

소의 심낭을 이용한 이종이식 보철편의 개발(I)

— 고정액의 농도와 장력 —

안 재 호* · 김 용 진**

— Abstract —

Investigation of Bovine Pericardial Heterograft (I)

— Concentration of fixatives and tensile strength —

Jae Ho Ahn, M.D.* and Yong Jin Kim M.D.**

Glutaraldehyde is known as an ideal preservatives for pericardial heterograft, and many laboratories used this chemicals for preparing tissue valves, pericardial patches and MVOP (monocusp ventricular outflow patch) so we tried to find out the appropriate concentration and ingredients of the Glutaraldehyde for the preparing bovine pericardium.

We selected 50 calves, aged about 2 years, and procured their pericardia. These were divided 6 groups such as fresh group, treated with only antibiotics, treated with Glutaraldehyde 0.5 %, 0.625 %, 0.75 %, and 0.875 %, and our experiments included microbial culture test, tensile strength measurement and microscopic examination.

On microbial culture, there were no growth on 1 week and 4 weeks after preparation with all kind of Glutaraldehyde, but on 4 weeks after only antibiotics treatment (Penicillin, Streptomycin, Kanamycin, Amphotericin ·B) E.coli and candida albicans were observed.

On tensile strength test, 0.625 % and 0.75 % Glutaraldehyde were revealed as the best preservatives for bovine pericardium and compared to other commercial products they kept more desirable tensile strength.

On light and electron microscopic examinations, Glutaraldehyde treated pericardia had much regular and compact collagem fibers and preserved more normal structures, but there were no difference between the different concentration of the Glutaraldehyde.

We concluded that 0.625 % and 0.75 % Glutaraldehyde were the best concentration for preservation of bovine pericardium in our experiment.

서 론

심장외과의 수술례가 증가하면서 많은 복잡심기형

- * 인하병원 흉부외과
Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Inha
General Hospital
- ** 서울대학교 병원 소아흉부외과
Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Seoul National University Childrens' Hospital
1989년 5월 8일 접수

및 재수술을 경험하게 되고 심장내 및 심낭 등에 결손이 있을 때 이의 교정을 위해 다른 조직이 필요한 경우가 많아졌다. 생체 적합성에서 볼때 자가조직이 최적이라는 것에는 이론의 여지가 없으나 자가조직을 이용할 수 있는 데는 양적인 제한이 있으므로 이의 대체제가 개발되어 Dacron, Teflon, PTFE (poly tetrafluoroethylene) 등의 인공섬유계통과 타 동물로부터 획득하는 천연재질 등이 현재 널리 이용되고 있으며 이들은 모두 외국에서 개발하여 전량 수입에 의존하고

있는 실정이다. 이 천연재질로서는 쉽게 구할 수 있는 소·돼지 등의 심낭이 흔히 사용되는데 면역학적 부작용을 없애고 석회화를 방지하며 세균학적 안전성을 얻기 위해 살균성 있는 고정액에 심낭을 처리하는 방법이 이용되고 있다.

1978년 Gallo 등이 Glutaraldehyde로 처리한 돈심낭을 개에게 사용하여 훌륭한 성적을 관찰하고 사람에게도 시도하여 유착 및 면역반응 등에서 좋은 결과를 보고한 이래 포르말린, 에틸렌글리콜, metaperiodate 처리 등 여러 변형 방법이 사용되었으나 아직은 글루타알데히드가 가장 적합한 보존제이자 고정액으로 여겨지고 있다. 이러한 실험성적 등을 바탕으로 상품화되어 나오는 것이 Shiley, Polystan Genetic Labs 등에서 나오는 제품인데 이들은 대개 Union-Carbide 회사로부터 글루타알데히드(Wydex®)를 공급받고 있다.

이 논문은 이 글루타알데히드를 보존제로 사용하여 우리 고유의 우심낭 이종이식 보철편 및 그를 이용한 제품을 만들어 내어 국산화함으로써 저렴하고 항구적인 공급을 도모하고자 하는 일련의 시도 중 첫 번째 논문이다.

연구 방법

우심낭의 획득

마장동 소재의 도축장에서 수의사의 협조하에 건강한 2살 전후의 도살된 소 50 마리로 부터 가능한 한 청결하게 심낭을 적출하여 지방을 대충 제거하고 항생제를 넣은 4°C의 Hanks 용액에 담아 보온통에 넣어 실험실로 운반한다. 이때 사용한 항생제는 Penicillin 50,000u/L, Streptomycin 1.0g/L, Kanamycin 1.0g/L, Amphotericin-B 25mg/L이었다.

글루타알데히드의 준비

처음의 실험에서는 Union-Carbide의 한국대리점인 동인당으로부터 필요한 농도의 글루타알데히드를 공급받고 완충제도 같이 공급받았으나 실험이 진행됨에 따라 석회화 등의 문제점을 보완하고자 50% 글루타알데히드(Wydex®)만을 구입하고 생화학교실에서 필요로 하는 농도에 따라 증류수와 생리식염수로 희석한 후 Hepes 완충제를 이용 pH와 Osmolarity를 맞추면서 실험을 계속하고 있다. 처음에 사용한 글루타알

데히드는 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%를 각각 공급받아 중탄산 나트륨, 제3인산나트륨, 제1인산 나트륨으로 이루어진 완충용액(Activator)을 사용법에 따라 적량을 넣으므로써 pH를 7.39~7.61로 맞춘 상태에서 우심낭을 고정하는 방법이었으며 이렇게 처리한 우심낭으로 인장강도를 측정하는데 이용하였다. 현재는 50% Wydex®를 직접 생리식염수와 증류수를 이용 희석하고 0.02M Hepes buffer로 pH를 7.3으로 맞추고 석회화 방지의 일환으로 0.26% Mgcl₂·6H₂O를 첨가하여 전체 Osmolarity를 290mOsm로 되도록하여 사용하고 있다.

우심낭의 처리

위와 같이 준비한 우심낭과 글루타알데히드를 이용하여 고정하기에 앞서 매끈한 표면을 갖는 제품을 만들기 위한 준비를 한다. 즉 5ℓ 들이의 큰 용기에 Hanks용액을 넉넉히 붓고 심낭을 용액에 완전히 잠긴 상태에서 자수들에 최소한의 장력이 미치도록 평편하게 고정하고 역시 멸균된 metzenbaum 가위와 forceps를 이용 지방조직 등이 붙어 너털거리는 외면을 매끈하게 고른후 자수들 채로 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%의 글루타알데히드용액이 들어있는 용기에 완전히 잠기도록 넣고 밀봉한다. 한 군은 항생제만을 섞은 Hanks용액에 보관한다. 이렇게 2일을 고정시키고는 자수들을 제거하고 균일한 부분을 일정한 규격으로 다듬어서, 처리한 글루타알데히드와 동일한 농도의 글루타알데히드가 100cc 정도 들어가는 밀봉할 수 있는 파이렉스 시험관에 하나씩 넣어 보관한다. 이렇게 하므로써 상품화된 수일제품과 비교하고 동물실험 및 임상실험에 이용할 수 있도록 준비된다.

세균학적 검사

시험관에 밀봉한, 농도 별로 준비된 우심낭을 1주일 및 4주일에 1×1cm정도로 떼어서 미생물 검사실에 의뢰하여 세균배양 검사를 시행한다. 이때 검사하는 항목은 일반 미생물 배양, 결핵균 배양, 진균 배양인데 항생제 만으로 처리한 군과 글루타알데히드 4종으로 처리한 군 등 모두 5군에 대해 항균 및 멸균 능력을 비교 관찰한다.

우심낭의 장력검사

심낭은 교원섬유들이 일정하지 않은 방향으로 달리면서 서로 교차하기도 하고 소용돌이도 치며 부위마다

그 분포가 균일하지 못하다. 따라서 무작위로 한 부분에서 떼어서는 그 심낭의 인장강도를 대표할 수가 없게 된다. 그래서 본 실험에서는 처리된 심낭을 펼치고 30°씩 각도를 달리하여서 얻어낼 수 있는 모두 6가지의 방향에 대해 0.5×5 cm의 장방향 절편을 취하여서 폭 5 mm에 대한 인장강도를 측정하므로써 그를 평균한 값이 그 심낭의 인장강도의 대표값이 되도록 시도하였다. 또한 표본의 수가 적으면 신뢰도가 떨어지므로 가능한 한 많은 표본을 취하여 통계처리를 시도한다. 장력의 측정은 0.5×5 cm의 장방향 절편을 취한 후 생리 식염수로 적셔서 경기도 군포 소재의 유한 사이나미드 회사로 운반하여 그곳에 설치된 Instron사의 Instron model 1130 Series IX, automated materials testing system을 이용 load speed 100 mm/sec, chart speed 100 mm/sec, interjaw distance 1.8 cm로서 측정하여 단위는 Kg중/5mm로 표기하였다. 또한 심낭의 두께와 장력과의 관계를 보기위해서 캘리퍼스로 표본들의 두께도 동시에 측정하였다.

광학현미경 검사

항생제로만 처리한 군과 글루타알데히드 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%로 처리한 4군들은 처리 후 1주일에, 그리고 대조군으로 갖 채취한 우심낭은 바로 광학현미경 검경 방법으로 고정하여서 모두 6군에 대해 검사를 실시한다. 즉 각 실험군의 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만들어서 4~5 μm의 박절을 취해 헤마톡실린-에오진 염색을 하여 관찰하였다. 또한 조직편을 2.5% 글루타알데히드에 고정한 후 탈수, 침투의 과정을 거쳐 Epon 블록을 만들어 미세박절기로 1 μm의 박절을 내어 툴루이딘 블루 염색을 하여 관찰하였다.

전자현미경 검사

광학현미경 검경 때 처럼 6 군에 대해 2.5% 글루타알데히드에 고정하고 osmium tetroxide에 후고정한 후 탈수, 침투의 과정을 거쳐 에폰 블록을 만든 다음 40~50 nm의 초미세 박절을 얻어 lead citrate, uranyl acetate에 중복 염색을 하여 Hitachi 투과형 전자현미경으로 관찰하였다.

통계적 처리

인장강도를 측정할 때 통계적 의미가 있도록 모두 800개 이상의 표본을 검사하여, 이를 IBM-AT 개인용

컴퓨터를 사용한 SAS 통계 package를 이용, ANOVA 및 T-test를 적용하였고, 또한 심낭의 두께와 장력의 관계를 상관계수와 regression 방정식으로 표시하였다. 이때 p-값은 0.05를 기준으로하여 유의 수준으로 삼는 것을 원칙으로 하였다.

결 과

세균학적 검사

항생제로만 처리한 군과 글루타알데히드 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%등으로 처리한 군 도합 5군에 대해 처리 후 보관 1주일 째에 배양을 시작한 결과 일반 미생물 배양, 결핵균 배양, 진균 배양에서 공히 아무런 균주도 자라고 있지 않음이 관찰되었다.

위의 5군에 대해 처리 후 보관 4주일 째에 배양을 시작한 결과 항생제만으로 처리한 군에서는 1주일 부터 균이 자라는 것이 관찰되어 3주일에 동정한 결과 E.coli와 Candida albicans가 자라는 것으로 나타났으나 글루타알데히드 4가지 농도로 처리한 군에서는 아무런 균도 관찰되지 않고 있다. 이는 저자 등이 선택한 항생제로는 항균작용이 완전치 못함을 시사하고 있다.

장력 검사

처리방법에 따라 분군하고 상품으로 나온 것과 갖 채취한 심낭 등의 장력을 비교한 것을 표1에 나타내었다.

즉 폭 5 mm로 균일화 시키고 길이는 대략 5 cm 정도로 하여 인장강도를 Kg중으로 표시한 것이다.

글루타알데히드로 처리한 것은 표본이 많은 편이나 항생제로만 처리한 것은 고정이 전혀 안되었고 보관도 곤란하여 표본수가 적었으나 1주일에 4.48 Kg중에서 4주일이 되면서 2.93 Kg중으로 급격히 떨어지는 양상을 보이고 있고 이를 t-test한 결과 p=0.07 정도로 나타나고 있다. 그러나 글루타알데히드로 처리한 군들에서는 시간의 경과에 따른 장력의 차이는 별로 인지되지 않고 있어 t-검증 상 0.5% 농도에서 p=0.25, 0.87%에서 p=0.25이고 나머지 두 군도 그 이상의 값을 나타내 일단 고정되면 장력 변화는 별로 없어 보인다. 이러한 농도 및 시간과의 관계, 상품, 비교 심낭군 등과의 유의한 차이 등을 보기 위해 ANOVA이 원배치법을 이용해 보았다. 이 표본 중 Polystan의 온심낭은 표본수도 적고 절대치가 많은 차이를 보이고

표 1. 심낭의 처리방법에 따른 장력의 비교 및 두께의 비교

	장 력			두 께	
	표본수	평균치 (Kg중/5 mm폭)	범위 (Kg중/5 mm폭)	표본수	범위 (mm)
fresh	35	3.386±1.461	1.0-7.30	29	0.29-0.6
항생제 Only	1주	4.483±2.372	1.15-9.02	5	0.57-0.61
	4주	2.925±1.537	1.15-5.85	12	0.25-0.55
0.5 % GA	1주	3.469±1.946	0.9-7.48	59	0.21-0.75
	4주	3.114±1.613	0.93-7.78	76	0.22-0.60
0.625 % GA	1주	3.883±1.982	0.95-8.70	77	0.23-0.61
	4주	3.929±1.804	1.02-8.56	88	0.24-0.63
0.75 % GA	1주	4.159±2.071	1.02-9.98	82	0.21-0.81
	4주	3.867±1.864	0.90-9.56	84	0.32-0.64
0.875 % A	1주	3.811±2.425	1.0-10.05	78	0.16-0.75
	4주	3.434±1.812	1.04-9.36	90	0.21-0.72
상품 Xenomedica (Equine)	35	2.754±1.43	1.0-6.40	32	0.14-0.57
Polystan (porcine)	9	1.32±0.416	0.6-2.20	6	0.26-0.32

있으므로 이를 제외하고 나머지 750개의 표본을 대상으로 크게 농도를 기준으로 7군으로 나누고(fresh, 항생제만, 글루타알데히드 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%, 및 상품), 시간을 기준으로 2군으로 무리를 지은 후 ANOVA를 해 보면 P(F)=0.0013으로 상당히 유의한 차이를 갖는 무리임을 알 수 있었다(표 2).

또한 농도에 따라, 시간에 따라서도 P(F)=0.0009, 0.0183 등으로 유의한 차이가 보이거나 이는 전체적인 양상만을 나타내는 것으로 글루타알데히드의 농

도별 효과를 보기 위해서는 글루타알데히드로 처리된 656개의 표본만을 다시 비교해야 한다. 그렇게 ANOVA한 것이 표3이다.

즉 글루타알데히드로 처리한 4군 간에는 P(F)=0.0187로서 유의한 차이가 있으며 특히 농도에 따라서는 P(F)=0.0044로 아주 의미있는 차이가 보이거나 시간이 경과하면서 즉 1주군과 4주군에서는 P(F)=0.0923으로 유의한 차이가 없다고 해석되어 진다. 이를 바탕으로 다시 표1을 해석하면 장력에 관해서는 항생제 처리

표 2. 전체표본에서의 Analysis of Variance

Dependent Variable: TENSION					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Rr >F
Model	11	113.33249574	10.30295416	2.81	0.0013
Error	738	2703.93205373	3.66386457		
Corrected Total	749	2817.26454947			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Tension Mean	
	0.040228	52.274241	1.9141224	3.66169333	
Dependent Variable: TENSION					
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr >F
CONC	6	84.473863	14.078977	3.84	0.0009
TIME	1	20.490737	20.490737	5.59	0.0183
CONC*TIME	4	8.367896	2.091974	0.57	0.6838

표 3. 클루타알데히드로 처리한 군에서의 Analysis of Variance

Dependent Variable:		TENSION			
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Rr >F
Model	7	64.75322898	9.25046128	2.42	0.0187
Error	648	2474.57018992	3.81878116		
Corrected Total	655	2539.32341890			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Tension Mean	
	0.025500	52.485431	1.9541702	3.72326220	

Dependent Variable:		TENSION			
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr >F
CONC	3	50.4650126	16.8216709	4.40	0.0044
TIME	1	10.8547850	10.8547850	2.84	0.0923
CONC*TIME	3	3.4334315	1.1444772	0.30	0.8256

로는 보존에 문제가 있으며 클루타알데히드 처리로서 보존효과를 기대할 수 있고 이때 그 농도 별 차이를 보면 0.5%에서는 1주, 4주에 모두 그 이상의 농도로 처리한 것과 비교하여 의미있게 낮게 나타나고 있음을 알 수 있다. 그 중 0.625%와 0.75%가 ANOVA 상으로 좋은 결과를 보인다고 해석된다. 또한 이들은 상품으로 나오는 외제와 비교하여도 의미있게 좋은 값을 보인다(그림 1).

이 장력에 영향을 미치는 심낭자체의 요소로는 심낭 섬유 방향과 심낭의 두께를 들 수 있겠다. 첫째, 심낭 섬유 방향은 표1에서 보듯 장력의 범위가 낮은 것과 높은 것이 대개 1kg중에서 10kg중으로 10배 이상의 차이가 있음을 알 수 있고 둘째, 심낭의 두께는 일견해서 큰 영향이 없어 보이나 그 범위는 0.16mm에서 0.81mm까지로서 장력과의 상관계수를 구해보면 $r=0.2885$ 로 $p=0.0001$ ($n=7111$)임을 알 수 있었다.

이를 그림으로 나타낸 것이 그림 2이다.

광학현미경 검사

앞에서 기술한 바 대로 6군으로 나누어 점검한 결과, 갓 채취한 심낭 비교군에서는 핵 및 세포의 형태가 잘 보존되어 있었고, 교원세포가 심한 굴곡을 보이며 그 섬유 방향 또한 불규칙하였다. 그리고 간질에는 부종을 나타내는 소견이 없었다. 이상의 소견이 비교의 기준이 되어서 항생제로만 처리한 군을 점검한 결과 핵 및 세포 형태가 심한 변성을 보이며 중피세포, 혈관 내피세포 및 섬유아세포의 부종이 관찰되었고 교원섬유의 종축 분절화가 있었으며 또한 간질의 부종도 심하였다. 클루타알데히드로 처리한 군에서는 농도에 따른 차이는 보이지 않았으나 모두 핵의 변화는 부분적 부종과 세포막 손실을 나타내고 있었다. 교원섬유속의 굴곡이 다소 관찰되었으나 분절화는 미약

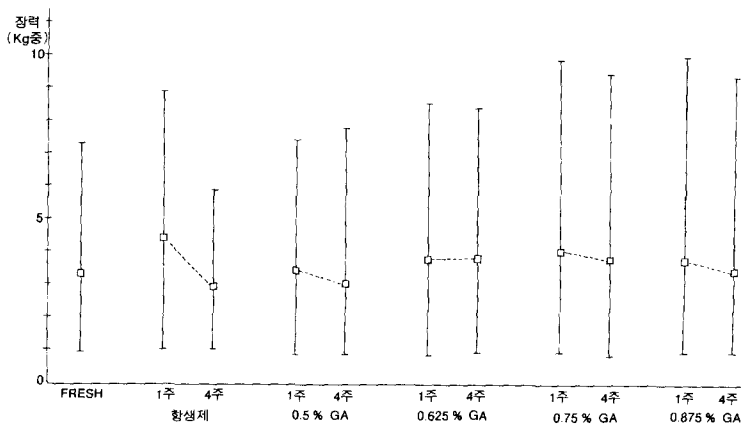


그림 1. 클루타알데히드 농도별 시간별 장력 비교

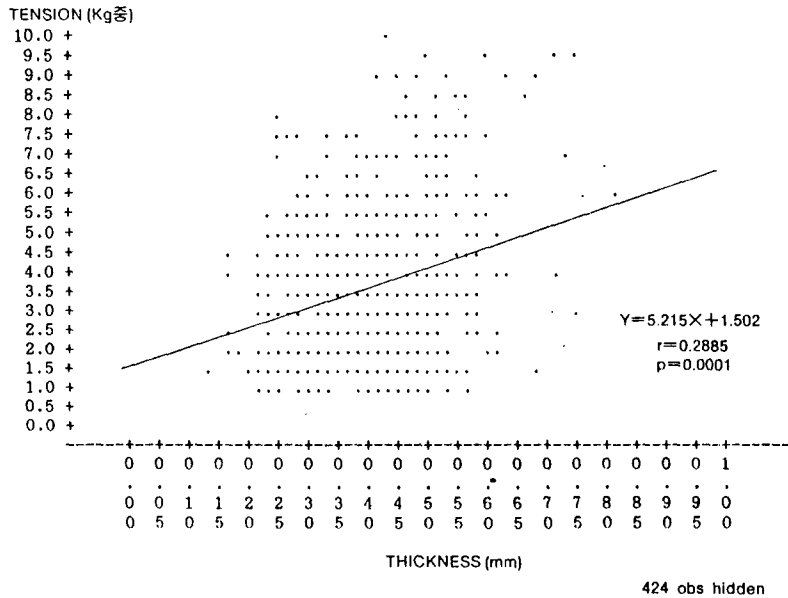


그림 2. 심낭의 두께와 장력의 관계

하였고 섬유사이의 간질은 넓어져 있지 않았다.

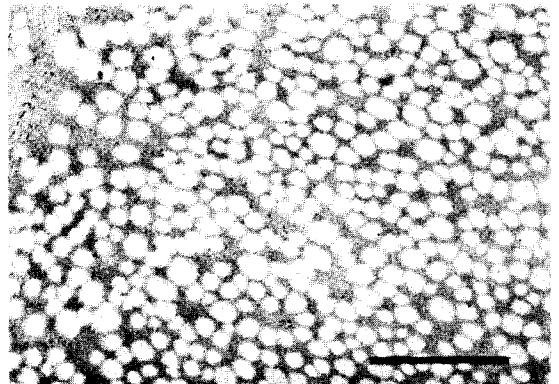
전자현미경 검사

상기 방법으로 6군으로 분군하였고 글루타알데히드의 농도에 따른 보존 상의 차이를 객관화하기 위해 교원 섬유속의 횡단면에서 가장 교원섬유가 밀집된 곳을 골라 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 의 면적당 교원섬유의 갯수를 측정하여 보았다.

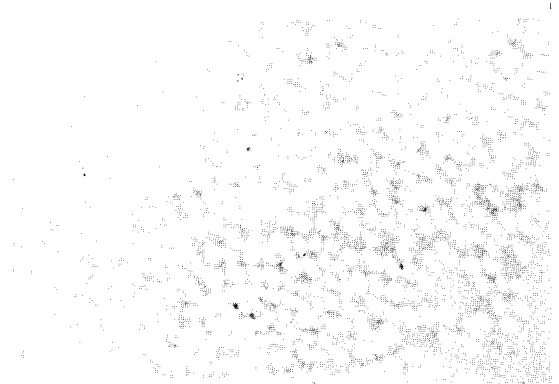
첫번째 군인 비교군에서는 핵이나 세포질 및 세포막이 잘 보존되어 있었으며 중피세포의 세포질은 소기관의 발달이 안 좋아 소량의 형질내 세망이 있을 뿐이었다. 교원섬유는 50 nm간격으로 40 nm넓이의 횡축 띠가 관찰되었고 교원섬유가 밀집되어 있는 부위에서는 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 222개 정도의 교원섬유가 관찰되었고 이 교원섬유의 굵기는 80~120 nm 정도로 비교적 균일하였다.

두번째 군인 항생제 만으로 처리한 것에서는 핵과 세포질이 소실되어 있었고 교원섬유의 굵기가 불규칙하고 종단면 상 같은 섬유에서도 위치에 따라 굵어진 분절이 빈번히 관찰되었다. 횡단면상 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 192개의 교원섬유가 관찰되어 비교적 성긴 분포를 보였으며 교원섬유의 굵기가 80~200 nm 정도로 차이가 심했고 간질이 넓어진 곳이 촛점성으로 관찰되었다. (그림3, 그림4)

글루타알데히드로 처리한 4군에서는 군 간에 차이

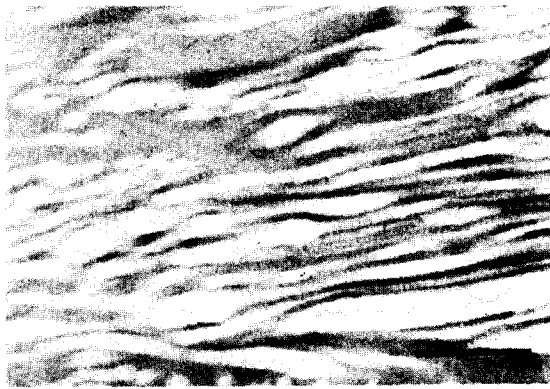


항생제만으로 처리한군

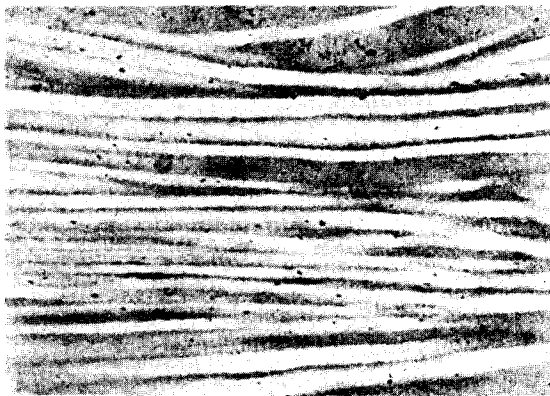


글루타알데히드 0.75%로 처리한군

그림 3. 25,000배로 관찰한 교원섬유의 종단면



항생제만으로 처리한군



글루타알데히드 0.75%로 처리한군

그림 4. 25,000배로 관찰한 교원섬유의 횡단면

점을 찾을 수가 없었으며 핵과 세포질이 종창되고 막이 파열되어 있었음이 관찰되었고 교원섬유의 굵기는 80~150 nm 정도로 비교적 일정하였다. 이 교원섬유의 밀도는 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 0.5%에서 205개, 0.625%에서 233개, 0.75%에서 195개, 0.875%에서 206개로 비교적 밀집되어 있었으나 농도에 따른 변화는 불규칙했다.

고 안

생체에서 결손 부위의 복원에는 결국 이물질이 사용되게 되는데, 심장 및 혈관의 복원에는 수술례의 증가에 따라 많은 대용제들이 개발되고 임상에서 사용되고 있다. 면역학적 부작용이 없어야 한다는 전제 조건을 만족시키기 위해 Dacron 등에 silicon rubber를 입혀서 사용해 보기도 하고 PTFE(Gore Tex®)등을 이용하기도 하나 유착 및 소아연령군에서의 석회화 등이

해결되지 않고 있으며²⁾ 다른 시도로 글루타알데히드 처리한 Xenograft valve를 1965년 처음 시도해 보기도 하였다²⁶⁾. 심장수술의 발달로 재수술의 경우가 증가하게 되면서 재수술의 가능성이 있는 환자에서는 이물질을 이용하여서라도 심장을 완전히 덮어 주는 것이 유리하여 PTFE, 글루타알데히드 처리한 우심낭, 마심낭, 돈심낭, 포르말린으로 처리한 우심낭, 돈심낭 등을 사용하여 유착의 방지를 시도하기도 하나^{1,3,4,5)} 그의 사용으로 오히려 더욱 심한 유착을 초래할 수도 있고 종격동염, 심낭삼출 등을 유발할 수도²⁾ 있으므로 그 유착 및 석회화의 방지에 대해 처리 방법을 다양하게 변화시켜 가며 보다 나은 처리법을 연구하고 있는 실정이다^{7,12,11)}.

1978년 Gallo 등이 글루타알데히드로 처리한 돈심낭을 개에게 이식하여 훌륭한 성적을 관찰하고 사람에게 시도하여 유착 및 면역반응 등에서 좋은 결과를 보고한 이래²⁶⁾ 포르말린, 에틸렌 글리콜, metaperiodate 처리 등 여러 변형 방법이 사용되었으나, 아직은 글루타알데히드가 가장 적합한 보존제이자 고정액으로 여겨지고 있다^{11,12)}. 이 글루타알데히드는 분자량이 100.1 M.wt이고 pKa가 3.0정도의 약산성을 나타내는 물질로서 염기상태에서 교원질의 아미노기($\epsilon\text{-NH}_2$)와 교차 결합을 하여 조직의 변성을 방지하고 체액성 항체반응을 없애는 효과를 보이고 또한 혈소판과도 교차반응하여 혈소판의 응집을 억제하는 효과가 있다. 그리고 염기상태에서 강한 살균력을 갖게되어 0.01% 삼푸 상태로서 세균을 주입 후 1주일 간 보관하고 세균 배양검사를 한 결과 아무런 균도 자라지 못하고 있다. 이 글루타알데히드는 아민기($\epsilon\text{-NH}_2$)와 초기 반응으로 중합되어 이 중합체는 화학적으로 불활성이다.³⁰⁾ 이때 이 반응의 속도를 조직 침투 속도로 표현한 연구가 있는데 2% 글루타알데히드가 실온에서 3시간에 0.7 mm를 침투하고 24시간에 1.5 mm를 침투한다고 한다²⁹⁾. 그리고 고정효과는 3시간에 0.5 mm, 24시간에 1 mm속도이고 저온에서는 떨어진다. 그러나 고농도로 올라가면 표면에서만 교차결합이 일어나고 염기상태로 오래 두면 글루타알데히드의 알데히드기끼리 중합을 일으켜 침전을 만들기도 하므로 장기간 사용시 주의가 필요하다. 이 글루타알데히드가 세균에 대해서도 같은 양상으로 반응하여 염기상태에서는 강한 살균력을 나타내므로 이는 의료기구의 소독 등에 많이 이용되고 있다. 이의 세포독성은 화학적 처리로 중화시키거나 물로 15분 정도 관류세척하여 그 독성은

무시될 수 있다³¹⁾. 이 글루타알데히드를 활성화 시키기 위해 pH를 높여 주어야 하는 바 처음에는 Wydex B에 포함된 상품화한 중탄산 나트륨, 제3 인산 나트륨, 제1인산 나트륨으로 구성된 활성화제를 이용하였으나 이의 pH가 본 논문의 대상에선 7.39-7.61정도였고 정량을 확실하게 할 수가 없어 수주일 후 다시 측정된 결과 7.71-8.2까지도 균일하지 못하였다. 물론 이는 글루타알데히드의 기능에는 영향이 없으나 표준화가 안되는 것이 만족치 못하였고, 현미경 검경 상부층 등의 소견이 관찰되어 다시 osmolarity를 측정된 결과 0.5%에선 67 mOsm/L, 0.625%에서 83 mOsm/L, 0.75%에선 98 mOsm/L, 0.875%에선 110 mOsm/L로 나타나 생체보다 훨씬 저장액 임을 알게되어, 우리나라대로 pH는 7.3으로 표준화하고 Osmolarity는 290 mOsm/L을 기준으로 하여 다시 용액을 만들어 사용하고 있다. 또한 완충제도 인산염은 칼슘과 반응하여 인산칼슘 등 석회화와 관련이 있을 것으로 추측하여 완충액을 HEPES buffer (238.3 M.wt., pKa 7.5)를 사용하고 같은 맥락으로 석회화를 방지하기 위해 MgCl₂를 추가로 섞고 pH meter로 적정하였고, osmolarity를 맞추기 위해 생리식염수와 증류수를 계산에 의해 적절한 비율로 섞어서 290 mOsm/L로 만들 수 있었다. 그리하여 글루타알데히드 농도에 따른 인장강도 및 세균, 병리 검사를 하여 글루타알데히드 농도가 0.625%, 0.75%에서 제일 나은 결과를 얻게 되었다. 그러나 아직은 석회화의 문제가 계속 속제로 남아³²⁾ 계면활성제(surfactant) 및 polyacrylamide 처리에 관한 동물 실험과 diamine의 처리 후 3-APD와 결합하여 석회화를 막아 보려는 시도를 해야 한다²⁹⁾. 이 석회화는 물리적 자극에 의해 교원질이 깨어지면서 교원질의 칼슘과의 결합부위가 혈류에 노출되면서 생기는 변성인데^{27,28)} 이 교원질의 칼슘과의 결합할 부위를 없애려는 시도가 상기했던 계면활성제, metaperiodate 처리²³⁾, Warfarin의 경구투여^{24,34)} 등의 방법이 되는 것이다.

자기 자신의 조직을 따를 수 있는 적합성은 어떤 물질도 가질 수 없는 것으로 자기의 심장으로 직접 교정을 못하는 경우 어쩔 수 없이 타물질 이용해야 한다. 특히 심낭조직이 모자라서 이물질 넣을 때는 많은 예에서 이중심낭을 면역학적 가공을 거쳐 보철제로 사용하는데 그런 것에 해당되는 경우에는 심장내 결손을 교정할 때 자신의 심낭을 이용한 경우, 심장의 도관을 사용하여 심낭을 직접 봉합할 수 없는 경우, 수

술 후 심장이 늘어난 경우, 전에 여러번 수술을 받아서 명확한 박리가 곤란했던 경우, 관상동맥 수술시 등이 있겠으며³⁾ 그럴 경우 유착이 적으려면 중피세포에 손상이 적어야 하고 심낭 내에 피가 고여 있어서는 안 되고³⁾ 봉합사도 심장에 닿지 않도록 하는 것이 중요할 뿐더러 접히거나 뒤틀리지 않도록 잘 마름질해야 한다^{4,5)}.

이 심낭의 특성을 알기 위해 많은 조직학적 연구가 있어 왔으며 그 결과 심낭은 장막층(Serosa), 섬유질층(fibrosa) 및 외심낭결체조직층의 3층으로 구분됨이 밝혀졌다^{6,15)}. 즉 장막층은 중피세포와 중피세포하 공간으로 구성되어 있고 이 중피세포는 섬모와 미세융기가 있어 마찰을 줄이고 표면적을 넓혀 심낭액의 이동을 원활히 하게 하며, 세포 간의 밀착은 desmosome의 도움으로 유지되고, Zonula occludentes가 자유로운 투과성을 억제해 준다. 또한 섬유질층은 교원섬유와 작은 탄성섬유가 서로 교차하고 얽히면서 심낭에 탄력을 주는데 이는 성장하면서 점점 증가하다가 나이가 들면서 떨어지게 된다⁶⁾. 본 연구에 사용된 우심낭은 보통 17개월에서 2살 정도의 숫소가 대부분이었고 그 중 수의사의 도움으로 건강한 군을 선별하여 채취하였으므로 이 탄성에 있어서는 만족할 만한 결과를 기대해도 좋을 것으로 사료된다. 마지막으로 외심낭결체조직층은 교원섬유속과 흉골에 붙는 건대 등으로 구성되는데 이는 완성된 처리품에서 거친 부분에 해당되므로 두드러지는 부분은 모두 다듬어 내어 가능한 한 매끄럽도록 하였고 실제 사용시는 혈액과 닿지 않는 부분이거나 심장 등과도 안닿는 쪽으로 위치시켜야 한다. 이 우심낭으로 복원력을 검사한 결과 육안적으로 구분 안 되는 변형은 만 하루 이내에 원상회복이 되고 8일 후면 실험의 영향이 완전히 소실된다고 했다¹⁴⁾. 우심낭의 두께는 보통 0.3-0.7 mm로 기술되어 있으며^{15,19)} 본 논문에서는 0.16-0.81 mm로 나타나고 있고 글루타알데히드나 포르말린 등에 고정하면 장막층의 중피세포층이 완전히 소실되고 외심낭결체조직층의 지방 조직들도 제거되는 것으로 관찰되고 있다. 이는 면역학적으로는 유리하나 이 중피세포의 손실로 기저막이 드러나고 교원섬유 등과 혈액성분이 직접 접촉하면서 섬유화 및 결정을 축적하면서 변성을 일으키는 요소가 된다^{16,18)}. 이 변성의 진행은 먼저 접촉면이 섬유화 되면서 염증세포가 침식하고 거대세포 등을 형성하면서 부분적인 균열 등으로 발전한다¹⁷⁾. 그런데 특이한 것은 사람에서의 심낭은 글루타알데히드 처리로

도 중피세포가 남는다는 점인데¹⁹⁾ 이를 이용하여 자기의 심낭조직으로는 글루타알데히드 처리를 하던가 하여 혈관 성형 및 심장내의 교정에 이용하고 결손된 심낭 부분은 가공 처리한 이종 심낭을 대용하는 방법이 본 병원에서는 자주 사용되어 왔다. 물론 현재까지의 연구 결과로는 글루타알데히드가 살균력, 고정력, 면역학적 장점 등 여러 면에서 우수하지만 아직도 만족스럽지 못하여 다시 이를 포르말린으로 보관하거나¹³⁾, 고정하는 동안 긴장을 주지 말고¹⁰⁾ 자연스러운 모양을 유지시켜주며 낮은 고정 압력 하에서 처리하며⁸⁾ 가장 이상적인 방향으로 만들어야 한다. 그 이상적인 조건은 불활성이고 재구성이 있고 투과력이 낮아야 하고 쉽게 조작할 수 있는 경도를 갖고 또한 싼값에 쉽게 구할 수 있어야 한다는 것이다¹³⁾.

글루타알데히드는 2% 이상의 농도에서는 고정시 조직이 수축되고 왜곡되는 양상을 나타내므로 가능한 한 낮은 농도에서 세균학적, 물리적인 안정성을 갖는 점을 찾아내고자 한 것이 이번 실험의 취지였던바로서 전자현미경 상으로는 교원섬유의 수축이나 왜곡에 의한 밀도의 변화 등을 주안점으로 관찰하였다. 결과적으로 0.5%부터 0.875%까지의 글루타알데히드로 처리한 군에서는 차이점이 없었고 정상 비교군과 비교하여 비교적 교원섬유의 굵기는 일정하게 유지되는 것으로 나타나 처리의 효과는 의미있어 보인다. 또한 이는 보통 흔히 상품에서 사용하고 있는 범위 내에서는 큰 차이가 없음을 시사하기도 하지만 인장강도에서의 약간의 차이점을 액면 그대로 인정하기는 어렵더라도 적어도 통계적으로 의미있는 수치를 0.625% 처리군과 0.75% 처리군에서 관찰되었다. 앞으로 이 농도에 맞추어 석회화를 방지하는 물질을 첨가하면서 동물실험을 통하여 보다 나은 고정액을 찾고자 한다.

결 론

2살 전후의 건강한 숫소 50마리를 대상으로 적출한 심낭을 글루타알데히드에 농도 별로(0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%) 처리하고, 비교군으로 상품화된 심낭제품과 항생제로만 처리한 군, 신선하게 채취한 후 바로 고정한 군 등을 선택하여 연구를 진행한 결과는 다음과 같았다.

1. 항생제로만 처리한 군과 0.5%, 0.625%, 0.75%, 0.875%로 처리한 모두 5군에 대해서, 처리 후 1주일 쯤에 일반 미생물 배양, 결핵균 배양, 진균 배양

에서 공히 아무런 균도 자라지 않고 있음이 관찰되었다. 그러나 4주째 다시 동일한 배양을 반복한 결과 글루타알데히드에서는 아무런 균주도 안 자라고 있으나 항생제 만으로 처리한 군에서는 진균 배양에서 *Candida albicans*가 관찰되고 일반 미생물 배양에서 *E.coli*가 관찰 되었다. 이는 우리가 선택한 항생제 만으로는 불만족스러웠다는 것과, 글루타알데히드 처리로 만족스러운 살균 내지는 항균효과를 보여 주고 있다는 것을 나타낸다.

2. 신선한 심낭군, 항생제로만 처리한 군, 글루타알데히드를 농도 별로 4종으로 만들어 처리한 각 군, 상품화되어 나온 Xenomedica제품과 Polystan 제품을 모두 5mm 폭의 긴 절편으로 30° 간격으로 처리하여 장력을 측정 한 결과, 신선군 3.386±1.461 Kg중, 항생제 1주 군 4.484±2.372 Kg중, 4주 군 2.925±1.537 Kg중, 0.5% 1주 군 3.469±1.946 Kg중, 4주 군 3.114±1.613 Kg중, 0.625% 1주군 3.883±1.982 Kg중, 4주 군 3.929±1.804 Kg중, 0.75% 1주 군 4.159±2.071 Kg중, 4주 군 3.867±1.864 Kg중, 0.875% 1주 군 3.811±2.425 Kg중, 4주 군 3.434±1.812 Kg중, 상품의 Xenomedica군 2.754±1.43 Kg중, polystan군 1.32±0.416 Kg중으로 관측되었다. 이를 ANOVA 통계처리를 하면 글루타알데히드 처리군은 농도에 따라 의미있는 차이가 인지되었고(P(F)=0.0044) 1주와 4주의 시간 경과에는 큰 의미가 없었다(P(F)=0.0923). 항생제 군은 시간 경과에 따라 P(t)=0.07로 나타나 보존효과가 없다고 할 수 있으며 모든 군들의 사이에는 유의한 차이가 관찰된다(P(F)=0.0013). 특기할 것은 상품으로 나온 것들의 장력은 본 실험에서 글루타알데히드로 처리했던 군과 비교하여 낮은 것으로 나타나고 있어 본 방법으로 처리하여도 지지대(Stent)로서의 심낭의 효과는 충분한 것으로 사료된다. 이 장력에 영향을 미치는 것으로 교원섬유의 방향과 심낭의 두께를 들 수 있으며 방향은 30°각도로 나누어서 종합하였으므로 결과에 보정되었다고 볼 수 있고 두께와 장력과의 관계는 r=0.2885(p=0.0001)로 인상보다는 통계적으로 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

3. 광학 현미경 검경 상 글루타알데히드로 처리한 4군 간에는 차이점이 관찰되지 않았으며 모두 핵의 부분적 부종과 세포막의 손실을 나타내고, 중피세포는 관찰되지 않았다. 또한 교원섬유 사이의 간질은 대체로 잘 보존되어 있었고 분절화는 미약하였다. 항생제

만으로 처리한 군에서는 핵 및 세포 형태가 심한 변형을 보이며 중피세포, 혈관내피세포 및 섬유아세포의 부종이 관찰되었고 교원섬유의 종축 분절화가 있었으며 또한 간질의 부종도 심하였다.

4. 전자 현미경 검경 상 정상 비교군에서는 핵, 세포질, 세포막 등이 잘 보존되어 있었으며 중피세포의 세포질은 소기관의 발달이 안 좋아 소량의 형질 내 세망이 있을 뿐이고 교원섬유는 50 nm 간격으로 40 nm 넓이의 횡축머가 관찰되었다. 교원섬유의 밀도는 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 222개 정도로 균일하게 관찰되었다. 항생제로만 처리한 군에서는 핵과 세포질이 소실되었고 교원섬유의 굵기가 불규칙하게 관찰되었으며 교원섬유의 밀도는 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 192개 정도로 관찰되었다. 글루타알데히드로 처리한 4군에서는 군간에 차이점을 찾을 수 없었으며, 핵과 세포질이 종창되고 막이 파열되어 있음이 관찰되었고, 교원섬유는 80~150 μm 정도로 굵기가 일정하였으며 밀도는 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 당 0.5%에서 205개, 0.625%에서 233개, 0.75%에서 195개, 0.875%에서 206개로 비교적 밀집되어 있으나 농도에 따른 변화는 불규칙하였다.

이상과 같은 실험 결과를 토대로 결론 내리면 글루타알데히드는 조직을 보존하고 고정시켜 주는 믿을 만한 약물로서 상기한 방법으로 제조한 0.625%와 0.75% 용액에서 처리한 우심낭은 인장강도 및 세균학, 현미경적 소견 상 가장 안정된 결과를 나타내고 있었다.

이를 토대로 앞으로 0.625%의 글루타알데히드 용액을 제조하여 우심낭을 고정시키고 처리하여 동물 실험 및 석회화 정도에 관한 생화학적 실험을 거치고 임상에 적용하여 한 걸음씩 더욱 믿을 만한 우리 나름의 보존 방법을 개발해 나아가야 하겠다.

끝으로 본 실험을 진행하는데 도와 주신 생화학교실의 전용성 교수, 병리학 교실의 서정욱 교수, 흉부외과 전공의 선생님들, 그리고 도축장의 관계자 여러분 및 물심양면으로 도와주신 로얄 메이칼과 동인당 제약, 유한 사이나미드 관계자 여러분께 심심한 사의를 표하는 바이다.

REFERENCES

- Heydorn WH, Daniel JS, Wade CE: A new look at pericardial substitutes. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 94:291 1987
- Milgalter E, Uretzky G, Siberman S, Appelbaum Y, Shimon D.V., Kopolovic J, Cohen D, Jonas H, Appelbaum A, Borman JB: Pericardial meshing: An effective method for prevention of pericardial adhesions and epicardial reaction after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 90:281 1985
- Gallo I, Artinano E, Duran CG: Late clinical results with the use of heterologous pericardium for closure of the pericardial cavity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 89:709 1985
- Revuelta JM, Rinaldi G, Johnston RH, Vaughan GD: Implantation of Pericardial Substitutes. *Ann Thorac Surg.* 38:190 1984
- Bailey LL, Li Z, Schulz E, Roost H, Yahiku P: A cause of right ventricular dysfunction after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 87:539 1984
- Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanaami O, Roberts WC: Histologic and ultrastructural features of Normal human Parietal pericardium. *Am J Cardiol* 46:744 1980
- Opie JC, Larrieu AJ, Cornell IS: Pericardial Substitutes: Delayed reexploration and findings. *Ann Thorac Surg* 43:383 1987
- Broom ND, Thomson FJ: Influence of fixation conditions on the performance of glutaraldehyde-treated porcine aortic valves: towards a more scientific basis. *Thorax* 34:166 1979
- Trowbridge EA, Roberts KM, Crofts CE, Lawford PV: Pericardial heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 92:21 1986
- Reece IJ, van Noort R, Martin TRP, Black MM: The physical properties of Bovine pericardium: A Study of the effects of stretching during Chemical treatment in Glutaraldehyde. *Ann Thorac Surg* 33:480 1981
- Zuhdi N, Hawley W, Voehl V, Hancock W, Carey J, Greer A: Porcine Aortic Valves as Replacements for human heart valves. *Ann Thorac Surg* 17:479 1974
- Carpentier A, Nashef A, Carpentier S, Ahmed A, Goussef N: Technique for prevention of Calcification of Valvular bioprosthesis. *Circulation* 70(Suppl I) I-165 1984
- Crawford FA, Sade RM, Spinale F: Bovine pericardium for congenital Heart defects. *Ann Thorac Surg* 41:602 1986
- Trowbridge EA, Crofts CE: Evidence that defor-

- mations which occur during mechanical conditioning of bovine pericardium are not permanent *Biomaterials* 7:49 1986
15. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC: *Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular Bioprostheses. J Thorac Cardiovasc Surg.* 81:747 1981
 16. Ferrans VJ, Spray TL, Billingham ME, Roberts WC: *Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute Cardiac valves. Am J Cardiol* 41:1159 1978
 17. Spray TL, Roberts WC: *Structural changes in Porcine xenografts used as substitute cardiac valves. Am J Cardiol* 40:319 197
 18. Riddle JM, Magilligan DJ, Stein PD: *Surface morphology of degenerated porcine bioprosthetic valves four to seven years following implantation. J Thorac Cardiovasc Surg.* 81:279 1981
 19. Allen DJ, DiDio LJA, Zacharias A, Fentie I, McGrath AJ, Puig LB, Pomerantzeff PNA, Zebini EJ. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 87:845 1984
 19. Allen DJ, DiDio LJA, Zacharias A, Fentie I, McGrath AJ, Puig LB, Pomerantzeff PNA, Zerbini EJ.: *Microscopic study of normal parietal pericardium and unimplanted Puig-Zerbini pericardial Valvular heterografts J Thorac Cardiovasc Surg.* 87:845 1984
 20. Meus PJ, Wernly JA, Campbell CD, Takanashi Y, Pick RL, Qui ZK, Replogle RL: *Long-term evaluation of pericardial substitutes. J Thorac Cardiovasc Surg.* 85:54 1983
 21. Danielson GK, Downing TP, Schaff HN, Puga FJ, DiDonato RM, Ritter DR: *Replacement of obstructed extracardiac conduits with autogenous tissue reconstruction. J Thorac Cardiovasc Surg.* 93:555 1987
 22. Carpentier A, Lemakgre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C: *Biological factor effecting long term results of valvular heterografts. J Thorac Cardiovasc Surg.* 58:467 1969
 23. Stein PD, Wang CH, Riddle JM, Magilligan DJ: *Leukocytes, platelets and surface microstructure of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valve. J Cardiac Surg* 3:253 1988
 24. Geha AS, Laks H, Stansel HC, Cornhill JF, Kilman JW, Buckley MJ, Roberts WC: *Late failure of porcine valve heterografts in children. J Thorac Cardiovasc Surg.* 78:351 1979
 25. William DB, Danielson GK, McGoon DC, Puga FJ, Mair DD, Edwards WD: *Porcine heterograft valve replacement in children. J Thorac Cardiovasc Surg.* 84:446 1982
 26. Gallo JI, Pomar JL, Artinano E, Val E, Duran C MG: *Heterologous Pericardium for the closure of pericardial defects. Ann Thorac Surg.* 26:149 1978
 27. Sabbah HN, Hamid MS, Stein PD: *Estimation of mechanical Stresses on closed cusps of porcine bioprosthetic valves: Effects of stiffening focal calcium and focal thinnig. Am J Cardiol* 55:1091 1985
 28. Sabbah HN, Hamid MS, Stein PD: *Mechanical stresses on closed cusps of porcine bioproschetic valves: correlation with sites of calcification. Ann Thorac Surg.* 42:93 1986
 29. Nimni ME: *The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis. J Cardiac Surg* 3:523 1988
 30. Lehninger AL: *Biochemistry. Worth publishers New York.* 1985
 31. 김익동, 이수영, 김풍택, 박병철, 최영욱, 이상욱 : Activated Glutaraldehyde의 활액막 자극에 대한 실험적 연구. *대한정형외과 학회지* 23 : 611, 1988
 32. Fishbein MC, Levy RJ, Ferrans VJ, Dearden LC, Nashef A, Goodman AP, Carpentier A: *Calcification of cardiac valve bioprostheses J. Thorac Cardiovasc Surg* 83:602 1982
 33. Nistal F, Garcia-Martinez V, Fernandez D, Artinano E, Mazorra F, Gallo I: *Degenerative pathologic findings after long term implantation of borine pericardial bioprosthetic heart valves. J Thorac Cardiovasc Surg* 96:642 1988
 34. Stein PD, Riddle JM, Kemp SR, Lee MW, Lewis JW, Mayilligan DJ: *Effect of warfarin on calcification of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valves. J Thorac Cardiovasc Surg* 90:119 1985
 35. Geha AS, Laks H, Stansel HC, Cornhill JF, Kilman JW, Buckley MJ, Roberts WC: *Late failure of porcine valve heterografts in children, J Thorac cardiovasc Surg* 78:351 1979