

Ex vivo Morphometric Analysis of Coronary Stent using Micro-Computed Tomography

Inho Bae^{*,****}, Jeongtae Koh^{**,***}, Kyungseob Lim^{*}, Daesung Park^{*}, Jongmin Kim^{*}, Myungho Jeong^{*****}

Heart Research Center, Chonnam National University Hospital^{},
Dental Science Research Institute and BK21, School of Dentistry, Chonnam National University^{**},
Research Center for Biomineralization disorders, Chonnam National University^{***},
Korea Cardiovascular Stent Research Institute^{****}*

미세단층촬영기법을 이용한 관상동맥 스텐트의 동물 모델 분석

배인호^{*,****}, 고정태^{**,***}, 임경섭^{*}, 박대성^{*}, 김종민^{*}, 정명호^{*,****}

전남대학교 병원 심장질환치료기술개발특성화연구소^{*}, 전남대학교 치의학전문대학원^{**},
전남대학교 바이오미네랄 장애연구소^{***}, 한국심혈관스텐트연구소^{****}

ABSTRACT

Micro-computed tomography (microCT) is an important tool for preclinical vascular imaging, with micron-level resolution. This non-destructive means of imaging allows for rapid collection of 2D and 3D reconstructions to visualize specimens prior to destructive analysis such as pathological analysis. Objectives. The aim of this study was to suggest a method for ex vivo, postmortem examination of stented arterial segments with microCT. And ex vivo evaluation of stents such as bare metal or drug eluting stents on in-stent restenosis (ISR) in rabbit model was performed. The bare metal stent (BMS) and drug eluting stent (DES, paclitaxel) were implanted in the left or right iliac arteries alternatively in eight New Zealand white rabbits. After 4 weeks of post-implantation, the part of iliac arteries surrounding the stent were removed carefully and processed for microCT. Prior to microCT analysis, a contrast medium was loaded to lumen of stents. All samples were subjected to an X-ray source operating at 50 kV and 200 μ A by using a 3D isotropic resolution. The region of interest was traced and measured by CTAN analytical software. Objects being exposed to radiation had different Hounsfield unit each other with values of approximately 1.2 at stent area, 0.12 ~ 0.17 at a contrast medium and 0 ~ 0.06 at outer area of stent. Based on above, further analyses were performed. As a result, the difference of lengths and volumes between expanded stents, which may relate to injury score in pathological analysis, was not different significantly. Moreover, ISR area of BMS was 1.6 times higher than that of DES, indicating that paclitaxel has inhibitory effect on cell proliferation and prevent infiltration of restenosis into lumen of stent. And ISR area of BMS was higher ($1.52 \pm 0.48\text{mm}^2$) than that of DES ($0.94 \pm 0.42\text{mm}^2$), indicating that paclitaxel has inhibitory effect on cell proliferation and prevent infiltration of restenosis into lumen of stent. Though it was not statistically significant, it showed that the extent of neointima of mid-region of stents was relatively higher than that of anterior and posterior region in parts of BMS as showing cross-sectional 2-D image.

Conclusions. MicroCT enables the non-destructive postmortem analysis of stented arteries. These results suggest that microCT can be utilized as an accessorial tool for pathological analysis.

Key Words : micro-computed tomography, stent, in-stent restenosis

요약

미세단층촬영기법은 전임상 동물실험 분석시 고해상도의 혈관 영상화를 위한 중요한 수단이다. 이는 조직 분석과 같이 샘플 훼손이 예상되는 분석 작업 이전에 비파괴적인 방법으로 2차원 또는 3차원 이미지 재구성할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 생체 이식용 의료기기인 스텐트를 동물모델에서 전임상 분석을 하는데 있어 미세단층촬영기법의 활용방법을 제시하고 금속 스텐트(BMS)와 약물(paclitaxel)이 코팅된 스텐트(DES)의 스텐트 내 재협착정도(ISR)를 토끼 모델을 이용하여 평가하고자 하였다. BMS와 DES를 무작위적으로 토끼의 장골동맥에 식립하고 4주 후에 스텐트가 식립된 주위 혈관을 적출한 다음 스텐트 내강에 조영제를 투여하였다. 미세단층촬영기를 이용하여 50kV/200 μ A의 X-ray 조사량으로 샘플을 스캔하였다. 정량적 분석을 위해 CTAN 소프트웨어를 이용하여 관심영역을 지정하여 정량적 분석을 수행하였다. 피폭 대상에 따라 각기 다른 CT값(Hounsfield Unit)을 획득할 수 있었으며(스텐트 영역; 약 1.2, 조영제 영역; 0.12~0.17, X-ray 비흡수 영역; 0~0.06), 이를 이용하여 2차원, 3차원적 영상을 획득하고 스텐트 내 재협착 면적을 산출하였다. 조직병리학적 분석의 엄증지수에 해당할 수 있는 확장된 스텐트의 크기를 측정하였을 때 BMS와 DES간의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 또한 BMS 그룹의 ISR($1.52 \pm 0.48\text{mm}^2$)이 DES의 ISR($0.94 \pm 0.42\text{mm}^2$)에 비해 약 1.6배 높은 것으로 확인되었다. 이는 DES에 코팅된 paclitaxel이 세포 증식을 억제하여 스텐트 내강으로 증식하는 것을 저해하였기 때문으로 판단된다. 2차원적 분석 결과 BMS의 재협착 분포는 스텐트 중간 영역에서 전면부와 후면부에 비해 비교적 높은 것으로 확인되었다. 이러한 연구 결과로 볼 때 미세단층촬영기법은 비파괴적인 방법으로 분석이 가능하며 정량적 분석을 위한 기존의 복잡한 조직병리학적 분석법의 보조적인 수단으로 활용될 수 있을 것이다.

중심단어 : 미세단층촬영, 스텐트, 스텐트 내 재협착

I. 서론

관상동맥 내에 콜레스테롤 또는 플라크가 축적되어 혈관이 좁아진 상태가 되면 혈류의 흐름이 원활하지 못하여 심장 근육에 혈액 공급이 감소되어 영양분과 산소가 부족하게 된다. 그 결과로 동맥경화, 심근경색, 협심증과 같은 증상이 나타나게 된다^[1]. 이러한 좁아진 혈관에 스텐트라는 원통형의 금속 그물망(Bare Metal Stent, BMS)을 체내에 삽입하여 혈관을 확장시켜 혈류의 흐름을 원활하게 하는 시술이 행해지고 있다^[2]. 하지만 이런 시술 후에도 혈관 평활근의 성장과 신생 내막(neointima)이 스텐트 내강으로 형성되는 이른바 스텐트 내 재협착(In-Stent Restenosis, ISR)이 여전히 큰 문제점으로 남아 있다. 이는 추가적인 치치가 필요하며 58-87%의 낮은 4년간 개통률이 보고되었다^[3-4]. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 10여년 전부터 스텐트

표면에 평활근 세포의 증식을 억제하는 약물을 코팅한 약물 용출 스텐트(Drug-Eluting Stent, DES)를 사용하고 있으며 계속해서 연구가 진행되고 있다. 스텐트를 비롯한 생체 이식용 의료기기에 관한 연구는 인체를 대상으로 실험을 할 수 없어서 전임상 동물실험의 중요성이 강조되고 있다. 현재까지의 연구방법은 돼지나 토끼의 혈관에 스텐트를 삽입한 후 일정 기간 후에 스텐트 주위 혈관의 양상을 조직학적 염색을 한 후 현미경 관찰을 통해 수작업으로 결과를 도출하는 조직병리학적 분석이 주로 행해지고 있다. 하지만 이러한 분석방법은 실험자 또는 염색약 종류, 전처리 과정에서의 조직 탈락등과 같은 외부변수에 따라 결과가 달라질 수 있는 여지가 크다. 또한 돼지실험의 경우 면역 조직 화학법에 적절한 항체의 선정이 어렵고 토끼 실험의 경우 혈관의 크기가 작아서 스텐트 스트럿(strut)을 빼내는 과정이 어렵다는 단점이 있다. 또한 조직이 회수되었다고 하더라도 조직의 고정(fixation),

조각화(slicing), 매립(embedding), 석회질 제거(decalcification), 촬영(photographing), 배열(alignment) 등 여러가지 복잡한 과정과 고비용이 수반되며 분석 후에는 조직의 파괴로 인하여 후속 분석을 할 수 없다는 단점이 있다.

최근 작은 크기 표본의 영상 검사 방법으로 여러 기술과 방법들이 개발 되고 있고 이중 한가지가 미세 산화 단층 촬영(micro-computed tomography; microCT)이다^[5]. 이는 기존의 조직병리학적 분석에 비해 비파괴적, 비침습적이면서 고해상도 영상을 얻을 수 있으며 3차원적 재구성이 가능하다는 장점이 있다. 또한 소프트웨어의 발전으로 인해 보다 정확하고 객관적인 분석이 가능하며 ISR 분석 등 정확한 정량적 분석이 요구되는 실험에 유익하게 사용될 수 있다^[6,7]. 이런 microCT의 다양한 장점으로 인해 동물 실험에 있어서 중요한 분석 방법으로 인식되고 있다.

본 연구에서는 토끼의 혈관에 BMS와 DES를 식립하고 일정 시간이 지난 후 microCT를 이용하여 각 스텐트 내의 ISR 정량방법을 제시하고 스텐트 위치별 2차원 이미지와 고해상도 3차원 이미지를 획득하여 구체적인 분석을 수행하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 장치 및 재료

스텐트 식립을 위한 동물로는 16주령 토끼(3.5kg, New Zealand White Rabbit, 다물 사이언스, 한국)를 사용하였고, 단층 영상 획득을 위해 미세단층촬영기(Skyscan1172, 벨기에)를 사용하였다. 다양한 분석을 위해서 NRecon과 CTAn 소프트웨어(Skyscan, 벨기에)를 사용하였다. 본 실험에서의 동물 실험은 전남대학교 의과대학 동물 보호 및 사용에 관한 가이드 라인과 법규를 준수하였다. DES에 사용된 약물은 paclitaxel이었으며 용량과 용법은 기존의 시판되는 제품에 맞추어 사용하였다^[8].

2. 동물실험

토끼의 급성 혈전을 막기 위해 실험 시작 1주일 전

부터 매일 20mg의 아스피린을 먹이와 함께 투여한 후 실험 당일 20mg/kg의 케타민과 2mg/kg의 자일라진을 토끼의 근육을 통해 주사하여 마취시켰다. 실험시에는 산소마스크를 통해 토끼에 산소를 공급하고 열 패드를 통해 체온을 37°C로 유지시켰다. 토끼의 오른쪽 경동맥을 통해 4F sheath를 삽입한 후 sheath를 통해 스텐트를 토끼의 장골동맥 좌우에 위치시킨 다음 12mmHg의 압력으로 BMS 또는 DES를 혈관에 확장하여 식립하였다. 식립 4주 후 20ml의 염화칼륨을 토끼의 경동맥을 통해 투여하여 안락사 시킨 후 식립된 스텐트 주위의 혈관을 적출하였다.

3. 미세단층촬영 및 단면 재구성

적출된 스텐트 주위 혈관의 단층 촬영을 하기 이전에 각 부위별 X-ray 흡수량의 차이를 확인하기 위해 스텐트 내강에 조영제를 투여하였다(Fig. 1).

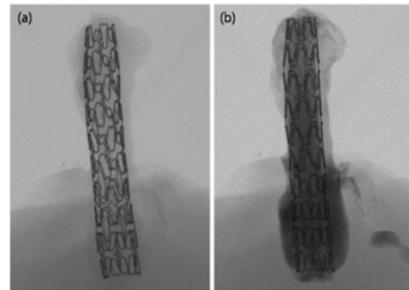


Fig. 1. The images of stent harvested at 4 weeks post-implantation with rabbit iliac arteries (a) and contrast medium was injected into the lumen of it (b)

그 후 미세단층촬영기를 이용하여 다음과 같은 조건하에 2차원 영상을 획득하였다. 원추형 빔(cone beam) 방식의 X-ray source를 이용하여 50kV / 200μA 조건에서 시편에 방사선을 조사하였고, 이때 해상도(spatial resolution)는 17μm로 조절하였다. 시편을 0.4도씩 회전시키면서 매회 1.2초간 방사선을 조사하였다. 촬영은 포커스 스폿(focus spot)에서 방사선 빔이 시편을 투과하여 charge-coupled devices (CCD) 카메라에 영상이 맺히는 원리를 이용하였다. 획득된 영상은 NRecon 소프트웨어를 이용하여 150개의 2차원 횡단면으로 재구성되었고, 각 단면간의 거리는 80μm로 설정하였다^[9].

Ⅲ. 실험결과

1. 부분별 CT값 획득

재구성된 2차원 횡단면은 CTAn 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 그 결과 2차원 영상에서 스텐트 strut 영역, 스텐트 내강의 조영제가 채워진 영역 그리고 스텐트 외부영역의 X-ray 비흡수 영역에서의 CT값, 즉 Hounsfield Unit(HU)값인 X-ray 흡수 정도가 다르게 나타나는 것을 확인하였다. 스텐트 영역에서의 CT값은 약 1.2, 스텐트 내강의 조영제가 채워진 영역에서는 약 0.12~0.17, 그리고 스텐트 외부영역의 X-ray 비흡수 영역에서는 0~0.06로 나타났다(Fig. 2).

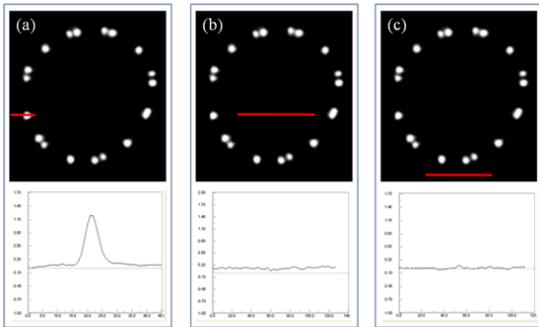


Fig. 2. CT values for each area by CTAn software. Stent area (a), contrast medium area in lumen of stent (b), outer area of stent (c). Bar indicates the position for analyzing.

2. CT값을 이용한 정량적 분석

이를 이용하여 2차원 이미지로부터 전체 영역과 스텐트 영역 그리고 조영제 영역을 구분하여 관심영역 (region of interest, ROI)을 설정한 후 후속 분석을 진행하였다(Fig. 3).

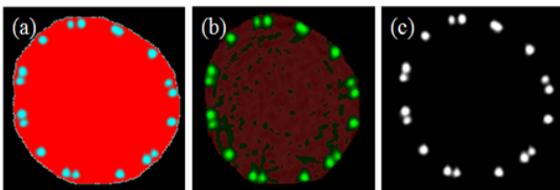


Fig. 3. The areas for region of interest, Total area (a), contrast medium area (b), stent area (c).

CTAn 소프트웨어를 이용하여 각 부분의 total area 값을 산출하였다. 전체 면적(Fig. 3a)에서 조영제 영역(Fig. 3b)과 스텐트 영역(Fig. 3c)의 면적값을 빼서 ISR의 면적을 도출한 결과 BMS 그룹의 ISR 면적은 1.5mm²였으며 DES의 ISR 면적은 약 1.0mm²였다(Fig. 4).

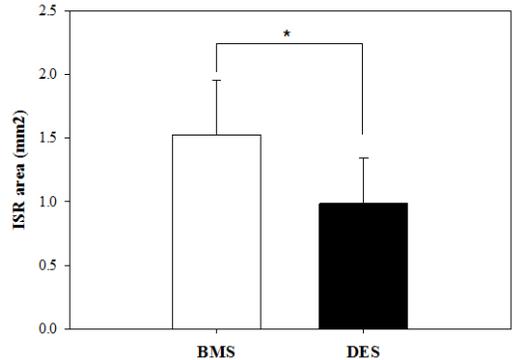


Fig. 4. Comparison of ISR between BMS and DES, n=8, *p < 0.05

3. 3차원 이미징

보다 정밀한 분석 및 스텐트 내강에서의 ISR 양상을 확인하기 위하여 3차원 이미징을 수행하였다. 그 결과 확장된 스텐트의 길이는 약 22 ± 1.8mm, 전면부 (proximal)의 두께는 2.6 ± 0.3mm 그리고 후면부(distal)의 두께는 3.1 ± 0.4mm 로 나타났다(Fig. 5a). 또한 스텐트와 스텐트 내강의 ISR 영역을 각각의 CT값을 적용하여 3차원 이미징을 수행하였을 때 DES에 비해 BMS의 영상이 좀 더 촘촘한 밀도를 보였다(Fig 5b).

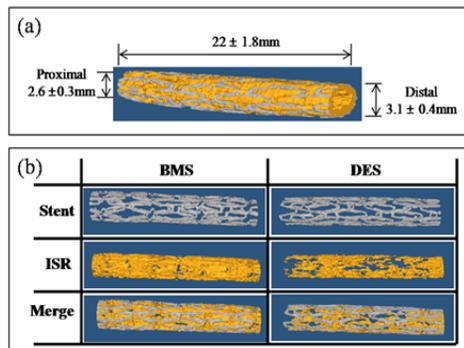


Fig. 5. Measurement of stent length after expanding stent (a), 3-D reconstruction images for each of region of interest and merged images (b).

4. 부위별 ISR 상세분석

3차원 이미징을 통해 확장된 스텐트와 ISR의 영상을 획득한 후 스텐트 부위에 따른 ISR 정도를 확인하였다. 그 결과 BMS의 경우 스텐트 전면부로부터 6 ~ 8mm 부위에 가장 많은 양의 ISR이 확인되었으며 0 ~ 3mm 와 16~18mm부위에서는 낮은 양의 ISR 이 확인되었다(Fig 6a, c). 반면 DES의 경우에는 스텐트 시작점부터 끝점까지 ISR이 고르게 분포하고 있음이 확인되었다(Fig 6b, d).

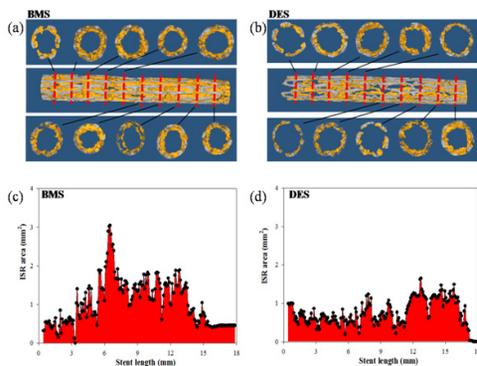


Fig. 6. Two dimensional images of desired cross section point (a, b) and the ISR extent of each of cross section with total length of stents 스텐트 (c, d).

IV. 고찰

본 연구의 목적은 혈관에 식립되는 의료가기인 스텐트를 동물모델에서 연구하고자 할 때 microCT를 이용하여 ISR을 정량적 분석하는 방법과 BMS와 DES의 결과를 확인하는데 있다. 생체를 포함한 모든 방사선에 대한 피폭체는 각각의 CT값을 갖는다. 즉 피폭체의 밀도에 따라 달라지는 선형감쇠계수인 Hounsfield Unit(HU)값에 따라 피폭체를 판단할 수 있다. 이미 임상적으로 CT값이 -700은 폐, -300 ~ -100은 연조직, -84는 지방, 30 ~ 45는 혈액, 40은 근육, 뼈는 700 등 각각의 피폭체에 대한 보편적인 CT값이 알려져 있다^[10].

하지만 ISR은 연조직이기는 하지만 신생된 조직이므로 정확한 CT값에 대한 보고가 없다. 따라서 본 연구에서는 스텐트 내강에 조영제를 투여하여(Fig. 1) 스텐트영역, 조영제 영역, 그리고 스텐트 외부의 X-ray

비흡수 영역으로 나누어 각각의 영역이 갖는 CT값을 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 서로 각기 다른 CT값을 확인할 수 있었고 이를 이용하여 각각의 영역의 면적을 구할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 면적값을 토대로 CTAn 소프트웨어를 이용하여 BMS와 DES의 ISR만의 면적을 산출하였다. 그 결과 약물이 코팅된 DES 그룹에서 약물코팅이 되지 않은 BMS에 비해 적은 양의 ISR이 확인되었다(Fig. 4). 이는 스텐트 표면에 코팅한 약물인 paclitaxel이 세포 증식을 억제하는 효과에 의한 것으로 여겨진다^[7,11]. 이는 3차원 이미징을 통해서도 육안으로 확인되었다(Fig. 5b). 이 때 확장된 스텐트의 사이즈를 3차원적으로 측정할 수 있었는데 이는 실험자에 따라 달라질 수 있는 변수인 스텐트 확장정도를 가늠할 수 있는 척도가 될 수 있을 것이며 이는 곧 병리학적으로 분석되는 injury score와 상통하여 보조적인 분석방법이 될 것으로 생각된다^[12].

CTAn 소프트웨어를 통한 분석은 microCT로 이미지를 재건하는 과정에서 80µm 마다 2차원적으로 단면화한 여러 슬라이드의 ISR값을 적분하여 계산된 값이어서 정확한 위치별 정량을 위해 3차원적 이미징과 길이에 따른 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과 BMS 경우 양 끝단에서보다는 중앙 부위에 많은 양의 ISR이 보인다. 이는 약물이 코팅되어 있는 DES가 스텐트 내강 전반에 고르게 분포하는 ISR 양상과 다른 결과이며 BMS의 종류, 길이, 식립 방법 등에 따라 달라질 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결론

본 연구에서는 생체 이식용 의료가기인 스텐트를 동물모델을 이용한 전임상 실험 후 분석을 하는데 microCT를 활용하는 방법 및 BMS와 DES의 ISR생성 정도를 비교하고자 하였다. 피폭체에 따라 각기 다른 CT값을 획득할 수 있었고, 이를 이용하여 ISR의 정량 및 3차원 이미징 및 위치에 따른 2차원적 분석을 수행할 수 있었다. 실험 결과 동물 모델에서 스텐트를 연구하고 할 때 본 연구에 사용된 미세 단층 촬영 기법은 기존의 고비용이고 복잡한 조직병리학적 분석의 보조적인 수단 또는 분석의 편리함을 제공할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A110351) and the Fundamental R&D Program for Core Technology of Materials funded by the Ministry of Knowledge Economy, Republic of Korea (K00060-282).

Reference

- [1] David Chua SN, Mac Donald BJ, Hashmi MSJ, "Finite-Element Simulation of Stent Expansion," *J Mater Process Tech*, Vol. 120, No. 1-3, pp.335-340, 2002.
- [2] Vorwerk D, Gunther RW, "Stent placement in iliac lesions : Thress years of clinical experience with the Wallstent," *Cardiovasc Intervent Radiol*, Vol. 15, No. 5, pp.285-290, 1992.
- [3] Long AL, Sapoval MR, Beyssen BM, et al, "Strecker stent implantation in iliac arteries : patency and predictive factors for long-term success," *Radiology*, Vol. 19, No. 4, pp.739-744, 1995.
- [4] Henry M, Amor M, Ethevenot G, et al, "Palmaz stent placement in iliac and femoropopliteal arteries : primary and secondary patency in 310 patients with 2-4-year follow-up," *Radiology*, Vol. 197, No. 1, pp.167-174, 1995.
- [5] Pan S, Liou W, Shih A, et al, "Experimental System for X-ray Cone-Beam Microtomography," *Microsc Microanal*, Vol. 4, No. 1, pp.56-62, 1998.
- [6] Foerst J, Ball T, Kaplan AV, "Postmortem in situ micro-CT evaluation of coronary stent fracture." *Catherter Cardiovasc Interv*, Vol. 76, No. 4, pp.527-531.
- [7] Nikolov HN, Pelz DM, Lownie SP, et al, "Micro-CT-compatible technique for measuring self-expanding stent force," *J Vasc Interv Radiol*, Vol. 21, No. 4, pp.562-570.
- [8] Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, et al, "Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis," *Circulation*, Vol. 103, No. 18, pp.2289-95, 2001.
- [9] Gabet Y, Kohavi D, Kohler T, et al, "Trabecular bone gradient in rat long bone metaphyses: mathematical modeling and application to morphometric measurements and correction of implant positioning," *J Bone Miner Res*, Vol. 23, No. 1, pp.48-57, 2008.
- [10] De Vos W, Casselman J, Swennen GR, et al, "Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and

maxillofacial region: A systematic review of the literature," *Int J Oral Maxillofac Surg*, Vol. 38, No. 6, pp.609-625, 2009.

- [11] Gershlich A, De Scheerder I, Chevalier B, et al, "Inhibition of restenosis with a paclitaxel-eluting, polymer-free coronary stent: the European evaluation of pacliTaxel Eluting Stent (ELUTES) trial," *Circulation*, Vol. 109, No. 4, pp.487-493, 2004.
- [12] Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al, "Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model," *J Am Coll Cardiol*, Vol. 19, No. 2, pp. 267-274, 1992.