

이종심혈관 조직에 대한 글루타알데하이드 및 용매를 첨가한 고정방법에 따른 장력, 탄력도 및 열성 안정성 비교연구

조성규* · 김용진* · 김수환* · 박지은* · 김웅한*

Comparison of the Uniaxial Tensile Strength, Elasticity and Thermal Stability between Glutaraldehyde and Glutaraldehyde with Solvent Fixation in Xenograft Cardiovascular Tissue

Sungkyu Cho, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.*, Soo Hwan Kim, M.D.*, Ji Eun Park, M.D.*, Woong-Han Kim, M.D.*

Background: With the advances of cardiac surgery, the demand for an artificial prosthesis has increased, and this has led to the development and utilization of diverse alternative materials. We conducted this research to improve an artificial prosthesis by examining the changes of the physical qualities, the pressure related tensile strength, the change in elasticity and the thermostability of a xenograft valve (porcine) and pericardium (bovine, porcine) based on the type of fixation liquid we used. **Material and Method:** The xenograft valves and pericardium were assigned into three groups: the untreated group, the fixed with glutaraldehyde (GA) group and the glutaraldehyde with GA + solvent such as ethanol etc. group. The surgeons carried out each group's physical activities. Each group's uniaxial tension and elasticity was measured and compared. Thermostability testing was conducted and compared between the bovine and porcine pericardium fixed with GA group and the GA + solvent group. **Result:** On the physical activity test in the surgeon's hand, no significant difference between the groups was sensed on palpation. For suture and tension, the GA + solvent group was slightly firmer than the low GA concentration group. In general, the circumferential uniaxial tension and elasticity of the porcine aortic and pulmonary valves were better in the fixed groups than that in the untreated group. There was no significant difference between the GA and GA + solvent groups ($p > 0.05$). Bovine and porcine pericardium also showed no significant difference between the GA group and the GA + solvent group ($p > 0.05$). When comparing between the groups for each experiment, the elasticity tended to be stronger in most of the higher GA concentration group (porcine pulmonary valve, porcine pericardium). On the thermostability testing of the bovine and porcine pericardium, the GA group and the GA + solvent group both had a sudden shrinking point at 80°C that showed no difference (bovine pericardium: $p = 0.057$, porcine pericardium: $p = 0.227$). **Conclusion:** When fixing xenograft prosthetic devices with GA, adding a solvent did not cause a loss in pressure-tension, tension-elasticity and thermostability. In addition, more functional solvents or cleansers should be developed for developing better xenografts.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:165-174)

Key words: 1. Xenograft
2. Glutaraldehyde
3. Bioprosthesis

*서울대학교 의과대학 서울대학교어린이병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

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

논문접수일 : 2008년 11월 11일, 심사통과일 : 2009년 2월 3일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-5209, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

심장 수술의 발전과 함께 선천성 복잡 심장 기형, 심장 판막 질환 및 대소 혈관 질환 등을 교정하기 위해 자기 조직이 아닌 다른 인공 보철편의 필요가 늘어나 그에 따른 다양한 대체제가 연구 개발, 이용되고 있으며, 특히 이종 장기로부터의 대체제는 오래 전부터 개발되어 사용되고 있다[1,2]. 과거부터 이종의 판막 및 심낭의 인체 내 이식이나 대체사용을 위해서 고정용액으로 glutaraldehyde (GA)가 가장 많이 사용되고 있다. 지금까지 많은 연구들은 소나 돼지 심낭이나 판막과 결합하는 GA의 알데하이드기(-CHO)가 체내의 칼슘과 반응하여 석회화가 일어나는 주 원인이 되고 있다고 판단하여[3,4], 이 알데하이드기의 결합부위를 미리 다른 물질과 결합시켜 칼슘과 결합하는 것을 막아 줌으로써 석회화를 방지하고자 시도하였다. 많은 연구에서 희석 GA 고정용액을 만들 때 기본적으로 마그네슘을 첨가하여 사용하고 있으며, 조직의 강화 및 무수상태(anhydrous)에서 탄력소(elastin) 등의 교차 결합(cross linking)을 위하여 계면활성제나 알코올 등 각종 용매(solvent)를 이용한 처리 방법 등이 소개된 바 있다. GA 석회화와 함께 기계적인 결합(mechanical failure)도 이종이식 판막과 심낭 보철편의 중장기 수술성적의 결합의 중요한 원인으로 알려져 있으나[5,6], 국내에서는 이종이식 판막과 심낭 보철 편에 대한 처치 방법에 따른 기계적인 성질에 대한 기초 연구가 없는 실정이다. 이에 본 저자들은 이종이식 판막과 심낭을 임상적 사용 전 아무 처치도 하지 않은 신선 그룹(fresh), GA로 고정된 그룹, GA에 에탄올 등과 같은 용매(solvent)를 첨가하여 고정된 그룹으로 나누어, 고정액과 방법에 따른 이종조직 판막과 심낭의 물리적 성질의 변화와 GA 결합의 안정성의 변화를 조직의 물리적 활성도(physical activity), 기계적 장력의 관계와 탄력도 변화, 열성 안정성 등을 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 이종 보철편의 채취

도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 도살된 돼지에서 심장 및 심낭을 적출하고, 차가운 phosphate buffered solution (PBS, 0.1 M, pH 7.4)에 넣어 ice box에 담아 실험실로 운반하여, 냉장상태에서 대동맥 판막, 폐동맥 판막, 심낭 등을 분리 적출하여 실험에 사용하게끔 보관한다. 또한 건강한 도살된 소의 심낭을 적출하여 같은 방법으로

운반한다.

2) 이종 판막, 심낭의 고정

도살장에서 냉장상태(4°C)로 실험실로 운반한 돼지의 대동맥 판막, 폐동맥 판막, 심낭, 그리고 소의 심낭을 도살 후 최소 12시간 내에 즉시 고정한다. GA만으로 고정한 그룹은 0.5~0.625% 혹은 1.5%, 3%의 완충 글루타알데하이드(buffered glutaraldehyde)에 담가 4°C에서 2~3일 고정 후 상온에서 0.3~0.25%의 완충 글루타알데하이드에서 7일간 고정하였다. GA의 고정과 함께 항 석회화를 위한 용매를 이용한 그룹은 0.25~0.3%, 0.5~0.625% 혹은 3% GA 고정 전과 고정 후의 방법으로 처리하였다. 처음부터 80% 에탄올(ethanol)이나 75% 에탄올+5% 옥타놀(octanol) 혹은 75% 에탄올+5% 옥타네디올(octanediol)을 같이 섞어 4°C에서 고정 후 상온에서 0.25~0.3% GA에 12일간 상온에서 고정하거나, 상온에서 0.5~0.625% GA에 5일 동안 고정 후 80% 에탄올이나 75% 에탄올+5% 옥타놀 혹은 75% 에탄올+5% 옥타네디올(PBS buffer, Ph 7.4)이 담긴 진탕기(shaker bath)에 넣어 2~3일간 처리 후 다시 상온에서 0.25~0.3% GA에 담가 7일간 고정 하였다. 이때 이종이식 대동맥 판막과, 폐동맥 판막의 고정 시에는 자연적인 형태를 유지하기 위해 형성 틀에 넣고, 대동맥판막은 14 mmHg, 폐동맥판막은 7 mmHg의 부하 압력(distension pressure)을 가한 후 판막이 뒤로 탈출되지 않음을 확인 후 무경관막압력(zero pressure)으로 고정하였다. 고정된 심낭 편들은 PBS solution으로 상온에서 여러 차례 세척한 후 4°C의 PBS 용액에 보관한 후에 각종 물리적 검사를 시행하였다.

3) 물리적 활성도 검사

처리된 이식 편들을 검사자의 손으로 직접 촉진, 봉합, 신장시켜 보았다. 검사의 일관성을 위하여 한 사람의 흉부외과의사의 기준으로 평가하였다. 촉진은 손으로 만져 보아 조직의 부드러운 정도를 측정하고, 봉합은 5-0 prolene을 이용하여 조직을 뚫을 때의 느낌을 기술하고, 신장도 조직을 당겨보아 늘어나는 정도를 측정 기술 하였다. 아무것도 처리하지 않은 이식 편을 0으로 기준하여 그 다음 단계별로 촉진(부드러움=1, 약간만 부드러움=2, 보통임=3, 부드럽지 않음=4, 약간 딱딱한 느낌=5), 봉합(잘 들어감=1, 약간만 잘 들어감=2, 보통임=3, 약간 저항감 느낌=4, 저항이 있음=5), 신장도(잘 늘어남=1, 약간 늘어남=2, 보통임=3, 잘 늘어나지 않음=4, 거의 늘어나지 않음=5)에

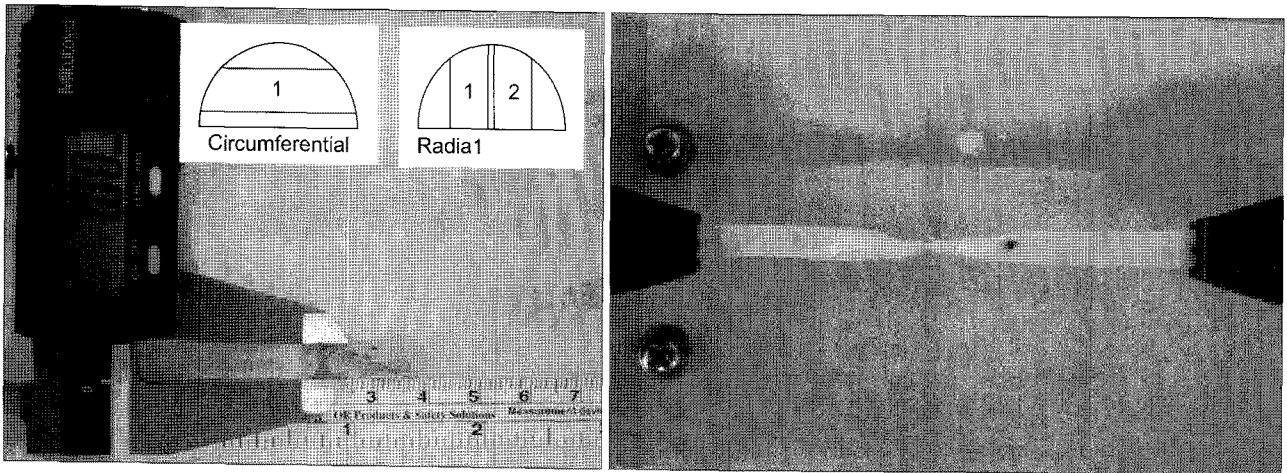


Fig. 1. Uniaxial tensile strength test of porcine valve and pericardium.

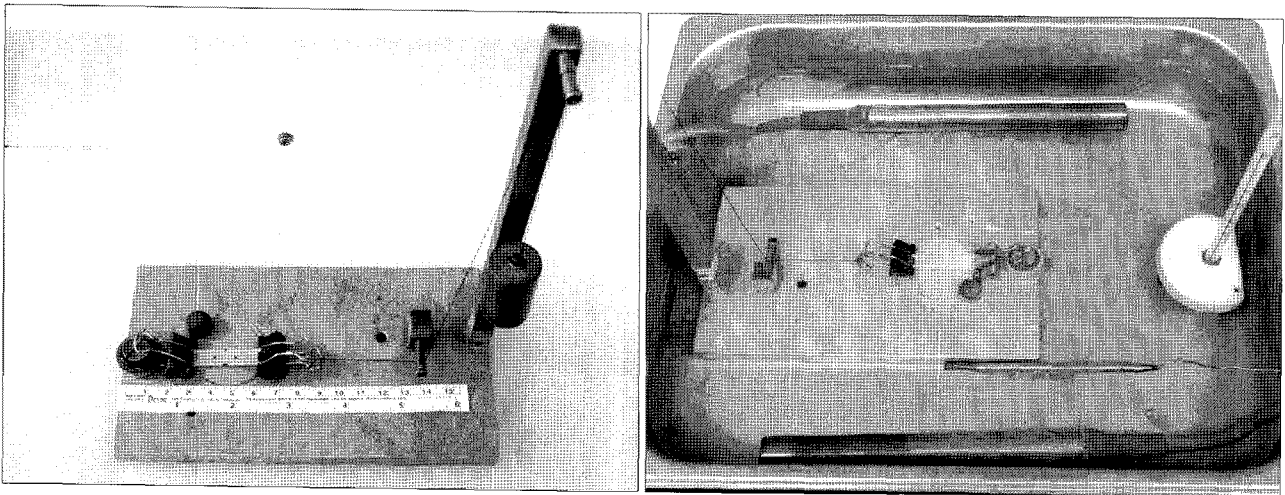


Fig. 2. Thermal stability test of bovine and porcine pericardium.

따라 점수를 매겨 각각 이식편의 점수를 평균 내어 저농도 GA, 고농도 GA, GA+용매 고정방법 별로 비교하였다.

4) 이종 판막, 심낭의 장력 검사와 탄력성 검사

처리된 돼지 대동맥 판막, 돼지 폐동맥 판막을 펼치고 원주방향(circumferential)과 방사방향(radial)으로 각각 방향을 달리하여 7.0×5.0 mm의 장 방향 절편을 취하여 폭 5 mm에 대한 인장강도와 탄력도를 측정 함으로서 그를 평균한 값이 그 판막의 인장강도 및 탄력도를 대표한 값이 되게 하였다(Fig. 1). 마찬가지로 처리된 돼지 심낭과 소의 심낭을 펼치고 30°C씩 각도를 달리하여서 얻을 수 있는 모두 6가지의 방향에 대해 0.5×5 cm의 장방향 절편을 취하여서

폭 5 mm에 대한 인장강도와 탄력도를 측정함으로써 그를 평균한 값이 그 심낭의 인장강도 및 탄력도의 대표 값이 되도록 시도하였다. 장력의 측정은, Digital Force Gauge, Model 5FGN, automated materials testing system (Japan Tech & Manufacture)을 이용, 심낭은 부하 속도(load speed) 100 mm/min, 판막은 부하 속도(load speed) 6 mm/min로 각각 달리 측정하여 단위는 Kgf/폭 5 mm로 표기하였다(Fig. 1)[7].

5) 소 심낭과 돼지 심낭의 열 안정성 검사

위와 같은 방법으로 어떤 처리도 하지 않은 이종 심낭절편과, GA 혹은 GA+용매로 처리된 이종 심낭절편을 8×30 mm의 절편으로 잘라 95 g의 추로 지속적인 장력을 가하

Table 1. Physical activity of xenograft by surgeon's hand

			Low GA	High GA	GA + solvent	
Palpation	Wall	N	18	15	38	p-value*
			1.77±0.42	1.86±0.51	2.10±0.60	p=0.087
	Valve	N	18	15	38	
			1.50±0.51	1.60±0.51	1.76±0.43	p=0.132
	Pericardium	N	18	15	23	
			1.66±0.48	1.73±0.45	2.04±0.56	p=0.071
Suture	Wall	N	18	15	38	p-value*/p-value [†]
			1.77±0.42	2.06±0.26	2.07±0.43	0.028/0.027
	Valve	N	18	15	38	
			1.44±0.51	1.66±0.48	1.89±0.61	0.021/0.018
	Pericardium	N	18	15	32	
			1.55±0.48	1.73±0.45	1.93±0.56	0.12/0.009
Extensibility	Wall	N	18	15	40	
			1.88±0.42	1.86±0.51	2.20±0.60	0.006/0.026
	Valve	N	18	15	40	
			1.38±0.51	1.66±0.48	1.95±0.43	0.000/0.000
	Pericardium	N	18	15	26	
			1.72±0.42	1.86±0.51	2.07±0.60	0.038/0.032

*=Statistical significances were tested by ANOVA analysis of variances among group; [†]=Paired T-test analysis between low GA group and GA + Solvent group (the group was selected based on ANOVA and Turkey's multiple comparison test); GA=Glutaldehyde.

게 한 후에 55°C의 증류수에 넣고 2°C/분의 속도로 물의 온도를 올리면서 이종이식 심낭절편이 급격하게 수축할 시점의 온도를 군별로 각각 측정 비교 하였다(Fig. 2).

6) 통계 방법

이종이식 판막과 심낭 장력을 Kgf/폭 5 mm, 탄력도는 처음길이에 대한 늘어난 길이의 비 %의 평균±표준편차로 표시하였다. 열 안정성 검사 시는 심낭 절편의 수축 시 온도를 °C로 표기하고 각 값을 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 통계적 차이는 paired T-test 및 ANOVA test로 검증하며, 각 실험 마다 고농도와 저농도의 GA로 고정 한 그룹까지의 각각의 그룹간 비교는 사후 검사 turkey b test를 하였다. p<0.05를 의미 있는 것으로 간주한다.

결 과

1) 물리적 활성도 검사

한 사람의 흉부외과의사에 의한 이종 이식 편에 대한 축진, 봉합, 신장도에 대한 주관적인 평가를 시행하였다. 이식편의 종류에 상관 없이 아무것도 처리하지 않은 것을 0으로 기준하여 고정 방법마다 다시 평가 하였으므로 종류별로 구분하지 않고 대 혈관 벽과, 판막, 심낭 세 군으

로 나누어 평가 Table 1에 나타내었다. 축진 시는 저농도 GA, 고농도 GA, GA+용매 처리 군간에 유의한 차이가 없었다. 봉합검사 시 저농도GA 고농도GA 처리군 간에 느껴지는 정도는 차이가 없었으나, 저농도와 GA+용매군 간에 대 혈관 벽(p=0.027), 판막(p=0.018), 심낭(p=0.009) 모두 유의하게 차이가 있었다. 신장도 검사에서도 저농도 GA와 GA+용매군 간에 대 혈관 벽(p=0.026), 판막(p=0.000), 심낭(p=0.0329) 모두 유의하게 차이가 있었다.

2) 돼지 대동맥 판막의 Fresh, Glutaraldehyde, Glutaraldehyde+용매 그룹 간 압력-장력, 압력-탄력 비교

아무런 처리를 하지 않은 돼지 대동맥 판막과 GA로 처리한 돼지 대동맥판막, GA+용매로 처리한 돼지 대동맥 판막의 장력과 탄력도를 Table 2에 나타내었다. 대동맥 판막의 원주(circumferencial)방향의 장력과 탄력 비교에서 아무런 처리를 하지 않은 대동맥판막에 비해 GA 혹은 GA+용매 처리를 한 대동맥 판막이 장력(0.025)이나 탄력도(p=0.006)가 더 증가하였다. 하지만 GA만 처리한 것과 GA+용매로 처리한 두 군간에 장력과 탄력도에 차이가 없었다. 대동맥 판막의 방사(radial)방향의 장력과 탄력비교는 장력의 경우 세 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 보이

Table 2. Tensile strength and elasticity of circumferencial and radial aortic valve

		Fresh	GA	GA + Solvent	p-value*/p-value [†]
Aortic circumferential	N	18	14	28	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	1.46±0.52	1.95±0.77	1.91±0.77	0.025/0.863
	Elongation ratio (%)	45.03±11.37	75.62±40.92	63.28±23.50	0.006/0.220
Aortic radial	N	17	13	28	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	0.23±0.06	0.43±0.16	0.30±0.04	0.175/0.278
	Elongation ratio (%)	58.35±5.96	89.04±12.94	71.72±4.44	0.029/0.120

*=Statistical significances were tested by ANOVA and Turkey's multiple comparison test of variances among group; [†]=Paired T-test analysis between GA group and GA + Solvent group; GA=Glutaladehyde.

Table 3. Tensile strength and elasticity of circumferencial and radial pulmonary valve

		Fresh	GA	GA + Solvent	p-value*/p-value [†]
Pulmonary circumferential	N	23	14	27	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	0.78±0.34	1.25±0.12	1.30±1.29	0.00/0.792
	Elongation ratio (%)	34.51±34.52	65.64±35.10	82.94±44.51	0.00/0.183
Pulmonary radial	N	23	14	17	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	0.14±0.05	0.18±0.66	0.16±0.45	0.073/0.401
	Elongation ratio (%)	64.77±16.36	97.06±40.56	102.64±39.68	0.003/0.686

*=Statistical significances were tested by ANOVA and Turkey's multiple comparison test of variances among group; [†]=Paired T-test analysis between GA group and GA + Solvent group; GA=Glutaladehyde.

Table 4. Tensile strength and elasticity of boviine pericardium

		Fresh	GA	GA + Solvent	p-value*/p-value [†]
Bovine pericardium	N	42	35	70	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	1.51±0.78	2.61±1.28	2.58±1.17	0.00/0.927
	Elongation ratio (%)	19.26±6.34	30.57±14.29	24.52±10.97	0.000/0.032

*=Statistical significances were tested by ANOVA and Turkey's multiple comparison test of variances among group; [†]=Paired T-test analysis between GA group and GA + Solvent group; GA=Glutaladehyde.

지 않았으나(p=0.175), 탄력비교에서는 아무런 처리를 하지 않은 것보다 GA나 GA+용매로 처리한 군이 더 나은 것으로 나왔고(p=0.029), GA로 처리한 군과 GA+용매로 처리한 군은 서로 유의하게 차이가 없었다(p=0.120).

3) 돼지 폐동맥 판막의 Fresh, Glutaraldehyde, Glutaraldehyde + 용매 그룹 간 압력 장력, 압력-탄력 비교

아무런 처리를 하지 않은 신선한 돼지 폐동맥 판막과 GA로 처리한 돼지 폐동맥판막, GA+용매로 처리한 돼지 폐동맥판막의 장력과 탄력도를 Table 3에 나타내었다. 폐

동맥 판막의 원주방향의 장력과 탄력 비교에서 아무런 처리를 하지 않은 폐동맥판막에 비해 GA 혹은 GA+용매 처리를 한 폐동맥 판막이 장력이나 탄력도가 더 높게 나왔다(p=0.00). 하지만 GA만 처리한 것과 GA+용매로 처리한 것은 장력과 탄력도에 차이가 없었다. 폐동맥 판막의 방사방향의 장력과 탄력비교는 장력의 경우 세 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나(p=0.073), 탄력비교에서는 아무런 처리를 하지 않은 것보다 GA나 GA+용매군이 더 나은 것으로 나왔고(p=0.003), GA군과 GA+Solvent군은 서로 유의하게 차이가 없었다(p=0.686).

Table 5. Tensile strength and elasticity of porcine pericardium

		Fresh	GA	GA + solvent	p-value*/p-value †
Porcine pericardium	N	42	35	70	
	Tensile strength (Kgf/5 mm)	0.76±0.32	0.83±0.39	0.81±0.34	0.816/0.837
	Elongation ratio (%)	11.43±3.54	15.62±6.51	16.75±7.53	0.163/0.427

*=Statistical significances were tested by ANOVA and Turkey's multiple comparison test of variances among group; †=Paired T-test analysis between GA group and GA + Solvent group; GA=Glutaldehyde.

Table 6. Thermal stability test of bovine pericardium and porcine pericardium

		Fresh	GA	GA + solvent	p-value*/p-value †
Bovine pericardium	N	30	35	35	70
	Thickness (mm)	0.32±0.052	0.40±0.12	0.37±0.10	0.001/0.183
	Temperature at sharp deflection point (°C)	66.33±1.39	79.96±1.73	80.86±2.45	0.000/0.057
Porcine pericardium	N	30	35	65	
	Thickness (mm)	0.01±0.02	0.15±0.03	0.17±0.06	0.000/0.265
	Temperature at sharp defelction point (°C)	65.42±1.52	79.39±2.36	79.98±2.28	0.000/0.227

*=Statistical significances were tested by ANOVA and Turkey's multiple comparison test of variances among group; †=Paired T-test analysis between GA group and GA + Solvent group; GA=Glutaldehyde.

4) 소 심낭의 Fresh, Glutaraldehyde, Glutaraldehyde + solvent 그룹 간 압력-장력, 압력-탄력 비교

아무런 처리를 하지 않은 신선한 소 심낭과 GA로 처리한 소 심낭, GA+용매로 처리한 소 심낭의 장력과 탄력도를 Table 4에 나타내었다. 아무런 처리를 하지 않은 신선한 돼지 심낭에 비해 GA 혹은 GA+용매 처리를 한 돼지 심낭의 장력이 더 나왔다(p=0.00). GA만 처리한 것과 GA+용매로 처리한 것 간에는 장력에 차이가 없었다(p=0.927). 아무런 처리를 하지 않은 돼지 심낭에 비해 GA 혹은 GA+용매 처리를 한 돼지 심낭의 탄력도는 더 좋았고(p=0.00), GA만 처리한 것에 비해 GA+용매로 처리한 것이 탄력도가 더 좋았다(p=0.032).

5) 돼지 심낭의 Fresh, Glutaraldehyde, Glutaraldehyde + solvent 그룹 간 압력-장력, 압력-탄력 비교

아무런 처리를 하지 않은 fresh 돼지 심낭과 GA로 처리한 돼지 심낭, GA+용매로 처리한 돼지 심낭의 장력과 탄력도를 Table 5에 나타내었다. 아무런 처리를 하지 않은 돼지 심낭과 GA 혹은 GA+Solvent 처리를 한 돼지 심낭의 장력이나 탄력도에 유의한 차이가 없었다(p=0.816/p=0.163). 그리고 GA만 처리한 것과 GA+용매로 처리한

것의 비교에도 장력과 탄력도에 유의한 차이가 없었다(p=0.837/p=0.427).

6) 소 심낭, 돼지 심낭의 Glutaraldehyde, Glutaraldehyde + solvent로 처리한 그룹간 열 안정성 비교 검사

아무 처리도 하지 않은 소와 돼지 심낭, GA로 처리한 소와 돼지 심낭, GA+용매로 처리한 소와 돼지 심낭의 열 안정성을 Table 6에 나타내었다. 아무 처리도 하지 않은 소 심낭의 두께(p=0.001), 급격 수축 시점 온도(p=0.000), 돼지 심낭의 두께(p=0.000), 급격 수축 시점 온도(p=0.000)는, GA 혹은 GA+용매로 처리한 것들에 비해 유의하게 차이가 있었다. GA로 처리한 소 심낭과 GA+용매 처리를 한 소 심낭 간에 심낭의 두께(p=0.183)와 급격하게 수축할 시점의 온도(p=0.057)는 유의하게 차이가 없었고, GA로 처리한 돼지 심낭과 GA+용매처리를 한 돼지 심낭 간에도 두께(p=0.265)와 온도(p=0.227)는 모두 유의하게 차이가 없었다. 아무것도 처리하지 않은 이식절편의 급격 수축 시점 온도는 65~66°C였고 GA 혹은 GA+용매로 처리한 이식절편이 급격하게 수축하는 시점의 온도는 모두 80°C 근처였다. Pearson 상관 분석을 구한 심낭절편 수축시의 온도와 심낭 두께 간에는 상관 관계가 없었다(p>0.4).

7) 저농도 Glutaraldehyde, 고농도 Glutaraldehyde 그룹 간 비교

각 이식 편 별로 통계 비교 검사 후 사후 검사를 통해, 저농도 GA, 고농도 GA, 용매 첨가 유무 별로 추가 검사를 하였다. 돼지의 대동맥 판막은 원주방향, 방사방향 모두에서 용매 첨가 상관 없이 저농도 GA 고정군과 고농도 GA 고정군간에 장력비교와 탄력도 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 돼지의 폐동맥 판막은 원주방향 장력비교에서는 저, 고농도 GA군간에 용매 첨가 유무 관계 없이 차이가 없었으나, 원주방향 탄력도 비교에서 solvent를 첨가하지 않은 군에서와(저농도 GA 처리 vs 고농도 GA: $50.90 + 23.54$ vs $102.50 + 33.75$, $p=0.028$), 용매를 첨가한 군에(저농도 GA 처리+용매군 vs 고농도 GA+용매 처리군: $62.89 + 39.88$ vs $108.00 + 37.75$, $p=0.001$)서 고농도 GA 고정 시 탄력도가 증가 하였다. 돼지의 폐동맥 판막의 방사방향 장력비교에서는 저, 고농도 GA 고정군간에 용매 첨가 유무 관계없이 차이가 없었으나, 방사방향 탄력도 비교에서는 용매를 첨가한 군에서 고농도 GA로 고정 한 것에서 탄력도가 증가 하였다(저농도 GA+용매 vs 고농도 GA+용매: $84.39 + 26.20$ vs $125.44 + 42.72$, $p=0.011$). 소의 심낭은 용매첨가 상관 없이 저농도 GA 고정군과 고농도 GA 고정군간에 장력비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었고($p > 0.05$), 탄력도 비교에서 저농도 GA 고정 시 용매를 첨가하지 않은 군이 용매를 첨가한 군보다 탄력도가 증가하였다(저농도 GA vs 저농도 GA+solvent: $34.26 + 15.29$ vs $21.00 + 8.27$, $p=0.000$). 돼지 심낭의 장력비교는 저농도 GA 고정군과 고농도 GA 고정군간에 장력비교에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 탄력도 비교에서는 용매를 첨가하지 않은 군(저농도 GA vs 고농도 GA: $13.19 + 5.89$ vs $21.66 + 3.23$, $p=0.001$)과 용매를 첨가한 군(저농도 GA+solvent vs 고농도 GA+solvent: $13.66 + 6.02$ vs $20.86 + 7.43$ $p=0.000$) 모두 고농도 GA 고정군에서 탄력도가 증가하였다.

결과적으로 일방향성 압력-장력, 압력-탄력도 검사에서, 돼지의 대동맥 판막의 경우 GA 고정군과 GA+용매 고정군 간에 압력-장력 및 압력-탄력도에 통계적으로 유의하게 차이가 없었고, 돼지의 폐동맥 판막의 경우에도 GA 고정군과 GA+용매 고정군 간에 압력-장력 및 압력-탄력도에 통계적으로 유의하게 차이가 없었다.

돼지의 심낭과 소의 심낭의 경우에도 GA 고정군과 GA+용매 고정군 간에 압력-장력 및 압력-탄력도에 통계적

으로 유의하게 차이가 없었다. 돼지의 심낭과 소의 심낭의 열 안정성 검사에서도 GA 고정군과, GA+용매 고정군 간에 모두 80°C 근처로서 서로 차이가 없다.

고찰

심장 수술의 발전과 함께 이종이식 보철편의 개발과 이용은 오래 전부터 사용되고 있으며, 우리나라에서도 심혈관 수술의 발달과 함께 많이 사용되고 있다. 현재 국내에서 심혈관 수술에 이용하는 조직 보철 편은 모두 수입품으로 국내에서 개발 사용되고 있는 이종 이식 보철 편은 없으며, 이것들을 개발하기 위한 이종조직의 기계적인 성질에 대한 기초 연구 또한 없는 실정이나 그 제작에 특별한 어려움이 있는 것도 아니므로 표준화된 방법으로 국내에서 자체 생산하는 것이 여러 이점이 있을 것으로 생각된다. 조직의 고정 시 통상적으로 pH, 온도, 고정액의 농도가 높을수록 더 단단하게 고정되는 경향이 있는 것으로 알려져 있다[8]. 지금 까지 이용되는 이종이식 보철 편들은 이종의 판막 및 심낭의 사용을 위해서 고정용액으로 glutaraldehyde (GA)가 많이 사용되고 있다. 알려진 바와 같이 GA의 사용은 이종 보철편의 면역성을 감소시키고, 효소성 분해에 저항성을 증진시킨다[7]. 또한 조직의 교원 섬유들이 GA와 안정된 교차 결합을 이루며 GA 중합체(polymer)를 표면에 형성하게 한다. 저농도의 GA에 고정할 경우 판막과 같이 팽창하는 조직의 교차 결합에 더 나은 것으로 알려져 있고 고농도의 GA 고정할 경우 GA 자체가 조직 전체에 과도하게 확산 되지 않게 장벽을 형성하고 조직 자체의 무기질 침착을 덜하게 하여 조직의 rapid surface cross linking에 더 좋고, 장기 관찰 시 석회화도 저농도에 고정할 것보다 덜 진행되는 것으로 알려져 있다[9]. 그러나 GA만으로 고정 시 크게 두 가지 문제점이 제기되고 있는데, 조직의 경직으로 이종판막의 경우 여단이 시에 돌출(buckling)이 발생하여 구조적 분해를 조장하게 되는 것과, 많은 연구에서 조직의 석회화와, 세포독성이 문제 시 되고 있다[10]. GA의 자유 알데하이드기가 칼슘과 결합하는 것이 석회화의 주 원인으로 생각되고 있어[3,4,11,12] 이 알데하이드기의 결합 부위를 다른 물질과 반응시켜 칼슘이 붙는 것을 방해하면 석회화를 예방할 수 있을 것으로 생각되어 많은 연구에서 희석 GA 고정용액을 만들 때 기본적으로 마그네슘을 첨가하여 사용하고 있으며, GA 독성의 항 중화 작용으로 각종 아미노산 등이 사용되고 있다. 또한 계면활성제나 알코올 등 용매를 이용한 처치 방

법, 편역제거 방법 등이 소개된 바 있다. 이중이식 보철편의 고정 처리시 에탄올(ethanol), 부탄올(butanol), 메탄올(methanol) 혹은 long chain alcohol (LCA)인 옥탄올(octanol), 옥타네디올(octanediol)과 같은 용매의 첨가는 칼슘과 결합하는 근원이 되는 조직의 인지질 성분을 감소시키고 칼슘 인 핵 형성(calcium phosphate nucleation)을 억제하고 콜라겐의 크기와 수를 감소시키며, GA와 칼슘의 결합을 억제하여 조직의 석회화 성향을 감소시키는 것으로 알려져 있다[10]. 에탄올과 같은 short chain alcohol (SCA)의 경우 고농도(>50%, 수성 완충액 속에서(in aqueous buffers))에서 알데하이드기에 붙을 수 있는 인지질을 제거하고 조직 콜라겐의 입체형태를 변화 시키고, SCA와 LCA를 같이 사용할 경우 LCA의 구조가 인지질과 비슷하여 효과적으로 인지질을 제거 하는 것으로 알려져 있다[10]. 또한 우리 흉부 외과학교실에서 돼지의 심낭을 이용하여 GA 농도에 따른 장력-두께 간의 구조를 연구 하여, GA, 에탄올, SDS 무 세포화 처리 효과는 심낭의 두께에 통계적인 차이는 있었지만 그 영향은 크지 않았으며, 이러한 여러 처리과정 중 심낭 조직의 손상으로 인한 장력의 손실은 없는 것으로 보고한 바 있다[13]. GA 농도에 따른 장단점과, 여러 solvent의 이점이 있는바 고농도 혹은 저농도 GA에 Solvent를 첨가하였을 경우, cross link에 영향을 주는지 장력과 탄력에 차이가 있는지를 이전 연구의 연장선상에서 돼지의 대동맥 판막과, 폐동맥 판막, 소의 심낭과 돼지의 심낭에서 시행하였다.

심혈관 조직의 물리적 활성도 검사에서 촉진소견은 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 봉합과, 신장도면에서는 저농도 GA에 비해 GA+용매군이 좀더 단단하게 느껴졌다. 비록 주관적이긴 하나 임상에서 외과 의사 실제 수술 시 느껴지는 정도를 평가한 것으로 Solvent 첨가 시 약간 단단하게 느껴짐을 알 수 있었다.

일방향성 압력-장력, 압력 탄력도 검사에서 아무것도 처리하지 않은 돼지의 대동맥 판막과, 폐동맥 판막이 GA 혹은 GA+용매를 처리한 것의 원주방향 압력-장력과 압력-탄력도에서 유의하게 더 좋아짐을 알 수 있었다. 돼지의 대동맥 판막과 폐동맥 판막의 방사방향 장력과 탄력도는 아무것도 처리하지 않은 것과 GA 혹은 GA+용매로 처리한 것 간에 유의한 차이가 없었는데, 판막 옆의 섬유 방향이 방사형인 것과 실험 기법을 고려하였을 때 GA의 고정이 장력과 탄력을 좋게 하지만 판막의 구조적 섬유 방향을 따라서 교차 결합을 다르게 함을 알 수 있겠다. GA를 처리한 돼지의 대동맥 판막과, 폐동맥 판막과 GA+용매

를 처리한 군 간의 장력과, 탄력이 유의하게 차이가 없었는데 이는 용매의 첨가가 장력과, 탄력도에 통계적으로 유의한 차이를 가져 오지 않았음을 알 수 있다. 소 심낭의 경우 판막과 같이 아무것도 처리하지 않은 fresh한 것보다 GA 혹은 GA 용매로 처리한 것이 장력과 탄력도 모두 증가하였고 탄력도의 경우는 GA로 처리한 것이 GA+용매로 처리한 것보다 더 나은 것으로 나타났다. 돼지의 심낭의 경우는 세 군간에 장력이나 탄력도에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 각 실험과 그룹 별로 ANOVA 검사 후 사후 통계 검사(Turkey b test)로 GA 농도 별로 비교를 하였을 때 모든 군에서 그렇지는 않았지만, 고농도 GA로 처리한 군(돼지의 폐동맥 판막, 돼지 심낭)에서 탄력도가 더 증가하는 경향이였다. GA 처리 후 단기 실험이어서 조직의 석회화 정도에 따른 물리화학적 변화는 알 수 없었으나, 기존의 고농도 처리시 알려진 무기질 침착을 적게 하는 것과 같은 것들이 탄력도에 영향을 주었을 것으로 생각되며 더 많은 절편으로 소 동물에게 생체 내 이식하여 장기적으로 연구를 할 필요가 있겠다. 소 심낭 절편과 돼지의 심낭 절편을 GA로 처리한 군과 GA+용매로 처리한 군간에 교차 결합의 안정성을 말해주는 열 안정성 검사[7,14]는 모두 절편이 급격하게 수축하는 시점이 80°C로 서로 차이가 없는 것으로 나타났고, 이 실험을 통해 GA에 용매를 첨가하였을 경우, 장력이나 탄력도 이외에 교차 결합의 안정성에도 통계적으로 유의한 차이를 가져 오지 않았음을 알 수 있었다. 이 실험에서 GA 고정 후 용매를 이용하여 항 석회화 처치를 했을 때 판막의 경우 장력이나, 탄력도에 차이가 없었음을 알 수 있었고, 소의 심낭 절편과, 돼지의 심낭 절편의 경우 장력에는 차이가 없었으나, 소의 심낭 절편의 경우 탄력도에서 차이를 보이는 것은 동물의 종류에 따른 심낭 섬유의 배열이나 밀도, 두께 등 구조적 차이인지, 위치 별 차이인지는 정확치 않으나, 향후 좀더 객관적인 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 인산화 지방의 심낭 조직 내로의 유입이 또 다른 석회화의 조건이 되는 것으로 알려져 있어 이에 대해 계면활성제 SDS의 이용 또한 알려져 있어 추가 연구가 필요 하겠다[15].

이와 같이 이 실험에서 GA로 고정 시 용매의 첨가 여부에 따른 이중이식편인 돼지의 대동맥 판막과 폐동맥 판막, 소, 돼지 심낭 조직의 손상으로 인한 장력, 탄력도, 열 안정성 등 물리적인 손실은 없는 것으로 생각된다.

보철편의 기계적인 성질은 GA에 의한 고정 효과가 중요하며 GA 농도, 용매의 추가, 무 세포화나 항 석회화 처

리과정에 따라 이중이식 판막 및 심낭의 물리적, 화학적 변화가 있을 것으로 보이며, 또한 판막의 장력 및 탄력의 물리적 검사를 위해 판막 옆 절편이 아닌 판막 옆(leaflet)의 자연적인 상태에서의 양방향성 압력-장력, 압력-탄력도 측정을 좀더 생체와 비슷한 조건에서의 시행할 수 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다[16].

결 론

일방향성 압력-장력, 압력-탄력도 검사에서, 돼지의 대동맥 판막, 폐동맥 판막, 돼지의 심낭과 소의 심낭 등 모든 경우 GA 고정군과 GA+용매 고정군 간에 압력-장력 및 압력-탄력도에 통계적으로 유의하게 차이가 없었다. 돼지의 심낭과 소의 심낭의 열 안정성 검사에서도 GA 고정군과, GA+용매 고정군 간에 모두 80°C 근처로서 서로 차이가 없었다. 즉, 이중 보철편의 GA 고정 시 용매의 사용은 통계적으로 유의한 차이를 보이는 조직의 물리적 변화는 가져오지 않음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS. *Pericardial substitutes: delayed exploration and findings*. Ann Thorac Surg 1987;43:383-5.
2. Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N. *Technique for prevention of calcification of valvular bioprostheses*. Circulation 1984;70(Suppl I):I165-8.
3. Nimni ME. *The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis*. J Card Surg 1988;3:523-33.
4. Webb CL, Benedict JJ, Schoen 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.
5. Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R. *A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. J Cardiovasc Surg (Torino) 2006;47:711-8.
6. Garcia Paez JM, Jorge-Herrero E, Carrera A, et al. *Chemical treatment and tissue selection: factors that influence the mechanical behaviour of porcine pericardium*. Biomaterials 2001;22:2759-67.
7. Gratzner PF, Pereira CA, Lee JM. *Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials*. J Biomed Mater Res 1996;31:533-43.
8. Sung HW, Hsu CS, Lee YS, Lin DS. *Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: Effects of pH, temperature, and fixative concentration*. J Biomed Mater Res 1998;31:511-8.
9. Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, Oppell UO. *High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model*. Ann Thorac Surg 2000;70:2091-5.
10. Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE, Moore MA. *Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential*. J Biomed Mater Res 2004;69:140-4.
11. 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.
12. 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.
13. Kim KC, Lee C, Choi CH, et al. *Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (tensile strength-thickness)*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:170-6.
14. Stacchino C, Bona G, Bonetti F, Rinaldi S, Ciana LD, Grignani A. *Detoxification process for glutaraldehyde-treated bovine pericardium: biological, chemical and mechanical characterization*. J Heart Valve Dis 1998;7:190-4.
15. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, et al. *Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves*. J Heart Valve Dis 2002;11:463-71.
16. Christie GW, Barratt-Boyes BG. *Biaxial mechanical properties of explanted aortic allograft leaflets*. Ann Thorac Surg 1995;60:5160-4.

=국문 초록=

배경: 심장 수술의 발전과 함께 자기 조직이 아닌 다른 인공 보철편의 필요가 늘어나 그에 따른 다양한 대체체가 연구 개발, 이용되고 있다. 본 연구는 더 나은 인공 조직보철편의 개발을 위해 이중이식 판막(돼지)과 심낭(돼지, 소)을 고정액에 따른 조직의 물리적 성질의 변화와 장력의 관계, 탄력도 변화, 열성 안정성을 알아 보고자 하였다. 대상 및 방법: 이중이식 판막과 심낭을 처리하지 않은 그룹(fresh), glutaraldehyde (GA)로 고정한 그룹, glutaraldehyde (GA)에 ethanol 등과 같은 용매(solvent)를 첨가하여 고정한 그룹 세 그룹으로 나누어 검사하였다. 1) 각각의 군을 물리적 활성도 검사를 시행하였다. 2) 각 군별로 이중이식편의 일방향성 장력과 탄력도를 검사 비교하였다. 3) 소 심낭과 돼지 심낭을 각군 간에 열성 안정성 검사를 시행하였다. 결과: 1) 물리적 활성도 검사에서 촉진시 유의한 차이가 없었고, 봉합과, 신장도면에서 저농도 GA에 비해 GA+용매 처리군이 좀더 단단하게 느껴졌다. 2) 일반적으로 돼지의 대동맥, 폐동맥 판막의 원주방향 일방향성 장력과 탄력도는 아무것도 처리하지 않은 것보다 GA 혹은 GA+용매 처리 시 나아졌고, GA 혹은 GA+용매로 처리한 것 간에는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 소와 돼지의 심낭의 경우에도 GA 혹은 GA+용매로 처리한 것 간에는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 3) 각 실험과 군간에 GA 농도별로 비교 시 모든 군에서 그렇지는 않았지만, 고농도로 GA로 처리한 군(돼지의 폐동맥 판막, 돼지 심낭)에서 탄력도가 더 증가하는 경향이였다. 4) 소와 돼지 심낭 절편의 열 안정성 검사에서 GA 처리군과 GA+용매로 처리군간에 급격 수축 시점이 80°C로 서로 차이가 없었다(소 심낭: $p=0.057$, 돼지 심낭: $p=0.227$). 결론: 이중 이식 보철편의 GA 고정 시 용매의 첨가는 압력-장력, 압력-탄력도, 열성 안정성 등 물리적 손실은 가져 오지 않는 것으로 생각되며, 계속해서 더 나은 이식 보철 편 개발을 위한 여러 기능성 용매의 사용이나 세정 액의 연구개발이 필요하다.

- 중심 단어 : 1. 이중이식
2. 글루타알데하이드
3. 생체인공삼입물