

헤파린의 국소 도포가  
임의형 피부 괴판 생존에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

양 은 정

헤파린의 국소 도포가  
임의형 피부 괴판 생존에 미치는 영향

지도 김석원 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2008년 7월 18일

연세대학교 대학원

의 학 과

양 은 정

# 양은정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원  
의학과  
2008년 7월 18일

## 감사의 글

감사합니다.

이 논문을 완성할 수 있도록 도와주신 모든 분들께 진심으로 감사를 드립니다. 논문 주제 선정과 구체적인 실험 진행 과정에서 함께 고민해 주시고, 실질적인 조언으로 격려해 주신 김석원 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한, 저의 연구를 격려해 주시고 학문적 사고와 어려움을 푸는 지혜를 가르쳐 주시고, 부족한 면을 도와주신 성형외과 교실 선생님들께 감사드립니다.

끝으로 오늘에 이르기까지 사랑과 이해로 뒷받침하여 주신 부모님과 동생에게 이 조그마한 영광을 돌립니다.

2008년 7월

양은정 올림.

# 차 례

## 표차례

표 1. Survival area of the skin flaps . . . . .	6
------------------------------------------------	---

## 그림 차례

그림 1. A random pattern skin flap . . . . .	17
그림 2. Application of the microneedle on the skin flap . . . . .	17
그림 3. Survival area of the flap measured by VISITRAK® . . . . .	17
그림 4. Laser Doppler flowmetry . . . . .	17
그림 5. Vessel formation of the central area of the flap . . . . .	18
그림 6. Number of vessels of critical zone of the skin flaps. . . . .	18
그림 7. Laser Doppler flux of mcroneedle with heparin groups . . . . .	18
그림 8. Laser Doppler flux value of control and experimental groups . . . . .	19
그림 9. Correlation between Doppler flux and survival rate . . . . .	19
그림 10. Flap necrosis . . . . .	19

국문 요약 . . . . .	1
-----------------	---

제 1 장 서론 . . . . .	2
--------------------	---

제 2 장 재료 및 방법 . . . . .	4
-------------------------	---

2.1. 실험동물 . . . . .	4
---------------------	---

2.2. 수술 준비 및 방법 . . . . .	4
---------------------------	---

제 3 장 결과 . . . . .	6
--------------------	---

제 4 장 고찰 . . . . .	7
--------------------	---

제 5 장 요약 및 결론 . . . . .	12
-------------------------	----

참고 문헌 . . . . .	13
-----------------	----

영문 요약 . . . . .	16
-----------------	----

## 헤파린의 국소 도포가 임의형 피부 피관 생존에 미치는 영향

임의형 피부 피관 작성 후 피관 허혈부의 국소 혈류 증진에 대한 헤파린의 영향을 평가하기 위하여, 마우스의 배부 피관을 이용하여 실험을 진행하였다. 헤파린을 피부 피관에 국소 도포한 후 피관의 생존 부위, 혈관 형성, 미세 혈류를 관찰하여 대조군과 비교 관찰하였다. 분자량이 500-700Daltons 이상인 유효 성분을 피부를 통하여 전달하고자 할 때에는, 세포막의 투과도나 전달 물질의 친지성을 증강시키거나 세포간 결합을 변형시켜야 한다. 분자량이 약 20,000Daltons 인 헤파린은 피부를 통한 전달이 제한되므로 전달을 증강시킬 수 있는 방법을 고려해야 한다. 본 연구에서는 분자량으로 인한 피부 전달의 제한점을 극복하기 위하여, 임상에서 쉽게 적용할 수 있는 미세 바늘 롤러(microneedle roller)를 이용하였다.

Hairless mouse 총 25 마리의 배부에 1.5x5 cm 꼬리쪽에 기저를 둔 임의형 피부 피관을 작도하였다 생리식염수만 도포한 군, 미세 바늘만 적용한 군, 헤파린만 도포한 군, 미세 바늘을 적용한 후 생리식염수를 도포한 군, 미세 바늘을 적용한 후 헤파린을 도포한 군으로 분류하여 군당 5 마리씩 수술 후 7 일간 실험 시행한 후, 피관의 생존률과 혈류를 측정하였다. 생존 면적을 평가한 결과, 미세 바늘로 헤파린의 피부 전달을 증가 시킨 군에서 유의하게 피관의 생존률이 높았고, 레이저 도플러를 사용하여 측정한 수술 후 미세 혈류는 높게 유지되었다. 그러나, 피관 허혈부내에 미세 혈관의 형성여부를 조직병리학적 관찰한 결과, 실험군과 대조군과의 차이가 의미 없었다.

본 실험에서 허혈성 피부 피관의 생존에 미세 바늘을 이용한 헤파린의 국소 투여로 생존률의 향상을 기대할 수 있었고, 이것은 헤파린 고유의 항응고작용에 의한 혈전 형성 방지와 미세 혈류 보존에 의한 것으로 사료된다.

(핵심되는 말: 헤파린, 국소 도포, 미세 바늘 롤러)

# 헤파린의 국소 투여가 임의형 피부 피관 생존에 미치는 영향

<지도 김 석 원 교수>

연세대학교 대학원 의학과  
양 은 정

## I. 서 론

피부 피관의 괴사는 감염이나 심부 조직의 노출을 초래하고, 결과적으로 이차 재건 수술을 필요로 하며, 입원 기간의 연장을 초래하기 때문에 피부 피관의 생존은 성형외과 영역에서 매우 중요한 수술적 관심 사항 중의 하나이다. 피부 피관의 생존을 위해서는 피관의 크기와 위치, 혈액 공급을 증대시키기 위한 지연 형성, 그리고 혈류량의 지속적인 유지 등을 고려하여야 한다. 혈류의 지속적인 유지는 특히 피관의 긴장, 중력, 압력, 혈종을 등의 물리적인 요인과 미세 혈관계의 혈전 형성 등이 혈액 공급을 방해하는 요인이 될 수 있다. 미세 혈관의 혈전 형성에 대한 기전은 아직까지 확실히 알려져 있지 않으며, 촉발 요인으로 피부관 작성 후 교감 신경 자극에 의한 미세 혈관의 수축<sup>1</sup>, 미세 혈관에서 혈류의 서행으로 인한 적혈구의 응집<sup>2</sup>, 프로스타글란딘에 의한 혈관의 수축과 혈소판의 응집 또는 술 후 혈소판의 접합력

증가<sup>3</sup> 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이와 더불어 관련된 원인을 제거하고, 피부 피관 생존을 증대시키기 위한 유효 성분에 대한 많은 연구가 진행되어왔다. 이러한 원인들 중에서 교정 가능한 것을 되도록 빨리 처치할수록 혈류가 저하된 피관의 생존률을 높일 수 있다.

헤파린은 가장 잘 알려진 항응고제 중의 하나로 내인 응고계에 작용하여 혈전 형성을 방지하고, 혈소판의 응집에 길항작용을 한다. 또한 혈관내피세포 성장 인자(EGF)와 강력히 결합하여 미세 혈관형성에도 관여 한다.<sup>4</sup> 헤파린은 주로 정맥이나 피하주사의 형태로 사용되지만, 정맥투여는 경우에 따라서 출혈과 같은 부작용이 있을 수 있고 투여 용량에 세심한 주의가 필요하기 때문에, 헤파린의 전신적 사용에 따르는 부작용을 피하면서 체내에 전달하기 위해 구강이나 향문, 호흡기 또는 피부 등의 전달 경로에 대한 연구가 활발하다.<sup>5</sup> 허혈적 변화에 의한 피관부의 국소적 괴사를 방지하기 위하여 헤파린을 피부 피관에 직접 투여하여 적용할 수 있는데 헤파린은 20,000Daltons 에 이르는 큰 분자량을 가진 물질로 피부를 통한 전달에 제한이 있다. 피부를 통해 분자량이 500-700Daltons 이상인 물질을 전달하고자 할 때는 세포막 투과도나 전달 물질의 친지성을 증강시키거나, 세포간 결합을 변형시켜야 한다.<sup>6</sup> 피부 투과도를 증가시키기 위해 화학적 증강물질을 이용하거나 이온영동법이나 전기천공법등의 물리적인 방법을 이용할 수 있다. 약물의 피부 투과를 위하여 연구된 다양한 방법들은 그 원리는 달라도 피부의 각질층을 뚫고 유효 성분을 전달하는데 충분한 구멍을 만든다는 점에서 공통점이 있다. 이 중 미세 바늘을 이용하여 각질층에 미세한 구멍 즉, 표피층을 직접 관통하는 통로(transcellular route)로 유효 성분을 전달하는 방법은 분자의 극성이나 분자량에 의한 영향을 최소화할 수 있으며 임상적 적용이 용이하여 분자량이 큰 헤파린을 피부를 통하여 전달하는 방법으로 선택하였다. 또한 피부에 미세 바늘을 적용할 때 접촉시간이 짧고, 통각 섬유가 위치하는 곳까지 접근하지 않기 때문에 통증도 유발되지 않는다. 본 저자는 피부 피관의 허혈부에 미세 바늘을 적용 한 후 헤파린을 국소 투여함으로써 피관 생존률에 미치는 영향에 대하여 연구하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 12 주 내외의 체중 30-40gm male hairless mouse 25 마리를 사용하였다. 쥐의 배부에 1.5x5 cm 피부 피판을 1 개씩 작도하였다. 실험동물은 아래와 같이 5 개의 관찰 그룹으로 나누어 조작하였다.

그룹 1(n=5)	배부에 작성한 임의형 피부 피판에 수술 직 후부터 하루에 4 회 생리식염수를 도포하였다.
그룹 2(n=5)	배부에 작성한 임의형 피부 피판에 수술 직 후부터 하루 한 번 미세 바늘 롤러(MTS(Microneedle therapy system); Unison Medical, Korea)를 가로 세로 각각 3 회 롤링하였다.
그룹 3(n=5)	배부에 작성한 임의형 피부 피판에 수술 직 후부터 헤파린용액을 하루에 4 회 도포하였다.
그룹 4(n=5)	배부에 작성한 임의형 피부 피판에 수술 직 후부터 하루에 한 번 미세 바늘 롤러를 가로 세로 각각 3 회 롤링하고, 생리식염수를 하루에 4 회 도포하였다.
그룹 5(n=5)	배부에 작성한 임의형 피부 피판에 수술 직 후부터 하루에 한 번 미세 바늘 롤러를 가로 세로 각각 3 회 롤링하고, 헤파린용액을 하루에 4 회 도포하였다.

### 2. 수술 준비 및 방법

포크랄(4% chloral hydrate, 40 mg/ml)을 마우스(hairless mouse)의 복강 내에 주사하여 마취 하였다. 수술 부위는 베타딘 10%와 알코올을 사용하여 소독하고, 모든 조작을 무균적으로 하였다. 마우스의 배부에 1.5X5cm 크기의 임의 피판을 꼬리쪽에 기저를 두도록 도안하고 피부와 육상층(panniculus carnosus)을 함께

포함하는 피관을 거상한 후, 다시 원래의 위치에 놓고 #5-0 black nylon 을 사용하여 단순 봉합하였다 (Fig. 1). 이 때, 피관을 봉합한 부위로 약물이 새어 들어가지 않도록 피관을 단단히 봉합한다. 미세 바늘(길이 500  $\mu\text{m}$ , 직경 250  $\mu\text{m}$ )이 달린 미세바늘 롤러(roller body width 21.5 mm, 8 microneedles/disc, 25 discs(total needle: 200/unit), Union Medical<sup>®</sup>) (Fig. 2)를 피관 전체 길이에 하루에 한 번 적용하였다. 미세바늘 롤러는 회 당 가로 세로 방향으로 세 번씩 왕복 적용하였다. 수술 직 후부터, 하루에 4 회 헤파린을 피부 피관에 직접 도포하였다. 피관 거상 후 7 일째에 약물 도포를 멈추었고, 먼저 수술 후 8 일째 피관 생존 면적을 평가하였다. 생존이 모호한 위험 부위는 생존 구역에서 제외하기로 하였고, 피관의 생존 영역을 그릴 수 있는 투명한 필름에 옮겨 VISITRAK<sup>®</sup> (Smith & Nephew, co) (Fig. 3)으로 피관의 생존 면적을 측정하고, 전체 피관 면적에서 생존률을 구하였다.

다음으로 헤파린이 혈관 형성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 각 피관의 위험 부위 즉, 중앙부를 10x10 mm<sup>2</sup> 생검 후 헤마톡실린에오진(Hematoxylin & Eosin) 염색을 하여 광학현미경하에서 혈관 형성상태를 관찰하였다. 100 배율에서 조직 표본 슬라이드 사진을 무작위로 5 부위를 측정 한 후 3 개 사진을 무작위로 선정하여 혈관의 숫자를 계산하였다(Fig. 4). 사진을 촬영한 실험자 이외의 다른 실험자가 포토샵 프로그램상에서 모세 혈관의 숫자를 세고, 측정값의 평균을 대표값으로 사용하였다. 모세혈관은 절단된 모양에 상관없이 혈관 형태를 띠는 것을 모두 포함하여 숫자를 세었다. 또한, 피관의 혈행 상태를 관찰할 목적으로 레이저 도플러(Periscan<sup>®</sup> PF 5010, Perimed ) (Fig. 5)로 직선형 프로브(probe 407-1)를 사용하여 피관의 기저부, 중앙부와 말단부의 관류를 측정하였다. 혈액의 관류(Blood perfusion)는 움직이는 혈구의 농도(concentration of the moving blood cells)와 혈구의 평균 속도(velocity)를 곱한 값으로, 레이저 도플러는 이러한 관류의 상대값을 측정하며, 단위는 PU(perfusion unit)으로 나타내었다. 각 피관의 관류정도는 수술 전에 측정된 값에 대하여 상대값으로 표기하였다. 수술 전에 피관의 중앙부에 사인펜으로 표기한 후, 수술 전, 수술 직 후, 수술 후 1 일째부터 5 일간 매일 혈행 상태를 관찰하였다. 통계학적 유의성을 Kruskal-Wallis test 와 Mann-Whitney U test 로 검정하였다.

### III. 결 과

각 Group 의 피판 생존 면적을 측정한 후 생존률을 표기하였다(표 1). 단위 % (mm<sup>2</sup>)

	Control	Microneedle	Heparin	Microneedle+ Saline	Microneedle + Heparin
1	45 (33.8)	54.8(41.1)	58.7(44.0)	56(42.0)	65.2(48.9)
2	39(29.3)	46.9(35.2)	52.6(39.5)	55.9(41.9)	69.4(52.1)
3	50.2(37.7)	53.8(40.4)	59(41.1)	50.1(37.6)	73.5(55.1)
4	47(35.3)	55(41.3)	54.8(45.8)	58(43.5)	59(44.25)
5	48.5(36.4)	52(39.4)	61(42.9)	53(39.8)	68(51)
mean±SD	45.9(34.5)±4.33	52.5(39.4)±3.35	57.2(42.9)±3.42	54.6(41)±3.08	67.0(54.4)±5.39

표 1. Survival area of the skin flaps

총 33 마리의 마우스의 배부 피부 피판을 시행하였으나, 이 중 3 마리는 마취약의 과다 복용으로 수술 후 조작하면서 죽었고, 3 마리는 수술 후 2 일째에 죽었다. 그룹 5 의 2 마리는 피판에 실험 초기에 혈종이 형성되어 피판의 괴사 및 감염을 초래하였고, 피판의 생존률을 평가하기에 적절하지 않아 실험에서 제외하였다. 총 33 마리에서 25 마리를 대상으로 하였다. 수술 후 8 일째 평가한 피판의 생존률은 미세 바늘을 적용한 후 헤파린을 도포한 그룹이 나머지 다른 그룹에 비하여 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았다(표 1). 그러나 위험 부위(중양부)의 혈관의 개수는 그룹간의 의미 있는 차이가 없었다(Fig. 6). 모든 그룹에서 수술 직 후에 관류 감소를 보이다가 수술 후 1 일째에는 관류가 다시 증가하였으나, 수술 전의 기본 값에는 미치지 못하였다(Fig. 7). 대조군과 각 실험군의 중양부의 미세 혈류를 레이저 도플러를 이용하여  $PU$ (perfusion unit)를 측정하여 비교한 결과, 미세 바늘을 적용한 후 헤파린을 도포한 실험군(그룹 5)에서 혈류가 높게 유지되었다(Fig. 8). 특히 수술 후 1 일 째 관류량은 피판의 생존 면적과 양의 상관 지수가 높았다(pearson correlation 0.667)(Fig. 9). 수술 후 4 일에서 5 일째부터 실험적으로 생존 영역이 구분될 때, 피판의 위험 부위에서는 혈류가 차차 감소하고, 피판의 말단부가 괴사를 일으키면서 혈류가 급격히 감소하였다(Fig.10).

## IV. 고찰

헤파린은 점액다당류(mucopolysaccharide)로서 주된 작용은 트롬보플라스틴 생성을 억제함으로써 프로트롬빈이 트롬빈으로 변형되는 것을 방지하여 항트롬빈의 활성도를 증가하며, 부 작용으로 혈액응고인자 V, IX, XI 를 억제한다. 헤파린은 이미 형성된 혈전을 용해시키기 보다는 혈전 형성을 방지시키는데 효과가 있으며, 혈소판 응집을 길항하는 작용을 한다.<sup>5</sup> 또한, 비만세포에서 유리되는 성분 중 유일하게 혈관 내피세포의 이동을 자극하여 혈관 형성을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>4</sup> 헤파린이 피판의 생존을 향상시키는 기전은 정확히 알려져 있지 않으나, 피판이 허혈 상태에 이르면 혈관 내피세포의 투과도와 수소이온의 축적을 줄여서 조직의 허혈 손상으로 인한 피해를 줄이고<sup>7</sup>, 파이브로넥틴(fibronectin)과 작용하여 내피세포 성장인자와 내피세포의 결합에 관여하여 혈관 형성 과정을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>4,8</sup> 또한, 헤파린의 항염증성 특성이 백혈구 매개-자유유리기(leukocyte-mediated free radical) 손상을 감소시킨다고 하지만, 피판의 생존을 향상시키는 기전은 산소자유유리기 치유(oxygen free radical scavenger) 기전과는 다른 것으로 추정되고 있다.<sup>7</sup> 토끼의 임의형 피부 피판에 헤파린을 1 일 4 회 총 200IU/kg/day 을 투여하였을때, 응고 시간의 2.7 배 증가와 피판 생존률의 증가를 보였고<sup>9</sup>, 돼지의 축피판과 임의형 피판에 헤파린을 400, 800/kg/day 을 삼투 펌프(osmotic pump)를 이용하여 지속적으로 주입하였을때 pTT 가 정상의 1.5 배까지 증가되었지만 피판 생존률의 증가는 없었다.<sup>10</sup> 쥐의 도서형 피부 피판에 헤파린을 전신 투여한 경우에는 신생혈관화를 촉진하여 재관류후에 피판 생존의 향상이 보고되었다.<sup>11</sup>

헤파린과 LMWH(low-molecular weight heparin)은 가장 흔하게 쓰이는 항응고제 중의 하나로 주로 정맥이나 피하 주사를 이용한다. 그러나 헤파린의 정맥 투여는 출혈, 혈소판 감소증, 과민반응(hypersensitivity reactions)과 일부에서 골다공증과 같은 부작용을 유발할 수 있어 투여 용량에 세심한 주의가 필요하다. 특히, 수술 후 피판 생존에 영향을 줄 수 있는 혈전 형성의 가능성에도 불구하고 출혈과 혈중 형성에 대한 위험 때문에 전신적 사용을 주의 해야 한다.<sup>11</sup>

약물을 국소적으로 도포하는 방법은 피관 생존에 충분한 양의 용량을 투여할 수 있고, 술기가 간편하며, 필요한 용량을 원하는 부위에 적용할 수 있다. 피관 허혈부에 선택적으로 미세혈류 개선에 관계된 약물을 전달할 수 있다면, 전신적인 부작용을 피하면서 허혈 및 괴사 예방에 중요 역할을 수행할 수 있다.<sup>5</sup> 그러나 피부를 통한 약물 전달은 각질층에 일정 크기(500-700Da)이상의 큰 분자량을 가진 유효 성분을 이동시키기 어려운 제한점이 있다. 피부를 통하여 약물 등의 유효성분을 효과적으로 전달하기 위한 다양한 방법에 대해 많은 연구가 되어 있다. 먼저, 각질층을 변형시키거나, 라이포솜(liposome) 등의 전달 물질이나 투과 증강 물질(penetration enhancer)들을 이용할 수 있다.<sup>12</sup> 라이포솜은 유효성분을 둘러쌀 수 있는 이중 분자구조를 가진 콜로이드성 입자로서 각질층에서 약물의 전달을 촉진한다.<sup>12</sup> 최근에는 라이포솜으로 둘러싼 헤파린을 분사 도포할 수 있는 스프레이 형태가 얇은 정맥 혈전증(superficial venous thrombosis)의 보조적 치료제로 등장했다.<sup>13</sup> 이러한 라이포솜 헤파린 스프레이는 실험을 통하여 효과적인 피부 투과도가 증명되었고<sup>14</sup>, 피부에 흡수되었을 때 라이포솜으로부터 헤파린이 서서히 유리되어 항응고 작용을 유지한다.<sup>15</sup> 또 인지질, 글리코시드와 혼합된 겔(gel) 형태의 치료제가 개발되어 혈전성 정맥염이나 정맥류성 정맥염 치료에 보조적으로 활용되고 있다.<sup>16-18</sup> 각질층의 세포들은 10-20%의 수분을 포함하는데 외부 환경에 의해 수분 포화도가 달라질 수 있다. 각질층의 수분 함량이 많아지면 각질층을 통한 유효 성분의 투과율을 상승시킬 수 있다. 이외에도 Azone, DMSO, alcohols, 지방산 등의 물질은 각질층의 지질구조를 파괴시킴으로써 투과성을 증가시킨다.

피부를 통한 약물 전달을 증대시키기 위한 물리적 방법에는 세포막의 전류를 변화시키거나, 유효 성분이 세포막을 건너뛸 수 있도록 빠르게 분사하거나 피부에 직접 전달을 위한 통로를 만들 수 있다.<sup>5,19</sup> 우선 피부에 초음파를 적용하여 특정 수준에 도달하면 세포간 간격에 큰 분자들을 투과시킬 수 있는 공동화(cavitation)와 세포막의 에너지 소실을 초래하는 초음파 영동법(sonophoresis)이 있다.<sup>20,21</sup> 공동화 형성은 세포간 간격을 증가시켜 피부 투과를 돕고, 에너지 소실은 각질층의 지질층을 수화시켜 피부장벽을 통한 분자들의 확산을 돕는다. 전기천공법(electroporation)과 이온 삼투요법(inotophoresis)은 세포막에 전류를 통하게 하여 확산, 전기이동(electrophoresis), 전기 삼투(electroosmosis) 등의 원리로 피부 장벽을 통과할 수 있는 친수성 통로(hydrophilic route)를 만든다.<sup>22,23</sup> 액화 이산화탄소 등 분사 유도 물질을 이용한 분사장치를 사용하여 순간적으로 피부장벽을 직접 투과

시킬 수도 있다. 압축시킨 헬륨가스를 이용해 100m/s 이상의 순간 속도로 물질을 전달하는 이러한 방법의 전달속도와 거리는 분자의 크기, 가스의 속도와 압력에 의해 결정된다.<sup>24</sup> 약물전달의 물리적 방법 중 미세 바늘을 이용한 방법은 각질층의 미세한 구멍을 뚫은 후 피부의 투과도를 증가시키고, 약물의 전달을 용이하게 한다.<sup>25</sup> 미세 바늘을 이용하여 피부 장벽을 통과시킬 경우, 분자의 극성이나 분자량에 의한 영향을 최소화할 수 있고, 피부에 미세 바늘을 적용할 때 접촉 시간이 짧아, 통각 섬유가 위치하는 곳까지 접근하지 않기 때문에 통증도 유발되지 않는다. 본 실험에서는 분자량이 큰 헤파린을 피부를 통하여 전달하는 방법 중 임상에서도 쉽게 적용할 수 있는 미세 바늘을 선택하였다.

본 실험에서 저자는 피관의 생존 부분을 육안으로 관찰하여 면적을 측정하였다. 생존여부가 불확실한 부분이나 허혈성 울혈이나 색조의 변화가 있는 영역은 생존 영역에서 제외시켰다. 피관의 원위부 괴사는 실험 실시 후, 최소 5 일에서 최대 7 일 사이에는 명확히 경계가 구분되어 실험 기간은 술 후 7 일로 한정하였고(Fig. 9), 술 후 8 일째 생존 면적을 측정하였다. 수술 후 피관의 수축이 일어나므로, 피관의 면적을 계산할 때는 전체 피관에서의 괴사된 면적의 비율을 구하여 비교하였다. 미세 바늘과 함께 헤파린을 적용한 군에서 유의하게 생존률의 증가( $p < 0.01$ )를 관찰하였다.

다음에 헤파린의 국소투여가 허혈 피관의 혈관 형성에 미치는 영향을 분석하기 위해 각 피관의 생존이 위험한 부위(critical area) 즉, 중앙부를 생검하여 모세 혈관의 숫자를 세고, 측정값의 평균을 대표값으로 하였다. 실험적으로 혈관 형성에 내피세포 형성인자를 이동을 촉진할 수 있는 헤파린의 농도는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 알려져 있으며<sup>4</sup>, 본 실험에서는 500IU/100  $\mu\text{l}$ 로 하루에 4 회 도포하였다. 이전 실험에서 쥐의 임의형 피부 피관에 헤파린을 50IU/kg을 전신 투여할 경우 대조군보다 15%, 100IU/kg, 200IU/kg을 투여한 군은 27%의 생존률 증가를 보고하였다.<sup>9</sup> 그러나 헤파린을 국소 투여할 경우 효과적인 양에 대한 보고는 이전에 없었다. 본 실험에서는 국소 투여시 소실될 수 있는 양을 감안하여 한 번에 도포하는 양은 500IU (500IU/100  $\mu\text{l}$ ), 하루에 피관에 축적되는 총 양은 2000IU 으로 전신 투여시에 비하여 고용량으로 정하였다. 본 실험에서는 하루에 2000IU 를 국소 투여하여 지속적인 출혈은 없었으나, 미세 바늘과 헤파린을 함께 적용하였던 경우에서 피관을 거상하기 위해 절개한 부분을 따라서 수술 후 혈중이 2 마리에서 관찰되었다. 이것은 피관을 거상할 때 적절한 지혈을 하지 않아서 발생한 것으로 사료되며, 절개선을 통하여 헤파린이 일부 새어 들어가 수술 직후에 지혈을

방해하였을 가능성이 있다. 혈종의 발생하였던 마우스는 피관의 생존면적을 측정하기에 적합하지 않아서 결과에서는 제외하였다. 생검은 수술 후 8 일째 피관의 중앙부에서 실시하였다. 수술 후 5-7 일 후에는 피관의 원위부가 괴사되어 혈관 형성 상태를 평가하기에 적합하지 않고, 혈관 확장 및 신생의 효과가 있는 프로스타글란딘을 쥐의 임의형 피부 피관에 국소 투여한 실험에서 약물의 영향으로 신생혈관화가 활발히 진행되는 부위가 피관의 생존이 위험한 중앙부에 해당하였기 때문이다.<sup>26</sup> 미세 바늘과 함께 헤파린을 도포한 군에서 피관 중앙부의 10x10 mm<sup>2</sup>에서 생검한 조직 소견에는 혈관 개수가 증가되어 있었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

마지막으로 혈행 상태를 관찰할 목적으로 레이저 도플러(Periscan<sup>®</sup> PF 5010, Perimed) (Fig. 5)로 미세 혈류를 측정하고자 하였다. 레이저 도플러는 조직에 반사된 레이저 광선의 진동수의 변화를 측정함으로써 조직의 관류량을 측정하는 비침습적인 방법이다. 레이저 광선이 움직이는 적혈구에 의해 산란되어 진동수의 변화를 초래한다. 레이저 도플러는 측정 기구의 보정(calibration)이 어렵고<sup>27</sup>, 미세한 움직임이 측정치에 영향을 줄 수 있고<sup>28</sup>, 수술 후 정상적인 치유과정에서의 피관의 수축으로 수술 전의 측정 지점을 정확히 재측정하는 것이 어렵다는 맹점을 가지고 있다. 이러한 측정시의 오차 요인에도 불구하고, 피부 피관을 관찰하는데 레이저 도플러 모니터링을 통해 유리 피관의 구제율(salvage rate)의 향상<sup>29</sup>과 얼마간의 임상적 적용이 가능하다는 평가를 받고 있다.<sup>30</sup> 저자는 수술 전 표기해 둔 부위를 수술 후에 재측정할 때 측정 지점의 오차를 줄이기 위하여 10 회 측정 후 평균값을 사용하였으며, 실험동물의 움직임을 예방하기 위해 충분히 마취된 후 관류량을 측정하였다. 미세 바늘과 함께 헤파린을 적용한 실험군에서 관류의 평균을 보면, 중앙부와 원위부에서 수술 직후에는 관류량의 급격한 감소를 보인 후 수술 후 1 일째 관류가 회복되었으나, 수술 전의 기본값에는 모두 미치지 못하였다. 실험이 진행될수록 원위부에서 급격한 관류의 감소를 보였으며, 중앙부에서도 관류의 감소가 관찰되었다(Fig. 7). 피부관 작성 초기에 있어서 헤파린 정맥 투여가 생존률 증대를 나타내는 것은 피부관 작성 후 초기에 생길 수 있는 혈전을 방지하기 때문이다. 대조군과 각 실험군에서 중앙부의 관류 평균을 비교해보면, 미세 바늘과 헤파린을 적용한 군에서 수술 후 1 일째 평균 관류량이 높게 유지되었고, 이후에도 관류량이 비교적 서서히 감소하였다(Fig. 8). 본 실험에서 수술 후 1 일째의 관류량과 피관의 생존률은 양의 상관 지수를 나타내었다 (Fig. 9). 레이저 도플러를 이용하여 초기에

측정한 관류량은 이후 허혈 피부 피관의 위험부위의 생존을 예측하는데 도움이 될 수 있고, 위험부위에 해당하는 부분에 조기 처치를 결정하는데 도움이 될 수 있겠다.

대조군과 비교하여 미세 바늘 또는 헤파린을 적용하였던 실험군에서 피관 생존률의 유의한 증가를 보였으며, 실험군내에서 그룹간 비교하면 헤파린을 미세 바늘과 함께 적용한 군에서 다른 실험군에 비하여 피관 생존률의 유의한 증가를 보였다. 이는 미세 바늘이 피부를 통한 헤파린의 전달에 효과가 있으며, 헤파린은 혈전 형성을 방지함으로써 허혈 피관의 생존률 향상에 긍정적인 효과가 있다고 할 수 있겠다.

## V. 요약 및 결론

헤파린은 잘 알려진 항응고제로서 혈관 내의 혈전 형성을 막음으로써 허혈 피판의 울혈을 감소시키고 혈류를 유지하며, 혈관 내벽 성장 인자와 섬유모세포와 강력하게 결합함으로써 혈관 형성을 조절한다는 가정하에 실험을 계획하였다.

생존 면적을 평가한 결과, 대조군과 헤파린만 도포했던 그룹에 비해서 미세 바늘로 헤파린의 피부 전달을 증가 시킨 그룹에서 유의한 차이로 피판의 생존률이 높았고 미세 혈류도 상대적으로 높게 유지되었다. 그러나 혈관의 형성 상태는 헤파린의 국소 투여만으로는 실험군과 대조군과의 의미 있는 차이가 없었다. 이것은 생존률의 증가가 신생혈관화나 혈관의 확장보다 헤파린의 고유의 항응고작용에 의한 혈전 형성 방지가 주된 작용이며, 헤파린을 허혈 피판에 적용할 때 주된 치료적 이점으로 생각된다.

결론적으로, 임의형 허혈 피부 피판의 생존에 미세바늘을 이용하여 헤파린을 국소 도포하는 것은 생존률 향상에 긍정적인 결과를 얻었으며, 이의 사용을 권고할 만 하다.

## 참고문헌

1. Palmer, B. Sympathetic denervation and reinnervation of cutaneous blood vessels following surgery. An experimental study on rats by means of a histochemical fluorescence method. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 4: 93–99, 1970.
2. Wells, R. E., Jr. Rheology of Blood in the Microvasculature. *The New England journal of medicine* 270: 889–893 CONCL, 1964.
3. Ham, J. M., Slack, W. W. The effect of small doses of heparin on platelet adhesiveness and lipoprotein–lipase activity before and after operation. *The British journal of surgery* 55: 227–230, 1968.
4. Folkman, J. Regulation of angiogenesis: a new function of heparin. *Biochem Pharmacol* 34: 905–909, 1985.
5. Motlekar, N. A., Youan, B. B. The quest for non–invasive delivery of bioactive macromolecules: a focus on heparins. *J Control Release* 113: 91–101, 2006.
6. Goldberg, M., Gomez–Orellana, I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat Rev Drug Discov* 2: 289–295, 2003.
7. Hobson, R. W., 2nd, Wright, J. G., Fox, D., et al. Heparinization reduces endothelial permeability and hydrogen ion accumulation in a canine skeletal muscle ischemia–reperfusion model. *J Vasc Surg* 7: 585–591, 1988.
8. Ehrlich, H. P., Jung, W. K., Costa, D. E., et al. Effects of heparin on vascularization of artificial skin grafts in rats. *Exp Mol Pathol* 48: 244–251, 1988.
9. Sawhney, C. P. The role of heparin in restoring the blood supply in ischaemic skin flaps: an experimental study in rabbits. *British journal of plastic surgery* 33: 430–433, 1980.
10. Wray, R. C., Jr., Young, V. L. Drug treatment and flap survival. *Plastic and reconstructive surgery* 73: 939–942, 1984.

11. Wong, L., Im, M. J., Hoopes, J. E. Increased survival of island skin flaps by systemic heparin in rats. *Ann Plast Surg* 26: 221–226, 1991.
12. Benson, H. A. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* 2: 23–33, 2005.
13. Gorski, G., Szopinski, P., Michalak, J., et al. Liposomal heparin spray: a new formula in adjunctive treatment of superficial venous thrombosis. *Angiology* 56: 9–17, 2005.
14. Betz, G., Nowbakht, P., Imboden, R., et al. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. *Int J Pharm* 228: 147–159, 2001.
15. Kim, T. D., Kambayashi, J., Sakon, M., et al. Metabolism of liposome-encapsulated heparin. *Thromb Res* 56: 369–376, 1989.
16. Belcaro, G., Nicolaidis, A. N., Geroulakos, G., et al. Essaven gel—review of experimental and clinical data. *Angiology* 52 Suppl 3: S1–4, 2001.
17. Incandela, L., De Sanctis, M. T., Cesarone, M. R., et al. Treatment of superficial vein thrombosis: clinical evaluation of Essaven gel—a placebo-controlled, 8-week, randomized study. *Angiology* 52 Suppl 3: S69–72, 2001.
18. Incandela, L., Belcaro, G., Nicolaidis, A. N., et al. Microcirculation after standardized application of Essaven gel on normal skin—a placebo-controlled, randomized study. *Angiology* 52 Suppl 3: S5–10, 2001.
19. Cross, S. E., Roberts, M. S. Physical enhancement of transdermal drug application: is delivery technology keeping up with pharmaceutical development? *Curr Drug Deliv* 1: 81–92, 2004.
20. Le, L., Kost, J., Mitragotri, S. Combined effect of low-frequency ultrasound and iontophoresis: applications for transdermal heparin delivery. *Pharm Res* 17: 1151–1154, 2000.
21. Mitragotri, S., Kost, J. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. *Pharm Res* 18: 1151–1156, 2001.
22. Weaver, J. C., Vanbever, R., Vaughan, T. E., et al. Heparin alters transdermal transport associated with electroporation. *Biochem Biophys Res*

*Commun* 234: 637–640, 1997.

23. Vanbever, R., Prausnitz, M. R., Preat, V. Macromolecules as novel transdermal transport enhancers for skin electroporation. *Pharm Res* 14: 638–644, 1997.

24. Schramm, J., Mitragotri, S. Transdermal drug delivery by jet injectors: energetics of jet formation and penetration. *Pharm Res* 19: 1673–1679, 2002.

25. Prausnitz, M. R. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 581–587, 2004.

26. Sawada, Y., Sugawara, M., Hatayama, I., et al. A study of topical and systemic prostaglandin E1 and survival of experimental skin flaps. *British journal of plastic surgery* 46: 670–672, 1993.

27. Langer, S., Biberthaler, P., Harris, A. G., et al. In vivo monitoring of microvessels in skin flaps: introduction of a novel technique. *Microsurgery* 21: 317–324, 2001.

28. Furnas, H., Rosen, J. M. Monitoring in microvascular surgery. *Ann Plast Surg* 26: 265–272, 1991.

29. Heller, L., Levin, L. S., Klitzman, B. Laser Doppler flowmeter monitoring of free-tissue transfers: blood flow in normal and complicated cases. *Plastic and reconstructive surgery* 107: 1739–1745, 2001.

30. Yuen, J. C., Feng, Z. Monitoring free flaps using the laser Doppler flowmeter: five-year experience. *Plastic and reconstructive surgery* 105: 55–61, 2000.

|

<Abstract>

## The Effect of Topical Application of Heparin on Skin Flap Survival

Eun Jung Yang

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

Directed by Professor Sug Won Kim

The objective of this study was to evaluate the effect of heparin for viability of random-pattern dorsal flap in hairless mouse. Twenty-five male hairless mice were randomly divided into five groups. A caudally based random dorsal flap, measuring 1.5x5cm, was used; five served as controls(Group1), Group 2(n=5) received only microneedling, Group 3(n=5) only heparin, Group 4(n=5) microneedle with saline, and Group 5(n=5) microneedle with heparin to the flap during 7 days. After 1 week, flap survival rate was measured. Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis statistical analysis of survival relationships was performed. The number of the capillaries was compared between the experimental and control group with respect to neovascularization after heparin application using imaging analysis program under hematoxylin-eosin stain and capillary blood flow were measured by laser doppler flowmetry. Heparin with microneedle treated mice were significantly better flap viability and microvascular flop than in controls (average flap area survival 67 % and 54.4mm<sup>2</sup> respectively; p<.01). Positive correlation was shown between flap survival rate and laser doppler flux value at first day after surgery. Increased number of the blood vessels could be observed but was not statistically significant. Heparin had a slight beneficial effect on flap viability and capillary flow but may not induce significant angiogenesis by topical application.

Key words: Heparin, Topical application, Microneedle



Fig. 1. On the back of the hairless mouse, a random pattern skin flap, measuring 1.5x5cm, caudally based, was elevated (above) and sutured back in place (below).



Fig. 2. Application of the microneedle on the skin flap of the hairless mouse

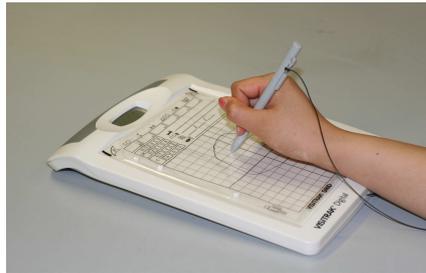


Fig. 3. Survival area of the flap was measured by VISITRAK® (Smith & Nephew, co). VISITRAK® uses digital true area measurement for accurate wound tracking.



Fig. 4. Laser Doppler flowmetry, Periscan® PF 5010, Perimed(left). Measurement of the microvascular flow of the skin flap on the back of the hairless mouse with laser doppler straight probe with miniholder(right).

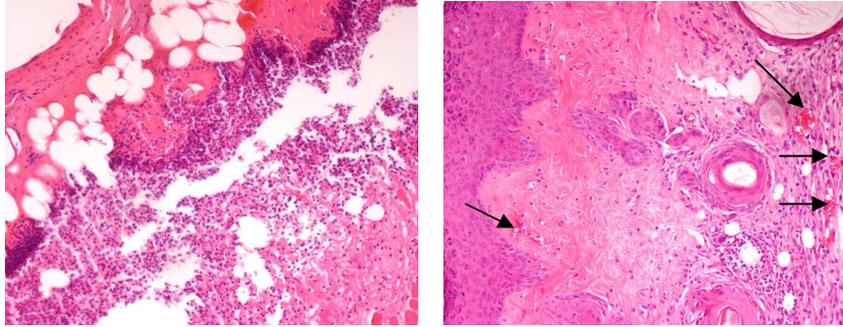


Fig. 5. Histologic slides of control(left) and microneedle with heparin applied group(right) in the critical area. Arrows indicate capillaries. Only sparse vessels were seen in control group and inflammatory cells were accumulated. A better increase in the number of capillaries is seen in group 5.

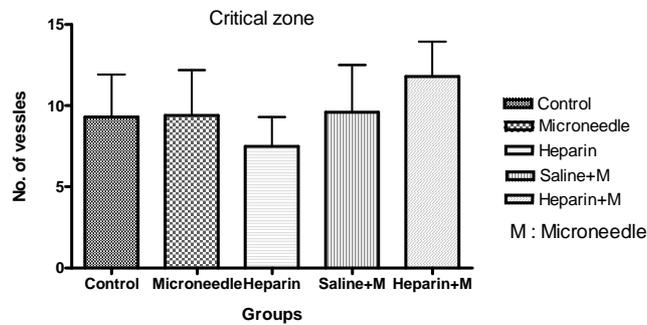


Fig. 6. Number of vessles of critical zone of the skin flaps. No significant increase was seen in the experimental groups.

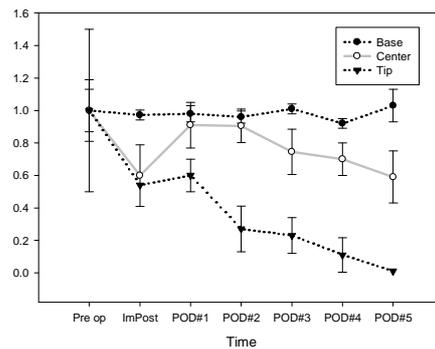


Fig. 7. Laser doppler flux value of microneedle with heparin experimental group. More prominent drop in oxygenation immediately after surgery, followed by slight increase in oxygenation over time. Baseline values were not recovered in the center and tip of the flap.

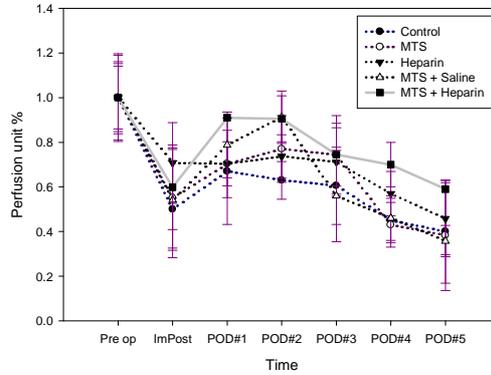


Fig. 8. Laser doppler flux value of control and heparin experimental group in central zone. Average flux of the microneedle with heparin group was higher than other experimental groups.

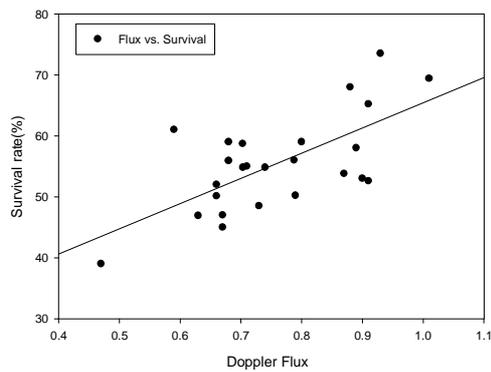


Fig. 9. Correlation between laser doppler flux value(relative value) and survival rate of the flap at 1<sup>st</sup> day postoperatively. Positive correlation was shown and laser doppler could help the early detection of the ischemic skin flap.

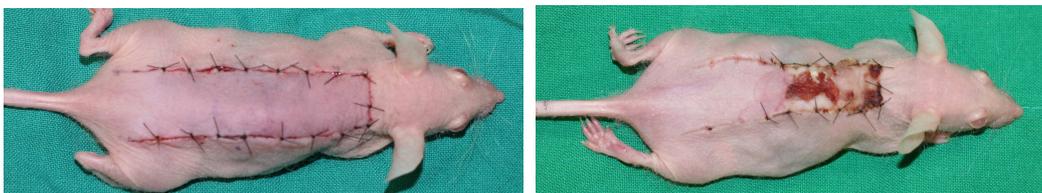


Fig. 10. Congestion over the entire flap was seen at 1<sup>st</sup> day after surgery(left) and distal flap necrosis was shown at 6<sup>th</sup> postoperative day(right).