

다양한 고정 처리법을 이용한 소 심장의 기계적 피로 자극 후 역학적 및 조직학적 변화

장형우* · 김용진* · 김수환** · 박지은** · 박천수* · 김웅한* · 김경환*

The Dynamic and Histologic Changes of Various Fixed Bovine Pericardiums Specimens after Mechanical Fatigue Stimuli

Hyoung Woo Chang*, Yong-Jin Kim*, Soo Hwan Kim**, Ji Eun Park**, Chun Soo Park*, Woong-Han Kim*, Kyung-Hwan Kim*

Background: As cardiovascular operations become more complex and sophisticated, there is an increasing need for various bioprostheses for use as components of blood vessels and heart valves. We developed a fatigue stimuli test instrument to objectively evaluate the mechanical durability of a bioprosthesis, and we tested several currently-known processing methods for bovine pericardium and we then compared the results. **Material and Method:** Fresh bovine pericardium was collected at the butcher shop with using aseptic technique, and each piece of pericardium was fixated and/or decellularized by 16 representative methods. We measured the permeability and compliance of the processed bovine pericardium samples, and measured them again after exposure to the fatigue stimuli. All the pieces of pericardium underwent microscopic examinations before and after the fatigue stimuli. **Result:** A mixture of glutaraldehyde and solvent treatment showed better mechanical durability than did the single glutaraldehyde treatment. High concentration glutaraldehyde treatment showed equal or no worse results than did low concentration glutaraldehyde treatment. After SDS (sodium dodecylsulfate) decellularization, the mechanical property of the bioprosthesis became much worse (20~190 times) and the mechanical durability to the fatigue stimuli was also very poor. **Conclusion:** We obtained the basic durability data after various fixation methods with using a home-made fatigue test instrument.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:148-156)

Key words: 1. Bioprosthesis
2. Pericardium
3. Biomedical engineering

서 론

심장 수술이 발전함에 따라 복잡 심기형 또는 재수술 등의 빈도가 높아지고 있으며, 이에 따라 심장 및 혈관 등을 재구성하고 결손부위를 보강하기 위한 생체 또는 화학

물질 보철편의 필요성이 대두되고 있으며, 세계적으로 다양한 재료들이 연구 개발, 이용되고 있는 실정이다. 그러나 가장 흔히 사용되는 이중 조직보철편은, 내구성이나 석회화 방지, 수술조작의 용이성 등에 있어 많은 부분이 미결 과제로 남아 있으며[1,2], 본 흉부외과학교실에서도

*서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

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

**서울대학교병원 임상의학 연구소, 바이오 이중장기개발사업단

Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 이루어진 것임(과제고유번호: A040004-008).

논문접수일 : 2008년 10월 6일, 심사통과일 : 2009년 2월 3일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-1509, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

좀더 나은 성질의 이종 조직보철편 개발을 위해 연구를 계속하고 있는 바, 이미 여러 편의 논문에서 이종 조직보철편의 동물 실험 및 제한적 임상 적용의 결과를 발표한 일이 있다[3-9]. 연구의 방향은 크게 두 가지로, 첫째는 신선 이종 심낭편의 보관, 탈세포화 및 고정 등 처리과정에 따른 결과물의 석회화 내성을 높이기 위한 것이며[5,7,8], 둘째는 신선 이종 심낭편의 처리과정에 따른 결과물의 기계적 성질을 개선하기 위한 것이다[3,4,6,9]. 이 연구는, 신선 이종 심낭편을 다양한 방법으로 처리한 후, 자체 개발한 조직편의 피로 실험 장치를 이용하여 일정한 기간과 강도의 기계적 부하를 준 뒤 피로 실험 전후의 성질을 비교하고, 또한 신선 이종(소) 심낭편의 처리방법에 따라 피로 실험에 대한 반응이 어떠한지를 비교하여 분석한 내용이다. 구체적으로는, 조직보철편의 면에 가해지는 압력에 따른 변형의 정도(유순도), 보철편의 면에 가해지는 정수압에 의해 발생하는 투과성의 정도 등이 주 관심사였다. 이와 함께 각 결과물들에 대해 현미경 분석을 통하여, 피로 실험 전후에 조직의 치밀도가 어떻게 변화하는지, 탈세포화 등에 따른 조직의 치밀도 변화는 어떠한지 등도 검사하였다. 투과도는 낮을수록 좋다고 생각하며, 유순도 역시 낮을수록 좋다고 본다. 특히 피로 실험 전후로 이러한 투과도와 유순도의 값이 변하는 정도가 적을수록 더 나은 고정 처리방법이라고 해석된다.

신선 이종(소) 심낭편을 처리하는 과정은 채취, 탈세포화, 고정 등으로 나뉜다. 탈세포화는 삼투압처리와 SDS (Sodium dodecylsulfate) 등을 이용하여 신선 이종(소) 심낭편에 존재하는 세포의 대부분을 제거하는 과정을 말하며, 처리 온도 및 사용 용액의 종류 등에 따라 다양한 방법이 있다. 고정은, 글루타르알데히드를 기본으로 하여 용매(solvent)를 사용하거나 또는 사용하지 않고 심낭편 단백질의 변형을 초래하여 보존성을 확보하는 과정을 말하며, 글루타르알데히드의 농도 및 용매 사용 여부, 용매의 종류 등에 따라 여러 가지 방법이 가능하다. 고정은 부수적으로 멸균효과와 항원성을 떨어뜨리는 효과를 가지며 이는 이종 이식 심낭편이 체내에서 감염 및 면역반응을 적게 일으키도록 하기에 매우 중요하다.

대상 및 방법

1) 이종 이식 보철편의 채취

도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 소나 돼지를 도살하여 즉시 소, 돼지심낭과 돼지대동맥, 폐동맥관막을 무

균법으로 적출하여 차가운 phosphate buffered solution (PBS, 0.1 M, pH 7.4, 4°C)에 넣어 아이스 박스에 담아 실험실로 운반한다.

2) 탈세포화(decellularization)

신선 이종 심낭편을 저장성(hypotonic) buffer에 12시간 동안 담가두고, 세척후 0.25% SDS를 포함한 저장성(hypotonic) buffer에 16시간 동안 담가 둔 뒤, 그 후 등장액에 8시간 동안 담가 둔다. 무세포화에 사용하는 용액에는 교질(matrix)조직의 보호를 위하여 항단백분해효소제나 항섬유분해효소제 등을 첨가하였으며, 전 과정은 냉장상태인 4°C, 회전 분탕기(rotating shaker)내에서 처리하고, 이후 고정 과정을 거치게 된다. 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 신선 이종 심낭편을 즉시 고정 처리하는 것이다.

3) 고정(fixation)

고정에는 글루타르알데히드와 용매(solvent)가 쓰이는데, 글루타르알데히드 0.2%, 0.25%, 0.5%, 0.6%, 3% 용액을 사용하였고, 용매는 에탄올(ethanol) 60%, 80%, 95% 용액이거나 75% 에탄올과 5% 옥타놀(octanol)의 혼합 용액, 혹은 75% 에탄올과 5% 옥타네디올(octanediol)의 혼합 용액 등을 사용하였다. 고정시간, 고정농도, 보관방법 등은 Table 1~3와 같으며, 고정의 온도는 4°C 또는 실온(room temperature)이었다.

4) 보관(storage)

0.25% 또는 0.3% 글루타르알데히드를 사용하였으며, 12일간 실온에서 보관한 심낭편을 실험에 사용하였다. 실험 초기에는 0.3% 글루타르알데히드 용액을 사용하였으나 후에는 0.25%를 사용하기로 하여 방법을 통일하였다.

5) 투과도(permeability) 검사

탈세포화, 고정, 보관 등의 처리과정을 마친 심낭편에, 생리식염수를 이용하여 100 mmHg의 압력을 1시간 동안 한쪽 방향에서 가한 뒤, 심낭편을 투과한 생리식염수의 양을 측정한다. 1시간 동안 동일한 면적의 심낭편을 투과한 생리식염수의 부피(cc/hr · cm²)로 결과를 표시한다. 투과성의 차이는 콜라겐 섬유다발의 영구적인 늘어남과 간격(gap)의 발생의 정도와 연관이 있다고 본다.

6) 유순도(compliance) 검사

탈세포화, 고정, 보관 등의 처리과정을 마친 심낭편에,

Table 1. Permeability and compliance of variously fixed bovine pericardium, before and after fatigue stimuli. Different solvents were used

Bovine pericardium fatigue test	Permeability (cc/hr · cm ²)		Compliance; 100 to 200 mmHg (μL/mmHg · cm ²)	
	Before	After	Before	After
Solvent focused - storage: 0.3% GA for 12 days at room temperature				
1. 0.5% GA for 2wks at RT (control)	0.07	0.51	0.29	0.54
2. 0.25% GA + 60% EtOH for 2d at 4°C + storage	0.03	0.41	0.19	0.67
3. 0.2% GA + 60% EtOH for 2d + storage	0.01	0.01	0.22	0.13
4. 0.25% GA + 95% EtOH for 3d + storage	0.11	0.05	0.19	0.25
5. 0.6% GA + 80% EtOH for 3d at 4°C + storage	0.01	0.16	0.64	0.51
6. 0.6% GA + 45% EtOH + 5% octanol at 4°C for 3d + storage	0.00	0.59	0.22	0.64
7. 0.6% GA + 45% EtOH + 5% octanediol at 4°C for 3d + storage	0.00	0.76	0.45	0.92
8. 0.5% GA + 30% n-butanol + 50% EtOH for 3d + storage	0.03	0.02	0.35	0.25

GA=Glutaraldehyde; EtOH=Ethanol; RT=Room temperature; d=Days.

Table 2. Permeability and compliance of variously fixed bovine pericardium, before and after fatigue stimuli. High concentration glutaraldehyde was used

Bovine pericardium fatigue test	Permeability (cc/hr · cm ²)		Compliance; 100 to 200 mmHg (μL/mmHg · cm ²)	
	Before	After	Before	After
High concentration glutaraldehyde fixation - storage: 0.25% GA for 12 days at room temperature				
9. 3% GA for 3d at RT + storage	0.17	0.16	0.25	0.32
10. 3% GA + 80% EtOH for 3d + storage	0.16	0.22	0.22	0.70
11. 3% GA + 20% n-butanol + 50% EtOH for 3d + storage	0.05	0.06	0.19	0.32
12. 3% GA + 45% ethanol + 5% octanol for 3d + storage	0.00	0.00	0.38	0.19

GA=Glutaraldehyde; EtOH=Ethanol; RT=Room temperature; d=Days.

생리식염수를 이용하여 각각 100, 120, 140, 160, 180, 200 mmHg의 정수압을 한쪽 면에서 가하여, 심낭편의 변형된 부피를 측정한다. 압력이 100 mmHg에서 200 mmHg로 증가하는 동안 변형된 부피를 유순도의 값으로 정하며, 심낭편의 면적이 다를 경우에도 비교가 가능하도록 하기 위하여 단위 면적으로 나누어, 단위는 μL/mmHg · cm²가 된다. 유순도의 변화는 콜라겐 섬유다발의 변성과 이완, 손상 정도와 연관이 있다고 본다.

7) 피로 실험(fatigue test)

실험을 위해 장비를 고안하였다. 지름이 25 mm인 원 모양의 심낭편에 박동성의 압력을 한쪽 방향에서 짧은 간격으로 반복해서 가할 수 있는 장치로, 생체 내에 심낭편을 이식하여 판막염으로 사용하는 경우를 재현하기 위해 0~180 mmHg까지의 박동성 압력 재현이 가능하다. 초당 7회

로 총 천 5백만 회의 압력 스트레스를 가하게 된다.

8) 광학 현미경 검사

각각의 실험 전후 및 보관 과정까지 끝난 심낭편은 10% 포르말린 용액에 담가진 채로 즉시 병리과로 보내졌으며, 파라핀 포매조직을 만들어 2~4 μm 절편으로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

결 과

1) 신선 우심낭편의 투과도와 유순도 측정

기본적인 실험결과 비교의 근거자료로서 아무런 처리를 하지 않은 신선 우심낭을 재료로 하여 투과도와 유순도를 측정하였다. 평균 투과도는 0.93 cc/hr · cm²였으며 표준 편차는 0.97이었다. 평균 유순도는 0.40 μL/mmHg · cm²

Table 3. Permeability and compliance of variously fixed bovine pericardium, before and after fatigue stimuli. Decellularization was applied or not

Bovine pericardium fatigue test	Permeability (cc/hr · cm ²)		Compliance; 100 to 200 mmHg (μL/mmHg · cm ²)	
	Before	After	Before	After
Decellularization focused - storage: 0.25% GA for 12 days at room temperature				
13. Fresh pericardium → 0.5% GA for 3d at RT+storage	0.04	0.25	0.48	0.76
14. Decellularized pericardium → 0.5% GA for 3d at RT+storage	7.64	19	4.1	8.28
15. Fresh pericardium → 0.5% GA + 80% EtOH for 3d+storage	0.23	0.13	0.57	0.32
16. Decellularized pericardium → 0.5% GA + 80% EtOH for 3d+storage	5.0	17	3.5	8.9

GA=Glutaraldehyde; EtOH=Ethanol; RT=Room temperature; d=Days.

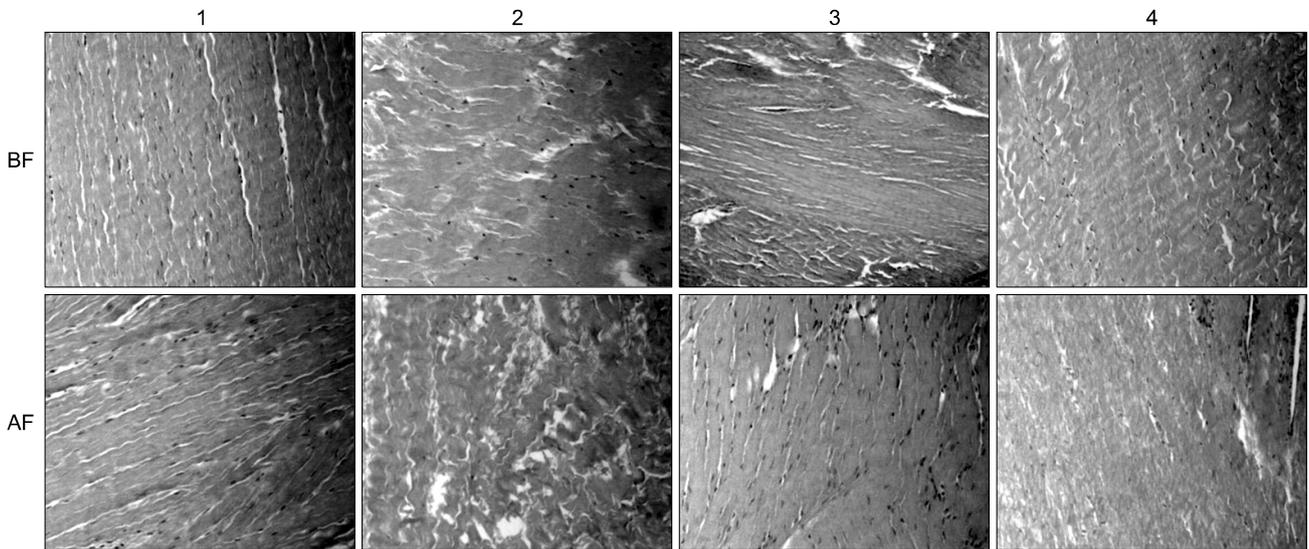


Fig. 1. H&E stain of fixed bovine pericardium (×100). Glutaraldehyde±various solvents. (1~4) BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

이고 표준 편차는 0.28이었다.

2) 용매(solvent)의 혼합여부 또는 용매의 농도에 차이를 둔 실험군

이 군에 속한 샘플은 여덟 개였다(Table 1). 현미경 관찰상 각각의 샘플에서 피로 실험 전후에 조직학적 차이는 특별히 발견할 수 없었다(Fig. 1, 2). 그러나 투과성 및 유순도 검사에 있어서는 에탄올 용매를 혼합하여 고정한 경우가 용매를 혼합하지 않은 경우에 비해 좀더 좋은 특성, 즉 피로 실험 전후로 투과성과 유순도가 낮은 상태로 유지되는 특성을 보였다(Table 1). 또한, 고정 시에 용매를 혼합한 경우 중에서도 그 용매의 농도가 높은 경우에 더 좋은 결과를 보였다. 결국, 가능한 높은 농도의 용매를 사용하여 고정하는 것이 더 좋은 결과물을 만들어낸다는 사

실을 알 수 있었다. 추가 실험을 통해 에탄올의 농도가 80%정도일 때에 가장 좋은 결과를 보임을 알 수 있었는데, 용매로서 에탄올에 더하여 옥타네디올, 옥타놀 등을 추가하였을 때에는 에탄올 농도에 큰 영향을 받지 않았다. 에탄올과 부타놀을 용매로 사용한 고정은 투과성과 유순도의 유지 측면에서는 유리하지만 외과의사가 샘플을 이용하여 실험적인 외과 수술조작을 가할 때 주관적인 불편함이 심하여 곤란하였다. 최종적으로 8개의 고정방법 중 0.6% 글루타르알데히드 용액에 80%의 에탄올을 섞어 3일간 고정한 후에 0.3% 글루타르알데히드 용액에 담가 12일간 보관한 것이 투과도, 유순도 유지가 잘 되었으며, 피로 실험 전후의 조직학적인 변화도 매우 적었다(Table 1).

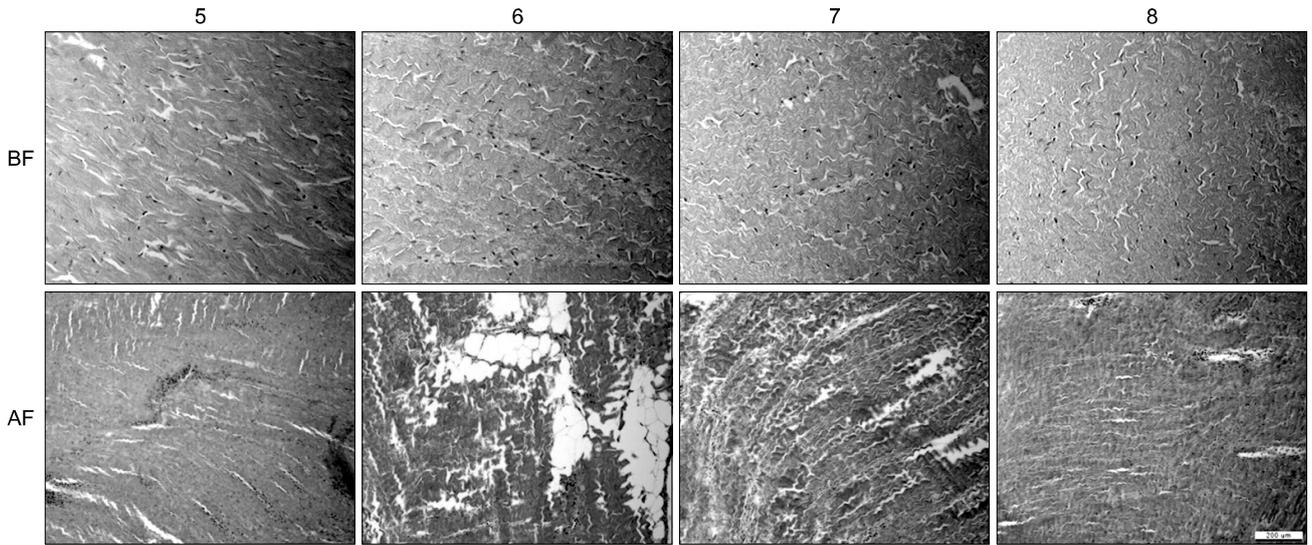


Fig. 2. H&E stain of fixed bovine pericardium (×100). Glutaraldehyde±various solvents. (5~8) BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

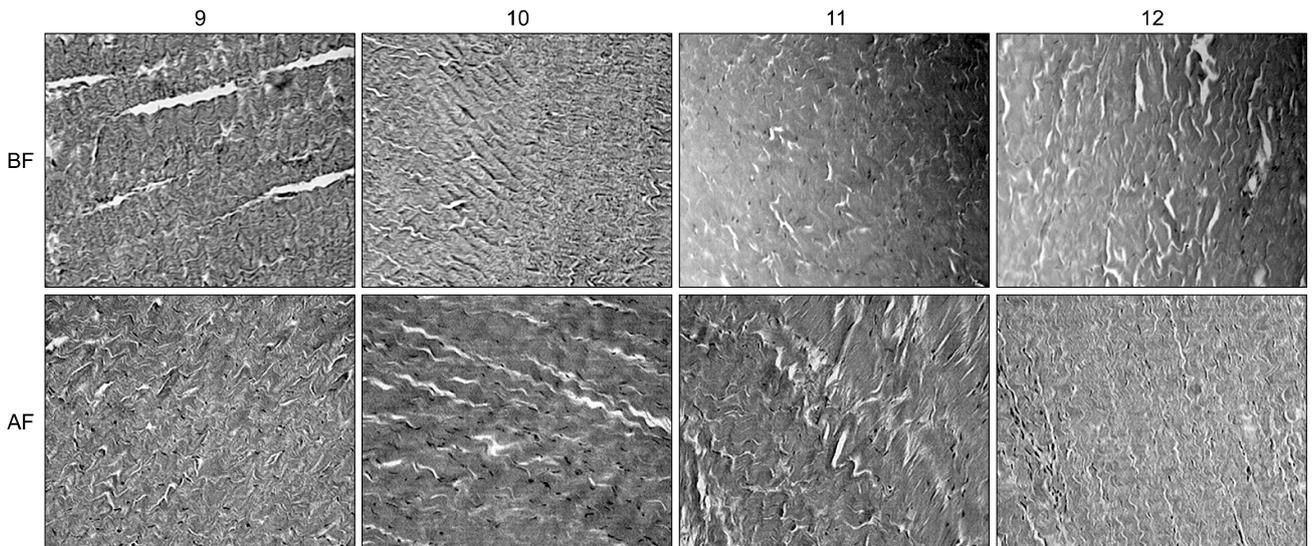


Fig. 3. H&E stain of fixed bovine pericardium (×100). High concentration glutaraldehyde (3%)±various solvents. (9~12) BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

3) 고농도 글루타르알데히드 사용 여부에 차이를 둔 실험군

이 군에 속한 샘플은 네 개였다. 고정용 글루타르알데히드의 농도는 대체로 저농도(1%)와 고농도(2~3% 정도)로 분류되는데, 이에 본 연구자들은 기존의 1% 미만 농도 글루타르알데히드를 이용한 고정법 대신 3% 글루타르알데히드와 용매를 사용하여 심낭편을 고정한 뒤 피로 실험 전후에 투과도, 유순도 및 조직학적 특성 등을 확인하였다. 그 결과

3% 글루타르알데히드를 사용한 군이 피로 실험 전후로 투과도, 유순도, 조직학적 특성에서 0.5% 글루타르알데히드 사용군에 비해 열등하지 않았다(Table 2). 조직학적으로도 피로 실험 전후에 큰 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 3).

4) 탈세포화(decellularization) 및 용매 사용 여부에 차이를 둔 실험군

이 군에 속한 샘플은 네 개였다. 탈세포화는 전통적으로 SDS (sodium dodecylsulfate) 용액을 사용하며 최근 다

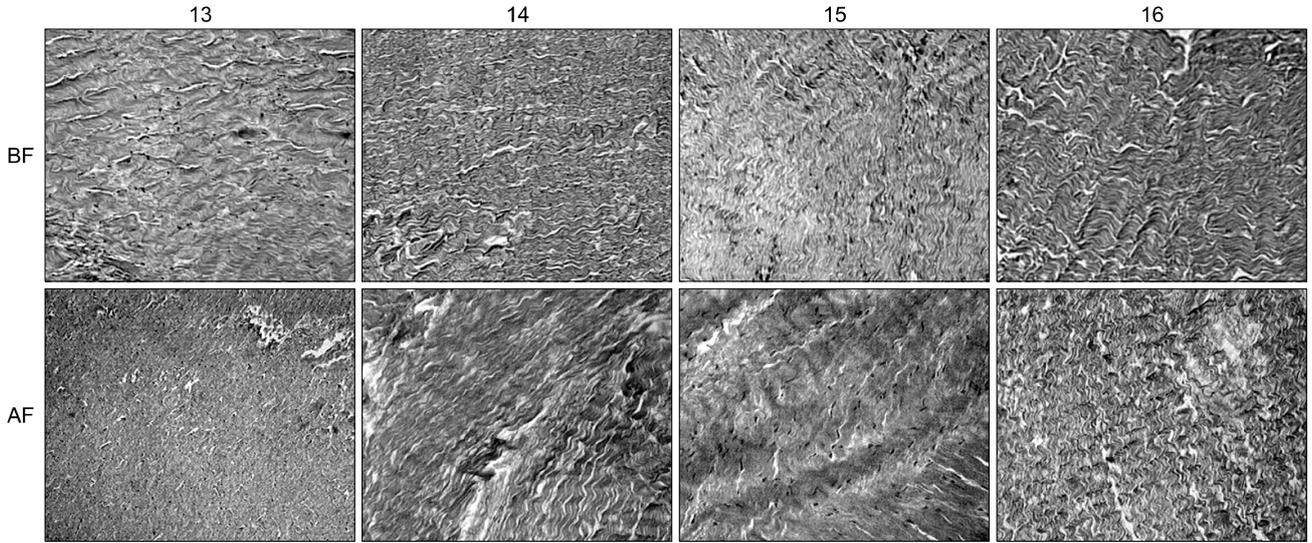


Fig. 4. H&E stain of fixed bovine pericardium (×100). Decellularization (±)solvent (80% ethanol). (13~16) BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

른 물질을 사용하기도 한다. 본 실험에서는 0.25% SDS 용액을 사용하였으며, decellularization 여부에 따라, 그리고 용매(에탄올)를 사용했는지 혹은 사용하지 않았는지의 여부에 따라 네 가지의 경우에 대해 피로 실험 전후로 투과성, 유순도, 조직학적 특성을 확인하였다. 그 결과 탈세포화를 시행한 샘플은 피로 실험 이전부터 투과성이 훨씬 높았고, 유순도 자체도 크게 높아져 있었다(Table 3). 피로 실험 후에는 탈세포화 시행군과 미시행군의 차이가 더욱 커져서, 탈세포화가 심낭편의 기계적 특성을 매우 악화시킨다고 생각되었다. 뿐만 아니라, 광학 현미경 검사에서도 탈세포화 처리 심낭편은 피로 실험 이전에 이미 콜라겐섬유다발의 치밀도가 떨어지고, 간혹 간격(gap)이 관찰되고, 피로 실험 후에는 이러한 현상이 심화되어, 콜라겐섬유다발의 분열(fracture), 손상 및 간격(gap)이 더욱 심해지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4)

고 찰

심혈관 수술에 사용할 적절한 대체물질을 찾는 연구가 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있는 가운데, 그 연구들은 크게 보아 두 가지의 중요 목표를 향하고 있다. 첫째는, 대체 물질이 인체 내에서 최소한의 생화학적, 면역 반응을 일으킬 것, 그렇게 함으로써 생화학, 면역 반응에 가장 큰 원인이 있다고 생각되는 석회화 및 혈관 내막의 과증식(intimal hyperplasia), 조직변성 등을 줄이고 대체 물질

의 인체 내 사용 기한을 늘려야 하는 것이며, 둘째는, 대체 물질이 갖는 물리학적 특성이 우수하여 수술 시 조작성이 용이하고 즉석에서 가공하기 쉬우며 오랜 기간 동안의 반복적인 혈액학적 스트레스에 대해 내구성을 지녀야 한다는 것이다.

1) 글루타르알데히드와 용매의 혼합 사용

소나 돼지의 심낭을 글루타르알데히드와 같은 시약으로 가공하여 콜라겐물질에 교차결합(crosslink)을 만들어주는 방법이 소개되고 난 뒤로 동물의 심낭을 인간의 수술에 사용할 수 있게 되었으며, 특히 글루타르알데히드를 이용한 처리가 이종이식편(xenograft)의 면역원성(immunogenicity)을 상당히 완화시켜준다는 사실이 알려지고 나서는 대부분의 연구에서 기본적으로 글루타르알데히드를 사용하고 있다. 그러나 글루타르알데히드를 사용하여 이종이식편을 고정하더라도, 석회화나 기계적으로 수명이 다하는 현상을 완전히 막을 수는 없다. 이 때문에 글루타르알데히드가 아닌 다른 고정 용액을 사용하거나, 또는 글루타르알데히드에 무수(anhydrous) 용매를 혼합하여 사용함으로써 특히 판막의 탄력섬유(elastin)의 교차결합을 유도하고, 조직에 생화학적 반응을 가하여, 판막이나 심낭의 고정 후 기계적 특성이나 장기적인 석회화를 인위적으로 조절하고자 하는 시도가 있었다[10].

2) 글루타르알데히드의 농도

글루타르알데히드를 이용하여 고정된 심낭편은 인체 내에 이식하였을 때 그 위로 내피화(endothelialization)가 일어나지 않는데 이것은 글루타르알데히드가 갖는 세포독성(cytotoxicity) 때문으로 생각되었고 이 때문에 고정 후에 글루타르알데히드를 충분히 제거(detoxify or neutralize) 하기 위한 린싱(rinsing), 아미노산(amino acid)을 이용한 중화법, 보관법(storage method) 등이 제시되었다[11]. 그러나 이 세포독성은 단지 세척만으로는 해결할 수 없으며, 글루타르알데히드에 의해 만들어진 교차 결합 자체의 붕괴에서 세포독성을 갖는 알데히드가 지속적으로 생성되어 나오기 때문에 세포독성 효과가 긴 시간 동안 지속됨을 알게 되었다[12,13]. 이를 해결하기 위해 다양한 방법들이 시도되었던 바, 현재 전통적인 0.5% 글루타르알데히드에 비해 고농도(2~3%) 글루타르알데히드는 잘 사용되지 않고 있다. 이는, 고농도 글루타르알데히드가 가지고 있을 것으로 생각되는 독성 때문이다. 그러나 Human 등은, 고농도 글루타르알데히드를 사용하여 고정할 때에는 프로테아제(protease)에 의한 소화 작용(digestion)에 대한 내성이 증가하며, 장력 모듈(tensile modulus)도 증가한다는 보고를 한 바가 있다. 그리고 같은 보고에서, 고농도 글루타르알데히드를 사용한 경우 대식세포(macrophage)의 확산(spreading) 범위를 크게 줄여줌으로써 인터류킨(interleukin)이나 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)가 관여하는 면역 반응을 저하시키는 효과가 있음을 주장하였다[14]. 또한 Zilla 등이 보고한 바에 따르면 1.0% 미만 농도의 글루타르알데히드는 돼지 조직을 이용한 연구에서 특별히 당단백질 파이프록틴(fibronectin)에 의해 일어나는 IgG 반응을 막는 데에 실패하였고, 1%가 넘는, 특히 3%에 가까운 농도의 글루타르알데히드만이 이러한 IgG 반응을 없앨 수 있다고 하였다[15]. 따라서 고농도 글루타르알데히드의 사용에 대한 논란은 계속되고 있다.

3) 탈세포화(decellularization)

이중 이식편을 사용하기 시작한 초창기에는 가능한 한 조직에 많은 세포가 산 채로 남아 있을수록 인체 내에 이식되었을 때 그 조직의 내구성이 좋아진다고 생각하였다. 이 때문에 허혈 시간(ischemic time) 개념이 도입되고 최대한 세포를 살아 있도록 유지하는 데에 많은 노력이 경주되었다[16]. 그러나 오히려 허혈 시간이 긴 심낭편이 더욱 좋은 내구성을 가진다는 사실을 알게 되면서[17], 세포가

거의 남아 있지 않은 쪽이 더욱 면역원성(immunogenicity)이 낮다고 생각하게 되었고[18,19], 어떻게 하면 신선 조직(fresh tissue)에 최소한의 손상을 주면서 최대한의 탈세포화를 달성할 수 있을 지가 새로운 방법으로 연구되고 있다[20-22]. 본 실험에서 사용한 SDS 용액은 심낭편의 기계물리학적 내구성을 크게 떨어뜨리는 것을 확인할 수 있었다. 향후 기계물리학적 내구성을 저하시키지 않으면서도 충분한 탈세포화를 달성할 수 있는 물질 및 방법 등의 개발이 절실하다 하겠다.

4) 피로 실험(fatigue test)

이중 이식편의 기계물리학적 성질을 시험하기 위하여 피로 실험의 개념이 도입되었는데, 이것은 이중 이식편을 이용해 제작한 인공 판막 등의 구조적 파괴가, 끊임없이 반복되는 기계적 스트레스에 의해 기계물리학적 내성을 상실하는 데에서 온다고 보게 되었기 때문이다[23,24]. 이 때문에 새로운 재료 각각의 내구성에 대한 정립된 시험 방법의 필요성이 대두되었다[25,26]. 피로 실험은 인공 판막과 인공 보철편에 대해 각각 이루어지고 있는데, 그 방법은 크게 두 가지로 나뉜다. 한쪽은, 피로 자극을 1분당 60~120회 정도 가하여 인간의 심박수와 유사하게 해야 한다고 믿는 그룹으로, 이때에는 단기간 내에 충분한 횡수의 피로 자극을 줄 수 없으므로 그 자극의 압력을 크게 증가시켜 수학적 함수를 도출해 냄으로써 생체재료의 내구성을 예측하고자 하였다[27,28]. 다른 그룹은, 1분당 1,800회 정도의 피로 자극을 가하되 그 압력을 80~100 mmHg 정도의 생리학적 범위로 조절하여 생체재료의 기능이 다할 때까지의 자극 횡수로 그 내구성을 평가하였다[29]. 대표적으로 Paez 등이 피로 자극 시험 장비를 이용하여 심낭 보철편의 기계적 내구성을 시험한 결과를 보고한 일이 있으나, 자극의 횡수를 분당 60회로 하였으며 또한 투과도와 유순도 등에 대한 평가가 아니었고, 현미경을 이용한 조직 검사도 시행하지 않은 것으로 되어 있다[30].

결 론

심혈관계 수술의 발달에 따라 더 나은 인공 보철물 소재에 대한 탐색과 개발 노력의 한 가지로서, 우심낭에 다양한 방법의 탈세포화, 고정 등 처리를 가한 뒤, 자체 개발한 피로 실험 장비로 투과도와 유순도 시험 및 조직검사 등 기계물리학적 내구성 검사를 시행하여 그 결과를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 첫째, 글루

타르알데히드 단독으로 사용하여 고정한 경우에 비해 에탄올 등 용매를 함께 사용하여 고정한 경우에 이종 이식편이 더 좋은 기계적 내구성을 가지게 된다. 둘째, 글루타르알데히드와 에탄올을 혼합하여 고정에 사용할 때에, 에탄올의 농도를 80%로 했을 경우 가장 좋은 기계물리학적 내구성을 갖게 한다. 셋째, 글루타르알데히드의 독성을 줄이기 위해 현재 잘 사용되지 않는 고농도(3%)의 글루타르알데히드를 사용하여 고정했을 때 그 결과물은 저농도(1% 미만) 글루타르알데히드를 사용했을 때와 비슷한 정도의 기계물리학적 내구성을 갖는다. 넷째, 탈세포화는 이종 이식편의 면역원성을 줄이기 위한 필수적인 과정으로 여겨지고 있으나, SDS를 이용한 탈세포화 처리를 거친 우심낭편은 투과도 및 유순도가 증가하여 기계물리학적 성질이 나빠지고, 피로 실험을 거친 후에는 투과도와 유순도가 더욱 증가하였고, 조직검사에서도 콜라겐섬유의 손상이 심하여 기계물리학적 내구성이 떨어진다.

이와 같이 심혈관 수술용 인공보철물 개발에 있어 피로 자극 실험은 재료가 갖는 기계적 내구성을 객관적으로 평가하여 우열을 가리고 더 나은 방법을 찾는 데에 있어 반드시 필요한 것이나 현재까지 국내 보고가 없다. 저자들은 우심낭편의 알려져 있는 다양한 고정 방법을 실제로 적용하여 각 고정 및 처리 방법에 따른 결과물의 기계적 내구성을 비교해보았다. 향후 이종조직판막이나 이종조직보철편의 더 나은 고정과 처리방법이 지속적으로 개발 중에 있으므로 이들을 평가하는 데에 피로 실험이 한 가지 과정으로 포함되어야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, et al. *A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. J Cardiovasc Surg (Torino) 2006;47:711-8.
2. 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.
3. 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.
4. Kim KB, Kim YJ, Rho JR, et al. *Investigation of bovine pericardial heterograft (II) - Clinical applications of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1990;23:465-73.
5. Kim KB, Kim YJ, Rho JR, et al. *Investigation of bovine pericardial heterograft (III) - Experimental evaluation of calcification in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1991;24:837-42.
6. 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.
7. Ahn JH, Han JJ, Park SS. *Prevention of calcification in bovine pericardial bioprosthesis*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:560-6.
8. Kim KC, Choi CH, Lee C, et al. *Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (Microscopic analysis of various fixation methods)*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:295-304.
9. Kim KC, Lee C, Choi CH, et al. *Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (Tensile strength-thickness)*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:170-6.
10. Gratzner PF, Pereira CA, Lee JM. *Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials*. J Biomed Mater Res 1996;31:533-43.
11. Gendler E, Gendler S, Nimni ME. *Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis*. J Biomed Mater Res 1984;18:727-36.
12. Weadock K, Olson RM, Silver FH. *Evaluation of collagen crosslinking techniques*. Biomater Med Devices Artif Organs 1983;11:293-318.
13. Huang-Lee LL, Cheung DT, Nimni ME. *Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks*. J Biomed Mater Res 1990;24:1185-201.
14. Human P, Zilla P. *The possible role of immune responses in bioprosthetic heart valve failure*. J Heart Valve Dis 2001;10:460-6.
15. Zilla P, Brink J, Human P, et al. *Prosthetic heart valves: Catering for the few*. Biomaterials 2008;29:385-406.
16. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, et al. *A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies*. J Thorac Cardiovasc Surg 1987;94:812-23.
17. Baskett RJ, Ross DB, Nanton MA, et al. *Factors in the early failure of cryopreserved homograft pulmonary valves in children: preserved immunogenicity?* J Thorac Cardiovasc Surg 1996;112:1170-8; discussion 1178-9.
18. Hoekstra F, Knoop C, Aghai Z, et al. *Stimulation of immune-competent cells in vitro by human cardiac valve-derived endothelial cells*. Ann Thorac Surg 1995;60:S131-3; discussion S133-4.
19. Batten P, McCormack AM, Rose ML, et al. *Valve interstitial cells induce donor-specific T-cell anergy*. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122:129-35.
20. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction*. J Biomed Mater Res

- 1994;28:655-66.
21. O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, et al. *The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation.* Semin Thorac Cardiovasc Surg 1999;11:194-200.
 22. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, et al. *Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix.* Circulation 2002;106:163-8.
 23. Grunkemeier GL, Jamieson WR, Miller DC, et al. *Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration.* J Thorac Cardiovasc Surg 1994;108:709-18.
 24. Guerra F, Bortolotti U, Thiene G, et al. *Long-term performance of the Hancock porcine bioprosthesis in the tricuspid position. A review of forty-five patients with fourteen-year follow-up.* J Thorac Cardiovasc Surg 1990;99:838-45.
 25. Carrera San Martin A, Garcia Paez JM, Garcia Sestafe JV, et al. *Selection and interaction of biomaterials used in the construction of cardiac bioprostheses.* J Biomed Mater Res 1998;39:568-74.
 26. Paez JM, Jorge-Herrero E, Carrera A, et al. *Ostrich pericardium, a biomaterial for the construction of valve leaflets for cardiac bioprostheses: mechanical behaviour, selection and interaction with suture materials.* Biomaterials 2001;22:2731-40.
 27. Carrera San Martin A, Garcia Paez JM, Jorge-Herrero E, et al. *Behaviour of the bovine pericardium used in cardiac bioprostheses when subjected to a real fatigue assay.* Biomaterials 1993;14:76-9.
 28. Garcia Paez JM, Carrera San Martin A, Jorge-Herrero E, et al. *Effect of the suture on the durability of bovine pericardium used in cardiac bioprostheses.* Biomaterials 1994;15:172-6.
 29. Gabbay S, Bortolotti U, Wasserman F, et al. *Fatigue-induced failure of the Ionescu-Shiley pericardial xenograft in the mitral position. In vivo and in vitro correlation and a proposed classification.* J Thorac Cardiovasc Surg 1984;87:836-44.
 30. Paez JM, Sanmartin AC, Herrero EJ, et al. *Durability of a cardiac valve leaflet made of calf pericardium: fatigue and energy consumption.* J Biomed Mater Res A 2006;77:839-49.

=국문 초록=

배경: 심혈관 수술이 발달함에 따라 혈관 또는 판막 등의 일부로써 사용하기 위한 보철편의 필요성이 대두되고 있다. 저자들은 보철편의 기계적 성질을 객관적으로 평가하고 내구성에 대한 정보를 얻기 위하여 피로 자극 시험 장비를 개발하였고, 다양한 방법으로 처리된 우(牛)심낭편을 시험하여 그 결과를 확인하고 서로 비교하여 더 나은 처리방법을 찾고자 하였다. 대상 및 방법: 도살장에서 신선 우심낭편을 무균 채취한 뒤 총 16가지의 대표적인 처리방법으로 우심낭편을 고정 또는 탈세포화한 뒤 피로 실험 전후로 조직의 투과도와 유순도를 측정하여 비교하였고 또한 광학현미경을 통한 조직검사로 조직 구조의 가시적인 변화 정도를 확인하였다. 결과: 글루타르알데히드 단독으로 고정한 경우에 비해 글루타르알데히드와 용매를 혼합하여 고정한 경우가 더 좋은 기계적 내구성을 보였다. 최근 기성제품에서는 저농도 글루타르알데히드가 널리 쓰이고 있으나, 면역학적 이점이 있을 것으로 생각되는 고농도 글루타르알데히드로 고정한 우심낭편도 기계적 내구성에 문제가 없었다. 탈세포화는 석회화 예방을 위해 다분히 필요한 과정으로 생각되고 있으나, 흔히 쓰이고 있는 SDS를 이용한 탈세포화는 우심낭편의 기계적 성질을 크게 악화시켜 투과도와 유순도가 20~190배 정도까지 증가하며, 탈세포화를 거친 우심낭편은 기계적 내구성도 매우 떨어져 피로 자극 후 투과도와 유순도가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 결론: 자체 개발한 피로 자극 실험 장비를 이용하여 다양한 방법으로 처리한 심낭편의 내구성을 평가할 수 있었으며 향후 최적의 심낭편 처리방법을 개발하기 위한 기초적인 데이터를 얻을 수 있었다.

중심 단어 : 1. 생체 인공 장기
2. 심낭
3. 생체공학