

술폰산화 폴리에틸렌옥사이드로 표면개질한 생체동맥의 석회화 저항 효과

김 형 목*·백 만 증*·선 경*·이 승 렬*·이 송 암*·
김 광 택*·이 인 성*·이 원 규**·박 기 동**·김 영 하**

=Abstract=

Calcification-resistant Effect of Surface-modified Biologic Arteries by Sulfonated Polyethyleneoxide

Hyoung Mook Kim, M.D.*, Man Jong Baek, M.D.*, Kyung Sun, M.D.*, Seung Yeol Lee, M.D.*,
Song Am Lee, M.D.*, Kwang Taik Kim, M.D.*, In Sung Lee, M.D.*, Won Kyu Lee, Ph.D.**,
Ki Dong Park, Ph.D.**, Young Ha Kim, Ph.D.**

Background: Calcific degeneration is the major cause of clinical failure of glutaraldehyde (GA) crosslinked bioprosthetic tissues implanted in the body and necessitates the reoperation or causes death. Surface modification of biologic tissues using sulfonated polyethyleneoxide (PEO-SO₃) has been suggested to significantly enhance blood compatibility, biostability and calcification-resistance by means of the synergistic effect of highly mobile and hydrophilic PEO chains and electrical repulsion of negatively charged sulfonate groups. This study was designed to evaluate the anticalcification effect of surface-modification of biologic arteries by direct coupling of PEO-SO₃ after GA fixation and changes of calcification according to the implantation period through the quantitative investigation of the deposited calcium and phosphorous contents of the biologic arterial tissues in the canine circulatory implantation model. **Material and Method:** Total of 16 fresh canine carotid arteries were harvested from eight adult dogs and divided into GA group(n = 8) and PEO-SO₃ group(n = 8). Sulfonation of diamino-terminated PEO was performed using propane sultone. Canine carotid arteries were only crosslinked with 0.65% GA solution in GA group and modified by direct coupling 5% PEO-SO₃ solution after GA crosslinkage for 2 days and stabilized by NaBH₄ solution for 16 hours in PEO-SO₃ group. In both groups the resected segment of bilateral carotid arteries were reconstructed. Reconstructed segments of the two groups were analysed the quantities of calcium and phosphorous contents after 3(n=4) and 6(n=4) weeks in vivo. **Result:** After implantation of 3 weeks, PEO-SO₃ group showed significantly less depositions

* 고려대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Korea University Seoul, Korea

** 한국과학기술원 고분자화학연구소

Polymer Chemistry Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

† 본 연구는 1998년 G7 의료공학 선도기술개발과제 지원비에 의해 연구되었음.

논문접수일 : 99년 7월 7일 심사통과일 : 99년 8월 10일

책임저자 : 김형목 (136-705) 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 흉부외과학교실 (Tel) 02-920-5307,
(Fax) 02-928-8793

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다

than GA group in both calcium(0.34 ± 0.03 vs 0.56 ± 0.14 mg/g of dried tissue) and phosphorous contents(1.12 ± 0.21 vs 1.80 ± 0.07 mg/g)($p < 0.05$). And the changes of calcium and phosphorous depositions were significant in both groups implanted for 3 weeks than the arteries before the implantation of the biologic arterial tissues($p < 0.05$). After implantation for 6 weeks, PEO-SO₃ group showed substantially less depositions than GA group in both calcium(0.54 ± 0.08 vs 1.11 ± 0.16 mg/g) and phosphorous contents(0.72 ± 0.10 vs 1.89 ± 0.62 mg/g)($p = 0.05$). The changes of calcium depositions were significant in both groups implanted for 6 weeks($p < 0.05$), but the phosphorous contents were not statistically significant.

Conclusion: These finding suggest that surface modification of biologic tissues by direct coupling of PEO-SO₃ after GA crosslinkage is highly resistant to calcification and can be useful for the development of calcification-resistant vascular grafts.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1999;32:989-97)

Key word : 1. Calcinosi
2. Organ preservatiomm
3. Blood vesel prosthesis

서 론

조직의 석회화는 인산칼슘(calcium phosphate)이나 칼슘염(calcium salt)과 같은 칼슘 화합물 등의 무기질침착(mineralization)으로 발생된다. 석회화는 생체내에 이식된 조직판막, 심실보조장치, 인공심장, 혈액 펌프 및 조직칩포 같은 인공 이식장기들에서 퇴행성 변성을 일으켜 장기간 생체내 안정성과 내구성 유지를 어렵게 하는 가장 중요한 원인의 하나이다^{1,2}.

특히 glutaraldehyde(GA)로 고정처리한 돼지 대동맥 판막이나 쇠심막 조직판막의 석회화 변성은 판막의 기능부전을 초래하여 재수술이나 사망에 이를 수도 있다. GA로 처리한 생체조직의 석회화 변성은 이식조직의 교원질(collagen)내 amino기와 GA의 aldehyde기 사이에 형성된 교차결합(crosslinkage)이 비교적 불안정하여 이식 후 잔유 aldehyde기 방출에 의한 독성반응이나 GA와 조직과의 교차결합에 의한 상호작용에 의해 불가피하게 일어난다^{3, 4}.

생체조직으로 제작된 조직판막이나 인공장기들은 항혈전성과 혈액학 측면에서 매우 우수하고 또한 항응고제 투여가 어려운 환자들에서 지금도 사용되고 있다⁵. 따라서 생체재료들이 적절한 혈액적합성과 생체내 안정성 및 항석회화 특성을 가지는 것은 인공장기의 장기간 내구성 유지뿐만 아니라 이상적인 생체 이식재료로 사용하는데 매우 중요하다.

GA로 처리한 조직이나 생체재료의 석회화 발생을 예방하고자 하는 여러 연구 보고는 많다. 칼슘 침착 억제제⁶, AlCl₃와 FeCl₃와 같은 양이온성 금속염⁷, 표면활성제(surfactant)⁸와 세정제(detergent)⁹, 에탄올 전처리, 잔유 aldehyde 제거에 의한 해독처리, 그리고 GA를 대체하는 교차결합물로 에폭시

화합물 등과 같은 여러 방법들이 보고되었다. 하지만 이들 방법들은 동물의 피하나 순환계 이식 실험에서 석회화 방지 효과가 일부만 알려져 있으며 임상에서 석회화를 완전히 예방하거나 방지할 수 있는 효과있는 항석회화 방법으로 인정된 것은 없다.

한편 생체재료의 표면을 개질하여 혈액적합성과 생체내 안정성을 향상시키려는 연구가 있었다. Andrade¹⁰는 조직의 표면이 친수성(hydrophilicity)을 가지면 혈액속의 물과 상호작용이 감소되어 혈액적합성이 향상된다고 하였고, polyethyleneoxide(PEO)는 대표적인 친수성 중합체(polymer)로 이러한 성질을 가진다고 하였다. 또한 Grasel 들¹¹은 조직의 표면에 음전하를 가지는 sulfonate(SO₃)를 결합시키면 혈액 성분들의 유착이 감소되어 우수한 혈액적합성을 보인다고 하였다.

Han 들^{12,13}은 PEO와 sulfonate의 이러한 특성을 polyurethane(PU)에 결합시켜 합성한 sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃)-PU은 PEO 분자와 음전하를 갖는 sulfonate에 의한 상승효과로 혈액속의 단백질과 혈소판의 부착이 억제되어 혈액적합성이 현저히 향상되고 석회화 저항성을 보인다고 하였다. 이후 Park 들^{14,15}은 돼지의 대동맥 판막을 PEO-SO₃로 표면개질시켜 시행한 생체의 실험, 쥐의 피하이식 실험, 그리고 이 판막을 인조혈관에 결합시켜 개의 심장 좌, 우측 혈류에 이식한 연구에서 PEO-SO₃로 처리한 돼지 판막조직은 기계적 특성과 collagenase에 대한 저항성 및 석회화 방지 효과가 매우 우수하다고 증명된 바 있다.

또한 본 저자들의 연구^{16,17}에서도 쇠심막 조직을 이용한 PEO-SO₃에 의한 조직의 표면개질 방법은 PEO의 낮은 접촉면 자유에너지(interfacial free energy)와 높은 유동성(dynamic

motion), sulfonate의 표면 음전하 효과에 의한 혈액성분들의 비점착성(nonadhesivity), 공간충전제(space-filler) 역할, 잔유 aldehyde기 제거에 의한 해독작용과 내피세포 성장 촉진 효과 등을 보여 조직의 생체내 안정성과 석회화 저항 효과가 우수하였다.

하지만 임상에서 사용되고 있는 생체혈관에서 PEO-SO₃ 표면개질 방법의 석회화 방지 및 대형동물의 전신 순환혈류 조직내에서의 석회화 방지 효과와 기전에 대한 연구는 아직 없다. 따라서 본 연구는 생체혈관을 GA로 교차결합시킨 후 PEO-SO₃로 표면개질하여 전신 순환혈류에 이식하였을 때 위에서 말한 PEO-SO₃ 표면개질 방법의 여러 효과들에 의해 항석회화 효과를 보일 것이라는 가설하에 진행되었고, 임상 적용 전단계로 대형동물의 혈관 이식 모델을 이용하여 PEO-SO₃로 표면개질된 생체혈관의 석회화 저항 효과를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상

본 연구에서는 PEO-SO₃로 표면개질한 생체혈관의 석회화 저항 효과를 알아보기 위하여 성견(30~50 kg) 8마리에서 경동맥 혈관 16개를 채취하여 다듬기를 한 다음, 0.65% glutaraldehyde(GA)로 교차결합시킨 혈관(GA군, n = 8)과 0.65% GA로 교차결합시킨 후 PEO-SO₃ 표면개질을 한 혈관(PEO-SO₃군, n = 8)으로 나누어 준비하였다. 실험은 성견(25~30 kg) 8 마리를 대상으로 준비한 두 군의 혈관을 양측 경동맥에 이식하여 각각 3주(n = 4)와 6주(n = 4) 동안 생존시켜 관찰하였다.

2 실험동물 관리

모든 실험견은 동일한 실험조건을 갖추기 위해 조직 이식 7일 전부터 동물실험실에서 전문관리인이 사육하여 건강상태를 유지하도록 하였고 실험 8시간 전부터 금식을 시켰다.

3. PEO-SO₃Na의 합성

본 실험에서 사용한 PEO-SO₃는 이전의 실험과 동일한 방법으로 합성하였다^{16,17)}. Diamino-terminated polyethyleneoxide (AT-PEO)는 chloroform속에 녹아 있는 AT-PEO(MW 1,000, Nippon Oil and Fats Co., Tokyo, Japan)를 핵산속에 침전시킨 다음 실온의 진공상태에서 건조시켜 제조하였고, propane sultone(PST)은 1,3-propane sultone(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, U.S.A.) 용액을 180°C의 0.5 mmHg 상태하에서 감압증류법에 의해 정제를 하였다. 정제된 AT-PEO와

propane sultone을 유기용매인 tetrahydrofuran(THF; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, U.S.A.)속에 녹여 각각의 용액을 제조하였다.

다음으로 10%(wt/vol) 1,3-propane sultone 용액을 10%(w/v) AT-PEO 용액에 첨적하여 50°C에서 5시간 동안 반응시켜 THF속에 침전된 생성물을 얻었다. 이 침전물을 여과시키고 다시 차거운 THF으로 세척하고, 실온에서 건조시켜 H₂N-PEO-SO₃를 합성하였다.

PEO와 sulfonate(SO₃)의 결합 여부는 Fourier transform infrared spectrometry(FT-IR, Mattson Alpha Centauri, Bucks, England)에서 1030cm⁻¹에 SO₂가 존재하고, proton nuclear magnetic resonance spectrometry(Proton NMR, Jeol JNM-PMX 60NMR, Tokyo, Japan)에서 propane sultone의 methylene기가 3.2 ppm에서 측정되고 또한 elemental analyzer(Fisons EA 1108, Italy)로 분석한 sulfur양이 PEO 분자내에 증가한 것으로 확인하였다.

한편 합성된 H₂N-PEO-SO₃는 분자구조 자체의 양말단 부위에 존재하는 음이온 전하의 sulfonate와 양이온 전하의 amino기가 서로 연결되어 중복고리(double ring)를 형성하는 양극성화합물(zwitterion)을 잘 형성하므로써 생체조직과의 결합반응이 잘 일어나지 않게 된다. 따라서 양극성화합물의 형성을 방지하기 위해서 H₂N-PEO-SO₃를 sodium borate buffer와 반응시켜 sulfonate의 수소이온(-SO₃H)을 나트륨으로 치환(-SO₃Na)한 수용액 상태의 PEO-SO₃Na를 합성하였다(Fig. 1).

4. 생체혈관의 준비 및 GA 교차결합과 PEO-SO₃ 표면개질

체중이 30~50 kg되는 한국산 잡견에 ketamine HCl(유한양행, 서울, 한국) 1 mg/kg을 근육주사하여 전치치한 후 전박정맥에 수액로를 확보한 다음 pentothal sodium(중의제약, 서울, 한국) 15 mg/kg을 정맥주사하여 마취를 유도하고 기관삽관을 하였으며 심전도를 지속적으로 감시하였다. 혈관 채취 수술 동안 인공호흡은 Harvard respirator(model #613, Harvard apparatus, South Natick, MA, USA)를 이용해 100% 산소와 N₂O로 일회 흡기량은 10 ml/kg, 호흡수는 분당 20회로 조절하였고 추가로 마취유지가 필요할 경우는 근이완제를 투여하였다.

잡견을 전신마취 후 바로 눕힌 상태에서 경부 중앙 세로 절개를 하여 양측 경동맥을 노출시킨 다음 헤파린(중의제약, 서울, 한국) 1 mg/kg을 정맥주사 후 양측 경동맥을 노출하여 겸자로 차단하고 약 5 cm 길이로 절단하여 채취한 경동맥 혈관 16개를 지방 및 섬유조직을 제거하고 4°C의 무균 증류수에 보존하였다. 혈관 채취 후 실험견들은 고려대학교 실험동물 관리규정에 따라 KCl(중의제약, 서울, 한국) 2 mEq/kg를 정맥주사하여 안락사시켰다. 다음으로 4°C의 25% GA

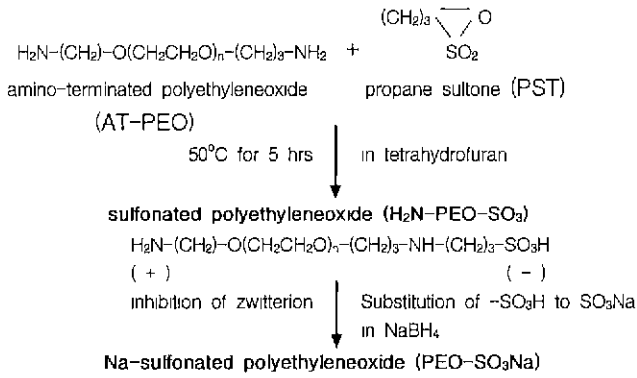


Fig. 1. Sulfonation process of polyethyleneoxide(PEO)

(electron microscopy grade; Sigma chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 용액을 0.05 mol/L의 phosphate buffered saline(PBS; pH 7.4)과 희석하여 0.65% GA 용액을 제조하였다. 증류수에 보존된 생체혈관을 0.65% GA 용액에 1주일 동안 4°C에서 보존하여, GA의 aldehyde기와 생체혈관 조직의 교원질내 lysine 과 hydroxylysine의 amino기 사이에 Schiff-base 형성을 통한 공유결합에 의해 교차결합을 시켰다. 생체혈관과 GA와의 교차결합의 형성 여부는 GA가 생체 조직과 결합시 주로 조직 교원질내의 lysine 성분들과 결합하기때문에 automated amino acid analyzer(Waters Pico Tag HPLC system, Milford, MA, U.S.A.)를 이용하여 조직내의 아미노산 구성분을 분석하여 lysine과 hydroxylysine의 성분량이 감소되는 것으로 확인하였다. GA군은 이 단계까지만 처리를 하여 가장 흔히 사용하는 보존 방법인 0.2% GA 용액속에 담가서 4°C에서 이식할 때까지 보존하였다.

PEO-SO₃군에서는 GA와 교차결합된 개의 동맥혈관을 다시 PEO-SO₃로 표면개질하였다. GA와 결합된 혈관조직을 sodium borate buffer에 녹아있는 5%(wt/vol) PEO-SO₃ 용액(pH 11.0, KJIST, Seoul, Korea)에 넣고 상온에서 2일 동안 교반시켜 조직내의 잔유 aldehyde기와 Schiff-base 형성을 통한 공유결합으로 PEO-SO₃를 직접 결합시켰다. 이때의 조직과 PEO-SO₃의 결합 정도는 조직내의 sulfur양의 증가를 elemental analyzer로 측정하여 확인하였다. 마지막으로 PEO-SO₃와 결합된 혈관조직을 PBS로 다시 10번 정도 세척한 다음 0.01 mol/L NaBH₄로 16시간 동안 4°C에서 환원시켜 안정된 결합을 갖는 PEO-SO₃로 표면개질된 생체혈관을 만들었다(Fig. 2). 이렇게 처리된 생체혈관은 4°C의 0.2% GA 용액속에서 이식할 때까지 보존하였다.

5. 생체 동맥혈관의 이식 및 채취

혈관 이식을 위한 잡견의 전신 마취는 혈관 채취 시에 사용한 방법과 동일한 방법으로 하였다. 추가로 마취유지가 필

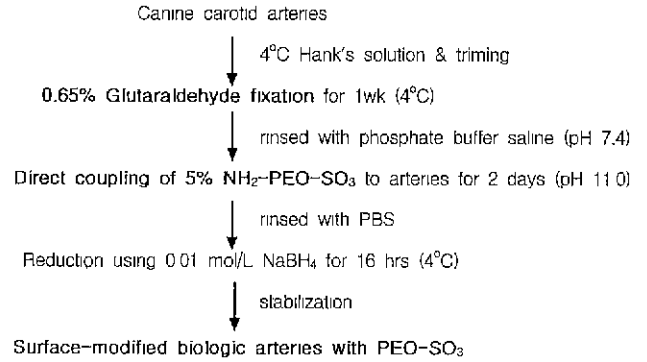


Fig. 2. Modification scheme of biologic arteries with sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃).

요할 경우는 근이완제를 투여하였으며 대퇴동맥 삽관을 통한 혈압과 심전도를 지속 감시하였다.

잡견을 전신마취 후 바로 눕힌 상태에서 경부 중앙 절개를 하여 양측 경동맥을 노출시킨 다음 헤파린(중외제약, 서울, 한국) 1 mg/kg을 정맥주사하였다. 다음으로 좌측 경동맥을 겸자로 차단하고 약 2 cm 길이로 원래의 동맥을 절제하였다. 그리고 미리 GA와 PEO-SO₃로 처리하여 준비한 두 군의 동맥혈관을 경동맥 절제 부위의 원위부와 근위부에 각각 7-0 prolene 봉합사로 연속봉합하여 동맥혈관을 재건하였다(Fig. 3).

혈관이식 후 두 군 모두 각각 3주와 6주 동안 생존시켜 관찰한 다음 다시 실험견을 전신마취한 상태에서 헤파린 1 mg/kg을 정맥주사한 다음 이식된 혈관조직을 포함한 주위 정상 혈관조직을 함께 채취하였다. 혈관 채취 후 실험견들은 고려대학교 실험동물 관리규정에 따라 KCl 2 mEq/kg를 정맥주사하여 안락사시켰다.

이식수술은 동일 술자에 의해 시행되었고, 실험견들의 감염예방을 위해 세팔로스포린계 항생제 1.0 g씩을 수술 직전과 직후에 한 번씩, 수술 1일 후에는 2번씩 정맥주사로, 이후 5일째까지는 근육주사로 투여하였다.

6. 칼슘과 인의 정량분석 및 통계 분석

채취한 동맥혈관 조직들을 증류수로 여러 번 세척하여 육안 소견을 관찰한 다음 생성된 혈전들을 제거하고 조직 주위에 유착되어 있는 섬유조직들을 제거하였다.

채취한 혈관조직을 작은 조각들로 잘라서 다시 증류수로 여러 번 세척한 후 90~110°C에서 2일 동안 건조시켜 무게를 측정한 다음, 약 600°C에서 10시간 정도 태워 재를 만들었다. 이때 생성된 재를 1% lanthanum chloride와 5% HCl이 섞여 있는 용액 2 ml속에 녹여 약 85°C에서 24 시간 동안 가수분해시켰다. 이때 생성된 가수분해산물을 inductively coupled plasma atomic emission spectrometer(ICP: Poly Scan G1E,



Fig. 3. Photographs of canine carotid arterial allografts implanted in the bilateral canine carotid arteries.

Thermo Jarrell ASH Co., Boston, MA, USA)를 이용하여 칼슘과 인의 양을 정량분석하였으며 건조 조직 1 g당 mg(mg/g of dried tissue) 단위로 평균±표준편차로 표시하였다.

통계적인 유의성은 SPSS(ver. 8.0)를 이용하여 비모수 통계 분석법인 Mann-Whitney test와 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 검정하였고 p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 3 주 동안 이식한 혈관 조직의 칼슘과 인의 변화(Fig. 4)

경동맥 혈관을 이식하기 전에 측정한 칼슘량은 GA군이 0.02 ± 0.01 mg/g, PEO-SO₃군은 0.06 ± 0.04 mg/g이었으나 이식 후 3주가 경과한 다음에 측정한 칼슘은 GA군이 0.56 ± 0.14 mg/g, PEO-SO₃군은 0.34 ± 0.03 mg/g으로 두 군간에 PEO-SO₃군에서 유의하게 적게 침착되었다(p<0.05).

또한 경동맥 혈관을 이식하기 전에 측정한 인의 양은 GA군이 0.79 ± 0.15 mg/g, PEO-SO₃군은 0.71 ± 0.05 mg/g이었으나 이식 3주 동안 침착된 인의 양은 GA군이 1.80 ± 0.07 mg/g, PEO-SO₃군은 1.12 ± 0.21 mg/g으로 두 군간에 PEO-SO₃군에서 유의하게 적게 침착되었다(p<0.05).

그리고 이식 전에 비해 3주 후에 동맥혈관 조직에 침착된 칼슘과 인의 양은 두 군에서 모두 유의한 차이로 증가하였다(p<0.05).

2. 6 주 동안 이식한 혈관 조직의 칼슘과 인의 변화(Fig. 5)

동맥혈관 조직에 침착된 칼슘량은 혈관 이식 전에는 GA군은 0.02 ± 0.01 mg/g, PEO-SO₃군은 0.03 ± 0.01 mg/g이었으며 이식 6주 후 침착된 칼슘량은 GA군이 1.11 ± 0.16 mg/g, PEO-SO₃군은 0.54 ± 0.08 mg/g이었다(p=0.05).

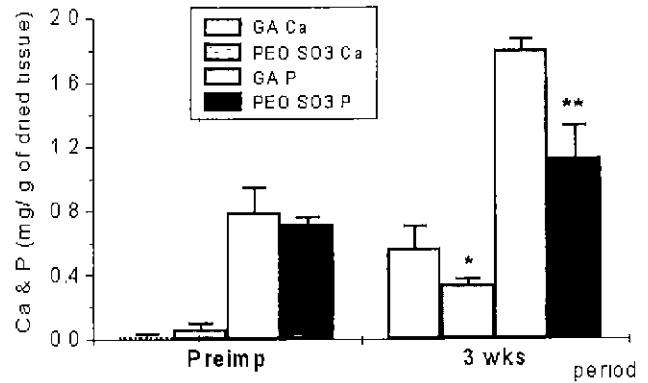


Fig. 4. Calcium and phosphorus contents of canine carotid arterial allografts after implantation of 3 weeks *p<0.05 between two groups in calcium content. **p<0.05 between two groups in phosphorus content. Preimp; preimplantation, GA; glutaraldehyde, PEO-SO₃; sulfonated polyethyleneoxide

또한 동맥혈관 조직에 침착된 인의 양은 혈관 이식 전에는 GA군은 0.72 ± 0.06 mg/g, PEO-SO₃군은 0.71 ± 0.06 mg/g이었으며 이식 6주 후 동맥혈관 조직에 침착된 인의 양은 GA군이 1.89 ± 0.62 mg/g, PEO-SO₃군은 0.72 ± 0.10 mg/g이었다(p=0.05).

그리고 이식 전에 비해 6주 후에 침착된 칼슘량은 유의한 차이로 증가하였으나(p<0.05) 인의 증가량은 통계적인 유의성이 없었다.

고 찰

생체 이식재료의 병적인 석회화는 심혈관 질환에 많이 사용되는 조직판막과 같은 여러 인공장기에서 기능장애를 초래하므로 임상에서 중요한 문제를 일으킨다.

Glutaraldehyde(GA)는 다른 aldehyde기 화합물에 비해 조직과 교차결합을 쉽게 형성하므로 생체 이식조직의 안정성을 향상시키기 위해 임상에서 흔히 사용된다¹⁸⁾. 조직과 GA의 교차결합은 조직 단백질인 lysine의 ε-amino기의 질소 원자내 비공유 전자와 GA의 주된 형태인 α, β-unsaturated aldehyde polymer속의 aldehyde carboxyl기의 탄소원자가 주로 Schiff-base 반응물을 생성하여 분자간(intermolecular) 및 분자내(intramolecular) 결합이 형성된다¹⁹⁾. 그러나 GA와의 교차결합은 조직의 석회화 발생에서 가장 중요한 요인으로도 작용한다. 특히, GA로 처리한 조직의 석회화는 숙주와 이식조직의 여러 요인들의 복합적인 상호작용으로 일어난다. 이것은 Schiff-base 형성에 의한 교차결합이 수용액속에서 비교적 불안정하여 aldehyde기가 방출되어 조직의 변성이나 독성반응을 일으키고³⁾ 또한 이식조직의 결합조직세포(connective

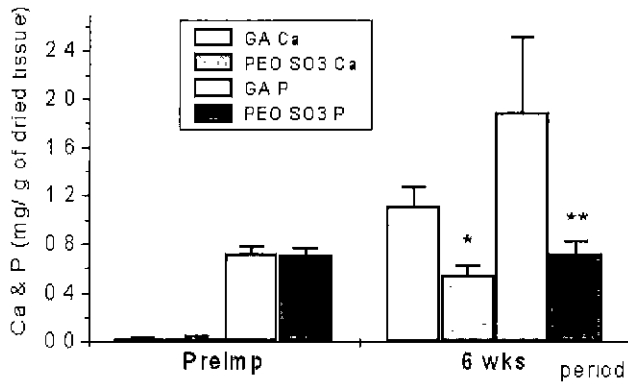


Fig. 5. Calcium and phosphorous content of canine carotid arterial allografts after implantation of 6 weeks. *p=05 between two groups in calcium content. **p=05 between two groups in phosphorous content Preimp, preimplantation, GA, glutaraldehyde, PEO-SO₃; sulfonated polyethyleneoxide.

tissue cell)와 교원질의 피사를 유발하여 석회화 과정이 불가피하게 일어나기 때문이다³⁾.

조직의 안정을 위한 GA와의 교차결합은 반응 초기 24시간 내에 최대로 일어나지만 적절한 교차결합을 위해서는 장기간 반응시키는 것이 중요하다⁴⁾. 본 연구에서는 조직과 GA를 중성 수용액에서 약 1주일 정도 교차결합시켰는데, 조직내 아미노산 성분을 분석한 결과 lysine 성분이 2.43%에서 0.73%로 감소된 것으로 보아 교차결합이 충분히 이루어졌음을 확인할 수 있었다

GA와 교차결합된 이식조직이나 인공생체재료의 석회화 발생을 예방하기 위한 많은 연구들이 진행되어 왔다. Diphosphonate는 내인성 칼슘 침착 억제제인 pyrophosphate 유도체의 하나로 GA 처리조직의 잔유 aldehyde기와 Schiff-base반응을 통한 공유결합을 형성하여 인산칼슘 형성을 억제하고 수산화인회석 결정을 방지하여 석회화를 억제한다고 알려져 있다⁶⁾. 그러나 전신 투여시 골 대사에 비가역적인 부작용을 초래하여 골 발달과 신체 발달에 장애를 초래할 수도 있다고 하였다⁶⁾. 양이온성 금속염(AlCl₃, FeCl₃)은 수산화인회석의 핵 형성 부위에 침착되는 인산의 산소원자와 쉽게 양이온 결합을 하여 강력한 정전기적인 상호작용을 유지하며, 또한 초기 핵 형성 부위인 기질수포내의 alkaline phosphatase의 활성도를 억제하여 석회화를 방지한다고 알려져 있다⁷⁾.

표면활성제인 sodium deodecyl sulfate(SDS)는 초기에 세포막의 인지질을 제거하고 또한 세포막의 표면 전하를 소수성 상태로 변화시키며 기질수포내의 alkaline phosphatase의 활성도를 억제하여 세포관련 석회화를 억제한다고 알려져 있다⁸⁾. 하지만 SDS는 조직판막 교원질의 본질과 부종을 초래하여 내구성을 현저히 감소시키고 또한 피하이식에서는 효과적이

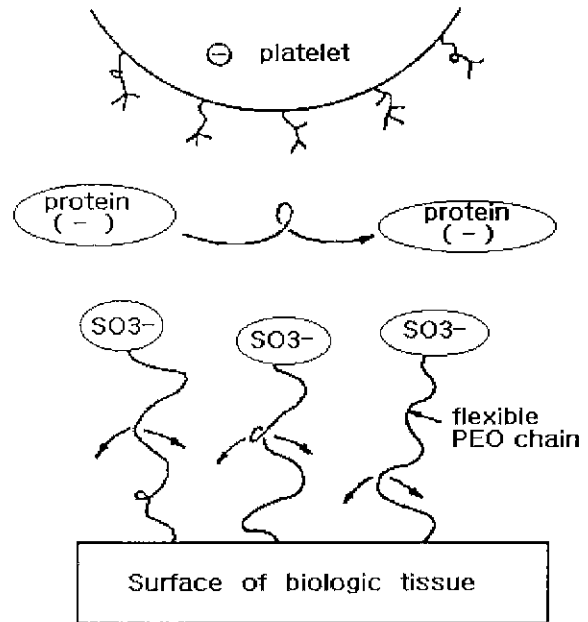


Fig. 6. Negative cilia model of surface-modified biologic canine arteries with sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃).

었지만 쇠 심낭 조직판막의 순환계 이식에서는 효과가 없었다고 하였다¹⁹⁾. Amino oleic acid(AOA)는 세정제로써 GA로 처리한 돼지 대동맥 판막에서 2-amino group이 잔유 aldehyde 기들과 Schiff-base 반응을 통해 결합하여 조직세포의 지속적인 피사를 방지하므로써 passive Ca²⁺ influx를 방지하고 또한 calcium-phospholipid-phosphate 복합체를 파괴하여 핵 형성 과정을 억제하여 석회화를 방지하지만 장기적인 생체내 안정성과 AOA의 변성 가능성이 문제이다⁹⁾.

한편 생체재료의 혈액적합성과 생체내 안정성을 향상시키기 위해 조직 표면에 대한 연구가 진행되어 왔었다. 본 연구에서 사용한 sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃)는 PEO와 propane sultone속의 sulfonate를 결합시켜 합성한 화합물이다. Han 등^{12,13)}은 PEO-SO₃를 최초로 합성하여 polyurethane(PU) 표면에 결합시켜 혈액적합성에 미치는 효과를 연구하였는데, 높은 유동성을 가지는 PEO와 음전하를 띠는 sulfonate의 전기적인 반발력에 의해 "negative cilia model" 현상이 발생되어 단백질과 혈소판 유착을 현저히 억제하였다고 하였다. 이것은 조직이나 중합체 표면에 PEO를 결합시키고 또한 음전하의 sulfonate를 결합시키면 혈액적합성이 현저히 향상될 수 있다는 다른 연구들의 이론과 유사한 결과를 보여준다^{10,20)}. PEO는 물과의 접촉면 자유에너지가 낮아 물에 잘 녹는 독특한 성질을 가지는 대표적인 친수성 중합체이다. 또한 수용액 속에서 다른 중합체에 비해 조직과 반응이 쉽고 확장된 사

슬구조가 매우 높은 유동성을 보임으로써 혈액성분에 대해 비점착성을 가지며 입체적인 안정성(steric stabilization)을 가지고 있다^{19, 21}.

그리고 조직 표면이 음전하를 띠는 sulfonate와 결합되면 혈액적합성이 향상될 수 있다. 이것은 헤파린이 음전하를 띠는 sulfonate 성분에 의해 독특한 항응고 효과를 보이고 정상 신체의 혈액성분과 혈관벽이 각각 음전하 상태를 띠고 있어서 전기적인 반발력이 작용하여 항혈전성이 유지되는 것으로 확인된다²². 그런데 Han 들¹³은 PEO-SO₃가 결합된 PU으로 제작한 관막은 쥐의 피하 이식 연구에서 생체내 안정성 및 석회화 저항성을 보였다고 하였다.

PEO-SO₃로 표면개질한 생체조직의 석회화 저항 효과는 여러 기전으로 설명할 수 있다. 우수한 혈액적합성을 보이는 PEO-SO₃의 “negative cilia model” 현상은 석회화 방지의 중요한 기전으로 작용할 수 있다¹³(Fig. 6). 즉, 높은 유동성을 가지는 PEO의 확장된 사슬구조, 음이온 전하를 띠는 sulfonate의 전기적인 반발력에 의한 PEO-SO₃ 구조의 조직표면에 대한 수직방향 정렬과 혈소판이나 단백질 등 혈액 성분들과의 비점착성, 조직표면에 결합되어 있는 PEO-SO₃와 접촉해 있는 물 분자 구조의 변화 및 물 분자에 의한 조직표면의 빠른 수화(wettability) 현상 등이 유발되어 혈액성분들의 유착을 억제하여 항혈전성과 생체내 조직의 안정성이 향상되는데, 이것은 또한 항석회화 기전으로 작용할 수 있다.

석회화 과정에서 GA와 조직사이에 형성된 교차결합으로 인한 석회화 과정의 분자치원의 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 하지만 이식 초기에 주로 일어나는 조직 세포 관련 석회화는 이들 세포들의 독특한 칼슘-결합 특성의 변화와 관련되는 것으로 보인다²³. 조직을 GA로 처리하면 세포막이 괴사되어 세포내로 유입된 Ca²⁺을 제거하기 위한 세포내의 plasma membrane-bound Ca²⁺-ATPase나 액성 세포질(soluble cytosol) 혹은 막-결합 단백질들의 기능이 작동하지 못해 Ca²⁺이 세포내에 과다축적되어 세포막내에 풍부한 유기 인산 등과 결합하여 수산화인회석(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)을 형성하게 된다. 이러한 초기 미세결정 핵들이 증식하고 성장하여 추가로 무기질 침착이 일어난다²³. 이것은 심한 허혈로 비가역적인 손상을 받은 심근세포가 재관류로 혈액에 노출되면 심근세포의 미토콘드리아에 석회화가 잘 일어나는 것과 유사하다.

PEO-SO₃를 이용한 생체조직의 표면개질은 PEO-SO₃의 amino기가 GA의 잔유 aldehyde기와 직접 결합하므로써, GA로 처리한 생체조직을 이식시 석회화 발생의 가장 중요한 요인으로 알려진 GA 교차결합의 가역적인 변성과 aldehyde기의 지속적인 방출로 인한 독성반응을 제거하고 또한 조직표면의 내피세포 발달을 촉진시키는 효과를 보여 석회화를

방지한 것으로 설명할 수 있다²⁴.

PEO는 조직의 공간충전제(space-filler)로 작용하여 혈액적합성을 향상시킨다고 알려져 있는데, PEO-SO₃ 또한 친수성 공간충전제로서 작용하여 석회화를 억제할 수 있다. 조직이 GA와 교차결합되면 extracellular proteoglycan과 anionic mucopolysaccharide substance를 잃어버려 형태학상으로 조직내에 수분이 차지하는 공간이 풍부하게 되며, 이러한 공간은 조직내 석회 침착을 증가시키게 된다. 그런데 PEO-SO₃는 이러한 조직공간을 채워서 교원기질의 점탄성(viscoelasticity)을 향상시켜 무기질 핵 형성과 석회 침착을 억제하여 석회화를 방지하게 된다²⁰. PEO-SO₃의 공간충전제 역할은 또한 조직의 균질성(homogeneity)을 유지하여 석회화를 방지할 수 있다. 조직표면의 균질성과 유공성(porosity) 및 균열(crack) 상태는 석회화의 시작에 중요한 역할을 한다. Han 들¹³은 PEO로만 처리한 PU은 균열이 광범위하게 관찰되었으나 PEO-SO₃로 처리한 경우에는 표면이 매우 균질하고 균열이 적고 탐식세포에 의한 미세균열이 적어서 이물질의 부착을 억제하여 석회 침착에 대해 강한 안정성을 보였다고 하였다. 생체조직을 이용한 본 연구에서도 PEO-SO₃로 처리한 경우 조직 교원질의 파열 및 석회 침착이 적게 발생한 것은 조직의 표면을 매끄럽게 유지하는 효과를 보임으로써 이물질과 혈액성분들의 부착을 억제하여 석회화를 방지하는 한 기전으로 작용한 것으로 해석할 수 있다.

또한 조직표면의 전하 상태는 혈액적합성뿐만 아니라 석회화 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰. 그런데 본 연구에서 PEO-SO₃로 표면처리한 생체조직은 sulfonate에 의한 음전하 효과로 혈액성분과 전기적인 반발력을 보일뿐만 아니라 pH를 감소시키는 효과를 보여 조직표면에 침착되는 칼슘 화합물을 용해시켜 항석회화 효과를 보일 수도 있다.

PEO-SO₃는 높은 친수성을 가지므로 물과 빨리 결합하여 조직표면을 덮어서 다른 혈액 성분들의 부착을 방지하고 조직내 잔유 aldehyde기와 결합하여 독성반응을 감소시키기 때문에 AOA와 같이 세정계의 하나로서 작용하여 석회화를 방지할 수 있다¹³. 또한 PEO-SO₃는 석회화 발생 억제제인 diphosphonate와 같은 작용을 하여 석회화를 방지할 수 있을 것이다^{7,13}. 즉, 양이온의 칼슘이 일단 sulfonate에 결합하여 칼슘 복합체를 형성하게 되면 상대적으로 국소적인 유리 칼슘 농도는 감소하게 되고 또한 칼슘 복합체는 다른 이온들의 표면 결합을 방지하기 때문이다. 이것은 PEO-SO₃-PU의 이식 초기에 어느 정도 칼슘이 침착되면 시간이 경과해도 다른 PU들에 비해서 더 이상 칼슘 침착이 증가하지 않는 것을 통해 알 수 있다¹³.

한편 본 연구에서 이식기간에 따라 정동맥 혈관에 침착된

칼슘과 인의 양이 차이가 있었다. 조직 이식 초기의 세포 관련 석회화 과정에서 GA로 처리한 조직의 연체조직세포나 속주세포 등에 미세결정(microcrystal)인 인산칼슘이 형성되는 기전은 이들 세포들의 독특한 칼슘-결합 특성의 변화와 세포 내의 해부상 구획과 관련된다. 3주와 6주 동안 이식조직에 침착된 칼슘은 두 군 모두 유의한 차이로 증가하였는데, 인의 양은 3주까지는 유의하게 증가하였으나 6주에서는 더 이상 증가하지 않았다. 이식 초기 단계에서는 조직세포와 세포 외기질내의 인산이 풍부한 부위에서 세포내로 유입된 풍부한 양의 칼슘과의 결합이 지속적으로 증가하게 된다. 하지만 이식기간이 경과함에 따라 세포내의 칼슘은 지속적으로 풍부하게 유지되지만 무기침착의 주성분인 인산칼슘이 어느 단계까지 형성되면 세포내인산 농도가 풍부한 해부구조 부위들이 더 이상 풍부한 인산을 공급하지 못하므로 더 이상 인의 침착이 증가하지 않는 것으로 해석된다. 이러한 결과는 이식 초기에 칼슘과 인의 침착이 어느 정도 증가하지만 시간이 경과함에 따라 인의 침착은 더 이상 증가하지 않거나 혹은 오히려 더 감소하는 양상을 보인 다른 연구¹⁵⁾와 유사하다.

결 론

생체조직과 교차결합한 glutaraldehyde(GA)는 조직의 안정성을 향상시키지만 불가피하게 석회화로 인한 퇴행성 변성을 초래한다. 그런데 성견의 생체 동맥혈관을 GA로 교차결합시킨 후 sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃)로 표면개질하여 성견의 혈관에 이식한 본 연구에서 PEO-SO₃로 표면개질한 생체혈관은 석회화에 대해 강한 저항 효과를 보였다. 이러한 PEO-SO₃의 표면개질 효과는 매우 높은 유동성을 보이는 PEO 분자와 음전하를 띠는 sulfonate 결합에 의한 "negative cilia model" 현상에 의한 혈액적합성의 향상 및 조직내 공간충전제 역할, 친수성을 가지는 PEO 분자의 낮은 접촉면 자유에너지와 조직 표면의 균질성 유지 등 여러 기전들의 복합적인 작용으로 발생하는 것으로 설명된다.

비록 본 연구가 이식표본수가 적고 관찰기간이 짧은 점은 있지만, PEO-SO₃에 의한 생체조직의 표면개질은 석회화 저항 효과를 보였다. 따라서 본 연구에서 사용한 PEO-SO₃ 표면개질 방법은 임상에서 생체내 이식조직의 석회화로 인한 퇴행성 변성을 감소시키고 장기적인 내구성을 향상시킬 수 있는 유용한 방법으로 사료된다. 이러한 항석회화 방법의 동물 및 인체에서의 혈액적합성과 안정성, 그리고 석회화 방지 효과에 대해서 다른 항석회화 처리방법과의 비교 연구가 추가로 더 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Levy RJ, Schoen FJ, Golomb G. *Bioprosthetic heart valve calcification: Clinical features, pathology, and prospects for prevention*. CRC Crit Rev Biocompat 1986;2:147-87.
2. Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, et al. *Biomaterial-associated calcification. Pathology, mechanisms, and strategies for prevention*. J Biomed Mater Res 1988;22:11-36.
3. Gendler E, Gendler S, Nimni ME. *Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis*. J Biomed Mater Res 1984;18:727-36.
4. Levy RJ, Schöen 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.
5. Cosgrove DM, Lytle BW, Gill CC, et al. *In vivo hemodynamic comparison of porcine and pericardial valves*. J Thorac Cardiovasc Surg 1985;89:358-68.
6. Webb CL, Benedict JJ, Schoen FJ, Linden JA, Levy RJ. *Inhibition of bioprosthetic heart valve calcification with aminodiphosphonate covalently bound to residual aldehyde groups*. Ann Thorac Surg 1988;46:309-16.
7. 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;14:1003-7.
8. Hirsch D, Drader J, Thomas TJ, Schoen FJ, Levy JT, Levy RJ. *Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate. Preincubation and controlled release studies*. J Biomed Mater Res 1993;27:1477-84.
9. Gott JP, Girardot MN, Girardot JMD, et al. *Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique*. Ann Thorac Surg 1997;64:50-8.
10. Andrade JD. *Interfacial phenomena and biomaterials*. Med Instrum 1973;7:110-20.
11. Grasel TG, Cooper SL. *Properties and biological interaction of polyurethane anionomers: Effect of sulfonate incorporation*. J Biomed Mater Res 1989;23:311-38.
12. Han DK, Jeong SY, Kim YH, Min BG, Cho HI. *Negative cilia concept for thromboresistance. Synergistic effect of PEO and sulfonated groups grafted onto polyurethanes*. J Biomed Mater Res 1991;25:561-75.
13. Han DK, Park KD, Jeong SY, et al. *In vivo biostability and calcification-resistance of surface-modified PU-PEO-SO₃*. J Biomed Mater Res 1993;27:1063-73.
14. Park KD, Yun JY, Han DK, et al. *Chemical modification of implantable biologic tissue for anti-calcification*. ASAIO J 1994;40:M377-82.
15. Park KD, Lee WK, Yun JY, et al. *Novel anti-calcification treatment of biological tissues by grafting of sulfonated poly(ethylene oxide)*. Biomaterials 1997;18:47-51.

16. 김형목, 백만중, 선 경 등. PEO-SO₃를 이용한 항석회화 조직세포의 개발(I)-접편을 이용한 대동맥과 폐동맥 이식 실험연구-. 대흉외지 1998;31:919-23.
17. 김형목, 백만중, 김광택 등. PEO-SO₃를 이용한 항석회화 조직세포의 개발(II)-동맥과 복막 이식 실험연구-. 대흉외지 1998;31:1023-30.
18. Jayakrishnan A, Jameela SR. *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. Biomaterials 1996;17:471-84.
19. Jones M, Eidbo EE, Hilbert SL, Ferrans VI, Clark RE. *Anticalcification treatments of bioprosthetic heart valves: in vivo studies in sheep*. J Card Surg 1989;4:69-73.
20. Park KD, Okano T, Nojiri C, Kim SW. *Heparin immobilization onto segmented polyurethaneurea surfaces-Effect of hydrophilic spacers*. J Biomed Mater Res 1988;22:977-92
21. Lee JH, Kopecek J, Andrade JD. *Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants*. J Biomed Mater Res 1989;23:351-68.
22. Han DK, Lee NY, Park KD, Kim YH, Cho HI, Min BG. *Heparin-like anticoagulant activity of sulphonated poly(ethylene oxide) and sulphonated poly(ethylene oxide)-grafted polyurethane*. Biomaterials 1995;16:467-71.

=국문초록=

배경: 석회화 변성은 glutaraldehyde(GA)로 처리한 생체조직을 인체에 이식할 때 임상에서 기능부전을 일으키는 가장 중요한 원인으로, 재수술이 필요하거나 사망을 초래한다. 생체조직을 sulfonated polyethyleneoxide(PEO-SO₃)로 표면개질하면 높은 유동성을 가지는 친수성 PEO 사슬과 음전하를 가지는 sulfonate의 전기성 반발력에 의한 상승 효과로 조직의 혈액적합성 및 생체내 안정성과 석회화 저항성이 향상될 수 있다. 본 연구는 GA와 교차결합된 생체 동맥혈관의 PEO-SO₃ 표면개질이 조직의 석회화 방지에 미치는 효과를 이식기간에 따른 석회화 침착량의 변화를 정량측정하여 알아보고자 동물실험으로 성견의 혈관 이식 모델을 이용하여 조직내 침착된 칼슘과 인의 양에 대해 연구하였다. **대상 및 방법:** 성견(30~50 kg) 8마리로부터 경동맥 혈관 16개를 채취하여 다듬기를 한 다음, 0.65% GA로 1주일 정도 교차결합한 시킨 혈관(GA군, n = 8)과 0.65% GA로 교차결합시킨 후 PEO-SO₃ 표면개질을 한 혈관(PEO-SO₃군, n = 8)으로 나누어 준비하였다. PEO-SO₃ 표면개질을 위해 먼저 diamino-terminated PEO와 propionic sultone을 반응시켜 PEO-SO₃를 합성하였으며, GA와 교차결합된 생체 혈관을 5% PEO-SO₃ 용액과 2일 동안 교반시킨 후, NaBH₄로 16시간 동안 환원시켜 안정된 결합을 갖는 PEO-SO₃로 표면개질된 생체 혈관을 제조하였다. 실험은 성견(25~30 kg) 8마리를 대상으로 양측 경동맥 혈관을 절제한 다음 준비한 두 군의 혈관으로 재건하여 각각 3주(n = 4)와 6주(n = 4) 동안 생존시켜 관찰하였다. **결과:** 생체혈관을 3주 동안 이식 후, PEO-SO₃군은 GA군에 비해 칼슘(0.34±0.03 vs 0.56±0.14 mg/g of dried tissue)과 인(1.12±0.21 vs 1.80±0.07 mg/g)의 침착량이 유의하게 적었다(p<0.05). 그리고 칼슘과 인의 침착량은 이식 전에 비해 3주 후 두 군 모두에서 유의한 차이로 증가하였다(p<0.05). 이식 6주 후, 동맥혈관 조직에 침착된 칼슘과 인의 양은 칼슘(0.54±0.08 vs 1.11±0.16 mg/g), 인(0.72±0.10 vs 1.89±0.62 mg/g)으로 두 군간에 통계적인 차이는 없었다(p=0.05). 그리고 이식 전에 비해 6주 후에 침착된 칼슘량은 유의한 차이로 증가하였으나(p<0.05) 인의 증가량은 통계적인 유의성이 없었다. **결론:** PEO-SO₃에 의한 생체혈관의 표면개질은 GA와의 교차결합에 의한 석회화에 저항성을 보이며 이러한 방법은 석회화에 저항성이 강한 생체혈관 개발에 응용할 수 있다.

- 중심단어 . 1. 석회화
2. 조직보존법
3. 생체혈관.