

글루타르알데하이드로 고정된 소 심낭의 아미노산을 이용한 항석회화 처리(에탄올, 글루탐릭 산, 호모시스테인 산 처리의 효과)

이 철* · 김용진** · 이창하* · 김수환** · 최승화**

Anticalcification Treatment of Glutaraldehyde-fixed Bovine Pericardium with Amino Acids (The Effect of Ethanol, Glutamic Acid and Homocysteic Acid Treatment)

Cheul Lee, M.D.*, Yong Jin Kim, M.D.**, Chang-Ha Lee, M.D.*,
Soo Hwan Kim, B.S.**, Seung-Hwa Choi, B.S.**

Background: Glutaraldehyde-fixed heterografts are prone to calcification after long-term implantation in human, and this is one of the limiting factors for the longevity of the heterografts used in cardiovascular surgery. The aim of the study was to evaluate the anticalcification effect of an ethanol and amino acids treatment on glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. **Material and Method:** Bovine pericardial tissues were divided into 5 groups. Group 1 consisted of tissues fixed with glutaraldehyde, group 2 consisted of commercially available bovine pericardial valve tissues (Carpentier-Edwards PERIMOUNT), group 3 consisted of glutaraldehyde-fixed tissues treated with ethanol, group 4 consisted of glutaraldehyde-fixed tissues treated with ethanol and L-glutamic acid, and group 5 consisted of glutaraldehyde-fixed tissues treated with ethanol and homocysteic acid. The tissue microstructure was examined by light and electron microscopy. Tissue samples of each group were implanted into rat subcutaneous tissue for 3 ~4 months and the calcium contents were measured after harvest. **Result:** The collagen fibers appeared to be well preserved in all the groups. The calcium contents of groups 2, 3, 4 and 5 (13.46 ± 11.74 , 0.33 ± 0.02 , 0.39 ± 0.08 and $0.42 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively) were all significantly lower than that of group 1 ($149.97 \pm 28.25 \mu\text{g}/\text{mg}$) ($p < 0.05$). The calcium contents of groups 3, 4 and 5 were all significantly lower than that of group 2 ($p < 0.05$). **Conclusion:** Treatment with ethanol alone or in combination with amino acids (L-glutamic acid or homocysteic acid) strongly prevented the calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:409-417)

Key words: 1. Calcification
2. Heterograft
3. Glutaraldehyde

서 론

돼지의 판막이나 소의 심낭을 이용하여 만든 조직판막,

판막도관(valved conduit) 및 첩포(patch)는 심혈관 수술의 다양한 분야에서 사용되고 있다. 이러한 이종 조직들은 조직의 안정성을 유지하고 항원성(antigenicity)을 감소시키

*세종병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sejong General Hospital

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교병원 임상의학연구소, 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: A040004-008).

논문접수일 : 2009년 2월 3일, 논문수정일 : 2009년 2월 23일, 심사통과일 : 2009년 2월 25일

책임저자 : 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.

며 멸균 상태를 만들기 위하여 통상적으로 glutaraldehyde로 고정하여 사용하게 된다. 그러나 인체 내에 장기간 이식 시 석회화로 인한 변성이 문제가 되며, 이러한 석회화는 이종 조직의 내구성을 감소시키는 중요한 요인들 중의 하나이다. 특히 소아의 경우 성인에 비하여 조기에 심한 석회화가 발생하여 이의 교체를 위한 잦은 재수술이 불가피한 경우가 많다. 이종 조직이 인체 내에서 석회화되는 자세한 기전에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 세포막에 다량으로 존재하는 인지질(phospholipids)이 석회화의 재료로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[1], 조직의 고정에 사용되는 glutaraldehyde 자체도 석회화에 관여하는 것으로 알려져 있다[2,3]. 특히 glutaraldehyde 중 조직 내 콜라겐(collagen)의 교차결합(cross-link)에 참여하지 않는 자유 알데하이드기(free aldehyde groups)는 세포독성을 가지고 있으며, 조직의 석회화를 유발하는 것으로 알려져 있다[4-6]. 따라서 이러한 이종 조직의 석회화를 최소화하거나 그 발생을 지연시키기 위한 다양한 연구들이 이루어져 왔으며[7-23], 일부의 연구 결과들은 실제 임상에도 이용되고 있으나 아직까지 석회화를 완전히 방지할 수 있는 이상적인 방법은 개발되지 않았다. 본 연구에서는 glutaraldehyde로 고정한 소 심낭에 항석회화 처리를 한 후, 쥐 피하 이식 모델(rat subcutaneous implantation model)을 이용하여 그 효과를 알아보고자 하였다. 항석회화 처리로는 지질 성분의 제거를 위한 ethanol 처리를 단독으로 시행하거나, ethanol 처리 및 자유 알데하이드기의 제거(항독소화)를 위한 아미노산(L-glutamic acid, homocysteic acid) 처리를 함께 시행하여 그 결과를 비교해보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 대조군 및 실험군의 설정

소 심낭 조직을 처리 방법에 따라 2개의 대조군 및 3개의 실험군으로 나누었다. Glutaraldehyde로 단순 고정한 소 심낭을 음성 대조군(negative control)으로, 항석회화 처리한 소 심낭으로 만든 상용화된 판막 조직을 양성 대조군(positive control)으로 하였으며, 대조군들의 생체내 석회화 정도를 알아보기 위한 실험은 별도로 시행하였다.

1군(음성 대조군): glutaraldehyde 고정

2군(양성 대조군): Carpentier-Edwards PERIMOUNT Mitral Bioprosthesis (Edwards Lifesciences, Irvine, CA)

3군: glutaraldehyde 고정 + ethanol 처리

4군: glutaraldehyde 고정 + ethanol 처리 + L-glutamic acid 처리

5군: glutaraldehyde 고정 + ethanol 처리 + homocysteic acid 처리

2) 조직 처리

(1) **Glutaraldehyde 고정(1, 3, 4, 5군)**: 도살장에서 얻은 소의 심낭을 phosphate buffered saline (PBS) 용액(0.1 M, pH 7.4)에 넣은 후 얼음 상자에 담아 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착한 즉시 심낭 조직을 생리식염수로 세척한 후, 심낭 조직 표면의 지방 조직들을 박리하여 제거하였다. 이렇게 준비한 조직들을 PBS로 완충된 0.6% glutaraldehyde 용액(pH 7.4)에 넣고 4°C에서 48시간 동안 고정한 후, 상온에서 7일간 추가로 고정하였다. 더 이상의 처리가 필요 없는 조직(1군)은 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 2% benzyl alcohol 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다. 추가적인 처리가 필요한 조직들(3, 4, 5군)은 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 다음 단계로 진행하였다.

(2) **Ethanol 처리**: 고정된 조직을 PBS로 완충된 80% ethanol 용액(pH 7.4)에 넣고 상온에서 24시간 동안 처리하였다. 더 이상의 처리가 필요 없는 조직들(3군)은 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 2% benzyl alcohol 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다. 추가적인 처리가 필요한 조직들(4, 5군)은 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 다음 단계로 진행하였다.

(3) **L-glutamic acid 처리**: L-glutamic acid를 0.5 M acetic acid 완충액에 녹여 0.1 M 용액을 만들었다(pH 4.5). Ethanol 처리를 끝낸 조직들 중에서 L-glutamic acid로 처리할 조직들을 위의 방법으로 만든 0.1 M L-glutamic acid 용액에 넣어 37°C에서 48시간 동안 처리하였다. 처리가 끝나면 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 2% benzyl alcohol 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다.

(4) **Homocysteic acid 처리**: Homocysteic acid를 0.5 M acetic acid 완충액에 녹여 0.1 M 용액을 만들었다(pH 4.5). Ethanol 처리를 끝낸 조직들 중에서 homocysteic acid로 처리할 조직들을 위의 방법으로 만든 0.1 M homocysteic acid 용액에 넣어 37°C에서 48시간 동안 처리하였다. 처리가 끝나면 생리식염수로 10분간 철저히 세척한 후 2% benzyl alcohol 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다.

3) 이식 전 심낭 조직의 현미경 검사

각종 처리에 의해 발생할 수 있는 심낭 조직 미세구조

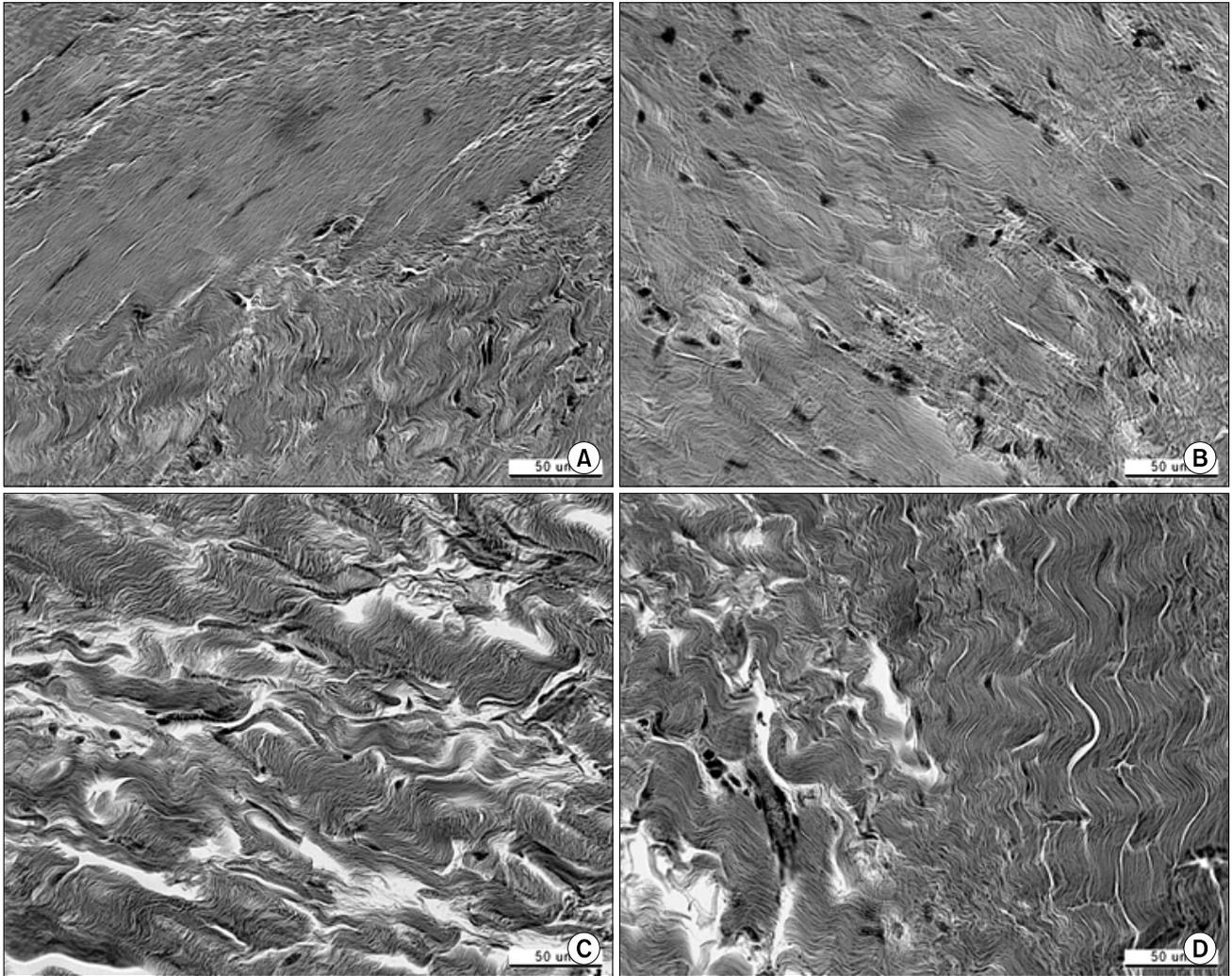


Fig. 1. Light microscopy of unimplanted bovine pericardium (hematoxylin-eosin stain, $\times 400$). Collagen fibers appear well preserved with a normally banded structure in all groups. (A) group 1, (B) group 3, (C) group 4, (D) group 5.

의 변화를 알아보기 위하여 각 군당 대표적인 1개씩의 조직들을 광학현미경(hematoxylin-eosin 염색, H-E stain) 및 전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)으로 검사하였다.

4) 쥐 피하 이식(Rat subcutaneous implantation)

이 실험은 서울대학교병원 임상의학연구소의 IACUC (International Animal Care and Use Committee)의 승인하에 시행되었다(IACUC No. 07-0214). 대조군에 대한 실험은 생후 10주령의 수컷 쥐(Sprague-Dawley rats, 336~392 g)들을 사용하였으며, 실험군에 대한 실험은 생후 8주령의 수컷 쥐(Sprague-Dawley rats, 296~321 g)들을 사용하였다.

Zoletil (20 mg/kg) 및 Rompun (5 mg/kg)을 복강내 투여하여 마취시킨 후, 등 부위를 제모하고 alcohol로 소독하였다. 항생제(cefazolin 20 mg/kg)를 피하 주사한 후, 등 부위에 4개의 피부 절개를 가한 뒤 피하 조직을 박리하여 공간을 만들고 각각의 공간에 생리식염수로 세척한 1개씩의 심낭 조직(가로 세로 1 cm)들을 이식하였다. 각 군당 이식한 심낭 조직의 갯수는 8~10개였다. 이식 후 상처 부위는 3-0 nylon으로 봉합하였다. 이후 12주간(대조군은 16주) 사육한 쥐들을 이산화탄소로 질식사시켜 안락사시킨 후, 체중을 측정하였다. 등 부위를 제모하고 이전의 상처 부위를 절개하여 피하 조직을 박리한 후, 이식되어 있는 심낭 조직들을 수거하였다. 심낭 조직에 붙어있는 쥐의 피하 조

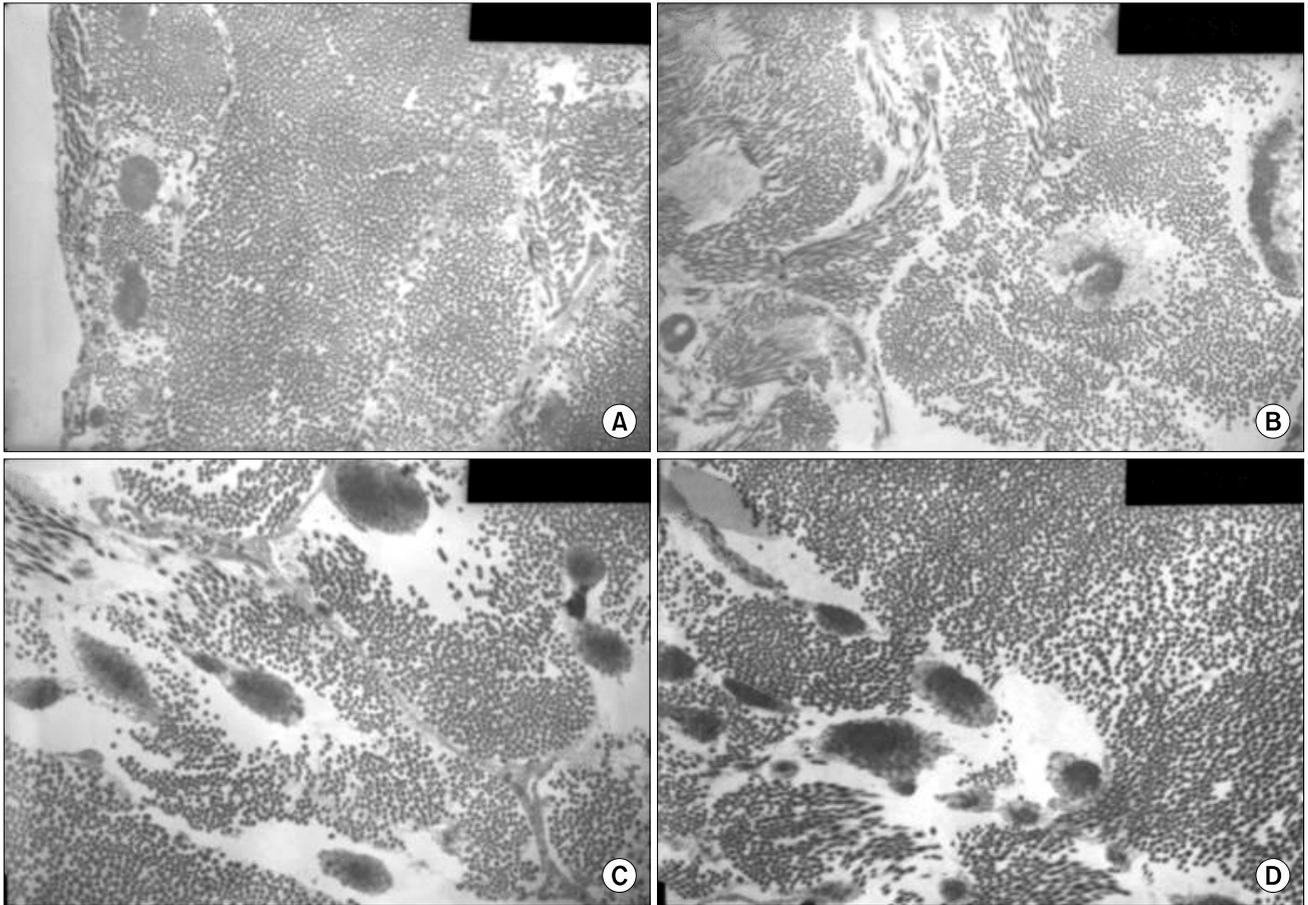


Fig. 2. Electron microscopy of unimplanted bovine pericardium ($\times 27,000$). Collagen fibers appear well preserved in all groups. (A) group 1, (B) group 3, (C) group 4, (D) group 5.

조직들을 박리하여 제거한 후 생리식염수로 세척하고, 칼슘 정량을 위하여 2% benzyl alcohol 용액에 보관하였다.

5) 칼슘 정량 분석

각 군당 6~9개 조직들의 칼슘 함량을 측정하였다. 수거한 심낭 조직들을 생리식염수로 세척한 후 건조시키고 (90°C , 48시간) 질량을 측정하였다. 건조된 조직들을 질산 (nitric acid, HNO_3)으로 전처리한 후, 유도결합 플라즈마-원자 방출분광기(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, ICP-AES)를 이용하여 조직내 칼슘 함량을 측정하였다.

6) 이식 후 심낭 조직의 현미경 검사

각 군당 대표적인 1개씩의 조직들을 전자현미경(TEM)으로 검사하여 석회화 유무 및 그 정도를 알아보았다.

7) 통계 분석

조직내 칼슘 함량에 대한 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 칼슘 함량의 차이를 분석하기 위하여 Mann-Whitney 검정을 시행하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다. 통계 처리를 위하여 SPSS (SPSS 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하였다.

결 과

1) 이식 전 심낭 조직의 현미경 검사

Glutaraldehyde 고정만 시행한 조직(1군), ethanol 처리만 추가로 시행한 조직(3군), 그리고 ethanol 및 아미노산 처리를 함께 추가로 시행한 조직(4, 5군) 모두에서 조직내 콜라겐 섬유들의 구조가 잘 유지되고 있음을 확인할 수

Table 1. Calcium content of explanted bovine pericardium

Group	N	Calcium content ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1 (GA fixation)	8	149.97 \pm 28.25
2 (CE PERIMOUNT)	7	13.46 \pm 11.74
3 (GA + Eth)	6	0.33 \pm 0.02
4 (GA + Eth + GluA)	8	0.39 \pm 0.08
5 (GA + Eth + HA)	9	0.42 \pm 0.06

GA=Glutaraldehyde; CE=Carpentier-Edwards; Eth=Ethanol; GluA=L-glutamic acid; HA=Homocysteic acid.

있었다(Fig. 1, 2).

2) 칼슘 정량 분석

각 군별 칼슘 함량을 Table 1과 Fig. 3에 정리하였다. 2, 3, 4, 5군의 칼슘 함량(각각 13.46 \pm 11.74, 0.33 \pm 0.02, 0.39 \pm 0.08, 0.42 \pm 0.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$)은 각각 항석회화 처리를 하지 않은 1군의 칼슘 함량(149.97 \pm 28.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$)과 비교하여 모두 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 또한 3, 4, 5군의 칼슘 함량(각각 0.33 \pm 0.02, 0.39 \pm 0.08, 0.42 \pm 0.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$)은 각각 상용화된 조직 판막을 사용한 2군의 칼슘 함량(13.46 \pm 11.74 $\mu\text{g}/\text{mg}$)과 비교하여 모두 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 항석회화 처리를 시행한 3, 4, 5군을 비교하여 보았을 때, ethanol 처리만 했던 3군(0.33 \pm 0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$)이 ethanol과 homocysteic acid 처리를 함께 했던 5군(0.42 \pm 0.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$)에 비하여 유의하게 낮은 칼슘 함량을 나타냈다($p < 0.05$).

3) 이식 후 심낭 조직의 현미경 검사

전자현미경(TEM) 검사에서 glutaraldehyde 고정만 시행한 조직(1군)에서는 높은 전자밀도를 보이는 석회화 소견을 관찰할 수 있었으며(Fig. 4), 이러한 소견은 조직 전체에 고루 분포하였다. Ethanol 처리만 추가로 시행한 조직(3군), 그리고 ethanol 및 아미노산 처리를 함께 추가로 시행한 조직(4, 5군)에서는 석회화 소견이 관찰되지 않거나, 국소적이고 미세한 석회화 소견만 관찰되었다(Fig. 4).

고 찰

이종 조직으로 만든 판막은 기계판막에 비하여 혈전색전증의 가능성이 낮고, 항응고 치료가 필요 없는 장점을 가지고 있어 인간의 판막 대체물로서 많이 사용되고 있다. 이러한 이종 조직들은 조직의 안정성을 유지하고 항원성을 감소시키며 멸균 상태를 만들기 위하여 통상적으

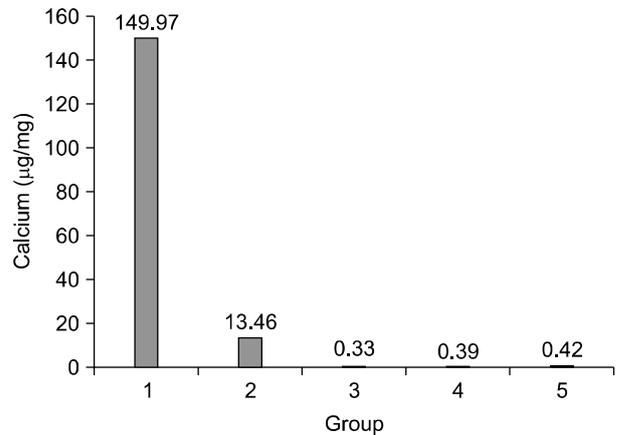


Fig. 3. Bar graph showing mean calcium content of explanted bovine pericardium. Group 1=Glutaraldehyde fixation; Group 2=Carpentier-Edwards PERIMOUNT; Group 3=Glutaraldehyde fixation + ethanol; Group 4=Glutaraldehyde fixation + ethanol + L-glutamic acid; Group 5=Glutaraldehyde fixation + ethanol + homocysteic acid.

로 glutaraldehyde로 고정하여 사용하게 된다. 그러나 인체 내에 장기간 이식 시 석회화로 인한 변성이 문제가 되며, 이러한 석회화는 조직판막의 내구성을 감소시키는 중요한 요인들 중의 하나이다. 석회화로 인한 변성은 성장하는 소아 환자들의 경우에 특히 빠른 속도로 발생하며, 이로 인한 빈번한 재수술이 큰 문제가 되고 있다. 이종 조직이 인체 내에서 석회화 되는 과정은 매우 복잡하며 그 정확한 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 숙주(host)의 대사상태, 이종 조직의 구조 및 화학적 성질, 그리고 기계적인 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있다.

이종 조직의 석회화는 주로 glutaraldehyde 처리에 의해 사멸화(devitalized)된 결합조직 세포(connective tissue cells)에서 시작되며, 그 기전은 세포외액의 칼슘이 세포막에 풍부하게 존재하는 인지질의 인(phosphorus)과 결합하여 결정체(calcium phosphate crystal)를 형성하는 것으로 알려져 있다[1,24]. 즉 조직내 인지질 성분들이 석회화의 재료로서 사용된다는 뜻으로서, 이러한 인지질을 제거함으로써 석회화를 방지하기 위한 연구들이 보고되었다[7-13]. Vyavhare 등[7,8]은 glutaraldehyde로 고정한 돼지의 대동맥 판막 조직에 ethanol을 처리하여 항석회화 효과가 있음을 동물실험에서 증명하였는데, 농도 50% 이상의 ethanol을 사용하여야 만족할 만한 항석회화 효과를 나타낸다고 하였고 ethanol이 석회화의 재료가 되는 인지질을 제거하는 동시에 조직내 콜라겐 구조의 영구적인 변화를 일으켜서 항석회화 작용을 나타내는 것으로 설명하였다. Pathak

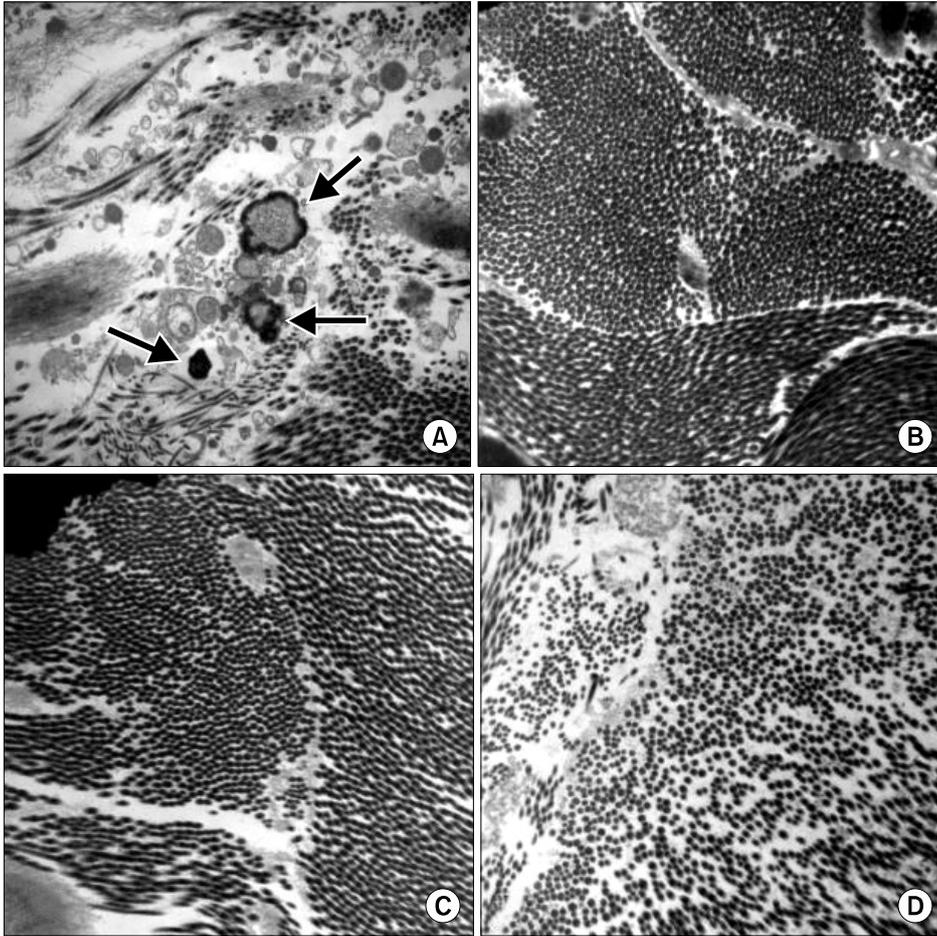


Fig. 4. Electron microscopy of harvested bovine pericardium ($\times 20,000$). Calcific deposits (arrows) are observed in group 1, whereas no calcification is observed in other groups. (A) group 1, (B) group 3, (C) group 4, (D) group 5.

등[11]은 glutaraldehyde로 고정된 돼지의 대동맥 판막 및 소 심낭 조직에 ethanol과 octanediol을 동시에 처리하여 항석회화 효과가 있음을 동물실험에서 증명하였다.

조직의 고정에 사용되는 glutaraldehyde 자체도 석회화를 유발한다고 알려져 있는데[2,3], 이는 콜라겐의 교차결합에 참여하지 않는 자유 알데하이드기들이 칼슘 이온들을 끌어들이어 초기 석회화에 관여함으로써 이루어진다고 설명하고 있다[4-6,24,25]. 또한 조직내 잔여 glutaraldehyde나 glutaraldehyde 중합체들이 생체 내에서 서서히 유리되거나 분해되어 자유 알데하이드기를 생산함으로써 석회화를 유발할 수 있다[25,26]. 따라서 자유 알데하이드기를 제거하기 위한 방법들이 연구되어 왔으며, 가장 대표적인 것이 아미노산을 이용한 항독소화(detoxification) 처리이다. 아미노산에 존재하는 아미노기(amino group)가 glutaraldehyde 고정 후 조직내에 남아있는 자유 알데하이드기와 결합하여 Schiff 염기(Schiff base)를 형성함으로써 자유 알데하이드기를 제거하여 석회화를 방지할 수 있다는 논리이다.

다양한 종류의 아미노산들이 이러한 역할을 할 수 있으며, 실제로 그 항석회화 효과가 동물 실험에서 증명되었다[14-23]. 또한 아미노산을 이용한 항독소화 처리는 조직내 콜라겐의 교차결합에는 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있는데, Stacchino 등[17]은 glutaraldehyde로 고정된 소 심낭에 homocysteic acid 처리를 하여도 교차결합의 정도를 나타내는 수축 온도(shrinkage temperature)는 변하지 않음을 증명하였다. 효과적인 항독소화 처리를 위해서는 반응 온도, 시간 및 산도(pH)와 같은 조건들이 중요하다. Zilla 등[21]은 대동맥 조직을 사용하여 효과적인 항독소화 처리의 조건들을 알아보기 위한 연구를 시행하였는데, 두꺼운 대동맥 조직의 경우 37°C , pH 4.5의 조건에서 일주일간 처리해야 효과적인 항독소화가 이루어진다고 보고하였다.

본 연구에서는 glutaraldehyde로 고정된 소 심낭 조직에 ethanol 및 아미노산 처리를 하여 쥐 피하 이식 모델에서 우수한 항석회화 효과가 있음을 증명하였다. 80% ethanol을 단독으로 처리하거나 L-glutamic acid 혹은 homocysteic

acid와 병행하여 처리한 경우 모두 항석회화 처리를 하지 않은 심낭 조직에 비하여 현저히 낮은 칼슘 함량을 보였다. 또한 상용화된 Carpentier-Edwards PERIMOUNT 판막 조직과 비교하여도 낮은 칼슘 함량을 보였다. Schoen 등[2]은 0.6% glutaraldehyde로 고정된 소 심낭 조직을 쥐 피하 조직에 이식하여 시간 경과에 따른 석회화 정도를 관찰하였는데, 이식 후 8~12주 사이에 최대 칼슘 함량(200~220 $\mu\text{g}/\text{mg}$)을 보이며 그 이후로는 16주까지 더 이상 칼슘 함량이 증가하지 않음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 대조군들(1, 2군)과 실험군들(3, 4, 5군)의 이식 기간이 각각 16주 및 12주로 차이가 있었으나, 항석회화 효과를 알아보기 위한 비교에는 큰 문제가 없을 것으로 사료된다. Ethanol 및 아미노산을 함께 처리하여 ethanol만 단독으로 처리한 경우보다 상승 작용을 통한 우수한 항석회화 효과를 기대하였으나, 이를 증명하지는 못하였다. 하지만 이론적으로는 ethanol과 아미노산의 항석회화 기전이 다르므로 두 가지 처리를 병행하여 좀 더 우수한 항석회화 효과를 기대해볼 수 있겠으며, 이를 증명하기 위하여서는 대동물 순환 모델(large animal circulatory model)을 이용한 장기간의 이식 실험이 추가적으로 필요하다고 사료된다.

결 론

쥐 피하 이식 모델을 이용한 단기간 생체내 이식실험 결과, glutaraldehyde로 고정된 소 심낭에 ethanol을 단독으로 처리하거나 ethanol과 아미노산(L-glutamic acid 혹은 homocysteic acid)을 함께 처리한 경우 모두 항석회화 처리를 하지 않은 소 심낭 조직과 비교하여 비슷한 정도의 우수한 항석회화 효과를 보였다. 이러한 결과는 상용화된 Carpentier-Edwards PERIMOUNT 판막 조직의 항석회화 효과에도 뒤지지 않는 것으로 판단되며, 향후 대동물 모델을 사용한 장기간의 이식 실험을 통하여 그 효과를 다시 한 번 검증해볼 필요가 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Schoen FJ. *Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology.* J Heart Valve Dis 1999;8:350-8.
2. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. *Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization.* Am J Pathol 1986;123:134-45.
3. Kim KM, Herrera GA, Battarbee HD. *Role of glutaraldehyde*

- in calcification of porcine aortic valve fibroblasts.* Am J Pathol 1999;154:843-52.
4. 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.
5. 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.
6. Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, et al. *Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material.* Ann Thorac Surg 1996;62:772-7.
7. Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, et al. *Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms.* Circulation 1997;95:479-88.
8. Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, et al. *Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships.* J Biomed Mater Res 1998;40:577-85.
9. Shen M, Kara-Mostefa A, Chen L, et al. *Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses.* Ann Thorac Surg 2001;71:S413-6.
10. Ogle MF, Kelly SJ, Bianco RW, Levy RJ. *Calcification resistance with aluminum-ethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep.* Ann Thorac Surg 2003;75:1267-73.
11. Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE, Moore MA. *Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential.* J Biomed Mater Res 2004;69A:140-4.
12. Clark JN, Ogle MF, Ashworth P, Bianco RW, Levy RJ. *Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride.* Ann Thorac Surg 2005;79:897-904.
13. Connolly JM, Alferiev I, Kronsteiner A, Lu Z, Levy RJ. *Ethanol inhibition of porcine bioprosthetic heart valve cusp is enhanced by reduction with sodium borohydride.* J Heart Valve Dis 2004;13:487-93.
14. Trantina-Yates AE, Human P, Zilla P. *Detoxification on top of enhanced, diamine-extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in the sheep model.* J Heart Valve Dis 2003;12:93-101.
15. Weissenstein C, Human P, Bezuidenhout D, Zilla P. *Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amin cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model.* J Heart Valve Dis 2000;9:230-40.
16. Valente M, Pettenazzo E, Thiene G, et al. *Detoxified glutaraldehyde cross-linked pericardium: tissue preservation and mineralization mitigation in a subcutaneous rat model.* J Heart Valve Dis 1998;7:283-91.
17. Stacchino C, Bona G, Bonetti F, Rinaldi S, Ciana LD,

- Grignani A. *Detoxification process for glutaraldehyde-treated bovine pericardium: biological, chemical and mechanical characterization.* J Heart Valve Dis 1998;7:190-4.
18. Jorge-Herrero E, Fernández P, Escudero C, García-Páez JM, Castillo-Olivares JL. *Calcification of pericardial tissue pre-treated with different amino acids.* Biomaterials 1996;17:571-5.
19. Liao K, Seiffter E, Hoffman D, Yellin E, Frater RWM. *Improved postfixation treatment of glutaraldehyde fixed porcine aortic valves by monosodium glutamate.* Artif Organs 1992;16:267-72.
20. Grimm M, Grabenwöger M, Eybl E, et al. *Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment.* J Cardiac Surg 1992;7:58-64.
21. Zilla P, Fullard L, Trescony P, et al. *Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts.* J Heart Valve Dis 1997;6:510-20.
22. Grimm M, Eybl E, Grabenwöger M, et al. *Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium.* J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102:195-201.
23. Ahn JH, Choi SY, Min SK, Won T. *Mitigation of calcification of heterograft tissue.* Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:307-12.
24. Schoen FJ, Levy RJ. *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention.* Ann Thorac Surg 2005;79:1072-80.
25. Chanda J. *Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat.* Ann Thorac Surg 1995;60:S339-42.
26. Southern LJ, Hughes H, Lawford PV, Clench MR, Manning NJ. *Glutaraldehyde-induced cross-links: a study of model compounds and commercial bioprosthetic valves.* J Heart Valve Dis 2000;9:241-9.

=국문 초록=

배경: Glutaraldehyde로 고정된 이종 조직을 인체 내에 장기간 이식 시 발생하는 기능부전의 주된 병변은 석회화이며, 이는 심혈관 수술에 사용되는 이종 조직 이식편(heterograft)의 내구성을 감소시키는 중요한 요인들 중 하나이다. 이 연구에서는 glutaraldehyde로 고정된 소 심낭에 ethanol 및 아미노산을 이용한 항석회화 처리를 하여 그 효과를 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 소 심낭 조직을 5개의 군으로 나누어 실험하였다. 1군은 glutaraldehyde 고정만 시행하였고, 2군은 상용화된 소 심낭 판막 조직(Carpentier-Edwards PERIMOUNT)을 사용하였으며, 3군은 glutaraldehyde 고정 후 ethanol 처리, 4군은 glutaraldehyde 고정 후 ethanol 및 L-glutamic acid 처리, 5군은 glutaraldehyde 고정 후 ethanol 및 homocysteic acid 처리를 하였다. 처리한 조직들의 미세구조를 광학 및 전자현미경으로 검사하였다. 각 군당 8~10개씩의 심낭 조직들을 쥐의 피하 조직에 3~4개월간 이식한 후 수거하여 각각의 칼슘 함량을 측정하였다. **결과:** Glutaraldehyde 고정만 한 조직 및 다양한 항석회화 처리를 한 조직들 모두 조직 내 콜라겐 섬유들의 구조가 잘 유지되고 있었다. 2, 3, 4, 5군의 칼슘 함량(각각 13.46 ± 11.74 , 0.33 ± 0.02 , 0.39 ± 0.08 , $0.42 \pm 0.06 \mu\text{g/mg}$)은 1군의 칼슘 함량($149.97 \pm 28.25 \mu\text{g/mg}$)과 비교하여 모두 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 3, 4, 5군의 칼슘 함량은 2군의 칼슘 함량과 비교하여 모두 유의하게 낮았다($p < 0.05$). **결론:** 쥐 피하 이식 모델을 이용한 단기간 생체내 이식실험 결과, glutaraldehyde로 고정된 소 심낭에 ethanol을 단독으로 처리하거나 ethanol과 아미노산(L-glutamic acid 혹은 homocysteic acid)을 함께 처리한 경우 모두 항석회화 처리를 하지 않은 소 심낭 조직과 비교하여 우수한 항석회화 효과를 나타냈다.

- 중심 단어 :** 1. 석회화
2. 이종 조직
3. 글루타르알데하이드