

우심낭(牛心囊)을 이용한 이종이식 보철편의 개발(Ⅲ)

—Glutaraldehyde 에 보존한 우심낭의 석회화에 관한 실험적 연구—

김기봉* · 김용진* · 노준량* · 서경필* · 김진규**

—Abstract—

Investigation of Bovine Pericardial Heterograft(Ⅲ)

—Experimental Evaluation of Calcification in
Glutaraldehyde-preserved Bovine Pericardium—

Ki Bong Kim, M.D.* , Yong Jin Kim, M.D.* , Joon Ryang Rho, M.D.* ,
Kyung Phille Suh, M.D.* , Jin Q Kim, M.D.**

Calcification is a major problem in glutaraldehyde-preserved bioprosthetic valves.

We have used bovine pericardium processed in a solution containing 0.625% glutaraldehyde, 0.05M HEPES buffer and 0.26% magnesium chloride in saline. And, we also treated the glutaraldehyde-preserved bovine pericardium with a surfactant, Triton X-100 to reduce calcification.

To evaluate the degree of calcification, 4 kinds of pericardial xenografts, group I (Xenomedica, equine pericardial xenografts), group II (0.625% glutaraldehyde-preserved bovine pericardiums), group III (0.5% Triton X-100 treated bovine pericardiums), and group IV (1.2% Triton X-100 treated bovine pericardiums) were implanted in subcutaneous layer of growing rabbits, and they were explanted about 3 months later.

The mean calcium contents($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry tissue) of 0.5% and 1.2% Triton X-100 treated bovine pericardiums (80.0 ± 27.1 & 78.6 ± 47.0 , respectively) were lower than those of glutaraldehyde-preserved bovine-pericardiums (126.2 ± 29.8) ($p=0.05$).

Thus, under the conditions of subcutaneous implantation in rabbits, Triton X-100 was efficient in calcification mitigation.

I. 서 론

본 서울대학교 의과대학 흉부외과학 교실에서는

*서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

**서울대학교 의과대학 임상병리학교실

**Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Seoul National University

1991년 9월 25일 접수

glutaraldehyde에 고정·보존한 우심낭을 이종 이식 보철편으로 사용하기 위하여, glutaraldehyde의 농도를 달리하여 우심낭을 고정한 후 장력검사 및 병리조직학적 검사를 시행하여 그중 0.625% glutaraldehyde 용액에서 처리한 것이 안정된 결과를 보임을 관찰하였으며¹⁾, 0.625% glutaraldehyde 용액에서 고정·보존한 우심낭을 실제 임상예들에서 사용하고 그 결과를 보고한 바 있다²⁾.

본 저자들은 생체에 이식된 이종이식 보철편에서 관

잘되는 석회화 변성을 예방하기 위한 연구의 일환으로, 0.625% glutaraldehyde에 보존한 우심낭을 표면활성제(Surfactant)의 일종인 Triton X-100에 처리하였으며, 상품화 되어 사용 중인 마심낭(馬心囊; equine pericardial xenograft), glutaraldehyde에만 보존한 우심낭 등과 함께 Triton X-100에 처리한 우심낭을 New Zealand White rabbit의 피하층에 이식한 후, 약 3개월 후에 추출하여, Triton X-100에 처리한 우심낭에서 석회화 변성이 감소하였음을 관찰하였기에 이에 보고한다.

II. 연구 방법

1. 우심낭의 제조

도축장에서 적출된 우심낭은 항생·항진균제를 첨가한 4℃의 냉장 생리 식염수(PH 7.35, Osmolarity 300 mOsm/L, Penicillin 10만 U/L, Streptomycin 100mg/L, fungizone 250mg/L)에 저장, 운반하였으며, 운반된 우심낭은 적출한지 6시간 이내에 0.625% glutaraldehyde, 0.05M HEPES buffer, 0.26% MgCl₂를 함유한 생리식염수 용액(PH 7.35, Osmolarity 320mOsm/L, filtration 0.2μm)이 든 용기속에서 24시간 동안 최소한의 장력이 미치도록 원형의 고정틀에서 고정하였다. 24시간후, 멸균 조작하에서 우심낭을 일정한 규격으로 자르고, 0.625% glutaraldehyde의 동일한 용액이 든 멸균 파이렉스 관에 넣어 보존하였다. 다시 24시간 후, 역시 멸균 조작하에서 동일한 glutaraldehyde 용액이 든 새로운 멸균 파이렉스 관에 옮겨 담아 보존하였으며, 이때 남은 여분의 우심낭 조각에 대해서는 미생물, 결핵균 및 진균에 대한 배양검사를 실시하여, 이상 유무를 확인하였다.

2. 표면 활성제(Surfactant)의 처리

0.625% glutaraldehyde 용액에서 72시간동안 고정-보존된 우심낭중 일부는 중성 표면활성제의 일종인 Triton X-100 이 0.5% 및 1.2%가 첨가된 0.625% glutaraldehyde 용액(pH 7.35, Osmolarity 320 mOsm/L)에 옮겨 넣어서 보존하였다.

3. 실험 대상

생후 7주에서 9주 사이의 신생 New Zealand White(NZW) rabbit 6마리를 실험 대상 동물로 하였다.

피하층에 우심낭을 이식할 당시의 토끼들의 체중은 0.73±0.14kg 이었으며 약 3개월 후 이식된 우심낭을 추출할 때의 체중은 2.35±0.84kg으로 증가되어 있었다.

4. 이종 보철편의 이식 및 추출

NZW rabbit 의 marginal aural vein을 통하여 Ketamine(10-20mg/kg)과 Diazepam(1mg/kg)을 정주하여 진정시킨 후, 토끼의 두개골에 맞게 고안한 마스크를 통하여 N₂O-O₂-Halothane을 흡입시킴으로써 마취를 유지하였으며 시술 부위의 감염을 예방하기 위하여 Penicillin(10만 U/kg)을 근주하였다. 측면 흉부의 털을 깎고 Betadine 으로 시술부위를 소독한 후, 약 1cm 길이로 피부 절개를 하였으며, 절개부위를 중심으로 좌, 우측에 각각 상, 하로 피하층을 박리하였다.

상품으로 시판 중인 마심낭(glutaraldehyde-preserved equine xenograft, Xenomedica AG, Luzern, Switzerland), 0.625% glutaraldehyde에만 보존한 우심낭, Triton X-100을 0.5% 및 1.2% 첨가한 glutaraldehyde 용액에서 보존한 우심낭 등 4종류의 우심낭을 1×2cm 크기로 자르고 생리 식염수 용액에서 5분 이상 충분히 행구어 씻어 낸 후, 박리된 피하층에 각각 이식하고 피부 절개 부위를 봉합하였다.

피하층에 심낭을 이식하고 94±15일 후에, 토끼들을 마취시키고 피하층에 이식된 심낭을 박리, 추출하였다.

5. 방사선 검사

Calcium 정량을 먼저 시행한 1마리를 제외한, 나머지 토끼 5마리에서 추출한 4종류의 심낭에 대해서 동시에 mammography unit(20 KVP, 30mAS)하에서 방사선 검사를 시행함으로써 석회화 정도를 비교하였다.

6. Calcium의 정량 분석

추출하여 Formalin에 보존해 둔 심낭을 증류수와 생리식염수 용액에서 5분이상 충분히 씻어 낸 후 동결건조기(lyophilizer)에서 12시간 이상 냉동 건조시키고 그 dry weight를 측정하였다. 냉동 건조된 심낭은 3ml의 Nitric acid(HNO₃, 60%)에 넣어서 용해시키고

이를 100℃로 끓여서 증발시켰다. 증발후 남은 분해 산물에는 Lanthanum이 함유된 diluent를 첨가, 추출한 후 Atomic absorption spectrophotometer(Varian Spectra 300AA, wave length 422.7nm)에서 calcium 양을 측정 하여 정량하였다($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight)³⁻⁵. 또한 이와 대조군으로 0.625% glutaraldehyde에 보존한 우심낭 6조각에 대해서 토끼에 이식하지 않고 calcium양을 정량, 비교하였다.

III. 결 과

1. 방사선 검사

Calcium 정량을 먼저 시행한 1마리를 제외한 나머지 토끼 5마리에서 추출한 각각 4종류의 심낭을 동일 평면에 놓고 촬영한 방사선 검사 소견상 Triton X-100을 각각 0.5%, 1.2% 첨가한 용액에서 보존한 군(III,IV)에서는 다른 두군의 심낭(I, II)보다 석회화가 부분적으로 경미하게 일어났음을 보였다(그림 1).

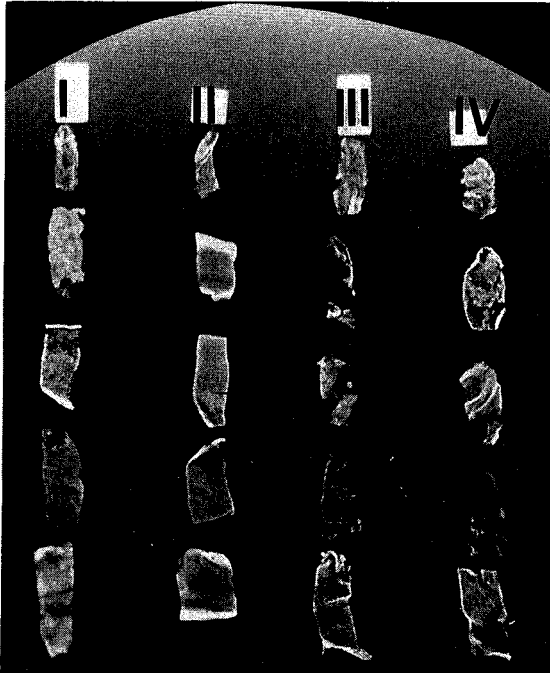


그림 1. Mammography unit(20 KVP, 30mAS) 하에서 촬영한 방사선 소견. Triton X-100을 각각 0.5%, 1.2% 첨가한 용액에 보존한 우심낭들(III,IV)에서, Xenomedica 마심낭이나, 0.625% glutaraldehyde에만 보존한 우심낭들(I, II) 보다 석회화가 경미하게 일어났음을 보이고 있다.

2. Calcium의 정량 분석

I군(Xenomedica, equine percardial xenograft)의 dry weight는 $78.8 \pm 42.1\text{mg}$, calcium 양은 $121.28 \pm 15.64\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight 이었으며, II군(0.625% glutaraldehyde에만 보존한 우심낭)의 dry weight는 $79.0 \pm 45.9\text{mg}$, calcium의 양은 $126.2 \pm 29.8\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight이었고, III군(0.5% Triton X-100을 첨가한 용액에서 보존한 우심낭)의 dry weight는 $51.2 \pm 24.6\text{mg}$, calcium의 양은 $80.8 \pm 27.1\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight이었고 IV군(1.2% Triton X-100을 첨가한 용액에 보존한 우심낭)의 dry weight는 $60.2 \pm 27.9\text{mg}$, calcium의 양은 $78.6 \pm 47.0\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight이었다. 이와 대조군으로 glutaraldehyde 용액에 보존하고 토끼에 이식하지 않은 우심낭들(control : C군)의 dry weight는 $29.2 \pm 5.9\text{mg}$, calcium양은 $1.07 \pm 0.42\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight 이었다(그림 2).

3. 통계학적 검정

6마리의 토끼에 이식한 네가지 심낭들, 즉 I, II, III,

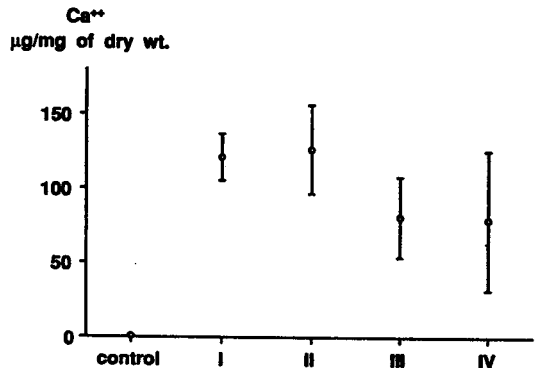


그림 2. Atomic absorption spectrophotometer에서 측정한 calcium 정량($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight).

control : 토끼에 이식하지 않은 우심낭의 calcium양(1.07 ± 0.42)

I : Xenomedica 마심낭(121.28 ± 15.64)

II : 0.625% Glutaraldehyde에만 보존한 우심낭(126.2 ± 29.8)

III : 0.5% Triton X-100을 첨가한 용액에서 보존한 우심낭(80.8 ± 27.1)

IV : 1.2% Triton X-100을 첨가한 용액에서 보존한 우심낭(78.6 ± 47.0)

IV군의 calcium양을 통계학적으로 비교하기 위하여 비모수적 통계분석법인 Friedman 순위에 의한 이원 분산 분석을 시행하였는데 검정 통계량 Xr^2 을 계산하면 13.4로서 $P=0.05$ 일때 Xr^2 값 7.815 보다 크므로 I, II, III, IV 네 군 사이에는 유의한 차이가 있다고 판정할 수 있었다($P<0.05$).

II군과 III, IV군 사이를 비교하기 위하여서는 역시 비모수적 통계분석법인 Wilcoxon의 부호화 순위 검정을 시행하였는데 II군과 III군, II군과 IV군 사이에서는 모두 $P=0.05$ 로서 유의한 차이가 있었다. 하지만 Triton X-100의 농도를 달리한 III군과 IV군 사이, 그리고 I군과 II군사이에는 모두 $P>0.1$ 로서 유의한 차이가 없었다.

IV. 고 안

Glutaraldehyde에 고정, 보존된 이종조직에서는 인체에 사용하기 이전에도 다양한 정도의 조직학적 변화가 관찰되며, 인체에 이식후에는 시간경과에 따라서 석회화 변성을 보임이 보고되어 왔다^{6~12}).

이종 조직을 인체에 사용시 세포 형태의 변화, 조직의 조기 변성, 교원질의 분열, 탄력섬유소의 소실등이 관찰되는데^{13~15}), 이러한 조직학적 변성은 동물에서 적출한 이종조직의 운반과정에서의 부적절한 보존, 적출후 glutaraldehyde 용액에서 고정할 때 까지의 시간 경과 및 고정시의 압력 조건등에 기인하며, 석회화 변성은 이종조직 자체 요인 및 환자 관련 요인 등에 의한다고 알려져 있다^{6,10,16~18}).

본 저자들은 도축장에서 적출한 우심낭을 항생-항진균제를 첨가한 4℃의 냉장 생리 식염수(pH 7.35, Osmolarity 300 mOsm/L)에 넣어서 운반하였으며, 적출후 6시간 이내에 0.625% glutaraldehyde, 0.05M HEPES buffer, 0.26% MgCl₂를 함유한 생리식염수 용액(pH 7.35, Osmolarity 300 mOsm/L)에서 최소한의 장력이 미치도록 고정, 보존하였다²). Glutaraldehyde에 고정한 이종조직을 인체에 이식하였을 때 시간경과에 따라 관찰되는 석회화 변성을 예방하기 위하여 glutaraldehyde 용액에 HEPES buffer, MgCl₂ 및 표면활성제 등을 첨가하거나^{9,17}), Polyacrylamide^{17,19}), Toluidine blue¹⁹), C-12 alkyl sulfate(Ts)^{20,21})등으로 처리함으로써 석회화 변성을 감소시키기 위한 연구들이 행하여져 왔다.

Carpentier등은¹⁷) 표면활성제 중 특히 N-Lauroylsarcosine 과 Triton X-100 으로 처리한 심낭들에서 석회화 변성의 정도가 가장 적음을 관찰하였고, 이는 아마도 표면활성제의 hydrophilic part가 조직내로의 lipid와 phospholipid의 침투를 방지함으로써 석회화 변성의 초기 단계의 진행을 막기 때문이라고 추정하였다. 하지만 Jones등은¹⁹) 표면활성제로 처리한 경우에서 석회화변성의 감소가 관찰되었으나, 조직 변성의 빈도 역시 증가함이 관찰되었으며 따라서 장기적 연구가 필요하다고 하였다.

Phospholipid의 침투를 방지하고, phosphate와 calcium이 교원질에 결합하는 것을 방지하기 위하여 polyacrylamide로 처리한 경우, 실험 동물의 피하이식시 석회화 변성의 감소가 관찰되었으나, 이에 기계적 굴곡을 가하거나 혈류에 접하는 위치에 이식시에는 석회화 변성의 감소효과가 소실됨을 보였다^{17,19}). Toluidine blue는 Ca⁺⁺ 결합부를 차단함으로써 교원질 변이를 초래하여 석회화 변성을 감소시킨다고 추정되는데, 생체 이식후 그 효과는 점차 감소함을 보임으로써, toluidine blue 와 glutaraldehyde의 상호작용은 가역적 이라고 생각된다¹⁹).

이종조직에서 일어나는 석회화 변성을 관찰하기 위한 실험 방법으로서, 실험동물의 피하층이나 근육층내에 조직을 이식하는 방법은, 이식편과 혈류사이에 직접적인 접촉이 없고, 실제 임상 사용예에서와 같은 긴장을 이식편이 받지 않으며, 혈소판 혈전의 유착이 일어나지 않고, 혈구나 혈장내 단백질과의 접촉도 일어나지 않으므로, 실제 임상예에서 일어나는 변화를 관찰하기에는 적절하지 못하다고 생각되기도 하지만^{19,22}) 인체에 이식된 이종 조직의 석회화 변성 경향을 유추하거나, 석회화 변성의 방지를 위한 일차적 실험적 선별검사로서는 충분히 타당성이 있는 실험방법이라고 생각된다^{17,23~27}).

본 저자들은 중성 표면활성제인 Triton X-100을 각각 0.5%와 1.2% 포함하는 glutaraldehyde 용액에 우심낭을 처리하였으며, 상품화되어 사용중인 마심낭, 0.625% glutaraldehyde 에만 보존한 우심낭 등과 함께 신생 NZW rabbit의 피하에 약 3개월간 이식한 후 추출하여 석회화 변성정도를 비교하였다. 표본수가 6이므로, 비모수적 통계분석법을 사용하여, 표면활성제인 Triton X-100에 처리한 군과 상품화 되어있는 마심낭이나 glutaraldehyde 에만 처리한 우심낭 사이에,

단위 무게당 calcium양을 정량, 비교 분석하였는데, Triton X-100에 처리한 우심낭들에서 calcium의 양의 유의한 감소가 관찰되었다($p=0.05$).

토끼의 피하에 우심낭을 이식하여 석회화 변성을 관찰한 본 연구 결과는 실제 임상 상황과는 차이가 나는 등 다소간의 문제점이 있으나, 이를 토대로 향후에는 좀더 큰 동물의 심장내에 이식하는 연구를 함으로써, 석회화 변성의 과정을 이해하고, 이를 줄이기 위한 연구에 일조가 될 수 있으리라 생각된다.

REFERENCES

1. 안재호, 김용진 : 소의 심낭을 이용한 이중이식 보철편의 개발 (I) ; 고정액의 농도와 장력. 대한흉부외과학회지 22 : 373-383, 1989
2. 김기봉, 김용진, 노준량, 서경필 : 우심낭(牛心囊)을 이용한 이중이식 보철편의 개발 (II) ; 0.625% glutaraldehyde에 보존한 우심낭의 임상적용. 대한흉부외과학회지 23 : 465-473, 1990
3. Levy RJ, Lian JB, Gallop P : *Atherocalcin, a r-carboxyglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque*. *Biochem Biophys Res Commun* 91 : 41-49, 1979
4. Levy RJ, Zenker JA, Lian JB : *Vitamin K-dependent calcium binding proteins in aortic valve calcification*. *J Clin Invest* 65 : 563-566, 1980
5. Tietz NW : *Textbook of clinical chemistry; Calcium and phosphate metabolism, Chapt. 12, 1347-1350, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986*
6. Riddle JM, Magilligan DJ, Stein PD : *Surface morphology of degenerated porcine bioprosthetic valves four to seven years following implantation*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81 : 279-287, 1981
7. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC : *Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprosthesis*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81 : 747-757, 1981
8. Gallo JI, Artinano E, Duran CMG : *Clinical experience with glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the closure of the pericardium after open heart surgery*. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 30 : 306-309, 1982
9. Carpentier A, Dubost C, Lance E, Nashef A, Carpentier S, Relland J, Deloche A, Fabiani JN, Chauvaud S, Perier P, Maxwell S : *Continuing improvements in valvular bioprostheses*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83 : 27-42, 1982
10. Valente M, Bortolotti U, Thiene G : *Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure*. *Am J Pathol* 119 : 12-21, 1985
11. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ : *Calcification of bioprostheses: Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization*. *Am J Pathol* 123 : 134-145, 1986
12. Nistal F, Garcia-Martinez V, Fernandez D, Artinano E, Mazonza F, Gallo I : *Degenerative pathologic findings after long-term implantation of bovine pericardial bioprosthetic heart valves*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 96 : 642-651, 1988
13. Ferrans VJ, Spray TL, Billingham ME, Roberts WC : *Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves: Transmission and scanning electron microscopic observation in 12 patients*. *Am J Cardiol* 41 : 1159-1184, 1978
14. Ashraf M, Blood CM : *Structural alterations of the porcine heterograft after various durations of implantation*. *Am J Cardiol* 41 : 1185-1190, 1978
15. Stein PD, Wang CH, Riddle JM, Magilligan DJ Jr : *Leukocytes, platelets, and surface microstructure of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valves*. *J Cardiac Surg* 3 : 253-261, 1988
16. Broom ND, Thomson FJ : *Influence of fixation condition on the performance of glutaraldehyde-treated porcine aortic valves; Towards a more scientific basis*. *Throax* 34 : 166-176, 1979
17. Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N : *Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses*. *Circulation* 70 (Suppl I) : 165-168, 1984
18. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Lery RJ : *The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses*. *Am J Pathol* 127 : 122-130, 1987
19. Jones M, Eidbo EE, Hilbert SL, Ferrans VJ, Clark RE : *Anticalcification treatments of bioprosthetic heart valves; In vivo studies in sheep*. *J*

Cardiac Surg 4 : 69–73, 1989

20. Arbustini E, Jones M, Moses RD, Eidbo EE, Carroll RJ, Ferrans VJ : *Modification by the Hancock T₈ process of calcification of bioprosthetic cardiac valves implanted in sheep. Am J Cardiol* 53 : 1388–1396, 1984
21. Thiene G, Laborde F, Valente M, Bical O, Talenti E, Bortolotti U, Gallix P : *Experimental evaluation of porcine-valved conduits processed with a calcium-retarding agent(T₈). J Thorac Cardiovasc Surg* 91 : 215–224, 1986
22. Dewanjee MK, Solis E, Mackey ST, Lenker J, Edwards WD, Didisheim P, Chesebro JH, Zollmann PE, Kaye MP : *Quantification of regional platelet and calcium deposition on pericardial tissue valve prostheses in calves and effect of hydroxyethylene diphosphate. J Thorac Cardiovasc Surg* 92 : 337–348, 1986
23. Fishbein MC, Levy RJ, Ferrans VJ, Dearden LC, Nashef A, Goodman AP, Carpentier A : *Calcification of cardiac valve prostheses; Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. J Thorac Cardiovasc Surg* 83 : 602–609, 1982
24. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ : *Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. Am J Pathol* 113 : 143–155, 1983
25. Levy RJ, Hawley MA, Schoen FJ, Lund SA, Liu PY : *Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. Circulation* 71 : 349–356, 1985
26. Levy RJ, Schoen FJ, Lund SA, Smith MS : *Prevention of leaflet calcification of bioprosthetic heart valves with diphosphonate injection therapy: Experimental studies of optimal dosage and therapeutic durations. J Thorac Cardiovasc Surg* 94 : 551–557, 1987
27. Imamura E, Sawatani O, Koyanagi H, Noishiki Y, Miyata T : *Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets; Subcutaneous implant studies in rats. J Cardiovasc Surgery* 4 : 50–57, 1989