

글루타르알데하이드 고정 돼지 심낭에서 Ethanol, L-lysine, NaBH₄ 병합 처치시 상승효과

김관창* · 김용진** · 김수환*** · 최승화***

Synchronized Synergism Using Ethanol, L-lysine and NaBH₄ in Glutaraldehyde Treated Porcine Pericardium

Kwan-Chang Kim, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.***, Soo Hwan Kim***, Seung Hwa Choi***

Background: Calcification is the most frequent cause of clinical failure of bioprosthetic tissues that are fabricated from Glutaraldehyde (GA)-fixed porcine valve or bovine pericardium. We recently used a multi-factorial approach of employing different mechanisms to investigate how to reduce the calcification of bioprosthetic tissues. The purpose of the present study was to evaluate the synchronized synergism using ethanol, L-lysine and NaBH₄ in glutaraldehyde treated porcine pericardium from the standpoint of calcification and tissue elasticity. **Material and Method:** Porcine pericardium was fixed with 0.625% GA (commercial fixation). An interim step of ethanol (80%; 1 day at room temperature) or L-lysine (0.1 M; 2 days at 37°C) or NaBH₄ (0.1 M; 2 days at room temperature) was followed by completion of the GA fixation (2 days at 4°C and 7 days at room temperature). The tensile strength and thickness of the samples were measured. The treated pericardiums were implanted subcutaneously into three-week old Sprague-Dawley rats for 8 weeks. The calcium content was assessed by atomic absorption spectroscopy and the histology of the samples. **Result:** The amount of calcium in the pericardium pretreated with ethanol (13.6±10.0 ug/mg, p=0.008), L-lysine (15.3±1.0 ug/mg, p=0.002) and both (16.1±11.1 ug/mg, p=0.012) was significantly reduced compared with the control (51.2±8.5 ug/mg). However, NaBH₄ pretreatment (65.7±61.8 ug/mg, p=0.653) and combined pretreatment that including ethanol, L-lysine and NaBH₄ (92.9±58.3 ug/mg, p=0.288) were not significantly different from the controls (51.2±8.5 ug/mg). Both the combined pretreatment using ethanol and L-lysine (7.60±1.55, p=0.76) and the combined pretreatment that included ethanol, L-lysine and NaBH₄ (7.47±1.85, p=0.33) increased the tensile strength/thickness ratio compared with that of the controls (4.75±1.88). **Conclusion:** The combined pretreatment using ethanol and L-lysine seemed to decrease the calcification of porcine pericardium fixed with glutaraldehyde, as compared to single pretreatment, and it increase the tissue elasticity, but to the degree that showed synchronized synergism. NaBH₄ pretreatment seemed to increase the calcification of porcine pericardium, irrespective of whether single or combined pretreatment was used.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:685-695)

Key words: 1. Calcification
2. Bioprosthesis
3. Xenograft

*이화여자대학교 의학전문대학원 흉부외과학교실

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

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

***서울대학교병원 임상의학연구소, 바이오 이종장기개발사업단

Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 A04004-008).

논문접수일: 2009년 6월 5일, 논문수정일: 2009년 9월 29일, 심사통과일: 2009년 9월 30일

책임저자: 김관창 (158-710) 서울시 양천구 목6동, 이화여자대학교 목동병원 흉부외과

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: mdkkchang@ewha.ac.kr

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

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

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서론

냉동 동종이식편(homograft tissue)의 공급 제한으로 glutaraldehyde (GA) 처리한 돼지 판막이나 소 심낭을 이용한 생체 인공조직이 널리 사용되고 있다. 이러한 생체 인공조직의 임상적인 실패의 가장 흔한 원인으로 조직의 석회화가 알려져 있다[1,2]. 하지만 임상적 중요성에 비해 정확한 석회화의 병리 기전은 알려져 있지 않으며, 조직 내 칼슘의 침착을 일으키는 phospholipids, 조직처리과정 중 proteoglycans의 제거에 의해 생기는 cavities, 세포의 괴사, 각종 화학물질처리[3], 면역반응[4], mechanical stress[5], 그 밖에 혈액에 존재하는 여러 단백질 및 염증 세포[6] 등이 이러한 석회화에 관여하는 것으로 알려져 있다.

이러한 생체 인공조직의 석회화를 줄이기 위하여 di-phosphonates[7]나 aluminum chloride, ferric chloride 같은 metal salts[8] 처리를 하기도 하고, sodium dodecyl sulfate[9] 같은 surfactant 처리나 amino oleic acid[10] 처리를 하는 방법 등이 알려져 있다. Collagen 구조를 바꾸어 주는 처리[11,12]를 하거나 GA 외에 다른 Epoxy compound와 같은 cross linker[13]를 사용하는 연구도 진행되고 있다.

최근에는 synchronized synergism에 대해 multifactorial approach가 시도 되고 있다. 기존의 0.625% 보다 고농도인 2~3% GA로 고정 처리하여 cross-link stability를 증가시키고, 남아 있는 GA를 효과적으로 제거하거나 GA 처리 후 free aldehyde기(-CHO)를 미리 L-lysine과 같은 amino acid와 결합시켜(Schiff base formation) 칼슘과 결합하는 것을 막는 방법[14,15] 등이 시도되고 있으며, Ethanol 등을 이용하여 조직 내 phospholipids를 제거하거나[16] 조직의 elasticity를 향상시키는 방법[17,18] 등의 여러가지 항석회화 처리를 병합함으로써 생체 인공조직의 석회화를 더욱 더 줄여 줄 것으로 예상된다. Sodium borohydride (NaBH₄)은 GA의 aldehyde기를 직접 환원시키거나 각종 amino acid와의 결합(Schiff base formation)을 보다 안정적인 결합으로 바꾸어 주는 것으로 알려져 있다[19].

본 저자들은 L-lysine을 이용한 diamine bridge가 Ethanol과 비슷한 항석회화 효과가 있었으며 cross-link를 증가시켜 이중 이식편의 두께와 장력을 증가시켜 주는 효과가 있음을 보고한 바가 있다[20]. 본 연구에서는 작용기전이 다른 ethanol, L-lysine, NaBH₄을 동시에 처리하였을 때 예상되는 synergic effect를 알아보고자 하였으며, 석회화와 함께 조직의 elasticity를 알아보고자 각각의 항석회화 처리한 porcine pericardium의 두께와, 장력을 이식 전에 측정하였

다. 석회화가 특히 문제가 되는 소아환자에서는 기존의 porcine valve나 bovine pericardium (두께 0.29±0.06 mm)에 비해 porcine pericardium이 조작(manipulation)하는데 더 용이하다고 판단하여 porcine pericardium으로 실험하였다[21].

대상 및 방법

1) Preparation of porcine pericardium

도살장에서 도살된 돼지(생후 3개월~4개월)에서 즉시 심낭을 적출하여 PBS solution (0.1 M, pH 7.4)에 넣어 ice box에 담아 실험실로 운반한다.

2) 실험군의 설정

총 6군으로 나누어 실험을 시행하였으며 각 군당 심낭 절편의 개수는 8개로 하였다. 1군을 control로 하여 2군과 3군에서는 80% ethanol과 L-lysine의 효과를 알아보고자 하였으며 4군은 80% ethanol과 L-lysine의 synergic effect를 알아보고자 하였고 5군과 6군에서는 NaBH₄의 효과를 알아보고자 하였다.

1군: 0.625% GA

2군: 0.625% GA + 80% Ethanol

3군: 0.625% GA + 0.1 M L-lysine

4군: 0.625% GA + 80% Ethanol + 0.1 M L-lysine

5군: 0.625% GA + 0.1 M NaBH₄

6군: 0.625% GA + 80% Ethanol + 0.1 M L-lysine + 0.1 M NaBH₄

3) 돼지 심낭 고정

돼지 심낭을 0.625% GA fixation1 (PBS buffer, pH 7.4)에 담가 4°C에서 2일간 고정한 후, 상온에서 7일간 추가로 고정한다. 고정이 끝나면 심낭을 가로 세로 1 cm 크기의 심낭편들로 나누어서 더 이상의 처치가 필요하지 않은 심낭편들은 PBS solution으로 상온에서 세척한 후, 쥐에게 이식한다. 추가적인 항석회화 처리가 필요한 심낭편들은 바로 다음 단계로 진행한다.

4) Ethanol 전처리

0.625% GA 고정 처리를 마친 심낭편들을 80% ethanol solution (PBS buffer, pH 7.4)에 담긴 shaker bath에 넣어 상온에서 24시간 동안 처리한다. 더 이상의 처치가 필요하지 않은 심낭편들은 PBS solution으로 상온에서 세척한 후, 쥐에게 이식한다.

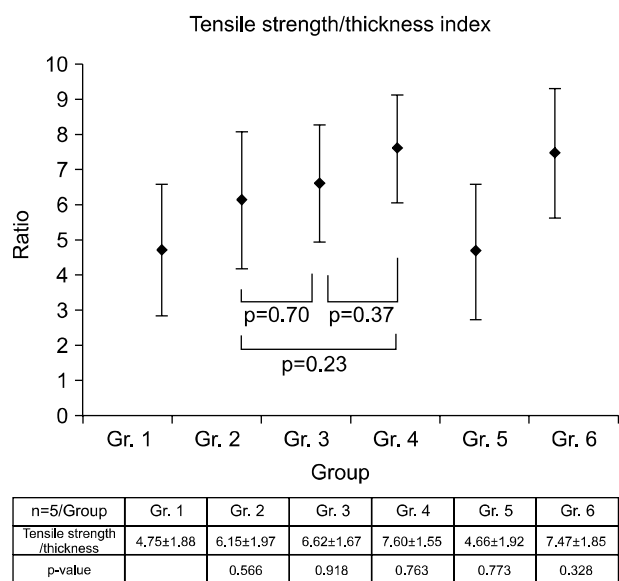


Fig. 1. The tensile strength/thickness index of porcine pericardium after Gr. 1) GA (0.625%) fixation, Gr. 2) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment, Gr. 3) GA (0.625%) fixation + L-lysine treatment, Gr. 4) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment, Gr. 5) GA (0.625%) fixation + NaBH₄ treatment, Gr. 6) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment + NaBH₄ treatment.

5) L-lysine 전처치

0.625% GA 고정 처리나 추가 Ethanol 처리를 마친 심낭편들을 PBS solution으로 세척한 후, 0.1 M L-lysine solution (acetic acid buffer, 0.5 M, pH 7.6)에 담가 37°C에서 48시간 동안 처리한다. 이후 PBS solution으로 상온에서 세척한 후, 쥐에게 이식할 때까지 4°C의 PBS solution에 보관한다.

6) NaBH₄ 전처치

0.625% GA fixation 처리나 추가 Ethanol & 0.1 M L-lysine 처리를 마친 심낭편들을 PBS solution으로 세척한 후, 0.1 M NaBH₄ (PBS buffer, pH 7.4)에 담가 상온에서 48시간 동안 처리한다. 이후 PBS solution으로 세척한 후, 쥐에게 이식할 때까지 4°C의 PBS solution에 보관한다.

7) Purpald 검사, 두께, 장력검사

각 군당 1개의 심낭편들은 쥐에게 이식하지 않고 광학 및 전자현미경으로 미세구조를 관찰한다. L-lysine으로 GA detoxification 처리를 한 심낭편에서 detoxification이 적

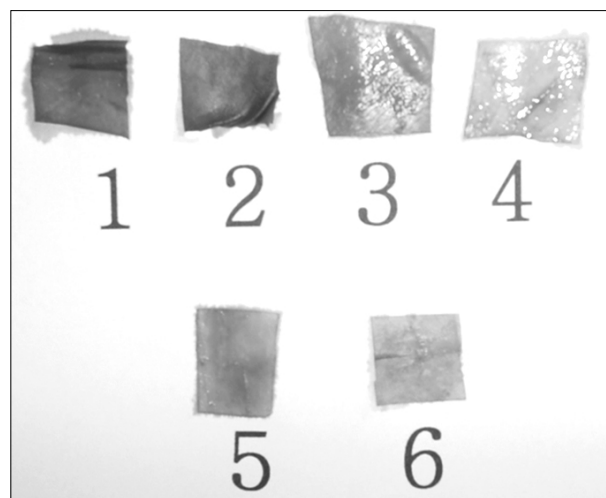


Fig. 2. Porcine pericardium with Purpald test after 1) GA (0.625%) fixation, 2) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment, 3) GA (0.625%) fixation + L-lysine treatment, 4) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment, 5) GA (0.625%) fixation + NaBH₄ treatment, 6) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment + NaBH₄ treatment.

절히 이루어졌는지 알아보기 위해 aldehyde residue evaluation을 위한 검사를 한다. 이를 위해서 심낭편을 saline으로 세척한 후 0.171 M Purpald in 1 M NaOH solution에 15분간 soaking한 후 공기 중에 노출시켜 심낭편의 color가 변하는데 걸리는 시간 및 color의 정도를 정성적으로 분석한다[22]. Detoxification 처리를 하지 않은 심낭편들에도 같은 검사를 해서 그 결과를 비교한다.

처리된 돼지 심낭을 펼치고 30°씩 각도를 달리하여서 얻어낼 수 있는 모두 6가지의 방향에 대해 0.5×5 cm의 장방형 절편을 취하여서 폭 5 mm에 대한 장력을 측정함으로써 그를 평균한 값이 그 심낭의 장력의 대표값이 되도록 시도하였다. 장력의 측정은 Japan Tech & Manufacture, Digital Force Gauge, Model 5FGN, automated materials testing system을 이용 load speed 100 mm/min로 측정하여 단위는 kg중/폭5 mm로 표기하였다. 또한 심낭의 두께와 장력과의 관계를 보기 위하여 버니어 캘리퍼스 Mitutoyo Thickness Gauge (Digimatic 543-122-15, Mitutoyo, Japan)로 표본들의 두께도 한 샘플에서도 여러 번 동시에 측정하였다.

8) 쥐 이식 모델

Zoletil (0.2 cc IP), Rompun (0.1 cc IP)으로 쥐를 마취한 다음 등 부위 피하조직에 4개의 pouch를 만든 후, 각각의

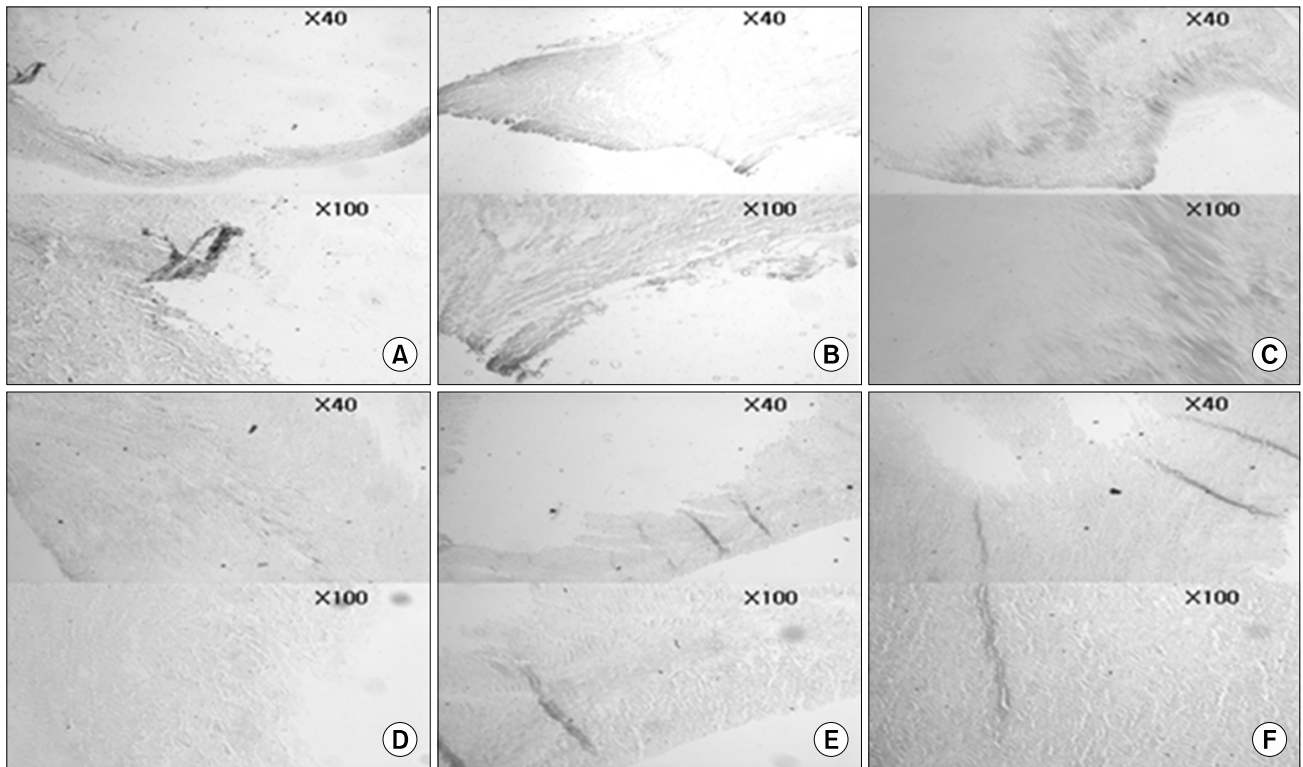


Fig. 3. Harvested porcine pericardium with Hematoxylin-eosin staining after (A) GA (0.625%) fixation, (B) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment, (C) GA (0.625%) fixation + L-lysine treatment, (D) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment, (E) GA (0.625%) fixation + NaBH₄ treatment, (F) GA (0.625%) fixation + ethanol (80%) treatment + L-lysine treatment + NaBH₄ treatment.

pouch에 위의 방법대로 처리한 심낭편들을 무작위로 이식한 후 상처를 봉합한다. 이후 8주간 사육한다. 심낭편 이식 후 8주가 지나면 실험을 종료하게 되며, CO₂ gas를 이용하여 쥐를 희생시킨다. 이식 시에 만들었던 subcutaneous pouch를 박리하여 심낭편들을 적출해낸다. 적출해낸 각각의 심낭편들을 결과 분석에 사용하게 된다.

9) H&E 염색, Vonkossa 염색, 전자현미경

광학 현미경적 검색은 적출된 심낭을 2~3 mm 두께의 조직으로 잘라 Dubosq-brasil 용액에 1시간 넣어두었다가 10% 포르말린에 후고정한 후 파라핀 포매 조직을 만들어 2~4 μ m 절편으로 박절하여 hematoxylin-eosin 및 vonkossa 염색하여 microscopic structure의 integrity 및 calcium 침착의 정도를 알아본다.

전자 현미경적 검색은 조직을 1 mm 크기로 절편하여 4% GA-PBS (0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4) 용액에 고정 후 1% OsO₄ (0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4)에 후고정하여 Epon LX 112 fixative에 embedding을 하였다. 1

μ m 절편에 toluidine blue 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였고 적절한 조직 표본의 위치를 결정한 후 Reichert Ultracut E-ultramicrotome (Leica, Inc., Buffalo, NY)으로 초박 절편하여 Uranyl acetate와 Lead citrate로 염색한 후 전자 현미경 JEM-100CX (Magnification; $\times 100 \sim \times 450,000$, acceleration voltage: 120 kV, JEOL U.S.A., Inc.)으로 관찰을 하였다.

10) 칼슘 정량

각 군의 심낭편의 석회화 정도를 알아보기 위해 calcium 정량을 시행한다. 이를 위해서 심낭편을 saline으로 세척한 후 24시간 이상 hot dryer에서 건조시킨 후 각각 조직의 무게를 측정한다. Glass tube에 담아 1 M HCl 용액 3 mL를 첨가하고 75°C dry oven (Fisher Scientific)에서 가온하며 완전 용해될 때까지 24시간 이상 기다린다. 용액을 e-tube에 옮겨 automatic environmental speed vac system을 이용하여 12시간 이상 증발시킨다. Pellet이 만들어진다면, PBS (phosphate buffered solution) 1 mL에 담아 Automatic chemistry I.S.E (HITACHI) 장비를 이용하여

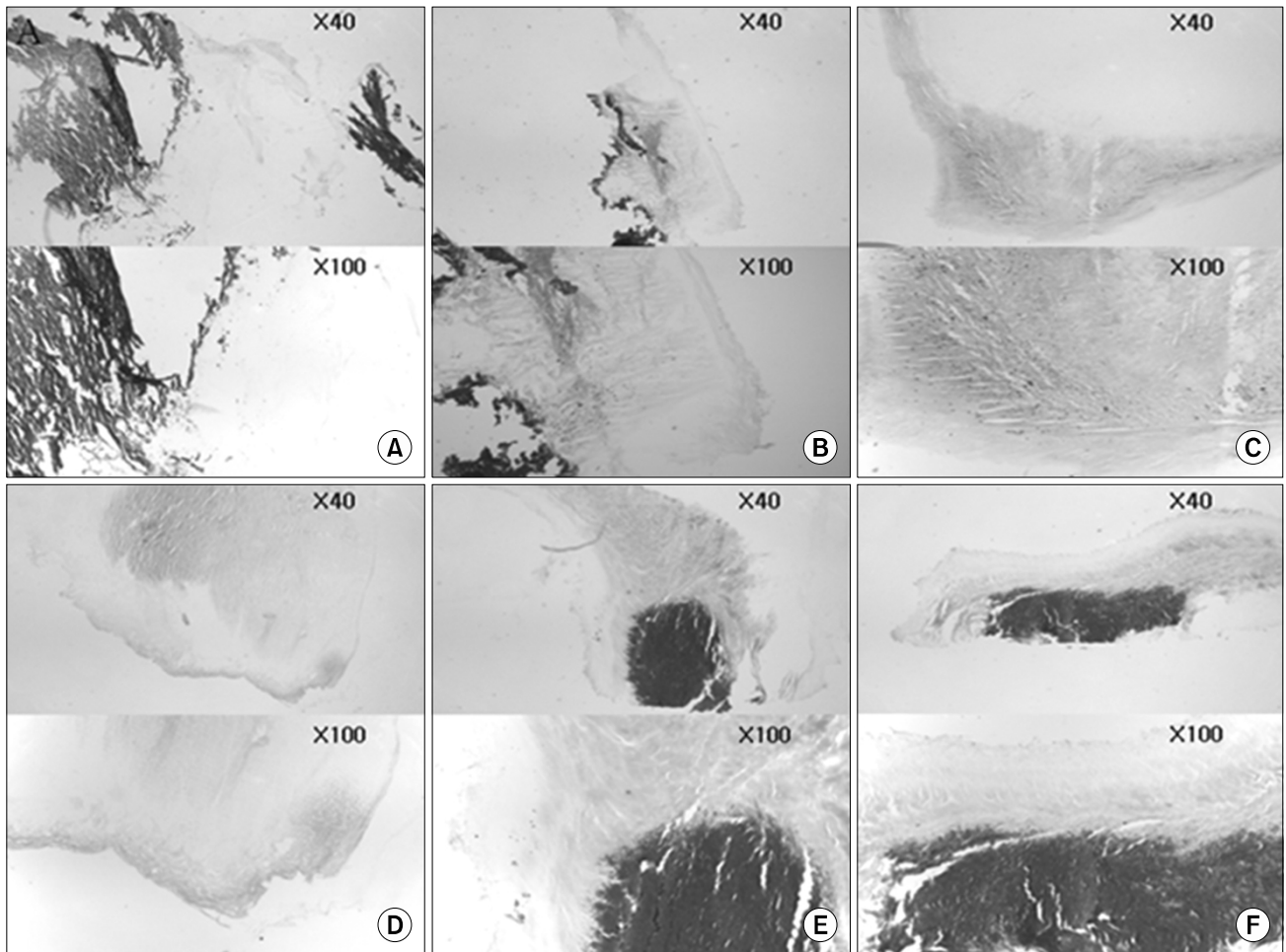


Fig. 4. Harvested porcine pericardium with Vonkossa staining after (A) GA (0.625%) fixation, (B) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, (C) GA (0.625%) fixation+L-lysine treatment, (D) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment, (E) GA (0.625%) fixation+NaBH₄ treatment, (F) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment+NaBH₄ treatment.

calcium content를 정량 한다.

11) 통계 방법

통계처리는 microsoft excel과 SPSS 14.0 K를 사용하였고, 모든 통계수치는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군의 평균치 비교는 Student T-test로 검증하였고, 각 군 간의 통계적 차이는 ANOVA 및 post-hoc test (Turkey test)로 검증하였으며 $p < 0.05$ 를 의미 있는 것으로 간주한다.

결 과

1) 장력/두께 비율

0.625% GA 고정만 시행한 control 군이 4.75 ± 1.88 ,

80% Ethanol 처리한 군이 6.15 ± 1.97 , L-lysine 처리한 군이 6.62 ± 1.67 , 80% Ethanol과 L-lysine 모두 처리한 군이 7.60 ± 1.55 , NaBH₄만 처리한 군이 4.66 ± 1.92 , 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄를 모두 처리한 군이 7.47 ± 1.85 이었다. 80% Ethanol 혹은 L-lysine 혹은 NaBH₄ 처리한 모든 군에서 0.625% GA 고정만 시행한 control과 비교하여 유의한 차이는 없었다(Fig. 1). 또한 ANOVA test를 통한 군간의 비교에서 유의한 차이는 없었다($p=0.058$).

2) Purpald test

돼지 심낭을 0.625% GA 고정 후에 L-lysine 처리한 군과 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군에서 약한 보라색을 띄었고 0.625% GA 고정 후에

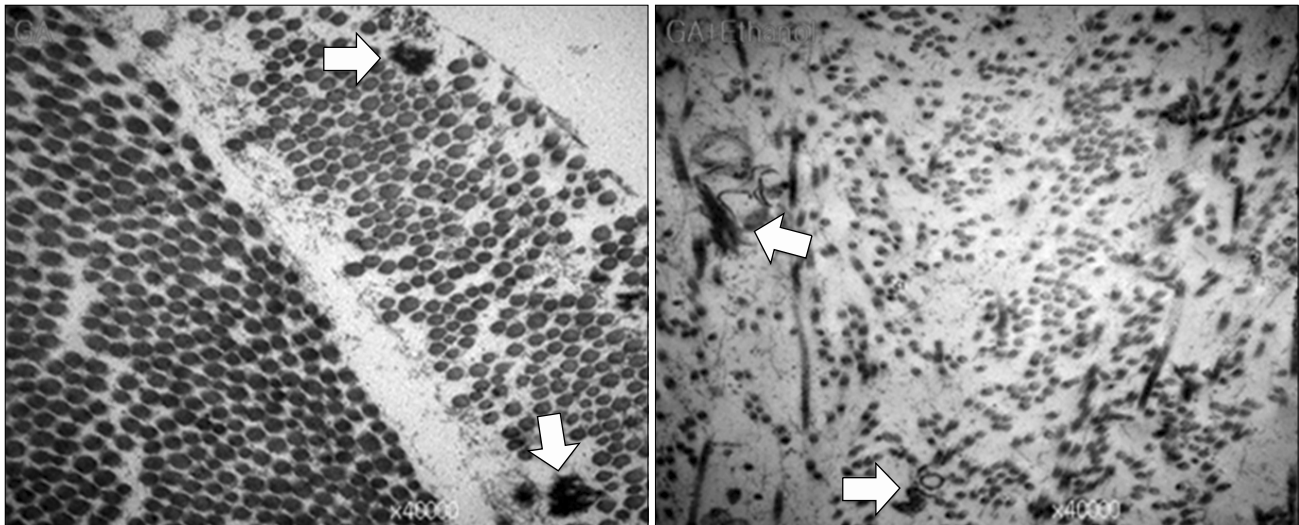


Fig. 5. Transmission electron microscopy of harvested porcine pericardium (1). Calcium nodules are found in fibrosa layer and epicardial connective tissue layer (thick arrow). Ethanol pretreatment led to smaller calcification deposits. Collagen fibers are maintained well.

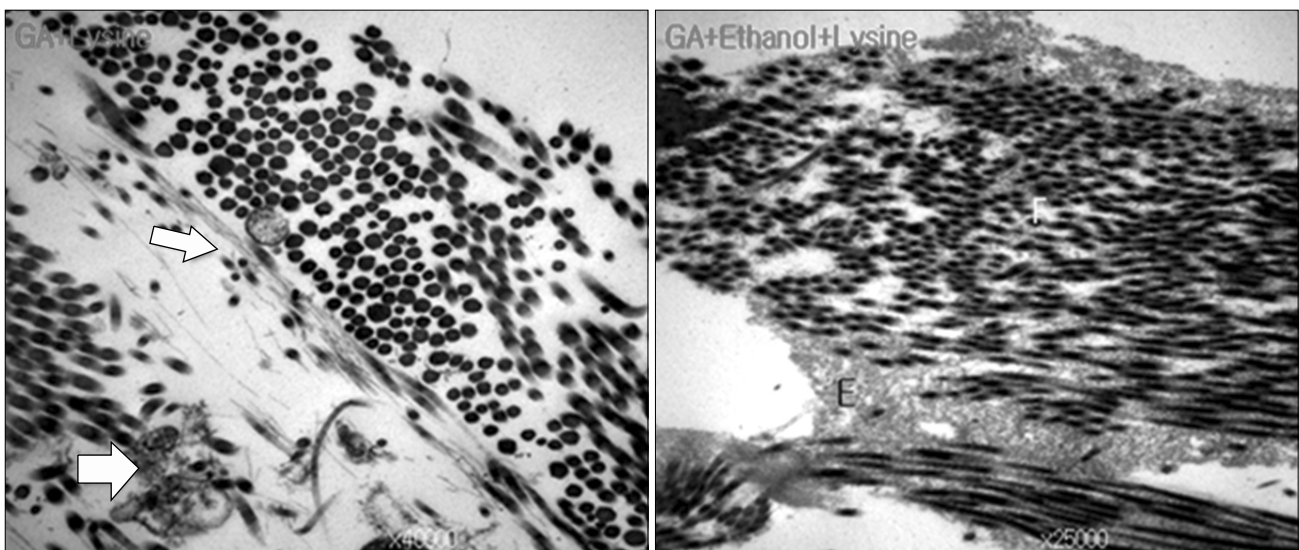


Fig. 6. Transmission electron microscopy of harvested porcine pericardium (2). Calcium nodules are found in epicardial connective tissue layer (thick arrow). The degradation of collagen fiber is found (thin arrow). Ethanol and L-lysine pretreatment shifted the ratio elastin:collagen ratio towards to collagen. E: elastin, F: fibril of collagen.

NaBH₄ 처리한 군과 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄을 모두 처리한 군에서 중간 정도의 보라색을 띄었으며 0.625% GA 고정만 시행한 군과 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군에서 가장 진한 보라색을 띄었다(Fig. 2).

3) Hematoxylin-eosin stain, Vonkossa stain, 전자현미경

심낭은 장막층, 섬유층, 심외막 결합조직으로 이루어져 있었으며 섬유층이 심낭의 대부분의 두께를 차지하였고 콜라겐, 탄력섬유(elastic fibers), 신경, 혈관들, 림프관들로 이루어져 있었다. 칼슘은 주로 심외막 결합

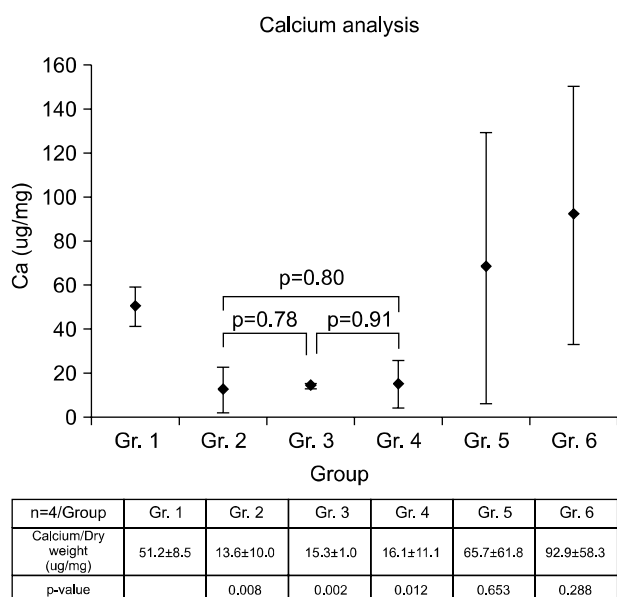


Fig. 7. Calcium analysis of harvested porcine pericardium after Gr. 1) GA (0.625%) fixation, Gr. 2) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment, Gr. 3) GA (0.625%) fixation+L-lysine treatment, Gr. 4) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment, Gr. 5) GA (0.625%) fixation+NaBH₄ treatment, Gr. 6) GA (0.625%) fixation+ethanol (80%) treatment+L-lysine treatment+NaBH₄ treatment. There were no significant differences among group 2, group 3, and group 4.

조직에 주로 침착되어 있었고 일부는 섬유층 내로 침범하고 있었다. 0.625% GA 고정만 시행한 군에서는 거의 전층에서 칼슘이 침착되어 있었으며 0.625% GA 고정 후에 NaBH₄만 처리한 군과 GA 고정 후에 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄을 모두 처리한 군에서는 섬유층 내로의 칼슘의 침착이 관찰되었고 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol 처리한 군, 0.625% GA 고정 후에 L-lysine 처리한 군, 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군은 세 층이 비교적 잘 유지되면서 주로 심외막 결합조직 내에 칼슘의 침착이 관찰되었다(Fig. 3, 4). 전자 현미경 소견에서 0.625% GA 고정만 시행한 군에 비해 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol 처리한 군에서 보다 작은 칼슘 결절이 침착 되는 것이 관찰 되었다(Fig. 5). 0.625% GA 고정 후에 80% Ethanol과 L-lysine 처리 후 collagen/elastin ratio 중 collagen이 증가한 것을 보여 주었으며 일부 collagen fiber의 degradation을 보여 주지만 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄ 처리 후에도 일반적인 콜라겐 골격 구조는 잘

유지되고 있었다(Fig. 6).

4) Calcium 정량

각 그룹당 4개씩 적출한 심낭편을 사용하였다. 돼지 심낭을 80% Ethanol 처리한 군이 13.6±10.0 ug/mg으로 가장 작았고 L-lysine 처리한 군이 15.3±1.0 ug/mg, 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군이 16.1±11.1 ug/mg, 0.625% GA 고정만 시행한 군이 51.2±8.5 ug/mg, NaBH₄만 처리한 군과 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄을 모두 처리한 군은 각각 65.7±61.8 ug/mg과 92.9±58.3 ug/mg으로 가장 많았다. GA 고정만 시행한 군과 비교하여 80% Ethanol 처리한 군(p=0.008)과, L-lysine 처리한 군(p=0.002), 그리고 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군(p=0.012)은 통계적으로 의미 있게 칼슘의 침착량이 적었지만, NaBH₄만 처리한 군(p=0.653)과 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄을 모두 처리한 군(p=0.288)은 칼슘의 침착량이 더 많았다(Fig. 7). 하지만 ANOVA test를 통한 군 간의 비교에서 유의한 차이는 없었다(p=0.076).

고 찰

돼지 판막이나 소 심낭을 이용한 생체 인공조직을 GA에 고정 보존하는 방법이 일반적으로 이용되고 있는데, 이는 조직의 교원섬유들이 GA와 안정된 cross-link를 이루며 GA polymer를 표면에 형성하는 것을 이용한 것이지만, 이 GA의 free aldehyde기(-CHO)가 칼슘과 결합하는 것이 석회화의 주 원인으로 생각되고 있다[23,24]. 본 연구에서는 이 free aldehyde기를 미리 L-lysine과 결합시켜줌으로써(Schiff base formation) 칼슘의 결합하는 것을 막는 L-lysine의 항석회화 효과를 in vivo와 in vitro 실험을 통해 알아보았다. Amino acid의 일반적인 구조는 amino group, hydrogen, carboxyl group, R-group으로 이루어져 있으며 R-group에 의해 amino acid 종류가 결정된다. L-lysine은 R-group의 끝에 또 다른 amino group이 있어서 각기 다른 free aldehyde기와 결합하여 Diamine bridge를 형성하여 detoxification 효과를 높일 수 있다. 결국 조직 내 cross-link를 증가시켜 cross-link stability를 증가시켜 주는 효과가 있을 것이다. In vitro 실험에서 0.625% GA 고정 후 L-lysine 처리한 군이 0.625% GA 고정만 시행한 군에 비해 tensile strength와 thickness가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 전자현미경에서도 elastin: collagen ratio 중 collagen이 더 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 이는 0.625%보다 고농도인 3% GA

로 고정 처리한 조직의 전자 현미경 소견에서와 마찬가지로 L-lysine 처리가 조직 내 cross-link를 증가시켜 cross-link stability 증가시킨 것으로 생각된다[14]. 3~4개월의 비교적 일정한 연령의 돼지 심낭을 사용하였지만 L-lysine 처리 전 심낭의 장력과 두께와 비교하지 않았기 때문에 L-lysine 처리만으로 심낭의 장력과 두께를 증가시켰다는 결론을 내리기에는 한계가 있을 것이다. 장력/두께 비율은 0.625% GA 고정 후 L-lysine 처리한 군이 0.625% GA 고정만 시행한 control 군이나 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol 처리한 군에 비해 증가되어 있었지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 1). 결국 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄ 처리 후에도 porcine pericardium의 tensile strength와 thickness와 같은 mechanical property에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 결론을 내리는 것이 합당할 것이다. ANOVA test를 통한 군간 비교에서 $p=0.058$ 로 군간에 유의한 차이를 보이지 않은 것은 그룹당 5개만으로 비교하였기 때문인 것으로 생각된다.

본 실험에서는 L-lysine의 처리 효과를 정성적으로 알아보기 위하여 rat subcutaneous layer에 이식하기 전에 residual aldehyde에 의해 보라색을 띠는 purpald test를 시행하였다. 2,4-dinitrophenylhydrazine or 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald)가 aldehyde group과 반응하여 보라색을 띠는 물질을 형성하게 된다. Aldehyde 존재유무를 알아보는 다른 방법으로는 Benedict's test, Fehling's test, Tollens' test, Bayer's tests가 있는데 모두 aldehyde group의 산화작용과 물질 내 금속의 환원작용을 이용한 것으로 검체가 수용성(water-soluble)이어야 한다는 단점이 있어서 본 실험에서와 같은 porcine pericardium 검체에서 사용하기에는 적절치 않았다. Purpald test 결과 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol만 처리한 군은 0.625% GA 고정만 시행한 군과 비슷한 진한 보라색을 띠 반면, 0.625% GA 고정 후 L-lysine만 처리하거나 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol과 L-lysine 모두를 처리한 군은 연한 보라색을 띠었다. 이는 L-lysine 처리를 통해 효과적으로 GA의 자유 aldehyde기(-CHO)가 제거되었음을 보여 준다(Fig. 2).

Rat subcutaneous model을 이용한 in vivo 실험에서 0.625% GA 고정 후 L-lysine 처리한 군이 0.625% GA 고정만 시행한 군에 비해 칼슘의 침착이 의미 있게 적었다. 하지만 0.625% GA 고정 후 80% Ethanol 처리한 한 군과는 차이가 없었다. 이러한 결과로 두 가지를 생각해 볼 수 있을 것이다. 첫째, 석회화 과정에는 조직 내 칼슘의 침착을 일으키는 phospholipids, 조직처리과정 중 proteoglycans의 제거에

의해 생기는 cavities, 세포의 괴사, 각종 화학물질처리, 면역반응, mechanical stress, 그 밖에 혈액에 존재하는 여러 단백질 및 염증 세포 등 여러가지 인자가 관여한다는 것이다. 최근 연구들에서 서로 다른 기전의 항석회화 처리를 같이 시행함으로써 synergy 효과를 보고하였다. 본 연구에서도 GA 고정 후 ethanol과 L-lysine을 처리하여 synergy 효과를 알아보고자 하였으나 ethanol과 L-lysine만 처리한 군과 유의한 차이는 없었다. NaBH₄은 GA (GA)의 aldehyde기를 직접 환원시키거나 각종 amino acid와의 결합(Schiff base formation)을 보다 안정적인 결합으로 바꾸어 주는 것으로 알려져 있기 때문에[19] Ethanol과 L-lysine과 같이 처리할 경우 synergy 효과가 있을 것으로 생각되었다. ANOVA test를 통한 군간 비교에서 $p=0.076$ 로 군간에 유의한 차이를 보이지 않은 것은 그룹당 3개만으로 비교하였기 때문인 것으로 생각된다.

GA 고정 후 NaBH₄만 처리하거나 GA 고정 후 Ethanol, L-lysine, NaBH₄ 모두 처리한 군에서 오히려 칼슘의 침착이 증가되어 있었다. 다른 연구 결과에서도 Ethanol과 NaBH₄를 같이 처리하였을 때는 항석회화 효과가 있지만 NaBH₄만 처리한 경우 오히려 석회화가 증가한 것으로 보고 하였다[19]. 정확한 기전이 알려져 있지 않으므로 본 연구에서도 NaBH₄의 효과를 평가하는 것은 한계가 있을 것이다. 둘째, L-lysine의 반응조건을 최적화하면 L-lysine의 항석회화 효과를 증가시킬 수 있을 것이다. Bovine pericardium을 사용하여 0.5 M L-lysine (24 hrs incubation at room temperature, pH 7.0) 처리한 실험에서는 L-lysine이 항석회화가 없는 것으로 보고하였지만 Porcine aortic wall을 사용하여 0.1 M L-lysine (48 hrs incubation at 37°C, pH 7.6) 처리한 실험에서는 오히려 효과가 있는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 porcine pericardium을 사용하여 0.1 M L-lysine (48 hrs incubation at 37°C, pH 7.6) 조건하에서 처리하였다. Pericardium이므로 0.1 M 이하 농도에서 48 hr 이상 incubation하는 것을 추천할 수 있을 것이다.

L-lysine 이외에 L-glutamine, L-glutamic acid, L-arginine과 같은 amine group들이 이론적으로 GA의 free aldehyde기와 결합(Schiff base formation)하여 항석회화 효과가 있는 것으로 알려져 있다[25]. L-glutamic acid의 경우 이러한 효과 이외에 sheep carotid arteries에서 spontaneous endothelial cell ingrowth 효과를 있는 것으로 알려졌으며[26-28] 다른 연구에서는 inflammatory cell infiltration을 감소시키는 효과를 보고하였다[29]. L-arginine의 경우 antiplatelet activity, angiogenesis, wound healing promotion, nerve regeneration 효

과가 있는 것으로 알려져 있다[30]. 하지만 실제 rat subcutaneous model에서 21일째에 GA 고정 후 L-lysine과 L-arginine처리만 군에서만 항석회화 효과가 있었고 GA 고정 후 L-glutamine과 L-glutamic acid 처리한 군에서는 GA 처리만 군에 비해 유의한 항석회화 효과는 없었다. 자연적으로 생기게 되는 석회화 등의 퇴행성 변화는, 어른에 비하여 대사가 더 활발한 성장기의 소아 환자들에게 있어서 더욱 그 진행 속도가 빠르다고 할 수 있다. 기존의 돼지 판막이나 소 심낭을 이용한 인공 생체조직의 경우 두께가 두꺼워 영아나 소아 환자들에서 사용하는 데에 제한이 있을 수 있다. 소(생후 28개월~30개월) 심낭의 두께가 0.29 ± 0.06 mm로 돼지(생후 3개월~4개월) 심낭의 두께 0.13 ± 0.05 mm에 비해 두 배 이상으로[16] 영아나 소아 환자들에서는 돼지 심낭을 이용한 인공 생체 조직의 사용이 보다 용이할 것이다. 쥐는 수명이 2~3년 정도이며 생후 3주까지를 포유기로, 생후 3주에서 14주까지를 성장기로 하고 생후 14주 이후 성체가 된다. 어린 나이 일수록 석회화가 빨리 진행되는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서는 생후 3주 연령의 쥐를 사용하였다. 일반적으로 이종 이식편의 기능은 콜라겐 골격 유지 정도와 내구성에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다[29]. 본 실험에서 돼지 심낭 보철편은 여러 조건하의 고정 방법들에 따라 콜라겐 골격의 전자 현미경적 구조에서 확인한 차이를 보이지 않아, GA, Ethanol, L-lysine, NaBH₄를 이용한 각종 조직 처리과정 중 조직손상에 의한 구조적, 기계적 손실은 없는 것으로 생각되었다.

결 론

Ethanol과 L-lysine을 병합처리 하였을 때, Ethanol과 L-lysine을 단독처리 하였을 때와 비교하여, 비슷한 항석회화 효과를 보여 주었으며 조직의 신축력을 증가시키는 경향을 보였다. NaBH₄는 병합처리 하였을 때 조직의 신축력을 증가시키는 경향을 보였지만, 단독처리 혹은 병합처리 하였을 때 모두 석회화를 증가시켰다.

심장 수술의 증가에 따르는 보철편의 수요 증가가 계속되는 상황에서 타 동물로부터 채취 제작한 인공 생체조직들은 정도의 차이는 있지만 심장 내 이식 후 석회화의 진행에 따르는 중장기 수술 성적의 미흡함이 계속 문제점으로 남아 있다. 본 연구에서는 돼지 심낭을 일반적인 심혈관 조직의 고정처리 방법인 0.625% GA 고정 처리 한 후, Ethanol과 L-lysine을 병합처리 하였을 때 효과를 알아보았

다. 이렇게 확립된 항석회화 처리기법은 다음 단계인 대동물 실험을 통하여 그 효과를 재검증할 수 있을 것이며, 궁극적으로는 성인에서의 완전 이식형 조직판막이나, 소아 환자에 이식할 수 있는 이종 조직판막 제조 및 상품화를 기대할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR. *Pathological considerations in replacement cardiac valves*. Cardiovasc Pathol 1992;1:29-52.
2. Grunkemeier GL, Jamieson WRE, Miller DC, Starr A. *Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration*. J Thorac Cardiovas Surg 1994;108:709-18.
3. 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 1993;113:143-55.
4. Paul H, Peter Z. *Characterization of the immune response to valve bioprotheses and its role in primary tissue failure*. Ann Thorac Surg 2001;71:S385.
5. Levy RJ, Qu X, Underwood T, Trachy J, Schoen FJ. *Calcification of valved aortic allografts in rats: effects of age, crosslinking, inhibitors*. J Biomed Mater Res 1995;29:217-26.
6. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL. *Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans*. Biomaterials 1991;12:638-89.
7. Thomas PJ, James AB, Barbara LC, Frederick JS, Gordon A, Robert JL. *Controlled release of ethanehydroxy diphosphonate from polyurethane reservoirs to inhibit calcification of bovine pericardium used in bioprosthetic heart valves*. Int J Pharm 1990;59:95-104.
8. Webb CL, Nguyen NM, Schoen FJ, Levy RJ. *Calcification of allograft aortic wall in a rat subdermal model: pathophysiology and inhibition by Al³⁺ and aminodiphosphonate preincubations*. Am J Pathol 1992;141:487-96.
9. Hirsch D, Drader J, Ythomas TJ, Schoen FJ, Levy JT, Levy RJ. *Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies*. J Biomed Mater Res 1993;27:1477-84.
10. Chen W, Scheon FJ, Levy RJ. *Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine bioprosthetic heart valves*. Circulation 1994;90:323-9.
11. Nimni WN, Cheung D, Strates B. *Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement*. J Biomed Mater Res 1994;15:465-9.

12. Chanda J. *Anticalcification treatment of pericardial prostheses*. Biomaterials 1994;15:465-9.
13. Pereira CA, Lee JM, Haberer SA. *Effect of alternative cross-linking methods on the low strain rate viscoelastic properties of bovine pericardial bioprosthetic material*. J Biomed Mater Res 1990;24:345-61.
14. Ameli E, Yates T, Hymana P, Zilla P. *Detoxication on top of enhanced, diamine-extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in sheep model*. J Heart Valve Disease 2003;12:93-101.
15. Humana P, Bezuidenhout D, Torriannib M, Hendriks M, Zilla P. *Optimization of diamine bridges in glutaraldehyde treated bioprosthetic aortic wall tissue*. Biomaterials 2002;23:2099-103.
16. Lee CH, Vyavahare N, Zand R, et al. *Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms*. J Biomed Mater Res 1998;42:30-7.
17. 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.
18. 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.
19. Connolly JM, Alferiev I, Kronsteiner A, Lu Z, Robert J. *Levy ethanol inhibition of porcine bioprosthetic heart valve cusp calcification is enhanced by reduction with sodium borohydride*. J Heart Valve Disease 2004;13:487-93.
20. Kim KC, Choi YK, Kim SH, et al. *Effect of diamine bridges using L-lysine in glutaraldehyde treated porcine pericardium*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:157-64.
21. 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.
22. Quesenberry MS, Lee YC. *A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: application under periodation conditions*. Anal Biochem 1996;234:50-5.
23. Maranto A, Schoen F. *Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves*. Circ Res 1988;63:844-8.
24. Zilla P, Weissenstein C, Bracher M, et al. *High glutaraldehyde concentrations reduce rather than increase the calcification of aortic wall tissue*. J Heart Valve Dis 1997;6:502-9.
25. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Escudero C, Garcia-Paez JM, Castillo-Olivares JL. *Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids*. Biomaterials 1996;17:571-5.
26. Moritz A, Grimm M, Eybl E, et al. *Improved biocompatibility by post fixation treatment of aldehyde fixed bovine pericardium*. Trans Am Sot Artif Intern Organs 1990;36:M300-3.
27. Moritz A, Grimm M, Eybl E, et al. *Improved spontaneous endothelialization by postfixation treatment of bovine pericardium*. Eur J Cardiothorac Surg 1991;5:155-60.
28. Eybl E, Grimm M, Grabenwoger M, Bock P, Muller M, Wolner E. *Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials*. J Thorac Cardiovasc Surg 1992;104:763-9.
29. Grabenwoger M, Grimm M, Eybl E, Leukauf C, Plenck H Jr, Bock P. *Decreased tissue reaction to bioprosthetic heart valve material after L-glutamic acid treatment. A morphological study*. J Biomed Mater Res 1992;26:1231-40.
30. Jee KS, Kim YS, Park KD, Kim YH. *A novel chemical modification of bioprosthetic tissues using L-arginine*. Biomaterials 2003;24:3409-16.

=국문 초록=

배경: 이종조직의 석회화는 기존에 사용된 돼지 판막이나 소 심낭을 이용한 생체 인공조직의 임상 실패의 주된 원인으로 알려져 있다. 최근에 항석회화 효과를 높이하고자 기전이 다른 여러 처치를 병합하는 시도들이 보고되고 있다. 본 연구에서는 작용기전이 다른 ethanol, L-lysine, NaBH₄을 병합 처리하였을 때 예상되는 상승 효과를 석회화와 조직의 신축력(elasticity)을 통해 알아보하고자 하였다. **대상 및 방법:** 0.625% Glutaraldehyde (4°C에서 2일, 상온에서 7일간) 고정된 돼지 심낭을 80% Ethanol (상온에서 1일), 혹은 0.1 M L-lysine (37°C에서 2일), 혹은 0.1 M NaBH₄ (상온에서 2일)로 처리 한 후 각각의 두께(thickness)와 장력(tensile strength)을 측정하였다. 각각의 항석회화 처리한 돼지심낭을 생후 3주된 쥐의 피하조직에 이식하고 8주 뒤 칼슘을 정량하고 조직학적 소견을 관찰하였다. **결과:** 0.625% glutaraldehyde 고정만 시행한 군(51.2±8.5 ug/mg)과 비교하여 80% Ethanol 처리한 군(13.6±10.0 ug/mg, p=0.008)과, L-lysine 처리한 군(15.3±1.0 ug/mg, p=0.002), 그리고 80% Ethanol과 L-lysine 처리한 군(16.1±11.1 ug/mg, p=0.012)은 통계적으로 의미 있게 칼슘의 침착량이 적었지만, NaBH₄만 처리한 군(65.7±61.8 ug/mg, p=0.653)과 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄로 모두 처리한 군(92.9±58.3 ug/mg, p=0.288)은 칼슘의 침착량이 더 많았다. 80% Ethanol과 L-lysine으로 처리한 군과 80% Ethanol, L-lysine, NaBH₄로 모두 처리한 군의 장력/두께 비율(tensile strength/thickness ratio)은 각각 7.60±1.55, 7.47±1.85로 glutaraldehyde 고정만 시행한 군의 4.75±1.88보다 증가되어 있는 경향을 보였다(p=0.76, p=0.33). **결론:** Ethanol과 L-lysine을 돼지심낭에 병합처리 하였을 때, Ethanol과 L-lysine을 단독처리 하였을 때와 비교하여, 비슷한 항석회화 효과와 조직의 신축력을 증가시키는 경향을 보였지만 병합처리에 의한 상승효과를 확인하지는 못하였다. NaBH₄는 단독처리 혹은 병합처리 하였을 때 모두 석회화를 증가시키는 경향을 보였다.

중심 단어 : 1. 석회화
2. 생체인공조직
3. 이종조직