

흰쥐에서 RGDS tetrapeptide가 소 심낭 이식절편의 피하이식 후 석회화에 미치는 영향

진 응* · 이 주 현* · 김 치 경* · 이 선 희*

= Abstract =

The Effects of RGDS Tetrapeptide on the Calcification of the Bovine Pericardium Transplanted Subcutaneously in Rats

Ung Jin, M.D.*, Ju Hyeon Lee, M.D.*, Chi Kyung Kim, M.D.*, Sun Hee Lee, M.D.*

Background: All kinds of tissue valves must be pretreated for the inactivation of immunologic properties and the strengthening of tissue before implantation. However, the tissue valves are gradually denatured with the calcification process and they eventually lose their functions. Recent reports have shown the existence of specific calcium binding non collagenous proteins in the calcified area of implanted biomaterials. This experiment was intended to confirm the effect of pretreatment with RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser) tetrapeptide on the calcification of subcutaneously implanted bovine pericardium in rats. RGDS tetrapeptide has the same amino acid sequence of attachment site of specific calcium binding non collagenous proteins. **Material and Method:** All bovine pericardial pieces were fixed with 0.6% glutaraldehyde. The pretreatments were done using 5 different methods, group I ; with normal saline for 60 minutes, group II ; with 0.5% GRSD(Gly-Arg-Ser-Asp) tetrapeptide solution for 60 minutes, group III ; with 0.5% RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser) tetrapeptide for 30 minutes, group IV ; with 0.5% RGDS for 60 minutes, and group V ; with 0.5% RGDS for 120 minutes. The pretreated bovine pericardial pieces were implanted subcutaneously at the abdominal sites of rats. 30 days after the implantation, the implanted bovine pericardial tissues were examined radiologically, biochemically, and histologically to measure the severity of calcification. **Result:** On the radiological examination, group I ; 68.42 ± 3.06 , group II ; 64.25 ± 5.58 showed significant difference with group III ; 48.00 ± 3.57 , group IV ; 43.67 ± 2.31 , and group V ; 42.58 ± 2.47 ($p < 0.05$). There was no difference between group I and II($p = 0.105$). On the biochemical examination, the amount of calcium in group I was ; 33.09 ± 6.59 mg, in group II ; 28.12 ± 5.50 mg, in group III ; 25.42 ± 7.67 mg, in group IV ; 20.51 ± 5.11 mg, and in group V ; 15.43 ± 4.25 mg. The group V showed significant difference with group I, II,

*가톨릭대학교 의과대학 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The Catholic University of Korea

† 2001년 대한 흉부외과학회 추계학술대회에서 포스터 구연됨.

‡ 본 논문은 가톨릭대학 성바오로병원 연구비의 보조로 이루어졌음.

논문접수일 : 2001년 11월 10일 심사통과일 : 2001년 12월 8일

책임저자 : 진 응(150-010) 서울특별시 동대문구 전농동 620-56, 성바오로 병원 흉부외과. (Tel) 02-958-2491, (Fax) 02-958-2477

E-mail:humerus@sph.cuk.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

III(p<0.05). There was no difference between I and II(p=0.388). On the histological examination, group I and II showed remarkable calcifications, and group III and IV showed minimal calcifications. However, no definite calcification was shown in group V. **Conclusion:** These results showed that the pretreatment with RGDS tetrapeptide had a decreasing effect on the calcification of bovine pericardium implanted subcutaneously in rats.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:94-101)

Key words: 1. Calcification
2. Bioprosthesis

서 론

심장판막질환에서 사용되는 조직판막은 혈액학적 성능이 정상 판막과 유사하며, 혈전발생의 위험이 낮아 항응고제의 복용에 따른 뇌출혈 등의 합병증을 피할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이런 조직판막은 사체 기증자에서 획득하거나, 돼지의 심장에서 획득한 판막 혹은 소 심낭을 이용하여 제작한다. 모든 조직판막은 이식 전에 면역학적으로 불활성화 되어야 하며, 사실상 세포의 기능을 상실한 사조직이라는 면에서 그 내구성을 보강시키기 위한 처치가 필요하다. 1960년대 초에는 포르말데하이드를 이식판막의 고정액으로 사용하였으나, 초기에 판막부전을 보이는 소견이 있어 이후에는 글루타알데하이드를 사용하여 고정을 하게 되었다¹⁾. 그러나 이렇게 내구성을 강화 시키기 위하여 글루타알데하이드로 처리한 이식조직은 시간이 지남에 따라 석회화가 진행되면서 그 기능을 상실하는 것으로 밝혀졌다^{2,3)}. 이와 같은 석회화로 인한 이식조직의 기능상실을 막기 위하여, 이식조직의 석회화 과정을 억제하기 위한 연구는 꾸준히 진행되어 왔다. 이러한 연구는 대부분 고정액의 조성을 변화 시키거나, 이식 직전 다른 화합물의 처리를 통하여 글루타알데하이드의 불포화기를 포화 시키거나 조직에 결합되어 있지 않는 글루타알데하이드를 세척 함으로서 석회화 과정을 억제하려 하였다^{4,5,6)}.

최근 이식조직의 석회화 기전에 관한 연구에서, Gura 등 (1997)은 정상적인 골성석회화 과정에 관여하는 여러 종류의 결합단백이 석회화 된 이식절편에서 검출되는 것을 확인하였다⁷⁾. 그러나 석회화 관련 결합단백이 이식절편의 석회화를 유발하는 과정 중에 결합하는지, 혹은 석회화가 진행된 뒤에 결과적으로 결합하는지는 아직 정확히 알려지지 않고 있다. 만약 정상 골성석회화 관련 결합단백이 이식절편의 석회화 과정에 직접적으로 관여한다는 것을 확인할 수 있다면, 이러한 결합단백의 결합을 억제함으로써 이식절편의 석회화를 줄일 수 있다고 사료된다.

본 연구는 석회화 관련 결합단백의 공통결합부인 RGD

(Arg-Gly-Asp)가 포함된 RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser) tetrapeptide로 이식절편을 처리하여 석회화 관련 결합단백의 결합을 억제하는 것이 이식 후 석회화를 감소시킬 수 있는가를 확인하기 위하여 시행하였다.

대상 및 방법

임상에서 흔하게 사용되는 조직판막의 재료인 소 심낭을 이용하였으며, 공여 개체에 따른 이식 후 반응의 편차를 최소화하기 위하여, 한 개체에서 획득한 심낭절편을 사용하였다. 본 실험에서 이용한 RGDS tetrapeptide(synthesized & 95% purified, Peptron, Korea)는 이식 조직에 석회화 관련 결합단백이 결합하는 것을 억제하기 위하여 이용되었으나, RGDS tetrapeptide가 단순히 이식절편의 칼슘 침착 가능 부위를 덮어 석회화를 억제할 가능성도 고려하여야 한다. 이런 이유로 동일한 분자크기를 갖는 GRSD(Gly-Arg-Ser-Asp) tetrapeptide (synthesized & 95% purified, Peptron)를 처리한 군을 함께 실험하여 조직표면의 포화에 의한 석회화의 억제 가능성을 보정 하였다.

1. 0.6% 글루타알데하이드를 이용한 소 심낭절편의 고정

8% 글루타알데하이드 용액(Sigma, USA)과 생리식염수를 섞어 0.6% 글루타알데하이드 용액을 준비하였다. 이식절편으로 사용한 소 심낭은 일반 도축장에서 구하여, 지방조직 및 결체조직을 깨끗이 제거한 다음 보관용기에 적당한 크기로 잘라 놓았다. 편편한 보관용기에 준비된 소 심낭절편을 펼쳐 놓은 후 0.6% 글루타알데하이드를 소 심낭절편이 충분히 고정될 수 있도록 붓고 4℃ 냉장고에 24시간 보관하였다.

2. 이식에 적절한 형태로 소 심낭절편을 준비

24시간 고정된 소 심낭절편을 꺼내어 3회에 걸쳐 충분한 양의 생리식염수에서 2분씩 흔들어서 씻어 내었다. 이후 소독된 비닐 판에 펼쳐 놓은 후 그 위에 같은 비닐 판을 덮고 윗

직이지 않도록 고정하였다. 소독된 문구용 펀치를 이용하여 소 심낭절편을 7×5×1 mm 타원형의 동일한 크기로 잘라낸 후, 양측의 비닐 판을 제거하고 소 심낭 조각을 20개씩 분류하여 각 군에 따라 준비된 처치 용액에 담가 놓았다.

3. 이식 전 소 심낭절편의 처치 용액

처치 용액의 농도는 아미노산으로 이식절편을 처리하는 경우와 같이 0.5%를 이용하였으며⁸⁾, 이식절편은 실온에서 처치용액에 담가 두었다.

- 1군 : 준비된 심낭절편을 생리식염수에 60분간 담가 놓는다.
- 2군 : GRSD 0.5%(GRSD tetrapeptide 15 mg + 생리식염수 3 cc) 용액에 60분간 담가 놓는다
- 3군 : RGDS 0.5%(RGDS tetrapeptide 15 mg + 생리식염수 3 cc) 용액에 30분 담가 놓는다.
- 4군 : RGDS 0.5% 용액에 60분간 담가 놓는다.
- 5군 : RGDS 0.5% 용액에 120분간 담가 놓는다.

4. 이식

몸무게 400g 전후의 Sprague-Dawley계 흰쥐 10마리를 케타민 35 mg/Kg을 근주하여 마취 후, 양와위로 사지를 고정하였다. 각 군별로 처치 용액에 담가 놓았던 심낭절편을 생리식염수로 씻어낸 후, 흰쥐의 복부 좌상 측에 1 군을 이식하는 것부터 시작하여 동일한 간격으로 5 곳의 피부를 절개하여, 순서대로 각 군의 이식절편 2개씩을 피하 층에 이식하였다 (Fig. 1). 이때 이식위치에 따른 편차를 없애기 위하여 2마리 마다 각 군의 이식위치를 바꾸어 이식하였다.

5. 사육

복부 피하에 소 심낭을 이식 받은 흰쥐의 칼슘 섭취량을 늘리기 위하여, 달걀껍질을 섞은 사료를 공급하며 30일 동안 사육하였다.

6. 이식절편의 획득 및 보관

이식 후 30일이 된 흰쥐는 마취 후 각 이식부위에서 한 쌍의 이식절편을 꺼내어 반듯이 편 다음, 하나는 액화 질소에 담가 순간 냉동 시켰으며 다른 하나는 10% 포르말린에 담가 저장하였다. 순간냉동 시킨 조직은 영하 70℃에서 보관하고, 포르말린에 담긴 조직은 실온에서 보관하였다.

7. 소 심낭절편의 석회화 측정

1) 방사선학적 검사

포르말린에 보관한 이식절편을 각 군별로 비닐 판에 배열한 후, 유방촬영용 필름에 방사선 촬영을 하였다. 이렇게 촬

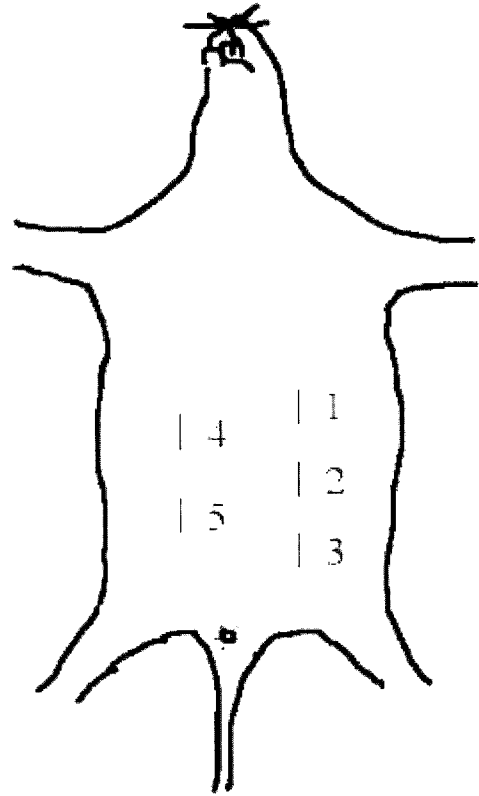


Fig. 1. The sites of implantations.
The implantation sites were changed at every 2 rats.

영된 영상을 디지털이미지로 전환 후, 255 단계의 음영도 측정이 가능한 프로그램(shareware, JascPaintshop pro v7.0, JascSoftware, USA)을 이용하여 각 조직음영의 밝기를 측정하고, 석회화의 정도를 평가하였다. 방사선 촬영에 사용되었던 조직은 고정하여 조직학적 검사를 시행하였다.

2) 생화학적 검사

조직 내 수분함량에 따른 오차를 최소화하기 위하여 냉동 상태의 각 조직을 용기 채로 냉동건조기(freezer dryer FD-ULT-3, Thermovact Co., USA)에서 냉동 건조 한 후 각 조직의 중량을 측정하였다. 다음 각 조직 용기에 6 N의 염산을 1 cc 씩 첨가하여 24시간 동안 상온에 놓아 조직을 용해시킨 후 조직 분쇄기를 이용하여 모든 조직을 분쇄하였다. 이후 이들 용기를 실온에서 12000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상층 액을 분리하여 315 nm 파장에서 spectrophotometer (Ultraspec 3000, Pharmaco Biotech, England)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정된 흡광도는 기준 값에 따라 칼슘이온의 농도로 환산되었으며 이를 조직의 무게로 나누어 조직 내 칼슘이온의 농도를 계산하였다⁹⁾.

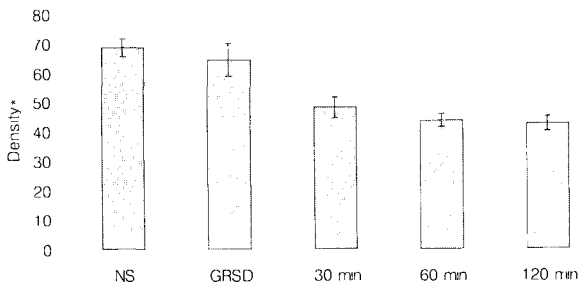


Fig. 2. Densities on X-ray examination of the bovine pericardial grafts implanted subcutaneously in rats for 30 days.

NS, pre-treatment with normal saline; GRSD, pre-treatment with GRSD solution; 30 min, pre-treatment with RGDS solution for 30 minutes; 60 min, pre-treatment with RGDS solution for 60 minutes; 120 min, pre-treatment with RGDS solution for 120 minutes; *, The density is graded from 0(black) to 255(white).

3) 조직학적 검사

방사선 촬영이 끝난 조직은 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후 40배율 하에서 석회화 정도를 확인하였다.

8. 통계처리

모든 가능한 자료는 평균±표준편차의 양식으로 기술하였다. 각 군사이의 통계적 유의성은 통계프로그램(SPSS for windows Ver. 8.0, SPSS, USA)을 사용하여 ANOVA와 Kruskal-Wallis test를 실행하였으며, Scheffe's test 로 사후 검정하였다. 유의수준은 P<0.05로 하였다.

결 과

1) 방사선학적 검사

각 군의 평균 음영도는 RGDS를 사용하지 않은 1, 2 군(68.42 ± 3.06, 64.25 ± 5.58)과 RGDS를 사용한 3, 4, 5군(48.00 ± 3.57, 43.67 ± 2.31, 42.58 ± 2.47)간에 유의한 차이를 보이고 있었다(p<0.05), (Fig. 2). 그러나 생리식염수로 처치한 1군과 GRSD를 사용한 2군간의 차이는 통계학적 의의를 보이지 않았다(p = 0.105). RGDS를 사용하였던 3, 4, 5군간에는 3군이 5군에 비하여 유의하게 음영도가 증가된 소견을 보였으며(p<0.05), 4군보다 5군이 음영도가 낮았으나 통계적 차이는 없었다(p=0.968).

2) 생화학적 검사

각 이식절편의 평균 칼슘이온 농도는 편차가 심해 모든 군 사이에서 통계적인 차이를 확인할 수 없었다(p>0.05). 다

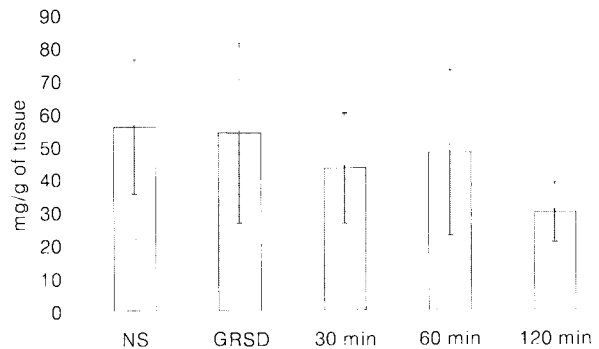


Fig. 3. Calcium concentrations of the bovine pericardial grafts implanted subcutaneously in rats for 30 days.

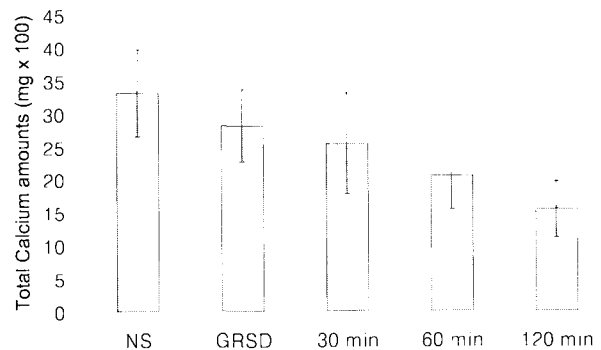
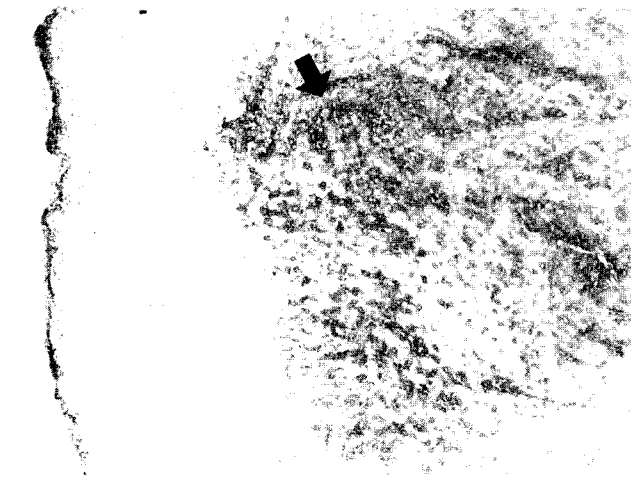


Fig. 4. The total amounts of calcium of bovine pericardial grafts implanted subcutaneously in rats for 30 days.

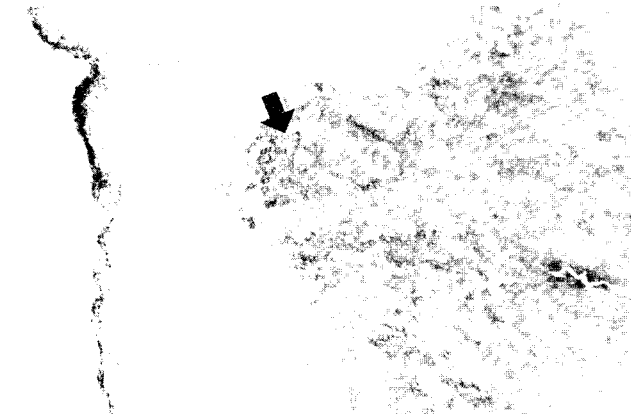
만 5군이 29.50 ± 9.00 mg/g으로 가장 적은 값을 보였으며 그 다음 3군 43.00 ± 16.64 mg/g, 4군 47.55 ± 25.13 mg/g, 2군 53.86 ± 23.27 mg/g, 1군 55.75 ± 20.53 mg/g의 순서로 농도가 높아지는 양상을 나타냈다(Fig. 3). 그러나 각 이식절편의 칼슘 총량은 1군 33.09 ± 6.59 mg, 2군 28.12 ± 5.50 mg, 3군 25.42 ± 7.67 mg, 4군 20.51 ± 5.11 mg, 5군 15.43 ± 4.25 mg을 보여, 5군이 1, 2, 3군에 비하여 통계적으로 유의하게 석회화 정도가 감소되어 있었다(p<0.05). 1군과 2군간에 유의한 차이는 없었으며(p=0.388), 4, 5군간에도 통계적 차이는 확인할 수 없었다(p=0.366), (Fig. 4).

3) 조직학적 검사

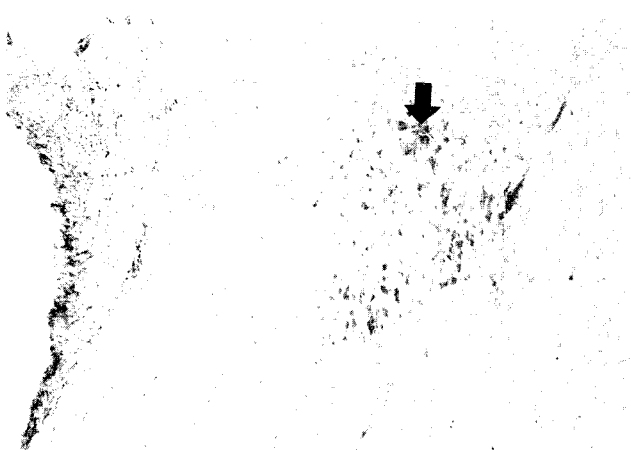
1, 2, 3, 4군에서 석회화가 보였으며, 모든 이식절편에서 석회화는 이식절편의 중심부에 위치하고 있었다(Fig. 5). 5군에서는 뚜렷한 석회화는 보이지 않았다. 석회화를 보인 1, 2, 3, 4군에서는 3, 4군의 석회화 정도가 경미하여 1군 및 2군과 차이를 보였다.



NS



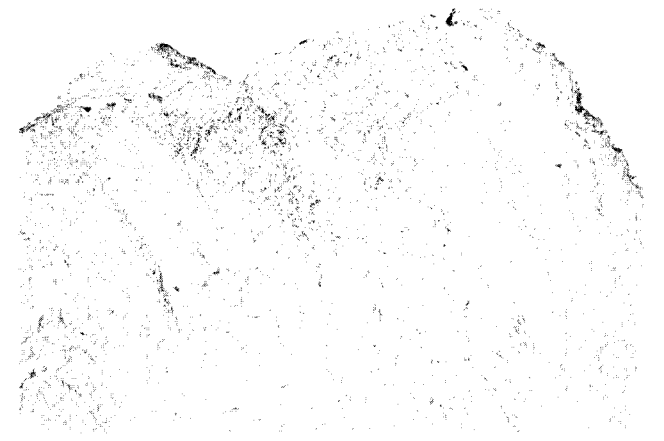
GRSD



30 min



60 min



120 min

Fig. 5. Microphotographs of the grafted bovine pericardial pieces 30 days after the subcutaneous implantation in rats(H & E stain, ×40).

Black arrows indicate the calcified areas.

NS, GRSD ; There are heavily calcified areas.

30 min, 60 min ; There are minimally calcified areas.

120 min ; There is no definite calcification.

고 찰

최근 이식조직 석회화의 병리기전에 관한 연구는, 정상적

인 골성석회화에 관여하는 결합단백인 osteopontin, bone acidic glycoprotein-75(BAG 75), SPARC(secreted protein acidic rich in cysteine), Sialoprotein II 등이 석회화된 이식조직에서 많이 발견된다는 사실을 확인하였다⁷⁾. 이는 이런 결합단백이 이식된 조직의 석회화에 관여한다는 간접적인 증거로 생각되나, 석회화의 과정을 유발하는 기전에 관련이 있는지 혹은 석회화의 결과로서 나타나는지는 확인되지 않고 있다. 골성 석회화와 관련된 결합단백은 생체 내에서 산성을 띠며 강력한 음전하를 나타내어 칼슘이온에 높은 친화력을 보이고, 또 RGD라는 공통 결합부를 갖고 있다. 현재까지 정상적인 골화 과정에서 이들 결합단백의 정확한 기능은 알려져 있지 않음

며, 이들 결합단백의 RGD가 골모세포 등의 RGD 수용체에 결합하여 칼슘의 분비 등을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그러나 RGD의 결합이 어떠한 경로로 세포내 정보전달 과정을 일으키는가는 확실치 않으며, 골성석회화 관련 결합단백들에서 RGD를 제외한 다른 부분이 어떠한 기능을 갖고 있는지도 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 RGD와 동일한 아미노산 배열을 갖는 RGDS tetrapeptide를 이식 전에 처치하여, 이식조직의 석회화를 줄일 수 있음을 확인하였다. 한편 RGDS tetrapeptide와 동일한 분자량을 갖는 GRSD tetrapeptide의 처치는 석회화에 영향을 미치지 못하였다. 이는 RGDS tetrapeptide가 숙주의 골성석회화 관련 결합단백이 이식절편에 직접적으로 결합하는 것을 차단하였음을 시사한다고 생각된다. 그러므로 본 실험의 결과는 숙주의 석회화 관련 결합단백이 RGD기의 수용체를 매개로 이식조직의 석회화 과정에 관련한다는 사실을 보여주고 있다. 그러나 글루타알데하이드로 처리한 이식세포가 정상적으로 RGDS tetrapeptide와 결합할 수 있는 수용체를 갖고 있는지는 확실하지 못하며, 세포의 수용체가 아닌 조직의 콜라겐 섬유에 부착되어 작용하였을 가능성도 배제할 수 없다.

흰쥐의 복부 피하에 이식 후 이식조직의 석회화 정도를 판정하는 모델은 많이 사용되고 있는 방법으로 이식 후 2주부터 석회화를 확인할 수 있는 것으로 알려져 있다^{7,10,11}. 본 실험에서는 이식 후 30일만에 이식조직의 석회화 정도를 판정하였으며, 대조군의 조직내 칼슘 농도는 55.75 mg/g을 보여 정상 심낭조직의 칼슘 농도인 0.8~1 mg/g에 비하여 충분한 석회화가 일어났음을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 석회화를 측정하는 방법 중 X-선 촬영후 음영도를 측정하는 방법은 일반적으로 많이 사용되고 있으며¹², 저자도 동일한 방법으로 각 구간에 차이를 확인할 수 있었다. 그러나 실제로 매우 얇은 조직의 석회화를 측정하기에는 그 오차가 심할 수 있다고 사료되며 특히 일반적인 densitometer를 사용하는 경우 그 측정부위에 따라 매우 많은 편차를 보일 수 있다. 저자들이 디지털이미지를 이용한 것은 실제 densitometer를 사용한 경우 너무 많은 측정오차가 발생되었기 때문이다. 반면 디지털이미지에서 그 음영을 측정하는 것은 densitometer에서 한 점을 측정하는 것에 비하여 원하는 넓이 전체의 음영을 측정할 수 있는 장점이 있어 그 측정오차를 줄일 수 있다고 사료된다. 본 실험에서는 생화학적인 방법으로 측정된 이식절편의 칼슘농도가 각 구간에 통계적 차이를 보이지 않았으나, 획득된 조직의 전체 칼슘 양은 통계적인 의의를 보여주고 있었다. 이것은 칼슘 농도는 이식조직의 획득과정에서 포함된 숙주 조직이 중량에 영향을 주었기 때문으로 생각된다. 일반적으로 이물 육아종을 형성하는 섬유조직에 석

회화가 없다면, 동일한 크기로 준비된 이식절편이라는 조건 하에서는, 획득된 전체 조직내에 칼슘 양이 오히려 석회화 정도를 더욱 정확하게 반영할 수 있을 것으로 생각된다. Levy 등(1983)은 석회화된 이식조직의 현미경 소견에서 이식조직의 주변보다 중심이 석회화 되는 경향을 보고하였다¹³. 이런 현상을 Wika 등(1993)은 "edge effect"라는 용어를 사용하였으며¹⁴, 중심의 석회화 부분이 석회화되지 않은 주변에 의해 둘러싸여 있는 것을 말한다. 이들은 석회화의 시작부위는 조직학적으로 표면이 아니라 섬유조직 층이며 또 이런 "edge effect"의 정도를 결정하는 요인은 화학적 처리방법이라고 하였다. 본 실험에서도 석회화가 주로 진행된 부위는 이식절편의 중앙에 위치하고 있었다. 그러나 염증세포의 침윤은 주로 이식절편의 주변부에 있어 대조적이었다. 실제 이식조직의 석회화를 유발하는 칼슘이 숙주의 혈장을 통해 운반되었다고 추정한다면 이식조직의 중앙부부터 시작된 석회화는 매우 흥미로운 소견으로 계속적인 연구가 필요한 부분이라고 사료된다. 그러나 실제 사람에게 이식된 조직판막의 석회화 소견은 조직의 중앙부뿐 아니라 판막의 관절부위에 심한 석회화 소견을 보이는 것으로 알려져 있다¹⁵. 이는 석회화 과정에 기계적인 스트레스가 관여함을 나타내는 것으로 생각된다¹⁶.

본 실험으로 RGDS의 처치가 이식조직의 석회화를 억제하는 효과는 확인 할 수 있었으나, 직접적으로 임상에 적용되기에는 무리가 있다고 생각된다. 우선 RGDS tetrapeptide가 이식절편과 충분한 반응을 하기 위한 시간과 농도는 본 실험에서는 확인할 수 없었으며 추가적인 연구가 필요하다. 또 본 실험은 정적인 상태에서의 실험이라는 한계가 있다. 실제로 심장내의 역동적인 환경에서는 판막의 관절부위에 교차결합이 파괴되어 칼슘이 침착하고 자랄 수 있는 환경이 될 수도 있다. 또 혈류가 흐르는 심장에 이식되는 경우 지속적인 혈류의 흐름에 의해 이식조직에 결합부를 점유하고 있던 RGDS 기가 씻겨 나갈 수 있다. 또한 RGDS 기가 시간이 지남에 됨에 따라 변성될 수 있다는 사실도 간과되어서는 안되리라 생각된다. 이런 이유로 실제 조직 판막에 RGDS기를 처리한 후 심장 내에 이식하여 장기간의 추적관찰로 석회화를 판정하는 과정이 임상에 직접 이용되기 전에 선행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 실험에서는 RGD와 동일한 아미노산 배열을 갖는 RGDS tetrapeptide로 소 심낭 절편을 처리한 다음 흰쥐의 복부 피하에 이식하여, 30일 후에 RGDS를 처치하지 않은 대조군에 비하여 이식절편의 석회화 정도가 적은 것을 확인할

수 있었다. 이러한 결과는 정상 골성석회화 결합단백이 이식 조직에 결합하는 것을 억제하는 RGDS tetrapeptide가 이식 조직의 석회화과정을 억제하는 효과가 있음을 보여주는 것으로, 이식조직의 석회화과정에 정상 골성석회화 결합단백이 관여함을 보여주는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Carpentier A, Dubost C, Lane E, et al. *Continuing improvements in valvular bioprostheses*. J Thorac Cardiovasc Surg 1982;83:27-42.
2. Gong G, Seifter E, Lyman WD, Factor SM, Blau S, Frater RWM. *Bioprosthetic cardiac valve degeneration : role of inflammatory and immune reactions*. J Heart Valve Dis 1993;2:684-93.
3. Liao K, Frater RWM, LaPietra A, Ciuffo G, Ilardi CF, Seifter E. *Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts*. Ann Thorac Surg 1995;60:S343-7.
4. Bernacca GM, Dimitri WR, Fisher AC, Mackay TG, Wheatley DT. *Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model*. Biomaterials 1992;13(6):345-52.
5. Tan WM, Loke WK, Tan BL, Wee A, Khor E, Goh KS. *Trivalent metal ions in the prevention of calcification in glutaraldehyde treated biological tissues. Is there a chemical correlation?* Biomaterials 1993;14(13):1003-7.
6. Vasudev SC, Moses LR, Sharma CP. *Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2000;28(3):241-53.
7. Gura TA, Wright KL, Veis A, Webb CL. *Identification of specific calcium-binding noncollagenous proteins associated with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium in the rat subdermal model*. J Biomed Mater Res 1997;35(4):483-95.
8. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Escudero C, Garcia-Paez JM, Castillo-olivares JL. *Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids*. Biomaterials 1996;17:571-5.
9. Grabenwoger 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.
10. Abolhoda A, Yu S, Oyarzun JR, McCormick JR, Bogden JD, Gabbay S. *The calcification of bovine pericardium : glutaraldehyde versus no-react biomodification*. Ann Thorac Surg 1996;62:169-74.
11. Valente M, Pettenazzo E, Thiene G, et al. *Detoxified glutaraldehyde cross-linked pericardium : tissue and mineralization mitigation in a subcutaneous rat model*. J Heart Valve Dis 1998;7:283-91.
12. Gong G, Seifter LE, Factor SM, Frater RWM. *Aldehyde tanning : the villain in bioprosthetic calcification*. Eur J Cardiothorac Surg 1991;5:288-93.
13. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. *Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats*. Am J Pathol 1983;113:143-55.
14. Wika KE, Utoh J, Brown J, Harasaki H. *Quantification of the edge effect in calcified bioprosthetic tissues*. J Biomed Mater Res 1993;27(10):1293-9.
15. Gabbay S, Bortolotti U, Wasserman F, Tindel N, Factor SM, Frater RWM. *Long-term follow-up of the Ionescu-Shiley mitral pericardial xenograft*. J Thorac Cardiovasc Surg 1984;88:758-63.
16. Thubrikar MJ, Deck DJ, Aouad J. *Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves*. J Thorac Cardiovasc Surg 1983;86:115-25.

=국문초록=

배경: 모든 조직판막은 면역학적인 불활성화 및 내구성 강화를 위하여 이식 전 처치를 필요로 한다. 그러나 조직 판막은 이식 후 점차적인 석회화 과정을 보이며, 결국 판막의 기능을 상실하게 된다. 최근 석회화 과정의 병리기전에 관한 연구에서는 이식된 조직판막의 석회화 부위에서 정상 골성석회화에 관련하는 결합단백이 검출되기에 이르렀다. 본 실험은 이러한 결합단백의 공통 결합부인 RGD(Arg-Gly-Asp)를 갖는 RGDS tetrapeptide를 이식 전 조직에 처치하여 이식 후 숙주의 골성석회화 관련 결합단백의 결합을 억제하는 것이 석회화과정에 영향을 줄 수 있는가를 확인하기 위하여 계획되었다. **대상 및 방법:** 실험은 소 심낭을 0.6% 글루타알데하이드에 처치한 후 이를 작은 절편으로 나누어 1군은 생리식염수에서 60분간 처리, 2 군은 RGDS와 같은 분자량을 갖는 0.5% GRSD tetrapeptide에서 60분간 처리, 3군은 0.5% RGDS에서 30분간 처리, 4 군은 0.5% RGDS에서 60분간 처리, 5군은 0.5% RGDS에서 120분간 처리하였다. 이렇게 처리된 소 심낭절편을 흰쥐의 복부 피하에 이식하였으며, 30일 후 채취하여 방사선 검사와 생화학적 검사 및 조직학적 검사를 시행하여 이식절편의 석회화 정도를 판정하였다. **결과:** 이식절편을 방사선 촬영 후, 측정된 음영도는 3, 4, 5 군에서 48.00 ± 3.57 , 43.67 ± 2.31 , 42.58 ± 2.47 로 1, 2군의 68.42 ± 3.06 , 64.25 ± 5.58 과 통계학적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 1군과 2군간의 유의한 차이는 없었다($p = 0.105$). 생화학적 검사에서 이식절편의 칼슘 총량은 1군 33.09 ± 6.59 mg, 2군 28.12 ± 5.50 mg, 3군 25.42 ± 7.67 mg, 4군 20.51 ± 5.11 mg, 5군 15.43 ± 4.25 mg을 보여, 5군이 1, 2, 3군에 비하여 통계적으로 유의하게 석회화 정도가 감소되어 있었다($p < 0.05$). 1군과 2군간에 유의한 차이는 없었다($p = 0.388$). 조직학적 검사에서는 1, 2군에서 현저한 칼슘의 침착을 확인할 수 있었으며 3, 4군은 적은 양의 칼슘침착을 보여주는 반면, 5군에서는 뚜렷한 칼슘 침착 부를 확인할 수 없었다. **결론:** 이상의 결과에서 이식 전 RGDS tetrapeptide를 처치하는 것이 흰쥐의 복부 피하에 이식된 소 심낭절편의 석회화를 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

- 중심 단어: 1. 석회화
2. RGDS
3. 조직판막