



저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

의학 박사학위 논문

Granulocyte colony-stimulating
factors의 탈세포화된 소구경
이식도관에 대한 중막 변성을
제외한 부정적인 리모델링의
최소화 효과

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

강준규

Granulocyte colony-stimulating
factors의 탈세포화된 소구경
이식도관에 대한 중막 변성을
제외한 부정적인 리모델링의
최소화 효과

지도교수 이 철 주

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2014년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의학과/의학전공

강 준 규

홍길동의 의학 박사학위 논문을
인준함.

심사위원장 이 철 주 인

심사위원 김 영 수 인

심사위원 탁 승 제 인

심사위원 윤 명 호 인

심사위원 주 석 중 인

아주대학교 대학원

2013년 11월 23일

Granulocyte colony-stimulating factor의 탈세포화된 소구경 이식도관에 대한 중막 변성을 제외한 부정적인 리모델링의 최소화 효과

빈약한 내피화와 내막의 과형성은 소구경 이식도관 실패의 주요 원인이다. 본 연구는 Granulocyte-stimulating factor(G-CSF)가 탈세포화된 소구경 이식도관의 리모델링을 억제하는 효과에 대한 연구이다. Sprague-Dawley 쥐의 신동맥하 복부 대동맥에 동종이식을 시행하고 이를 G-CSF 처치 여부에 따라 두군으로 나누었다. 8 주 후에 이종 이식편을 채취하여 내막의 과형성, 콜라겐의 침착, 액틴 염색 세포를 조사하였다. 중막층의 세포 재증식과 탄력 섬유모양의 모양 변화에 관하여서도 조사하였다. G-CSF 처치군에서 내막층의 구성에서 콜라겐이 더 성긴 모습이 관찰되었고 액틴 염색 세포가 더 우세함이 관찰되었다. 중막층의 탄력 섬유모양의 변성은 비슷하였으며 정상에 비하여 얇아진 결과를 나타냈다. 그러나 본 빌레브란트 팩터와 CD31 의 염색의 증가와 세포 및 초미세 구조가 더 잘 보존된 점은 G-CSF 군에서 리모델링과 내피화가 더 진행되었음을 알 수 있다. 본 연구는 G-CSF 가 탈세포화된 소구경 이식도관의 부정적인 리모델링을 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있으나 G-CSF 가 중막층을 보존하는 역할을 하는지에 관해서는 확실하지 않다.

핵심어 : G-CSF, 탈세포화된 소구경 이식도관, 내막의 과형성, 부정적인 리모델링

차 례

국문요약	i
차례	ii
그림차례	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법(혹은 연구대상 및 방법)	3
III. 결과	7
IV. 고찰	9
V. 결론	12
참고문헌	13
ABSTRACT	18

그림 차례

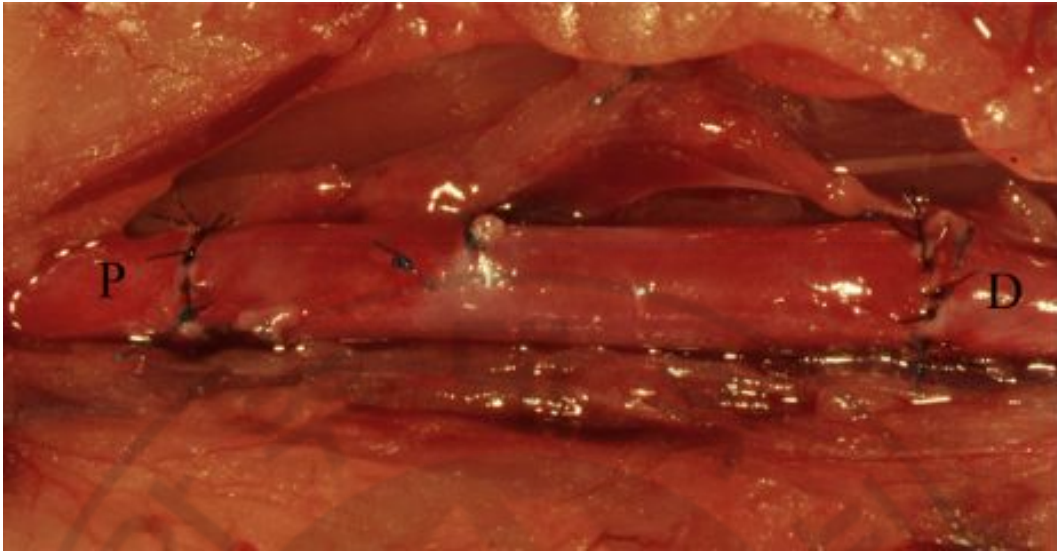


Fig. 1. Suture anastomosis with multiple interrupted Nylon #9-0 suture..... 3

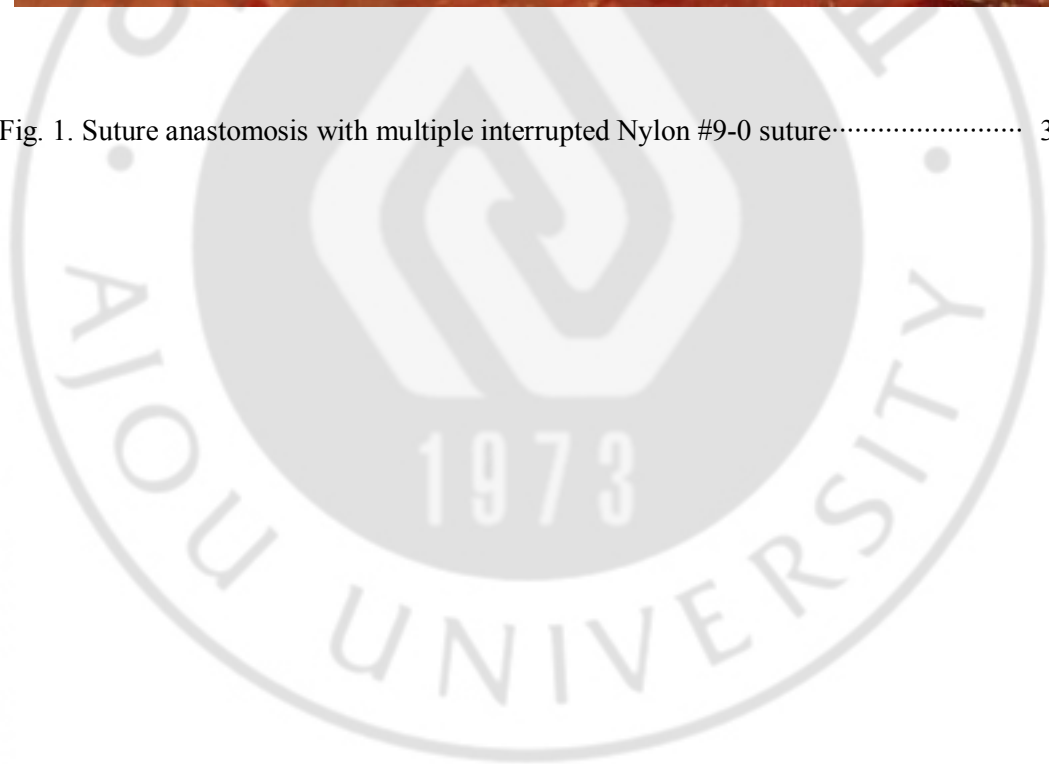




Fig. 2. Confluent layer of endothelial cells and abundant cellularity in the underlying medial layer of the normal vessel(a) and absent endothelial coverage and absence of cells and nucleic components in the deeper medial layer in the decellularized vessel(b)…… 7

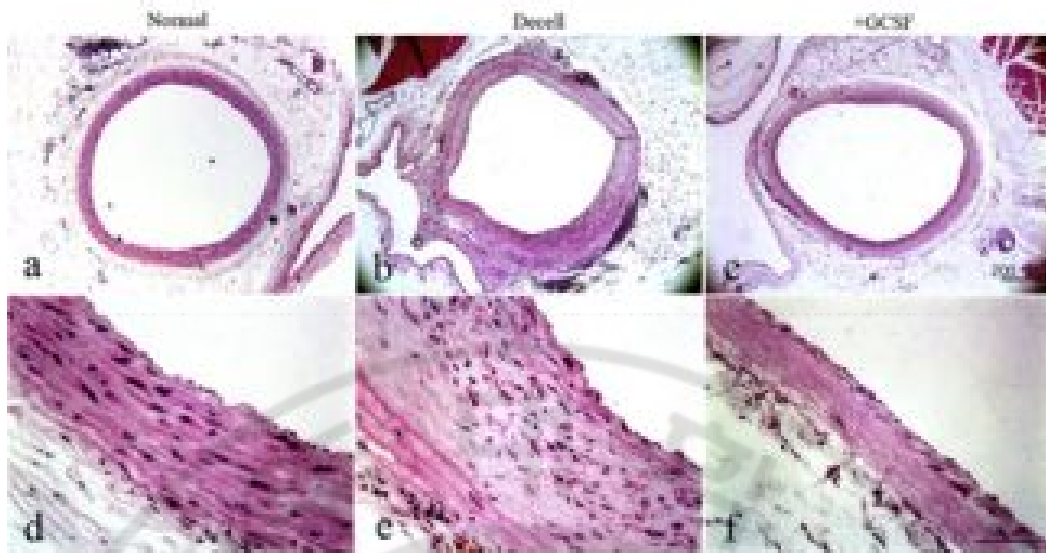
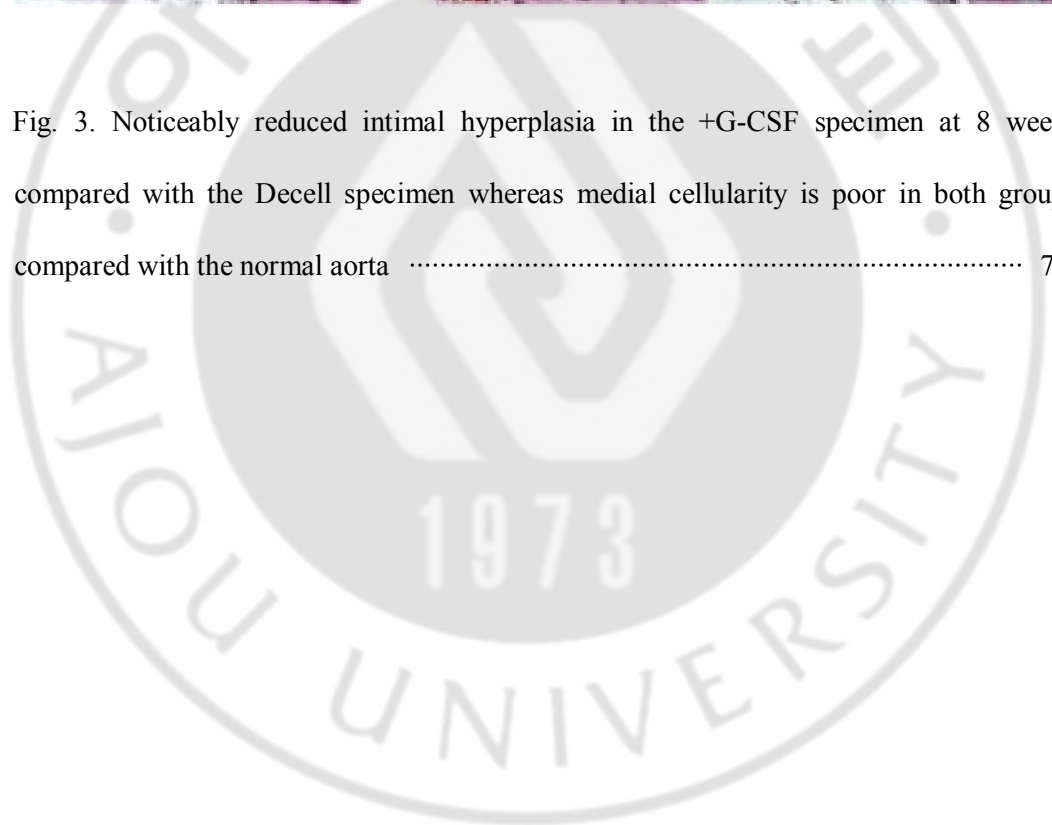


Fig. 3. Noticeably reduced intimal hyperplasia in the +G-CSF specimen at 8 weeks compared with the Decell specimen whereas medial cellularity is poor in both groups compared with the normal aorta 7



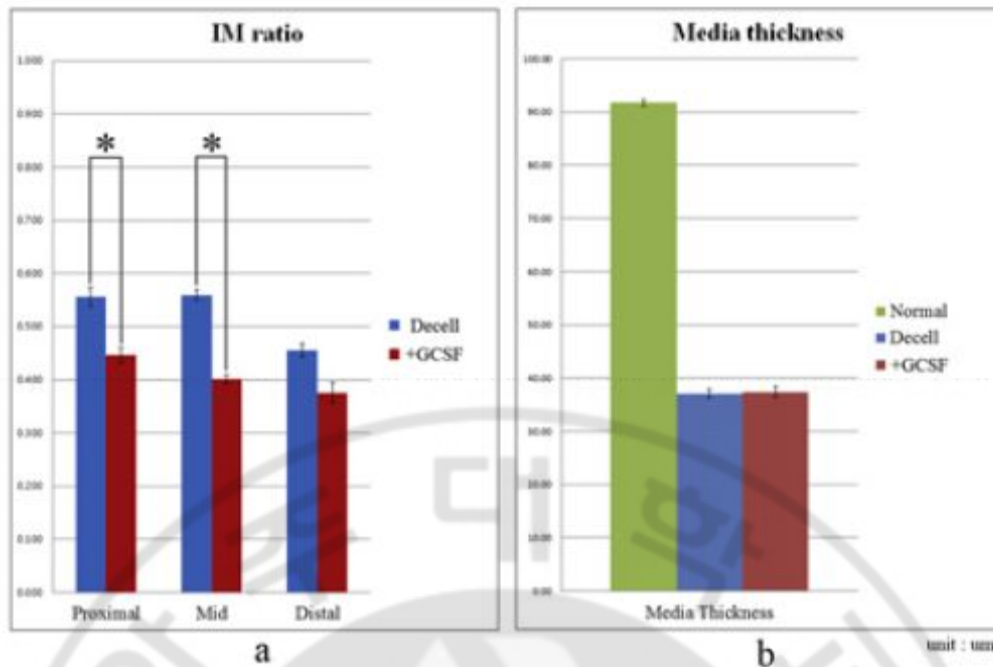


Fig. 4. Intimal hyperplasia formation in both groups (i.e., IM ratio shows a decreasing pattern in the order of proximal, mid, and distal segments). However, the IM ratio is consistently less in the +G-CSF specimen compared with the Decell specimen in all sections

7

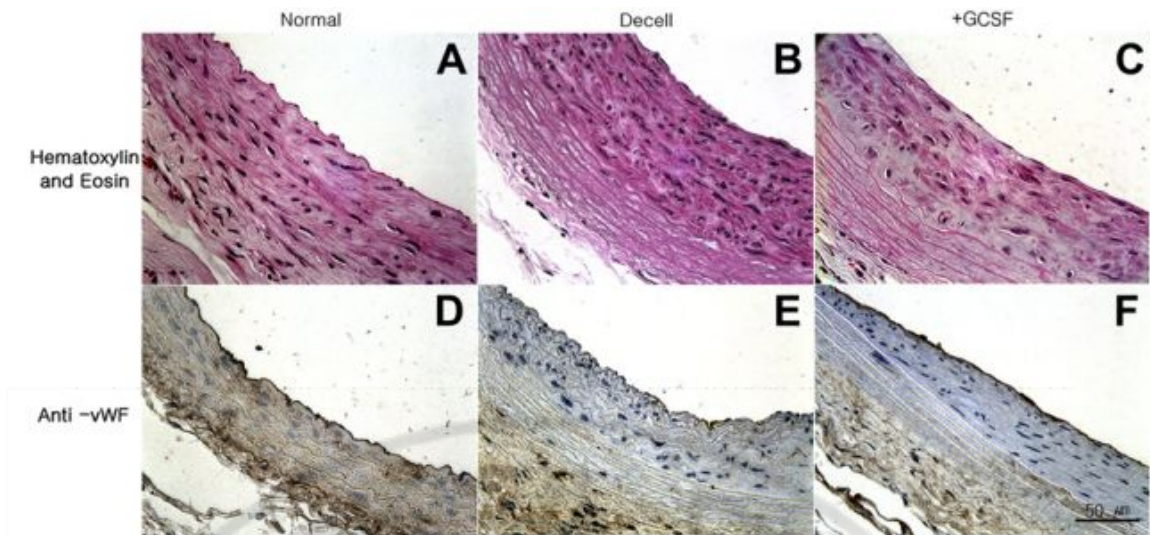


Fig. 5. Enhanced endothelialization and greater vWF staining in the +G-CSF specimen compared with the Decell group(C,F, vs B,E). Endothelialization and vWF staining are similarly less prominent in both groups compared with the normal aorta(A and D).

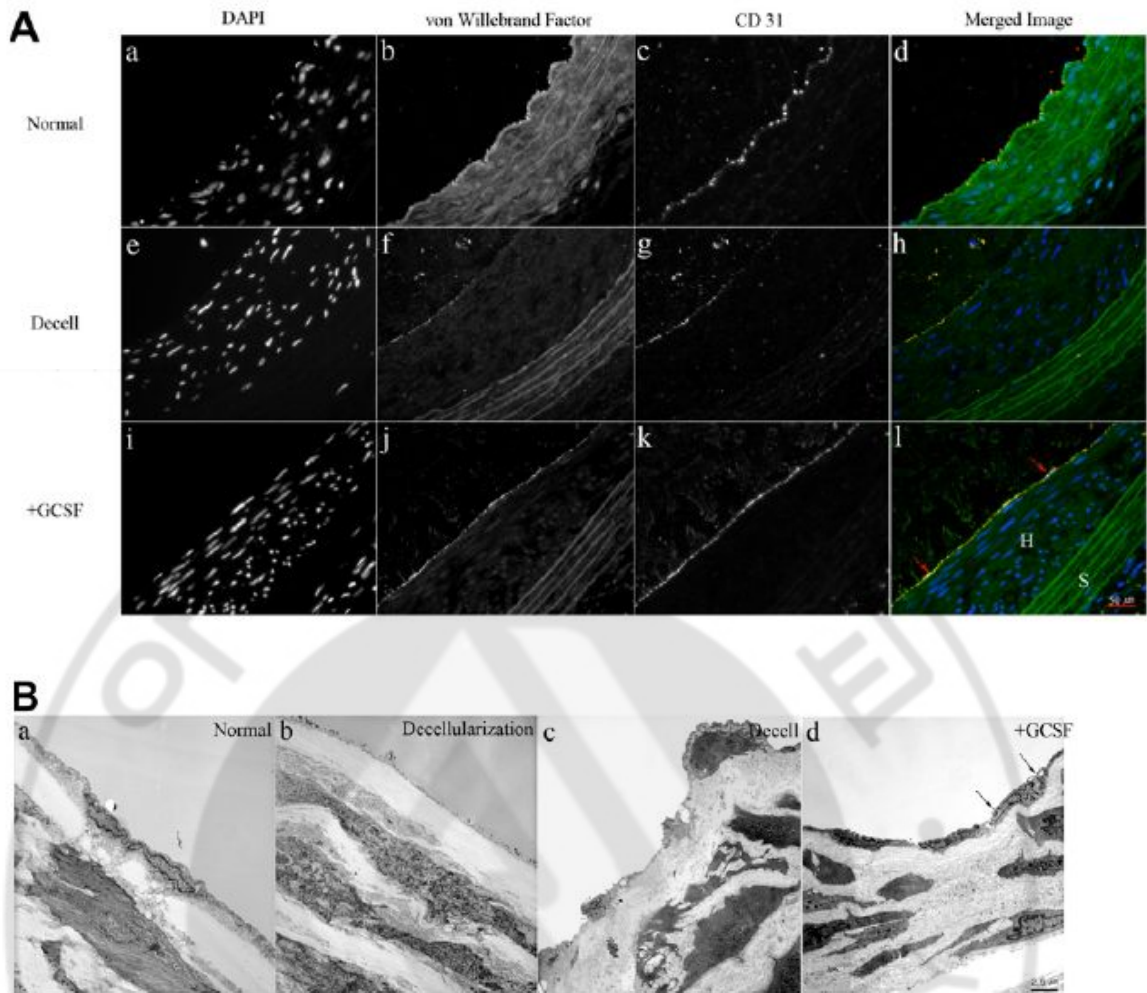


Fig. 6. Immunohistochemistry of the normal, Decell, and +G-CSF grafts at 8 weeks shows variable intensity of vWF(b,f,j) and CD31+(c,g,k). The merged image shows good colocalization of both signals on the innermost confluent cell layer on the luminal surface(d,h,l). The signals in the +G-CSF aorta appear stronger than in the Decell specimen. The DAPI staining shows poor cellularity in the medial layer(e,i). The normal aorta shows a contiguous layer of flat-appearing endothelial cells(a). The decellularized normal aorta before implantation shows the absence of any cellularity(b). The Decell specimen is lined

by flat-appearing endothelium-like cells, but cytoplasmic endothelial projections with irregular surface contours can be seen from the luminal side(d). 8



I. 서 론

다크론 등을 이용한 합성 소구경 도관은 임상에서 많이 사용되나 혈전, 내막의 과성장, 폐색성 동맥 경화 등에 의하여 도관 폐색이 조기에 발생하는 것으로 보고되고 있다.¹⁴ 대복재 정맥과 같은 자가 혈관이 더 우수한 결과를 나타내나 이전에 인조 혈관을 사용했던 경우나 자가혈관의 질이 좋지 않은 경우 자가 혈관의 사용이 제한된다. 이로 인하여 우수하고 생체에 적합한 도관의 개발이 요구되고 있다.

탈세포화는 생물학적 스캐폴드 방법에 있어서 면역 반응을 피하는데 매우 유용하다고 알려져 있다.⁵ 그러나 비록 탈세포화가 혈관의 이식 후 생물학적으로 스캐폴드를 불활성화 시키는데 매우 우수한 결과를 나타내지만, 반면에 혈관의 탈세포화는 혈관의 부정적인 리모델링과 연관이 있으며 혈관 내피세포의 부족을 야기하고 혈전의 형성에 관여하여 도관의 폐색을 일으키는 것과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 여러 가지 생물반응장치를 이용하여 혈관 내피세포로 이식도관의 내면을 덮는 노력들이 실험실에서 이루어지고 있다.⁶⁻¹⁰ 그러나 이런 생물반응장치를 이용한 방법은 기술적으로 매우 어려울 뿐만 아니라 시간과 비용을 감안할 때 비효율적이다. 이런 한계점을 극복하기 위하여 생체 내 상피세포화가 가능한, 혈행 속에 순환하고 있는 골수로부터 유래된 줄기 세포를 이용하는 시도들이 진행되고 있다.^{8,10-13} Griese 등¹⁴ 은 토끼의 혈관 손상 모델을 통하여 줄기세포의 빠른 상피세포화와 내막 과증식의 감소를

발표하였으며, 타카미야 등¹⁰은 granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)가 상피세포화를 증가시키고 내막의 과형성을 억제함을 발표하였다. 조 등¹⁵은 개의 탈세포화된 대동맥 동종이식 실험을 통하여 G-CSF가 상피세포화를 증가시키고 내막 과증식을 억제함을 보고하였다. 이런 여러 연구들에 기초하여 본 연구는 쥐를 이용하여 탈세포화된 소구경 이식도관에 대한 G-CSF의 영향을 연구하였다.



II. 재료 및 방법

총 24 마리(12 마리의 공여쥐와 12 마리의 수여쥐)의 암컷 Spargue-Dawley 쥐를 사용하였으며 각각의 무게는 250-300 g 이었다. 각각을 탈세포화된 대동맥을 이식한 탈세포군(Decell group, n=6) 과 탈세포화된 대동맥을 이식한 후 G-CSF 로 처치한 G-CSF(G-CSF group, n=6) 군으로 나누었다. Zoletil 50(40mg/kg; Virbac Laboratories, Carros, France), Xylazine(10mg/kg; Bayer, Leverkusen, Germany), 0.9% 생리 식염수의 2:1:2 혼합용액을 복강내에 0.25mL 주입함으로 써 마취를 유도하였다. 공여쥐의 정중 복부 절개 후 혈전의 생성을 억제하기 위하여 헤파린 (100g 당 10IU)을 하대정맥으로 주입한 후 신동맥 직하방에서 장골동맥까지의 복부 대동맥을 적출하여 생리 식염수로 세척한 후 탈세포화를 진행하였다.

수여쥐를 공여쥐와 같은 방법으로 마취하고 헤파린을 주입한 후 나일론 9-0 봉합사를 이용하여 대동맥을 이식하였다.(Fig. 1) 통증 치료와 감염 방지를 위하여 케토프로펜 5mg/kg 와 아목시실린 150 mg/kg 를 수술 후 3 일간 피하 주사 하였다. G-CSF 군의 쥐들은 G-CSF(Leukokine injection, 150 mcg; CJ CheilJedang Corp, Seoul, Korea)주입에 관한 표준화된 지침 용량이 없으므로 이전 실험 연구자들의 연구를 참조하여 수술전 1 일부터 수술 후 9 일까지 총 10 일간 25 mcg/0.2mL/d 의 용량으로 피하 주사하였다.¹⁵⁻¹⁷ 수술 후 합병증이나 사망은 관찰되지 않았다. 실험 동물은 National Institute of Health 에 의하여 편찬되고 Institute of Laboratory Animals Resources 에 의하여 마련된 “Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”(National Academy Press 1996:1-119) 에 근거하여 다루어 졌다.

공여취에서 적출된 대동맥은 Hank's balanced salt solution (HBSS) 에 두세차례 세척하여 15-18 시간동안 섭씨 37 도에서 0.25%(v/v) Triton X-100(Sigma, St.Louis, MO, USA) 와 0.25%(w/v) sodium deoxycholate 가 포함된 10mL 의 생리 식염수와 함께 10 cm Petri dish 에 보관하였다. 대동맥은 HBSS 에 담가서 매 두시간마다 용액을 바꿔가면서 흔들어 주었다. 세척제를 제거하기 위하여 위와 같은 작업을 세번 반복하였다. 각각의 대동맥 샘플은 150IU/mL DNase I, 100 µg/mL RNase A, 50 mM magnesium chloride 가 포함된 10 mL 의 phosphate-buffered saline (PBS) 에서 15-18 시간 동안 섭씨 37 도에서 보관하였다. 각각의 탈세포화된 대동맥은 생리식염수에 담겨져서 섭씨 4 도에서 사용전까지 보관되었다.

이식된 도관은 8 주후 적출되었다. 처음과 같은 방법으로 마취한 후 수술 중 기계적인 조작에 의하여 내피세포가 떨어져 나가는 것을 방지하기 위하여 적출전에 4%(v/v) buffered paraformaldehyde 용액을 60 mmHg 의 압력으로 관류시켰다. 대동맥을 적출할 때에는 전체적으로(en bloc) 주변의 근육 및 주위조직과 함께 적출하였다. 현미경을 이용하여 주위 조직을 제거한 후 포르말린에 최소 3 시간 동안 처치한 후에 파라핀에 고정하였다. 기본적인 light microscopic 염색은 hematoxylin-eosin(H&E), Elastica von Gieson, Masson's trichrome 으로 구성되었다.

공여 대동맥의 벽과 새로 형성된 내막층의 콜라겐 침착, 근육 세포, 탄력 섬유를 조사하였다. H&E 염색을 통하여 내막의 과형성과 형태학적 분석을 시행하였고 콜라겐은 Masson's trichrome 염색으로, 근육 세포는 α -actin 염색, 탄력 섬유와 혈관 전체의 구조적인 완성도는 elastic 염색으로 분석하였다.

AxioVision Release 4.8.2 digital software(Carl Zeiss AG, Jena, Germany) 를 이용하여 각 대동맥의 횡단면을 50 배 확대하여 4 등분한 후 가장 두꺼운 부위의

중막층의 두께를 측정하였다. 각 대동맥의 근위부, 중간, 원위부 1/3 지점을 측정하였으며 각 군에서 3 개의 정상 대동맥의 각각의 군에 해당하는 대동맥의 중간값을 구하였다.

내막의 과성장을 보기 위하여 내막이 과형성된 영역과 내막 과형성 부위와 전체 혈관 단면의 합인 내막 중막(intima media, IM) 비율을 구하였다. 이를 측정하기 위하여 단면 영상을 50 배 확대하고 AsioCAB MRm(Carl Zeiss AG)와 AxioVision Release 4.6(Carl Zeiss AG) software 을 이용하여 촬영하였다. 전체 혈관 벽의 두께를 측정할 때 가장 외측은 외막으로 정하였고 가장 내측은 내강면으로 하였다. 내막의 과형성의 영역을 측정하기 위하여 가장 외측은 새로 형성된 내막이 혈관 스키펴드로부터 떨어진 부위로 정하였다.

파라핀에 담겨서 3 μ m 두께로 잘려진 후 파라핀을 제거하였다. 파라핀을 제거한 후 0.1%(v/v) Triton X-100 & 0.05%(v/v) Tween-20 in 0.01M sodium citrate buffer for antigen 혼합용액에 담겨졌다. Endogenous peroxidase 는 0.3% hydrogen peroxidase in methanol solution 을 사용하였다. von Willebrand factor(vWF) 와 α -smooth muscle actin 을 위한 면역조직화학법은 rabbit anti-vWF antibody(1:200; catalog no. F3520; Sigma) 와 mouse anti-human smooth muscle actin antibody(1:100; catalog no. M0851;Dako, Glostrup, Denmark) 를 사용하였다. 항체 반응은 EnVision DAB+ kit(catalog no. K4006, K4010; Dako) 를 이용하여 측정하였다. CD31 과 vWF 를 위한 면역 형광은 goat anti-platelet/endothelial cell adhesion molecule-1(PECAB-1) antibody (1:100; catalog no. sc-1506; Santa Cruz Biotechnology Inc.) 와 rabbit-anti vWF antibody 를 이용하였다. 항체 반응은 rabbit anti-goat IgG conjugated Cy3(catalog no.305-165-006; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) 와

goat anti-rabbit IgG conjugated Alexa 488(catalog no. A-11034;Invitrogen Life Technologies Inc., Eugene, OR, USA) 를 이용하였다.

조직을 알코올로 탈수한후 Lowicryl HM20 kit (catalog no 14340; Electron Microscopy Sciences, Inc.)에 고정하였다. 60nm 로 매우 얇게 자른후 uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색을 하고 EM 109(Carl Zeiss AG) 전자 현미경에 준비하였다.

Mann-Whitney U test 를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였다. P 값은 0.05 미만일 경우 통계적으로 의미가 있는 것으로 하였다.



Ⅲ. 결 과

고배율 현미경 (400 x magnification) 으로 정상 혈관의 내피세포 층과 그밑에 위치하는 중막층의 풍부한 세포를 관찰할 수가 있었다(Fig. 2a). 탈세포화된 혈관에서는 내피세포가 관찰되지 않았고 더 깊은 중막층의 세포와 세포의 핵이 없음이 관찰되었다(Fig. 2b).

수술 8 주후, 탈세포 군의 대동맥에서는 내막의 과형성이 관찰되었고 콜라겐과 α -actin staining smooth cell 이 균등하고 분포되었다(Fig. 3Ab, Ae, C). 내막의 과형성은 α -actin staining smooth cell 이 더 우세하며 균등하고 콜라겐 침착이 드물게 분포된(Fig. 3Ac,Af,C) G-CSF 군보다 탈세포 군에서 더 두드러졌다. 각군의 리모델링의 정도를 보기 위하여 IM 비율을 측정하였다. G-CSF 군과 탈세포군의 근위부, 중간부, 원위부의 각각의 IM 비율의 중간값은 각각 0.45 ± 0.09 , 0.40 ± 0.05 , 0.38 ± 0.11 , 0.56 ± 0.11 , 0.56 ± 0.06 , 0.46 ± 0.07 이었다($P = 0.05$). 두군에서 모두 혈류의 방향에 따라 근위부엿 원위부로의 내막 변화가 비슷한 패턴으로 나타났다(Fig. 4).

탄력 섬유가 정상에서 나타나는 특유의 파도모양을 잃어버리고 직선 모양으로 퍼지는 소견이 양군에서 모두 관찰되었다. 양군간의 혈관벽의 두께의 중간값은 큰차이를 나타내지 않았으나(37.01 ± 0.71 vs 37.37 ± 0.82) 정상 혈관보다는 매우 두께가 감소되었다(91.72 ± 0.62)(Fig. 3, Fig. 4b, Fig. 5). 전체적으로 G-CSF 의 처치여부에 상관없이 양군에서 정상 대동맥 벽에 비하여 늘리고 얇아진 소견이 관찰되었다. 비록 8 주후 적출된 조직이 탈세포한 직후의 조직보다 세포가

많음이 관찰되었지만 그럼에도 불구하고 호스트의 세포로부터 어떤 중대한 재구성이 진행될 것이라는 주장을 입증하는 데는 무리가 있다.

G-CSF 군에서 탈세포군보다 vWF 의 염색이 증가된 소견이 관찰되었다(Fig. 5). 본 연구에서 CD31 과 vWF 는 내피세포의 존재에 대한 지표로 사용되었다. 전자 현미경 소견에서 탈세포화된 대동맥의 세포의 모양은 좀더 구형태를 띠고 좀더 변칙적인 모양이며 세포간의 접촉은 덜하고 내강 표면의 미세 융모(microvilli)가 적은 것으로 관찰되었다. 반면 G-CSF 군에서는 세포의 모양이 납작하고 더 많은 미세 융모가 관찰되며 세포간 접촉도 더 많은 것으로 관찰되어 정상 내피세포와 더 많이 닮아 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 6).



IV. 고찰

혈전생성, 이식거부, 과도한 내막의 과형성과 동맥류 변성은 합성, 동종, 이종 소구경 이식도관을 임상에 적용할 때 직면하는 가장 큰 문제들이다.^{14,19,20}

조직의 탈세포화는 빠르고 쉽게 시행할 수 있고, 각각의 요구에 따라서 다양한 길이의 혈관 들을 대량으로 진행할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 쥐 모델로 탈세포화된 도관이 혈관 조직 공학 연구에서 우수한 잠재력이 있음을 알 수 있다. 탈세포화된 혈관 조직이 봉합을 견디는 능력과 같은 생리적인 능력이 있음은 과거의 연구에서 보고되었다.^{21,22} 그러나 면역적 불활성이라고 알려진 항원성의 존재와 같은 매우 중요한 문제들이 아직도 해결을 해야 되는 문제이며.^{23,24} 이로 인하여 혈소판의 응집 가능성이 증가되고, 혈전이 생성되며 완전한 내피화가 이루어 지지 않기 때문에 조기 도관 폐색이 유발된다.²⁵

CD 34 는 골수에서 유래하는 조혈모세포를 인지하는 물질로 널리 사용되고 있다.²⁶⁻²⁸ G-CSF 는 골수로부터 이런 세포들의 유리를 증폭시키는 것으로 알려져 있다.^{29,30} 본 연구는 탈세포화된 도관에서 G-CSF 의 내피화와 리모델링에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. G-CSF 군에서는 탈세포 군에 비하여 우수한 내피화를 보였으며 이는 vWF 와 CD31 염색이 증가되는 소견으로 알 수 있다.

내막의 과형성의 정확한 이유는 아직 명확하게 밝혀지지는 않았으나 특히 도관-정맥 연결이나 동맥-정맥 연결에서 나타나는 문합부 와류의 형성과 낮은 전단 응력(shear stress)은 복합적으로 혈역학적인 스트레스로 작용할 것이라고 받아들여지고 있다.^{8,12,31} 위의 설명에 부가적으로 혈류 역동학적인 스트레스가

내막 과형성에 영향을 줄 것이라는 의견이 있다.^{32,33} 다른 이유로는 외과적인 손상과 도관-혈관의 크기 차이 등이 있다.⁸ 관찰된 내막 과형성의 패턴이 도관의 모양과도 연관이 있다는 사실로 보아 이런 주장들은 본 연구와도 관련이 있다. 근위부에서 원위부로 갈수록 내막 과형성이 줄어드는 경향은 내막 과형성을 일으키는 자극은 양군 모두에서 동일하게 작용하였다. 신내막의 높이가 가장 높았던 근위부 문합부위는 와류의 세기가 가장 센 곳이다. 이런 관점은 도관-정맥 연결 부위와 동맥간 연결 부위에서 내막 과형성이 가장 두드러졌다는 이전의 연구와도 일치하는 점이다.^{34,35}

대부분의 고분자에 기초한 혈관 조직 공학은 생체밖에서 생반응물질을 이용한 세포심기(cell seeding) 과 상피화에 집중되어있다.^{7,9} 그러나 이런 방법들은 재구현하기가 어렵고 기술적으로 난이도가 높으며 경제적으로 많은 비용이 소모되며 긴 준비기간 때문에 대부분 실험으로 그치거나 임상에 적용을 하기 어렵다. L'Heureux et al.³⁶ 은 소구경 도관의 조직 공학을 이용한 연구를 발표하였다. 이 연구는 도관의 성숙에 최소 10 주가 걸리는 매우 복잡하고 시간이 많이 소모되는 과정이었다. 이 도관의 실패의 가장 중요한 요인은 동맥류 변성이었다. 이현상에 대하여 중막층의 세포질의 부족과 기능적인 탄력섬유의 부족을 원인으로 설명하였는데 이는 이전 연구의 다른 조직 공학 도관 실험에서도 나타났던 점이다.^{36,37} 본 연구에서는 동맥류 변성이 나타나지 않았으나 혈관벽이 얇아지고 탄력섬유가 평평해지는 점으로 미루어 보아 동맥류 변성으로 진행할 가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 탄력섬유는 일시적으로 부풀어 올랐다 하더라도 원래의 모양으로 되돌아 가려는 성질을 지니고 있으며 이런 되돌아 가려는 경향은 동맥과 같이 탄력 섬유에 의하여 유지되는 조직에서 필수적인 성질이다.³⁹ 되돌아 가려는 성질을 잃었을 경우 딱딱하게 되어

순응도를 소실하고 확대가 진행되어 본연구와 같이 평평한 탄력 섬유가 된다. 그러므로 내막층의 구조적 완성도를 유지하고 이를 지지하는 탄력 섬유가 잘 유지될 수 있도록 연구가 설계되어야한다.

본 연구의 이제까지의 결과도 미래의 연구에 대한 준비가 될 것이다. 상대적으로 작은 실험군과 짧은 관찰 기간은 본 연구의 제한점이 될 것이다. 비록 작은 수의 쥐의 대동맥으로 전체 말초 동맥을 대표하는 데에는 제한점이 있으나 G-CSF 가 혈관의 리모델링에 미치는 영향은 본 연구가 거둔 성과라고 할 수 있다. 본 연구의 궁극적인 목적은 미래의 발전적인 연구를 통하여 탈세포화된 도관의 임상적인 적용이다. 대형 동물 실험 뿐만 아니라 본 연구와 같이 쥐와 같은 소형 동물 모델의 실험은 기본적인 혈관 실험의 기초 자료를 축적하여 대형 동물 실험에 적용하는데 중요한 역할을 할 것이다. 본 연구의 결과는 내막층의 리모델링 뿐만 아니라 중막층의 구조적 완성도를 보존하는 것이 중요함을 보여주고 있다. 과거의 연구들은 혈관 전체의 건강성은 단지 내피 세포 뿐만 아니라 하부의 중막층의 지지가 중요함을 나타내고 있다. 탄력 섬유의 파괴는 동맥류 변성을 일으킬 것이다. 근육 중막층에서 기저막의 파괴와 다른 변성은 정상적인 성숙한 근육 세포의 역변화를 일으키는 신호 전달을 유발할 수 있고 이것이 연속적인 증식, 체외 matrix 물질의 분비를 촉진하고, 내막의 과형성을 야기할 것이다.⁴⁰⁻⁴²

V. 결 론

본 연구는 상피화를 증가시키고 내막 과형성을 억제함으로써 부정적인 리모델링을 억제하는 G-CSF 의 효과를 밝혔다. 앞으로의 연구는 G-CSF 가 상피화와 섬유모세포의 증식과 관련하여 혈관의 리모델링에 끼치는 효과의 기전을 이해하는 방향으로 나아가야 할 것이다. 근육세포와 연관된 중막층의 세포질과 중막층의 구조적 완성도를 보존하고 동맥류 변성을 막는 효과에 대한 미래의 연구가 필요하다.



VI. 참고문헌

1. Berger K, Sauvage LR, Rao AM: Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 175(1):118-127, 1972
2. Clowes AW: Improving the interface between biomaterials and the blood. The gene therapy approach. *Circulation* 93(7):1319-1320, 1996;
3. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A: The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl* 15(3):241-278, 2001
4. Walpoth BH, Rogulenko R, Tikhvinskaia E: Improvement of patency rate in heparin-coated small synthetic vascular grafts. *Circulation* 98(19 Suppl):II319-323 discussion II324, 1998
5. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF: Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27(19):3675-3683, 2006
6. Martin ND, Schaner PJ, Tulenko TN: In vivo behavior of decellularized vein allograft. *J Surg Res* 129(1):17-23, 2005
7. McFetridge PS, Bodamyali T, Horrocks M: Endothelial and smooth muscle cell seeding onto processed ex vivo arterial scaffolds using 3D vascular bioreactors. *ASAIO J* 50(6):591-600, 2004
8. Roy-Chaudhury P, Sukhatme VP, Cheung AK: Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 17(4):1112-1127, 2006

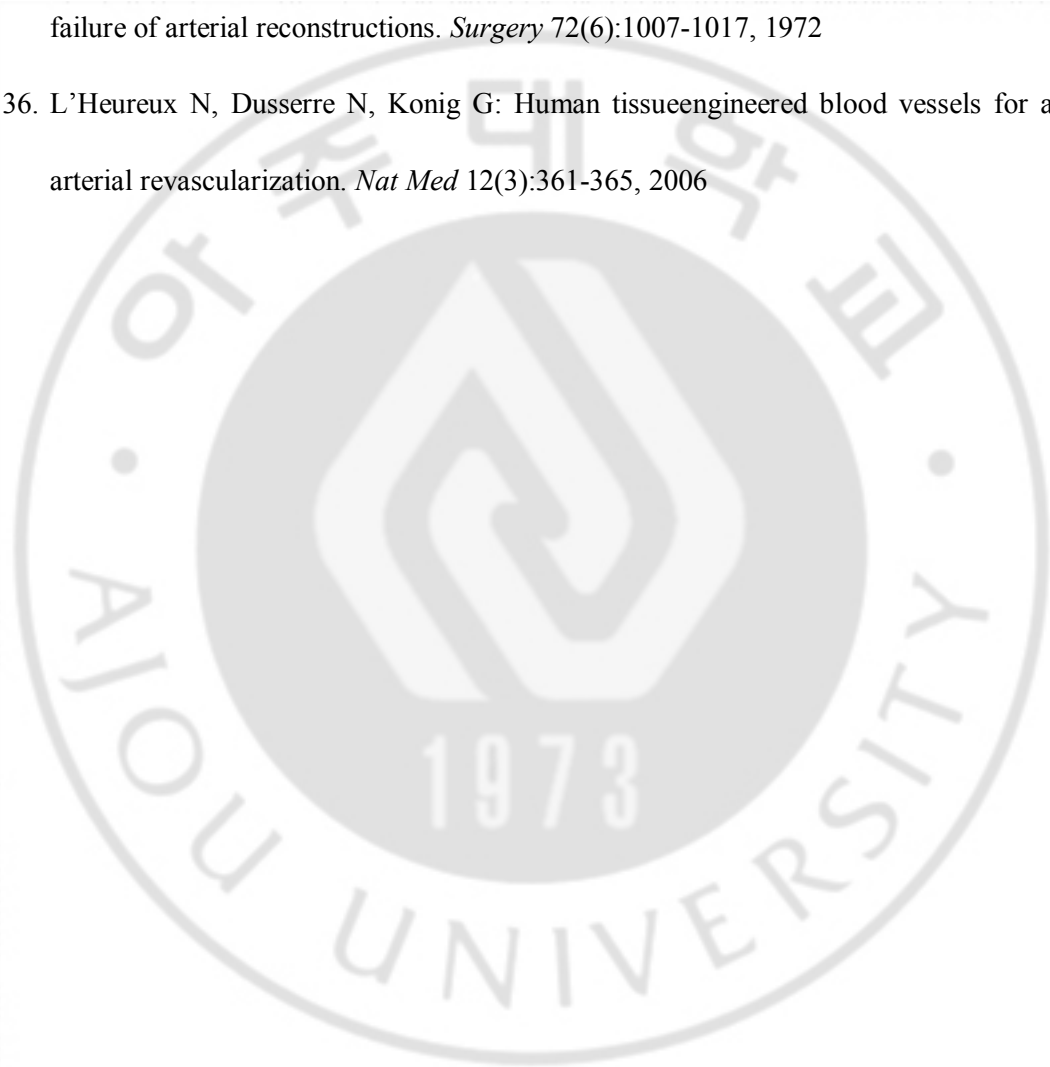
9. Song Y, Wennink JW, Kamphuis MM: Dynamic culturing of smooth muscle cells in tubular poly(trimethylene carbonate) scaffolds for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 17(3-4):381-387, 2011
10. Takamiya M, Okigaki M, Jin D: Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4):751-757, 2006
11. Rafii S, Lyden D: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9(6):702-712, 2003
12. Remuzzi A, Ene-Iordache B, Mosconi L: Radial artery wall shear stress evaluation in patients with arteriovenous fistula for hemodialysis access. *Biorheology* 40(1-3): 423-430, 2003
13. Takahashi T, Kalka C, Masuda H: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5(4):434-438, 1999
14. Griese DP, Ehsan A, Melo LG: Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 108(21):2710-2715, 2003
15. Cho SW, Lim JE, Chu HS: Enhancement of in vivo endothelialization of tissue-engineered vascular grafts by granulocyte colony-stimulating factor. *J Biomed Mater Res A* 76(2):252-263, 2006
16. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J: Effects of recombinant human granulocyte colony-

- stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72(6):2074-2081, 1988
17. To LB, Haylock DN, Simmons PJ: The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89(7):2233-2258, 1997
18. Hwang SJ, Kim SW, Choo SJ: The decellularized vascular allograft as an experimental platform for developing a biocompatible small-diameter graft conduit in a rat surgical model. *Yonsei Med J* 52(2):227-233, 2011
19. Ikonomidis JS, Gibson WC, Gardner J: A murine model of thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res* 115(1):157-263, 2003
20. Lesauskaite V, Tanganelli P, Sassi C: Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Hum Pathol* 32(9):1003-1011, 2001
21. Quint C, Arief M, Muto A: Allogeneic human tissueengineered blood vessel. *J Vasc Surg* 55(3):790-798, 2012
22. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN: Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg* 40(1):146-153, 2004
23. Cicha I, Ruffer A, Cesnjevar R: Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes. *Cardiovasc Pathol* 20(4):222-231, 2011
24. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G: Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 23(6):1002-6.

discussion 1006, 2003

25. Davie EW: Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* 74(1):1-6, 1995
26. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: Precursors of colonyforming cells in humans can be distinguished from colonyforming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 169(5): 1721-1731, 1989
27. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS: Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151(6):1221-1234, 2000
28. Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS: Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6246-6251, 2002
29. Adachi Y, Imagawa J, Suzuki Y: G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice. *J Mol Cell Cardiol* 36(5): 707-710, 2004
30. Wolfram O, Jentsch-Ullrich K, Wagner A: G-CSF-induced mobilization of CD34(+) progenitor cells and proarrhythmic effects in patients with severe coronary artery disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 30(Suppl 1): S166-169, 2007
31. Paszkowiak JJ, Dardik A: Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg* 37(1):47-57, 2003
32. Krueger U, Zanow J, Scholz H: Computational fluid dynamics and vascular access. *Artif Organs* 26(7): 571-575, 2002
33. Leuprecht A, Perktold K, Prosi M: Numerical study of hemodynamics and wall

- mechanics in distal end-to-side anastomosis of bypass grafts. *J Biomech* 35(2):225-236, 2002
34. Haruguchi H, Teraoka S: Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs* 6(4):227-235, 2003
35. Imparato AM, Bracco A, Kim GE: Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery* 72(6):1007-1017, 1972
36. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G: Human tissueengineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 12(3):361-365, 2006



VII. Abstract

Granulocyte Colony-Stimulating Factor Minimizes Negative Remodeling of Decellularized Small Diameter Vascular Graft Conduits but Not Medial Degeneration

Joonkyu Kang

Ajou medical school, The Graduate School of Ajou University

(Supervised by Professor Cheol Joo Lee)

Background: Poor endothelialization and intimal hyperplasia are major causes of small diameter vascular conduit (SDVC) failure. The present study was aimed to investigate the influence of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on inhibiting adverse remodeling of decellularized SDVCs.

Methods: Sprague-Dawley rats implanted with allograft infra renal abdominal aortic conduits were divided into 2 groups according to whether they were treated with G-CSF (+G-CSF group; n = 6) or without (Decell group; n = 6). The conduits were harvested at 8 weeks after surgery and examined for intimal hyperplasia, collagen deposition, and α -actin staining cells. The medial layer was also examined for signs of cellular repopulation and changes in the elastic fiber morphology.

Results: Intergroup comparison of the intimal composition showed relatively sparse collagen content and predominance of α -actin staining cells in the +G-CSF group. The medial layer

in the 2 groups showed similar degrees of elastic fiber degeneration and wall thinning relative to the normal aortic wall. However, the enhanced staining for von Willebrand factor and CD31, along with transmission electron microscopy findings of superior cellular and ultrastructural preservation, suggested that the remodeling and endothelialization in the +G-CSF conduits were superior to those in the Decell conduits.

Conclusions: This study suggests that G-CSF exerts a positive influence on inhibiting adverse vascular remodeling of decellularized vascular conduit implants. However, whether G-CSF administration may also effectuate an improved ability to preserve the medial structural integrity is unclear.

Keywords : G-CSF, decellularized small diameter vascular conduit, intimal hyperplasia, negative remodeling