

가토 대퇴정맥 미세정맥문합술 후 정맥 문합부 재생에 관한 미세조직학적 연구

노홍섭 · 김철환 · 김경욱

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:340-349)

ULTRASTRUCTURAL STUDY FOR VEIN REGENERATION AFTER MICROVASCULAR ANASTOMOSIS IN RABBIT FEMORAL VEIN

Hong-Seop Rho, Chul-Hwan Kim, Kyung-Wook Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College 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.

In this study, vascular patency and thrombus formation in experimental micro-venous 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-venous anastomosis with heparin irrigation, all of 12 anastomosis site were good vascular patency.
2. In thrombus formation in 2 weeks group(Experimental I), 2 site of 6 cases were observed thrombus, and in 4 weeks group(Experimental II), 1 site of 6 cases were observed thrombus.
3. In histologic examination, normal vein(Control Group) showed continued internal elastic lamina, well formed thick smooth muscle layer and connective tissue. The group of 2 weeks after microvenous anastomosis(Experimental I) showed locally recovered internal lamina, discontinued internal lamina, disorganized smooth muscle cells and granulation tissue around suture silk. In the group of 4 weeks after micro-venous anastomosis(Experimental II), anastomosis site showed almostly continued internal lamina, disorganized smooth muscle cells and cicatrized tissue around suture silk.
4. In scanning electron microscope examination in 2 weeks(Experimental I) after micro-venous anastomosis, mesh fibrin formation showed near to endothelial cells, and in 4 weeks after micro-venous anastomosis(Experimental II), numerous blood cells and fibrin mesh formation was seen associated with irregular endothelial cell arrangement.
5. In transmission electron microscope examination in 2 weeks after micro-venous anastomosis(Experimental I), irregular arrangement of smooth muscle cells was seen adjacent to collagenized tissue around suture silk. In 4 weeks after micro-venous anastomosis(Experimental II), denuded venous wall composed of relatively well arranged smooth muscle cells was covered by endothelial cells, but fibroblast cells and foreign body giant cells near to suture silk was remained.

From the results obtained in this study, results of good vascular patency and anti-thrombotic effect of heparin were obtained as a local irrigation solution, and repair of venous endothelial cell was observed in 2 weeks after micro-venous anastomosis.

Key words: Microvascular anastomosis, Vein, Regeneration

I. 서 론

김 경 욱

330-716 충남 천안시 안서동 29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과

Kyung-Wook Kim

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

29 Amseodong, Choengan, Chungnam, 330-716, Korea

Tel: 82-41-550-1994 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: kkwoms@dku.edu

미세혈관수술법을 이용한 유리조직 이식술은 수술 술기, 수술 재료, 술후 피관의 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, 유리피관의 허혈

시간, 문합부의 혈전 형성, 혈관경축 등이 실패의 중요한 요소로 작용한다³⁵⁾. 이중 유리조직의 지속적인 허혈시간은 유리조직의 혈류량의 감소로 인하여 결국 유리피판의 이식술은 실패로 진행되며, 또한 미세혈관문합부의 혈전 형성은 가장 주된 실패요인의 하나로 간주되고 있다⁶⁾. Halton 등은⁷⁾ 수지절단환자의 문합술 후 혈전으로 인한 실패율을 17%로 보고하였으며, 전 세계적으로도 유리조직이식술에서의 혈관문합술 후의 혈전으로 인한 실패율은 약 10%에 달한다⁸⁾.

혈전의 형성기전은 혈관의 손상으로 인한 혈관내피의 노출로 인하여 주위의 교원질이 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 제제로서 혈액의 점도를 감소시키고, 혈관내피세포에 부착하여 음전하를 강화시켜 혈소판의 부착력을 감소시키며, 섬유소원이 섬유소로 전환되는 것을 억제하여 항혈전 효과를 나타낸다¹⁴⁾. 1980년 Acland 등¹⁰⁾이 다양한 완충용액을 미세혈관문합술에 관주용액으로 사용하여 조직병리학적 효과를 연구한 이래로 많은 미세혈관의과용 제제가 연구되어 왔다. 이러한 항혈전 제제의 국소적 투여가 임상적으로 미세혈관 문합술에 경험적으로 사용되고는 있지만, 혈관문합 후 개존 정도와 혈관내피세포의 재생을 미세 조직학적으로 연구한 문헌은 드물다. 이에 본 연구는 국소적 항혈전 제제인 heparin을 미세정맥 문합술 부위에 국소적으로 투여하여 정맥문합부의 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 3kg 내외의 자성 가토 18마리를 사용하였다. 대조군으로서 정상정맥 채취를 위해서 6마리를, 12마리는 실험군으로 하여 6마리는 정맥문합 후 2주째(실험1군, EXP I), 나머지 6마리는 정맥문합 후 4주째(실험2군, EXP II) 조직학적 관찰을 위하여 배정하였다.

2. 연구방법

(1) 동물실험

동물을 Ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행) 10mg/kg 및 0.15ml/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 2% 염산 리도카인(광명제약)을 침윤 주사하였다. 수술 현미경하에서 천하복벽동맥의 분지부에서 서혜인대까지 주위조직을 박리하여 우측 대퇴정맥을 노출시켰다. 혈관강직을 예방하기 위하여 2% Lidocaine을 5분간 점적하였고, 대퇴정맥의 근위부 및 원위부에 미세혈관용 검자를 장착하여 양단을 고정한 후 정맥을 횡절단하였다. Jewler's forcep과 미세수술용 가위를 사용하여 혈관내막이 노출될 때까지 외막을 제거하였다. 혈관 내강을 이완시킨 후, lactated Ringer's 용액과 heparin(50U/ml)를 혼합하여 혈관내강을 세척하였다. 미세수술 기구를 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 혈관검자를 제거한 후 창상을 증별로 봉합하였으며, 술후 항생제는 사용하지 않았다.

(2) 개존, 혈전 관찰 및 평가

혈관개존(vascular patency) 상태를 파악하기 위하여 empty-and-refill test를 이용하여, 양호한 개존(P0), 약간 감소된 개존(P1), 심하게 감소된 개존(P2) 및 비개존(P3)으로 분류하여 실험 1, 2 군 모두 문합 30분, 7일째 수술현미경 하에서 관찰하였고, 혈전(thrombus) 형성의 평가는 혈전 관찰 안됨(T0), 소량의 혈전 관찰(T1), 중증도의 혈전(T2), 큰 혈전(T3)으로 분류하여, 실험1 군은 2주째, 실험 2군은 4주째, 동물을 희생시킨 후 혈관의 장축에 평행하게 절개를 가하고 수술현미경하에서 혈관내부의 혈전 양상을 관찰하였다.

(3) 표본 제작

실험 1군은 2주째, 실험 2군은 4주째, 동물의 심장에 Ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행)를 다량주사하여 희생시킨 후 문합부를 중심으로 혈관의 장축에 평행하게 절제한 혈관을 채취하였다.

가. 광학현미경적 관찰

절취한 혈관을 10% 중성 포르말린에 고정하고 통법대로 처리하여, 여러 장의 4 μ m 파라핀 절편을 제작하였다. 1% toluidine blue 용액을 사용하여 염색한 후 광학현미경하에서 조직병리학적 특징을 관찰하였다.

나. 주사전자현미경(SEM) 관찰

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

Table 1. Venous Patency at 30minute and 7 days after Microvascular Anastomosis

Patency	Experimental	EXPI		EXP II	
		30min	7 days	30min	7 days
P0		6	5	5	5
P1		0	1	1	1
P2		0	0	0	0
P3		0	0	0	0

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

다. 투과전자현미경(TEM) 관찰

절취한 혈관을 문합부를 중심으로 혈관이 말리지 않게 잘 편 후, 조직을 1mm의 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. 0.2mm 정도 되는 블록에서 초박절편을 제작하고 탄소격자상에 올려놓고 Uranyl acetate와 Lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEOL JEA CX II, JAPAN)으로 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 혈관개존 상태

가. 문합 30분경과 후

각 실험군의 6례씩의 정맥문합 중에서, 실험 1군에서는 모든 정맥문합에서 양호한 개존을 나타내었다. 실험 2군에서는 양호한 개존이 5례, 약간 감소된 개존이 1례였다(Table 1).

나. 문합 7일 후

실험 1군에서는 5례가 양호한 개존을 보였고, 1례가 약간 감소된 개존을 보였으며, 실험 2군에서는 실험 1군과 동일한 결과를 보였다(Table 1).

2. 혈전(thrombus) 형성

실험 1군에서는 4례에서 혈전의 생성이 없었으며, 2례에서 소량의 혈전이 관찰되었다. 실험 2군에서는 5례에서 혈전이 관찰되지 않았으며, 1례에서 중증도의 혈전이 관찰되었다(Table 2).

3. 광학현미경 소견

정상 정맥은 내탄력막이 연결되어 있고 잘 발달된 두꺼운 평활근 세포층과 결합조직층으로 구성되어 있었다(Fig. 1, 2). 문합 2주군(EXP I)에서는 내탄력막의 연속성이 결여되어 있었으

Table 2. Thrombus Formation of Femoral Vein in Anastomosis Area in Experimental I, II after microvascular anastomosis

Thrombus	Experimental	EXP II	EXP III
T1	2	0	
T2	0	1	
T3	0	0	

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

며, 평활근세포층도 불균형을 이루고 있었고, 봉합사 주위에는 육아조직층이 관찰되었다(Fig. 3). 일부에서는 내탄력막의 재생이 나타난 부위도 발견되었다(Fig. 4). 문합 4주군(EXP II)에서는 내탄력막의 연속성이 유지되어 내탄력막의 재생이 이루어 졌으나, 봉합사 주위로 육아조직이 관찰되었고(Fig. 5, 6), 반흔조직이 관찰되는 부위도 나타났다(Fig. 6).

4. 주사전자현미경 소견

정상 정맥의 경우, 규칙적으로 배열된 내피세포를 관찰할 수 있었으며 긴 주름을 형성하였다. 또한 내피세포 주위에 혈구 세포들도 관찰되었다(Fig. 7). 혈관 문합 후 2주군(EXP I)에서는 섬유소 망이 형성된 부위가 관찰되었으며, 불규칙한 배열의 내피세포 주위로 섬유소 및 적혈구가 관찰되었으며 부분적으로 섬유소가 묻혀있는 부위도 나타났다(Fig. 8). 혈관 문합 후 4주군(EXP II)에서는 많은 혈구세포들과 함께 섬유소 망이 관찰되었고(Fig. 9), 봉합사 주위에서 불규칙하게 배열된 내피세포 주위에 섬유소가 덮혀 있는 부위가 관찰되었다(Fig. 10).

5. 투과전자현미경 소견

대조군 정상 정맥에서는 노출된 혈관벽은 내피세포 하방에 잘 발달된 평활근세포층이 관찰되었다(Fig. 11). 혈관 문합 2주

군(EXP I)에서는 봉합사 주위로 불규칙하게 배열된 평활근세포층이 나타났으며, 콜라겐 조직층도 관찰되었다(Fig. 12). 혈관문합 4주군(EXP II)에서는 노출된 혈관벽은 비교적 잘 배열된 평활근세포층 상방의 내피세포층이 관찰되었으나(Fig. 13), 봉합사 주위에는 섬유아세포와 이물반응으로 인한 거대세포들이 관찰되는 부위도 있었다(Fig. 14).

IV. 총괄 및 고찰

미세혈관 문합술 후의 개존률은 유리피판이식술의 성공률에 가장 중요한 요인으로 작용한다. 비록 실패율은 술기의 발전에 따라 많이 감소하였지만 그 실패율은 47%에 달한다. 유리피판의 실패는 문합술 시의 기술적 문제점, 즉 문합시의 혈관벽의 손상, 비정확한 봉합침과 봉합사의 관통 혈관내피세포의 열상, 부정확한 봉합사 간의 위치, 혈관의외막층의 문합부 함입 등이 그 원인은 매우 다양하다. 그 외에도, 문합부의 긴장력, 외부 압박, 혈관의 꼬임 현상이나 혈관손상부에서의 문합 등, 혈관의 상태나 위치에 따라 문합부의 혈전의 생성 가능성은 더 높아진다^{12,69}.

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^{12,30}, 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 관주용이나, 국소세척용, 전신투여용으로 많이 이용되는 항응고제제로서 미세혈관문합술에서의 heparin의 사용은 혈액의 재관류율을 향상시킨다^{31,33}. 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 음

전하를 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 피판의 성공률을 높일 수 있다고 하였다⁴³. 국소적 관주용액으로 Heparin의 이용을 사용하는 많은 보고와 함께 현재 임상적으로 널리 이용되고 있다^{41,44,49}. 혈전예방을 위한 이상적인 헤파린의 투여는 Johnson과 Barker는 최소한 50U/ml 이상이어야 효과적이라고 하였으며⁴⁹, 전신 투여 시에는 100U/ml의 농도로 주입하여야 전신적 부작용이 없이 양호한 개존과 혈전예방을 얻는다고 하였다⁵⁰. 또 어떤 연구에 의하면 20U/ml 농도의 Heparin을 국소 세척용으로 사용하여 적절한 혈전예방효과를 얻었다고 보고하였으나³², 아직까지는 국소적 세척을 위한 heparin의 적정 농도는 논란의 대상이 되고 있다. 뿐만 아니라, 현재까지의 혈전용해제 사용 시에 있어서 혈전용해효과를 정확히 측정할 수 있는 결정적인 지혈혈청학적 지수는 없다. 본 연구에서도 heparin을 이용하여 국소적 적용을 시행하였다. 혈전은 발생 시기에 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. 조기혈전의 용해 과정에 관한 See-Tho 등의 연구에서 완전 폐쇄가 일어나지 않는 소량의 혈전의 용해과정은 anti-thrombin III에 의해 혈전이 용해된다고 하였으며⁶⁷, 내막손상이 일부 나타난 경우에서도 혈전용해 과정이 일어난다는 보고도 있다⁶⁸.

본 연구에서는 혈전의 검사를 위해 문합 후 30분 후에 조기혈전 여부를 empty-and-refill test로 개존 검사를 시행하고, 7일 후에는 개존 검사를 시행하였고, 문합 2주째와 문합 4주째에 혈관을 절제하여 육안으로 확인하였다. 문합 30분경과 후 각 실험군의 6례씩의 정맥문합 중에서, 실험1군에서는 모든 정맥문합에서 양호한 개존을 나타내었다. 실험2군에서는 양호한 개존이 5례, 약간 감소된 개존이 1례였다. 문합 7일 후, 실험1군에서는 5례가 양호한 개존을 보였고, 1례가 약간 감소된 개존을 보였으며, Group 실험2군에서는 실험1군과 동일한 결과를 보였다. 혈전(thrombus) 형성은 실험1군에서는 4례에서 혈전의 생성이 없었으며, 2례에서 소량의 혈전이 관찰되었다. 실험2군에서는 5례에서 혈전이 관찰되지 않았으며, 1례에서 중증도의 혈전이 관찰되었다.

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 일

어난다고 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, Mosele⁶⁷⁾는 혈관 평활근 세포에서, Weinstein⁶⁰⁾, Nitingale⁶⁵⁾ 및 Thurston⁶³⁾은 주변 정상 내막 세포에서 성장이 일어남을 보고하였다. 문합혈관의 조직학적 변화에 대한 많은 전자현미경적 연구가 보고되어 왔으나, 대부분 미세혈관의 내면이나 외면의 변화만을 관찰하는 주로 주사전자현미경적 소견이며, 투과전자현미경의 소견을 보고한 문헌은 드물다⁶⁰⁻⁶⁶⁾. 본 연구에서 광학현미경 소견상, 정상 정맥은 내탄력막이 연결되어 있고 잘 발달된 두꺼운 평활근 세포층과 결합조직층으로 구성되어 있었다. 문합 2주군(실험1군)에서는 내탄력막의 연속성이 결여되어 있었으며, 평활근세포층도 불균형을 이루고 있었고, 봉합사 주위에는 육아조직층이 관찰되었으며, 일부에서는 내탄력막의 재생이 나타난 부위도 발견되었다. 문합 4주군(실험2군)에서는 내탄력막의 연속성이 유지되어 내탄력막의 재생이 이루어 졌으나, 봉합사 주위로는 육아조직이 관찰되었고, 반흔조직이 관찰되는 부위도 나타났다. 주사전자현미경 및 투과전자현미경소견에서는 정상 정맥의 경우, 규칙적으로 배열된 내피세포를 관찰할 수 있었으며 긴 주름을 형성하였다. 또한 내피세포 주위에 혈구세포들도 관찰되었으며, 노출된 혈관벽은 내피세포 하방에 잘 발달된 평활근세포층이 관찰되었다. 혈관 문합 후 2주군(실험1군)에서는 섬유소 망이 형성된 부위가 관찰되었으며, 불규칙한 배열의 내피세포 주위로 섬유소 및 적혈구가 관찰되었으며 부분적으로 섬유소가 묻쳐있는 부위도 나타났으며, 봉합사 주위로 불규칙하게 배열된 평활근 세포층이 나타났으며, 콜라겐 조직층도 관찰되었다. 혈관 문합 후 4주군(실험2군)에서는 많은 혈구세포들과 함께 섬유소 망이 관찰되었고, 봉합사 주위에서 불규칙하게 배열된 내피세포 주위에 섬유소가 덮혀 있는 부위가 관찰되었으며, 노출된 혈관벽은 비교적 잘 배열된 평활근 세포층 상방의 내피세포층이 관찰되었으나, 봉합사 주위에는 섬유아세포와 이물반응으로 인한 거대세포들이 관찰되는 부위도 있었다.

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 없음으로 향후 이에 대한 연구가 보다 더 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 국소적 항혈전제제인 Heparin을 이용하여 미세정맥문합술 부위에 국소적으로 투여하여 정맥문합부의 개존 상태를 검사한 후, 치유상태를 조직학적, 그리고 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 검사 및 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미세정맥 문합 후 30분 후, 7일 후의 개존도 검사 시에 Heparin을 이용하여 문합한 결과, 12마리의 미세정맥 문합에서 모두 양호한 개존을 나타내었다.
2. 미세정맥 문합 후, 문합 2주째(실험1군)의 혈전양상은 6부위 중에서 2례에서 혈전이 관찰되었고, 문합 4주째(실험2군)에는 1례에서 중증도의 혈전이 관찰되었다.
3. 광학현미경 소견 상, 정상 정맥은 내탄력막이 연결되어 있고 잘 발달된 두꺼운 평활근 세포층과 결합조직층으로 구성되어 있었고, 문합 2주군(실험1군)에서는 내탄력막의 재생이 나타난 부위와 연속성이 결여되어 있는 부위가 모두 관찰되었다. 문합 4주군(실험2군)에서는 내탄력막의 연속성이 유지되었다.
4. 주사전자현미경 소견 상, 정상 정맥의 경우, 규칙적으로 배열된 내피세포를 관찰할 수 있었으며 긴 주름을 형성하였다. 문합 2주군(실험1군)에서는 불규칙한 배열의 내피세포 주위로 섬유소 및 적혈구가 관찰되었으며 부분적으로 섬유소가 묻쳐있는 부위도 나타났으며, 문합 4주군(실험2군)에서는 봉합사 주위에서 불규칙하게 배열된 내피세포 주위에 섬유소가 덮혀 있는 부위가 관찰되었다.
5. 투과전자현미경 소견 상, 정상 정맥 혈관(대조군)에서는 노출된 혈관벽은 내피세포 하방에 잘 발달된 평활근 세포층이 관찰되었다. 혈관 문합 2주군(실험1군)에서는 봉합사 주위로 불규칙하게 배열된 평활근 세포층이 나타났으며, 콜라겐 조직층도 관찰되었다. 혈관문합 4주군(실험2군)에서는 노출된 혈관벽은 비교적 잘 배열된 평활근 세포층 상방의 내피세포층이 관찰되었으나, 봉합사 주위에는 섬유아세포와 이물반응으로 인한 거대세포들이 관찰되는 부위도 있었다.

이상의 연구에서 미세혈관문합술시에 국소세척제로서의 Heparin의 효과를 관찰할 수 있었으며, 문합 후 정맥내막의 치유과정에서 문합 후 2주에는 내막의 재생이 일어남을 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 Reconstr 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. Stemerma 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 Reconstr 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. *Plast Reconstr Surg* 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 re-clamping 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 Syrg* 1957;40:496.
25. Goulian D: The use of bromphenol blue in the assay of rheomacroses effects 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. *Br 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 extrimities 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-Zuschrigften: 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 electon microscopie 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 scanning and transmission electron microscopy of arterial endothelium. In *Scanning Electron Microscopy* ed. 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.
 67. See-Tho K, Harris EJ: Thrombosis with outflow obstruction delays thrombolysis and results in chronic wall thickening of rat veins. *J Vasc Surg* 1998;28:115-123.
 68. Segel B, Swami V, Can A, Parsons RE, Golub RM, Kolecki R, Kitamura H: Intimal hyperplasia producing thrombus organization in an experimental venous thrombosis model. *J Vasc Surg* 1994;19:350-360.

사진부도 설명

Fig. 1. Continued internal elastic lamina, remained endothelial cells, well formed thick smooth muscle layer and connective tissue in Control Group.

Fig. 2. Continued internal elastic lamina, remained endothelial cells, blood cells and connective tissue in Control Group.

Fig. 3. Discontinued internal lamina, disorganized smooth muscle cells and granulation tissue around suture silk after 2 weeks in Experimental I.

Fig. 4. Locally recovered internal lamina, loose connective tissue after 2 weeks in Experimental I.

Fig. 5. Continued internal lamina, disorganized smooth muscle cells and cicatrized tissue around suture silk in Experimental II.

Fig. 6. Almostly recovered internal lamina, smooth muscle cell layer and cicatrized tissue in Experimental II.

Fig. 7. Blood cells attached to regular arrangement of endothelial cells in Control Group.(SEM)

Fig. 8. Mesh fibrin formation near to endothelial cells after 2 weeks in Experimental I.(SEM)

Fig. 9. Numerous blood cells and fibrin mesh formation associated with irregular endothelial cell arrangement after 4 weeks in Experimental II.(SEM)

Fig. 10. Irregular arrangement of endothelial cells associated with fibrin covered side around suture after 4 weeks in Experimental II.(SEM)

Fig. 11. Denuded venous wall composed of smooth muscle cells covered by endothelial cells in normal vein (Control Group)(TEM).

Fig. 12. Irregular arrangement of smooth muscle cells adjacent to collagenized tissue around suture silk after 2 weeks in Experimental I.(TEM).

Fig. 13. Denuded venous wall composed of relatively well arranged smooth muscle cells covered by endothelial cells after 4 weeks in Experimental II.(TEM).

Fig. 14. Fibroblast cells and foreign body giant cells near to suture silk remain after 4 weeks in Experimental II.(TEM)

Abbreviation

SEM : Scanning Electron Microscopy

TEM : Transmission Electron Microscopy

사진부도 ①

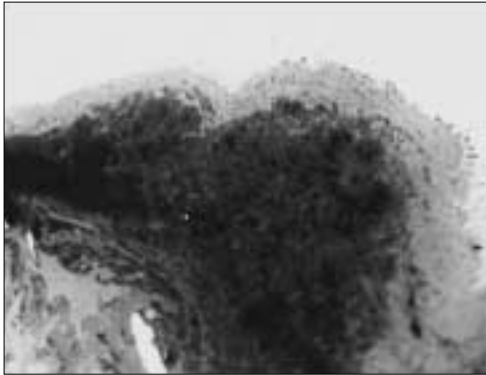


Fig. 1



Fig. 2

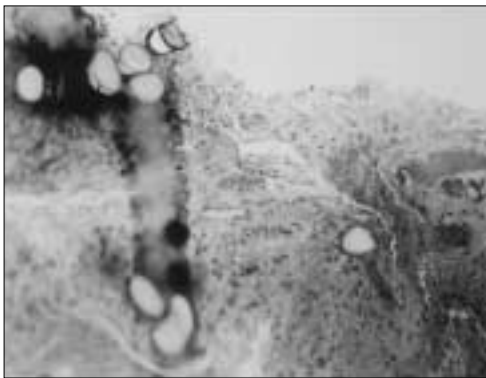


Fig. 3

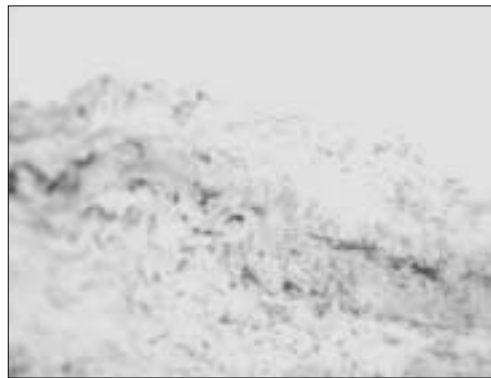


Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

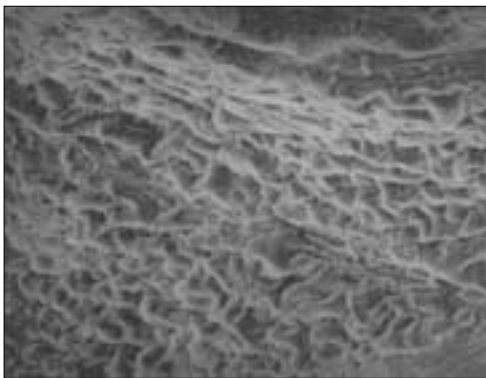


Fig. 7

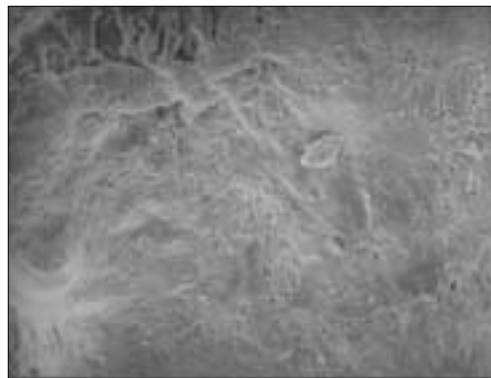


Fig. 8

사진부도 ②

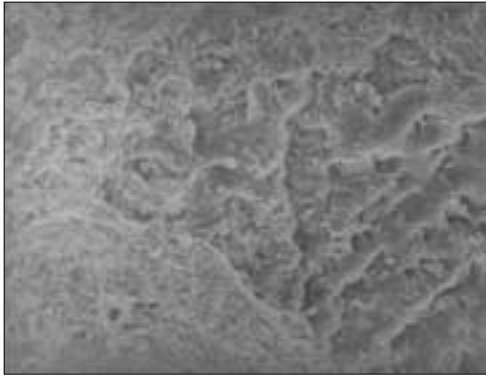


Fig. 9

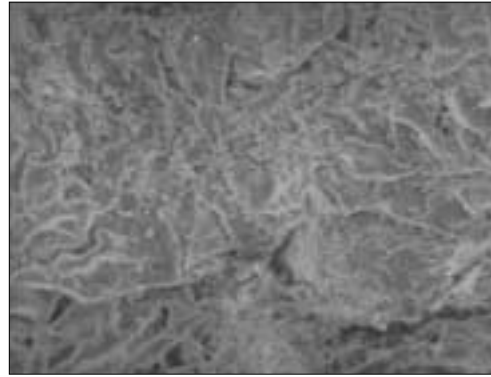


Fig. 10

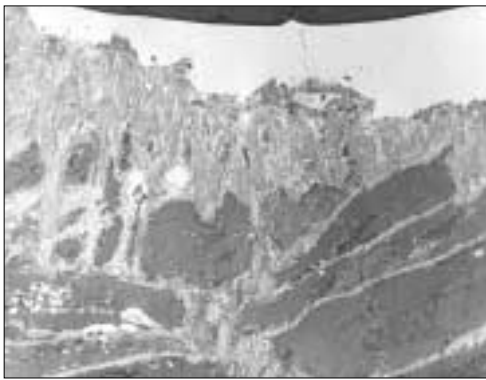


Fig. 11

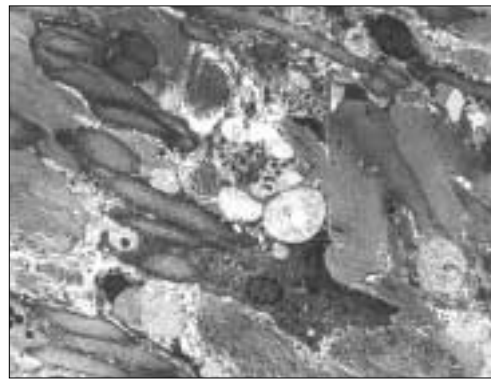


Fig. 12



Fig. 13

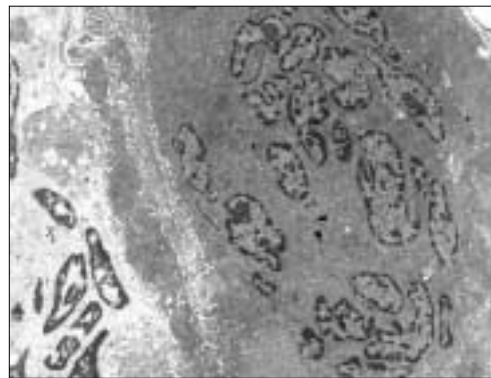


Fig. 14