

생체적합성 인조혈관의 개발 - 혈관내피화 인조혈관 -

김형묵* · 이윤신** · 이인성* · 이헌재* · 손호성* · 김광택*

=Abstract=

Development of Biocompatible Vascular Graft - Endothelialization of Small Vascular Graft -

Hyoung-Mook Kim, M.D.*, Yoon-Shin Lee, Ph.D.**, In-Sung Lee, M.D.*,
Hyun-Jae Lee, M.D.*, Ho-Seong Son, M.D.*, Kwang-Taik Kim, M.D.*

Prevention of thromboembolism is the most important task in the development of biocompatible small caliber artificial vascular graft. In normal vessels, vascular endothelial cells maintain homeostasis by secreting numerous factors. The aim of this study is to develop a method which improves biocompatibility of small caliber polyurethane graft using endothelial cell culture technique, and evaluate the effectiveness of extracellular matrix for endothelialization which was produced by cultured fibroblast.

Methods; Multiporous polyurethane tube of 3 mm diameter, 0.3 mm thickness was manufactured for vascular graft. Three mongrel dogs were intubated and internal jugular veins removed. Extracellular matrix produced by cultured fibroblast which was obtained from dog's internal jugular vein were coated to the polyurethane graft. Then, endothelial cells extracted from jugular vein were cultured and fixed on the extracellular matrix layer of vascular graft. Endothelial cell coated vascular grafts were implanted to the carotid arteries of experimental dogs as interposed autograft. Implanted grafts were removed after 3 and 6 weeks. As a control, PTFE graft was interposed on carotid artery.

These experiments demonstrated that extracellular matrix produced by fibroblast can afford a base for endothelial cell linings of polyurethane graft. Although thrombosis were developed on autografted endothelial cell coated graft, 33 % opening was noticed, and showed less adhesion to adjacent tissue layer. These findings suggest that fibroblast produced extracellular matrix which can be used for endothelial cell lining vascular graft, and by improving the cultured endothelial cell function, there will be a new modality for reducing thrombosis on small vascular graft.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 373-80)

Key words : 1. Blood vessel prosthesis
2. Endothelialization

* 고려대학교 의과대학 흉부외과

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

** 서울대학교 의과대학 의공학연구소

** Institute of Biomedical Engineering, Seoul National University

*** 본 논문은 고려대학교 생명과학연구소의 연구비 지원 결과임.

논문접수일: 96년 1월 23일 심사통과일: 96년 3월 6일

통신저자: 김광택, (136-705) 서울시 성북구 안암동 126-1, 고려대학교 병원. Tel. (02) 920-5309, Fax. (02) 928-8793,

Email KTKIM@KUCCNX.KOREA.AC.KR

서 론

모든 정상 혈관 가장 안쪽에 존재하는 혈관내피세포들이 혈액응고와 지혈인자, 수축, 이완시키는 인자와 그밖에 여러가지 중요한 인자들을 합성하여 항상 정상 기능 혈관을 유지하게 하는 중요한 역할을 한다¹⁾. 그러므로 지난 10년간 많은 연구자들은 소구경 인조혈관의 혈전현상을 줄이기 위해서 인조혈관 내면을 혈관 내피세포화하는 방법에 대해 연구하였다²⁻⁴⁾. 인조혈관의 혈관내피세포화를 위해서는 안쪽 표면이 혈관내피세포의 부착(adhesion), 이동(migration), 증식을(proliferation rate)이 높은 물질로 처리되어야 한다. 피부의 섬유아세포, 대동맥의 평활근 세포, 각막 내피세포 등에서 분비하는 세포외기질(extracellular matrix) 성분들인 collagen, glycosaminoglycan, proteoglycan과 glycoprotein 중에서 몇몇성분들을 인조혈관내면에 처리해서 상피화했을 뿐만 아니라 현재도 많은 연구자들이 개발중에 있다^{5, 6)}. 섬유아세포는 결합조직세포의 일종으로 성장률도 뛰어나며, 분비되는 세포외기질의 주된 성분들 중에 혈액응고를 예방하는데 필요한 물질로 알려져 있는 heparin sulfate와 chondroitin sulfate를 포함하고 있을 뿐만 아니라, collagen type I과 III를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다^{7, 8)}.

본 연구에서는 혈관내피세포의 부착과 성장을 도와줄 수 있는 기질로 증식력, 부착력과 이동력이 강한 섬유아세포가 생성한 세포외기질을 인조기질(artificial basement membrane)로 선택했다. 그리고 세포가 형성한 세포외기질을 손상시키지 않고 세포를 파괴하기 위해서 본 연구팀이 다른 방법들과 비교해서 우수하다고 밝혀진 irradiation 방법을 사용했다⁹⁾.

인조혈관의 재료로는 기계적 성질과 혈액 적합성이 뛰어나 인공심장에 많이 사용되고 있는 폴리우레탄을 사용했으며, 폴리우레탄에 적당한 다공성을 주어 유연성과 투과성이 우수한 소구경 인조혈관을 개발하였다. 다공성 인조혈관은 혈관내피세포의 증식을 유도하여 인조혈관내면의 혈전성을 줄이고, 혈관 주위의 조직들이 인조혈관의 pore들을 통해서 적당하게 자라들어와 혈관내벽에 안정성을 주어서 자연 혈관과 비슷한 탄성도를 갖는 이상적인 혈관이 될 수 있다¹⁰⁾.

본 연구의 목적은 다공성 폴리우레탄 소구경 인조혈관의 생체적합성을 높이기 위한 방법을 개발하는 것인데, 혈관내피세포화를 위해 섬유아세포에서 생성하여 분비된 전체 세포외기질이 유용한 지를 알아보기 위한 것이다. 본

연구에서는 혈관의 외벽으로 다공성폴리우레탄을, 중간부분으로는 섬유아세포의 세포외기질을, 내면부분으로는 이식된 자가혈관내피세포를 대치시키는 방법으로 자연혈관과 비슷한 형태의 3층 구조 혈관을 내경 3mm로 제작하였다. 대조군으로는 시판되고있는 PTFE혈관을 사용하였다.

대상 및 방법

다공성 폴리우레탄 혈관 제작

폴리우레탄 혈관의 제작방법은 폴리우레탄(Pellethane 2363-80AE, Dow Chemical Co., USA)을 N, N'-dimethylacetamide(DMAC, Sigma)에 20 w/v %의 농도로 녹인 용액에 3mm 내경의 유리관을 담갔다가 꺼내면서 유리관에 고르게 도포되도록 한 뒤, DMAC를 제거시키기 위해서 40°C에서 2일간 건조시킨다. 폴리우레탄이 일정한 두께로 고르게 도포되도록 이 과정을 세번 반복한다. 다공성 폴리우레탄혈관제조방법은 폴리우레탄 20 w/v %의 농도로 녹인 DMAC 용액에 3mm 내경의 유리관을 담갔다가 꺼내면서 유리관에 고르게 도포되도록 한 뒤, 30% ethyleneglycole/EtOH 용액에 5시간 동안 반응시켜서 다공성을 형성시킨다. 여분의 DMAC와 불순물을 제거하기 위해서 메탄올과 하루동안 반응시킨다. 인조혈관은 3mm의 내경과 0.3mm의 두께를 지니도록 제조되었다. 각각의 다공성 폴리우레탄혈관의 내면과 단면을 Hitachi S-510 Scanning Electron Microscope(SEM)으로 관찰하였다.

섬유아세포의 분리 및 배양

혈관내피세포를 얻기 위해 실험잡종개의 혈관주위에 붙어있는 조직을 채취하여 cord buffer(0.01 M glucose in Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free PBS, pH=7.4)에 보관해서 혈액성분을 제거시키고, 조직을 약 1mm² 크기로 자른후 0.2% collagenase(collagenase/cord buffer[w/v], Type I, Worthington Biochemical Co., U.S.A.)와 30분간 반응시킨다. Collagenase의 활성을 중화하기 위하여 아래 세포침전물에 10%의 fetal bovine serum(FBS, Hyclone)이 첨가된 medium IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma)를 첨가한 후 250ml의 스텐레스체에 걸러낸다.

250g에서 5분간 원심분리하고 침전물에 10% FBS이 첨가된 medium IMDM를 첨가시킨 후 35 μ m 나일론 망사체에 걸러낸다. Medium IMDM를 첨가시켜 250g에서 다시 5분간 원심분리한다. Medium IMDM에 10% FBS, 10 mM Hepes, 100U/ml Penicillin, and 100 ug/ml Streptomycin을 첨가하여, 세포를 1 \times 10⁶ cells/25cm²의 밀도로

Corning tissue culture flask (Corning, NY)에 넣어, 37°C에서 가습된 5% CO₂ 상태에서 배양한다. 배양액은 2~3일에 한번씩 갈아 준다. 세포들이 성장해서 합류되었으면, 배양액을 제거하고 Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺가 제거된 Phosphate buffer saline (PBS)으로 세척하여 serum과 떨어진 세포들을 제거한다. 0.05% trypsin과 0.02% EDTA로 처리하여 계대배양한다. 계대 배양한 세포들을 액화질소에 냉동, 보관하여 두었다가 필요할 때 녹여서 사용한다.

세포외기질 형성

여섯번째 계대배양한 섬유아세포를 제작된 폴리우레탄 혈관에 4 × 10⁴ cells/cm²의 밀도로 주입시킨 후 90도 각도로 회전시키면서 혈관내면에 부착시킨 후 배양한다. 7일 후 섬유아세포들이 합류되면 PBS로 세척한 후, Co⁶⁰ 감마선 10,000 rad 선량에 노출시킨다. 이렇게 형성된 세포외기질의 형태를 주사전자현미경으로 관찰한다.

혈관내피세포 분리 및 배양

무게가 11~15 Kg의 개를 15 mg/Kg ketamine으로 근육 주사하여 마취하고 기관삽관 후 Havard 인공호흡기로 심폐기능이 유지된 상태에서 수술방법으로 목의 중간 부분을 경정맥 주행에 따라 열고 경정맥 길이가 약 8cm 되도록 조심스럽게 박리하고 잘라낸다.

얻은 경정맥을 Cord Buffer (0.01 M glucose in Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free PBS, pH = 7.4)에 넣어 혈액성분들을 제거시킨 후, 0.2% collagenase (collagenase/cord buffer [w/v], Type I, Worthington Biochemical Co., U.S.A.)에 담구어서 37°C에서 5분 동안 반응시킨다. Collagenase를 제거시킨 후 cord buffer를 주입한 다음 37°C에서 5분 동안 방치해 둔다. 경정맥 속 안으로 cord buffer를 주입시키면서 흘려보내므로 혈관내피세포들이 떨어져서 원심분리관에 수집된다. 수집된 용액을 250g에서 5분간 원심분리한 후 Medium 199 (M199)에 10% FBS, 10mM Hepes, 100 U/ml Penicillin, and 100 ug/ml Streptomycin을 첨가한 배양액을 첨가하여 세척한다. 세포를 1 × 10⁶ cells/25cm²의 밀도로 Corning tissue culture flask (Corning, NY)에 넣어, 37°C에서 가습된 5% CO₂ 상태에서 배양한다. 배양액은 2~3일에 한번씩 갈아 준다. 세포들이 성장해서 합류되었으면, 배양액을 제거하고, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺이 없는 PBS로 세척하여 serum과 떨어진 세포들을 제거한다. 0.05% trypsin과 0.02% EDTA로 처리하여 계대배양한다. 계대배양을 반복하여서 혈관에 이식할 충분한 세포를 얻는다. 배양된 혈관내피세포들의 형태는 위상차 현미경으로 관찰한다.

세포외기질위에 혈관내피세포 배양

형성된 세포외기질위에 3~5번째 계대배양한 혈관내피 세포를 4 × 10⁴ cells/cm²의 밀도로 주입시킨 후 30분 동안 방치해서 세포가 부착하도록 하였고, 이러한 방법을 90도 각도로 회전시키면서 반복하였다. 혈관내면에 부착시킨 후 5일 동안 배양해서 혈관내피세포가 합류되게 한다. 혈관내피세포가 인조혈관 내면에 덮혀있는 형태를 주사형전자현미경과 Hematoxylin과 Eosin 염색으로 관찰한다.

생체 (in vivo) 실험

소구경 인조혈관 (3mm inner diameter; 0.3mm wall thickness; 70mm length)에 배양한 섬유아세포를 4 × 10⁴ cells/cm²의 밀도로 부착시킨 후 배양하였다. 세포들이 합류되면 (약 5일) 섬유아세포가 함유된 인조혈관을 10,000 rad 선량의 Co⁶⁰ 감마선에 노출시켰다. 형성된 세포외기질이 자가 혈관내피세포를 6 × 10⁴ cells/cm²의 밀도로 부착시킨 후 배양시켰다. 대조군으로는 세포외기질이 없는 폴리우레탄 인조혈관과 시판되고 있는 PTFE 혈관을 사용했다. 준비된 인조혈관을 잠종실험 개 (weight; 15 Kg)의 양쪽 경동맥을 절단 후 대치 이식하였다. 봉합방법은 개별 단단문합 방법을 사용했고 봉합실은 7번 (prolene blue 7.0)을 사용했다. 이식한 6주와 3주 후 개를 이식 혈관의 개통 상태와 내면을 확인하기 위하여 기관내삽관 전신마취하에 이식 혈관을 노출시킨다. 이식된 혈관의 개방성 (graft patency)은 이식된 혈관과 말단혈관 (distal artery)의 맥박 (pulse)을 촉진하여 평가한다. 이식된 혈관을 제거해서 PBS로 세척하여 혈액성분들을 제거한 후 PBS에 0.001 M EDTA, 0.13 M NaCl, 0.005 M KCL와 3% glutaraldehyde을 포함시킨 용액에 8시간 이상 고정시킨다. 처리가 끝난 인조혈관들은 길이로 열어서 두 부분으로 나누고 각각 3개 표본 (양측 봉합부분과 중앙부분)으로 나누어서 표본들을 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 조직학적 평가를 하였다.

결 과

다공성 폴리우레탄 혈관 관찰

Fig. 1에서는 구경이 각기 다른 폴리우레탄의 혈관과 다공성이 부여된 혈관과 부여안된 혈관들의 사진이다. Fig. 1의 (A) 다공성 폴리우레탄 인조혈관내면과 (B) 단면의 SEM 소견사진이다. 내면의 pore의 크기는 10 micrometer 이하이지만, 단면의 pore의 크기들이 10~20 micrometer로 일

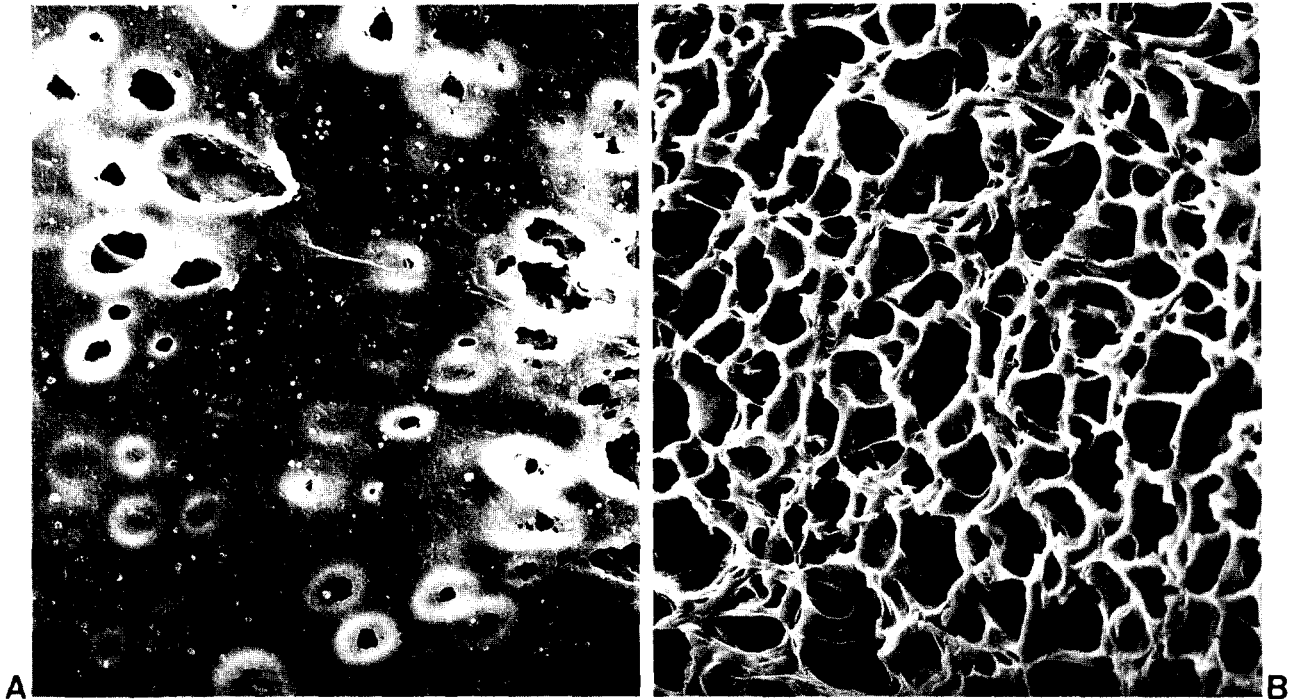


Fig. 1. Scanning electron photomicrographs taken from (A) inner surface of the 3mm polyurethane graft, (B) cut surface of the graft.



Fig. 2. Scanning electron photomicrograph of extracellular matrix layer of the graft

정합을 보여준다.

섬유아세포의 배양 및 세포외기질 형성

배양한 섬유아세포들의 현미경 소견 관찰결과 3일째에 조직 배양기에서 배양된 세포의 형태는 전형적인 섬유아세포의 형태인 긴 모양을 나타내고 있다. Fig. 2는 폴리우레탄혈관에 형성된 세포외기질의 주사전자현미경 소견이며 핵들이 제거되어 있음을 나타낸다.

혈관 내피세포 배양

Fig. 3은 배양 플라스크에서 배양 5일 후의 세포 형태이다. 전형적인 다각형의 혈관내피세포의 형태를 나타내고 있다. 2주 동안 배양하는 동안에 3번 계대배양해서 인조혈관 한개에 부착시킬 충분한 분량의 세포를 얻었다.

Fig. 4는 개의 경동맥에 이식하기전에 인조혈관의 단면을 H&E 염색한 소견이다. 인조혈관내면이 혈관내피세포로 덮여있음을 나타내며 핵들이 뚜렷이 보인다. 세포들이 혈관외벽에 산재해있음을 나타내고 있다.

생체 (in vivo) 실험

본 연구에서 3마리의 개를 사용했으며 양쪽의 경동맥에 인조혈관을 이식시켰다. 6개의 인조혈관을 시험했다.

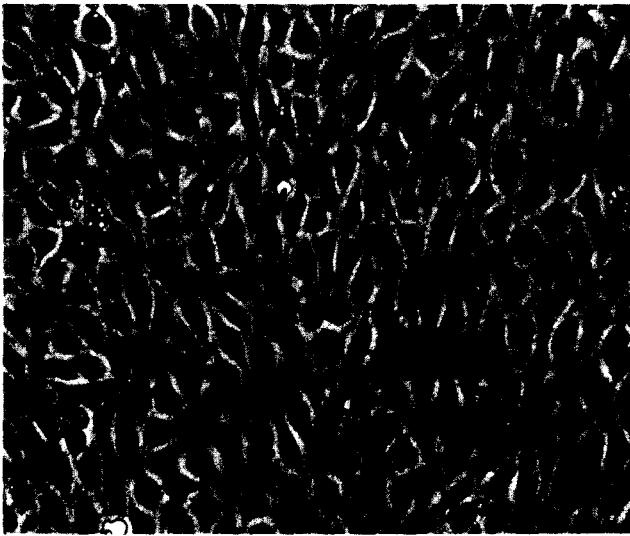


Fig. 3. Lower-power photomicrograph taken from cultured dog vascular endothelial cells ($\times 200$)

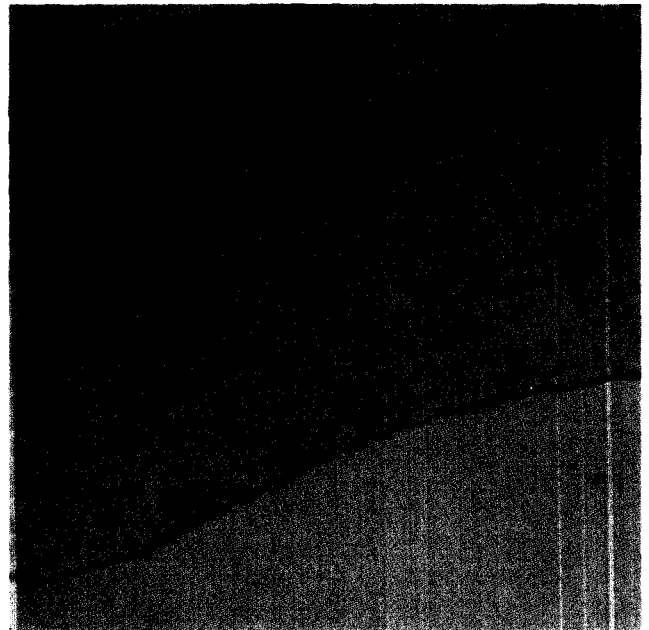


Fig. 4. Lower-power photomicrograph of cut surface of endothelialized vascular graft. Note the graft inner surface covered with cultured endothelium, outer surface is also covered with cells (Hematoxylin and eosin; $\times 125$)

다공성이 부여되지 않은 폴리우레탄 인조혈관을 경동맥에 이식한 30분 후 제거한 혈관에서는 이식하자마자 혈관의 혈액 순환이 순조롭지 않아서 30분 후 제거해서 열어보았더니 혈관의 양쪽 입구가 막혀있으며 혈관의 중간부분은 혈전현상이 있음을 나타내었다. 시판되고 있는 PTFE 인조혈관을 경동맥에 이식한 3주 후 생검한 인조혈관은 혈전으로 인조혈관이 막혀 있었다. Fig. 5는 이식 6주 후 생검한 인조혈관의 소견사진이다. 혈관 양쪽 입구는 파이프린으로 변하고있는 것을 관찰할 수 있으며 양쪽 접합부분에는 조직과의 반응이 많은 반면에 인조혈관의 다른 부분들은 조직과의 반응이 없었다.

이때 사용한 인조혈관은 다공성 폴리우레탄 + 세포외기질 + 자가혈관내피세포의 3층 구조를 한 인조혈관이었다.

이식한 혈관의 길이는 5~6cm이었으며 본 연구에서 시험한 3층 구조의 인조혈관의 수는 3개 이었다. 생검하여 관찰한 결과 33%의 개방성 (patency)을 얻었다. Fig. 6은 이식했던 다공성 폴리우레탄과 PTFE 인조혈관의 단면을 H&E 염색한 소견사진이다. 다공성 폴리우레탄 인조혈관의 경우는 내면과 외면의 핵들이 산재해 있음을 나타냈으며 PTFE 인조혈관의 경우 그러한 현상을 발견할 수 없었다. 다공성 폴리우레탄인 경우 내면에 세포잔해들을 발견할 수 있었으며, 모든 경우 내면의 단백질 층을 발견할 수 있었다.

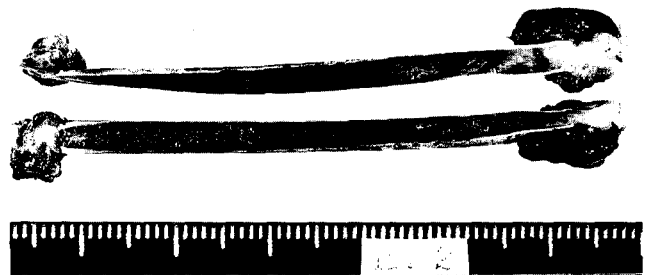


Fig. 5. Photograph taken from endothelialized polyurethane graft 6 weeks after operation. Anastomotic sites were infiltrated by host connective tissue.

고찰

본 연구의 궁극적인 목적은 현재 세계적으로 상품화되어 있어도 생체에 적용해서 성공율이 희박한 소구경 인조혈관의 개발에 관한 것이다. 혈전성이 우수해서 인공심장의 재료로 많이 사용되는 폴리우레탄을 기본재질로 사용했다. 다공성을 부여하여 혈류역학상 필요한 성질인 유연성 (compliance), 투과성 (permeability)과 탄성 (elasticity)을 개질하여 봉합자극들이 봉합한 후 금방 원상복구되는 것

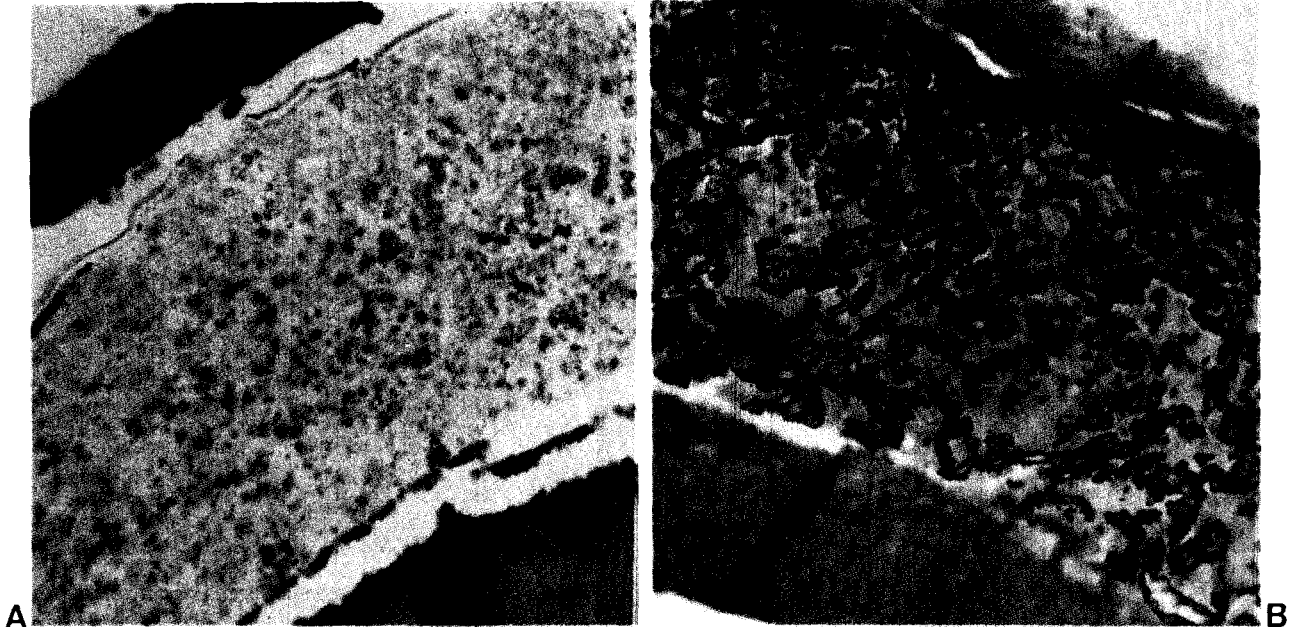


Fig. 6. Photograph taken from vascular grafts. **A.** Endothelialized polyurethane graft 6 weeks after operation; surface of the graft covered with scattered cells and thrombus layer. **B.** PTFE (polytetrafluoroethylene) graft 6 weeks after operation; surface of the graft covered with thrombus (Hematoxylin and eosin; $\times 125$).

을 관찰하였고, 비틀림 현상(kinking)을 발견할 수 없었다. 또한 봉합하기가 다공성이 부여된 폴리우레탄의 경우가 부여되지 않은 폴리우레탄보다 더 용이했다. 봉합한 후 혈액의 유출현상은 다공성 폴리우레탄을 사용했을 경우 조금 띄었지만 30분 후에는 유출현상을 관찰할 수 없었다. 3층 구조(다공성 폴리우레탄 + 세포외기질 + 혈관내피세포) 인조혈관에서는 봉합한 후 혈액 유출현상을 발견할 수 없었다. 현재 상품화되어 사용되고 있는 소구경 PTFE 인조혈관은 내경 4~6mm 사이를 많이 사용하지만 4mm 이하는 아직 적용되는 횟수가 적다. 본 실험에서 다공성 폴리우레탄과 PTFE 혈관을 비교해 본 결과 유연성과 탄성에 있어서 다공성 폴리우레탄이 우수함을 관찰할 수 있었다.

본 연구팀에서는 섬유아세포에서 형성된 세포외기질을 이용하여 생체외와 생체내 실험의 결과에서 세포외기질이 혈관내피세포의 기본기질이 될 수 있다고 발표하였다⁹⁾. 본 연구에서는 예비 시험으로 3개의 견본을 동물모델로 개에 적용했는데 6주 후 생검한 결과 33%의 성공율을 보였지만 혈관 내벽에서 혈전현상을 발견할 수 있었다. 모두 내벽(다공성 폴리우레탄 + 세포외기질 + 단백질 + 혈액성분 잔해)에 단백질층을 발견할 수 있었는데, 이

식수술 중에 경동맥에서 혈액순환이 중단되므로 봉합이 완료된 후 혈액순환을 재개할 때 응결성 혈액이 통과하기 때문에 내벽에 점착되어 생긴 것으로 생각된다. 이식된 인조혈관의 길이가 6cm 정도로 길어서 이러한 현상이 관찰될 수 있으며, 경동맥이므로 혈류의 양과 속도가 대동맥보다 적으므로 점착현상이 더 크게 나타날 수 있다고 생각된다. 이러한 경우 혈관내피세포가 혈전방지물질들을 빨리 생성하지 못했을 것이므로 혈관내피세포의 기능을 다 발휘할 수 없었을 것이다. 실험모델이 쥐인 경우에는 내경이 1.5mm인 3층 구조 인조혈관을 대동맥에 이식했기 때문에 이러한 현상을 관찰할 수 없었다. 대동맥인 경우 혈류의 속도가 빠르고 이식한 인조혈관의 길이도 1cm 정도로 짧았다. 이식한지 6주 후에 생검했는데 이러한 현상도 관찰할 수 없었고 내면에 혈관내피세포가 형성되어 있었다. 그러므로 이식한 인조혈관의 길이를 내경의 10배 이상인 3~5cm로 하고 heparin을 수술시작할 때 주입시켜 혈액 응고현상을 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

세포외기질이 도포된 폴리우레탄위에서 배양된 혈관내피세포가 전단응력(shear stress)에 노출되었을 때 세포탈락 정도에 대한 실험을 한 결과 15 dyne/cm²의 shear stress에서 9.75%의 세포 탈락율이 관찰되었다. 또한 세포외기

질위에 혈관내피세포를 배양시킨 후 세포의 기능을 측정하기 위해서 혈소판의 유착을 억제하는 Prostacyclin (PGI₂)의 합성 능력을 측정하여 대조군에 비하여 유의하게 높은 것을 관찰하였다 (21.97 ± 3.45 vs 4.93 ± 0.31 pg/1000 cells)¹¹⁾.

폴리우레탄의 독성시험을 생체밖(in vitro)실험으로 M199 (serum free)에 다공성 폴리우레탄을 담가서 생체와 비슷한 조건에서 3개월 동안 보관 후, 이 용액으로 혈관내피세포의 성장률을 측정한 결과 대조군과 비슷한 결과를 얻었으므로 재질의 독성은 발견할 수 없었다.

생체재료들의 생체적합성을 평가하기 위해서 여러 가지 동물들을 선택해서 실험해야 한다. 쥐를 동물모델로 선택할 경우 쥐의 수명이 짧기 때문에 장기간(3개월 이상) 동안 생체에서 생체재료들의 변화를 관찰할 수 없다. 그러므로 본 연구에서는 개를 모델로 선택했다. 실험의 준비와 개의 생리에 익숙하지 않아서 성공률이 낮았지만 본 연구를 통해서 다공성 폴리우레탄의 역학적 성질, 무독성과 주변조직과의 친화력도 우수함을 관찰했다. 쥐와 개의 모델에서 혈관내피세포화된 인조혈관에서는 주변조직세포들의 침투가 적어서 혈관의 내경이 좁아짐을 관찰할 수가 없었다.

결론적으로 섬유아세포에서 얻어진 전체 세포외기질이 소구경 인조혈관의 내피세포화를 위한 기본 기질로써 적합한 재료며 다공성 폴리우레탄도 인조혈관의 외막으로 좋은 재료가 될 수 있다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 소구경 인조혈관의 생체적합성을 향상시키기 위해서 혈관내피세포를 인조혈관에 부착하는 방법으로, 다공성 폴리우레탄을 외벽으로 제작한 인조혈관에 섬유아세포에서 생성한 세포외기질을 부착하는 방법을 개발하고 이 기술이 혈관내피세포화에 유용한지 관찰하였다. 다공성인조혈관의 내피세포배양하여 부착시키는 방법으로서 실험장건의 경정맥조직의 섬유아세포와 내피세포를 분리한 후 배양하였다. 다공성 폴리우레탄의 벽에 섬유아세포를 배양하여 세포외기질을 형성시킨 후에 감마선 처리한 결과는 세포외기질층이 주사전자현미경으로 관찰

되었다. 세포외기질층위에 혈관내피세포를 배양하여 내피세포화된 인조혈관을 제작하였다.

섬유아세포에서 형성된 세포외기질을 이용하여 실험한 결과에서 세포외기질이 혈관내피세포의 기본기질이 될 수 있다. 내피세포화된 인조혈관을 실험건의 경동맥에 이식하였고 6주 후 생검한 결과 33%의 성공율을 보였지만 혈관 내벽에서 혈전현상을 발견할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Nossel HL, Vogel HJ. *Pathobiology of the endothelial cell*. Academic Press, 1982
2. Bjorek CG, Esquivel CO, Bergentz CE, et al. *Reduced thrombogenic characteristics of expanded polytetra-fluoroethylene and polyurethane arterial grafts after heparin bonding*. Surgery 1984;95:102-7
3. Yamada KM, Olden K. *Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood*. Nature 1978;275:179-84
4. Belden TA, Schmit SP, Falkow LJ, Sharp WV. *Endothelial cell seeding of small diameter vascular grafts*. ASAIO Trans 1982;28:173-7
5. Declerck YA, Jones PA. *The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth muscle cells*. Biochem J 1981;186:217-25
6. Hedman K, Kurkinen M, Alitalo K, Vaheri A, Johansson S, Hook M. *Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures*. J Cell Biol 1979;81:83-91
7. Sage H, Pritzl P, Bornstein P. *Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: Comparison of aortic, venous capillary, and corneal endothelium*. Arteriosclerosis 1981;1:427-42
8. Lee YS, Park DK, Min BG. *Endothelial cell seeding onto extracellular matrix for development of polyurethane vascular prosthesis*. J KOSOMBE 1991;12:165-70
9. Lee YS, Kim YB, Park DK, Seo JW, Lee KB, Min BG. *Endothelial cell seeding onto extracellular matrix of fibroblasts for the development of small diameter polyurethane-vessel*. ASAIO 1993;39:3,740-5
10. White RA. *The effect of porosity and biomaterial on the healing and long-term mechanical properties of vascular prosthesis*. ASAIO 1988;36:96-100
11. Kim MA, Lee YS, Chung Jk, Lee MM, et al. *Antithrombotic effect of endothelial cells cultured on extracellular matrix coated polyurethane: prostaglandin synthesis and platelet adhesion studies*. KJHT 1994;2:141-8

=국문초록=

소구경 인조혈관의 생체적합성 향상은 혈전생성을 막는 것이 해결해야 할 문제점이다. 정상혈관의 혈관내피세포는 항상 정상기능 혈관을 유지하게 하는 중요한 역할을 한다. 본 연구의 목적은 다공성 폴리우레탄 소구경 인조혈관의 생체적합성을 높이기 위한 방법을 개발하는 것인데, 혈관내피세포화를 위해 섬유아세포에서 생성분비되는 세포외기질이 어느정도 유용한 지를 알아보기 위한 것이다.

방법: 인조혈관골격은 폴리우레탄을 이용하여 직경 3mm와 두께 0.3mm, 길이 6cm로 가공하였고, 체중 15kg되는 잡종개의 경정맥에서 얻은 섬유아세포를 배양하여 폴리우레탄 튜브벽에 부착배양하여 세포외기질층을 형성시켰다. 그다음 개의 경정맥에서 내피세포를 분리배양하여 충분한 세포를 인조혈관 내면을 세포 배양한 자가혈관내피세포로 증착시키서 자연혈관과 비슷한 형태의 3층 구조 인조혈관을 만들었다. 혈관내피세포가 부착된 직경 3mm의 소구경 인조혈관을 길이 6cm로 잡종건의 경동맥에 자가이식하였고, 이식후 3주, 6주에 이식한 인조혈관을 적출하여 조사하였다. 동물실험의 대조군으로는 시판되고 있는 직경 4mm 길이 6cm PTFE 혈관을 사용했다.

결과: 개의 경정맥내피세포를 분리 배양하여 직경 3mm 폴리우레탄 인조혈관 내벽을 내피세포화 하는데는 섬유아세포를 먼저 배양하여 생성된 세포의 기질을 기반으로 하여 혈관내피세포를 부착시켜 생체적합성이 개선된 인조혈관을 개발할 수 있다. 동물실험한 3마리의 개에서 내피세포 부착 인조혈관 3개와 다공성 폴리우레탄 인조혈관 3개를 이식한 결과는 내피세포 부착인조혈관에서 33%의 개방성이 있었으나 혈전형성도 관찰되었다.

개에 이식된 혈관내피세포화 인조혈관을 6주안에 제거한 혈관에서 혈전이 생겨 폐색되기는 하였지만 앞으로 내피세포의 생육성 향상으로 혈전방지 소구경 인조혈관의 개발에 새로운 방법이 될 것으로 판단되었다.