

# 마이크로 유체 시스템을 통한 혈소판검사 방법 연구

이호윤\* · 김정훈\*\* · 김계휴\* · 김연수\* · 신세현\*

## Study of platelet test method in a microfluidic system

Hoyoon Lee\*, Jung Hun Kim\*\*, Gehyu Kim\*, Yeonsoo Kim\* and Sehyun Shin\*\*

**Abstract :** Platelet, which plays a crucial role on hemostasis, is prone to be activated by mechanical shear stress as well as agonists such as ADP and collagen. Then, the activated platelets initiate adhering on an exposed collagen tissue at injury sites of vessel with forming their aggregation. In this study, we designed an in-vivo mimic system in a microfluidic chip, which can test platelet function with the stimulation of shear stress or agonists. Shear conditions were controlled by various rotating speed of microstirrer in a confined blood chamber and each sample flow was driven by negative pressure with a withdrawal of syringe pump. Shear-activated platelets encountered a collagen coating region causing their adhesion and aggregation inside the microchannel, so that blood flow became significantly slow and eventually stop. In order to quantify platelet function, the migration distance (MD) of blood through the microchannel was monitored. As the microstirrer speed increased, MD initially decreased exponentially but then increased beyond a critical rpm. These findings imply that MD is a latently relevant index in order to measure the effect of shear and drug on platelet function. Conclusively, the present microfluidic system is quick and simple, while providing a precise assay to measure the effects of shear and drug on platelet activation, aggregation and adhesion.

### 1. 서 론

혈소판은 지혈작용에 중요한 혈구이다. 혈관의 상치로 인해 혈관의 내벽 구성요소인 콜라겐 조직이 혈액에 노출되어 출혈이 발생하면, 혈소판은 활성화되어 콜라겐 조직에 응집(aggregation)하고 점착(adhesion)하여 지혈작용을 촉진시킨다. 혈소판은 화학적 작용물질인 콜라겐 또는 ADP에 의해 활성화되며, 혈관벽의 손상 또는 아트로픽 동맥경화로 인해 발생한 높은 전단응력에 의해 활성화 된다<sup>(1)</sup>. 일반적으로 혈소판은 8 Pa 이상의 높은 전단응력에 노출될 때 활성화되는 것으로 알려져 있다<sup>(2)</sup>. 이러한 혈소판의 활성화는 혈소판의 병적상태를 검사하는 기준으로 사용될 수 있다<sup>(3-4)</sup>.

기존의 혈소판 검사는 주로 선천성 혈소판 기능이상, 수술 전 출혈성 질환 선별 등에서 사용되어 왔다. 하지만, 현재에는 혈소판의 활성 반응이 증가할

수록 스텐트혈전증 및 심근경색에 의한 사망 위험성이 증가함<sup>(5)</sup>에 따라 혈소판검사의 필요성이 대두되고 있다. 또한 심혈관 질환에 대한 항혈전치료가 임상적으로 널리 사용되고 있어, 환자별 맞춤 약물저항 검사가 필요하다.

본 연구는 마이크로 스테러의 회전으로 인한 높은 전단응력을 통해 혈소판 활성 및 응집을 촉진시킨 후, 마이크로 채널 내의 혈액 이동거리를 측정하여 혈소판 기능 및 약물반응을 검사하는 방법에 대한 연구이다.

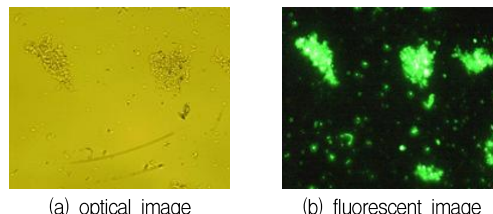


Fig. 1 Microscope images for morphological change of platelets with the shear stimulation

\* 고려대학교

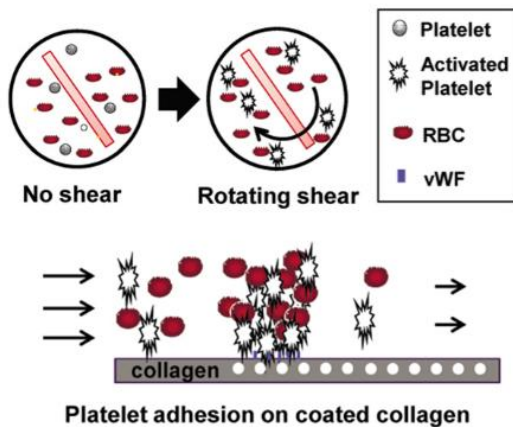


Fig. 2 Schematics of shear-induced platelet activation and its adhesion on the collagen

## 2. 본 론

### 2.1. 실험방법

상완정맥으로부터 EDTA 튜브를 사용하여 혈액을 채혈한다. 200  $\mu$ L의 혈액 샘플을 마이크로 칩 상단에 주입하여 각각의 대조군 및 진단활성화 혈액챔버로 이동시킨다. 진단활성화 혈액챔버 내부의 마이크로 스테리러를 3600  $s^{-1}$ 으로 1분 동안 회전시켜 혈소판을 활성화시킨다. 마이크로 채널 내부에 일정한 음압을 형성하여 혈액샘플을 이동시킨다. 마이크로 채널의 콜라겐 코팅영역에 이르러 혈소판이 응집 및 점착하여 인해 유동이 점차 저하되고 결국 정지한다. 이때의 대조군과 진단활성화 혈액의 이동거리(Migration distance; MD)를 비교하여 혈소판 기능을 검사한다.

### 2.2. 결과

본 연구의 결과로서, 마이크로 스테리러의 회전속도를 높여 전단율을 증가시키에 따라 MD의 감소가 확인되었다. 진단활성화 시키지 않은 혈액 샘플의 유동은 끝내 멈추지 않고 터치다운(touch down)한데 반하여, 진단활성화 혈액에서는 혈소판의 활성화에 의한 응집 및 점착으로 인해 MD가 감소하는 것을 알 수 있다. 하지만, 전단율 3600 $s^{-1}$ 이상의 자극에서는 MD가 다시 증가하는 결과를 얻었다. 3600 $s^{-1}$  전단율 이상에서의 MD 증가를 통해 일정 이상의 전단자극이 혈소판의 활성화를 오히려 감소시켰음을 알 수 있다. 이러한 혈소판 활성화 경향은 FACS 결과를 통해서도 확인되었다. CD41

및 CD62p를 사용하여 혈소판 활성화(%)를 확인한 결과, 전단율 3600  $s^{-1}$ 에서 최대 활성화를 갖고 더 높은 전단율에서 혈소판 활성도가 감소하였다.

## 3. 결 론

본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 도출하였다.

- 1) 본 연구에서 제시한 혈소판검사 방법을 통해 생체 내 발생하는 혈소판 반응을 모사하여 혈소판 기능을 검사할 수 있는 가능성을 보였다.
- 2) 혈액 챔버 내부에 위치한 마이크로 스테리러의 회전을 통하여 전단력 유도 혈소판 활성화(Shear induced platelet activation)를 구현할 수 있었다.
- 3) 본 연구에서 제시한 MD는 FACS와의 비교를 통해 혈소판 활성화도를 적절히 반영함이 확인되었으며, 혈소판 기능검사의 척도로서 가능성을 보였다.
- 4) 본 연구의 MD를 활용한 혈소판검사 방법을 통하여, 빠르고 간편하며, 또한 정확하게 전단력 유도 혈소판 활성화 및 작용물질에 의한 혈소판 활성화를 분석할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고 문헌

- (1) Konstantopoulos, K., et al. "Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients." *Thrombosis and haemostasis* 74.5 (1995): 1329-1334.
- (2) Nesbitt, Warwick S., et al. "A shear gradient - dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation." *Nature medicine* 15.6 (2009): 665-673.
- (3) Song, Suk-Heung, Chae-Seung Lim, and Sehyun Shin. "Scalable evaluation of platelet aggregation by the degree of blood migration." *Applied Physics Letters* 103.24 (2013): 243702.
- (4) Song, Suk-Heung, Chae-Seung Lim, and Sehyun Shin. "Migration distance-based platelet function analysis in a microfluidic system." *Biomechanics* 7.6 (2013): 064101.
- (5) Lee, Hae-Young. "Effects of antiplatelet drugs in cardiovascular prevention." *The Korean Journal of Medicine* 85.1 (2013): 15-21.