

고지혈증 제브라피쉬 모델 혈관의 전단응력 측정

최우락* · 염은섭* · 서은석** · 이상준*

Measurement of wall shear stress on the blood vessels of hypercholesterolemic zebrafish

Woorak Choi*, Eunseop Yeom*, Eunseok Seo**, Sang Joon Lee*

Abstract : Atherosclerosis commonly occurs in curved or bifurcated arteries with hemodynamic peculiarities. In this regard, many researchers have investigated associations between hemodynamic characteristics and the outbreak locations of atherosclerosis. However, previous experiments using artificial in vitro vessels or mammal models have some limitations in monitoring the outbreak and progression of cardiovascular diseases. In this study, wall shear stress (WSS) on blood vessels of a hypercholesterolemic zebrafish was estimated based on micro-PIV technique. As a result, lipid deposit on blood vessels is highly related with the regions of low WSS. This estimation using a hypercholesterolemic zebrafish model would be useful for understanding the relations between hemodynamic features and pathological causes of atherosclerosis.

1. 서 론

혈관에 작용하는 벽면전단응력(wall shear stress)과 죽상동맥경화(atherosclerosis)의 초기발생 사이의 관련성을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있다.⁽¹⁾ 최근에는 급사의 원인중 하나인 죽상경화반 파열 (plaque rupture) 또한 벽면전단응력과 관련이 있다는 연구 결과가 발표되면서 벽면전단응력과 죽상동맥경화 사이의 관련성에 대한 연구가 큰 관심을 받고 있다.⁽²⁾ 하지만 기존 연구들에서 사용 되어진 혈관내피세포가 배양된 도관(conduit)은 실제 혈관 조건과 달라 그 결과를 바로 적용 하는데 문제가 있었다. 또한 포유류 모델들은 불투명한 혈관에 흐르는 혈류를 제대로 측정할 수 있는 장치가 제한적이며, 동맥경화의 발생을 유도하기 위해서는 오랜 시간이 걸린다는 한계점을 가지고 있다. 최근에는 제브라피쉬 (zebrafish)에 고콜레스테롤 사료를 식이함으로써 고지혈증을 유도할 수 있으며, 사람의 동맥경화 발생과 유사한 과정들이 일어난다는 연구 결과가 발표되었다.⁽³⁾ 제브라피쉬는 질병의 진행 속도

가 빠르고, 생후 30일간 투명성을 유지하기 때문에, 질병의 진행 과정을 실시간으로 monitoring 할 수 있다. 제브라피쉬가 가진 이러한 특성은 죽상동맥경화 연구 모델로서 큰 장점이다. 본 연구에서는 제브라피쉬의 혈관에 작용하는 벽면전단응력을 PIV 기법을 이용하여 측정 하였다. 그리고 죽상동맥경화증의 초기증상이라 할 수 있는 지질 축적 (lipid accumulation)량을 혈관위치별로 정량적으로 측정하여, 벽면전단응력의 크기와 지질 축적량 사이의 상관관계를 분석하였다.

2. 실험 방법

혈관 내피세포에 GFP(green fluorescent protein)가 발현되어 있는 tg[ffii1a:EGFP] 제브라피쉬에 생후 5일부터 10일간 고콜레스테롤 사료를 식이함으로써 고지혈증을 유도하였다. 제브라피쉬 내부 혈관구조와 축적되어있는 지질의 모습을 공초점 현미경 (Confocal microscopy)을 이용하여 촬영하고, 형광을 띄는 지질에서 나오는 빛의 세기를 측정함으로써 혈관 위치별 지질의 축적량을 비교하였다. 또한 공초점 현미경 영상을 이용하여 혈관의 직경과 내피세포의 두께, 그리고 무세포 경계층(Cell free layer,CFL)의 두께를 측정

* 포항공과대학교 기계공학과

** 대구경북과학기술원 뉴바이올로지학과

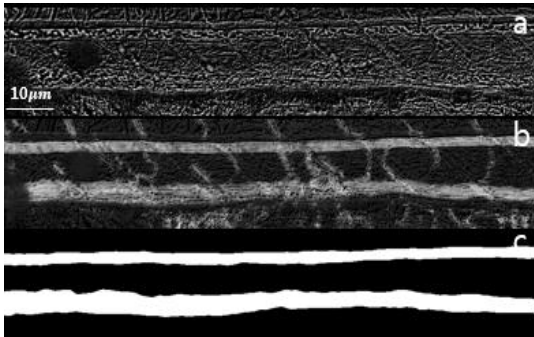


Fig. 1 Blood vessel images of a 15 dpf (day post fertilization) zebrafish model (a) after low-pass filtering, (b) additional image processing to represent standard deviations, and (c) Masks need for PIV analysis.

하였다.

또한 고속카메라를 이용하여 제브라피쉬의 혈관 내부 혈액흐름을 촬영하고, micro-PIV 기법을 이용하여 속도장을 측정하였다. 이때 적혈구를 추적입자로 사용하였다. PIV 분석에 필요한 mask 와 cell-rich 영역을 측정하기 위해 Fig. 1과 같이 연속된 영상에서 각 화소(pixel)별 표준편차와 iterative thresholding method 를 사용하였다. 이렇게 측정된 속도장 정보에 CFL 내부에서 혈장의 속도가 혈관 벽에서부터 선형적으로 증가한다는 가정을 적용하여 벽전단응력을 계산하였다.⁽⁴⁾

3. 실험 결과

제브라피쉬의 주요 동맥과 정맥을 부분에서의 전단응력과 지질 축적량을 측정하여 비교 분석하였다. Micro-PIV를 이용하여 제브라피쉬 혈관 내부 혈류를 분석한 결과, 등쪽 대동맥(dorsal aorta)에 작용하는 벽전단응력은 약 1Pa, 꼬리정맥(caudal vein)의 경우 약 0.1Pa인 것으로 나타났다. 심박수는 2~3Hz로 유지되어 정상적인 상태의 값과 비슷하였는데, 이를 통해 정상적인 혈액흐름에서 측정된 결과임을 확인할 수 있다.

형광을 띄는 지질을 정량적으로 분석한 결과, 꼬리정맥에서 많은 지질이 축적되는 것으로 나타났다. 이것은 기존 연구들에서 발표된 내용과도 일치하는 결과이다. 혈관위치별 벽면전단응력 측정 결과와 비교한 결과, 전단응력이 낮은 혈관 부위에서 많은 지질이 축적되는 것으로 나타났다.

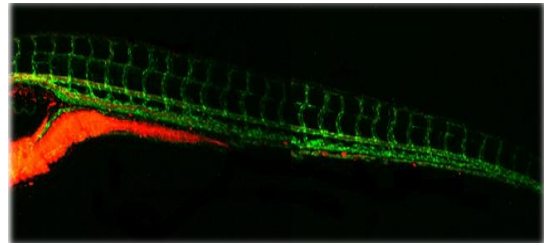


Fig. 2 Fluorescent image depicting lipid accumulation in a zebrafish model.

4. 결론

인체 혈관에서 벽전단응력이 낮은 혈관에서 동맥경화가 자주 발생하는 현상이 제브라피쉬 혈관에서도 일어남을 확인하였다. 이에 따라 향후 벽면전단응력과 관련된 죽상동맥경화의 병리학적 연구와 함께 관련 치료제 개발 연구에 제브라피쉬가 질병 모델로서 유용하게 활용되어질 것으로 기대된다.

후 기

본 연구는 교육과학기술부/한국연구재단 창의적연구진흥사업 (생체유동현상 규명 및 생체모방 연구)의 재원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- (1) Tarbell, J. M. et. al., 2014, "Fluid mechanics, arterial disease, and gene expression." Annual Review of Fluid Mechanics, pp. 591 ~ 614.
- (2) Hourigan, K. et. al., 2013, "Evolution and rupture of vulnerable plaques: a review of mechanical effects." Chrono Physiology and Therapy, pp. 23 ~ 40.
- (3) Stoletov, K. et. al., 2009, "Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish." Circulation Research, pp. 952 ~ 960.
- (4) Bumseok N. et. al., 2010, "Effect of cell free layer variation on arteriolar wall shear stress." Annual of Biomedical Engineering, pp. 359 ~ 366.