

백서 피하에 이식된 우심낭편의 석회화 방지에 관한 연구 -MgCl₂ 효과-

안 재 호 *

=Abstract=

Calcium Mitigation in the Bovine Pericardial Tissue in the Rat Subcutaneous Implantation model - MgCl₂ Effect

Jae Ho Ahn, M.D. *

Bovine pericardial bioprosthesis treated with glutaraldehyde is one of the most popular prosthetic materials, but late calcific degeneration must be solved. According to the alleged hypothesis of this calcification mechanism the free aldehyde groups on the surface of the tissue treated with glutaraldehyde bind to the circulating free calcium and induce mineralization. For mitigating the calcific degeneration, I added MgCl₂ into the 0.625% glutaraldehyde solution to compete with calcium for binding to free aldehyde from the glutaraldehyde.

I prepared 60 pieces of square shaped bovine pericardia and fixed in the 0.625% glutaraldehyde solution as control group(group 1), and the other 60 pieces in the same glutaraldehyde solution with 4g/L MgCl₂ 6H₂O as the other group(group 2). After fixation for 1 month these were implanted into the bellies of 60 Sprague-Dawley rats subdermally and extracted on 1 month, 2 months, 3 months and 6 months later. With atomic absorption spectrophotometry I measured the deposited calcium amount with the following results; 1 month and 2 months after implantation I could not find any differences between two groups, but in the 3rd month calcium was 1.738 mg/g in group 1 and 0.786 mg/g in group 2 and in the 6th month calcium had risen to 3.102 mg/g in group 1 and 1.623 mg/g in group 2, which has statistical significance(p<0.05). This means magnesium shows meaningful calcium mitigation effects on subcutaneously implanted bovine pericardium in the rat models.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:451-5)

Key word : 1. Calcinosis
2. Heterograft
3. Glutaraldehyde

서 론

심혈관 외과의 수술례가 증가하면서 많은 복잡 심기형 및

재수술을 경험하게 됨에 따라, 심장 내 및 심낭 등의 결손 부위에 인공 이식편의 사용이 높아지고 또한 인공 조직 판막 및 혈관 대체물로 이중 이식편의 필요성이 많이 요구되

* 이화여자대학교 의과대학 흉부외과

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Medical College, Ewha Women's University

† 이 연구는 1996학년도 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의한 연구임

논문접수일 : 97년 11월 10일 심사통과일 : 98년 1월 20일

책임저자 : 안재호, (158-710) 서울특별시 양천구 목동 911-1. 이대목동병원 흉부외과. (Tel) 02-650-5151, (Fax) 02-649-4930

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

고 있다. 생체 적합성에서 볼 때 자가조직으로 이러한 결합 부를 복구시키는 것이 최적이라는 것에는 이론의 여지가 없으나 자가 조직을 이용할 수 있는 데는 공급에 제한이 있으므로 이의 대체제가 개발되어 Dacron, Teflon, polytetrafluoroethylene(PTFE) 등의 인공섬유 계통과 타 동물로 부터 획득하는 천연 재질 등이 현재 널리 이용되고 있으나 이들 모두 외국에서 개발하여 전량 수입에만 의존하고 있는 실정이다. 이에 연구자는 자체적으로 우심낭을 glutaraldehyde 용액에 처리한 보철편을 개발하여¹⁾ 임상에 적용하여 보았으나²⁾ 심한 석회화가 초기에 발생하여 중장기 수술성적이 만족치 못했던 것을 경험하여³⁾ 이 석회화의 방지 내지는 완화가 보철편을 이용한 심장 수술 후의 만족할 만한 장기 성적에 절대적으로 필요할 것으로 사료되어, 우심낭편을 마그네슘이 첨가된 glutaraldehyde 용액에 일정 기간 고정 보관하여 동물에 이식 후 석회화의 완화 효과를 기대하여 보았다. 이러한 시도의 배경은 glutaraldehyde 의 free aldehyde 기가 칼슘과 결합함으로써 시작되는 석회화의 과정을 칼슘 대신 마그네슘이 경쟁함으로써 석회화를 방지 내지는 완화할 것이라는 가정하에서⁴⁾ 시작 되었으며, 실험 동물로는 백서를 선택, 복부 피하에 이렇게 준비된 우심낭편을 이식하여 시간의 경과와 함께 석회화가 진행되는 것을 atomic absorption spectrophotometry로 칼슘을 정량함으로써 이 마그네슘 첨가 glutaraldehyde 용액의 석회화 완화 효과를 알아보고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 우심낭의 수집 및 준비

우심낭을 도살장에서 청결하게 채취하여 항생제로 1,000만 단위의 Penicillin(종근당제약, 한국)과 1 g의 streptomycin(종근당제약, 한국)을 섞은 1,000 ml 생리식염수 용액에 담아 냉장 상태로 실험실로 운반하여, ventilating hood에서 우심낭 주위의 조직을 깨끗이 박리한 후 1×1 cm 의 정방형의 우심낭편으로 만들어 생리식염수로 잘 씻은 후, 다음의 미리 준비된 대조군의 glutaraldehyde 용액(1군)과 비교군으로 마그네슘만이 더 첨가된 동일한 glutaraldehyde 용액(2군)에 각각 나누어 고정 보관하였다. 이런 상태로 실온에서 한달간 보관한 후 백서의 복부 피하에 이식하는데 사용하였다.

2. glutaraldehyde 용액의 준비

Glutaraldehyde(Sigma Co., U.S.A.)는 그 순도가 실험에 중요한 영향을 미칠 수 있으므로^{1,2,3)} 미국의 Sigma 사로부터 직접 수입하여 사용하였고, 그밖의 시약 들도 모두 Sigma 사의 제품을 이용하였다. 먼저 1군은 비교군으로 HEPES 완충액을 이용 pH를 7.4 전후로 맞춘 0.625% glutaraldehyde 용액을 제

Table 1. Composition of 0.625% glutaraldehyde solution

In 1L of distilled water:	
25% glutaraldehyde solution	26ml
MgCl ₂ 6H ₂ O	4g
NaCl	4.9g
HEPES	4.76g
pH is adjusted to 7.4 with NaOH	

조하여 위에서 준비한 우심낭편 60 조각을 담아 고정 1개월 보관하고(Table 1), 2군은 같은 용액에 MgCl₂·6H₂O 를 4g/l 첨가하여 고정액을 제조⁵⁾ 다른 우심낭편 60 조각을 담아 1개월 보관하였다.

3. 백서에의 피하 이식

60마리의 수컷 Sprague-Dawley 백서(생후 4주, 무게 150g 전후)를 준비하여 12~15mg/kg의 ketamin(유한양행, 한국)을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후, 양와위로 소동물 수술대에 고정시키고 복부의 털을 깨끗이 깎았다. Betadine 으로 수술창이 될 부위를 잘 닦은 후, 피부와 피하 조직을 정중 절개하고 양쪽으로 피하층을 박리하여 pocket 을 만든 다음, 위에서 준비된 1군과 2군의 우심낭편을 생리식염수에 15 분 이상 잘 세척하여 여분의 glutaraldehyde 를 제거한 후 각각 한 조각 씩 갈라서 심고 4-0 나 5-0 prolene 연속봉합으로 창상을 닫았다. 수술 직후와 다음날 항생제(cefalosporin 0.2g/마리)를 근주하여 감염을 예방하며 사육장에서 정상적으로 사육하였다. 이렇게 이식된 우심낭편을 이식 후 1개월, 2개월, 3개월 및 6개월 째에 각 15마리 씩 단위로 다시 수거하여 침착된 칼슘의 양을 정량하기 위해 준비하였다.

4. 칼슘의 정량

경추 탈골로 마비시킨 실험 백서를 다시 수술대에 양와위로 고정 시키고, 먼저의 수술창을 열어 우심낭편을 수거하였다. 이 수거된 우심낭편을 24 시간 이상 freeze drier(Labconco, U.S.A.)에서 냉동 건조 시킨 후 각각 조직의 무게를 재고, 2 ml Effendorf tube 에 담아 6N HCl 용액 1 ml 를 첨가 warm incubator에서 70℃ 정도로 가온하며 24 시간 이상 완전 용해 될 때 까지 기다린다. 이 조직 용액에 Lanthanum 용액(5% Lanthanum, 3N HCl, Sigma Co., U.S.A.)을 첨가하여 모두 2 ml 가 되도록 표준화한 후, 표준 칼슘 용액(in 0.5% Lanthanum, 0.6N HCl)을 이용 atomic absorption spectrophotometer(Perkin-Elmer, U.S.A.)로 칼슘을 정량하므로써 두군 간의 시간에 따른 석회화 정도를 객관화하였다.

Table 2. Deposited calcium after subcutaneously implanted bovine pericardium in this experimental rat. The group 1 as a control shows steadily increasing calcium deposition, but in magnesium treated group(group 2) the calcification is much mitigated with time elapsed.

(mean ± standard error, mg/g)

	1 month	2 months	3 months	6 months
group 1	0.321 ± 0.014	0.830 ± 0.084	1.738 ± 0.414	3.102 ± 1.067
group 2	0.285 ± 0.018	0.921 ± 0.121	0.786 ± 0.080	1.623 ± 0.601
p-value	0.105	0.236	0.010	0.026

5. 통계처리

칼슘은 우심낭의 단위 무게당 침착된 정도를 mg/g으로 평균 ± 표준오차로 표시하고, 양 군간의 통계적 차이는 repeated measured ANOVA 및 post-hoc test로 Turkey test를 이용하여 prism이라는 통계 software 를 통해 p<0.05를 의미있는 것으로 간주, 통계 처리하였다.

결 과

60마리의 백서 복부 피하에 우심낭편을 이식 후, 1 개월, 2 개월, 3 개월과 6 개월이 경과하였을 때 15 마리씩 이 이식편을 적출하여 칼슘을 정량한 결과 1 개월 및 2 개월 때에는 1군 0.32 mg/g, 0.83 mg/g, 2군 0.28 mg/g, 0.92 mg/g 으로 양군 간에 student t-test 상 유의한 차이가 없었으나, 3 개월 및 6 개월 때에는 1군이 1.74 mg/g, 3.10 mg/g, 2군 0.79 mg/g, 1.62 mg/g으로 p<0.05의 통계적 유의성을 보여 주며 2군에서 칼슘 침착의 증가 정도가 줄어들고 있음을 보여주고 있었다. 즉 1, 2 개월 경과한 초기에는 양군 간에 석회화의 차이는 없었으나, 시간이 경과하며 계속 석회화가 진행되었고, 3 개월 이상 지나면서 석회화의 정도가 차이를 나타내어 마그네슘염을 첨가한 군에서 통계적으로 유의하게 칼슘 침착의 정도가 완화되는 것을 알 수 있었다(Table 2)(Fig. 1).

고 찰

심장 수술의 증가에 따르는 보철편의 수요 증가가 계속되는 상황에서 인공 보철편인 Dacron, Teflon, polytetrafluoroethylene(PTFE) 등과 타 동물로부터 채취한 천연 재질 등 모두를 외국에서 개발하여 전량 수입에만 의존하고 있어 우리나라에서도 자체적으로 이에 상응하는 보철편의 개발이^{1,2)} 필요한 시점이다. 현재 사용되고 있는 이종이식 보철편은 우심낭, 마심낭 및 돈심낭, 돈대동맥 판막 등이 있으며 이들은 glutaraldehyde 에 고정 보관하여 비교적 손쉽게 이용할 수 있으나⁶⁾, 모두들 정도의 차이는 있지만 심장, 심낭 및 혈관 등

Calcium Deposition in the Bovine Pericardium

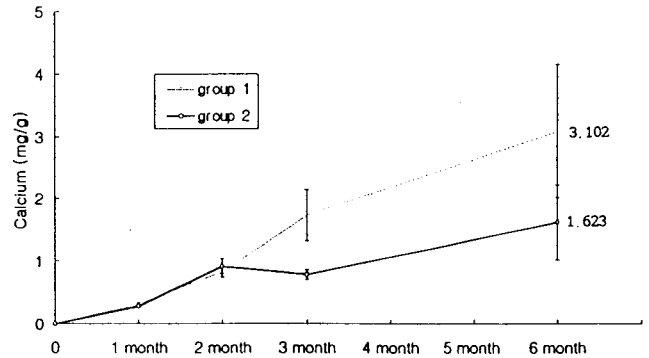


Fig. 1. On the 1st and the 2nd month after implantation there was no different calcium deposition between two groups, but on the 3rd and the 6th month the calcium deposition were 1.738mg/g and 3.102mg/g in group 1, and 0.786mg/g and 1.623mg/g in group 2, which had statistically significant differences (p<0.05). This shows meaningful calcium mitigation effects of magnesium salts.

인체에 이식했을 경우 석회화가 진행되면서⁷⁾ 환자의 증장기 수술성적에 나쁜 영향을 미치게 되어⁸⁾ 이에 대한 보완책이 문제점으로 남아 있다. 연구자가 만들어서 사용한 우심낭 조직 보철편에서도 이러한 석회화가 심하게 관찰되어^{1,2,3)} 이의 개선이 없이는 임상에서 안심하고 적용할 수 없는 실정이다.

이들 이종보철편의 이식 후 석회화의 기전으로는 조직과 결합한 glutaraldehyde 의 free aldehyde 기가 조직 및 혈중의 Ca²⁺ 과 결합함으로써 석회화가 시작, 진행되어가는 것이라고 생각하고 있는데⁴⁾, 이에 앞서 인산화 지방의 조직 내로의 유입이 또 하나의 석회화 전제 조건이 된다⁹⁾. 본 실험에서는 glutaraldehyde 의 free aldehyde 기가 Mg²⁺ 과 결합하도록 유도함으로써 Ca²⁺ 과 결합할 부위를 먼저 blocking 시키려는 목적으로 MgCl₂를 glutaraldehyde 용액에 첨가함으로써 석회화 완화 효과를 관찰하고자 하였다. 이때 실험동물로 생후 4주 정도의 Sprague-Dawley 백서를 사용하였는데, imbred 종을 이용하면 실험 결과에 더욱 객관성을 강화할 수 있었을 것으로 사료되며⁵⁾, 또한 석회화의 정도를 동물의 피하조직 층에서 관찰하였으나, 보다 실제 인체 이식 모델을 상정한다면 혈액과 직접 접촉하는 모델 즉 원통 구조로 제작하여 혈관에 이식하는 실험을 행하여야 할 것이다¹⁰⁾ 생각하며 후속 실험으로 그러한 방법을 준비 중이다. 이런 실험과 유사한 기본 idea 로 칼슘과의 결합을 방지하기 위해 3가의 철 이온에 chylating 시킨 후 glutaraldehyde 용액에 고정하는 법¹¹⁾, 마찬가지로 3가의 aluminum 이온을 이용하는 방법¹²⁾ 등에서도 본 실험과 비슷한 상당한 석회화의 완화 효과를 발표하고 있다.

이러한 Mg 염에 의한 완화효과와 더불어, 추가로 다양한

아미노산 등에 처리를 한다든가¹³⁾, 계면활성제로 전처리하는 방법⁹⁾ 등을 추가 하여 더욱 나은 석회화의 완화효과를 연구 하여 외국으로 부터 수입되는 상품화되어 있는 보철편보다 한결 우수한 결과를 얻을 수도 있을 것으로 기대되며, 계속해서 여러 가능성 있는 첨가제의 사용이나 세척액을 개발^{14,15,16)}, 임상에 적극 활용하마로서 수술 후 환자의 장기 예후가 호전될 수 있도록¹⁷⁾ 기대할 수 있겠고, 이들에 대한 수입 대체 효과 등도 극대화 할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

이상과 같은 결과를 종합하면 glutaraldehyde 용액에 이종 이식 보철편을 보존하는 것은 현재로서는 가장 안전하고 훌륭한 보존 방법이지만 석회화에 의한 변성으로 이식 후의 장기 성적이 만족스럽지 못하여, 이 석회화의 완화를 위해 glutaraldehyde에 마그네슘염을 첨가함으로써 이 마그네슘이 glutaraldehyde로 부터 유리되는 free aldehyde기와 미리 결합, 이식 후 조직 및 혈중의 칼슘과 결합하여 석회화를 초래하는 free aldehyde 기를 blocking 함으로서 석회화에 의한 변성을 줄여 이식 후 환자의 중장기 성적에 좋은 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. 안재호, 김용진. 소의 심낭을 이용한 이종이식 보철편의 개발(I). 대흉외지 1989;22:373-83.
2. 김기봉, 김용진, 노준량, 서경필. 소의 심낭을 이용한 이종이식 보철편의 개발(II). 대흉외지 1990;23:465-73.
3. 안재호, 노윤우, 이조한 등. 돼지를 이용한 대동맥 판막에서 자가 폐동맥 판막이식 및 우심실 유출로 형성술의 신술식 개발. 대흉외지 1996;29:822-7.
4. Nimni ME. The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis. J Card Surg 1988;3:523-33.
5. Carpentier SM, Monier MH, Shen M, Carpentier AF. Do donor or recipient species influence calcification of bioprosthetic tissues? Ann Thorac Surg 1995;60:S328-31.
6. Lio K, Seifert E, Hoffman D, Yellin EL, Frater RWM. Bovine pericardium versus porcine aortic valve: Comparison of tissue biological properties as prosthetic valves. Artif Organs 1992;16:361-5.
7. Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS. Pericardial substitutes: Delayed exploration and findings. Ann Thorac Surg 1987; 43: 383-5.
8. Liao K, Frater RWM, LaPietra A, et al. Time-dependent effect of Glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts. Ann Thorac Surg 1995;60: S343-7.
9. Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N. Technique for prevention of calcification of valvular bioprosthesis. Circulation 1984;70(Suppl I)I-165-8.
10. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts, allografts and xenografts in rats. J Vasc Surg 1994;19:446-56.
11. Carpentier SM, Carpentier AF, Chen L, et al. Calcium mitigation in bioprosthetic tissues by iron pretreatment: The challenge of iron leaching. Ann Thorac Surg 1995;60: S332-8.
12. Webb CL, Schoen FJ, Levy RJ. Al+++ preincubation inhibits calcification of bioprosthetic heart valve tissue in the rat subdermal model. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1988; 34:855-9.
13. 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.
14. Chandra J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: An experimental study in rat. Ann Thorac Surg 1995;60:S339-42.
15. Chandra J, Rao SB, Mohanty M, et al. Prevention of calcification of tissue valves. Artif organs 1994;18:752-7.
16. 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.
17. 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.

=국문초록=

심혈관계 수술 시 이용되는 조직판막 등 glutaraldehyde 에 보존한 이종보철편들은 석회화에 의한 변성으로 환자의 장기성적에 나쁜 영향을 주게 된다. 이에 연구자는 glutaraldehyde 용액에 Mg 염을 첨가, 자유 알데히드와 미리 결합하게 함으로서 조직 및 혈중의 칼슘과 반응하는 것을 막아 석회화를 완화하고자 시도하였다. 우심낭을 정방형 조각으로 만들어 60 조각의 우심낭편은 대조군으로 0.625% glutaraldehyde 용액에 보존하고 (1군), 60 조각은 MgCl₂·6H₂O 를 4g/L 첨가한 glutaraldehyde 용액에(2군) 각각 한달 간 보관하였다. 이들을 60 마리의 백서의 복부 피하에 각각 한 조각 씩 이식하여 1 개월, 2 개월, 3 개월 및 6 개월 째에 적출, spectrophotometry 로 이 우심낭편에 침착한 칼슘을 정량분석한 결과 1 개월 및 2 개월 째에는 두군 간의 석회화 정도에 차이가 없었으나, 3 개월에 1군 1.738 mg/g, 2군 0.786 mg/g, 6 개월에 1군 3.102 mg/g, 2군 1.623 mg/g으로 정량되어 p<0.05 의 통계적 차이가 관찰되고 있다. 즉 마그네슘염의 첨가로 중기 이상 시간이 경과함에 따라 피하에 이식된 보철편의 석회화가 완화 되었음을 알 수 있었다.

- 중심단어 : 1. glutaraldehyde
2. Mg 염
3. 이종 이식
4. 석회화