포잔해물들이 폐포내로 유리되어 대식세포가 탐식하는 소견을 볼 수 있었다. 폐포 강 및 간질 내에 염증세포의 침윤은 보이지 않았으며 내피세포 및 폐포 상피세포의 조직 손상은 모두 보존 기간중 초래된 허혈성 손상으로 판단되었다. Pickford 등<sup>20</sup>의 성적과 비교할 때 혈관 내피세포 손상은 비슷한 결과를 보였으나, I형 폐포 상피세포에서는 본 실험에서 보다 뚜렷하게 국소적인 허혈성 손상을 보여 주었다.

최근 폐이식에 관한 연구에서 폐보존 방법 개선과 더불어 폐보존액 선택과 다양한 첨가제를 함께 사용하여 폐보존의 효과를 높이고 있다. 공여폐의 보존 방법과 보존액의 종류는 매우 다양하며, 과거에는 저온 crys-

talloid 용액, 냉혈액을 포함한 보존액을 사용하거나, 혈액으로 관류를 계속 시키면서 공여폐를 냉각시켜서 운반하는 방법 등을 시도하였다.<sup>32,37</sup> 최근에는 Euro-Collins 용액, Belzer 용액, UW용액, hypertonic citrate 용액, LPDG 용액을 보존액으로 사용하고 첨가제로서 PGE<sub>1</sub>, verapamil, prostacyclin, allopurinol, nifedipine 등을 함께 사용하여 폐보존 효과를 높이려고 시도하고 있으나 아직도 개선의 여지가 남아 있다.<sup>20,21,38,39</sup> Stanford 대학의 폐이식 연구팀은 저온 crystalloid 관류 용액을 사용하여 6시간 동안 심폐관류를 실시하였고, 저온 관류과정에서 야기되는 혈관수축 반응을 폐혈관의 확장제인 PGE<sub>1</sub>을 사용하여 억제함으로써 허혈에 의한 조직 손상을 줄일 수 있었다.<sup>37</sup> PGE<sub>1</sub>은 혈관 확장 기능 외에 혈소판 응집을 억제시키면서, 세포막의 통합성 (integrity)을 유지시켜 혈관 내피세포의 종창을 감소시키는 작용이 있음이 밝혀졌다.<sup>30</sup>

MEC 용액은 장기이식에서 가장 보편적으로 널리 쓰이는 보존액으로써, 세포내 용액으로 고칼륨제제임에도 불구하고 신장 또는 간에서 양호한 보존 효과를 얻고 있다.<sup>40</sup> 그러나 폐조직에서는 아직까지 타장기에 비해서 보존 효과가 그다지 높은 편이 아니다.<sup>20</sup> 최근 세포외액성 용액이며 저칼륨제제인 LPDG용액을 공여폐의 관류 및 보존액으로 사용하고 있으며 보존 효과가 우수함이 문헌에 보고되고 있다.<sup>14,19,39,41</sup> 본 연구에서 MEC 용액에 첨가제인 VP만을 사용한 실험군이 MEC 용액에 VP와 PGE<sub>1</sub>을 함께 사용한 군에 비해서 폐조직 변화가 보다 경미하였던 점에 대해서는 이들 실험군의 수가 적어서 폐보존 효과의 정도를 비교하기는 무리라고 생각된다. LPDG 용액에 VP와 PGE<sub>1</sub>을 사용한 군에서 폐조직의 폐포 상피세포 및 모세혈관 내피세포의 초미형태학적 변화가 MEC 용액에 이들 첨가제를 같이 사용한 군에 비교하여 보다 경미하였다. 이것은 LPDG 용액에 첨가제를 함께 사용한 실험군이 MEC용액에 첨가제를 사용한 실험군보다 조직손상을 보다 적게 초래한다는 Yamazaki 등<sup>42</sup>의 보고와 일치하는 성적이나, LPDG 용액을 임상적 폐이식의 보존 용액으로 널리 사용하기 위해서는 향후 더욱 많은 수의 동물을 대상으로 한 실험을 통해서 공여폐의 보존 효과가 우수함을 증명해야 될 것으로 생각된다.

폐관류 및 보존 과정에서 초래되는 허혈성 손상을 형태학적으로 평가하는 데 있어서 투과 및 주사 전자현미경적 관찰이 많은 도움을 줄 수 있다.<sup>17,22</sup> 주사전자현미경으로는 폐포 구조 및 상피세포의 변화와 폐동맥 내막 변화를 관찰하는데 유용하며, 투과전자현미경으로는 작은 혈관 또는 폐포 모세혈관 내피세포의 종창, 수포, 축삭모양 돌기 형성 등과 폐포상피세포의 초미형태학적 변화를 관찰하는데 편리하다.<sup>17</sup> 그러나 이식 폐에서 전자현미경 관찰에 의한 연구보고는 극히 제한되어 있다. 최근 보존액 개발에 관한 연구가 활발하면서 보존 효과를 평가하기 위해 전자현미경을 많이 이용하고 있



다.<sup>20,22,30,42</sup> 본 실험에서 투과전자현미경을 통해 혈관 내 피세포의 종창과 수포형성 그리고 축각 모양 돌기가 혈관 내로 돌출하는 소견을 관찰할 수 있었다. 폐포벽은 미만성으로 종창과 비후를 보였으며 폐포강은 매우 좁아지고 일부에서는 파괴된 세포잔해물과 대식세포를 포함한 삼출성 물질이 폐포강을 폐쇄하고 있었다. 폐포상피세포는 흔히 기저막에서 박리되거나 단절되어 있으며, 폐포내에는 대식세포가 파괴된 세포 잔해물을 탐식하는 소견을 볼 수 있었다. 주사전자현미경 관찰을 통해서 관류 과정후 폐실질 조직의 국소적인 폐포허탈 소견을 볼 수 있었고, 보존 과정 후에는 다발성의 폐포허탈과 함께 경화를 볼 수 있었으며 일부에서는 폐포벽의 비후와 폐포내에 세포 잔해물의 존재를 확인할 수 있었다.

재관류 때 볼 수 있는 내피세포의 소견으로는 세포질 종창, 수포형성, 파괴 및 기저막으로부터 탈락 등이다. 내피세포의 소실은 세포종창과 밀접한 관련이 있으며, 이 손상은 보존 과정에서 시작하여 재관류과정에서 더욱 현저해진다.<sup>20</sup> 본 실험에서 재관류 과정 후에는 폐실질 조직의 경화가 미만성으로 보이면서 폐포내에는 세포잔해물을 포함한 삼출성 물질이 차여 있음을 관찰할 수 있었다. 이런 주사전자현미경 소견은 광학 현미경 소견과 잘 일치되었다. 재관류 과정에서 조직 손상이 초래되는 기전은 혈관내피세포에 혈액이 노출되면서 calcium 유입이 cytosolic protease를 촉진하고, 그것은 xanthine dehydrogenase를 xanthine oxidase로 변환시킴으로써 산소 유리기가 만들어지고, 이것이 조직에 손상을 초래하는 것으로 보고있다.<sup>17,20</sup> 그리고 Pickford등<sup>20</sup>은 재관류 과정에서 산소유리기에 의한 세포막 지질의 과산화가 조직손상의 원인으로 보았다. 최근 VP와 같이 칼슘 채널 차단 작용 외에 산소유리기를 처리할 수 있는 기능을 가진 첨가제를 사용함으로써 재관류후 야기되는 조직손상을 더욱 감소시킬 수 있다.<sup>33,43</sup>

이상의 실험 결과로 관류에 의한 폐조직 변화는 경미하였고, 보존 후에는 중등도의 폐조직 손상을 보였다. LPDG용액에 VP 및 PGE<sub>1</sub>을 함께 사용한 군이 MEC용액에 이들 첨가제를 사용한 군에 비하여 공여폐의 형태학적 보존이 다소 우수함을 알 수 있었다. 재관류 후에는 관류 및 보존 과정보다 훨씬 심한 형태학적 변화를 보였는데 이들 변화는 급성 폐손상의 초기 병변을 보여주는 소견으로 인식되었다. 따라서 공여폐에 사용할 적절한 보존액 선택과 보존 및 재관류 과정에서 조직 손상을 최소화하는 것이 폐이식의 성공률을 높이는 데 있어서 중요한 요소가 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

저자는 공여폐에 관류를 시킨 후 보존 과정에서 야기될 수 있는 형태학적 변화와 이식 직후 재관류를 시행한 후 초래될 수 있는 폐조직의 변화를 광학 및 전자현

미경으로 검색하여 이들 과정에서 나타난 초미형태학적 변화를 관찰하였다. 그리고 본 실험에서 사용한 폐보존액에 따라 폐조직에 미치는 영향을 전자현미경 관찰로 비교하였다.

광학현미경 관찰에서 사용한 모든 보존액에서 공통적으로 폐관류에 의한 조직손상은 매우 경미하였다. 전자현미경 소견에서 폐포 모세혈관은 불규칙하고, 혈관내피세포에 종창은 뚜렷하지 않았다. 폐보존 후에는 광학현미경 소견에서 폐포허탈과 경화가 폐관류 군에 비하여 더욱 뚜렷하게 보였고 부분적으로 폐간질 부위가 비후되었다. 전자현미경 소견에서 폐포 허탈이 뚜렷하면서 I형 폐포상피세포의 종창 및 파괴와 파괴산물이 폐포내로 유리되었고, 대식세포의 탐식이 현저하였다. 폐포 모세혈관 내피세포는 종창, 수포형성 및 혈관 내로 축각모양 돌기를 관찰할 수 있었다. 재관류후 광학현미경 관찰에서 폐실질의 허탈과 경화가 뚜렷하여 저배율에서 쉽게 볼 수 있었고 폐포 구조의 심한 변형과 폐간질 조직의 비후가 현저하였다. 전자현미경 소견에서 I형 폐포상피세포는 종창, 수포형성 및 파괴를 보였고 폐포 내로 파괴산물이 자주 보였다. II형 상피세포의 세포질 내에는 다층판체의 수가 감소하고 내용물은 비어 있었다. 폐포 모세혈관들은 그 형태가 매우 불규칙하였으며 내피세포에서 다수의 수포형성과 종창을 보였고, 혈관 내에는 파괴산물과 축각모양 돌기가 뚜렷하게 보였다. 폐간질 부위는 종창으로 미만성 비후를 보였다.

LPDG보존액을 사용한 군에서는 폐포허탈과 폐포상피세포의 종창과 파괴, 폐포 모세혈관 내피세포의 종창, 수포형성 및 파괴 그리고 간질의 비후가 심하였다. LPDG용액에 VP와 PGE<sub>1</sub>을 함께 사용한 군에서는 폐조직에 나타난 형태학적 변화가 경미하였다. MEC용액에 VP와 PGE<sub>1</sub>을 사용한 군에서는 폐포상피세포와 폐포 모세혈관 내피세포의 변화가 LPDG용액 군에 비해서 현저하였다. 폐동맥 내막의 주사전자현미경 소견에서 LPDG용액을 사용한 군에서 내피세포의 종창이 MEC용액 군에 비해서 보다 미만성으로 관찰되었으나 형태학적으로 현저한 차이는 보이지 않았다.

이상의 실험 결과를 근거로 관류에 의한 폐조직 변화는 경미하였고, 보존 후에는 중등도의 폐조직 손상을 보였다. 재관류후에는 관류 및 보존 과정보다 훨씬 심한 형태학적 변화를 보였는데 이들 변화는 급성 폐손상의 초기 병변에 해당되었다.

## 참 고 문 헌

1. World Health Organization. Guiding principles on human organ transplantation. Lancet 1991; 337: 1470-1.
2. Hosenpud JD, Novick RJ, Breen TJ, Keck B, Daily P. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twelfth official report-1995. J Heart Lung

- Transplant 1995; 14: 805-15.
3. 이광수. 한국 공여 장기 관리기구의 설립과 운용. 대한이식학회지 1993; 7: 19-26.
  4. 김용일, 오창권, 이상열 등. 신장이식 1,200예에서 발생한 수술적 합병증 및 치료. 대한이식학회지 1994; 8: 23-32.
  5. 이승규, 이혁상. 간이식. 우리 나라의 현황과 세계적인 추세. Medical Postgraduates 1995; 23: 133-7.
  6. Cooley DA, Bloodwell RD, Hallman GL, Nora JJ, Harrison GM, Leachman RO. Organ transplantation for advanced cardiopulmonary disease. Ann Thorac Surg 1969; 8: 30-46.
  7. Burke CM, Theodore J, Baldwin JC, et al. Twenty-eight cases of human heart-lung transplantation. Lancet 1986; 1: 517-9.
  8. Starnes VA, Theodore J, Oyer PE, et al. Pulmonary infiltrates after heart-lung transplantation: Evaluation by serial transbronchial biopsies. J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 98: 945-50.
  9. Cooper JD. The evolution of techniques and indications for lung transplantation. Ann Surg 1990; 212: 249-56.
  10. Demikhov VP. Experimental transplantation of vital organs. New York, Consultants Bureau Enterprises, 1962.
  11. Metra H. Note preliminaire sur la greffe totale du poumon chez le chien, C R Acad Sci (Paris) 1950; 231: 1176-8.
  12. Juvenelle AA, Ciret C, Wiles CE. Pneumonectomy with replantation of the lung in the dog for physiologic study. J Thorac Surg 1951; 21: 111-3.
  13. 이두연, 배기만, 백효채, 박만실, 이원영. 황견에서 좌측 폐 이식수술 및 우측 폐동맥 절찰 수술후 폐동맥압 변화에 관한 연구. 대한흉부학회지 1994; 27: 345-52.
  14. 박창권, 이광숙, 유영선 등. 일측 폐이식 실험견에서 이식 폐의 기능 평가 연구. 대한흉부외과학회지 1995; 28: 1098-106.
  15. 권건영. 폐이식 거부반응의 병리학적 양상 및 분류. 계명의대 논문집 1995; 14: 420-30.
  16. Cooper JD. Current status of lung transplantation. Transplant Proc 1991; 23: 2107-14.
  17. Hall SM, Odom N, McGregor CG, Haworth SG. Transient ultrastructural injury and repair of pulmonary capillaries in transplanted rat lung: Effects of preservation and reperfusion. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7: 49-57.
  18. Mills AN, Hooper TL, Hall SM, McGregor CG, Haworth SG. Unilateral lung transplantation: Ultrastructural studies of ischemia reperfusion injury and repair in the canine pulmonary vasculature. J Heart Lung Transplant 1992; 11: 58-67.
  19. Sundaresan S, Lima O, Date H, et al. Lung preservation with low-potassium dextran flush in a primate bilateral transplant model. Ann Thorac Surg 1993; 56: 1129-35.
  20. Pickford MA, Green CJ, Sarathchandra P, Fryer PR. Ultrastructural changes in rat lungs after 48 hour cold storage with and without preservation. Int J Exp Pathol 1990; 71: 513-28.
  21. Date H, Matsumura A, Manchester JK, et al. Evaluation of lung metabolism during successful 24-hour canine lung preservation. J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 480-91.
  22. Fehrenbach H, Riemann D, Wahlers T, Hirt SW, Haverich A, Richter J. Scanning and transmission electron microscopy of human donor lungs: Fine structure of the pulmonary parenchyma following preservation and ischemia. Acta Anat Basel 1994; 151: 220-31.
  23. Southard JH, Pienaar H, Mcanulty JF. The University of Wisconsin Solution for organ preservation. In: Morris PJ, Tilney NL, eds. Transplantation reviews Vol 3. Philadelphia: WB Saunders, 1989; 103.
  24. Fujita H. Procedures from fixation to embedding. J Clin Electron Microsc 1989; 21: S31-5.
  25. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophys Biochem Cytol 1961; 9: 409-17.
  26. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J Biophys Biochem Cytol 1958; 6: 475-9.
  27. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-12.
  28. 田中敬一, 永谷隆. 圖說 走査電子顯微鏡 -生物試料作製法-. 東京, 朝倉書店, 1986, 85-104.
  29. Hardy JD, Webb WR, Dalton MI, Walker GR. Lung homotransplantation in man: Report of an initial case. JAMA 1963; 186: 99-108.
  30. Higgins RS, Letsou GV, Sanchez JA, et al. Improved ultrastructural lung preservation with prostaglandin E<sub>1</sub> as donor pretreatment in a primate model of heart-lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 965-71.
  31. Fehrenbach H, Hirt SW, Wahlers T, Schnabel PA, Haverich A, Richter J. Euro-Collins flush perfusion in human lung preservation - Ultrastructural studies of the preservation quality of the contralateral donor lung in clinical single lung transplantation. J Heart Lung Transplant 1994; 3: 1-14.
  32. Haverich A, Scott W, Jamieson S. Twenty years of lung preservation-a review. J Heart Transplant 1985; 4: 234-40.
  33. Bando K, Tago M, Teraoka H, Seno S, Senoo Y, Teramoto S. Extended cardiopulmonary preservation for heart-lung transplantation: a comparative study of superoxide dismutase. J Heart Transplant 1989; 8: 59-66.
  34. Toledo-Pereyra L, Hare T, Simmons R, Najarian J. Lung preservation technique. Ann Thorac Surg 1977; 23: 487-94.
  35. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. N Engl J Med 1985; 312: 159-63.
  36. Block ER, Patel JM, Angelides KJ, Sheridan NP, Garg LC. Hyperoxia reduces plasma membrane fluidity: a mechanism of endothelial cell dysfunction. J Appl Physiol 1986; 60: 826-35.
  37. Starkey TD, Sakakibara N, Hagberg RC, Tazelaar HD,

- Baldwin JC, Jamieson SW: Successful six hour cardiopulmonary preservation with simple hypothermic crystalloid flush. *Heart Transplant* 1986; 5: 291-7.
38. Kawahara K, Itoyanagi N, Takahashi T, Akamine S, Kobayashi M, Tomita M. Transplantation of canine lung allografts preserved in UW solution for 24 hours. *Transplantation* 1993; 55: 15-8.
39. Steen S, Sjoberg T, Massa G, Ericsson L, Lindberg L. Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 434-40.
40. 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: 745-50.
41. 박원균, 배재훈. 장시간의 폐보존. 계명대의 논문집 1995; 14: 391-5.
42. Yamazaki F, Yokomise H, Keshavjee SH, et al. The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins' solution for pulmonary preservation. *Transplantation* 1990; 49: 690-4.
43. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: An overview. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 249-68.
-