

# 아미노산 후처치의 이중 심낭보철편 석회화 완화 효과

안 재 호\*

= Abstract =

## Mitigation of Calcification in Bovine Pericardial Bioprosthesis after Amino Acids Posttreatment

Jae Ho Ahn, M.D.\*

**Background:** Bovine pericardium fixed in glutaraldehyde solution (GA) has been one of the most popular surgical bioprosthesis, however, late calcific degeneration after implantation remains to be solved. To mitigate calcific degeneration, we posttreated the bovine pericardium with amino acids after GA fixation. **Material and Method:** 40 small pieces of bovine pericardia were fixed in 0.625% GA solution with 4 g/L MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O as a control group (group 1). 40 pieces fixed in the same GA solution were posttreated with 2% chitosan solution (group 2) and the other 40 pieces posttreated with 8% glutamate (group 3). These were implanted into the belly of forty Fisher 344 rats subdermally and extracted at 1 month, 2 months, 3 months and 4 months after implantation. **Result:** With atomic absorption spectrophotometry we measured the deposited calcium amount and the results were as follows; 2.01±0.13 mg/g in group 1, 2.34±0.73 mg/g in group 2, 2.49±0.15 mg/g in group 3 at 1 month after implantation, and 3.57±0.15 mg/g in group 1, 3.52±0.92 mg/g in group 2, 3.46±0.12 mg/g in group 3 at the second month. But 5.45±0.42 mg/g in group 1, 3.22±1.31 mg/g in group 2 and 4.20±0.55 mg/g in group 3 at the 3rd month, which have statistical significance in group 2 (p<0.05). Finally at 4th month, 6.01±1.21 mg/g in group 1, 3.78±1.82 mg/g in group 2, 3.92±0.92 mg/g in group 3, which also have statistical significance (p<0.05). **Conclusion:** This means posttreatment with 2% chitosan shows meaningful calcium mitigation effects after 3rd month on subcutaneously implanted bovine pericardium in the rat models but 8% glutamate shows mitigation effect after 4months in this experiment.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:131-135)

**Key words:** 1. Glutaraldehyde  
 2. Glutamate  
 3. Transplantation, heterologous  
 4. Calcification

### 서 론

생체에 이식된 이중이식편의 석회화 과정과 그 완화 방법 등에 대해 연구자는 여러 차례 연구결과를 발표한

바 있으며<sup>1-3)</sup> 그 결과가 타 연구자의 것과 일치하기도 하나 예상과 다른 경우도 많이 관찰되었다. 면역학적인 면에서 고려하여 자기 자신의 조직을 이용하는 것이 가장 이상적이라는 데에는 이론이 없지만 자가 조직의 양

\*이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Medical College, Ewha Women's University, Seoul, Korea

논문접수일 : 2002년 12월 3일, 심사통과일 : 2002년 12월 30일

책임저자 : 안재호 (158-710) 서울 양천구 목동 911-1, 이대목동병원 흉부외과

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: jhahn@mm.ewha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

적인 제한으로 동종 조직의 이동을 시도하나 이 역시 공급 제한으로 인하여 이종조직으로 이를 대신할 수밖에 없는 실정이다<sup>4,5)</sup>. 또한 현재 임상에서 이용하고 있는 이들 이종조직은 모두 외국으로부터 전량 수입하고 있는 바, 연구자는 자체적으로 도축장으로부터 우심낭을 청결하게 수거하여 glutaraldehyde (이하 GA라 함) 용액에 처리한 이종보철편을 개발하고자 시도하고 있다. 초기에 연구자가 제작한 이종보철편은<sup>1)</sup> 동물 실험<sup>2)</sup> 및 제한된 임상 적용에서<sup>3)</sup> 심한 석회화가 조기에 발생하여 중기 수술성적이 만족치 못했던 것을 경험하여 이 석회화의 방지 내지는 완화가 보철편을 이용한 심장 수술 후의 만족할 만한 장기 성적에 절대적으로 필요할<sup>6)</sup> 것으로 생각되었다. 이종이식편의 보존을 위하여 사용되는 GA는 조직과 결합하고 이렇게 결합된 이 GA의 aldehyde기(-CHO)가 체내의 칼슘과 결합함으로써 석회화가 시작되고 진행되어 가는 주 원인으로 생각되고 있어<sup>7,8)</sup>, 이 GA의 aldehyde기 결합부위를 다른 금속 등의 물질과 결합시켜 칼슘이 붙는 것을 방해하는 것이 석회화 방지의 원리가 된다. 이에 표준이 되는 GA 용액을 만들 때 마그네슘을 첨가하였으며 이는 기본적으로 널리 사용되는 방법이고<sup>9)</sup>, 여기에 3가의 철로 전처리하여 칼슘의 결합을 방지하는 방법<sup>10)</sup>, sodium dodecyl sulfate 등 계면활성제로 GA 용액에 고정하기 전에 보관하여 전처리하는 방법<sup>4)</sup> 등이 발표되고 있다. 연구자는 아미노산의 N-terminal기와 GA의 aldehyde가 결합하도록 하여<sup>11,12)</sup> 석회화를 방지 혹은 완화할 수 있을 것이라는 가설하에 glutamate 및 chitosan 등의 아미노산을 이용, 다음의 실험을 진행하여 이상적인 이종조직편을 얻고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 우심낭의 수집, 처리 및 보관

공인 도축장에서 수의사의 도움하에 소의 심장을 주위 조직과 같이 수거한 후 준비한 도구를 이용, 심낭만을 청결하게 채취하여 1 L당 1 g의 Amcillin (종근당)과 1 g의 황산 streptomycin (종근당)을 섞은 생리식염수 용액에 담아 냉장 상태로 곧바로 실험실로 운반한다. 동물 실험대 위에서 심낭 주위의 지방조직 등을 깨끗이 박리하고 심낭 조직만을 1×1 cm의 정방형으로 재단한 후 같은 항생제 용액에 24시간 냉장 보관한다. 이들을 생리 식염수로 세척하여, 40조각의 우심낭

편은 대조군으로 삼아 MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O (Sigma Co., U.S.A.)를 4 g/L 첨가한 0.625% GA (Sigma Co., U.S.A.) 표준용액에 고정 보존하고(1군), 40조각은 1군과 같은 GA 표준용액에 보관하다 백서 피하이식 24시간 전에 생리식염수에 1시간 세척하여 2% chitosan (Sigma Co., U.S.A.)용액에 보관(2군)하였고, 또 다른 40조각은 2군과 같은 방법으로 8% glutamate (Sigma Co., U.S.A.) 용액에 보관(3군)한 후 각각 생리식염수에 30분 세척하여 동물 실험에 이용하였다.

### 2) 백서에의 피하 이식

150 g 정도의 생후 1개월 미만인 40마리의 수놈 Fisher 344 백서(이화대의 동물실험실)를 준비하여 12~15 mg/kg의 ketamine (유한양행)을 복강 내로 주사해 마취시킨 후, 양와위로 가온되는 소동물 수술대 위에 고정시키고 복부의 털을 깨끗이 깎는다. Betadine으로 수술창이 될 부위를 잘 닦은 후, 피부와 피하 조직을 정중 절개하고 양쪽으로 피하층을 박리하여 3개의 pocket을 만든 다음, 위에서 준비한 1, 2, 3군의 우심낭편을 생리식염수에 30분 정도 잘 세척하여 여분의 GA를 제거한 후 각각 한 조각씩 갈라서 심고 5-0 prolene 연속봉합으로 창상을 닫는다. 수술 직후와 다음날 Cefamezin (동아제약) 0.2 g을 근주하여 감염을 예방하며 실험동물 사육장에서 정상식으로 사육한다. 이렇게 이식된 우심낭편을 이식 후 1개월, 2개월, 3개월 및 4개월째에 각 10마리 단위로 다시 수거하여 침착된 칼슘의 양을 정량하기 위해 준비한다.

### 3) 칼슘의 정량

경추 탈골로 마비시킨 실험 백서를 다시 수술대에 양와위로 고정시키고, 먼저의 수술창을 열어 우심낭편을 수거한다. 이렇게 수거한 우심낭편을 24시간 이상 freeze dryer (Labconco, U.S.A.)에서 냉동 건조시킨 후 각각 조직의 무게를 재고, 2 ml Effendorf tube에 담아 6N HCl 용액 1 ml를 첨가하고 60°C warm incubator (비준과학)에서 가온하며 완전 용해될 때까지 24시간 이상 기다린다. 이 조직 용액에 Lanthanum (Sigma Co., U.S.A.) 용액(5% Lanthanum, 3N HCl)을 첨가하여 모두 2 ml가 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 세 군 간의 시간에 따른 석회화 정도를 측정한다.

**Table 1.** Deposited calcium (mg/g) in bovine pericardia after subcutaneous implantation in rat model

	1 month	2 month	3 month	4 month
Group 1	2.01 ± 0.13	3.57 ± 0.15	5.45 ± 0.42	6.01 ± 1.21
Group 2	2.34 ± 0.73	3.52 ± 0.92	3.22 ± 1.31	3.78 ± 1.82
Group 3	2.49 ± 0.15	3.46 ± 0.12	4.20 ± 0.55	3.92 ± 0.92
			p < 0.05	p < 0.05

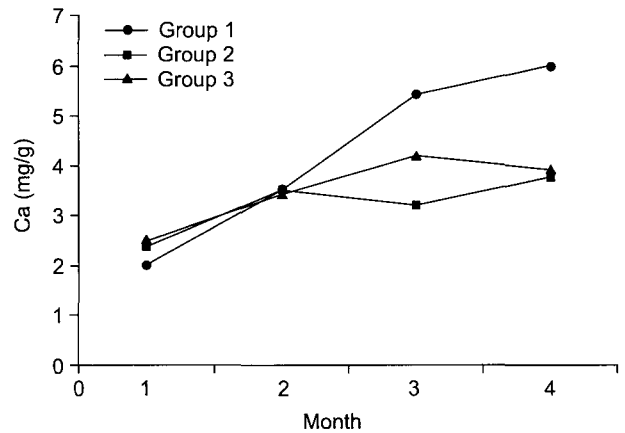
The group 1 as a control shows steadily increasing calcium deposition. In group 2 (posttreated with chitosan) the calcification was much mitigated after the 3rd month compared to the control, and in group 3 (posttreated with glutamate) the mitigation of calcification was also observed after the 3rd month in this experiment

#### 4) 통계처리

칼슘은 우심낭의 단위 무게당 침착된 정도를 mg/g 단위로 평균 ± 표준편차로 표시하고, 각 군 간의 통계적 차이는 repeated ANOVA 및 post-hoc test (Turkey test)로 검증하며 p < 0.05를 의미있는 것으로 간주한다.

## 결 과

40마리의 백서 복부 피하에 우심낭편을 이식 후, 1개월, 2개월, 3개월 및 4개월이 경과하였을 때 10마리씩 이 이식편을 적출하였다. 수거한 이식편들은 신선한 심낭편으로 보이는 것으로부터 돌과 같이 딱딱하게 굳은 조직까지 다양한 변화를 보였으며 이들에 침착된 칼슘을 정량한 결과는 Table 1과 같았다. 즉 1개월째에는 1군 2.01 ± 0.13 mg/g, 2군 2.34 ± 0.73 mg/g, 3군 2.49 ± 0.15 mg/g으로 세 군 간에 유의한 차이가 없었고, 2개월째에도 1군 3.57 ± 0.15 mg/g, 2군 3.52 ± 0.92 mg/g, 3군 3.46 ± 0.12 mg/g으로 세 군 간에는 통계적 차이가 없었으나, 3개월째에는 1군이 5.45 ± 0.42 mg/g, 2군 3.22 ± 1.31 mg/g, 3군 4.20 ± 0.55 mg/g로 관찰되어 p < 0.05의 통계적 유의성을 보여 주며 2군에서 칼슘 침착의 증가 정도가 줄어들고 있음을 보여주고 있었다. 4개월째에는 1군에서 6.01 ± 1.21 mg/g, 2군 3.78 ± 1.82 mg/g, 3군 3.92 ± 0.92 mg/g으로 2, 3군에서 통계적으로 유의한 석회화 완화를 보였다(p < 0.05). 즉 1, 2개월째인 초기에는 세 군 간에 석회화의 차이는 없었으나, 시간이 경과하며 계속 석회화가 진행되었고, 3개월



**Fig. 1.** As mentioned on table 1 calcium deposition were increased with elapsing time in control (group 1). To the contrary chitosan treated group (group2) and glutamate (group 3) showed mitigated calcification after the 3rd month (p < 0.05).

이 지나면서 석회화의 정도에 차이를 보여 chitosan 후처치 군 및 glutamate 후처치 군에서 통계적으로 유의하게 칼슘 침착의 정도가 완화되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

## 고 찰

현재 많은 임상의학분야에서 인조 보철물들이 개발되어 상대적으로 그 사용 빈도가 줄기는 하였지만 아직도 이종조직 보철편은 계속 사용되고 있으며, 국내에서 심혈관 수술 등에 이용되는 이러한 이종조직 보철편들이 전량 수입에만 의존되는 실정으로서 실제로는 그 제작에 특별한 어려움은 없으나 사용할 때 환자에게 비용의 부담이 크므로 우리도 자체적으로 이에 상응하는 이종조직 보철편을 개발할 필요가 있다. 이들 임상에서 사용되고 있는 이종조직 보철편들은 정도의 차이는 있지만 인체 이식 후 석회화 변성에 따르는 중장기 수술성적의 결함이 계속 문제점으로 남아 있는바<sup>2,3)</sup> 이에 관심을 갖고 연구하면 현재 해외에서 수입되는 상품화되어 있는 보철편보다 한결 우수한 결과를 얻을 수도 있을 것이다. 일반적으로 이종조직 보철편은 GA용액에 고정 보존하는 방법이 널리 이용되고 있는데, 이는 조직편의 collagen fiber들이 GA와 안정된 cross-link를 이루며 GA polymer를 표면에 형성하는 것을 이용<sup>7)</sup>하는 것이다. 이렇게 만들어진 이종조직 보철편의 생체 내 이식 후 석회화 변성을 초래하는 기전으

로는 보철편 조직과 결합한 GA의 free aldehyde 기가 이식받은 숙주의 조직 및 혈중의  $Ca^{2+}$  과 결합하면서 석회화가 시작되며 진행되어 가는 것이라고 생각된다<sup>4)</sup>. 이때 GA의 free aldehyde 기가  $Mg^{2+}$  과 결합하도록 유도함으로써  $Ca^{2+}$  과 결합할 부위를 먼저 blocking 시키려는 목적으로  $MgCl_2$ 를 GA 용액에 첨가하므로써 석회화 완화를 유도하였고, 이에 앞서 인산화 지방의 조직 내로의 유입이 또 하나의 석회화 전제 조건<sup>7,8)</sup>이 되는 바 계면활성제의 친수성 부위가 지방 및 인산 지방이 조직으로 이동하는 것을 막아 주므로써 조직 석회화의 첫 번째 단계를 막아준다는 가설<sup>13,14)</sup>하에 여러 연구들에서 다양한 계면활성제로 전처치한 결과가 발표되었다. Carpentier 등은 중성 계면활성제가 단기의 석회화 방지에 효과가 있었던 것에 반해 음이온성 계면활성제는 효과가 떨어진다는 결과를 보여주기도 하였으나<sup>4)</sup>, 본 연구자의 실험실에서는 이와는 다르게 sodium dodecyl sulfate 등 음이온 계면활성제가 Triton X-100의 중성 계면활성제보다 전처치 효과가 우수한 것으로 나타나는<sup>15)</sup> 등 다른 결과를 보여주어 지속적인 연구가 필요한 상태이다. 이 GA의 aldehyde기의 결합부위를 다른 물질과 반응시켜 칼슘이 붙는 것을 방해하여 석회화를 예방하기 위한 또 다른 시도로 본 실험에서는 아미노산의 N-terminal기와 GA의 aldehyde가 결합하도록 하는 방법을 이용, chitosan 및 glutamate 분자의 N-terminal기가 GA에 보존한 우심낭 표면에 결합해 있는 GA의 자유 aldehyde가 다시 상호 결합하므로써 칼슘과의 결합을 막거나 줄이는 효과가 있는가를 관찰하였다. Chitosan은 성상이 고형의 과립으로 물에 잘 용해되지 않는 바, 본 연구자에 의한 일련의 선행된 실험에서 4%의 chitosan 용액은 과포화된 chitosan이 침전되어 미세한 잉여의 고형 chitosan 입자들이 우심낭의 표면에 이물질로 붙어 오히려 이식 후 이식 조직의 석회화에 핵으로 작용하는 결과를 보여주고 있어 본 실험에서는 2% 용액으로 불포화를 줄이는 시도를 하였고 또한 이를 여과지에 걸러 고형성분을 제거하여 사용하였다. 8%의 glutamate 용액도 실온에서는 잘 녹지 않고 가온하여야만 용융되는 과포화 상태인 바 이 역시 여과지로 걸러 사용하였다. 이러한 시도의 결과로 아미노산의 후처치가 3개월 이후 석회화 완화의 효과를 보여주고 있다고 하겠다.

각종 심혈관 수술 등에 따르는 이종조직 보철편의 수요가 지속되고 있는 상황에서 인조 합성 보철물들과

다 동물로부터 채취한 천연 재질 등이 모두 외국에서 개발되어 전량 수입에만 의존하고 있어 우리나라에서도 자체적으로 이에 상응하는 보철물들의 개발이 필요하다. 또한 이들 보철편들은 정도의 차이는 있지만 심장 내 이식 후 석회화의 진행에 따르는 중장기 수술 성적의 미흡함이 계속 문제점으로 남아 있는 바<sup>9)</sup>, 본 연구 등을 통해 외국에서 수입되는 기존의 제품보다 한결 우수한 석회화 방지 혹은 완화 효과를 갖는 이종조직 보철편의 제작을 기대할 수 있겠다. 계속해서 석회화를 방지 혹은 완화시킬 수 있는 다양한 가능성 있는 첨가제의 사용이나 전처치 및 후처치 방법 등을 위한 세척액의 개발<sup>4,8-12,16)</sup> 및 임상에서 수술 후의 새로운 약제사용 등의 방법을 연구, 개발함으로써 이종조직의 이식 후 환자의 장기 예후가 호전되도록 할 수 있을 것이며 수입 대체 효과 등도 부수적으로 얻을 수 있을 것이다.

## 결 론

본 실험의 결과, 시간이 경과하며 계속 석회화가 진행되었지만 3개월이 지나면서 chitosan 후처치 군 및 glutamate 후처치 군에서 통계적으로 유의하게 칼슘 침착의 정도가 완화되는 것을 관찰함으로써 아미노산으로의 후처치가 이식된 조직의 석회화 완화에 도움이 되고 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. 안재호, 김용진. 소의 심낭을 이용한 이종이식 보철편의 개발 (I). 대흉외지 1989;22:373-83.
2. 안재호, 노윤우, 이조한 등. 돼지를 이용한 대동맥 판막에서 자가 폐동맥 판막이식 및 우심실 유출로 형성술의 신술식 개발. 대흉외지 1996;29:822-7.
3. 김기봉, 김용진, 노준량, 서경필. 소의 심낭을 이용한 이종이식 보철편의 개발(II). 대흉외지 1990;23:465-73.
4. 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.
5. Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS. Pericardial substitutes: Delayed exploration and findings. Ann Thorac Surg 1987; 43:383-5.
6. 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.
7. Nimni ME. The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular pros-

- thesis. J Card Surg 1988;3:523-33.
3. Webb CL, Benedict JJ, Schen 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. Chanda J. *Anticalcification treatment of pericardial prostheses.* Biomaterials 1994;15:465-9.
  12. Chandra J. *Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: An experimental study in rat.* Ann Thorac Surg 1995;60:S339-42.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 안재호, 한재진, 박성수. *우심낭편의 석회화 방지에 관한 연구-계면활성제의 전처리 효과-* 대흉외지 1998;31:560-6.
  16. Chandra J. *Posttreatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium.* Artif Organs 1994;18:408-10.

=국문 초록=

**배경:** Glutaraldehyde (GA)에 보존한 이중보철편들은 생체 이식 후 석회화 변성을 보이는 문제점을 나타내므로 이 단점을 보완하기 위해 연구자는 GA 용액에 Mg염을 첨가 칼슘의 반응을 막아 석회화를 완화하며 더불어 chitosan 및 glutamate 등의 아미노산으로 후처리하여 석회화 완화를 극대화하고자 하였다. **대상 및 방법:** 우심낭을 정방형 조각으로 만들어 40조각의 우심낭편은 대조군으로 MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O를 4 g/L 첨가한 0.625% GA 용액에 보존하고(1군), 40조각은 이 GA 용액에 보관하다 이식 24시간 전 2% chitosan 용액에 옮겨 보존(2군), 또 다른 40조각 역시 같은 방법으로 8% glutamate 용액에 후처리(3군)하여, 이들을 40마리의 백서 복부 피하에 각각 한 조각씩 이식하여 1개월, 2개월, 3개월 및 4개월째에 적출, spectrophotometry로 침착한 칼슘을 정량하였다. **결과 :** 이식 후 1개월 및 2개월에는 세 군 간의 석회화 정도에 차이가 없었으나, 3개월째에는 1군 5.45±0.42 mg/g, 2군 3.22±1.31 mg/g, 3군 4.20±0.55 mg/g의 통계적 차이를 보여, 2군에서 유의한 석회화 완화 효과가 관찰되고 있고 (p<0.05), 4개월째에는 1군 6.01±1.21 mg/g, 2군 3.78±1.82 mg/g, 3군 3.92±0.92 mg/g으로 2, 3군에서 유의한 석회화 완화 효과를 보여주고 있다(p<0.05). **결론:** 즉 2% chitosan 후처리로 3개월의 시간이 경과함에 따라 피하에 이식된 보철편의 석회화가 완화되었으며 8% glutamate는 4개월에서 그 완화효과를 보여주고 있다.

- 중심 단어 :** 1. Glutaraldehyde  
2. Glutamate  
3. 이중이식  
4. 석회화