

< 논문 >

유정란 배아 혈액유동의 *in vivo* 측정

여창섭* · 한규연** · 이상준†

(2005년 9월 2일 접수, 2006년 2월 22일 심사완료)

In Vivo Measurements of Blood Flow in a Chicken Embryo Using Micro PIV Technique

Chang Sub Yeo, Kyu Yeon Han and Sang Joon Lee

Key Words : Blood Flow(혈액유동), Embryo(태아), PIV(입자영상유속계), Placenta(태반)

Abstract

To analyze *in-vivo* blood flow characteristics in a chicken embryo, *in-vivo* experiment was carried out using micro-PIV technique. Because endothelial cells in blood vessels are subject to shear stress of blood flow, it is important to get velocity field information of the placental blood flow. Instantaneous velocity fields of an extraembryonic blood vessel using a high-speed camera and intravital microscope. The flow images of RBCs were obtained with a spatial resolution of $20 \times 20 \mu\text{m}$ in the whole blood vessels. The mean velocity field data confirm that the blood flow does show non-Newtonian fluid characteristic. The blood in a branched vessel merged smoothly without any flow separation into the main blood vessel with the presence of a slight bump. This *in-vivo* micro-PIV measurement technique can be used as a powerful tool in various blood flow researches.

1. 서론

혈관의 안쪽은 얇은 두께를 가지는 내피세포로 이루어져 있으며, 혈류유동에 의해 혈관내피세포에 가해지는 벽면전단응력(wall shear stress)이 혈관 세포의 형상변화에 영향을 주어, 혈관의 생성(genesis)과 병리학적인 동맥경화에 중요한 역할을 한다는 사실이 여러가지 연구를 통해 알려져 있다.⁽¹⁾

일반적으로 동맥은 평활근이라 하는 근육에 둘러싸여 있으며, 이 평활근의 수축과 확장은 뇌에서 나오는 전기적 신호에 따르며 혈압과 혈류 유동특성을 결정한다. 그리고 동맥 내부에 분포되어 있는 내피세포가 혈류유동의 상태, 즉 전단응력의

크기에 따라 동맥의 국부적 수축 또는 확장을 스스로 결정한다.

이와 같이 혈관 내부의 전단응력은 생체 조직의 발달과 성장에 밀접하게 연관되어 있기 때문에 혈류유동과 벽면전단응력분포에 대한 정량적인 정보는 순환기질환 연구에 매우 중요하다.

이에 따라 최근 들어 살아있는 생체를 대상으로 혈류유동을 측정하는 연구가 체내실험과 체외실험을 통하여 수행되었다. 예를 들어 Hove⁽²⁾ 등은 zebrafish에 PIV(particle image velocimetry) 속도장 측정 기법을 적용하여 심장 내부의 전단응력과 심장발달 사이의 상관관계를 연구하였다. 또한 Sugii⁽³⁾ 등은 쥐의 장간막에 있는 세동맥(arteriole)에서의 혈류유동을 PIV기법으로 측정한 연구결과를 발표하였다. 그러나 혈류가시화를 위해 수술로 관측하고자 하는 혈관을 생체 바깥으로 꺼내어 실험하는 관계로 생체리듬에 영향을 줄 수 있으며, 유동 영상을 얻는 동안 호흡에 기인하여 생체시료 가 많이 움직이게 되는 단점이 있다.

생명체의 발생과 성장에 있어서 초기에 해당하

† 책임저자, 회원, 포항공과대학교 기계공학과
E-mail : sjlee@postech.ac.kr

TEL: (054) 279-2169 FAX: (054) 279-3199

* 회원, 포항공과대학교 대학원 기계공학과

** 포항공과대학교 생명과학과

는 태아 내부의 혈액유동에 대한 정확한 정보는 조직과 세포의 성장에 필요한 산소와 영양분 전달, 그리고 전단응력이 혈구와 내피세포에 미치는 영향에 대한 연구에 있어서 중요하다.

조류의 유정란 내부 태아의부혈관(extraembryonic blood vessel)들은 인간과 같은 포유류의 태반(placenta)과 유사한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 일부 연구자들은 병리학적인 관점에서 조류의 알을 이용하여 태아의부혈관에 혈류장애물을 설치하고 가시화를 통해 태반의 혈류유동의 변화가 심장의 기형발생에 미치는 영향에 대해 연구하였다.^(4,5)

그러나, 이들 연구에서는 유동가시화를 위해 염료(dye)나 입자(particle)를 주입하여 혈관속에 혈구와의 화학반응을 일으키고 생체 조직에 자극을 유발할 수 있다는 단점이 있다. 따라서 생체대사활동에 영향을 주지 않고 혈류유동을 측정 할 수 있는 새로운 측정기법의 개발이 요구된다.

본 연구에서는 생체 혈액의 적혈구를 추적입자로 사용하는 *in vivo* micro PIV 혈류유동측정기법을 개발하고 이를 이용해 유정란 내부의 혈액유동을 정량적으로 가시화하고 유동특성을 연구하였다.

2. 실험장치 및 방법

2.1 유정란

본 연구에서는 생체 혈액유동 측정대상으로 유정란을 선택하였다. 산란일자가 3일정도 지난 유정란을 구입 후 온도는 37℃, 습도는 70%로 유지되는 배양기에서 4일간 배양시켰다.

현미경으로 혈류유동을 직접 관찰하기 위해 유정란의 공기실 부위의 껍질을 직경 3cm 정도 제거하고 이송장치에 수정란을 고정시켰다.

유정란과 같은 생명체는 주위의 온도변화에 매우 민감하게 반응하기 때문에, 실험도중 온도를 일정하게 유지하는 것이 중요하다. 이를 위해 원격외선을 이용하여 실험이 진행되는 동안 유정란의 온도를 37℃로 유지시켰다.

Fig. 1은 닭의 유정란을 부화기에서 68시간 부화시킨 후, 카메라를 이용하여 촬영한 태아의 심장과 주위 혈관을 촬영한 영상이다. 그림에서 보는 바와 같이 눈과 심장 그리고 태아에게 산소와 영양을 공급하는 동맥과 정맥이 태아를 중심으로 난황 전체에 걸쳐 오른쪽과 왼쪽으로 넓게 퍼져 있으며, 대부분의 혈관이 난황 위쪽에 퍼져 있어 혈관의 관찰이 용이하였다.

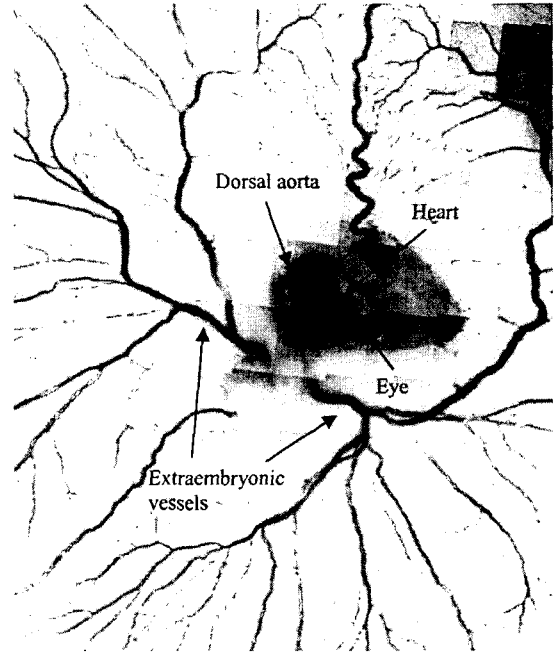


Fig. 1 Chicken embryo after approximately 68 hours of incubation

2.2 측정원리

매크로 스케일의 유체흐름에 대한 일반적인 PIV실험에서는 레이저 평면광으로 측정영역을 조사하고, 산란된 입자영상을 취득한다. 그러나 micro PIV실험의 경우, 측정하고자 하는 유동 내부에 수 마이크로미터 폭의 얇은 레이저 시트를 만들어야 하는데 이는 광학적으로 실현하기 쉽지 않다. 따라서 체적조명(volume illumination)방법을 사용하여 측정하고자 하는 대상물 전체를 조명하고 현미경 대물렌즈의 초점거리를 미세하게 조절하여 초점평면 내부의 입자영상을 취득하게 된다.⁽⁶⁻⁸⁾

PIV기법을 적용함에 있어서 연속적인 2장의 혈구 영상으로부터 2화상 상호상관기법을 이용하여 적혈구들의 변위 정보를 얻었다. 두 영상 사이의 시간간격으로 변위 정보를 나누어 줌으로써 순간 속도장을 구하였다. 그런데 체적 조명을 하게 되면 난반사에 의해 깨끗한 혈구영상을 얻기가 쉽지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Fig. 2와 같이 CMOS 카메라 전방에 550nm 영역의 필터를 설치하여 적혈구 입자의 명암비를 향상시켰다.

2.3 *In-vivo* μ PIV 영상기법

수정란 내부 혈관의 구조와 미세혈관에서의 혈액 유동을 가시화하기 위하여, *in-vivo* μ PIV 시스템을 이용하였다. Fig. 3은 본 연구에 사용된 *in-vivo* μ PIV시스템의 개략도를 나타낸 것이다.

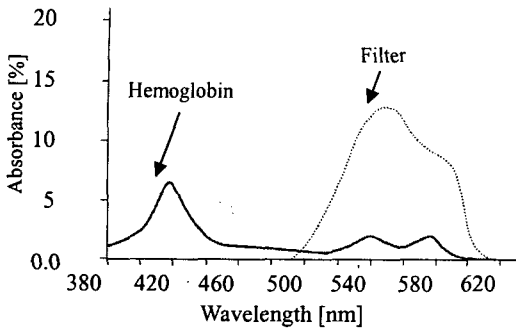


Fig. 2 Absorbance spectra of RBC filter

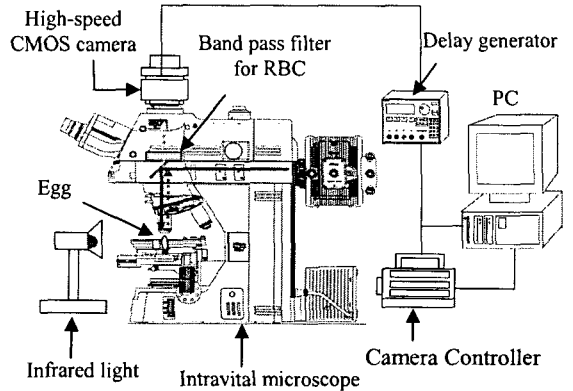


Fig. 3 Schematic diagram of in-vivo μ -PIV system

수정란의 혈액유동은 NA(numerical aperture)값이 0.5인 10배 배율의 대물렌즈를 사용하였다. 이 때 관찰 영역(field of view)의 크기는 2.44×2.44mm이고, 공간해상도는 2.38 μ m/pixel이다. 앞에서 언급한 것처럼 적혈구영상의 명암비를 향상시키기 위하여 적혈구의 흡수 파장영역에 해당하는 밴드 패스(band pass)필터를 현미경(Nikon ECLIPSE 80i)의 카메라 전방에 장착하여 향상된 이미지를 얻었다.

100-W 할로겐 램프에서 백색광원이 샘플에 조사하면 적혈구가 540nm 근방의 파장영역은 흡수하고 나머지 파장영역의 빛은 반사한다. 따라서 적혈구입자의 영상이 카메라에 영상정보로 들어오게 되어 컴퓨터에 저장된다.

일반적인 μ PIV시스템에서는 형광입자를 투입하고 레이저와 카메라를 동기시켜 두 장의 영상 사이의 시간간격(Δt)을 손쉽게 조절할 수 있다. 반면에 본 연구에서는 형광입자가 아닌 적혈구를 추적입자로 그대로 사용하고 펄스형 레이저를 사용하지 않고 할로겐 램프를 사용하므로 일반 CCD 카메라를 사용할 경우 셔터속도에 한계가 있게되어 시간간격(Δt) 내에서 적혈구의 이동범위가 조사구간을 벗어나게 되어 제대로 속도장을 측정하기 어렵다.

본 연구에서는 1024×1024 픽셀의 공간분해능으로 초당 2,000프레임까지 찍을 수 있는 고속카메라(Photron ultraAPX FASTCAM)를 사용하였다. 이 고속카메라는 CMOS타입이며 10-bit 데이터로 디지털영상을 취득한다. 본 실험에서는 혈액유동을 1024×1024 픽셀 해상도로 초당 125프레임씩 측정하였으며, 미소조사구간은 16×16 픽셀에 50% 중첩을 하였다.

따라서 본 연구의 μ PIV시스템의 경우 속도벡터 사이의 간격이 19.04 μ m인 속도정보를 얻을 수 있다.

3. 결과 및 고찰

3.1 혈관유동 영상

혈관은 크게 동맥과 모세혈관 그리고 정맥으로 이루어져 있다. 동맥의 경우 심장의 박동으로 인해 유량이 주기적으로 변하는 맥동성을 가진다. 동맥혈관은 Fig. 4에 나타낸 것처럼 심장에서 멀어짐에 따라 계속 분지되면서 궁극적으로 적혈구의 크기 보다 작은 직경의 모세혈관에 이르게 된다.

심장에서 나오는 혈액유동이 처음 만나는 혈관이 대동맥(aorta)이다. 이곳에서는 심장의 수축기에 탄력성이 큰 혈관 벽이 팽창되면서 맥동성 유동의 큰 에너지를 흡수하게 된다. 동시에 심장에서 갑자기 뿜어나온 많은 양의 혈액을 저장하는 기능을 하게 된다.

심장에서 대동맥으로 나오는 혈액흐름이 없는 이완기에는 대동맥 혈관이 수축하게 되고 앞서 저장한 혈액을 하류 동맥 쪽으로 보내주어 유체흐름이 끊어지지 않게 도와주는 기능을 한다. 대동맥 혈관 벽들이 하류방향으로 순차적으로 팽창과 수축을 반복하게 되면서 강한 맥동성 유동은 어느 정도 완만한 맥동성 유동으로 바뀌게 되며, 혈액은 대동맥을 여러 갈래의 가지(branch)혈관에 나누어져 동맥(artery)을 거쳐 세동맥(arterioles)으로 도달하게 된다.

전체 세동맥의 단면적을 합하면 대동맥이나 동맥의 전체 단면적 합계보다 약 20배 이상 크다. 그리고 모세혈관의 단면적 합계는 세동맥의 전체단면적보다 약 10배 이상 크다. 이렇게 가는혈관들의 단면적이 큰 이유는 모세혈관에 다다른 피가 맥동성(pulsatility)없이 정상상태로 흐르게 하여 세포에 산소와 영양분을 안정적으로 공급하기 위한 것이다.

본 실험에서도 수정란 태아의 외부혈관중 동맥

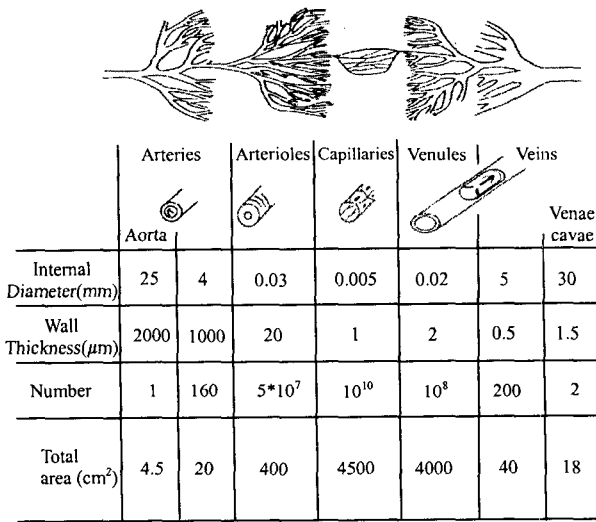


Fig. 4 Structural characteristics of the peripheral vasculature system (Mohrman-Heller 1991)

혈에서 주기적인 맥동성 혈액유통을 관찰할 수 있으며 모세혈관과 정맥혈에서는 맥동성이 없는 정상상태의 혈류유통을 관찰할 수 있었다. 맥동성 혈액유통의 경우 심장 박동의 주기에 따라 유통특성이 달라지므로 심장의 박동을 실시간으로 모니터링 하면서 카메라와 동기화하는 작업이 필요하다. 본 연구는 정맥혈관에 대해 수행되었으며 추후 동맥혈관 유통특성 연구도 수행할 예정이다.

Fig. 5는 수정란 내부의 정맥혈관 유통을 촬영한 영상이다. 포유류의 경우 적혈구의 크기가 $7\sim 8\mu\text{m}$ 에 비해 조류의 경우 이보다 큰 $10\mu\text{m}$ 정도의 크기를 가졌다. 그리고 형상은 중앙이 움푹 들어간 형태가 아니고 원추형태를 가졌다.

본 연구에서 다룬 혈관의 직경은 대략 $100\sim 180\mu\text{m}$ 이었으며 그림 속에 있는 혈액은 아래쪽에서 위 방향으로 움직인다. 큰 혈관의 경우, 3지점에서 혈관유통의 방향이 크게 바뀌었다.

3.2 혈류 속도장

Fig. 6은 Fig. 5에서 원으로 표시된 정맥혈관 부분의 혈액흐름을 PIV속도장 측정기법으로 구한 순간속도장과 순간속도장 1,000장을 앙상블 평균하여 도출한 평균속도장 결과를 나타낸다.

같은 정맥혈관에서 측정한 순간 속도장과 평균 속도장 사이에 차이를 보이는 것은 혈관에서 적혈구의 위치가 시간에 따라 변하고 그 분포도 균일하지 않기 때문이다. 취득한 순간속도장에 들어있는 에러벡터들은 후처리 과정에서 통계적 기법을 이용하여 제거하였다.

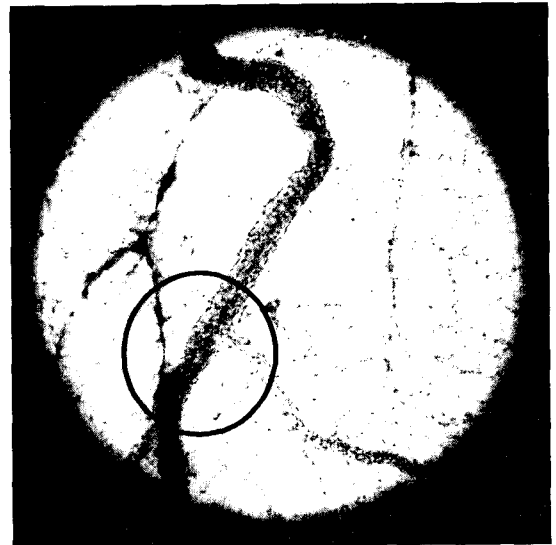


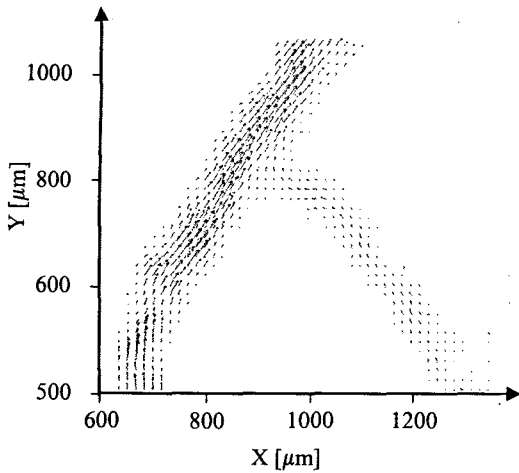
Fig. 5 Typical image of blood flow captured in an extraembryonic blood vessel

혈관 벽면부근에서도 속도벡터 정보를 잘 볼 수 있었으며 공간 해상도는 $20 \times 20\mu\text{m}$ 이었고 벽면에서 속도벡터는 0에 가까웠다.

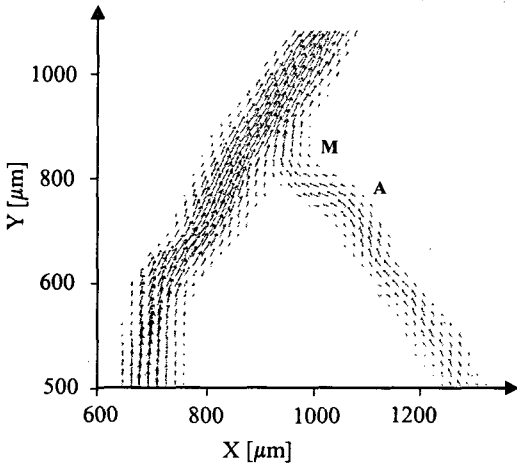
완전히 발달된 관유동에서 뉴턴 유체의 층류속도 분포는 포물선이다. Fig. 6의 평균 속도장 결과를 보면 혈관의 중심부위에서는 비교적 완만한 속도 변화를 보이며 벽면으로 갈수록 속도가 감소하고 있다. 이것은 혈류의 비뉴턴성 유동 특성 이외에 또 하나의 중요한 특성인 항복응력에 기인한 것으로 생각된다. 항복응력을 가지는 유체는 유동에 가해지는 응력이 항복응력보다 작으면 유체는 움직이지 않고, 가해지는 응력이 항복응력을 초과하면 뉴턴 유체와 같은 거동을 하게 된다. 기존의 점성모델에 의하면 반경방향 길이가 특정길이보다 클 경우에는 전단응력이 관 벽에서 최대값을 가지고, 이보다 작을 경우에는 전단율이 0에 가까워지므로 항복응력과 같아진다고 하였다. 이에 따르면 원형단면관의 중앙 부분에서 속도분포는 다소 평탄(flat)한 특징을 가진다.

혈장 자체는 뉴턴 유체의 특성을 가지고 있지만, 혈구를 포함하고 있는 혈액의 경우에는 비뉴턴 유체이며, 비뉴턴 유체의 특성인 항복응력을 고려할 때의 실험 결과가 타당함을 알 수 있다.

Fig. 6에서 재미있는 현상으로 오른쪽의 작은 혈관이 왼쪽의 큰 혈관과 만나는 구간에서 유동박리 없이 두 혈액 흐름이 자연스럽게 하나로 합쳐진다. 이것은 오른쪽 혈관의 A지점에 위치한 굴곡에 기인하여 접합점 M위치에서 두 혈류가 만나는 접촉



(a) Instantaneous velocity field



(b) Mean velocity field

Fig. 6 Instantaneous and time-averaged mean velocity distributions of blood flow

각도가 크게 감소하여 큰 혈관의 흐름에 완만하게 합쳐지기 때문으로 보인다.

Fig. 7은 주유동방향 속도성분의 속도장 결과를 나타낸 것이다. 여기서 보면 최대속도는 혈관 중앙 부분에서 나타나며, 그 값은 약 $700\mu\text{m/s}$ 정도이며 일정 구간에서 이 속도를 유지하는 것을 확인할 수 있다. 중앙부에서 벽면부위로 갈수록 속도가 빠르게 감소되는 것으로 나타났다.

4. 결론

유정란의 혈관구조 및 혈류 흐름을 실시간, *in-vivo* 방식으로 촬영하였다. 그리고 micro-PIV기법을 적용하여 $20\times 20\mu\text{m}$ 의 공간 분해능으로 정맥혈관의 혈류 속도장을 측정하였으며, 비뉴턴 유체의

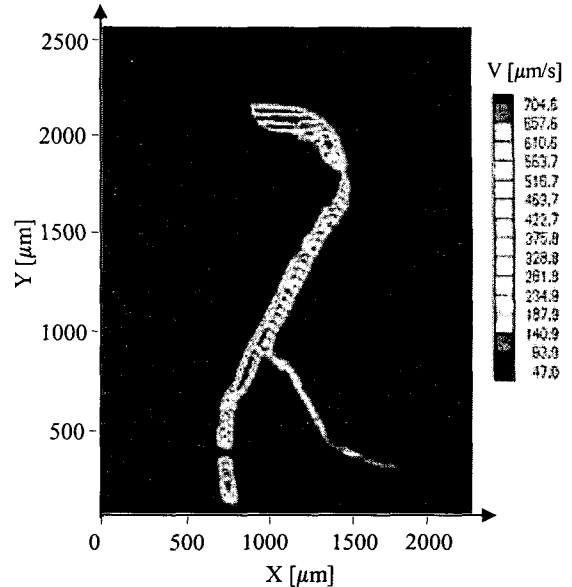


Fig. 7 Streamwise mean velocity field

유동특성을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 작은 혈관이 큰 혈관과 만나는 접합부위에서 혈류들이 유동박리 없이 자연스럽게 합쳐지는 것으로 나타났다. 이것은 두 혈관이 접합하기 직전에 위치한 굴곡부위가 두 유동 사이의 접속각도를 줄임으로써 가능하게 된 것으로 보인다.

본 연구에 사용 되어진 생체혈관 유동영상기법은 동물과 같은 생체의 혈관 구조와 혈류역학을 연구하는데 크게 도움이 될 것으로 기대된다.

후기

본 연구는 과기부(과학재단)에서 지원한 특정기초연구(과제번호: R01-2004-000-10500-0)와 시스템바이오다이내믹스 국가핵심연구센터의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Malek, A. M., Alper, S. L. and Izumo, S., 1999, "Hemodynamic Shear Stress and its Role in Atherosclerosis," *Journal of American Medical Association*, Vol. 282, pp. 2035~2042.
- (2) Hove, J. R., Köster, R. W., Frouhar, A. S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S. E. and Gharib, M., 2003, "Intracardiac Fluid Forces are an Essential Epigenetic Factor for Embryonic Cardiogenesis," *Nature*, Vol. 421, pp. 172~177.
- (3) Sugii, Y., Nishio, S. and Okamoto, K., 2002, "Measurement of a Velocity Field in Microvessels Using a High Resolution PIV Technique," *Annals of The New York Academy of Sciences*, Vol. 972, pp. 331~336.

- (4) Vennemann, P., Kiger, K. T., Lindken, R., Groenendijk, B. W., Stekelenburg-de Vos, S., ten Hagen, T. M., Ursem, N. C., Poelmann, R., Westerweel, J. and Hierck, B., 2005, "In vivo Micro Particle Image Velocimetry Measurements of Blood-plasma in the Embryonic Avian Heart," *Journal of Biomechanics*, in press.
- (5) Hogers, B., DeRuiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A. C. and Poelmann, R. E., 1999, "Extraembryonic Venous Obstructions Lead to Cardiovascular Malformations and can be Embryolethal," *Cardiovascular Research*, Vol. 41, pp. 87~99.
- (6) Santiago, J. G., Wereley, S. T., Meinhart, C. D., Beebe, D. J. and Adrian, R. J., 1998, "A Particle Image Velocimetry System for Microfluidics," *Experimental in Fluids*, Vol. 25, pp. 316~319.
- (7) Meinhart, C. D., Wereley, S. T. and Santiago, J. G., 1999, "PIV Measurement of a Microchannel Flow," *Experimental in Fluids*, Vol. 27, pp. 414~419.
- (8) Koutsiaris, A. G., Mathioulakis, D. S. and Tsangaris, S., 1999, "Microscope PIV for Velocity-field Measurement of Particle Suspensions Flowing Inside Glass Capillaries," *Measurement Science and Technology*, Vol. 10, pp. 1037~1046.