

ŽILINSKÁ UNIVERZITA V ŽILINE
FAKULTA RIADENIA A INFORMATIKY



Hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli pre vývoj
mikrofluidických zariadení

DIZERTAČNÁ PRÁCA

ŽILINSKÁ UNIVERZITA
FAKULTA RIADENIA A INFORMATIKY

Hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli pre vývoj
mikrofluidických zariadení

DIZERTAČNÁ PRÁCA

28360020203014

Študijný program: Aplikovaná informatika
Študijný odbor: Informatika
Pracovisko: Fakulta riadenia a informatiky
Katedra softvérových technológií
Žilinská univerzita v Žiline
Školiteľ: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.
Školiteľ špecialista: RNDr. Hynek Bachratý, PhD.

Žilina, 2020

Mgr. Monika Smiešková

Anotácia

Typ práce:	Dizertačná práca
Akademický rok:	2019/2020
Názov práce:	Hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli pre vývoj mikrofluidických zariadení
Autorka:	Mgr. Monika Smiešková
Školiteľka:	doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.
Školiteľ špecialista:	RNDr. Hynek Bachratý, PhD.
Jazyk:	Slovenčina
Počet strán:	114 s.
Počet obrázkov:	58
Počet tabuliek:	19
Počet referencií:	60
Kľúčové slová:	výpočtový model, medzibunkové interakcie, kalibrácia interakcií, hromadné vlastnosti toku červených krviniek, bezbunková vrstva

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa chcela poďakovať školiteľke Katke Bachratej za trpezlivý a ľudský prístup, množstvo dobrých nápadov a kreatívny prístup k práci. Rovnako patrí vďaka aj Ivanovi Cimrákovi, Hynkovi Bachratému a Ivete Jančigovej za odbornú pomoc a konzultácie pri realizácii mojej práce. Ďakujem tiež Martinovi, Mišovi, Kike, Marianke, Betke, Kati, Ferimu a Tomášovi za priateľskú pracovnú atmosféru.

V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojmu manželovi Jurajovi a deťom, Dianke a Damiankovi, za obrovskú podporu počas celého môjho doktorandského štúdia.

Abstrakt

SMIEŠKOVÁ, Monika: *Hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli pre vývoj mikrofluidických zariadení*. [Dizertačná práca] Žilinská univerzita v Žiline. Fakulta riadenia a informatiky. Katedra softvérových technológií. - Vedúca dizertačnej práce: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. – Žilina: FRI ZU, 2020, 114 s.

Predložená dizertačná práca sa zaoberá výpočtovým modelovaním toku červených krviniek v mikrofluidických kanáloch. Simulačné experimenty boli realizované s využitím softvérového balíku ESPREesSo s voľne šíriteľným zdrojovým kódom. Práca sa zameriava na analýzu hromadných vlastností toku červených krviniek prirodzene sa vyskytujúcich v reálnych systémoch, ako sú vytváranie bezbunkovej vrstvy v blízkosti stien kanála alebo marginalizácia poškodených buniek. Jedným z cieľov práce bolo prostredníctvom týchto hemodynamických javov overiť hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli. Samotnému výskumu mnohobunkových systémov na rozsiahlych simuláciách predchádzala kalibrácia a analýza medzibunkových interakcií. V práci je predstavená metodika procesu kalibrácie, ako aj výsledky interakčných parametrov pre konkrétne simulačné podmienky.

Kľúčové slová: výpočtový model, medzibunkové interakcie, kalibrácia interakcií, hromadné vlastnosti toku červených krviniek, bezbunková vrstva

Abstract

SMIEŠKOVÁ, Monika: *Bulk properties of cell flow in a computational model for the development of microfluidic devices*. [Dissertation thesis] - University of Žilina. Faculty of Management Science and Informatics. Department of Software Technology. - Supervisor: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. - Žilina, FRI ZU, 2020, 114 p.

The presented dissertation thesis deals with computational modelling of red blood cell flow in microfluidic channels. Simulation experiments were performed using the ESPREesSo open-source software package. The work focuses on the analysis of the bulk properties of red blood cell flow naturally occurring in real systems, such as the formation of a cell-free layer near the canal walls or the marginalization of damaged cells. One of the aims of the work was to verify the bulk properties of cell flow in a computational model through hemodynamic phenomena. The research of multicellular systems on large-scale simulations was preceded by calibration and analysis of intercellular interactions. The work presents the methodology of the calibration process, as well as the results of interaction parameters for specific simulation conditions.

Key words: computational model, cell-cell interactions, calibration of interactions, bulk properties of red blood cell flow, cell - free layer,

Obsah

Obsah	13
Zoznam skratiek	16
Zoznam obrázkov	17
Zoznam tabuliek	21
1. Úvod	23
1.1. Spoločenská motivácia.....	23
1.2. Ciele práce	24
2. Súčasný stav	27
2.1. Biologické a fyzikálne pozadie modelu	27
2.1.1. Červené krvinky	27
2.1.2. Tok kvapaliny v mikrokanáloch.....	28
2.1.3. Červené krvinky v šmykovom toku	32
2.2. Technologické prostriedky.....	34
2.3. Popis modelu.....	35
2.3.1. Model prúdiacej kvapaliny.....	35
2.3.2. Model elastických objektov	36
2.3.3. Prepojenie prúdiacej kvapaliny a elastických objektov	41
2.3.4. Interakcie medzi objektami	42
2.4. Výzvy a limity výpočtového modelu.....	45
2.5. Simulácie hustých suspenzií	46
3. Kalibrácia interakcií medzi bunkami	49
3.1. Úvod do problematiky medzibunkových interakcií.....	49
3.2. Návrh kalibračného postupu	50

3.2.1. Štandardné podmienky	51
3.2.2. Návrh kalibračného experimentu.....	52
3.2.3. Rozsah testovaných MC parametrov	53
3.2.4. Detekcia prekrytia buniek.....	54
3.2.5. Návrh verifikačných experimentov.....	57
3.3. Výsledky a diskusia	59
3.4. Vymedzenie platnej oblasti vybraných MC parametrov	62
3.4.1. Rýchlosť kvapaliny	62
3.4.2. Simulačný krok	64
3.4.3. Diskretizácia kvapaliny.....	65
3.5. Zhrnutie.....	66
4. Kolízia buniek v šmykovom toku	67
4.1. Teoretické predpoklady kolízneho správania buniek	67
4.2. Popis experimentov	68
4.3. Uhol sklonu RBC v šmykovom toku.....	70
4.3.1. Meranie uhla sklonu RBC.....	70
4.3.2. Porovnanie metód určovania hlavnej osi RBC	72
4.3.3. Vplyv kolízie na uhol sklonu RBC	75
4.4. Kolízny posun.....	77
4.4.1. Vplyv šmykovej rýchlosti.....	78
4.4.2. Vplyv elasticity buniek	79
4.5. Zhrnutie.....	81
5. Validácia hromadných vlastností krvného toku vo výpočtovom modeli	83
5.1. Biologické pozadie bezbunkovej vrstvy	83
5.2. Popis simulačných experimentov	84

5.3. Rýchlostné profily.....	86
5.4. Trajektórie buniek	88
5.5. Bezbunková vrstva (CFL).....	92
5.6. Zhrnutie.....	94
6. Marginalizácia poškodených RBC.....	97
6.1. Popis simulačných experimentov	98
6.2. Metódy spracovania výsledkov.....	99
6.3. Výsledky a diskusia	100
6.3.1. Vplyv objemového podielu poškodených buniek na radiálnu migráciu	100
6.3.2. Vplyv elasticity bunky na radiálnu migráciu	103
6.3.3. Vplyv rýchlosti toku na radiálnu migráciu tuhých buniek.....	104
6.4. Zhrnutie.....	105
7. Záver.....	107
Zoznam publikácií	108
Zoznam použitej literatúry	110

Zoznam skratiek

CFL	cell-free layer (bezbunková vrstva)
CIF	Cell-In-Fluid - výskumná skupina pôsobiaca na KST
CTC	Circulating Tumor Cell (cirkulujúca nádorová bunka)
DC-IBM	Dissipative Coupling of Immersed Boundary Method
ESResSo	Extensible Simulation Package for Research on Soft matter
Hct	Hematokrit - objemový podiel červených krviniek
LB	Lattice-Boltzmann
MC	Membrane collision - odpudivý potenciál zabezpečujúci medzibunkové interakcie
MNŠ	Metóda najmenších štvorcov
OIF	Object In Fluid - modul zabezpečujúci prepojenie elastického objektu s tekutinou
PCA	Principal component analysis (Analýza hlavných komponentov) - štatistická metóda
PLT	Platelete (krvné doštičky alebo tiež trombocyty)
RBC	Red Blood Cell (červená krvinka)
WBC	White Blood Cell (biela krvinka)

Zoznam obrázkov

Obr. 2.1: Tvar a rozmery červenej krvinky.	28
Obr. 2.2: Couetteov tok. a) Spodná stena je statická a horná sa pohybuje rýchlosťou $2v_0$. Bunka umiestnená v strede sa začne otáčať a pohybovať sa doprava. b) Dve rovnobežné steny sa pohybujú v opačných smeroch. Bunka umiestnená v strede sa otáča, ale zostáva v rovnakej polohe. (podľa [5]).....	30
Obr. 2.3: Poiseuilleov tok.	30
Obr. 2.4: Rotácia červenej krvinky pri nízkej šmykovej rýchlosti.	32
Obr. 2.5: Ukážka tank-treadingu červenej krvinky.	32
Obr. 2.6: Diskretizácia tekutiny - D3Q19 verzia Lattice-Boltzmannovej metódy (zdroj [14]).	35
Obr. 2.7: Ilustrácia dvoch spôsobov rozhybania tekutiny: a) pomocou externej sily, b) pomocou pohyblivej steny. (zdroj: [15]).....	36
Obr. 2.8: Príklady rôznej triangulácie a) pre modely RBC s 141, 347 a 642 povrchovými bodmi (zľava) a b) pre modely krvných doštičiek guľovitého a diskoidného tvaru so 102 povrchovými bodmi.	37
Obr. 2.9: Zobrazenie funkčnosti modulu pružnosti. (zdroj: [17]).	37
Obr. 2.10: Modul ohybu k_b pôsobí pri zmene uhla medzi dvoma susednými trojuholníkmi na povrchu bunky. (zdroj: [5])	38
Obr. 2.11: Modul zachovania lokálnej plochy, podľa [17].	39
Obr. 2.12: Modul zachovania celkovej plochy. Trojrozmerná bunka je reprezentovaná ako dvojrozmerný kruh a jej inak dvojrozmerná plocha je tu reprezentovaná ako obvod kruhu (podľa [17]).	39
Obr. 2.13: Modul zachovania celkového objemu bunky. Trojrozmerná bunka je znázornená ako dvojrozmerný kruh a jej objem ako plocha tohto kruhu (podľa [17]).	40
Obr. 2.14: Ukážka vzájomného pôsobenia prúdiacej kvapaliny a vnoreného objektu pre 2D. (zdroj: [19]).....	42
Obr. 2.15: Ukážky prekryvania povrchovej membrány jednej a tej istej bunky.	43
Obr. 2.16: 2D ilustrácia dvoch typov odpudzovania. a) odpudivý potenciál <i>soft-sphere</i> , b) odpudivý potenciál <i>membrane-collision</i> . (zdroj [5]).....	44
Obr. 2.17: Dva typy odpudivého potenciálu pre interakciu objekt-objekt. (zdroj [5]).....	44

Obr. 2.18: Ukážka periodického poľa prekážok v mikrofluidickom zariadení (zdroj [20]).	45
Obr. 2.19: Príklad geometrie kanála určeného na skúmanie vplyvu zúženia na hrúbku CFL alebo deformovateľnosti RBC. (podľa [25])	46
Obr. 3.1: Príklady nefyziologického správania červených krviniek. a) Prekrytie buniek b) Interakcia buniek na príliš veľkú vzdialenosť	49
Obr. 3.2: Geometria simulačného boxu kalibračného experimentu.	52
Obr. 3.3: Detekcia prekrytia buniek	54
Obr. 3.4: Určenie normálových vektorov $w_{AB,P}$ a $w_{AB,C}$	56
Obr. 3.5: Algoritmus na detekciu prekrytia trojuholníka a hrany	57
Obr. 3.6: Geometria simulačného boxu (A) pre rôzne počiatočné polohy buniek	58
Obr. 3.7: Geometria simulačného boxu (B) z dvoch rôznych pohľadov.	59
Obr. 3.8: Porovnanie y -ovej a z -ovej zložky rýchlosti pre dve rôzne kombinácie MC parametrov: a) $a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$ (oranžová krivka), b) $a = 1.0$, $n = 5.0$, $d_{cut} = 0.4$ (modrá krivka)	61
Obr. 3.9: Závislosť max. rýchlosti od externej sily pre kalibračné (KAL) a verifikačné simulácie (VAL).	63
Obr. 4.1: Geometria Kanála I.	68
Obr. 4.2: Schéma kolízie dvoch červených krviniek v šmykovom toku.	69
Obr. 4.3: Počiatočné natočenie buniek.	70
Obr. 4.4: Uhol sklonu bunky vzhľadom na smer toku.	71
Obr. 4.5: Rôzne metódy zistenia hlavnej osi bunky pre prípad šmykovej rýchlosti a) $\gamma = 100 \text{ s}^{-1}$ a b) $\gamma = 2000 \text{ s}^{-1}$. Pre prípad $\gamma = 2000 \text{ s}^{-1}$, 1. a 2. metóda poskytujú rovnaký výsledok. Hodnoty uhlov zobrazených hlavných osí pre obidve šmykové rýchlosti sú uvedené v Tab. 4.2.	73
Obr. 4.6: Ukážky tvarov buniek s vyznačenou hlavnou osou určenou metódou $X_{(\min/\max)}$ (plná čiara) pri rôznych šmykových rýchlostiach. Zľava doprava: $\gamma=300 \text{ s}^{-1}$, $\gamma=600 \text{ s}^{-1}$, $\gamma=1000 \text{ s}^{-1}$ ($k_s = 0.05$).	73
Obr. 4.7: a) Porovnanie časového vývoja uhla sklonu bunky získaného metódou najvzdialenejších uzlov (čierna krivka) a metódou PCA (červená krivka) pre prípad šmykovej rýchlosti $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$. b) Povrchové uzly bunky v okamihu numerického výkyvu ($\gamma t = 9800$).	74

- Obr. 4.8: Porovnanie vývoja uhla ϕ v čase s využitím metódy max. vzdialeností uzlov (červená krivka) a PCA (čierna krivka). Uvedený priebeh predstavuje časový vývoj uhla RBC1 pri kolízii s druhou bunkou a zodpovedá nastaveniam $\gamma=100 \text{ s}^{-1}$, počiatočné natočenie je A.75
- Obr. 4.9: Porovnanie časového vývoja uhla ϕ pre prípad a) $\gamma=100 \text{ s}^{-1}$, b) $\gamma=1000 \text{ s}^{-1}$. Červená krivka predstavuje časový vývoj uhla RBC1 pri kolízii s druhou bunkou a čierna krivka uhol natočenia samostatnej bunky, ktorá bola umiestnená na rovnakú pozíciu ako RBC1.75
- Obr. 4.10: Porovnanie časového vývoja uhla ϕ pre prípad a) počiatočného natočenia B a b) natočenia C. Červená krivka predstavuje časový vývoj uhla RBC1 a čierna krivka RBC*.77
- Obr. 4.11: a) Kolízny posun pri šmykovej rýchlosti s hodnotami v rozmedzí 100 až 2000 s^{-1} s elasticitou bunky $k_s = 0.005$ a počiatočným natočením A. Zvislá prerušovaná čiara označuje okamih, v ktorom sa počítala hodnota Δd_{RBC1} . b) Závislosť celkového posunu po kolízii Δd_{RBC1} od šmykovej rýchlosti pre všetky tri počiatočné natočenia.78
- Obr. 4.12: a) Kolízny posun elastických ($k_s = 0.005$) a tuhých buniek ($k_s = 1$) s rôznym počiatočným natočením pri $\gamma = 1000 \text{ s}^{-1}$. b) Časové snímky rotácie tuhých buniek pri počiatočnom natočení B.79
- Obr. 4.13: Kolízny posun pre bunky s rôznou elasticitou. Počiatočné natočenie buniek je B a šmyková rýchlosť je 1000 s^{-1}80
- Obr. 4.14: Časové snímky kolízie dvoch buniek s odlišnou elasticitou povrchovej membrány. Snímky sú zaznamenané v časoch 0.25, 0.5, 0.75, 0.9 a 1 ms.81
- Obr. 5.1: Schematické znázornenie tvorby bezbunkovej vrstvy.84
- Obr. 5.2: Geometria simulačného boxu.85
- Obr. 5.3: Vizualizácia rôznej elasticity buniek použitých v simuláciách. a) Porovnanie buniek s podobnou elasticitou ks00056 (červená) a ks0007 (modrá). b) Porovnanie elasticity infikovanej - ks00127 (zelená) a tuhej - ks1 (biela) bunky voči zdravej bunke - ks00056 (červená).86
- Obr. 5.4: Rýchlostné profily, závislosť x-ovej zložky rýchlostného vektora [m/s] od priemeru kanála [μm]. (a) Porovnanie rýchlostných profilov tokov so zdravými bunkami ($k_s = 0.0056$) pre rôzne úrovne hematokritu pri použití rovnakej externej sily. (b) Rýchlostné profily tokov pre Hct = 5%, (c) pre Hct = 10% a (d) pre Hct = 15% pre hodnoty k_s 0.0056, 0.007, 0.0127 a 1.0. Čierne krivky predstavujú parabolický profil plazmy bez prítomnosti RBC.87
- Obr. 5.5: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre Hct = 15% a všetky štyri sady elastických koeficientov: (a) ks00056, (b) ks0007, (c) ks00127, (d) ks1. Nezávislá premenná je x-ová súradnica buniek.89
- Obr. 5.6: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre bunky s elasticitou ks00056 a pre všetky tri úrovne hematokritu: (a) Hct = 5%, (b) Hct = 10%, (c) Hct = 15%. Nezávislá premenná je x-ová súradnica.89

Obr. 5.7: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre bunky s elasticitou ks00056 a pre všetky tri úrovne hematokritu: (a) Hct = 5%, (b) Hct = 10%, (c) Hct = 15%. Nezávislá premenná je x-ová súradnica.....	91
Obr. 5.8: Vývoj hrúbky CFL v závislosti od simulačného kroku pre prípad Ht = 15% a ks00056. Zaznamenával sa každý 1000. simulačný krok. Červená čiara označuje oblasť, od ktorej sa merala CFL.....	92
Obr. 5.9: Príklad hrúbky CFL pre Ht = 5% a ks00056.	93
Obr. 6.1: a) Schematické znázornenie simulačných experimentov. b) Ukážka zo simulácie so zobrazením rýchlosti tekutiny.	98
Obr. 6.2: a) 2-D znázornenie vzdialenosti ťažiska bunky od hlavnej osi kanála (d). b) Schematické rozdelenie kanála na koaxiálne oblasti.	100
Obr. 6.3: Časový vývoj priemernej vzdialenosti buniek od hlavnej osi kanála d normovanej na výšku kanála pre rôzne objemové podiely v percentuálnom zastúpení a) 20%, b) 40% a c) 60% tuhých buniek. Čierna krivka - poškodené bunky, červená krivka - zdravé bunky, modrá krivka - všetky bunky spolu.	101
Obr. 6.4: Rovnovážny stav d ako funkcia X_Z pre zdravé a poškodené bunky. Pre porovnanie sú uvedené výsledky a) z nášho výpočtového modelu a b) z Kumar et al. 2011 [45] (pôvodný obrázok). Legenda: S - tuhšie častice, F - elastické, Overall - spolu.	102
Obr. 6.5: Časový vývoj počtu tuhých buniek v troch koaxiálnych oblastiach pre rôzne objemové podiely v percentuálnom zastúpení a) 20%, b) 40% a c) 60% tuhých buniek. Červená krivka predstavuje n_P v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.	103
Obr. 6.6: Vývoj marginalizačného pomeru v čase pre suspenzie s rôznym objemovým podielom poškodených buniek.	103
Obr. 6.7: Časový vývoj počtu poškodených buniek s rôznou elasticitou v troch koaxiálnych oblastiach. Objemový podiel tuhých buniek je 20%. Červená krivka predstavuje n_P v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála. ...	104
Obr. 6.8: Ukážka deformovania červených krviniek účinkom rôznej rýchlosti tekutiny. Snímky pochádzajú zo simulácií s Hct = 15%, $X_Z = 0.8$, $k_s(P) = 1$ a max. rýchlosti toku sú (zľava doprava) 0.005, 0.037 a 0.072 m/s.	105
Obr. 6.9: Časový vývoj počtu tuhých buniek (celkom 31) v troch koaxiálnych oblastiach pre a) $v_{max} = 0.005$ m/s, b) $v_{max} = 0.037$ m/s a c) $v_{max} = 0.072$ m/s. Červená krivka predstavuje n_P v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.	105

Zoznam tabuliek

Tab. 2.1: Funkcia $f^*(H/W)$.	31
Tab. 3.1: Numerické parametre bunky.	51
Tab. 3.2: Numerické parametre tekutiny.	51
Tab. 3.3: Testované hodnoty MC parametrov.	53
Tab. 3.4: Maximálny počet prekrížených hrán, ku ktorému došlo v priebehu simulácie pre vybrané parametre a , n a pre $d_{cut} = 0.39$.	60
Tab. 3.5: Maximálny počet prekrížených hrán, ku ktorému došlo v priebehu simulácie pre vybrané parametre a , n a pre $d_{cut} = 0.4$.	60
Tab. 3.6: Výsledky detekcie prekrytia povrchových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) pri použití toku tekutiny s rôznou rýchlosťou a MC parametrov s hodnotami $a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$.	63
Tab. 3.7: Vybrané hodnoty MC parametrov pre rýchlostné intervaly.	63
Tab. 3.8: Prekrytie bunkových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) v závislosti od nastaveného simulačného kroku pre vybranú kombináciu MC parametrov ($a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$).	64
Tab. 3.9: Prekrytie bunkových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) v závislosti od diskretizácie kvapaliny (LB-grid) pre vybranú kombináciu MC parametrov ($a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$).	65
Tab. 4.1: Použité rýchlosti v_0 a šmykové rýchlosti toku γ .	69
Tab. 4.2: Uhly sklonu buniek $[\circ]$ získané štyrmi spôsobmi pre prípad $\gamma = 100 \text{ s}^{-1}$ a $\gamma = 2000 \text{ s}^{-1}$.	72
Tab. 4.3: Priemerný uhol ϕ $[\circ]$ RBC1 po kolízii a samostatnej bunky (RBC*) pre rôzne šmykové rýchlosti a počiatočné natočenie A.	76
Tab. 4.4: Elastické koeficienty buniek použitých pri analýze kolízneho posunu.	80
Tab. 5.1: Elastické koeficienty buniek použitých v simuláciách.	85
Tab. 5.2: Prehľad objemových prietokov (Q) a max. rýchlostí pre rôzne úrovne hematokritu a všetky štyri sady elastických koeficientov.	88
Tab. 5.3: Hodnoty vyjadrujú priemer všetkých hodnôt d' pre bunky z oblasti kanála A a B. Pre porovnanie trajektórií sa použili polohové vektory z 9070 zaznamenaných simulačných cyklov, čo predstavuje hodnotu n .	91

Tab. 5.4: Hrúbky CFL (δ) v μm pre hematokrit 5, 10 a 15% a všetky štyri sady elastických koeficientov. δ predstavuje priemernú hodnotu z δ_1 a δ_2 93

Tab. 6.1: Špecifikácia parametrov v rôznych simulačných setoch. 99

1. Úvod

1.1. Spoločenská motivácia

Vznik mikrofluidických techník v posledných desaťročiach poskytol bezprecedentnú presnosť v technológii kontinuálneho prúdenia, čo prinieslo nové možnosti v širokom spektre oblastí. Okrem zvýšenia presnosti, prinášajú množstvo iných výhod ako rýchlejší reakčný čas; zníženie spotreby činidiel; zvýšenú analytickú citlivosť; kontrolu experimentálnych podmienok a prenosnosť; jednoduchšiu automatizáciu a paralelizáciu testov; integráciu laboratórnych rutín do jedného zariadenia, a podobne. V mikrofluidických systémoch sa malé množstvá tekutín manipulujú pomocou presne navrhnutých kanálov s rozmermi na úrovni mikrometrov, čo predstavuje rozmery porovnateľné s bunkovým mikroprostredím *in vivo*. Kombinované s pokročilými molekulárnymi, zobrazovacími a bioinformatickými technikami, predstavujú robustnú sadu nástrojov v bunkovej analýze.

Vzhľadom na finančnú, časovú i technologickú náročnosť výroby takýchto zariadení, ponúka sa možnosť ich optimalizácie pomocou počítačových simulácií, ktorá by umožňovala nastavenie konkrétnej geometrie mikrokanála a jeho vnútornej štruktúry s požadovanými parametrami. Ďalším prínosom numerických modelov je ich detailný vzhľad do systému. Umožňujú podrobnejšie skúmanie krvného toku, napríklad presné stanovenie pozícií, deformovateľnosti či rotácií buniek v priebehu experimentu, ktoré je v laboratórnych podmienkach len ťažko realizovateľné. Predstavujú tak užitočný nástroj pri objasňovaní teoretických základov hemodynamiky, čo je nápomocné pri vývoji nových liečiv a diagnostických techník.

Oblasti vývoja numerického modelu sa venuje aj výskumná skupina Cell-in-fluid (CIF)[1] pôsobiaca na Fakulte riadenia a informatiky na Žilinskej univerzite. Model je implementovaný v softvéri ESPResSo s licenciou Open Source a umožňuje modelovanie krvi na úrovni krvných buniek ponorených v prúdiacej kvapaline. Je ďalej rozširovaný o nové časti, ktoré zachytávajú relevantné doposiaľ nepopísané vlastnosti buniek. Neoddeliteľnou súčasťou výpočtového prístupu je aj priebežná validácia modelu, primárne realizovaná porovnávaním simulačných a biologických experimentov.

1.2. Ciele práce

Predložená práca sa zameriava na analýzu hromadných vlastností toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach a skúmanie faktorov, ktoré ich ovplyvňujú, využitím štatistík citlivých na ich zmenu. Nadväzuje na už dosiahnuté výsledky v tejto oblasti pri činnosti výskumnej skupiny Cell-in-fluid.

Objemový podiel červených krviniek v krvi je približne 45% a tvoria tak významný podiel interakcií prebiehajúcich v mikrofluidických zariadeniach. Na korektné fungovanie modelu je nevyhnutná nie len ich presná reprezentácia, ale aj správne nastavenie interakcií medzi nimi. Medzibunkové interakcie neboli doposiaľ podrobené systematickému skúmaniu, preto prvým krokom je ich kalibrácia, verifikácia a analýza senzitivity.

Na interakcie má vplyv mnoho faktorov ako napríklad veľkosť a elastické vlastnosti buniek, počet povrchových bodov membrány, rýchlosť toku, a i. Nie je možné pri kalibrácii zohľadniť všetky kombinácie týchto faktorov, preto nakalibrované hodnoty interakčných parametrov nepredstavujú univerzálne hodnoty, ale hodnoty zabezpečujúce fyziologické správanie buniek pri ich vzájomnej interakcii za štandardných podmienok. Pod pojmom štandardné podmienky rozumieme typicky používaný model bunky a simulačných nastavení, a nastavenie fyzikálnych veličín v rozsahu bežných laboratórnych podmienok. Zámerom je vytvoriť spôsob, ktorým bude možné efektívne realizovať kalibráciu medzibunkových interakcií pre konkrétne požadované podmienky.

Pre potvrdenie platnosti výsledkov výpočtového modelu je potrebná validácia modelu, pri ktorej sa porovnáva výskyt špecifických, nenaprogramovaných udalostí vyvolaných simulačným modelom s výskytom týchto udalostí v skutočnom systéme. Červené krvinky vykazujú v šmykovom toku viaceré vzorov správania. Napríklad vytvorenie bezbunkovej vrstvy v blízkosti stien kanála je prirodzeným javom a dobrý model buniek by mal toto správanie zachytiť. Na overenie modelu je možné simulovať podmienky biologických experimentov a pozorovať, či sa pozorovaná udalosť vyskytuje a či charakteristiky udalosti zodpovedajú pozorovaným hodnotám z experimentov. Takáto analýza hromadných vlastností červených krviniek v mikrokanáli je nosnou témou predloženej práce.

V tejto dizertačnej práci sme si vymedzili nasledujúce ciele::

1. Vytvoriť metodiku kalibrácie medzibunkových interakcií vhodnú pre budúce využitie pri rôznych simulačných podmienkach.
 - Nájsť konkrétne hodnoty parametrov medzibunkových interakcií, ktoré zabezpečia fyziologické správanie červených krviniek pri ich vzájomnej interakcii za štandardných simulačných podmienok.
 - Overiť funkčnosť nakalibrovaných hodnôt a vymedziť oblasť vstupných nastavení, v ktorej zabezpečujú svoju funkcionálnosť.

2. Validácia hromadných vlastností
 - Prostredníctvom vybraného hemodynamického javu overiť hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli.
 - Využiť výpočtový model v konkrétnej aplikačnej štúdií vo výskume teoretických modelov hromadného správania biologických krvných buniek.

2. Súčasný stav

Pred tým ako predstavíme výpočtový model, priblížime si v Kap. 2.1 prostredie, ktoré simulujeme. Pri fyzikálnom pozadí prúdiacej tekutiny sa zameriame na teoretické princípy, o ktoré sa ďalej v práci opierame a charakteristiky toku, ktoré sú často udávané v biologických experimentoch. Vzhľadom na zameranie predloženej práce je pri popise samotného výpočtového modelu kladený dôraz na medzibunkové interakcie. Na záver, v Kap. 2.5, je uvedená prehľadová štúdia experimentov hustých suspenzií s využitím mikrofluidických zariadení s akcentom na skúmanie hromadného správania buniek.

2.1. Biologické a fyzikálne pozadie modelu

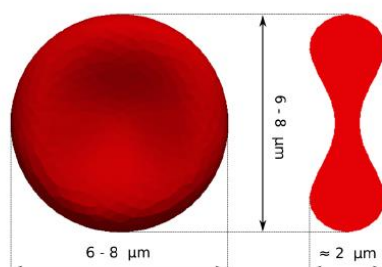
2.1.1. Červené krvinky

Z mikroskopického pohľadu je krv hustá suspenzia krvných buniek a proteínov suspendovaných v krvnej plazme. Majoritnou zložkou krvi sú červené krvinky (tiež erytrocyty, angl. Red Blood Cell - RBC), ktoré u zdravého človeka tvoria približne 40 - 44 %. Ďalšími dôležitými zložkami sú biele krvinky (tiež leukocyty, angl. White Blood Cell - WBC), zastúpené voči RBC v pomere 1:500, a krvné doštičky (tiež trombocyty, angl. Platelete - PLT) s výskytom približne 1:10 voči RBC. Biele krvinky spolu s krvnými doštičkami tvoria približne 1 % krvi a zvyšok predstavuje krvná plazma.

Vzhľadom na výrazné zastúpenie červených krviniek voči ostatným krvným bunkám, predstavíme si ich stavbu a vlastnosti. Zdravé zrelé červené krvinky majú tvar bikonkávneho disku s priemerom $7,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$, s povrchovou plochou približne $136 \mu\text{m}^2$ a objemom približne $91 \mu\text{m}^3$ [2]. Ich hlavnou funkciou je dodávať kyslík z pľúc do periférnych tkanív a prenášať oxid uhličitý späť do pľúc.

Pri prechode obehovým systémom musia červené krvinky prechádzať aj extrémne tenkými kapilármi s prierezmi menšími ako je ich priemer, z čoho vyplýva veľká elasticita a deformovateľnosť bunkovej membrány. Tvoria sa v kostnej dreni a v procese dozrievania strácajú bunkové jadro ako aj všetky ostatné bunkové organely, ako sú mitochondrie, Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum. Zrelé červené krvinky tak pozostávajú už len z bunkovej

membrány a cytoplazmy [3]. Bunková membrána sa skladá z dvoch vrstiev, fosfolipidovej dvojvrstvy a cytoskeletonovej spektrínovej siete. Fosfolipidická dvojvrstva je zodpovedná za udržanie približne konštantného povrchu bunky. Tieto dve vrstvy bunkovej membrány sú navzájom poprepájané proteínmi. Membrána obsahuje tiež iónové pumpy, ktoré udržiavajú vnútorný objem červenej krvinky konštantný. Cytoplazma je pomerne jednotná tekutina bohatá na hemoglobín, biomolekulu obsahujúcu železo, ktorá dokáže viazať kyslík a je zodpovedná za červenú farbu buniek.



Obr. 2.1: Tvar a rozmery červenej krvinky.

Pri mnohých poruchách alebo chorobných stavoch môžu erytrocyty vykazovať variácie vzhľadu, morfológie alebo straty elasticity v dôsledku patologických stavov. Strata elasticity červených krviniek sprevádza viacero chorôb (malária, kosáčiková anémia, cukrovka, leukémia, a i.), preto sa skúmaniu a detekcii takto poškodených RBC venuje v súčasnej biomedicíne veľká pozornosť.

2.1.2. Tok kvapaliny v mikrokanaľoch

Pri ustálenom prúdení reálnej kvapaliny malou rýchlosťou sa vrstvy kvapaliny po sebe pravidelne posúvajú, prúdnice sú navzájom rovnobežné. Takéto prúdenie kvapaliny sa nazýva laminárne. **Laminárne prúdenie** sa môže udržať iba do určitej kritickej rýchlosti. Po jej prekročení je možné pozorovať vírenie a nestálosť obrazu vytvorených prúdnic, pričom vzniká turbulentné prúdenie. Povahu toku možno rozlíšiť na základe hodnoty Reynoldsového čísla (Re). **Reynoldsove číslo** dáva do vzájomného pomeru zotrvačné sily a viskózne sily pôsobiace pri prúdení tekutín.

$$Re = \frac{\text{zotrvačné sily}}{\text{viskózne sily}} = \frac{\rho vr}{\mu} = \frac{vr}{\nu} = \frac{\rho \dot{\gamma} r^2}{\mu}, \quad (2.1)$$

kde ρ je hustota tekutiny, v je rýchlosť prúdenia tekutiny v kanáli, μ je dynamická viskozita tekutiny a ν je kinematická viskozita tekutiny, pričom medzi kinematickou a dynamickou viskozitou platí vzťah $\mu = \rho \cdot \nu$, $\dot{\gamma}$ je šmyková rýchlosť a r je polomer častice alebo iný typický rozmer. Vzhľadom problematickú definíciu tohto parametra je potrebné s Re pracovať obozretne a poznať spôsob jeho výpočtu. Z pohľadu celého systému sa pri výpočte Reynoldsovho čísla za typický rozmer považuje hydraulický priemer D_h definovaný ako

$$D_h = \frac{4A}{P}, \quad (2.2)$$

kde A je plocha prierezu a P je obvod namáčanej plochy. Pre kanále s kruhovým prierezom sa hydraulický priemer rovná priemeru kanála D a pre kanále s obdĺžnikovým prierezom (s kvapalinou v celom objeme) platí vzťah

$$D_h = \frac{4wh}{w+h}, \quad (2.3)$$

kde w a h sú šírka a výška kanála.

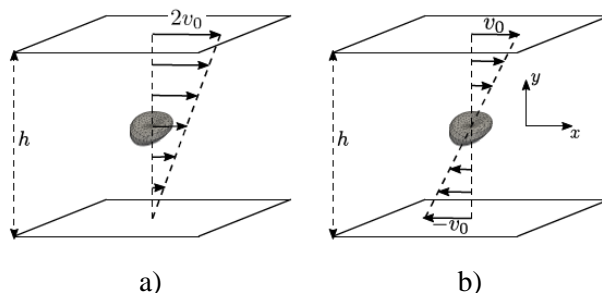
Samotné Re je bezrozmerná veličina. Pri hodnotách do približne 2000 sa tok považuje za laminárny, pri hodnotách nad 2100 za turbulentný a hodnoty medzitým predstavujú tzv. prechodnú oblasť [4].

Šmykový tok

Medzi jednotlivými vrstvami laminárneho toku pôsobí šmykové napätie. Môžeme si to predstaviť ako dosku ťahanú po hladine vody s určitou silou. Trením doska prenáša pohyb na hladinu, ktorý sa trením prenáša aj na ďalšie vrstvy vody v smere, ktorý je kolmý na smer pohybu dosky. Šmykové napätie závisí od viskozity a rýchlosti tekutiny.

Jednoduchým príkladom šmykového toku je **Couetteov tok**. Ide o tok medzi dvoma rovnobežnými rovinami, pričom roviny sa navzájom pohybujú. V prípade, že vzdialenosť dvoch (nekonečných) rovín je h , spodná stena je nehybná a horná stena sa pohybuje konštantnou rýchlosťou $2v_0$ v smere x , rýchlostný profil tekutiny je lineárny (Obr. 2.2 (a)). Šmyková rýchlosť je v celom kanáli konštantná a rovná sa

$$\dot{\gamma} = \frac{2v_0}{h}. \quad (2.4)$$

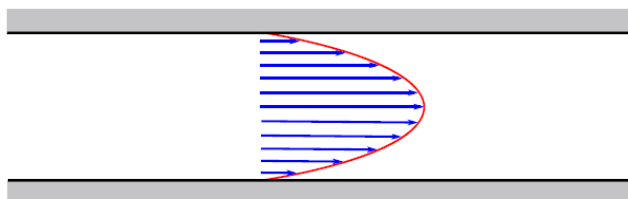


Obr. 2.2: Couetteov tok. a) Spodná stena je statická a horná sa pohybuje rýchlosťou $2v_0$. Bunka umiestnená v strede sa začne otáčať a pohybovať sa doprava. b) Dve rovnobežné steny sa pohybujú v opačných smeroch. Bunka umiestnená v strede sa otáča, ale zostáva v rovnakej polohe. (podľa [5])

V prípade, že sa obidve roviny pohybujú rovnakou rýchlosťou v_0 navzájom opačným smerom, je rýchlostný profil tiež lineárny s $v(h/2) = 0$, ako je to znázornené na Obr. 2.1(b). Takéto nastavenie je užitočné na skúmanie účinkov šmykového toku na bunky. Pri umiestnení bunky do stredu toku je vystavená šmykovému napätiu a dochádza k deformáciám bunky indukovaných týmto šmykovým napätím, ale bunka zostáva v rovnakej pozícii vzhľadom na smer x . Využitie dvoch pohyblivých stien predstavuje nastavenie, ktoré umožňuje použiť simulačný box s malými rozmermi. Toto nastavenie sme využili na skúmanie kolízií buniek v šmykovom toku, čomu sa venuje Kap 4.

Poiseuilleov tok

Homogénny tok kvapaliny v mikrofluidickom kanáli je charakterizovaný svojím parabolickým profilom a nazýva sa Poiseuilleov tok. Ide o osovo symetrický laminárny tok, v ktorom je rýchlosť kvapaliny na stenách nulová a narastá do maximálnej hodnoty v strede kanála (Obr. 2.3).



Obr. 2.3: Poiseuilleov tok.

Pre účely výpočtových simulácií je nevyhnutné poznať rýchlosť tekutiny. Častým spôsobom uvádzania rýchlosti je **objemový prietok**. Ten je definovaný ako objem tekutiny dV prechádzajúcej daným prierezom za jednotku času dt :

$$Q = \frac{dV}{dt}. \quad (2.5)$$

Ak prierezová plocha A s rýchlosťou v prejde za dobu dt dráhu $s = vdt$, objem pretečenej kvapaliny sa rovná $V = As = Avdt$. Predchádzajúci vzťah je možné zapísať ako

$$Q = vA. \quad (2.6)$$

Objemový prietok je vo vzťahu s rozdielom tlakov na začiatku a na konci kanála podľa Hagen–Poiseuilleovej rovnice. Pre laminárny tok nestlačiteľnej kvapaliny s konštantnou rýchlosťou v kanály s kruhovým prierezom nadobúda tvar (podľa [6]):

$$\frac{\Delta P}{L} = \mu \frac{8Q}{\pi R^4}, \quad (2.7)$$

kde $\Delta P/L$ je rozdiel tlaku medzi začiatkom a koncom kanála, L je dĺžka kanála, μ je dynamická viskozita tekutiny, Q je objemový prietok a R je priemer kanála. S využitím všeobecného vzťahu: *šmykové napätie = dynamická viskozita \times šmyková rýchlosť*, potom šmykovú rýchlosť na stene kanála $\dot{\gamma}$ newtonovskej tekutiny, tiež označovanú ako "zdanlivú" šmykovú rýchlosť (z angl. *apparent shear rate*), vypočítame:

$$\dot{\gamma}_a = \frac{4Q}{\pi R^3} = \frac{4v}{R}, \quad (2.8)$$

pričom pre šmykové napätie platí: $\tau = \frac{R\Delta P}{2L}$. Pre kanále s pravouhlým prierezom sa šmyková rýchlosť vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\dot{\gamma}_a = \frac{6Q}{WH^2} = \frac{4v}{H}, \quad (2.9)$$

kde W je šírka a H je výška kanála. Pomer výšky k šírke (H/W) by mal byť takmer nula ($W \gg H$), pretože existujúca teoretická rovnica, ktorá prevádza objemový prietok a tlakový gradient na šmykové napätie je založená na predpoklade, že rýchlosť nezávisí od bočnej polohy. V [7] zaviedli do rovnice členy zohľadňujúce geometriu pravouhlého kanála

$$\dot{\gamma}_a = \left(\frac{6Q}{WH^2}\right) \left(1 + \frac{H}{W}\right) f^* \left(\frac{H}{W}\right). \quad (2.10)$$

Funkcia $f^*(x)$ je vypočítaná numerickým prístupom a pre vybrané hodnoty H/W je uvedená v Tab. 2.1.

Tab. 2.1: Funkcia $f^*(H/W)$.

H/W	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
f^*	1,0000	0.7946	0.6820	0.6242	0.5991	0.5928

2.1.3. Červené krvinky v šmykovom toku

Červené krvinky vykazujú v šmykovom toku viacero vzorov správania. Typicky sa RBC vystavená šmykovému toku môže predĺžiť a vyrovať v konštantnom uhle vzhľadom na tok. Za určitých podmienok prúdenia môže v závislosti od šmykovej rýchlosti rotovať (angl. tumble) alebo vykazovať pohyb typu tank-treading. Z dôvodu neexistencie slovenského ekvivalentu tohto výrazu, budeme v ďalšom texte používať pôvodný anglický názov.

Rotácia bunky (angl. flipping alebo tiež tumbling)

Počas rotácie sa bunka správa ako pevný disk v šmykovom toku. Tento pohyb je charakteristický pri pôsobení malej šmykovej rýchlosti a bol zaznamenaný pre suspenzačné média s nízkou aj vysokou viskozitou [8]. Bunka sa otáča neurčito s frekvenciou otáčania v závislosti od jej orientácie vzhľadom na prietok (Obr. 2.4).



Obr. 2.4: Rotácia červenej krvinky pri nízkej šmykovej rýchlosti.

Tank-treading

S výnimkou veľmi nízkych šmykových rýchlostí sa červená krvinky zarovnáva so smerom toku a deformuje sa na elipsoid. Zároveň vykazuje valivý pohyb membrány okolo jej vnútra bez výrazných zmien tvaru bunky (Obr. 2.5). Frekvencia tank-treadingu je takmer lineárna so šmykovou rýchlosťou. Názov vznikol na základe podobnosti rotácii tankového pásu okolo kolies.



Obr. 2.5: Ukážka tank-treadingu červenej krvinky.

Okrem vplyvu šmykového toku na samostatnú červenú krvinku, boli pozorované aj procesy charakteristické pre viacbunkové systémy, ktorých podstata vyplýva z interakcií medzi krvinkami.

Bezbunková vrstva (angl. Cell-free layer, CFL)

V dôsledku vysokých strižných napätí rozvinutých okolo steny a profilu parabolickej rýchlosti, majú deformovateľné červené krvinky tendenciu migrovať smerom ku stredu cievy, čo následne vedie k tvorbe tenkej vrstve plazmy bez prítomnosti krviniek v blízkosti cievnych stien. Táto problematika ako aj simulačné experimenty zaoberajúce sa faktormi, ktoré ovplyvňujú tvorbu bezbunkovej vrstvy, sú bližšie popísané v Kap. 5.

Fahraeus-Lindqvistov efekt

Fahraeus-Lindqvistov efekt súvisí s vytváraním bezbunkovej vrstvy. Efekt popisuje ako sa mení viskozita krvi s meniacim sa priemerom toku. Vytvorením bezbunkovej vrstvy klesá trenie medzi stenou a bunkami, pričom CFL má lokálne zníženú viskozitu. Výsledkom je zníženie relatívnej viskozity krvi. Čím je priemer toku menší, tým je hrúbka CFL relatívne voči nemu väčšia preto sa tzv. zdanlivá viskozita krvi znižuje so zmenšujúcim sa priemerom toku. Tento efekt nastáva priemeroch v rozmedzí od 7 do 300 μm .

Marginalizácia

Pri vytváraní CFL môžu deformovateľné RBC vytlačiť tuhšie krvné bunky (napríklad krvné doštičky, biele krvinky, poškodené RBC) z jadra toku smerom k oblasti blízkej CFL. Dochádza k transportu a kumulácii tuhších buniek v blízkosti cievnych stien. Marginalizácií poškodených červených krviniek sa venuje Kap. 6.

Agregácia

K agregácii, teda k zhlukovaniu, červených krviniek dochádza pri nízkych šmykových silách za prítomnosti vláknitých proteínov. Vďaka jedinečnému diskoidnému tvaru krviniek, ktorý poskytuje veľkú povrchovú plochu na ich vzájomný kontakt, sa formujú jednorozmerné zväzky krviniek známych ako *rouleauxy*. Agregácia buniek zatiaľ nie je implementovaná do nášho výpočtového modelu, takže zanedbávame jej vplyv na hromadné vlastnosti krviniek.

2.2. Technologické prostriedky

Použitý softvér

Model elastických objektov v toku tekutiny je vyvíjaný v open-source programovom balíku ESPResSo [9] s licenciou GPU. Doménou softvéru sú simulácie molekulárnej dynamiky mnohočasticových systémov využívaných najmä vo fyzike, chémii, či molekulárnej biológii. Výskumnou skupinou CIF bol doplnený o modul elastických objektov *Object in fluid* (OIF), ktorý umožňuje modelovať trojrozmerné objekty skladajúce sa z väčšieho množstva častíc o určitej hmotnosti [10]. Program ESPResSo je paralelizovateľný a dá sa nasadiť na PC, klastre alebo na superpočítače s mnohými procesormi. Jadro softvéru je napísané v jazyku C/C++ a používateľské rozhranie zabezpečuje programovací jazyk Python.

Na grafické zobrazovanie simulačných výsledkov bol použitý softvér Paraview [11], ktorý umožňuje 3D vizualizáciu výstupných dát zo simulácií vo formáte vtk.

Numerické výstupy zo simulácií boli spracované v softvéroch MS Excel [12] a MATLAB [13].

Výpočtové prostriedky

Vykonávanie simulácií je výpočtovo náročné. Prípravná fáza, zahŕňajúca vytváranie skriptov, ich testovanie a doladovanie vstupných nastavení, prebiehala na osobnom počítači. Samotné simulácie boli realizované na klastri Žilinskej univerzity, ktorý je financovaný z projektu „Slovenská infraštruktúra pre vysokovýkonné počítanie“ (ITMS 26210120002) a má nasledovnú špecifikáciu:

46 výpočtových uzlov:

Procesory: 2×6 jadrový Intel(R) Xeon(R) CPU L5640 @ 2.27GHz

RAM: 96GB / HDD: 2×500 GB

2 výpočtové uzly:

Procesory: 2×10 jadrový Intel(R) Xeon(R) CPU E7- 8860 @ 2.27GHz

RAM: 256GB / HDD: 2×300 GB

+ $2 \times$ grafická karta NVIDIA GF100 [Tesla M2070].

2.3. Popis modelu

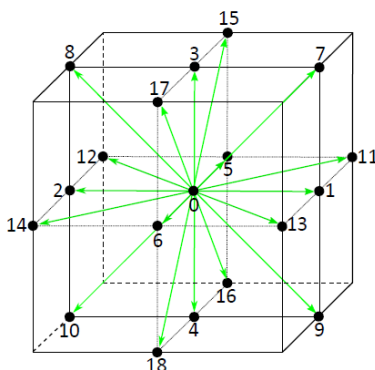
Pre simuláciu krvi v mikrofluidických zariadeniach, je potrebné vytvoriť model elastických objektov predstavujúcich krvné bunky a model prúdiacej kvapaliny. Tieto dva celky predstavujú hlavné časti výpočtového modelu. Ich vzájomné prepojenie je zabezpečené metódou vnorenej hranice s disipatívnym spojením. Dôležitou súčasťou modelu sú tiež vzájomné interakcie medzi elastickými objektami ako aj interakcie medzi objektami a jednotlivými časťami mikrokanála ako sú prekážky alebo steny kanála.

2.3.1. Model prúdiacej kvapaliny

Kvapalina je modelovaná pomocou Lattice-Boltzmannovej metódy [14], ktorá je založená na diskretizácii priestoru kvapaliny do bodov. Body sú rovnomerne rozmiestnené v trojdimenzionálnej Eulerovskej mriežke, pričom mriežka je fixná počas celej simulácie. Kvapalina je reprezentovaná fiktívnymi časticami, ktoré narážaním do seba prenášajú informáciu o veľkosti rýchlosti a smere, ktorým sa pohybujú. Rovnica pre pohyb fiktívnych častíc je nasledovná:

$$n_i(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i \Delta t, t + \Delta t) = n_i(\mathbf{x}, t) - \Delta_i(\mathbf{n}(\mathbf{x}, t)) + f_i(\mathbf{x}, t) \quad (2.11)$$

kde Δt je časový krok použitý v simulácii, Δ_i je kolízny operátor, a f_i je externá sila pôsobiaca na kvapalinu. Funkcia $n_i(x, t)$ hovorí, koľko fiktívnych častíc prúdi z miesta \mathbf{x} v čase t v smere jednotkového vektora \mathbf{e}_i .



Obr. 2.6: Diskretizácia tekutiny - D3Q19 verzia Lattice-Boltzmannovej metódy (zdroj [14]).

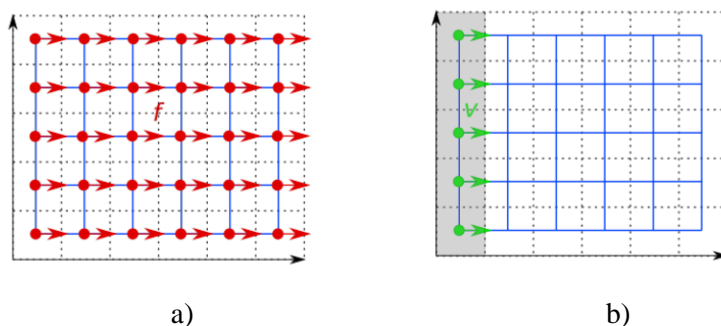
Diskrétny smery pohybu môžu byť definované rôzne. V softvéri ESPResSo sa na výpočet kvapaliny v 3D používa D3Q19 verzia Lattice-Boltzmannovej metódy, čo znamená, že v troch rozmeroch sa môžu fiktívne častice pohybovať devätnástimi rôznymi smermi (Obr. 2.6).

Pre úplné popísanie prúdiacej kvapaliny je potrebné dopočítať ešte makroskopické veličiny ako rýchlosť \mathbf{u} a hustotu ρ . Tie vypočítame nasledovne:

$$\rho(\mathbf{x}, t) = \sum_i n_i(\mathbf{x}, t) \quad \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = \frac{\sum_i n_i(\mathbf{x}, t) \mathbf{e}_i}{\rho(\mathbf{x}, t)} \quad (2.12)$$

kde $\rho(\mathbf{x}, t)$ je hustota a $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ je rýchlosť kvapaliny v mieste mriežky \mathbf{x} v čase t .

Tekutina sa v ESPResSe uvádza do pohybu dvomi spôsobmi. Prvý spôsob je prostredníctvom externej sily, ktorá pôsobí v každom bode mriežky (parameter `ext_force`). Druhý spôsob je založený na vytvorení steny s určitou rýchlosťou, ktorá tekutinu postupne rozhýbe (Obr. 2.7).



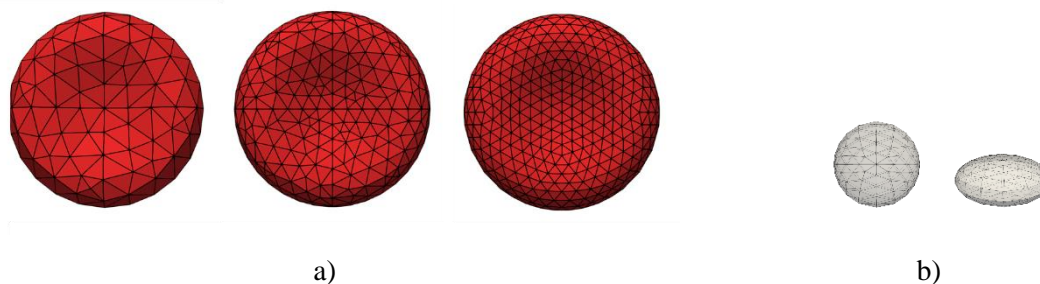
Obr. 2.7: Ilustrácia dvoch spôsobov rozhýbania tekutiny: a) pomocou externej sily, b) pomocou pohyblivej steny. (zdroj: [15])

Veľkosť externej sily potrebnej na zabezpečenie konkrétnej rýchlosti resp. objemového prietoku (na základe napríklad údajov z biologickej štúdie) je možné zistiť na dve iterácie z lineárnej závislosti medzi externou silou a rýchlosťou kvapaliny [16].

2.3.2. Model elastických objektov

Červená krvinka neobsahuje jadro ani väčšinu bunkových organel, na základe čoho pristupujeme k zjednodušeniu pri jej modelovaní. Modelujeme ju ako elastickú membránu vyplnenú rovnakou kvapalinou ako je v jej okolí. Na modelovanie membrány je použitá povrchová triangulácia – povrch objektu je pokrytý nepravidelnou trojuholníkovou sieťou (Obr. 2.8). Každý vrchol

trojuholníka predstavuje hmotný bod a tieto body sú navzájom prepojené pružinami, čo zabezpečuje elasticitu vnorených objektov. Elastické vlastnosti sa nastavujú prostredníctvom piatich elastických koeficientov príslušných modulov (popísaných nižšie), pričom každý modul má definovanú silu pôsobiacu na vrcholoch siete. Neskôr bol do modelu zahrnutý aj viskózný modul, ktorý zabezpečuje viskózne správanie objektu.

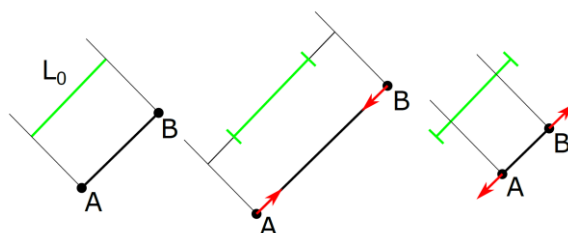


Obr. 2.8: Príklady rôznej triangulácie a) pre modely RBC s 141, 347 a 642 povrchovými bodmi (zľava) a b) pre modely krvných doštičiek guľovitého a diskoidného tvaru so 102 povrchovými bodmi.

Model elastických objektov bol vyvinutý hlavne na modelovanie červených krviniek, ale je možné s ním modelovať aj objekty iných tvarov a vlastností. Na Obr. 2.8(b) sú znázornené dva rôzne typy krvných doštičiek, ktoré sú často modelované ako tuhé častice guľovitého alebo diskoidného tvaru. Nastavením všetkých elastických koeficientov na hodnotu jedna sa z elastického objektu stáva tuhý objekt s definovanou hmotnosťou, veľkosťou a tvarom.

Modul pružnosti

Úlohou modulu pružnosti (angl. stretching modulus) je zachovať pokojovú dĺžku jednotlivých väzieb medzi povrchovými bodmi. Ide o modul s lokálnym pôsobením. Strany trojuholníkov si môžeme predstaviť ako pružiny



Obr. 2.9: Zobrazenie funkčnosti modulu pružnosti. (zdroj: [17]).

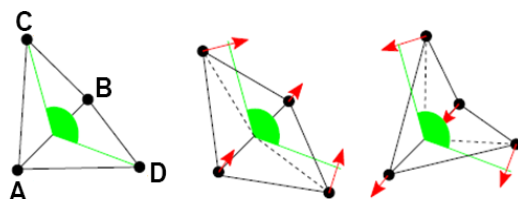
s nelineárnym správaním (viď Obr. 2.9), ktoré priťahujú resp. odtláčajú povrchové body, ak sú od seba ďalej resp. bližšie ako počas relaxovaného stavu. Silu pružnosti $F_s(A,B)$ pôsobiacu medzi bodmi A a B vypočítame zo vzťahu

$$F_s(A,B) = k_s \kappa(\lambda)(L - L_0) \mathbf{n}_{AB}, \quad (2.13)$$

kde k_s je koeficient pružnosti, $\lambda = \frac{L}{L_0}$ pričom L a L_0 je aktuálna a relaxovaná dĺžka väzby medzi bodmi A a B, $\kappa(\lambda)$ je nelineárna funkcia zodpovedajúca Neo-Hookeanovmu správaniu $\kappa(\lambda) = \frac{\lambda^{0.5} - \lambda^{-2.5}}{\lambda + \lambda^{-3}}$ a \mathbf{n}_{AB} je jednotkový vektor v smere spojnice bodov A a B. Aby bol súčet síl v celej sústave rovný nule, rovnako veľká sila opačného smeru pôsobí aj v bode B.

Modul ohybu

Modul ohybu (angl. bending modulus) riadi lokálnu zmenu uhla medzi susednými trojuholníkmi povrchovej siete bunky.



Obr. 2.10: Modul ohybu k_b pôsobí pri zmene uhla medzi dvoma susednými trojuholníkmi na povrchu bunky. (zdroj: [5])

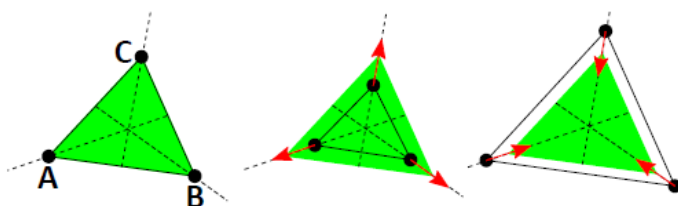
Pre dva susedné trojuholníky označené ABC a ABD so spoločnou hranou AB , je veľkosť pôsobiacej sily v bode C daná vzťahom

$$F_b(C) = k_b(\theta - \theta_0) \mathbf{n}_{ABC}, \quad (2.14)$$

kde k_b je koeficient ohybu, θ je aktuálny uhol medzi dvoma susednými trojuholníkmi so spoločnou hranou AB , θ_0 je uhol medzi týmito dvoma trojuholníkmi v relaxovanom stave, a \mathbf{n}_{ABC} je normálový vektor roviny ABC . Analogická sila so zodpovedajúcim normálnym vektorom \mathbf{n}_{ABD} sa aplikuje na vrchol D. Aby bol súčet síl v celej sústave rovný nule, v bodoch A a B pôsobí sila, ktorá má polovičnú veľkosť a opačný smer ako sila $F_b(C)$ (viď. Obr. 2.10).

Modul zachovania lokálnej plochy

Hlavnou úlohou tohto modulu (angl. local area modulus) je zachovanie lokálnej plochy v jednotlivých trojuholníkoch na povrchu bunky. Princíp jeho fungovania je znázornený na Obr. 2.11.



Obr. 2.11: Modul zachovania lokálnej plochy, podľa [17].

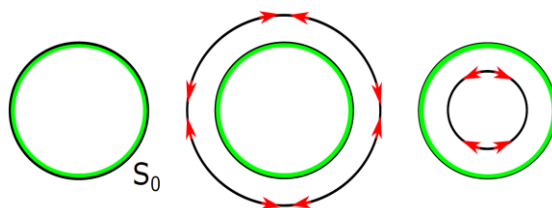
Ak T predstavuje ťažisko trojuholníka ABC a t_A, t_B, t_C označujú veľkosti vektorov AT, BT, CT , potom sila pôsobiaca na vrchol A je daná vzťahom

$$F_{al}(A) = k_{al} \frac{S - S_0}{t_A^2 + t_B^2 + t_C^2} t_A, \quad (2.15)$$

v ktorom k_{al} je koeficient zachovania lokálnej plochy, S a S_0 je aktuálna a relaxovaná plocha trojuholníka ABC . Analogické sily pôsobia na vrcholy B a C .

Modul zachovania celkovej plochy

Modul zachovania celkovej plochy (angl. global area modulus) má globálny charakter a jeho úlohou je udržiavať konštantný povrch objektu počas celej simulácie. Jeho fungovanie je schématicky znázornené na Obr. 2.12.



Obr. 2.12: Modul zachovania celkovej plochy. Trojrozmerná bunka je reprezentovaná ako dvojrozmerný kruh a jej inak dvojrozmerná plocha je tu reprezentovaná ako obvod kruhu (podľa [17]).

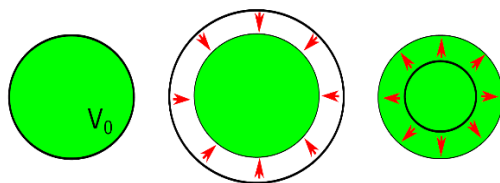
Modul zachovania globálnej plochy je do softvéru implementovaný pomocou vzťahu

$$\mathbf{F}_{ag}(\mathbf{A}) = k_{ag} \frac{S-S_0}{S_0} S_{ABC} \frac{t_A}{t_A^2+t_B^2+t_C^2}, \quad (2.16)$$

kde k_{ag} je koeficient zachovania globálnej plochy, S_0 je veľkosť povrchu bunky v jej relaxovanom stave a S je jej aktuálny povrch. S_{ABC} predstavuje povrch trojuholníka ABC a T ťažisko tohto trojuholníka, pričom platí $t_A = |AT|$, $t_B = |BT|$ a $t_C = |CT|$.

Modul zachovania objemu

Druhý globálny modul, modul zachovania objemu (angl. volume modulus), má na starosti udržiavať konštantný objem objektu počas celej simulácie. Pôsobenie sily je znázornené na Obr. 2.13.



Obr. 2.13: Modul zachovania celkového objemu bunky. Trojrozmerná bunka je znázornená ako dvojrozmerný kruh a jej objem ako plocha tohto kruhu (podľa [17]).

Veľkosť sily vypočítame ako

$$\mathbf{F}_V(\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}) = -k_V \frac{V-V_0}{V_0} S_{ABC} \mathbf{n}_{ABC}, \quad (2.17)$$

kde k_V je koeficient zachovania objemu, V je celkový objem telesa, V_0 je jeho relaxovaný objem, S_{ABC} je obsah trojuholníka ABC , \mathbf{n}_{ABC} je jednotkový normálový vektor trojuholníka ABC .

Modul viskozity membrány

Neskôr bol do modelu pridaný modul viskozity (angl. viscosity modulus). Tento modul má na starosti spomalenie pri zmene tvaru objektu a môžeme si ho predstaviť ako tlmič paralelne spojený so strunou. Sila tlmenia bude pôsobiť proti relatívnemu pohybu každého bodu triangulácie a jej veľkosť bude proporčná k jeho relatívnej rýchlosti. Silu pôsobiacu na vrchol A definujeme ako

$$\mathbf{F}_{visc}(\mathbf{A}) = -k_{visc} \frac{\Delta L_{AB}}{\delta t} = -k_{visc} (\mathbf{v}_{AB} \mathbf{n}_{AB}) \mathbf{n}_{AB}, \quad (2.18)$$

kde k_{visc} je viskózný koeficient, L je vzdialenosť medzi A a B a dt je diferenciál času a v_{AB} je relatívna rýchlosť medzi bodmi A a B . Analogická sila opačnej veľkosti pôsobí na vrchol B .

2.3.3. Prepojenie prúdiacej kvapaliny a elastických objektov

Pohyb tekutiny a pohyb vnorených objektov je modelovaný pomocou dvoch rôznych sietí. Pre ich prepojenie sa využíva metóda vnorenej hranice s disipatívnym spojením (DC-IBM, Dissipative Coupling of Immersed Boundary Method) popísaná v [5]. Vnorené objekty sú charakterizované hranicami, teda vrcholmi ich povrchovej siete, ktoré sa riadia Newtonovou rovnicou pohybu

$$\mathbf{F} = m_j \frac{\delta^2 X_j}{\delta t^2}, \quad (2.19)$$

kde m_j je hmotnosť bodu j vnorenej hranice, X_j je jeho pozícia a F je celková sila pôsobiaca na tento bod, ktorú môžeme vyjadriť vzt'ahom:

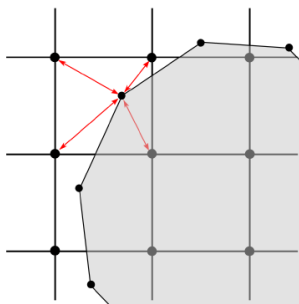
$$\mathbf{F} = \mathbf{F}_{jf} + \mathbf{F}_{je} + \mathbf{F}_{ext}. \quad (2.20)$$

Okrem všetkých vonkajších síl \mathbf{F}_{ext} (vrátane tých, ktoré vznikajú interakciami bunka-bunka a bunka-stena resp. bunka-prekážka) a všetkých elastických síl \mathbf{F}_{je} pôsobiacich na bod j je súčasťou celkovej sily aj sila vyvíjaná tekutinou na bod vnorenej hranice \mathbf{F}_{jf} . Táto sila je úmerná rozdielu rýchlosti bodu vnorenej hranice \mathbf{v} a rýchlosti tekutiny \mathbf{u} v rovnakom mieste a teda platí:

$$\mathbf{F}_{jf} = \zeta(\mathbf{v} - \mathbf{u}), \quad (2.21)$$

kde ζ je koeficient prenosu síl (angl. friction coefficient). Parameter ζ reprezentuje lokálne trecie sily, jeho nastavenie je závislé od viskozity a hustoty kvapaliny a od geometrie vnoreného objektu [14]. Kalibrácia koeficientu ζ ako aj analýza jeho senzitivity je uvedená v [18].

Vzhľadom na rôznu mieru diskretizácie kvapaliny a objektu je potrebné rýchlosť kvapaliny \mathbf{u} dopočítať pomocou lineárnej interpolácie pre každý bod vnorenej hranice ako je to ilustrované pre 2D model na Obr. 2.14. Interakcia medzi vnorenými bunkami a tekutinou je obojsmerná, teda sily, ktorými pôsobí vnorený objekt na tekutinu, sú vyhodnotené rovnako ako sily, ktorými pôsobí tekutina na vnorený objekt [19].



Obr. 2.14: Ukážka vzájomného pôsobenia prúdiacej kvapaliny a vnoreného objektu pre 2D. (zdroj: [19])

2.3.4. Interakcie medzi objektami

Okrem prepojenia tekutiny s elastickými objektami je potrebné zabezpečiť aj všetky ostatné interakcie medzi objektami, ktoré sú prítomné v mikrokanáli. Ide o vzájomné interakcie medzi krvnými bunkami a interakcie medzi bunkami a prekážkami resp. stenami kanála. Neskôr boli pridané aj interakcie medzi jednotlivými povrchovými uzlami tej istej bunky.

Z pohľadu charakteru pôsobiacich síl uvažujeme v zásade o dvoch rôznych silách. Prvá je odpudivá sila, ktorej úlohou je zabezpečiť, aby sa povrchové siete dvoch objektov pri zrážke neprekryli. V našom modeli využívame odpudivé sily typu *soft-sphere* a *membrane-collision*, ktoré si podrobnejšie popíšeme. Druhý typ sily je adhézia čiže príľnavosť. Je to schopnosť nadviazať väzbu medzi dvoma krvinkami, alebo väzbu medzi krvinkou a iným vnoreným objektom. V súčasnosti adhézia vo výpočtovom modeli ešte nie je implementovaná. Do budúcnosti sa počíta s jej využitím najmä pri zachytávaní CTC na povrchu vybraných častí mikrofluidických zariadení alebo pri tvorbe agregátov červených krviniek.

Z dôvodu zníženia výpočtovej náročnosti prebieha pred samotnou aplikáciou interakčných síl algoritmus detekcie kolízie implementovaný medzi všetky páry existujúcich objektov v danej simulácii. V prvom kroku algoritmu sa objekty "uzavrú" do priestorových boxov a najskôr sa iba skontroluje, či sa tieto objekty dostali do vzájomného kontaktu. Iba pre tie páry zapuzdrených objektov, ktoré sú dostatočne blízko, sa potom skutočné hranice objektov používajú na kontrolu toho, či skutočne došlo ku kolízii. Na rozdiel od elastických síl, *soft-sphere* aj *membrane-collision* nepôsobia stále, ale začnú pôsobiť až od určitej vzdialenosti povrchových bodov, preto sa označujú ako neviazané interakcie (z angl. non-bonded).

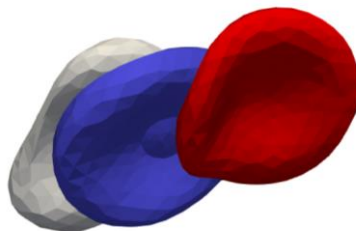
Interakcie typu *soft-sphere*

V našom výpočtovom modeli sa interakcia objekt-objekt transformuje do sústavy interakcií častica-častica, kde častice sú všetky povrchové body siete daných objektov. Keď sa častice dvoch rôznych objektov dostanú dostatočne blízko, začnú na ne pôsobiť odpudivé sily. Potenciál odpudivej sily typu *soft-sphere* popisuje rovnica:

$$V(d) = a \cdot d^{-n} \begin{cases} \text{pre } d < d_{cut} \\ \text{pre } d > d_{cut}, V(d) = 0 \end{cases} \quad (2.22)$$

kde d je vzdialenosť medzi časticou a bodom hranice, d_{cut} je hranica, pri ktorej sila začne pôsobiť (pre väčšie vzdialenosti nie je na častice aplikovaná žiadna odpudivá sila), a je škálovací parameter a n (typicky väčší ako 1) určuje ako "prudko" sa udeje odozva keď sa k sebe častica a bod približujú.

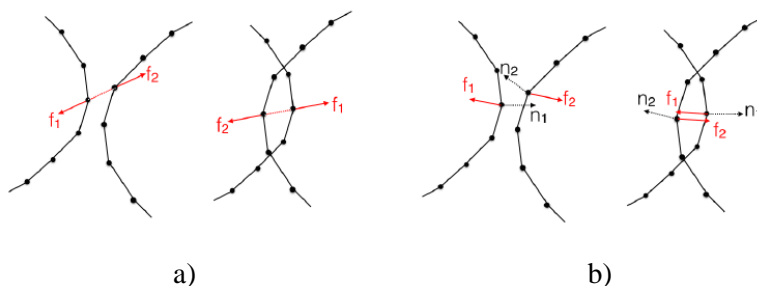
Odpudivá sila typu *soft-sphere* **zabezpečuje interakciu medzi bunkou a prekážkou**, resp. stenou kanála. V určitých prípadoch dochádza v simuláciách k prekrytiu membrány jednej a tej istej bunky (Obr. 2.15). Na elimináciu tohto neželaného stavu sme zaviedli *soft-sphere* odpudivý potenciál aj **medzi jednotlivé povrchové uzly jednej bunky** (ďalej označované tiež ako self-cell interakcia). Odpudivé sily nepôsobia medzi susednými uzlami, aby nedochádzalo k ich vzájomnému odtlačaniu a teda k deformáciám povrchovej membrány.



Obr. 2.15: Ukážky prekryvania povrchovej membrány jednej a tej istej bunky.

Interakcie typu *membrane-collision*

Nevýhodou potenciálu *soft-sphere* je to, že v prípade, kedy už došlo k prekrytiu dvoch objektov, namiesto toho, aby sa napravilo toto nefyzikálne správanie a objekty sa navzájom odtlačili, tento potenciál ich zasunie do seba ešte viac. Na odstránenie tohto problému sme implementovali do prostredia ESPResSo nový typ odpudivého potenciálu tzv. *membrane-collision*. Porovnanie pôsobenia týchto dvoch typov odpudivosti je zobrazené na Obr. 2.16.



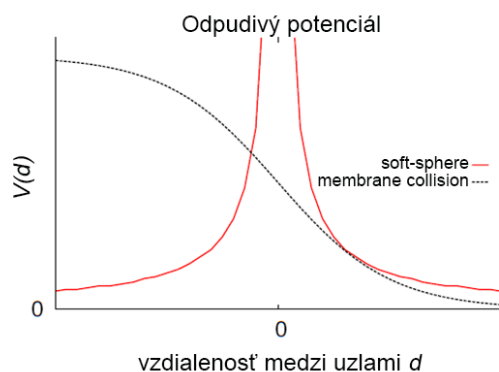
Obr. 2.16: 2D ilustrácia dvoch typov odpudzovania. a) odpudivý potenciál *soft-sphere*, b) odpudivý potenciál *membrane-collision*. (zdroj [5])

Membrane-collision je podobný interakcii typu *soft-sphere*, ale zohľadňuje nielen vzdialenosť dvoch bodov, ale aj normálové vektory na povrchu zodpovedajúcich objektov v týchto dvoch bodoch. Na základe týchto normálových vektorov sa určí, či sa obe membrány navzájom pretli alebo nie, a aplikujú sa odpudivé sily v správnom smere (Obr. 2.16 (b)).

Odpudivé sily typu *membrane-collision* používame pre interakciu bunka-bunka a ich potenciál je popísaný nasledujúcou rovnicou:

$$V(d) = a \cdot \frac{1}{1+e^{nd}} \begin{cases} \text{pre } d < d_{cut} \\ \text{pre } d > d_{cut}, V(d) = 0 \end{cases} \quad (2.23)$$

kde d je opäť vzdialenosť medzi dvomi časticami, d_{cut} je hranica, pri ktorej sila začne pôsobiť, a je škálovací parameter a n určuje ako "prudko" sa udeje odozva, keď sa k sebe častice približujú.



Obr. 2.17: Dva typy odpudivého potenciálu pre interakciu objekt-objekt. (zdroj [5])

Proces kalibrácie medzibunkových interakcií je súčasťou predloženej dizertačnej práce. Popis kalibrácie a výsledky sú uvedené v Kap. 3.

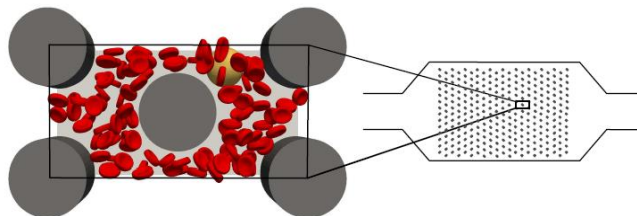
2.4. Výzvy a limity výpočtového modelu

Simulácia priebehu reálneho deja vyžaduje využitie rozsiahlych výpočtov na veľkých počítačoch, alebo ich skupinách (grid, cloud). V simuláciách sa v každom simulačnom kroku vyhodnocuje pohyb kvapaliny a buniek ako aj všetky typy interakcií. Okrem hardverového vybavenia a vhodne zvolenej paralelizácie výpočtov, je možné časovú náročnosť simulácií ovplyvňovať aj určitým zjednodušením modelu, či optimalizáciou algoritmov. V tomto koncepte zjednodušenie modelu predstavuje zníženie počtu výpočtových uzlov. Napríklad znížením počtu povrchových uzlov RBC membrány, najmä pri vyšších hematokritoch, kedy je tento vplyv markantnejší, môže viesť k významnému zníženiu výpočtovej náročnosti. Preto je stále aktuálnou otázkou v našom výskume hľadanie optimálnej miery medzi zložitou modelom, kvôli vernému popisu reálneho deja a medzi jeho zjednodušením, kvôli limitom počítačového spracovania.

V softvéri ESPResSO je možné simulovať periodické vlastnosti vo všetkých troch smeroch, čo umožňuje simulovať relatívne malé simulačné boxy namiesto celého mikrokanála. Vo všeobecnosti v simulačnom boxe s rozmermi $\text{box}_x \times \text{box}_y \times \text{box}_z$ bez stien kanála, platia pre rýchlosť \mathbf{v} nasledujúce podmienky

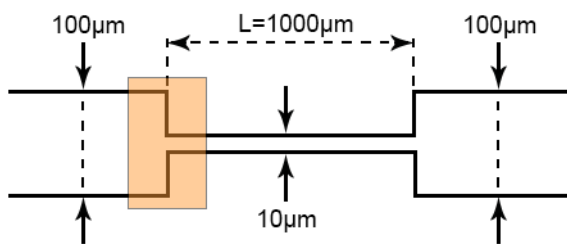
$$\begin{aligned} \mathbf{v}(0, y, z) &= \mathbf{v}(\text{box}_x, y, z) & \forall y, z \\ \mathbf{v}(x, 0, z) &= \mathbf{v}(x, \text{box}_y, z) & \forall x, z \\ \mathbf{v}(x, y, 0) &= \mathbf{v}(x, y, \text{box}_z) & \forall x, y \end{aligned} \quad (2.24)$$

Aplikovanie periodických okrajových podmienok môže byť na jednej strane výhodné, inokedy zase obmedzujúce. Nesporné výhody prinášajú pre mikrokanály s periodickým poľom prekážok [20, 21], alebo priame mikrokanály bez prekážok [22, 23]. V takýchto prípadoch je možné simulovať len vybranú periodicky sa opakujúcu časť mikrofluidického kanála (Obr. 2.18), čo predstavuje významné zníženie výpočtovej náročnosti.



Obr. 2.18: Ukážka periodického poľa prekážok v mikrofluidickom zariadení (zdroj [20]).

Iná situácia je v prípade kanálov s členitou geometriou alebo v prípadoch kanálov s veľkými rozmermi, pri ktorých je rozdelenie mikrokanála na menšie výpočtové boxy nežiadúce vzhľadom na výskumný záměr. Napríklad kanály podobnej geometrie aká je znázornená na Obr. 2.19 sú určené na analýzu vplyvu zúženia na hrúbku bezbunkovej vrstvy. Ak by sme chceli nasimulovať takýto kanál za rovnakým účelom bolo by potrebné simulovať dostatočne dlhý kanál pred zúžením na dosiahnutie úplnej CFL. Podľa [24] sa dá odhadnúť dĺžka kanála (L), ktorá je potrebná na úplný rozvoj bezbunkovej vrstvy, podľa vzťahu $L = 25D$, kde D je priemer kanála. Simulácia takejto geometrie by bola výpočtovo príliš náročná. Tento typ geometrie je možné využiť aj na zisťovanie deformovateľnosti RBC, kedy sa z videozáznamu získavajú rozmery RBC po vstupe do zúženej časti kanála. Pre tento účel by v simulačnom experimente stačilo nasimulovať len vstup do zúženia (zvýraznená časť).



Obr. 2.19: Príklad geometrie kanála určeného na skúmanie vplyvu zúženia na hrúbku CFL alebo deformovateľnosti RBC. (podľa [25])

2.5. Simulácie hustých suspenzií

Analýza zložitých biologických systémov si vyžaduje veľké simulácie, pretože biologické experimenty zvyčajne merajú makroskopické charakteristiky mnohobunkových systémov. Napriek svojmu biomedicínskeho významu nebolo zatiaľ úplne objasnené kolektívne šírenie červených krviniek v mikrokanáli [26]. Medzi hromadné vlastnosti krviniek, ktoré sú stále aktuálne z biomedicínskeho hľadiska a zároveň vhodné pre validáciu výpočtového modelu patrí napríklad bezbunková vrstva alebo difúzne správanie buniek v mikrokanáli.

Bezbunková vrstva (CFL) sa zvyčajne vytvára v blízkosti cievnych stien v dôsledku migrácie červených krviniek do stredu mikrokanálu. Bola tiež pozorovaná v strednej línii kanála po sútoku dvoch mikrokanálov [27]. V [28] bolo prezentované nové kontinuálne mikrofluidické zariadenie na čiastočnú extrakciu červených krviniek s využitím efektu náhleho zúženia kanála, ktorý

zvyšuje hrúbku CFL. V [29] za účelom lepšieho pochopenia blokácie prietoku krvi autori skúmajú, ako môžu plynové bubliny (embólie) v mikrocievach ovplyvniť distribúciu červených krviniek v toku a ako interagujú s CFL.

Štúdia [30] si dáva za cieľ, prostredníctvom kvantifikovania a charakterizovania agregátov RBC, zvýšiť súčasné pochopenie mechanizmu tvorby týchto agregátov. Boli kvantifikované účinky hematokritu, šmykovej rýchlosti, viskozity a teploty na veľkosti vytvorených agregátov RBC použitím mikrofluidickej technológie spolu s vysokorýchlostnou kamerou na vizualizáciu toku.

V [26] bol analyzovaný difúzny pohyb vyvolaný hlavne interakciami medzi bunkami. Skúmala sa koncentrácia buniek v určitej pozícii naprieč šírkou mikrokanála Y-ového tvaru, pričom červené krvinky boli distribuované z jednej časti mikrokanála a z druhej prúdila čistá plazma.

Aj napriek tomu, že vedeckých štúdií z oblasti analýzy toku krvi je pomerne veľké množstvo, je len málo takých, ktoré poskytujú všetky potrebné informácie k rekonštrukcii experimentu výpočtovým modelom. Pre náš výskum sú však prínosné aj výpočtové simulácie toku červených krviniek iných výskumných tímov. Modely sa líšia vzhľadom na cieľ, ktorý chcú dosiahnuť a jav, ktorý chcú zachytiť. Sú dostupné in-silico experimenty zamerané na validáciu elastických vlastností modelu RBC [31, 32], na validáciu viskoelastického správania modelu RBC v šmykovom toku [33, 34] a podobne. Validácia hromadného správania modelov RBC je zriedkavejšia.

Rozsiahlu simuláciu realizovali v [35], kde bol simulovaný transport a agregácia 13 000 RBC pomocou metódy diskretných prvkov, počas ktorých boli červené krvinky modelované ako tuhé elipsoidné častice so zanedbateľnou deformovateľnosťou. Ešte rozsiahlejšia simulácia bola prezentovaná v [36], v ktorej sa použilo veľké množstvo červených krviniek (viac ako 100 000 RBC), ale bunky boli reprezentované elipsoidmi bez vzájomnej agregácie.

V článku [37] je predstavený výpočtový model, v ktorom je krv modelovaná ako suspenzia červených krviniek s použitím metódy disipatívnej dynamiky častíc. V in-silico experimentoch boli skúmané kvantitatívne charakteristiky bezbunkovej vrstvy v závislosti od hematokritu. V článku [38], od rovnakého autorského kolektívu, skúmajú proces agregácie viacerých červených krviniek a predpokladaných krvných reologických vlastností.

V článku [39] bola vykonaná simulácia krvnej suspenzie s hematokritom až 45% (49 152 RBC), čo predstavuje hodnotu neriedenej krvi, v šmykovom toku pri rôznych rýchlostiach. V štúdií skúmali a porovnávali s biologickými výsledkami makroskopické charakteristiky ako agregácia buniek, natočenie buniek v šmykovom toku ako aj bezbunkovú vrstvu. Uvedená je aj závislosť týchto charakteristík od rýchlosti toku.

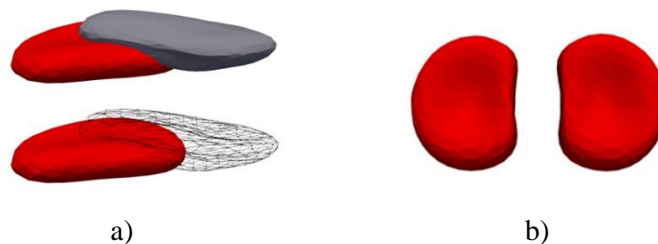
V článku [40] sa okrem červených krviniek simulujú aj náhodne umiestnené malé nedeformovateľné guľôčky s priemerom 4 μm , ktoré reprezentujú krvou transportované mikročastice. Analýzou ich rozloženia v priestore (v priereze kanála) v priebehu a na konci simulácie a ich radiálnej rýchlosti boli skúmané transportné vlastnosti krvného toku so 40% hematokritom.

3. Kalibrácia interakcií medzi bunkami

Po úvodnom predstavení si problematiky medzibunkových interakcií (Kap. 3.1) pristúpime ku samotnej kalibrácii. Prvým krokom pri analýze týchto interakcií bol návrh a implementácia algoritmu detekcie prekrytia buniek, ktorý je popísaný v Kap. 3.2.4. V ďalších podkapitolách sú uvedené vstupné parametre a podmienky kalibračného experimentu ako aj získané výsledky. V Kap. 3.6 sú diskutované simulačné parametre, ktoré ovplyvňujú medzibunkové interakcie a citlivosť zvolenej sady *membrane-collision* parametrov na tieto vplyvy.

3.1. Úvod do problematiky medzibunkových interakcií

Krv je hustá suspenzia, v ktorej dochádza často k interakciám medzi bunkami, preto je pre správne fungovanie výpočtového modelu potrebné venovať im náležitú pozornosť a zabezpečiť ich korektné správanie. Je zrejmé, že sa bunky v reálnom prostredí navzájom neprekrývajú. Ide teda o samozrejmu požiadavku na výpočtový model. V simuláciách k takejto situácii môže dôjsť, napríklad v prípade, kedy kvôli väčšiemu simulačnému kroku prejdú povrchové častice jednej bunky cez membránu susednej bunky skôr, než mal odpudivý potenciál možnosť odkloniť trajektóriu častíc. Ďalším príkladom nefyziologického správania buniek je ich interakcia na príliš veľkú vzdialenosť, ku ktorej by v reálnom prostredí nedošlo. Príklady nefyziologického správania buniek v simulačnom modeli sú ilustrované na Obr. 3.1.



Obr. 3.1: Príklady nefyziologického správania červených krviniek. a) Prekrytie buniek b) Interakcia buniek na príliš veľkú vzdialenosť

Pre interakcie medzi bunkami používame v našom modeli odpudivé sily typu *membrane-collision* popísané v Kap. 2.1.3, ktorých potenciál je daný rovnicou (2.4). Kalibrovat' interakcie znamená nájsť takú sadu hodnôt parametrov a , n a d_{cut} (ďalej označované ako MC parametre), pri ktorej modelované bunky vykazujú fyziologické správanie. Keďže správanie buniek

v simuláciách je úzko prepojené aj s ostatnými vstupnými parametrami, je tiež potrebné určiť nakoľko sú získané hodnoty MC parametrov citlivé na zmenu simulačných podmienok ako napríklad rýchlosť tekutiny, LB-grid, simulačný krok a podobne.

3.2. Návrh kalibračného postupu

Neprekryvanie buniek je kvalitatívna požiadavka na výpočtový model, ktorá sa len ťažko kvantifikuje. Cieľom je vytvoriť kalibračný proces, pomocou ktorého bude možné spoľahlivo určiť resp. overiť správne nastavenie MC parametrov pre konkrétne požadované podmienky.

Pri navrhovaní kalibračného procesu sme sa zaoberali otázkami:

- Ako nadizajnovať simulačný box, aby k interakcii dvoch buniek došlo čo v najkratšom čase a s dostatočným kontaktom?
- V akom rozsahu majú byť testované MC parametre?
- Akým spôsobom spúšťať a vyhodnocovať veľké množstvo simulácií?
- Akým spôsobom detegovať, či došlo k prekrytiu bunkových membrán?
- Akým spôsobom verifikovať funkčnosť zistených MC parametrov pri odlišných podmienkach vzájomného kontaktu?
- Ktoré zo simulačných parametrov majú vplyv na medzibunkové interakcie?
- V akom rozsahu základných simulačných nastavení zabezpečujú zistené hodnoty MC parametrov svoju funkčnosť?

V nasledujúcich podkapitolách si rozoberieme požiadavky kladené na kalibračný proces a na ich základe navrhujeme potrebné simulačné a verifikačné experimenty. Popri návrhu budeme uvádzať aj konkrétne hodnoty pre kalibráciu medzibunkových interakcií za štandardných podmienok. Za štandardné podmienky považujeme typicky používaný model červenej krvinky, simulačných nastavení a nastavenie fyzikálnych veličín v rozsahu bežných laboratórnych podmienok.

3.2.1. Štandardné podmienky

V našom výskume často používame pre reprezentovanie červenej krvinky model s 374 povrchovými uzlami, ktorý v mnohých simulačných úlohách predstavuje dobrý kompromis medzi dostatočne podrobným popisom reálnej RBC a výpočtovou náročnosťou. V Tab. 3.1 sú uvedené hodnoty elastických koeficientov získané z kalibrácie elastických vlastností RBC a zodpovedajú zdravej dobre deformovateľnej RBC. Hodnoty sú uvedené v jednotkách LB a zodpovedajúcim jednotkám SI sústavy. Na jednotlivé povrchové uzly bunky je aplikovaná *self-cell* interakcia s hodnotami parametrov $self_a = 0.0001$, $self_n = 1.2$ a $self_cut = 0.5$. V Tab. 3.2 sú zosumarizované numerické parametre tekutiny. Hodnoty hustoty a kinematickej viskozity zodpovedajú hodnotám krvnej plazmy pri 20 °C.

Tab. 3.1: Numerické parametre bunky.

PARAMETRE	LB JEDNOTKY	SI JEDNOTKY
rozmer bunky	$7.82 \times 7.82 \times 2.58$ Lm	$(7.82 \times 7.82 \times 2.58) \cdot 10^{-6}$ m
koef. pružnosti (k_s)	0.005 LN/Lm	$5 \cdot 10^{-6}$ N/m
koef. ohybu (k_b)	0.006 LNLm	$6 \cdot 10^{-18}$ Nm
koef. zachovania lokálnej plochy (k_{al})	0.02 LN/Lm	$2 \cdot 10^{-5}$ N/m
koef. zachovania celkovej plochy (k_{ag})	0.7 LN/Lm	$7 \cdot 10^{-4}$ N/m
koef. zachovania objemu (k_v)	0.9 LN/Lm ²	900 N/m ²
Viskozita bunkovej membrány	0 Lm ² /Ls	0 m ² /s

Tab. 3.2: Numerické parametre tekutiny.

PARAMETER	LB JEDNOTKY	SI JEDNOTKY
Diskretizácia kvapaliny (LB-grid)	1 Lm	$1 \cdot 10^{-6}$ m
Hustota	1.025 Lkg/Lm ³	$1.025 \cdot 10^3$ kg/m ³
Kinematická viskozita	1.3 Lm ² /Ls	$1.3 \cdot 10^{-6}$ m ² /s
Koeficient prenosu síl (ζ)	1.41 [nNs/m]	1.41 [-]

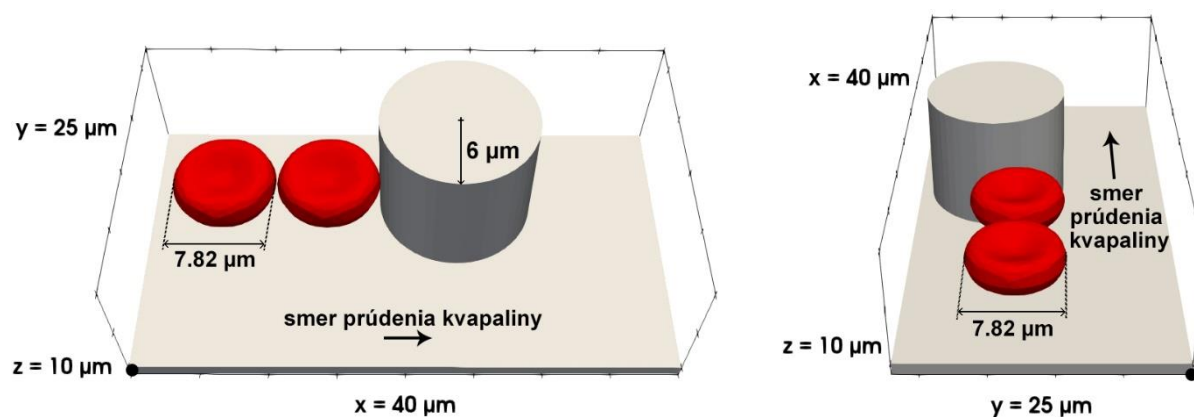
Koeficient prenosu síl ζ , ktorý zabezpečuje prepojenie prúdiacej kvapaliny a červených krviniek, je v závislosti od fyzikálnych vlastností kvapaliny a geometrie RBC nastavený na hodnotu získanú z jeho kalibrácie [18].

3.2.2. Návrh kalibračného experimentu

Na rozdiel od kalibrácie elastických vlastností bunky, ktorá bola realizovaná na základe biologických experimentov [41, 42], pre kalibráciu medzibunkových interakcií je potrebné navrhnúť vlastný in-silico experiment. Kalibračný box by mal byť malých rozmerov, aby počet výpočtových uzlov nebol zbytočne veľký, čo by predstavovalo zvýšenie výpočtového času. Ďalej je potrebné zabezpečiť požiadavku, aby bunky spolu interagovali v čo najkratšom čase a zároveň, aby ich kontakt bol dostatočne intenzívny.

Na základe požiadaviek kladených na efektívnu kalibráciu sme navrhli kalibračný experiment jednoduchej geometrie. Simulačný box má tvar kvádra s rozmermi $40 \times 25 \times 10 \mu\text{m}$ (dĺžka \times šírka \times výška) a zo spodnej strany je ohraničený stenou. Do simulačného boxu boli umiestnené dve bunky so súradnicami svojich centier v μm [14.2, 13.0, 5.0], [6.2, 13.0, 5.0] a s rovnakým počiatočným natočením ako je to znázornené na Obr. 3.2. Aby boli bunky nútené spolu interagovať v čo najkratšom čase, bola tesne pred nimi umiestnená cylindrická prekážka s priemerom $12 \mu\text{m}$.

Kvapalina prúdila v smere osi x a bola uvedená do pohybu externou silou s hodnotou $\text{fluid_force} = 0.0005$, čo zodpovedá maximálnej rýchlosti $0,0079 \text{ m/s}$ (na bočných stranách prekážky v smere jej prúdenia).



Obr. 3.2: Geometria simulačného boxu kalibračného experimentu.

Interakcie medzi bunkami a prekážkou boli modelované odpudivým potenciálom *soft-sphere* s parametrami $\text{soft}_a = 0.0001$, $\text{soft}_n = 1.2$ a $\text{soft}_{cut} = 0.1$. Simulačný krok bol $0.05 \mu\text{s}$ a každých 100 krokov boli výstupné dáta zaznamenávané.

3.2.3. Rozsah testovaných MC parametrov

Doteraz sa pri viacbunkových simuláciách nastavovali MC parametre určitým rozumným spôsobom bez ich bližšieho skúmania. Na základe doterajších skúseností ako aj z požiadaviek na vzájomné správanie buniek, vplynuli hodnoty kalibrovaných MC parametrov, ktoré sme v jednotlivých kalibračných simuláciách nastavovali. S ohľadom na prirodzenú požiadavku, aby bunky medzi sebou interagovali na čo najmenšiu vzdialenosť, pre parameter d_{cut} (vzdialenosť dvoch buniek, pri ktorej začne pôsobiť odpudivý potenciál) boli skúmané hodnoty v rozmedzí 0.1 - 0.5 a na základe získaných výsledkov boli podrobnejšie preskúmané hodnoty medzi 0.3 - 0.4 s diferenciou 0.01. Pre parameter n (strmosť odozvy, teda ako rýchlo sa odozva udeje) a parameter a (maximálna veľkosť odozvy) boli skúmané hodnoty v širokom rozsahu, ktoré pokrývajú aj limitné prípady, vrátane príliš silných interakcií, pri ktorých sa simulácie stávajú numericky nestabilné. Prehľad testovaných hodnôt je uvedený v Tab. 3.3, pričom boli testované všetky kombinácie týchto hodnôt, čo predstavuje 5876 kalibračných simulácií.

Tab. 3.3: Testované hodnoty MC parametrov.

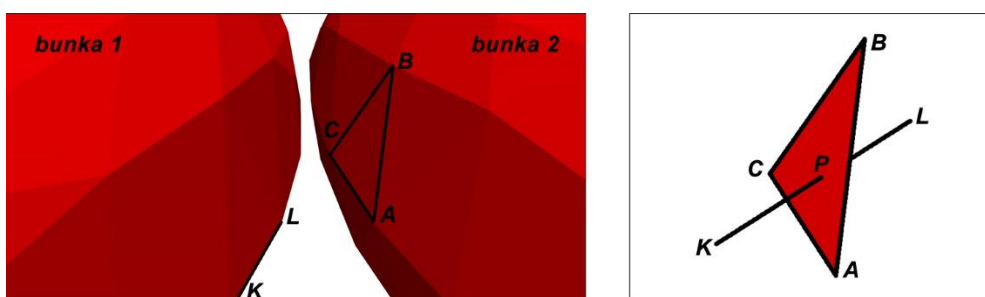
Parameter	Interval	Diferencia
a	0.0001 - 0.0009	0.00001
	0.001 - 0.009	0.0001
	0.01 - 0.09	0.001
	0.1 - 0.9	0.01
	0.1 - 1.0	0.1
	1.0 - 10.0	1.0
n	0.0 - 2.0	0.1
	2.0 - 10.0	1.0
d_{cut}	0.1 - 0.5	0.1
	0.3 - 0.4	0.01

Pre efektívne spúšťanie a spracovanie takehoto množstva simulácií bol navrhnutý systém dávkového spúšťania simulácií a výsledky sa zaznamenávali do prehľadných tabuliek.

Pri overovaní MC parametrov pre potreby simulácií s neštandardnými nastaveniami je postačujúce spustiť kalibračný experiment s vybranou sadou resp. niekoľko málo kalibračných experimentov v úzkom rozsahu MC parametrov.

3.2.4. Detekcia prekrytia buniek

Na detekciu prekrytia buniek musíme vyhodnotiť vzájomnú polohu medzi každou hranou povrchovej siete danej bunky a každým trojuholníkom povrchovej siete susednej bunky.



Obr. 3.3: Detekcia prekrytia buniek

Algoritmus detekcie prekrytia trojuholníka ABC a hrany \overline{KL} môžeme rozdeliť do nasledujúcich štyroch krokov. Vstup do algoritmu predstavuje trojuholník vybraný zo zoznamu trojuholníkov povrchovej siete prvej bunky a hrana je vybraná zo zoznamu hrán druhej bunky.

1. krok

Určíme analytické vyjadrenie roviny $\rho(\cdot)$, v ktorej leží trojuholník ABC . Pre ľubovoľný bod $X = [x, y, z]$, ktorý leží v rovine $\rho(\cdot)$ platí

$$\rho(X) = ax + by + cz + d = 0, \quad (3.1)$$

Bázu tejto roviny tvoria vektory napríklad $\mathbf{u} = \overrightarrow{AB}$ a $\mathbf{v} = \overrightarrow{AC}$. Koefficienty a, b, c určujú normálový vektor roviny $\rho(\cdot)$, označíme ho $\mathbf{w} = [a, b, c]$. Normálový vektor je kolmý na bázičné vektory \mathbf{u} a \mathbf{v} . Keďže nezáleží na veľkosti normálového vektora, môžeme ho vypočítať pomocou vektorového súčinu bázičných vektorov roviny

$$\mathbf{w} = \mathbf{u} \times \mathbf{v} \Rightarrow a = u_2v_3 - u_3v_2, \quad b = u_3v_1 - u_1v_3, \quad c = u_1v_2 - u_2v_1. \quad (3.2)$$

Hodnotu parametra d určíme dosadením bodu $A = [a_1, a_2, a_3]$ do rovnice roviny:

$$\rho(A) = aa_1 + ba_2 + ca_3 + d = 0 \Rightarrow d = -(aa_1 + ba_2 + ca_3) \quad (3.3)$$

2. krok

Určíme polohu hrany \overline{KL} voči rovine trojuholníka $\rho(\cdot)$, v ktorej leží trojuholník ABC . Postupne do rovnice roviny (3.1) dosadíme okrajové body K a L . Získame tak hodnoty $\rho(K)$ a $\rho(L)$.

Ak $\rho(K) \cdot \rho(L) \geq 0$, obidva koncové body K a L ležia v tom istom polpriestore určenom rovinou $\rho(\cdot)$, a preto hrana \overline{KL} rovinu nepretína, maximálne sa jej dotýka ($\rho(K) \cdot \rho(L) = 0$). V takomto prípade sa algoritmus ukončí a prevedie sa výber nových vstupných údajov.

Ak $\rho(K) \cdot \rho(L) < 0$, koncové body K a L ležia v opačných polpriestoroch určených rovinou $\rho(\cdot)$. V takomto prípade hrana \overline{KL} pretína rovinu $\rho(\cdot)$.

Ďalším krokom bude nájdenie ich spoločného priesečníka.

3.krok

Pre výpočet priesečníka hrany \overline{KL} a roviny ρ najprv určíme parametrické vyjadrenie priamky $p(\cdot)$, ktorá prechádza bodmi K a L . Pre ľubovoľný bod $X = [x, y, z]$, ktorý leží na priamke $p(\cdot)$ platí

$$X = K + t \cdot s, \quad s = L - K = [s_1, s_2, s_3], \quad t \in R \quad (3.4)$$

Dostávame parametrické vyjadrenie súradníc všetkých bodov $X = [x, y, z]$ ležiacich na priamke $p(\cdot)$:

$$x = k_1 + ts_1, \quad y = k_2 + ts_2, \quad z = k_3 + ts_3 \Rightarrow t = \frac{x-k_1}{s_1} = \frac{y-k_2}{s_2} = \frac{z-k_3}{s_3} \quad (3.5)$$

Hodnotu parametra $t = t_p$ získame dosadením do rovnice roviny (3.1):

$$\begin{aligned} \rho(X) = 0 &\Rightarrow a(k_1 + ts_1) + b(k_2 + ts_2) + c(k_3 + ts_3) + d = 0 \Rightarrow \\ &\Rightarrow t_p = -\frac{ak_1 + bk_2 + ck_3 + d}{as_1 + bs_2 + cs_3} \end{aligned} \quad (3.6)$$

Získali sme súradnice priesečníka hrany a roviny:

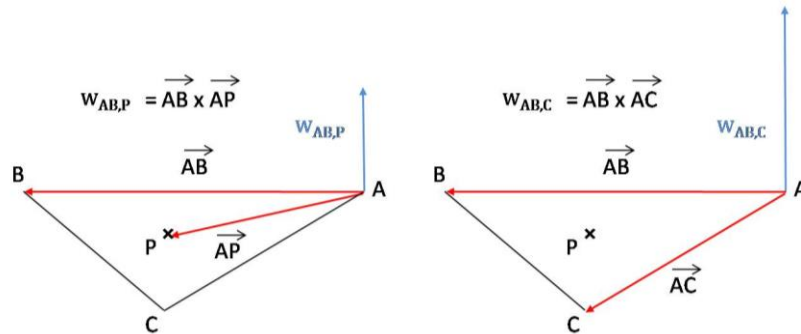
$$P = [p_1, p_2, p_3] = [k_1 + t_p s_1, k_2 + t_p s_2, k_3 + t_p s_3] \quad (3.7)$$

4.krok

Posledný krok je overiť, či priesečník hrany \overline{KL} a roviny ρ leží vo vnútri trojuholníka ABC . Použijeme tzv. *pravidlo pravej ruky*. V trojuholníku ABC vyberieme ľubovoľný vrchol napríklad A a k nemu zostrojíme dvojicu vektorov \overrightarrow{AB} a \overrightarrow{AP} . Pomocou vektorového súčinu určíme ich normálový vektor $w_{AB,P}$ a tiež vypočítame normálový vektor $w_{AB,C}$ pre rovinu s bázou \overrightarrow{AB} a \overrightarrow{AC} .

$$w_{AB,P} = \overrightarrow{AB} \times \overrightarrow{AP}, \quad w_{AB,C} = \overrightarrow{AB} \times \overrightarrow{AC} \quad (3.8)$$

Geometrické znázornenie určenia normálových vektorov $w_{AB,P}$ a $w_{AB,C}$ v prípade, že bod P leží v trojuholníku ABC je na Obr. 3.3:



Obr. 3.4: Určenie normálových vektorov $w_{AB,P}$ a $w_{AB,C}$.

Nutnou podmienkou, aby bod P ležal v trojuholníku ABC je, aby obidva normálové vektory mali rovnaký smer. Na detekciu smeru normálových vektorov použijeme skalárny súčin. Pre vektory napríklad u a v má:

$$\langle u, v \rangle = u \cdot v^T = \|u\| \cdot \|v\| \cdot \cos(\alpha), \quad (3.9)$$

pričom $\|u\|$ a $\|v\|$ sú veľkosti vektorov a α je uhol, ktorý zvierajú.

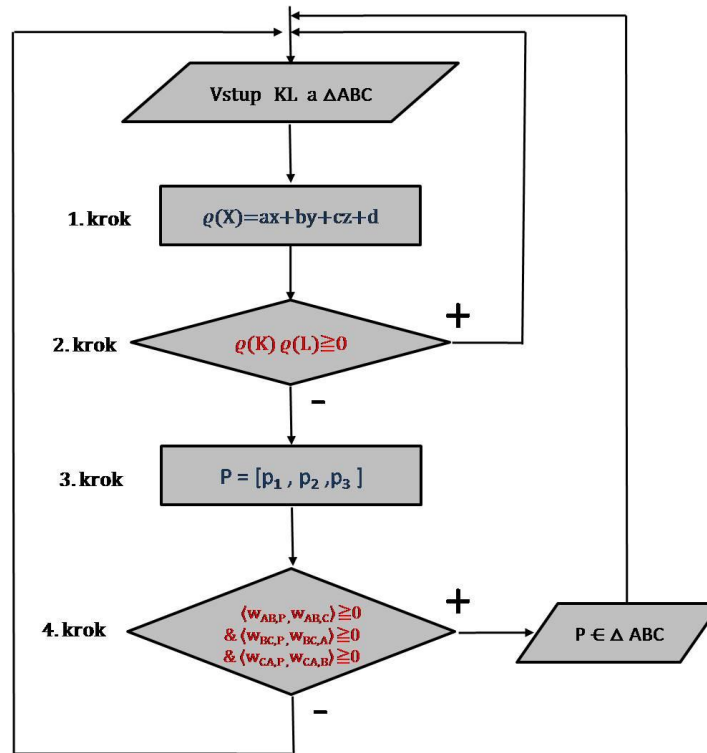
Ak normálové vektory, ktoré sú navzájom rovnobežné, majú rovnaký smer, potom uhol medzi nimi je $\alpha = 0$ a ich skalárny súčin je nezáporný.

$$P \in \triangle ABC \Rightarrow \langle w_{AB,P}, w_{AB,C} \rangle = w_{AB,P} \cdot w_{AB,C}^T \geq 0 \quad (3.10)$$

Rovnaké nutné podmienky získame pri výbere ďalších vrcholov B a C . V prípade, že všetky uvažované dvojice normálových vektorov majú rovnaký smer, získali sme postačujúcu podmienku pre overenie, že priesečník P leží v trojuholníku ABC .

$$\left. \begin{aligned} \langle w_{AB,P}, w_{AB,C} \rangle = w_{AB,P} \cdot w_{AB,C}^T \geq 0 \\ \langle w_{BC,P}, w_{BC,A} \rangle = w_{BC,P} \cdot w_{BC,A}^T \geq 0 \\ \langle w_{CA,P}, w_{CA,B} \rangle = w_{CA,P} \cdot w_{CA,B}^T \geq 0 \end{aligned} \right\} \Rightarrow P \in \Delta ABC \quad (3.11)$$

V prípade pozitívneho vyhodnotenia nastalo prekrytie povrchových membrán uvažovanými bunkami. Algoritmus je znázornený schématicky na Obr. 3.5.



Obr. 3.5: Algoritmus na detekciu prekrytia trojuholníka a hrany

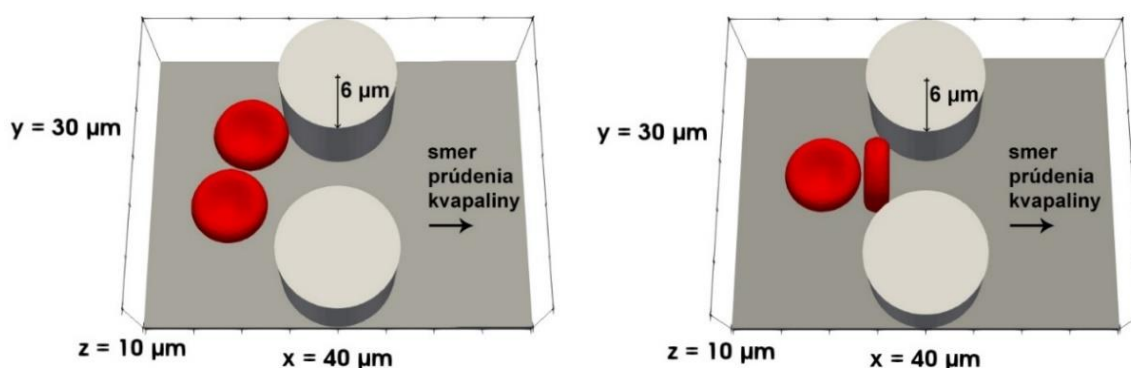
3.2.5. Návrh verifikačných experimentov

Cieľom verifikačných experimentov je otestovať vybranú sadu MC parametrov pri rovnakých simulačných podmienkach aké boli nastavené v kalibračných simuláciách, pričom bunky budú pri vzájomnej interakcii vystavené odlišným okolnostiam. Uvažujme dve kritické situácie, v ktorých dochádza k intenzívnemu kontaktu buniek. Prvou je tok krvi cez časti mikrofluidického zariadenia, ktoré tvoria prekážku v toku, čím menia jeho lokálne nastavenia ako šmykové napätie, rýchlosť a smer kvapaliny. Takýmito časťami môžu byť vnorené prekážky alebo zúženia kanála. Bunky pred prekážkou alebo pri vstupe do úzkej štrbiny sú v závislosti od rýchlosti kvapaliny vystavené vzájomnému tlaku s obmedzenými priestorovými možnosťami.

Trochu iná situácia je v prípade simulácií hustých suspenzií, teda suspenzií s $Hct \geq 15\%$, kedy už nie je možné zanedbávať viac než dvoj-bunkové interakcie (na rozdiel od zriedených alebo semi-zriedených suspenzií). Bunky sú nútené k vzájomnej interakcii vplyvom šmykového toku.

Geometria (A) - interakcia buniek pred vstupom do úzkeho priestoru

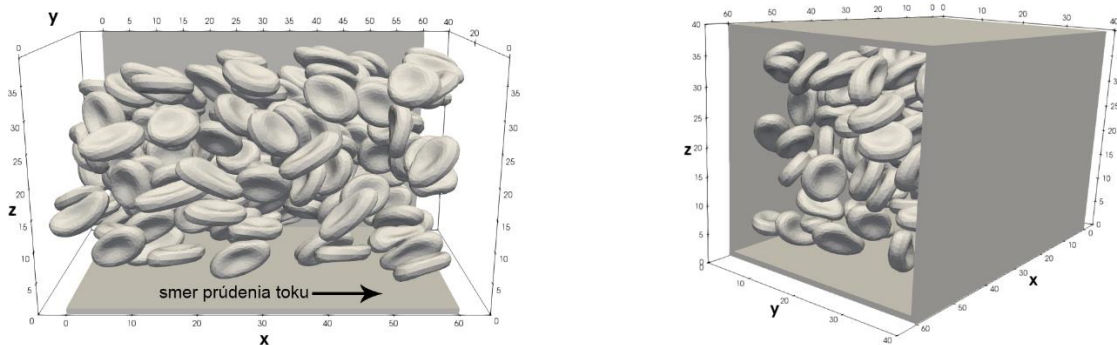
V simulačnom boxe (A) sú bunky "nútené" k bližšiemu kontaktu prechodom cez užší priestor. Za týmto účelom bola do simulácie pridaná druhá prekážka. Geometria simulačného boxu (A) je znázornená na Obr. 3.6. Bunky boli umiestnené v dvoch rôznych vzájomných pozíciách.



Obr. 3.6: Geometria simulačného boxu (A) pre rôzne počiatočné polohy buniek.

Geometria (B) - simulácia hustej suspenzie v priamom kanáli bez prekážok

Pri druhej verifikačnej simulácii (B) bolo do simulačného boxu kvádrového tvaru s rozmermi $60 \times 40 \times 40 \mu\text{m}$ umiestnených 159 buniek, čo predstavuje 15% hematokrit. Bolo realizovaných päť simulácií vždy s iným náhodným nasadením buniek. Mikrokanál bol uzavretý zo všetkých štyroch bočných strán a otvorený v smere prúdenia kvapaliny. V tomto smere bola aj zabezpečená periodickosť toku. Geometria simulačného boxu je znázornená na Obr. 3.7. Rýchlosť tekutiny bola 0.0055 m/s . Simulačný krok bol nastavený na hodnote $0.05 \mu\text{s}$ a každý 1000 krok sa zaznamenával. Vo všetkých simuláciách prešli bunky dĺžku kanála približne 3.5-krát.



Obr. 3.7: Geometria simulačného boxu (B) z dvoch rôznych pohľadov.

3.3. Výsledky a diskusia

V tejto časti prediskutujeme výsledky kalibrácie medzibunkových interakcií prebiehajúcich za štandardných podmienok. Cieľom je určiť konkrétnu sadu MC parametrov, ktorú budeme používať v ďalších simulačných experimentoch.

V priebehu všetkých kalibračných simulácií prebiehala v každom simulačnom kroku detekcia prekrytia, pri čom výsledok bol počet hrán povrchovej membrány bunky, ktoré pretli membránu druhej bunky v danom kroku. Na porovnanie vzájomnej interakcie buniek sme použili maximálny počet prekrížených hrán, ku ktorému došlo v priebehu celej simulácie. Hodnota 0 znamená, že počas simulácie nedošlo k žiadnemu prekrytiu. V Tab. 3.4 a 3.5 sú uvedené výsledky pre vybrané kombinácie MC parametrov.

Pre praktické využitie kalibrácie je potrebné vybrať jednu konkrétnu kombináciu MC parametrov, ktorú bude možné zadávať ako vstup medzibunkových interakcií do simulácií. Zatiaľ čo požiadavka, aby bunky začali medzi sebou interagovať až pri svojom tesnom priblížení (požiadavka na minimálnu hodnotu d_{cut}) je zrejماً, otázkou ostáva akou silou má odpudivý potenciál pôsobiť. Odpudivá sila má byť minimálna avšak dostatočne účinná, aby pri kolízii dvoch povrchových častíc dokázala zmeniť ich trajektóriu. Príliš veľký odpudivý potenciál môže spôsobiť neprirodzene veľké "odskočenie" jednej alebo viacerých povrchových častíc, čo predstavuje nefyziologické a teda neželané správanie buniek.

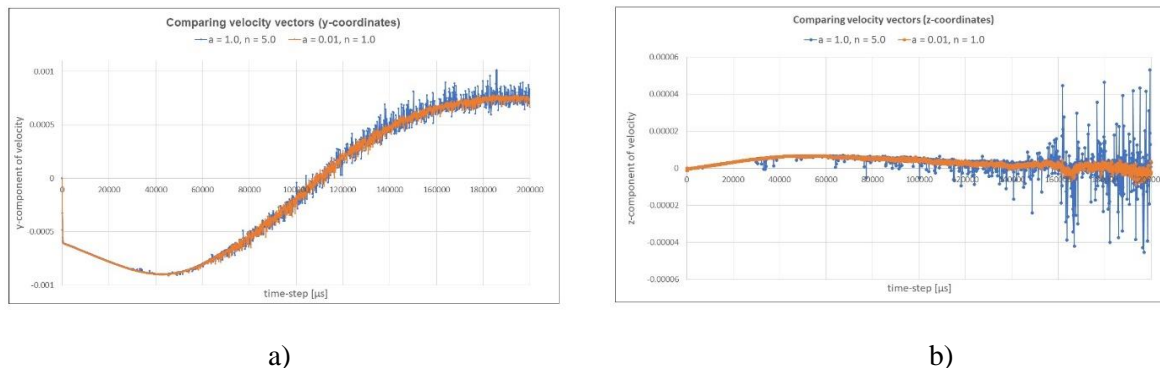
Tab. 3.4: Maximálny počet prekrížených hrán, ku ktorému došlo v priebehu simulácie pre vybrané parametre a , n a pre $d_{cut} = 0.39$.

		a									
		0.0004	0.0006	0.0008	0.001	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.02
n	1	16	4	6	8	8	6	6	6	6	6
	1.5	16	4	6	8	8	6	6	6	6	6
	2	16	6	4	6	8	6	6	6	6	6
	2.5	18	14	4	6	8	6	6	6	6	6
	3	22	16	6	4	8	6	6	6	6	6
	3.5	24	16	8	4	8	8	6	6	6	6
	4	26	16	16	8	8	8	6	6	6	6
	4.5	32	20	16	8	6	8	6	6	6	6
	5	34	26	16	16	6	8	6	6	6	6

 Tab. 3.5: Maximálny počet prekrížených hrán, ku ktorému došlo v priebehu simulácie pre vybrané parametre a , n a pre $d_{cut} = 0.4$

		a									
		0.0004	0.0006	0.0008	0.001	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.02
n	1	8	0	6	6	6	0	0	0	0	0
	1.5	14	0	6	6	6	0	0	0	0	0
	2	16	0	0	6	6	0	0	0	0	0
	2.5	18	6	0	0	6	6	0	0	0	0
	3	18	10	0	0	6	6	0	0	0	0
	3.5	22	14	2	0	6	6	0	0	0	0
	4	26	16	8	2	6	6	0	0	0	0
	4.5	28	18	14	2	6	6	0	0	0	0
	5	34	18	16	8	0	6	0	0	0	0

Na Obr. 3.8 sú zobrazené y-ové, z-ové zložky strednej rýchlosti RBC vypočítané ako priemer príslušných rýchlostných zložiek všetkých povrchových triangulačných uzlov. X-ová zložka neposkytuje signifikantný rozdiel. Obidva vektory zodpovedajú hodnote $d_{cut} = 0.4$, teda prípad kedy nedošlo ku prekrytiu. Zmenená bola veľkosť pôsobenia odpudivého potenciálu. V prvom prípade boli parametre nastavené na hodnotách $a = 0.01$, $n = 1.0$ (oranžová čiara) a v druhom prípade $a = 1.0$, $n = 5.0$ (modrá čiara). Z hodnôt vektorov je vidieť dôsledok pôsobenia nadmerne veľkej odpudivej sily, ktorá spôsobuje zväčšenie rozptylu dát.



Obr. 3.8: Porovnanie y-ovej a z-ovej zložky rýchlosti pre dve rôzne kombinácie MC parametrov: a) $a = 0.01, n = 1.0, d_{cut} = 0.4$ (oranžová krivka), b) $a = 1.0, n = 5.0, d_{cut} = 0.4$ (modrá krivka)

Na základe týchto požiadaviek sme ako optimálnu kombináciu MC parametrov vybrali hodnoty:

$$a = 0.01, n = 1.0, d_{cut} = 0.4.$$

Tieto hodnoty nepredstavujú univerzálnu sadu. Je potrebné si uvedomiť, že medzibunkové interakcie závisia od množstva rôznych faktorov. Okrem dôležitých parametrov každej simulácie ako sú LB-grid, simulačný krok alebo rýchlosť kvapaliny (diskutované v Kap. 3.4), závisia aj od veľkosti bunky, počtu uzlov na jej povrchu ako aj od jej elastických vlastností. Preto si pre každú novú simuláciu, púšťanú najmä s neštandardnými nastaveniami a pre nové geometrie kanálov, treba overiť, či sa bunky pri vzájomnom kontakte správajú očakávaným spôsobom.

Verifikačné experimenty

Verifikačné simulácie (A) medzibunkových interakcií dopadli pozitívne. Podľa očakávania vybraná sada MC parametrov zabezpečila požadované správanie buniek a nedochádzalo k prekrytiu povrchových membrán buniek.

V prípade verifikačných simulácií (B) sme okrem nakalibrovaných hodnôt MC parametrov spustili sériu simulácií s hodnotami parametra $d_{cut} = 0.1, 0.2$ a $0.3 \mu\text{m}$. Pri daných simulačných nastaveniach sme nezaznamenali prekrytie bunkových membrán ani pri hodnote $d_{cut} = 0.3 \mu\text{m}$. Nakalibrované MC parametre pre priame kanále bez prekážok predstavujú efektívne zabezpečenie medzibunkových interakcií, nie však najoptimálnejšie.

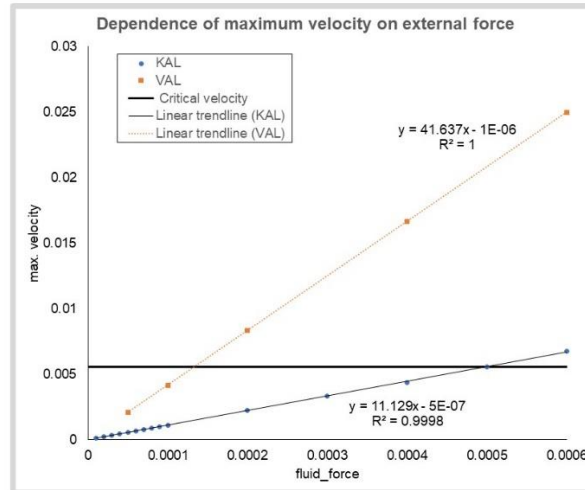
3.4. Vymedzenie platnej oblasti vybraných MC parametrov

V predchádzajúcej časti sme na základe kalibrácie určili konkrétnu sadu MC parametrov pre interakcie medzi bunkami s povrchovou sieťou s 374 uzlami. Otázkou je, ako sa budú bunky vzájomne správať pri zvolenom nastavení medzibunkových interakcií, ak bude simulácia prebiehať s inými nastaveniami. Cieľom je vymedziť oblasť platnosti vybranej sady MC parametrov v závislosti od parametrov, ktoré majú vplyv na medzibunkovú interakciu. Zameriame sa na základné simulačné nastavenia, diskretizáciu kvapaliny a simulačný krok. Kľúčový význam predpokladáme pre vplyv rýchlosti kvapaliny.

3.4.1. Rýchlosť kvapaliny

Kvapalina je v našom výpočtovom modeli uvedená do pohybu externou silou prostredníctvom vstupného parametra `fluid_force`. Táto sila súvisí s rozdielom tlakov na vstupe a výstupe simulačného boxu a v štúdiu [16] bola analyzovaná lineárna závislosť medzi `fluid_force` a objemovým prietokom pre rozsah hodnôt bežne používaných v laboratórnych experimentoch. Koeficienty priamky sú však silno závislé od geometrie kanála. Na Obr. 3.9 sú na porovnanie znázornené priebehy týchto závislostí pre kalibračný kanál (KAL) a verifikačný kanál (VAL). Rýchlosť kvapaliny môže významným spôsobom ovplyvniť interakciu medzi bunkami, kedy pri jej veľkých hodnotách je povrchová membrána jednej bunky "vtlačená" do priestoru druhej bunky.

Pri rovnakých simulačných nastaveniach aké boli nastavené v kalibračných simuláciách boli testované hodnoty externej sily v intervale od $1 \cdot 10^{-5}$ do 0,1. V Tab. 3.6 sú uvedené výsledky prekrytia pre vybranú oblasť `fluid_force`. Pri všetkých simuláciách s nižšou rýchlosťou toku než je uvedená v tabuľke, nedochádzalo k prekrytiu a pri vyšších rýchlostiach (pre `fluid_force` medzi 0.001 až 0.1) sa prekrytie podľa očakávania zväčšovalo. Medzná hranica rýchlosti kvapaliny, pri ktorej vybraná sada MC parametrov zabezpečuje požadované správanie buniek je približne 0.0056 m/s.



Obr. 3.9: Závislosť max. rýchlosti od externej sily pre kalibračné (KAL) a verifikačné simulácie (VAL).

Tab. 3.6: Výsledky detekcie prekrytia povrchových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) pri použití toku tekutiny s rôznou rýchlosťou a MC parametrov s hodnotami $a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$.

fluid_force ($\cdot 10^{-3}$)	0.0001	0.0002	0.0003	0.0004	0.0005	0.0006	0.0007	0.0008	0.0009	0.001
$v_{max} \cdot 10^{-3}$ [m/s]	0.0011	0.0022	0.00332	0.00437	0.00557	0.00673	0.00789	0.00906	0.01018	0.01120
prekrytie	0	0	0	0	0	8	10	6	6	6

MC parametre pre vyššie rýchlosti toku

Pre použitie tekutiny prúdiacej s vyššou rýchlosťou ako stanovená kritická rýchlosť je potrebná nová kalibrácia MC parametrov. Ako limitnú rýchlosť, pri ktorej je ešte možné použiť daný model bunky sme určili 0.01 m/s. Pri vyšších rýchlostiach sa bunky s danými elastickými koeficientami príliš deformujú a ich použitie v simuláciách je problematické. Vyššia rýchlosť tekutiny bola v novej sérii kalibračných experimentov zabezpečená externou silou 0.0008. Všetky ostatné simulačné nastavenia ostali nezmenené. Z výsledkov detekcie prekrytia vyplýva nutnosť zväčšenia parametra d_{cut} na hodnotu 0.5 μm . Výsledky kalibrácií sú zhrnuté v Tab. 3.7.

Tab. 3.7: Vybrané hodnoty MC parametrov pre rýchlostné intervaly.

v_{max} [m/s]	a	n	d_{cut}
menej ako 0.00557	0.01	1.0	0.4
0.00557 - 0.01	0.001	1.0	0.5

3.4.2. Simulačný krok

Ide o dôležitý simulačný parameter. Udáva, ako často sa prepočítava poloha všetkých častíc (objektov) prítomných v simulácii. Tento parameter korešponduje s δt vo vzťahu (2.19). Pri nastavení väčšieho simulačného kroku (time-step), môže dôjsť k prekrytiu bunkových membrán, kedy odpudivý potenciál nemal možnosť včas odkloniť trajektóriu buniek. Tento problém je možné eliminovať zmenšením simulačného kroku, čo však vedie k zvýšeniu výpočtovej náročnosti simulácie. Preto je dôležité, najmä pri simuláciách hustých suspenzií, tento parameter citlivo nastaviť.

Prekrytie bunkových membrán v závislosti od nastaveného simulačného kroku bolo skúmané za rovnakých podmienok, pri ktorých prebiehali kalibračné experimenty. Testovali sa hodnoty simulačného kroku od 0.01 až 0.1, čo predstavuje rozsah bežne používaných hodnôt v našich simuláciách.

Tab. 3.8: Prekrytie bunkových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) v závislosti od nastaveného simulačného kroku pre vybranú kombináciu MC parametrov ($a = 0.01$ $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$).

simulačný krok [μs]	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
v_{max} [m/s]	0.00524	0.00539	0.00537	0.00538	0.00557	0.00570	0.00583	0.00593	0.00600	0.00601
prekrytie	0	0	0	0	0	12	14	16	17	16

Ako vidieť z Tab. 3.8 vybrané MC parametre nezabezpečujú požadované správanie buniek v celom intervale testovaných hodnôt simulačného kroku. Zmenou simulačného kroku dochádza aj k určitej zmene rýchlosti toku a po prekročení kritickej rýchlosti dochádza k očakávanému prekrytiu buniek.

Otázkou ostáva, akým spôsobom je možné nastaviť simulačné podmienky, aby pri zvolených MC parametroch nedochádzalo k prekrytiu buniek pri použití simulačného kroku napríklad s hodnotou 0.1 μs . V takomto prípade je potrebné zabezpečiť max. rýchlosť toku 0.00557 m/s zmenou externej sily. Pre overenie tohto tvrdenia bola spustená simulácia v kalibračnom kanáli s externou silou 0.00044, ktorá pri simulačnom kroku 0.1 μs zabezpečuje $v_{max} = 0.0055$ m/s. Výsledky potvrdili náš predpoklad. Zmena simulačného kroku ovplyvňuje medzibunkové interakcie nepriamo, prostredníctvom malej zmeny rýchlosti toku. Takže kľúčovým faktorom ostáva rýchlosť, ktorá nesmie presiahnuť kritickú hodnotu.

3.4.3. Diskretizácia kvapaliny

Diskretizácia kvapaliny sa v simuláciách nastavuje parametrom LB-grid. Tento parameter predstavuje rozmer jednej kocky v mriežke, do ktorej je diskretizovaná kvapalina. Obmedzením pri voľbe hustoty siete, t. j. počtu bodov na povrchu, je pomer medzi priemernou dĺžkou hrany bunky a dĺžkou hrany mriežky tekutiny. Objekt aj tekutina sú diskretizované do bodov, ktoré navzájom interagujú. Tieto vrcholy sú v navzájom rôznych sieťach. Pre kvapalinu máme pravidelnú kubickú sieť, pre bunky je to nepravidelná trojuholníková sieť na jej povrchu. V prípade, že v jednej kocke tekutiny sa nachádza príliš málo povrchových bodov bunky (povrchová triangulácia bunky je príliš riedka), ich interakcia je problematická a dochádza k nefyzikálnemu správaniu sa modelu. Problém nastáva aj v opačnom prípade, ak sieť bunky je príliš hustá. Vo všeobecnosti sa odporúča, aby objekt mal aspoň 3 – 4 diskretizačné body vo vnútri jednej kocky výpočtovej mriežky kvapaliny. Dôležitým faktorom na zvolenie správnej diskretizácie kvapaliny je aj dizajn kanála. Tu je dôležité, aby diskretizačné vrcholy kvapaliny vhodne pokrývali rôzne prekážky a celkový dizajn v simulačnom boxe. Znižovanie hodnoty LB-grid predstavuje zväčšovanie počtu diskretizačných bodov, čo prispieva k zvyšovaniu výpočtovej náročnosti. Avšak s rastúcim počtom buniek prítomných v simulácii, vplyv väčšej diskretizácie kvapaliny na výpočtový čas klesá.

Pre účely skúmania vplyvu LB-grid na interakciu medzi bunkami boli upravené rozmery simulačného boxu na $30 \times 30 \times 90 \mu\text{m}$, aby bolo možné za rovnakých podmienok nastaviť LB-grid na hodnoty 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 a 3.0. Pretože zmena LB-grid pri konštantne nastavenej externej sile ovplyvňuje rýchlosť kvapaliny, bola externá sila pri každej simulácii nastavená tak, aby bola zachovaná maximálna rýchlosť kvapaliny 0.0055 m/s. Ostatné podmienky simulácie ostali rovnaké ako pri kalibračných experimentoch.

Tab. 3.9: Prekrytie bunkových membrán (maximálny počet prekrížených hrán) v závislosti od diskretizácie kvapaliny (LB-grid) pre vybranú kombináciu MC parametrov ($a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$).

LB-grid [μm]	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
fluid_force	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.000075	0.000065
prekrytie	0	0	0	0	0	0

Zmena diskretizácie kvapaliny, podobne ako simulačný krok, ovplyvňuje medzibunkové interakcie nepriamo, cez zmenu rýchlosti. Z výsledkov uvedených v Tab. 3.9 vyplýva, že pre

bežne používané hodnoty diskretizácie kvapaliny so zachovaním rovnakej maximálnej rýchlosti vybraná kombinácia MC parametrov zabezpečuje požadované správanie buniek.

3.5. Zhrnutie

Pomocou implementovanej detekcie prekrytia sme skúmali vzájomné správanie buniek. Bola vytvorená metodika kalibrácie medzibunkových interakcií - navrhnutý kalibračný experiment, verifikačné experimenty, ako aj postup vymedzenia platnej oblasti zvolených MC parametrov a postup spracovania výsledkov.

Zároveň sme navrhnutú metodiku využili na kalibráciu MC parametrov pre bežne používaný model červenej krvinky a pre štandardné simulačné nastavenia. Na základe výsledkov sme vybrali konkrétnu sadu MC parametrov s hodnotami $a = 0.01$ $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$ do maximálnej rýchlosti kvapaliny 0.0055 m/s a $a = 0.001$ $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.5$ do maximálnej rýchlosti kvapaliny 0.01 m/s, pri ktorých bunky vykazovali fyziologické správanie. Uvedené hodnoty sú platné pre bunky s povrchovou sieťou s 374 uzlami a koeficientami elastických vlastností uvedených v Tab. 3.1. Určili sme v akom rozsahu je možné meniť základné simulačné nastavenia, rýchlosť tekutiny, simulačný krok a LB-grid, aby bolo zachované požadované správanie buniek. Výsledky budú aplikované v ďalších etapách výskumu.

4. Kolízia buniek v šmykovom toku

V predchádzajúcej časti sme nastavili parametre medzibunkových interakcií a vo verifikačných simuláciách sme overili ich platnosť z pohľadu zabezpečenia "neprekryvania" bunkových membrán. V tejto kapitole bližšie preskúmame do akej miery kolízia dvoch buniek v simuláciách odráža reálne správanie buniek. Nie je jednoduché nájsť biologické experimenty, z ktorých výstupom je merateľná charakteristika, podstatou ktorej je interakcia medzi bunkami. Preto sme zvolili kolíziu červených krviniek v šmykovom toku, pričom z fyzikálnej podstaty laminárneho toku a mechanicko-elastických vlastností červenej krvinky vieme odhadnúť kolízne správanie buniek. Zároveň výstupy slúžia ako vstupné údaje do niektorých teoretických modelov CFL, difuzivity buniek a podobne. Na overenie platnosti modelu sa mechanizmy kolízie porovnávajú s inými výpočtovými modelmi [43, 44, 46, 46].

4.1. Teoretické predpoklady kolízneho správania buniek

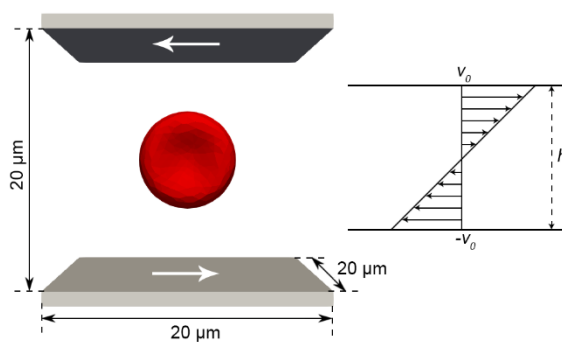
Skúmali sme kolíziu dobre deformovateľných červených krviniek so štandardnými elastickými vlastnosťami (Tab. 3.1) a pre porovnanie úplne tuhú červenú krvinku. Počiatočné natočenie buniek predstavovalo tri hraničné možnosti v trojrozmernom priestore a šmyková rýchlosť bola v rozmedzí 100 až 2000 s⁻¹. Na základe teoretických poznatkov o správaní sa červených krviniek v šmykovom toku očakávame nasledovne:

- V pomalom toku bude dochádzať k rotácií buniek, ktorú pri zvyšovaní rýchlosti nahradí pohyb tank-treading.
- V prípade deformovateľných RBC neplatí pri binárnych kolíziách časová symetria (účinnok drsnosti povrchu a proteínových reťazcov v plazme zanedbávame). Očakávame, že bunky sa krátko po kolízii nevrátia úplne na svoju pôvodnú trajektóriu (v smere rýchlostného gradientu), ale v závislosti od šmykovej rýchlosti sa "usídlia" v určitej výške so vzdialenosťou Δd (viď. Obr. 4.2).
- V prípadoch s nízkou šmykovou rýchlosťou bude miera deformácie buniek obmedzená a priebeh kolízie bude podobný kolízii tuhých buniek. V závislosti od rýchlosti sa bunky budú viac deformovať a vyrovnávať smeru toku, čím sa bude znižovať maximum ich kolíznych trajektórií.

4.2. Popis experimentov

KANÁL I

V Kanáli I. boli realizované pomocné simulácie využité na analýzu metód určovania hlavnej osi bunky, ako aj niektorých vlastností bunky v šmykovom toku. Do stredu simulačného boxu s rozmermi $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ bola umiestnená červená krvinka so štandardnými parametrami uvedenými v Kap. 3.2.1 v Tab. 3.1. Šmykový tok bol iniciovaný nastavením konštantnej horizontálnej rýchlosti v_0 a $-v_0$ na hornú a dolnú stenu kanála, ako je to znázornené na Obr. 4.1. Ide o Couetteov šmykový tok s lineárnym rýchlostným profilom, pričom vo výške kanála $h/2$ je rýchlosť tekutiny 0 m/s . Keďže v tejto výške je umiestnené aj ťažisko bunky, dochádza k deformácii bunky a k rotačnému resp. tank-trading pohybu, ale jej ťažisko ostáva na fixnej pozícii. V smere osi x (smer prúdenia toku) a v smere osi y bola zabezpečená periodicitá toku.

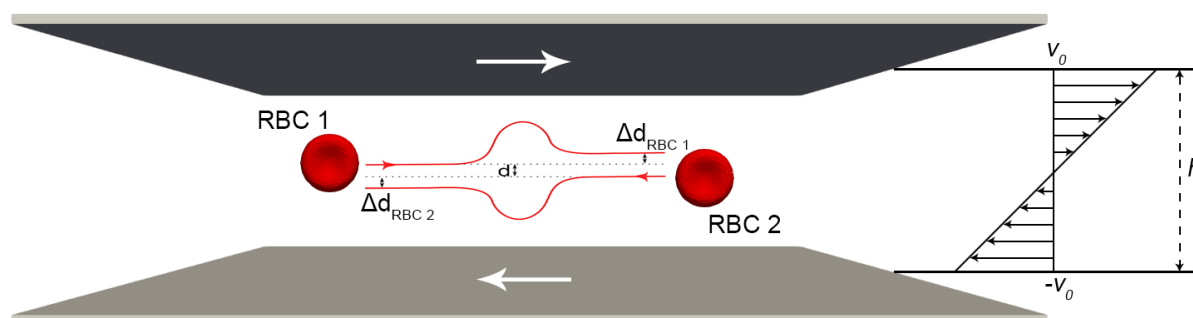


Obr. 4.1: Geometria Kanála I.

KANÁL II

Štúdiá párových kolízií v šmykovom toku sa uskutočňovala taktiež v Couetteovom šmykovom toku, ale s upravenými rozmermi. Rozmery simulačného boxu boli v tomto prípade $100 \mu\text{m}$ v smere toku kvapaliny (os x), $30 \mu\text{m}$ v smere rýchlostného gradientu (os z) a $50 \mu\text{m}$ v smere osi y . Tekutina bola uvedená do pohybu rovnakým spôsobom ako pri KANÁLI I, t.j. nastavením konštantnej horizontálnej rýchlosti v_0 a $-v_0$ na hornú a dolnú stenu kanála (Obr. 4.2). Použité rýchlosti v_0 vypočítané zo zvolených šmykových rýchlostí podľa $v_0 = 2\dot{\gamma}/h$ (zo vzťahu 2.4) sú zosumarizované v Tab. 4.1. Počiatočné umiestnenie buniek bolo symetrické vzhľadom na

axiálnu os s počiatočným posunom v smere toku $\Delta x = 20 \mu\text{m}$, v smere rýchlostného gradientu $\Delta z = 2 \mu\text{m}$ a v smere y-ovej súradnice $\Delta y = 0 \mu\text{m}$. Hodnota Δd_{RBC} predstavuje výsledný posun bunky v smere rýchlostného gradientu po kolízii. Vzhľadom na symetrické správanie buniek, budú ďalej uvádzané len výsledky pre RBC1.



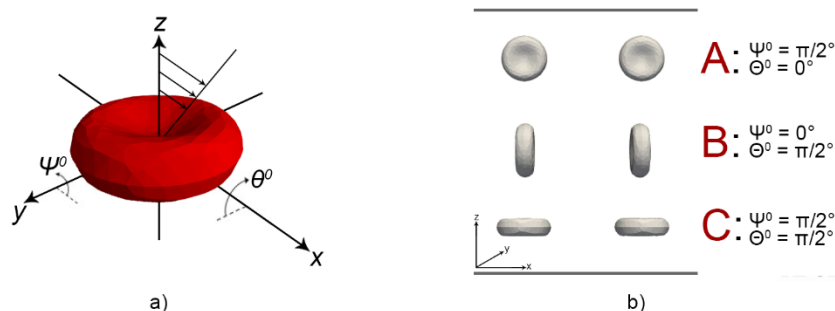
Obr. 4.2: Schéma kolízie dvoch červených krviniek v šmykovom toku.

Tab. 4.1: Použité rýchlosti v_0 a šmykové rýchlosti toku $\dot{\gamma}$.

šmyková rýchlosť toku $\dot{\gamma}$ [s^{-1}]	rýchlosť v_0 [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
100	0.0015
300	0.0045
500	0.0075
800	0.0120
1000	0.0150
1500	0.0225
2000	0.0300

Počiatočné natočenie bunky v simulačnom boxe

Na určenie počiatočného natočenia buniek zadefinujeme dva uhly. Ako hlavnú os bunky označíme os prechádzajúcu jej stredom kolmom smere na rovinu diskoidu (na Obr. 4.3(a) sa zhoduje s osou z). Počiatočný uhol natočenia ψ^0 je definovaný ako uhol medzi smerom toku (axiálny smer) a hlavnou osou RBC. Uhol θ^0 je definovaný ako počiatočný uhol medzi osou y a hlavnou osou RBC. Definované uhly sú znázornené na Obr. 4.3(a) a na Obr. 4.3(b) sú zobrazené tri krajné možnosti počiatočnej orientácie s príslušnými uhlami ψ^0 a θ^0 . Pre zjednodušenie sú tieto tri počiatočné orientácie označené ako A, B, C.



Obr. 4.3: Počiatočné natočenie buniek.

4.3. Uhol sklonu RBC v šmykovom toku

Pri vyšších hodnotách šmykovej rýchlosti, nad určitou prahovou hodnotou, prechádzajú bunky z rotačného pohybu do tank-trading pohybu, ktorý je charakterizovaný pohybom bunkovej membrány okolo vnútornej tekutiny. V tomto stave pohybu sa bunky predlžujú, nadobúdajú tvar elipsoidu a vyrovnávajú sa v konštantnom uhle vzhľadom na tok. Ich orientáciu je možné kvantifikovať uhlom sklonu ϕ , čiže uhlom hlavnej osi bunky vzhľadom na smer toku. V [47] autori ukazujú, že uhol sklonu nie je v skutočnosti konštantný, ale ide skôr o kmitavý pohyb. Na uhol sklonu má určitý vplyv aj viskozitný pomer medzi vnútornou tekutinou bunky a tekutinou okolitého prostredia [48], ktorý je v našom prípade nastavený na hodnotu jedna, a teda vplyv rozdielu viskozít zanedbávame. K dispozícii sú experimentálne údaje, ktoré kvantifikujú spriemerované hodnoty ϕ za špecifických podmienok. Takéto experimentálne údaje sa môžu použiť na validáciu výpočtových modelov [60].

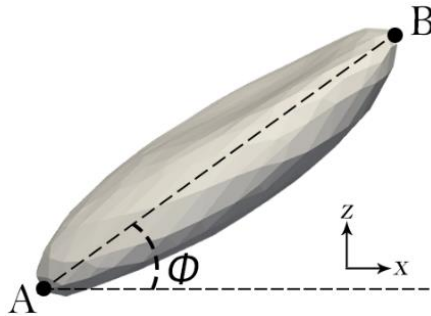
Cieľom tejto štúdie bolo overiť správanie sa RBC v šmykovom toku na základe merania uhla sklonu RBC pri rôznych experimentálnych podmienkach a zistiť vplyv kolízie na uhol sklonu bezprostredne po nej. Najskôr si však rozoberme rôzne prístupy k určovaniu uhla sklonu vo výpočtových modeloch.

4.3.1. Meranie uhla sklonu RBC

Uhol sklonu bunky bol meraný vzhľadom na smer toku (viď. Obr. 4.4). Pri použitom nastavení experimentu má tok lineárny rýchlostný profil, pričom v smere osi y je rýchlosť konštantná, preto je možné y -ové súradnice povrchových uzlov zanedbať. Na meranie uhla sklonu sme použili nasledujúci postup:

- určenie dvoch bodov hlavnej osi bunky A a B
- extrahovanie ich x-ových a y-ových súradníc A_x, A_z, B_x, B_z
- výpočet uhla sklonu ϕ podľa nasledujúceho výrazu

$$\phi = \arctg \left[\frac{B_z - A_z}{B_x - A_x} \right]. \quad (4.1)$$



Obr. 4.4: Uhol sklonu bunky vzhľadom na smer toku.

Prvým krokom je určenie hlavnej osi bunky resp. určenie povrchových uzlov, ktorých spojnica tvorí hlavnú os. Výpočtové modely poskytujú podrobné informácie, z ktorých je možné určovať hlavnú os viacerými spôsobmi. Preskúmali sme štyri rôzne metódy, ich vplyv na výsledný uhol sklonu, ako aj možnosti ich využitia. Prvé dve metódy spočívajú v nájdení vhodných membránových uzlov, z ktorých sa priamo počítal uhol sklonu bunky. Pri ďalších dvoch metódach sa na všetky povrchové uzly bunky nazeralo ako na súbor bodov a aplikovaním matematických metód, lineárnej regresie a analýzy hlavných komponentov, sa najprv určila hlavná os bunky a následne sa stanovili dva body A, B ležiace na nej. Skúmané metódy sú:

1. **metóda:** Krajné uzly v smere osi x (označenie: $X_{min/max}$).

Počas simulácie sa s využitím funkcie `bound_points[].get_pos()` priamo zaznamenávali súradnice krajných uzlov vzhľadom na os x . Spojnica tohto minimálneho a maximálneho povrchového uzlu v smere x -ovej osi predstavuje hlavnú os bunky. Využitelnosť tejto metódy sme skúmali vzhľadom na ľahkú dostupnosť potrebných údajov bez nutnosti zvyšovania výpočtovej náročnosti. Súradnice extrémnych uzlov (vo všetkých troch smeroch) patria medzi štandardné výstupy zo simulácií a nachádzajú uplatnenie v rôznych post-processingových výpočtoch.

2. **metóda:** Povrchové uzly s najväčšou vzájomnou vzdialenosťou.

V každom zaznamenanom simulačnom kroku sa z x-ových a z-ových súradníc povrchových uzlov vypočítala vzdialenosť medzi každou dvojicou uzlov. Hlavnú os bunky v tomto prípade tvorí spojnica dvoch uzlov s najväčšou vzdialenosťou. Táto metóda predstavuje intuitívnu voľbu pri určovaní hlavnej osi bunky a stretávame sa s ňou aj v odborných publikáciách.

3. **metóda:** Lineárna regresia.

Pomocou regresnej analýzy, využitím Metódy najmenších štvorcov (MNS), sa cez x-ové a z-ové súradnice povrchových uzlov preložila priamka a následne sa z rovnice danej priamky určili body A , B .

4. **metóda:** Analýza hlavných komponentov (PCA).

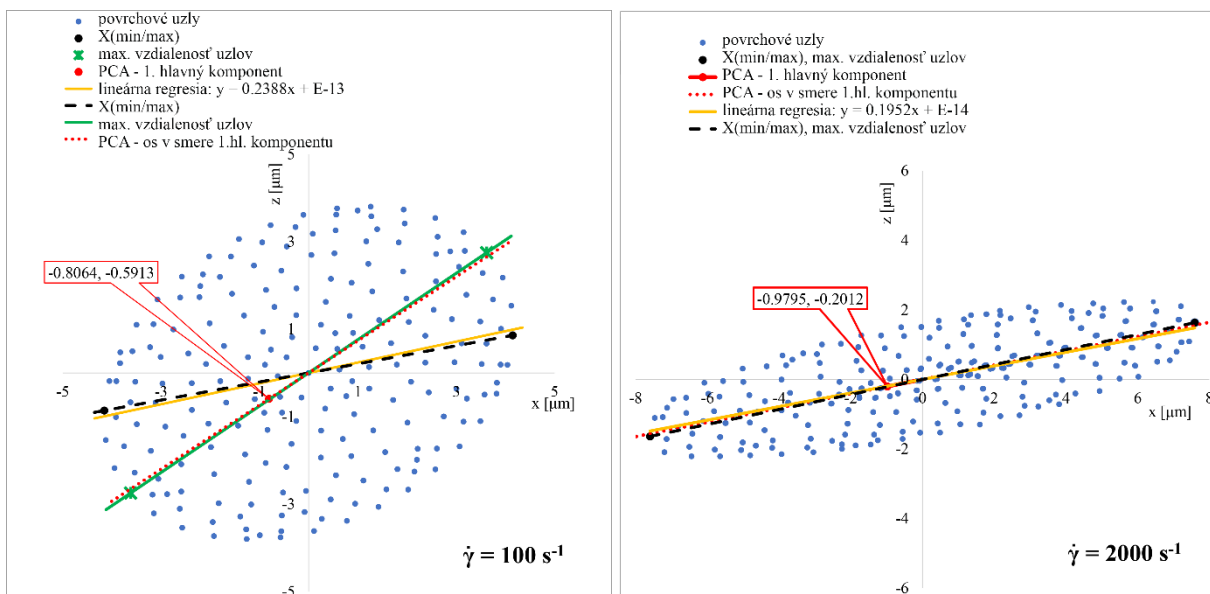
Pomocou metódy PCA sa určil smer najväčšieho rozptylu povrchových uzlov, prvý hlavný komponent. Využitím smerového vektora prvého hlavného komponentu sa určili body A , B .

4.3.2. Porovnanie metód určovania hlavnej osi RBC

Na porovnanie metód určovania hlavnej osi sme použili KANÁL I (vid' Obr. 4.1). Výsledky sú ukázané na simulačných experimentoch s počiatočným natočením bunky A a s hodnotami šmykovej rýchlosti 100 a 2000 s^{-1} , kedy sú bunky zdeformované v odlišnej miere. Na Obr. 4.5 sú znázornené x-ové a z-ové súradnice povrchových častíc buniek pre tieto dva prípady a hlavné osi bunky získané so všetkými štyrmi metódami. V Tab. 4.2 sú uvedené príslušné uhly sklonu bunky.

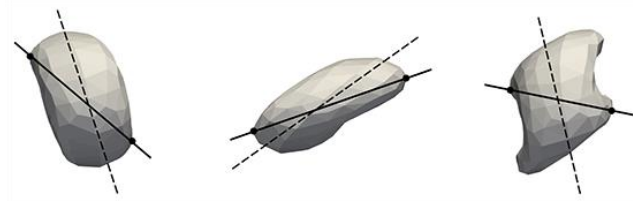
Tab. 4.2: Uhly sklonu buniek [$^{\circ}$] získané štyrmi spôsobmi pre prípad $\dot{\gamma}=100 \text{ s}^{-1}$ a $\dot{\gamma}=2000 \text{ s}^{-1}$.

	1. $X_{(min/max)}$	2. max. vzdial. bodov	3. lineárna regresia	4. PCA	rozpätie
$\dot{\gamma}=100 \text{ s}^{-1}$	11.71	37.22	13.43	36.25	25.51
$\dot{\gamma}=2000 \text{ s}^{-1}$	12.15	12.15	11.05	11.61	1.1



Obr. 4.5: Rôzne metódy zistenia hlavnej osi bunky pre prípad šmykovej rýchlosti a) $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$ a b) $\dot{\gamma} = 2000 \text{ s}^{-1}$. Pre prípad $\dot{\gamma} = 2000 \text{ s}^{-1}$, 1. a 2. metóda poskytujú rovnaký výsledok. Hodnoty uhlov zobrazených hlavných osí pre obidve šmykové rýchlosti sú uvedené v Tab. 4.2.

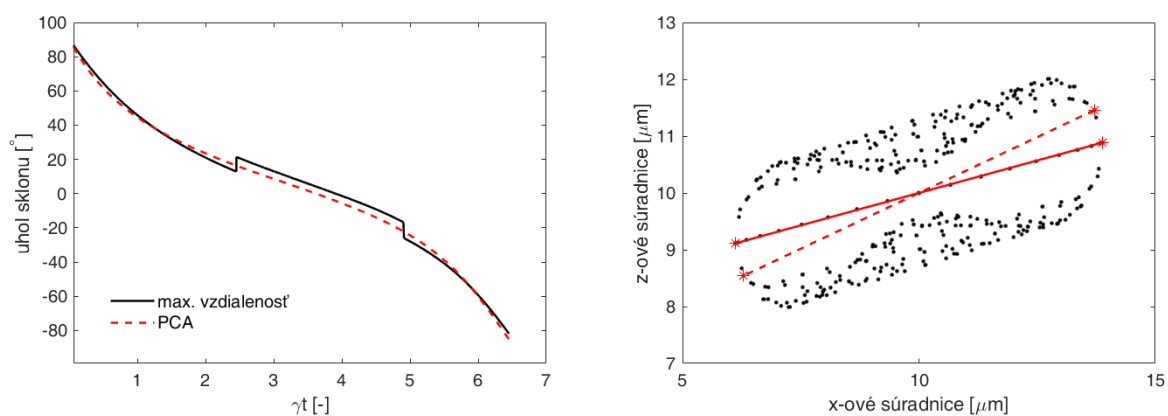
Pri pomalom toku tekutiny, kedy sa bunky deformujú len málo, prvá a tretia metóda určenia bunkovej diagonály zlyhávajú. Obidve tieto metódy taktiež zlyhávajú aj pri rýchlejších tokoch v prípadoch, kedy bunka nadobúda zložitejší tvar, napríklad vplyvom zníženej elasticity. Ukážky takýchto tvarov bunky sú zobrazené na Obr. 4.6.



Obr. 4.6: Ukážky tvarov buniek s vyznačenou hlavnou osou určenou metódou $X_{(\min/\max)}$ (plná čiara) pri rôznych šmykových rýchlostiach. Zľava doprava: $\dot{\gamma} = 300 \text{ s}^{-1}$, $\dot{\gamma} = 600 \text{ s}^{-1}$, $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$ ($k_s = 0.05$).

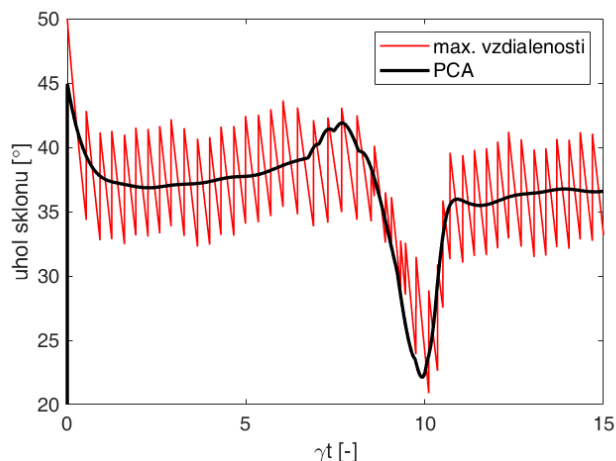
Iná situácia nastáva pri rýchlom toku, keď je bunka výrazne deformovaná do elipsoidu (Obr. 3(b)). V takom prípade dostávame väčšiu zhodu výsledkov zo všetkých štyroch metód. Prvými dvoma spôsobmi boli vybrané identické povrchové uzly, čomu zodpovedá rovnaký uhol $12,15^\circ$. Rozpätie nameraných uhlov $1,1^\circ$ predstavuje približne 9% z najväčšej hodnoty.

Teraz sa pozrime bližšie na 2. a 4. metódu, ktoré poskytujú konzistentné výsledky v širokej škále šmykovej rýchlosti. Na Obr. 4.7(a) je zobrazený časový vývoj uhla sklonu málo deformovanej bunky v pomalom toku ($\dot{\gamma}=50 \text{ s}^{-1}$), kedy dochádza k rotácii bunky. Na krivke získanej 2. metódou (čierna krivka) je viditeľný skok približne o 8° , spôsobený výberom novej dvojice povrchových uzlov, ktoré sú relatívne ďaleko od predchádzajúcej dvojice (Obr. 4.7(b)). Naproti tomu, metóda PCA určuje smer hlavnej osi bunky so všetkých povrchových uzlov, preto túto deviáciu spôsobenú niekoľkými uzlami dokázala zanedbať. Tým pádom determinovala spojitý charakter rotačného pohybu.



Obr. 4.7: a) Porovnanie časového vývoja uhla sklonu bunky získaného metódou najvzdialenejších uzlov (čierna krivka) a metódou PCA (červená krivka) pre prípad šmykovej rýchlosti $\dot{\gamma}=50 \text{ s}^{-1}$. b) Povrchové uzly bunky v okamihu numerického výkyvu ($\gamma t = 9800$).

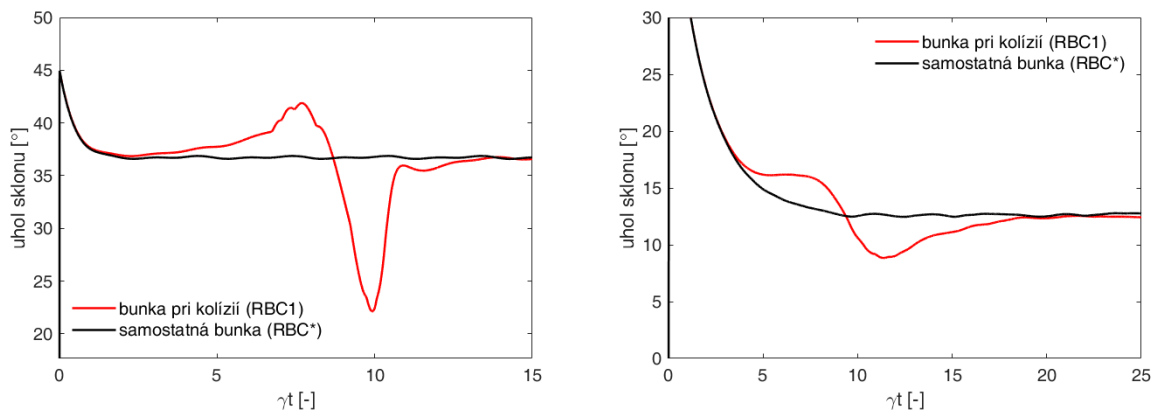
Tento efekt použitia metódy PCA si demonštrujeme na dlhšom časovom zázname pohybu kolíznej bunky (RBC1). Na Obr. 4.8 je záznam vývoja uhla ϕ v čase, ktorý mapuje celý priebeh kolízie. Použitím metódy max. vzdialeností sme získali krivku, ktorej oscilujúci priebeh by mohol byť chybné interpretovaný ako kmitavý pohyb bunky. Túto deviáciu však spôsobuje samotná numerická metóda. Naproti tomu krivka získaná pomocou metódy PCA, vďaka svojmu "hladkému" priebehu, podstatne lepšie popisuje reálne správanie bunky. Z týchto dôvodov budeme v ďalšej analýze používať túto metódu.



Obr. 4.8: Porovnanie vývoja uhla ϕ v čase s využitím metódy max. vzdialenosti uzlov (červená krivka) a PCA (čierna krivka). Uvedený priebeh predstavuje časový vývoj uhla RBC1 pri kolízii s druhou bunkou a zodpovedá nastaveniam $\dot{\gamma}=100 \text{ s}^{-1}$, počiatočné natočenie je A.

4.3.3. Vplyv kolízie na uhol sklonu RBC

Simulácie sa realizovali v Kanáli II popísanom v kapitole 4.2 s počiatočným natočením A. Uhol sklonu bol vypočítaný pomocou rovnice 4.1, pričom na odhad bunkovej uhlopriečky bola použitá 4. metóda (PCA). Uhol sa počítal v každom zaznamenanom simulačnom kroku. Porovnávali sme uhol sklonu bunky po kolízii s druhou bunkou (RBC1) a uhol bunky, ktorá bola umiestnená do šmykového toku samostatne a na rovnakej pozícii ako RBC1, pričom simulácie bežali za rovnakých vstupných podmienok. Túto bunku budeme ďalej označovať RBC*.



Obr. 4.9: Porovnanie časového vývoja uhla ϕ pre prípad a) $\dot{\gamma}=100 \text{ s}^{-1}$, b) $\dot{\gamma}=1000 \text{ s}^{-1}$. Červená krivka predstavuje časový vývoj uhla RBC1 pri kolízii s druhou bunkou a čierna krivka uhol natočenia samostatnej bunky, ktorá bola umiestnená na rovnakú pozíciu ako RBC1.

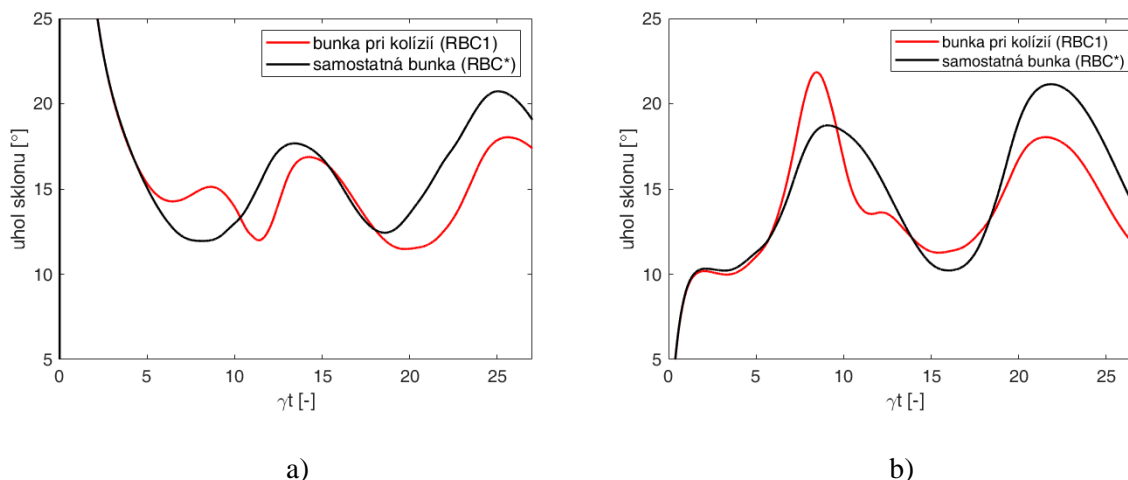
Na Obr. 4.9 je zobrazený vývoj uhla sklonu pre prípad $\dot{\gamma}=100\text{s}^{-1}$ a $\dot{\gamma}=1000\text{s}^{-1}$. Na začiatku simulácie je bunka v paralelnej polohe vzhľadom na tok s uhlom $\phi = 90^\circ$ (počiatočné natočenie A). Počas prvej časti simulácie sa bunka vyrovnáva vzhľadom na smer toku tekutiny. V Tab. 4.3 sú uvedené priemerné hodnoty uhla $\bar{\phi}$ a intervaly vytvorené pomocou pravidla 3σ . Intervaly majú tvar $(\bar{\phi} - 3s, \bar{\phi} + 3s)$, kde s označuje výberovú odchýlku a je štatistickým odhadom smerodajnej odchýlky σ . Z výsledkov vyplýva výrazný vplyv šmykovej rýchlosti na uhol natočenia. So zväčšovaním rýchlosti toku sa uhol sklonu znižuje.

Tab. 4.3: Priemerný uhol ϕ [°] RBC1 po kolízii a samostatnej bunky (RBC*) pre rôzne šmykové rýchlosti a počiatočné natočenie A.

	100 s⁻¹	300 s⁻¹	1000 s⁻¹	2000 s⁻¹
RBC1	36.56 ± 0.42	24.31 ± 0.54	12.47 ± 0.15	11.30 ± 0.78
RBC*	36.72 ± 0.27	24.42 ± 0.48	12.68 ± 0.24	11.67 ± 0.15

Pre všetky šmykové rýchlosti bola nameraná len nepatrne zväčšená hodnota uhla samostatnej bunky voči RBC1 po kolízii. Tento rozdiel je po porovnaní intervalov 3σ štatisticky nevýznamný. Určitý vplyv sme očakávali na základe kolízneho posunu diskutovaného v nasledujúcej kapitole, kedy sa bunka po kolízii nevráti hneď na svoje pôvodnú pozíciu, ale dochádza k určitému posunu v smere rýchlostného gradientu. Bunka je pri kolízii vytlačená bližšie k stene, kde sa na určitý čas usídli. Veľkosť tohto posunu závisí od šmykovej rýchlosti. V zmenenej pozícii na bunku pôsobí odlišné šmykové napätie, ktoré má vplyv na sklon bunky.

Ak umiestnime bunky do šmykového toku s počiatočným natočením B a C dochádza, oproti natočeniu A, k väčšiemu kmitavému pohybu. Po úvodnom natočení buniek vzhľadom na smer toku sa ich amplitúdy časom znižujú v závislosti od viskozity tekutiny, v ktorej sú vnorené. Pri kolíziách s takýmito počiatočnými natočeniami dochádza k výraznejšiemu vplyvu interakcie medzi bunkami na uhol sklonu krátko po kolízii. Na Obr. 4.10 je na ukážku zobrazený vybraný prípad časových vývojov uhla ϕ pre natočenia B a C so šmykovou rýchlosťou 1000 s^{-1} . Pri natočení B sa priemerný uhol sklonu po kolízii zmenšil o 1.8° na hodnotu 13.8° voči RBC*, pričom amplitúda kmitov sa zmenšila približne o 1.9° . V prípade natočenia C došlo po kolízii k výraznejšej zmene amplitúdy, ktorá sa zväčšila o 4.1° na hodnotu 10.9° .



Obr. 4.10: Porovnanie časového vývoja uhla ϕ pre prípad a) počiatočného natočenia B a b) natočenia C. Červená krivka predstavuje časový vývoj uhla RBC1 a čierna krivka RBC*.

4.4. Kolízny posun

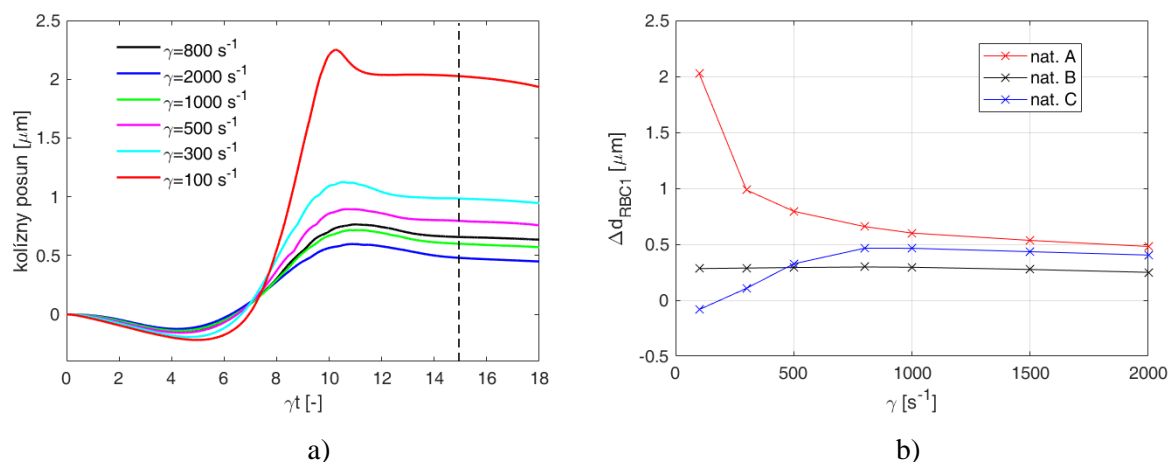
Pod pojmom kolízny posun sa rozumie posun bunky v smere rýchlostného gradientu (v našom prípade v smere z-ovej súradnice) bezprostredne po kolízii buniek. Celkový kolízny posun Δd_{RBC} kvantifikuje tento posun na základe rozdielu polohy ťažiska bunky pred a po kolízii. Na hodnotu Δd_{RBC} vplýva viacero faktorov ako napríklad šmyková rýchlosť, elasticita a veľkosť buniek, viskozita okolitej tekutiny.

Štúdie kolízneho posunu v jednoduchom šmykovom toku boli realizované za účelom lepšieho pochopenia migrácie krvných buniek v cievnych systémoch. V [46] je rozpracovaný teoretický model Hydrodynamická metóda Monte Carlo na opis transportu častíc v suspenziách, ktorý predpokladá dva kľúčové zdroje transportu a to migráciu vyvolanú stenou a kolízie hydrodynamických párov. V [43] rozširujú model šmykom indukovanej difúzie a v časti zaoberajúcej sa kolíznymi posunmi sa sústreďujú na interakcie medzi červenou krvinkou a krvnou doštičkou.

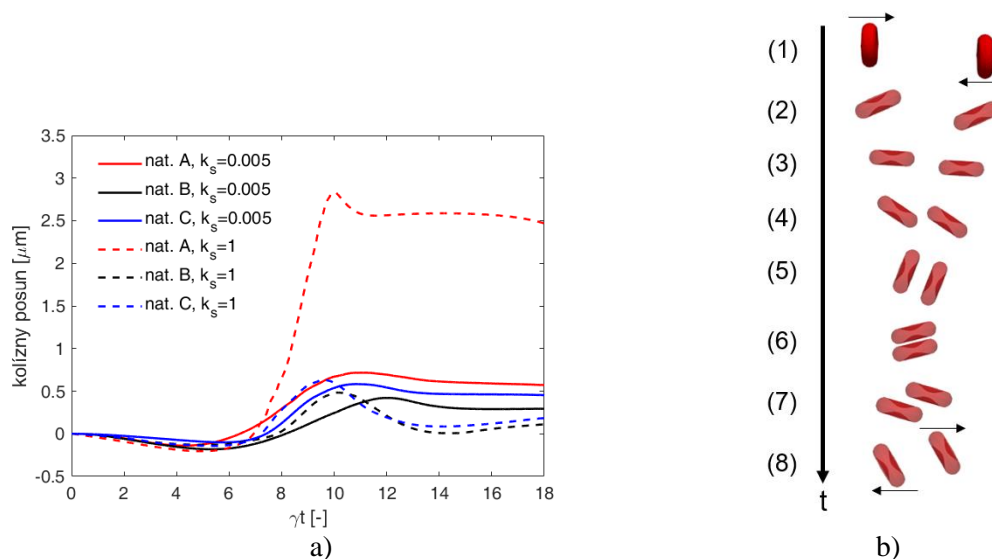
Cieľom tejto štúdie bolo overiť správanie interagujúcich buniek na základe celkového kolízneho posunu a konfrontovať naše závery s inými výpočtovými modelmi. Zamerali sme sa na dva faktory vplývajúce na kolízny posun, ktoré nás zaujímali z konceptuálneho hľadiska predloženej práce. Ide o vplyv šmykovej rýchlosti a elasticity krviniek. Všetky simulácie v tejto kapitole boli realizované v Kanáli II (Kap. 4.2) za uvedených podmienok, pokiaľ nie sú uvedené zmeny vstupných parametrov využité na niektoré konkrétne účely.

4.4.1. Vplyv šmykovej rýchlosti

Vplyv šmykovej rýchlosti na priečny posun pred a po kolízii sme skúmali pri hodnotách $\dot{\gamma}$ v rozmedzí 100 až 2000 s^{-1} , čo predstavuje širokú oblasť rýchlostí v mikrofluidický kanáloch. V prípadoch s nižšou šmykovou rýchlosťou je miera deformácie obmedzená, preto je kolízia v zásade podobná prípadu tuhého objektu. Za hraničnú teoretickú možnosť považujeme kolíziu úplne tuhých buniek, ktoré mali všetky elastické koeficienty nastavené na hodnotu jedna. Na Obr. 4.11(a) sú zobrazené trajektórie centier buniek RBC1 voči normovanému času pri všetkých skúmaných šmykových rýchlostiach a pre počiatkové natočenie A. Pri $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$ sa počas kolízie RBC1 posunula o 2.3 μm v smere rýchlostného gradientu, ale bezprostredne po zrážke sa ustálila približne 2.0 μm nad svojou počiatkovou pozíciou. Táto vratná trajektória nie je tak výrazná v prípadoch s väčšou rýchlosťou, pri ktorých dochádza k výraznejšej šmykom indukovanej deformácii. Všeobecne pre natočenie A platí, že so zväčšením šmykovej rýchlosti sa znižuje celkový kolízny posun. Pri počiatkovom natočení B šmyková rýchlosť prakticky neovplyvňuje Δd a pri natočení C dochádza k zväčšovaniu hodnoty Δd do približne $\dot{\gamma} = 800 \text{ s}^{-1}$ (Obr. 4.11(b)).



Obr. 4.11: a) Kolízny posun pri šmykovej rýchlosti s hodnotami v rozmedzí 100 až 2000 s^{-1} s elasticitou bunky $k_s = 0.005$ a počiatkovým natočením A. Zvislá prerušovaná čiara označuje okamih, v ktorom sa počítala hodnota Δd_{RBC1} . b) Závislosť celkového posunu po kolízii Δd_{RBC1} od šmykovej rýchlosti pre všetky tri počiatkové natočenia.



Obr. 4.12: a) Kolízny posun elastických ($k_s = 0.005$) a tuhých buniek ($k_s = 1$) s rôznym počiatočným natočením pri $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$. b) Časové snímky rotácie tuhých buniek pri počiatočnom natočení B.

Na Obr. 4.12(a) sú zosumarizované kolízne posuny pre všetky tri hraničné natočenia. Pre porovnanie sú zobrazené aj kolízne posuny tuhých buniek (čiarkované krivky). Tuhé bunky sú pri kolízii vo vzájomnom rotačnom pohybe (Obr. 4.12(b)) a tento rotačný pohyb spôsobuje priblíženie buniek ku stredu kanála hneď po kolízii. Hodnoty ich Δd vymedzujú pre dané elastické vlastnosti bunkovej membrány hranice platné v celom rozsahu šmykovej rýchlosti.

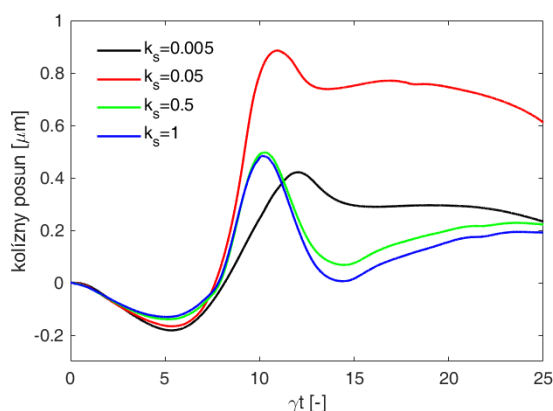
4.4.2. Vplyv elasticity buniek

V ďalších častiach práce sa budeme zaoberať aj vplyvom elasticity buniek na hromadné vlastnosti toku krviniek. V tejto súvislosti nás zaujímalo ako ovplyvňuje kolízny posun elasticita buniek. Zamerali sme sa na homogénny dvoj-bunkový systém, v ktorom obe interagujúce bunky mali elasticitu nastavenú na rovnakej úrovni. V Tab. 4.4 sú zosumarizované použité elastické koeficienty buniek. Na elasticitu buniek má najväčší vplyv koeficient pružnosti (k_s), ktorého zmenou sa zabezpečila rôzna úroveň elasticity bunky. Ďalej budeme označovať jednotlivé sady týmto koeficientom. Hodnota $k_s = 0.005$ predstavuje zdravú elastickú bunku a hodnota $k_s = 1$ teoretickú možnosť, tuhú bunku bez akýchkoľvek elastických vlastností. Vzájomné počiatočné natočenie buniek bolo B a šmyková rýchlosť bola nastavená na hodnote 1000 s^{-1} , čo predstavuje rýchlosť toku, v ktorom zdravé červené krvinky vykazujú tank-trading pohyb.

Tab. 4.4: Elastické koeficienty buniek použitých pri analýze kolízneho posunu.

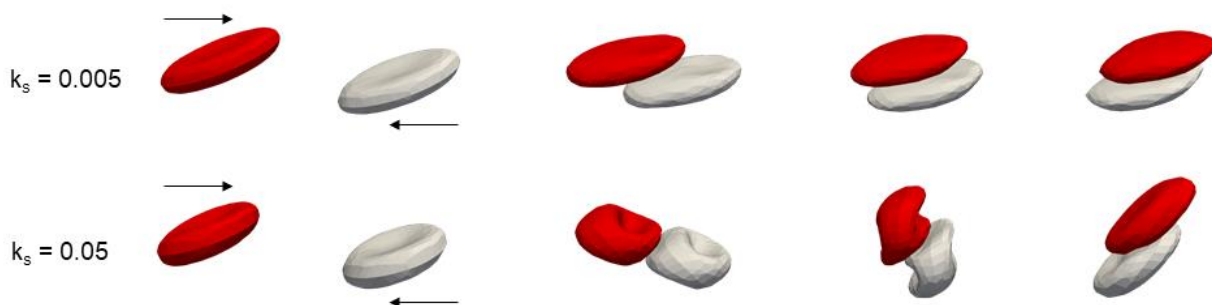
Parametre	$k_s = 0.005$	$k_s = 0.05$	$k_s = 0.5$	$k_s = 1$
koef. pružnosti (k_s)	0.005 mN/m	0.05 mN/m	0.5 mN/m	1 mN/m
koef. ohybu (k_b)	3×10^{-18} Nm	3×10^{-18} Nm	3×10^{-18} Nm	1×10^{-16} Nm
koef. zachovania lokálnej plochy (k_{al})	0.02 mN/m	0.02 mN/m	0.02 mN/m	1 mN/m
koef. zachovania celkovej plochy (k_{ag})	0.7 mN/m	0.7 mN/m	0.7 mN/m	1 mN/m
koef. zachovania objemu (k_v)	0.9 mN/m ²	0.9 mN/m ²	0.9 mN/m ²	1 mN/m ²

Na Obr. 4.13 sú zobrazené trajektórie centier buniek RBC1 počas kolízie. Hodnota Δd_{RBC1} elastickej bunky (čierna krivka) je 0.3 μm . Červená krivka predstavuje trajektóriu približne 10-násobne tuhšej bunky, čo rádovo zodpovedá poškodenej biologickej bunke. V tomto režime dochádza k relatívne výraznému kolízному posunu ($\Delta d_{RBC1} = 0.75 \mu\text{m}$). Zvýšená tuhosť bunky spôsobuje kombinovaný pohyb rotácie a tank-tradingu. Pre vizuálne porovnanie sú na Obr. 4.14 znázornené časové snímky oboch kolízií. Na Obr. 4.13 je ďalej možné pozorovať podobný priebeh trajektórií buniek s $k_s = 0.5$ a 1 (zelená a modrá krivka) spôsobený ich podobnou tuhosťou. Tuhé bunky sú pri interakcii vo vzájomnom rotačnom pohybe a tento rotačný pohyb spôsobuje priblíženie buniek ku stredu kanála hneď po kolízii.



Obr. 4.13: Kolízny posun pre bunky s rôznou elasticitou. Počiatočné natočenie buniek je B a šmyková rýchlosť je 1000 s^{-1} .

Podobný vplyv elasticity bunkovej membrány sme zaznamenali aj pre počiatočné natočenie C. Pri natočení A dochádza k postupnému zvyšovaniu hodnoty Δd_{RBC1} so zvyšujúcou sa tuhosťou buniek. K podobným záverom došli aj autori v [46], aj keď vzhľadom na iné odlišné vstupné parametre nie je možné z kvantitatívneho hľadiska výsledky porovnať.



Obr. 4.14: Časové snímky kolízie dvoch buniek s odlišnou elasticitou povrchovej membrány. Snímky sú zaznamenané v časoch 0.25, 0.5, 0.75, 0.9 a 1 ms.

4.5. Zhrnutie

Bunková kolízia ovplyvňuje uhol natočenia bunky v jednoduchom šmykovom toku len veľmi málo. K mierne väčšiemu vplyvu dochádza pri počiatočnom natočení buniek typu B a C, kedy bunky vykazujú kmitavý pohyb. Taktiež sme preskúmali štyri metódy určovania hlavnej bunkovej osi. Spôsob využívajúci štatistickú metódu Analýzu hlavných komponentov (PCA) poskytol konzistentné výsledky v širokom rozpätí vstupných podmienok. Z porovnania výsledkov vidieť, že spôsob aproximácie bunkovej uhlopriečky, najmä pre zložitejšie tvary buniek, môže mať veľký vplyv na výsledný uhol. Tento fakt je potrebné zohľadniť pri interpretácií výsledkov napríklad pri porovnávaní biologických experimentov a výpočtových modelov.

Z výsledkov kolízneho správania buniek v jednoduchom šmykovom toku vyplynulo, že počiatočné natočenie buniek ovplyvňuje ich priečny posun bezprostredne po kolíznej udalosti. Pri počiatočnom natočení A so zvyšujúcou sa šmykovou rýchlosťou celkový posun po kolízii nelineárne klesá, a naopak znižovanie elasticity buniek spôsobuje zväčšovanie kolízneho posunu. Pri natočeniach B a C sa účinok šmykovej rýchlosti uplatňuje v menšej miere.

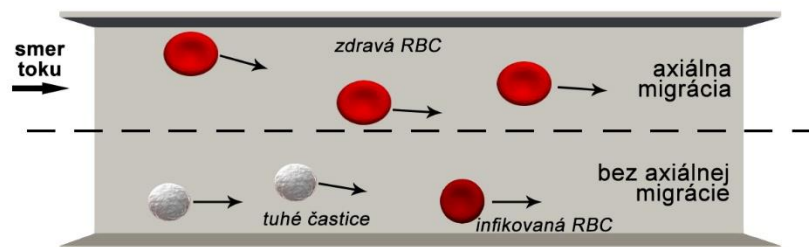
5. Validácia hromadných vlastností krvného toku vo výpočtovom modeli

Na validáciu hromadných vlastností toku krvi sme zvolili hemodynamický jav, tzv. vytváranie bezbunkovej vrstvy (CFL, cell-free layer), v blízkosti stien mikrokanála. Cieľom je preskúmať vplyv deformovateľnosti buniek na hrúbku CFL pri rôznych úrovniach objemového podielu RBC v toku. Okrem toho sme analyzovali vplyv deformovateľnosti buniek na trajektórie buniek a rýchlostné profily. Získané výsledky z výpočtových simulácií sme konfrontovali s výsledkami z biologických experimentov ako aj s výsledkami z iných výpočtových modelov [24, 49].

5.1. Biologické pozadie bezbunkovej vrstvy

Jedna z vlastností mnohobunkových systémov vyskytujúc sa v mikrocievnom systéme je vytváranie bezbunkovej vrstvy v blízkosti cievnych stien. Ide o hemodynamický jav, ktorý prispieva k reologickým vlastnostiam krvi prúdiacej v mikrocievach. Napríklad pomáha pri tlačení tvrdších objektov, ako sú biele krvinky a krvné doštičky, na stenu cievy, aby sa neustále "vzorkoval" endotel na ochorenie a prasknutie. Taktiež moduluje účinky zachytávania oxidu dusnatého červenými krvinkami a môže viesť k heterogénnej distribúcii krvných buniek v mikrovaskulárnych sieťach [37]. Preto má detailné pochopenie tohto javu veľký význam pre komplexné chápanie hemodynamiky v mikrocirkulácii. Dostupné štúdie zaoberajúce sa danou oblasťou, zároveň poskytujú užitočné informácie pre validáciu výpočtového modelu.

Bezbunková vrstva sa zvyčajne vytvára v blízkosti úzkych cievnych stien (približne do priemeru 300 μm). V dôsledku vysokých šmykových napätí rozvinutých okolo steny a parabolického profilu rýchlosti, majú deformovateľné RBC tendenciu migrovať do stredu cievy, čo následne vedie k tvorbe tenkej vrstvy pri stene cievy, ktorá neobsahuje krvné bunky. Naopak, biele krvinky, ktoré sú tuhšie než RBC, ako aj tuhšie RBC sa lokalizujú skôr v blízkosti CFL.



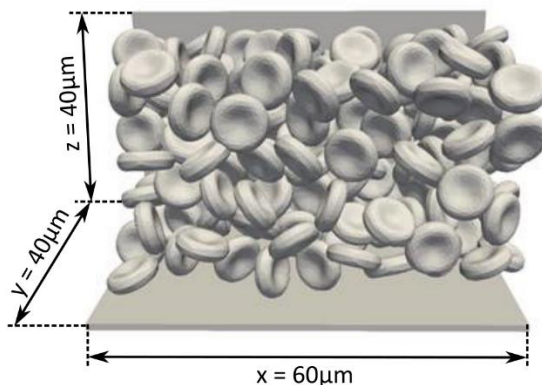
Obr. 5.1: Schematické znázornenie tvorby bezbunkovej vrstvy.

Za posledné desaťročie sa zvýšil záujem o preskúmanie tohto javu využitím mikrofluidických techník. Podľa [50] šírka CFL vo všeobecnosti klesá so zvyšujúcim sa hematokritom (Hct). Toto potvrdzujú aj v [51] a ako kľúčový faktor asymetrie trajektórií a hrúbky bezbunkovej vrstvy uvádzajú práve deformovateľnosť buniek. Práca [52] sa zaoberá skúmaním vplyvu rôznej membránovej tuhosti RBC a rôznej objemovej frakcie týchto tuhých RBC na adhéziu bielych krviniek (WBC) v prietoku krvi.

Na získanie kvantitatívneho porozumenia dynamiky krvných buniek je potrebné preskúmať hromadné správanie červených krviniek, ktoré sú primárne charakterizované svojou elasticitou. Napriek všeobecne známemu vplyvu deformovateľnosti RBC na bezbunkovú vrstvu, doposiaľ nie sú účinky straty elasticity krviniek na CFL uspokojivo objasnené. Pochopenie týchto procesov môže poskytnúť užitočný pohľad na patológiu mnohých ochorení, pri ktorých sa vyskytuje zníženie deformovateľnosti krviniek.

5.2. Popis simulačných experimentov

Všetky simulácie prebiehali v simulačnom boxe s kvádrovým tvarom, ktorý bol uzavretý so štyrmi stenami paralelnými so smerom toku tekutiny (v smere osi x). V tomto smere boli zabezpečené periodické vlastnosti tekutiny, čo umožňovalo zníženie výpočtovej náročnosti aj pre simulácie s väčším počtom buniek. Rozmery simulačného boxu boli $60 \times 40 \times 40 \mu\text{m}$ (Obr. 5.2).



Obr. 5.2: Geometria simulačného boxu.

Tekutina bola diskretizovaná do trojrozsomernej mriežky s priestorovým krokom $1 \mu\text{m}$. Kinematická viskozita tekutiny bola $1.0 \text{ m}^2/\text{s}$ a hustota bola $1000 \text{ kg}/\text{m}^3$. Koeficient prenosu síl bol 1.1549 . Na uvedenie toku do pohybu boli použité externé sily s hodnotami, ktoré zabezpečili objemový prietok približne $5 \mu\text{m}^3/\mu\text{s}$. Bunky boli reprezentované povrchovou sieťou s 374 uzlami, s priemerom $7.82 \mu\text{m}$ a objemom $90.75 \mu\text{m}^3$. Interakcie medzi bunkami boli modelované použitím nakalibrovaných MC parametrov ($a = 0.01$, $n = 1.0$, $d_{cut} = 0.4$). Interakcie medzi bunkami a stenami kanála boli modelované použitím *soft-sphere* potenciálu s parametrami $\text{soft}_a = 0.0001$, $\text{soft}_n = 1.2$, $\text{soft}_{cut} = 0.1$.

Na modelovanie buniek s rôznou tuhosťou sme použili štyri rôzne sady elastických koeficientov a ich numerické hodnoty sú zosumarizované v Tab. 5.1. Jednotlivé sady sú označené podľa naťahovacieho koeficientu (k_s), ktorý má na deformovateľnosť bunky najväčší vplyv. Sady s označením ks00056 a ks0007, bežne používané v našich simuláciách, zodpovedajú deformovateľnosti zdravých červených krviniek. Sada ks00127 predstavuje tuhšiu infikovanú bunku a ks1 hraničnú možnosť v simuláciách, kedy bunka predstavuje tuhý objekt. Na Obr. 5.3 je pre ilustráciu znázornené vizuálne porovnanie deformovateľnosti použitých buniek pri vynútenej interakcii s prekážkou.

Tab. 5.1: Elastické koeficienty buniek použitých v simuláciách.

Parametre	ks00056	ks0007	ks00127	ks1
koef. pružnosti (k_s)	0.0056 mN/m	0.007 mN/m	0.0127 mN/m	1.0 mN/m
koef. ohybu (k_b)	$0.006 \times 10^{-15} \text{ Nm}$	$0.01 \times 10^{-15} \text{ Nm}$	$0.01 \times 10^{-15} \text{ Nm}$	$1 \times 10^{-15} \text{ Nm}$
koef. zachov. lokálnej plochy (k_{al})	0.01 mN/m	0.01 mN/m	0.01 mN/m	1.0 mN/m
koef. zachov. celkovej plochy (k_{ag})	0.7 mN/m	0.7 mN/m	0.7 mN/m	1 mN/m
koef. zachov. objemu (k_v)	0.9 kN/m ²	900 N/m ²	900 N/m ²	1000 N/m ²



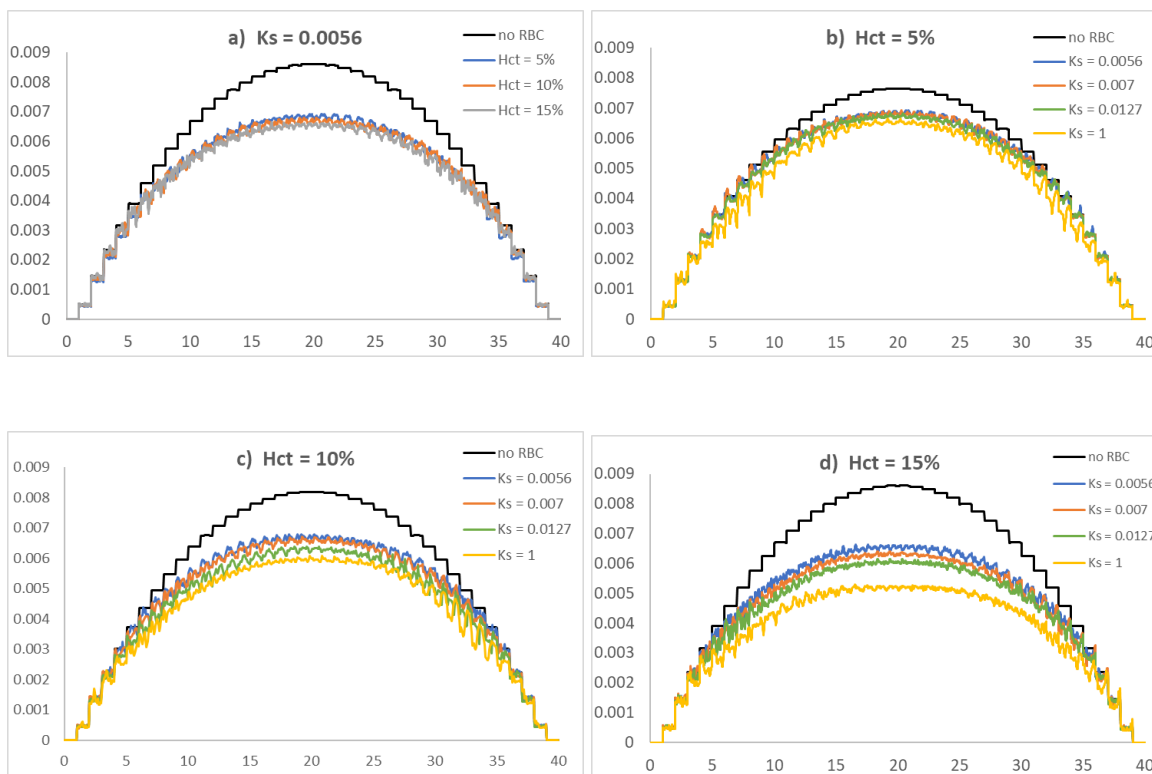
Obr. 5.3: Vizualizácia rôznej elasticity buniek použitých v simuláciách. a) Porovnanie buniek s podobnou elasticitou ks00056 (červená) a ks0007 (modrá). b) Porovnanie elasticity infikovanej - ks00127 (zelená) a tuhej - ks1 (biela) bunky voči zdravej bunke - ks00056 (červená).

Testovali sa toky s 5%, 10% a 15% hematokritom ($Hct, \% vol_{RBC}/vol_{TOTAL}$) pre všetky štyri sady elastických koeficientov. V jednotlivých simuláciách mali všetky bunky rovnaké elastické vlastnosti z príslušnej sady koeficientov. Bunky boli do simulačného boxu naseedované náhodným rozmiestnením a natočením, pričom pre všetky simulácie s rovnakým Hct mali bunky rovnaké počiatočné pozície.

V priebehu simulácií boli v pravidelných intervaloch zaznamenávané informácie o bunkách (každých 1000 krokov), pričom simulačný krok bol $0.05 \mu s$. Zaznamenávané informácie o každej bunke boli: simulačný krok, polohový vektor centra bunky, vektor rýchlosti centra bunky a pozičné vektory okrajových bodov bunky.

5.3. Rýchlostné profily

Po uvedení toku do pohybu bežali simulácie dostatočne dlhý čas potrebný na dosiahnutie ustáleného stavu, ktorý bol charakterizovaný časovo nezávislým rýchlostným profilom. Na Obr. 5.4 sú zobrazené axiálne rýchlosti tekutiny merané v smere osi y v polovičnej výške kanála. Vidíme rýchlostné profily s parabolickým priebehom typické pre Poiseuilleove laminárne toky, pri ktorých rýchlosť kvapaliny na stenách kanála je nulová a narastá do maximálnej hodnoty v strede kanála. Tekutina je v simuláciách uvedená do pohybu externou silou a prostredníctvom rovnice 2.21 je zabezpečený prenos síl z tekutiny na bunky. Tento prenos je obojstranný, z čoho vyplýva zníženie axiálnej rýchlosti toku v prítomnosti buniek oproti čistej tekutine (na Obr. 5.4 je znázornená čiernou farbou). Vplyv zväčšujúceho sa hematokritu na rýchlostné profily pre bunky s najväčšou elasticitou je zobrazený na Obr. 5.4 (a).



Obr. 5.4: Rýchlostné profily, závislosť x-ovej zložky rýchlostného vektora [m/s] od priemeru kanála [μm]. (a) Porovnanie rýchlostných profilov tokov so zdravými bunkami ($k_s = 0.0056$) pre rôzne úrovne hematokritu pri použití rovnakej externej sily. (b) Rýchlostné profily tokov pre $\text{Hct} = 5\%$, (c) pre $\text{Hct} = 10\%$ a (d) pre $\text{Hct} = 15\%$ pre hodnoty k_s 0.0056, 0.007, 0.0127 a 1.0. Čierne krivky predstavujú parabolický profil plazmy bez prítomnosti RBC.

Zaznamenali sme významný vplyv elasticity buniek na rýchlosť tekutiny. Čím sú bunky tuhšie, tým viac znižujú maximálnu rýchlosť toku. Tento efekt je tým významnejší čím je objemový podiel buniek v tekutine vyšší. V súlade s týmto sa v centrálnej oblasti mikrokanála zistilo podstatné zníženie rýchlosti pre všetky objemové frakcie, pričom k najväčšiemu zníženiu došlo pri $\text{Hct} = 15\%$ (Obr. 5.4 (b) a Obr. 5.4 (c)). Pri tuhších bunkách pozorujeme profily laminárneho toku s takmer plochou rýchlosťou v strede, čo naznačuje rovnomernejšie rozloženie jadra buniek naprieč kanálom. Okrem toho sa ploché rýchlostné profily rozširujú ku stenám pre väčšie hodnoty Hct , čo znamená širšie jadro RBC a menšia hrúbka CFL.

Pri jednotlivých simuláciách bola tekutina uvedená do pohybu externými silami tak, aby objemový prietok pre všetky použité hematokrity a bunky zo sady $ks00056$ bol približne $5 \mu\text{m}^3/\mu\text{s}$, pričom pre simulácie s rovnakým Hct bola použitá externá sila s rovnakou veľkosťou.

Medzi objemovým prietokom a parametrom externej sily je pri bežných laboratórnych rýchlostiach lineárna závislosť [22] a konkrétne hodnoty boli stanovené interpoláciou z kalibračných simulácií s bunkami typu ks00056. V Tab. 5.2 sú uvedené numerické hodnoty objemových prietokov a maximálnych rýchlostí tekutiny získané zo simulácií.

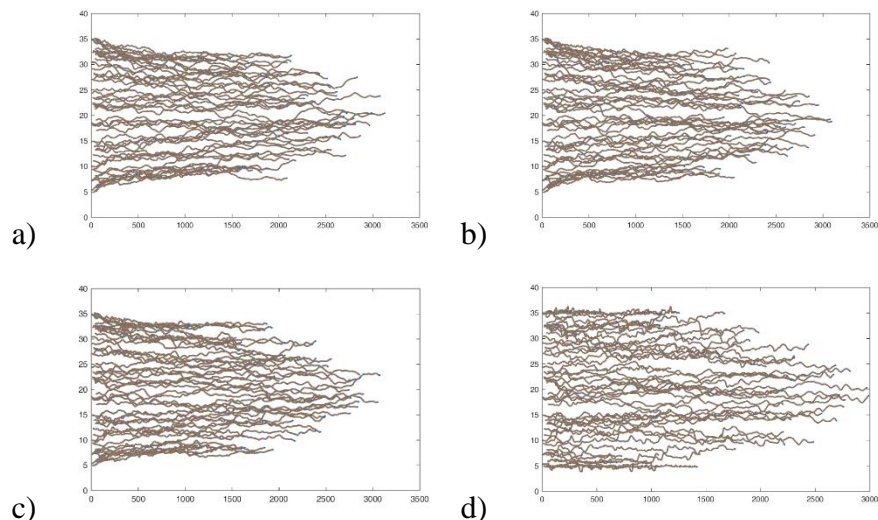
Tab. 5.2: Prehľad objemových prietokov (Q) a max. rýchlostí pre rôzne úrovne hematokritu a všetky štyri sady elastických koeficientov.

	Hct = 5%		Hct = 10%		Hct = 15%	
	ext_force = 0.000072		ext_force = 0.000077		ext_force = 0.000081	
	Q [$\mu\text{m}^3/\mu\text{s}$]	w _{max} [m/s]	Q [$\mu\text{m}^3/\mu\text{s}$]	w _{max} [m/s]	Q [$\mu\text{m}^3/\mu\text{s}$]	w _{max} [m/s]
bez RBC	5.28	0.0077	5.64	0.0082	5.94	0.0086
ks00056	5.06	0.0070	5.01	0.0068	5.05	0.0065
ks0007	5.04	0.0069	5.01	0.0067	4.91	0.0062
ks00127	5.00	0.0068	4.82	0.0064	4.69	0.0060
ks1	4.65	0.0066	4.45	0.0061	4.08	0.0053

5.4. Trajektórie buniek

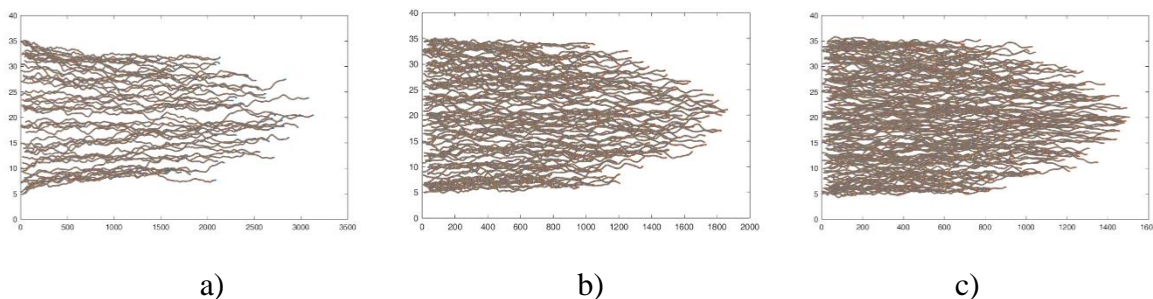
Štúdia [53], v ktorej sa porovnávali trajektórie bunky ovplyvnené iba jej počiatočným natočením a prúdovými líniami krvnej plazmy s trajektóriami ovplyvnenými medzibunkovými interakciami, poukazuje na veľký vplyv medzibunkových interakcií v podmienkach mnohobunkových systémov. Naším cieľom je preskúmať vplyv deformovateľnosti bunky na zmenu trajektórií pri rôznych hematokritoch s hodnotami 5%, 10% a 15%.

Obr. 5.5 znázorňuje priebeh simulácie z-súradníc centier buniek pri Hct = 15% pre všetky štyri sady elastických koeficientov. Nezávislá premenná je x-ová súradnica polohového vektora. Z vizuálneho porovnania grafov je zrejماً väčšia tendencia lokalizácie buniek do stredovej oblasti kanála pre bunky s najväčšou elasticitou. Táto tendencia so zvyšovaním tuhosti buniek klesá. Pre bunky zo sady ks1 (Obr. 5.5(d)) je možné pozorovať, že vzdialenosti okrajových RBCs ostávajú v priebehu celej simulácii konštantné. Rovnaké správanie buniek bolo možné pozorovať pre všetky hematokrity.



Obr. 5.5: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre $Hct = 15\%$ a všetky štyri sady elastických koeficientov: (a) ks00056, (b) ks0007, (c) ks00127, (d) ks1. Nezávislá premenná je x-ová súradnica buniek.

Pri porovnaní trajektórií centier buniek s rovnakou elasticitou pre rôzne Hct (Obr. 5.6) je vidieť, že so zvyšovaním Hct sa viditeľne znižuje hrúbka CFL. Kvantitatívne vyhodnotenie CFL je bližšie popísané v Kap. 5.5.



Obr. 5.6: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre bunky s elasticitou ks00056 a pre všetky tri úrovne hematokritu: (a) $Hct = 5\%$, (b) $Hct = 10\%$, (c) $Hct = 15\%$. Nezávislá premenná je x-ová súradnica.

Euklidovské vzdialenosti

Bunky boli do simulačného boxu naseedované náhodným rozmiestnením a natočením, pričom pre všetky simulácie s rovnakým Hct mali bunky rovnaké počiatočné pozície, aby bolo možné skúmať vplyv rôznej deformovateľnosti buniek na ich správanie v rámci konkrétneho hematokritu.

Našou snahou je porovnať dve rôzne trajektórie tej istej bunky s rôznymi elastickými vlastnosťami. Pre tieto účely využijeme štandardnú euklidovskú vzdialenosť. Každá trajektória P sa skladá z n bodov meraných v časoch $\{t_1, t_2, \dots, t_n\}$. Môžeme ju vyjadriť ako postupnosť n trojrozmerných bodov $P = \{P_1, P_2, \dots, P_n\}$, pričom $P_i = [x_i, y_i, z_i]$. Z algebraického hľadiska môžeme trajektóriu P prezentovať dvojrozmernou maticou \mathbf{P} :

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1 & x_2 & \dots & x_n \\ y_1 & y_2 & \dots & y_n \\ z_1 & z_2 & \dots & z_n \end{pmatrix}. \quad (5.1)$$

Dve trajektórie P^1 a P^2 porovnáme pomocou vektora euklidovských vzdialeností medzi ich bodmi

$$\mathbf{d} = (d(P_1^1, P_1^2), d(P_2^1, P_2^2), \dots, d(P_n^1, P_n^2)). \quad (5.2)$$

Z algebraického hľadiska vytvoríme rozdielovú maticu \mathbf{U} s riadkami \mathbf{u}_i ,

$$\mathbf{U} = (\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots, \mathbf{u}_3) = \mathbf{P}^1 - \mathbf{P}^2 = \begin{pmatrix} x^1 - x^2 \\ y^1 - y^2 \\ z^1 - z^2 \end{pmatrix}. \quad (5.3)$$

Súradnice vektora $\mathbf{d} = (d_1, d_2, \dots, d_n)$ predstavujú euklidovské veľkosti stĺpcov rozdielovej matice \mathbf{U} :

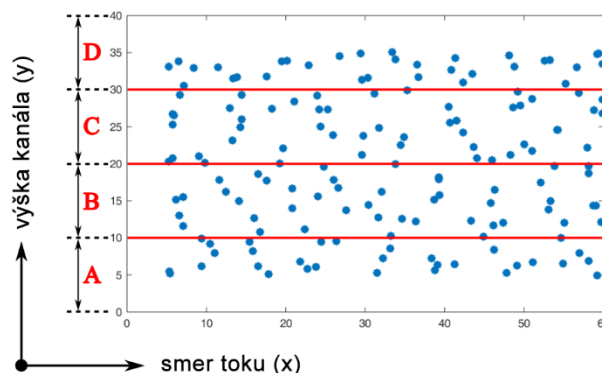
$$d_i = |\mathbf{u}_i| = \sqrt{(x_i^1 - x_i^2)^2 + (y_i^1 - y_i^2)^2 + (z_i^1 - z_i^2)^2}. \quad (5.4)$$

Pre určenie miery odlišnosti dvoch trajektórií použijeme aritmetický priemer súradníc vektora \mathbf{d} :

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i. \quad (5.5)$$

Pre porovnávanie trajektórií sme ako štandard zvolili bunky s najväčšou elasticitou zo sady ks00056, voči ktorým sme porovnávali bunky z ostatných setov elastických koeficientov. Teda \bar{d} predstavuje priemer súradníc vzdialenostného vektora vždy tej istej bunky (s rovnakým počiatočným seedingom) v dvoch rôznych simuláciách. Zaujímala nás aj miera odlišnosti trajektórií buniek lokalizovaných bližšie pri stenách voči tým, ktoré sú v stredovej časti kanála. Preto sme kanál rozdelili pozdĺžne na štyri rovnaké oblasti v smere z-ovej súradnice. Jednotlivé

oblasti sú označené ako A, B, C a D, pričom oblasť A predstavuje spodnú štvrtinu kanála a D najvrchnejšiu štvrtinu ako je to znázornené na Obr. 5.7. Bunky boli rozdelené do vytvorených oblastí na základe z-ových súradníc ich centier pri počiatocnom seedingu (interval v μm - oblasť A: $\langle 0,10 \rangle$, oblasť B: $\langle 10,20 \rangle$, oblasť C: $\langle 20,30 \rangle$, oblasť D: $\langle 30,40 \rangle$).



Obr. 5.7: Trajektórie centier buniek (z-ové súradnice) pre bunky s elasticitou ks00056 a pre všetky tri úrovne hematokritu: (a) Hct = 5%, (b) Hct = 10%, (c) Hct = 15%. Nezávislá premenná je x-ová súradnica.

Hodnoty v Tab. 5.3 vyjadrujú priemer všetkých hodnôt d' , ktoré určujú vzdialenosť medzi trajektóriami buniek s rovnakým počiatocným seedingom (v oblasti A a B) v simuláciách so zvýšenou tuhosťou buniek voči simuláciám so zdravými bunkami. Výsledky z oblastí C a D vzhľadom na osovú symetriu neuvádzame.

Tab. 5.3: Hodnoty vyjadrujú priemer všetkých hodnôt d' pre bunky z oblasti kanála A a B. Pre porovnanie trajektórií sa použili polohové vektory z 9070 zaznamenaných simulačných cyklov, čo predstavuje hodnotu n .

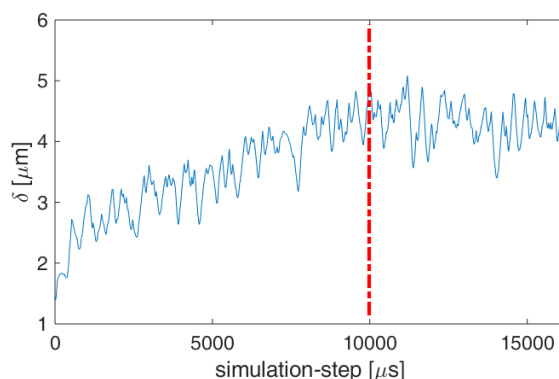
Hct = 5%	ks00056 a ks0007	ks00056 a ks00127	ks00056 a ks1
oblasť A	33.4425	75.9003	227.7332
oblasť B	30.8247	58.5822	163.2905
Hct = 10%	ks00056 a ks0007	ks00056 a ks00127	ks00056 a ks1
oblasť A	40.8615	50.1321	119.5161
oblasť B	30.2567	48.6564	100.6939
Hct = 15%	ks00056 a ks0007	ks00056 a ks00127	ks00056 a ks1
oblasť A	31.3572	47.7766	108.3397
oblasť B	25.1766	46.2808	98.3065

Do výsledných priemerných vzdialeností sa vo veľkej miere premieta odlišná vzdialenosť (v smere osi x), ktorú bunky s rôznou elasticitou v priebehu simulácie dosiahli. Toto je spôsobené najmä vplyvom rôzne deformovateľných buniek na rýchlostný profil, ako už bolo

ukázané. Dôsledkom toho je, že najrýchlejšia bunka zo setu ks00056 pre $Hct = 15\%$ prešla vzdialenosť približne $2493 \mu\text{m}$ a tá istá bunka zo setu ks1 prešla vzdialenosť len $1313 \mu\text{m}$.

5.5. Bezbunková vrstva (CFL)

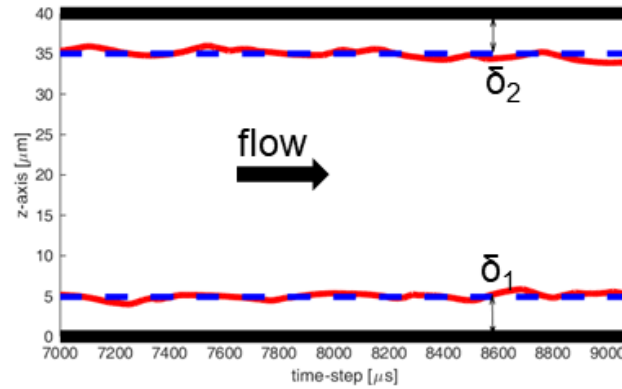
Šírka alebo hrúbka vrstvy bez buniek sa môže definovať ako vzdialenosť medzi stenou mikrokanálu a hraničnou oblasťou jadra červených krviniek. Bunky boli naseedované do celého objemu simulačného boxu s náhodnými pozíciami centier buniek a rotáciou, pričom pri seedingu bola vzdialenosť okrajových buniek od stien kanála pre jednotlivé simulácie v rozpätí $1.0\text{-}1.2 \mu\text{m}$. Aj laboratórne experimenty vykazujú určitú nenulovú počiatočnú CFL v stave bez prítomnosti prítoku v dôsledku entropického odpudzovania medzi RBC a stenou kanála, napríklad v dôsledku bráneného rotačného pohybu [31]. Hrúbka CFL sa meria po ustálení toku, kedy už nedochádzalo k zmene jej hrúbky. Na Obr. 5.8 je ukázaný vývoj hrúbky CFL v závislosti od simulačného kroku pre prípad $Ht = 15\%$ a ks00056. Červenou čiarou je znázornená oblasť kedy CFL dosiahla plató.



Obr. 5.8: Vývoj hrúbky CFL v závislosti od simulačného kroku pre prípad $Ht = 15\%$ a ks00056. Zaznamenával sa každý 1000. simulačný krok. Červená čiara označuje oblasť, od ktorej sa merala CFL.

Hodnoty hrúbky CFL predstavujú priemernú vzdialenosť okrajových bodov hraničných buniek od spodnej (δ_1) a vrchnej (δ_2) steny kanála v smere osi z , tak ako je to zobrazené na Obr. 5.9.

Jednotlivé hodnoty δ_N sa získali premietnutím vrcholov buniek do roviny $x\text{-}y$ a boli merané v každom simulačnom kroku ($0.05 \mu\text{m}$) pozdĺž smeru prúdenia tekutiny. V Tab. 5.4 sú uvedené hodnoty δ , ktoré boli získané spriemerovaním δ_1 a δ_2 .



Obr. 5.9: Príklad hrúbky CFL pre Ht = 5% a ks00056.

V súlade s biologickými experimentami, hrúbka CFL so zvyšujúcim sa hematokritom klesá. Výnimkou sú simulácie s úplne tuhými bunkami (zo sady ks1), ktoré nevytvárajú žiadnu CFL. V tomto prípade uvedené hodnoty δ predstavujú počiatočnú vzdialenosť buniek od stien kanála, ktorá sa v priebehu simulácií prakticky nemení. Z Tab. 5.4 je taktiež evidentný vplyv deformovateľnosti buniek na tvorbu CFL: čím sú bunky tuhšie, tým sa znižuje hrúbka CFL. Pre prípad 15% Hct a ks00056 je δ približne 4.1 μm , pričom na Obr. 5.6(c) je viditeľný už len malý odklon trajektórii od stien kanála. Všimnite si, že na obrázku sú zobrazené trajektórie centier buniek a nie okrajové body buniek, z ktorých sa vypočítava hrúbka CFL. Do hodnoty 4.1 μm sa do určitej miery premieta natočenie okrajových buniek.

Tab. 5.4: Hrúbky CFL (δ) v μm pre hematokrit 5, 10 a 15% a všetky štyri sady elastických koeficientov. δ predstavuje priemernú hodnotu z δ_1 a δ_2 .

Hct	ks00056	ks0007	ks00127	ks1
5%	5.46	5.03	4.63	1.25
10%	4.01	3.33	3.26	1.13
15%	2.98	2.46	1.86	1.09

Simulované CFL sú v čiastočnej zhode s tými, ktoré sa nachádzajú v experimentoch in vitro a in vivo. Dostupné experimentálne údaje však vykazujú značný rozptyl, ktorý neumožňuje veľmi prísne kvantitatívne porovnanie. Napríklad v [37] sú uvedené hrúbky CFL z niekoľkých experimentálnych štúdií pre kanál s priemerom 40 μm a Hct 16-20% v rozmedzí od 3.5 až 5.3 μm . Pre 15% Hct uvádzajú hodnotu CFL zo simulačného modelu 5.1 μm . V [37] uviedli in-

vivo meraní CFL pre cievu s priemerom 40 približne $3.5 \mu\text{m}$ pri $\text{Hct} = 16\%$. Hrúbka CFL získaná našim výpočtovým modelom, ktorú je možné porovnať s uvedenými hodnotami, je $4.1 \mu\text{m}$. Zodpovedá výsledku simulácie pre prípad $\text{Hct} = 15\%$ a zdravým dobre deformovateľným bunkám (ks00056). Dôvodov pre menšiu hodnotu CFL v porovnaní s experimentálnymi údajmi môže byť viacero.

V [37] sú rozobraté dôvody významného rozptylu dostupných výsledkov in-vivo meraniach CFL. Podľa autorov zmeny v priemere ciev môžu lokálne meniť prietok krvi, a tým ovplyvniť merania CFL. V [54] odhadli potenciálnu chybu v meraniach CFL na približne 10% v dôsledku zmeny priemeru cievy. Variácie v priemere ciev môžu ovplyvniť migráciu erytrocytov smerom k stredu cievy, čo je hlavný mechanizmus pre rozvoj CFL. Okrem toho migrácia erytrocytov silne závisí od dĺžky cievy a nerovnomernosti prietoku v dôsledku bifurkácií v blízkosti cievy. Dĺžka cievy nebola špecifikovaná v experimentoch a nemusí byť dostatočne dlhá na to, aby umožnila erytrocytom plne migrovať do centra cievy a vytvoriť stabilné jadro toku. V takomto prípade by hrúbky CFL namerané v in-vivo experimentoch mohli vykazovať menšie hodnoty v porovnaní s tými zo simulácií. V simuláciách sa použili periodické okrajové podmienky v smere prúdenia toku, ktoré umožňujú dosiahnutie úplnej migrácie RBCs. Obmedzenie v tomto smere predstavuje len výpočtová náročnosť simulácií hustých suspenzií, ktorá je určujúcim faktorom pre dosiahnutie dostatočne dlhých simulácií. Okrem toho sa pri in-vivo meraniach pracuje s reálnym hematokritom krvi, na úrovni 40-45% , čo je mimo rozsah tejto štúdie.

5.6. Zhrnutie

Pri vývoji výpočtového modelu je nevyhnutnou súčasťou tohto procesu jeho dôkladná validácia. Na validáciu hromadných vlastností sme skúmali hemodynamický jav vyskytujúci sa v užších cievach, a to tvorbu bezbunkovej vrstvy pri stenách. Krvný tok v mikrokanáli bol simulovaný s rôzne tuhými bunkami a pre tri rôzne úrovne hematokritu. Výsledky potvrdzujú zvýšenú migráciu buniek od stien kanála ku jeho stredu, čoho výsledkom je vytvorenie CFL v blízkosti stien. Uvedené výsledky, v súlade s biologickými experimentami, potvrdzujú znižovanie hrúbky CFL so zvyšujúcim sa hematokritom. Taktiež bol potvrdený vplyv deformovateľnosti buniek na CFL. Pri porovnaní našich výsledkov s výsledkami z in-vitro resp. in-silico experimentov, sme zaznamenali istý nesúlad. Avšak experimentálne hodnoty CFL vykazujú značný rozptyl, ktorý neumožňuje veľmi prísne kvantitatívne porovnanie. Vyvinutý model je

schopný zachytiť základné hromadné vlastnosti prietoku krvi. Okrem toho sme analyzovali vplyv rôznej deformovateľnosti buniek na ich pohyb v mikrokanáli. To môže byť užitočné pre ďalšiu štatistickú analýzu alebo na určenie, ako dobre simulovaný model zodpovedá experimentu, ale tiež na kontrolu nezrovnalostí medzi samotnými experimentmi.

6. Marginalizácia poškodených RBC

Pri vytváraní CFL môžu deformovateľné RBC vytlačiť tuhšie krvné bunky z jadra toku smerom k oblasti CFL. Dochádza k transportu tuhších buniek ku stenám a ich následnej kumulácii. Tento proces, známy ako marginalizácia, bol s využitím mikrofluidického zariadenia prvý krát demonštrovaný pre maláriu infikované červené krvinky v [55]. Lokalizácia tuhších infikovaných krviniek v blízkosti CFL bola využitá na ich separáciu pomocou systému bočných vývodov. Strata elasticity červených krviniek sprevádza okrem malárie aj mnohé iné choroby, napríklad kosáčiková anémia, cukrovka, leukémia, a ďalších, preto sa výskumu a detekcii takto poškodených RBC venuje v súčasnej biomedicíne veľká pozornosť [56].

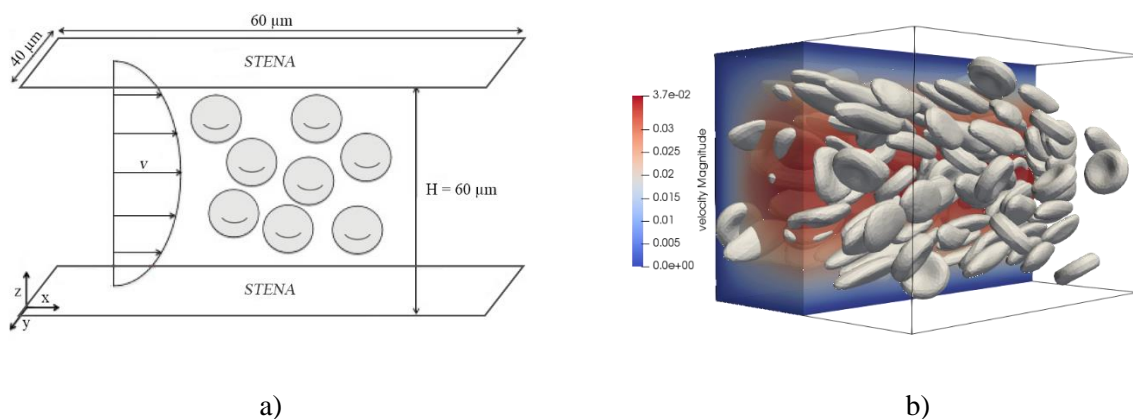
Z biologického hľadiska je významná aj marginalizácia ďalších krvných buniek, bielych krviniek a krvných doštičiek [43, 57]. Tie sa zvyčajne nachádzajú vo zvýšenej koncentrácii v blízkosti cievnych stien, čo je kľúčový faktor pre fyziologickú reakciu na zápal alebo poškodenie cievnej steny. Predpokladá sa, že zvýšená tuhosť bielych krviniek a krvných doštičiek oproti červeným krvinkám hrá dôležitú úlohu pri ich marginalizácii. Svoju úlohu však zohrávajú aj odlišnosti v tvaroch a veľkostiach.

Ďalšou významnou oblasťou, ktorá sa zaoberá marginalizáciou častíc je aj vývoj liekov najmä v oblasti liečby rakoviny. Spoločným cieľom takýchto častíc sú cievne steny, takže v tomto kontexte musí mať ideálna častica na dodávanie liečiva tendenciu k segregácii smerom k stenám [58]. Preto je optimalizácia vlastností častíc na dodávanie liečiva pre lepšie zacielenie (tvarom, veľkosťou a deformovateľnosťou) sám o sebe zaujímavým problémom.

V tejto štúdii sme sa zamerali na heterogénnu zmes zloženú zo zdravých dobre deformovateľných krviniek a poškodených krviniek so zvýšenou membránovou tuhosťou. Analyzovali sme radiálnu migráciu poškodených buniek v závislosti od ich objemového podielu v zmesi, úrovne tuhosti a rýchlosti tekutiny. Overovali sme, či sa v našom modeli vyskytuje marginalizácia poškodených krviniek v dostatočnej intenzite, a či rôzne faktory ovplyvňujúce tento proces vykazujú očakávané trendy.

6.1. Popis simulačných experimentov

Simulácie boli realizované v rovnakom simulačnom boxe ako experimenty popísané v predchádzajúcej kapitole (Kap. 5.2) a numerické parametre tekutiny boli nastavené na štandardných hodnotách (Kap. 3.2.1). Schematicky je geometria kanála zobrazená na Obr. 6.1(a). Simulovaná suspenzia však obsahovala zmes buniek s dvomi odlišnými elastickými vlastnosťami. Jednu časť tvorili zdravé dobre deformovateľné RBC a druhú časť tuhšie RBC s obmedzenou deformovateľnosťou. Hematokrit bol 15%, čo pri použití buniek so štandardnými vlastnosťami (Kap. 3.2.1) predstavuje 154 buniek. Z tohto množstva v jednotlivých simuláciách tvorilo 20%, 40%, 60%, 80% a 100% poškodených buniek. Teda, objemový podiel zdravých elastických buniek v zmesi (X_Z) sa menil medzi hodnotami 0 a 1, pričom $X_Z = 0$ zodpovedá čistej suspenzii tuhých buniek a $X_Z = 1$ zodpovedá čistej suspenzii zdravých buniek. Podobne môžeme vyjadriť objemový podiel poškodených buniek X_P . Ďalej budeme používať písmeno „P“ na označenie poškodených (tuhých resp. tuhších) buniek a písmeno „Z“ na označenie zdravých dobre deformovateľných buniek.



Obr. 6.1: a) Schematické znázornenie simulačných experimentov. b) Ukážka zo simulácie so zobrazením rýchlosti tekutiny.

Vykonalí sme tri základné sety simulácií, set s meniacim sa objemovým podielom poškodených buniek, meniacou sa rýchlosťou tekutiny a meniacou sa elasticitou bunkovej membrány. Bunky boli do simulačného boxu rozmiestnené s náhodnou pozíciou a rotáciou, avšak v jednotlivých setoch mali bunky rovnaké počiatočné rozmiestnenie aj natočenie. Napríklad v simuláciách s 20% a 40% poškodených buniek, mali všetky bunky v oboch simuláciách rovnaké počiatočné súradnice svojich povrchových bodov, ale rozdielnemu počtu buniek bola nastavená zmenená

elasticita. Okrem týchto simulácií boli spustené aj kontrolné simulácie, ktoré mali rovnaké vstupné nastavenia, ale odlišné (náhodné) počiatočné rozmiestnenie buniek. Parametre, ktoré sa v jednotlivých simuláciách menili sú prehľadne zosumarizované v Tab. 6.1.

Využitie povrchovej siete buniek s 374 uzlami a diskretizácie tekutiny 1 μm , pri rozmeroch kanála $60 \times 40 \times 40 \mu\text{m}$, predstavuje približne 960 000 výpočtových uzlov. Každá zo simulácií bola paralelizovaná na 48 jadrách a bežala na klastri ŽU po dobu 10 dní.

Tab. 6.1: Špecifikácia parametrov v rôznych simulačných setoch.

$k_s(\mathbf{Z})$	$k_s(\mathbf{P})$	X_Z	$v_{max} [\text{ms}^{-1}]$	$Re [-]$
0.005	1.00	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1	0.037	0.50
0.005	0.30	0.8	0.037	0.50
0.005	0.03	0.8	0.037	0.50
0.005	1.00	0.8	0.072	1.00
0.005	1.00	0.8	0.005	0.07

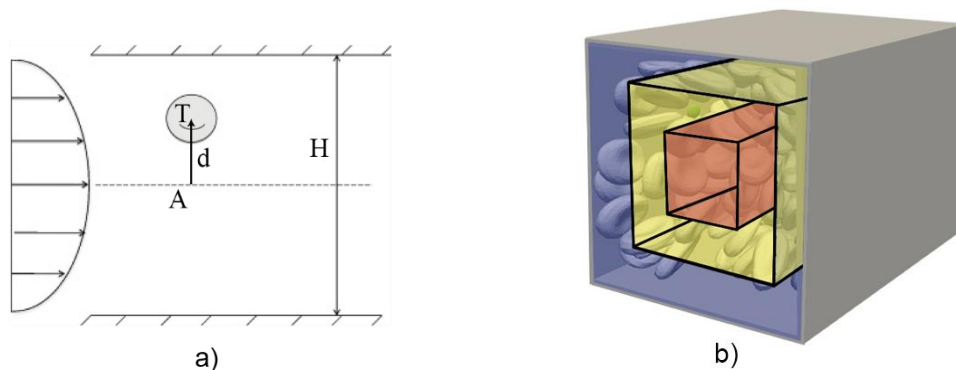
6.2. Metódy spracovania výsledkov

Zameriavame sa na radiálnu migráciu, tzn. migráciu v smere šmykového gradientu, tuhých buniek. Na charakterizáciu tohto rozdelenia častíc použijeme priemernú absolútnu vzdialenosť ťažiska bunky od hlavnej osi kanála \bar{d} . Ak ťažisko bunky označíme ako T a jeho kolmý priemet na hlavnú os kanála ako A , potom d vypočítame podľa vzťahu

$$d = \|T - A\| = \sqrt{(T_x - A_x)^2 + (T_y - W/2)^2 + (T_z - H/2)^2}, \quad (6.1)$$

kde W je šírka a H výška kanála ($W = H = 40 \mu\text{m}$). Následne v každom simulačnom kroku vypočítame priemernú hodnotu pre zdravé krvinky, poškodené a aj pre všetky bunky spolu.

Táto charakteristika nám však neposkytuje podrobné informácie o skutočnom rozdelení buniek v priečnom smere. Na kvantifikáciu tejto skutočnosti použijeme časový vývoj počtu ťažísk buniek (n_P) v pozdĺžnych oblastiach. Celý objem kanála rozdelíme na niekoľko koaxiálnych oblastí pozdĺž stredovej osi toku, tak ako je to schematicky znázornené na Obr. 6.2(b). Vzniknuté koaxiálne objemy sa vyznačujú variabilitou šmykovej rýchlosti a lokálneho hematokritu. Analyzujeme prechody poškodených červených krviniek medzi týmito vytvorenými oblasťami v závislosti od objemového podielu poškodených krviniek, miery ich deformovateľnosti a rýchlosti toku.



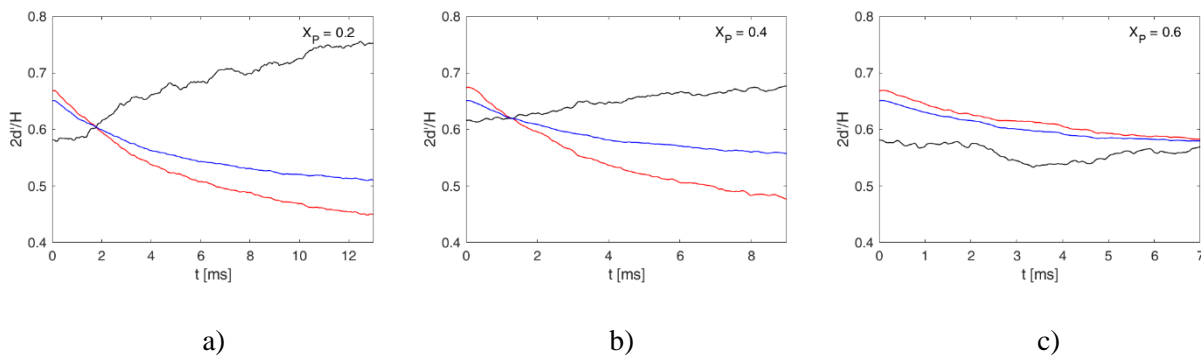
Obr. 6.2: a) 2-D znázornenie vzdialenosti ťažiska bunky od hlavnej osi kanála (d). b) Schematické rozdelenie kanála na koaxiálne oblasti.

Na kvantifikovanie podielu buniek preskupených do periférnych oblastí kanála sa používa marginalizačný pomer (označovaný tiež ako percento marginalizácie). Ide o pomer počtu marginalizovaných častíc v CFL ku celkovému počtu suspendovaných častíc rovnakého druhu. Vzdialenosť od steny kanála, ktorú musí bunky dosiahnuť, aby bola označená za marginalizovanú časticu, závisí od podmienok experimentu, preto nie je jednoznačne špecifikovaná. V našom prípade budeme za takúto oblasť považovať okrajovú koaxiálnu oblasť.

6.3. Výsledky a diskusia

6.3.1. Vplyv objemového podielu poškodených buniek na radiálnu migráciu

Analýza vplyvu objemového podielu poškodených buniek v krvnej suspenzii bola realizovaná z výsledkov zo sady simulácií s meniacou sa hodnotou X_P v rozmedzí 0 až 1. Z časového vývoja priemernej vzdialenosti tuhých buniek od hlavnej osi kanála (Obr. 6.3) vyplýva, že ak sú poškodené bunky v menšom pomernom zastúpení oproti zdravým, majú tendenciu migrovať do periférnych oblastí (čierna krivka). Naopak, hodnoty \bar{d} pre zdravé bunky (červená krivka) klesajú, čo naznačuje migráciu elastických buniek do stredovej časti kanála. Iná situácia nastáva, keď poškodené bunky tvoria majoritnú zložku suspenzie. V takomto prípade nie je viditeľný žiadny trend v migrácii poškodených buniek.

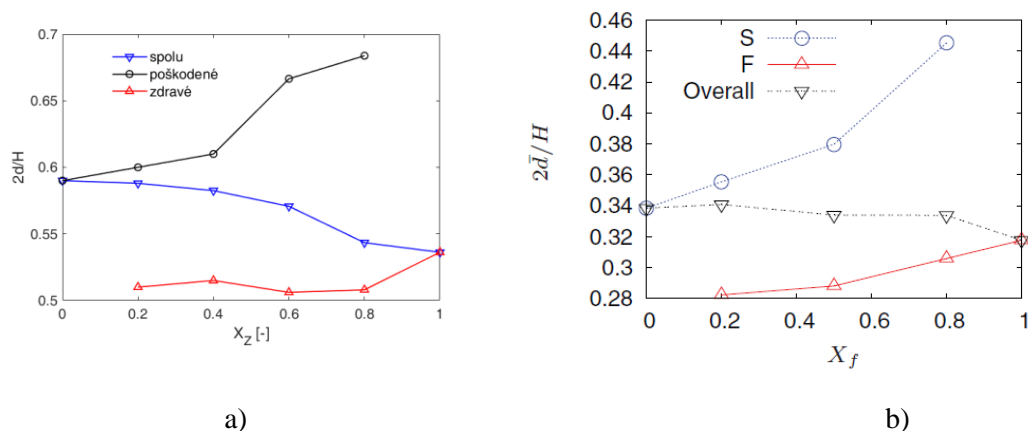


Obr. 6.3: Časový vývoj priemernej vzdialenosti buniek od hlavnej osi kanála \bar{d} normovanej na výšku kanála pre rôzne objemové podiely v percentuálnom zastúpení a) 20%, b) 40% a c) 60% tuhých buniek. Čierna krivka - poškodené bunky, červená krivka - zdravé bunky, modrá krivka - všetky bunky spolu.

Ďalej zosumarizujeme výsledky pre priemernú vzdialenosť tuhých buniek od hlavnej osi kanála \bar{d} pri všetkých hodnotách skúmaných X_Z (Obr. 6.4(a)). Z obrázku sú zrejmé dva trendy. Prvým je, že sa \bar{d} pre zdravé aj pre poškodené bunky zvyšuje so zvyšujúcim sa X_Z , hoci \bar{d} pre celú suspenziu so zvyšujúcim sa X_Z klesá. Pri zvyšovaní podielu zdravých buniek sa suspenzia stáva v priemere deformovateľnejšou a ako sme ukázali v predchádzajúcej kapitole zväčšuje sa hrúbka CFL a bunky majú v priemere väčšiu tendenciu migrovať do stredu kanála. Preto má suspenzia ako celok nižšie \bar{d} . Alternatívna interpretácia vyššie uvedeného pozorovania je, že so zvyšujúcim sa podielom zdravých buniek sa tuhšie posúvajú smerom k stene, zatiaľ čo, so zvyšujúcim sa podielom tuhších buniek sa elastické bunky posúvajú smerom k stredovej línii.

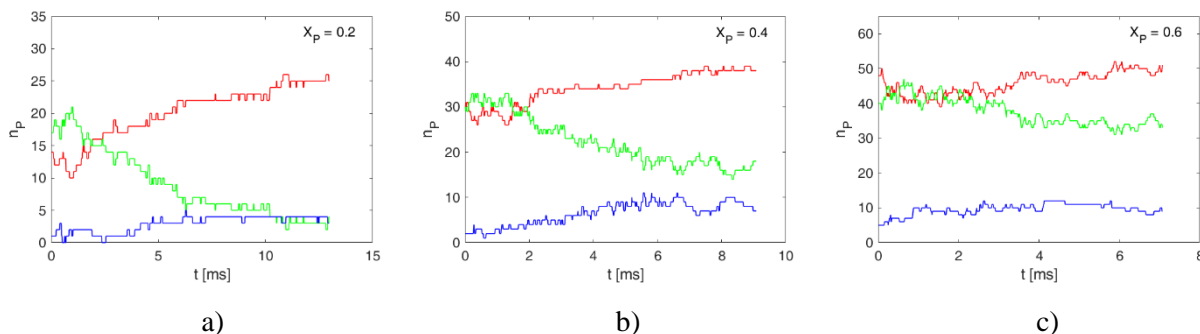
Druhé pozorovanie sa týka rýchlosti nárastu alebo poklesu \bar{d} daného druhu s meniacou sa frakciou iných druhov: Rýchlosť nárastu \bar{d} poškodených buniek je rýchlejšia so zvyšujúcim sa X_Z , ako je rýchlosť poklesu \bar{d} zdravých buniek s klesajúcim X_Z .

Pri porovnaní výsledkov z nášho výpočtového modelu a výsledkov z [45] (Obr. 6.4) je evidentná zhoda v trendoch. Odlišnosti môžeme pozorovať v hodnotách normovanej \bar{d} . V našom prípade poškodené bunky predstavujú tuhé objekty, ktoré sa lokalizujú tesne pri stenách kanála. Zatiaľ čo v [45] ide o častice so zníženou elasticitou, ktoré majú tendenciu sa lokalizovať v blízkosti vytvorenej bezbunkovej vrstvy a tým vykazujú menšiu priemernú vzdialenosť od centrálnej osi.

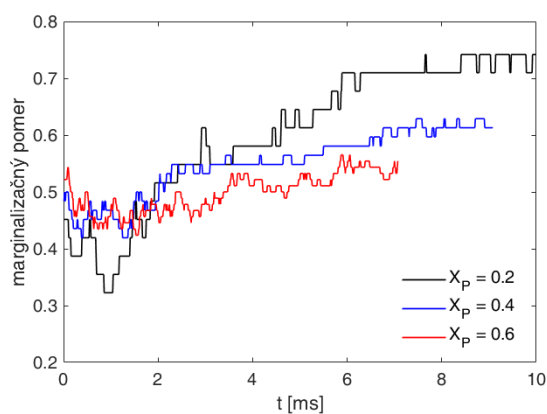


Obr. 6.4: Rovnovážny stav \bar{d} ako funkcia X_z pre zdravé a poškodené bunky. Pre porovnanie sú uvedené výsledky a) z nášho výpočtového modelu a b) z Kumar et al. 2011 [45] (pôvodný obrázok). Legenda: S - tuhšie častice, F - elastické, Overall - spolu.

Na získanie ďalších poznatkov o distribúcii častíc je na Obr. 6.5. časový priebeh migrácie poškodených buniek vyjadrený počtom buniek v jednotlivých koaxiálnych oblastiach. Vo všetkých prípadoch X_P je vidieť nárast počtu buniek v stredovej oblasti kanála, čo naznačuje, že častice sú unášané smerom k stredovej línii. Toto správanie je konzistentné s výsledkami suspenzií tuhých častíc v [59]. Po určitom čase začnú tuhé bunky opúšťať stredovú oblasť a migrovať smerom ku okrajom. Pri všetkých troch hodnotách X_P je viditeľný proces marginalizácie. Na porovnanie, ako rýchlo dochádza k preskupeniu tuhých buniek v blízkosti stien kanála v prípadoch ich rozdielného zastúpenia v zmesi je na Obr. 6.6 zobrazený vývoj marginalizačného pomeru. Z výsledkov je možné vyvodit' záver, že rýchlosť marginalizácie klesá so zvyšujúcim sa podielom poškodených buniek. V prípade, keď sa tuhé bunky stali majoritnou zložkou v zmesi ($X_P = 0.6$), ide len o veľmi pozvoľne prebiehajúci proces. Na začiatku simulácie bolo v okrajovej koaxiálnej oblasti približne polovicu tuhých buniek a po 6 ms sa v tejto oblasti vyskytuje približne 55% zo všetkých tuhých buniek.



Obr. 6.5: Časový vývoj počtu tuhých buniek v troch koaxiálnych oblastiach pre rôzne objemové podiely v percentuálnom zastúpení a) 20%, b) 40% a c) 60% tuhých buniek. Červená krivka predstavuje n_P v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.

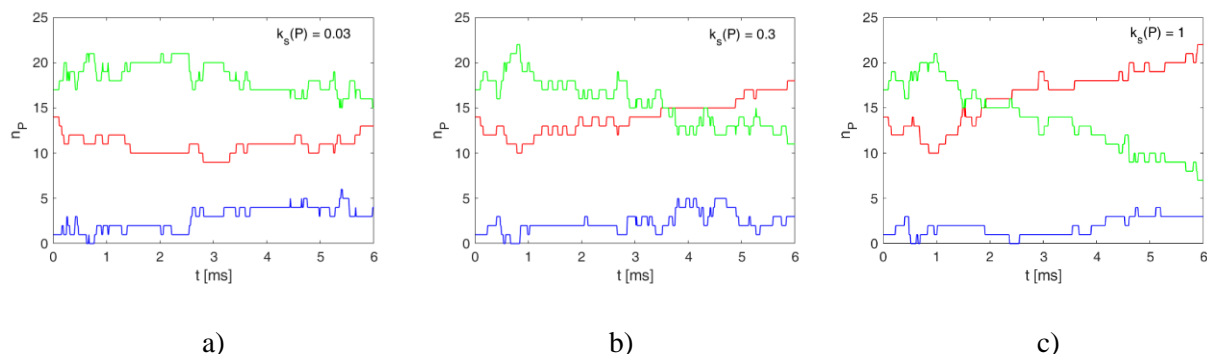


Obr. 6.6: Vývoj marginalizačného pomeru v čase pre suspenzie s rôznym objemovým podielom poškodených buniek.

6.3.2. Vplyv elasticity bunky na radiálnu migráciu

Skúmali sme tri rôzne úrovne tuhosti poškodených buniek pri ich 20% zastúpení v zmesi. Pri $k_s(P)=0.03$ (Obr. 6.7(a)) dochádza k presunu poškodených buniek do stredovej oblasti kanála, čo sa odráža na zvyšujúcich sa hodnotách n_P v stredovej oblasti (modrá krivka) za súčasného poklesu v prostrednej oblasti (zelená krivka). V tomto prípade nepozorujeme žiadnu migráciu smerom ku stenám kanála. V [46] autori uvádzajú, že už pri pomerne malých zmenách elasticity membrány dochádza k marginalizácii poškodených buniek, pričom nie je kvantifikovaná zmena elasticity. Z našich výsledkov nie je možné vysloviť jednoznačný záver, či zníženie elasticity v prípade $k_s(P)=0.03$ (Obr. 6.7(a)) nie je postačujúce na marginalizáciu poškodených buniek, alebo je potrebná niekoľko násobne dlhšia simulácia. Na základe dosiahnutých výsledkov pre

poškodené bunky s vyššou tuhosťou, však môžeme vyvodit' záver, že zväčšujúca sa tuhosť bunky urýchľuje preskupenie poškodených buniek do okrajových oblastí.

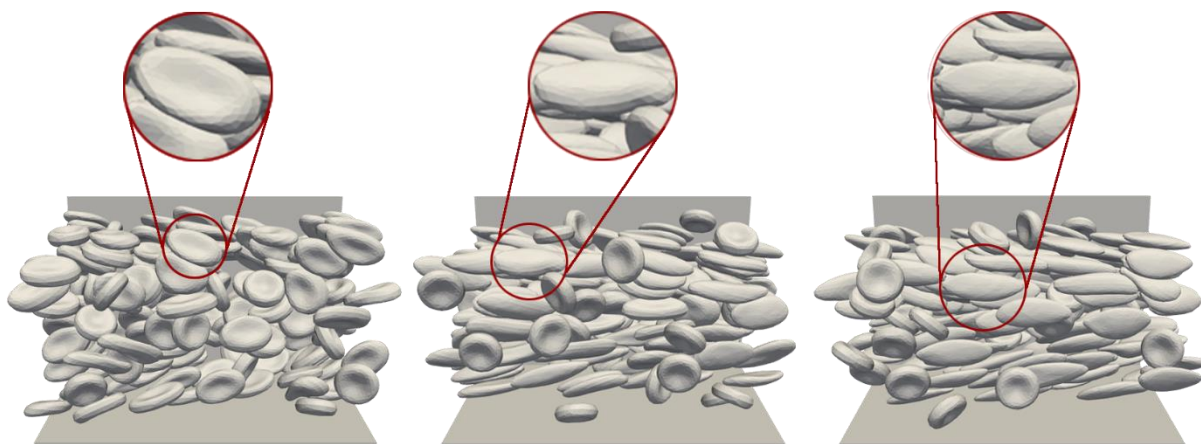


Obr. 6.7: Časový vývoj počtu poškodených buniek s rôznou elasticitou v troch koaxiálnych oblastiach. Objemový podiel tuhých buniek je 20%. Červená krivka predstavuje n_p v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.

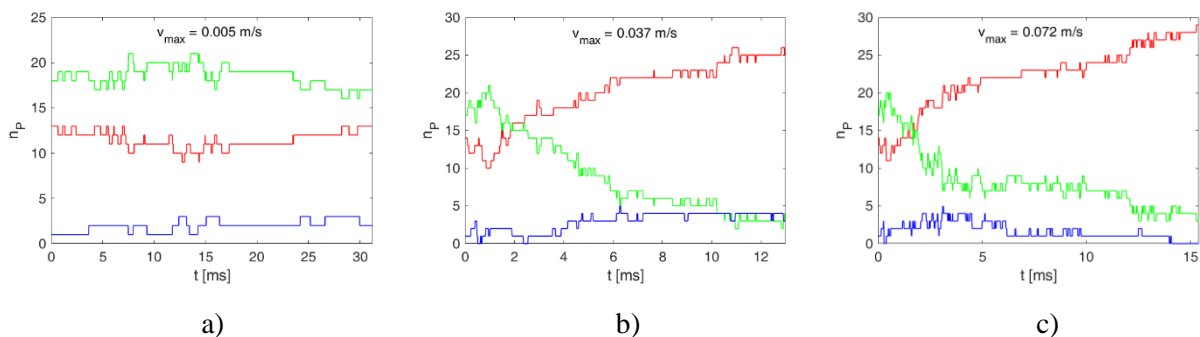
6.3.3. Vplyv rýchlosti toku na radiálnu migráciu tuhých buniek

Na skúmanie vplyvu rýchlosti tekutiny na marginalizáciu poškodených buniek sme využili simulácie s $X_Z = 0.8$ a $k_s(P) = 1$, ktoré boli spustené pri troch rôznych rýchlostiach tekutiny, pričom hodnoty maximálnej rýchlosti boli 0.005, 0.037 a 0.072 m/s. Na porovnanie, krv tečúca v aorte (najväčšej cievy v ľudskom tele) dosahuje rýchlosť približne 0.33 m/s a v najužších cievnych kapilárach prúdi približne 1000-násobne pomalšie. Na Obr. 6.8 je ukázaný vplyv rýchlosti tekutiny na rozsah zdeformovania buniek pri použitých rýchlostiach.

Ako bolo diskutované v Kap. 4.4.1, pri nízkych rýchlostiach toku sa elastické bunky deformujú len v obmedzenej miere a ich správanie je viac podobné správaniu tuhých častíc. Zmes zdravých a poškodených buniek vystupuje skôr ako suspenzia zložená z homogénnych častíc. Preto je možné marginalizačný proces pozorovať len pri vyšších rýchlostiach toku. Toto správanie je možné pozorovať na vývoji n_p v čase pri najpomalšom toku (Obr. 6.9(a)), kedy v relatívne dlhej simulácii nepozorujeme žiadnu zvýšenú migráciu tuhých buniek ku stenám kanála. K rovnakému záveru dospeli aj autori v [46, 43]. Z porovnania rýchlejších tokov (Obr. 6.9(b) a (c)) si môžeme všimnúť, že pri väčšej rýchlosti toku sa urýchľuje uvoľňovanie stredovej oblasti kanála od tuhých buniek, ktoré sú vytláčané z tejto oblasti.



Obr. 6.8: Ukážka deformovania červených krviniek účinkom rôznej rýchlosti tekutiny. Snímky pochádzajú zo simulácií s $Hct = 15\%$, $X_Z = 0.8$, $k_s(P) = 1$ a max. rýchlosti toku sú (zľava doprava) 0.005, 0.037 a 0.072 m/s.



Obr. 6.9: Časový vývoj počtu tuhých buniek (celkom 31) v troch koaxiálnych oblastiach pre a) $v_{max} = 0.005$ m/s, b) $v_{max} = 0.037$ m/s a c) $v_{max} = 0.072$ m/s. Červená krivka predstavuje n_P v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.

6.4. Zhrnutie

Rozsiahle simulácie odhaľujú rad funkcií distribúcie častíc v uzavretých mnohobunkových systémoch:

- V binárnych suspenziách častíc rovnakej veľkosti s rozdielnou elasticitou povrchovej membrány tuhšie bunky marginalizujú, ak sú zriedenou zložkou, zatiaľ čo zdravé dobre deformovateľné bunky majú tendenciu migrovať ku stredu kanála.
- Rýchlosť marginalizácie tuhších buniek klesá so zväčšujúcim sa podielom ich zastúpenia v suspenzii.

- Zväčšujúca sa tuhosť bunkovej membrány poškodených buniek urýchľuje marginalizačný proces.
- Marginalizácia krvných buniek sa vyskytuje len pri vyšších rýchlostiach a so zvyšovaním rýchlosti toku rastie stupeň marginalizácie.

7. Záver

Sledovaním hromadných vlastností toku krvi sme nadviazali na predchádzajúce úlohy nášho výskumného tímu, ktoré sa do veľkej miery sústreďovali na nastavovanie a overovanie vlastností červenej krvinky, prioritne zamerané na elasticitu ako jej primárnej vlastnosti. To, či model krvinky s danými elastickými koeficientami zodpovedá reálnej krvinke sa doteraz porovnávalo len so záznamom jednej krvinky, prípadne priemernej hodnoty pre jednu krvinku. V predloženej práci sme sa zaoberali analýzou hromadných vlastností toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach a skúmali sme faktory, ktoré ich ovplyvňujú, využitím štatistík citlivých na ich zmenu.

Prostredníctvom vybraných hemodynamických javov sme v rámci validácie modelu skúmali vplyv deformovateľnosti buniek na hrúbku bezbunkovej vrstvy pri rôznych úrovniach objemového podielu RBC v toku. Analyzovali sme vplyv deformovateľnosti buniek na ich trajektórie a rýchlostné profily. Tiež sme sa zaoberali radiálnou migráciou poškodených buniek v závislosti od ich objemového podielu v zmesi, úrovne elasticity povrchovej membrány a rýchlosti tekutiny.

Samotnému výskumu mnohobunkových systémov na rozsiahlych simuláciách predchádzala kalibrácia a analýza medzibunkových interakcií. Pomocou implementovanej detekcie prekrytia sme skúmali vzájomné správanie buniek. Bola vytvorená metodika kalibrácie medzibunkových interakcií - navrhnutý kalibračný experiment, verifikačné experimenty, ako aj postup vymedzenia platnej oblasti zvolených interakčných parametrov a postup spracovania výsledkov. Celý proces kalibrácie je ukázaný na konkrétnom prípade pre bežne využívaný model bunky a pre zadané štandardné simulačné podmienky.

Pri dokončovaní práce sa ukázalo veľa možností, ako pokračovať v ďalšom výskume. Ľudská krv má 40-45% hematokrit. V našom výskume sme sa zaoberali hematokritom do 15%, čím sme pokryli zloženie krvi v úzkych cievach. Smerovanie ďalšieho výskumu môže byť zamerané na zvyšovanie hematokritu za účelom modelovania reálneho zloženia krvi. Simulácie takto hustých suspenzií sú však výpočtovo extrémne náročné, preto bude potrebné zahrnúť do ďalšieho vývoja modelu aj jeho optimalizáciu.

Zoznam publikácií

- [1] Slavík, M., Kovalčíková, K., Bachratý, H., Bachratá, K., & Smiešková, M. (2018). Processing of Cells' Trajectories Data for Blood Flow Simulation Model. In: *EPJ Web of Conferences* (Vol. 180, p. 02092). EDP Sciences.
- [2] Smiešková, M. (2018). The influence of RBC surface discretization on computer simulation. In: *MIST 2018, Mathematics in Science and Technologies*, [s.l.] (Nemecko): CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018. - ISBN 978-1-9876-0339-2 - s. [1-6]
- [3] Bachratý, H., Bachratá, K., Chovanec, M., Kajánek, F., Smiešková, M., & Slavík, M. (2018, April). Simulation of blood flow in microfluidic devices for analysing of video from real experiments. In: *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 279-289). Springer, Cham.
- [4] Smiešková, M. (2019). Computational model of blood flow and cell-free layer: a validation study. In: *MIST 2019, Mathematics in science and technologies*. [s.l.] (Slovensko) : [s.n.], 2019. - ISBN 9781794002180, s. 73-78
- [5] Smiešková, M., & Bachratá, K. (2019, June). Validation of Bulk Properties of Red Blood Cells in Simulations. In: *2019 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)* (pp. 417-423). IEEE.
- [6] Bachratá, K., Bachratý, H., Smiešková, M. (2019). Genetic constructivism in mathematical preparation of computer science students. In: *ICETA 2019, 17th IEEE International conference on emerging elearning technologies and applications: Information and communication technologies in learning*. ISBN 978-1-7281-4967-7. s. 29-35.
- [7] Bohiniková, A., Maia, I., Smiešková, M., Bugáňová, A., Moita, A., Cimrák, I. & Lima, R. (2020). Assessment of Computational Cell Model Benefits for Optimization of Microfluidic Devices. In: *Proceedings of the 13th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies - Volume 1: BIODEVICES*, ISBN 978-989-758-398-8, pages 280-287.
- [8] Bachratý, H., Bachratá, K., Chovanec, M., Jančígová, I., Smiešková, M., & Kovalčíková, K. (2020). Applications of machine learning for simulations of red blood cells in microfluidic devices. In: *BMC bioinformatics*, 21(2), 1-15.

Publikácie v tlači:

- [1] Smiešková, M., Bachratá, K., Mazza Guimares, I. Calibration of cell-cell interactions in fluid flow for the simulation model. Presentované na *Experimental Fluid Mechanics (EFM) 2018, International conference: Praha, Czech Republic*, November 13-16, 2018.

- [2] Smiešková, M. Effect of the Cell Collision on the Inclination Angle of RBC in a Shear Flow. In: *MIST 2020, Mathematics in science and technologies*.

Zoznam použitej literatúry

- [1] *Cell-in-fluid research group*, <https://cellinfluid.fri.uniza.sk/>, online, prevzaté: január 2020
- [2] TURGEON, Mary Louise. *Clinical hematology: theory and procedures*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [3] PRETINI, Virginia, et al. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in physiology*, 2019, 10: 945.
- [4] AVILA, Kerstin, et al. The onset of turbulence in pipe flow. *Science*, 2011, 333.6039: 192-196.
- [5] CIMRÁK, Ivan; JANČIGOVÁ, Iveta. *Computational Blood Cell Mechanics: Road Towards Models and Biomedical Applications*. CRC Press, 2018.
- [6] KIRBY, Brian J. *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*. Cambridge university press, 2010.
- [7] SON, Younggon. Determination of shear viscosity and shear rate from pressure drop and flow rate relationship in a rectangular channel. *Polymer*, 2007, 48.2: 632-637.
- [8] VIALLAT, Annie; ABKARIAN, Manouk (ed.). *Dynamics of Blood Cell Suspensions in Microflows*. CRC Press, 2019.
- [9] *ESPResSo*, <http://espressomd.org>, online, prevzaté: január 2020
- [10] GitHub, <https://github.com/icimrak/espresso/>, prevzaté: január 2020
- [11] <http://www.vtk.org/>, online, prevzaté: január 2020
- [12] MS Excel, <https://products.office.com/sk-sk/excel>, online, prevzaté: január 2020
- [13] MATLAB, <https://uk.mathworks.com/products/matlab.html>, online, prevzaté: január 2020
- [14] BHAUMIK, S. K.; LAKSHMISHA, K. N. Lattice Boltzmann simulation of lid-driven swirling flow in confined cylindrical cavity. *Computers & fluids*, 2007, 36.7: 1163-1173.
- [15] M. Slavík: Identifikácia simulačného modelu pohybu elastických objektov v toku tekutiny, Dizertačná práca, Žilinská univerzita, 2018
- [16] KOVALČÍKOVÁ, Kristína, et al. Volumetric flow rate in simulations of microfluidic devices. In: *EPJ Web of Conferences*. EDP Sciences, 2018. p. 02046.
- [17] CIMRÁK, Ivan; GUSENBAUER, Markus; JANČIGOVÁ, I. An ESPResSo implementation of elastic objects immersed in a fluid. *Computer Physics Communications*, 2014, 185.3: 900-907.

- [18] BUŠÍK, Martin; CIMRÁK, Ivan. The calibration of fluid-object interaction in immersed boundary method. In: *EPJ Web of Conferences*. EDP Sciences, 2017. p. 02013.
- [19] CIMRÁK, Ivan; GUSENBAUER, Markus; SCHREFL, Thomas. Modelling and simulation of processes in microfluidic devices for biomedical applications. *Computers & Mathematics with Applications*, 2012, 64.3: 278-288.
- [20] BUŠÍK, Martin, et al. Simulation study of rare cell trajectories and capture rate in periodic obstacle arrays. *Journal of Computational Science*, 2016, 17: 370-376.
- [21] BACHRATÝ, Hynek, et al. Methods of exploring the red blood cells rotation during the simulations in devices with periodic topology. In: *2017 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)*. IEEE, 2017. p. 36-46.
- [22] QI, Qin M.; SHAQFEH, Eric SG. Theory to predict particle migration and margination in the pressure-driven channel flow of blood. *Physical Review Fluids*, 2017, 2.9: 093102.
- [23] SMIEŠKOVÁ, Monika; BACHRATÁ, Katarína. Validation of Bulk Properties of Red Blood Cells in Simulations. In: *2019 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)*. IEEE, 2019. p. 417-423.
- [24] KATANOV, Dinar; GOMPPER, Gerhard; FEDOSOV, Dmitry A. Microvascular blood flow resistance: role of red blood cell migration and dispersion. *Microvascular research*, 2015, 99: 57-66.
- [25] BOAS, Liliana Vilas, et al. Assessment of the deformability and velocity of healthy and artificially impaired red blood cells in narrow polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels. *Micromachines*, 2018, 9.8: 384.
- [26] CHUANG, Cheng-Hsi, et al. Collective spreading of red blood cells flowing in a microchannel. *Journal of biomechanics*, 2018, 69: 64-69.
- [27] LEBLE, Vladimir, et al. Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation. *Biomicrofluidics*, 2011, 5.4: 044120.
- [28] PINHO, Diana; YAGINUMA, Tomoko; LIMA, Rui. A microfluidic device for partial cell separation and deformability assessment. *BioChip Journal*, 2013, 7.4: 367-374.
- [29] BENTO, David, et al. Microbubble moving in blood flow in microchannels: Effect on the cell-free layer and cell local concentration. *Biomedical microdevices*, 2017, 19.1: 6.
- [30] MEHRI, Rym; MAVRIPLIS, Catherine; FENECH, Marianne. Red blood cell aggregates and their effect on non-Newtonian blood viscosity at low hematocrit in a two-fluid low shear rate microfluidic system. *PloS one*, 2018, 13.7.
- [31] FEDOSOV, Dmitry A., et al. Multiscale modeling of red blood cell mechanics and blood flow in malaria. *PLoS computational biology*, 2011, 7.12.

- [32] ADEMILOYE, A. S.; ZHANG, L. W.; LIEW, K. M. A multiscale framework for large deformation modeling of RBC membranes. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 2018, 329: 144-167.
- [33] DUPIN, Michael M., et al. Modeling the flow of dense suspensions of deformable particles in three dimensions. *Physical Review E*, 2007, 75.6: 066707.
- [34] NAKAMURA, Masanori; BESSHO, Sadao; WADA, Shigeo. Spring-network-based model of a red blood cell for simulating mesoscopic blood flow. *International journal for numerical methods in biomedical engineering*, 2013, 29.1: 114-128.
- [35] CHESNUTT, J. K. W.; MARSHALL, J. S. Blood cell transport and aggregation using discrete ellipsoidal particles. *Computers & fluids*, 2009, 38.9: 1782-1794.
- [36] RAHIMIAN, Abtin, et al. Petascale direct numerical simulation of blood flow on 200k cores and heterogeneous architectures. In: *SC'10: Proceedings of the 2010 ACM/IEEE International Conference for High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis*. IEEE, 2010. p. 1-11.
- [37] FEDOSOV, Dmitry A., et al. Blood flow and cell-free layer in microvessels. *Microcirculation*, 2010, 17.8: 615-628.
- [38] FEDOSOV, Dmitry A., et al. Predicting human blood viscosity in silico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.29: 11772-11777.
- [39] XU, Dong, et al. Large scale simulation of red blood cell aggregation in shear flows. *Journal of biomechanics*, 2013, 46.11: 1810-1817.
- [40] FALCUCCI, Giacomo, et al. Simulating Soft-Sphere Margination in Arterioles and Venules. *arXiv preprint arXiv:1801.09218*, 2018.
- [41] DAO, M.; LI, J.; SURESH, S. Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte. *Materials Science and Engineering: C*, 2006, 26.8: 1232-1244.
- [42] DAO, Ming; LIM, Chwee Teck; SURESH, Subra. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2003, 51.11-12: 2259-2280.
- [43] ZÁVODSZKY, Gábor, et al. Red blood cell and platelet diffusivity and margination in the presence of cross-stream gradients in blood flows. *Physics of Fluids*, 2019, 31.3: 031903.
- [44] OMORI, Toshihiro, et al. Membrane tension of red blood cells pairwise interacting in simple shear flow. *Journal of biomechanics*, 2013, 46.3: 548-553.
- [45] KUMAR, Amit; GRAHAM, Michael D. Segregation by membrane rigidity in flowing binary suspensions of elastic capsules. *Physical Review E*, 2011, 84.6: 066316.

- [46] KUMAR, Amit; RIVERA, Rafael G. Henríquez; GRAHAM, Michael D. Flow-induced segregation in confined multicomponent suspensions: effects of particle size and rigidity. *Journal of fluid mechanics*, 2014, 738: 423-462.
- [47] ABKARIAN, Manouk; FAIVRE, Magalie; VIALLAT, Annie. Swinging of red blood cells under shear flow. *Physical review letters*, 2007, 98.18: 188302.
- [48] OMORI, Toshihiro, et al. Hydrodynamic interaction between two red blood cells in simple shear flow: its impact on the rheology of a semi-dilute suspension. *Computational Mechanics*, 2014, 54.4: 933-941.
- [49] BENTO, David, et al. Visualization and measurement of the Cell-Free Layer (CFL) in a microchannel network. In: *European congress on computational methods in applied sciences and engineering*. Springer, Cham, 2017. p. 930-936.
- [50] KIM, Sangho, et al. The cell-free layer in microvascular blood flow. *Biorheology*, 2009, 46.3: 181-189.
- [51] FUJIWARA, Hiroki, et al. Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel. *Journal of Biomechanics*, 2009, 42.7: 838-843.
- [52] GUTIERREZ, Mario, et al. Presence of rigid red blood cells in blood flow interferes with the vascular wall adhesion of leukocytes. *Langmuir*, 2018, 34.6: 2363-2372.
- [53] SLAVÍK, Martin, et al. The sensitivity of the statistical characteristics to the selected parameters of the simulation model in the red blood cell flow simulations. In: *2017 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)*. IEEE, 2017. p. 344-349.
- [54] KIM, Sangho, et al. Temporal and spatial variations of cell-free layer width in arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007, 293.3: H1526-H1535.
- [55] HOU, Han Wei, et al. Deformability based cell margination—a simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation. *Lab on a Chip*, 2010, 10.19: 2605-2613.
- [56] KWON, Sangwoo, et al. Biomechanical properties of red blood cells infected by Plasmodium berghei ANKA. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234.11: 20546-20553.
- [57] CHANG, Hung-Yu, et al. Quantifying platelet margination in diabetic blood flow. *Biophysical journal*, 2018, 115.7: 1371-1382.
- [58] MÜLLER, Kathrin; FEDOSOV, Dmitry A.; GOMPPER, Gerhard. Margination of micro- and nano-particles in blood flow and its effect on drug delivery. *Scientific reports*, 2014, 4: 4871.
- [59] NOTT, Prabhu R.; BRADY, John F. Pressure-driven flow of suspensions: simulation and theory. *Journal of Fluid Mechanics*, 1994, 275: 157-199.

- [60] CIMRÁK, Ivan. Effect of dissipative coupling parameter in a computational model on the inclination angle of red blood cells in a shear flow. In: *Proceedings of the 9th International Conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics*. 2018. p. 1-5.