

돼지의 심낭, 판막을 이용한 이종이식 보철편의 개발 (고정 방법에 따른 조직학적 분석)

김관창* · 최창휴** · 이창하*** · 이 철*** · 오삼세***
박성식**** · 김웅한***** · 김경환***** · 김용진*****

Development of Porcine Pericardial Heterograft for Clinical Application (Microscopic Analysis of Various Fixation Methods)

Kwan-Chang Kim, M.D.*, Chang-Hyu Choi, M.D.**, Chang Ha Lee, M.D.***, Chul Lee, M.D.***, Sam Sae Oh, M.D.***, Seongsik Park, M.D.****, Woong Han Kim, M.D.*****, Kyung Hwan Kim, M.D.*****, Yong Jin Kim, M.D.*****

Background: Various experimental trials for the development of bioprosthetic devices are actively underway, secondary to the limited supply of autologous and homograft tissue to treat cardiac diseases. In this study, porcine bioprostheses that were treated with glutaraldehyde (GA), ethanol, or sodium dodecylsulfate (SDS) were examined with light microscopy and transmission electron microscopy for mechanical and physical imperfections before implantation. **Material and Method:** 1) Porcine pericardium, aortic valve, and pulmonary valve were examined using light microscopy and JEM-100CX II transmission electron microscopy, then compared with human pericardium and commercially produced heterografts. 2) Sections from six treated groups (GA-Ethanol, Ethanol-GA, SDS only, SDS-GA, Ethanol-SDS-GA and SDS-Ethanol-GA) were observed using the same methods. **Result:** 1) Porcine pericardium was composed of a serosal layer, fibrosa, and epicardial connective tissue. Treatment with GA, ethanol, or SDS had little influence on the collagen skeleton of porcine pericardium, except in the case of SDS pre-treatment. There was no alteration in the collagen skeleton of the porcine pericardium compared to commercially produced heterografts. 2) Porcine aortic valve was composed of lamina fibrosa, lamina spongiosa, and lamina ventricularis. Treatment with GA, ethanol, or SDS had little influence on these three layers and the collagen skeleton of porcine aortic valve, except in the case of SDS pre-treatment. There were no alterations in the three layers or the collagen skeleton of porcine aortic valve compared to commercially produced heterografts. **Conclusion:** There was little physical and mechanical damage incurred in porcine bioprosthesis structures during various glutaraldehyde fixation processes combined with anti-calcification or decellularization treatments. However, SDS treatment preceding GA fixation changed the collagen fibers into a slightly condensed form, which degraded during transmission electron micrograph. The optimal methods and conditions for sodium dodecylsulfate (SDS) treatment

*이화여자대학교 의학전문대학원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Ewha Womans University

**가천의과대학교 길병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Gil Medical Center, Gachon University of Medicine and Science

***부천세종병원 흉부외과, 세종심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sejong General Hospital, Sejong Heart Research Institute

****단국대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Dankook University

*****서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교병원 임상의학 연구소, 바이오 이종장기개발사업단

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A040004).

논문접수일 : 2008년 1월 15일, 심사통과일 : 2008년 4월 21일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-5209, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

need to be modified.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:295-304)

Key words: 1. Calcification
2. Heterograft
3. Glutaraldehyde
4. Electron microscopy

서 론

심장 수술의 발전과 함께 다양한 복잡 심기형과 재수술을 경험하게 됨에 따라 심장 및 혈관 등의 결손을 교정하기 위해 자기 조직이 아닌 다른 보철편의 필요가 늘어나 그에 따른 다양한 대체제가 연구 개발, 이용되고 있다 [1,2]. 초기에 본 흉부외과학 교실에서 이종 보철편을 [3,4] 동물 실험 및 제한된 임상 적용에서 심한 석회화가 초기에 발생하여 중장기 수술성적이 만족스럽지 못했던 것을 발표한 바 있으며 [5], 따라서 이 석회화의 방지 내지는 완화가 보철편을 이용한 수술의 장기 성적에 중요한 요소가 될 것으로 [6] 판단하여, 내구성이 보다 장기적이고 변성이 적고 인체에 적합한 생체보철편의 개발을 위하여 보완 실험을 거듭하는 중이다. 지금까지 많은 연구들은 소나 돼지심낭과 결합하는 glutaraldehyde (GA)의 aldehyde 기 (-CHO)가 체내의 칼슘과 반응하여 석회화가 일어나는 주 원인이 되고 있다고 판단하여 [7,8], 이 aldehyde기의 결합 부위를 미리 다른 물질과 결합시켜 칼슘과 결합하는 것을 막아 줌으로써 석회화를 방지하고자 시도하였다. 많은 연구에서 희석 glutaraldehyde 고정용액을 만들 때 기본적으로 마그네슘을 첨가하여 사용하고 있으며, 계면활성제나 알코올을 이용한 처치 방법 등이 소개된 바 있다. 석회화와 함께 기계적인 결함(mechanical failure)도 이종이식 보철편의 중장기 수술성적의 결함의 중요한 원인으로 알려져 있으나 [9,10], 이종이식 보철편으로서 기계적인 성질에 대한 기초 연구가 없는 실정이다. 본 저자들은 적절한 이종조직보철편의 개발을 위해서, 이미 상용화되고 있는 기존의 이종이식 보철편들과 기계적, 물리학적, 조직학적 비교를 다음과 같이 여러가지 방법으로 처리된 이종조직 보철편과 시행하였다. 단순 0.625% Glutaraldehyde (GA)에 고정법, 각각 0.625% Glutaraldehyde 고정 전후 Ethanol 처리법, Sodium dodecylsulfate (SDS)로, 무세포화처리법 등을

시행하여 여러 가지 조건들에서 제조되는 돼지 심낭, 돼지의 대동맥, 폐동맥 판막의 임상적용 전에 광학 및 전자 현미경을 통해 구조의 변화, 특히 콜라겐 섬유와 기질의 미세구조 변화를 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 이종이식 보철편의 제조

도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 도살된 돼지에서 즉시 심낭과 대동맥, 폐동맥판막을 적출하여 차가운 phosphate buffered solution (PBS, 0.1M, pH 7.4, 4°C)에 넣어 ice box에 담아 실험실로 운반한다.

2) 이종이식 보철편 고정

살장에서 냉장상태(4°C)로 실험실로 운반한 돼지 심낭과 대동맥판막, 폐동맥판막을 도살 후 최소 12시간 내에 즉시 고정한다. 도살장에서 적출한 돼지 심낭과 대동맥판막, 폐동맥판막을 0.625% glutaraldehyde solution (PBS buffer, pH 7.4)에 담가 4°C에서 2일간 고정한 후, 상온에서 7일간 추가로 고정한다. 고정이 끝나면 가로 세로 1.5 cm 크기의 조직편들로 나누고 더 이상의 처치가 필요하지 않은 조직편들은 PBS solution으로 상온에서 24시간 동안 세척한 후 4°C의 PBS solution에 보관한다. 추가적인 항석회화 처리가 필요한 조직들은 바로 다음 단계로 진행한다.

3) 광학 현미경 및 전자 현미경 검사

광학 현미경적 검사는 적출된 심낭 혹은 대동맥, 폐동맥 판막을 사용하였으며 2~3 mm 두께의 조직을 Dubosq-brasil 용액에 1시간 넣어두었다가 10% 포르말린에 후고정한 후 파라핀포매조직을 만들어 2~4 um 절편으로 박절하여 hematoxylin-eosin, von Kossa, phosphotungstic acid hematoxylin, Movat pentachrome, elastica-van Gieson 염색을

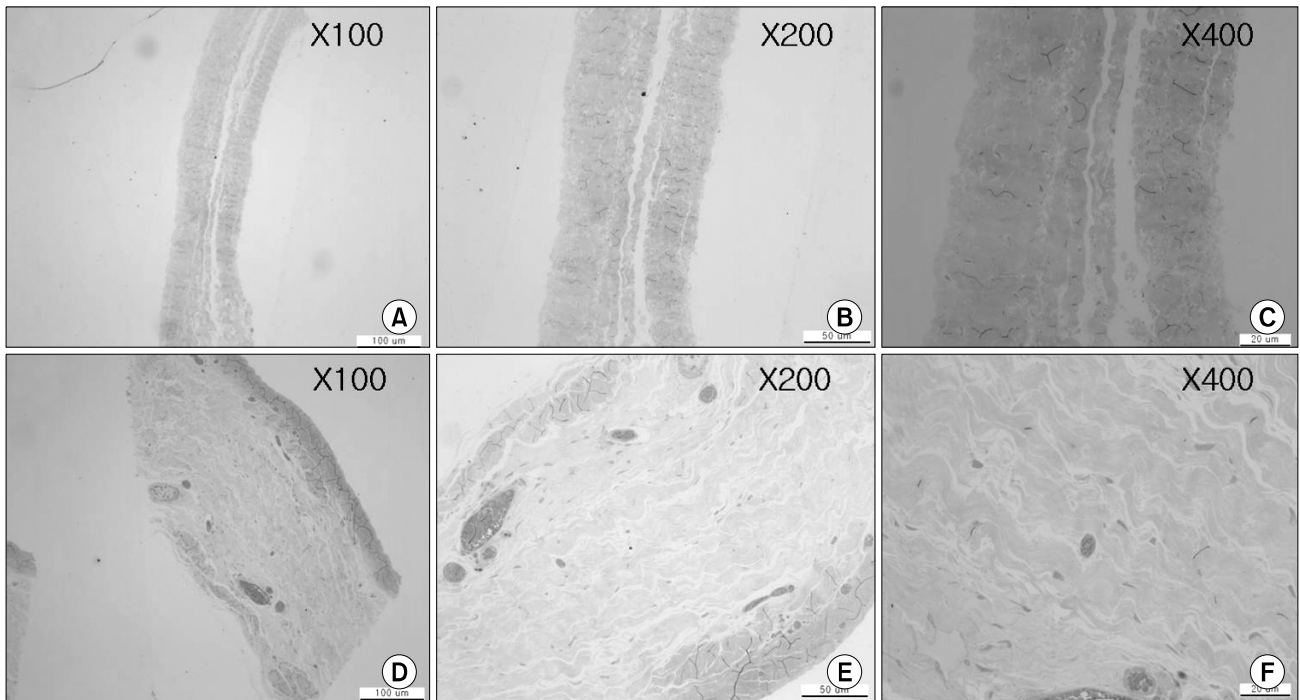


Fig. 1-1. Light micrographs of normal pericardium without processing, stained with alkaline toluidine blue. (A-C) Porcine pericardium (D-F) Human pericardium. Collagen fiber is maintained well. Human pericardium is thicker than bovine's (twice).

시행하였다.

전자 현미경적 검색은 조직을 1 mm 크기로 절편하여 4% glutaraldehyde-PBS (0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4) 용액에 고정한 후 1% OsO₄ (0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4)에 후고정하여 Epon LX 112 fixative에 embedding을 하였다. 1 μm 절편에 toluidine blue 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였고 적절한 조직 표본의 위치를 결정한 후 Reichert Ultracut E-ultramicrotome (Leica, Inc., Buffalo, NY)으로 초박절편하여 Uranyl acetate와 Lead citrate로 염색한 후 전자 현미경 JEM-100CX (Magnification; X100~X450,000, acceleration voltage: 120 kV, JEOL USA, Inc.)으로 관찰을 하였다.

4) 항석회화 및 무세포화처리(Ethanol, SDS)

(1) 80% Ethanol 처리: 80% ethanol 처리는 조직편을 0.625% glutaraldehyde 고정전과 고정후의 다른 2가지방법으로 24시간 처리하였고, 각각의 처리 과정 중에는 생리 적 용액 (PBS)로 충분히 세척(3×10 min) 한 후 다음 단계를 시행하였다.

고정된 혹은 고정되지 않은 조직편들을 4°C 80% ethanol solution (PBS buffer, pH 7.4)이 담긴 shaker bath에 넣어

상온에서 24시간 동안 처리 후, 4°C의 PBS solution에 보관하거나, 고정하지 않은 조직편은 세척 후 0.625% glutaraldehyde 고정하고, 4°C의 PBS solution에 보관한다.

(2) Sodium dodecyl sulfate (SDS)를 이용한 무세포화 과정 후 처리: 조직편들을 Hypotonic buffer (Tris, 10 mmol/L; EDTA, Aprotinin, PH 8, Sigma Co., U.S.A.)에서 상온 14시간, 그 후 0.5% SDS를 포함한 Hypotonic buffer에서 24시간, 그 후 Isotonic buffer (Tris, 50 mmol/L; EDTA, Aprotinin, PH 8, Sigma Co., U.S.A.)에서 24시간 처리하여 무세포화과정을 시행하고 생리수에 세척 후 보관하여 무세포화만 시행한 군과, 무세포화과정에 0.625% glutaraldehyde 고정용액에 추가 2주간 고정한 군을 나누었고, 추후 검사를 위하여 생리수(PBS) 세척 후 4°C에 보관한다.

(3) Ethanol처리 및 Sodium dodecyl sulfate (SDS)를 이용한 무세포화 처리: 상온에서 80% ethanol을 24시간 처리 후, 진술한 방법으로 다시 무세포화과정을 한 후 0.625% glutaraldehyde 고정용액에 추가 2주간 고정한 군과, 먼저 무세포화한 후 24시간 ethanol 처리 후 다시 0.625% glutaraldehyde 고정용액에 추가 2주간 고정한 군으로 실험을 진행하였다.

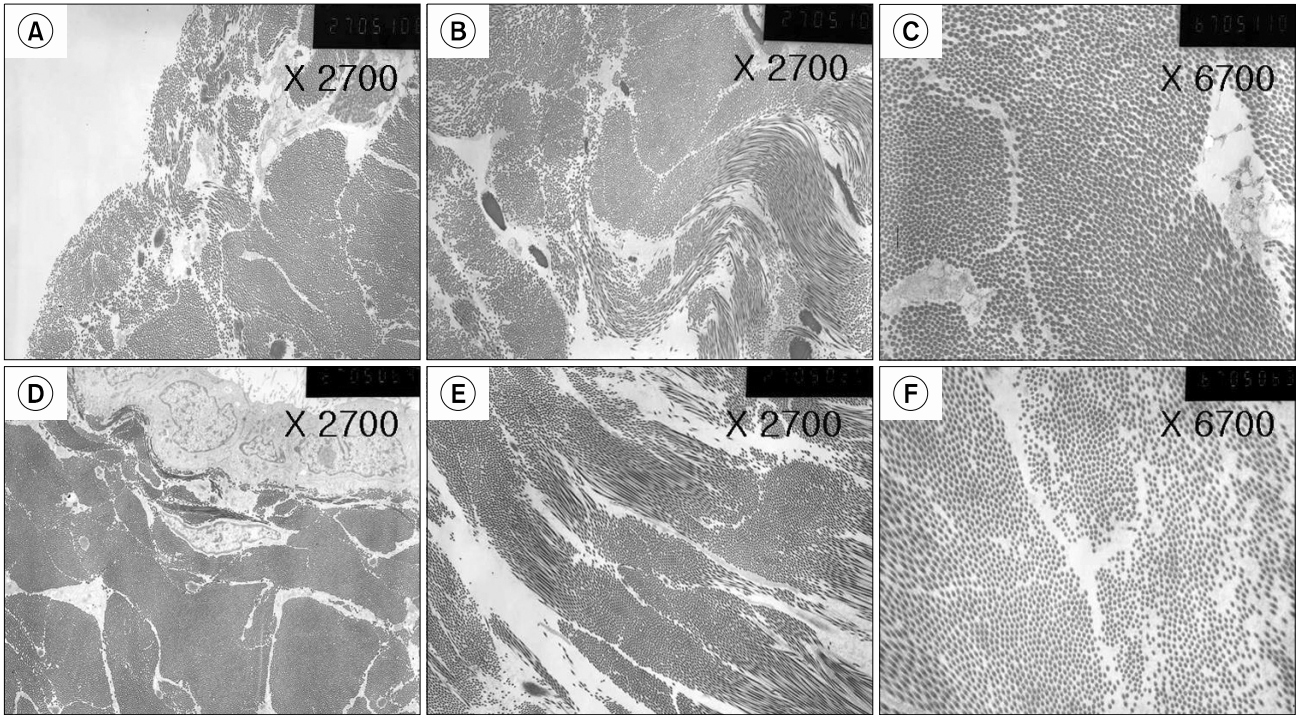


Fig. 1-2. Transmission electron micrographs of normal pericardium without processing. (A-C) Porcine pericardium (D-F) Human pericardium. Collagen fiber is maintained well. Human pericardium is thicker than bovine's (three times).

결 과

1) 아무런 처리를 하지 않은 돼지 심낭과 사람 심낭 비교

사람의 심낭(0.36 ± 0.02 mm)은 돼지 심낭(0.13 ± 0.05 mm)에 비해 세배 정도로 두꺼워 보였으며 둘다 장막층(serosal layer), 섬유층(fibrosa), 심외막 결합조직(epicardial connective tissue)로 이루어져 있었다. 장막층은 중피세포(mesothelial cell)로 이루어진 부드러운 층을 이루었다. 섬유층은 심낭의 대부분의 두께를 차지 하였고 콜라겐, 탄력섬유(elastic fibers), 신경, 혈관들, 림프관들로 이루어져 있었다. 심외막 결합조직은 느슨하게 연결된 콜라겐과 탄력섬유로 이루어져 거친 층을 이루었다(Fig. 1).

2) Glutaraldehyde 고정, 항석회화(ethanol), 무세포화 처리(SDS) 후 돼지 심낭

돼지 심낭을 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군과, 0.625% glutaraldehyde 고정전과 고정후에 80% Ethanol 처리한 군과, sodium dodecylsulfate (SDS)를 이용한 무세포화 처리만 시행한 군, 무세포화과정에 0.625% glutaraldehyde

고정한 군, 80% ethanol 처리 후 다시 무세포화과정을 한 후 0.625% glutaraldehyde 고정한 군, 무세포화한 후 다시 ethanol 처리 후 다시 0.625% glutaraldehyde 고정한 군 모두 콜라겐은 잘 유지 되고 있었다. 하지만 무세포화처리만 시행하거나 먼저 무세포화처리 후 glutaraldehyde 고정 처리한 군의 콜라겐 섬유들도 다른 군에 비해 느슨하게 연결된 양상이었다(Fig. 2).

소나 돼지의 심낭으로 만들어진 Shelhigh, Biocor, Supple Peri-guard 의 제품들도 콜라겐 섬유들은 잘 유지 되고 있었다(Fig. 3).

3) 아무런 처리를 하지 않은 돼지 대동맥 판막, 폐동맥판막

돼지 대동맥 판막, 폐동맥판막은 섬유판(lamina fibrosa), 해면질판(lamina spongiosa), 심실판(lamina ventricularis) 세 층으로 이루어져 있었다(Fig. 4). 섬유판은 원주형태의 콜라겐 섬유로 되어 있었으며, 해면질판은 glycosaminoglycans (proteoglycan)이 주 성분으로 되어 있었고, 심실판은 방사상의 탄력섬유를 가진 elastin으로 이루어져 있었다.

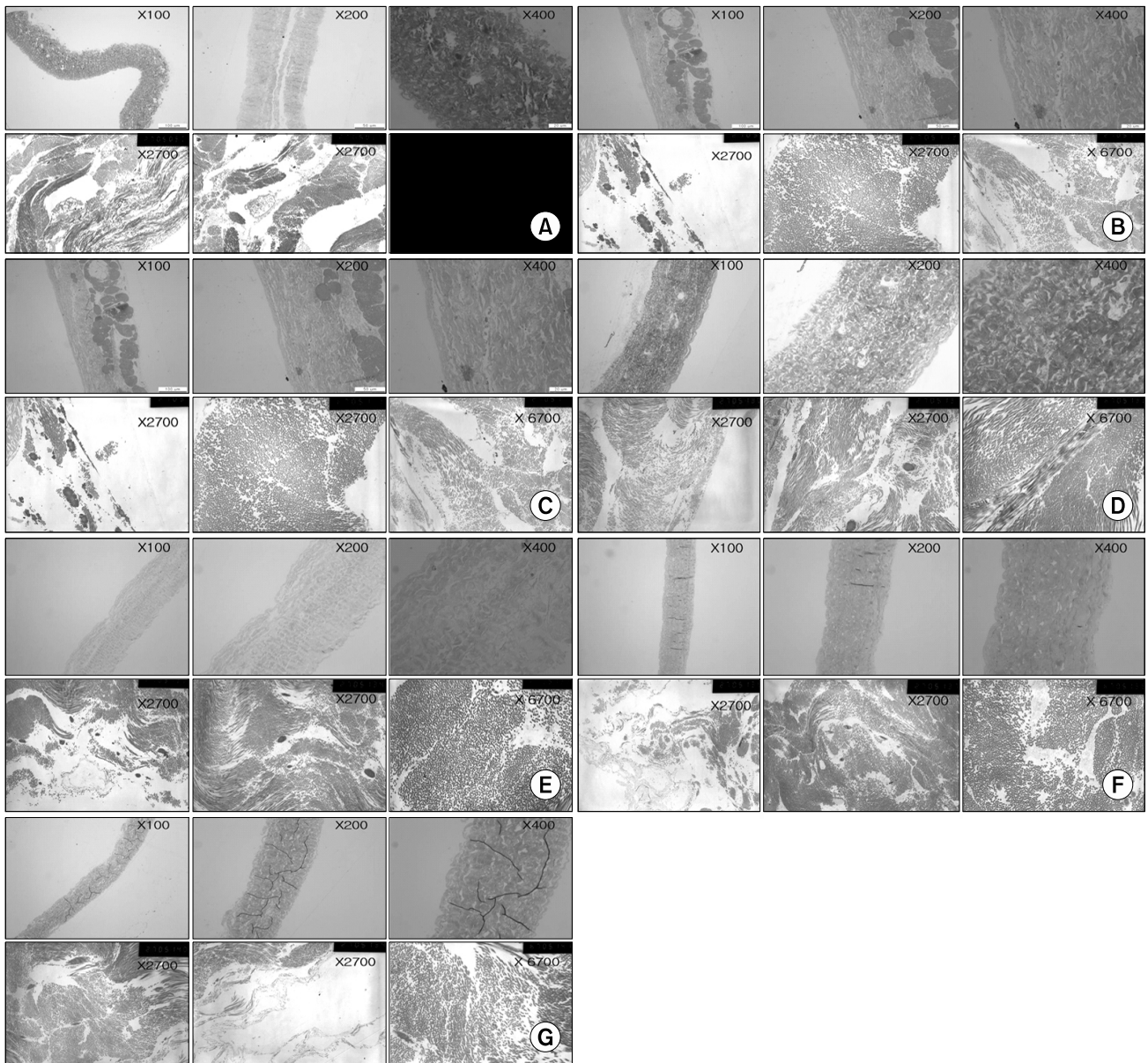


Fig. 2. Porcine pericardium with (A) glutaraldehyde (0.625%) fixation, (B) ethanol treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (C) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol treatment, (D) decellulization (0.25% SDS), (E) decellulization (0.25% SDS) treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (F) ethanol treatment+decellulization (0.25% SDS) treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (G) decellulization (0.25% SDS) treatment+ethanol treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation. Collagen fiber is maintained well, except in (D), (E), and (G). In that group, collagen fiber is slightly condensed and gaped.

4) Glutaraldehyde 고정, 항석회화, 무세포화 처리 후 돼지 대동맥 판막, 폐동맥판막

돼지 대동맥판막, 폐동맥판막을 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군과, 0.625% glutaraldehyde 고정전과 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군과, sodium dodecylsulfate

(SDS) 처리로 무세포화만 시행한 군, 무세포화과정에 0.625% glutaraldehyde 고정한 군, 80% ethanol 처리 후 다시 무세포화과정을 한 후 0.625% glutaraldehyde 고정한 군, 무세포화한 후 다시 ethanol 처리 후 다시 0.625% glutaraldehyde 고정한 군 모두 세층과 콜라겐은 잘 유지되고 있었다. 하지만 무세포화만 시행하거나 먼저 처리한 군은

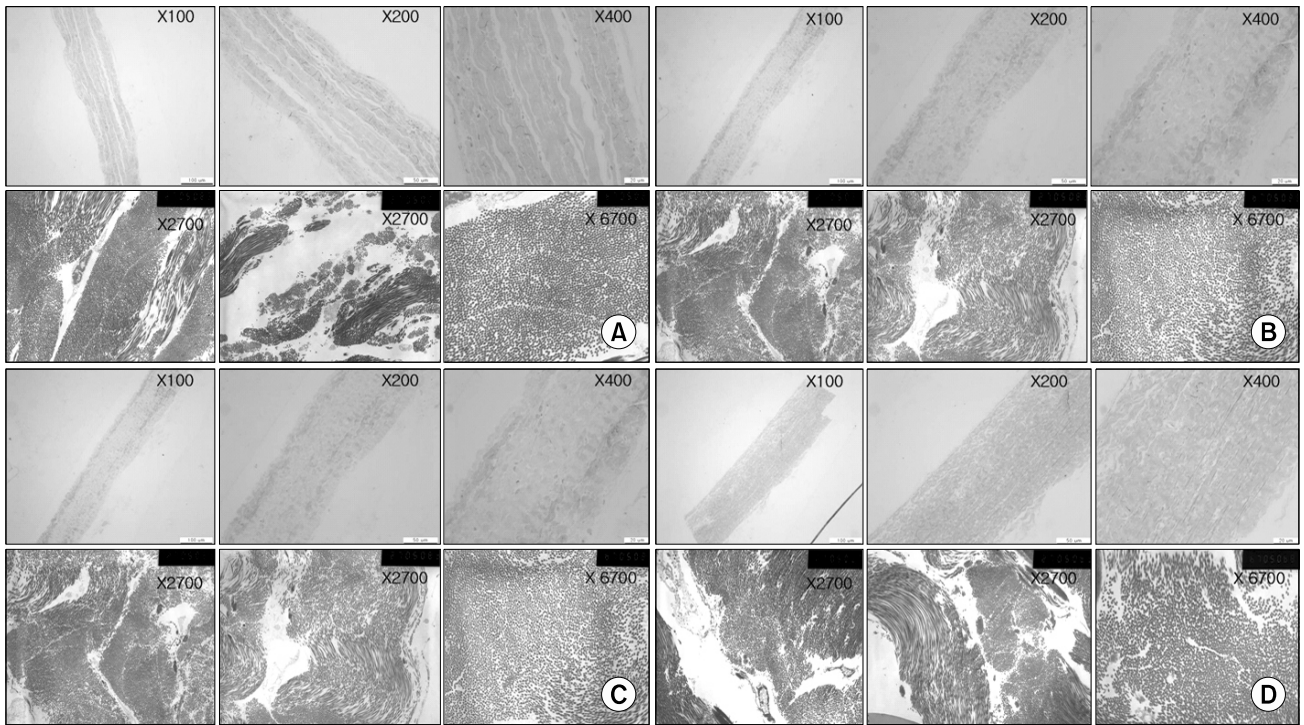


Fig. 3. (A) Shelhigh bovine pericardium, (B) Shelhigh porcine pericardium, (C) Supple peri-guard bovine pericardium, (D) Biocor bovine pericardium. Collagen fiber is maintained well.

심낭에서 처럼 콜라겐구조는 다른 군에 비해 느슨하게 연결된 양상이었다(Fig. 4).

돼지 판막 혹은 심낭으로 만들어진 Carpentier Edwards, Medtronic, Shelhigh, Biocor 등의 다른 제품들도 세계의 층은 잘 유지되었고 콜라겐도 잘 유지 되고 있었다(Fig. 5).

고 찰

본 저자들은 우리 교유의 이중이식 보철편 및 그를 이용한 제품을 만들어 내고자 이미 상용화되고 있는 기존의 이중이식 보철편들과 비교함으로써 0.625% glutaraldehyde 에 보존한 돼지심낭과 대동맥판막, 폐동맥판막을 ethanol, sodium dodecyl sulfate (SDS)를 이용한 무세포화 등으로 항석회화 처리를 한 후 임상적용 전에 이중이식 보철편의 광학 현미경 및 전자 현미경 소견을 알아 보고자 하였다. 현재 국내에서 심장 수술 등에 이용하는 조직보철편은 모두 수입 완제품으로 경제적으로 환자에게 부담이 되고 있는 실정이나, 그 제작에 특별한 어려움이 있는 것도 아니므로 표준화된 방법으로 국내에서 자체 생산하는 것이 여러 이로우미 있을 것으로 생각된다. 지금까지 사용되고

있는 모든 보철편들은 정도의 차이는 있지만 인체 내에 이식 후 석회화의 진행에 따르는 중장기 성적의 문제점들이 계속 남아 있는바 이에 중점을 두고 연구 보완하면 기존의 수입 보철편보다 한결 우수한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 조직 보철편, 대표적으로 돼지심낭 보철편은 GA에 고정 보존하는 방법이 일반적으로 이용되고 있는데, 이는 조직의 교원섬유들이 GA와 안정된 cross-link를 이루며 GA polymer를 표면에 형성하는 것을 이용한 것이지만, 이 GA의 자유 aldehyde기가 칼슘과 결합하는 것이 석회화의 주 원인으로 생각되고 있어[7,8,13] 이 aldehyde기의 결합부위를 다른 물질과 반응시켜 칼슘이 붙는 것을 방해하면 석회화를 예방할 수 있을 것이다.

인산화 지방의 심낭 조직 내로의 유입이 또 다른 석회화의 조건이 되는 것으로 알려져 있으므로 계면활성제의 전처리로 계면활성제 SDS의 친수성 부위가 지방 및 인산 지방이 조직으로 이동하는 것을 막아주는 기전을 또한 이용하였다[11,12]. 이 계면활성제의 석회화 완화 효과의 다른 가설로는 항원성 높은 세포 표면의 가용성 단백질인 mucopolysaccharide, glycoprotein 등을 이 계면활성제가 제거하여 면역학적으로 석회화를 완화한다고도 알려져 있

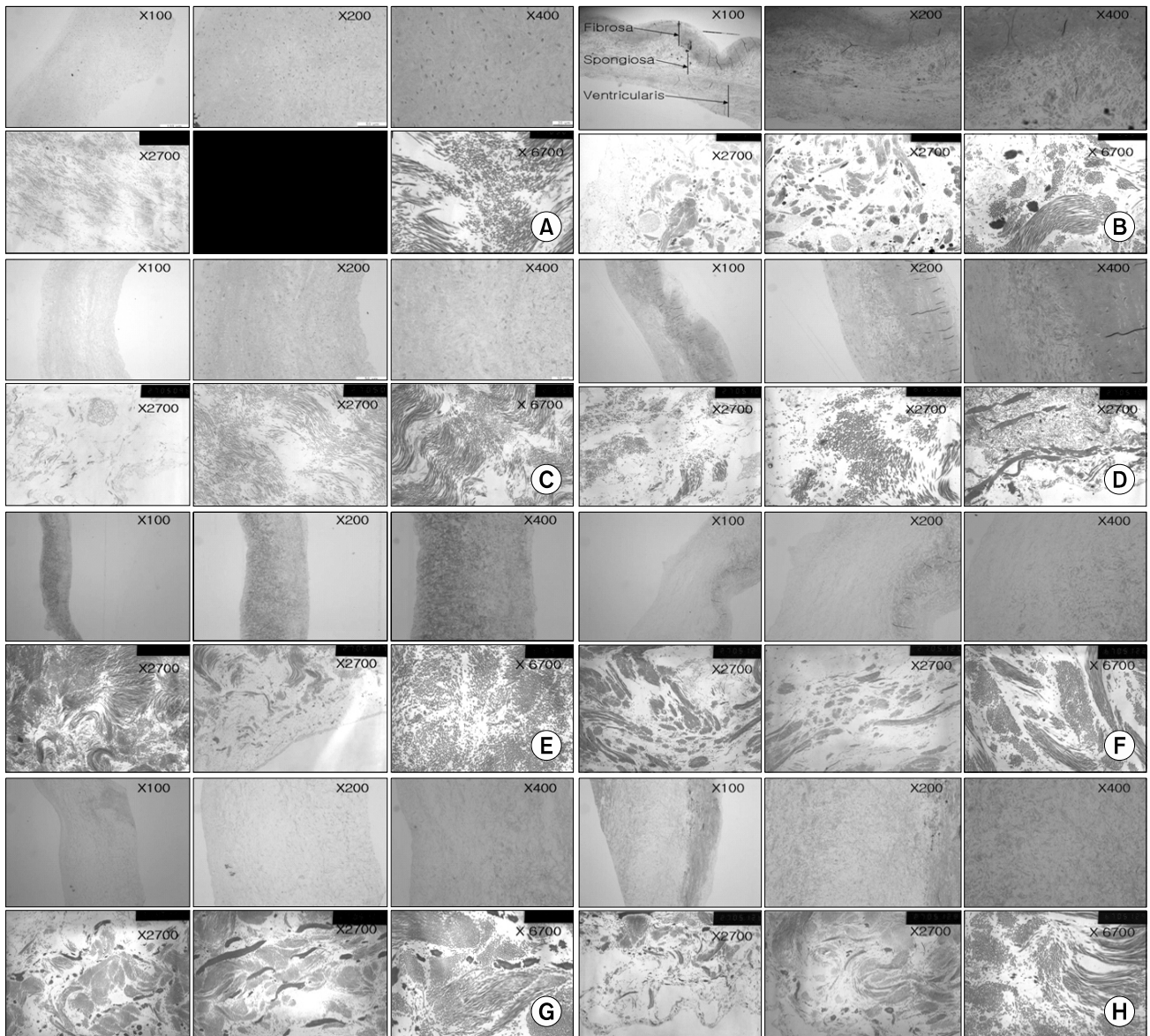


Fig. 4. Porcine valve (A) without processing, with (B) glutaraldehyde (0.625%) fixation, (C) ethanol treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (D) glutaraldehyde (0.625%) fixation+ethanol treatment, (E) decellulization (0.25% SDS), (F) decellulization (0.25% SDS) treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (G) ethanol treatment+decellulization (0.25% SDS) treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation, (H) decellulization (0.25% SDS) treatment+ethanol treatment+glutaraldehyde (0.625%) fixation. Three layers are intact. Collagen fiber is maintained well, except in (E), (F), and (H). In that group, collagen fiber is slightly condensed and acellular state.

다[7,14]. 즉 SDS가 우심낭편 표면의 세포 구성물을 용해하고 세포 외 간질층은 보존하여 중층의 elastin과 collagen network 등을 잘 유지하게 함으로서 석회화 완화 효과를 나타내는 것으로 해석할 수 있다. 최근 들어 이식조직의 무세포화는 이종이나 동종면역의 감소와 이식조직의 석회화의 발원지소소가 될 수 있는 세포를 제거하는 것이

항석회화 방법으로도 이용되고 있으며 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다[15-17].

Ethanol은 calcium phosphate nucleation을 억제하고 콜라겐의 크기와 수를 감소시켜 영구적인 변화를 초래하는 것으로 알려져 있으며, GA고정에 의한 콜라겐 fibril의 D-banding에 변화가 보고되고 있다[18,19].

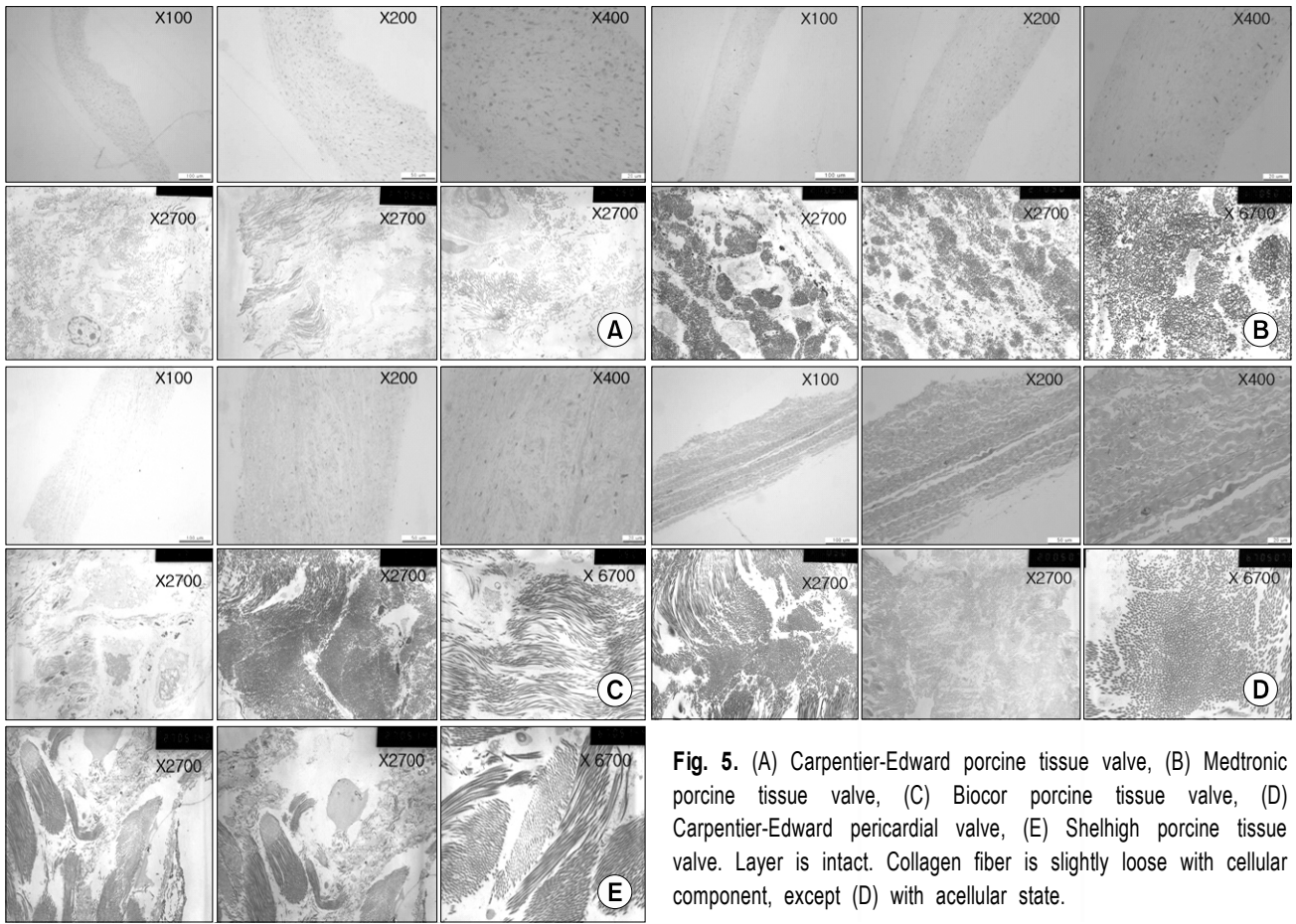


Fig. 5. (A) Carpentier-Edward porcine tissue valve, (B) Medtronic porcine tissue valve, (C) Biocor porcine tissue valve, (D) Carpentier-Edward pericardial valve, (E) Shelhigh porcine tissue valve. Layer is intact. Collagen fiber is slightly loose with cellular component, except (D) with acellular state.

일반적으로 이종 이식된 판막의 전자현미경 소견에서 본래의 판막과 다른 점은 1) 내피세포가 없고, 2) 생육 불가능한 공여된 이종 사이질세포(nonviable donor interstitial cell), 3) 기계적으로 변성된 콜라겐 골격, 4) 이식 받은 장기의 결체조직의 재증식(Repopulation by recipient connective tissue)의 결여가 알려져 있으며 이종 판막의 기능은 콜라겐 골격 유지 정도와 내구성에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있습니다[20]. 본 실험에서 이종이식 돼지심낭과 대동맥 판막, 폐동맥판막 보철편은 여러 조건하의 고정 방법들에 따라 콜라겐 골격의 전자 현미경적 구조에서 확연한 차이를 보이지 않아, GA를 이용한 각종 조직 처리과정 중 조직손상에 의한 구조적, 기계적 손실은 없는 것으로 생각되었다. 하지만 GA 고정하기 전에 SDS로 무세포화 처리를 시행한 경우 콜라겐 조직의 미세한 변성이 전자현미경에서 관찰 되었다.

전자현미경 소견에서 심낭의 콜라겐 조직은 대동맥판막의 섬유판의 콜라겐 조직만큼 치밀하지 않으며 심낭이

주로 type I 콜라겐으로 이루어진 반면 판막의 경우 type I 과 type III 콜라겐으로 이루어져 있는 것으로 알려져 있습니다[21]. 본 실험에서도 대동맥 판막, 폐동맥판막의 섬유판은 원주형태의 콜라겐 섬유로 되어 있었으며, 해면질판은 glycosaminoglycans (proteoglycan)이 주 성분으로 되어 있었고, 심실판은 방사상의 탄력섬유를 가진 elastin으로 이루어져 있었다. 섬유판은 원주형태의 콜라겐 섬유로 이루어져 주변의 대동맥벽, 폐동맥벽에 압력을 전달하여 판막첨판(valve cusp)이 높은 압력도 견딜 수 있도록 하였다. 해면질판은 영성한 콜라겐으로 구성 되어 있지만 주 성분이 glycosaminoglycans (proteoglycan)으로 물을 흡수하여 스펀지와 같은 조직을 형성함으로써 판막이 닫혀 있는 동안에 충격을 흡수할 수 있도록 되어 있다. 심실판은 주로 방사상의 탄력섬유를 가진 elastin으로 이루어져 있으며 이러한 탄력 섬유는 판막의 열고 닫히는 과정에서 판막첨판의 모양을 유지 하며 판막이 닫혀 있는 동안에는 최대한 늘어나게 된다. 심낭은 장막층, 섬유층, 심외막 결합

조직으로 이루어져 있었으며 섬유층이 심낭의 대부분의 두께를 차지 하였고 콜라겐, 탄력섬유(elastic fibers), 신경, 혈관들, 림프관들로 이루어져 있었다.

결 론

심장 수술의 증가에 따르는 보철편의 수요 증가가 계속 되는 상황에서 인공 보철편들과 타 동물로부터 채취 제작한 보철편들은 정도의 차이는 있지만 심장 내 이식 후 석회화의 진행에 따르는 중장기 수술 성적의 미흡함이 계속 문제점으로 남아 있다. 이에 본 연구 등을 통해 기존의 수입 보철편보다 한결 우수한 석회화 방지 혹은 완화 효과를 갖는 보철편을 제작, 상품화할 수 있을 것으로 기대하며, 계속해서 석회화를 방지 혹은 완화 시킬 수 있는 여러 가능성 있는 첨가제의 사용이나 세척액의 개발, 임상에서 수술 후의 새로운 약제 사용 등의 방법 개발로서 환자의 장기 예후가 호전되도록 할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS. *Pericardial substitutes: delayed exploration and findings*. Ann Thorac Surg 1987;43:383-5.
- Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N. *Technique for prevention of calcification of valvular bioprosthesis*. Circulation 1984;70(Suppl I):165-8.
- Ahn JH, Kim YJ. *Investigation of bovine pericardial heterograft (I) -concentration of fixatives and tensile strength-*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1989;22:373-83.
- Kim KB, Kim YJ, Rho JR, Suh KP. *Investigation of bovine pericardial heterograft (II)*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1990;23:465-73.
- Ahn JH, Noh YW, Rhee JH. *Pulmonary autograft with right ventricular outflow tract reconstruction in swine model*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996;29:822-7.
- Liao K, Frater RWM, LaPietra A, et al. *Time-dependent effect of Glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts*. Ann Thorac Surg 1995;60:S343-7.
- Nimmi ME. *The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis*. J Card Surg 1988;3:523-33.
- Webb CL, Benedict JJ, Schoen FJ, Linden LA, Levy RJ. *Inhibition of bioprosthetic heart valve calcification with aminodiphosphonate covalently bound to residual aldehyde groups*. Ann Thorac Surg 1988;46:309-16.
- Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R. *A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. J Cardiovasc Surg (Torino) 2006;47:711-8.
- Garcia Paez JM, Jorge-Herrero E, Carrera A, et al. *Chemical treatment and tissue selection: factors that influence the mechanical behaviour of porcine pericardium*. Biomaterials 2001;22:2759-67.
- Stein PD, Riddle JM, Kemp SP, et al. *Effect of warfarin on calcification of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valves*. J Thorac Cardiovasc Surg 1985;90:119-25.
- Golomb G, Ezra V. *Prevention of bioprosthetic heart valve tissue calcification by charge modification: effects of protamine binding by formaldehyde*. J Biomed Mater Res 1991;25:85-98.
- Carpentier SM, Monier MH, Shen M, Carpentier AF. *Do donor or recipient species influence calcification of bioprosthetic tissues?* Ann Thorac Surg 1995;60:S328-31.
- Ahn JH, Han JJ, Park SS. *Prevention of calcification in bovine pericardial bioprosthesis*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:560-6.
- Meuris B, Verbeken E, Flameng W. *Prevention of porcine aortic wall calcification by acellularization: necessity for a non-glutaraldehyde-based fixation treatment*. J Heart Valve Dis 2005;14:358-63.
- Schoen FJ, Levy RJ. *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg 2005;79:1072-80.
- Hirsch D, Drader J, Thomas TJ, Schoen FJ, Levy JT, Levy RJ. *Inhibition of calcification of porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies*. J Biomed Mater Res 1993;27:1477-84.
- Jastrzebska M, Mroz I, Barwinski B, Zalewska-Rejda J, Turek A, Cwalina B. *Supramolecular structure of human aortic valve and pericardial xenograft material: atomic force microscopy study*. J Mater Sci Mater Med 2007;28; [Epub ahead of print]
- Jastrzebska M, Wrzalik R, Kocot A, Zalewska-Rejda J, Cwalina B. *Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue*. J Biomater Sci Polym Ed 2003;14:185-97.
- Schoen FJ. *Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology*. J Heart Valve Dis 1999;8:350-8.
- Hiester ED, Sacks MS. *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements*. J Biomed Mater Res 1998;39:207-14.

=국문 초록=

배경: 지금까지 심장 및 혈관 등의 결손을 교정하기 위하여 자기 조직이 아닌 다른 보철편의 필요가 증가함에 따라, 그에 따른 다양한 대체체가 연구 개발되고 있으며, 임상에서 실제로 흔히 이용되고 있다. 본 연구는 새로운 조직의 처리방법을 개발하기 위하여 이미 상용화되고 있는 기존의 일부 이중 이식 보철편들과, 여러 가지 조건 들에서 제조되는 이중조직인 돼지 심낭과 대동맥, 폐동맥판막 등의 보철편들의 임상적용 전에 각종 고정, 처리 방법에 따른 이중조직의 조직학적 변성이나 변화의 가능성을, 물리적, 구조적, 기능적 최적의 상태를 분석하기 위하여 광학 현미경 및 전자 현미경 소견을 통하여 알아 보고자 하였다. **대상 및 방법:** 1) 0.625% glutaraldehyde 용액에 고정 전과 고정 후의 돼지 심낭과 대동맥, 폐동맥판막, 사람의 심낭, 그리고 상용화 되고 있는 기존의 이중이식 보철편들과 광학 및 전자현미경으로 비교관찰 하였다. 2) 돼지 심낭과 대동맥, 폐동맥판막을 0.625% glutaraldehyde 고정 전과 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군과, sodium dodecylsulfate (SDS) 을 이용하여 무세포화 처리한 시행한 군, 무세포화과정 후에 0.625% glutaraldehyde 고정한 군, 80% ethanol 처리 후 다시 무세포화과정을 한 후 0.625% glutaraldehyde 고정한 군, 무세포화한 후 다시 ethanol 처리 후 다시 0.625% glutaraldehyde 고정한 군으로 나누어 각각을 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다. **결과:** 1) 돼지 심낭은 장막 층(serosal layer), 섬유층(fibrosa), 심외막 결합조직(epicardial connective tissue)로 이루어져 있었으며, 여러 가지 처치 후에도 모두 콜라겐 섬유는 잘 유지 되고 있었다. 하지만 무세포화만 시행하거나 먼저 무세포화 처리한 군의 콜라겐구조는 다른 군에 비해 느슨하게 연결된(loosely condensed) 양상이었다. 기존의 소나 돼지의 심낭으로 만들어진 Shelhigh, Biocor, Supple Peri-guard 등의 제품들의 콜라겐 섬유는 비교적 잘 유지 되고 있었다. 2) 돼지 대동맥, 폐동맥 판막은 섬유판(lamina fibrosa), 해면질판(lamina spongiosa), 심실판(lamina ventricularis) 세층으로 이루어져 있었으며 이 판막들은 여러가지 처치 후에도 모두 세층과 콜라겐 섬유는 잘 유지 되고 있었다. 하지만 무세포화만 시행하거나 먼저 처리한 군은 심낭에서 처럼 콜라겐구조는 다른 군에 비해 약간 느슨하게 연결된(loosely condensed) 양상이었다. 돼지 대동맥판막으로 만들어진 Carpentier Edwards, Medtronic, Shelhigh, Biocor의 다른 제품들도 세개의 층은 잘 유지되었고 콜라겐도 잘 유지 되고 있었다. **결론:** 이중이식 돼지심낭과 대동맥 판막, 폐동맥 판막 보철편은 여러 조건하의 고정 방법들에 따라 광학 및 전자 현미경적 구조의 확연한 차이를 보이지 않아, Glutaraldehyde를 이용한 각종 조직 처리과정 중 조직손상에 의한 구조적, 기계적손실은 없는 것으로 생각되며, sodium dodecylsulfate (SDS)을 이용하여 무세포화 처리를 시행한 경우 대부분의 보철편에서 콜라겐 조직의 미세한 변성이나 분해(degradation)가 광학 및 전자현미경에서 관찰되어, 무세포화의 처리방법이나 조건의 적절화가 필요한 것으로 생각되었다.

- 중심 단어 :** 1. 석회화
2. 이중 조직
3. 글루탈알데하이드
4. 전자현미경