

PEO-SO₃를 이용한 항석회화 조직침포의 개발 (I)

- 잠견을 이용한 대동맥과 폐동맥 이식 실험연구 -

김 형 목* · 백 만 중* · 선 경** · 김 광 택* · 이 인 성*
김 학 제* · 이 원 규*** · 박 기 동***

=Abstract=

Development of Calcification-Resistant Bovine Pericardium with PEO-SO₃ (I)

- An implantation study of bovine pericardium at aorta and pulmonary artery in canine model -

Hyoung Mook Kim, M.D. *, Man Jong Baek, M.D. *, Kyung Sun, M.D. **, Kwang Taik Kim, M.D. *,
In Sung Lee, M.D. *, Hark Jei Kim, M.D. *, Won Kyu Lee, Ph.D. ***, Ki Dong Park, Ph.D. ***

Background: Calcific degeneration is unavoidable in either homo- or heterografts implanted in the human body. We have developed a calcification-resistant cardiovascular tissue patch using a novel technique of anticalcification. **Material and Method:** Fresh bovine pericardium was harvested at the slaughter house and transferred to the laboratory in Hank's solution. After trimming and fixing the pericardium, it was embedded in 4°C 0.65% glutaraldehyde for a week and then washed by phosphate-buffered saline(PBS) of pH 7.4. This prepared pericardium was then stored in 2.5% sulphonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃) solution for 2 days at room temperature and reversed by 4°C NaBH₄ solution for 16 hours. To evaluate the calcification-resistance of surface modified bovine pericardium with PEO-SO₃, either glutaraldehyde-treated(GA group, n=4) or PEO-SO₃-treated pericardial patch(PEO-SO₃ group, n=4) was implanted into adult mongrel dog to reconstruct the main pulmonary artery and the descending aorta using a partial clamp technique. After 1 month follow-up, the implanted patches were retrieved to evaluate the pathologic findings and the content of calcium and phosphorous. **Result:** The PEO-SO₃ group showed substantially less retraction and significantly less calcium deposition than the GA group in both aortic(7.10±1.05 vs. 13.81±2.33 mg/g of dried tissue) and pulmonary positions(1.55±0.29 vs. 6.72±0.70 mg/g)(p<0.01). Phosphorous contents were also less in the PEO-SO₃ group than the GA group significantly, 8.11±1.07 mg/g vs. 19.33±4.31 mg/g in the aortic and 2.58±0.40 vs. 12.60±3.40 mg/g in the

* 고려대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Korea University, College of Medicine

** 인하대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Inha University, College of Medicine

*** 한국과학기술원 고분자화학 연구소

Polymer Chemistry Laboratory, Korea Institute of Science and Technology

† 본 연구는 1996년 보건복지부 G7 의료공학 선도기술개발과제 지원비에 의해 연구되었음

‡ 본 연구는 1997년 제 29차 대한흉부외과학회 추계학술대회에서 구연되었음

논문접수일 : 98년 4월 16일 심사통과일 : 98년 6월 16일

책임저자 : 김형목, (136-705) 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 안암병원 흉부외과. (Tel) 02-920-5307, (Fax) 02-928-8793

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

pulmonary position(p<0.01). **Conclusion:** These findings suggest that PEO-SO₃ modified bovine pericardium is highly calcification-resistant but further study is needed to evaluate the long-term biological safety and compatibility of the prosthesis.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:919-23)

Key word : 1. Calcinosiis
2. Pericardial patch

서 론

생체조직으로 만든 첩포는 심혈관계 수술에서 다양한 용도로 사용되고 있다. 그 중 상용화되어 가장 많이 사용되는 것이 쇠 심막(bovine pericardium)으로 인공 심장판막이나 심혈관 재건용 첩포(patch) 등의 재료로 쓰이고 있다. 그러나 이종조직을 생체내 이식하면 여러 문제점들이 발생되며 특히 칼슘 침착으로 인한 석회화 변성으로 조직의 기능상의 내구성이 영구적이지 못하여 임상에서 재수술이 불가피하게 되는 등 그 사용이 제한된다¹⁾.

본 연구진은 독자적인 항석회화 기술을 이용하여 쇠 심막을 처리함으로써 석회화 변성을 억제 내지는 지연시키고, 더 나아가 항석회화 조직첩포의 국산화 가능성을 확인하기 위해 본 연구를 실시하였다. 실험 목표는 PEO-SO₃로 항석회화 처리한 조직첩포를 혈류에 노출시켰을 때 글루타르알데하이드로만 처리한 조직첩포에 비해 석회화 변성 정도가 낮다는 것을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

실험모델은 한국산 잡견을 이용하여 좌측 및 우측 혈류에 노출된 조직첩포의 동태를 관찰하기 위해 하행대동맥과 주폐동맥 혈관벽을 일부 절제한 후 조직첩포로 재건하였고(Fig. 1), 일정기간 후 적출하여 병리변화와 칼슘 및 인의 침착량을 비교하는 것으로 계획하였다(Table 1).

조직첩포의 제작을 위해 도축장에서 채취한 쇠 심막의 지방조직을 제거한 후 Hank용액에 처리하여 가용성 단백질을 제거하였다. 잔유 지방조직의 제거 후 적절한 크기로 절제한 심막을 4°C 0.65% glutaraldehyde (Sigma Chemical Co., USA) 용액에 일주일 동안 보관한 다음 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 이후 PBS에 녹인 2.5% 숄론산화 폴리에틸렌옥사이드 용액(PEO-SO₃, pH 11.0)(KIST, Korea)에 넣고 상온에서 2일 동안 교반시킨 다음, 최종적으로 0.01M NaBH₄로 4°C에서 16시간 동안 환원시켜 비교적 안정한 개질을 갖는 PEO-SO₃ 처리 조직첩포를 제작하였다. 제

작된 첩포는 특별한 소독은 하지 않은 채로 소독없이 이식 직전까지 0.2% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 보관하였다.

실험은 한국산 잡견(25~30 kg) 8마리를 대상으로 실험군(PEO-SO₃군)과 대조군(GA군)을 각각 4마리 씩 구분하였다. 모든 실험견은 동일 실험조건을 갖추기 위해 수술 7일 전부터 고려대 안암병원 동물실험실에서 전문관리인이 사육하였고, 수술일까지 청결상태를 유지하면서 실험 6시간 전부터 금식시켰다. 수술 당일 염산 케타민(유한양행, 한국) (1 mg/kg, 근육주사)으로 전처치한 후 전박정맥에 수액로를 확보하여 펜토탈 소듐(중외제약, 한국) (15 mg/kg, 정맥주사)로 마취를 유도하고 기관내 삽관하였다. 인공호흡은 수술기간 동안 Harvard respirator (Harvard apparatus, USA) (model #613)를 이용해 100% 산소를 흡기량 10 ml/kg, 호흡수 20회/분으로 투입하였다. 수술 중 마취유지에 필요할 경우는 펜토탈 100 mg을 추가로 정맥주사하였다. 감시장치는 심전도 모니터와 대퇴동맥 삽관을 통한 혈압을 지속하여 관찰하였다. 수술은 우측으로 눕힌 자세에서 좌측 흉부를 면도한 후 5분 늑간을 통해 흉강으로 진입하였다. 주폐동맥을 노출시키기 위해 횡격막신경 앞쪽의 심막을 종절개하였고, 하행 흉부 대동맥은 후종격막을 절개하여 좌측 쇄골하동맥 이하 부위를 노출시켰다. 헤파린 (한림제약, 한국) (1 mg/kg, 정맥주사)을 투여한 후 폐동맥, 대동맥의 순으로 혈관검자로 부분 차단한 상태에서 혈관벽을 2 cm 이상 종절개하고 혈관벽의 양단을 각각 0.5 cm 이상 절제해 낸 다음, 조직첩포를 2×2.5 cm 크기의 방추형으로 디자인하여 혈관벽을 재건하였다. 문합은 5-0 폴리프로필렌(Ethicon, U.S.A.) 봉합사를 이용해 연속봉합하였다. 문합이 끝난 후 혈관검자를 풀어 혈류를 재개한 다음 프로타민 (한국유나이티드, 한국)을 헤파린 투여량과 1:1로 주사하여 헤파린을 중화하였다. 문합부위의 출혈은 대부분 단순압박으로 해결되었다. 이후 폐가 완전히 확장된 것을 확인하고 배액관을 일시적으로 넣어 흉강 내 공기를 빼낸 다음 수술창을 봉합하였다. 감염예방을 위해 세팔로스포린계 항생제 1.0 g을 수술 직전과 직후에 한 번 투여하였고, 1일 째에는 2번씩 정맥주사로 이후 5일까지는 근육주사하였다. 대부분의 실험견이 수술 1일 째 음식섭취와 보행이

Table 1. Experimental protocols of anticalcification effects of PEO-SO₃.

1. Comparison of 2 groups
PEO-SO₃ treated after glutaraldehyde fixation(PEO-SO₃ group)
Glutaraldehyde treated(GA group)
2. Implantation at aorta & pulmonary artery (PA) for 4 wks & retrieval
3. Analysis of deposited amount of Ca, P & microscopic pathology

PEO-SO₃; sulphonated polyethyleneoxide

가능하였다. 수술 후 관찰기간은 13~50일로 평균 30일이었다. 최종관찰을 위해 실험견을 위에 언급한 방법과 동일하게 마취한 후 헤파린(1 mg/kg)을 정주한 다음 전신마취 상태에서 KCl(1 cc/kg)를 정맥주사하여 안락사시켰다. 이후 기왕의 수술창을 통해 개흉하여 조직첨포가 설치된 부위의 혈관벽을 넓게 절제해 내서 육안소견과 함께 조직병리검사 및 칼슘과 인의 정량분석을 위해 절제한 조직첨포를 매우 작은 조각들로 나누어 6N HCl로 산-가수분해시킨 다음 ICP (inductively coupled plasma, Plasmascan 710, Lattam Co. USA)로 정량 분석하여 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의성의 검정은 SPSS 7.0를 이용하여 T-test를 시행하여 P값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

이식된 조직첨포는 술전 2×2.5 cm 크기에서 실험군의 경우는 1.0×0.8 cm 크기로, 대조군의 경우는 0.8×0.6 cm 크기로 줄어들고 두꺼워져 있었다 (p=NS). 조직첨포의 칼슘 정량 분석 결과, 폐동맥에 이식한 실험군의 칼슘침착은 대조군의 약 1/5 정도였으며(1.55±0.29 vs. 6.72±0.70 mg/g, p<0.01) 폐동맥에 이식한 경우도 실험군이 대조군의 약 1/2 정도였다(7.10±1.05 vs. 13.81±2.33 mg/g, p<0.01) (Fig. 2). 인의 함량도 양쪽 모두 실험군이 대조군에 비해 현저히 적었다(폐동맥; 2.58±0.40 vs. 12.60±3.40 mg/g, 대동맥; 8.11±1.07 mg/g vs. 19.33±4.31 mg/g) (p<0.01) (Fig. 3).

두 군 모두 내부에 혈전은 보이지 않았으며, 봉합부위와 조직첨포의 내면은 혈관 내피세포로 구성된 내막층으로 덮여 있었다. 조직병리검사에서 염증소견, 첨포조직 변성도, 석회화 등의 소견은 대조군에서 현저하였다(Table 2, Fig. 4).



Fig. 1. Photographs of bovine pericardial patches implanted at pulmonary artery (upper, black arrow) and descending aorta(lower, black arrow).

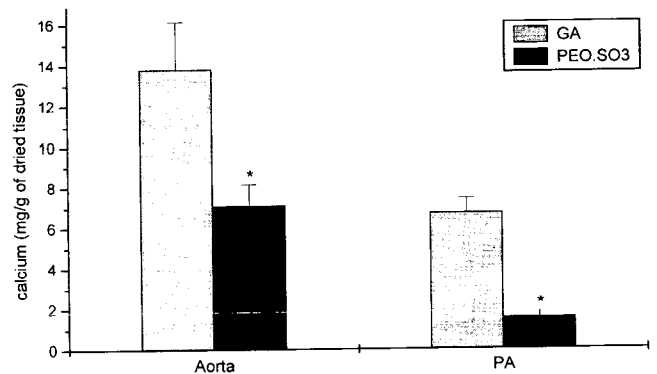


Fig. 2. Calcium content of tissue patches after 4 weeks of implantation(*p<.05).

GA; glutaraldehyde, PEO-SO₃; sulphonated polyethylene oxide, PA; pulmonary artery

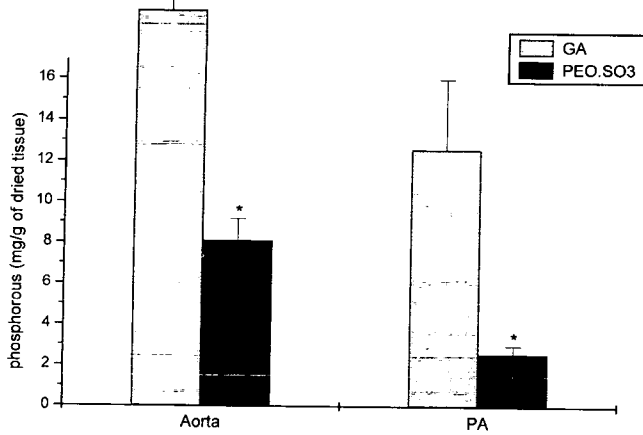


Fig. 3. Phosphorous content of tissue patches after 4 weeks of implantation(*p<.05). GA; glutaraldehyde, PEO-SO₃; sulphonated polyethylene oxide, PA; pulmonary artery

Table 2. Pathologic findings of patches implanted at arterial positions

	Aorta		PA	
	GA	PEO-SO ₃	GA	PEO-SO ₃
Neointima formation	++	++	++	++
Reendothelialization	++	++	++	++
Medial hypertrophy	+++	++	++	++
Inflammation	+++	+	++	+
Destruction of tissues	+++	++	++	+
Calcific degeneration	+++	++	++	-/+

PA; pulmonary artery, GA; glutaraldehyde, PEO-SO₃; sulphonated polyethylene oxide

고 찰

작금의 국내 의료현실은 급격하게 성장하는 국민소득과 보건의료에 대한 관심의 증대, 의료보험의 확대 등으로 의료에 대한 수요가 가속적으로 증가되고 있으며 공급되는 의료의 양과 질도 선진국과 비교하여 크게 뒤지지 않는다고 본다. 그러나 이에 비해 의료장비나 진료재료의 국산화 상황은 임상 실적의 외형에 어울리지 않게 매우 저조한 상태이다. 이는 값비싼 외국제품의 수입에 따른 경제적인 손실 외에도 제품개발과정에 얻어지는 독자적인 기술축적이나 국제사회에서의 경쟁력 손실이라는 측면에서도 문제가 된다고 본다.

본 연구의 의의는 기존의 특허와 중복되지 않는 독자적인 기술로 생체 조직의 항칼슘화 처리를 했다는 데에 있다. 또한 이미 PEO-SO₃로 항칼슘 처리된 조직세포의 in vitro 연구²⁾를 통해 열 안정성, 효소분해 저항성, 기계적 특성의 평가가 완료된 상태에서, 동물실험의 in vivo 연구를 통해 체내에 이

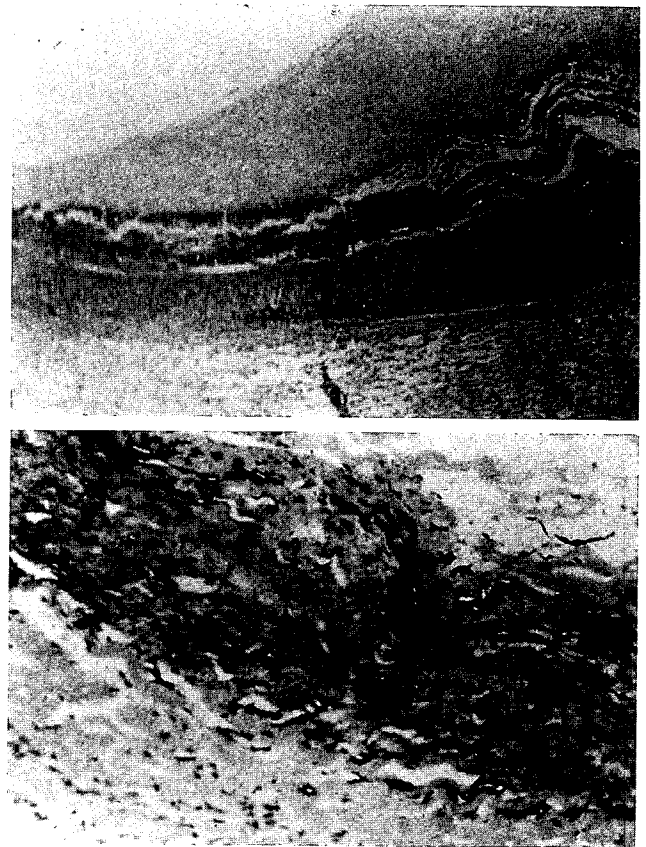


Fig. 4. Microscopic findings of bovine pericardial tissue patches in control group after 4 weeks of arterial implantation. Upper: Total layers of arterial wall including implanted patch show neointimal formation, destruction of tissue patch and outer infiltrations of inflammatory cells(H & E stain, ×40). Lower: There is marked calcific degeneration of tissue patch (H & E stain, ×200).

식된 조직세포의 단기간의 관찰에 있어서 안정성과 항칼슘성을 증명하였다는 점이다. 따라서 향후 항균성에 대한 추가 정보와 내구성에 대한 장기추적을 통해 그 안정성을 재확인하는 경우 곧 임상적용이 가능하리라 본다.

Glutaraldehyde(GA)는 알데하이드(aldehyde)기가 양쪽에 있는 분자구조를 가진다. 심낭을 GA용액으로 처리하면 알데히드기가 조직의 아미노(amino)기와 가교(cross-bridging)를 형성하는데, 이때 한쪽의 알데히드기만 조직과 결합하고 나머지 한쪽은 유리되는 상태가 된다. 이것을 phosphated buffered saline(PBS)로 세척한 후 PEO-SO₃ 용액에 넣고 상온에서 2일 동안 교반시키면 미반응 알데히드기가 PEO-SO₃와 반응하게 되고, 최종적으로 환원제인 NaBH₄로 환원시키면 안정한 결합을 갖는 최 심막 조직세포(BP-PEO-SO₃)가 완성된다²⁾.

결과적으로 본 실험에서 사용한 방법에 의해 최 심막 세포를 개질할 경우 조직사이의 space filling효과, 칼슘 침착인

자의 하나인 콜라겐의 카르복시기의 blocking, PEO-SO₃의 음이온 효과, PEO 분자구조 자체의 비점착성 및 유동성 등 여러 복합적인 작용으로 항석회화 특성이 조직점포에 부여되는 것으로 보인다³⁻⁵⁾.

본 연구진에 의해 개발된 항석회화 조직점포는 임상에서 심혈관계 수술을 포함하여 다양한 용도로 사용될 수 있으리라 생각되며, 보다 유의한 안정성 확보를 위해 염증 혹은 독성반응 여부, 조직성장 가능성에 대한 장기관찰이 요구된다.

결 론

저자들은 석회화에 내구성을 가진 심혈관용 조직점포를 개발하고자 새로운 항칼슘 처리법의 하나인 PEO-SO₃로 처리한 심막점포와 임상에서 많이 사용되는 글루타르알데하이드 용액으로만 처리한 심막점포를 성견의 주폐동맥과 대동맥에 이식 후 1개월 후에 조직병리 변화와 칼슘 및 인의 함량을 알아보았다.

1. PEO-SO₃로 처리한 조직점포가 글루타르알데하이드 용액으로만 처리한 조직점포에 비해 칼슘 및 인의 침착량이 현저하게 적었다.

2. 글루타르알데하이드 용액으로만 처리한 조직점포는 PEO-SO₃로 처리한 조직점포에 비해 조직 위축 변성 및 석회화로 인한 조직 파괴가 현저하였다.

3. 이상의 결과에서 PEO-SO₃로 처리한 조직점포는, 비록 1개월의 단기 관찰결과이지만, 충분한 석회화 내성을 보이며 이 조직점포의 장기적인 안정성과 적합성에 대해서는 계속적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Schoen FJ, Harasaki H, Kim K, et al. *Biomaterial-associated calcification: Pathology, mechanisms, and strategies for prevention.* J Biomed Mater Res 1988;22:11-36.
2. Park KD, Yun JY, Han DK, Kim YH, Kim HM, Kim KT. *Chemical modification of implantable biological tissue for anti-calcification.* ASAIO J 1994;40:M377-82.
3. Han DK, Jeong SY, Kim YH, et al. *Negative cilia concept for thromboresistance: synergistic effect of PEO and sulfonated groups grafted onto polyurethanes.* J Biomed Mater Res 1991;25:561-75.
4. Han DK, Park KD, Jeong SY, et al. *In vivo biostability and calcification-resistance of surface-modified PU-PEO-SO₃.* J Biomed Mater Res 1993;27:1063-73.
5. Han DK, Park KD, Jeong SY, et al. *In vivo canine studies of a sinkhole valve and vascular graft coated with biocompatible PU-PEO-SO₃.* ASAIO J 1993;39:537-41.

=국문초록=

배경: 인체에 이식된 동종 혹은 이종조직은 궁극적으로 석회화 변성이 일어난다. 저자들은 독자적인 항석회화 처리법을 이용해 석회화에 내구성을 가진 심혈관용 조직점포를 개발하였다. **대상 및 방법:** 도축장에서 채취한 신선한 소의 심막을 Hank 용액에 담아 실험실로 이송하였다. 불필요한 부분을 절제해 낸 심낭조직을 0.65% glutaraldehyde 용액(4℃)에 1주일 동안 저장한 다음 phosphate-buffered saline 용액(pH 7.4)로 세척하였다. 이후 2.5% 술폰산화 폴리에틸렌옥사이드(PEO-SO₃) 용액으로 실온에서 2일 동안 처리한 다음 4℃ NaBH₄ 용액으로 16시간 동안 환원시켰다. 실험은 글루타르알데하이드 용액으로만 처리한 심막점포와 항석회화 처리된 심막점포를 각각 대조군(GA군, n=4)과 실험군(PEO-SO₃군, n=4)으로 나누어 혈관벽에 이식하여 석회화 변성 정도를 비교하였다. 실험모델은 성견의 폐동맥과 대동맥 벽의 일부를 절제한 후 심막점포로 재건하는 방법을 이용하였고, 수술 후 평균 1개월 째에 이식된 점포를 적출하여 조직병리 변화와 칼슘 및 인 함량을 측정하였다. **결과:** 실험군이 대조군에 비해 조직 위축 변성, 칼슘(폐동맥; 1.55 ± 0.29 vs. 6.72 ± 0.70 mg/g, 대동맥; 7.10 ± 1.05 vs. 13.81 ± 2.33 mg/g) 및 인의 침착량(폐동맥; 2.58 ± 0.40 vs. 12.60 ± 3.40 mg/g, 대동맥; 8.11 ± 1.07 mg/g vs. 19.33 ± 4.31 mg/g)이 현저하게 적었다 (P<0.01). **결론:** 이상의 결과에서 PEO-SO₃로 처리한 조직점포는, 비록 단기관찰 결과이지만, 충분한 석회화 내성을 보이며 이 조직점포의 장기적인 안정성과 적합성에 대해서는 계속적인 연구가 필요할 것이다.

중심단어: 1. 항석회화
2. 술폰산화 폴리에틸렌 옥사이드, PEO-SO₃
3. 쇠 심낭