

개에서 자가 fibrin glue가 골 결손치유에 미치는 영향

이종일 · 송하나 · 김남수*

전북대학교 수의과대학
(게재승인: 2005년 5월 20일)

Effects of bone healing capacity by autologous fibrin glue in experimental bone defect dogs

Jong-il Lee, Ha-na Song, Nam-soo Kim*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: May 20, 2005)

Abstract : This study was investigated of the bone healing capacity by autologous fibrin glue in experimental bone defect dogs. The autologous fibrin glue manufactured just before the experiment was mixed with the concentrated fibrinogen from whole blood of the experimental dog and bovine thrombin. The experimental group was constituted with seven dogs. The experimental osteotomy was performed 5 mm length in bilateral region of proximal diaphyseal fibulae. The defected regions of experimental group were filled with the autologous fibrin glue by duploject. The experimental regions had been radiographed biweekly for 16 weeks to observe new bone formation and union. Bone alkaline phosphatase (BALP) in all groups was evaluated biweekly till the end of the experiment to determine osteoblast activities. New bone formation had been observed in five regions of three dogs at four weeks after the experimental treatment and in two regions of one dog at ten weeks. The other seven regions of the experimental group and control group were not observed new bone formation until the end of the experiment. BALP value in four dogs observed new bone formation was increased to 97.10 IU/L (453.96%) at two weeks after the experimental treatment. The results of this experiment were suggested that the autologous fibrin glue was moderately effective in new bone formation in dogs.

Key words : fibrin glue, BALP, osteoblast activities, dog

서 론

Fibrin glue는 혈액에서 유래한 생물학적인 접착제로 혈액응고의 과정 중 fibrin의 단량체가 중합하는 과정에서 접착력을 가지게 되는 것으로 알려져 있다 [3, 7, 10, 12, 14]. Fibrin은 조직접착력이 강하여 지혈장벽으로 작용하며, 섬유아세포의 성장을 위한 안정된 fibrin 망을 제공하는 틀로 작용하면서 신생모세혈관의 형성과 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [2, 3, 7, 10, 11, 14, 18, 23, 26]. 상품화된 fibrin glue는 이러한 작용에 착안하여 현재 골연골골절고정술, 신경, 건, 반월상 연골 및 혈관 봉합술, 피부이식술 등 다양한 임상

분야에 이용되고 있다 [8, 11, 12, 16, 27]. 특히 정형외과 영역에서는 골 형성 단백질, 골 분말 등의 골 이식 물질들의 형태를 유지시키고 고정시켜 주는 틀로서 제공되고 있으며, 이와 관련하여 골의 신생에 영향을 미치는지에 대해서도 많은 연구들이 진행되어 왔다 [10, 15, 17, 20, 22].

Fibrin glue가 골의 신생에 영향을 미치는지에 대해서는 논란의 여지가 많으나, Bosch 등 [10], Arbes 등 [7]은 골의 신생에 영향을 미친다고 보고한 반면, Albrektsson 등 [6]은 골의 신생에 영향을 미치지 못하거나 골의 형성을 감소시킨다고 주장하였다 [21].

또한, 상품화된 fibrin glue는 타인의 혈액에서 추출한

이 논문은 2005년도 전북대학교 생체안정성연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌음

*Corresponding author: Nam-soo Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-2800, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: namsoo@chonbuk.ac.kr]

fibrinogen을 주원료로 사용하고 있기 때문에 바이러스 성 감염이나 후천성 면역결핍증 등의 잠재적인 질환에 이환될 수 있는 위험성과 면역거부반응에 의한 부작용이 우려되고 있으므로 자가 fibrin glue를 권장하고 있는 실정이다 [9, 23, 24, 27].

이에 본 연구는 공시동물에서 채취한 소량의 혈액을 이용하여 자가 fibrin glue를 제조한 후, 공시동물의 비골(fibula)을 실험적으로 결손시켜 자가 fibrin glue를 단독으로 투여하였을 때 골의 신생에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

임상적으로 건강한 소형견 9두(연령 2.5±1.5 years, 체중 3.5±1.5)를 2주간 예비사육 후 암수 구별 없이 자가 fibrin glue를 주입한 실험군 7두와 생리식염수를 주입한 대조군 2두로 분류하였다.

자가 fibrin glue 제작

실험동물에서 채취한 혈액을 항응고(3.8% sodium citrate) 처리하여 얻은 혈장에 포화 황산암모늄 용액을 0.35 ml/1 ml 비율로 첨가하고 3000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 생성된 침전물에 섬유소용해 억제제인 tranexamic acid를 첨가하여 용액 A를 만들었다. 상용화된 bovine thrombin에 40 mM calcium chloride를 첨가하여 용액 B를 만들었다. 동량의 용액 A와 B를 duploject를 사용하여 실험부위에 동시에 주입하였으며 10~15초 후에 fibrin 응괴를 얻었다.

비유합 골절모델과 시술

마취는 각 공시동물을 24시간 절식시킨 후 전마취제로 atropine sulfate(0.025 mg/kg)를 사용하였으며 xylazine hydrochloride(2 mg/kg)와 ketamine hydrochloride(20 mg/kg)로 합병마취 하였다. 수술은 일반적인 술식에 따랐으며 비골은 하퇴부의 외측 근위부로 접근하였으며, 노출된 비골의 근위골간부(proximal diaphysis)를 약 5 mm 절제하여 비유합 골절 모델을 만들었다. 절제된 비골 결손 부위에 실험군은 자가 fibrin glue를, 대조군은 생리식염수를 주입한 뒤 일반적인 방법에 따라 봉합하였다.

후처치로 시술시 부터 3일간 enrofloxacin(5 mg/kg, IM, BID)만을 투여하였고 포대는 상황에 따라 적절히 교체하였으며 외부고정은 하지 않았다.

방사선학적 검사

시술 후 16주 동안 매 2주 간격으로 비골 결손 부위

를 방사선 촬영하여 골절 모델의 상태와 신생골의 형성 과정을 조사하였다.

BALP의 측정

Rosalki and Foo [25]의 방법을 변형시킨 Behr and Barnert [4, 9]의 방법을 이용하여 bone alkaline phosphatase(BALP)를 측정하였다. 각 군에서 시술 후 16주 동안 매 2주 간격으로 채취한 혈청을 deep freezer(-80°C)에 보관한 후 측정하였다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.01을 유의한 차이의 한계로 하였다.

결 과

임상증상

실험기간 동안 각 실험견의 체온, 심박수 및 호흡수 등의 일반 임상증상은 정상범위내의 변화를 나타냈다.

신생골의 형성과 유합

Fibrin glue를 이식하고 방사선 사진으로 관찰한 결과 14예 중에서 7예(50%)가 유합을 나타내었다(Table 1).

유합(union)의 양상은 7예 중 5예는 시술 후 2~4주부터 이식부위에 가골이 형성되기 시작하여 6~8주에 유합이 일어나기 시작하였으며 그 중 2예는 16주 후에 비골의 원형에 가까운 형태로 복구되었다(Fig. 1).

나머지 2예의 경우 이식 후 8주까지 아무런 변화를 보이지 않았으나 10주부터 가골이 형성되기 시작하여 16주에 골유합이 일어나기 시작하였다.

유합이 일어나지 않은 7예(non-union)는 실험이 끝날 때까지 신생골이 형성되는 것을 관찰할 수 없었고 이식 후 4주부터 이식부위의 골이 흡수되기 시작하여 정상보

Table 1. Radiographic appearance of Autologous fibrin glue implantation

Case No.	1	2	3	4	5	6	7
Incorporation L - R	NN	NU	UU	UU	UU	NN	NN
Weeks of New bone formation	--	- 4	10 10	4 3	4 2	--	--
Weeks of Union	--	- 14	16 16	12 8	12 6	--	--

U: Union, N: Non-union, L: Left, R: Right



Fig. 1. Serial radiograph of complete union case after autologous fibrin glue implantation. pre-op: pre-operation; 0, 4, 8, 12, 16: weeks after experimental treatment.



Fig. 2. Serial radiograph of non-union case after autologous fibrin glue implantation. pre-op: pre-operation; 0, 4, 8, 12, 16: weeks after experimental treatment.



Fig. 3. Serial radiograph of saline implantation group (non-union). pre-op: pre-operation; 0, 4, 8, 12, 16: weeks after experimental treatment.

다 가늘어지고 양끝은 침상으로 나타났으며 이식 부위의 간격이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

생리식염수를 주입한 대조군 4예에서도 이식부위에서 신생골이 형성되는 것을 관찰하지 못하였고, 비유합형과 마찬가지로 이식부위가 흡수되어 정상보다 가늘어지고 양끝이 침상으로 나타나고 있는 것을 관찰할 수 있었다

(Fig. 3).

BALP치의 변화

각 공시동물에서 골아세포 활성도의 지표로 알려진 BALP치를 측정하여 비교한 결과 신생골의 형성으로 유합이 일어난 예의 경우 이식 전 17.53 IU/L에서 이식 후

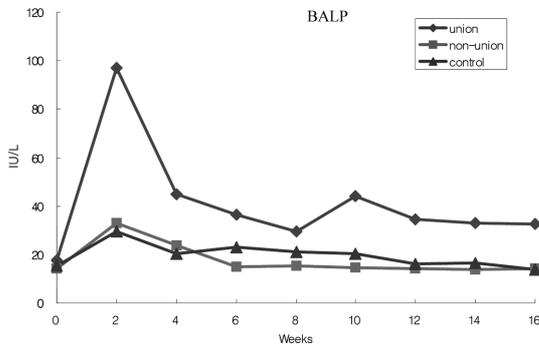


Fig. 4. Changes of BALP value in serum.

2주에 97.10 IU/L로 453.96% 증가하였다가 4주부터 8주까지 점차 감소하였고 다시 10주에 44.26 IU/L로 증가하였다가 12주부터 16주까지 큰 변화 없이 서서히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

유합이 일어나지 않은 예의 경우 이식 전 14.25 IU/L에서 이식 후 2주에 32.98 IU/L로 131.53% 증가를 보였으나 4주 이후에 서서히 감소하였고, 생리식염수를 이식한 예의 경우도 이식 전 15.27 IU/L에서 이식 후 2주에 29.69 IU/L로 94.37% 증가를 보였으나 4주부터 16주까지는 큰 변화 없이 일정한 변화를 나타내고 있었다(Fig. 4).

이러한 변화는 유합이 일어난 예와 유합이 일어나지 않은 예 및 유합이 일어난 예와 생리식염수를 이식한 예 사이에서는 유의성이 인정되었으나($p < 0.01$) 유합이 일어나지 않은 예와 생리식염수를 이식한 예 사이에서는 유의성이 인정되지 않았다.

고 찰

Fibrin은 혈액응고과정의 마지막 단계에서 생성되는 것으로 지혈장벽으로 작용하고 세망을 형성하여 세망내로 염증세포들의 이주와 분화를 촉진시키는 등 창상치유의 초기단계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [2, 3, 7, 10, 11, 14, 18, 23, 26]. 이들 염증세포 중 대식세포에서 방출되는 growth factor는 미분화 간엽세포들의 이주와 분화를 자극하여 신생 모세혈관의 생성과 침윤을 촉진시키고 섬유아세포 등의 모세포들이 분화를 일으키도록 한다고 보고되었다 [18].

골절부위에서의 fibrin은 골절부위로 이주한 미분화 간엽세포가 골아세포로 분화하는 것을 촉진시키고 주변 골막에 존재하는 골아세포를 활성화시켜 신생골의 형성을 가속화하는 것으로 알려져 있으나 [2, 3, 7, 10, 11, 14, 23] 논란의 여지가 많다.

토끼의 피질골을 결손시킨 후 동종의 fibrin glue를 주

입한 결과 대조군에 비하여 초기에 골결손이 치유되었고, 탈석회화한 이종골기질과 복합투여시 그 효과가 증대되었다고 Bosch 등 [10]이 보고하였다. 양 등 [3]은 자가골수와 자가 fibrin glue를 복합이식 한 실험에서 골수만을 단독으로 투여한 경우보다 골형성이 현저하게 일어나는 것을 관찰 하였고, 이것은 fibrin glue가 초기 창상치유 및 신생혈관의 형성을 촉진시킬 뿐만 아니라 골수세포를 일찍이 고정시키면서 골결손부에 틀로 작용하여 골형성을 촉진시킨 것이라고 보고하였다.

그러나 Albrektsson 등 [6]은 개를 이용한 실험에서 fibrin glue가 골형성을 촉진시키는 것을 발견하지 못하였다고 발표하면서 토끼의 부착성 골성장율이 사람이나 개에 비해 월등히 뛰어나기 때문에 fibrin glue가 골형성에 직접 관여하기보다는 골연골 골편을 고정함으로써 창상치유와 신생혈관 형성을 촉진시킨 결과로 평가하였다.

본 실험에서는 fibrin glue를 단독 투여한 14예 중 7예(50%)에서 신생골이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 중 5예에서는 2~4주째에 가골이 형성되기 시작하여 6~8주째에 유합이 일어나기 시작하였다. 이것은 fibrin glue가 초기 골결손부의 신생골형성에 중요한 역할을 한 것으로 사료된다.

BALP는 Rosalki와 Foo [25]가 개발한 이후로 골아세포의 활성도 측정에 사용되어 왔다 [1, 4, 5, 19]. BALP의 측정은 골아세포의 골형성 과정에서 분비되는 ALP에 포함되어 있는 당단백인 N-acetylglucosamine이 wheat germ lectin과 결합하는 성질을 이용한 방법으로 본 연구자들의 실험 [1, 4, 5]에서 다른 방법들 보다 더 효과적인 방법으로 인정되었으며 BALP의 변화와 골아세포의 활성도 사이에 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서도 유합이 일어난 7예의 4두에서 가골이 형성되기 시작하는 2주에 BALP의 농도가 17.53 IU/L에서 97.10 IU/L로 453.96%의 변화율을 보였다. 이후 점차 감소하였다가 8주에 29.47 IU/L에서 10주에 44.26 IU/L로 152.53% 증가하였는데 이것은 10주에 가골이 형성되기 시작한 1두의 영향으로 사료된다. 이에 반해 유합이 일어나지 않은 예와 생리식염수를 주입한 예의 BALP는 큰 변화 없이 일정한 변화를 나타내고 있었다. BALP의 변화는 방사선학적 관찰의 결과와 유사한 소견을 보이며 fibrin glue가 실험적 골결손 부위의 신생골 형성에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Fibrin glue의 주요 성분인 fibrinogen의 제조방법은 그 침강방식에 따라 황산암모늄 침강법, Polyethylene glycol 침강법, 냉동 침강법, Glycine 침강법 그리고 Ether 침강법과 Ethanol 분할법 등이 있으나 이들은 혈액에서 fibrinogen을 분리하는 이론적인 방법들이고 실제 임상에서 사용되는 방법은 한정되어 있다 [2, 12, 15, 27]. 황

산암모늄 침강법은 가장 먼저 임상에 응용된 자가 fibrin glue의 제조 방법으로 박 및 차 [2, 23]는 이 방법을 이용하여 혈장 fibrinogen 농도를 약 8배 농축하였으며 본 실험에서도 이 방법을 이용하여 수 초안에 fibrin 응괴를 얻을 수 있었다. 자가 fibrin glue는 수술 받을 환경의 혈액을 이용하는 제제이므로 바이러스성 간염 등의 잠재적인 감염성 질환에 노출되거나 면역반응을 일으킬 위험이 없고, 저장에 따른 문제점이 없을 뿐만 아니라 실온에서도 비교적 간단히 만들 수 있으며 상품화된 fibrin glue에 비해 가격이 저렴한 것 등이 장점이다. 그러나 농축된 fibrinogen을 얻기 위해서는 최소 9 ml 이상의 혈액이 필요하므로 어린 개나 몸집이 작은 개에서는 문제가 될 수 있으며 혈액 질환이 있는 경우에도 제조가 불가능하고, 상품화된 fibrin glue에 비해 fibrinogen의 농도가 낮고 순도가 떨어지는 것 등이 단점이다 [2, 3].

본 연구에서 자가 fibrin glue를 실험적 골결손 부위에 이식하여 초기에 신생골이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이것은 fibrin glue가 초기 창상치유와 신생혈관의 형성에 관여하면서 골절 골의 초기 치유단계에 영향을 미쳐 신생골의 형성을 촉진시킨 것으로 생각된다. 동물의 골형성 능력은 골의 크기와 두께에 따라 큰 차이가 있으므로 비골이 아닌 다른 부위에서 fibrin glue의 신생골 형성에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

자가 fibrin glue가 골 결손부에서 신생골의 형성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 개의 비골간부를 실험적으로 결손시키고 자가 fibrin glue를 이식하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 공시동물로부터 얻은 소량의 혈액을 이용하여 자가 fibrinogen을 얻을 수 있었고, 이를 이용하여 자가 fibrin glue를 제작할 수 있었다.

(2) 방사선학적 검사에서 자가 fibrin glue를 이식한 개 7마리의 14예 중 7예(50%)에서 신생골이 형성된 것을 관찰할 수 있었다.

(3) 혈청화학적 검사에서 자가 fibrin glue를 이식한 군에서 2주에 BALP의 농도가 최고치를 나타내어 골아세포가 활성화되었음을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 개에서 자가 fibrin glue는 골 결손부위에서 신생골의 형성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김남수, 최인혁. 골형성 지표로써 bone alkaline

phosphatase(BALP)와 TALP치에 대한 BALP치 비율(B/T)의 응용. 대한수의학회지 1999, **39**, 1197-1209.

2. 박문서, 차창일. 황산암모늄 침강법에 의해 제조된 자가 Fibrin접착제에 대한 생화학적 연구. 한이인지 1989, **32**, 547-557.

3. 양규현, 김남현. 자가 Fibrin으로 고정하여 이식한 자가골수세포가 골결손 치유에 미치는 영향. 대한정형외과학회지 1991, **26**, 1289-1304.

4. 조성진, 김남수, 최인혁. 정상적인 개에서의 Serum Bone Alkaline Phosphatase의 활성치. 한국임상수의학회지 1997, **14**, 65-69.

5. 최인혁, 이종일. 동결건조한 산양뼈의 개이식 효과. 한국임상수의학회지 1998, **15**, 442-449.

6. Albrektsson T, Bach A, Edshage S, Jonsson A. Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate. Acta Orthop Scand 1982, **53**, 757-763.

7. Arbes H, Bosch P, Lintner F, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.). Arch Orthop Traumat Surg 1981, **98**, 183-188.

8. Arce AA, Garin DM, Garcia VM, Jansana JP. Treatment of radial head fracture using a fibrin adhesive seal. J Bone Joint Surg (Br). 1995, **77**, 422-424.

9. Berh W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin : a simplified method and its clinical plausibility. Clin Chem 1986, **10**, 1960-1966.

10. Bosch P, Lintner F, Arbes H, Brand G. Experimental investigations of the effect of the fibrin adhesive on the Kiel heterologous bone graft. Arch Orthop Traumat Surg 1980, **96**, 177-185.

11. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. Biomaterials 1997, **18**, 235-242.

12. DePalma L, Criss VR, Luban NLC. The preparation of fibrinogen concentrate for use as fibringlue by four different methods. Transfusion 1993, **33**, 712-720.

13. Fishman WH. Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. Am J Med 1974, **54**, 617-650.

14. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. Plast Reconstr Surg 2000, **105**, 953-963.

15. Jarzem P, Harvey EJ, Shenker R, Hajipavlou A. The effect of fibrin sealant on spinal fusions using allograft in dogs. Spine 1996, **21**, 1307-1312.

16. Kania RE, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L,

- Petite H.** Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: Long-term study in rabbit femoral defect model. *J Biomed Mater Res* 1998, **43**, 38-45.
17. **Kaplonyi G, Zimmerman I, Frenyo AD, Farkas T, Nemes G.** The use of fibrin adhesive in the repair of chondral and osteochondral injuries. *Injury* 1988, **19**, 267-272.
18. **Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson III WH.** Role of platelets and fibrin in the healing sequence *Ann Surg* 1982, **196**, 379-388.
19. **Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li CK, Lee KM.** Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg* 1993, **75**, 288-292.
20. **Lasa JrC, Hollinger J, Drohan W, MacPhee M.** Delivery of demineralized bone powder by fibrin sealant. *Plast Reconstr Surg* 1995, **96**, 1409-1417.
21. **Lucht U, Bunger C, Moller JT, Joyce F, Plenck JrH.** Fibrin sealant in bone transplantation. *Acta Orthop Scand* 1986, **57**, 19-24.
22. **Matsumoto K, Kohmura E, Kato A, Hayakawa T.** Restoration of small bone defects at craniotomy using autologous bone dust and fibrin glue. *Surg Neurol* 1998, **50**, 344-346.
23. **Park MS, Cha CI.** Biochemical aspects of autologous fibrin glue derived from ammonium sulfate preparation. *Laryngoscope* 1993, **103**, 193-196.
24. **Reiss RF, Oz MC.** Autologous fibrin glue : production and clinical use. *Transfusion Medicine Reviews* 1996, **10**, 85-92.
25. **Rosalki SB, Foo AY.** Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984, **7**, 1182-1186.
26. **Schwarz N, Redl H, Zeng L, Schlag G, Dinges HP, Eschberger J.** Early osteoinduction in rats is not altered by fibrin sealant. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1993, **293**, 353-359.
27. **Yoshida H, Kamiya A.** A quicker preparation method for autologous fibrin glue. *Biol Pharm Bull* 1998, **21**, 1367-1370.