



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043885
(43) 공개일자 2020년04월28일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/483 (2006.01) G01N 27/02 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 33/4836 (2013.01)
G01N 27/021 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0031120</p> <p>(22) 출원일자 2019년03월19일
심사청구일자 2019년03월19일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180124677 2018년10월18일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)</p> <p>(72) 발명자
오정화
대전광역시 유성구 가정로 141번지</p> <p>안재환
대전광역시 유성구 가정로 141번지
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
이원희</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

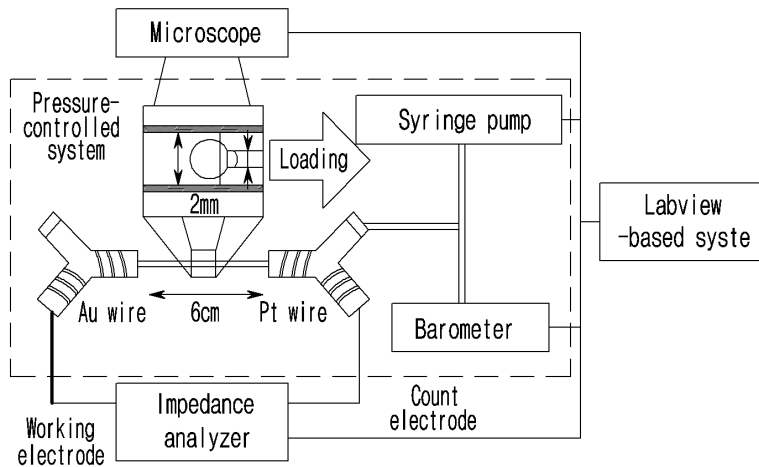
(54) 발명의 명칭 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 평가 시스템

(57) 요약

임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 평가 시스템에 관한 것으로,

본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템은 3차원 간 마이크로티슈를 사용하여 시험 약물의 지방간 형성 및 간 섬유화 독성에 의한 경도 변화를 비침습적이고 높은 재현성으로 동시에 분석할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
G01N 2500/10 (2013.01)
G01N 2800/7052 (2013.01)
G01N 2800/709 (2013.01)

양희영
 대전광역시 유성구 가정로 141번지
한형윤
 대전광역시 유성구 가정로 141번지

- (72) 발명자
윤석주
 대전광역시 유성구 가정로 141번지
안준호
 대전광역시 유성구 가정로 141번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03035898
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초 연구지원사업
 연구과제명 간조직의 구역별 대사 환경 (liver Zonation) 모사 미세 플랫폼 개발
 기여율 40/100
 주관기관 안전성평가연구소
 연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3A9C4953144
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 전통천연물 기반 유전자-동의보감 사업
 연구과제명 천연물 독성스크리닝을 위한 대체독성평가 실용화 기술개발
 기여율 40/100
 주관기관 안전성평가연구소
 연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1801-03
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 안전성평가연구소
 연구사업명 신약평가 예측용 기반기술 개발 사업
 연구과제명 AOP 기반 안전성 예측 기술 개발 사업
 기여율 20/100
 주관기관 안전성평가연구소
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

제1관; 및 상기 제1관 내부에 삽입 설치되고, 관의 길이가 상기 제1관보다 작은, 제2관;을 포함하는 간세포 스페로이드 변형 발생부; 및

상기 간세포 스페로이드 변형 발생부와 연결되어 간세포 스페로이드의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 분석기(impedance analyzer)를 포함하는 임피던스 측정부;를 포함하고,

상기 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스로부터 지방간 및 간 섬유화 독성을 평가하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1관 내경은 상기 제2관 외경과 동일하고, 상기 제2관의 내경은 간세포 스페로이드 직경보다 작은 것을 특징으로 하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간세포 스페로이드 변형 발생부는,

상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제3관으로, 상기 제3관은 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스페로이드 위치를 조절하는 제3관; 및

상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제4관으로, 상기 제4관은 상기 제1관내 압력을 조절하여 제1관 내 간세포 스페로이드 위치를 조절하는 제4관;을 포함하는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제3관은 Y자 형상이고,

상기 Y자 형상의 제3관은

상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제 i 관;

주사기가 연결되어 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스페로이드 위치를 조절 가능하게 하는 제 ii 관; 및

전극 소재를 포함하는 제 iii 관;을 포함하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 제4관은 Y자 형상이고,

상기 Y자 형상의 제4관은

상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제 I 관;

기압계(barometer)와 실린지 펌프 (syringe pump)가 연결되는 제II관; 및

전극 소재를 포함하는 제III관;을 포함하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 제iii관 내부에 구비되는 전극 소재는 코일 형상의 와이어 형태이고, 상기 제 i 관의 내부로 연장 형성된 것을 특징으로 하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 제III관 내부에 구비되는 전극 소재는 코일 형상의 와이어 형태이고, 상기 제 I 관의 내부로 연장 형성된 것을 특징으로 하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템.

청구항 8

제1항에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스펜로이드를 위치시키는 단계;

간세포 스펜로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;

간세포 스펜로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;

상기 제1 임피던스 및 제2 임피던스로부터, 상기 간세포 스펜로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및

정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 지방간 독성을 평가하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,

간세포 스펜로이드 변형 발생부가 버퍼 용액으로 채워진 상태에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,

시험 약물이 처리된 간세포 스펜로이드로부터 도출되는 내부 저항 (interior resistance) 값이, 정상 대조군보

다 클 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,

시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드로부터 도출되는 외부 저항 (exterior resistance) 값이, 정상 대조군보다 클 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,

시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드로부터 도출되는 정전 용량 (capacitance) 값이, 정상 대조군보다 작을 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법.

청구항 13

제1항에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;

간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;

간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;

간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제3 임피던스를 측정하는 단계;

간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제4 임피던스를 측정하는 단계;

상기 제1 임피던스, 제2 임피던스, 제3 임피던스, 제4 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및 기압의 변화로부터 스페로이드의 경도를 도출하는 단계를 포함하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 제2관 내경은, 상기 간세포 스페로이드 직경보다 작은 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법은,

간세포 스페로이드 변형 발생부가 버퍼 용액으로 채워진 상태에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 평가 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간은 간암이 발생하기까지 지방간, 간섬유화, 간경변 등의 단계를 거치기 때문에(비특허문헌 1, Liver Cancer. 2013 Aug; 2(3-4): 365-366) 지방간, 간섬유화를 유발하는 약물을 신약개발 초기 스크리닝 단계에서 거르는 과정은 매우 중요하다.

[0005] 초기 스크리닝 단계는 일반적으로 배양 접시에 인간 유래 세포를 배양한 후 약물에 직접 노출하여 세포활성의 저하를 보는 방식으로 진행되나 약물대사효소능 등 임상실험 결과와 유의성이 많이 떨어지는 단점이 존재한다. 이를 보완하기 위해 마이크로티슈(microtissue, MT) 및/또는 세포 스페로이드(cell spheroid)등 세포를 3차원 배양하여 작은 조직을 형성하여 스크리닝을 진행할 경우 배양 접시에서 배양된 간세포에 비해 약물대사효소나 활성 등이 높아 대체시험법으로 많이 사용되고 있다. 하지만, 단순 약물 독성뿐 아니라 세포 내 지방을 축적시키는 약물이나 긴 섬유 단백질인 콜라겐의 과다 분비로 인한 간 섬유화를 유도하는 약물 등은 세포의 용해(lysis), 또는 절개(section) 등의 번거로운 단계를 거쳐야 한다. 이러한 과정을 거치지 않고 조직 내부의 상태를 측정할 수 있는 방법으로 다양한 주파수의 교류전류를 흘려보내는 임피던스 분광법(impedance spectroscopy)이 연구되어 왔다.

[0007] 세포막은 친수성과 소수성 성질을 가지는 지질층으로 이루어져 있어 캐패시터(capacitor, 축전기) 성질을 띤다. 캐패시터는 고주파수의 전류는 통과하지만 저주파수의 전류는 차단하는 저주파수 필터로 작동한다. 이를 통해 고주파수와 저주파수의 임피던스(회로에서 전압이 가해졌을 때 전류의 흐름을 방해하는 값)의 차이를 통해 조직 내부 상태를 평가할 수 있는 것이다. 건강한 조직의 내부는 70% 이상 전류가 잘 흐르는 이온 수로 이루어져 있지만 약물에 의해 지방이 형성된 경우 전류저항이 높아져 조직 내부 임피던스 값이 증가한다.

[0009] 간 조직내 섬유화과정의 일어나면 세포 사이 섬유 단백질이 증가하여 조직의 강도(stiffness)가 증가한다. 조직을 일정한 압력으로 좁은 통로에 넣었을 때 조직의 저항값이 증가하는 것을 보았고 이는 조직의 변형률과 상관관계가 있음을 증명하였다. 가해진 압력과 변형률의 비를 통해 조직의 강도를 측정할 수 있다.

[0011] 이러한 연구 결과로,

[0012] 본 발명은 마이크로티슈 및/또는 세포 스페로이드를 사용하여 스크리닝 시험 약물의 지방간 및/또는 간 섬유화 독성을 비침습적이고 높은 재현성으로 분석할 수 있는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템과, 상기 시스템을 사용한 지방간 및 간 섬유화 독성 평가방법을 개발하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Liver Cancer. 2013 Aug; 2(3-4): 365-366

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 일 측면에서의 목적은 3차원 간 마이크로티슈를 사용하여 시험 약물의 지방간 및 간 섬유화 독성을 비침습적이고 높은 재현성으로 동시에 분석할 수 있는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 일 측면에서의 목적은 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 사용한 시험 약물의 지방간 독성 평가방법을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 일 측면에서의 목적은 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 사용한 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0022] 본 발명의 일 측면은,

[0023] 제1관; 및 상기 제1관 내부에 삽입 설치되고, 관의 길이가 상기 제1관보다 작은, 제2관;을 포함하는 간세포 스페로이드 변형 발생부; 및

[0024] 상기 간세포 스페로이드 변형 발생부와 연결되어 간세포 스페로이드의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 분석기(impedance analyzer)를 포함하는 임피던스 측정부;를 포함하고,

[0025] 상기 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스로부터 지방간 및 간 섬유화 독성을 평가하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은,

[0028] 상기에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;

[0029] 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;

[0030] 간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;

[0031] 상기 제1 임피던스 및 제2 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및

[0032] 정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 지방간 독성을 평가하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법을 제공한다.

[0034] 나아가, 본 발명의 또 다른 일 측면은,

- [0035] 상기에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0036] 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0037] 간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0038] 간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제3 임피던스를 측정하는 단계;
- [0039] 간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제4 임피던스를 측정하는 단계;
- [0040] 상기 제1 임피던스, 제2 임피던스, 제3 임피던스, 제4 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0041] 기압의 변화로부터 스페로이드의 경도를 도출하는 단계를 포함하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법을 제공한다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명의 일 측면은, 원통 형상의 제1관;
- [0044] 상기 제1관 내부에 삽입 설치되되, 외면이 상기 제1관 내면과 접하여 설치되고, 원통 길이가 상기 제1관보다 작은, 원통 형상의 제2관;
- [0045] 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 Y자 형상의 제3관에 있어서, 상기 Y자 형상의 제3관은 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제 i 관, 주사기가 연결되어 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스페로이드 위치를 조절 가능하게 하는 제 ii 관 및 코일 형상의 금(Au) 와이어가 내부에 구비되되 금 와이어의 일 말단이 외부로 돌출되는 제 iii 관을 포함하는 것을 특징으로 하는 Y자 형상의 제3관;
- [0046] 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 Y자 형상의 제4관에 있어서, 상기 Y자 형상의 제4관은 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제 I 관, 튜브를 통해 기압계 (barometer)와 실린지 펌프 (syringe pump)가 연결되는 제 II 관 및 코일 형상의 백금(Pt) 와이어가 내부에 구비되되 백금 와이어의 일 말단이 외부로 돌출되는 제 III 관을 포함하는 것을 특징으로 하는 Y자 형상의 제4관; 및
- [0047] 상기 외부로 돌출된 금 와이어에 연결되는 작업 전극 (working electrode) 및 상기 외부로 돌출된 백금 와이어에 연결되는 상대 전극 (counter electrode)을 포함하는 임피던스 분석기 (impedance analyzer); 를 포함하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 제공한다.
- [0049] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은, 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0050] 제 ii 관에 연결된 주사기를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키는 단계;
- [0051] 제 II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 내부에 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0052] 제 II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거(탈착)시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0053] 상기 제1 임피던스 및 제2 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0054] 정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 지방간 독성을 평가하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법을 제공한다.

- [0056] 나아가, 본 발명의 또 다른 일 측면은, 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스펜로이드를 위치시키는 단계;
- [0057] 제ii 관에 연결된 주사기를 사용하여 간세포 스펜로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키는 단계;
- [0058] 제II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펜로이드를 제2관의 일 말단에 고정시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0059] 제II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 기압을 높여 간세포 스펜로이드를 제2관 내부로 이동시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0060] 제II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 기압을 높여 간세포 스펜로이드를 제2관 내부로 더욱 이동시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제3 임피던스를 측정하는 단계;
- [0061] 제II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펜로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제4 임피던스를 측정하는 단계;
- [0062] 상기 제1 임피던스, 제2 임피던스, 제3 임피던스, 제4 임피던스로부터, 상기 간세포 스펜로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0063] 기압의 변화로부터 스펜로이드의 경도를 도출하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템은 3차원 간 마이크로티슈를 사용하여 시험 약물의 지방간 및 간 섬유화 독성을 비침습적이고 높은 재현성으로 동시에 분석할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템 모식도를 나타내는 이미지이다.
 도 2는 기압 변화에 따른 간 마이크로티슈(MT)의 변형, 임피던스, 위상각 변화를 나타내는 이미지이며, 도 2a는 대조군에 해당하고, 도 2b는 지방간 유도 약물인 0.5M 올레산을 처리한 간 마이크로티슈(MT)에 해당한다.
 도 3은 기압 변화에 따른 간 마이크로티슈(MT)의 저항 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0070] 본 발명의 일 측면은,
- [0071] 제1관; 및 상기 제1관 내부에 삽입 설치되고, 관의 길이가 상기 제1관보다 작은, 제2관;을 포함하는 간세포 스펜로이드 변형 발생부; 및
- [0072] 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부와 연결되어 간세포 스펜로이드의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 분석기(impedance analyzer)를 포함하는 임피던스 측정부;를 포함하고,
- [0073] 상기 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스로부터 지방간 및 간 섬유화 독성을 평가하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 제공한다.
- [0075] 본 측정시스템은 미지의 약물이 처리된 간세포 스펜로이드(또는 마이크로티슈(microtissue, MT))를 기압을 통해

고정한 후 약한 교류 전류를 흘려 마이크로티슈 내부의 상태를 측정 가능하게 한다. 지방간 유발 약물에 의해 전류저항이 높은 지방이 많이 형성된 마이크로티슈는 임피던스가 정상 대조군 마이크로티슈에 비해 높게 측정된다. 또한 기압(응력)에 의한 마이크로티슈의 임피던스(변형률)의 비를 통해 마이크로티슈의 강성(stiffness)을 측정할 수 있다. 간 섬유화는 간 세포 사이 염증에 의한 섬유 단백질(e.g. 콜라겐)의 과다축적으로 조직의 강성이 증가하는 것으로 평가한다. 임피던스는 마이크로티슈의 변형률과 비례하므로 기압을 정밀하게 조절하면 응력 변형 곡선(stress-strain curve)을 그려 그 기울기로 강성을 평가할 수 있다.

- [0077] 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템에 있어서, 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부는 임피던스 측정 대상인 간세포 스펜로이드가 위치하며, 간세포 스펜로이드가 외부 조건에 의해 변형이 발생할 수 있는 공간일 수 있다. 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부는 제1관 및 제1관 내부에 삽입 설치되는 제2관을 포함한다.
- [0078] 상기 제1관은 중공의 실린더 형상일 수 있고, 원통 등의 형상일 수 있다. 상기 2관 또한 중공의 실린더 형상일 수 있고, 원통 등의 형상일 수 있다.
- [0079] 상기 제1관 내경은 상기 제2관 외경과 동일할 수 있고, 상기 제2관은 상기 제1관 내부에 삽입 설치되며, 외면이 상기 제1관 내면과 접하여 설치될 수 있다. 상기 제1관 내경과 제2관 외경이 동일함에 따라, 제2관이 제1관 내부에 고정될 수 있다. 제2관은 제1관 내부 중심에 고정될 수 있다. 제1관과 제2관은 길이방향으로의 면이 서로 접하여 구비될 수 있다.
- [0080] 상기 원통 형상의 제2관 내경은, 상기 간세포 스펜로이드 직경보다 작은 것이 바람직하다. 상기 원통 형상의 제2관 내경이 상기 간세포 스펜로이드 직경보다 작음으로써, 상기 간세포 스펜로이드가 제2관을 통과하지 못하고 감압에 의해 제2관의 일 말단에 고정될 수 있다.
- [0082] 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부는 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제3관으로, 상기 제3관은 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스펜로이드 위치를 조절하는 제3관; 및 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제4관으로, 상기 제4관은 상기 제1관 내 압력을 조절하여 제1관 내 간세포 스펜로이드 위치를 조절하는 제4관;을 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 제3관은 Y자 형상이고, 상기 Y자 형상의 제3관은 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제 i 관; 주사기가 연결되어 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스펜로이드 위치를 조절 가능하게 하는 제 ii 관; 및 전극 소재를 포함하는 제 iii 관;을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제 iii 관 내부에 구비되는 전극 소재는 코일 형상의 와이어 형태이고, 상기 제 i 관의 내부로 연장 형성될 수 있다.
- [0084] 상기 제4관은 Y자 형상이고, 상기 Y자 형상의 제4관은 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제 I 관; 기압계(barometer)와 실린지 펌프(syringe pump)가 연결되는 제 II 관; 및 전극 소재를 포함하는 제 III 관;을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제 III 관 내부에 구비되는 전극 소재는 코일 형상의 와이어 형태이고, 상기 제 I 관의 내부로 연장 형성될 수 있다.
- [0085] 일례로, 상기 제 iii 관 내부에 구비되는 코일 형상의 금(Au) 와이어는, 제 i 관의 내부로 연장 형성될 수 있고, 상기 제 III 관 내부에 구비되는 코일 형상의 백금(Pt) 와이어는, 제 I 관의 내부로 연장 형성될 수 있다. 이렇게 금, 백금 와이어가 연장 형성될 경우 상기 금, 백금 와이어가 제1관, 제2관, 제3관, 제4관 내 채워지는 버퍼 용액을 보다 용이하게 공유할 수 있어, 정확하고 신뢰성 있는 임피던스 값 변화를 측정할 수 있게 된다.
- [0087] 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템에 있어서, 상기 임피던스 측정부는 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부와 연결되어 간세포 스펜로이드의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 분석기(impedance analyzer)를 포함한다. 상기 임피던스 분석기는 작업 전극 및 상대 전극을 포함하고, 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부와 연결될 수 있다. 구체적인 일례로, 상기 임피던스 분석기의 작업 전극은 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부의 전극 소재를 포함하는 제 iii 관의 전극 소재와 연결될 수 있으며, 바람직하게 상기 전극 소재는 코일 형태의 금 와이어로 구성되어 외부로 돌출된 금 와이어와 연결될 수 있다. 또한, 상기 임피던스 분석기의 상대 전극은 상기 간세포 스펜로이드 변형 발생부의 전극 소재를 포함하는 제 III 관의 전극 소재와 연결될 수 있으며, 바람직하게 상기 전극 소재는 코일 형태의 백금 와이어로 구성되어 외부로 돌출된 백금 와이어와 연결될 수

있다.

- [0089] 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템은 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스로부터 지방간 및 간 섬유화 독성을 평가할 수 있다.
- [0091] 또한, 구체적인 일례로, 본 발명의 일 측면은, 원통 형상의 제1관;
- [0092] 상기 제1관 내부에 삽입 설치되되, 외면이 상기 제1관 내면과 접하여 설치되고, 원통 길이가 상기 제1관보다 작은, 원통 형상의 제2관;
- [0093] 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 Y자 형상의 제3관에 있어서, 상기 Y자 형상의 제3관은 상기 제1관의 일 말단에 연결되는 제 i 관, 주사기가 연결되어 상기 제1관 내 압력을 가해 제1관 내 간세포 스페로이드 위치를 조절 가능하게 하는 제 ii 관 및 코일 형상의 금(Au) 와이어가 내부에 구비되되 금 와이어의 일 말단이 외부로 돌출되는 제 iii 관을 포함하는 것을 특징으로 하는 Y자 형상의 제3관;
- [0094] 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 Y자 형상의 제4관에 있어서, 상기 Y자 형상의 제4관은 상기 제1관의 다른 일 말단에 연결되는 제 I 관, 튜브를 통해 기압계 (barometer)와 실린지 펌프 (syringe pump)가 연결되는 제 II 관 및 코일 형상의 백금(Pt) 와이어가 내부에 구비되되 백금 와이어의 일 말단이 외부로 돌출되는 제 III 관을 포함하는 것을 특징으로 하는 Y자 형상의 제4관; 및
- [0095] 상기 외부로 돌출된 금 와이어에 연결되는 작업 전극 (working electrode) 및 상기 외부로 돌출된 백금 와이어에 연결되는 상대 전극 (counter electrode)을 포함하는 임피던스 분석기 (impedance analyzer); 를 포함하는, 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템을 포함할 수 있다.
- [0097] 나아가, 상기에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0098] 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0099] 간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0100] 상기 제1 임피던스 및 제2 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0101] 정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 지방간 독성을 평가하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법을 제공한다.
- [0103] 구체적인 일례로, 본 발명의 다른 일 측면은, 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0104] 제 ii 관에 연결된 주사기를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키는 단계;
- [0105] 제 II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 고정시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0106] 제 II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단으로부터 제거 (탈착)시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0107] 상기 제1 임피던스 및 제2 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0108] 정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 지방간 독성을 평가하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 지방간 독성 평가방법을 제공한다.

- [0110] 상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,
- [0111] 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시킨 후,
- [0112] 제1관을 Y자 형상의 제3관과 Y자 형상의 제4관 사이에 연결하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0114] 또한, 상기 제2관 내경은, 상기 간세포 스페로이드 직경보다 작은 것이 바람직하며, 그 이유는 전술한 바와 동일하다.

- [0116] 나아가, 상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,
- [0117] 간세포 스페로이드 변형 발생부가 버퍼 용액으로 채워진 상태에서 수행되는 것이 바람직하고, 일례로, 제1관, 제2관, 제3관 및 제4관이 버퍼 용액으로 채워진 상태에서 수행되는 것이 바람직하다.

- [0119] 또한, 상기 시험 약물의 지방간 독성 평가방법은,
- [0120] 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드로부터 도출되는 내부 저항 (interior resistance) 값이, 정상 대조군보다 클 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계;
- [0121] 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드로부터 도출되는 외부 저항 (exterior resistance) 값이, 정상 대조군보다 클 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계; 및/또는
- [0122] 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드로부터 도출되는 정전 용량 (capacitance) 값이, 정상 대조군보다 작을 경우, 시험 약물이 지방간 독성을 갖는 것으로 판단하는 단계; 를 더 포함할 수 있다.

- [0124] 나아가, 상기에 따른 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0125] 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;
- [0126] 간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0127] 간세포 스페로이드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제3 임피던스를 측정하는 단계;
- [0128] 간세포 스페로이드를 제2관으로부터 제거시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제4 임피던스를 측정하는 단계;
- [0129] 상기 제1 임피던스, 제2 임피던스, 제3 임피던스, 제4 임피던스로부터, 상기 간세포 스페로이드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0130] 기압의 변화로부터 스페로이드의 경도를 도출하는 단계를 포함하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법을 제공한다.

- [0132] 구체적인 일례로, 본 발명의 또 다른 일 측면은, 상기 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템의 제1관 내부에, 시험 약물이 처리된 간세포 스페로이드를 위치시키는 단계;
- [0133] 제 ii 관에 연결된 주사기를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 접촉하도록 위치시키는 단계;
- [0134] 제 II 관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스페로이드를 제2관의 일 말단에 고정시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정하는 단계;

- [0135] 제Ⅱ관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펀지로드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제2 임피던스를 측정하는 단계;
- [0136] 제Ⅱ관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펀지로드를 제2관의 내부로 밀어넣고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제3 임피던스를 측정하는 단계;
- [0137] 제Ⅱ관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펀지로드를 제2관의 일 말단으로부터 제거 (탈착)시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제4 임피던스를 측정하는 단계;
- [0138] 상기 제1 임피던스, 제2 임피던스, 제3 임피던스, 제4 임피던스로부터, 상기 간세포 스펀지로드의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance) 및 정전 용량 (capacitance)을 도출하는 단계; 및
- [0139] 기압의 변화로부터 스펀지로드의 경도를 도출하는 단계; 를 포함하는, 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법을 제공한다.

- [0141] 상기 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법은,
- [0142] 정상 대조군과 비교하여 시험 약물의 간 섬유화 독성을 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0144] 상기 시험 약물의 간 섬유화 독성 평가방법에 있어서,
- [0145] 제Ⅱ관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펀지로드를 제2관의 일 말단에 고정시키고, 임피던스 분석기 (impedance analyzer)를 사용하여 제1 임피던스를 측정한 후,
- [0146] 제Ⅱ관에 연결된 실린지 펌프 (syringe pump)를 사용하여 간세포 스펀지로드를 제2관으로부터 제거시키기 이전에,
- [0147] 실린지 펌프 (syringe pump)를 통한 감압 정도를 변경하여 추가적인 임피던스를 더 측정할 수도 있다.

- [0149] 예를 들어,
- [0150] 상기 제1 임피던스를 측정하는 단계는,
- [0151] 실린지 펌프 (syringe pump)를 통해 기압을 -10 mPa로 설정하여 제1-1 임피던스를 측정하고,
- [0152] 실린지 펌프 (syringe pump)를 통해 기압을 -15 mPa로 설정하여 제1-2 임피던스를 측정하고,
- [0153] 실린지 펌프 (syringe pump)를 통해 기압을 -20 mPa로 설정하여 제1-3 임피던스를 측정하는 단계를 더 포함할 수도 있다.

- [0155] 기압을 강하게 설정할수록 간세포 스펀지로드는 제2관의 일 말단에 더욱 강력하게 고정된다. 스펀지로드가 제2관의 내부로 들어갈수록 변형률이 증가하면 임피던스 값이 증가한다. 간 섬유화 유발 약물에 의해 간세포 스펀지로드의 강성이 증가한다면, 응력에 따른 임피던스의 비가 줄어들게 된다.

- [0157] 본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템은 3차원 간 마이크로티슈를 사용하여 시험 약물의 지방간 및 간 섬유화 독성을 비침습적이고 높은 재현성으로 동시에 분석할 수 있는 효과가 있으며, 이는 후술하는 실시예 및 실험예에 의해 직접적으로 뒷받침된다.

- [0159] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다.
- [0160] 단, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명을 일 측면에서 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0162] <제조예 1> 간 마이크로티슈(MT) 형성
- [0163] 1. 완전히 분화된 HepaRG 간세포 주를 4,000,000 세포/100 uL 밀도로 수득하였다.
- [0164] 2. (주)마이크로핏 사의 C253000 제품의 매뉴얼대로 제품을 준비한 후, 각 웰 당 1번의 세포 부유액을 10 uL씩 분주하여 각 웰 당 400,000 개의 HepaRG 세포가 위치하도록 하였다. 본 단계는 마이크로 패턴 플레이트나 현적법(hanging drop) 등 3D 세포 제조 방법을 이용해도 무방하다.
- [0165] 3. 3일 간 배양하며 매일 세포 배지를 교체하였다.
- [0166] 4. 4일째 Corning 사의 Ultra-Low attachment surface multiple well plate size 96 웰에 각각 MT 를 1000 uL 용 블루 팁을 사용하여 분주하였다.
- [0168] <실시예 1> 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템 제작
- [0169] 1. 외경 2 mm, 내경 1.8 mm, 길이 8 cm 유리관(제1관)에, 외경 1.8 mm, 내경 0.4 mm, 길이 5 mm 의 플라스틱 팁(제2관)을 유리관 가운데 부분에 위치시켰다.
- [0170] 2. 2개의 Y자 관(각각 제3관, 제4관)을 준비한 후, Y 관(제3관) 한쪽(제iii관)에 지름 0.5 mm, 길이 5 cm 99% 이상 금(Au) 와이어를, 또 다른 Y 관(제4관) 한쪽(제III관)에는 지름 0.5 mm, 길이 5 cm 99% 이상 백금(Pt) 와이어를 코일 형태로 위치시키고, 상기 금(Au), 백금(Pt) 와이어의 끝 부분을 Y 관 외부에 노출한 후, 공기와 물이 새지 않도록 관(제iii관, 제III관) 말단을 밀봉하였다.
- [0171] 3. 백금(Pt) 와이어가 위치한 Y 관 나머지 한쪽 끝(제II관)은 튜브로 연결되어 기압센서와 실린지 펌프와 연결하고, 금(Au) 와이어가 위치한 Y 관 나머지 한쪽 끝(제ii관)은 1 mL 주사기에 연결하여 추후 간 마이크로티슈(MT) 위치를 수동적으로 조절할 수 있게 하였다.
- [0172] 4. 각 Y관 내부를 PBS 버퍼로 채웠다.
- [0174] <실험예 1> 약물 유도 지방간 독성 평가
- [0175] (실시예 1의 1 내지 4에 이어서)
- [0176] 5a. Ultra-Low attachment에 분주한 간 마이크로티슈(MT)에 지방간 독성 약물인 0.5M 올레산(oleic acid)을 1 일 또는 2 일간 처리하였다.
- [0177] 6a. 상기 실시예 1의 1번 유리관 끝에 200 uL 파이펫을 꽂고, 다른 한쪽 끝을 통해 간 마이크로티슈(MT)와 배양액을 빨아드려 기포가 생기지 않도록 유리관을 채웠다.
- [0178] 7a. 기포가 생기지 않도록 상기 유리관을, 상기 실시예 1, 4번의 2개 Y관(제3관, 제4관) 사이에 꽂는다.
- [0179] 8a. 각 Y관 내 와이어가 같은 액체를 공유하도록 액체 내 기포를 제거한다.
- [0180] 9a. 일정 전위(Potentiostat) 또는 임피던스 분석기(impedance analyzer)의 작업 전극/감지 전극(Working electrode/sensing electrode)을, Y관(제iii관) 밖으로 도출된 금(Au) 와이어에 연결하고, 레퍼런스/상대 전극(Reference/counter electrode)을, Y관(제III관) 밖으로 도출된 백금(Pt) 와이어에 연결하였다.
- [0181] 본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템 모식도를 도 1에 나타내었다.
- [0182] 10a. 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁 끝에 위치하도록, 1 mL 주사기를 이용하여 위치시켰다.
- [0183] 11a. 기압이 -5 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 압력 차이에 의해 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁에 고정되도록 한다.
- [0184] 12a. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 교류 임피던스를 측정하여 간 마이크로티슈(MT)와 PBS 버퍼의 임피던스를 측정한다.

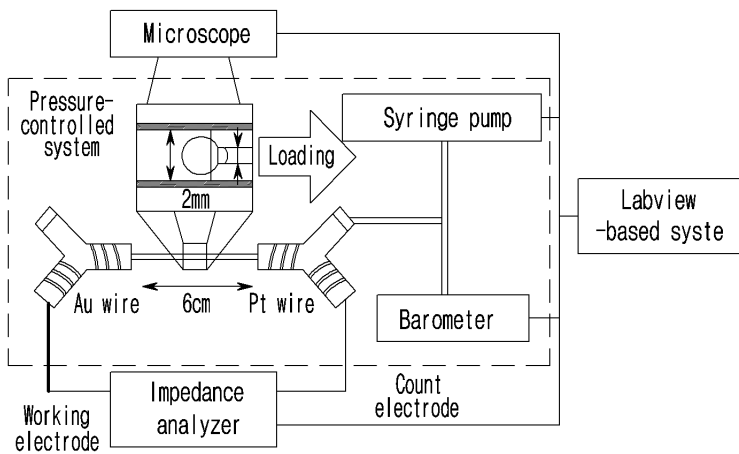
- [0185] 13a. 기압이 10 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁으로부터 제거되도록 한다.
- [0186] 14a. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 임피던스를 측정하여 PBS 버퍼(background)의 임피던스를 측정한다.
- [0187] 15a. Fitting 프로그램 (e.g. Zview)을 통해 12a. 의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance), 정전 용량 (capacitance) 값과, 14a. 의 저항(resistance), 정전 용량 (capacitance) 값을 구한다.
- [0188] 16a. 간 마이크로티슈(MT)의 내부 저항, 외부 저항, 정전 용량 값을, 정상 대조군과 비교한다. 이때, 정상 대조군은 지방간 독성 약물인 올레산(oleic acid)을 처리하지 않은 간 마이크로티슈(MT)로부터 측정되는 값을 나타낸다.
- [0189] 17a. 올레산(oleic acid)으로 인해 조직 내 지방이 형성되었다면 전류 흐름이 방해되어 내부 저항값이 증가하고, 세포크기가 커졌다면 세포 간의 간격을 반영하는 외부 저항값이 증가한다. 정전 용량은 세포막의 안정성을 반영하므로 시험 약물이 독성이 있다면, 정전 용량값은 감소한다.
- [0191] 그 결과를 도 2a, 도 2 b, 도 3에 나타내었다.
- [0193] 도 2는 기압 변화에 따른 간 마이크로티슈(MT)의 변형, 임피던스, 위상각 변화를 나타내는 이미지이며, 도 2a는 대조군에 해당하고, 도 2b는 올레산을 처리한 간 마이크로티슈(MT)에 해당한다.
- [0194] 도 3은 기압 변화에 따른 간 마이크로티슈(MT)의 저항 변화를 나타내는 그래프이다.
- [0196] 도 2a, 도 2b, 도 3에 나타난 바와 같이,
- [0197] 올레산(oleic acid)으로 인해 간 마이크로티슈(MT) 내 지방이 형성되어, 정상 대조군 대비 임피던스와 저항값이 증가하는 것으로 나타났다.
- [0199] 이로부터, 본 발명의 일 측면에서 제공되는 임피던스 기반 지방간 및 간 섬유화 독성 평가 시스템은 3차원 간 마이크로티슈를 사용하여 시험 약물의 지방간 및 간 섬유화 독성을 비침습적이고 높은 재현성으로 동시에 분석할 수 있음을 알 수 있다.
- [0201] <실험예 2> 약물 유도 간 섬유화 독성 평가
- [0202] (실시에 1의 1 내지 4에 이어서)
- [0203] 5b. Ultra-Low attachment 에 분주한 간 마이크로티슈(MT)에 간 섬유화 유발 약물인 TGF-beta를 1 일 또는 2 일 간 처리하였다.
- [0204] 6b~12b. 상기 실험예 1의 6a~12a와 동일하게 수행하였다.
- [0205] 13b 기압이 -10 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁으로 약간 더 강하게 고정되도록 한다.
- [0206] 14b. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 교류임피던스를 측정하여 간 마이크로티슈(MT)와 PBS 버퍼 (background)의 임피던스를 측정한다.
- [0207] 15b. 기압이 -15 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁으로 약간 더 강하게 고정되도록 한다.
- [0208] 16b. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 교류임피던스를 측정하여 간 마이크로티슈(MT)와 PBS 버퍼

(background) 의 임피던스를 측정한다.

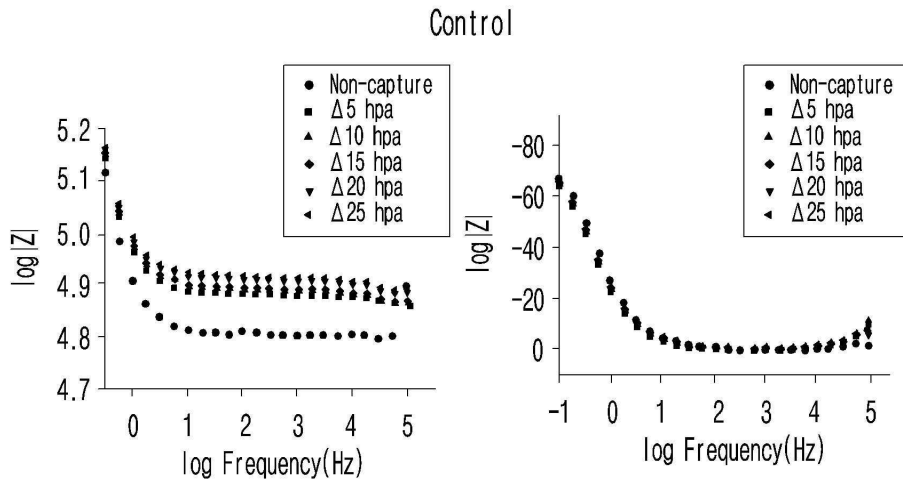
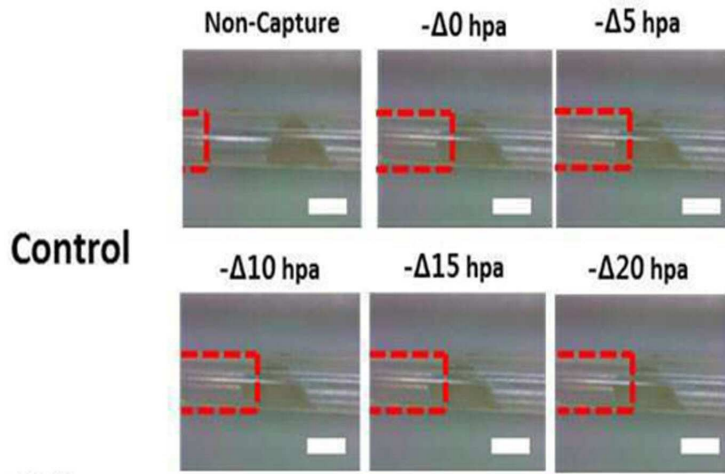
- [0209] 17b. 기압이 -20 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁으로 약간 더 강하게 고정되도록 한다.
- [0210] 18b. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 교류임피던스를 측정하여 간 마이크로티슈(MT)와 PBS 버퍼 (background) 의 임피던스를 측정한다.
- [0211] 19b. 기압이 10 mPa 되도록 실린지 펌프를 설정하여 간 마이크로티슈(MT)가 플라스틱 팁으로부터 제거되도록 한다.
- [0212] 20b. 고정전압 50 mV 으로 10^6 Hz 에서 10^{-2} Hz 까지 임피던스를 측정하여 PBS 버퍼 (background) 의 임피던스를 측정한다.
- [0213] 21b. Fitting 프로그램 (e.g. Zview)을 통해 12b, 14b, 16b, 18b의 내부 저항 (interior resistance), 외부 저항 (exterior resistance), 정전 용량 (capacitance) 값과, 20b의 저항(resistance), 정전 용량 (capacitance) 값을 구한다.
- [0214] 22b. PBS의 임피던스를 제외한 간 마이크로티슈(MT)의 내부 저항, 외부 저항, 정전 용량 값을, 정상 대조군과 비교한다. 이때, 정상 대조군은 간 섬유화 유발 약물인 TGF-beta를 처리하지 않은 간 마이크로티슈(MT)로부터 측정되는 값을 나타낸다.
- [0215] 23b. 임피던스는 간 마이크로티슈(MT)의 변형율과 비례하여 증가한다. 따라서 응력에 따른 변형률의 변화는 기압과 임피던스의 기울기로 나타낼 수 있다. 간 섬유화 유발 약물에 의해 간 마이크로티슈(MT)의 강성도 (stiffness)가 증가한다면 응력에 따른 변형률의 비가 줄어든다.

도면

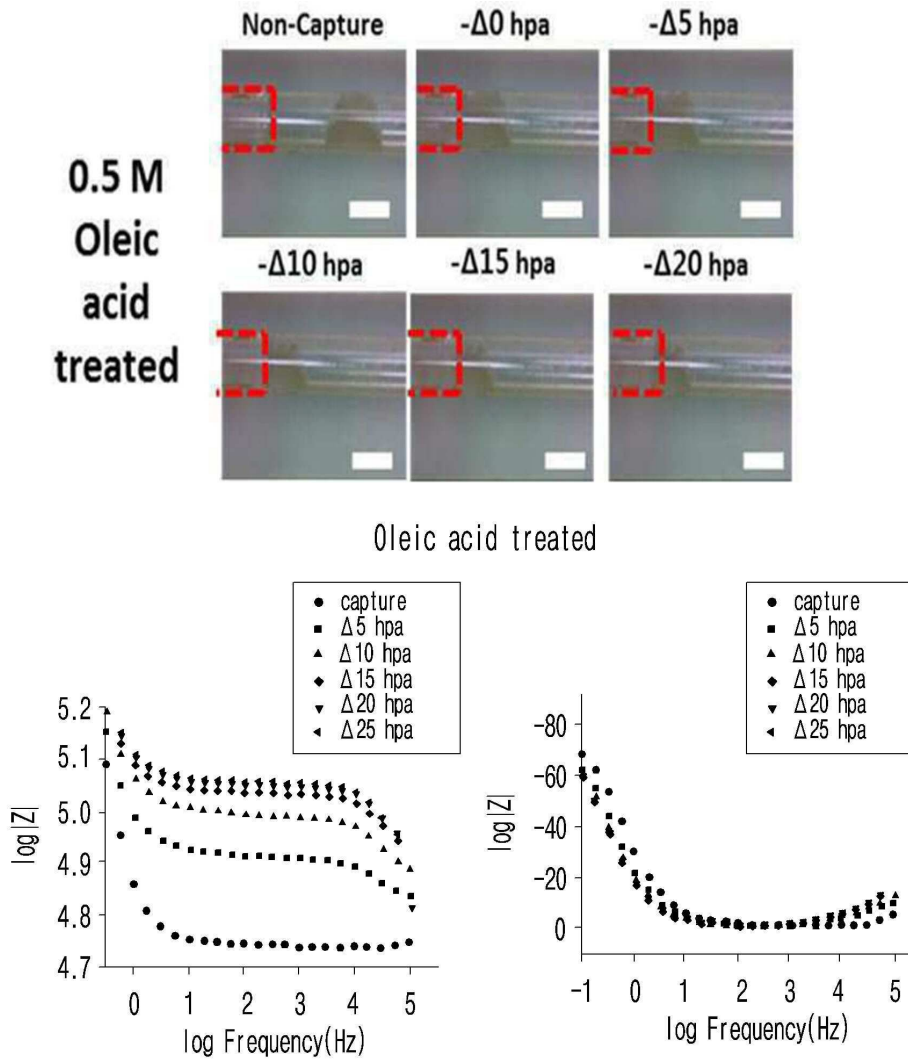
도면1



도면2a



도면2b



도면3

