

생체조직 인공심장판막용 술폰산화 PEO가 결합된 생체조직의
in vivo 항칼슘화 특성

윤주영^o · 박기동 · 한동근 · 정서영 · 김영하 · 김광택* · 김형묵*
한국과학기술연구원 고분자화학연구팀, *고대의대 흉부외과

In Vivo Anticalcification of Sulfonated PEO-Grafted Tissues
for Bioprosthetic Heart Valve

J.Y. Yun^o · K.D. Park · D.K. Han · S.Y. Jeong · Y.H. Kim · K.T. Kim* · H.M. Kim*
Polym. Chem. Lab., KIST, *Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Korea University

1. 서 론

심장은 사람의 순환계 중심부에 위치해서 지속적인 혈액의 흐름을 유지해 주는 펌프라고 할 수 있다. 역류를 막아주는 판막을 이용, 정상적인 사람의 경우에 끊임 없이 박동을 하게 된다. 즉, 사람의 심장에는 그림 1과 같이 4개의 판막이 있어서 심장 수축에 따라 혈류와 혈압이 유지되게 되어 있다. 이들 판막 중 특히 승모판막(mitral valve)과 대동맥 판막(aortic valve)이 여러가지 병변이 생기면 적기에 인공심장판막으로 대체함으로써 심장기능을 개선시킬 수 있다. 이러한 인공심장판막은 현재 기계식 판막과 조직판막이 사용되고 있는데, 전자는 항응혈제를 항상 복용해야 하는 단점이 있고 후자의 경우는 유사한 형태와 기능을 가지고 있고 비교적 항응혈성도 우수하지만 칼슘화로 인해 내구성이 떨어지는 단점이 있다. 칼슘화(calcification)란 인공장기의 파손을 일으키는 가장 중요한 원인의 하나로 알려져 있는데 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite)와 같은 몇가지 인산 칼슘 화합물(calcium phosphate mineral)이나 단순한 탄산 칼슘 등의 칼슘 침착을 말하며 이로 인해 재료가 유연성을 상실하여 협착, 굴곡파괴 및 천공등을 일으키게 된다. 응혈과는 달리 칼슘화는 재료가 혈액에 노출된 후 비교적 긴 시간에 걸쳐 일어나는 현상으로 장기간 혈액과 접촉하는 의약품 재료개발시 칼슘화의 억제는 응혈형성의 방지보다도 더 중요한 요인이 된다¹⁾. 특히 조직판막의 경우 우수한 항응혈성에도 불구하고 칼슘화로 인하여 오랜동안 사용치 못하고 있다. 특히 생체조직판막²⁾, 인

공심장펌프³⁾, 자궁내 피임기구⁴⁾ 및 콘택트렌즈⁵⁾에서 이러한 이영양성 칼슘화를 흔히 볼 수 있으며 일부 기계식 심장 판막(mechanical valve)⁶⁾과 인공혈관⁷⁾에서도 발생된다. 따라서 우수한 의약품 재료로 사용하기 위해서는 항응혈성과 더불어 우수한 항칼슘화 특성이 요구되고 있다.

본 연구에서는 장기적 항칼슘화 및 혈액적합성이 우수한 새로운 조직판막을 개발하기 위하여 1차년도와 다른 화학적 방법으로 생체조직을 화학적으로 개질하였다. 즉 술폰산화와 폴리에틸렌옥사이드(PEO-SO₃Na)를 새로운 방법으로 돼지의 대동맥 판막에 그래프트 시킨 후 이의 특성을 분석하고 쥐와 개를 이용하여 *in vivo* 칼슘화 실험으로부터 생체조직의 항칼슘화 특성을 검토하였다.

2. 재료 및 실험방법

생체조직의 개질

생체조직(prosthetic tissue, BT)을 합성한 PEO-SO₃Na를 이용하여 아래와 같은 방법으로 개질하였다.

BT-PEO-SO₃Na-I의 개질방법은 채취한 대동맥판막을 2% (v/v) glutaraldehyde (GA, Sigma제 전자 현미경 특급시약)에 하루동안 4℃에서 보관하면 GA의 양쪽 알데히드가 조직의 아미노기와 가교를 형성할 뿐만 아니라, 한쪽 말단의 알데히드기만이 조직과 결합하고 나머지 한쪽은 유리돼 있는 상태가 되게 된다. 이런 조직을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척 후 PBS에

녹인 5% (w/v) PEO-SO₃Na 용액 (pH 11로 조절) 200 ml에 넣고 상온에서 2 일간 교반시키면서 반응시키면 미반응 알데히드가 H₂N-PEO-SO₃Na와 반응하여 PEO-SO₃Na 가 그래프트된 개질 생체조직을 제조하였다. 여기에 수용성 carbodiimide (Pierce제 1급 시약)인 1.7%(w/v) EDC를 사용해서 H₂N-PEO-SO₃Na의 아미노기를 생체조직의 카르복시기에 추가결합시킨다. 최종적으로 0.65% GA에 1 주일 보관 후 최종적으로 NaBH₄로 16 시간동안 4 ℃에서 환원시켜 안정한 결합을 갖는 BT-PEO-SO₃Na-I를 제조하였다.

BT-PEO-SO₃Na-II의 개질방법은 BT-PEO-SO₃Na-I와 유사하나 기계적 물성을 부여하기 위해서 NaIO₄로 생체조직을 개질반응 중간에 산화시키는 방법이다. 즉, 먼저 방법에서 EDC반응이 끝난 후 생체조직은 3% (w/v) NaIO₄ 용액과 Hanks 용액을 1 : 2의 비율로 만든 1% NaIO₄ 용액 200 ml에 넣어 4 ℃ 암소에서 24 시간 보관하면 생체조직의 히드록시기가 알데히드로 산화되게 한다. 생성된 알데히 드기는 생체조직 자체의 유리아미노기와 자발적으로 가교를 형성하게 된다. 그 외에는 위의 방법과 동일한 절차를 거쳐 BT-PEO-SO₃Na-II를 제조하였다.

특성 분석

원소분석기 (Fisons Model EA 1108)로 황 (sulfur) 분석을 행하여 PEO-SO₃Na의 grafting 정도를 확인하였고 Differential scanning calorimetry (Du Pont 2,100)를 사용해서 25 ℃ 부터 150 ℃ 까지 분당 10 ℃로 승온하여 fresh BT, BT control (GA-treated BT) 및 BT-PEO-SO₃Na의 수축온도 (shrinkage temperature, Ts) 를 측정하였다. 수분함유량은 BT control과 BT-PEO-SO₃Na를 24 시간동안 4 ℃에서 침적시킨 다음 표면의 수분을 여과지로 제거한 후의 무게 (Gw)를 측정하고, 시료를 100 ℃에서 24 시간 동안 건조시킨 후의 무게 (Gd)를 측정 후 아래의 식으로 생체조직의 수분 함유량 (Cw)을 평가하였다.

$$Cw = \frac{Gw - Gd}{Gw} \times 100$$

여기서, Cw : 수분함유량 (%)
Gw : 수화된 무게 (mg)
Gd : 건조된 무게 (mg)

Collagenase에 대한 생체조직의 분해저항성은 Collagenase 1 mg/ml를 포함한 N -2-hydroxyethylpiperazine-N' - ethanesulfonic acid (HEPES) buffer-용액 (pH 7.4)에 넣고 36 시간 동안 37 ℃에서 교반 후, 건조하여 이의 무게를 원래의 무게와 비교하였다.

In vivo 칼슘화 실험

먼저 쥐를 이용한 피하조직 실험에서 실험동물은 약 80 g 정도의 4주된 쥐 (rat)를 사용하였다. 시료 (1 x 2 cm)는 1종류의 control과 2종류의 개질 BT-PEO-SO₃Na를 준비하였다. 쥐를 케타민으로 마취시킨 후 복부의 털을 깎고 알콜로 소독한 다음 중앙부분의 피부를 등뼈 방향으로 절개하였다. 이어서 복부의 피부와 근육사이의 피하 (subcutaneous)조직에 pouch를 만들어 좌우에 각각 생체조직 control과 개질된 BT-PEO-SO₃Na를 동시에 이식하고 봉합하였다. 3주 후 시료들을 쥐에서 꺼내어 칼슘화 및 조직반응 정도를 비교, 분석하였다.

개를 이용한 A-I shunt 실험은 길이 8 cm, 지름 1 cm의 인공혈관 (Gore-Tex 그래프트)의 내면 (lumen)에 BT control 침판 (leaflet) 한개와 개질한 침판 (BT-PEO-SO₃) 한개를 3 cm 거리를 두고 각각 6-0 prolene으로 봉합하였다. 이렇게 제조된 판막침판을 함유한 그래프트에 식염수를 주사하여 침판이 정상적으로 가동되는 것을 확인하고 EO gas 소독을 한 후 개(잡견, 40 kg)에 aorta-iliac shunt (A-I shunt) 방법으로 이식을 행하였다. 먼저 개를 마취 후 복부의 털을 깎고 알콜로 소독한 다음 복각후강 (retroperitoneum)으로 접근하여 복부의 대동맥 (abdominal aorta)과 왼쪽 장골동맥 (left iliac artery)을 노출시켜서 그래프트를 6-0 prolene으로 봉합하였다. 6주 후 시료를 꺼내어 쥐의 피하조직 실험과 같은 방법으로 칼슘화 및 조직반응 정도를 비교, 분석하였다.

칼슘 및 인의 정량분석은 시료를 host 조직이 없는 상태로 채취한 후 탈이온수로 가볍게 수세한 다음 냉동 건조하여 무게를 단 후 이것을 6N HCl 용액 (2 ml)에 넣고

100 ℃에서 하루동안 가수분해하였다. 이 용액을 필터용 주사기를 사용해서 여과 후 탈이온수로 전체용액을 10 ml로 희석한 다음 칼슘과 인을 분석하였다. 정량분석은 Inductively Coupled Plasma (ICP, Plasmascan 710, Lattam Co.)기기로 행하였다. 칼슘과 인의 양은 건조된 조직 무게 (mg)당 침착된 칼슘 및 인의 양 (ug)으로 표기하였다.

조직 반응검사는 시료를 host의 조직을 포함한 *en bloc*으로 채취한 다음 neutral buffered formalin으로 고정 화시킨 후 일련의 에탄올 용액으로 탈수한다. 완전 탈수된 시료를 파라핀으로 embedding하고 microtome으로 얇게 자른 다음 조직의 성장 및 반응과 칼슘화 유무를 확인하기 위하여 hematoxylin-eosin(H&E) 방법으로 염색 (staining)하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 연구결과 및 고찰

본 연구의 목적은 보다 새로운 방법으로 PEO-SO₃Na를 생체조직에 그래프트 시킴으로써 항칼슘화 및 내구성인 기존의 상품화된 것보다 개선된 인공심장 조직판막을 개발하는데 있다. PEO-SO₃Na를 결합시킬 경우 해파린과 같은 음이온 효과, PEO의 space filling 및 mobility 효과, 칼슘침착 유도인자 중의 하나인 콜라겐의 카르복시기를 blocking하는 등의 상승작용을 기대할 수 있다. 이러한 목적을 위하여 생체조직을 개질하는데 다음의 2가지 방법이 사용되었다. 첫번째 방법은 생체조직의 산화과정을 거치지 않고 GA 처리 후 활성화된 조직에 의해서 PEO-SO₃Na를 그래프트 시킨 다음 여기에 반응촉매인 EDC를 사용하여 다시 한번 PEO-SO₃Na를 반응시켜 결합효율을 높이는 개질방법이다(BT-PEO-SO₃Na-I). 두번째는 첫번째 방법에 추가로 NaIO₄로 산화시켜 자체 가교가 일어나게 함으로써 기계적 물성을 향상시킨 방법이다 (BT-PEO-SO₃Na-II).

생체조직에 PEO-SO₃Na의 결합을 확인하기 위해 개질된 생체조직에 대한 황분석을 하였는데 GA만 처리한 BT control의 황함량은 1.18%인데 비해서 PEO-SO₃Na가 반응된 BT-PEO-SO₃Na-I와 여기에 NaIO₄로 산화해 가교시킨 BT-PEO-SO₃Na-II의 경우 각각 1.65 및 1.44%의 높은 황함량의 결과를 보였다. 여기서 산화처리를 한 경우

가 약간 낮은 황함량을 나타낸것은 PEO-SO₃Na의 그라프트율의 차이라기 보다는 생체조직 자체의 황함량의 차이로 사료된다. 또한 이전에 사용한 술폰산화 PEO (PEO-SO₃)와 비교하면 술폰산염화 PEO(PEO-SO₃Na)를 사용한 경우가 훨씬 황함유량이 높은 결과로부터 술폰산염화 PEO를 사용시 판막조직과 반응을 잘 함을 알 수 있다.

BT control 및 BT-PEO-SO₃Na의 DSC에 의한 열분석의 수축온도를 비교한 결과 단지 GA로 가교시킨 BT control의 경우는 97 ℃, 술폰산염화 PEO를 그래프트시킨 경우는 108 ℃로 증가하였고, 특히 여기에 NaIO₄로 산화시킨 경우는 119 ℃로 그 값이 크게 증가하였다. 이 결과는 생체조직에 술폰산염화 PEO를 결합시키면 filling효과 또는 자체 가교에 의해서 수축 온도가 높아져 생체내 안정성이 증가함을 나타내고 있다.

개질 생체조직의 콜라게나제에 대한 분해저항성을 비교한 BT control의 경우 분해되지 않고 남은 양이 71.5%이나 술폰산염화 PEO가 그래프트된 BT-PEO-SO₃Na-I, II는 각각 77.5 및 74.5%의 미분해물이 그대로 남아있어서 개질한 경우가 콜라게나제에 대해서 분해저항성이 더 크다는 것을 알 수 있다. 이 결과는 전술한 DSC의 수축온도와 잘 일치하고 있다. 즉, 생체조직이 술폰산염화 PEO로 개질될 경우 생체내 안정성 및 효소에 의한 분해저항성이 더 크게 됨을 시사하고 있다.

In vivo 칼슘화 동물실험의 결과를 표 1, 2에 각각 나타내었다. BT control에 비해서 개질한 생체조직이 상당히 적은 양의 칼슘과 인이 침착됨을 알 수 있었다. 3주 후의 조직반응은 BT control 및 BT-PEO-SO₃Na 양자에서 염증반응은 대체로 적었다. 그러나 개질한 BT-PEO-SO₃Na에 비해서 BT control이 더 많은 염증세포가 조직 판막과 host경계에 있었다. BT control에 있어서 대표적인 염증세포로는 대식세포(macrophage), 거대세포(giant cell), 임파구(lymphocyte) 및 혈장세포(plasma cell)등과 섬유 형성(fibrosis)이 관찰되었다. 특히 BT control에서는 host조직 내에서 칼슘이 침착된 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 조직내에서 칼슘화가 진행되었음을 의미한다. 이러한 조직반응의 결과로부터 생체조직이 이식되면 일단 염증반응이 일어나 이식되는 조직에 따라서 염증

반응 및 칼슘화가 조절될 수 있음을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 돼지의 대동맥 판막의 침판 생체 조직을 술폰산염화 PEO로 개질하여 조직판막의 침판으로 사용시 개선된 항칼슘화 특성 및 내구성으로 인하여 기존의 조직판막에 비해서 장기간 사용할 것으로 기대된다.

4. 참고 문헌

1. S.D. Bruck, Proc. *IUPAC 28th Macromolecular Symp.*, Amherst, Mass, 1982, p. 403.
2. F.J. Schoen, *J. Cardiac Surg.*, 2, 65 (1987).
3. D.L. Coleman, *TASAIO*, 27, 708 (1981).
4. S.R. Khan, et al., *Human Pathol.*, 16, 732 (1985).
5. M. Ruben, et al., *Br. J. Ophthal.*, 59, 141 (1975).
6. F.J. Schoen, et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 88, 208 (1984).
7. S.A. Wesolowski, et al., *Surgery*, 50, 91 (1961).

표 1. 쥐를 이용한 생체조직의 칼슘화 실험의 결과*

Tissue	Ca	P
BT control	6.8 ± 5.1	4.2 ± 2.4
BT-PEO-SO ₃ Na-I	2.1 ± 1.1	3.7 ± 1.7
BT-PEO-SO ₃ Na-II	1.7 ± 0.5	3.3 ± 1.4

*Mean ± S.D. (n=5), unit: ug/mg.

표 2. 개를 이용한 생체조직의 칼슘화 실험의 결과*

Tissue	Ca	P
BT control	13.4 ± 6.0	5.4 ± 1.8
BT-PEO-SO ₃	2.7 ± 1.3	2.3 ± 1.3

*Mean ± S.D. (n=3), unit: ug/mg.