

이종 심장 판막 이식편에서 효과적인 탈세포화 방법에 관한 연구; 저장성 용액(hypotonic solution)의 삼투압 처치법 효과

성시찬* · 김용진** · 최선영*** · 박지은*** · 김경환** · 김웅한**

A Study on an Effective Decellularization Technique for a Xenograft Cardiac Valve: the Effect of Osmotic Treatment with Hypotonic Solution

Si Chan Sung, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.**, Sun Young Choi, M.D.***, Ji Eun Park, M.D.***, Kyung-Hwan Kim, M.D.**, Woong-Han Kim, M.D.**

Background: Cellular remnants in the bioprosthetic heart valve are known to be related to a host's immunologic response and they can form the nidus for calcification. The extracellular matrix of the decellularized valve tissue can also be used as a biological scaffold for cell attachment, endothelialization and tissue reconstitution. Thus, decellularization is the most important part in making a bioprosthetic valve and biological scaffold. Many protocols and agents have been suggested for decellularization, yet there have been few reports about the effect of a treatment with hypotonic solution prior to chemical or enzymatic treatment. This study investigated the effect of a treatment with hypotonic solution and the appropriate environments such as temperature, the treatment duration and the concentration of sodium dodecylsulfate (SDS) for achieving proper decellularization. **Material and Method:** Porcine aortic valves were decellularized with sodium dodecylsulfate at various concentrations (0.25%, 0.5%), time durations (6, 12, 24 hours) and temperatures (4°C, 20°C)(Group B). Same the number of porcine aortic valves (group A) was treated with hypotonic solution prior to SDS treatment at the same conditions. The duration of exposure to the hypotonic solution was 4, 7 and 14 hours and the temperature was 4°C and 20°C, respectively. The degree of decellularization was analyzed by performing hematoxylin and eosin staining. **Result:** There were no differences in the degree of decellularization between the two concentrations (0.25% 0.5%) of SDS. Twenty four hours treatment with SDS revealed the best decellularization effect for both groups A and B at the temperature of 4°C, but there was no differences between the groups at 20°C. Treatment with hypotonic solution (group A) showed a better decellularization effect at all the matched conditions. Fourteen hours treatment at 4°C with hypotonic solution prior to SDS treatment revealed the best decellularization effect. The treatment with hypotonic solution at 20°C revealed a good decellularization effect, but this showed significant extracellular matrix destruction. **Conclusion:** The exposure of porcine heart valves to hypotonic solution prior to SDS treatment is highly effective for achieving decellularization. Osmotic treatment with hypotonic solution should be considered for achieving decellularization of porcine aortic valves. Further study should be carried out to see whether the treatment with hypotonic solution could reduce the exposure duration and concentration of chemical detergents, and also to evaluate how the structure of the extracellular matrix of the porcine valve is affected by the exposure to hypotonic solution.

*부산대학교 의학전문대학원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Pusan National University

**서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

***서울대병원 임상의학 연구소, 바이오 이종장기개발사업단

Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

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

논문접수일 : 2008년 4월 14일, 심사통과일 : 2008년 10월 10일

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

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

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

Key words: 1. Bioengineering
2. Artificial heart valve
3. Artificial organs

서 론

조직판막은 기계판막에 비해 훌륭한 혈액학적 특징, 항응고제 사용으로 인한 부작용의 감소, 감염에 대한 우수한 내구성 등의 우수한 점이 있으나 내구성에서 기계판막에 비하여 불리하여 제한적으로 이용되어져 왔다. 그러나 최근 조직판막의 내구성을 제한하는 퇴행성 변화(degenerative change) 및 석회화가 조직판막에 남아 있는 세포성분에 대한 조직 항원에 대한 환자의 면역반응이 깊게 관여하는 것으로 알려지면서[1] 탈세포화는 새로운 조직판막을 만드는데 그 중요성이 증가되고 있다[2,3]. 이는 글루탈알데하이드로 처리한 이종 조직판막의 제조에는 물론 동종 판막의 사용에도 이 기법이 이미 이용되고 있다. 더 나아가 동종 혹은 이종 판막을 탈세포화하여 조직 지지체(scaffold)로 사용하여 여기에 체내 혹은 체외에서 환자의 세포가 자라게 함으로서 이 세포들로 하여금 지속적으로 세포 기질(cell matrix)을 만들게 하여 그 내구성을 연장하거나 소아에서는 이들 판막의 성장도 기대해 보는, 탈세포화는 조직공학(tissue engineering) 분야에 매우 중요한 한 부분이 되었다[4-7].

이상적인 탈세포화는 면역반응을 최소화 할 수 있는 세포성분의 완전제거와 조직자체의 물리적 성질(mechanical property)을 잘 유지하고 재생세포화(recellularization)에 적합한 세포외 기질(extracellular matrix)의 완벽한 보존이라고 할 수 있다. 그러므로 이러한 이상적인 탈세포화 방법을 찾기 위한 연구는 활발히 이루어지고 있다. 저자 등은 이상적인 조직판막의 제조 공정의 초기의 한 단계로서 가장 경제적이고 효과적인 탈세포 방법을 찾기 위한 초기 실험의 일환으로 돼지 대동맥판막 탈세포화 조건의 변수실험을 시행하였다.

대상 및 방법

1) 이종이식 조직의 채취

도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 도살된 돼지의

심장을 4°C 생리식염수에 담아 냉장상자에 보관하여 즉시 실험실로 가져온다. 실험실에서 채취된 신선한 돼지 심장을 박리하여 대동맥판막을 얻고 생리식염수로 여러 번 세척한 후 복합항균제(Penicillin 10,000 unit/100 cc, Streptomycin 10 mg/100 cc, Amphotericin B 25 μ g/100 cc, Sigma)를 섞은 인산염완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS pH 7.4)에 약 1~2시간 동안 4°C에서 냉장 보관하면서 무세포화 과정을 준비한다.

2) 돼지 대동맥판막의 무세포화

냉장 인산염완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS pH 7.4)에 보관된 돼지 대동맥판막의 절편(10 mm×15 mm)을 저장성 완충용액(Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8)에서 각각의 온도와 정해진 시간 동안 분당 100회 이상의 회전 진탕기(rotating shaker)에서 처리하고(group A), 이 후 Sodium dodecylsulfate (SDS)가 첨가된 저장성 완충용액(Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8)으로 옮겨 세정용매에 의한 탈세포화 과정을 거친다. 이 탈세포화 과정이 끝나면 등장성 완충용액(Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8)을 이용해 회전 진탕기에서 약 12시간 세척한다 다른 용액에 옮길 때에는 생리용액(50 mL PBS)에 5분간 3회 이상 세척 후 이동한다. 이와 같이 무세포화 과정의 실험이 끝난 후에는 조직을 생리식염수에 세척 후 10% 포르말린에 고정하여 병리조직검사를 시행한다.

3) 탈세포화의 조건

모두 20개의 돼지 대동맥판막을 사용하였으며 SDS 용액에 처리하기 전 저장성 용액(hypotonic solution)에 노출시킨 군을 A군(n=10), 노출 시키지 않은 군을 B군(n=10)로 나누고 각 군에서 저장용액에 노출 시간(4, 7, 14시간), 온도(4°C, 20°C), sodium dodecylsulfate (SDS) 용액에 노출 시간 및 농도(6, 12, 24시간, 0.25%, 0.5%)에 따라 다시 세분

Table 1. Conditions of decellularization for porcine aortic valve and their nucleus count

Valve number	Temperature (°C)	Hypotonic sol (h)	SDS% (h)	Nucleus count*	Valve Number	Temperature (°C)	SDS% (h)	Nucleus count*
1	4	14	0.25 (24)	0	11	4	0.25 (24)	11
2	4	14	0.5 (24)	0	12	4	0.5 (24)	10
3	4	7	0.25 (12)	12	13	4	0.25 (12)	46
4	4	7	0.5 (12)	5	14	4	0.5 (12)	25
5	4	4	0.25 (6)	10	15	4	0.25 (6)	37
6	4	4	0.5 (6)	16	16	4	0.5 (6)	17
7	20	7	0.25 (12)	8	17	20	0.25 (12)	0
8	20	7	0.5 (12)	0	18	20	0.5 (12)	24
9	20	4	0.25 (6)	0	19	20	0.25 (6)	20
10	20	4	0.5 (6)	0	20	20	0.5 (6)	20

SDS=Sodium dodecylsulfate; h=Hour. *Number of nucleus in 200 μ m $\times$ 200 μ m in the slide of hematoxylin and eosin staining ($\times$ 100).

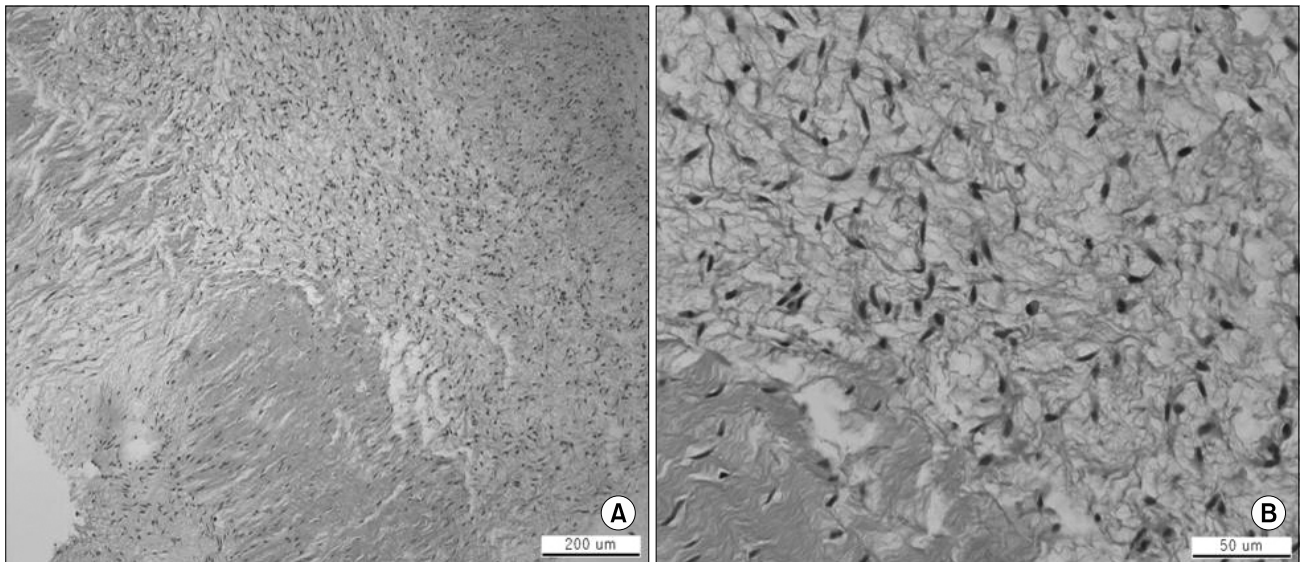


Fig. 1. Normal porcine aortic valve, control (hematoxylin and eosin staining). (A) $\times$ 100, (B) $\times$ 400.

하여 모두 20가지의 조건에서 실험하였다(Table 1).

4) 탈세포화의 정도 측정

탈세포화와의 정도는 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 한 후 100배 배율의 슬라이드에서 가장 세포핵이 많이 남아 있는 부위를 선정하여 200 μ m $\times$ 200 μ m 내의 세포핵의 수를 세어 탈세포화의 정도로 이용하였다. 세포가 완전히 파괴되어 흘러나온 핵의 잔유물인 형체가 뚜렷하지 않는 azurophilic substance는 세포핵 수에서 제외하였다. 기질의 보존 정도는 hematoxylin-eosin (H-E) 염색 400배율에서 관찰하였다.

5) 통계방법

모든 평균은 mean $\pm$ SD로 표현하였고 평균의 차이는 Microsoft office Excel program을 이용하여 독립변수 T-검정법을 이용하여 $p < 0.05$ 일 때를 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) SDS 농도에 따른 탈세포화의 정도

같은 조건에서 SDS 농도, 0.25와 0.5%에서 탈세포 정도

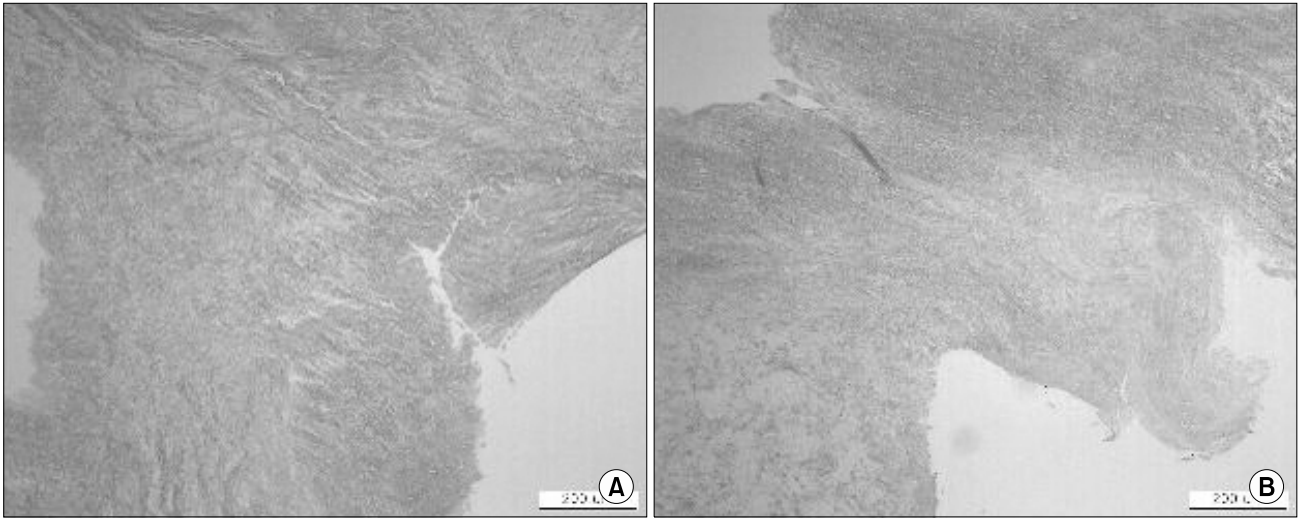


Fig. 2. Histologic results after decellularization (hematoxylin and eosin staining, $\times 100$). (A) Treatment with hypotonic solution for 14 hours prior to sodium dodecylsulfate treatment (0.25%) for 24 hours. (B) Without treatment with hypotonic solution. It is apparent that the treatment with hypotonic solution showed more efficient decellularization than without hypotonic solution treatment.

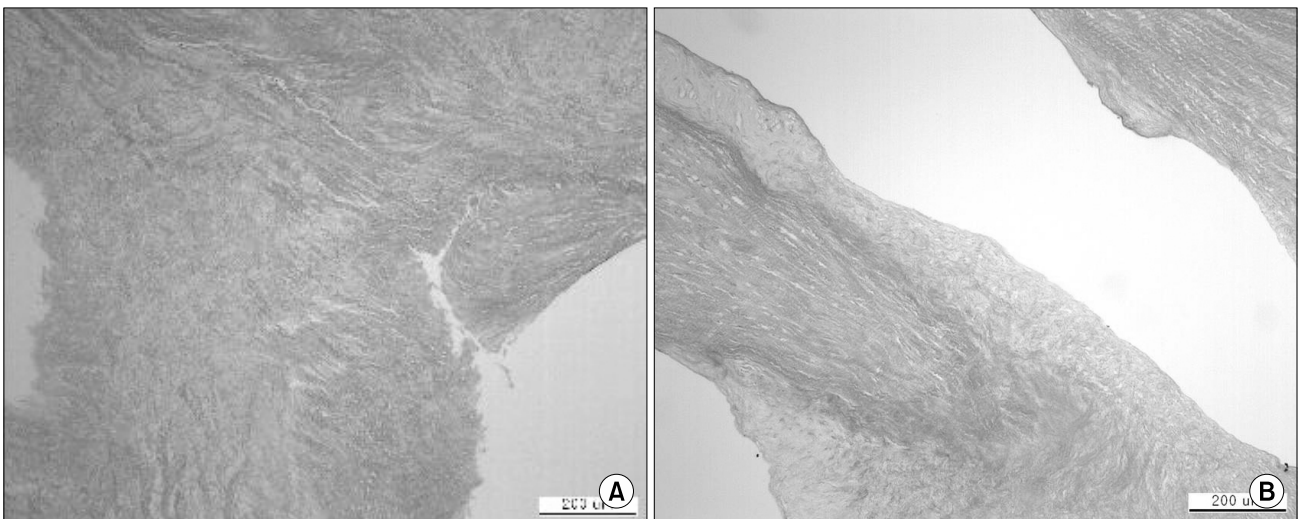


Fig. 3. Histologic results after decellularization (hematoxylin and eosin staining, $\times 100$). (A) Treatment with hypotonic solution for 14 hours prior to sodium dodecylsulfate treatment (0.25%) for 24 hours. (B) Treatment with hypotonic solution for 4 hours prior to sodium dodecylsulfate treatment (0.5%) for 6 hours. It is apparent that 14 hour's treatment with hypotonic solution showed more efficient decellularization than 4 hour's treatment.

의 차이는 없었다(평균 세포핵수; 14.4 ± 15.8 vs 11.7 ± 10.0 , $p=0.65$) (Table 1).

2) SDS 용액에의 노출 시간에 따른 탈세포화의 정도

A군 B군 모두에서, 4°C 의 조건에서 처리 시간(24시간, 12시간, 6시간)에 따른 탈세포 효과는 24시간에서 가장 좋

았으며 20°C 에서는 처리 시간에 따른 차이는 없었다 (Table 1).

3) 저장성 용액(hypotonic solution) 처리 유무

세포핵이 제거되는 효과가 뚜렷하였다(Fig. 1, 2). 1~10 번의 A군과 저장성 용액의 처리과정이 없는 B군의 11~

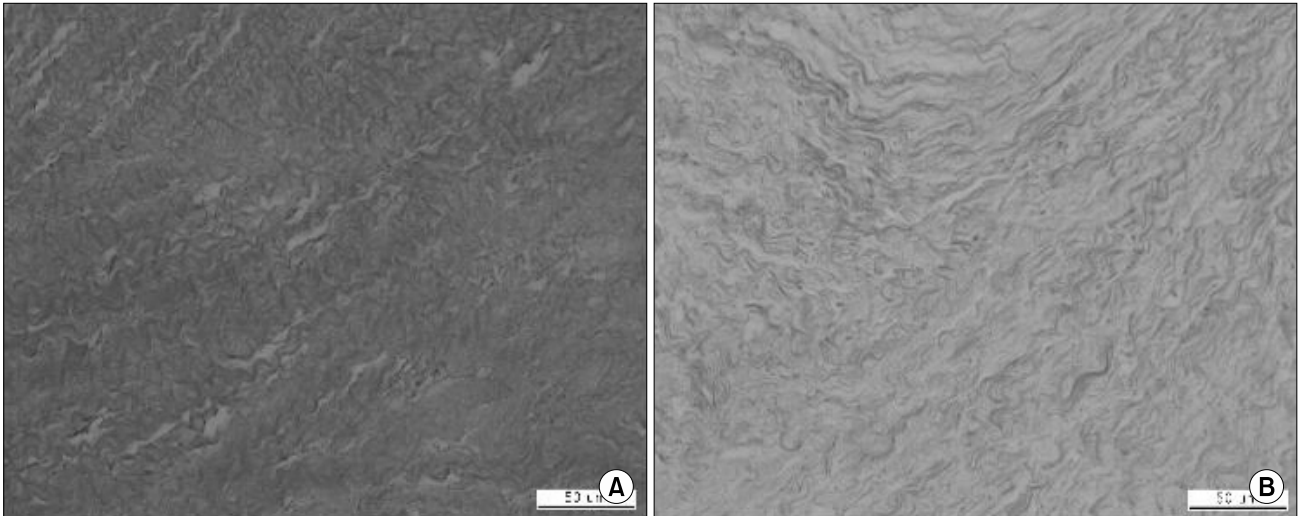


Fig. 4. Histologic results after decellularization (hematoxylin and eosin staining $\times 400$). (A) Treatment with hypotonic solution for 4 hours at 4°C prior to sodium dodecylsulfate treatment (0.25%) for 6 hours. (B) Treatment with hypotonic solution for 4 hours at 20°C prior to sodium dodecylsulfate treatment (0.25%). It is apparent that treatment with hypotonic solution at 20°C showed significant extracellular matrix destruction.

20번 실험판막에서 비교한 결과 1~10번 즉 A군에서 B군보다 핵이 제거되는 양상이 뚜렷하였다(평균 세포핵 수; 5.1 ± 6.0 vs 21.0 ± 13.3 $p=0.003$) (Table 1, Fig. 2).

4) 저장성 용액의 처치시간(A군)

같은 SDS 농도에서 처치시간이 가장 긴 14시간 실험조건에서 세포핵의 제거 효과가 가장 좋았다(Table 1, Fig. 3). 그러나 이는 SDS 용액 처치시간이 같이 길게 설정되어 있었으므로 저장성 용액 처치시간이 길어서인지 SDS 용액 처치시간이 길어서 인지를 알 수가 없다. 그러나 같은 SDS 용액 처치 시간에서 저장성 용액 처치 군(A군)의 탈세포화 정도는 저장성 용액으로 처치하지 않은 B군에 비해 좋았다.

5) 저장성 용액에의 노출온도(A군)

전체적으로 20°C 에서 4°C 보다 탈세포화의 효과는 좋은 경향은 보이나 통계학적 의미는 없었고 20°C 에서 탈세포화는 세포외 기질의 파괴가 심한 소견을 보였다(Fig. 4).

고 찰

세포성분에 대한 조직 항원을 없애기 위한 탈세포화는 여러 조직공학 혹은 재생의학 분야에서 성공적으로 이용되고 있다. 탈세포화를 위해서 장기의 종류 및 사용 목적

에 따라 여러 가지 방법을 이용하고 있다. 조직으로부터의 세포 제거의 효과는 세포의 기원(origin)과 물리적, 화학적, 효소적 방법들에 따라 달라질 수 있다. 그리고 이들 세포 제거 방법들은 세포를 제거한 후 남은 세포외 기질 지지체(extracellular matrix scaffold)의 생화학적 조성(biochemical composition), 미세구조, 물리적 성질에 영향을 줄 수 있으므로 이는 다시 이들 지지체의 이식 후 숙주반응(host response)에 영향을 줄 수 있다. 그러므로 탈세포화 방법의 목표는 남아있는 세포외 기질(extracellular matrix)에 대한 조성(composition), 생물학적 활성도(biological activity), 물리적 성질(mechanical integrity)에 최소한의 영향을 주면서 모든 세포와 세포핵 물질을 효과적으로 제거할 수 있는 것이라 하겠다.

가장 많이 사용되는 탈세포화의 방법은 보통 물리적 방법, 화학적 방법, 효소적 방법을 함께 이용한다. 그리고 일반적인 탈세포화 방법은 처음 물리적 방법이나 이온성 용액(ionic solution)을 이용해서 세포막을 파괴시키고 효소법을 이용해서 세포외 기질로부터 세포의 구성성분(cellular components)을 분리시킨 다음, 세포내 물질 및 세포핵 물질을 세정용매(detergent)를 이용하여 녹이고(solubilization), 마지막으로 세포의 찌꺼기(debris)들을 제거하는 방법을 사용한다[8].

본 연구는 돼지 대동맥판막에서 효과적인 탈세포화 방법을 찾는 초기단계의 연구로서 삼투압처리를 이용한 저장

성 용액의 처리 유무와 노출 시간 및 온도, SDS 농도와 노출 시간 및 온도에 따른 탈세포화의 정도를 관찰 하였다.

본 연구를 통해서 저자들이 밝히고자 한 내용은 첫째 SDS 단독에 의한 탈세포화가 가능한지, 가능하다면 그 적정 농도와 노출 시간은 어느 정도인지, 둘째, 저장성 용액에 의한 노출이 과연 필요한지, 필요하다면 적정 노출 시간과 온도는 어느 정도인지를 밝히기 위함이었다. 이를 위해 여러 조건에서 변수실험을 시행하였다.

실험의 결과는 SDS 단독에 의한 탈세포화는 매우 불완전하였다. 그리고 0.25%, 0.5%의 SDS농도의 차이에 의한 탈세포화 정도의 차이는 발견할 수 없었다. 본 실험에서 얻은 가장 중요한 결과는 SDS 노출 전 저장성 용액에의 처리가 매우 중요함을 보여주었다. 저장성 용액에 노출된 군이 노출되지 않은 군에 비해 전체적으로 탈세포화의 정도에 큰 차이를 보였으며 노출 시간(4, 7, 14시간)이 가장 긴 14시간에 가장 양호한 탈세포화 정도를 보였다(Table 1, Fig. 3). 저장성 용액의 노출 온도에 있어서는 20°C에서 4°C보다 탈세포화 정도는 더 양호하게 보이나 20°C에서 세포외 기질의 파괴가 더 심해 보였다(Tabel 1, Fig. 4). 이는 20°C에서 4°C에서보다 세포 파괴로 흘러나온 세포내 lysozyme 등 효소들이 상대적으로 더 활성화 되어 세포외 기질을 파괴하면서 발생한 현상으로 추측되었다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 4°C에서 저장성 용액에 14시간처리 한 다음, 0.25% 혹은 0.5% SDS용액으로 24시간 처리하는 것이 가장 좋은 탈세포화의 효과를 나타낸 것으로 나타났다

조직을 저장성 용액으로 처리하는 것은 삼투압을 이용하여 세포를 팽창시켜 세포막을 터트려 세포를 파괴하는 매우 간단한 방법이다. 그러나 탈세포화에 있어 저장성 용액의 효과에 대해서는 많이 알려진 것이 없다. 이는 세포파괴에 있어 물리적 방법과 거의 유사한 기전으로 세포를 파괴할 것으로 생각된다. 그러나 이 방법만으로 세포를 완전히 제거할 수는 없고[9], 보통 추가적으로 세포 지꺼기(cell debris)를 제거하기 위해 효소적 혹은 화학적 처리가 필요하다고 한다[8]. 가장 보편적으로 사용하는 용액은 10 mM tris buffer solution으로 여기에 chelating agent 인 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)를 섞어 세포와 세포외 기질과의 결합(binding)을 약화 시켜 세포를 잘 빠져 나오게 하고 세포 파괴시 누출되는 세포내 여러 효소의 활성을 방지하기 위해 protease inhibitor인 phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, leupeptin 등을 첨가하여 사용한다. 본 실험에서는 10 mM tris buffer solution에 EDTA와 apro-

tinin을 첨가하여 사용하였다. 저장성 용액에 노출 시간은 많은 실험에서 24시간 혹은 36시간 정도 노출시키나 본 연구에서는 조금 짧은 4, 7, 14시간에 노출시켰다. 저장성 용액에 노출 시킬 때 그 온도도 매우 중요한데 이는 세포 파괴시 누출되는 세포내 효소의 활성화 정도가 온도와 관계가 있기 때문이다. 본 연구에서도 조직의 탈세포화 시간을 단축시킬 목적으로 20°C에 노출 시켜 보았으나, 탈세포화의 효과는 우수해 보였지만 세포외 기질의 손상이 심하였다. 이는 20°C에서 4°C에서 보다 효소들의 활성도가 훨씬 강함을 시사하는 바이다. 본 연구의 결과에서 보면 저온(4°C)에서는 비록 여러 효소나 세정제들의 활성화나 기능을 약화시킬 수 있지만, 무세포화과정에 비교적 장시간 노출시킴으로서 효소적, 화학적 탈세포화의 효과를 유지하고, 특히 세포외 기질의 손상을 최소화 할 수 있을 것으로 생각되었다.

SDS는 탈세포 효과가 매우 강력한 이온성 세정제(ionic detergent) 중 하나로서 세포의 acidic phospholipid를 제거한다[10]. SDS는 높은 이온성의 양측 친매성 리간드(highly ionic, amphipathic ligands)를 가지고 있고 이는 소수성 도메인(hydrophobic domain)을 통해 단백질과 결합하여 친수성 도메인(hydrophilic domain)을 노출시켜 음전하(negative charge)들을 많이 만들어 단백질이 친수성(hydrophilic)이 되게 하여 물과 결합함으로써 조직의 부종을 증가 시키고, 수소결합을 와해시킴으로서 콜라겐의 안전성을 감소시킨다고 한다[11]. 또 elastin은 주로 소수성(hydrophobic)이기 때문에 SDS에 노출되면 소수성을 잃어버려 수성환경(aqueous environments)에 노출되게 된다[11].

SDS는 다른 세정제(detergent)들과 비교하여 잔존 핵물질, vimentin 같은 세포질 단백을 거의 완전하게 제거할 수 있다고 알려져 있지만[12,13] SDS는 고유조직구조를 파괴하는 경향이 있어 glycoaminoglycan (GAG)의 감소나 콜라겐의 구조(integrity)를 약화 시킬 수 있다고 한다[12]. 그리고 탈세포화 된 조직을 사용할 경우 남아 있을 수 있는 미량의 SDS는 숙주세포(host cell)들의 정착을 방해하거나 세포독성 물질(cytotoxic agent)로 작용하여 세포를 파괴시킨다고 한다[14]. 그러나 Gratzner 등[15]은 세포독성(cytotoxicity)에 의한 재세포화(recellularization)의 방해보다는 세포외 기질 자체의 유기화학적 혹은 구조적 변화가 재세포화를 위한 조직 지지체로 사용하는 경우, 가능하다면 저농도, 짧은 시간의 SDS를 사용하던가 독성이 약한 다른 세제의 사용을 고려하여야 할 것으로 생각된다. 그러나

Wilcox 등[13]은 SDS로 처리한 무세포 돼지 판막 기질(matrix)에 평활근세포가 잘 재세포화(recellularization) 되었다고 하였다. 글루탈알데하이드를 이용한 조직판막 제작에는 탈세포화의 효과가 강력한 SDS의 사용이 더 유리할 것으로 생각된다. 실험에 사용되는 SDS 농도는 보통 0.03~1%이며[16] 등장성 용액(isotonic buffer solution) 혹은 증류수에 섞어 쓰기도 하나 저장성 용액에 가장 많이 섞어 사용한다. 그 이유는 저장성 용액과 함께 사용하므로써 낮은 삼투압을 이용해 저장성 용액과 함께 세포내로 잘 들어갈 것이라고 생각하기 때문이다[16].

결 론

본 실험에서 SDS 처리 전 저장성 용액으로 처리하는 것이 탈세포화에 매우 효과적이어서 탈세포화 방법 중 하나의 중요한 과정임을 보여주었다. 삼투압처치를 이용한 저장성 용액에 의한 처리는 저체온(4°C)에서 장시간(14시간) 처리하는 것이 세포외 기질의 보호와 함께 더 효과적으로 탈세포를 할 수 있음을 보여 주었다. 향후 추가적인 연구를 통해 저장성 용액에의 노출이 탈세포화에 필요한 화학적 세정제(chemical detergent)의 농도를 줄이고 노출시간을 줄일 수 있는지 그리고 세포외 기질의 변화에 어느 정도 영향을 주는지를 밝혀야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126: 2003-10.
2. Hirsch D, Drader J, Thomas TJ, et al. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled released studies. *J Biomed Mater Res* 1993;27: 1477-84.
3. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 199; 47:439-65.
4. Avakkol W, Gelehrter S, Goldberg CS, Bove EL, Devaney

- EJ, Ohye RG. Superior durability of synergraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1610-4.
5. Dohomen PM, Lembcke A, Holinski S, et al. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg* 2007;84:729-36.
6. Dohmen PM, da Costa F, Holinski S, et al. Is there a possibility for a glutaraldehyde-free porcine heart valve to grow?. *Eur Surg Res* 2006;38:54-61.
7. Erdbrugger W, Konertz W, Domen PM, et al. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. *Tissue Eng* 2006;12:2059-68.
8. Gilbert TW, Sellaro TL, Badyak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-83.
9. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell transplant* 2003;12:659-66.
10. Hirsch D, Drader J, Thomas TJ, et al. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled released studies. *J Biomed Mater Res* 1993;27: 1477-84.
11. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial-biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res* 1994;28:655-66.
12. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003;26:421-7.
13. Wilcox HE, Korossis SA, Booth A, et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis* 2005;14:228-37.
14. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:399-405.
15. Gratzner PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularization matrix. *Tissue Engineering* 2006;12:2975-83.
16. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis* 2002;11:457-62.

=국문 초록=

배경: 조직판막에 남아있는 세포물질은 환자의 면역반응과 관련이 있고 석회화의 원인이 된다고 알려져 있으며 탈세포화된 판막조직의 세포외 기질은 숙주세포(host cell)가 부착되고 내피화(endothelialization)되어 조직으로 재 구성되게 하는 생물학적 지지체로도 사용될 수 있다. 그러므로 탈세포화는 조직판막의 면역반응 최소화과 지지체의 형성에 가장 중요한 부분이다. 탈세포화를 위해 많은 방법과 약제들이 개발 되어 왔다. 그러나 화학적 혹은 효소적 탈세포화 방법에 앞서 삼투압(osmolality)을 이용한 저장성 용액 처치에 대한 효과를 보여준 논문은 드물다. 본 연구는 탈세포화에 있어서 저장성 용액 처치의 효과를 밝히고 아울러 탈세포화시 적절한 온도, 처치시간, sodium dodecylsulfate (SDS)의 농도를 밝히고자 시행되었다. **대상 및 방법:** 돼지 판막을 여러 조건 즉 SDS농도(0.25%, 0.5%), 저장성용액 처치시간(6, 12, 24시간), 온도(4°C, 20°C)를 달리하여 일종의 이온세정용매인 SDS를 이용하여 탈세포화를 하였다. 저장성 용액에 노출 시키지 않은 군을 B군으로 하고 동수의 돼지 판막을 같은 조건에서 SDS에 처치하기 전에 저장성용액에 노출 시켰다(A군). 저장성 용액에의 노출은 4, 7, 14시간, 4°C와 20°C로 구분하여 각각 탈세포화의 정도를 조사하였다. 탈세포화와 세포외 기질의 보존 정도는 hematoxylin-eosin (H-E) 염색으로 표본을 관찰하였다.

결과: SDS의 두 농도, 0.25%, 0.5%에서 탈세포화의 정도의 차이는 발견할 수 없었다. 4°C 환경에서 24시간 SDS로 처치한 것이 A, B군 모두에서 가장 양호한 탈세포화를 소견을 보였고 20°C에서는 탈세포화 정도에 차이가 없었다. 저장성 용액으로 처치한 A군 모두에서 같은 조건의 처치하지 않은 B군에 비해 더 양호한 탈세포화 소견을 보였다. 4°C, 14시간 저장성용액에 노출된 판막이 가장 좋은 탈세포화의 소견을 보였고, 20°C의 저장성 용액에 노출된 판막은 양호한 탈세포의 소견을 보였으나 심한 세포외 기질의 파괴를 관찰할 수 있었다. **결론:** 판막조직의 탈세포화에 있어서 삼투압처리를 이용한 저장성 용액 처치는 매우 효과적인 방법으로서, 돼지 판막조직의 탈세포화에 꼭 적용되어야 할 방법으로 생각된다. 저장성 용액에의 노출이 탈세포화에 필요한 화학적 세정제(chemical detergent)의 농도를 줄이고 이러한 세정제의 농도나 노출시간을 줄일 수 있는지 그리고 세포외 기질의 변화에 어느 정도 영향을 주는지에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 1. 생체공학
2. 인공심장판막
3. 인공장기