

글루타르알데하이드 고정 소심낭막에서의 내피세포 증식에 대한 글루탐산 및 파라벤용액의 효과

김범식* · 이문환** · 유세영** · 김원곤***

=Abstract=

Effect of L-Glutamic Acid and Paraben Solution on the Endothelial Cell Proliferation in the Glutaraldehyde-Fixed Bovine Pericardium

Bum-Shik Kim, M. D.*, Moon-Hwan Lee, M. D.**, Se-Yeung Yoo, M. D.**, Won-Gon Kim, M. D.***

The conventional glutaraldehyde(GA) fixation method of tissue valves is considered to be responsible for accelerated valve degeneration. The release of toxic GA from the valve tissue is believed to limit endothelial cell(EC) ingrowth. Removal of toxic GA by reaction with L-glutamic acid and storage in a Paraben solution may offer good EC growth.

To investigate the conditions for endothelialization of tissue valves, the growth properties of ECs on the conventionally and alternatively treated pericardial tissue were compared. Conventional preparation included zero-pressure fixation for 72 hours in phosphated-buffered saline(PBS) solution containing 0.5% GA at 4°C and storage into PBS containing 0.2% GA(group I). Alternatively treated pericardial tissues were divided into three postfixation treatment groups; (1) storage in PBS solution containing Paraben(group II), (2) treatment with PBS containing 8% L-glutamic acid(PH 7.35) and storage in PBS solution containing Paraben(group III), (3) treatment with L-glutamic acid dissolved in distilled water(PH 3.5) (group IV). Pericardial tissue were transferred into the 24-well plate after storage for 4 weeks.

ECs were harvested enzymatically from the bovine pulmonary artery and grown to confluence on culture flask surfaces. Detached ECs by trypsin were incubated into the each well of the 24-well plate including test pericardial tissues. Cells were detached by trypsin, 1, 2, 3, 5, 7 days after incubation and counted on the hemacytometer. Cell viability test was performed by trypan-blue exclusion method.

Acute cell death in the group I were found even after prolonged washing. The group II showed prolonged cell survival compared with the group I. Both group III and group IV showed better cell growth than group II. There was no statistically significant difference between group III and group IV method in terms of EC growth.

* 분당 차병원 흉부외과

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, BunDang Cha-Hospital, Seoul, Korea

** 경희대학교 의과대학 흉부외과

** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Kyeong Hee University, Seoul, Korea

*** 서울대학교병원 흉부외과, 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

논문접수일: 95년 3월 8일 심사통과일: 95년 8월 23일

통신저자: 김원곤, (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, Tel. (02) 760-2346, Fax. (02) 764-3664

This results suggest that treatment by L-glutamic acid and storage in a Paraben solution be a promising approach for improvement of durability of GA-treated tissue valves.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996;29:7-13)

Key words : 1. bioprosthesis 2. Glutamate 3. Endothelial cell 4. Viability

서 론

인공심장판막의 임상 적용은 1960년대 초반 Harken 과¹⁾ Starr 가²⁾ 각각 대동맥판막과 승모판막을 caged ball valve 로 치환한 보고를 발표하면서 본격화 되기 시작하였다. 그 후 수십가지 종류의 각종 인공심장판막이 개발되어오는 과정에서, 어떤 인공판막들은 여러가지 단점때문에 개발 직후에 바로 사라지기도 하고 또 어떤 인공판막들은 그 우수성을 인정받아 오래동안 약간씩의 개선을 거치면서 지금까지 널리 사용되어 오고 있다. 그러나 아직 모든 조건을 완전히 충족할만한 이상적인 인공심장판막은 개발되지 못하고 있는 것도 사실이다³⁾. 인공판막중 기계판막은 그 내구성에 있어서 조직판막에 비해 월등히 우수한 장점이 있지만, 혈전색전증의 위험성이 높는데다 이를 예방하기 위해 항응고제를 일생동안 복용해야 하는 큰 단점이 있다. 조직판막은 반면 혈전색전증의 발생 가능성이 낮으며 따라서 항응고제의 사용으로 인한 부작용을 최소한으로 줄일 수 있다는 점에서 한때 많은 관심을 모았으나 내구성 측면에서의 취약점이 결정적인 한계로 지적되었다.

장기간 인체에 삽입된 후에 적출된 조직판막들의 표면을 현미경으로 관찰해 보면 내피세포화(endothelialization)가 거의 일어나지 않고 있는 것을 관찰할 수 있다^{4, 5)}. 이러한 내피세포화의 부재는 조직판막에서 석회화(calcification)의 중요 요인의 하나인 혈장의 과도한 침습을 초래하게 되고 이로 말미암아 판막조직의 변성을 조장할 수 있는 것으로 추정되고 있다⁶⁾. 따라서 조직판막의 표면에 미리 자가내피세포(autologous endothelial cell)를 부착시켜 주거나 또는 생체삽입후 자가내피세포가 판막표면에서 성장하는 것을 도와주는 방법이 있다면, 조직판막의 가장 큰 취약점인 내구성을 향상시키는 데에 크게 기여할 것이라는 추론이 가능하다.

내피세포를 파종하여 생체삽입용 인공장기의 혈액적합성을 개선시켜보려는 노력은 특히 소구경인공혈관(small-diameter vascular grafts) 분야에서 1970년대말 부터 활발한 연구가 진행되어⁷⁾ 최근에는 일부 임상시도가 시행되고 있다. 그러나 조직판막 같이 동물조직에서 유래된 재질을

사용하는 경우에는 조직의 처리 과정에 사용되는 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 고정액의 독성으로 인해 내피세포의 성장이 억제되는 것으로 알려져 있다^{8, 9)}. 따라서 조직판막 표면에 내피세포가 원활히 부착되기 위해서는 글루타르알데하이드로 인한 독성을 제거해주는 것이 선결 과제이다. 글루타르알데하이드로 처리된 조직판막의 독성은 글루타르알데하이드로부터 유리된 알데하이드기(aldehyde group) 때문인 것으로 알려져 있다. 한편 글루탐산(L-glutamic acid)은 결정성 이염기성 아미노산으로 단백질속에 널리 분포하는 물질로서, 화학적으로 글루타르알데하이드의 알데하이드기와 반응하여 알데하이드기를 제거할 수 있는 물질로 알려져 있다^{10, 11)}. 이에 따라 글루탐산으로 미리 조직판막을 처리하여 글루타르알데하이드의 독성을 중화시키고 이후 정균용액인 파라벤용액(Paraben solution)에 보관하여, 조직판막 표면에 내피세포가 원활하게 성장될 수 있도록 해보려는 연구가 일부에서 진행되고 있다^{10, 11)}.

본 실험에서는 이러한 연구보고 결과들을 자체 실험실의 조건에서 확인하고, 이를 바탕으로 조직판막의 내구성 향상을 위한 연구기초를 확립하는데 일차 목적이 있다. 이를 위해서 먼저 조직판막의 재질중의 하나로 사용되는 소의 심낭막을 채취한 후 글루타르알데하이드로 고정시키고 이를 글루탐산 및 파라벤용액으로 처리한 다음 내피세포를 파종시켜 각 실험군별 내피세포의 성장 정도를 비교분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 소 심낭막 채취 및 고정

먼저 서울시 보건환경연구원의 협조하에 도축장에서 소의 신선한 심낭막을 심장과 함께 채취하였다. 채취된 심낭막은 표면을 수술칼로 전체적으로 가볍게 긁어줌으로서 심낭막의 장막표면(serosal surface)에 존재하는 중피세포층(mesothelial cell layer)을 제거해 주었다. 그런뒤에 심낭막을 통상적인 무압력고정법 하에서 72시간 동안 0.5% 글루타르알데하이드를 함유한 인산염완 충식염수(phosphat-

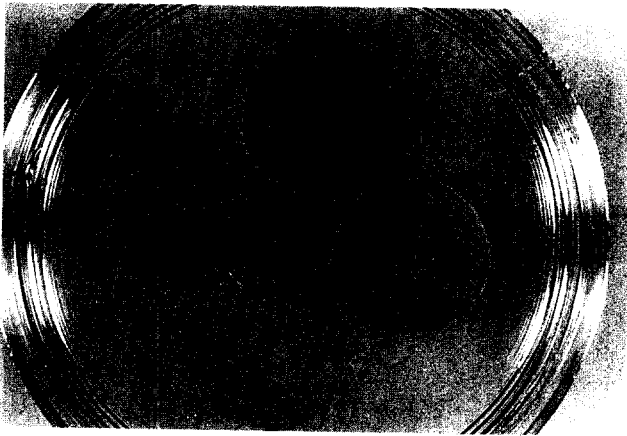


Fig. 1. Pericardial tissues after zero-pressure fixation for 72 hours in 0.5% glut araldehyde solution

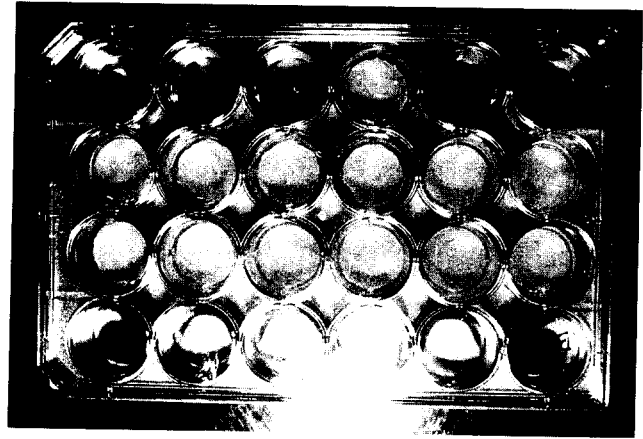


Fig. 2. 24-well culture plate containing containing pericardial tissues

ed buffered saline)에서 고정시켰다(pH 7.4, 4℃). 고정된 심낭막들은 배양 용기의 크기에 맞추어 각각 1.76cm²의 절편으로 자른 뒤에(Fig. 1) 실험군에 따라 각각 다음과 같은 고정후 처리(postfixation treatment)과정을 시행하였다.

2. 실험군에 따른 고정후 처리

1) 제 1 차 실험¹⁰⁾

(1) 실험대조군

심낭막의 절편 없이 배양용기에 바로 내피세포를 파종한 군으로 하였다.

(2) 제 1 실험군

글루타르알데하이드에서 72시간 고정된 심낭막 절편들을 0.25% 글루타르알데하이드를 포함한 인산염 완충식염수(pH 7.4, 4℃)에서 보관하였다.

(3) 제 2 실험군

글루타르알데하이드에 72시간 고정된 심낭막 절편을 1.76cm²당 생리식염수 20ml로 20분동안 25℃에서 세척후 파라벤용액(aqueous solution of 0.02% propyl- hydroxybenzoate and 0.18% methyl-hydroxy-benzoate)을 함유한 인산염완충식염수에 4주 동안 보관하였다(25℃).

(4) 제 3 실험군

글루타르알데하이드에 72시간 고정된 심낭막 절편을 제 2 실험군과 동일한 방법으로 세척하였다. 그런 뒤에 0.8% 글루탐산을 함유한 20ml의 인산염완충식염수에서 48시간 동안 보관하였다(PH 7.35, 25℃). 이후 생리식염수로 반복해서 세척한뒤 제 2실험군에서와 동일한 방법으로 파라벤용액에서 저장하였다.

(5) 제 4 실험군

글루타르알데하이드에 72시간 고정된 심낭막 절편을 처리할때 글루탐산을 인산염완충식염수 대신 증류수에 혼합하는 것외에는 제 3 실험군과 동일하게 처리하였다. 이때 글루탐산 용액의 PH는 3.5가 되었다.

2) 제 2 차 실험

제 1 차 실험에서 나온 결과를 토대로 심낭막편을 파라벤에 보관하였을때와 그렇지 않았을 때와의 효과를 비교하기 위하여, 제 1 차 실험에서와 똑같은 조건의 실험군들에서 파라벤 대신에 세포배양에 통상적으로 사용되는 페니실린과 스트렙토마이신의 혼합용액으로 심낭막 절편들을 보관하였다. 그런 뒤에 이들 각각의 절편에서 내피세포들의 성장을 비교 관찰하였다.

3. 내피세포 파종전 준비

각 실험군의 심낭막 절편들을 인산염완충식염수로 충분히 세척하여 과도한 보존액을 제거한뒤 24개의 구멍을 가진(24-well) 배양용기에 위치시켰다(Fig. 2). 배양용기내에서 심낭막 절편들은 장막(serosa)이 위로 오도록 위치시켰다. 실험의 신뢰도를 높이기 위해 각 실험군당 2개씩의 심낭막 절편(duplicate)들을 준비하였다. 각 절편들은 섭씨 37도에서 24시간동안 fetal bovine serum(FBS) 1ml 로 한번 코팅 시켰으며 FBS는 내피세포파종 직전에 제거하였다.

4. 내피세포 배양

소의 폐동맥으로부터 내피세포를 배양하였으며 그 방법

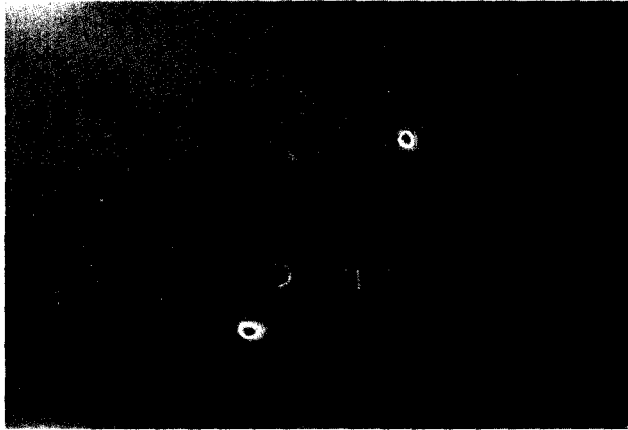


Fig. 3. Cell viability test(Trypan-blue exclusion test): Pead cells are dyed by trypan-blue in contrast with viable cells.

은 김원곤 등이 발표한 방법과¹²⁾ 동일한 방법을 사용하였다. 요약해서 설명하자면, 먼저 도축장에서 심낭막을 채취할때 소의 폐동맥을 함께 채취하였다. 폐동맥을 실험실로 운반한 뒤 collagenase(Wortington Biomedical Company, 192 unit/mg)에 의한 소화효소 분리법(enzymatic digestion)으로 폐동맥으로부터 내피세포부유액(endothelial cell suspension)을 수거하였다. 내피세포부유액은 원심분리 및 재부유(resuspension) 과정을 거쳐 폴리스티렌 세포배양플라스크에 옮기고, 이를 섭씨 37도, 90% 습도, 그리고 5% 이산화탄소의 조건하에서 항온배양을 하였다. 배양플라스크내에서 내피세포들이 완전한 세포 간 합류상태를 이루어 접촉성 성장억제(contact inhibition)가 일어나면 세포들을 계대배양(sub culture)시켰다. 배양된 세포는 면역형광기법에 의해 내피세포 여부를 확인하였다. 즉 내피세포내의 제 8 인자 연관항원에 대한 일차 항체(Immunotech, cat. # 0803)로 항원-항체 반응을 일으킨뒤 fluorescein isothiocyanate 표식 이차 항체로 처리하여 이를 형광현미경으로 관찰하였다.

5. 심낭막 절편에 내피세포 파종 및 파종후 내피세포수 측정

1) 내피세포 파종

이차 계대배양된 폐동맥 내피세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액으로 처리하여 날개의 세포들로 수확한 후 이들 세포들을 20%의 FBS와 인슐린(10 µg/ml)을 혼합한 M-199 세포배양액에 5×10^4 /ml의 농도로 부유시켰다. 그리고 이 부유액을 1.76cm² 짜리 심낭막 절편이 들어있는 각 용기에다 1ml씩 주입하였다.

2) 배양후 내피세포수 측정

내피세포가 파종된 용기들을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양하였다. 이때 배양액은 2일 마다 교체하였다. 내피세포파종후 1, 2, 3, 5, 7일째에 각 심낭막 절편들을 0.2% collagenase 에 담아 37°C 물통에서 30분간 두어 내피세포를 유리시켰다. 각 절편들로부터 유리된 내피세포들을 혈구계산판에 도말하여 전체 세포수를 측정하였다.

3) 내피세포의 생존율검사

유리된 내피세포들의 생존율검사는 trypan-blue dye exclusion 방법을 사용하였다. 즉 세포부 유액 100 µl와 0.4% trypan-blue 용액(Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 µl를 시험관내에서 잘 혼합시킨 다음, 5~15분 내에 혈구계산판에 도말하여 생존율을 판정하였다(Fig. 3).

6. 통계처리

내피세포 증식에 관한 통계적 유의성 검사는 각 실험군 별로 낱짜 별로 ANOVA의 비모수 통계인 Kruskal-Wallis test를 시행하였다. 그리고 세포생존율에 관한 유의성 검사는 Chi-square test를 시행하였다.

결 과

1. 내피세포 배양 및 확인

소의 폐동맥에서 분리 배양된 내피세포들은 배양 4~5일후에 단층의 합류상태(confluence)를 만들면서 전형적인 자갈돌 모양(cobblestone appearance)의 소견을 보였다. 각 세포들은 3~4개의 핵(nucleolus)을 함유한 한개의 난원형 핵을 가지고 있었다. 배양된 세포들을 면역형광기법에 의해 면역형광현미경으로 관찰한 결과 세포내에 현저한 형광성이 관찰되었다. 세포내의 형광성은 주로 세포질(cytoplasm)내에서 관찰되었으며 세포핵에서는 거의 관찰되지 않았다.

2. 실험군별 내피세포증식 및 생존율

1) 제 1 차 실험(Table 1)

모든 실험은 2회 반복되었다. 실험 결과 글루탐산이나 파라벤용액의 처리 없이 전통적인 방법으로 심막조직을 보관한 제 1 실험군에서는 배양 1일째부터 다른 실험군들에 비해 현저히 낮은 세포수를 보이다가 실험 5일째 부터는 전혀 세포가 관찰되지 않았다. 측정된 세포들을 대상으로 시행한 trypan-blue dye exclusion test 에서도 다른 실험군들에 비해 세포 생존율이 월등히 낮았다. 통계학적 유의성은 발견되지 않았지만 숫자상으로 제 3 실험군과 제 4 실험

Table 1. Number of Endothelial Cells and Viable Cell Percentage according to the Culture Period (the First Set of Experiment)

Group/ Period	1day	2day	3day	5day	7day
Control	5.70±0.424 [#] (94.3%)	1.08±0.028* (95.3%)	2.15±0.071* (94.3%)	1.99±0.120* (93.0%)	2.13±0.311* (92.9%)
Group 1	0.22±0.311 (16.7%)	0.20±0.032 (8.6%)	0.05±0.063 (2.4%)	0.00 (0.0%)	0.00 (0.0%)
Group 2	0.89±1.252 (66.7%)	0.85±0.126 (69.3%)	0.65±0.094 (61.7%)	2.62±1.194 (74.4%)	4.16±1.540 (73.5%)
Group 3	0.88±0.0 (77.3%)	1.42±0.629 (77.1%)	1.67±0.346 (67.3%)	6.09±1.194 (85.6%)	7.98±0.346 (83.1%)
Group 4	0.66±0.311 (72.0%)	1.82±0.126 (75.9%)	2.73±0.660 (70.6%)	6.55±0.032 (78.1%)	9.89±1.603 (79.0%)

Mean±Standard deviation

* No. of endothelial cell.×10⁴

() Viable cell percentage

험군에서 세포증식이 활발하게 관찰되었다. 생존세포율에 있어서는 제 3 실험군과 제 4 실험군에서 제 3 실험군의 1~2일, 제 4 실험군의 1~3일 사이를 제외하고는 배양 기간이 경과함에 따라 통계학적으로 유의한 차이가 발견되었다(p<0.001). 글루탐산 처리없이 파라벤용액만으로 심낭막 절편을 보관한 제 2 실험군에서도 제 3, 4 실험군에 비해서는 못하지만 제 1 실험군에 비해서는 좋은 내피세포증식 상태를 보였다(p<0.01).

2) 제 2 차 실험 (Table 2)

심낭막의 고정후 처리과정의 보관액으로서 파라벤용액 대신 페니실린과 스트렙토마이신 용액을 사용하고 나머지 과정은 전술한 제 1, 2, 3, 4 실험군과 똑같이 처리한 실험이었다. 전체적으로 유의한 세포 증식을 관찰할 수가 없었다. 더구나 배양 7 일후에 분리한 세포들의 생존율 검사에서는 약 19%의 생존율을 보인 제 4 실험군을 제외하고는 제 1, 2, 3 실험군에서는 모두 생존한 세포들을 전혀 관찰할 수가 없었다.

고찰

글루타르알데하이드는 교원성 생물질 (collagenous biomaterial)의 생물학적, 물리학적 성상을 조절하고 변형시키며 그 구조를 유지시켜 주는 작용으로 오래전부터 생물조직의 효과적인 보존을 위한 용도로 의학이나 가축산업 등에서 널리 사용되어 오고있는 물질이다^{13, 14}. 특히 글루타

Table 2. Number of Endothelial Cells and Viable Cell Percentage according to the Culture Period (the Second Set of Experiment)

Group/ Period	1day	2day	3day	7day
Group 1	1.50±0.1414 (56.7%)	2.95±0.2121 (3.6%)	1.95±0.1838 (1.2%)	3.99±1.2516 (0.0%)
Group 2	1.85±0.0707 (59.7%)	2.35±0.6364 (28.4%)	2.88±0.0000 (26.9%)	1.07±0.5020 (0.0%)
Group 3	1.75±0.2121 (69.2%)	2.50±0.4738 (68.2%)	3.45±0.0707 (26.6%)	0.75±0.4384 (0.0%)
Group 4	1.06±0.0849 (55.0%)	1.67±0.2192 (50.3%)	1.84±0.1556 (66.0%)	0.98±0.3182 (8.8%)

Mean±Standard deviation

* No. of endothelial cell.×10⁴

() Viable cell percentage

르알데하이드는 생물조직에서 유래된 심혈관계 인공삽입물에서 콜라겐 섬유를 화학적으로 교차결합시켜 분해를 막고 조직의 항원성을 억제시켜 주는 중요한 역할을 한다^{8, 15}. 이러한 이유 때문에 글루타르알데하이드는 현재 조직판막의 제조과정에서 가장 보편적으로 사용되는 보존액으로 자리잡고 있다.

조직판막의 보존에 사용되는 글루타르알데하이드는 그러나 조직과 교차결합시에 조직에 결합되지 않은 알데하이드기의 유리로 인한 독성 때문에 생체삽입후 자가내피세포의 부착에 큰 장애를 주는 것으로 알려져 있다^{9, 14, 16}. 유리된 알데하이드기는 조직판막 표면에 침착된 섬유단성 조직의 밑에서 축적되기 때문에 혈액과의 접촉에서도 희석이 잘 되지 않는다⁹. 이러한 글루타르알데하이드의 독성은 세포 성장에 대단히 치명적이어서 심지어 글루타르알데하이드로 처리된 조직판막을 세척한 용액도 내피세포의 성장을 억제할 수있는 것으로 보고되고 있다¹⁴. 생체삽입후 조직판막에서 이러한 글루타르알데하이드의 독성으로 인한 내피세포의 부재는 석회화의 중요한 요인의 하나인 혈장의 과도한 침습을 초래하게 되고 결국 이로 말미암아 판막조직의 변성을 조장할 수있는 것으로 추정되고 있다⁷. 따라서 조직판막의 이러한 문제점을 예방하기 위해서 글루타르알데하이드의 독성을 중화시킬 수있는 방법의 개발 필요성이 대두되고 있다.

글루탐산(L-glutamic acid)은 유리 (free) 글루타르알데하이드와 화학적으로 반응하여 이를 비활성화시킬 수 있는 물질로 알려져 있다. 글루탐산과 글루타르알데하이드 간의 정확한 반응기전은 아직 알려지지 않았지만 가장 가능

성이 있는 것으로는 유리 글루타르알데하이드 고분자
PH 의존성 탈중합(depolymerization)을 일으켜 결과적
으로 아세틸 및 에스테르 결합을 일으키는 것이 주된 작용일
것으로 보고있다¹⁰⁾. 그리고 파라벤은 0.02% propyl-
hydroxy-benzoate와 0.18% methyl-hydroxy-benzoate의 혼
합 정균용액으로 보통 방법으로 고정된 조직판막을 이 용
액에다 보관한뒤 사용 직전에 생리 식염수에 1분간 3번씩
세척하면 글루타르알데하이드에 의한 세포독성이 현저히
감소된다는 실험보고가 있다^{14, 17)}.

본 실험에서는 글루타르알데하이드의 독성에 대한 글루
탐산과 파라벤용액의 중화효과를 분석하기 위하여, 먼저
소의 심낭막을 통상적인 무압력고정법하에 72시간동안
(pH 7.4, 4°C), 0.5% 글루타르알데하이드를 함유한 인산염
완충식염수에서 고정시켰다. 소의 심낭막은 한때 국내에
서도 널리 사용되었던 조직판막인 Ionescu-Shiley 판막의
재질로 사용되었을 뿐아니라 Grabenw ger 등의 실험¹¹⁾에서
와 같이 본 실험의 재료로서도 우수한 대상으로 판단되어
이를 이용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 심낭막 조직의
고정법은 조직판막 고정에 보통 사용되는 방법이다. 즉 단
량체(monomer)의 글루타르알데하이드에 의해 교원섬
유(collagen fibril)를 교차결합시키는 기전으로 조직의 기
계학적 안정성을 증가시키며, 이러한 고정과정은 생리적
PH 7.4에서 시행됨으로서 중합체(polymer)를 이룬 글루타
르알데하이드의 상당한 부분이 조직내로 합병되는 것을
원활하게 해주는 것이다. 이렇게 형성된 글루타르알데하
이드의 중합체는 조금씩 분해되어 독성을 지닌 알데하이
드기를 계속해서 배출시키는 공급원이 된다¹⁶⁾. 글루타르알
데하이드에 의한 심막조직의 고정시간은 Schoen 등¹⁸⁾에
의하면 72시간내에 조직의 최대한 교차결합이 일어날 수
있기 때문에 본 실험에서도 조직과 결합되지 않은 글루타
르알데하이드를 최대한 제거할 목적으로 72시간 고정하는
방법을 선택하였다.

본 실험에서 내피세포를 얻기위한 공급원으로 이용한
소의 폐동맥은 공립 도축장에서 도축 직후 바로 무균상태
에서 비교적 손쉽게 획득할 수 있는 장점이 있다. 그리고
소의 혈관에서 채취한 내피세포들은 배양시 내피세포 성
장인자를 첨가하지 않더라도 세포증식이 잘 되는 장점도
크다. 실제 본 실험에서도 collagenase에 의한 효소분리 방
법으로 소의 폐동맥에서 채취된 내피세포들은 배양후 통
상 4~5일후에 단층을 이루는 상태에서 완전한 세포간의
합류가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.

각 실험군의 심낭막 절편에서 배양 1, 2, 3, 5, 7 일째에
세포수를 측정된 결과 제 1 실험군에서는 배양 1 일째부터

현저한 세포수의 감소를 보이면서 배양 5 일째 부터는 살
아있는 세포가 전무한 것을 관찰할 수 있었다. 이는 전통
적인 방법에 의해 처리된 심낭막에서는 독성 알데하이드
기가 유리되기 때문인 것으로 판단되었다. 세포배양지에
서 0.1 ppm 이상의 글루타르알데하이드가 있더라도 내피
세포 성장에 유의한 억제작용을 하며 1 ppm 이상에서는
배양 7일내에 세포들이 사망하며 그리고 5 ppm에서는 세
포들이 즉시 사망한다는 기존의 연구결과들을^{8, 9, 16)} 종합할
때 본실험의 제 1 실험군에서는 적어도 1 ppm 이상의 글
루타르알데하이드가 존재할 것으로 추정되었다. 글루탐산
처리 없이 파라벤용액 만을 보관액으로 사용한 제 2 실험
군에서는 제 1 실험군에 비해 향상된 세포증식과 생존율
이 관찰되었다. 이런 실험결과는 파라벤 대신 페니실린과
스트렙토마이신을 사용하여 심낭막 절편들을 보관한 제 2
차 실험군에서는 관찰되지 않았다. 그리고 똑같이 글루탐
산과 파라벤용액을 사용하였지만 글루탐산과 유리 알데하
이드와 반응하는 PH를 각각 변화시킨 제 3 실험군과 제 4
실험군에서는 비록 통계학적으로 유의한 차이는 증명되지
못하였지만 세포 숫자상으로는 제 4 실험군에서 좋은 결
과를 보였다. 세포증식에 관한 이러한 소견은 다른 연구결
과와 대체로 일치하는 소견이었다⁹⁾. 즉 제 3 실험군에 비
해 제 4 실험군에서 세포증식이 더 잘 일어나는 것은 이론
적으로 산성 PH 하에서 글루탐산으로 처리하면 단량체 알
데하이드의 형성을 용이하게하고 이 저분자 단량체는 고
분자의 중합체에 비해 조직내에 걸림이 덜하면서 보다 잘
세척될 수 있다는 것이다¹⁶⁾. 글루타르알데하이드의 독성
중화에 글루타민산 못지않게 파라벤용액이 중요한 역할을
한다는 것은 제 2차 실험군 전반에서 확인되었다. 심낭막
절편들을 파라벤용액 대신 페니실린과 스트렙토마이신용
액에서 보관한 실험 결과 배양 7일째에 제 4 실험군에서
약간의 세포생존율을 보인 것을 제외하고는 제 1, 2, 3 실험
군에서 모두 생존세포를 전혀 관찰할 수가 없었다. 파라
벤용액의 이러한 글루타르알데하이드 독성 중화효과는
Gendler 등의 보고와 일치하는 소견이었다¹⁴⁾. 향후 파라벤
용액의 글루타르알데하이드 독성 중화 기전에 관한 보다
구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

조직판막의 재질로도 사용될 수 있는 소의 심낭막 절편
들을 보통의 방법대로 글루타르알데하이드로 고정된 후
글루탐산 및 파라벤용액으로 처리하면 글루타르알데하
이드의 독성을 중화하여 생체삽입 후 자가내피세포의 성장

을 도모할 가능성이 크다는 실험결과를 얻었다. 이러한 연구결과는 장차 조직판막의 내구성 향상 연구에 기여할 수 있을 것으로 추정된다.

참고 문헌

1. Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S. *Partial and complete prostheses in aortic insufficiency*. J Thorac Cardiovasc Surg 1960;40:744-62
2. Starr A, Edwards ML. *Mitral replacement: clinical experience with a ball-valve prosthesis*. Ann Surg 1961;154:726-40
3. Whittlesy D, Geha AS. *Selection and complication of cardiac valvular prostheses*. In: Baue AE, Geha AS, Hammond, Laks H, Naunheim KS. *Glenn's Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 5th ed. Prentice-Hall International Inc. 1991;1719-28
4. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC. *Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves*. Am J Cardiol 1981;48:443-54
5. Riddle JM, Magilligan DJ, Stein PD. *Surface morphology of degenerated porcine bioprosthetic valves four to seven years following implantation*. J Thorac Cardiovasc Surg 1981;81:279-87
6. Sigot-Luizard MF, Domurado D, Sigot M, et al. *Cytocompatibility of albuminated polyester fabrics*. J Biomed Mater Res 1984;18:895-909
7. Herring M, Gardner A, Glover J. *A single-staged technique for seeding vascular graft with autogenous endothelium*. Surgery 1978;84:498-504
8. Wiebe D, Megerman J, L'Italien GJ, Abbott WA. *Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin*. J Vasc surg 1988;104:26-33
9. Eybl E, Griesmacher A, Grimm M, Wolner E. *Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells*. J Biomed Mater Res 1989;23:1355-65
10. Grimm M, Grabenw ger M, Ebyl E, et al. *Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment*. J Cardiac Surg 1992;7:58-64
11. Grabenw ger M, Grimm M, Ebyl E, et al. *Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve material*. J Cardiac Surg 1992;7:79-84
12. 김원곤, 광영태, 유세영. 소폐동맥 내피세포를 이용한 인조혈액 접촉표면의 혈액적합성. 대흉외지 1993;26:80-5
13. Rosenberg N, Thompson JE, Keshishian JM, Vander Werf BA. *The modified bovine arterial graft*. Arch Surg 1976;111:222-6
14. Gendler E, Gendler S, Nimni ME. *Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprostheses*. J Biomed Mater Res 1984;18:727-36
15. Oliver RF, Grant RA, Cox RW, Cooke A. *Effect of aldehyde crosslinking on human dermal implants in the rat*. Br J Exp Pathol 1980;61:544-51
16. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, et al. *Biological effects of residual glutaraldehyde-tanned collagen materials*. J Biomed Mater Res 1980;14:753-64
17. Nimni ME, Cheung D, Strates B, et al. *Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement*. J Biomed Mater Res 1987;21:741-71
18. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. *Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses*. Am J Pathol 1986;123:134-45
19. Grimm M, Ebyl E, Grabenw ger, et al. *Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102:195-201