

# De optische eigenschappen van stromend bloed

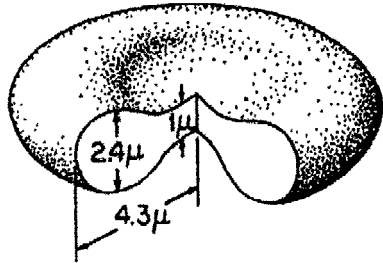
Dirk Faber<sup>Y</sup>, Wiendelt Steenbergen en Frits de Mul  
Universiteit Twente, fac. Technische Natuurkunde, Biofysische Technieken  
postbus 217, 7500 AE Enschede

## Inleiding

In diagnostische toepassingen binnen de biomedische optica wordt van laserlicht-weefsel interacties gebruik gemaakt om eigenschappen te meten of om structuren af te beelden. In Laser Doppler Flowmetry (LDF) wordt gebruik gemaakt van Dopplerverschuivingen in het aan bewegende bloedcellen terugverstrooide licht om uitspraken te doen over doorbloeding van weefsel. Hoewel deze methoden al jarenlang in de klinische praktijk worden toegepast is de generatie van de gemeten signalen nog steeds onderwerp van onderzoek en bestaat er geen absolute doorbloedingsstandaard. Door het complexe dynamische gedrag van bloed en de hoge concentratie van verstrooiers valt verstrooiing aan onverdund bloed buiten de reikwijdte van bestaande lichtverstrooiingstheorieën. Omdat een deel van het licht in LDF toepassingen verstrooid wordt aan een enkele cel zijn de enkelvoudige verstrooiingseigenschappen van belang. Deze resultaten zijn eerder gepresenteerd door Steenbergen *et al* in 1999<sup>1</sup> en 2000<sup>2</sup>.

## Samenstelling en eigenschappen van stromend bloed

De optische eigenschappen van bloed worden gedomineerd door de optische eigenschappen van rode bloedcellen (RBC's). RBC's bestaan uit een dun lipide membraan dat een geconcentreerde hemoglobine oplossing bevat. Een onvervormde bloedcel heeft een diameter van ongeveer



afmetingen van een rode bloedcel

8  $\mu\text{m}$  en een bi-concave, donut-achtige vorm zoals weergegeven in de figuur. In de figuur zijn typische dimensies aangegeven. De cellen bevinden zich in plasma, een eiwitrijke oplossing. De volumefractie, *hematocriet*, van rode bloedcellen in het plasma varieert afhankelijk van geslacht en fysieke condities tussen de 35% en 55%. Gezien de hoge concentratie en de afmetingen van RBC's moet bloed zijn stromingsgedrag kunnen aanpassen om nog door dunne vaten te kunnen stromen; bloed moet de viscositeit kunnen aanpassen. Dit proces heet *'shear thinning'*. Wanneer een afschuifsnelheid (engels: *shear rate*) op bloed werkt treden de volgende effecten op, die allen het effect hebben dat de stroming minder wordt verstoord, waardoor de viscositeit wordt verlaagd:

- Aggregatie bij lage shear. Als gevolg van electrostatische aantrekking vormen de cellen 'geldrol'-achtige structuren, zgn. rouleaux. Dit proces is reversibel.

<sup>Y</sup> tegenwoordig bij AMC laser centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam

- Oriëntatie en deformatie. Onder invloed van een shear zullen de cellen zich eerst in de stroming gaan richten en bij toenemende shear gaan uitrekken, met de lange as in de richting van de stroming<sup>3</sup>
- Axiale migratie Rode bloedcellen in een stroming bewegen zich van de wand af naar het centrum van een bloedvat. Dit resulteert in een cel-vrije zone aan de rand, die als 'smearmiddel' fungeert: het Fåhræus effect.

Al deze effecten hebben invloed op de optische eigenschappen van het bloed. Veel onderzoek is reeds gedaan op dit gebied.<sup>4-5-6</sup> In de meeste onderzoeken is gebruik gemaakt van verdund bloed; of aan onverdund bloed in dikke lagen zodat geen gecollimeerd licht wordt waargenomen; of in geometrieën waarbij meerdere shear rates tegelijkertijd optreden. In het onderzoek waarvan de resultaten hier worden besproken wordt een poging gedaan de *enkelvoudige* verstrooiingseigenschappen van *onverdund* bloed, onderhevig aan *een enkele* shear rate te bepalen. Hierbij ligt het accent op de optische eigenschappen als functie van de shear rate.

### Optische eigenschappen

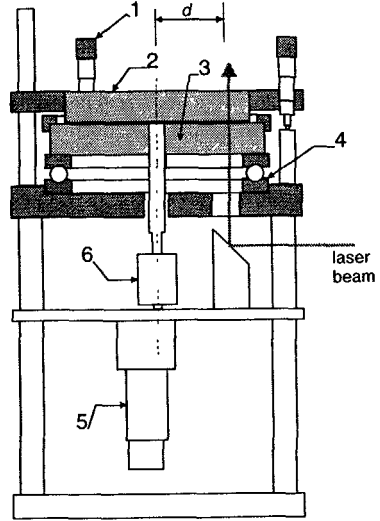
De optische eigenschappen van bloed die van belang zijn in biomedische diagnostiek zijn:

- de (gecollimeerde) verzwakkings- of interactie-coëfficiënt  $\mu_t$  [ $\text{mm}^{-1}$ ]; deze geeft de kans op interactie per eenheid van weglengte, en is de som van de absorptiecoëfficiënt en de verstrooiingscoëfficiënt;
- de verstrooiingsanisotropie  $g$  [-]; dit is een maat voor de anisotropie van de hoekverdeling van het verstrooide licht. Als  $g=0$  is de verstrooiing isotroop, als  $g=1$  is de verstrooiing volledig voorwaarts gericht. De hoekverdeling van het verstrooide licht wordt beschreven door de zgn *fasefunctie*: deze beschrijft de kans op verstrooiing over een zekere hoek. Een voor biologisch materiaal veel

gebruikte fasefunctie is de Henyey-Greensteinfunctie Deze heeft slechts één parameter: de verstrooiingsanisotropie.

### Meetopstelling en -methode

Het niet-optische deel van de meetopstelling is weergegeven in de figuur hierna. Het bloed wordt ingeklemd tussen twee glasplaten (2,3) waarvan de bovenste in hoogte verstelbaar is met micrometerschroeven (1). Zo ontstaat een laagdikte



$d_s$ . De onderste glasplaat rust op een kogellager (4) en de snelheid  $V$  van deze plaat (en daarmee de shear rate  $\gamma$  op het bloed tussen de platen;  $\gamma \sim V/d_s$ ) kan worden gecontroleerd met behulp van een motor en overbrengingskast (5,6). Het laserlicht (632nm) komt van onderaf het bloedlaagje binnen op afstand  $d$  van het centrum van de glazen platen.

Het licht wordt met een optische fiber gedetecteerd. De fiber is ingeklemd in een arm die kan roteren in een vlak parallel aan de richting van de shear rate, en kan transleren in een vlak loodrecht daarop.

Bloed van een mannelijke vrijwilliger wordt gebruikt. Aan het bloed wordt EDTA toege-

voegd om stolling te voorkomen. EDTA beïnvloedt de morfologie van de rode bloedcellen niet<sup>7</sup>. De hematocriet wordt vastgelegd op 44% en om zuurstofverzadiging te verzekeren wordt het bloed 20 minuten met lucht doorstroomd.

### Verzwakkingscoëfficiënt vs shear rate

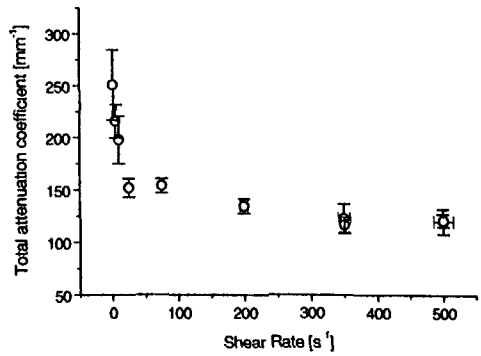
De intensiteit van het licht door een sample met laagdikte  $d_s$  en verzwakkingscoëfficiënt  $\mu_t$  neemt af volgens de wet van Lambert-Beer:

$$I_{coll} = I_0 e^{-\mu_t d_s} \quad [1]$$

waarbij  $I_{coll}$  de gecollimeerde intensiteit en  $I_0$  de invallende intensiteit. Door de gecollimeerde intensiteit te meten bij verschillende laagdiktes kan de verzwakkingscoëfficiënt worden gevonden. De gecollimeerde intensiteit wordt bepaald door met de detectiefiber in een horizontaal vlak door de bundel te scannen. De gemeten intensiteitsdistributie bestaat uit een Gaussisch deel (vanwege het Gaussisch profiel van de laser bundel) plus een achtergrond veroorzaakt door verstrooid licht. Door nu een Gaussische functie met een offset aan de gemeten data te fitten, wordt de gecollimeerde intensiteit gevonden als de amplitude van het Gaussische deel. Het bereik van de laagdikte waarin gemeten kan worden ligt voor hogere shear rates tussen 20 en 60  $\mu\text{m}$ ; waarbij de ondergrens wordt bepaald door variaties in het kogellager en de bovengrens door de laagdikte waar de gecollimeerde transmissie nog meetbaar is. Voor lage shear rates is de maximale laagdikte 45  $\mu\text{m}$ . De metingen zullen vergeleken worden met uitkomsten van Mie theorie, wat een exacte oplossing geeft voor de verstrooiingseigenschappen van bolvormige deeltjes. Hierbij is gebruik gemaakt van een computerprogramma gebaseerd op code van Zijp en ten Bosch<sup>8</sup>.

In onderstaande figuur staat  $\mu_t$ , bepaald volgens formule [1], uitgezet tegen de shear rate.

In de figuur is te zien dat  $\mu_t$  voor hoge shear rates binnen de foutmarges constant



is, met een waarde van 120  $\text{mm}^{-1}$ . Dit gebied wordt geassocieerd met deformatie van de RBC's en is consistent met literatuur<sup>9-10</sup>. Voor het middengebied liggen de waarden hoger; een typische waarde is 150  $\text{mm}^{-1}$ . Voor lage shear rates stijgt  $\mu_t$ . De foutmarges in de shear rate worden grotendeels bepaald door de variaties in de laagdikte ten gevolge van instelfouten en variaties in het rollager. De fouten in de verzwakkingscoëfficiënt worden bepaald door de fit van formule [1] volgens een kleinste kwadraten methode. Voor zeer lage shears is de fout groter omdat er minder meetpunten beschikbaar zijn. Voor de gebruikte golflengte is de verstrooiingscoëfficiënt ongeveer een factor 100 hoger dan de absorptiecoëfficiënt, zodat de interactie door verstrooiing wordt gedomineerd. Een voorspelling op basis van Mie theorie levert 165  $\text{mm}^{-1}$ .

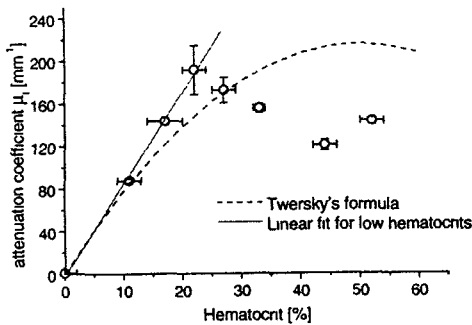
Het is moeilijk zonder directe visualisatie de link te leggen tussen deze waarden en processen in de stroming. In de literatuur<sup>4-5</sup> wordt bij lage shear rates, wanneer rouleaux formatie optreedt, het ontstaan van "plasma-gaten" gemeld waardoor het licht ongehinderd kan passeren. Dit zou resulteren in een lagere verzwakkingscoëfficiënt. Deze plasma-gaten werden echter niet waargenomen. Dit effect van ongehinderde transmissie zou nog veel sterker tot uiting moeten komen indien een golflengte wordt gebruikt waar absorptie veel hoger is. Metingen bij een golflengte van 535 nm

lieten dit ook niet zien. Het effect werd wel bij verdund bloed (Hct = 22%) waargenomen.

### Verzwakingscoëfficiënt vs hematocriet

Voorspellingen op basis van bijvoorbeeld Mie theorie geven eigenschappen voor individuele deeltjes; bijvoorbeeld de *efficiency* voor verstrooiing ofwel het percentage van het opvallend licht wat interactie ondergaat. Om uitspraken te doen over de macroscopische optische eigenschappen van een medium, dus de kans op interactie, moet dus een verband worden gelegd waarin de deeltjesconcentratie (in geval van bloed de hematocriet) is opgenomen. Voor lage concentraties neemt de kans op interactie linear toe met de deeltjesconcentratie. Men spreekt hier van *onafhankelijke* verstrooiing: de deeltjes beïnvloeden elkaars optische eigenschappen niet.

Voor media met zeer hoge concentratie van de verstrooiers is de verstrooiing *afhankelijk*, dat wil zeggen de verstrooiingseigenschappen van het ene deeltje wél door andere deeltjes worden beïnvloed. Denk hierbij bijvoorbeeld aan reductie van het schijnbare oppervlak door afscherming. Voor deze situatie is door Twersky<sup>11</sup> een extra factor (1-H) in rekening gebracht ten opzichte van het lineaire verband om *afhankelijke* verstrooiing te beschrijven.



In de bovenstaande figuur is de verzwakingscoëfficiënt uitgezet tegen de hematocriet. Zoals te zien is neemt  $\mu_a$  in eerste instantie linear toe met de hematocriet. De

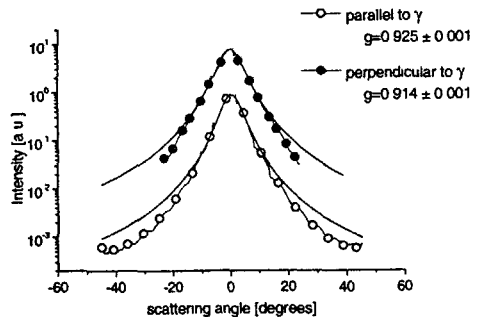
waarden die hierbij worden gevonden sluiten goed aan bij literatuurwaarden<sup>4</sup> en de afwijking van Mie theorie is in de orde van 10%. Na de maximum  $\mu_a$  bij een hematocriet van rond de 20% neemt de coëfficiënt af tot de waarde bij onverdund bloed is bereikt. Kwalitatief gezien treedt het "Twersky-effect" wel op; de kwantitatieve beschrijving is echter te simpel.

### Verstrooiingsprofiel

Bij verschillende shear rates en verschillende laagdiktes is het hoekafhankelijke verstrooiingsprofiel gemeten in de richtingen parallel aan en loodrecht op de shear rate. De verstrooiingsanisotropie  $g$  is bepaald door aan de gemeten data een Henyey Greenstein functie te fitten, zoals is geïllustreerd in de figuur. Deze functie wordt gegeven door:

$$\rho(\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cos\theta)^{3/2}} \quad [2]$$

In het algemeen geeft deze functie een goede beschrijving van het verstrooiingsprofiel voor alle shear rates en alle laagdiktes in een interval van 0° tot 10° à 20°. Deze  $g$ -waarden zijn veel lager dan gerapporteerd in literatuur. Door de geometrie van deze meting is het gemiddeld aantal verstrooiingsgebeurtenissen hier 7.2. Deze meervoudige verstrooiing verbreedt het profiel en dus daalt de anisotropie

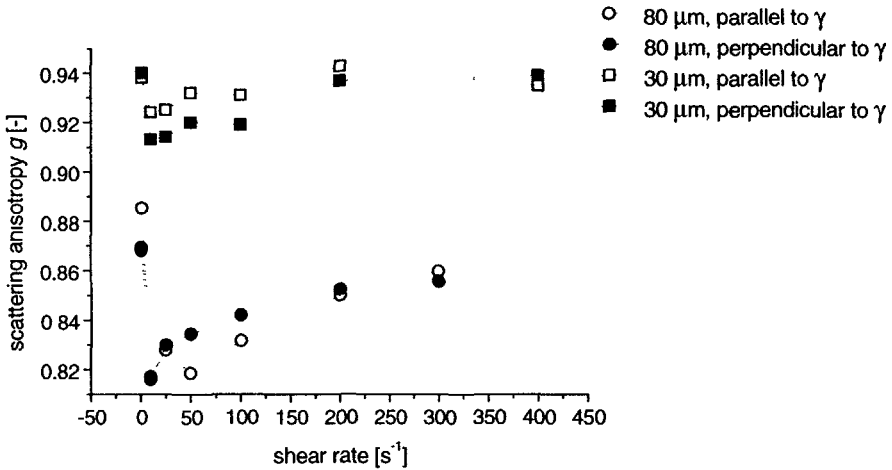


Door deze metingen bij een vaste laagdikte voor meerdere shear rates te herhalen kan een verband tussen  $g$  en shear rate worden opgesteld, zoals weergegeven in de figuur hieronder:

Het feit dat de waarden voor de laagdikte van 80  $\mu\text{m}$  lager liggen dan voor 30  $\mu\text{m}$  komt door het groter aantal verstrooiingen. Verder neemt de anisotropie toe met de

### Enkelvoudige verstrooiingsanisotropie

Door een waarde van  $g$  te bepalen bij een aantal laagdiktes voor een zekere shear rate wordt in feite de verstrooiingsanisotropie bepaald als functie van het gemiddeld aantal verstrooiingsgebeurtenissen; de *orde* van de verstrooiing. De behandeling van de methode om uit de metingen bij meervoudige verstrooiing de verstrooiingsanisotropie van een enkele gebeurtenis te



shear rate, afgezien van de waarde bij  $1 \text{ s}^{-1}$  die hoger ligt. Voor deeltjes die groot zijn ten opzichte van de golflengte wordt verstrooiing gedomineerd door diffractie. Door uitrekking van het deeltje 'lijkt' het groter wat resulteert in een nauwer diffractiepatroon en dus grotere  $g$  waarde. Dit verklaart echter niet de toename loodrecht op de shear rate. Uit de metingen van  $\mu_4$  is bekend dat de verzwakingscoëfficiënt daalt met shear rate. Voor een gegeven laagdikte neemt dus het aantal verstrooiingsgebeurtenissen af met shear. Uit Monte Carlo simulaties volgt dat dit effect groot genoeg is om de toename van  $g$  in de richting loodrecht op de shear te bepalen. Het is verleidelijk de waarde bij  $1 \text{ s}^{-1}$  te verklaren in termen van rouleaux formatie (deeltjesvergroting) maar hiervoor zijn te weinig details beschikbaar.

herleiden, voert hier te ver.

### Conclusies en vooruitblik

De verzwakingscoëfficiënt is bepaald als functie van de shear rate. Door de mechanische instabiliteit van het systeem terug te dringen is een grotere nauwkeurigheid haalbaar. Het is vooralsnog niet mogelijk het verband te leggen met processen in de stroming; hiervoor is directe visualisatie van de processen in de stroming nodig. De verstrooiingsanisotropie bepaald door de best passende Henyey Greenstein fasefunctie neemt voor beide meet-richtingen toe met shear rate voor een zekere laagdikte; voor een zeer lage shear rate is de verstrooiing meer voorwaarts gericht.

Om in de toekomst tot betere resultaten te komen zijn enige aanpassingen nodig. Een

completere sample-karakterisatie en manipulatie is nodig om metingen aan opeenvolgende samples met grotere zekerheid te kunnen vergelijken. Enkele aanpassingen aan de set-up, bijvoorbeeld een halve bol geometrie, kunnen het aantal benodigde correctiestappen verminderen en kunnen voor een groter meetbereik en -nauwkeurigheid zorgen.

## Referenties

- [1] W. Steenbergen, R. Kolkman, F. de Mul, "Light scattering properties of undiluted human blood subjected to simple shear", *J. Opt. Soc. Am. A*, **16** 1999, pp. 2959-2967.
- [2] W. Steenbergen, R. Kolkman, D. Faber, F. de Mul, "Scattering properties of human whole blood under simple shear", *SPIE-proc.*, **2923** 2000, paper 3923-34.
- [3] G. Streekstra, "Light scattering by red blood cells in ektacytometry: Fraunhofer versus Anolamous diffraction", *Appl. Opt.* **32**, 1993, pp. 2266-2272.
- [4] H.J. Klose, E. Volger, H. Brechtelsbauer, L. Heinrich, H. Schmid-Schönbein, "Microrheology and Light Transmission of Blood", *Pflügers Arch.* **333**, 1972, pp. 126-139.
- [5] L.G. Lindberg, P.Å. Öberg, "Optical properties of blood in motion", *Opt. Eng.* **32** 1993 pp. 253-257.
- [6] A. Roggan, M. Friebel, K. Dörschel, A. Hahn, G. Müller, "Optical properties of Circulating Human Blood in the Wavelength Range 400-2500 nm", *J. Biomed. Opt.* **4**, 1999, pp. 36-46.
- [7] S.E. Charm, G.S. Kurland, "Blood flow and microcirculation", Wiley, New York, 1974.
- [8] J.R. Zijp, J.J. ten Bosch, "Pascal program to perform Mie calculations", *Opt. Eng.* **32(7)**, 1993, p. 1691-1695.
- [9] J.M. Steinke, A.P. Shepherd, "Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells", *App. Opt.* **27(19)**, 1988, p. 4027-4033.
- [10] A.G. Borovoi, E.I. Naats, U.G. Oppel, "Scattering of light by a red blood cell" *J. Biomed. Opt.* **3(3)**, 1998 p. 364-372.
- [11] V. Twersky, "Absorption and multiple scattering by biological suspensions", *J. Opt. Soc. Am.* **60**, 1970, pp. 1084-1093.