

拉伸應力對紅血球溶血的影響

THE EFFECT OF EXTENSIONAL STRESS ON RED BLOOD CELL HEMOLYSIS

計畫編號：NSC 101-2221-E-032-004- 執行期限：101/08/01~102/07/31

盧博堅 P.C. Lu¹ 嚴仁鴻 J.H. Yen¹ 蔡明勳 M.H. Tsai¹ 邱奕銘 Y.M. Chiou¹ 陳曉鐘 H.Z. Chen¹ 陳銘凱 M.K.Chern²，¹ 淡江大學水資源及環境工程系 Department of Water Resources and Environmental Engineering, Tamkang University, ² 淡江大學化學系 Department of Chemistry, Tamkang University

摘要 - 本研究以突縮之微細短毛細管做為實驗流場，其在進口端會產生一強烈的拉伸應力場，此流場先經由 CFD 的計算，求出其應力值，然後採用豬的新鮮紅血球，進行溶血的測試，以了解拉伸應力對溶血的影響。結果顯示和先前的研究結果是一致的，拉伸應力為紅血球破壞的主要機械力，且其閾值約為 1000 Pa。

Abstract - In this study, we created a strong extensional stress flow field with the sharp contraction of a short capillary. The flow field generated at the entrance of the capillary was calculated with CFD to determine the stress values, which was followed by hemolysis experiments with porcine red blood cells to determine the effects of extensional stress on hemolysis. Our results were consistent with prior studies in that the extensional stress was the primary mechanical force involved in hemolysis with a threshold value of 1000 Pa.

緣由與目的

溶血(hemolysis)是血液流經血泵、人工心瓣、氧合裝置等人工器官時，紅血球遭受非生理流況所產生之應力使其外膜破裂而釋放出血紅素到血漿中。血漿中的自由血紅素是含有毒性的，會造成腎臟及其他器官之衰竭。因此在人工器官的研發中，均期望能預測人工器官內的流況所引發的溶血。美國食品藥物管理局(FDA)提出一個計畫案，集合 28 個實驗室，試圖建立一個標準的計算流體模式，應用在評估醫療裝置功能以及血球破壞的安全性，要求在新設計的雛型，以及針對目前已經在臨床上使用的人工器官的改善計畫，先進行 CFD 的評估，而不必花費時間及金錢去製造原型、做動物實驗及臨床實驗[1]。早期的研究利用簡單的均勻剪力流場，以切應力及暴露時間為參數，找出這些參數乘冪關係之模式[2]。此模式普遍被一些學者採用來做人工器官的溶血預測模式。但從量化的觀點來看，體外真實血液實驗的結果和 CFD 的分析有很大的差別[3]。會造成此種差異性的原因，一般認為拉伸應力對血球的破壞更甚於剪應力。本實驗利用圓管內插入中央有小圓孔之薄圓板，此小圓孔有如一個短的毛細管，可以在進口端產生一拉伸流場，其產生的拉伸應

力足夠破壞紅血球。利用此設置探討血球受拉伸應力的破壞機制及其溶血的閾值，此有助於溶血模式的修正。

材料與方法

1. CFD 流場分析

流場的模擬如圖 1 所示，模擬軟體為 Fluent 6.3。毛細管管徑為 0.051 cm，厚度為 0.2 cm，流體黏滯度為 17 cP 與 31 cP。毛細管內的平均速度設定為 3~16 m/s，其雷諾數均小於 2000，屬於層流。先由 CFD 計算流場，再計算其切應力 $\tau_{rz} = -\mu((\partial v_r / \partial z) + (\partial v_z / \partial r))$ 與拉伸應力 $\tau_{zz} = -\mu(2\partial v_z / \partial z)$ ， $\tau_{rr} = -\mu(2\partial v_r / \partial r)$ 。完成每個設定速度之流場後，沿半徑等間格取得十條分布於流場的流線，並求得於流線上之最大的拉伸應力與切應力，再取兩條臨近的流線之平均值乘上此二流線所包含之面積權重，最後加總並除上總面積得流場的三應力的最大平均值(表 1)。

2. 溶血實驗

流場設置如圖 2 所示。利用 Dextran 40 加入 PBS 用以改變溶液的黏度，其黏滯度為 17 cP 和 31 cP，然後加入經過離心與清洗過後豬血的血球，調配為血容積比 5 %。實驗時，鋼管內先注滿血液，然後以馬達控制器設定活塞所需之推進速度與距離，將血液推過圓片的小孔，並收入到注射針筒之中。經過流場破壞後之實驗樣本，再利用分光光譜儀，設定在波長 540 nm 量測其 O.D 值，來推求血紅素濃度，得知樣本與其完全破壞之自由血紅素濃度，兩者之比得溶血指數 IH(%)。表 1 所示之 IH(%) 為 6 次不同實驗之平均值。

結果與討論

從圖 3 中可以很明顯的發現流場中的三種應力是屬於局部性的熱點分布，其應力於轉角處附近較大，切應力於轉角內仍有應力呈現一羽毛狀的向內延伸，而拉伸應力只有一小部分。同一條流線上，可以明顯發現三種應力在入口端呈現一尖峰值，其中 τ_{zz} 的值最大， τ_{rr} 和 τ_{rz} 的值較小(圖 4)。拉伸應力只有在入口端出現峰值，而在其他位置皆趨近於零， τ_{rz} 的應力分布在入口端達到峰值之後仍有應力上升且向內延伸，其量級相當於峰

值。由 Zhao et al.[4]的研究發現血球在微流道中，即使壁切應力達 5000 Pa，也無溶血的現象發生。Lee et al.[5]利用平板的雙曲線微流道探討紅血球的變形指數。發現在相同應力之下拉伸應力所造成的變形是切應力的 2 倍。且有多位學者發現在剪力流場之下，紅血球的細胞膜會產生戰車履帶式的轉動，減少剪應力對血球的破壞。由以上可知紅血球的破壞，拉伸應力才是血球破壞的機械力。關於溶血部分，從圖 5 可以看到溶血與 τ_{zz} 在各個量級的關係，而大於 1000 Pa 之後溶血的趨勢呈現一穩定上升，不同粘滯度下的兩條線，應力與溶血呈現相同的趨勢，因此認定 1000 Pa 為溶血的閾值。Down et al. [6]依據 Keshaviah[7]的長毛細管溶血實驗結果，重作 CFD 的分析，利用管內的一條流線作為溶血閾值的分界線，此線至管壁為溶血區，以溶血區所佔之的面積比，即為溶血 IH 的百分比。據此溶血的閾值為 3000 Pa，但是在較小的 IH 之下，此分界線相當鄰近管壁，而近管壁的應力梯度較大，會導致其值的誤差。

結論

過去很多研究學者認為切應力是血球破壞的機械力，但是由最近的文獻中，驗證拉伸應力才是血球破壞的主要機械力。而在本研究中所得實驗結果，拉伸應力的大小與溶血指數呈現一個平滑曲線的趨勢，且在不同黏性度之下兩條曲線相互重合，從此曲線得知拉伸應力的溶血閾值為 1000 Pa。此實驗結果可作為溶血模式修正的參考依據。

參考文獻

- [1] Hariharan P, Giarra M, Reddy V, et al. (2011) ASME J Biomech Eng , 133/ 041002-1-13.
- [2] Giersiepen M, Wurzinger LJ, Opitz R, Reul H (1990) Int J Artif Organs, 13:300–6.
- [3] Behbahani M, Behr M, Hormes M, Steinseifer U, Arora D, Pasquali M (2009) Eur J Appl Math, 20:369-97.
- [4] Zhao R, Antaki JF, Naik T, Bachman TN, Kameneva MV, Wu ZJ (2006) Biorheology , 43:747-65.
- [5] Lee SS, Yim Y, Ahn KH, Lee SJ (2009) Biomed Microdevices, 11:1021-7.
- [6] Down LA, Papavassiliou DV, O’Rear EA (2011) Ann Biomed Eng , 39(6):1632-42.
- [7] Keshaviah P (1974) Doctoral Dissertation, University of Minnesota.

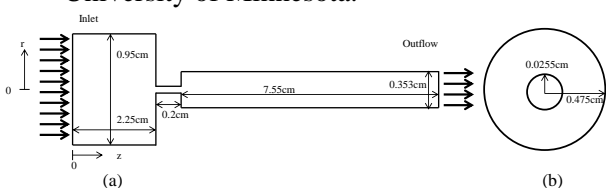


圖 1 模擬流場示意圖。(a)軸向斷面，(b)圓片。

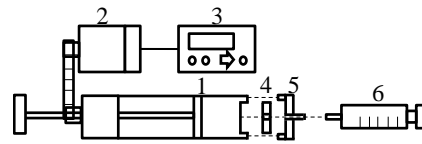


圖 2 實驗設置圖。(1.活塞，2.步進馬達，3.馬達控制器，4.圓片，5.不銹鋼盤，6.針筒。)

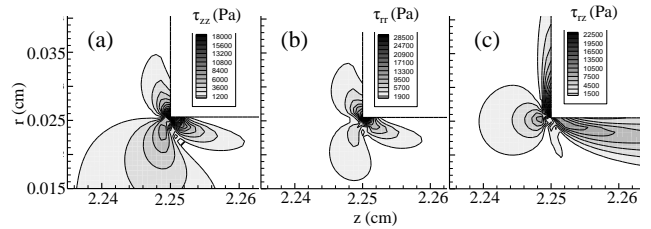


圖 3 毛細管入口銳角處之應力分布圖。

(a) τ_{zz} , (b) τ_{rr} , (c) τ_{rz} 。(d=0.051 cm, $\mu=17$ cP, V=16 m/s)

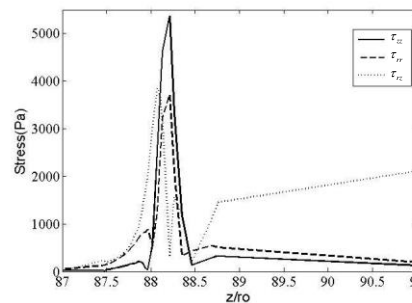


圖 4 τ_{zz} 、 τ_{rr} 和 τ_{rz} 應力在流線之上之變化。(d=0.051 cm, $\mu=17$ cP, V=16 m/s)

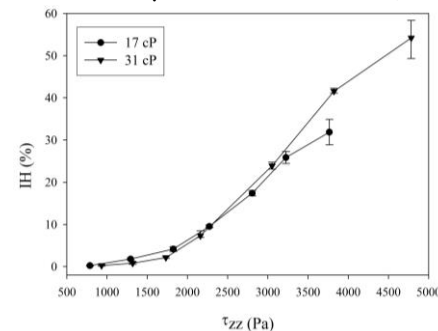


圖 5 不同黏滯度下 τ_{zz} 應力與溶血指數 IH 之關係圖。

表 1 設定速度下之應力與溶血指數 IH 關係表。

Viscosity (cP)	Average velocity at contraction tube (m/s)	Maximum τ_{zz} (Pa)	Maximum τ_{rr} (Pa)	Maximum τ_{rz} (Pa)	IH (%)
17	4	788	523	598	0.2±0.1
	6	1293	843	952	1.8±0.2
	8	1824	1176	1240	4.2±0.6
	10	2272	1484	1509	9.5±0.3
	12	2805	1856	1840	17.4±0.6
	14	3225	2125	2098	25.9±1.4
31	16	3765	2495	2402	31.9±3.0
	3	931	578	774	0.3±0.2
	4	1319	827	1052	0.9±0.3
	5	1732	1111	1326	2.2±0.3
	6	2161	1413	1660	7.7±0.8
	8	3052	2027	2249	23.9±0.8
	10	3823	2512	2832	41.7±0.6
	12	4783	3098	3489	53.8±4.5