

Micro PIV 를 기반한 혈액 점도 측정 기법

홍현지* · 정미림** · 염은섭†

Microfluidic Method for Measurement of Blood Viscosity based on Micro PIV

Hyeonji Hong*, Mirim Jung** and Eunseop Yeom†

Abstract Increase of blood viscosity significantly changes the flow resistance and wall shear stress which are related with cardiovascular diseases. For measurement of blood viscosity, microfluidic method has proposed by monitoring pressure between sample and reference flows in the downstream of a microchannel with two inlets. However, it is difficult to apply this method to unknown flow conditions. To measure blood viscosity under unknown flow conditions, a microfluidic method based on micro particle image velocimetry(PIV) is proposed in this study. Flow rate in the microchannel was estimated by assuming velocity profiles represent mean value along channel depth. To demonstrate the measurement accuracy of flow rate, the flow rates measured at the upstream and downstream of a T-shaped microchannel were compared with injection flow rate. The present results indicate that blood viscosity could be reasonably estimated according to shear rate by measuring the interfacial width and flow rate of blood flow. This method would be useful for understanding the effects of hemorheological features on the cardiovascular diseases.

Key Words : Micro PIV(Micro 입자영상유속계), Viscosity(점도), Microfluidic Device(미세유체 장치)

기호설명

Q : 유체의 유량 [mL/h]

U(y) : 위치 y에 따른 속도 분포

H : 채널 두께 [μm]

W : 채널 폭 [μm]

L : 채널의 길이 [μm]

P : 압력 [Pa]

μ : 유체의 점도 [cP]

1. 서론

혈액은 혈장에 적혈구, 백혈구, 혈소판 및 다양한 단백질을 함유하고 있다. 이 중 적혈구가 대부분의 비율을 차지하고 있으며, 적혈구의 거동에 의해 혈액의 유변학적 특징이 많은 영향을 받는다. 구체적으로, 낮은 전단변형률에서는 적혈구들이 서로 응집하여 응집체를 형성하고, 높은 전단변형률에서는 모양을 변화시켜 유동 저항을 감소시켜 준다^(1,2). 높은 혈액의 점도는 유동 저항 및 벽면 전단응력(wall shear stress; WSS)을 증가 시키며, 순

† School of Mechanical Engineering, Pusan National University, Busan, South Korea
E-mail: esyeom@pusan.ac.kr

* School of Mechanical Engineering, Pusan National University, Busan, South Korea

** Busan Dongrae Wooridul Spine Hospital, Busan, South Korea

환기 질환과의 연관성이 많은 연구에 의해 밝혀지고 있다⁽³⁾.

이러한 점도를 측정하기 위해 모세관 점도계⁽⁴⁾, 회전식 점도계(cone-and-plate 타입, Coutte 타입)⁽⁵⁾ 및 낙구식 점도계(falling ball)⁽⁶⁾가 일반적으로 사용된다. 그러나 이러한 점도계들은 상대적으로 많은 샘플 양을 필요로 하고, 정확한 측정을 위해서는 반복 실험을 수행해야한다는 단점을 가지고 있다⁽⁷⁾. 따라서 획득할 수 있는 샘플의 양이 적은 혈액의 경우, 기존의 장치를 이용하여 점도를 측정하는데 어려움을 겪을 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 적은 샘플 양으로 상대적으로 정확하게 점도를 측정하는 미세 채널을 이용한 점도계가 제안되었다^(8,9). 구체적으로는 압력, 유량, 표면장력, 그리고 기준 용액의 유동을 이용한 압력 측정 등을 기반으로 점도를 측정할 수 있는 미세 장치가 제안되고 있다. 압력 측정을 기반한 장치는 마이크로 채널 내 센서를 유동 방향으로 삽입하여 압력을 바로 측정하고 측정된 압력을 Hagen-Poiseuille식에 적용하여 점도를 측정한다⁽¹⁰⁾. 그리고 유량을 측정하여 점도를 측정하는 장치는 앞서 언급한 압력 측정 기반 장치와 기본 원리는 비슷하다. 이러한 점도계는 모세관 점도계와 유사하게 압력을 통제하고 모세관에 흐르는 유량을 측정하여 점도를 측정한다⁽¹¹⁾. 유사하게 미세채널 내부의 모세관 압력에 의해 유량을 계면의 이동을 측정하여 점도를 측정하는 미세 기법도 존재한다⁽¹²⁾. 본 연구실에서는 테스트 샘플과 점도를 알고 있는 기준 용액(reference fluid)을 두개의 입구에 각각 주입하고 두 용액의 혼합액이 하나의 출구로 빠져나오는 미세 채널을 이용하여 점도를 측정하는 방법을 제안하였다⁽¹³⁻¹⁴⁾. 이러한 방법은 샘플 유동의 유량을 변화시켜 전단 변형률(shear rate)을 조절할 수 있다. 따라서 상대적으로 적은 샘플 양을 이용하여(1 mL 이하) 전단 변형률에 따른 점도의 변화를 측정하는 연구를 수행하였다. 그러나 이 방법은 샘플의 주입 유량을 알아야만 한다는 단점이 있으며, 유량을 알지 못하면 점도를 측정할 수 없다. 이러한 단점 때문에 ex vivo 측정이나 맥동 펌프와 같이 유량이 정량화 되지 않은 경우에 적용을 할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 주입 유량을 알지 못할 경

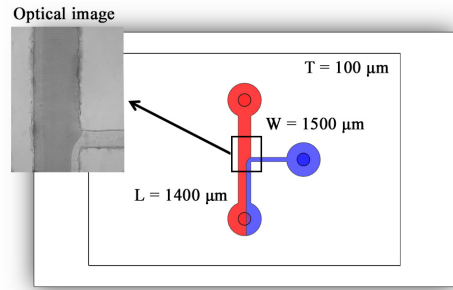


Fig. 1. T-shape micro-channel ($T = 100 \mu\text{m}$) used for measuring blood viscosity; Main channel ($W = 1500 \mu\text{m}$, $L = 1400 \mu\text{m}$), Side-channel ($W = 500 \mu\text{m}$, $L = 700 \mu\text{m}$)

우에도 점도를 측정할 수 있도록, 샘플 유동의 유량을 micro 입자영상유속계(Particle Image Velocimetry) 기법을 적용하여 측정하고, 획득한 유동 정보를 이용하여 점도를 측정하려 한다.

2. 실험장치 및 방법

2.1 미세 채널 제작

Fig. 1에 나타난 바와 같이, T자 형태의 미세 채널을 이용하여 혈액의 점도를 측정하였다. 미세 채널의 몰드(mold)는 3D 프린터를 이용하여 제작하였으며, 채널의 두께는 $100 \mu\text{m}$ 이며, 혈액이 흐르는 채널의 폭(W)과 길이(L)는 $1,500 \mu\text{m}$ 와 $1,400 \mu\text{m}$ 이다. 기준 용액인 생리식염수가 흐르는 채널의 폭과 길이는 $500 \mu\text{m}$ 와 $700 \mu\text{m}$ 이다. PDMS 폴리머(Sylgard 184; Dow Corning, USA)와 경화제를 10:1 비율로 섞은 혼합액을 제작된 몰드 위에 부어주고 기포를 제거시킨다. 그리고 80도에 3시간동안 경화시켜 PDMS Block을 몰드에서 제거한 후, 두개의 입구와 하나의 출구를 펀치로 뚫어준다. 그 후, 산소 플라즈마 처리(CUTE, Femto Science, Korea)를 통하여 PDMS Block과 유리 기판을 서로 접착시켜 미세 채널을 제작한다.

2.2 실험 구성

미세 채널을 광학 현미경(Olympus BX51; Tokyo, Japan) 위에 올리고 $\times 4$ 대물렌즈를 통해 관측한다.

혈액 샘플과 생리식염수(pH 7.4, Bio Solution, Korea)는 주사기 펌프(neMESYS, Centoni GmbH, Germany)를 통하여 미세 채널에 주입된다. 유동 영상은 고속 카메라(Phantom VEO710L, Vision Research Inc., Wayne, NJ, USA)를 통하여 유량에 따라 최대 초당 프레임 수 1,000으로 획득하였다.

2.3 혈액 샘플 준비

기증자로부터 채취한 혈액 샘플은 헤파린 튜브에 넣어 항응고처리를 해준다. 처리된 혈액은 원심분리를 통해 혈소판과 백혈구가 제거되고, 혈장과 적혈구를 원하는 헤마토크릿으로 다시 섞어 실험에 사용될 혈액 샘플을 준비하였다. 본 연구는 부산대학교 생명윤리위원회 승인을 거쳐 진행하였다.

2.4 Micro 입자영상유속계

획득한 채널 내부 영상을 유동영역에 대해 자른 후, 입자영상유속계의 정확도를 올리기 위해 영상 처리를 하였다. 입자영상유속계에서 사용한 조사구간의 크기는 32×32 픽셀이고, 50% 중첩(overlapping)을 적용하였다. 측정 시 발생하는 에러를 줄이기 위해 3×3 median 커널을 이용하여 필터링(filtering)을 하였다. 보다 구체적인 절차 및 영상 처리방법은 본 연구실의 사전 연구에 자세히 설명 되어 있다.⁽¹⁴⁾

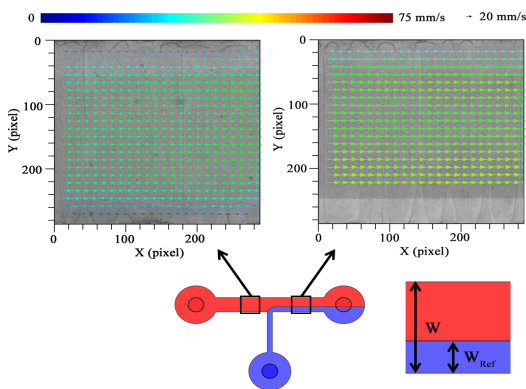


Fig. 2. The velocity fields of PBS with tracer particles at the upstream (left panel) and the downstream (right panel)

3. 결과 및 토의

3.1 Micro 입자영상유속계를 통한 유량 측정

두 개의 채널 입구에 각각 샘플과 생리식염수를 흘려주면 T채널의 하류에는 두 유동의 경계면이 형성된다. 본 실험에서는 micro 입자영상유속계를 이용하여 유량을 측정하기 때문에 측정된 유량과 주입 유량의 차이를 정확히 파악하는 것이 중요하다. 이를 위해 추적 입자(평균직경: $0.52 \mu\text{m}$; Thermo Scientific)를 생리식염수 1 mL 당 5×10^9 의 입자수로 섞어준 샘플과 입자를 섞지 않은 생리식염수 기준 용액을 이용하여 상류와 하류의 유동을 측정하였다. Fig. 2는 추적 입자가 섞인 생리식염수(샘플)의 채널 상류와 하류에서의 속도장을 보여준다. 에러를 줄이기 위해 약 1,000개 속도장의 평균으로 결과를 구하였다. 입자가 섞이지 않은 식염수와 샘플이 하류에서 만나면서 경계층이 발생하여 샘플 유동의 폭은 줄어들고, 전체 속도는 증가하는 것을 확인할 수 있다. 두 유동 사이의 압력비를 측정하기 위해 생리식염수의 폭(w_{Ref})을 영상 처리 기법을 이용하여 측정한다⁽¹¹⁾.

실제로 micro 입자영상유속계를 이용하여 측정된 2차원 속도장 정보는 현미경의 초점 평면에서의 속도 정보만 가지기 때문에 사각 채널에서의 유량을 예측하기 어렵다. 다만 본 연구실의 이전 연구를 통해 낮은 배율의 광학렌즈를 사용할 경우 micro 입자영상유속계의 결과는 전체 두께의 평균 정보를 가진다고 가정을 할 수 있으므로⁽¹¹⁾, 다음 식을 이용하여 유량을 예측할 수 있다.

$$Q = \int_0^w U(y) dy \times H \quad (1)$$

샘플이 기준 용액과 만나면서 상류와 하류에서 샘플 폭이 달라진다. 이는 샘플 유동의 속도 분포가 달라지게 만든다. 유량 측정을 기반으로 한 점도 측정을 위해서는 하류에서 유량을 정확하게 측정할 수 있어야하기 때문에, micro 입자영상유속계를 이용하여 측정된 상류와 하류에서의 유량을 펌프의 주입 유량과 비교하였다 (Fig. 3).

주입 유량과 측정된 유량은 전체적으로 10%이 내의 차이를 보이며, 상류와 하류에서 측정된 유량 사이에 차이는 그렇게 크지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로, micro 입자영상 유속계를 이용하여 유동을 알지 못하는 경우에도 샘플의 유량을 상대적으로 정확하게 측정할 수 있다는 것을 검증 하였다.

3.2 압력과 샘플 폭 사이의 상관식

샘플의 점도를 측정하기 위해 본 측정 방법은 샘플과 기준 용액 사이의 압력 비를 이용한다. 사각 채널 내부의 유동의 압력은 다음 식으로 근사할 수 있다⁽¹⁵⁾. ($H/W \ll 1$ 라 가정)

$$P = \frac{12\mu \times \Delta L \times Q}{WH^3} \quad (2)$$

위 식을 기반으로 같은 채널을 흐르는 생리 식염수와 샘플 유동의 압력 비는 아래와 같이 간략히 표현할 수 있다.

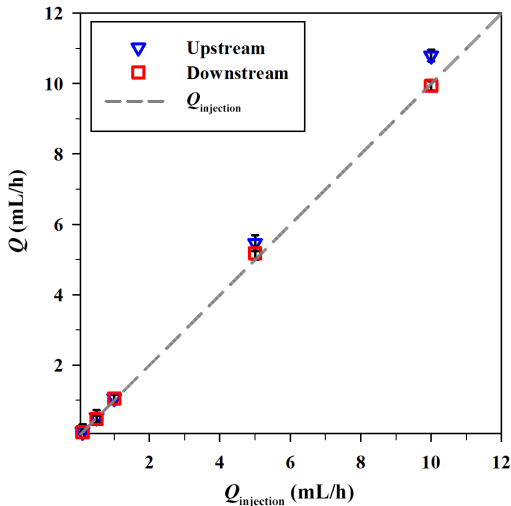


Fig. 3. The comparison of controlled flow rate (injection) and flow rates measured at the upstream and downstream in the channel using micro PIV

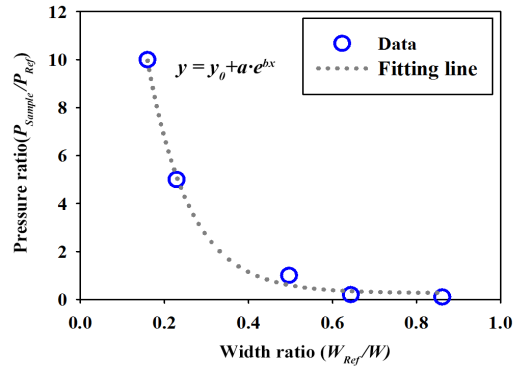


Fig. 4. The data and fitting curve representing the pressure ratio(P_{Sample}/P_{Ref}) according to the width ratio(W_{Ref}/W) ($y_0 = 0.270$, $a=47.694$, $b=9.980$)

$$\frac{P_{Sample}}{P_{Ref}} = \frac{\mu_{Sample} Q_{Sample}}{\mu_{Ref} Q_{Ref}} \quad (3)$$

여기서 하첨자 Sample, Ref는 측정하려는 샘플과 생리 식염수의 특성을 나타낸다. 식 (3)으로부터 샘플과 생리식염수의 유량, 두 유동의 압력 비, 생리 식염수의 점도(μ_{Ref})를 알고 있을 때 샘플의 점도를 구할 수 있다. 유량은 micro 입자영상유속계를 통하여 측정할 수 있기 때문에, 두 유동의 압력 비를 알면 모르는 샘플의 점도(μ_{Sample})를 측정할 수 있다. 그러나 두 유동의 압력을 바로 측정할 수 없기 때문에, 간접적인 방법으로 전체 채널(W)에서 생리 식염수가 차지하는 폭(W_{Ref})을 측정하여 압력 비(P_{Sample}/P_{Ref})를 구한다.

Fig. 4는 전체 채널에서 생리 식염수의 폭 비에 따른 압력비의 변화를 나타내고 있다. 샘플의 압력이 증가할수록 전체 폭에 대한 생리식염수의 폭이 감소하는 경향을 확인할 수 있다. 역으로 생리식염수의 폭을 측정하여 압력을 알기 위해 폭의 비에 따른 압력의 변화를 지수 함수식($y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$)으로 비선형 최소자승법(Nonlinear least squares method) 기반 피팅을 수행하여 변수를 구하였다($y_0 = 0.270$, $a=47.694$, $b=9.980$). 따라서 유량과 생리 식염수의 폭 비를 측정하면 아래 식을 통해 점도를 측정할 수 있다.

$$\mu_{Sample} = \frac{P_{Sample}}{P_{Ref}} \mu_{Ref} \frac{Q_{Ref}}{Q_{Sample}} = \left[\nu_0 + a \cdot e^{b(W_{Ref}/W)} \right] \mu_{Ref} \frac{Q_{Ref}}{Q_{Sample}} \quad (4)$$

계산을 위해 생리 식염수의 점도는 사전연구에서 측정된 1.00 ± 0.05 cP의 값을 이용하였다.

3.3 혈액 샘플의 점도 측정

Fig. 5는 다른 헤마토크릿을 가지고 있는 샘플이 1 mL/h의 유량으로 흐를 때 채널 하류의 속도장을 보여준다. Micro 입자영상유속계를 이용하여 유동을 측정하기 위해 적혈구를 추적 입자로 사용하였다. 혈장 속 적혈구의 비율이 증가할수록 점도가 증가하여, 헤마토크릿이 증가할수록 동일한 유량 조건에서도 압력이 커져 더욱 넓은 폭을 차지하게 된다. 헤마토크릿이 0인 혈장의 경우는 적혈구를 추적 입자로 사용하지 못하기 때문에 추가적으로

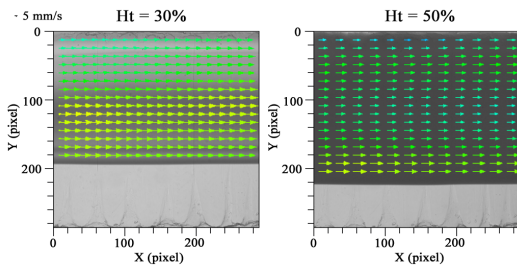


Fig. 5. The velocity fields of the blood samples at downstream (Ht=30%; left, Ht=50%; right)

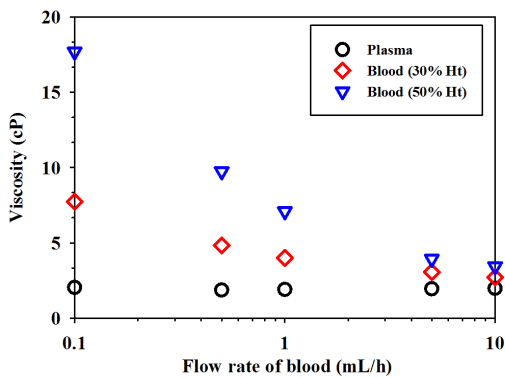


Fig. 6. Variations of viscosity according to the flow rate for three blood samples (Plasma, Blood with 30% Ht and 50% Ht)

추적 입자를 섞어 micro 입자영상유속계를 수행하였다.

Fig. 6은 각각 다른 헤마토크릿 비율을 지닌 혈액 샘플들을 채널에 흘려주어 측정된 점도를 보여준다. 점도를 측정하기 위해 혈액 샘플 유동의 유량을 Micro 입자영상유속계를 이용하여 측정하였으며, 동시에 채널의 폭을 측정하였다. 혈액 샘플의 주입 유량을 증가 시키면 이에 의해 전단 변형률이 증가 하게 된다. 따라서 혈액 유량을 변화 시켜, 전단 변형률에 따른 점도의 변화를 관측할 수 있다. 적혈구가 없는 혈장의 경우는 유량에 따라 점도의 변화가 거의 발생하지 않는 것을 확인 할 수 있다. 그러나 혈액 샘플의 경우, 전단 변형률이 낮아질수록 점도가 증가하는 전단희박유체(shear thinning fluid) 특성을 보인다. 이러한 경향은 샘플 내 적혈구의 농도가 증가할수록 심화되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 특성은 낮은 전단 변형률에서 혈장 내 적혈구가 서로 응집하는 적혈구 응집 현상에 기인한다. 본 실험에서 측정된 값은 이전의 사전 연구에서 수행된 결과와 유사하며, 이를 토대로 micro 입자영상유속계를 기반으로 한 점도 측정이 가능하다는 것을 확인할 수 있다⁽¹⁴⁾.

4. 결론

본 연구에서는 micro 입자영상유속계를 이용하여 샘플 유동의 유량을 측정하고, 이를 이용하여 샘플의 점도를 측정하는 미세 장치를 이용한 방법을 검증하였다. 이전에 본 연구실에서 제안된 방법과 유사하게 점도를 측정하기 위해, 샘플과 기준 유체의 유동들 사이의 압력 비와 폭비의 관계식을 실험에 앞서 구하였다. 따라서 미세 채널 하부에서 기준 유체의 유동 폭과 샘플 유동의 유량을 영상 분석 기법과 micro 입자영상유속계를 이용하여 측정하여 혈액 샘플의 점도를 측정할 수 있었다. 이렇게 제한된 방법은 혈유변학적 특성과 순환기 질 환 사이의 연관성을 이해하는 연구에 도움이 될 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. NRF-2016R1C1B2014255)이다.

REFERENCE

- 1) Chien, S., 1970, "Shear Dependence of Effective Cell Volume as a Determinant of Blood Viscosity," *Science*, Vol. 168, No. 3934, pp. 977-979.
- 2) Sherwood, J. M., Dusting, J., Kaliviotis, E. and Balabani, S., 2012, "The Effect of Red Blood Cell Aggregation on Velocity and Cell-Depleted Layer Characteristics of Blood in a Bifurcating Microchannel," *Biomicrofluidics*, Vol. 6, No. 2, pp. 24119.
- 3) Cowan, A. Q., Cho, D. J. and Rosenson, R. S., 2012, "Importance of Blood Rheology in the Pathophysiology of Atherothrombosis," *Cardiovascular Drugs & Therapy*, Vol. 26, No. 4, pp. 339-348.
- 4) Srivastava, N. and Burns, M. A., 2006, "Analysis of Non-Newtonian Liquids Using a Microfluidic Capillary Viscometer," *Anal Chem*, Vol. 78, No. 5, pp. 1690-1696.
- 5) Krieger, I. M., 1968, "Shear Rate in the Couette Viscometer," *Transactions of the Society of Rheology*, Vol. 12, No. 1, pp. 5-11.
- 6) Cho, Y. I., Hartnett, J. P. and Lee, W. Y., 1984, "Non-Newtonian Viscosity Measurements in the Intermediate Shear Rate Range with the Falling-Ball Viscometer," *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, Vol. 15, No. 1, pp. 61-74.
- 7) Kim, H., Cho, Y. I., Lee, D. H., Park, C. M., Moon, H. W., Hur, M., Kim, J. Q. and Yun, Y. M., 2013, "Analytical Performance Evaluation of the Scanning Capillary Tube Viscometer for Measurement of Whole Blood Viscosity," *Clin Biochem*, Vol. 46, No. 1-2, pp. 139-142.
- 8) Allmendinger, A., Dieu, L. H., Fischer, S., Mueller, R., Mahler, H. C. and Huwyler, J., 2014, "High-Throughput Viscosity Measurement Using Capillary Electrophoresis Instrumentation and Its Application to Protein Formulation," *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 99, No. 0, pp. 51-58.
- 9) Gupta, S., Wang, W. S. and Vanapalli, S. A., 2016, "Microfluidic Viscometers for Shear Rheology of Complex Fluids and Biofluids," *Biomicrofluidics*, Vol. 10, No. 4, pp. 043402.
- 10) Pipe, C. J., Majmudar, T. S. and McKinley, G. H., 2008, "High Shear Rate Viscometry," *Rheologica Acta*, Vol. 47, No. 5-6, pp. 621-642.
- 11) Solomon, D. E., Abdel-Raziq, A. and Vanapalli, S. A., 2016, "A Stress-Controlled Microfluidic Shear Viscometer Based on Smartphone Imaging," *Rheologica Acta*, Vol. 55, No. 9, pp. 727-738.
- 12) Srivastava, N., Davenport, R. D. and Burns, M. A., 2005, "Nanoliter Viscometer for Analyzing Blood Plasma and Other Liquid Samples," *Anal Chem*, Vol. 77, No. 2, pp. 383-392.
- 13) Yeom, E., Kim, H. M., Park, J. H., Choi, W., Doh, J. and Lee, S. J., 2017, "Microfluidic System for Monitoring Temporal Variations of Hemorheological Properties and Platelet Adhesion in Lps-Injected Rats," *Sci Rep*, Vol. 7, No. 1, pp. 1801.
- 14) Yeom, E., Park, J. H., Kang, Y. J. and Lee, S. J., 2016, "Microfluidics for Simultaneous Quantification of Platelet Adhesion and Blood Viscosity," *Sci Rep*, Vol. 6, No., pp. 24994.
- 15) Cornish, R. J., 1928, "Flow in a Pipe of Rectangular Cross-Section," *Proceedings of the Royal Society of London Series A*, Vol. 120, No. 786, pp. 691-700.