

혈전 측정용 3D printed chip 설계 및 흡연의 영향 사전 연구

김해빈* · 엄은섭†

Design of 3D printed chip for thrombus measurement and feasibility study for smoking effect

Haebeen Kim* and Eunseop Yeom†

Abstract Thrombogenesis, which is the process of blood clot formation, can be initiated by platelet activation. Excessive formation of blood clot in the bloodstream can lead to thrombosis. Therefore, when dealing with patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) or children, it is necessary to use small amounts of blood. Hence, it is important to develop methods for the rapid and accurate measurement of the platelet function using a small amount of blood. In this study, 3D printing technology was utilized to facilitate the production of micro channels. The amount of platelet adhesion in smokers and non-smokers was compared by repeatedly exposing the structure of the channel to adjust the number of blood injections and facilitate thrombosis attachment to simple stenosis structures.

Key Words : Platelet activation (혈소판 활성화), Thrombus (혈전), Shear rate (전단 변형률), 3D printing (3D 프린팅), CFD Simulation (전산유체역학)

1. 서론

혈소판 활성화는 혈전 생성과 부착을 유도하게 되고, 과도한 혈전은 혈관을 막히게 하여 심장마비, 뇌졸중, 동맥경화증 등의 심혈관 질환을 유발한다. 이러한 혈전증은 성인질환인 당뇨병, 고혈압뿐만 아니라, 흡연으로 인한 적혈구 과응집으로도 발생 가능하다.⁽¹⁾ 혈전증으로 인한 심각한 장애를 예측, 방지 및 관리하기 위해

서는 신속한 혈전 모니터링이 중요하다.⁽²⁾ 또한 지혈이 어려운 파종성 혈관 내 응고(DIC) 환자나 소아의 경우, 채혈량이 제한되어 적은 양의 혈액으로 혈전 측정이 요구된다. 그러므로 소량의 혈액으로 신속하고 정확한 혈전 양 측정을 위한 연구가 필요하다.

선행된 연구를 통해 높은 전단력이 혈소판 활성화를 유발하고, 이는 후속 혈소판 응집 및 혈전 성장을 초래하는 것으로 보고되었다.⁽³⁾ 이러한 원리를 활용하여, 단일 채널, 병렬 채널 및 굴곡진 채널 등에서의 협착 구조의 채널을 제시하였으며,^(2,4) 콜라겐으로 코팅된 마이크로 비드 등의 구조를 사용하기도 했다.⁽⁵⁾

그러나 이러한 채널을 제작할 때, 제작 시간

† School of Mechanical Engineering, Pusan National University (PNU), Associate Professor
E-mail: esyeom@pusan.ac.kr

* School of Mechanical Engineering, PNU,
MS Student

이 오래 걸리고 형상을 쉽게 변형하기 어렵다는 문제점이 있다. 본 연구에서는 채널 모양을 쉽게 변형할 수 있고, 3D 프린팅을 이용하여 몰드를 제작하여 제작이 용이하게 하였다. 이후, 몰드에 PDMS를 부어 경화시키는 방식으로 채널을 제작하였다. 또한 단순 협착 구조로 혈액 주입 횟수를 조절하여 채널의 구조를 반복 노출시킴으로써 혈소판 활성화와 혈전 부착에 대한 효과를 기대하였고, 흡연자와 비흡연자의 혈액을 비교함으로써 흡연에 따라 혈소판의 활성 정도를 파악하는 사전 연구를 수행하였다.

2. 연구 방법

2.1 실험 구성

실험 구성은 Fig 1과 동일하며, 현미경(SZ61TR, Olympus, Tokyo, Japan) 위에 채널을 올리고 현미경과 연결된 고속카메라 (Chronos 1.4, Korea)를 사용하여 관측하였다. 혈액 샘플은 주사기 펌프 (neMESYTS, Centoni GmbH, Germany)를

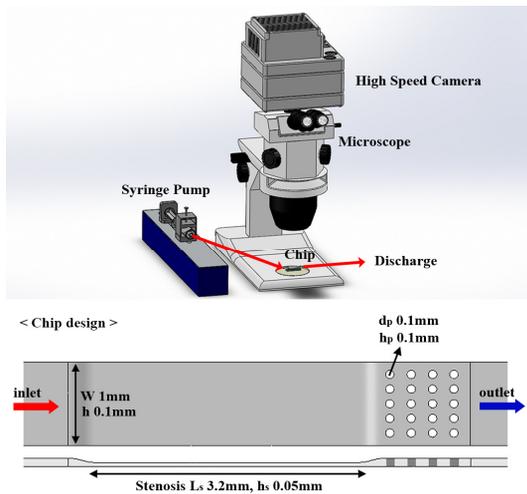


Fig 1. Schematic diagram of the experimental setup. The 1mL syringe is installed with syringe pump and it is connected the chip. The chip used in the experiment contained a circular column with a diameter of 0.1 mm. (W: channel width, h: channel height, L_s: stenosis length, h_s: stenosis height, d_p: pillar diameter, h_p: pillar height)

통하여 채널에 주입되었다. 혈전 부착 이미지는 유량에 따라 최대 초당 프레임 수 100으로 획득하였다. 혈액의 변성을 억제하기 위해 혈액 채취 후 2시간 이내에 항온항습 챔버(25°C, 상대 습도 55 %)에서 실험을 진행하였다.

혈액의 채널 노출 시간은 혈소판 활성화와 생성 및 부착에 영향을 미친다. 혈전 모니터링을 위해 채널 구조가 몇 번 반복 노출되는 것이 적절한지 결정하기 위해 주입 횟수를 조절하여 구조를 반복 노출시켰다. 1 mL의 혈액을 주입 후, conical tube에 모인 혈액을 다시 주입하는 과정을 3회 반복했다.

혈액은 흡연자 4명, 비흡연자 4명의 기증자로부터 실험 당일 채취 후, 즉시 EDTA 튜브에 넣어 항응고처리 되었다. 본 연구는 부산대학교병원의 기관 심사위원회 (IRB)에 의해 허가되었으며, 헬싱키 선언의 규정 (H-1911-028-085)을 따른다.

2.2 채널 제작

채널은 Solidworks (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., USA) 소프트웨어를 통해 모델링 되었으며, 3D 프린팅 한 몰드를 사용하여 PDMS로 채널을 제작하였다. 채널의 너비는 1 mm, 총 길이는 15 mm, 높이 0.1 mm로 그 중 높이가 0.05 mm인 협착이 3.2 mm구간으로 구성하였다. 혈소판 활성화로 인한 혈전 생성 및 부착을 위해 단순 협착 모델 후류에 가로세로 총 20개의 원기둥을 배치하였다. 수치해석을 통해 협착 이후 상대적으로 낮은 전단 변형률 영역 내 재순환 영역이 형성되어 혈전 부착에 효과적인 기둥의 원 지름을 선정하였다.

칩 몰드는 3D 프린터 BMF S240 (10 μm 분해능, JiveSolutions)과 재료 HTL을 사용하여 출력하였다. 출력된 몰드를 plate에 부착한 후, PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, USA) 폴리머와 경화제를 10:1로 섞은 후 몰드에 부어 기포를 제거하고, 약 40°C에서 5시간동안 경화하였다. 경화된 PDMS Block은 몰드에서 분리하여, 입구와 출구를 펀치로 뚫어주었다. 그 후, 산소 플라즈

마 처리 (CUTE, Femto Science, Korea)를 이용하여 slide glass에 부착하여 칩을 제작하였다. 부착된 PDMS의 inlet, outlet 통로에는 혈액 주입과 배출을 위해 직경 1.5 mm인 tygon tube (inlet: 길이 23 mm, outlet: 길이 10 mm)를 각각 삽입하였다. 실험 전, 23G needle을 사용하여 콜라겐 (농도 0.32 mg/mL)을 주입한 후, 콜라겐 부착을 위해 인큐베이터에 약 37°C에서 12시간동안 배양하여 콜라겐으로 인한 혈소판 응집 및 접촉을 용이하게 했다.^(3,6)

2.3 수치해석 방법

Fluent 2022 R1 (ANSYS, Inc., USA)을 활용하여 내부 기둥 지름의 크기에 따른 속도와 전단 변형률 변화를 비교하였다. 수치해석 결과를 바탕으로 채널 내부의 기둥을 설계하였다. 원기둥 지름에 따른 혈전 부착의 영향을 확인하기 위해 위 모델링의 원기둥 지름을 0.05 mm, 0.1 mm, 0.15 mm로 변경시켜가며 해석을 진행하였다. 실험에 사용된 경계조건은 실험의 체적유량 10 mL/h에 기반하여 입구 조건으로 질량유량 2.944×10^{-6} kg/s, 출구 조건은 0 Pa를 적용하였다. 작동 유체는 Newtonian 로 가정하고 혈액의 물성치를 참고하여 점도 0.004 kg/m·s, 밀도 1060 kg/m³을 사용하였다.

2.4 영상 처리 분석

실험 후, 칩에 부착된 혈전의 양을 측정하기

위해 Matlab R2022b을 통해 영상 분석을 하였다. 획득한 영상은 회색 이미지로 변환한 후, 혈전이 형성된 이미지에 실험 시작 시 촬영된 혈전이 없는 이미지를 빼서 혈전이 차지하고 있는 면적만 분리하였다. 분리된 이미지는 Otsu's method를 활용하여 이진화 하였으며, 혈전이 차지하는 픽셀 수를 획득하였다. 배율을 고려한 픽셀당 실제 길이로 변환하여 혈전 면적을 계산하였다.

3. 결과

3.1 수치해석 결과

속도와 전단 변형률은 혈소판의 활성화와 혈전 부착에 영향을 주는 요소이다.^(2,6) 또한 recirculation은 혈전 부착에 도움을 주는데 이는 전단 변형률의 변화로 확인할 수 있다.

Fig 2는 원기둥 지름 사이즈에 따른 유선을 보여준다. 채널의 협착 부위를 나오면서 감속된 유동은 기둥을 지남에 따라 국소적으로 가속과 감속을 반복한다. 현 실험 과정에서는 실험 시작 시, 채널 안으로 기포가 들어갈 수 있는데 채널의 기둥 개수가 동일하기 때문에 지름이 크기가 커짐에 따라 국소적인 가속이 강해져서 실험 도중 발생할 수 있는 기포 제거에 효과적이라고 예상했다. 또한 혈전 부착에 도움을 줄 수 있는 recirculation을 발생시키는 전단 변형률의 순간적인 변화를 비교하여 효과적인 채널을 설계했다.

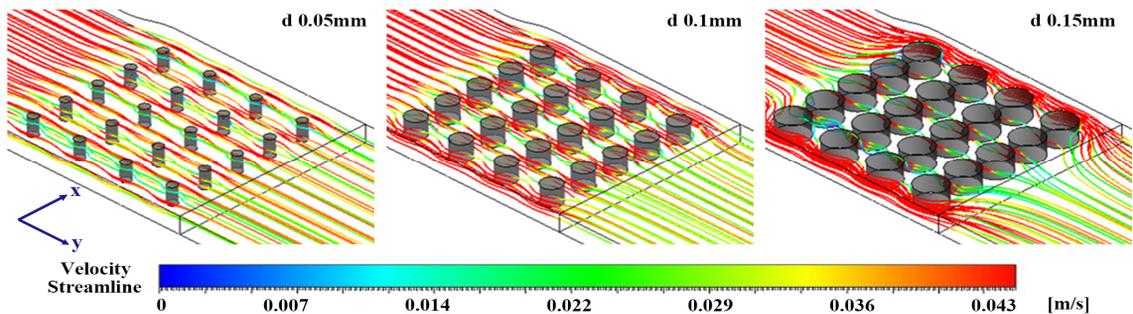


Fig 2. Streamlines for velocity in chips with different circular obstacles. The diameter of obstacles is 0.05, 0.1 and 0.15 mm.

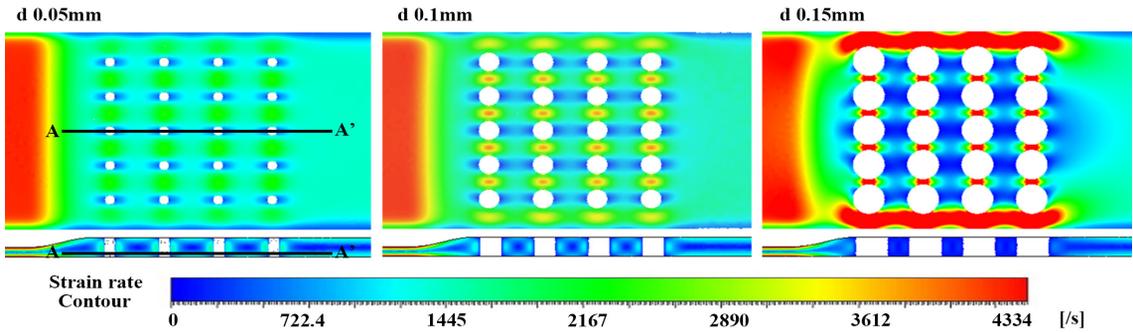


Fig. 3. Contours for strain rate in chips with different circular obstacles. The diameter of obstacles is 0.05, 0.1 and 0.15 mm.

지름이 커질수록 기둥 사이에서 x축 방향으로의 유동이 증가하고 y축 방향으로의 유동이 감소하였다. 속도가 증가하는 구간에서는 실험 중 발생한 기포가 채널을 지나 빠져나갈 수 있게 도와주며, 속도가 감소한 구간에서는 혈전 부착이 이루어질 것으로 예상했다. 지름 0.15 mm의 경우, 기둥과 기둥 사이가 너무 좁아 채널의 양끝으로 유동이 집중되어 기둥 사이에서 유량이 적어지게 된다. 이는 대부분의 혈액이 일부 유로에 집중되어 빠져나가는 것을 의미한다. 이와 같은 현상은 부착된 혈전이 큰 압력으로 제거되거나, 큰 혈전이 기둥과 기둥사이의 좁은 틈을 막아 채널 유로 전체를 막을 수 있기 때문에 0.05 mm와 0.1 mm 지름이 혈전 부착에 있어 더 적합하다고 판단했다.

Fig 3은 원기둥 지름 크기에 따른 전단 변형률 분포를 나타낸 것이다. 지름이 커질수록 x축 방향 기둥 사이의 전단 변형률이 증가하고, y축 방향의 기둥 사이에서는 전단 변형률이 감소하며, 이 결과는 앞서 제시한 속도 streamline 경향과 큰 차이가 없었다. 혈전은 전단 변형률이 감소하는 기둥 또는 기둥 사이에 부착될 것으로 판단하였고, 낮은 전단 변형률로 인해 기둥이 혈전 필터링 역할을 수행할 것으로 기대하였다.

Fig 4는 Fig 3에서 추출한 데이터를 그래프화한 것이다. 그래프의 x축 값은 채널의 길이이고, y축 값은 해당 지점에서의 전단 변형률이다. 추출한 데이터 값은 Fig 3의 A-A'에서 확인할 수 있듯이 채널의 바닥에서부터 0.008 mm 떨어진 곳의 중심축에서 추출하였다.

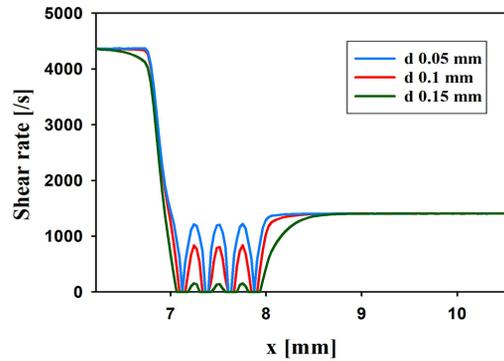


Fig. 4. Relation between the circle size and shear rate of stenosis in the chip. Strain rate value extracted from the A-A' line in Fig. 3.

협착이 끝나는 지점에서 세 채널 모두 전단 변형률이 급격히 감소하는 것을 확인하였고, 혈전 부착 지점인 기둥 구간에서의 전단 변형률은 지름의 크기가 작을수록 큰 변화를 보였다. 기둥 사이에서 전단 변형률이 급격하게 변동하는 것을 확인하였고, 지름의 크기가 가장 큰 0.15 mm의 경우, 부착 구간에서의 전단 변형률의 변동이 적은 것을 확인하였으며, 부착 구간 이후에서의 전단 변형률이 다른 지름의 값보다 천천히 변화하는 것을 보아 부착 구간 이후에서도 혈전 부착이 함께 이루어질 것으로 판단하였다.

기둥 구간 외에서의 혈전 부착은 관찰하기 어려울 뿐만 아니라 기둥 구간에서의 부착 효과를 확인하려는 본 연구에서 벗어나기 때문에 지름 0.15 mm는 부적절한 크기라고 판단하였다.

순간적인 가속과 감속은 기포 제거에 효율적이며, 이를 고려하면 기둥 사이의 유동이 원활한 0.05 mm와 0.1 mm가 적합하다고 판단했다. 협착 이후에 상대적으로 낮은 전단 변형률 영역이 형성되어 기포 제거와 혈전 부착에 효과적인 0.1 mm가 적합하다고 판단했다.

3.2 혈전 부착량 비교

혈전 부착은 콜라겐 배양에 따라 모든 구역에서 발생 가능하며, 실제로 촬영되지 않은 구간에서도 부착이 이루어졌다. 본 연구에서는 채널 구조에 따른 혈전 부착량을 측정하기 위해 구조물 근처의 혈전 부착량만 측정하였다. 실험은 기둥의 지름이 0.1 mm인 채널에서 진행되었다. 흡연자 4명, 비흡연자 4명 총 8개의 혈액 샘플로 각 2번 반복 수행되었으며, Fig 5는 대표적인 결과를 흡연자와 비흡연자 및 동일한 칩에 반복 주입한 횟수에 따라 정리하였다. 주입 횟수가 증가할수록 혈소판 응집 양이 증가하였으며, 흡연자의 혈액에서 더 많은 혈소판 응집 및 부착이 관찰되었다. 비흡연자의 혈액의 경우 혈소판 응집이 거의 발생하지 않았으며, 소량의 응집체는 높이가 달라지는 협착 끝부분에 부착하였다. 흡연자 혈액의 경우, 비흡연자에 비해 많은 혈

소판 응집체가 생성되었고, 협착 끝 부분과 기둥 사이에 부착되었다.

시뮬레이션과 비교하였을 때, 속도와 전단 변형률이 가장 크게 변화하는 협착 끝 부분에서 가장 많은 혈소판 응집체가 부착되었으며, 응집체의 양이 많아질수록 속도와 전단 변형률이 낮은 기둥 사이에서 부착되었다. 또한 여러 기둥들이 필터 역할을 하여 큰 혈소판 응집체들을 부착시켰다.

Table 1. Adhered areas of platelets for smokers and nonsmokers according to the number of injections.

	Area [mm ²]		
	Injection 1	Injection 2	Injection 3
Smoker	0.032±0.008	0.076±0.031	0.159±0.149
Nonsmoker	0.017±0.027	0.040±0.024	0.068±0.036

Table 1은 혈소판 응집체가 부착된 면적을 Matlab R2022b의 image process를 통해 정량화 하여 평균 ± 표준편차로 정리한 것이다. 영상은 예상한 것과 같이 주입 횟수에 따라 응집된 혈소판의 부착 면적이 증가하고 동시에 흡연자의 혈소판 응집체의 부착 면적이 비흡연자에 비해 2배 이상 큰 것을 확인할 수 있었다. 그러나 같

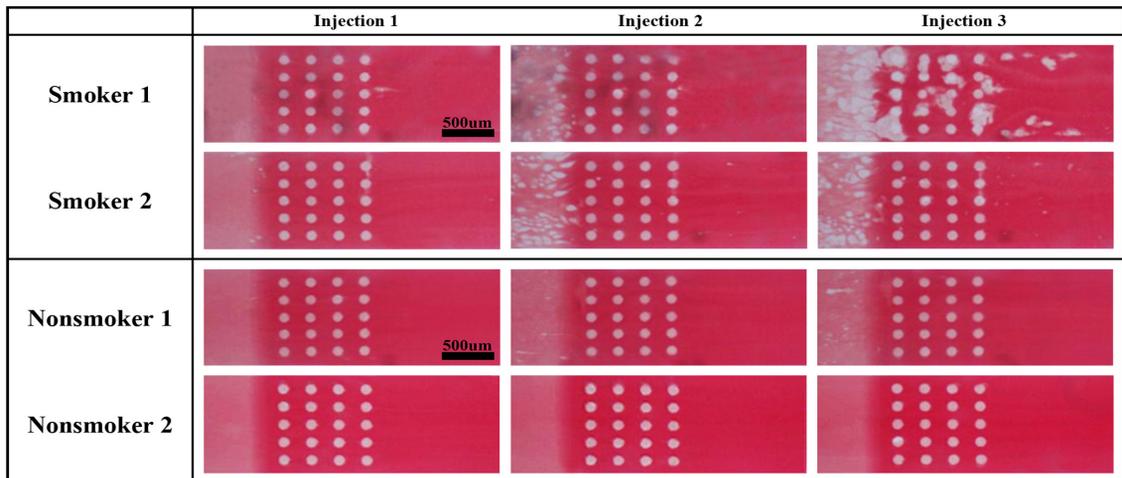


Fig. 5. Representative images of platelet adhesion using blood samples of smokers and non-smokers according to the number of injections.

은 흡연자 군 내에서도 개개인의 혈소판 반응 정도의 차이가 있어 상대적으로 높은 표준편차를 보이는 것을 확인할 수 있다.

실험결과를 통해 협착 구간으로 인해 혈소판 활성화가 진행되었으며, 협착 끝 부분에 부착되지 못한 혈소판 응집체는 20 개의 기둥을 거치면서 부착되어 협착만 있는 구조보다 기둥이 포함된 구조가 혈전 부착에 있어서 효과적이라는 것을 관찰했다.

4. 결론

본 연구에서는 3D 프린터를 이용하여 모델을 출력한 후, 채널을 제작하는 방식을 채택하여 혈전 양 측정을 위한 채널을 빠르고 쉽게 제작하고자 하였다. 가로세로 총 20개의 기둥으로 구성된 단순 협착 모델을 사용하여 혈전 부착을 용이하게 하였으며, 시뮬레이션을 통해 기둥의 적절한 지름 크기를 결정하였다. 혈액의 주입 횟수를 늘려 감에 따라 혈소판 활성화를 조절하려 하였다. 흡연자와 비흡연자의 혈액을 사용하여 채널의 성능을 확인하였다. 흡연자 혈액의 경우 비흡연자 혈액에서 보다 2배 이상 많은 혈소판 응집체가 부착된 것을 관찰할 수 있었고, 이러한 경향이 주입 횟수에 따라 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 질병에 따라 달라지는 극명한 혈전 반응이 아닌 흡연과 같은 인자로 기인한 미소한 혈전의 변화량을 측정할 수 있었다.

따라서, 이 연구는 3D 프린팅을 활용한 협착 구조 채널 제작 기술을 통해 혈전 모니터링 분야에서의 응용 가능성을 제시하고, 신속하고 정확한 혈전 양 측정에 기여할 수 있을 것이다.

후 기

이 성과는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2018R1A5A2023879).

REFERENCE

- 1) Ying Li, Tae-Hoon Bok, Jeong-Hwa Yang, Min-Joo Choi, And Dong-Guk Paeng, "The acute effects of smoking on the cyclic variations in blood echogenicity of carotid artery", *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 37, No. 4 (513~521), 2011
- 2) Abhishek Jain, Amanda Graveline, Anna Waterhouse, Andyna Vernet, Robert Flaumenhaft and Donald E. Ingber, "A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function", *Nature communications* 7, 2016
- 3) Mhairi J. Maxwell, Erik Westein, Warwick S. Nesbitt, Simon Giuliano, Sacha M. Dopheide, Shaun P. Jackson, "Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation", *Blood* 109 (2) (566~576), 2007
- 4) Suhwan Lee, Hyeonji Hong, Eunseop Yeom, Jae Min Song, "Measurement of RBC (red blood cell) deformability using 3D Printed Chip combined with Smartphone", *Journal of the Korean Society of Visualization*, Vol. 18, No. 3 (103~108), 2020
- 5) Sihui Xu, Jinxiang Piao, ByoungKwon Lee, ChaeSeung Lim, Sehyun Shin, "Platelet thrombus formation by upstream activation and downstream adhesion of platelets in a microfluidic system", *Biosensors and Bioelectronics* Vol 165, 2019
- 6) Sung Yong Jung and Eunseop Yeom, "Microfluidic measurement for blood flow and platelet adhesion around a stenotic channel: Effects of tile size on the detection of platelet adhesion in a correlation map", *Biomicrofluidics* 11, 2017