

수종의 항혈전제의 국소 세척이 미세혈관문합의 동맥 치유 및 개존에 미치는 영향

최용철 · 김경욱 · 김철환

단국대학교 치과대학 부속 치과병원 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:117-128)

EFFECT OF ARTERIAL REPAIR AND PATENCY AFTER MICROVASCULAR ANASTOMOSIS WITH TOPICAL IRRIGATION OF VARIOUS ANTI-THROMBUS DRUGS

Yong-Chul Choi, Kyung-Wook Kim, Chul-Hwan Kim

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University

Free flap transplantation with microvascular anastomosis has been successfully performed by development of surgical technique, materials and post-operative monitoring equipments of flap. But success rate of microvascular anastomosis is influenced by various factors, and failure rate is about 5-10%. The most influential factor for success rate is surgical technique and other factors that influence failure of microvascular anastomosis are ischemic time of free flap, thrombus formation of anastomosis region and vascular spasm. Many studies has been published in microvascular anastomosis with histologic effect for irrigating solution. But local irrigation solution has been used clinically in microvascular anastomosis, the comparison with each solution, microhistological study for endothelial cell repair and vascular patency has not been reported.

The heparin which is anti-thrombotic agent, and urokinase which is fibrinolytic agent are used for this study. Vascular patency and thrombus formation in experimental micro-arterial anastomosis, and endothelial repair were observed with histologic analysis, scanning electron microscopy, transmission electron microscopic examination.

The results were obtained as follows:

1. In vascular patency test in 30 minute and 7 days after micro-arterial anastomosis, equal effects of good vascular patency were obtained in group of local irrigation with heparin and urokinase.
2. In thrombus formation in 7 days after micro-arterial anastomosis, equal effects of minimal thrombus formation were obtained in group of local irrigation with heparin and urokinase.
3. In toluidin blue staining in 7 days after micro-arterial anastomosis, local destruction of endothelial cell and inner elastic lamina were seen and endothelial repair was not seen.
4. In scanning electron microscope examination in 7 days after micro-arterial anastomosis, endothelial cell was not seen in peripheral to suture materials, thrombus associated fibrin network was observed.
5. In transmission electron microscope examination in 7 days after microarterial anastomosis, inflammatory cell was seen within smooth muscle cells in site of endothelial cell destruction, smooth muscle cell around suture material were arranged irregularly, some collagenous change were seen.

From the results obtained in this study, same results of good vascular patency and anti-thrombotic effect of heparin and urokinase were obtained as a local irrigation solution, and repair of endothelial cell was not seen in 7 days after micro-arterial anastomosis.

Key words: Microvascular Anastomosis, Anti-thrombus drug, Heparin, Urokinase

I. 서 론

김 경 욱

330-716 충남 천안시 신부동 산 7-1번지
단국대학교 치과대학 부속 치과병원 구강악안면외과

Kyung-Wook Kim

Dept. of Oral & Maxillofacial Surg. School of Dentistry,
Dankook University 7-1 Sinbudong, Cheonan, 330-716, Korea
Tel: 82-41-550-1993 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: kkwoms@dku.edu

미세혈관수술법을 이용한 유리조직 이식술은 수술 술기, 수술 재료, 술후 피판의 감시 장치, 약물 등의 발전으로 그 성공률이 높아져 왔다. 그러나 미세혈관 문합술의 성공률은 다양한 요인에 의하여 많이 좌우되며, 그 실패율은 5-10%에 이른다^{1,2)}. 그중 외과적 술기가 가장 중요한 요인이며, 유리피판의 허혈 시간, 문합부의 혈전 형성, 혈관경축 등이 실패의 중요한 요소

로 작용한다^{3,5)}. 이중 유리조직의 지속적인 허혈시간은 유리조직의 혈류량의 감소로 인하여 결국 유리피판의 이식술은 실패로 진행되며, 또한 미세혈관문합부의 혈전 형성은 가장 주된 실패요인의 하나로 간주되고 있다⁶⁾. Halton 등은 수지절단환자의 문합술 후 동맥혈전으로 인한 실패율을 17%로 보고하였으며⁷⁾, 전 세계적으로도 유리조직이식술에서의 혈관문합술 후의 혈전으로 인한 실패율은 약 10%에 달한다⁸⁾.

혈전의 형성기전은 혈관의 손상으로 인한 혈관내피의 노출로 인하여 주위의 고원질이 노출되고 여기에 혈소판이 침착되고 돌기를 내는 등, 그 형태학적인 변화가 일어나고 ADP (Adenosine diphosphate), serotonin 등을 유리하여 다른 혈소판과 응집된다. 이후 섬유소와 적혈구의 침착이 일어나 혈전증을 유발하게 된다^{5,9,12)}.

현재 임상적으로 이용될 수 있는 대표적인 항혈전제에는 aspirin, heparin, vitamin K 길항제, 원섬유소용해성제제인 streptokinase, urokinase, tPA(Tissue plasminogen activator) 등이 있다¹³⁾.

이중 heparin은 1916년, McLean에 의해 발견된 항섬유소 제제로써 혈액의 점도를 감소시키며, 혈관내피세포에 부착하여 음전하를 강화시켜서 혈소판의 부착력을 감소시키며, 섬유소원이 섬유소로 전환되는 것을 억제하여 항혈전 효과를 나타낸다¹⁴⁾. 그리고 Urokinase는 plasminogen을 plasmin으로 전환시켜 섬유소 응괴(clot)를 분해시켜 혈전의 용해작용을 한다¹⁵⁾. 1980년 Acland 등은¹⁶⁾ 다양한 완충용액을 미세혈관문합술에 관주용액으로 사용하여 조직병리학적 효과를 연구한 이래로 많은 미세혈관외과용 제제가 연구되어 왔다. 그러나 이러한 항혈전 제제의 국소적 투여가 임상적으로 미세혈관문합술에 경험적으로 사용되고는 있지만, 그 약제를 서로 비교하여 혈관문합 후 개존 정도와 혈관내피세포의 재생을 미세 조직학적으로 비교 연구한 문헌은 드물다. 이에 본 연구는 국소적 항혈전 제재인 Heparin과 원섬유소용해성 제재인 Urokinase를 미세동맥문합술 부위에 국소적으로 투여하여 동맥문합부의 개존 상태와 치유상태를 조직학적, 그리고 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 사용한 검사 및 관찰을 하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물로는 일정기간동안 동일 조건에서 사육된 체중 3 kg 내외의 웅성가토 18마리를 사용하였다. 6마리를 항혈전제를 사용하지 않은 군(Group I)으로 배정하였고, 6마리는 Heparin 투여군(Group II), 6마리는 Urokinase 국소 투여군(Group III)으로 배정하였다.

2. 연구방법

(1) 동물실험

동물을 Ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행) 10 mg/kg 및

0.15 ml/kg의 2% xylazine hydrochloride(Rumpun[®], 한국바이엘)을 근주하여, 마취시킨 후, 우측 서혜부에 털을 제거하고 베타딘 용액으로 소독한 후, 지혈을 목적으로 1:100,000의 epinephrine이 함유된 0.2% 염산 리도카인(광명제약)을 침윤 주사하였다. 수술현미경하에서 천하복벽동맥의 분지부에서 서혜인대까지 주위조직을 박리하여 우측 대퇴동맥을 노출시켰다. 혈관장질을 예방하기 위하여 2% Lidocaine을 5분간 점적하였고, 대퇴동맥의 근위부 및 원위부에 미세혈관용 겹자를 장착하여 양단을 고정한 후 동맥을 횡절단하였다. Jewler's forcep과 미세수술용 가위를 사용하여 혈관내막이 노출될 때까지 외막을 제거하였다. 혈관 내강을 이완시킨 후, 각 군에서 필요한 항혈전제를 이용하였는데, 6마리의 항혈전제를 사용하지 않은 군(Group I)은 lactated Ringer's 용액을 이용하여 혈관내강을 세척하였고, 6마리의 heparin 투여군(Group II)은 lactated Ringer's 용액과 heparin(50 U/ml)를 혼합하여 혈관내강을 세척하였으며, 나머지 6마리의 urokinase 투여군(Group III)은 lactated Ringer's 용액과 Urokinase(20,000 U/ml)의 혼합액을 이용하였다. 미세수술기구를 사용하여 절단된 혈관을 10-0 Ethilon[®](Ethicon LDT., U.K.)으로 미세혈관문합술을 총 8개의 문합을 시행하여 혈관 단단문합술을 시행하였다. 문합술 후 2% Lidocaine을 점적하고 3분간 기다린 후 혈관겹자를 제거하였다(Fig. 1, 2). 문합 30분 후에 수술현미경하에서 혈관개존(vascular patency) 상태를 empty-and-refill test를 이용하여 검사하였다. 수술이 끝난 다음 창상을 층별로 봉합하였으며, 술후 항생제는 사용하지 않았다.

(2) 희생 및 관찰

개존 상태를 확인하기 위하여 각 실험군(Group I, II, III) 모두, 술후 7일째에 동물을 마취시킨 후, 수술현미경 하에서 empty-and-refill test를 이용하여 평가하였고(Fig. 3), 문합부를 중심으로 혈관을 절제한 다음, 미세 가위로 혈관의 장축에 평행하게 절개를 가하고 수술현미경하에서 혈관내부의 혈전 양상을 관찰하였다(Fig. 4).

(3) 평가

혈관개존(vascular patency) 상태를 파악하기 위하여 문합 30분 후와 7일째에 수술현미경하에서 empty-and-refill test를 이용하여 평가하였고, 양호한 개존(P0), 약간 감소된 개존(P1), 심하게 감소된 개존(P2) 및 비개존(P3)으로 분류하였다. 혈전(thrombus) 형성의 평가를 위해서 문합 7일째, 수술현미경하에서 관찰하여 혈전 관찰 안됨(T0), 소량의 혈전 관찰(T1), 중증도의 혈전(T2), 큰 혈전(T3)으로 분류하였다.

(4) 표본제작

가. 광학현미경적 관찰

실험동물 심장에 Ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행)을 다량 주사하여 희생시킨 후, 문합부를 중심으로 혈관의 장축에 평행하게 절개한 혈관(Fig. 4)을 10% 중성 포르말린에 고정하고 통법대로 처리하여, 여러 장의 4 μm 파라핀 절편을 제작하

였다. 1% toluidine blue 용액을 사용하여 염색한 후 광학현미경 하에서 조직병리학적 특징을 관찰하였다.

나. 주사전자현미경적 관찰

혈관내면의 변화를 관찰하기 위하여 술후 7일째 절취한 혈관을 문합부를 중심으로 혈관이 말리지 않게 잘 편 후, 조직을 1 mm의 크기로 잘라 2.5% glutaldehyde 용액에 넣은 후 고정액은 acetate veronal을 사용하여, pH 7.2로 완충시키고, 1% osmium tetraoxide를 사용하여 30-60분 후 고정하였다. 고정액을 증류수로 씻어낸 후 알코올로 탈수시키고, gold를 증착하여 주사전자현미경(JSM-5410 LV, JEOL社, Japan)으로 관찰하였다.

다. 투과전자현미경(TEM)적 관찰

7일째 절취한 혈관을 문합부를 중심으로 혈관이 말리지 않게 잘 편 후, 조직을 1 mm의 크기로 잘라 2.5% glutaldehyde 용액에 넣은 후 고정액은 acetate veronal을 사용하여, pH 7.2로 완충시키고, 1% osmium tetraoxide를 사용하여 30-60분 후 고정하였다. 고정액을 증류수로 씻어낸 후 알코올로 탈수시키고, n-butyl methacrylate에 침윤시킨 후, 젤라틴 캡슐에 포매하고, 60°C에서 중합하고 축매제는 1% benzoyl peroxide를 사용하였다. 0.2 mm 정도 되는 블록에서 초박절편을 제작하고 탄소격자상에 올려놓고 Uranyl acetate와 Lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEOL JEA CX II, JAPAN)으로 관찰하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 혈관개존 상태

가. 문합 30분경과 후

각 Group 군의 6레씩의 동맥문합 중에서, Group I에서 양호한 개존이 4레, 약간 감소된 개존이 1레였고, 심하게 감소된 개존이 1레였다. Group II에서는 모든 동맥문합에서 양호한 개존을 나타내었다. Group III에서는 양호한 개존이 5레, 약간 감소된 개존이 1레였다(Table 1).

나. 문합 7일 후

Group I의 6레의 동맥문합 중에서 4레가 개존에 완전 실패하였고, 1레에서 심한 개존 감소를 보인 동맥이 1레, 약간 감소된 개존이 1레였다. Group II에서는 5레가 양호한 개존을 보였고, 1레가 약간 감소된 개존을 보였으며, Group III에서는 Group II와 동일한 결과를 보였다(Table 1).

2. 혈전(thrombus) 형성

문합 7일째에 문합부 내부를 혈전(thrombus) 형성의 평가를 위해서 문합 7일째, 동물을 마취하고 문합부를 중심으로 근원심으로 1 cm의 동맥을 절단하고, 절단된 혈관의 장축에 평행하

Table 1. Arterial patency at 30minute and 7 days after microvascular anastomosis

Group Patency	Group I		Group II		Group III	
	30min	7 days	30min	7 days	30min	7 days
P0	4	0	6	5	5	5
P1	1	1	0	1	1	1
P2	1	1	0	0	0	0
P3	0	4	0	0	0	0

(P0: good patency, P1:slightly reduced patency, P2: severly reduced patency, P3: no patency)

Table 2. Thrombus formation of femoral artery in anastomosis area at 7 days after microvascular anastomosis

Group Patency	Group I	Group II	Group III
	T0	0	4
T1	0	2	0
T2	2	0	0
T3	4	0	0

(T0: no thrombus, T1: small thrombus, T2: medium thrombus, T3: large thromus)

게 절개를 가하고 수술현미경하에서 혈관내부의 혈전 양상을 관찰한 결과, Group I 군에서 모두 혈전이 관찰되었다. 그 중 4레에서 큰 혈전이 관찰되었고, 2레에서 중등도의 혈전이 2레였다. Group II에서는 4레에서 혈전의 생성이 없었으며, 2레에서 소량의 혈전이 관찰되었다. Group III에서는 6레 모두에서 혈전이 관찰되지 않았다.

3. 광학현미경 소견

정상 혈관은 내막, 중막, 외막의 3층으로 구성되어 있고 내막은 편평상피와 소성결합조직인 내막하층으로 구성되어 있으며 내탄력막의 존재는 분명치 않았다. 또한 중막은 4-5층의 두꺼운 탄력막과 평활근 세포로 구성되어 있었다. 외막은 외탄력막이 분명치 않았고, 소성결합조직과 교원섬유로 구성되어 있었다(Fig. 5). Group I에서는 평활근 세포와 혈관내피세포, 내탄력막의 연결성이 부분적으로 또는 심하게 결여되어 있었으며(Fig. 6, 7), Group II에서는 문합부와 그 인접부위를 제외한 부위에서는 정상 내피세포의 관찰이 보였으나, 내탄력막이 상실된 부위에서는 내피세포가 붙지 못하고 유리되어 있었다. 중막 부위에서의 괴사의 소견도 관찰되었으며, 봉합사 주위로 염증성 육아조직이 발견되었다. 평활근 세포와 혈관내피세포, 내탄력막의 연결성이 부분적으로 결여되어 있었으며(Fig. 8, 9), 봉합사 주위로 불규칙하게 배열된 평활근 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 10). Group III에서는 혈관의 계속성이 유지되고 있었고 혈병은 거의 소실되어 있었으며, 평활근 세포와 혈관내피세포, 내탄력막의 연결성이 부분적으로 또는 심하게 결여되어 있었으며 외막에서는 결합조직의 증식이 보이고 교원섬유의 배열이 일정해지며 혈관의 중축에 평행하게 배열되어 있었다. 또한 섬유모세포의 증식이 왕성하였으며 내막과 중막의 연결성은 보이지 않았으나, 중막이 혈관의 중축으로 증식됨이 관찰되었다(Fig. 11, 12).

4. 주사전자현미경 소견

봉합사 주변을 부정형의 물질이 덮혀 있었으며 혈구의 수는 미미하였으며, 섬유소들이 관찰되었으나 내피세포의 재생은 보이지 않았다. 봉합사는 섬유소망으로 덮혀 있었다. 정상 동맥의 경우, 혈관장축에 평행하게 배열된 내피세포를 관찰할 수 있었으며, 긴 주름을 형성하였다(Fig. 13). Group I에서는 불규칙하게 배열되거나. 규칙적으로 배열된 혈관내피세포 내에 적혈구 및 혈전이 관찰되었으며, 봉합사 주위에는 내피세포의 재생이 되지 않았으며, 아직 섬유소, 적혈구들로 덮혀 있었으며(Fig. 14-16), 일부 혈관에서는 섬유소 망이 형성된 부위도 나타났다(Fig. 17). Group II에서는 불규칙한 배열의 내피세포 주위로 섬유소 및 적혈구가 관찰되었으며 부분적으로 섬유소가 묻쳐있는 부위도 나타났다(Fig. 18-22), 일부에서는 내피세포의 새로운 생성 부위도 나타났으며(Fig. 19), 봉합사 주위의 내피세포에 섬유소망이 나타난 부분도 관찰되었다(Fig. 20). Group

III에서는 봉합사 주위에서 불규칙하게 배열된 내피세포주위에 섬유소가 덮혀 있는 부위가 관찰되었다(Fig. 23, 24).

5. 투과전자현미경 소견

Group I에서는 동맥벽은 평활근 세포가 노출되어 있었으며, 혈전도 부분적으로 보였으며, 봉합사 주위로 평활근 세포 부위에는 콜라겐 조직이 증식되어 있었다(Fig. 25-28). Group II, III에서는 봉합사 주위의 평활근 세포가 나선형으로 배열된 부위가 관찰되었으며, 평활근 세포 주위에는 염증성 세포와 혈전이 관찰되었다(Fig. 29-37).

IV. 총괄 및 고찰

최근 미세수술술기의 발달로 인해 구강 및 안면부 종양의 외과적 절제술 후 소실된 구강악안면 부위의 결손을 재건하는 수술이 팽목할 만한 발전을 이루어 왔다. 많은 기술적인 발전과 더불어 미세혈관수술은 그 성공률이 높아졌지만 수복된 혈관의 혈전형성은 피판의 실패에 가장 큰 요인이 되어왔으며, 수술로 인한 자극, 국소적 혈관손상, 수술에 의한 혈류변경, 허혈시간, 혈관경축, 혈관폐쇄 등은 혈전형성을 증가시킨다.

이로 인한 미세혈관 문합부위의 혈류량의 감소로 인한 혈전에 대한 연구가 미세혈관수술의 연구 분야에 있어 진행되어져 왔다^{17,18)}.

정상 혈관은 중심부에는 적혈구, 주위에는 혈소판이 흘러 혈류를 형성하는데 혈관내막에 위치한 내막세포들이 외상을 받지 않은 정상 혈관에서는 혈소판이 자극을 받지 않는다. 만약 혈관의 내막이 손상된 경우에는 내피세포들을 상실하게 되어 노출된 교원질과 함께 하부의 결체조직이 쉽게 혈전을 형성하는 면을 형성하게 되어^{5,19)} 혈소판의 불가역적 화학적 변화를 유도하여 혈소판내의 Adenosine diphosphate가 유리되어 다른 혈소판을 응집시키는 연쇄반응의 결과로 혈소판 응집체를 형성하게 되고^{12,20)}, 여기에 fibrin과 적혈구 등이 붙어 일반적인 혈전을 형성하게 된다. 미세혈관의 혈전 형성에 대한 기여 인자에 대해서는 확실히 밝혀지지 않았지만 피판술 후 교감신경 자극에 의한 미세혈관의 수축현상²¹⁾, 혈류의 서행으로 인한 적혈구 응집 현상²²⁾, 또는 술후 혈소판의 접합력 증가²³⁾ 등이 관여하는 것으로 알려져 왔다. 이러한 혈전의 형성을 방지하기 위하여 low molecular weight dextran^{24,25)}, Dicumarol, Complamin²⁶⁾, Heparin²⁷⁾, prostaglandin 억제제²²⁾ 등 수많은 약제들이 연구되어 왔다. 현재까지 개발된 지혈기전을 억제하는 약제는 항혈전제, 항응고제, 혈전용해제로 크게 3가지로 대별할 수 있다. 항혈전제에는 Aspirin²⁸⁾, Macrodex²⁹⁾, 등이 있으며 주로 임상적으로는 전신투여제로 많이 이용되고 있다. 항응고제는 Heparin, Dicumerol, Warfarin sodium 등이 있는데 미세혈관수술에는 Heparin이 현재 가장 널리 이용된다³⁰⁾. Heparin은 미세혈관수술에서 가장 많이 국소 관류용이나, 국소세척용, 전신투여용 등으로 많이 이용되는 항응고제제로서 미세혈관문합술에서의

heparin의 사용은 혈액의 재관류율을 향상시킨다³¹⁻³³). Heparin의 항응고 기전을 살펴보면, Heparin은 혈관 내피세포에 부착되어 서서히 방출되어^{14,34-36}), 유리된 heparin은 순환 혈액내의 antithrombin III와 결합함으로써 항 응집효과를 나타낸다^{34,37,38}). 또한 혈관 내피세포의 내막에 부착된 heparin은 내피세포의 음전하를 증가시켜 혈관 내강벽에 혈소판이 부착되는 것을 방지하는 작용을 한다^{39,41}). 고 농도의 Heparin의 국소적 사용은 미세혈관수술에 있어 혈전형성의 방지에 유용한 역할을 하며⁴²), Heparin의 전신적 투여에 관한 농도에 대하여 많은 임상적인 후향적 연구가 있어 왔으나 일반적으로는 수술중의 저용량의 heparin을 1회 투여한 후, 수술 후 5-7일 동안 시간당 20-30unit의 투여가 혈중의 형성이 없이 피관의 성공률을 높일 수 있다고 하였다⁴³). 국소적 관주용액으로 Heparin의 이용을 사용하는 많은 보고와 함께 현재 임상적으로 널리 이용되고 있다^{41,44,49}). 혈전용해제는 대표적으로 streptokinase와 urokinase가 많이 이용되어 왔으며 이들은 plasminogen에 작용하여 섬유소를 가수분해시키는 단백용해효소인 plasmin으로 이를 활성화시킴으로써, 혈전의 용해를 촉진시키게 한다⁵⁵). 혈전용해제에 의해 활성화된 plasmin은 섬유소를 분해시킬 뿐만 아니라, fibrinogen을 변형시킴으로써 혈장내의 fibrinogen의 농도를 감소시키게 된다^{45,46}). 이중 Urokinase는 크게 두 가지 요법으로 많이 이용되고 있는데, 첫째는 혈전의 용해요법으로서 이미 형성된 혈전을 용해하여 혈류의 재소통을 목적으로 함이고, 둘째는 혈전형성을 방지하여 혈류의 유지를 목적으로 한다⁴⁷).

혈전은 발생시기에 따라 조기혈전과 후기혈전으로 나눌 수 있는데, 조기혈전은 문합 후 처음 10분 내에 주로 발생되고, 후기 혈전은 첫 48시간 내에 많이 생기며, 72시간이 지나면 그 빈도는 감소된다고 하였다⁴⁸). 본 연구에서는 혈전의 검사를 위해 문합 후 30분 후에 조기혈전여부를 empty-and-refill test로 개존 검사를 시행하고, 7일 후에는 개존 검사 및 문합부 혈관을 절제하여 육안적으로 확인하였다. 본 연구에서는 혈관개존 상태는 Group I, II, III 모두에서 초기 30분 후에는 심하게 감소된 개존된 1례를 제외하고는 비교적 양호하였으나, 문합 후 7일째 다시 개존 검사를 시행한 결과 Group I에서는 4례에서 개존의 심한 실패율을 보여 항혈전제를 투여하지 않은 군에서 개존에 실패한 것으로 유의하게 나타났으며, 6례 모두에서 혈전의 형성이 관찰되었다. Group II, III에서는 각각 문합 7일째 각각 6례에서 개존을 모두 확인하였고 서로 동일한 개존율을 보였으며, 혈전의 형성은 Group II에서는 4례에서 혈전의 생성이 없었으며, 2례에서 소량의 혈전이 관찰되었다. Group III에서는 6례 모두에서 혈전이 관찰되지 않았다.

혈전에 방을 위한 이상적인 헤파린의 투여는 Johnson과 Barker는 최소한 50 U/ml 이상이어야 효과적이라고 하였으며⁴⁹), 전신 투여 시에는 100 U/ml의 농도로 주입하여야 전신적 부작용이 없이 양호한 개존과 혈전에 방을 얻는다고 하였다⁵⁰). 또 어떤 연구에 의하면 20 U/ml 농도의 Heparin을 국소 세척용으로 사용하여 적절한 혈전예방효과를 얻었다고 보고하였으나⁵²), 아직까지는 국소적 세척을 위한 heparin의 적정 농도는 논란의

대상이 되고 있다. 뿐만 아니라, 현재까지의 혈전용해제 사용시에 있어서 혈전용해효과를 정확히 측정할 수 있는 결정적인 지혈혈청학적 지수는 없다. Urokinase의 투여용량은 여러 가지 동물모델이나 임상적으로 쓴 보고는 많지 않다. Claus는⁵¹) Urokinase를 2,000 IU/Kg/hr로 투여했을 때 12-36 시간 내에 50-100 mg의 fibrinogen의 감소가 있었다고 보고한 반면, Zdebllick 등은⁴⁷) 쥐의 뒷다리를 절단시킨 후 25,000 U/ml를 약 20분간 서서히 주입한 결과 양호한 하지의 생존률에 대해 보고하였으며, 최근에는 대체적으로 고용량의 urokinase를 사용한다⁵²). 본 연구에서 Group II의 Heparin의 농도는 heparin(50U/ml)를 혼합하여 혈관내강을 세척하였으며, 나머지 6마리의 urokinase 투여군(Group III)은 lactated Ringer's 용액과 Urokinase(20,000 U/ml)의 혼합액을 이용하였는데, 두 군 모두에서 큰 차이가 없이 양호한 혈전방지 효과를 얻었다.

문합부의 혈관 내막이 재생되어 가는 과정은 여러 문헌들에서 유사한 결과를 나타낸다. 초기 혈관에는 내막세포들이 소실되고 여기에 혈소판이 응집하며 가성내막으로 먼저 덮히게 된다. 주위로 염증성 세포들이 침윤되고, 거대대식세포들이 나타나 재생 활동에 들어가게 된다. 시간이 경과함에 따라 혈관 벽에 섬유세포들이 증식하고 내막세포가 나타나서 완전한 재생을 일으키게 된다. 그러나 내막세포의 재생 시기에 관해서는 아직까지 논란이 있다. Thurston은 약 1주경에 재생이 일어난다고 하였으며⁵³), 어떤 학자들은 2주⁵⁴), 4주⁵⁵⁻⁵⁷), 그리고 Fuch 등⁵⁸)과 Milward 등은⁵⁹) 6주가 되어야 완전한 내막세포의 재생이 일어난다고 하였다 뿐만 아니라 재생되는 내막세포의 기원에 대하여서도 여러 학설이 존재하는 데, Milward는⁵⁹) 혈액내의 단핵세포로부터 화생된다고 하였으며, Mosele는⁵⁷) 혈관 평활근 세포에서, Weinstein⁶⁰), Nitingale⁵⁵) 및 Thurston은⁵³) 주변 정상 내막 세포에서 성장이 일어남을 보고하였다. 본 연구에서의 문합 1주일 후의 조직학적 소견 상, 내막세포의 재생은 관찰할 수 없었다. 문합혈관의 조직학적 변화에 대한 많은 전자현미경적 연구가 보고되어 왔으나, 대부분 미세혈관의 내면이나 외면의 변화만을 관찰하는 주로 주사전자현미경적 소견이며, 투과전자현미경의 소견을 보고한 문헌은 드물다^{60,66}). 본 연구에서 투과전자현미경 상, 문합 후 1주일째에는 모든 군에서 혈관내막이 광학현미경 소견과 유사하게 내막이 파괴되어 있었고, 내막하층이 노출되어 여기에 혈소판이 응집되고 염증성 변화가 일어나 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 주사전자현미경의 소견에서는 봉합사 주변이 무정형의 물질이 덮혀 있었으며 혈구의 수는 미미하였으며, 섬유소들이 관찰되었으나 내피세포의 재생은 보이지 않았다. 봉합사는 섬유소망으로 덮혀 있었다. Group I에서는 불규칙하게 배열되거나, 규칙적으로 배열된 혈관내피세포 내에 적혈구 및 혈전이 관찰되었으며, 봉합사 주위에는 내피세포의 재생이 되지 않았으며, 아직 섬유소, 적혈구들로 덮혀 있었으며, 일부 혈관에서는 섬유소 망이 형성된 부위도 나타났다. Group II에서는 불규칙한 배열의 내피세포 주위로 섬유소 및 적혈구가 관찰되었으며 부분적으로 섬유소가 묻혀있는 부위도 나타났다. 일부에서는 내피세포의 새로운

생성 부위도 나타났으며, 봉합사 주위의 내피세포에 섬유소망이 나타난 부분도 관찰되었다. Group III에서는 봉합사 주위에서 불규칙하게 배열된 내피세포주위에 섬유소가 덮혀 있는 부위가 관찰되었다. 그러나 내막세포의 완전한 재생 과정이나, 재생되는 내막세포의 기원에 대한 연구에 대하여는 더 오랜 기간의 연구기간이 필요하리라고 사료되며, 또한 미세혈관 문합술에서 이용되는 혈전용해제는 아직까지 정형화된 모델이 없으므로 향후 이에 대한 연구가 보다 더 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 국소적 항혈전제인 Heparin과 원섬유소용해성 제제인 Urokinase를 이용하여 미세동맥문합술 부위에 국소적으로 투여하여 동맥문합부의 개존 상태를 검사한 후, 치유상태를 조직학적, 그리고 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 검사 및 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미세동맥 문합 후 30분 후, 7일 후의 개존도 검사 시에 Heparin과 Urokinase를 사용한 군에서는 양호한 개존을 나타내었으나, 혈전용해제를 사용하지 않은 군에서는 불완전한 개존을 나타내었다.
2. 미세동맥 문합 후, 7일 후의 혈전의 양상은 개존도 검사와 유사하게 Heparin과 Urokinase를 사용한 군에서는 혈전이 미미하였으나, 항혈전제를 사용하지 않은 군에서는 다량의 혈전이 발생하였다.
3. 미세동맥문합 7일 후의 톨루이딘 블루 염색에서 모든 군의 동맥벽의 혈관내피세포 및 내탄력막은 부분적으로 파괴되었고, 완전히 치유되지 않았다.
4. 미세동맥문합 7일 후의 주사전자현미경 소견 상, 모든 군에서 봉합사 주위는 혈관내피세포가 소실되었으며, 섬유소로 둘러싸인 혈전이 발견되었다. 그러나 정상 인접부위에서는 잘 배열된 혈관내피세포 층이 관찰되었다.
5. 미세동맥문합 7일 후의 투과전자현미경 소견 상, 모든 군에서 혈관내피세포가 상실된 동맥벽에서 평활근세포 사이에 염증세포의 침투가 관찰되었으며, 봉합사 주위에서 평활근세포는 불규칙한 배열을 보였으며, 콜라겐화가 진행된 부위도 나타났다.

이상의 연구에서 미세혈관문합술시에 국소세척제로서의 Heparin과 Urokinase는 모두 혈관개존 및 혈전억제효과에 있어 유사하게 양호한 효과를 얻을 수 있었으며, 혈관내막의 치유는 문합 7일 후에는 일어나지 않았음을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Romano JE, Biel MA: Thrombolysis in microvascular surgery using tissue-type plasminogen activator. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1989;115:1318-1321.
2. Hergueter CA, Handren J, Kersh R, May JW Jr: Human recombinant

tissue type plasminogen activator and its effect on microvascular thrombosis in the rabbit. Plast Reconstruct Surg 1988;81:418-424.

3. Jacobson JH, Suarez EL: Microsurgery in anastomosis of small vessels. Surg Forum 1960;11:243.
4. Adams WP, Ansari MS, Hay MT, et al: Patency of different arterial and venous end-to-side microvascular techniques in a rat model. Plast Reconstr Surg 2000;105:156-161.
5. Acland R: Thrombus formation in microvascular surgery: An experimental study of effect of surgical trauma. Surg 1973;73:766-771.
6. Khouri RK, Cooley BC, Kenna DM, Edstrom LE: Thrombosis of microvascular anastomosis in traumatized vessels: fibrin versus platelets. Plast Reconstr Surg 1990;86:110-117.
7. Halton RB, O'Brien BM, Morrison A et al: Survival factors in replantation and revascularization of the amputated thumb: 10 years experience. Scand J Plast Reconstr Surg 1984;18:163-168.
8. Shaw WW, Converse JM: A survey of 2680 free flaps: Survival, donor site and applications among experienced microvascular surgeons. Proceedings of the Fiftieth Annual Convention of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. Plast Surg Forum 1981;4:93.
9. Shoop R, Bakerzak SP, Larrimer NR, Lee RE: Surface morphology of early hemostatic reaction. Am J M Sci 1970;260:122.
10. Stemeran MB, Spact TH: The subendothelium and thrombogenesis. Bull NY Acad Med 1972;48:289-301.
11. Holmsen H, Day HJ, Stormorken H: The blood platelet release reaction. Scand J Haematol Suppl 1961;8:3-26.
12. Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and thrombosis: Basic principle and clinical practice. 2nd ed. Lippincott, Philadelphia, pp594, 1982.
13. Matthew HC, William PA: Pharmacologic optimization of microurgery in the new millenium. Plast Preconstr Surg 2001;108:2088-2096.
14. Glimelius B, Busch CH: Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. Thromb Res 1978;12:773-782.
15. Stassen JM: Intraoperative thrombolytic treatment of microarterial occlusion by selective rt-PA Infusion. Plastic and Reconstructive Surgery 1995;96(5):1215.
16. Acland RD, Lubbers LL, Grafton RB, Bensimon R: Irrigating solution for small blood vessel surgery-A histologic comparison. Plast Reconstr Surg 1980;65:460-466.
17. Fernandez EJ, Nadal RD, Gonzalez SM, Caffee HH: The effect of stasis on a microvascular anastomosis. Microsurgery 1983;4:176-177.
18. Pottie R, Rossouw DJ, Zeeman BJ, Lamont A: Experimental reclamping of free-flap pedicles: the effect of prolonged stasis on the anastomosis and clamp site. Plast Reconstr Surg 1987;79:786-795.
19. Acland RD: Prevention of thrombosis in microvascular surgery by the use of magnesium sulfate. Br J Plast Surg 1972;25:292.
20. Born GVR, Gross MJ: Effects of inorganic ions and plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. J Physiology(Lond) 1964;170:397.
21. Palmer B: sympathetic denervation and innervation of cutaneous blood vessels following surgery. Scand J Plast Reconstr Surg 1970;4:93-99.
22. Gordon HS: Experimental evidence for involvement of prostaglandins in viability of acute skin flaps: Effects on viability and mode of action. Plast Reconstr Surg 1981;67:355.
23. Ham JM, Slack WW: Platelet adhesiveness after operation. Br J Surg 1967;54:385.
24. Oneal RM, Knode RE, et al: The effect of low molecular weight dextran on the survival of skin flap in pig's vascularized either by a single artery and vein or by a subdermal plexus. Plast Reconstr Surg 1957;40:496.
25. Goulian D: The use of bromphenol blue in the assay of rheomacrodeseffects on flap viability. Plast Reconstr Surg 1967;39:227.
26. Artruson G, Khanna NN: The effects of hyperbaric oxygen, dimethyl sulfoxide and complamin on the survival of experimental skin flaps. Scand J Plast Reconstr Surg 1970;4:80.
27. Swhney CP: The role of heparin in restoring the blood supply in

- ischemic skin flaps: an experimental study in rabbits. *Brit J Plast Surg* 1980;33:430.
28. Bertele V, et al: Platelet thromboxane synthetase inhibitors with low doses of aspirin: possible resolution of the "aspirin dilemma." *Science* 1983;220:517.
 29. Ljungstroem KG: Prophylaxis of postoperative thromboembolism with dextran 70: improvement of efficiency and safety. *Acta Chir Scand* 1983;514:1.
 30. O' Reilly RA: Anticoagulant, antithrombotic and thrombolytic drugs. In *The Pharmacological basis of therapeutics* 7th ed. Macmillan Publishing. Co. New York, 1985.
 31. Scinclair S: The importance of topical heparin in microvascular anastomosis: a study in the rat. *Br J Plast Surg* 1980;33:422-426.
 32. Zimberg EM, Choo DI, Zotter LA: The effect of heparinized irrigating solution on patency of experimental microvascular anastomosis. *Microsurgery* 1989;10:103-107.
 33. Reichel CA, Croll GH, Puckett CL: A comparison of irrigation solution for microanastomosis. *J Hand Surg* 1988;13A:33-36.
 34. Heibert LM, Jaques LB: Heparin uptake on endothelium. *Artery* 1976;2:26-37.
 35. Mahadoo J, Hiebert LM, Jaques LB: Vascular sequestration of heparin. *Thromb Res* 1977;12:79-90.
 36. Jaques LB, Hiebert LM: The close relationship of heparin and the vessel wall. *Artery* 1989;16:140-150.
 37. Rogenberg RD: Action and interaction of antithrombin and heparin. *N Engl J Med* 1975;292:146-156.
 38. Johnson PC, Barker JH: Thrombosis and antithrombotic therapy in microvascular Surgery. *Clin Plast Surg* 1992;19(4):799.
 39. Srinivasan S, Aaron R, Chopra PS, Lucaset T, Sawyer PN: Effect of thrombotic and antithrombotic drugs on the surface charge characteristics of canine blood vessels: In vivo and in vitro studies. *Surgery* 1968;64:827-833.
 40. Skulesky E, Rudich Z, Danon D: Surface charge properties of luminal front of blood cells: An electron microscopical analysis. *Thumb Res* 1975;7:623-628.
 41. Swartz WM, Banis JC: *Head and neck microsurgery*, Baltimore, 1992, Williams and Wilkins.
 42. Scinclair S: The importance of topical heparin in microvascular anastomosis: a study in the rat. *Br J Plast Surg* 1980;33:422.
 43. Kroll SS, et al: Anticoagulants and hematomas in free flap surgery. *Plast Reconstr Surg* 1995;96(3):643.
 44. Baker SR: Complications of microvascular surgery. In *Bakers SR, editor: Microsurgical Reconstruction of the Head and Neck*. New York, 1989, Churchill Livingstone.
 45. Lattel GL: Thrombolytic therapy: A new strategy for the treatment of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1994;311:710.
 46. Sasahue AA: When and how to use fibrinolytic agents. *Drug Ther* 1984;9:11.
 47. Zdebhick TA, Schaffer JW, Field GA: The use of urokinase in ischemic replanted extrimitities in rats. *J Bone Joint Surg* 1987;69A:442.
 48. O, Brien BM, Hayhurst JW: Principle and techniques of microvascular surgery. In *Converse LM, ed. Reconstructive Plastic Surgery*, 2nd ed., Philadelphia, London, Toronto. Saunders, 1977. pp349.
 49. Johnson PC, Barker JH: Thrombosis and antithrombotic therapy in microvascular surgery. *Clin Plast Surg* 1980;33:422-426.
 50. Hudson DA, Engelbrecht G, Duminy FJ: Another method to prevent venous thrombosis in microsurgery: An in situ venous catheter. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:999-1003.
 51. Clauss A: Gerinnungsphysiologische Schnell methode zur brstimmung des fibrinogens. *Acta Haemat* 1957;17:237.
 52. Leser-Zuschrifften: Dosierung un uber wachung der thrombolysse therapie mit urokinase. *Dtsch Med Wsch* 1980;105:419.
 53. Thurston JB, Buncke HJ, Chate NL, Weinstein PR: A scanning electron microscopy of microarterial damage and repair. *Plast Reconstr Surg* 1976;57:197.
 54. Harashina T, Fujino T, Watanabe S: The intimal healing of microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg* 1976;58:608.
 55. Nightingale G, Fogdestam I, O' Brien BM: Scanning electron microscopic study of experimental microvascular anastomosis in the rabbit. *Br J Plast Surg* 1980;33:283.
 56. Weinstein PR, Mehdom M, Szabo Z: Microsurgical anastomosis, Vessel injury, regeneration and repair. *Serafin D, Buncke HJ (ed) Mosby St Louis, Toronto, London, 1977 pp111-144.*
 57. Mosele HS, Connel RS, Krippaehne WW: Healing of the canine aorta after endarterectomy, A scanning electron microscopy. *Ann Surg* 1974;180:329.
 58. Fuchs JC, Hagen PO: Long-term fate of autologous vein grafts. Microsurgical composite tissue transplantation. *Serafin D, Buncke HJ (ed) Mosby St Louis, Toronto, London, 1977 pp90-110.*
 59. Milward T, Rayner CRW: A method for studying endothelial regeneration in small vessels. *Plast Reconstr Surg* 1979;63:245.
 60. Bjorkerus S, Bondjers G: Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. *Artherosclerosis* 1971;13:335.
 61. Chisolm G, Gainer J, Stoner G: SEM(scanning electron microscope) studies of aortic structure. *Angiologica* 1973;10:10.
 62. Groniowski J, Biczyskova W, Walski M: Scanning electron microscope to biologic investigations. *Lab Invest* 1966;15:1320.
 63. Hoff H, Gottlob R: Ultrastructural changes of large rabbit blood vessels following mild mechanical trauma. *Virchow's Arch Pathol Anat* 1968;345:93.
 64. Stewart G, Ritchie W, Lynch P: Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Path* 1974;74:507.
 65. Sunage T, Shimamoto T, Nelson E: Correlated scnning and transmission electron microscopy of arterial endothelium. In *Scanning Electron Microscopy* ed by O Johari, I Corvin. Reserch Inst, Chicago, 1973, pp459.
 66. Webster W, Bishop S, Geer J: Experimental aortic intimal thickening. *Am J Path* 1974;76:265.

사진부도 설명

- Fig. 1. Low power view of immediate post-anastomosis in Group II.
Fig. 2. High power view of immediate post-anastomosis in Group II.
Fig. 3. High power view of 7 days after anastomosis in Group II.
Fig. 4. Surgical specimen of 7 days after anastomosis.
Fig. 5. Prominent internal elastic lamina, endothelial cells and smooth muscle layer in normal artery.
Fig. 6. Widely discontinued internal elastic lamina, and endothelial cells with smooth muscle cells around suture silk in Group I.
Fig. 7. Locally discontinued internal elastic lamina with suture silk in smooth muscle cells in Group I.
Fig. 8. Numerous discontinued internal elastic lamina, residual endothelial cells with thick smooth muscle layer in Group II.
Fig. 9. Numerous discontinued internal elastic lamina, disorganized smooth muscle cells around suture silk in Group II.
Fig. 10. Discontinued internal elastic lamina under thick smooth muscle cells around suture silk in Group III.
Fig. 11. Discontinued internal elastic lamina, residual endothelial cell and well formed thick smooth muscle layer in Group III.
Fig. 12. Locally discontinued internal elastic lamina, cicatrized smooth muscle layer in Group III.
Fig. 13. Paralleled arrangement of endothelial cells in normal arterial wall(SEM).
Fig. 14. Blood cells on irregular arrangement of endothelial cells in Group I(SEM).
Fig. 15. Paralleled arrangement of endothelial cells covered by fibrin in Group I(SEM).
Fig. 16. Unrecovered endothelial cells, fibrin and blood cells around suture silk in Group I(SEM).
Fig. 17. Mesh formed fibrin covering side in Group I(SEM).
Fig. 18. Conglomerated fibrin and blood cells on endothelial cells in Group II(SEM).
Fig. 19. Fibrin and blood cells on newly forming endothelial cells in Group II(SEM).
Fig. 20. Fibrin network on endothelial cells around suture silk in Group II(SEM).
Fig. 21. Fibrin network and blood cells on endothelial cells around suture silk in Group II(SEM).
Fig. 22. Irregular arrangement of endothelial cells associated with fibrin formation in Group II(SEM).
Fig. 23. Irregular arrangement of endothelial cells covered by fibrin formation around suture silk in Group III(SEM).
Fig. 24. Partially irregular arrangement of endothelial cells associated with fibrin covered side around suture silk in Group III(SEM).
Fig. 25. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered By blood clot in Group I(TEM).
Fig. 26. Smooth muscle cells adjacent to collagenized tissue around suture silk in Group I(TEM).
Fig. 27. Denuded arterial wall composed smooth muscle cells covered by blood clot in Group I(TEM).
Fig. 28. Denuded arterial wall composed smooth muscle cells covered by blood clot in Group I(TEM).
Fig. 29. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered by blood clot and invaded by PMN in Group II(TEM).
Fig. 30. Whorled smooth muscle cells around suture silk in Group II(TEM).
Fig. 31. Whorled smooth muscle cells adjacent to collagenized tissue in Group II(TEM).
Fig. 32. Wavy collagenized smooth muscle cells in Group II(TEM).
Fig. 33. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered by thick blood clot in Group II(TEM).
Fig. 34. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered by thick blood clot in Group III(TEM).
Fig. 35. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered by blood clot and invaded by PMNL in Group III(TEM).
Fig. 36. Denuded arterial wall composed of smooth muscle cells covered by blood clot and invaded by PMN in Group III(TEM).
Fig. 37. Collagenized smooth muscle cells adjacent to spindle shaped fibroblasts in Group III(TEM).

Abbreviation

- PMNL : Polymorphoneuclear Leukocyte
SEM : Scanning Electron Microscopy
TEM : Trasmision Electron Microscopy

사진부도 ①

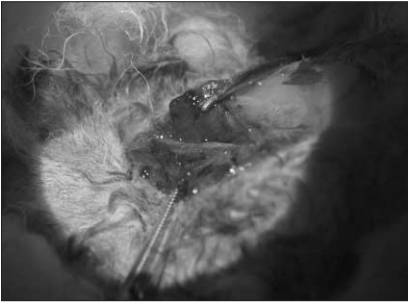


Fig. 1

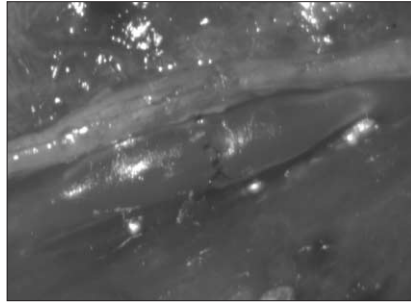


Fig. 2

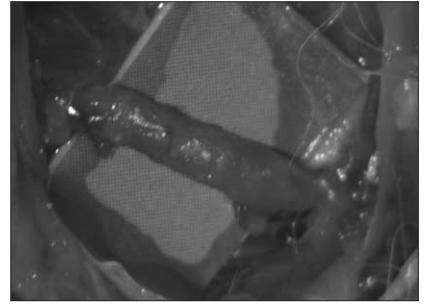


Fig. 3

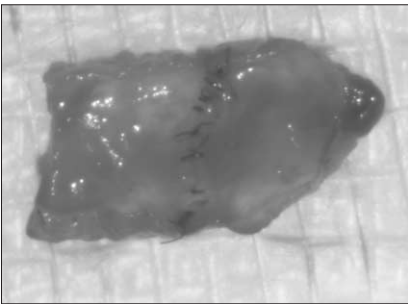


Fig. 4

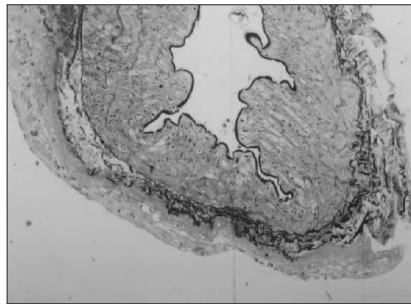


Fig. 5

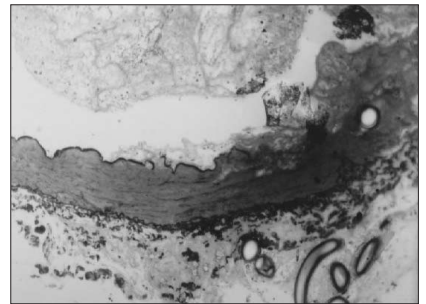


Fig. 6

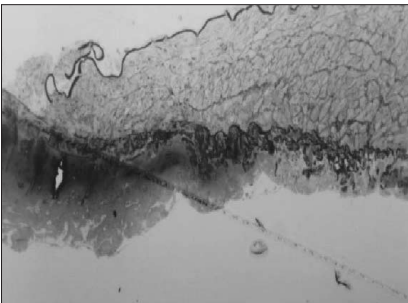


Fig. 7

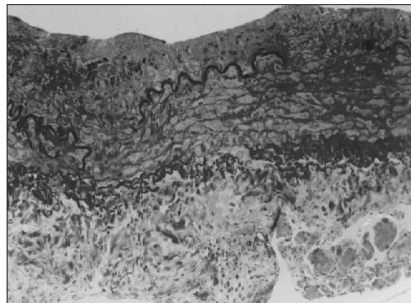


Fig. 8

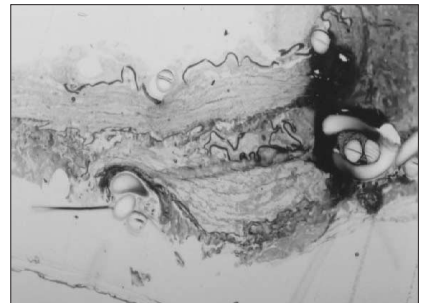


Fig. 9

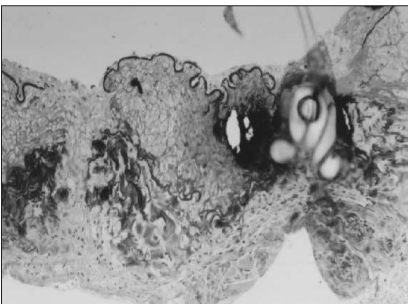


Fig. 10

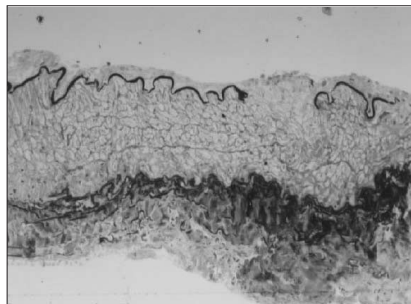


Fig. 11

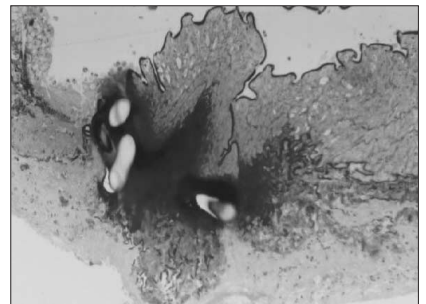


Fig. 12

사진부도 ②

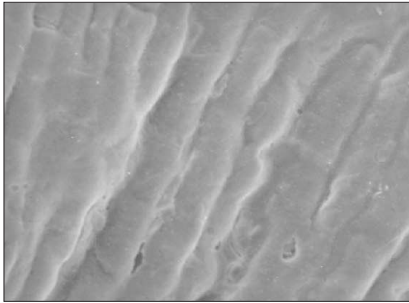


Fig. 13

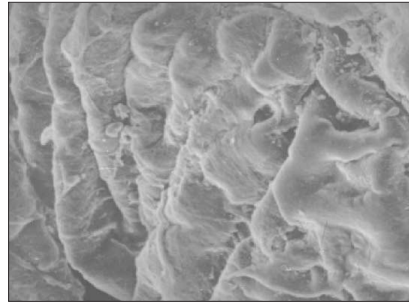


Fig. 14

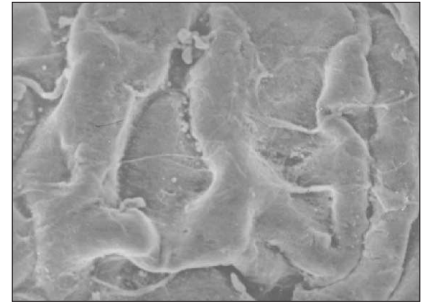


Fig. 15

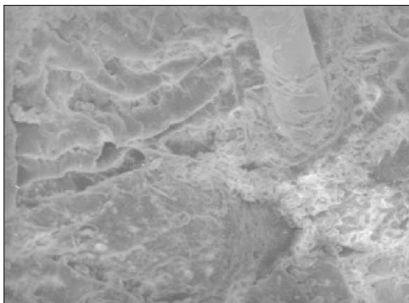


Fig. 16

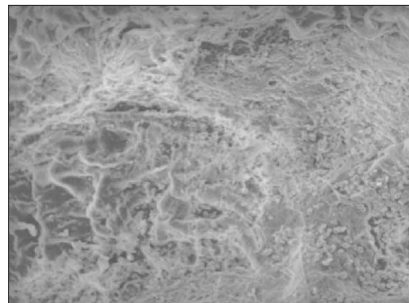


Fig. 17

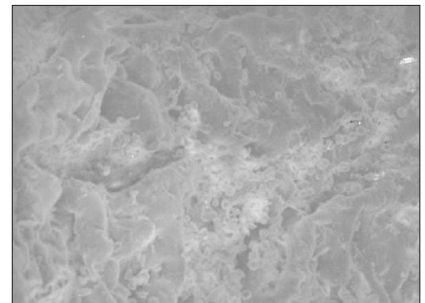


Fig. 18

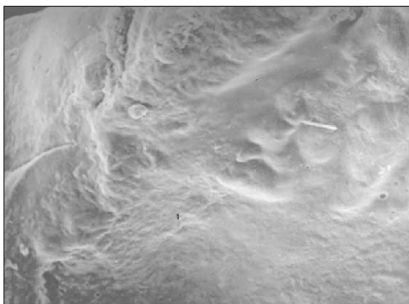


Fig. 19

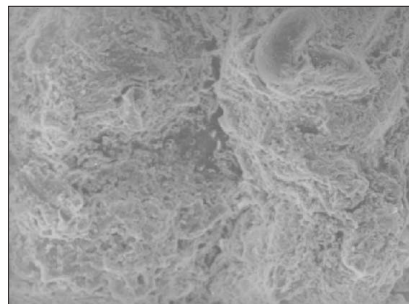


Fig. 20

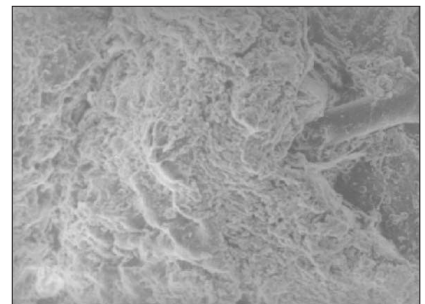


Fig. 21

사진부도 ③

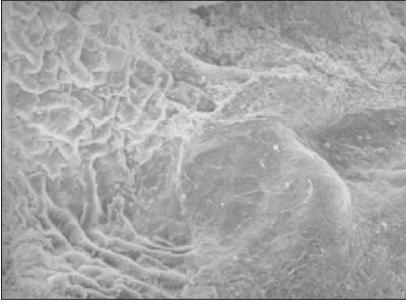


Fig. 22

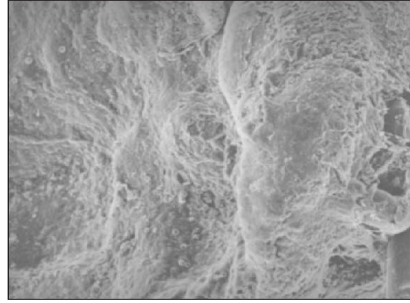


Fig. 23

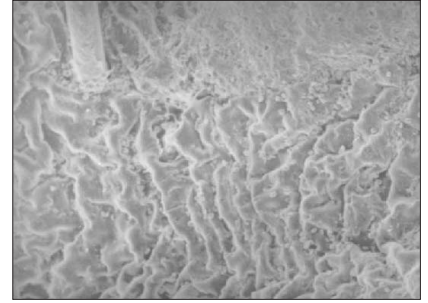


Fig. 24

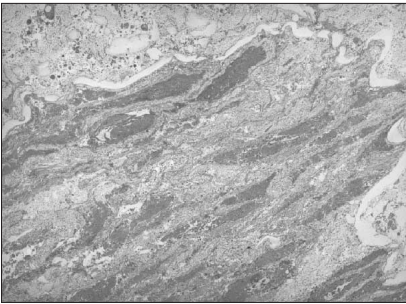


Fig. 25

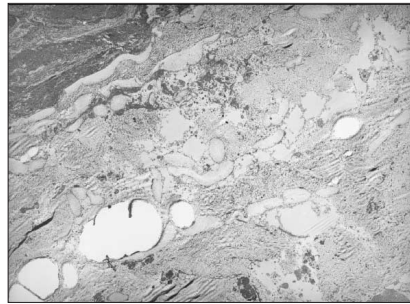


Fig. 26

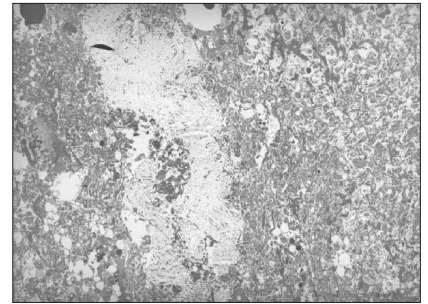


Fig. 27

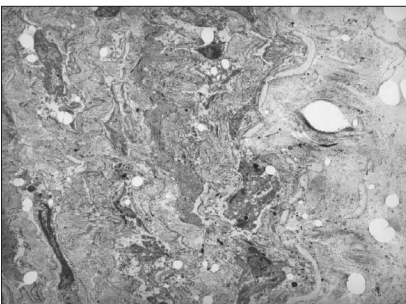


Fig. 28

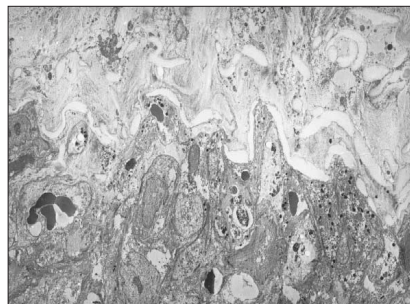


Fig. 29



Fig. 30

사진부도 ④

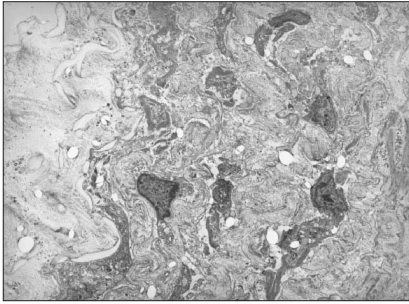


Fig. 31

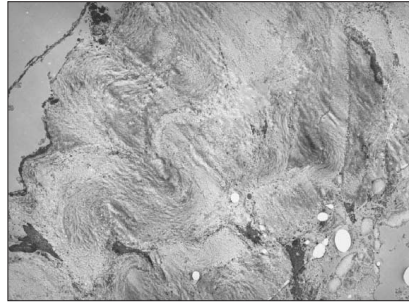


Fig. 32

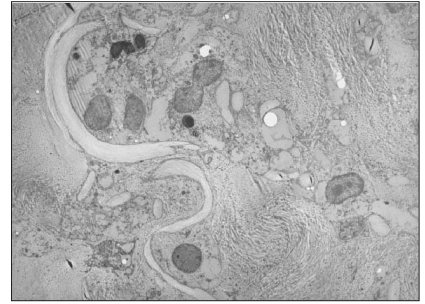


Fig. 33

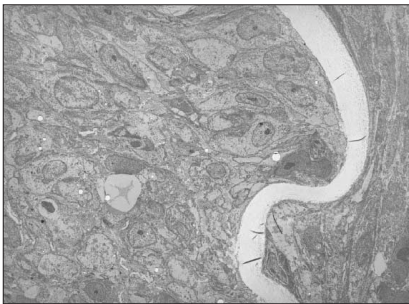


Fig. 34

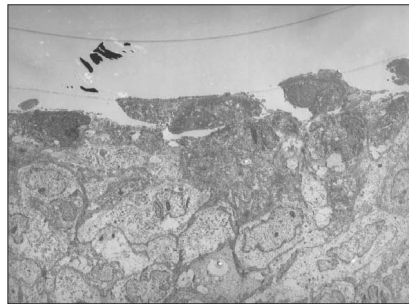


Fig. 35

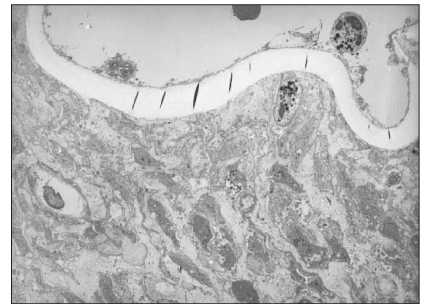


Fig. 36



Fig. 37