

소심낭 절편의 무세포화와 알코올 전처치를 포함한 여러 고정 처리법 시행 후 석회화 경감 효과 관찰 연구

황성욱* · 김용진** · 김수환*** · 최승화***

Anti-calcification Effects in Decellularized and Variously Fixed Bovine Pericardium

Seong Wook Hwang, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.**, Soo Hwan Kim***, Seung-Hwa Choi***

Background: Our goal was to evaluate anti-calcification effects of decellularization and diverse fixing methods including preincubation of the bovine pericardium with ethanol. We also assessed changes in mechanical properties. **Material and Method:** Harvested bovine pericardium was decellularized with 0.25% sodium dodecylsulfate and then treated with 5 methods of fixation: ① 0.5% glutaraldehyde (GA) for 14 days, ② 0.5% GA for 5 days, 2% GA for 2 days and 0.25% GA for 7 days, ③ 0.5% GA for 5 days, 2% GA for 2 days, 0.25% GA for 7 days, and then 70% ethanol for 2 days, ④ 0.5% GA for 5 days, a mixture of 2% GA and 70% ethanol for 2 days, and 0.25% GA for 7 days, ⑤ 0.5% GA for 5 days, a mixture of 2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days and then 0.25% GA for 7 days. All treated bovine pericardia were tested for histological variables, lipid content, and mechanical properties including tensile strength and thermal stability. A total 10 kinds of differently treated bovine pericardia were implanted into rat subdermis and harvested 8 weeks later. Harvested pericardia were evaluated for calcium content. **Result:** No protein denaturation was observed microscopically after decellularization. There was a 32% mean decrease in tensile strength index after decellularization in the bovine pericardium group fixed. Octanediol preincubation attenuated the decrease in tensile strength and maintained thermal stability. TG and cholesterol were not affected by decellularization but were decreased by organic solvent. Calcium content was decreased after decellularization, and organic solvent preincubation decreased calcification in the non-decellularized bovine pericardium group. **Conclusion:** Decellularization and organic solvent preincubation have anti-calcification effects but decellularization may cause mechanical instability. A method of decellularization and fixation that does not cause damage to matrices will be needed for evaluation of the next step in using tissue-engineering for replacement of cardiac valves.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:235-245)

- Key words:** 1. Tissue engineering
2. Glutaraldehyde
3. Pericardium
4. Calcification

*분당서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Bundang Hospital

**서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

***서울대학교병원 이종장기이식센터

Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A040004-008).

논문접수일 : 2009년 9월 28일, 논문수정일 : 2010년 2월 17일, 심사통과일 : 2010년 3월 9일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-5200, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

심장 수술에서 여러 선천성 기형의 결손 교정과, 조직 판막의 판막염으로 이용하기 위하여, 우심낭은 여러 가지 상업적 제품으로 사용되고 있다. 우심낭을 사람 체내에 이식하기 위해서는 면역성을 낮추고, 일정 이상의 강도를 유지하며, 또한 체내 효소에 의한 분해를 늦추기 위해 단백질의 고정화 필요하다. Collagen 고정을 위해서 glutaraldehyde (GA)에 의한 고정방법이 가장 많이 사용되고 있으나[1], 고정된 우심낭을 사람 체내에 이식하는 경우에도 그 수명은 제한적이며, 가장 많은 원인은 이식한 우심낭편의 석회화이다[2]. 우심낭편을 이용한 조직판막의 경우 비석회화적 손상의 원인으로 판막염에 가해지는 응력, 간세포(interstitial cell)와 상피세포의 부재로 인한 판막조직 재생의 실패 등을 들 수 있으나 석회화적 손상과 비석회화적 손상은 서로 공동작용의 효과가 있을 수 있다[3].

석회화의 원인은 다양하며, 숙주의 대사, 혈액학적 원인과 이식편의 요소 등의 원인으로 나눌 수 있다[3]. 이 중 이식편 측 요소가 석회화에 기여하는 원인에 대해서 가장 광범위한 연구가 이루어져 있으나 아직까지 절대적 인과 관계가 명확한 원인은 밝혀지지 않았다. 널리 받아들여지고 있는 가설로서는 고정 시의 세포의 괴사와 이로 인한 칼슘대사의 정지, 칼슘이온의 세포 내 유입과, 인지질과의 결합에 의한 수동적 석회화의 이론이 있다[3]. 그러나 최근 다시, 이식편에 대한 면역거부 반응이 석회화의 시작과 밀접하게 연관되어 있음이 보고되기도 하였다[4].

석회화 기전에는 여러 원인이 복합적으로 작용하는 것으로 생각되나, 이식편의 무세포화는 면역반응 감소와 칼슘결정의 초기 생성 방지를 기대할 수 있는 방법이다. 이식편의 무세포화를 위해서는 기존에 사용되고 있는 용제로는 SDS, Triton X-100, Tween-20, MEGA 10, Deoxycholate 등이 있으며 이 중 SDS는 안정된 이식편의 세포 제거 능력을 보이고 있으나, 고농도로 사용 시 조직 내 기질에 대한 손상도 보고되어 있다[5,6].

에탄올을 GA로 고정된 이식편에 전처리함으로써 이식편 석회화를 방지할 수 있음을 보고한 예가 있으며, 이는 고정 후 남아 있는 세포 잔해 등의 인지질을 제거함에 기인하는 것으로 생각된다[7].

기존의 연구에서는 기왕의 고정되어 있는 조직이나 신선 조직을 무세포화하여 그 기계적 특성과 항석회화 효과를 관찰하는 것이 대부분이었으나, 저자 등은 우심낭을 무세포화한 후 고정을 병행하고, 신선 우심낭의 고정 후

와 비교하여, 각각의 기계적 특성을 측정하고 생체 내에 이식한 후 석회화의 정도를 측정하였다. 또한 고정 시 ethanol과 octanediol를 사용한 유기용매 처치를 시행한 군도 추가함으로써 이식편의 GA 고정 시 알코올 전처치가 끼치는 영향도 평가하였다.

대상 및 방법

1) 이종 이식 보철편의 채취

도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 소를 도살 직후 심낭을 적출하여 차가운 phosphate buffered solution (PBS, 0.1 M, pH 7.4, 4°C)에 담가 아이스박스에 넣어 실험실로 이동하였다.

2) 무세포화 처리(decellularization)

실험실에 도착 즉시 심낭 주변의 지방 조직과 심근을 깨끗이 제거한 후 우심낭의 무세포화 처리를 위해 회전분탕기(rotator shaker) 내의 저장성 용액(Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.05%; aprotinin, 5 KIU/mL; Neomycin trisulfate 50 mg/L; pH 8)에 분당 200회의 constant shaking 상태로 12시간 동안 담가둔 후, 0.25% SDS를 첨가한 6~8°C의 저장성용액에 분당 200회의 constant shaking 상태로 24시간 동안 담가두었다. 이후 4°C의 고정성 용액(Tris, 100 mmol; NaCl, 0.3 mol; pH 8.0)에 12시간 담가 둔 후 4°C의 등장성 용액(Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; EDTA, 0.05%; aprotinin, 5 KIU/mL; Neomycin trisulfate 50 mg/L; pH 8)에 constant shaking 상태로 12시간 동안 저장하였다. 저장성과 등장성 용액에는 단백질분해효소의 억제제를 위해 aprotinin과 EDTA, Neomycin trisulfate를 투여하였다.

3) 고정 및 유기용매(Ethanol, Octanediol) 처리

무세포화 처리를 시행한 우심낭과 무세포화 처리를 시행하지 않은 우심낭을 각각 5가지의 방법으로 고정하여 분류하였다. ① 0.5% GA로 2주간 처리한 군과, ② 0.5% GA로 5일간 처리한 후 2일간 2% GA와 7일간 0.25% GA로 순차적으로 처리한 군, ③ 0.5% GA로 5일간 처리하고 2일간 2% GA와 7일간 0.25% GA로 순차적으로 처리한 후 70% 에탄올에서 2일간 처리한 군, ④ 0.5% GA로 5일간 처리하고 2% GA와 70% 에탄올의 혼합액으로 2일간 처리한 후, 0.25% GA로 7일간 처리한 군, 그리고 ⑤ 0.5% GA로 5일간 처리하고 2% GA, 65% 에탄올 그리고 5% octa-

nediol의 혼합액으로 2일간 처치한 후, 0.25% GA로 7일간 처치한 군의 상기 다섯 가지 방법으로 처리한 군으로 구분하였다. ③, ④, ⑤의 방법에서는 유기용매 처치 후 Hanks' solution으로 1시간 처치 후 다음 과정을 시행하였으며 모든 처치는 상온에서 시행하였다. 처치 후 심낭편은 0.25% GA액에 저장하였다.

4) 광학 현미경 검사

각각의 처치가 끝난 심낭편은 10% 포르말린 용액에 후 고정된 후 파라핀포매 조직을 만들어 2~4 μ m 절편으로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 기계적 특성에 대한 검사

각각의 처치된 우심낭편에 대하여 한 군 당 각각 5개의 5×50 mm 장방형 절편을 취하여 폭 5 mm에 대한 인장강도를 측정하였다. 장력의 측정은 Automated Materials Testing System with Digital Force Gauge (Model 5FGN, Japan Tech & Manufacture)를 사용하여 100 mm/min의 속도로 심낭절편 양측을 신장하여 끊어질 때 나타난 값을 그 심낭절편의 장력(tensile strength)으로 하였으며 단위는 "Kg/width 5 mm"로 표시하였다. 두께 측정 시, 각각의 심낭편을 장력 측정 전 캘리퍼스 Mitutoyo Thickness Gauge (Digital 543-122-15, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 양쪽 끝과 그 중간의 두께를 측정하여 세 값의 평균을, 측정된 심낭편의 두께 값이 되도록 하였다.

Thermal stability 검사의 경우 shrinkage temperature test의 방식을 취하였는데, 분당 2°C 상승하도록 만든 생리 식염수가 담겨있는 욕조에서 8×10 mm의 절편에 일정한 부하를 유지시킨 후 온도 상승 시 1%의 길이 단축이 있는 온도를 그 값으로 정하였다.

6) 지질의 측정

각각의 처치가 끝난 우심낭편을 homogenized 한 후, 2 : 1 chloroform/methanol을 이용하여 지질을 추출하여 중성지방과 콜레스테롤 양을 측정하였다.

7) 석회화 정도의 측정

각각의 처치가 끝난 우심낭편에서 6개씩 1.5 cm 크기의 원형 절편을 만들었다. 주령 6주 정도의 150~200 그램 무게가 나가는 암컷 Sprague-Dawley rat을 0.2 cc Zoletil과 0.1 cc Rompun 복막주사를 통하여 마취를 시행하고, 제모를

시행한 배부에 피부절개를 가한 후 피하조직에 우심낭편을 이식하였다. 심낭편 이식 8주가 지난 후 Thiopental 복막주사를 통하여 안락사 시킨 후 이식하였던 절편을 채취하였다. 채취한 절편을 건조하고 칼슘을 추출한 후, atomic absorption spectrophotometer를 사용하여 그 양을 측정하였다. 대조군은 무세포화 처치를 시행하지 않고 0.5% GA에 고정된 심낭편의 칼슘 양을 이용하였다.

8) 통계 방법

각 군 간의 통계적 차이는 기계적 특성의 경우, 무세포화를 시행한 그룹과 시행하지 않은 그룹 안에서 각각 비모수적 방법으로 Kruskal Wallis test를 시행하였으며, one way ANOVA post-hoc test (Turkey test)로 다중비교를 하였다. 동일한 고정방법으로 처리한 무세포화를 시행한 군과 시행하지 않은 군끼리 비모수적 방법으로 Mann-Whitney test를 통해 그 차이를 검증하였다. 심낭편의 두께와 장력의 관계는 Spearman 상관 분석을 2개의 그룹에서 각각 시행하였다. 지질과 칼슘의 양은 전체 군과 무세포화를 시행한 군, 그리고 무세포화를 시행하지 않은 군에서 각각 비모수적 방법으로 Kruskal Wallis test를 시행하고, one way ANOVA post-hoc test (Turkey test)로 다중비교를 하였다.

결 과

1) 무세포화 전후의 우심낭편의 조직학적 검사

무세포화를 시행한 모든 우심낭 군에서 세포를 찾을 수 없었다. 고정 시 GA 농도와 유기용매 투여 여부의 차이를 두었으나 이에 따른 기질 내 단백질 변성은 관찰되지 않았고, 무세포화 처치 시 단백질 간의 치밀도가 떨어지는 양상을 보였으나 특이적이지는 않았다(Fig. 1).

2) 무세포화 전후의 우심낭편의 기계적 특성(Table 1)

무세포화를 시행하지 않은 심낭편에서는 두께와 장력이 고정 방법에 따라 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으며($p < 0.05$) 다중 비교를 통해서 비교하였을 때, 장력의 경우 4군은 다른 모든 군과 유의한 차이가 있었고($p < 0.001$), 3군과 5군 사이에도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). 두께의 경우 5군이 다른 모든 군에 비해 유의하게 두터웠으며($p < 0.001$), 두께와 장력은 연관성이 있는 것으로 검증되었다($p < 0.05$, $r = 0.565$). 무세포화를 시행하지 않은 심낭편에서는 고정 방법에 따라 thermal stability test 결과에는 차이가 없었다(Fig. 2).

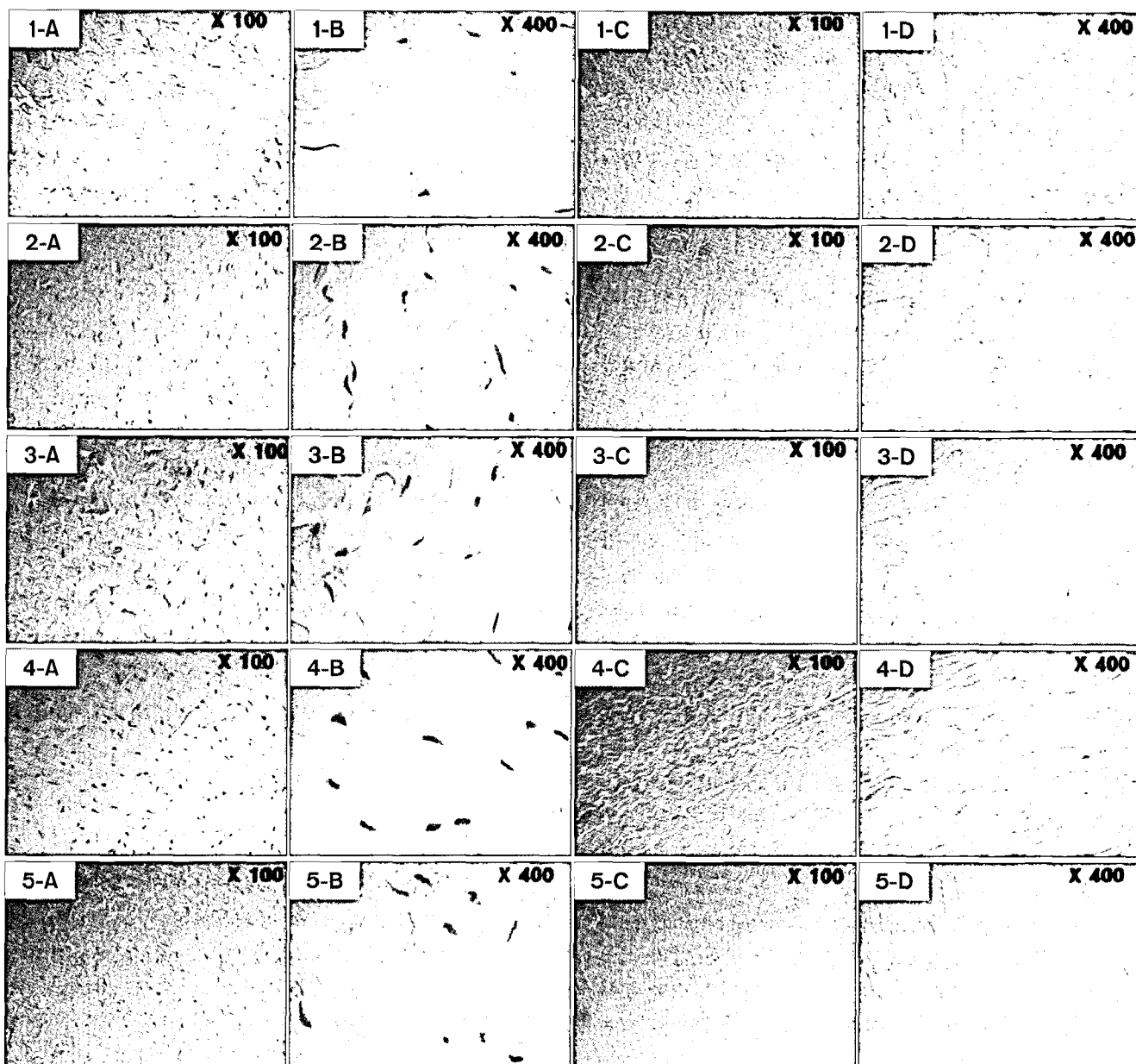


Fig. 1. H-E stain ($\times 100$, $\times 400$) of bovine pericardium with diverse methods of fixation. There was no visible cell in decellularized bovine pericardium group. No specific matrix derangement was noticeable either. (A, B) Not decellularized pericardium. (C, D) Decellularized pericardium.

(1) 0.5% GA for 7 days \rightarrow 0.25% GA for 7 days.

(2) 0.5% GA for 5 days \rightarrow 2% GA for 2 days \rightarrow 0.25% GA for 7 days.

(3) 0.5% GA for 5 days \rightarrow 2% GA for 2 days \rightarrow 0.25% GA for 7 days \rightarrow 70% ethanol for 2 days.

(4) 0.5% GA for 5 days \rightarrow 2% GA and 70% ethanol for 2 days \rightarrow 0.25% GA for 7 days.

(5) 0.5% GA for 5 days \rightarrow 2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days \rightarrow 0.25% GA for 7 days.

무세포화를 시행한 심낭편에서도 두께와 장력은 연관성이 있는 것으로 나타났으며($p < 0.001$, $r = 0.855$), 각 심낭편

은 고정 방법에 따라 두께와 장력의 차이가 있었다($p < 0.001$) (Fig. 3). 고정 방법에 따라 분류한 군을 다중비교하

Table 1. The average thickness and tensional strength of bovine pericardia (n=5 in each group)

	Thickness (mm)		Tensional strength (kgf/5 mm)	
	No decell	Decell	No decell	Decell
1	0.36±0.03	0.32±0.03	3.16±0.45	1.05±0.14
2	0.38±0.01	0.29±0.04	3.44±0.23	1.65±0.64
3	0.39±0.03	0.28±0.01	3.09±0.63	0.69±0.09
4	0.38±0.06	0.23±0.02	1.13±0.48	0.37±0.14
5	0.54±0.07	0.42±0.02	3.91±0.24	2.81±0.59

1=0.5% GA for 7 days→0.25% GA for 7 days;
 2=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days;
 3=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days→70% ethanol for 2 days;
 4=0.5% GA for 5 days→2% GA and 70% ethanol for 2 days→0.25% GA for 7 days;
 5=0.5% GA for 5 days→2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days→0.25% GA for 7 days.
 Decell=Decellularization.

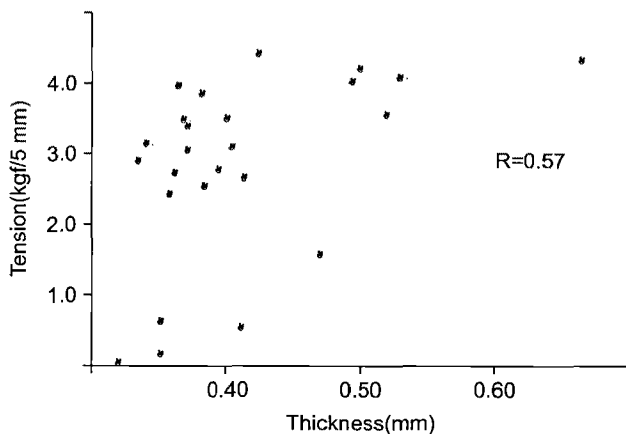


Fig. 2. Relationship between thickness and tensile strength in the non-decellularized bovine pericardium group after fixation.

였을 때, 장력의 경우, 10군이 다른 모든 군과 유의한 차이가 있었으며(p<0.05), Thermal stability test 결과 10군과 9군 간에 유의한 차이가 있었다(p<0.05).

동일한 고정 방법을 사용하였을 때 장력의 비교는 두께의 보정을 위해 index값을(장력/두께, kgf/5 mm/mm) 사용하였으며, 무세포화를 시행하는 경우 4, 5번을 제외한 고정 방법에서 유의한 장력의 변화가 있는 것으로 나타났다(p<0.05). 또한 고농도의(2%) GA로 고정시키는 경우와

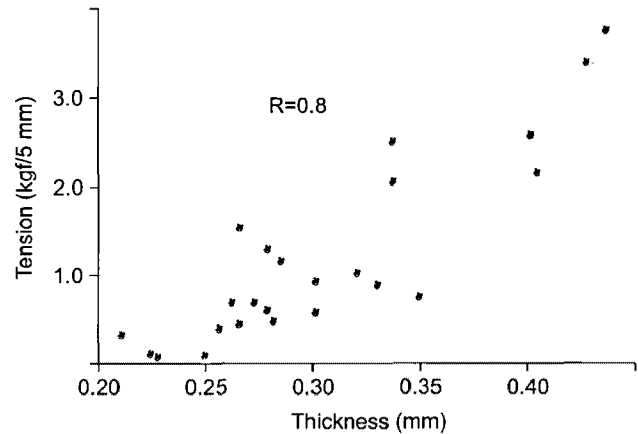


Fig. 3. Relationship between thickness and tensile strength in the decellularized bovine pericardium.

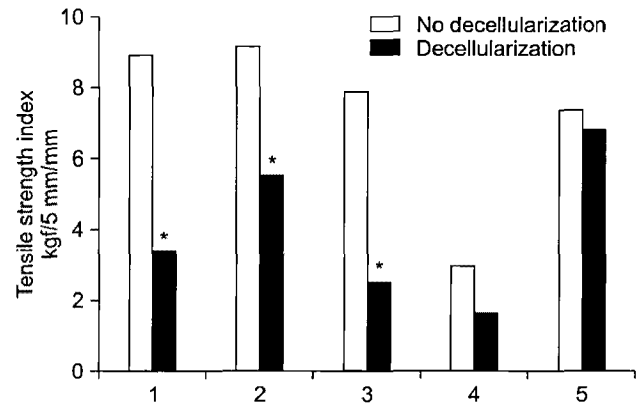


Fig. 4. The change of tensile strength index by decellularization. If octanediol treatment was added, there was remarkable reduction in decrease of tensile strength.

1=0.5% GA for 7 days→0.25% GA for 7 days;
 2=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days;
 3=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days→70% ethanol for 2 days;
 4=0.5% GA for 5 days→2% GA and 70% ethanol for 2 days→0.25% GA for 7 days;
 5=0.5% GA for 5 days→2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days→0.25% GA for 7 days.

*p<0.05.

octanediol을 투여하는 두 가지 경우를 제외하고 유의한 thermal stability의 감소가 있었다(Fig. 4, Table 2).

무세포화는 동일한 고정 방법을 사용하였을 때 우심낭에 평균 32% 정도의 장력의 감소를 가져오는 것으로 나타났다으며, (8~68%) octanediol을 투여하는 경우 무세포화

Table 2. The change of thermal stability after decellularization (n= 5 in each group)

		No decellularization	Decellularization
Thermal stability °C	1	78.5±2.24	75±0*
	2	77±2.09	76±1.37
	3	79±2.85	75.5±1.12*
	4	78±1.12	74±2.24*
	5	77.5±1.77	77.5±1.77

1=0.5% GA for 7 days→0.25% GA for 7 days;
2=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days;
3=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days→70% ethanol for 2 days;
4=0.5% GA for 5 days→2% GA and 70% ethanol for 2 days→0.25% GA for 7 days;
5=0.5% GA for 5 days→2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days→0.25% GA for 7 days.
*p<0.05.

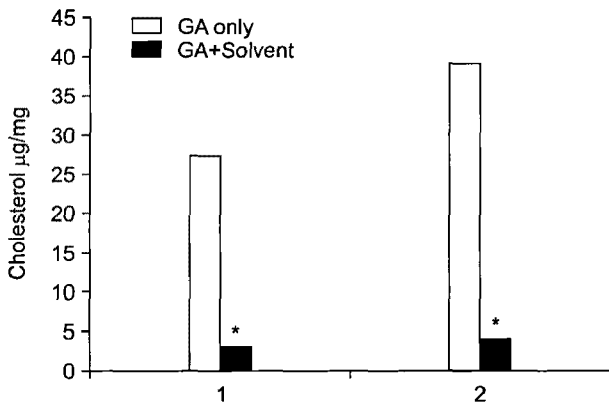


Fig. 5. The change of cholesterol content by addition of solvent. In the case of organic solvent treatment, there was statistical decrease of cholesterol amount. 1=Non-decellularized group; 2=Decellularized group. GA=Glutaraldehyde. *p<0.05.

시 장력이 떨어지는 것을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다, 또한 octanediol 투여나 고농도의 GA 처치를 하지 않는 경우 thermal stability도 감소하는 것으로 나타났다.

3) 무세포화 전후의 우심낭편의 지질량

지질량을 비교할 때 유기용매 처치의 효과를 보기 위하여, 무세포화를 시행하거나 시행하지 않은 2개의 그룹 안에서, GA만으로 고정된 군과 유기용매를 처치한 군 2개의 군으로 각각 나누어 총 4개의 군을 비교하였다. 유기용매

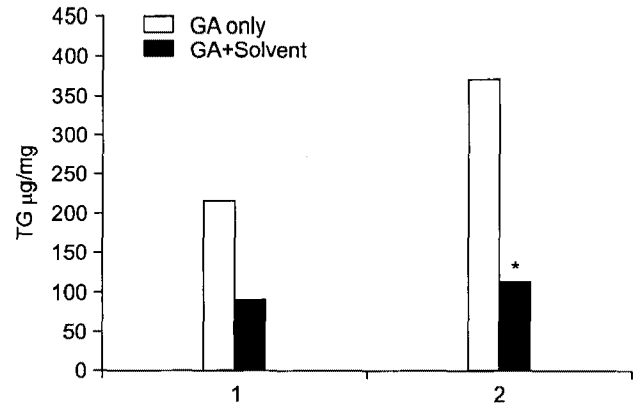


Fig. 6. The change of Triglyceride content by addition of solvent. In the group of decellularized bovine pericardium, there was a decrease of triglyceride amount if organic solvent was added. 1=Non-decellularized group; 2=Decellularized group. GA=Glutaraldehyde. *p<0.05.

Table 3. The change of calcium amount after decellularization (n= 5 in each group)

		No decellularization	Decellularization
Calcium µg/mg	1	49.76±16.79	7.80±14.87*
	2	55.68±10.41	9.96±17.45*
	3	20.02±26.56	1.26±0.56
	4	28.00±27.03	6.56±11.66
	5	18.94±25.04	0.82±0.15

1=0.5% GA for 7 days→0.25% GA for 7 days;
2=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days;
3=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days→70% ethanol for 2 days;
4=0.5% GA for 5 days→2% GA and 70% ethanol for 2 days→0.25% GA for 7 days;
5=0.5% GA for 5 days→2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days→0.25% GA for 7 days.
*p<0.05.

를 처치하는 경우 무세포화와 상관없이 콜레스테롤의 감소가 관찰되었으며, 중성지방의 경우 무세포화를 시행한 그룹에서만 그 값이 감소하였다. 무세포화를 시행한 후 중성지방과 콜레스테롤의 양이 오히려 늘어나는 양상을 보였으나 통계적 의미는 없었으며, octanediol 전처치를 시행한 경우, 무세포화 처치된 우심낭 그룹 안에서 유기용매 처치를 시행하지 않은 군에 비해 유의하게 지질량이 감소되었다(p<0.05)(Fig. 5, 6).

Table 4. Comparison of calcium contents by p-value between each group

$\mu\text{g}/\text{mg}$	1	2	3
	52.72±13.53	22.32±24.63	8.88±15.33
1			
52.72±13.53			
2	<0.001		
22.32±24.63			
3	<0.001	ns	
8.88±15.33			
4	<0.001	<0.05	ns
2.88±6.80			

1=No decellularization+GA only treatment;
2=No decellularization+GA, solvent treatment;
3=Decellularization+GA only treatment;
4=Decellularization+GA, solvent treatment.
GA=Glutaraldehyde.

4) 이식된 우심낭편의 석회화

유기용매를 투여하지 않고 GA만으로 고정을 시행하였을 때 무세포화 처치가 석회화 정도를 낮추는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 0.5% GA 처치만을 시행한 군을 대조군으로 비교하였을 때 무세포화 처치를 시행한 모든 군에서 석회화의 감소를 보였으며, 이는 고농도의 GA 처치를 시행한 군에 대해서도 같은 양상을 보였다.

무세포화 처리를 시행하지 않은 그룹에서 유기용매 전처치를 시행하는 경우 석회화 정도가 줄어드는 것으로 관찰되었다. 무세포화 처리를 시행한 그룹 안에서 유기용매 전처치는 의미 있는 항석회화 효과를 보이지 않았으며 이는 무세포화 처리에 의해 유기용매의 항석회화 효과가 감소되었기 때문일 것으로 생각된다(Table 3, 4, Fig. 7).

고 찰

면역 거부 반응은 동종이식편 이식 후 조기실패의 원인으로 지목되어 왔으며 세포막에서 발현하는 항원에 대한 면역 반응을 없애기 위해, 동종이식편의 무세포화에 대한 활발한 연구가 이루어져 왔다[8-11]. 냉동보관되거나 신선 상태에서 무세포화 후 이식되는 동종이식편과 달리 이종이식편을 사람의 생체에 이식하기 위해서는, 단백질을 고정하는 과정을 거치게 되는데 이 과정의 목표는 살균을 하고 항원성을 낮추는 외에, 체내에서의 자가분해를 늦추고 물질적 안정성을 강화하여 그 수명을 늘리고자 함에 있

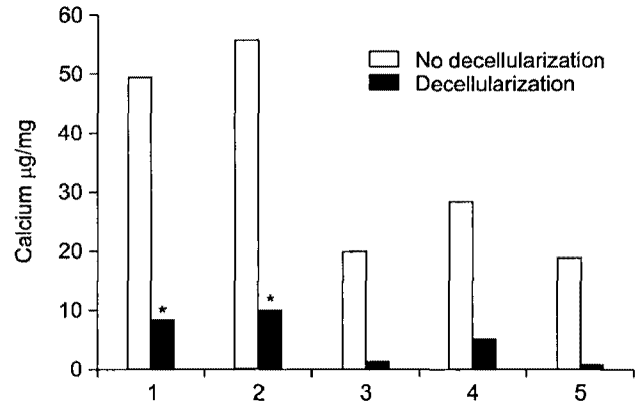


Fig. 7. Calcium contents in each bovine pericardium group. Decellularization showed anti-calcification effect ($n=5$ in each group).
1=0.5% GA for 7 days→0.25% GA for 7 days;
2=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days;
3=0.5% GA for 5 days→2% GA for 2 days→0.25% GA for 7 days→70% ethanol for 2 days;
4=0.5% GA for 5 days→2% GA and 70% ethanol for 2 days→0.25% GA for 7 days;
5=0.5% GA for 5 days→2% GA, 65% ethanol, and 5% octanediol for 2 days→0.25% GA for 7 days.

* $p < 0.05$.

다[3]. GA (1,5-pentanedialdehyde; $\text{CHO}[\text{CH}_2]_3\text{CHO}$)는 현재 이종조직의 고정에 가장 많이 쓰이는 물질이며 친수성과 소수성의 양가성을 가진 알데하이드(aldehyde)로, 단백질의 Lys 또는 Hyl residues의 ϵ -amino group과 반응하여 collagen과 collagen 사이 또는 collagen 내의 교차결합 반응을 만듦으로써 조직을 고정시킨다[1]. Glutaraldehyde (GA)로 고정된 조직은 신선 조직에 비해서 경도가 높아지고[12], 그와 동시에 장력에 대한 신전도가 늘어난다[13]. 또한 GA는 살균 능력과 함께 세포독성이 있으며, 이는 이식편의 고정 시 세포를 괴사시킬 뿐 아니라 이식 후 숙주 결체조직 세포의 침윤을 막고, 주위 조직에 흘러나와 손상을 줄 수 있으며[14], 고정 시 결합하지 않은 aldehyde 기가 직접 칼슘과 결합하여 석회화의 원인이 될 수도 있다[15]. 이를 막기 위해, 저장 시 일반적으로 사용하는 저농도의 GA 이외의 물질을 사용하거나[16], 고정 후 세척을 철저히 하는 외에 GA를 중화하기 위한 여러 가지 방법들이 고안되었다[17].

이종이식편을 사용한 조직판막의 경우 10년 안에 반수 이상에서 재수술이 필요하며 그 원인은 판막의 석회화와 비석회화적 손상이 있고, 이 두 가지 요인은 동반되어 상

호 상승의 효과가 있다. 석회화의 원인에는 이식편 요소, 숙주 요소, 기계적 요소가 있으며 기계적 원인으로는 판막엽에 가해지는 전단력, 판막엽의 증가된 응력과 불균등한 응력의 작용, 그로 인한 판막엽의 손상 등을 들 수 있고 이는 다시 이식편의 괴사된 세포, 잔류 세포 조직, 항원성 등의 요소와 상승하여 석회화를 가속화시킨다. 이러한 석회화에 기인하는 기계적 요인을 제거하기 위하여 GA 고정 시 다양한 장력을 가하는 방법이 고안되었다[18].

석회화의 원인 중 하나인 숙주 요소의 예로는 어린 동물에게 이식된 이식편의 조기 부전을 들 수 있다. 이는 항진된 칼슘대사가 원인이 될 수 있으며, 또한 면역반응이 석회화에 개입하는 간접 증거가 될 수 있다[19].

석회화의 과정은 초기의 nucleation phase 또는 intrinsic calcification과, 이후의 crystal formation 또는 extrinsic calcification의 시기로 나눌 수 있다. 초기 intrinsic calcification은 괴사된 세포 내로 세포 외 고농도의 칼슘의 유입과 이후 세포막, 핵, 세포기관들에 있던 인지질과의 결합을 통해서 칼슘결정이 만들어지고 이후 extrinsic calcification의 시기에서는 칼슘결정들의 성장과 결합을 통해서 기질 내 단백질의 석회화까지 진행된다. 초기 석회화에서 칼슘의 유입은 고정, 허혈, 처치 중의 손상 등에 의해 괴사된 결체조직 세포에서 시작되며 이는 수동적 반응으로 생각할 수 있으나, 그 외에 세포 괴사와 더불어 칼슘 침착에 대해 면역거부 반응이 관여할 가능성을 생각할 수 있다. 이종 이식편에 대한 면역거부 반응의 우려는 조직판막 이식을 시행한 초기부터 있었으나, 이후 수동적 석회화 이론이 일반적으로 받아들여졌다. 이로 인해 GA를 대체하는 고정 방법에 대한 광범위한 연구가 이루어졌으며, 그 연구에는 carbodiimide, 1-ethyl-3-(3 dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), hexamethylene diisocyanate hexamethylene diisocyanate (HMDC), Diamine, Glycerol, Epoxy compound 등의 매체에 의한 단백질의 교차결합 방법과 Hydrothermal method, 자외선 조사 염료매개의 광산화 등의 대체 고정 방법이 있다. 또한 GA 중화 작용을 통해 석회화를 억제하기 위하여 3가 금속 양이온, protamine sulfate, L-glutamic acid, 2-amino oleic acid, diphosphonate 등에 대한 연구가 이루어졌다. 그러나 근래의 연구들은 이종조직 이식 시 석회화 반응에 면역거부 반응이 관여하고 있음을 보여주고 있으며, 그 예로서는 고농도의 GA 고정이 역설적으로 석회화를 낮추고[20], 동일하게 고정 처리한 동종조직과 이종조직을 이식한 경우 이종조직에서 35배의 석회화가 발생하는 것[21] 등을 들 수 있다. 더불어 최

근 Manji 등[22]은, 이종 조직 이식 시 동종조직 이식 시보다 3배 이상의 항체가 생성되며 이는 증가된 석회화와 연관되어 있음을 관찰하여, 세포성 면역 반응과 더불어 체액성 면역반응이 석회화에 기여함을 보고하였다.

무세포화 처리는, 이러한 수동적 석회화와 면역반응에 기인한 석회화를 모두 방지할 수 있으나 무세포화 처리 시 기질 단백질의 변성과 glycosaminoglycan의 제거를 통해 이식편의 기계적 강도의 감소를 가져올 수 있다는 우려가 있다[23]. 무세포화 처치를 위해서 사용되고 있는 물질로는 sodium dodecylsulfate (SDS), octylphenoxy polyethoxyethanol (Triton X-100), Tween-20, MEGA 10, Deoxycholate 등이 있으며, 이들은 대부분 그 기전이 세포벽내의 인지질 제거에 있다. 이들 중 단독으로 사용 시 세포 제거의 효과가 가장 큰 것은 SDS이나 collagen triple helix의 안정성을 저해시키고 elastin network의 부종을 초래하는 것으로 알려져 있다[24,25]. 무세포화 처리가 이식편의 기계적 특성을 변형시키지 않는다는 보고와, 무세포화 처리와 고정을 병행할 경우 50%까지 장력(fracture tension)의 감소가 있다는 상반되는 보고를 동일한 저자가 발표한 예가 있다[26,27]. 그러나 무세포화 처리는 석회화나 면역반응과는 다른 의미에서 숙주세포에 의한 이식편의 재세포화에 필수적인 부분으로서 연구하여야 할 필요가 있다.

에탄올은 GA로 고정된 조직에 투여 시 인지질과 콜레스테롤의 완전한 추출과, 수분 함량을 떨어트리며, 영구적 collagen 구조의 변형을 가져와 이로 인해 collagen 분해효소에 대한 저항성을 높이는 것으로 보고되었다. Octanediol은 long chain alcohol로서 에탄올에 비해 인지질의 제거 능력이 높다는 보고가 있다[28].

저자 등은 우심낭에서 무세포화 처치를 시행하고, 이어 고농도의 GA 처리와 알코올 전처치를 포함한 여러 고정 방법을 시행함으로써, 무세포화와 고정 방법이 이식편의 석회화와 기계적 특성에 끼치는 영향을 평가하고자 하였다. 우심낭 고정 시의 GA 농도는, 임상에서 통상적으로 사용하는 1% 이하와 기존의 연구에서 항석회화 효과가 관찰된 3% 이하에서 0.5%와 2%를 이용하였다.

무세포화를 시행한 경우 신선 우심낭을 바로 고정한 경우보다 장력에서 32% 정도의 감소가 있었으며, 특히하게 octanediol 처리를 병행한 경우 무세포 처리를 시행하지 않은 경우에 비해 의미있는 장력의 감소가 없는 것으로 관찰되었다. 무세포화에 의한 기계적 특성의 약화는 무세포화 처리 방법에 변화의 필요를 시사할 수 있으며, 이는 향후 재실험을 통해 검증되어야 할 것이다.

각각의 방법의 석회화 정도를 평가하기 위해서 쥐의 피하조직에 우심낭편을 이식하였다. 기존의 보고에서는 3주령 쥐의 피하조직에 조직을 이식하는 경우 이식 후 8주 정도에 최대한도(200~250 μ g/mg)의 석회화 효과를 얻을 수 있는 것으로 되어 있으며[1], 본 실험에서는 석회화의 정도는 무세포화나, 알코올 전처치를 시행하지 않은 경우 최대 70 μ g/mg 정도의 수치를 보였다. 무세포화는 강한 항석회화의 효과가 있었으며, 유기용매 전처치를 시행하는 경우 무세포화를 시행하지 않은 그룹에서 석회화의 정도가 줄어들었고, 유기용매 전처치와 무세포화를 병행 시 석회화의 양이 더욱 의미있게 감소하였다. 세분화된 유기용매의 구분에서는 octanediol 전처치를 시행하는 경우 석회화 정도가 가장 낮은 것으로 나타났다. 기존의 연구결과와는 달리 이 실험에서는 고농도의 GA 고정은 항석회화 효과를 보이지 않았다.

쥐의 피하 이식 실험에서 항석회화 작용을 보인 물질은 양의 혈관에서 실험한 경우에는 항석회화 효과가 없었던 보고도 있으며[29], 이는 종 간의 반응 차이 이외에 혈액학적 요인이 석회화에 기여할 수 있음을 시사한다. 무세포화와 고정을 동반하였을 때 생기는 이식편의 강도 저하는 실제 임상 상황에서 석회화를 심화시켜 이식편의 조기 부전을 가져오는 원인이 될 수 있으며, 이러한 면에서 대동물에서의 체순환 회로 내 이식 실험이, 현 실험에서 보인 기계적 강도 저하의 임상적 의미를 보다 가까이 판단할 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다.

더 나아가 이종조직 판막이나 이종조직 보철편이 이식된 생체 내에서 영구적으로 기능하기 위해서 이식편의 숙주세포에 의한 내피화와 결체조직세포의 침투가 있어야 하며, 그러기 위해서는 이식편에 세포독성 물질이 남아 있지 않고 면역반응도 유발하지 않아야 한다.

최초로 상업화된 제품으로 사람 체내에 이식된 이종장기 판막의 조기부전의 원인도 무세포화 처리 중 발생한 구조적 결함에서 기인한 것으로 생각되며[30], 이로 미루어 기계적 성능을 저하시키지 않는 무세포화 처리와 세포독성이 없는 고정방법, 그리고 이 두 가지 방법의 병행 처리에 대한 연구는 이종조직 판막의 최종적 목적인, 성장 가능하며 영구적으로 기능하는 이식편 개발의 여러 과정에서 중요한 부분이 될 것이다.

참 고 문 헌

- Schoen FJ, Levy RJ. *Tissue heart valves: current challenge and future research perspectives*. J Biomed Mater Res 1999; 47:439-65.
- Carpentier A, Deloche A, Relland J, et al. *Six-year follow-up of GA-preserved heterografts; with particular reference to the treatment of congenital valve malformations*. J Thorac Cardiovasc Surg 1974;68:771-82.
- Schoen FJ, Levy RJ. *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg 2005;79:1072-80.
- Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, et al. *GA-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation 2006;114:318-27.
- Bodnar E, Olsen EG, Florio R, Dobrin J. *Damage of porcine aortic valve tissue caused by the surfactant sodiumdodecylsulphate*. Thorac Cardiovasc Surg 1986;34:82-5.
- Samouillan V, Lamure A, Maurel E, et al. *Characterization of elastin and collagen in aortic bioprostheses*. Med Biol Eng Comput 2000;38:226-31.
- Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, et al. *Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation*. Circulation 1997;95:479-88.
- Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. *Extracellular matrix proteins: bystanders or active participants in the allograft rejection cascade?* Ann Transplant 1996;1:14-8.
- Smith JD, Hornick PI, Rasmi N, Rose ML, Yacoub MH. *Effect of HLA mismatching and antibody status on "homovital" aortic valve homograft performance*. Ann Thorac Surg 1998;66:S212-5.
- Grauss RW, Hazekamp MG, Vliet SV, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. *Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling*. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;126:2003-10.
- Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, et al. *Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat*. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;130:469-76.
- Talman EA, Boughner DR. *GA fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue*. Ann Thorac Surg 1995;60(Suppl 2):S369-73.
- Lee JM, Haberer SA, Boughner DR. *The bovine pericardial xenograft: I. Effect of fixation in aldehydes without constraint on the tensile viscoelastic properties of bovine pericardium*. J Biomed Mater Res 1989;23:457-75.
- Huang-Lee LLH, Cheung DT, Nimni ME. *Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric GA derived crosslinks*. J Biomed Mater Res 1990; 24:1185-201.
- Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, et al. *Impact of GA on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material*. Ann Thorac Surg 1996;62:772-7.
- Christine ES, Jennie MB. *Baier A cellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering*. Biomaterials 2000;21:2215-31.
- Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, Anderson HC, Levy RJ.

- Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention.* J Biomed Mater Res 1988; 22(Suppl A1):11-36.
18. Langdon SE, Chernecky R, Pereira CA, Abdulla D, Lee JM. *Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials.* Biomaterials 1999;20:137-53.
 19. O'Brien TK, GAbbay S, Parkes AC, Knight RA, Zalesky PJ. *Immunological reactivity to a new GA tanned bovine pericardial heart valve.* Trans Am Soc Artif Intern Organs 1984; 30:440-4.
 20. Zilla P, Weissenstein C, Bracher M, et al. *High GA concentration reduces rather than increase the calcification of aortic wall tissue.* J Heart Valve Dis 1997;6:502-9.
 21. Vincentelli A, Latrémouille C, Zegdi R, et al. *Does GA induce calcification of bioprosthetic tissues?* Ann Thorac Surg 1998;66:S255-8.
 22. Manji R, Zhu LF, Nijjar NK, et al. *GA-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection.* Circulation 2006;114:318-27.
 23. Courtman DW, Pereira CA, Kashaf V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction.* J Biomed Mater Res 1994;28:655-66.
 24. Henriquez M, Lissi E, Abuin E, Ciferri A. *Assembly of amphiphilic compounds and rigid polymers. I. Interaction of SDS with collagen.* Macromolecules 1994;27:6834-40.
 25. Kawazoye S, Tian SF, Toda S, et al. *The mechanism of interaction of SDS with elastin fibers.* J Biochem 1995;117: 1254-60.
 26. Courtman DW, Pereira CA, Kashaf V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction.* J Biomed Mater Res 1994;28:655-66.
 27. Courtman DW, Pereira CA, Omar S, Langdon SE, Lee JM, Wilson GJ. *Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets.* J Biomed Mater Res 1995;29:1507-16.
 28. Pettenazzo E, Valente M, Thiene G. *Octanediol treatment of GA fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model.* Eur J Cardiothorac Surg 2008;34:418-22.
 29. Jones M, Eidbo EE, Hilbert SL, Ferrans VJ, Clark RE. *Anticalcification treatment of bioprosthetic heart valves: in vivo studies in sheep.* J Card Surg 1989;4:69-73.
 30. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, et al. *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients.* Eur J Cardiothorac Surg 2003;23:1002-6.

=국문 초록=

배경: 심장혈관대체물로서 인체내에 이식된 우심낭의 부전은 석회화 및 기계적 변성에 의하여 이루어지며, 조기 부전의 가장 흔한 원인인 석회화 방지를 위하여 우심낭의 무세포화 처치를 시행하고 알코올 전처치를 포함한 여러 고정 방법을 병행하여 그에 따른 기계적 특성의 변화와 실제 생체 이식 시 석회화 정도를 알아보고자 하였다. 대상 및 방법: 우심낭을 신선 상태와, 0.25% Sodium dodecylsulfate를 이용하여 무세포화 처치를 한 상태에서 각각 5가지의 방법을 이용하여 고정을 시행하였다. 5가지의 방법은 ① 0.5 % glutaraldehyde (GA)로 2주간 처치, ② 0.5% GA로 5일간 처치, 그 후 2일간 2% GA 처치 후 7일간 0.25% GA로 처치, ③ 0.5% GA로 5일간 처치 후 2일간 2% GA 처치 후 7일간 0.25% GA로 처치, 이후 70% 에탄올로 2일간 처치, ④ 0.5% GA로 5일간 처치 후, 2% GA와 70% 에탄올 혼합액으로 2일간 처치한 후 0.25% GA로 7일간 처치, ⑤ 0.5% GA로 5일간 처치 후 2% GA, 65% 에탄올, 5% octanediol 혼합액으로 2일간 처치한 후, 0.25% GA로 7일간 처치하여 구분하였다. 각각의 처치 후 조직 검사와 지질 양 측정과 기계적 특성에 대한 검사를 시행하였다. 처치가 끝난 총 10종류의 우심낭편을 쥐의 피하조직에 이식하고 8주가 지난 후 채취하여 석회화의 정도를 측정하였다. 결과: 조직 검사에서 무세포화 후에 특이적인 기질의 변성은 관찰되지 않았으며, 동일한 고정 방법을 사용한 경우 무세포화 처리를 한 우심낭편에서 평균 32% 정도의 장력 저하가 있었고, 유기용매 전처치 시 octanediol을 병행 처치하면 장력 저하를 줄이고 thermal stability를 유지시키는 효과가 있었다. 중성지방과 콜레스테롤의 양은 무세포화 처리에 영향을 받지 않았으며, 유기용매 중 octanediol 전처치를 시행하는 경우 그 양이 더욱 줄어드는 양상을 보였다. 무세포화 처리는 항석회화 효과를 보였으며, 유기용매 전처치를 시행하는 경우 석회화의 양이 더욱 감소하였다. 결론: 유기용매 전처치와 무세포화는 항석회화 효과가 있으며, 무세포화 처리는 우심낭 조직의 기계적 성능의 감소를 가져왔다. 조직의 기질에 손상을 주지 않는 무세포화와 고정방식에 대한 연구는 이종장기 연구 과정에서 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

- 중심 단어 : 1. 조직공학
2. 글루타르알데하이드
3. 심외막
4. 석회화