

소의 심낭 고정에서 용매 처리, 무세포화 혹은 항독성화 처리가 조직의 장력 및 신장도에 미치는 영향

장 우 성* · 김 용 진* · 김 수 환**

Effects on Tensile Strength and Elasticity after Treatment with Glutaraldehyde, Solvent, Decellularization and Detoxification in Fresh Bovine Pericardium

Woo Sung Jang, M.D.*, Yong Jin Kim, M.D.*, Soo Hwan Kim, BS**

Background: Bioprosthetic materials have been made using glutaraldehyde fixation of porcine or bovine pericardium during cardiovascular surgery. But these bioprostheses have the problems of calcification and mechanical failure. We determined changes in tensile strength and elasticity of pericardium after glutaraldehyde, solvent, decellularization and detoxification. **Material and Method:** Tissues were allocated to four groups: glutaraldehyde with and without solvent, decellularization, and detoxification. We studied tensile strength and strain on tissues. We measured the tensile strength of fresh pericardium stretched in six directions (with 5 mm width), and % strain, which we calculated from the breaking point when we pulled the pericardium in two directions. **Result:** Tensile strength was reduced when we used the usual concentrated glutaraldehyde fixation (n=83, MPa=11.47±5.40, p=0.006), but there was no change when we used solvent. Elasticity was increased after glutaraldehyde fixation (n=83, strain (%)=24.55±9.81, p=0.00), but there was no change after solvent. After decellularization of pericardium, the tensile strength was generally reduced. The decrease in tensile strength after concentrated glutaraldehyde fixation for a long time was significantly greater less than after concentrated solvent (p=0.01, p=0.00). After detoxification, the differences in strength and strain were not significant. **Conclusion:** After glutaraldehyde treatment of pericardium there is no loss in tensile strength (even though we did the glutaraldehyde, solvent and detoxification treatments LOGIC IS UNCLEAR). Also, these treatments had a tendency to increase elasticity. Although post-treatment decellularization led to a significant loss in strength, this effect could be attenuated using a low concentration of solvent or hypertonic solution.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:1-10)

Key words: 1. Bioprosthesis
2. Mechanical failure
3. Pericardium
4. Glutaraldehyde

*서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

**서울대학교병원 임상의학연구소

Seoul National University Hospital, Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

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

논문접수일 : 2009년 8월 18일, 논문수정일 : 2009년 9월 8일, 심사통과일 : 2009년 9월 9일

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.

서 론

단순, 복잡 심장 기형의 수술을 시행하는데 있어서 심장 기형의 결손을 교정하기 위해 이중 보철편의 수요가 늘어나고 있다. 이에 따라 보철편이 연구 개발, 이용되고 있으며 특히 이중 장기로부터의 보철편은 오래 전부터 개발되어 사용되고 있다[1,2]. 1978년 Gallo 등이 글루타알데하이드(glutaraldehyde, GA)로 처리한 돼지 심낭을 개에게 사용하여 훌륭한 성적을 관찰하였고 사람에게 시도하여 유착 및 면역 반응 등에서 좋은 결과를 보고한 이래 포르말린, 에틸렌글리콜 처리 등 여러 변형 방법이 사용되었으나 아직은 GA가 가장 적합한 보존제이자 고정액으로 여겨지고 있다. 하지만 GA는 GA의 알데하이드기(-CHO)가 체내의 칼슘과 반응하여[3,4] 석회화를 일으키고 이것이 중장기 수술 성적에 영향을 주게 되어 지금까지 많은 연구들은 GA의 알데하이드기의 결합 부위를 미리 다른 물질과 결합시켜 칼슘과 결합하는 것을 막아 줌으로써 석회화를 방지하고자 하였다. 또한 이와 함께 이중 이식편의 기계적인 결함(mechanical failure)도 이중 이식 판막과 심낭 보철편의 중장기 수술 성적의 중요한 원인으로 알려져 있다[5,6]. 김관창 등[7]은 돼지의 심낭을 이용하여 GA 농도에 따른 장력-두께간의 구조를 연구하여 GA, 에탄올, Sodium dodesyl sulfate (SDS) 무 세포화 처리 효과는 심낭의 두께에 차이는 있었지만 그 영향은 크지 않았으며, 여러 처리 과정 중 심낭 조직의 손상으로 인한 장력의 손실은 없는 것으로 보고한 바 있다. 하지만 국내에서 심낭 보철편의 처리 방법에 따른 기계적인 성질에 대한 기초 연구가 아직까지 미비한 실정이다. 이에 본 저자들은 소의 심낭을 이용하여 GA를 고정한 그룹, GA에 에탄올 등과 같은 용매(solvent)를 첨가한 그룹, 여기에 무세포화(decellularization) 처리를 더한 그룹, lysine 등의 아미노산 기를 첨가하여 항독성화(detoxification) 처리를 한 그룹으로 나누어 고정액과 처리 방법에 따른 조직의 물리-기계적 장력 및 신장도의 변화를 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 이중 보철편의 채취 및 용매의 첨가

소의 심낭을 도살 후 냉장 상태(4°C)에서 최소 12시간 내에 즉시 고정한다. GA 고정은 일반적으로 0.1% 이하를 초저농도(ultra low concentrated), 0.1~0.25%를 저농도(low concentrated), 0.25~0.625%를 상용농도(usual concentrated),

1% 이상을 고농도(high concentrated) 고정으로 편의상 분류하였다. GA (buffered glutaraldehyde)만으로 고정한 그룹은 상용농도(0.25~0.6%) 또는 고농도(1.5%, 3%)의 완충 GA (buffered glutaraldehyde)에 담가 4°C에서 3~5일간 고정 한 후 상온에서 상용농도(0.25%, 0.3%)의 완충 GA에 7~12일간 고정하였다. GA의 고정과 함께 항 석회화를 위한 용매를 첨가한 그룹은 GA 고정과 같은 과정으로 고정 처리를 하였고 GA 고정 중간 및 뒤에 용매를 첨가하였다.

상용 농도(0.5%, 0.6%) GA 또는 고농도 GA (3%)에 3일에서 5일 동안 고정 후 80% 에탄올(ethanol)이나 45%, 75% 에탄올+5% 옥탄올(octanol) 또는 45%, 75% 에탄올+5% 옥타네디올(octanediol)을 같이 섞어 4°C에서 GA 고정 후 상온에서 상용농도 GA에 7~12일간 상온에서 고정 하거나, 상온에서 0.5% 또는 3% GA에 3~5일 동안 고정 후 상온에서 0.25% GA에 담가 7~12일간 고정한 후 80% 에탄올이나 45%, 75% 에탄올+5% 옥탄올 혹은 45%, 75% 에탄올+5% 옥타네디올(PBS buffer, pH 7.4)이 담긴 진탕기(shaker bath)에 넣어 1~2일간 처리하였다. 또한 상용농도(0.5%) GA 고정 후 45°C에서 GA 고정 또는 용매를 첨가하여 온도에 따른 물리-장력 및 신장도의 변화를 관찰 하였다.

고정된 심낭편들은 냉장 인산염 완충 식염수(phosphate buffered solution, PBS, 0.1 M, pH 7.4)로 여러 차례 세척한 후 4°C의 PBS 용액에 보관한 후에 각종 물리적 검사를 시행하였다. GA 고정 및 용매를 이용한 실험 방법은 상용농도 및 고농도, 온도에 따른 GA 고정, 용매를 첨가한 군으로 분류하여 Table 1에 정리하였다.

2) 무세포화

무세포화 처리 전 복합 항균제(1 cc/L, antibiotic & antimycotic solution, Sigma, 100 U penicillin, 0.1 mg streptomycin, 0.25 g/mL amphotericin)에 의한 생체 균주 부담 완화(Bioburden reduction)를 시도하였고, 이후 무세포화 과정 중에는 항생제를 사용하지 않았다. 이후 PBS에 보관된 소의 심낭 절편을 각각의 온도와 정해진 시간에 따라 분당 100회전 이상의 회전 진탕기(rotating shaker)에서 처리하였고 저장성 완충 용액, 고장성 완충 용액, 등장성 완충 용액을 이용해 무세포화를 진행하였다. 이후 상용농도 및 고농도 GA 고정, 용매 첨가를 시행하였다. 무세포화에 사용된 용액은 Sodium dodesyl sulfate (SDS), Triton X-100 혹은 Sodium deoxycholate (DOA)였다. 각각의 완충 용액의 조성 및 산도는 다음과 같다.

Table 1. Methods of glutaraldehyde & solvent fixation

| Group | Methods |
|------------------|---|
| Usual GA group | 0.5% GA 1 wk.+0.25% GA 1 wk. 0.6% GA for 3 days+0.3% GA for 12 days 0.5% GA 2 wks. |
| High GA group | 0.5% GA 5 days+0.5% GA 2 days 45°C+0.25% GA 1 wk. 3% GA 3 days+0.25% GA 12 days 0.5% GA 5 days+3% GA 3 days+0.25% GA 1 wk. 0.5% GA 5 days+1.5% GA 3 days+0.25% GA 1 wk. |
| Usual GA+solvent | 0.6% GA 3 days+80% EtOH 3 days 4°C+0.3% GA 12 days 0.6% GA 3 days+45% EtOH+5% octanol 3 days 4°C+0.3% GA 12 days 0.6% GA 45% EtOH+5% octanediol 3 days 4°C+0.3% GA 12 days |
| High GA+solvent | 3% GA 3 days+80% EtOH 3 days+0.25% GA 12 days 3% GA 3 days+0.25% GA 12 days+0.8% EtOH 24 h 3% GA 3 days+20% 1-butanol+50% EtOH 3 days+0.25% GA 12 days 3% GA 3 days+45% EtOH & 5% octanol 3 days+0.25% GA 12 days 0.5% GA 5 days+2% GA 2 days+0.25% GA 1 wk+70% ethanol 2 days 0.5% GA 5 days+(1.5~3%) GA 3 days+80% EtOH+0.25% GA 1 wk. 0.5% GA 5 days+(1.5~3%) GA 3 days+75% EtOH+5% octanol 3 days+0.25% GA 1 wk. 0.5% GA 5 days+(1.5~3%) GA 3 days+75% EtOH+5% octanediol 3 days+0.25% GA 1 wk. 0.5% GA 5 days+2% GA+65% EtOH+5% octanol 2 days 45°C+0.25% GA 1 wk. 0.5% GA 5 days+2% GA+70% EtOH 2 days 45°C+0.25% GA 1 wk. |

GA=Glutaraldehyde.

Table 2. Methods of decellularization

| | |
|-----|---|
| D0 | Hypotonic 14 h 4°C+hypotonic with 0.25% SDS 24 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 120 rpm |
| D1 | Hypotonic 14 h 4°C+hypotonic with 0.25% SDS 24 h 4°C+hypertonic 8 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 120 rpm |
| D2 | Hypotonic 6 h 4°C+hypotonic with 0.25% SDS 14 h 10°C+hypertonic (II) 8 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 150 rpm |
| D3 | Hypotonic 14 h 4°C+hypotonic with 0.25% SDS 24 h 4°C+isotonic (recombinant a-gal&Dnase&Rnase, pH 6.0) 12 h 4°C+isotonic 8h 4°C 120 rpm |
| D4 | Hypotonic 14 h 4°C+hypotonic with 0.25% Triton X-100+0.25% DOA 24 h 4°C+isotonic a-Galactosidase&Dnase, Rnase, pH 6.0) 12 h 4°C+isotonic 14 h 4°C 120 rpm |
| D5 | Hypotonic with 0.5% triton X-100 14 h 4°C+hypotonic with 0.5% DOA 24 h 4°C+isotonic 12 h 4°C+hypertonic 24 h 4°C+PBS 4 h 4°C 120 rpm |
| D6 | Hypotonic with 0.5% SDS 14 h RT+hypertonic (I) 4 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 200 rpm |
| D7 | Hypotonic with 0.5% SDS 14 h RT+hypertonic (II) 8 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 200 rpm |
| D8 | Hypotonic with 1% DOA 4 h RT+hypertonic (I) 4 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 200 rpm |
| D9 | Hypotonic with 1% DOA 14 h RT+hypertonic (II) 8 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 200 rpm |
| D10 | Hypotonic 6 h 10°C+hypotonic with 2% DOA 24 h 10°C+hypertonic (II) 12 h 4°C+isotonic 12 h 4°C 200 rpm |

D=Decellularization; GA=Glutaraldehyde; SDS=Sodium dodesyl sulfate; DOA=Sodium deoxycholate; PBS=Phosphate buffered solution; RT=Room temperature.

저장성 완충 용액(Hypotonic buffered solution): Distilled water 1,000 mL; Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8.

등장성 완충 용액(Isotonic buffered solution): Distilled water 1,000 mL; Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8.

고장성 완충 용액 I (Hypertonic buffered solution I): Distilled water 1,000 mL; Tris, 100 mmol/L; NaCl, 0.3 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL; neomycin trisulfate 10 ml/L; pH 8.

고장성 완충 용액 II (Hypertonic buffered solution II): Distilled water 1,000 mL; Tris, 200 mmol/L; NaCl, 0.6 mol/L

Table 3. Methods of detoxification

| No | Methods | N | MPa* | Strain [†] (%) |
|----|---------------------------|----|------------|-------------------------|
| 1 | Fresh bovine pericardium | 61 | 14.58±4.79 | 15.38±3.33 |
| 2 | GA | 40 | 12.45±4.61 | 22.46±13.23 |
| 3 | GA + solvent | 40 | 17.82±7.58 | 21.17±6.94 |
| 4 | GA + lysine | 40 | 14.85±6.98 | 21.91±9.32 |
| 5 | GA + solvent + lysine | 40 | 15.09±6.78 | 21.67±8.19 |
| 6 | GA + glycine | 43 | 10.38±4.01 | 23.45±9.32 |
| 7 | GA + solvent + glycine | 44 | 14.14±4.22 | 23.07±7.62 |
| 8 | D+GA + lysine | 20 | 10.17±5.69 | 23.67±11.77 |
| 9 | D+GA + solvent + lysine | 21 | 13.95±6.75 | 17.78±6.72 |
| 10 | D+GA + glycine | 20 | 11.27±3.23 | 18.67±7.21 |
| 11 | D+GA + solvent + glycine | 20 | 10.71±5.43 | 25.58±9.77 |
| 12 | D1+GA + lysine | 20 | 14.11±7.07 | 25.59±9.77 |
| 13 | D1+GA + solvent + lysine | 30 | 13.77±6.12 | 22.33±6.84 |
| 14 | D1+GA + glycine | 20 | 12.92±3.68 | 27.33±6.81 |
| 15 | D1+GA + solvent + glycine | 30 | 11.62±5.24 | 24.94±7.10 |

*MPa=Tensile stress at break (kgf/width 5 mm); [†]Strain (%)=Tensile strain at break (%); GA=Glutaraldehyde; D=Hypotonic for 6 h, hypotonic with 0.25% SDS 14 h 10°C, hypertonic (II) 8 h, isotonic 12 h 4°C (200 rpm); D1=Hypotonic for 6 h, hypotonic with 0.1% SDS 14 h 10°C, hypertonic (II) 8 h, isotonic 12 h 4°C (200 rpm).

L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/ml; neomycin trisulfate 10 ml/L; pH 8.

다른 용액에 옮길 때에는 생리 용액(50 mL PBS)에 5분 간 3회 이상 세척 후 이동하였다.

무세포화 실험 방법은 Table 2에 정리하였다.

3) 항독성화 방법(Detoxification methods)

GA 고정 및 용매 첨가, 무세포화를 시행한 소의 심낭에 항독성화를 위해 0.1 M L-Lysine (acetic acid buffer, 0.5 M, pH 7.6) 및 0.2 M Glycine (1X PBS, pH 7.6) 용액을 37°C에서 48시간 동안 80 rpm으로 진탕기에 돌려 처리한 용액을 첨가하여 각각의 장력 및 신장도를 측정하였다. 항독성화 실험방법은 Table 3에 정리하였다.

4) 소의 심낭의 장력 및 탄력성 검사

소의 심낭은 교원 섬유들이 일정하지 않은 방향으로 달리면서 서로 교차하기도 하고 소용돌이도 치며 부위마다 그 분포가 균일하지 못하다. 따라서 무작위로 한 부분을 떼어서는 그 심낭의 인장 강도를 대표할 수 없게 된다. 따라서 처리된 심낭을 펼치고 30도씩 각도를 달리하여서 얻을 수 있는 6가지의 방향에 대하여 0.5×5 cm의 장방형 절편을 취하여서 폭 5 mm에 대한 인장 강도를 측정함으로써 그를 평균한 값이 그 심낭의 인장 강도의 대표값이

되도록 하였다. 장력의 측정은 Japan Tech & Manufacture (Mitutoyo, Japan), Digital Force Gauge (IMADA, Japan), Model 5FGN, automated materials testing system을 이용 load speed 100 mm/min로 측정하여 단위는 MPa (=kgf/width 5 mm)로 표기하였다. 또한 심낭의 두께와 장력과의 관계를 보기 위하여 캘리퍼스 Mitutoyo Thickness Gauge (Digimatic 543-122-15, Mitutoyo, Japan)로 표본들의 두께도 한 샘플에서도 여러 번 동시에 측정하였다. 신장도는 양 방향으로 늘어 끊어지는 시점에서의 길이를 측정하여 늘어난 정도를 %로 표시하였다.

5) 통계 방법

소의 심낭의 두께는 mm, 심낭 장력을 MPa (=kgf/폭 5 mm), 탄력도는 처음 길이에 대한 늘어난 길이의 비 %의 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 통계적 차이는 모수 검정 방법으로 ANOVA test로 검증하였으며, 각 실험마다 각각의 그룹 간 비교는 사후 검사 Tamhane test를 하였다. 비모수 검정 방법으로 Mann-Whitney U 검정을 사용하였으며 각 군 간의 p값이 0.05 미만을 의미 있는 것으로 간주하였다.

Table 4. Results of glutaraldehyde & solvent fixation

| No | Methods | N | MPa* | Strain [†] (%) |
|----|--------------------------|-----|------------|-------------------------|
| 1 | Fresh bovine pericardium | 61 | 14.58±4.79 | 15.38±3.33 |
| 2 | Usual GA | 83 | 11.47±5.40 | 24.55±9.81 |
| 3 | Usual GA+solvent | 169 | 11.72±7.24 | 21.06±7.57 |
| 4 | High GA | 46 | 13.95±4.19 | 27.60±13.57 |
| 5 | High GA+solvent | 60 | 15.53±4.86 | 21.95±8.73 |
| 6 | Usual GA 45°C+solvent | 33 | 13.61±7.31 | 21.06±6.43 |

*MPa=Tensile stress at break (kgf/width 5 mm); [†]Strain (%)=Tensile strain at break (%); GA=Glutaraldehyde.

Table 5. Hypertonic treatment in decellularization

| No | Methods | N | MPa* | Strain [†] (%) |
|----|---|----|------------|-------------------------|
| 1 | Hypotonic 8 h+hypotonic with 0.5% SDS 16 h+isotonic 12 h 8°C | 10 | 4.60±0.68 | 18.52±4.12 |
| 2 | Hypotonic 8 h PBS with 1% DOA 24 h, PBS 12 h 8°C | 5 | 6.55±2.26 | 13.33±3.34 |
| 3 | Hypotonic 8 h+hypotonic with 0.5% SDS 24 h+hypertonic 8 h+isotonic 12 h 8°C | 15 | 10.65±4.37 | 17.78±7.09 |
| 4 | Hypotonic 8 h+PBS with 1% DOA 24 h+hypertonic 8 h+PBS 12 h 8°C | 10 | 8.64±4.65 | 16.00±4.10 |

*MPa=Tensile stress at break (kgf/width 5 mm); [†]=Strain (%)=Tensile strain at break (%); PBS=Phosphate buffered solution; DOA=Sodium deoxycholate.

결 과

1) GA 고정 후 용매를 첨가하였을 때 그룹 간 압력-장력, 압력-신장도 비교

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭과 GA로 처리한 소 심낭, GA+용매로 처리한 소심낭의 장력 및 신장도를 Table 4에 나타내었다.

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭과 비교하여 상용농도 GA 고정시 MPa값이 통계적으로 유의하게 감소하였다(p=0.006). 하지만 고농도의 GA에 고정하였을 때에는 MPa값의 감소는 관찰되지 않았다. 상용농도 및 고농도 GA 고정 후 용매 첨가할 때 고정 전후의 장력은 통계적 차이는 없었으나 용매를 첨가할 때 약간 증가하는 경향을 보였다. 실험 과정 중 에탄올처리, 옥탄올, 옥타네디올을 첨가 처리하였을 때 장력의 차이는 관찰되지 않았다. 하지만 옥탄올에 비해 옥타네디올에서 장력의 값이 약간 증가하는 경향은 볼 수 있었다. 부탄올 첨가시 장력의 값은 증가하는 경향은 보였으나 통계적 의미는 없었다. 45°C로 일종의 고온 처리 방법의 GA 고정을 하였을 때 상온과 비교하여 MPa값의 차이는 보이지 않았다.

신장도를 살펴보면 아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭에 GA 고정을 하였을 때 신장도가 통계적으로 유의하게 증가하였다(p=0.000). 상용농도 및 고농도 GA 고

정을 한 두 그룹간의 신장도의 차이는 관찰되지 않았다. 또한 용매 첨가시 신장도의 변화는 통계적으로 유의하지 않았다. 에탄올처리, 옥탄올, 옥타네디올을 첨가 처리하였을 때 신장도가 약간 늘어나는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 온도에 따른 신장도의 변화 역시 관찰되지 않았다.

2) 무세포화 후 그룹 간 압력-장력, 압력-신장도 비교

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭과 GA로 처리한 소의 심낭, GA+용매로 처리한 소의 심낭, 무세포화 과정을 시행한 소의 심낭의 장력 및 신장도를 Table 5, 6에 나타내었다.

우선 무세포화를 시행한 군에서는 전반적으로 MPa값이 감소하는 경향을 보였고 신장도는 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. 0.25% SDS를 사용한 무세포화 과정 중 저장성 용액(Hypotonic solution)을 사용하여 탈세포화를 하였을 때 조직의 장력 및 신장도는 감소하는 경향을 보였다. 저장성 용액을 8시간 처리한 군과 14시간 처리한 군을 비교하였을 때 14시간 처리한 그룹에서 장력 및 신장도가 통계적으로 유의하게 감소하였다. 고장성 용액(Hypertonic solution) 처치를 첨가하였을 때 MPa값이 증가하였고(D0, D1, p=0.01, p=0.921, p=0.000), 신장도는 유의한 차이를 보이지는 않았다. 고장성 용액의 처리 시간을 늘렸을 때 신

Table 6. Decellularization & fixation

| No | Methods | N | MPa* | Strain [†] (%) |
|----|-----------------------------------|----|------------|-------------------------|
| 1 | Fresh bovine pericardium | 61 | 14.58±4.79 | 15.38±3.33 |
| 2 | D0+usual concentration GA | 13 | 8.64±2.83 | 23.57±6.06 |
| 3 | D0+usual concentration GA+solvent | 16 | 6.96±4.31 | 28.54±11.42 |
| 4 | D0+high concentration GA | 5 | 10.75±3.08 | 30.00±4.72 |
| 5 | D0+high concentration GA+solvent | 15 | 7.07±4.73 | 17.78±8.51 |
| 6 | D1+usual concentration GA | 11 | 11.63±2.65 | 20.00±5.37 |
| 7 | D1+high concentration GA | 25 | 9.94±6.15 | 19.13±5.40 |
| 8 | D1+usual concentration GA+solvent | 10 | 8.17±3.45 | 15.34±3.22 |
| 9 | D1+high concentration GA+solvent | 20 | 14.16±3.71 | 20.17±7.21 |
| 11 | D2+high concentration GA+solvent | 10 | 8.55±2.60 | 26.33±5.97 |
| 12 | D3+usual concentration GA | 5 | 9.43±2.28 | 18.00±5.06 |
| 13 | D3+high concentration GA+solvent | 5 | 7.87±2.55 | 23.33±5.27 |
| 14 | D4+usual concentration GA | 5 | 19.09±3.28 | 14.00±3.65 |
| 15 | D4+high concentration GA+solvent | 5 | 14.69±2.28 | 11.33±1.82 |
| 10 | D5+high concentration GA | 10 | 8.24±2.01 | 28.83±6.19 |
| 16 | D6+high concentration GA+solvent | 15 | 5.09±2.61 | 29.33±6.07 |
| 17 | D7+high concentration GA+solvent | 8 | 4.37±1.82 | 34.79±3.72 |
| 18 | D8+high concentration GA+solvent | 9 | 8.92±1.87 | 25.18±4.89 |
| 19 | D9+high concentration GA+solvent | 6 | 7.41±0.96 | 34.72±1.95 |
| 20 | D10+high concentration GA+solvent | 5 | 6.38±3.47 | 24.67±10.63 |

*MPa=Tensile stress at break (kgf/width 5 mm); [†]Strain (%)=Tensile strain at break (%); D=Decellularization; GA=Glutaraldehyde.

장도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(p=0.000) (Table 4). 이종이식의 항원인 α -gal, Rnase, Dnase를 제거하였을 때 장력 및 신장도는 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 못했다. 0.25%의 SDS를 첨가한 그룹과 다른 저농도의 0.25% Triton X-100과 0.25% DOA를 첨가한 그룹을 비교하였을 때 0.25% Triton X-100과 0.25% DOA를 첨가한 그룹에서 통계적으로 의미 있게 장력 및 신장도가 유지되었다(장력: p=0.008, p=0.008, 신장도: p=0.151, p=0.008). 고농도의 0.5% SDS를 사용한 무세포화 과정에서 MPa값은 감소하고 신장도는 증가하는 경향이 있으며, 0.25%보다 고농도인 0.5% Triton X-100과 0.5% DOA를 첨가하였을 때 MPa값은 역시 감소하였다. 0.25% SDS와 1% DOA를 비교하였을 때 1% DOA에서 통계적으로 유의하지는 않지만 MPa값이 높은 경향이 관찰되었고(p=0.303, p=0.713), 신장도는 특별한 차이를 보이지 않았다. DOA농도가 고농도인 2% DOA를 첨가하였을 때 MPa값이 좀 더 감소하는 경향을 보였다. 삼투압이 다른 고장성 용액(I)과 고장성 용액(II)간 장력의 차이는 관찰되지 않았다.

3) 탈독성화 후 그룹간 압력-장력, 압력-신장도 비교

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭과 GA 고정, GA+용매, 무세포화 과정, 탈독성화 과정을 시행한 소의 심낭의 장력 및 신장도를 Table 3에 나타내었다.

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭, 용매 첨가 후, 무세포화 시행 후 각각 Lysine 및 Glycine으로 항독성화 처리를 하였을 때 MPa값의 차이는 통계학적으로 발견되지 않았고 Lysine군과 Glycine군 간의 차이도 관찰할 수 없었다. 신장도는 아무런 처리를 하지 않은 소의 심낭과 비교하여 용매 및 무세포화 처리 후 Lysine으로 항독성화 처리를 하였을 때 신장도가 증가하는 경향을 보였고, Glycine 첨가 군중 저농도의 GA를 첨가한 군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(p=0.028, 0.007, 0.045, 0.214). Lysine 및 Glycine 처리한 두 군 간의 신장도 차이는 관찰되지 않았다.

고찰

심장 수술에 있어 이종 이식 보철편의 사용은 보편적으로 행하여지고 있으며 그 빈도 또한 증가하고 있다. 하지

만 현재 국내에서 사용되고 있는 이중 이식 보철편 중 국내에서 개발 사용되고 있는 것은 없으며 또한 이것들을 개발하기 위한 이중 조직의 물리-기계적인 성질에 대한 기초 연구 또한 없는 실정이다. 더군다나 현재 국내에 수입되고 있는 보철편은 경제적인 측면에서도 환자에게 많은 부담을 주고 있다. 이에 표준화된 방법으로 이중 이식 보철편을 자체적으로 제작하는 것에 여러 장점이 있을 것으로 생각된다.

일반적으로 조직 보철편은 GA에 고정 보존하는 방법을 사용하고 있는데 이는 조직의 교원 섬유들이 GA와 안정된 교차 결합을 이루며 GA 중합체를 표면에 형성하는 것을 이용하여 이중 보철편의 면역성을 감소시키고 효소성 분해에 저항성을 증진시킨다[8]. 저농도의 GA에 고정할 경우 판막과 같이 팽창하는 조직의 교차 결합에 더 나은 것으로 알려져 있고 고농도의 GA로 고정을 할 경우 조직 자체의 무기질 침착을 덜하게 하여 조직의 빠른 표면 교차 결합에 더 좋고, 장기 관찰 시 석회화도 상용농도에 비해 덜 침착하는 것으로 알려져 있다[9]. 하지만 GA만으로 고정할 경우 조직의 석회화 및 세포 독성이 문제시 되고 있다[10]. 이에 지금까지의 많은 연구에서 GA의 석회화 원인으로 GA의 자유 알데하이드기가 칼슘과 결합하는 것 [3,4,11,12]이라고 알려져 있으며 이 알데하이드기의 결합 부위를 다른 물질과 반응시켜 칼슘이 붙는 것을 방해하면 석회화를 예방할 수 있을 것으로 생각되어 희석 GA 고정 용액을 만들 때 기본적으로 마그네슘을 첨가하여 사용하고 있으며 이중이식 보철편의 고정 처리시 에탄올, 부탄올 혹은 long chain alcohol (LCA)인 옥탄올(octanol), 옥타네디올(octanediol)과 같은 용매의 첨가는 칼슘과 결합하는 근원이 되는 조직의 인지질 성분을 감소시키고 칼슘 인 핵 형성(calcium phosphate nucleation)을 억제하고 교원섬유, 콜라겐(collagen)의 크기와 수를 감소시키며, GA와 칼슘의 결합을 억제하여 조직의 석회화 성향을 감소시키는 것으로 알려져 있다[10]. 에탄올과 같은 short chain alcohol (SCA)의 경우 고농도에서 알데하이드 기에 붙을 수 있는 인지질을 제거하고 조직 콜라겐의 입체형태를 변화시키고, SCA와 LCA를 같이 사용할 경우 LCA의 구조가 인지질과 비슷하여 효과적으로 인지질을 제거하는 것으로 알려져 있다[10]. 또한 GA 고정시 알코올계 용매의 첨가는 유전상수(dielectric constant)를 감소시켜 교원섬유의 전위 라이실 기(polar lysyl residues)를 내전(inward rotation) 시켜 아미노산의 반응부위를 감소시켜 교차결합 성질을 변화시키는데, 혐수 성질(hydrophobic character)인 탄력섬유(ela-

stin)의 교차결합에 도움이 되는 것으로 알려져 있다[13].

한편 조직의 세포 독성 방지를 막기 위한 각종 아미노산들이 사용되고 있다. 또한 조직의 내구성을 제한하는 퇴행성 변화 및 석회화가 조직에 남아 있는 세포성분에 대한 조직 항원에 대한 환자의 면역 반응이 깊게 관여하는 것이 알려지면서[14] 무세포화의 중요성이 더해지고 있다. 동종 혹은 이중 조직을 무세포화하여 조직 지지체(scaffold)로 사용하여 여기에 체내 혹은 체외에서 환자의 세포가 자라게 함으로서 이 세포들로 하여금 지속적으로 세포 기질을 만들게 하여 그 내구성을 연장하거나 소아에서는 이들 조직의 성장도 기대해 보게 되었다. 무세포화의 목표는 면역반응을 최소화할 수 있도록 세포 성분을 완전히 제거하는 것과 동시에 조직 자체의 물리적 성질을 잘 유지하고 재생세포화에 적합한 세포외 기질을 완벽히 보존하는 것이라 할 수 있겠다.

양방향성 장력 검사에서 아무 처리하지 않은 신선한 소의 심낭과 비교하여 상용농도의 GA 고정을 하였을 때 장력이 통계적으로 유의하게 감소함을 관찰할 수 있었고, 고농도의 GA 고정을 하였을 때에는 장력의 감소 차이가 관찰되지 않았다. 이는 조직의 GA 고정으로 일반적인 두께의 증가로 인한 MPa 값의 감소와 또한 조직의 고정에 따른 위축에 의하여 상대적인 탄력성의 증가가 일어난다고 볼 수 있다. 고농도 GA로 고정을 하고 용매를 첨가하였을 때 기계적 장력의 손실이 적었던 것은 기존에 알려진 고농도의 GA처리 시 조직 자체의 무기질 침착을 덜하게 하여 조직의 빠른 표면 교차 결합을 더 좋게 하는 것들이 영향을 주었을 것이라고 판단된다.

상용농도 및 고농도 GA 고정 후 용매를 첨가하였을 때 고정 전 후의 장력은 통계적 차이는 없었으나 용매를 첨가할 때 약간 증가하는 경향을 보였다. 또한 에탄올처리 후 옥탄올, 옥타네디올을 첨가하였을 때 장력의 차이는 관찰되지 않았다. 하지만 옥탄올에 비해 옥타네디올에서 장력의 값이 약간 증가하는 경향은 볼 수 있었다. 부탄올 첨가시 장력의 값은 증가하는 경향을 보였으나 소 심낭의 두께가 많이 두꺼워져 심낭 고정에 사용하기에는 무리가 있을 것으로 생각된다. 온도에 따른 장력의 변화는 관찰되지 않았다.

아무 처리하지 않은 신선한 소의 심낭과 비교하여 GA 및 GA에 용매를 더했을 때 신장도는 모두 통계적으로 유의하게 늘어남을 알 수 있었다. 또한 용매 첨가 전, 후의 신장도를 비교하였을 때 용매 첨가 후 신장도가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적 차이는 관찰되지 않았다.

온도에 따른 신장도의 차이 역시 관찰되지 않았다.

무세포화 처리를 하였을 때 0.25% SDS를 사용한 용액에서 저장성 용액(Hypotonic solution)을 사용하였을 때 장력의 값이 감소하는 것을 알 수 있었고 고장성 용액(Hypertonic solution)을 사용하였을 때 장력의 값은 증가함을 알 수 있었다. 하지만 성시찬 등[15]이 발표한 무세포화가 잘되는 조건을 보면 SDS 처리 전 저장성 용액으로 처리하는 것이 무세포화에 매우 효과적이라고 발표하여 무세포화를 효과적으로 하면서 장력의 감소가 적은 방법의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 무세포화를 위해 고농도의 세정용매(0.5% SDS 사용군)를 사용했을 때 장력의 값이 낮게 됨을 알 수 있었다. 성시찬 등[15]은 0.5% SDS와 0.25% SDS의 무세포화 정도의 차이가 없다고 하였으나 SDS는 고유 조직 구조를 파괴하는 경향이 있어 glycoaminoglycan (GAG)의 감소나 콜라겐의 구조를 약화 시킬 수 있다고 알려져 있어[16] SDS 0.25% 농도 이상의 고농도 사용은 심각한 조직(matrix)의 손상을 유발하는 것으로 생각된다. 따라서 가능하면 저농도의 세정 용매를 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

SDS와 다른 세정제를 비교하였을 때 1% DOA에서 장력이 높은 경향을 보였고 2% DOA에서는 장력이 SDS보다 낮은 경향을 보이는 것으로 결과가 나왔다. 하지만 박전수 등[17]은 DOA는 세포의 제거는 잘 이루어지지만 특히 온도가 높아질수록 세포 외 조직의 손상이 심해지는 경향을 보인다고 하여 고농도의 DOA를 무세포화 용액으로 사용함에 주의를 요하겠다.

신장도 자체는 전반적으로 무세포화를 시행하였을 때 늘어나는 경향을 보였고 무세포화를 위해 사용한 세정용매가 고농도나 두 가지 이상의 용액을 첨가하였을 때 감소하였다.

항독성화 처리를 하였을 때 GA 고정, GA+용매, GA+용매+무세포화 후 장력 및 신장도의 차이는 관찰되지 않았고 항독성화 처리를 위해 사용된 Lysine 및 Glycine 사이의 장력 및 신장도 값의 차이는 통계학적 유의성이 없었다. 이를 통해 항독성화 처리를 해도 조직의 장력 및 신장도에 특별한 영향을 주지 않음을 알 수 있어 항독성화 및 석회화 방지를 위해 Lysine 및 Glycine 등의 아미노산 등의 사용이 도움이 될 것으로 판단된다.

무세포화 및 항독성화 실험 과정에서 실험 군의 수가 적어 완전한 결론을 내기에는 부족함이 있었다. 그리고 단기 실험이어서 장기적인 조직의 석회화 정도, 물리-기계적 장력 및 신장도의 변화를 알 수는 없었다. 앞으로 더

많은 수의 절편으로 소에게 생체 내 이식하여 장기적으로 연구할 필요가 있겠다. 또한 소의 심낭의 두께에 따른 오차를 줄이기 위해 여섯 방향으로 취해 실험을 시행하였고 보정 값을 사용하였지만 심낭 부분에 따른 두께의 차이 등을 완전히 보정할 수는 없었을 것이다. 이에 앞으로 좀 더 많은 수의 실험이 필요할 것이다.

결 론

소의 심낭을 이용하여 장력 및 신장도 검사를 시행하였을 때 상용농도의 GA 고정에서 장력이 감소하였다. 또한 용매 첨가 및 무세포화 시 고농도의 세정 용매의 사용, 장기간 저농도의 용액을 사용하지 않는다면 장력의 변화는 관찰되지 않았다. GA 고정 후 마지막 단계인 항독성화 처리를 하여도 장력의 변화는 관찰되지 않았다. 신장도는 용매 처리, 무세포화 처리를 하였을 때 늘어나는 경향을 보였고 항독성화 처리 시는 신장도에 영향이 없었던 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS. *Pericardial substitutes: delayed exploration and findings*. Ann Thorac Surg 1987;3:383-5.
2. Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N. *Technique for prevention of calcification of valvular bioprostheses*. Circulation 1984;70(Suppl I):165-8.
3. Nimmi ME. *The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis*. J Cardiac Surg 1988;3:523-33.
4. 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.
5. Sung HW, Hsu CS, Lee YS, Lin DS. *Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: effects of pH, temperature, and fixative concentration*. J Biomed Mater Res 1998;31:511-8.
6. Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, Oppell UO. *High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model*. Ann Thorac Surg 2000;70:2091-5.
7. 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.

8. 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.
9. Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, Oppell UO. *High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model.* Ann Thorac Surg 2000;70:2091-5.
10. 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;69:140-4.
11. 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.
12. 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.
13. Gratzner PF, Pereira GA, Lee JM. *Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials.* J Biomed Mater Res 1996;31:533-43.
14. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, Deruiter MC. *Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling.* J Thorac Cardiovasc Surg 2003;126: 2003-10.
15. Sung SC, Kim YJ, Choi SY, Park JE, Kim KW, Kim WH. *A study on an effective decellularization technique for a xenograft cardiac valve: the effect of osmotic treatment with hypotonic solution.* Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008; 41:679-86.
16. Wilcox HE, Korossis SA, Booth A, et al. *Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix.* J Heart Valve Dis 2005;14:228-37.
17. Park CS, Kim YJ, Sung SC, et al. *Study on an effective decellularization technique for cardiac valve, arterial wall and pericardium xenografts: optimization of decellularization.* Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:550-62.

=국문 초록=

배경: 심장 혈관계 수술에서 인공 조직 보철편은 주로 소나 돼지 판막, 심낭의 글루타알데하이드 고정 방법을 사용하고 있으나 중장기적으로 이식편의 석회화 및 물리-기계적인 결함이 문제시 되고 있다. 이 중 본 연구에서는 소의 심낭에 글루타알데하이드 고정, 용매, 무세포화, 항독성화 처리가 조직의 물리-기계적 장력 및 신장도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 아무런 처리를 하지 않은 신선한 소의 심낭과 여러 방법의 글루타알데하이드 고정 및 용매 첨가 그룹, 무세포화 그룹, 항독성화 처리 그룹 등으로 나누어 각 조직의 물리-기계적 장력 및 신장도 검사를 시행하였다. 심낭을 30도 각도로 달리하여 얻어낸 6가지 방향에 대하여 폭 5 mm에 대한 인장 강도를 구하여 장력을 측정하였고, 양방향으로 늘려 끊어지는 시점에서의 길이를 측정하여 늘어난 정도를 구하여 신장도를 측정하였다. **결과:** 1) 상용 농도의 글루타알데하이드 고정시 장력이 감소하며($n=83$, $MPa=11.47\pm 5.40$, $p=0.006$) 용매를 첨가하였을 때 장력의 변화는 관찰되지 않았다. 신장도는 글루타알데하이드 고정시 늘어났으며($n=83$, $strain (\%)=24.55\pm 9.81$, $p=0.00$), 용매 첨가시 신장도의 변화는 관찰되지 않았다. 2) 무세포화 처리시 대부분의 장력은 감소하는 경향을 보였으며($p>0.05$) 장기간 저농도 용액 처리, 고농도의 세정용매 처리시 장력의 감소가 통계적으로 유의했으며($p=0.01$, $p=0.00$), 신장도는 늘어나는 경향을 보였다. 3) 항독성화 처리 시 장력 및 신장도에 유의한 차이를 보이지 않았다. **결론:** 소의 심낭에 글루타알데하이드 고정, 용매, 항독성화 처리 후에는 장력 손실이 관찰되지 않으며 신장도는 증가하는 경향을 보였다. 무세포화에 따른 장력의 손실이 뚜렷하였으나 저 농도 세정제 사용과 고농도 용액처리를 보강한 무세포화 처리에서는 장력의 손실이 향상되었다. 계속해서 더 나은 이식 보철편 개발을 위한 다양한 용매의 연구 개발이 필요하다.

- 중심 단어 :**
1. 생체인공삼입물
 2. 기계적 결함
 3. 심낭
 4. 글루타알데하이드