

여러 수액들의 Irrigation이 백서의 미세혈관 내피에 미치는 영향*

이화여자대학교 의과대학 성형외과학교실

윤진호·김한중

= Abstract =

Effect of Various Irrigation Fluids on Arterial and Venous Endothelium after Ischemia

Chin Ho Yoon · Han Joong Kim

Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University

This study examines the extent of endothelial damage following a period of irrigation with various crystalloid irrigation fluids. Both arteries and veins were evaluated after irrigation with normal saline, lactated Ringer's, balanced salt solution(BSS), and balanced salt solution plus(BSS⁺). The arterial and venous endothelia were examined with the scanning electron microscope. Using a randomized blind observer scoring system, micrographs were evaluated for changes in nuclear shape, cell junction integrity, cytoplasm changes, and sloughing of the endothelial cell layer. BSS⁺ and BSS produced statically significant(P<.001) improvement over the other two irrigation fluids in the arteries. BSS⁺ and BSS were statically superior(P<.001) in the venous vessels. The compositions of BSS and BSS⁺ tend to maintain a physiologic environment in the presence of ischemia. These maintained a morphologic appearance closer to that of perfusion-fixed controls. The data suggest a protective effect of such physiologic preparations on the endothelium. The preservation of intact endothelium may play a role in decreased platelet activation, continued production of prostacyclin, and maintenance of an intact barrier between the intra-cellular and extracellular spaces. This could enhance the survival of transplanted or transferred tissue, by helping to maintain nearly normal endothelium during surgery.

서론

성형외과 영역에서 미세혈관 문합술이 보편화 되었으며, 허혈기간 이후에 발생하는 미세혈관내

*본 연구는 이화여자대학교 교수연구기금 연구비 지원으로 이루어졌음.

의 손상의 원인과 정도를 규정하고 이를 방지하기 위한 많은 연구가 있어왔다. 특히, 미세혈관 문합시 혈관내에 잔존해 있는 내용물 제거에 사용적합한 수액으로 heparinized lactated Ringer's나 heparinized saline을 사용하였으나 이러한 수액에 의한 내피의 손상등 문제점이 논의되어 왔던 바 저자

들은 더욱 생리적이라고 사료되는 두가지의 수액, balanced salt solution(BSS)과 balanced salt solution plus(BSS+)를 혈관계척액으로 이용하여, 그 결과를 비교 연구하고자 한다. 백서의 대퇴동맥과 정맥에서 normal saline, lactated Ringer's, BSS, BSS+를 사용하여 내피 손상의 정도를 비교하였다.

실험 재료 및 방법

실험동물로는 평균 체중 약 250gram의 음성 Sprague Dawley albino rats 200마리를 대상으로 하여 사료 및 생활 조건을 일정하게 하였다. 마취는 ethanol 흡입으로 마취유도후 ketamine(케타라, 유한양행, 500mg/cc)을 2cc/kg씩 복강내 주사하여 유지시켰다. 서혜부에서 완전히 절단 후 대퇴동맥에 gauze needle이 부착된 1cc주사기로 수액을 주사 하였다(사진 1). 수액으로서는 normal saline(NS), lactated Ringer's(LR), balanced salt solution(BSS), balanced salt solution plus(BSS+)를 사용하였고(사진 2, 표 1) 각 수액 100ml에 heparin 1000 Unit를 혼합하여 1분에 0.8cc 주사하였다. 각 혈관을 30분간 irrigation한 후 동맥과 정맥을 절취하여 주사현미경 검사를 위해 0.1M sodium cacodylate buffer로 고정하고, sodium cacodylate buffer의 3% glutaraldehyde로 pH 7.4로 조정했다. 주사현미경을 사용하여 내막의 조직학적 변화를 관찰하고, 각 수액의 내막에 대한 효과를 10점 만점으로 채점하였다(부도 1).

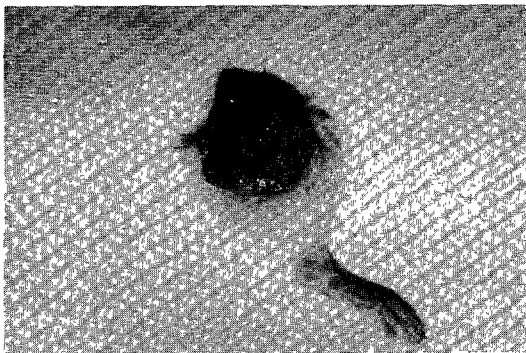


사진 1. 서혜부 절단 후 대퇴동맥을 노출한 모습.

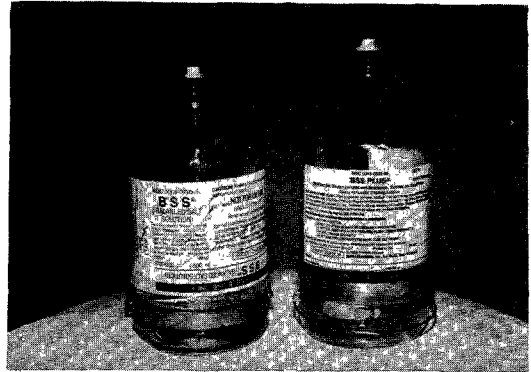


사진 2. 수액으로 사용한 balanced salt solution과 balanced salt solution plus.

Table 1. Composition of irrigation fluids

	NS	LR	BSS	BSS ⁺
Sodium(mEg/l)	154	130	145	154
Chloride(mEg/l)	154	112	129	131
Potassium(mEg/l)		4	10	5
Calcium(mEg%)		6	6	2
Magnesium(mEg/l)			3	2
Lactate(mEg%)		28		
Acetate(mEg%)			29	
Citrate(mEg%)			6	
Phosphate(mEg%)				25
Bicarbonate(mEg%)				25
Glucose(mEg%)				5.1
Glutathion(mg%)				0.3
Heparin	1000u/100ml in all fluids			

결 과

A. 동 맥

주사현미경 소견상 동맥의 관주법(irrigation)에 있어서 BSS+는 다른 수액보다 뚜렷하게 내막의 손상이 적었다(표 2). normal saline을 사용한 혈관에서는 내막이 균열되고 불규칙하며 정상적인 주름이 결여되었고, 세포 접합부 파괴가 보였다(사진 3). lactated Ringer's를 사용한 혈관에서는 정상적인 주름을 유지하고 있었으나, 부분적으로 세포질의 개창 및 세포 부속현상이 일어났다(사진 4). BSS에서는 전반적인 내피의 세포배열은 잘 유지되어 있으나, 부분적으로 세포질의 개창을 볼

SCORING

Nucleus and cytoplasm :

- 3 flattened, non-prominent and elliptical nucleus no fenetration on cytoplasm
- 2 flattened, non-prominent and elliptical nucleus no vacuoles and minimal fenestration on cytoplasm
- 1 prominent and elliptical nucleus minimal fenestration and minimal vacuoles on cytoplasm
- 0 mis-shapen and raised nucleus vacuoles and severe fenestration on cytoplasm

Cell junctions :

- 3 well defined, no stretching
- 2 demarcated, well defined, minimal stretching
- 1 moderate stretching without complete disruption
- 0 disruption of junction

Overall :

- 4 no sloughing
- 3 minimal sloughing
- 2 moderate sloughing
- 1 severe sloughing

Fig. 1. 내막의 조직학적 변화에 대한 scoring system.

Table 2. Arterial irrigation results

Fluid	No. of specimens	Mean score
NS	12	5.85 ± 1.37
LR	12	6.08 ± 1.21
BSS	12	6.21 ± 1.62
BSS ⁺	12	8.17 ± 1.16

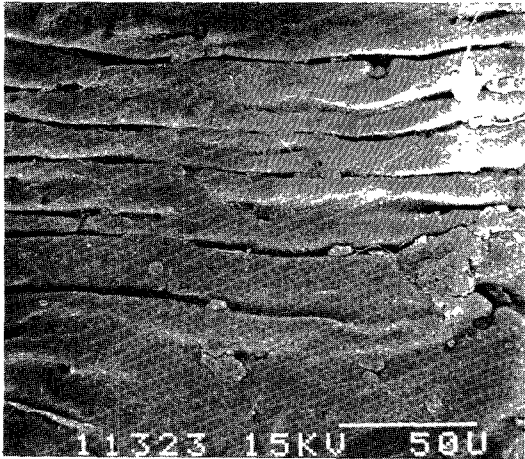


사진 3. normal saline 사용한 동맥실험군 SEM ×400 정상적인 fold의 소실과 불규칙하고 균열된 내막 보임.

수 있었다(사진 5). BSS⁺에서는 정상과 유사한 내피형태의 보존상태를 나타냈다. 특히 세포 접합부의 손상이 최소였으며 세포질은 개창되지 않

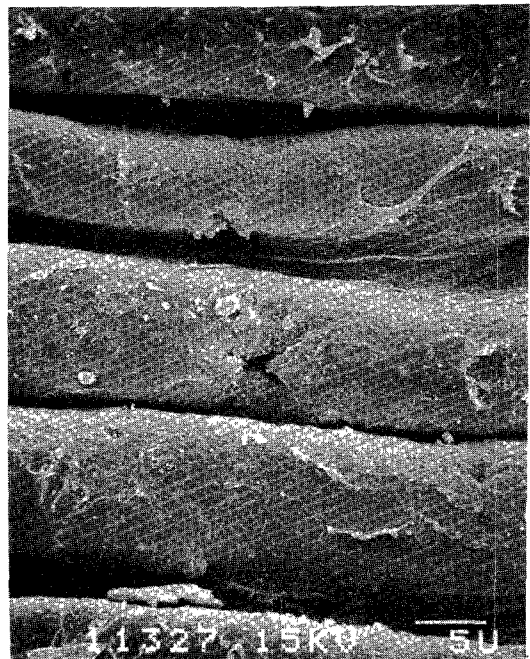


사진 4. Lactated Ringer's 사용한 동맥. SEM ×2000 정상적인 주름은 유지하나 세포부육현상 보임.

았고, 공포 현상(vacuolization)의 증후를 거의 나타나지 않았고, 핵은 타원형이었다(사진 6).

B. 정 맥

정맥 내막의 보존에 있어서 BSS⁺와 BSS가 NS,

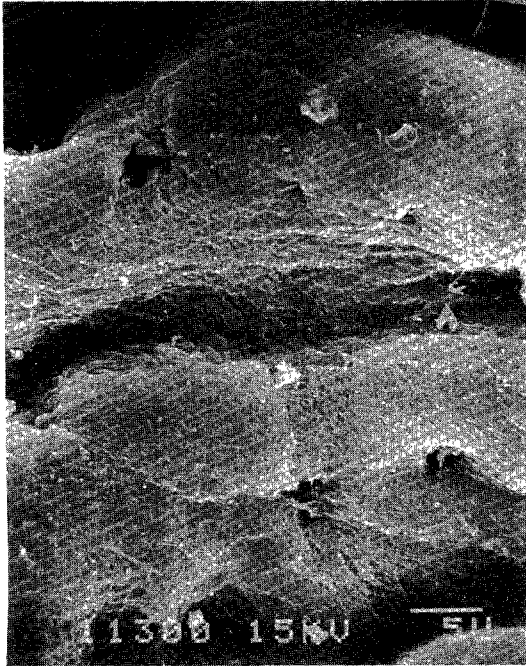


사진 5. BSS 사용한 동맥 SEM $\times 2000$ 내피의 세포 배열은 유지되나 세포질의 개창 보임.

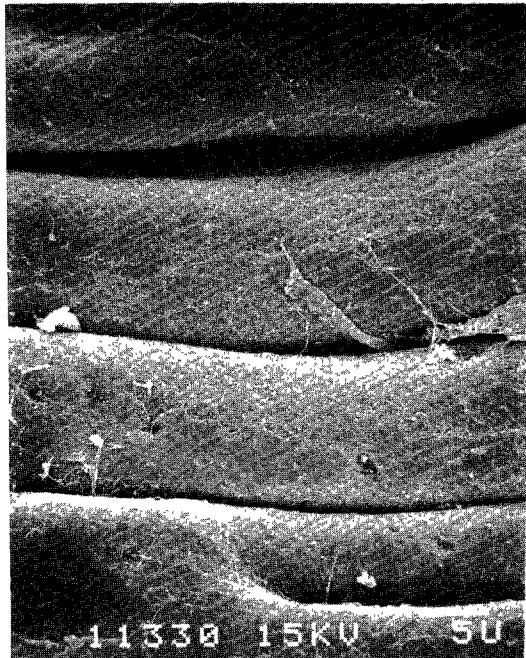


사진 6. BSS+ 사용한 동맥 SEM $\times 2000$ 정상과 유사한 내피상태가 보존됨.

Table 3. Venous irrigation results

Fluid	No. of specimens	Mean score
NS	12	6.75 ± 1.28
LR	12	6.91 ± 1.26
BSS	12	8.08 ± 0.57
BSS ⁺	12	8.41 ± 0.64

LR보다 더욱 우월한 것으로 평가되었다(표 3). normal saline에서는 세포질의 손상 및 세포 접합부의 개창이 있었다(사진 7).

lactated Ringer's에서도 normal saline에 비해 정도의 차이는 있으나, 세포질의 변화와 세포층의 파괴를 보였다(사진 8). BSS에서는 세포질의 변화가 거의 없으며, 내피도 잘 유지되어 있었다(사진 9). BSS⁺에서는 대조군 정맥과 거의 유사하게 세포질의 변화나 세포 접합부의 파괴, 부유 현상이 없이 내막이 잘 유지되어 있었다(사진 10).

고 찰

성형외과 영역에서 미세혈관 문합술이 최초로



사진 7. Normal saline 사용한 정맥 SEM $\times 1000$ 세포질의 손상 및 세포 접합부의 개창 보임.



사진 8. Lactated ringers를 사용한 정맥. SEM×1000 세포질의 변화와 세포층의 파괴 보임.

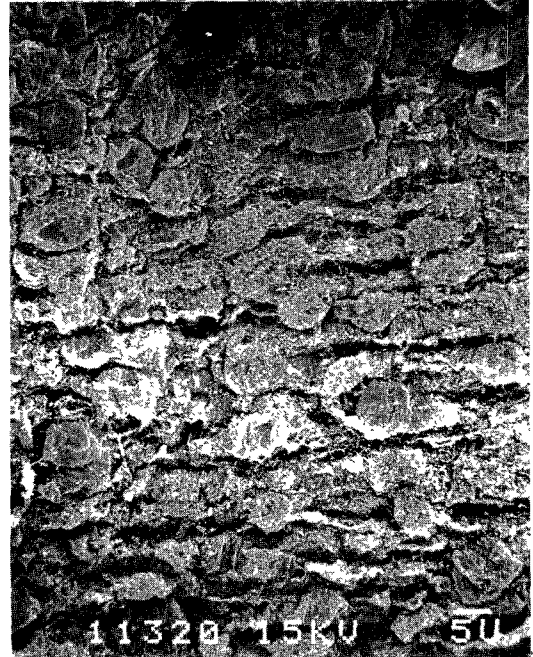


사진 10. BSS+ 사용한 정맥 SEM ×1000 세포질의 변화나 세포접합부의 파괴없이 내막이 잘 유지됨.



사진 9. BSS 사용한 vein SEM ×1000 세포질의 변화가 거의 없으며 내피도 잘 유지됨.

소개된 것은 1960에 Jacobson과 Suarez²⁾가 외경 3mm인 혈관문합에 성공한 것으로, 이후 미세혈관 문합술은 다양한 영역에서 통상술기로 사용되고 있다. 미세혈관 문합술시에 허혈기간 이후에 발생하는 혈관내 손상의 원인과 정도를 규정하기 위해 많은 연구가 있었으며¹⁾ 관주법과 관류법(perfusion) 수액은 수술도중과 후에 조직생존에 잠재적으로 도움이 되는 것으로 여겨왔다³⁾⁴⁾. 혈관 내피는 보통 사용되는 수액에 의한 생화학적 변화에 민감하여⁵⁾⁶⁾ 이는 특히 저산소증과 이온 변화율에 민감한 결과로서 관주후의 내막의 상태는 손상 정도의 지표로서 사용할 수 있다⁷⁾⁸⁾. 그러므로 미세혈관 문합술 동안 내막세포의 형태와 기능을 보호함으로써 조직생존을 증진시킬 수 있을 것이다. 내피는 세포내외와 세포의 공간사이의 해부학적 장벽으로 작용하여 삼투압과 수압의 균형을 유지하는데 직접 관계가 있고⁹⁻¹¹⁾ 또 다른 기능으로는 glyocalyx의 생산과 prostaglandin의 생산과 prostaglandin의 생산과 유출의 기능이 있다¹²⁻¹⁷⁾. 이러한 내피의 기능 유지를 위해서는 수많은 대사적

요구(metabolic reuirement)를 만족시켜야 하므로, 많은 연구자들이 사용 적합한 수액을 찾기 위해 고심해 왔으며 대부분의 학자들은 손쉽게 구할 수 있는 lactated Ringer²¹⁾나 normal saline²²⁾을 선택해서 사용하는 현실이다. 본 실험에서는 normal saline과 lactated Ringer's의 내피형태 보존능력을 두가지의 수액, 즉 BSS와 BSS⁺로 비교하였다. 후자의 두 수액은 안과 수술시 각막의 내피를 보존하기 위해 고안된 등장액으로 1976년 Edelhauser⁸⁾ 각막내피 관주시 여러 수액들보다 손상이 적었다고 보고하였다.

BSS는 pH 7.4의 등장액으로 acetate와 citrate 성분을 포함하고 있으며 BSS⁺는 glucose glutathion을 포함시킨 BSS formula의 변형으로²³⁾²⁴⁾ 각막 내피세포의 보호를 위해 BSS를 보완발전시킨 최신의 수액이다²⁵⁾²⁶⁾. 이들 수액에 포함된 성분의 중요성은 다음과 같다. 허혈기간 중 조직 내 산소량은 속히 감소하게 되며, 세포에서의 에너지 합성은 비능률적인 방법으로 된다. 이것은 세포를 유지할 수는 있으나 대사물, 가장 중요하게는 glucose와 citrate의 손실이 일어난다. 이때, 부산물로 젖산이 생기며Ca⁺⁺의 증가가 오게 된다. 이러한 에너지 chain을 계속한다면 xanthine oxidase-superoxide radical system에 들어가게 된다. 이와같이, 세포의 생화학적 상태가 허혈에 의해 손상되는 것은 에너지원의 공급과 산소공급으로써 완화될 수 있다¹⁾. 즉 관주수액은 glucose를 신속히 공급하며 최종산물을 제거하고 생리적인 pH를 유지하기 위한 buffer를 제공해야 한다. 또한 superoxide radical scavenging system에 중요한 cofactor로써 glutathion이 있다. 이는 수용성으로 세포의 세포막을 통해 수동적으로 확산되는 경향이 있는 성분이다. 세포막은 superoxide radical에 의해 손상받기 쉬우며, radical scavenging은 세포막의 원상태를 유지하는데 도움이 될 수 있다⁸⁾²⁶⁾. BSS는 생리적 pH에서 BSS⁺와 유사한 이온성분과 buffer system을 함유하고 있으며, 동맥실험에서는 현저한 내막유지를 나타내지 않고, 정맥실험에서 단지 약간의 효과만을 나타낸다. 이와같은 두가지 수액의 성분을 비교하면 내막 유지의 원인이 에너지원의 공급이나 superoxide radical scavenging system의 유지에 있음을 암시해 준다. 결과적으로

BSS⁺는 허혈기간중 내막의 손상을 예방하기 위해 가장 큰 가능성을 갖는 수액으로서 임상적으로 수액의 선택에서 고려해야 할 것으로 사료된다.

결 론

이상과 같이 여러 수액들의 관주가 미세혈관 내피에 미치는 영향에 대해 관찰한 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 동맥에서는 BSS⁺가 다른 수액에 비해 정상에 유사한 내피형태를 보였으며 이러한 차이는 다른 실험군에 비해 통계상으로 뚜렷했다(p<.001).

2) 정맥내피의 보존에 있어서는 BSS⁺가 BSS가 NS, LR보다 더욱 우월한 것으로 평가되었다(p<.001).

3) BSS는 NS, LR에 비해 혈관 내피손상이 적었으며 BSS⁺는 본 실험에서 다른 수액에 비해 가장 이상적인 혈관세척액으로서 임상이용에 고려되어야 한다.

References

- 1) Dell PC, Seaber AV, Urbabiak JR : *The effect of systemic acidosis on Perfusion of replanted extremities. J Hand Surg* 1980 ; 5 : 433-438
- 2) Jacobson JH, Suarez EL : *Microsurgery in anasomosis of small vessels. Surg Forum* 1960 ; 11 : 243-246
- 3) Harashina T and Buncke HJ : *Study o washout solutions for microvascular replantation and transplantation. Plast Reconstr Surg* 1975 ; 56 : 542-547
- 4) Flores J, et al : *The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. J Clin Invest* 1972 ; 51 : 118-122
- 5) Ashford TP and Frieiman DG : *The role of the endothelium in the initial phases of thrombosis. An electron microscopic study* 1967 ; 50 : 257-261
- 6) Leaf A : *Cell swelling A factor in ischemic tissue injury. Circulation* 1963 ; 48 : 455-459
- 7) Dikstein S, Maurice DM : *The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. J Physiol* 1972 ; 221 : 29-35
- 8) Edelhauser HF, VanHorn DL, Schultz RO, Hyn-diuk RA : *Comparative toxicity of intraocular irrigating solutions on the corneal endothelium. Ame*

- J Ophthalmol* 1976 : 170 : 627-638
- 9) Morison AD, Orci L, Berwick L, et al : *Morphology and metabolism of an aortic intima-media preparation in which an intact endothelium is preserved.* *J Clin Invest* 1976 : 57 : 650-655
 - 10) Morrison AD, Orci L, Berwick L, et al : *The effects of anoxia on the morphology and composite metabolism of the intact aortic intima-media preparation.* *J Clin Invest* 1977 : 59 : 1927-1934
 - 11) Morrison AD, Orci L, Berwick L, Winegrad AI : *A new look at the metabolism of the arterial wall.* *Trans Assoc Am Physicians* 1976 : 89 : 237-241
 - 12) Thorgeirsson G, Robertson AL : *The vascular endothelium-Pathobiologic significance.* *Amer J Pathol* 1978 : 93 : 803-808
 - 13) Hammersen F, Hammersen E, Osterkamp-Baust U : *Structure and function of the endothelial cell.* *Prog Appl Microcirc* 1983 : 1 : 1-8
 - 14) Ryan JW, Ryan US, Habliston D, Martin L : *Synthesis of prostaglandins by pulmonary endothelial cells.* *Trans Assoc Am Physicians* 1978 : 91 : 343-347
 - 15) O'Malley MK, Nikat EM, McCann RL, Hagen P-O : *Increased vascular sensitivity to norepinephrine following injury.* *Surg Forum* 1984 : 35 : 445-448
 - 16) Bunting S, Moncada S, Vane JR : *Antithrombotic properties of vascular endothelium.* *Lancet* 1977 : 1075-1078
 - 17) Lehninger AL : *The metabolism of the arterial wall.* In *lansing AL(ed.) : The Arterial Wall Aging Structure and Chemistry.* Baltimore : The Williams and Wilkins Co., pp220-246, 1959
 - 18) Harashina T, Buncke HJ : *Study of washout solutions for microvascular replantation and transplantation.* *Plas Reconstr Surg* 1975 : 56 : 542-548
 - 19) Chait LA, May JW Jr, O'Brien CM, Hurley JV : *The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps.* *Plast Reconstr Surg* 1978 : 61 : 421-426H
 - 20) Hicks TE, Boswick JA Jr, Solomons CC : *The effects of perfusion on an amputated extremity.* *J Trauma* 1980 : 65(4) : 460-465
 - 21) Acland RD, Luffers LL, Grafton RB, Bensimon R : *Irrigating solutions for small blood vessel surgery-A histologic comparison.* *Plast Reconstr Surg* 1980 : 65 : 4690-468
 - 22) Mazer N, Barbieri CH, Goncalves RP : *Effect of different irrigating solutions on the endothelium of small arteries : Experimental study in rats.* *Microsurg* 1986 : 7 : 9-13
 - 23) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN : *Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation.* *Surg* 1983 : 94 : 428-435
 - 24) Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, et al : *The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps.* *Ann Surg* 1983 : 198(1)
 - 25) Merrill DL, Fleming TC, Girard LJ : *The effects of physiologic balanced salt solutions and normal saline on intraocular and extraocular tissues.* *Amer J Ophthalmol* 1960 : 49 : 895-898
 - 26) McCarey BE, Edelhauser HF, VanHorn DL : *FRunctional and suructural changes in the corneal endothelium during in vitro perfusion.* *Invest Ophthalmol* 1973 : 12 : 410-419