

공초점현미경을 이용한 생체내 세포공핍층 계측 In Vivo Cell Free Layer Measurement Using Confocal Microscopy

*안진효¹, 최성민¹, 이호², 박철우²

*J. H. An¹, S. M. Choi¹, H. Lee², #C. W. Park(chwoopark@knu.ac.kr)²

¹경북대학교 대학원 기계공학과, ²경북대학교 기계공학부

Key words : In vivo, Cell Free Layer, Confocal Microscopy, Hematocrit

1. 서론

현대에 들어오면서 현대인의 식생활 습관의 급격한 변화 등으로 인해 심혈관계 질환의 비중이 점점 높아지고 혈류와 관련된 질환의 유발 및 임상적 현상이 사회적 문제로 심각하게 대두되고 있다. 이러한 현상과 관련하여 심혈관계 질환은 의학 분야에서 뿐만 아니라 공학적 기법을 통한 혈류역학적(bio-fluid dynamic) 측정 및 해석에 대한 시도와 가설에 대한 연구가 활발하게 진행되어지고 있다.¹

일반적으로 혈액 유동은 비뉴우튼 유체 특성과 탄성적(elastic) 특성을 함께 가지고 있으며, 맥동(pulsatile) 구조를 가지기 때문에 정량적 특성 파악이 매우 어려우며 특히, 혈액(blood)에 포함된 혈구들이 가지는 혈유변학적 특성값의 측정 및 해석은 심혈관계 질환의 상관관계 도출에 중요한 역할을 할 수 있어 현재까지 계속적인 연구가 이루어지고 있는 실정이다.²

혈액 속에는 여러 가지 필수적 구성성분과 단백질 성분의 부유물들이 포함되어 있는데, 그 중에서 적혈구는 산소와 영양분을 생체 내로 공급해주는 역할을 수행함으로써 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 관점에서 적혈구의 유동을 측정하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있는데 혈액은 불투명하고 적색을 띠고 있어서 혈액 내 적혈구를 가시화하기란 쉬운 일이 아니다.

최근까지 형광물질을 이용한 micro-PIV 시스템과 같은 가시화 기법이 일조를 하고 있으나, 제한된 신호강도와 투명 탐색창 조건이 필수적으로 요구되어지고 있고, 생체 외(in-vitro) 조건에 제한되어 실제 특성값 해석에 어려움이 따른다.^{3,4} 따라서 본 연구에서는 레이저 스캐닝 방식의 공초점현미경 시스템을 활용하여 계측된 생체내(in vivo) 조건의 마우스 혈액 내 적혈구의 영상을 이미지 하고 취득된 영상에서 혈류 유동의 특성값인 세포공핍층(cell free layer)의 두께를 계측 및 추출하는 연구

를 수행하였다.

2. 실험장치 및 방법

공초점현미경(confocal microscopy)은 현재 생명광학(bio-photonics) 분야에서 많이 활용되고 있는 대표적인 광학 계측 장비로서 기존의 광학현미경보다 매우 우수한 공간분해능을 가짐과 동시에 관찰대상(sample)의 피하조직을 정밀히 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있어 생체내 조건의 연구에서 최근들면서 많이 응용되어지고 있다.

본 연구에서는 생체내 세포공핍층 계측 및 인지를 위하여 레이저 스캐닝 방식의 공초점현미경 시스템을 활용하였고 대상 생물체는 마우스의 세동맥 레벨 미세순환계를 타겟으로 이미징 하였다. 광원으로는 800nm 파장대를 가진 CWTi:Sapphire 레이저를 사용하였으며 혈관 내 적혈구의 유동 모습을 이미징 하였다.

Fig. 1은 본 연구에서 사용된 공초점현미경 시스템의 개략도를 보여주고 있다. 영상취득을 위해서 광경로를 폴리곤미러로 래스터 스캐닝되게 구성하였다. 현미경 시스템에서는 40배의 대물렌즈를 사용하였으며, NA 값은 1.2 이었다.

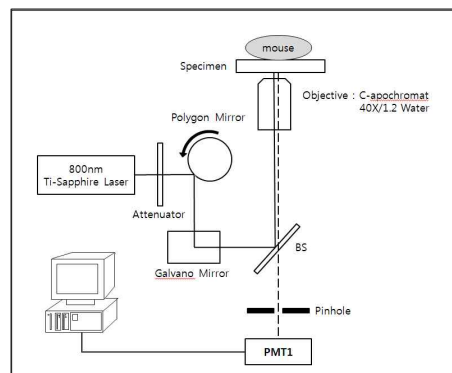


Fig. 1 Schematic diagram of the CLSM system.

3. 결과 및 고찰

Fig. 2는 마우스의 세동맥 레벨 혈관에서 취득한 혈관 및 적혈구 유동의 샘플 영상을 보여주고 있다. 레이저 스캐닝 공초점현미경 시스템의 공간해상도는 일반적으로 CCD 형태의 고해상도 광학 카메라에 비하여 낮지만 불투명 창과 같은 생체 대상 관찰에서는 매우 장점을 가질 수 있다. 이처럼 공초점현미경 시스템을 활용하여 취득된 상대적으로 깨끗한 생체내 유동장 이미지를 통하여 생체내 혈관 내부 혈류유동에서 혈구 구성성분의 면적의 계산을 통하여 적혈구의 분포비율인 헤마토크릿(hematocrit)을 계산하고 영상처리 기법을 활용하여 픽셀간의 거리의 계산을 통하여 세포공핍층의 두께를 산출하였다.

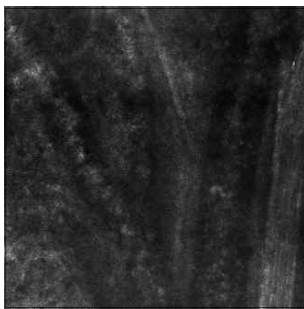


Fig. 2 CLSM image of the blood vessel. (in vivo)

세포공핍층의 두께는 벽면으로부터 가장 근접해 있는 혈구들에 대하여 거리 임계값(threshold)을 설정하고 픽셀의 간격을 활용하여 두께 값을 계산하였다. 이처럼 계산된 세포공핍층의 두께를 Fig. 3에 나타내었다. 전체적으로 혈관의 길이방향을 통해서 혈구의 불규칙한 배열과 유동의 비균일성으로 인해 혈구가 분포되지 않는 범위가 매우 큰 영역에서 나타나는 구역도 존재함을 알 수 있다. 취득된 영상을 통하여 산출된 세포공핍층의 두께의 분포는 헤마토크릿이 증가함에 따라 선형적으로 감소되고 있음을 알 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 생체 내 적혈구를 추적입자로 활용하여 이미징하여 혈류 유동을 가시화하고 취득된 영상에서 영상처리 기법을 활용하여 헤마토크릿의 변화와 세포공핍층의 두께를 산출하여 보

았다. 레이저 스캐닝 방식의 공초점현미경 시스템을 활용하여 생체내 조건의 마우스 세동맥 미세순환계 혈관을 이미징 할 수 있었다.

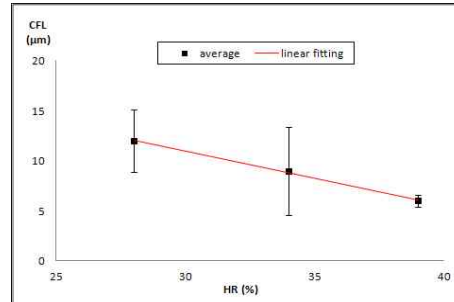


Fig. 3 Evaluation of the Cell Free Layer. (in vivo)

후기

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(20090069912), 교육과학기술부의 지역거점연구단육성사업(노화극복·웰빙을 위한 융합의료기술개발사업단) 및 한국연구재단의 대학중점연구소지원사업(2010-0020089)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. N. Maeda, "Erythrocyte rheology in micro-circulation", Japanese J. Physiology, 46, 1-14, 1996.
2. O. K. Basurt, D. Gelmont, H. Meiselman, "Red blood cell deformability in sepsis", Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 421-427, 1998.
3. C. W. Park, S. J. Lee, S. H. Shin, "Micro-PIV measurements of in vitro blood flow in a micro-channel", Int. J. Vascular Biomed. Eng., 1(2), 30-35, 2003.
4. R. J. Adrian, "Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics", Annu. Rev. Fluid Mech., 23, 261-304, 1991.