

백서 대퇴동맥 외막층 제거후 혈관동결시 조직형태학적 변화 및 재생에 관한 연구

김태득 · 김경욱 · 이재훈 · 김창진*

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실 · 순천향대학교 의과대학 병리학교실

Abstract

HISTOMORPHOLOGIC CHANGE AND REGENERATION OF THE ADVENTITIA-STRIPPED AND FROZEN RAT FEMORAL ARTERY : HISTOLOGIC, HISTOMORPHOMETRIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC STUDY.

Tae-Deug Kim, Kyung-Wook Kim, Jae-Hoon Lee, Chang-Jin Kim*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

*Department of Pathology, College of Medicine, Soonchunhyang University**

Vasospasm causes microvascular surgery to fail as a main factor in the loss of transferred flap dye to the diminution of blood flow in reconstruction surgery. Although there has been extensive research to resolve the vasospasm problem, no one has reached an ideal solution to date. However, cryotherapy, which is often used for destruction of tumor lesions, is being presented as a new way of releasing vasospasm. After making a histomorphometric measurement on vasodilation during the course of 1, 3 and 7 days, 2 and 4 weeks, and 5 months periods and observing the change of blood vessel in a histologic, immunohistochemical, and scanning electronic microscopic approach, the results were as follows :

1. Vascular inner diameters of the experimental 1 and 3 days groups were measured $476.3 \pm 28.20 \mu\text{m}$, $497.15 \pm 48.79 \mu\text{m}$ respectively showing statistically meaningful vasodilation ($P < 0.05$), which continued by the experiment 4 weeks group. However, in the experimental 5 months group, the vascular inner diameter appeared similar to the control groups. Even though the thickness of smooth muscular layers come out to be thinner in all the experimental groups compared to the control group, it was difficult to find any statistical meaningfulness. In addition, the vascular external diameters of every experimental groups were shown to be longer than the control group.
2. In light microscopic view, severe injury was evident on the smooth muscular layer cell from the experimental 1 day group, started recovering partially from the experimental 7 days group, and was mostly restored in the experimental 4 weeks group and layer of adventitial stripping were nearly recovered 2 weeks group.
3. The PCNA positive cells of smooth muscular layer were observed from the experimental 7 days group and had a tendency to increase by the experimental 2 weeks group. In the experimental 4 weeks and 5 months group, the number of PCNA positive cells observed was comparable to the control group.
4. α -SMA level of smooth muscular layer cells, having been significantly lower than the control group in the severely damaged experimental 1 day group. It was seen to be increased in the experimental 7 days group and turned out to show similar α -SMA level in 4 weeks to the control group.
5. In the view of SEM, the endothelial cells were destructed and falling off, and also present the appearance of flattening in the experiment 1 day group. The endothelial layer cells started partially recovering from the 7 days group after the freezing injury. On 4 weeks and 5 months, the endothelial cells were fully covered the damaged area, also it's appearance is similar to control group.

In conclusion, the vascular freezing after the removal of adventitia caused damages to smooth muscular layer cells, and brought about vasodilation, which continued by the 4th week. The smooth muscular layer cells started partially reviving from the 7rd day after the damage by vascular freezing, and recovered their similar figure to the control group's 4 weeks later. This was considered the result of cells which surround the damaged blood vessel being influxed into the smooth muscular layers. Therefore, this local freezing injury on the blood vessel was thought to be applied clinically to relieve severe vasospasm which cannot be treated by vasodilation drug, a microvascular surgery.

I. 서 론

김 태 득

330 - 715, 충청남도 천안시 안서동 산 29

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Tae-Deug Kim

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University.

#29, Anseo - Dong, Cheonan - City, Chungnam. 330 - 715, Korea

Tel: (0417) 550-1991, 1993 FAX: (0417) 551-8988

혈관경축(vasospasm)은 재건 영역에 있어서 혈류의 감소로 인해 이전된 조직을 상실하게 하는 주 원인으로 작용하며, 주로 동맥에서 호발되나 정맥에서도 발생되어 미세수술의 실패를 야기한다¹⁻³⁾.

혈관경축 현상은 Hunter⁹⁾에 의해 처음으로 기술된 이래 미세수술의 발달과 함께 최근에서야 많은 연구가 시행되고 있다⁶⁾. 혈관경축의 기전에 대해서는 정확히 밝혀지지는 않았으나 허혈(ischemia)^{7,9)}, 산증¹⁰⁾, 저혈량 등¹¹⁾에 의해 기인한다는 연구들이 보고되고 있으며, Seaber¹²⁾는 미세수술시 부주의한 시술로 인한 과도한 동맥벽의 신장 및 미세혈관 겹차사용, 혈관의 내막세포 손상, 신경계의 작용, 누출된 혈액, 온도 및 혈류량의 변화에 의해 발생한다고 기술하고 있다.

혈관경축을 해소하기 위한 방법으로는 국소적 또는 전신적으로 다양한 약물요법¹³⁻¹⁸⁾ 및 신경계 작용 차단을 위한 외과적 처치 등^{19,21)}에 의한 연구가 시행된 바 있으나 저조한 효과 또는 부작용을 초래하는 등 현재까지 혈관경축의 예방과 치료에 대한 이상적 방법은 확립되어 있지 않고 있다. 그러나 최근 Bertelli와 Mira²²⁾는 아산화질소(N₂O) 냉매제를 이용한 혈관동결을 시행하여 혈관확장을 관찰하고 이를 새로운 혈관경축의 해소법으로 제시한 바 있으며, Cavadas^{23,24)}도 에틸 클로라이드 냉매제를 이용하여 백서의 동맥 및 정맥의 동결시 혈관확장 현상이 나타남을 보고하고 있다.

냉매제를 이용한 동결수술은 양성종양이나 악성종물의 파괴를 목적으로 구강내에서는 Gage 등²⁵⁾이 처음으로 임상에서 시행한 이래, Emmings 등²⁶⁾은 악골내 종양을, Weaver 등²⁷⁾은 구강내 및 피부암종을, Al-Drouby²⁸⁾는 구강내 백반증을, McIntosh 등²⁹⁾은 기저세포암종을, Hartmann 등³⁰⁾은 혈관종을, Li³¹⁾는 설암을, Pogrel³²⁾ 그리고 Salmassy 등³³⁾은 법랑아세포종 등에서 이를 적용하여 좋은 결과를 얻었다고 보고하고 있으며 여러 외과분야에서 임상적으로 종물의 치료에 널리 사용되고 있다³⁴⁻³⁸⁾.

동결수술에 의한 조직파괴는 세포내부와 세포외부에 형성되는 얼음결정체에 의한 직접적인 세포손상과, 얼음결정이 녹을 때 발생하는 삼투압 및 전해질 장애현상이 복합되어서 발생되며 또한 급속동결 및 반복된 동결은 세포외부 뿐만 아니라 세포내부에 더욱 큰 얼음결정체를 형성하여 조직파괴 효과가 크게 나타난다^{39,40)}. 이렇듯 동결수술은 주로 조직파괴를 위한 목적으로 많은 연구가 시행된 바 있으나, 혈관경축의 새로운 해소법으로 Bertelli와 Mira²²⁾는 혈관동결법을 제시하고, Cavadas^{23,24)}도 이를 실험적 연구를 통해 확인한 바 있다.

혈관의 동결시 초기 반응으로는 내피세포의 손상과 부종을 보이며 며칠 후에는 혈관들의 전색을 초래하여 결국 세포들의 허혈 및 파괴로 인해 조직의 괴사현상이 나타나는 것으로 보고되고 있다⁴¹⁾. 그러나 Bertelli와 Mira²²⁾는 백서를 이용한 연구에서 동결 후 거의 모든 내피 및 중막세포들과 아드레날린성 신경섬유들이 파괴되었음에도 불구하고 혈관내 혈전, 내피세포들의 과증식 및 동맥류성 혈관확장(aneurysmic dilatation)과 같은 현상의 발현없이 혈관의 세포들이 재생됨과 함께 혈관의 확장을 관찰하여 보고하고 있다.

이와같은 상이한 결과에도 불구하고 혈관동결에 의한 혈관경축 해소가 해소된다면 Raynaud's 증후군과 같은 혈관성질환 및 미세조직 이천시 발생하는 혈전의 예방에 좋은 치료법으로 제시될 수 있을 것으로 사료되며, 혈관종과 같은 맥관성 종물의 동결

수술시 인접부의 신생혈관 증식과 함께 빈번한 재발의 경험에 비쳐 동결 후 혈관재생에 관한 연구는 맥관종과 같은 질환의 치료 및 재발을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다.

본 연구는 혈관종을 비롯한 구강종물의 치료시 광범위하게 사용되는 동결수술법이 혈관경축 현상의 해소법으로 제시되고 있어 이를 임상적으로 미세혈관수술에 응용하고자 백서의 대퇴동맥 외막층 제거 후 액화탄산가스(CO₂) 냉매제를 이용한 혈관동결 손상을 유도한 후 시간경과에 따른 혈관 직경의 형태학적 변화, 조직학적 및 α-SMA(α-Smooth Muscle Actin), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)항체를 이용하여 대퇴동맥 조직의 재생 변화를 면역조직화학적으로 관찰하고 혈관 내면의 변화를 주사전자현미경으로 관찰하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

체중 250g 내외의 웅성백서(Sprague Dawley) 48마리를 사용하였으며 물과 인공사료로 사육하였다.

2. 연구방법

1) 동물실험

동물을 xylazine(Rompun, 한국바이엘)과 케타민(Ketalar, 유한양행) 혼합액으로 마취하였다(Rompun 0.2ml + Ketalar 0.8ml, 용량 0.1ml/100g, 복강내 주사). 우측 서혜인대 부위의 피부를 종결개하고 상복부 지방층의 혈관을 확인 후 대퇴혈관속(bundle)을 노출시킨 다음 미세현미경(Zeiss, Germany)하에 미세혈관 수술기구를 이용하여 주위 대퇴신경 및 대퇴정맥을 이단하여 대퇴동맥을 분리하였다. 그 후 상복부 혈관 분지 부위와 약 1cm 떨어진 부위에 미세혈관검자를 이용하여 대퇴동맥의 혈류 정체를 시킨 후 혈관의 외막층을 제거한 후 CM-73 system(Frigitronic, USA)의 663 동결봉에 액화탄산가스(CO₂) 냉매제를 이용하여 혈관에 압력이 가해지지 않도록 한 다음 혈관을 1분 간 동결시켰다. 대조군으로 좌측 대퇴혈관도 동일한 방법으로 노출시키고 미세혈관 검자로 혈류정체를 유도한 후 동결봉을 적용하였지만 동결시키지는 않았다. 수술이 끝난 다음 창상을 층별로 봉합하였으며, 술 후 항생제는 사용하지 않았다.

2) 혈관의 조직형태계측 관찰

OPTIMAS (Midia Cybergenetics, Silver Spring, MD, USA)의 software program을 이용하여 100배 하에서 내강직경(Internal diameter : ID, μm), 혈관벽두께(Wall thickness : WT, μm) 및 외강직경(Outer diameter : OD, μm)을 각각 측정하였으며 한 혈관당 내강과 외강은 4곳, 혈관벽두께는 8곳에서 측정하였고, 각 군당 20개 이상의 표본에서 이들의 평균값과 표준편차를 산출하였다. 이들 실험군 간의 통계적 검정은 ANOVA Test로 시행하였다.

Table 1. Summary of the Experimental Procedure Schedule for Sacrifice

Day Group	Sacrifice					
	1D	3Ds	7Ds	2Ws	4Ws	5Ms
Con. (Lt)	8	8	8	8	8	8
Exp	LM	6	6	6	6	6
	SEM	2	2	2	2	2
(Rt)	T	8	8	8	8	8

Abb. Con : Control Exp : Experimental T : Total
 Lt : Left Rt : Right LM : Light Microscope
 SEM : Scanning Electron Microscope
 D : Day W : Week M : Month

3) 광학 현미경적 관찰

술후 1일, 3일, 7일, 2주, 4주, 5개월 쯤 각기 동물을 6마리씩 희생시키고, 좌우측 대퇴혈관을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하여 통법으로 파라핀포매를 시행하였다. 포매 후 4 μ m 두께로 절편을 만들어 Hemtoxylin & Eosin(H&E), Masson's trichrome(MT), Orcein 염색을 시행하여 조직학적 관찰을 시행하였다(Table 1).

4) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 염색은 파라핀 절편을 탈파라핀 및 재수화시키고 PCNA, α -SMA 항원에 대한 제 1항체를 이용하여 LSAB-(Labelled Streptavidin-Biotin) 방법으로 시행하였다(Table 2). 통법에 따라서 합수시킨 절편을 내분비성 peroxidase의 활성을 막기

Table 3. Immunohistochemical Staining Procedure

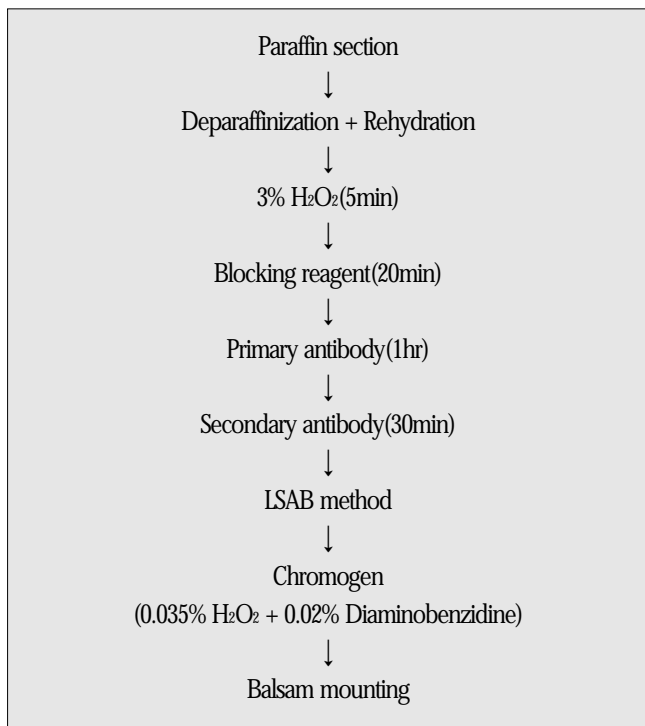


Table 2. Antibodies Used in This Study

Antibody	Immunogen	M/W	Dilution	Manufacture
PCNA	PC10	34KD	1:200	Dako
α -SMA	LA4	42KD	1:100	Dako

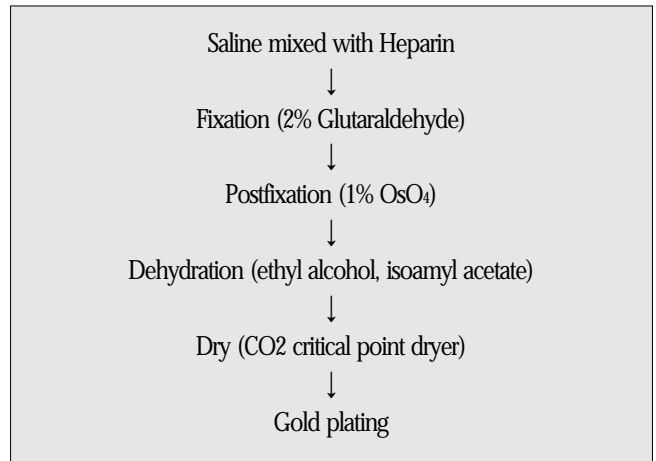
위해 3% 과산화수소로 5분 간 처리한 다음 10mM Antibody인산 완충식염수로 수세하였다. 비특이적 항체결합을 방지하기 위하여 차단항체(10% 정상 혈청)로 20분 간 처리한 다음 제 1항체를 23°C에서 1시간 동안 부란시키고, 인산완충식염수로 수세한 다음 제 2항체인 biotinylated IgG 항체로 30분간 처리하고 다시 인산완충식염수로 수세하여 LSAB방법으로 처리하였다. 0.035% 과산화수소를 함유한 0.02% DAB(Diaminobenzidine)로 발색하였고 발색에 봉입한 다음 광학현미경으로 대퇴동맥 조직의 재생 변화를 관찰하였으며, PCNA 표지지수는 전체 세포핵 300개중 양성반응 세포수를 세어 산출하였고 α -SMA 양성 정도는 OPTIMAS software program 으로 계산하였다(Table 3).

5) 주사전자현미경적 관찰

술 후 혈관내면의 변화를 관찰하기 위하여 1일, 3일, 7일, 2주, 4주, 5개월 쯤 동물을 각 2마리씩 마취하고, 대동맥에 카놀라를 삽관하여 혈관확장제인 1% 리도카인 1cc를 주입하고 우심방을 절개한 다음 대동맥 카놀라를 통해 헤파린 식염수(50 IU/ml 37°C)로 우심방으로 부터 더이상의 혈액이 환류되지 않을 때까지 혈액을 씻어냈다. 대퇴동맥을 약 12mm 길이로 채취 하고 혈관 내강을 다시 헤파린 식염수로 세척한 후 혈관 중축을 따라 절개하였다.

주사전자현미경적 관찰을 위해 혈관이 중첩되지 않도록 잘 편 후 흡착기에 부착하여 2% 글루타르알데하이드 용액에 고정하였다. Half Karnovsky 용액에 2시간 동안 전고정하고 0.1M 인산 완충식염수에 30분간 세척하였다. 이후 2% osmic acid에 1시간 동안 후고정한 다음 에탄올의 농도를 상승시켜 가며 탈수했다. Isoamyle acetate에 담갔다가 이산화탄소를 사용한 임계점 건조기

Table 4. Procedure for SEM Examination



로 건조시키고 gold를 증착하여 주사전자현미경(JSM-5410 LV, JEOL Co.)으로 관찰하였다(Table 4).

III. 연구 결과

1. 광학 현미경적 소견

가) 대조군

실험 전기간 동안 혈관의 내막, 중막의 구조는 정상적인 소견이었으며 외막층이 제거되지 않은 부위와 비교시 조직학적 변화 양상은 구분할 수 없었다. 술후 1일째 평활근층의 핵은 외상에 의해 불규칙한 양상을 보였으며, 외막층은 일부 제거된 양상이 관찰되었으나 2주째 이후에는 외막층이 재생된 소견을 보였다(Fig.1 - 3).

나) 실험군

1일째 H&E 소견에서는 심하게 확장된 내강 및 평활근층의 손상과 잔존된 외막 주위에 염증세포의 침윤을 볼 수 있었으며, MT 소견에서는 내강의 확장과 함께 중막층의 심한 손상이 관찰되었고, Orcein 소견에서도 내강의 확장과 탄력섬유들이 불규칙한 배열과 외막층이 제거된 양상을 볼 수 있었다(Fig. 7 - 9).

3일째 소견은 1일 제와 거의 유사한 양상을 나타냈다.

7일째 H&E 소견에서는 지속된 내강의 확장 현상과 평활근층의 두께가 감소된 양상으로 이 부위의 세포 형태는 알 수 없었으며, MT 소견에서는 평활근층의 적색 염색 양상으로 보아 1, 3일 제에 비해 어느정도 회복된 소견을 나타냈으며, Orcein 소견에서는 불규칙한 탄력섬유들이 관찰되었다(Fig. 13 - 15).

2주째 H&E 소견에서는 지속적인 혈관확장 현상을 볼 수 있었으며, 평활근층 세포들의 핵이 어느정도 관찰되어 회복되는 양

상을 나타냈으며, MT 소견에서는 붉은 염색상이 평활근층에 어느정도 나타났으나 이는 7일째에 비해 감소된 양상으로 회복이 진행된 양상을 띄었고 외막층의 형태는 대조군과 유사했다. Orcein 소견에서는 비교적 규칙적인 탄력 섬유 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 19 - 21).

4주째 H&E 소견에서는 평활근층에서 다수의 세포핵이 관찰되었으며, 외막 주위에서 거의 미약한 염증세포들이 남아있었다. MT 소견에서는 방추형의 평활근 세포가 관찰되었으며, Orcein 염색에서는 탄력섬유의 배열이 비교적 규칙적인 양상을 나타냈다(Fig. 25 - 27).

5개월째 H&E, MT, Orcein 소견에서는 대조군에 비해 내막의 과 증식을 보였으나, 중막 및 외막은 대조군과 거의 유사한 정상 소견을 보였다(Fig. 31 - 33).

2. 조직형태계측 관찰

실험 1일, 3일째의 혈관 내강의 직경은 각각 $476.3 \pm 28.20 \mu\text{m}$, $497.15 \pm 48.79 \mu\text{m}$ 로, 대조군 $230.65 \pm 47.39 \mu\text{m}$, $227.65 \pm 29.02 \mu\text{m}$ 에 비하여 통계적으로 유의성 있는 ($P < 0.05$) 확장을 보였다. 이러한 혈관 확장은 실험 4주째까지 지속되는 소견을 보였으나 실험 5개월째에서는 대조군과 유사한 혈관 내경을 보였다.

평활근층의 두께는 5개월째를 제외한 실험군에서 대조군에 비하여 얇아졌으나 통계적 유의성은 없었다. 또한 혈관 외경도 모든 실험군에서 대조군에 비하여 넓은 소견을 보였다(Table 5).

3. 면역조직화학적 소견

대조군 PCNA 소견은 음성반응을 보였으며 α -SMA 소견은 평활근층의 강한 양성반응을 나타냈다(Fig. 4, 5 및 Table 6, 7).

실험군 1일째 PCNA 소견에서는 핵의 관찰을 볼 수 없었으며 음성반응을 나타냈고, α -SMA 소견은 평활근 세포의 윤곽을 알기 어려운 양상으로 염색표출은 관찰할 수 없었으며, 3일째 소견은 실험 1일째 소견과 유사하게 나타났다(Fig. 10, 11 및 Table 6, 7).

7일 제 PCNA 소견에서 미약한 양성세포를 평활근층에서 발견할 수 있었으며, α -SMA 소견에서도 평활근층의 양성반응이 3일 제에 비해 조금 더 증가된 양상을 보였는데 이는 외막층 가까운 부위에서 표출되었다(Fig. 16, 17 및 Table 6, 7).

Table 5. Histomorphometric Features of Femoral Artery.

Group	Day	Day					
		1D	3Ds	7Ds	2Ws	4Ws	5Ms
ID	Con.	230.65±47.39	277.65±29.02	268.32±61.66	280.5±30.10	251.6±21.34	314.6±29.80
	Exp.	*476.3±28.20	*497.1±48.79	499.8±73.79	451.3±55.45	357.27±23.35	308.5±26.54
WT	Con.	48.5±11.20	52.8±8.46	67.1±8.45	59.2±4.45	58.2±2.01	92.4±13.24
	Exp.	36.3±5.10	37.7±1.92	32.9±8.41	47.1±6.15	48.2±4.36	71.7±12.13
OD	Con.	545.9±56.76	559.6±14.84	560.3±59.47	487.1±37.36	534.2±23.45	730.0±94.64
	Exp.	723.3±30.49	447.95±5.46	694.9±36.55	720.3±81.38	583.2±34.23	626.8±65.651

Abb. Con : Control Exp : Experimental
 ID : Internal diameter (μm) WT : s (μm) OD : Outer diameter (μm)
 D : Day W : Week M : Month $P < 0.0$

Table 6. Distribution of Degree of PCNA Stainability

Group	Day	Day					
		1D	3Ds	7Ds	2Ws	4Ws	5Ms
Con. SMW		-	-	-	-	-	-
Exp. SMW		-	-	12.3±4.76	38.4±6.47	9.4±6.37	-

Con : Control Exp : Experimental

SMW : Smooth muscle wall

(-) : Negative reaction

D : Day W : Week M : Month

Table 7. Distribution of Degree of α -SMA Stainability

Group	Day	Degree of α -SMA Stainability					
		1D	3Ds	7Ds	2Ws	4Ws	5Ms
Con. SMW		100	100	100	100	110	100
Exp. SMW		12.4±	8.5±	20.3±	68.3±	89.2±	94.5±
		6.46	3.57	4.76	5.36	10.24	8.57

Con : Control Exp : Experimental

SMW : Smooth muscle wall

D : Day W : Week M : Month

2주째 PCNA 소견은 평활근층에서 7일째에 비해 강한 양성반응을 보였으며, α -SMA 양성반응은 외막층 근접부위 뿐 아니라 평활근층 내부에서도 양성반응이 발현된 양상이었다(Fig. 22, 23 및 Table 6, 7).

4주째 PCNA 양성반응은 2주 째에 비해 감소된 양상을 나타내 평활근층의 회복소견을 알 수 있었으며, α -SMA의 양성반응이 뚜렷하게 나타났다(Fig. 28, 및 Table 6, 7).

5개월째 PCNA 소견은 음성반응을, α -SMA에서는 강양성반응이 평활근층에서 관찰되었다(Fig. 34, 35 및 Table 6, 7).

4. 주사 전자현미경적 소견

대조군은 정상 내막층 형태인 주름 모양이 관찰되었으며, 부분적으로 피브린 침착을 볼 수 있었다(Fig. 6).

실험군 1일째 소견은 내피세포의 심한 손상으로 인해 자갈밭과 같은 형상이 관찰되었으며(Fig. 12), 7일째 소견에서는 어느정도 내피세포의 형태가 관찰 됨으로써 1일째에 비해 비교적 회복된 양상을 보였다(Fig. 18). 2주 째 소견은 1주째에 비해 더욱 명확한 내피세포의 형태를 알 수 있었으며(Fig. 24), 4주째에서는 내피세포가 완전히 피개되어 내막층의 주름형태를 나타내 내피세포의 손상이 거의 회복된 양상을 보였으며(Fig. 30), 5개월째는 정상 소견에 가까운 세포 형태를 나타냈다(Fig. 36).

IV. 총괄 및 고찰

혈관벽의 구조는 내막, 중막 및 외막의 3층으로 구성되어 있어 가장 안쪽에 위치하는 내막은 내피세포층과 내피밑층으로 구성되며 내피 밑층은 결합조직 및 탄력섬유, 섬유모세포 등으로 이루어져 있다. 중막은 주로 평활근섬유로 이루고 그 사이에 탄력섬유로 섞여 있으며 외막은 주로 결합 조직섬유로 구성되며 맥관벽 혈관(Vasa Vasorum)을 함유한다.

외막의 제거시 이에 대한 반응으로는 혈관 자체에 영양을 공급하는 맥관벽 혈관 손상에 의해 Barker 등⁴²⁾은 내막의 과증식 및 동맥경화의 발생에 대해, Odashiro 등⁴³⁾은 내피세포의 기능 손상에 대해, Margic⁴⁴⁾은 내피세포층의 파괴와 단열현상이 일어남을, Urbaniak 등⁴⁵⁾은 혈관벽의 괴사됨을 보고하였다. 이에 어떤 학자

들은 미세혈관 문합시 외막층의 제거없이 적절한 외과적 수기를 행한다면 성공적인 결과를 얻을 수 있다고 보고하였다⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

그러나 대부분의 학자들은 위와같은 결과에도 불구하고 미세혈관 문합시 외막층 조직은 혈관 내막내로 함입되어 혈류의 장애와 혈전의 형성을 초래하므로 이를 방지하기 위해 외막층의 제거를 추천하고 있으며 임상적으로는 문합 예정부위 양쪽으로 약 2-3mm내 외막층을 제거하고 있다. Lohman 등⁴⁹⁾은 외막층의 제거시 무딘(blunt) 및 날카로운(sharp) 이단술을 적용한 결과 무딘 경우에는 문합 원위부위의 혈관경축을 야기하며 혈관 관류의 감소를 초래하고, 조직학적으로는 내피세포의 부종 및 이개현상을 나타냈으나, 날카롭게 제거한 경우는 혈관 관류의 변화 및 내막층의 어떤 변화도 없었다고 밝히고 있다. Kemler 등⁵⁰⁾도 미세현미경하에서 외막층을 제거한 결과 날카로운 이단술에서도 외막층이 그대로 남아 있음을 보고 문합시 혈관의 절단면 가까운 부위만이 깨끗하게 외막층이 제거될 수 있고, 또한 무딘 이단술은 혈관에 외상을 줌으로써 다른 부위의 혈관세포들의 손상을 초래함으로써 외막층 제거시 날카로운 이단술이 필요하다고 보고 하였다.

미세혈관 수술시는 혈관 문합 부위의 3mm 이내 외막층을 제거하고 있으나, 본 실험에서는 혈관은 절단 하지않고 약 6mm의 외막층을 미세현미경하에서 미세수술 가위와 조직겸자를 사용하여 날카로운 이단술로 제거하여, 동결 손상군을 실험군으로, 혈관동결을 시행하지 않은 군은 대조군으로 설정하였다. 또한, 대조군내에서 외막층이 제거된 부위와 외막층이 제거되지 않은 부위의 조직 손상의 비교를 관찰하였으나 본 연구에서는 이 두 군내 부위의 상호 조직학적 변화 양상의 차이점은 발견하기 어려웠다. 이러한 양상은 Lohman 등⁴⁹⁾, Kemler 등⁵⁰⁾의 결과와 일치한다고도 생각되지만, 이들의 결과와 상호 비교를 위해서는 실험설계를 변형한 연구가 필요하다고 생각된다. 그러나 Kemler 등⁵⁰⁾이 밝힌 것 처럼 본 연구에서도 외막층의 제거 후에도 거의 모든 외막층이 남아 있음을 현미경적 관찰을 통해 발견할 수 있었다.

혈관경축은 미세혈관 수술시 흔히 발견될 수 있다. 혈관경축의 발생시는 혈류의 저류현상에 의한 혈전 형성을 야기하여 미세수술에 의한 이전된 조직의 괴사를 야기하게 된다. 이의 원인으로서는 다양한 연구에 의해 제시되고 있지만 정확한 기전은 밝혀지고 있지 않다. 특히 미세혈관 수술시 발생하는 혈관경축의 원인으로서는 과도한 혈관벽의 신장 및 미세혈관경자 등과 같은 외상에 의한 혈관근육의 수축반응, 강력한 혈관확장제를 분비하는 내피세포의 손상시, 혈관수축을 시키는 신경계의 작용, 혈액에 의한 혈관수축 등으로 밝혀지고 있다.

혈관경축을 야기하는 물질로는 Endothelin-1, Thromboxane A2 와 Norepinephrine을 들 수 있다. Endothelin-1은 혈관의 평활근에서 분비되며, Thromboxane A2는 혈관손상시 응집되는 혈소판으로부터, Norepinephrine은 교감신경에서 유리된다^{44,51,52)}. 이들의 기전은 혈관평활근 세포질내로 칼슘이온 농도를 증가시키는 수용기에 작용하여 혈관수축을 촉진시키는 것으로 나타난다^{53,54)}. Kim 등⁵⁵⁾은 이들 중 Endothelin-1의 혈관수축작용 효과가 가장 큰 것으

로 보고했다.

혈관경축의 예방 및 해소를 위한 치료목적의 연구는 여러 종류의 혈관확장제를 이용하여 국소적 및 전신적 투여 또는 유리피판의 동맥내 직접 주사등 다양하게 시행되어 왔다. Kim 등⁵⁶⁾은 칼슘 길항제인 Nicardipine을 전신적투여 및 피판의 동맥내 주사시 가장 강력한 혈관확장이 나타났으며 현재 미세수술시 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 리도케인의 국소적 투여는 가장 저조한 혈관확장이 나타남을 보고한 바 있으며, Jembeck 등⁵⁷⁾도 리도케인은 농도차에 따라서는 혈관수축도 야기시킬 수 있다고 보고하였다. 그러나 칼슘 길항제의 전신적 및 피판 동맥내 주사는 혈관확장 현상외에 피부 및 근육내 칼슘의 과농도 침착이 발생하여 세포들의 허혈성 괴사를 초래하며 또한 전신적 저혈압을 유발하여 결국 조직의 관류가 감소하여 허혈성 손상을 나타내는 부작용을 지니고 있다^{15,58)}.

혈관경축 해소법으로 또 다른 연구는 신경계 작용에 대한 것으로서 혈관의 외막층은 교감 신경섬유들이 무수히 산재하므로 혈관경축은 이들 신경계 작용에 기인한다고 생각하여, Phelps 등^{19,20)} 및 Bird 등²¹⁾은 교감신경 차단제 주사를 통해 그리고 Flatt⁵⁹⁾ 및 Wilgis⁶⁰⁾는 혈관의외막층을 제거하는 교감신경 절제술을 시행함으로써 혈관경축의 해소를 이루었다. 그러나 Wadstrom 등⁶¹⁾은 혈관경축 현상은 신경계 작용에 의해 조절되는 것이 아니고 단지 혈관평활근의 국소적 현상에 의한 것으로 밝혔으나 반면에 Yee 등⁶²⁾은 손가락 부위에 발생한 심한 혈관경축을 혈관 외막층을 제거함으로써 교감신경 지배의 차단과, 혈관의 감압(decompression) 효과로 인해 혈관경축이 해소되었음을 보고한 바 있다.

이와같이 혈관경축 현상에 대한 기전 또한 아직 밝혀지고 있지 않았으며, 현재까지 혈관경축의 예방 및 이를 해소하기 위한 치료약물 또는 방법이 확립되어 있는 상태는 아니다. 그러나 Bertelli와 Mira²⁹⁾는 혈관경축을 해소하기 위한 새로운 방법으로 냉매제를 이용한 혈관동결을 제시하였다. 동결수술은 주로 양성종양, 전암병소 및 악성종양의 병소부위를 파괴하기 위한 목적으로 단독 또는 수술과 병용해 사용하는 외과적 술식의 한 방법으로 임상적으로 여러 외과분야에서 널리 사용되고 있다. 동결수술시 이용되는 냉매제의 온도는 -20~-190°C로 그 종류에 따라 프레온 가스(-29.8°C)는 피부마취시 및 피부박피술시 이용되며, 탄산가스(-78.5°C)는 피부의 반흔 또는 여드름 치료시, 아산화질소(-89.5°C)는 피부과, 안과 및 부인과 영역의 양성종양에, 액화질소(-196°C)는 주로 침윤성이 강한 양성종양, 전구암중, 악성종양에 사용되고 있다⁶³⁾. 동결수술의 장점으로는 시술이 간단하고 비교적 동통 및 반흔이 적게 발생하고 출혈이 없는 것이나 술 후 예상치 못한 심한 부종의 발생과 심부 조직의 정확한 파괴정도를 알기 어려운 단점도 있다³⁰⁾.

동결법으로 가장 간단한 것은 절연 손잡이로 탈지면을 냉매에 적시어 병소에 바르는 방법이 있으나 이는 병소의 크기 및 특성에 따라 수차례 반복해야 하는 번거로움과 온도나 압력 차이가 발생할 수 있어 치료기준 설정이 어려운 단점도 있다. 그러나 Cooper와 Lee⁶⁴⁾에 의해 동결기구의 조절장치가 개발됨에 따라 임상적 적용이 용이하게 되었다. 임상적으로 사용되는 동결수술기

구 형태는 분사식 또는 동결봉으로 대별된다. 분사식 방법은 동결 효과가 심부 조직까지 크게 나타나는 장점이 있으나 작은 병소나 안구, 구강내, 질부위 병소에 적용시는 주위 인접 정상 조직까지 손상을 줄 수 있는 단점이 있다. 동결봉은 분사식 기구의 사용 제한이 될 수 있는 위와같은 부위에 적용할 수 있으며, 적용시 압력이 요구되는 혈관종의 치료 시에 널리 사용되고 있다⁶⁵⁾. 본 실험에서는 탄산가스를 냉매제로 이용하여 CM-73 system 663 동결봉을 사용하여 1분간 혈관동결을 유도하였다.

Bertelli와 Mira²⁹⁾는 백서의 상복부 동맥에 아산화질소 냉매제를 이용하여 혈관동결을 유도하여 동결의 해빙 후 즉시, 그리고 시간 경과에 따라 120일째까지도 혈관확장을 관찰하고 이를 새로운 혈관경축 해소법으로 제시하고 있다. Cavadas^{23,24)} 에틸클로라이드 냉매제를 이용하여 동맥 및 정맥의 혈관확장 현상을 보고한 바 있으며 또한 심한 경축 현상을 나타낸 유리비골 피판에 혈관동결을 유도하여 성공적인 임상 증례를 처음으로 발표했다. 본 실험에서는 Optimas 소프트웨어 프로그램을 이용하여 혈관의 내강, 평활근층 및 외경의 조직형태학적 계측변화를 검사한 결과 실험 1일, 3일째에서 통계학적 유의성 있는 확장 현상을 보였으며 유의성은 없으나 4주째까지 지속되는 혈관 확장을 보였고, 5개월째에서는 대조군과 거의 같은 양상을 보였다. 평활근층의 두께변화는 통계학적 유의성은 없었으나 감소된 양상을 나타냈으며, 외경의 변화는 개체의 변이성으로 추측되는 결과와 함께 통계학적 유의성은 없었지만 확장된 양상을 보였다.

혈관동결에 의한 조직 손상의 재생에 관한 연구에서 Cancilla 등⁶⁶⁾은 백서의 뇌혈관을 동결처리 후 3일 제부터 내피세포의 재생이 시작되어 15일째 정상적인 혈관형태로 회복된 양상을 관찰하고 내피세포의 분화 및 이주는 기저막으로부터 기인된다고 하였으며, Whittaker⁶⁷⁾는 백서의 협부 연조직에 동결 후 협부 미세혈관을 관찰한 결과 동결의 해빙 후 협부 미세혈관의 혈류 증가 현상이 1시간까지 관찰되었으나 그 후 혈전 형성으로 인한 혈류의 감소와 5시간 후에는 혈류가 정지됨을 보고하였다. 그러나 Bertelli와 Mira²⁹⁾는 혈관동결 후 거의 모든 내막과, 중막 세포들의 파괴와 교감신경 섬유들의 변성이 관찰되었지만, 중막의 두께와 형태는 거의 정상으로 유지된 상태였으며, 또한 외막층의 맥관벽 혈관들의 기능도 정상이었으며 모든 실험군에서 혈전, 내막의 과증식, 동맥류성 혈관확장(aneurysmic dilatation)현상은 없었고, 동결 120일 제에는 내막세포, 외막층의 교감신경 섬유들은 완전한 재생과, 중막세포들은 부분적 배열 이상을 보였지만 거의 정상에 가까운 소견을 나타냈다고 보고하였다. Cadavas^{23,24)}도 백서의 대퇴 동맥과 정맥의 동결처리 후 내막 및 중막세포들의 파괴 현상을 관찰하였으나 시간경과에 따라 30일째는 내막 및 외막층은 정상적으로 회복된 소견이었으며, 중막세포들도 약간의 배열 이상을 보였으나 거의 정상에 가까운 양상이었으며, 전 실험군에서 혈전형성은 없었음을 보고하였으며, Kang 등⁶⁷⁾도 백서 대퇴동맥 동결 후 내막세포 및 외막층 세포들은 20일째, 중막 세포들은 30일째 거의 회복된 양상이었음을 보고했다. 본 실험에서도 동결 후 시간 경과에 따라 손상된 혈관조직들의 재생을 관찰하였으며 특히 중막층의 세포재생은 7일째 부분적으로 시

작되어 4주째는 거의 정상소견과 유사했으며 5개월째에서는 평활근 세포들의 규칙적이며 성숙한 방추형상을 보여 완전 회복되었음을 알 수 있었다. 또한 전 실험군을 통해 혈전형성 및 동맥류성 혈관확장 현상은 발견되지 않았다. 그러나 중막층의 두께는 대조군에 비해 얇아진 양상을 보여 Bertelli 등²⁰⁾의 소견과는 약간 상이하였다.

혈관의 동결유도시 혈관확장 기전에 대해서는 정확히 밝혀지고 있지 않으나, Bertelli 등²⁰⁾ 및 Cavadas^{23,24)}는 동결에 의한 중막층 세포들의 손상으로 이 부위의 세포들이 이주(depopulation)하기 때문이라고 보고하였으며 그 후 시간 경과에 따라 점차 손상된 중막층 세포들이 유입(repopulation)되어 재생되거나 동결손상 후 중막층 두께 변화는 없었던 것으로 나타났다. 본 실험에서도 혈관 동결 후 중막층 세포들의 손상 양상이 시간 경과에 따라 재생되는 과정을 관찰하였으나, 중막층의 두께는 감소된 양상을 나타내 이는 Bertelli 등²⁰⁾의 결과와는 상이했다. Blinzinger 등⁶⁸⁾ 및 Baker 등⁶⁹⁾은 연조직 동결수술시 세포들이 파괴되고 괴사되거나 세포의 기저막 형태는 변화되지 않으며 이는 주위 정상조직들이 이주 및 분화될 수 있는 기질로 작용한다 하였으며, Kang 등⁷⁰⁾도 혈관동결 후 손상된 내피세포들의 재생은 인접 정상 내막세포 기저막 부위로부터 재생되었음을 보고한 바 있다. 또한 경조직의 동결수술시는 모든 골세포들은 파괴되어 무기질 골체만 남게 되나 이는 인접한 정상골로부터 신생골이 형성될 수 있는 기질로 작용하게 된다⁷⁰⁾.

이상의 문헌고찰 및 실험을 통해 혈관동결에 의한 혈관확장 현상은 중막층의 세포손상에 기인되는 것으로 생각되며 중막층 세포손상으로 인해 이 부위 세포들의 탄력 기능은 감소되어 본 실험 결과에서와 같이 중막층 두께의 감소 현상을 나타내리라 생각된다. 중막층 세포들은 시간 경과에 따라 재생되며, 이들은 주위 외막층에 가까운 부위부터 재생되었는데 이는 외막층내 맥관벽 혈관들의 재생에 의해 기인되는 것으로 추측되었으며, 혈관동결은 혈관확장을 초래하는 것으로 생각된다. 이에 일반적 약물로 해소할 수 없는, 또는 심한 혈관손상에 의해 야기된 혈관경축시 이를 해소하기 위한 방법으로 혈관동결은 임상적으로 사용될 수 있으리라 생각되나 추후 미세수술에 응용하기 위해서는 좀 더 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 미세수술시 시행하는 혈관외막의 제거술 및 미세혈관 검자 사용하에 탄산가스 냉매제를 이용하여 백서의 대퇴동맥을 동결처리하고 1일, 3일, 7일, 2주, 4주, 5개월에 각각 희생하여 시간경과에 따른 혈관확장 현상에 대한 조직형태학적 계측과, 혈관의 변화를 조직학적, 면역조직화학적 및 주사전자현미경적으로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험 1, 3일째의 혈관 내경은 각각 $476.3 \pm 28.20 \mu\text{m}$, $497.15 \pm 48.79 \mu\text{m}$ 로, 대조군 $230.65 \pm 47.39 \mu\text{m}$, $227.65 \pm 29.02 \mu\text{m}$ 에 비하여 통계적으로 유의성 있는 ($P < 0.05$) 확장을 보였다. 이러한 혈관확장은 실험 4주째까지 지속되는 소견을 보였으나 실험 5개월

째에서는 대조군과 유사한 혈관 내경을 보였다. 평활근층의 두께는 실험군 5개월째를 제외하고 대조군에 비하여 얇아졌으나 통계적 유의성은 없었다. 또한 혈관 외경도 모든 실험군에서 대조군에 비하여 넓은 소견을 보였다.

2. 광학현미경적 소견상 혈관손상은 실험 1일째부터 심한 평활근층 세포 손상을 보였고 이러한 손상의 회복은 실험 7일째부터 부분적으로 회복되기 시작하여 실험 4주째에는 거의 회복된 소견을 보였으며 제거된 외막층은 2주째부터 대조군과 거의 유사한 양상을 보였다.
3. 평활근 세포 PCNA 양성반응 세포는 실험 7일째부터 관찰되기 시작하여 실험 2주째까지 증가되는 경향을 보이다가 실험 4주, 5개월째는 대조군과 거의 유사한 소견을 보였다.
4. 평활근 세포의 α -SMA 표출은 손상이 심한 실험 1일째에는 대조군에 비하여 심하게 감소된 양상이었고 7일째 증가된 양상을 보이면서 4주째는 대조군과 거의 유사한 발현을 보였다.
5. 주사전자현미경적 소견상 혈관손상이 심한 실험 1일째에는 내피세포의 탈락과 내벽의 평탄함이 관찰되었다. 혈관 손상의 회복이 시작되는 실험 7일째부터는 내피세포의 배열이 다소 불규칙한 양상을 나타냈으나 시간 경과에 따라 회복되는 소견으로, 4주째 및 5개월째는 대조군과 거의 유사한 형태를 보였다.

이상의 소견을 종합하면 혈관 외막 제거 후 동결은 혈관의 평활근 세포에 손상을 주어 혈관 확장 결과를 초래하며 혈관 확장은 4주째까지 지속되는 양상이었다. 혈관동결 손상후 평활근 세포의 재생은 7일째부터 부분적으로 시작하여 4주째 이후에는 대조군과 유사한 회복 소견을 보였으며, 이러한 치유양상은 혈관 주위 세포가 평활근층으로 유입된 결과로 생각된다. 따라서 혈관 미세수술시 혈관 확장제로 치료되지 않는 심한 혈관경축의 발생시 이를 해소하기 위한 혈관에 대한 국소적 동결 손상은 임상적으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Acland R : Prevention of thrombosis in microvascular surgery by the use of magnesium sulphate. BrJ Plast Surg. 25 : 292, 1972.
2. Gu YD, Wu MM, Li HL : Circulatory crisis in free toe-to-hand transfer and its management: I. Clinical experience. J. Reconstr. Microsurg. 5 : 11, 1989.
3. Khouri RK : Avoiding free flap failure. Clin Plast Surg. 19 : 773, 1992.
4. Hunter J : Works, vol 1 in Palmer JF (ed): London, Longman & Co. 1835, p538.
5. Cantelmo NL, Cutler BS, Wheeler HB, et al : Noninvasive detection of carotid stenosis following endarterectomy. Arch Surg. 116 : 1005, 1981.
6. Lindbom A : Arterial spasm caused by puncture and catheterization. Acta Radiol. 47 : 449, 1957.
7. May JW Jr, Chait LA, O'Brien BM, et al : The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. Plast Reconstr Surg. 61 : 256, 1978.
8. Chait LA, May JW Jr, O'Brien BM, et al : The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps. Plast & Reconstr Surg. 61 : 421, 1978.
9. Van Nueten J, Vanhoutte P : Improvement of tissue perfusion with inhibitors of calcium ion influx. Biochem Pharmacol. 29 : 479, 1980.
10. Dell PC, Seaber AV, Urbaniak JR : Effect of systemic acidosis on per

- fusion of replanted extremities. *J Hand Surg.* 5 : 433, 1980.
11. Morris HB, Sylvia AL, Seaber AV, et al : Effect of acute normovolemic dextran 70 hemodilution on osteischemic skeletal muscle restriction and perfusion. *Surg Form.* 32 : 536, 1981.
 12. Seaber AV : Experimental vasospasm. *Microsurgery.* 8 : 234, 1987.
 13. Nichter LS, Sobieski MW : Efficacy of verapamil in the salvage of failing random skin flaps. *Ann Plast Surg.* 21 : 242, 1988.
 14. Pang CY, Forrest CR, Morris SF : Pharmacologic augmentation of skin flap viability: a hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. *Ann Plast Surg.* 22 : 293, 1988.
 15. Stein HJ, Fayman MS, Osthnzen MM : Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. *Surgery.* 106 : 617, 1989.
 16. Water LM, Peal RM, Macaulay RM : A comparative analysis of the ability of five classes of pharmacologic agents to augment skin flap survival in various models and species: an attempt to standardize skin flap research. *Ann Plast Surg.* 23 : 117, 1989.
 17. Kawabata H, Knight KR, Coe SA : Experience with calcium antagonists nifedipine, diltiazem, and verapamil and beta 2-agonist salbutamol in salvaging ischemia skin flaps in rabbits. *Microsurgery.* 12 : 160, 1991.
 18. Knight KR : Review of postoperative pharmacologic influence in ischemic skin flaps. *Microsurgery.* 15 : 675, 1994.
 19. Phelps DB, Lilla JA, Boswick JA : Common problems in clinical replantation and revascularization in the upper extremity. *Clin Orthop* 33 : 11, 1978.
 20. Phelps DB, Rutherford RB, Boswick JA : Control of vasospasm following trauma and microvascular surgery. *J Hand Surg.* 4 : 109, 1979.
 21. Bird TM, Strunin L : Anaesthetic considerations for microsurgical repair of limbs. *Can Anaesth Soc.* 31 : 51, 1984.
 22. Bertelli JA, Mira JC : Vascular freezing. A new method for immediate and permanent vasospasm relief: An experimental study in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 93 : 1041, 1994.
 23. Cavadas PC : In vivo vascular freezing in clinical microvascular transfer. *Microsurgery.* 17 : 121, 1996.
 24. Cavadas PC : In vivo microvascular freezing in Veins: Experimental Study. *Microsurgery.* 17 : 115, 1996.
 25. Gage AA, Koepf SW, Wehrle D, et al : Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer.* 12 : 1646, 1965.
 26. Emmings FG, Nelders Me, Greene GW, et al : Freezing the mandible without excision. *J Oral Surg.* 24 : 145, 1966.
 27. Weaver AW, Smith DB : Cryosurgery for head and neck cancer. *Am J Surg.* 126 : 466, 1974.
 28. Al-Drouby HAL : Oral leukoplakia and cryotherapy. *Br Dent J.* 155 : 124, 1983.
 29. McIntosh GS, Osborne DR, Li AKC, et al : Basal cell carcinoma review of treatment results with special reference to cryotherapy. *Postgraduate Med J.* 59 : 698, 1983.
 30. Hartmann PK, Verne D, Davis RG : Cryosurgical removal of a large oral hemangioma. *Oral Surg.* 58 : 280, 1984.
 31. Li Z : Cryosurgery in 50 cases of tongue carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 49 : 504, 1991.
 32. Pogrel MA : The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. *J Oral Maxillofac Surg.* 51 : 269, 1993.
 33. Salmassy DA, Pogrel MA : Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. *J Oral Maxillofac Surg.* 53 : 784, 1995.
 34. Lee M : Regional management of liver metastases. *I Cancer Invest.* 1 : 237, 1983.
 35. Chang AE, Schneider PD, Sugarbaker PH : A prospective randomized trial of regional versus systemic continuous 5-fluorodeoxyuridine chemotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Sur.* 206 : 685, 1987.
 36. Stone MD : Surgical therapy for recurrent liver metastases from colorectal cancer. *Arch Surg.* 125 : 718, 1990.
 37. Sonnex TS, Ralfs IG, Dawber RP, et al : Erythroplasia of Queyrat : Treatment by liquid nitrogen cryosurgery. *Br J Dermatol.* 106 : 581, 1982.
 38. Holt PJA : Cryotherapy for skin cancer : Results over a 5-year period using liquid nitrogen spray cryosurgery. *Br J Dermatol.* 119 : 231, 1988.
 39. Whittaker DK : Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. *Ann R Coll Surg Engl.* 66 : 313, 1984.
 40. Le Pivert PJ : Basic consideration of the cryolesion, in Ablin RJ(ed): *Handbook of Cryosurgery*, New York, Marcel Dekker. 22, 1980.
 41. Lask GP, Moy RL : Principles and techniques of cutaneous Surgery. *The McGraw-hill comp.* 153, 1996.
 42. Barker SG, Tilling LC, Miller GC, et al : The adventitia and atherogenesis : Removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a "neoadventitia." *Atherosclerosis* 105:131, 1994.
 43. Odashiro T, Komori K., Ishii T, et al : Comparison of endothelial function between in situ and reversed vein graft: Differences in endothelium-dependent responses. *Surgery* 117 : 179, 1995.
 44. Margic K : Early changes in dissected small vessels-Experimental study on rat arteries and veins. *Plast Reconstr Surg.* 75 : 375, 1985.
 45. Urbaniak, JR, Soucacos, PN, Adelaar, RS, et al : Experimental evaluation of microsurgical techniques in small artery anastomoses. *Orthop Clin North Am.* 8 : 249, 1977.
 46. Eisenhardt HJ, Hennecken H, Klein PJ, et al : Experiences with different techniques of microvascular anastomosis. *J Microsurg.* 1 : 341, 1980.
 47. O'Brien B : *Microvascular Reconstructive Surgery*. Edinburgh : Churchill-Livingstone. 1977. Pp. 57-59.
 48. Lee SH, Fisher B : Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50 : 668, 1961.
 49. Lohman R, Siemionow M, Rockwell WB : Acute adverse effects of blunt adventitial stripping. *Ann Plast Surg.* 35 : 60, 1995.
 50. Kemler MA, Kolkman WF, Slootweg PJ et al : Adventitial stripping does not strip the adventitia. *Plast Reconstr Surg.* 6 : 1926, 1997.
 51. Knight KR, Lepore DA, O'Brien B : Interrelationships between prostanooids and skin flap survival: a review *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 44 : 195, 1991.
 52. Tan N, Inoue H, Aihara M, et al : The effects of endothelin-1 on flap necrosis. *Ann Plast Surg.* 35 : 389, 1995.
 53. Wendling W, Harakal C : Effects of prostaglandin F and thromboxane A₂ analogue on bovine cerebral arterial tone and calcium fluxes. *Stroke* 22 : 66, 1991.
 54. Van Breemen C, Leuteen P, Yamamoto H, et al : Calcium activation of vascular smooth muscle. *Hypertension* 8(Suppl II): II-89, 1986.
 55. Highsmith RF, Blackburn K, Schmidt DJ : Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Ann Rev Physiol* 54 : 257, 1992.
 56. Kim DC, Chen D, Perrotta V et al : Porcine gastroepiploic artery as an in vitro experimental model to study vasodilators in microsurgery. *Ann Plast Surg.* 36 : 502, 1996.
 57. Jernbeck J, Smuelaon OE : Effects of lidocaine and calcitonin gene-related peptide (CGRF) on isolated human radial arteries. *J Reconstr Microsurg* 1993 ; 9 : 361-365.
 58. Kerrigan CL, Stotland MA : Ischemia reperfusion injury - a review. *Microsurgery* 1993 ; 14 : 165-175.
 59. Flatt AE : Digital artery sympathectomy. *J Hand Surg.* 5 : 550, 1980.
 60. Wilgis EFS : Digital sympathectomy for vascular insufficiency. *Hand clinics,* 1 ; 1:361, 1985.
 61. Wadstrom J : Nervous influence on traumatic vasospasm in the rabbit ear artery. *Microsurgery* 12 : 89, 1991.
 62. Yee AMF, Hotchkiss RN, Paget SA : Adventitial stripping : A digit procedure in refractory Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol.* 25 : 269, 1998.
 63. Graham GF : Cryosurgery. *Clinics in Plastic Surgery* 20 : 131, 1993.
 64. Cooper I, Lee A : Cryostatic congelation. A system for producing a limited controlled region of cooling or freezing a biologic tissue. *Serv Ment Dis* 133 : 259, 1961.
 65. Dawber RPR : Cryosurgery in principles and techniques of cutaneous Surgery p 153, 1996.

66. Cancilla PA, Frommes SP, Kahh LE, et al : Regeneration of cerebral microvessels : A morphologic and histochemical study after local freeze-injury. *Laboratory Investigation* 40 : 74, 1979.
67. Kang JI, Kim KW, Lee JH : Regeneration of endothelium and smooth muscle cell of rat femoral artery after freezing injury. 245 : 47, 1998.
68. Blinzinger K, Malsushima A, Anzil AP : High structural stability of vascular and glial basement membrane in areas of total brain tissue necrosis. *Experientia* 25 : 976, 1969.
69. Baker RN, Cancilla PA, Pollock PS, et al : The movement of exogenous protein in experimental cerebral edema: an electron microscopic study after freeze-injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 30 : 668, 1971.
70. Bradley PF, Fisher AD : The cryosurgery of bone, an experimental and clinical assessment. *Br J Oral Surg* 13 : 11, 1975.

사진부도 설명

- Fig. 1. Note partially stripping of adventitia, thick smooth muscle layer in control group (H&E, $\times 200$).
- Fig. 2. Note partially stripping of adventitia, normal smooth muscle cell in control group (MT, $\times 200$).
- Fig. 3. Internal and external elastic fiber showing into smooth muscle layer in control group (Orcein, $\times 200$).
- Fig. 4. Negative reaction in smooth muscle layer (PCNA, $\times 200$).
- Fig. 5. Note smooth muscle showing severe positive reaction regular pattern in control group (α -SMA, $\times 200$).
- Fig. 6. Longitudinally sectioned femoral artery 1 day after sham dissection in control group. Note normal intimal surface (SEM, $\times 500$).
- Fig. 7. Note vasodilation and infiltration of inflammatory cells into adventitial layer and smooth muscle layer 1 day after freezing (H&E, $\times 100$).
- Fig. 8. Note severe injury of smooth muscle layer 1 day after freezing (MT, $\times 100$).
- Fig. 9. Note stripping of adventitial layer, irregular pattern of elastic fiber, increasing of internal diameter 1 day after freezing (Orcein, $\times 200$).
- Fig. 10. Note negative reaction of PCNA into smooth muscle layer 1 day after freezing (PCNA, $\times 200$).
- Fig. 11. Note can't discernible shape of smooth muscle cell, negative reaction 1 day after freezing (α -SMA, $\times 400$).
- Fig. 12. Note irregular figure of intimal layer just as gravel 1 day after freezing (SEM, $\times 75000$).
- Fig. 13. Note decreasing the dimension of smooth muscle layer 7 days after freezing (H&E, $\times 400$).
- Fig. 14. Note injury of smooth muscle cells 7 days after freezing (MT, $\times 400$).
- Fig. 15. Note irregular pattern of elastic fibers 7 days after freezing (Orcein, $\times 400$).
- Fig. 16. Note mild positive reaction into smooth muscle layer 7 days after freezing (PCNA, $\times 400$).
- Fig. 17. Positive reaction showing into smooth muscle cells near the adventitial layer 7 days after freezing (PCNA, $\times 400$).
- Fig. 18. Note immatured regenerating endothelial cells 7 days after freezing (SEM, $\times 750$).
- Fig. 19. Note increasing the dimension of internal diameter, somewhat showing of smooth muscle cells after 2 weeks after freezing (H&E, $\times 200$).
- Fig. 20. Photomicrograph showing red color remnant of smooth muscle layer 2 weeks after freezing (MT, $\times 200$).
- Fig. 21. Note a little regular pattern showing of elastic fibers 2 weeks after freezing (Orcein, $\times 200$).
- Fig. 22. Photomicrograph showing severe positive reaction in adventitial layer 2 weeks after freezing (PCNA, $\times 400$).
- Fig. 23. Note more positive reaction present than 7 days is smooth muscle layer 2 weeks after freezing (α -SMA, $\times 200$).
- Fig. 24. Note more regenerated figure of intimal layer than those of 7 days group (SEM, $\times 500$).
- Fig. 25. Note showing increased number of smooth muscle cells 4 weeks after freezing (H&E, $\times 400$).
- Fig. 26. Note fusiform regenerating smooth muscle cells 4 weeks after freezing (MT, $\times 400$).
- Fig. 27. Note showing nearly regular pattern of elastic fiber 4 weeks after freezing (Orcein, $\times 400$).
- Fig. 28. Photomicrograph of PCNA negative reaction in smooth muscle layer 4 weeks after freezing (PCNA, $\times 400$).
- Fig. 29. Smooth muscle cells showing more positive reaction than those of 2 weeks after freezing (α -SMA, $\times 400$).
- Fig. 30. Photomicrograph showing nearly healed intimal layer 4 weeks after freezing (SEM, $\times 200$).
- Fig. 31. Smooth muscle cells showing mature fusiform shape and regular pattern. Note intimal hyperplasia 5 months after freezing (H&E, $\times 400$).
- Fig. 32. Healed medium, note intimal hyperplasia 5 months after freezing (MT, $\times 400$).
- Fig. 33. Note elastic fiber showing regular pattern 5 months after freezing (Orcein, $\times 400$).
- Fig. 34. Photomicrograph showing negative reaction 5 months after freezing (PCNA, $\times 400$).
- Fig. 35. Photomicrograph showing severe positive reaction is medial layer 5 months after freezing (α -SMA, $\times 400$).
- Fig. 36. Healed endothelium 5 months after freezing (SEM, $\times 350$).

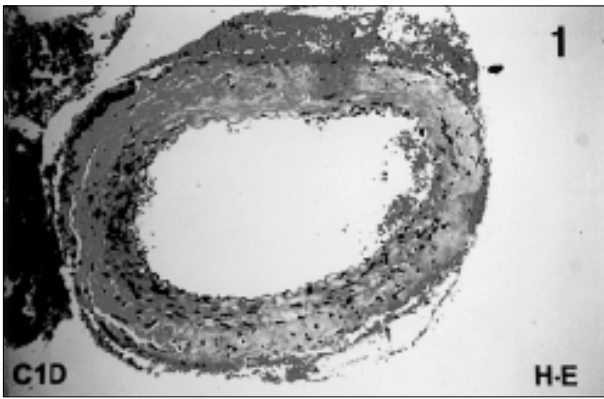


Fig. 1

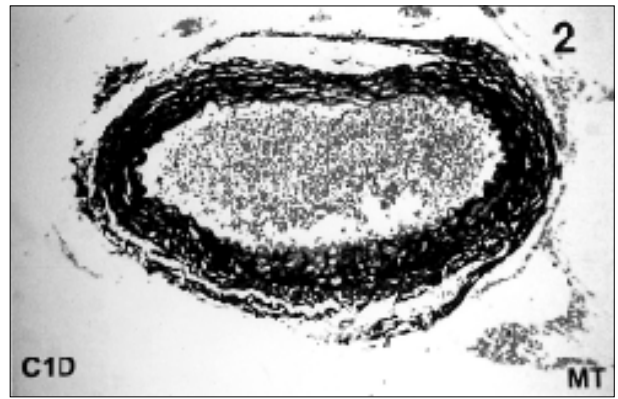


Fig. 2

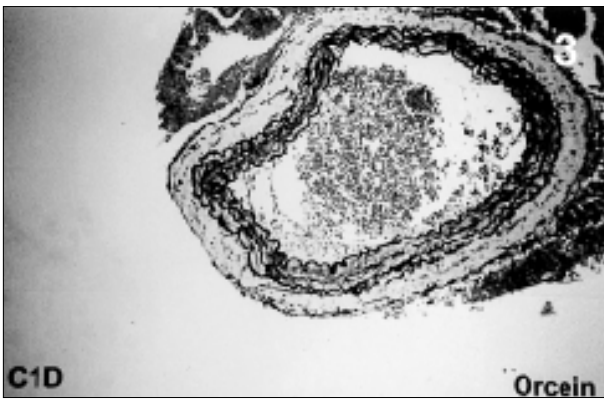


Fig. 3

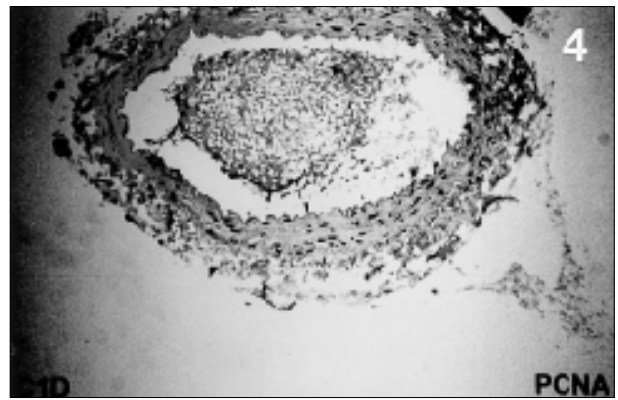


Fig. 4

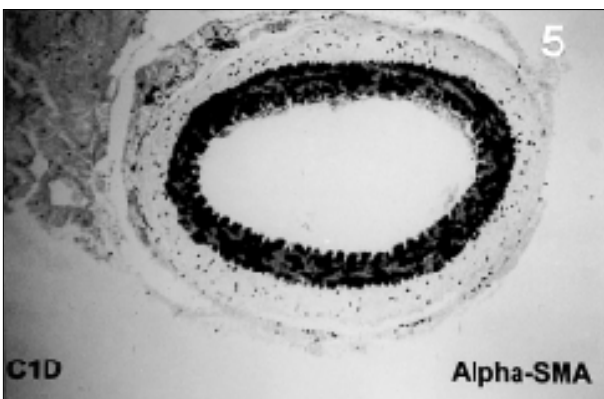


Fig. 5

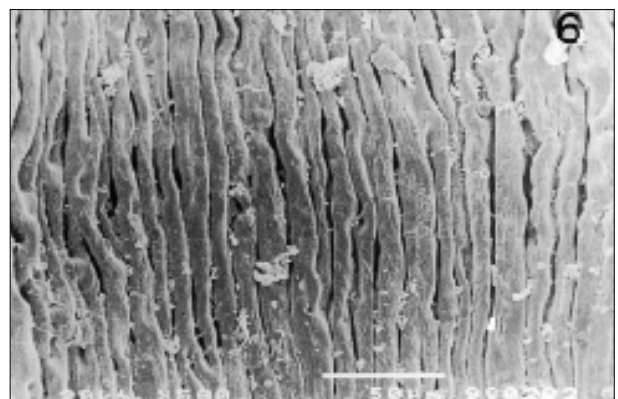


Fig. 6

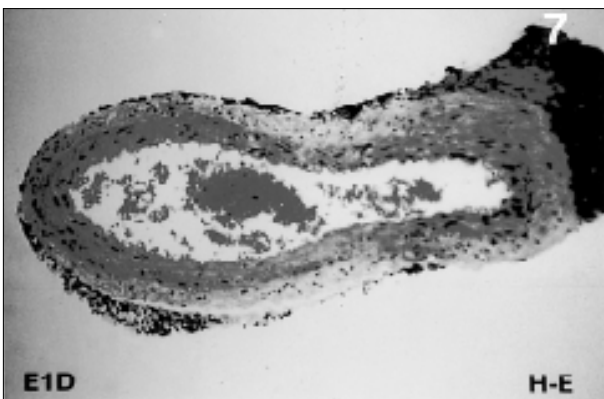


Fig. 7

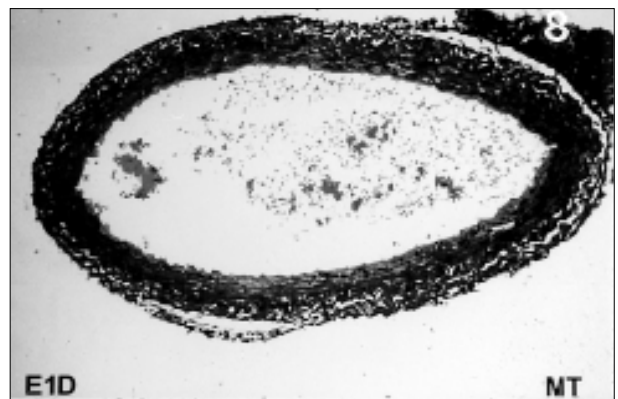


Fig. 8

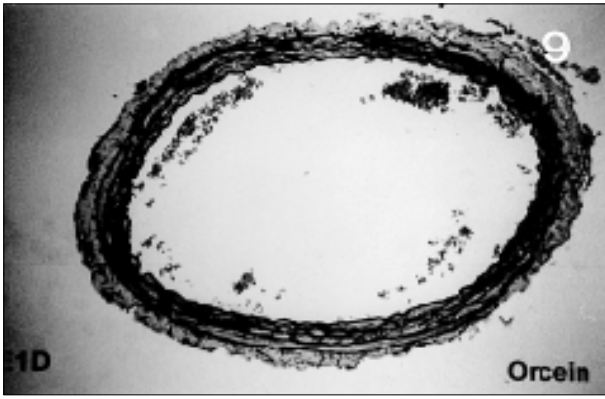


Fig. 9

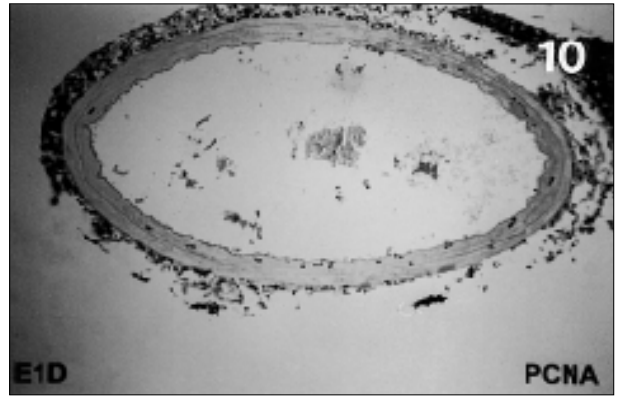


Fig. 10

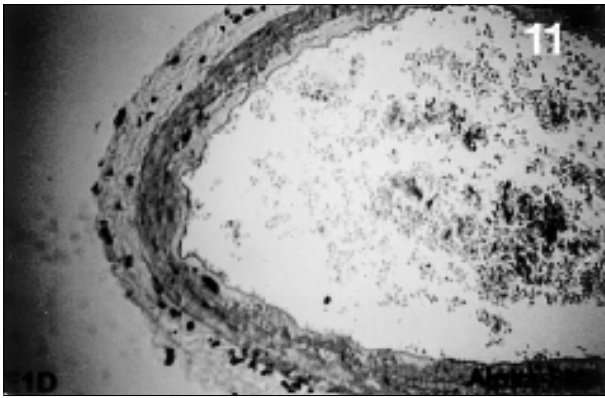


Fig. 11



Fig. 12

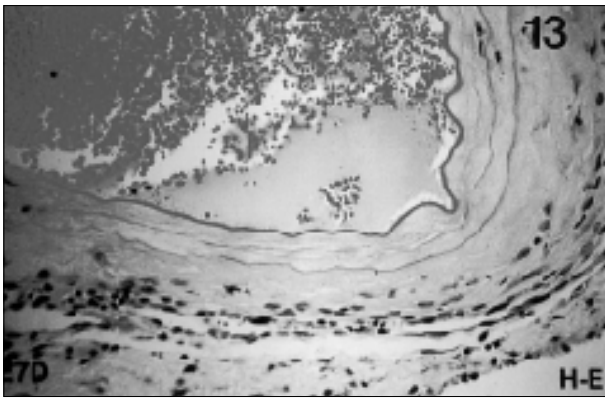


Fig. 13

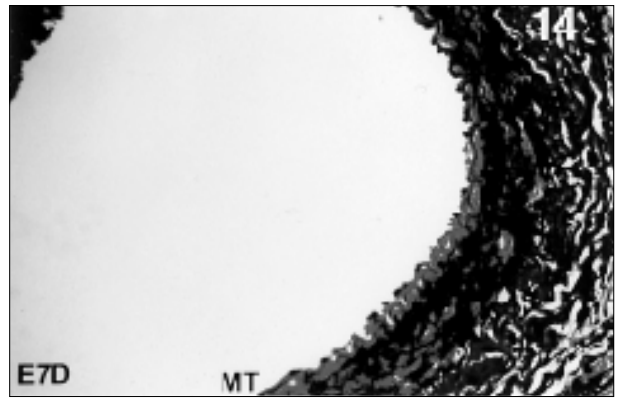


Fig. 14

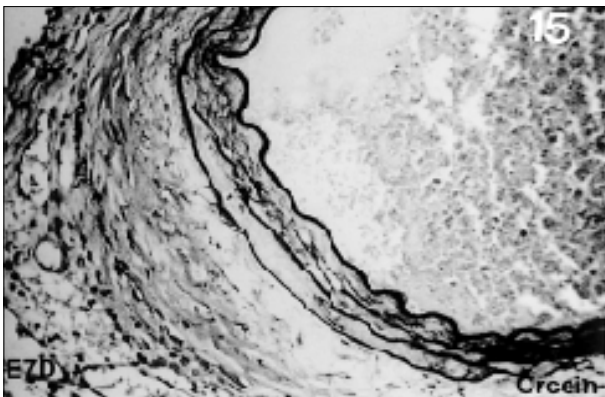


Fig. 15

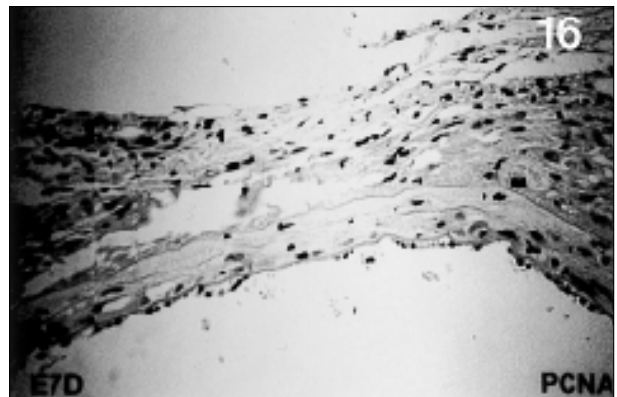


Fig. 16

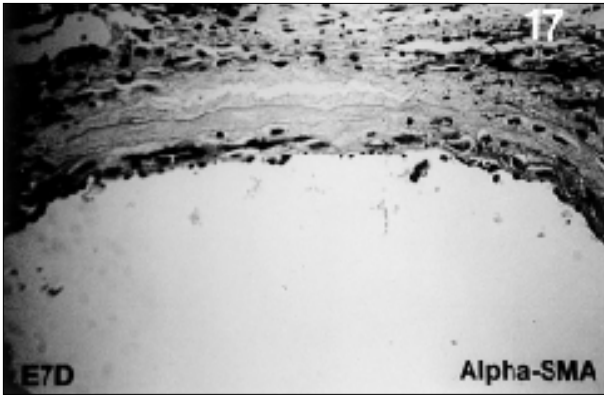


Fig. 17

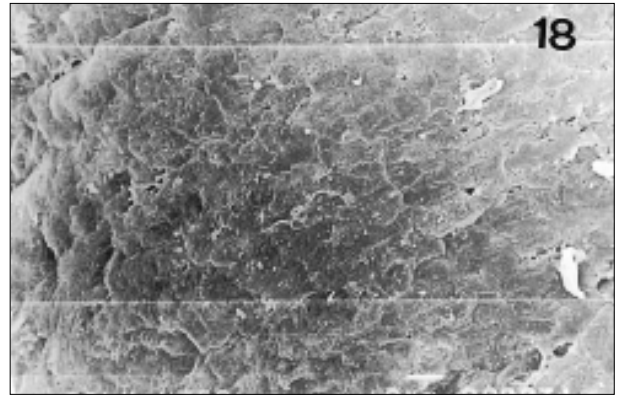


Fig. 18

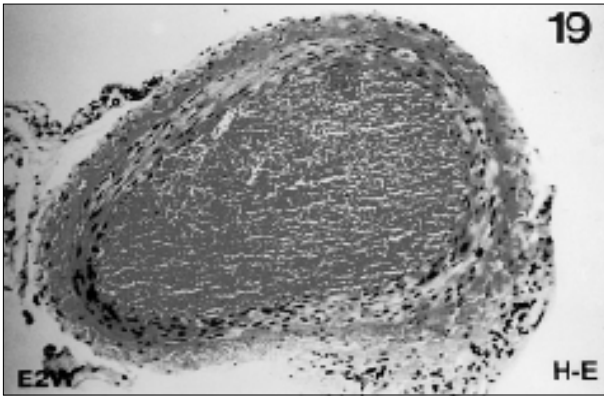


Fig. 19

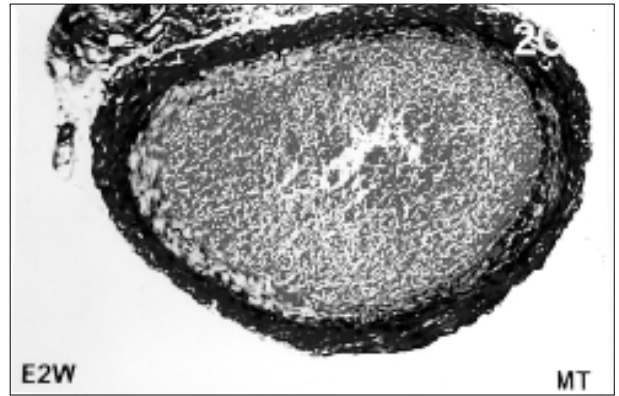


Fig. 20

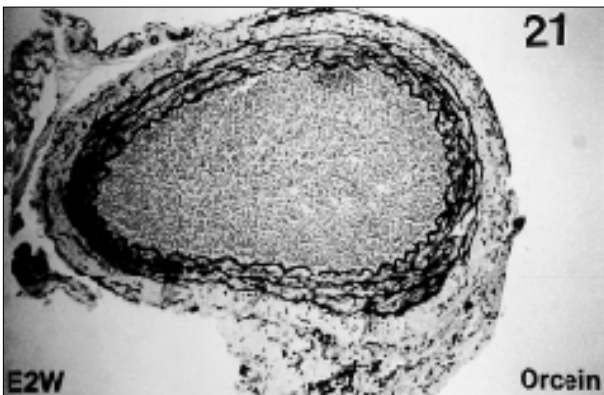


Fig. 21

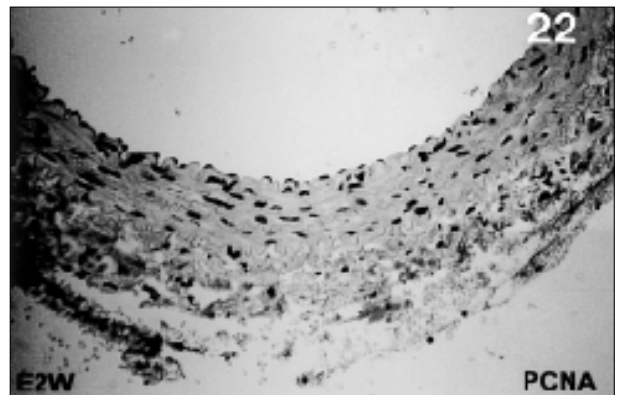


Fig. 22

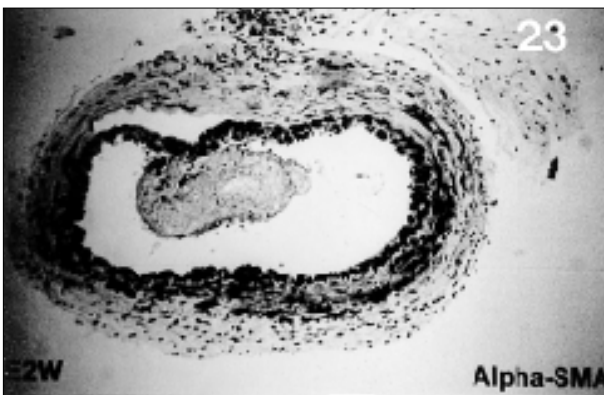


Fig. 23

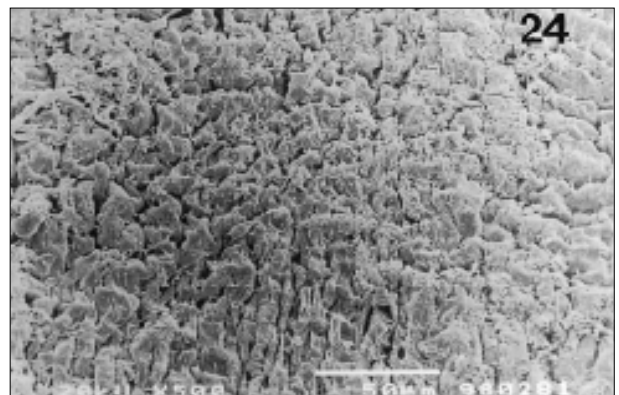


Fig. 24

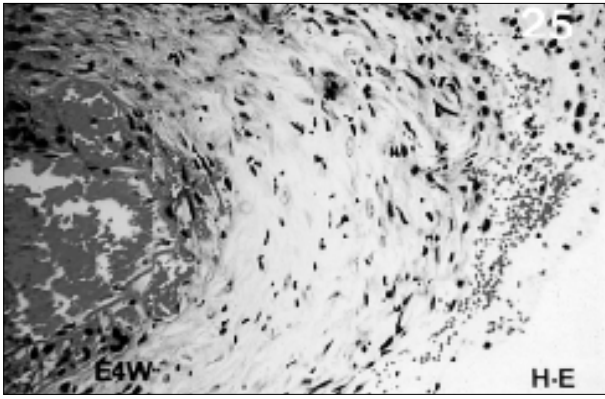


Fig. 25

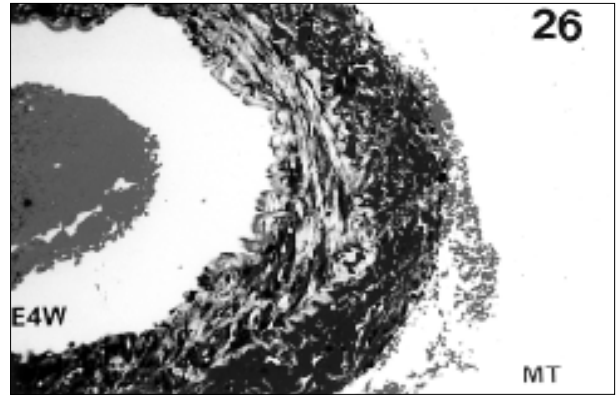


Fig. 26

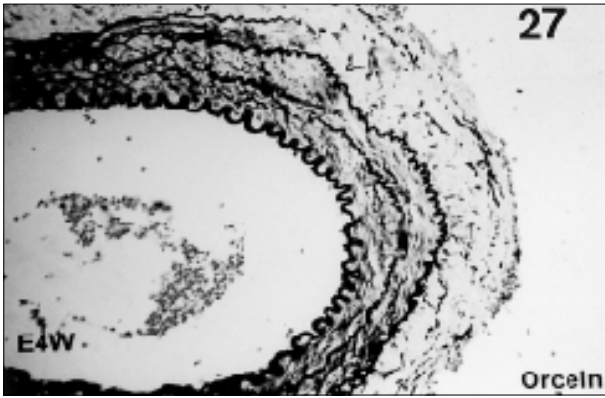


Fig. 27

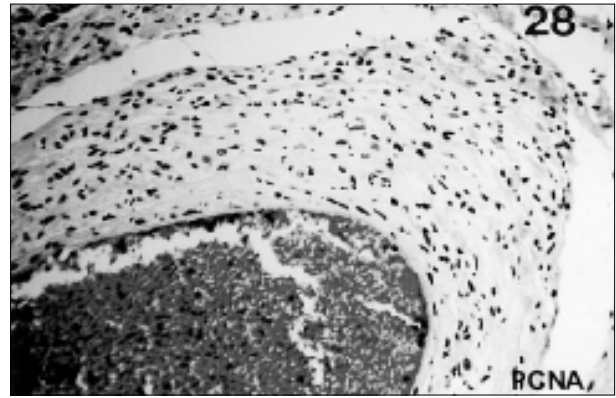


Fig. 28

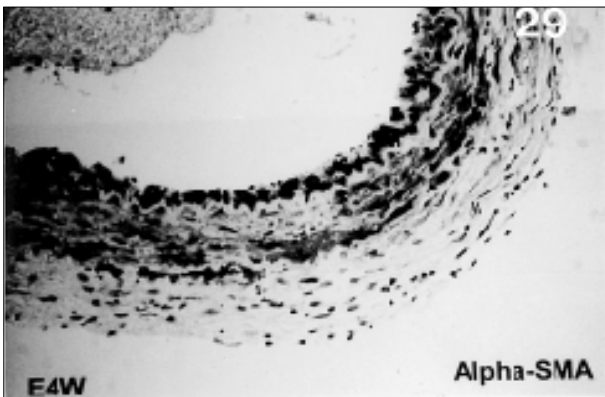


Fig. 29

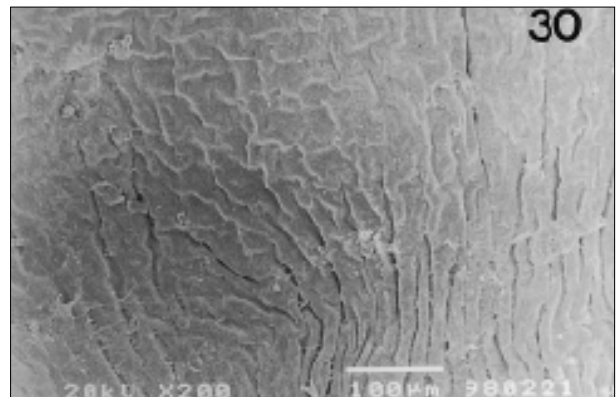


Fig. 30

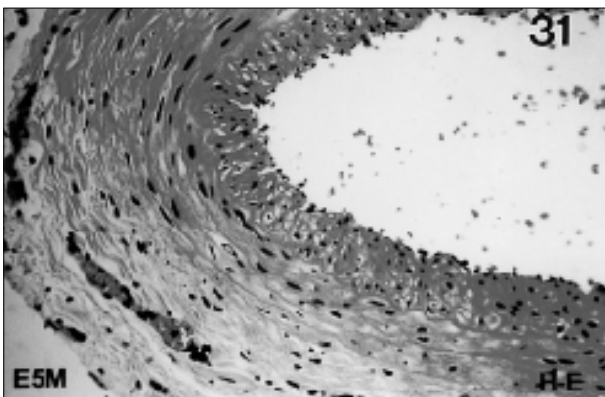


Fig. 31

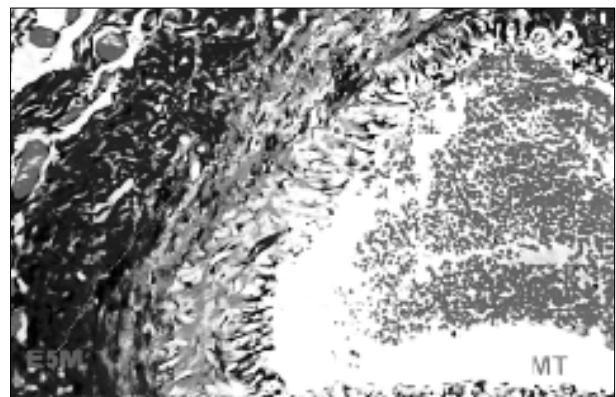


Fig. 32

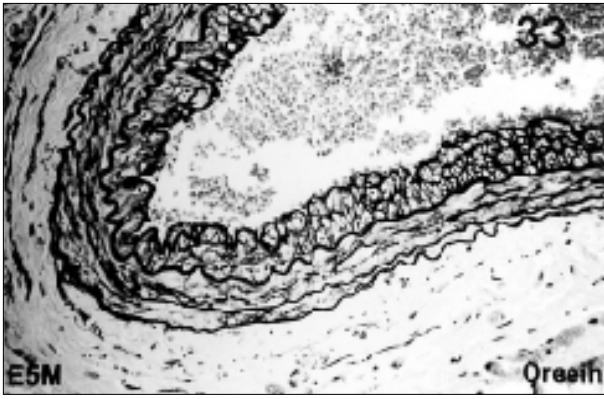


Fig. 33

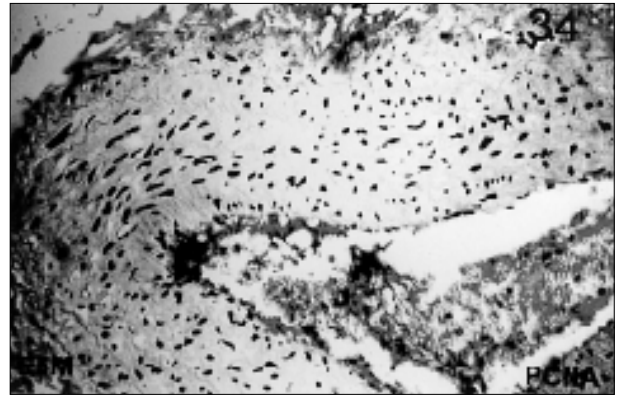


Fig. 34

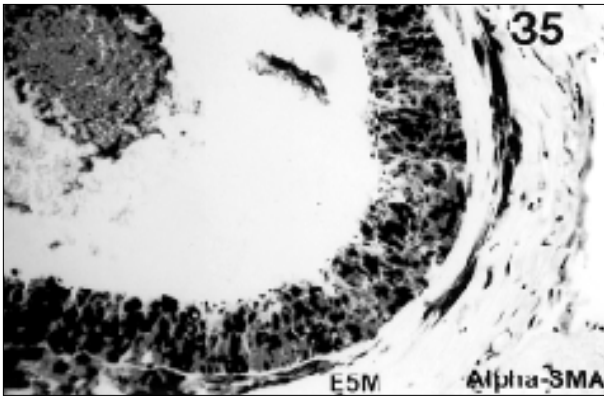


Fig. 35

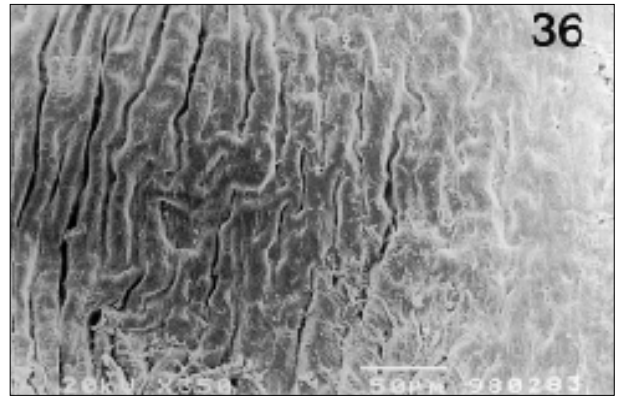


Fig. 36