

우심실 유출로에 이식한 무세포화 이중 폐동맥 판막도관의 생체 적합성 및 조직병리학적 변화양상에 대한 연구

허재학* · 김원곤** · 김용진** · 박현정***

Biocompatibility and Histopathologic Changes of the Acellular Xenogenic Pulmonary Valved Conduit Grafted in the Right Ventricular Outflow Tract

Jae-Hak Huh, M.D.*, Won Gon Kim, M.D.**, Yong Jin Kim, M.D.**, Hyun Jeong Park***

Background: The xenogenic or allogenic valves after in vitro repopulation with autologous cells or in vivo repopulation after acellularization treatment to remove the antigenicity could be used as an alternative to synthetic polymer scaffold. In the present study, we evaluated the process of repopulation by recipient cell to the acellularized xenograft treated with NaCl-SDS solution and grafted in the right ventricular outflow tract. **Material and Method:** Porcine pulmonary valved conduits were treated with NaCl-SDS solution to make the grafts acellularized and implanted in the right ventricular outflow tract of the goats under cardiopulmonary bypass. After evaluating the functions of pulmonary valves by echocardiography, goats were sacrificed at 1 week, 1 month, 3 months, 6 months, and 12 months after implantation, respectively. After retrieving the implanted valved conduits, histopathologic examination with Hematoxylin-Eosin, Masson's trichrome staining and immunohistochemical staining was performed. **Result:** Among the six goats, which had been implanted with acellularized pulmonary valved conduits, five survived the expected time period. Echocardiographic examinations for pulmonary valves revealed good function except mild regurgitation and stenosis. Microscopic analysis of the leaflets showed progressive cellular in-growth, composed of fibroblasts, myofibroblasts, and endothelial cells, into the acellularized leaflets over time. Severe inflammatory response was detected in early phase, though it gradually decreased afterwards. The extracellular matrices were regenerated by repopulated cells on the recellularized portion of the acellularized leaflet. **Conclusion:** The acellularized xenogenic pulmonary valved conduits were repopulated with fibroblasts, myofibroblasts, and endothelial cells of the recipient and extracellular matrices were regenerated by repopulated cells 12 months after the implantation. The functional integrity of pulmonary valves was well preserved. This study showed that the acellularized porcine xenogenic valved conduits could be used as an ideal valve prosthesis with long term durability.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:482-491)

*상계백병원 흉부외과, 인제대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sanggye Paik Hospital, Inje University College of Medicine

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Heart Research Institute

***서울대학교병원 전임상실험실

Laboratory for Experimental Animal Research, Seoul National University Hospital

† 본 논문은 한국과학재단 특정기초연구 R01-2002-000-00112-0의 연구지원에 의해 이루어진 것임.

논문접수일 : 2004년 2월 20일, 심사통과일 : 2004년 5월 14일

책임저자 : 김원곤 (100-744) 서울시 종로구 연건동 28, 서울대병원 흉부외과, 심장연구소

(Tel) 02-760-2346, (Fax) 02-764-3664, E-mail: wongon@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

Key words: 1. Xenograft
2. Tissue engineering
3. Cell death

서 론

심장판막 치환수술에 사용되고 있는 조직판막은 기계 판막에 비해 혈전색전증의 위험성은 적고 항응고제를 복용하지 않는다는 장점이 있으나, 약한 내구성 및 칼슘 침착 등으로 인한 조직의 퇴행성 변화 등이 문제점으로 지적되고 있다. 이는 인체 내에서 이중 조직에 대한 면역반응을 감소시키고 세포간질의 효소분해 및 변성을 방지하여 판막의 내구성을 강화하기 위해 도입된 글루타르알데하이드를 이용한 고정법에서 기인하는 것으로 생각하고 있다[1,2]. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 이중 조직판막 콜라겐의 변성을 막고 면역반응을 감소시키기 위해 도입된 글루타르알데하이드 고정과정을 대체하거나 변형하기 위한 다양한 연구들이 이루어지고 있다. 이러한 연구들의 궁극적인 목표는 판막의 기능이 잘 유지되고 조직 적합성을 갖추어 항응고제를 사용할 필요도 없으며 장기간의 내구성을 갖춘, 자가판막과 유사한 판막을 만드는 것이라고 할 수 있겠다[3]. 이러한 조직 적합성을 갖춘 판막을 개발하기 위해 최근에는 조직공학적 기법을 도입하여, 합성화합물이나 이중 또는 동종의 판막을 이용하여 지지체(scaffold)를 만든 다음 섬유아세포, 혈관내피세포 등을 파종하거나[4,5], 무세포화 판막도관을 이식한 후에 생체 내에서 수용체의 세포가 이주 및 증식하여 재세포화되기를 유도하여[6,7] 완전한 생체 적합성을 가진 조직 대체물을 만드는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 하지만 무세포화 판막도관의 수용체 세포에 의한 재세포화는 세포간질의 적절한 환경을 필요로 하는데 이는 무세포화 과정에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으며[7], 고농도의 염화나트륨 용액과 sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액을 이용한 무세포화 처리과정은 세포성분의 제거에서나 자가세포 파종 시 혈관내피세포도 잘 부착되는 것으로 알려졌다[8]. 본 연구에서 저자들은 돼지의 폐동판막을 NaCl-SDS 용액으로 처리하여 만든 무세포화 이중 판막을 염소의 우심실 유출로에 이식하는 동물실험을 시행한 후에 자가세포로 재세포화되는 과정을 시간경과별로 관찰하여

무세포화 이중 판막의 생체 적합성과 수용체 판막으로의 재형성과정(remodeling)을 규명해보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 무세포화 돼지 폐동맥 판막도관의 준비

몸무게 30~40 kg의 돼지 6마리에서 판막을 포함한 주 폐동맥 근위부를 적출하여 PBS (phosphated buffered saline) 용액으로 씻은 다음 37°C의 1.5 M 염화나트륨 용액에 넣고 24시간 동안 37°C 항온기에서 보관하였다. 다시 PBS 용액으로 조직파편들을 씻어낸 다음 37°C의 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 넣고 37°C 항온기에서 1시간 동안 처리하였다. 판막도관에서 세포 조직파편들과 잔존한 SDS 용액을 제거하기 위하여 4 L의 PBS 용액으로 48시간 동안 씻은 다음 무세포화 상태를 확인한 후 7% Dextran-6% sucrose- 1mM EDTA 용액에 -70°C로 냉동시켜 사용할 때까지 보관하였다[8].

2) 동물실험: 폐동맥 판막도관 치환술

몸무게 30~40 kg의 염소(Capra aegagrus hircus)를 케타민(11 mg/kg)과 럼폰(0.22 mg/kg)을 근육주사하여 진정시킨 후 기관내튜브를 삽입한 후 enflurane을 이용하여 흡입 마취하였고 케타민으로 마취심도를 조절하였다. 좌측 경부를 절개하여 총경동맥과 경정맥에 동맥선과 중심정맥을 각각 확보한 다음 좌측 4번째 늑간을 통하여 개흉술을 시행하였다. 헤파린(300 IU/kg)을 정맥 주사한 후 하행 흉부 대동맥과 우심방이에 삽관한 다음 막성산화기를 이용하여 체외순환을 시작하였다. 인공심폐기는 정상체온하에서 가동하였고 심정지액은 사용하지 않았으며, 심장이 박동하고 있는 상태에서 폐동맥 판막도관 치환술을 시행하였다. 무세포화 돼지 이중 판막을 점검하고 판막하부심근 등을 절제한 다음 염소의 우심실유출로를 폐동맥판막을 포함하여 절제한 후 무세포화 돼지 이중 판막을 염소의 우심실 유출로에 이식하였다(Fig. 1). 이식된 판막도관의

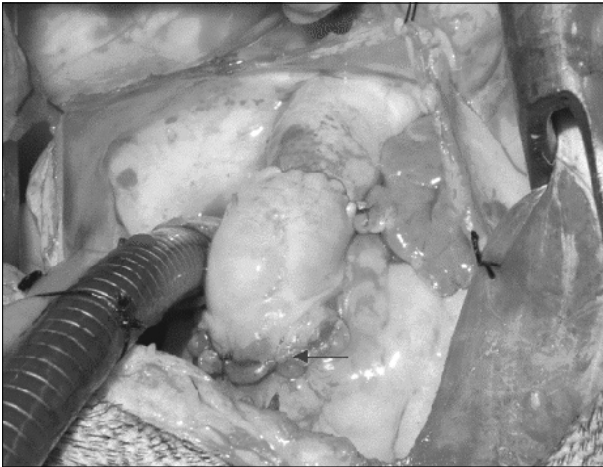


Fig. 1. Pulmonary valved conduit was implanted in the right ventricular outflow tract of goat under extracorporeal circulation. Considering the effect of residual cells in the myocardium, the implanted conduit was trimmed to have minimal portion of the subvalvular muscle (arrow).

직경은 1.28 ± 0.07 cm이었고, 길이는 2.02 ± 0.37 cm이었으며, 냉동보관 시간은 8.5 ± 2.3 일이었다. 인공심폐기에서 이탈한 후 프로타민(3 mg/kg)으로 헤파린을 중화시키고 흉관을 삽입한 후 동물의 상태를 확인하고 늑골 및 늑간 근육, 폐배근 등을 순서대로 봉합하였다. 감염방지를 위한 항생제(cefazolin 1.0 g)를 수술 전과 수술 후 2회 정맥주사하였으며 이중 판막도관의 생체 내에서의 적합성을 평가하기 위해 항응고제는 투여하지 않았다.

3) 이중 판막의 기능평가 및 적출

이중 폐동맥 판막의 기능 및 조직학적 평가는 이식술을 시행한 후 1주, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월이 경과한 후 시행하여 시간경과에 따른 변화양상을 평가하였다. 폐동맥 판막의 기능평가는 동물을 희생시키기 직전에 시행하였으며, 이식할 때와 마찬가지로 좌측 개흉술을 시행한 후 심조음파를 시행하여 폐동맥의 상태를 평가하였다. 폐동맥 판막을 문합부를 포함하여 적출한 후 이중 조직 내에서의 생체 적합성을 평가하기 위하여 혈전증 여부, 판막의 상태, 석회화 정도 등을 육안으로 관찰한 다음 저선량 촬영장치(specimen radiography, 4805N X-ray system, Hewlett Packard)를 이용하여 석회화 여부를 확인하였다.

4) 조직병리학적 검사

Hematoxylin-Eosin 염색 및 Masson's trichrome 염색을 하

여 조직학적 변화를 관찰하였으며, 석회화 정도를 보기 위해서 Von Kossa 염색을 시행하여 저선량 촬영장치의 촬영 결과와 비교하였다. 재세포화된 세포들의 구성 성분을 확인하기 위하여 섬유아세포 및 근섬유아세포에 대하여는 일차 항체인 Vimentin (Biogenetics)과 smooth muscle actin (DAKO)을, 혈관내피세포에 대하여는 Factor-VIII related antigen (von Willebrand factor, Biogenetics), CD34 (Immunotek), CD31 (DAKO) 등을 이용하여 면역화학요법으로 염색하였다.

결 과

1) 수술 후 경과

무세포화 이중 판막도관을 이식받은 6마리의 염소 중에서 5마리는 판막도관 이식 후 예정된 실험 종료 시점까지 생존하였으나, 1마리는 이식 후 42일째 사망하였으며, 부검 결과 사망원인은 폐동맥 판막의 심한 혈전증으로 인한 폐동맥 폐색증이었다.

2) 폐동맥판막 기능의 평가

심조음파 검사에서 판막 이식 후 1주일과 1년이 경과한 폐동맥 판막에서 경도의 폐동맥 판막 폐쇄부전 소견을 보였으며, 1개월이 경과한 폐동맥 판막에서 경도의 폐동맥 판막 협착 소견이 있었다. 하지만 판막엽(leaflet) 자체의 비후나 융합 등의 소견은 없었으며, 판막의 운동성은 모든 경우에 잘 보존되어 있어 판막 변성으로 인한 판막부전보다는 수술 시 발생한 공여동물과 수용동물의 판막크기의 불일치나 판막도관의 비틀림 등의 영향이었다고 생각하였다. 심비대나 수축기능의 저하 등 심부전을 시사하는 소견은 관찰되지 않았다.

3) 이중 판막도관의 생체 내 적합성에 대한 평가

육안검사에서 예정된 실험 종료 시점까지 생존한 모든 경우에서 판막엽이 잘 보존되어 있었고 판막엽이 비후되거나 경화되는 등의 변성이 일어난 경우는 없었다. 저선량촬영장치로 촬영한 폐동맥 판막도관에서 3개월과 6개월 후 적출한 판막 원위 문합부 주변에서 봉합선을 따라 원형상의 석회화가 관찰되었으나, 스트레스를 많이 받는 판막엽이나 판막륜 주위에서 석회화는 관찰되지 않았다. Von Kossa 염색에서도 석회화 소견이 거의 없고 원위 봉합 부위에만 석회화가 관찰되어 저선량촬영장치 촬영결과와 부합하는 소견을 보였다(Fig. 2). 이식초기에 문합부



Fig. 2. The radiogram of specimen (low Kvp) by Faxitron showed no calcification except distal anastomosis site. The consistent findings were observed at H & E staining (middle panel) and the von Kossa staining (lower panel).

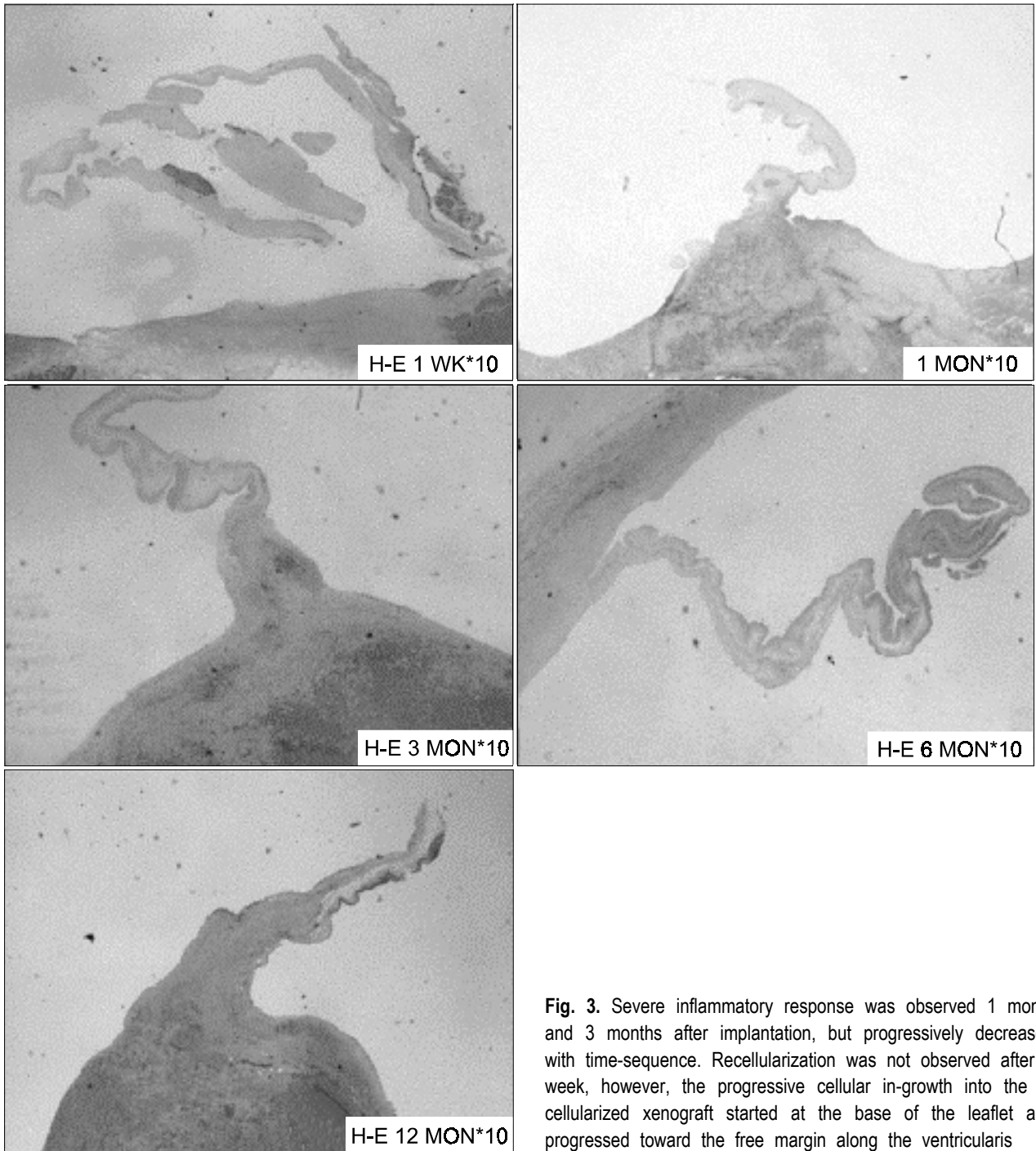


Fig. 3. Severe inflammatory response was observed 1 month and 3 months after implantation, but progressively decreased with time-sequence. Recellularization was not observed after 1 week, however, the progressive cellular in-growth into the acellularized xenograft started at the base of the leaflet and progressed toward the free margin along the ventricularis

주위에 심한 호중구의 침윤을 보이는 염증반응을 보였으나 시간이 경과하면서 점차 수용체 세포로 재세포화 되어 감에 따라 점차 감소하였다(Fig. 3).

4) 조직병리학적 검사

이식 1주일 후에는 Hematoxylin-Eosin 염색에서 아직 섬유아세포의 침투나 혈관내피세포의 피복이 관찰되지 않고 있으며 판막하 심근 부분에 호중구의 침윤이 심한 염

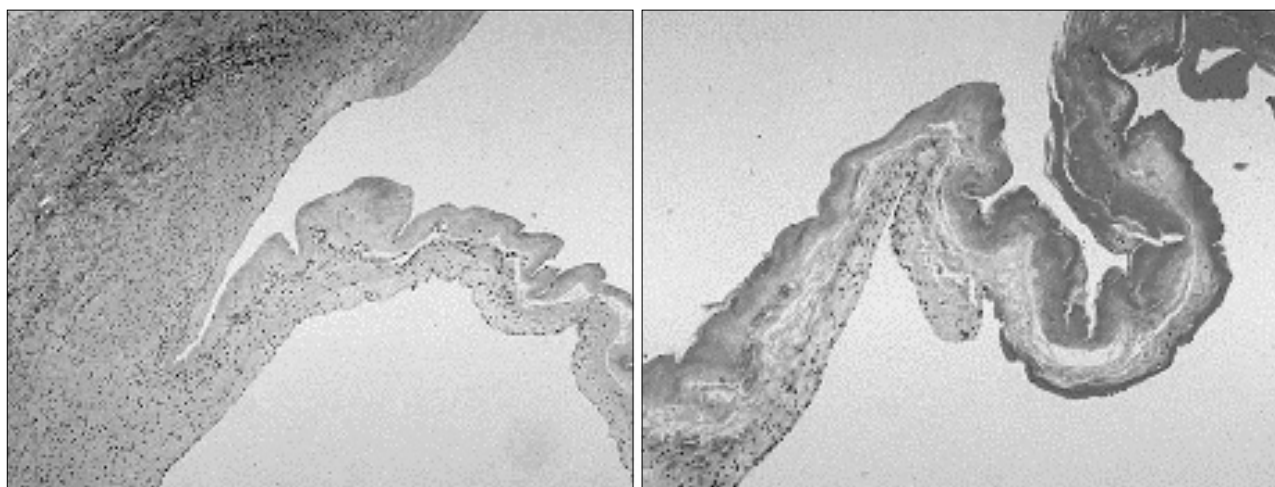


Fig. 4. Microscopic finding of xenogenic porcine pulmonary valve 6 months after implantation. The fibrin clot and microthrombi were observed on the un-recellularized part of the acellularized leaflet (left). This finding and the expired case caused by pulmonary obstruction suggested the need for temporary anticoagulation until the recellularization process was completed.

증소견을 나타내고 있고, 미세혈전이 관찰되고 있었다. 이식 1개월 후에는 아직 염증 소견이 남아 있으나 섬유아세포의 침윤이 판막기시부(leaflet base) 주위에서 시작되고 있었다. 3개월 후에는 염증소견이 많이 감소하였으며 섬유아세포나 혈관내피세포가 판막엽 높이의 25~30%까지 자라 들어왔으며, 혈전이나 석회화는 관찰되지 않았다. 이러한 세포의 재생은 판막의 심실쪽면(ventricularis)을 따라 먼저 일어났으며, 폐동맥과 판막의 폐동맥쪽면(fibrosa) 기시부에서도 세포가 자라 들어오는 것이 관찰되었다. 이식 6개월 후에는 세포 침윤이 판막엽 높이의 50%까지 진행되었으며, 이식 1년 후에는 70%까지 재세포화가 이루어졌다. 하지만 판막의 침부에는 재세포화가 이루어지지 않은 부분이 남아 있었으며, 재세포화되지 않은 판막의 침부에서는 부분적으로 섬유소의 침착과 미세혈전이 관찰되었다(Fig. 3, 4). Masson's trichrome 염색에서 콜라겐 구조는 잘 보존되고 있었으며, 이러한 콜라겐은 시간이 지남에 따라 더욱 풍부한 콜라겐이 관찰되었고 판막엽의 재세포화된 부분에서 주로 염색되어 새로 이주해 들어간 세포들에서 만들어진 세포간질이라고 판단하였으며, 이러한 세포들의 기능이 잘 유지되고 있음을 시사하였다(Fig. 5). 재세포화된 세포들의 구성성분을 확인하기 위해 시행한 면역조직화학검사에서 Vimentin (Biogenetics)과 smooth muscle actin (DAKO)에 대하여 양성반응을 보여 섬유아세포 및 근섬유아세포를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 혈관내피세



Fig. 5. Masson's trichrome staining of acellularized xenogenic porcine pulmonary valve 6 months after implantation was positive at the recellularized portion of the acellularized leaflet. This finding showed the extracellular matrices were regenerated by repopulated cells, and indicated the function of repopulated cells might be preserved.

포에 대하여는 Factor-VIII related antigen (von Willebrand factor, Biogenetics), CD68 (DAKO), CD34 (Immunotek), CD31 (DAKO) 등을 이용하여 염색하였는데 양성반응은 뚜렷하지 않았으나 조직병리학적 소견에서 그 형태나 구조적 특성으로 혈관내피세포임을 알 수 있었다.

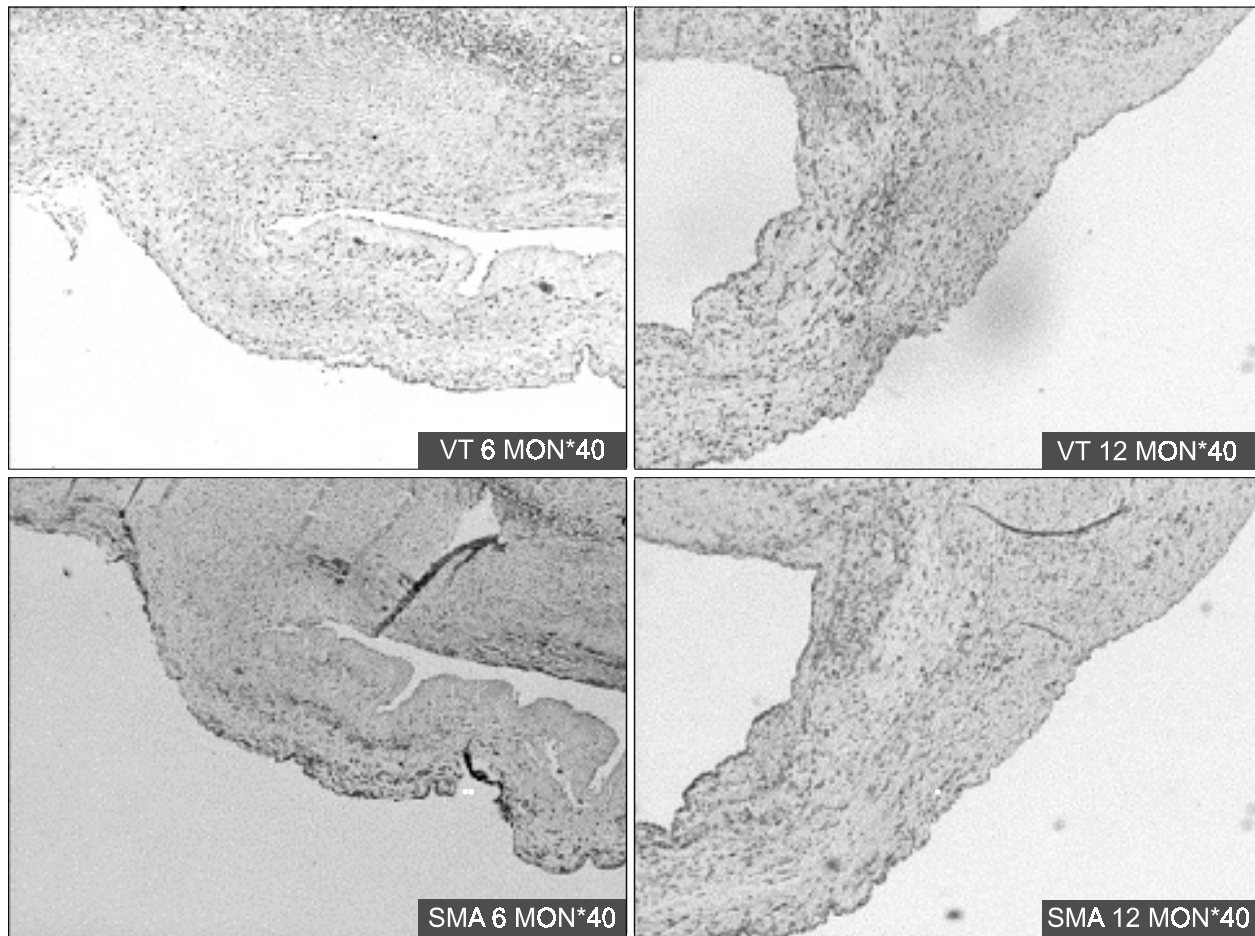


Fig. 6. The repopulated cells were fibroblasts and myofibroblasts, which was identified by immunohistochemical staining using vimentin (upper panel) and smooth muscle actin (lower panel).

고 찰

생물학적 또는 합성화합물에 만든 지지체에 살아있는 자가 세포를 파종하여 완전한 생체적합성을 가진 판막을 만드는 여러 가지 조직공학적 방법에서 이종 혹은 동종의 생체조직을 지지체로 하기 위해서는 생체 조직 내에서 항원성이 높은 세포 및 단백 성분을 제거하는 과정이 매우 핵심적인 과정이다. 이러한 무세포화 처리과정에는 Triton X-100[9] 등과 같은 세정제를 이용하거나, 냉동 및 해동 [10,11], 핵산의 효소분해[6]나 Trypsin/EDTA 용액[4] 등 여러 가지 방법들이 소개되고 있다. 최근에는 고농도의 염화나트륨 용액과 sodium dodecyl sulfate (NaCl-SDS)을 이용한 방법이 무세포화 판막도관을 만드는 데 효과적인 것으로 알려졌다[8]. 무세포화 판막도관 내로 수용체 세포

가 이주하기 위해서는 세포간질의 적절한 미세환경이 유지되어야 하는데 이러한 세포간질은 무세포화 과정에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다[7]. 즉, Leyh 등[7]은 Trypsin/EDTA용액으로 처리하여 세포성분을 제거한 무세포화 판막도관을 폐동맥에 이식한 연구에서 양의 폐동맥 판막을 무세포화 처리하여 양의 우심실 유출로에 이식한 경우, 돼지의 이종판막과는 달리 세포간질에 섬유아세포, 근세포 등의 세포수가 적고, 세포간질 내에서 심한 석회화를 관찰하였는데, 이는 Trypsin의 영향 등으로 무세포화 과정에서 세포간질의 미세환경이 변화되어 이주한 세포들이 살아남기에 부적합하게 손상된 것으로 생각하였다. 동종 혹은 이종의 무세포화 판막을 지지체로 한 몇몇 연구들에서 재세포화된 세포의 구성에 대하여 다양한 결과들을 보여주고 있다. 즉, Goldstein 등[6]은 양에 이식한 돼지의 대동맥 판막으로 합성한 판막도관(SynerGraft porcine

heart valve)에서 근섬유아세포는 세포간질속으로 성장해 들어왔으나 판막표면의 혈관내피세포 피복은 관찰되지 않았다고 보고하였으며, Steinhoff 등[4]은 양에 이식한 동종 무세포화 판막에서 실험실 내에서 혈관 내피세포로 피복하여 이식한 판막은 4~12주에 완전히 혈관 내피세포로 피복되었고 능동적인 세포간질의 합성도 나타냈지만, 혈관 내피세포로 피복하지 않고 이식한 무세포화 판막에서는 3개월 후의 판막표면은 혈관 내피세포로 피복되었으나 세포간질 내에서는 소수의 섬유아세포만이 판막기저부 주위에서 관찰되었고 콜라겐 등은 관찰되지 않는 것으로 보고하였다. Leyh 등[7]은 전술한 논문에서 자가세포를 파종하지 않고 이식한 이중 무세포화 폐동맥 판막도관은 동종 판막과는 달리 혈관 내피세포, 섬유아세포 및 근세포의 3가지 세포로 재세포화되었다고 보고하였는데 이렇게 저자마다 다른 결과를 나타내는 가장 큰 이유는 무세포화 과정에서 일어나는 세포간질의 변화가 이식된 조직의 재세포화에 영향을 미쳤기 때문이라고 생각할 수 있다. 본 연구에서 이중판막에 대한 자가세포의 이주가 시간이 경과함에 따라 점진적으로 진행하여 완성된 것은 세포간질의 미세환경이 세포이주에 적합하였음을 나타내는 것으로 NaCl-SDS용액으로 폐동맥판막에서 세포성분은 완벽히 제거하면서도, 세포간질은 수용체의 세포이주에 적합하도록 보존하고 있다는 것을 나타낸다. 또한 본 연구에서 호중구 등의 염증세포는 판막엽의 기저부 및 판막하부 심근 주위에 주로 침윤하였는데, 이는 NaCl-SDS용액으로 처리한 무세포화 판막도관 내에 잔존할 수 있는 심근세포의 영향이나 수술에 의한 손상 등으로 인한 염증반응으로 생각되며, 시간이 경과하여 판막도관이 자가세포로 재세포화되어 감에 따라 점차 감소하여 이식 6개월 및 12개월 후에는 미세하게 남아있는 것은 이식 후 염증반응이 점차 사라져 이중판막이 자가판막으로 재형성되어가고 있음을 시사하는 것이다. 한편, 세포이주가 판막엽의 기저부에서부터 판막첨부를 향하여 진행함에 따라 세포이주가 진행되지 않은 판막첨부 주위에는 미세혈전이 때때로 발견되어 혈전색전증이 발생할 가능성을 보여 주었으며, 실험 6주 후에 1마리는 혈전증에 의한 폐동맥 폐색증으로 사망하였다. 이러한 이식 초기의 염증반응과 혈전증 등은 불완전한 생체 적합성을 보여주는 것으로 이 점이 실험실 내에서 혈관 내피세포를 배양하여 미리 피복한 후 이식하는 방법에 대한 단점으로 지적될 수 있으며, 혈관 내피세포의 부재는 세포간질을 혈류에 노출하여 혈전증의 위험을 높일 수 있으므로[12] 문합부위의 치유가 완전히 이루

어지고 이식판막의 재세포화가 이루어질 때까지 일시적으로 항응고제의 사용이 필요할 것으로 생각된다. 그리고 세포들의 이주가 판막의 심실쪽면을 따라 먼저 진행되고 뒤늦게 폐동맥과 판막의 폐동맥쪽면을 따라 진행된 것은 아마도 본 연구에서 사용된 이중 폐동맥 도관이 판막하부 심근은 문합을 위한 최소한의 길이만을 포함하고 있었으나 동맥벽은 평균 2 cm가 도관에 포함되어, 이로 인하여 발생한 수용체 세포의 이주 거리의 차이에서 기인한 것으로 생각되었다. 따라서 향후 연구에서 이중 판막도관 지지체는 가능하면 판막만을 포함하고 판막하부의 심근이나 대혈관은 배제하여 판막주위의 수용체 세포들이 재세포화되는 기간을 가능하면 줄이고 염증반응도 감소시킬 수 있도록 하여야 할 것이다. 본 연구에서 폐동맥판막의 기능을 초음파로 평가하였을 때 경도의 폐쇄부전증이나 폐동맥 협착 이외에 판막엽 자체의 병변은 없었으며 대체로 판막기능이 잘 유지되고 있음을 알 수 있었다. 이는 자가세포로 치환되기 이전의 무세포성 이중 판막이 무세포화 처리 후에도 콜라겐 등의 세포간질이 잘 유지되어 판막의 내구성이 적어도 자가세포가 완전히 이주할 때까지 잘 보존되어 판막의 기능이 잘 유지되고 있음을 시사해준다. 하지만 자가세포로 재세포화될 때까지 판막기능이 잘 유지되는지에 대한 평가는 폐순환하에서보다는 기계적 스트레스가 높은 체순환의 고압력 부하 환경에서 다시 검증되어야 할 것으로 생각한다. 본 연구에서 원위 문합부를 따라 원형의 미세한 석회화가 발생한 이외에는 판막이나 주위구조에서 석회화는 발견할 수 없었는데 이러한 소견도 또한 이주한 섬유아세포 등 세포간질 내 세포의 기능이 온전하여 세포간질의 보존 및 재형성이 잘 이루어지고 있음을 시사한다고 할 수 있다. 이상의 결과를 통하여 NaCl-SDS용액으로 처리한 무세포화 이중 폐동맥 판막도관은 수용체 내에 이식한 후 섬유아세포 및 혈관 내피세포로 완전히 재세포화되고 그 기능도 잘 유지되어 무세포화 이중 판막도관이 그 자체로 훌륭한 판막 대체물로 사용될 수 있는 가능성을 보여 주었다.

결 론

본 연구를 통하여 NaCl-SDS로 처리한 무세포화 이중 폐동맥 판막도관을 우심실 유출로에 이식하여 1주, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월이 지난 후 시간경과에 따른 조직학적 변화양상을 관찰하였다. 무세포화 판막도관은 수용체의 섬유아세포 및 혈관내피세포로 재세포화되었는데 이

는 판막엽의 기저부에서부터 첨부를 향하여 점진적으로 진행하였다. 이식 12개월 후에는 이종 판막도관은 수용체의 섬유아세포, 근섬유아세포 및 혈관 내피세포로 재세포화되었고, 호중구의 침윤 등 염증반응도 시간이 지날수록 점차 감소하여 이식 6개월 및 12개월 후에는 미세하게 남아있는 등 이종 판막이 점차 자가판막으로 재형성되어 가고 있음을 알 수 있었다. 또한 이식된 폐동맥판막에 대한 심초음파 검사를 통해 일부에서 경도의 폐동맥협착과 폐쇄부전증을 보인 이외에는 이식된 판막기능이 잘 유지되고 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 통하여 NaCl-SDS로 처리한 무세포화 이종 판막도관은 수용체내에 이식한 후 섬유아세포 및 혈관내피세포로 완전히 재세포화되고 그 기능도 잘 유지되어 장기적인 내구성을 갖춘 이상적인 판막 대체물로 사용될 수 있는 가능성을 보여줄 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L. *Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1969;58:467-83.
2. Grimm M, Eyble E, Grabenwoger M. *Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102:195-201.
3. Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, et al. *Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation*. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:732-40.
4. Steinhoff G, Stock U, Karim N. *Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits-in vivo restoration of valve tissue*. Circulation 2000;102(suppl III):III 50-5.
5. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K. *Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix*. Circulation 2002;106(suppl I):63-8.
6. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, et al. *Transpecies heart valve replacement: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft*. Ann Thorac Surg 2000;70:1962-9.
7. Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P. *In vivo repopulation of xenogenic and allogenic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation*. Ann Thoracic Surg 2003;75:1457-63.
8. Kim WG, Park JK, Lee WY. *Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts*. Int J Artif Organs 2002;25(8):791-7.
9. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. *Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg 1998;14:279-84.
10. Grillo HC, McKhann CF. *The acceptance and evolution of dermal homografts freed of viable cells*. Transplantation 1964;2:48-59.
11. Fang CH, Robb EC, Yu GS, et al. *Observation on stability and contraction of composite skin grafts: xenodermis or allodermis with and isograft onlay*. J Burn Care Rehab 1990;11:538-42.
12. Allaire E, Guettier C, Michel JB. *Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isograft, allografts and xenografts in rats*. J Vasc Surg 1994;19:446-56.

=국문 초록=

배경: 이중 혹은 동종의 판막을 항원성이 높은 세포 성분을 무세포화 과정을 통해 제거한 후, 실험실에서 자가세포를 파종하거나 수용체 내에서 재세포화시킴으로써 합성 화합물 지지체의 대안으로 사용할 수 있다. 본 연구에서는 NaCl-SDS 용액을 이용하여 만든 이중 무세포화 폐동맥 판막도관을 우심실 유출로에 이식하여 수용체 세포로 재세포화되어 가는 과정을 평가하였다. **대상 및 방법:** 돼지의 폐동맥 판막도관을 채취하여 NaCl-SDS 용액으로 처리하여 무세포화 이중 폐동맥 판막도관을 준비한 다음 이를 심폐바이패스하에 염소의 우심실 유출로에 이식하였다. 이식 후 1주, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월이 경과한 후에 심초음파를 이용하여 폐동맥 판막의 기능을 평가하고, 폐동맥 판막 도관을 적출한 후 Hematoxylin-Eosin, Masson's trichrome 및 면역화학요법 염색을 시행하여 조직학적 변화양상을 관찰하였다. **결과:** 무세포화 이중 폐동맥 판막도관을 이식한 6마리 가운데 5마리가 판막도관 이식 후 실험 종료시점까지 생존하였다. 이식 판막의 기능평가를 위한 심초음파에서 경도의 폐동맥 판막 폐쇄부전이나 협착 이외에는 판막의 기능이 잘 유지되고 있었다. 조직학적 검사에서 무세포화 판막도관 내로 수용체 세포에 의한 재세포화가 시간경과에 따라 점진적으로 진행되는 양상을 보였으며 재세포화된 세포들은 섬유아세포, 근섬유아세포 및 혈관내피세포를 확인할 수 있었다. 문합부 주위에서 심한 염증반응을 보였으나 시간이 경과하면서 점차 감소하였다. **결론:** 무세포화 이중 폐동맥 판막도관은 이식 12개월 후에는 수용체의 섬유아세포 및 혈관 내피세포로 재세포화되었고 세포간질도 잘 보존되어 있었으며, 폐동맥 판막의 기능도 잘 유지되었다. 따라서 본 연구를 통하여 무세포화 이중 판막도관은 장기적인 내구성을 갖춘 이상적인 판막 대체물로 사용될 수 있는 가능성을 시사하였다.

중심 단어 : 1. 이중이식
2. 조직공학
3. 세포사망
4. 재세포화