

**ŽILINSKÁ UNIVERZITA V ŽILINE**

---

**AUTOREFERÁT  
DIZERTAČNEJ PRÁCE**

---

**Žilina, máj 2020**

**Mgr. Monika Smiešková**

**Žilinská univerzita v Žiline**  
**Fakulta riadenia a informatiky**

**Mgr. Monika Smiešková**

Autoreferát dizertačnej práce

**Hromadné vlastnosti toku buniek vo výpočtovom modeli pre vývoj  
mikrofluidických zariadení**

---

na získanie akademického titulu „*philosophiae doctor*“ (v skratke PhD.)

v študijnom programe doktorandského štúdia

**aplikovaná informatika**

v študijnom odbore:

**informatika**

Žilina, máj 2020

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na katedre softvérových technológií, Fakulte riadenia a informatiky Žilinskej univerzity v Žiline

- Predkladateľ:** Mgr. Monika Smiešková  
Katedra softvérových technológií  
Fakulta riadenia a informatiky  
Žilinská univerzita v Žiline
- Školiteľ:** doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.  
Katedra softvérových technológií  
Fakulta riadenia a informatiky  
Žilinská univerzita v Žiline
- Školiteľ špecialista:** RNDr. Hynek Bachratý, PhD.  
Katedra softvérových technológií  
Fakulta riadenia a informatiky  
Žilinská univerzita v Žiline
- Oponent:** Prof. Ing. Juraj MIČEK, PhD.  
Katedra technickej kybernetiky  
Fakulta riadenia a informatiky  
Žilinská univerzita v Žiline
- Oponent:** prof. RNDr. Vladimír Janiš, CSc.  
Katedra matematiky  
Fakulta prírodných vied  
Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica

**Autoreferát bol rozoslaný dňa:** .....

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa 17. 8. 2020 o 10:30 h. pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce schválenou odborovou komisiou v **študijnom odbore informatika**, v **študijnom programe aplikovaná informatika**, vymenovanou dekanom Fakulty riadenia a informatiky Žilinskej univerzity v Žiline dňa .....

**Prof. Ing. Karol Matiaško, PhD.**  
predseda pracovnej skupiny odborovej komisie  
študijného programu **aplikovaná informatika**  
v študijnom odbore **informatika**  
Fakulta riadenia a informatiky  
Žilinská univerzita  
Univerzitná 8215/1  
010 26 Žilina

# 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 nadizajnovanie 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) 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 viacero 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.

Na základe zamerania tejto práce sme si stanovili 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 štúdii vo výskume teoretických modelov hromadného správania biologických krvných buniek.

## 2. 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. 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.

Na modelovanie bunkovej membrány je použitá povrchová triangulácia – povrch objektu je pokrytý nepravidelnou trojuholníkovou sieťou. Každý vrchol trojuholníka predstavuje hmotný bod a tieto body sú navzájom prepojené pružinami, čo zabezpečuje elasticitu vnorených objektov. Kvapalina je modelovaná pomocou Lattice-Boltzmannovej metódy, ktorá je založená na diskretizácii priestoru kvapaliny do rovnomerne rozmiestnených bodov v

Eulerovskej mriežke (LB grid). Tekutina je uvedená do pohybu externou silou, ktorá odráža objemový prietok kvapaliny v mikrofluidickom kanáli [1].

Interakcia medzi kvapalinou a vnoreným objektom je zabezpečená metódou vnorenej hranice s disipatívnym spojením (DC-IBM, Dissipative Coupling of Immersed Boundary Method). Vnorené objekty sú charakterizované hranicami, teda vrcholmi ich povrchovej siete, ktoré sa riadia Newtonovou rovnicou pohybu

$$F = m_j * \delta^2 X_j / \delta t^2, \quad (2.1)$$

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 vzťahom:

$$F = F_{jf} + F_{je} + F_{ext}. \quad (2.2)$$

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

$$F_{jf} = \zeta(v - u), \quad (2.3)$$

kde  $\zeta$  je koeficient prenosu síl (friction coefficient).

Na modelovanie medzibunkových interakcií používame *membrane-collision* odpudivý potenciál tvaru  $V(d) = a * 1 / (1 + e^{nd})$  a pre interakcie medzi bunkami a stenou *soft-sphere* potenciál daný rovnicou  $V(d) = a * d^n$  pre  $d < d_{cut}$ . Parameter  $d$  predstavuje vzdialenosť medzi povrchovými uzlami dvoch buniek resp. bunky a steny,  $d_{cut}$  je vzdialenosť, pri ktorej potenciál začne fungovať a parametre  $a$ ,  $n$  určujú priebeh odpudivej sily.

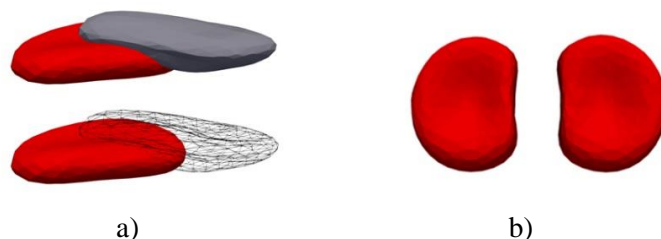
Elastické vlastnosti objektu zabezpečuje päť elastických modulov, pričom každý modul má definovanú silu pôsobiacu na vrcholoch siete. Tri moduly majú lokálny charakter: modul pružnosti (zachovanie dĺžky jednotlivých hrán trojuholníkov), modul ohybu (zachovanie uhlov medzi každou dvojicou susedných trojuholníkov) a modul zachovania lokálnej plochy (zachovanie plochy jednotlivých trojuholníkov povrchovej triangulácie). Zvyšné dva zabezpečujú globálne vlastnosti objektov: modul zachovania celkovej plochy a modul zachovania objemu. Koeficienty elastických modulov, ktorým v použítom softvéri zodpovedajú parametre  $ks$ ,  $kb$ ,  $kal$ ,  $kag$  a  $kv$ . Prostredníctvom týchto koeficientov sa v simuláciách nastavujú požadované elastické vlastnosti buniek.

### 3. Kalibrácia interakcií medzi bunkami

#### 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*. Kalibrovať 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.

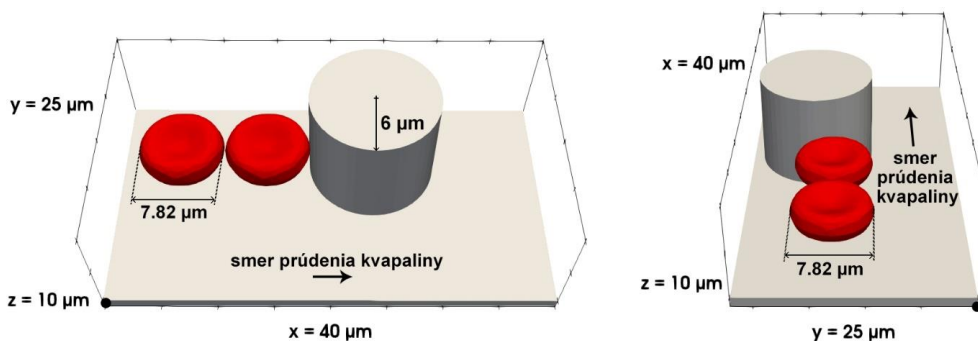
Pri navrhovaní kalibračného procesu sme sa zaoberali otázkami:

- Ako nadizajnovat' 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?

Popri návrhu kalibračného postupu boli uvádzané 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.

## Návrh kalibračného experimentu

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  $\mu\text{m}$   $[14.2, 13.0, 5.0]$ ,  $[6.2, 13.0, 5.0]$  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).

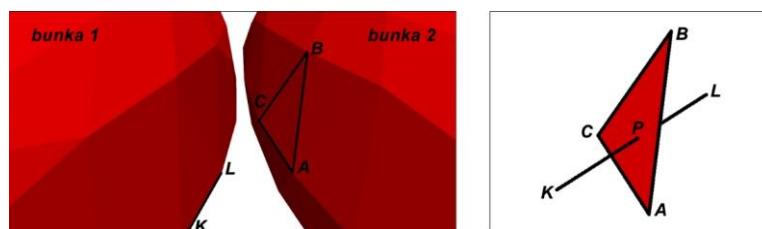


Obr. 3.2: Geometria simulačného boxu kalibračného experimentu.

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.

## Detekcia prekrytia buniek

Pri detekcii prekrytia bunkových membrán sa v každom simulačnom kroku vyhodnocovala vzájomná poloha každej hrany povrchovej siete jednej bunky s každým trojuholníkom susednej bunky.



Obr. 3.3: Detekcia prekrytia buniek

## 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. Uvažujeme 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. Na základe vyššie uvedeného boli navrhnuté dva typy verifikačných experimentov, a to interakcia buniek pred vstupom do úzkeho priestoru a simulácia hustej suspenzie v priamom kanáli bez prekážok

### 3.3. Výsledky kalibrácie

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.

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 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.

### 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 bolo vymedziť oblasť platnosti vybranej sady MC parametrov v závislosti od parametrov, ktoré majú vplyv na medzibunkovú interakciu. Zamerali sme sa na základné simulačné nastavenia, diskretizáciu kvapaliny a simulačný krok. Na základe výsledkov sme za kľúčový faktor určili rýchlosť tekutiny, ktorá nesmie presiahnuť kritickú hodnotu. Zmena diskretizácie kvapaliny, podobne ako simulačný krok, ovplyvňuje medzibunkové interakcie nepriamo, cez malú zmenu rýchlosti, ktorú vyvolávajú.

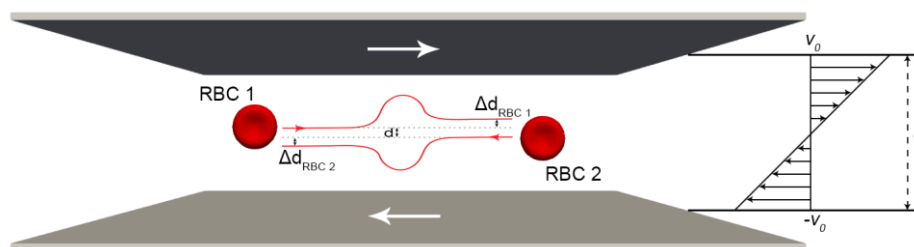
## 4. Kolízia buniek v šmykovom toku

V predchádzajúcej časti sme nastavili parametre medzibunkových interakcií a vo verifikačných simuláciách sme overili ich platnosť z pohľadu zabezpečenia "neprekrývania" 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 [7, 8, 9].

### 4.1. Popis experimentov

Simulačné experimenty prebiehali v dvoch typoch simulačného boxu. 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. Šmykový tok bol iniciovaný nastavením konštantnej horizontálnej rýchlosti  $v_0$  a  $-v_0$  na hornú a dolnú stenu kanála. 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 periodicita toku.

Štúdiá párových kolízií v šmykovom toku sa uskutočňovala taktiež v Couetteovom šmykovom toku, ale s upravenými rozmermi (Kanál II). 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. (Obr. 4.2). Použité rýchlosti  $v_0$  vypočítané zo zvolených šmykových rýchlostí podľa  $v_0 = 2\dot{\gamma}/h$  boli v rozsahu 100 až  $2000 \text{ s}^{-1}$ .

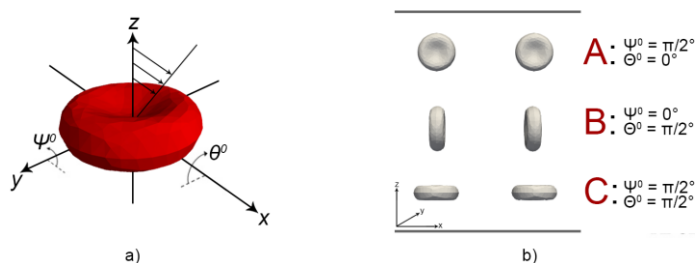


Obr. 4.1: Schéma kolízie dvoch červených krviniek v šmykovom toku.

#### 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  $\Psi^0$  je definovaný ako uhol medzi smerom toku (axiálny smer) a hlavnou osou RBC. Uhol  $\theta^0$  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 počiatkovej orientácie s príslušnými uhlami  $\Psi^0$  a  $\theta^0$ . Pre zjednodušenie sú tieto tri počiatkové orientácie označené ako A, B, C.



Obr. 4.2: Počiatkové natočenie buniek.

## 4.2. 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  $\phi$ , čiže uhlom hlavnej osi bunky vzhľadom na smer toku. K dispozícii sú experimentálne údaje, ktoré kvantifikujú spriemerované hodnoty  $\phi$  za špecifických podmienok. Takéto experimentálne údaje sa môžu použiť na validáciu výpočtových modelov.

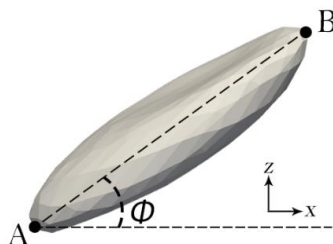
Cieľom tejto štúdie bolo overiť správanie sa RBC v šmykovom toku na základe merania uhla sklonu RBC pri rôznych experimentálnych podmienkach a zistiť vplyv kolízie na uhol sklonu bezprostredne po nej. Najskôr si však rozoberme rôzne prístupy k určovaniu uhla sklonu vo výpočtových modeloch.

### Meranie uhla sklonu RBC

Uhol sklonu bunky bol meraný vzhľadom na smer toku (viď. Obr. 4.3) podľa nasledujúceho postupu:

- 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  $\phi$  podľa nasledujúceho výrazu

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

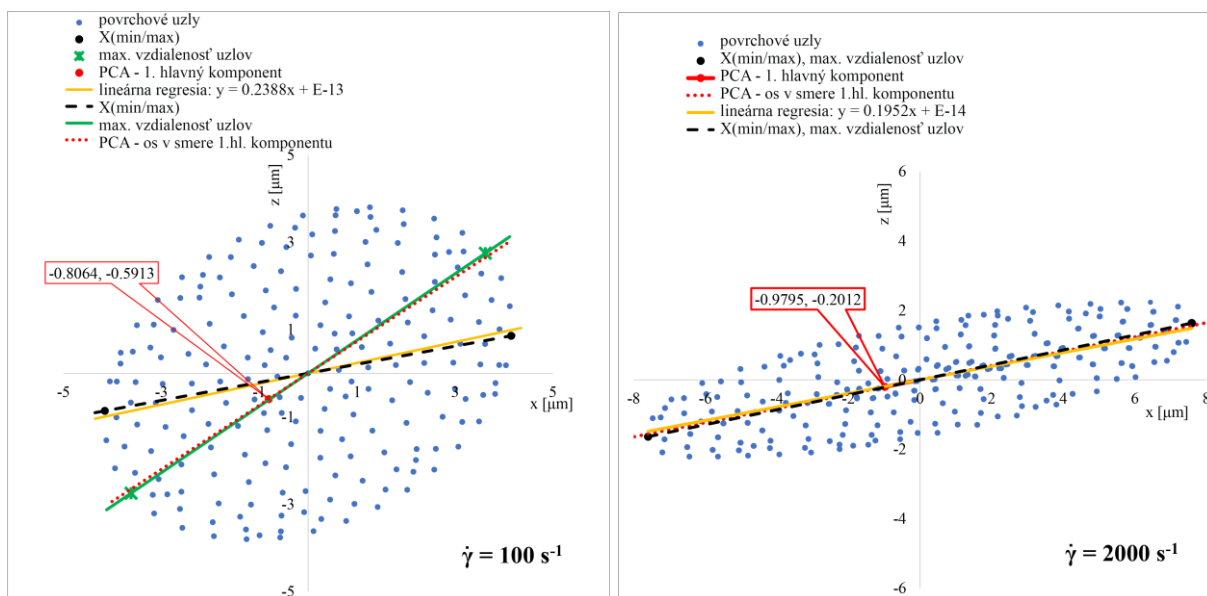


Obr. 4.3: Uhol sklonu bunky vzhľadom na smer toku.

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. 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.
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.
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.

Výsledky sú ukázané na simulačných experimentoch s počiatočným natočením bunky A a s hodnotami šmykovej rýchlosti  $100 \text{ s}^{-1}$  a  $2000 \text{ s}^{-1}$ , kedy sú bunky zdeformované v odlišnej miere. Na Obr. 4.4 sú znázornené x-ové a z-ové súradnice povrchových častíc buniek pre tieto dva prípady a hlavné osi bunky získané so všetkými štyrmi metódami.



Obr. 4.4: 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.

Na základe ďalšej analýzy bola vybraná metóda PCA, ktorá určuje smer hlavnej osi bunky so všetkých povrchových uzlov a najlepšie determinovala spojitý charakter rotačného pohybu.

### Vplyv kolízie na uhol sklonu RBC

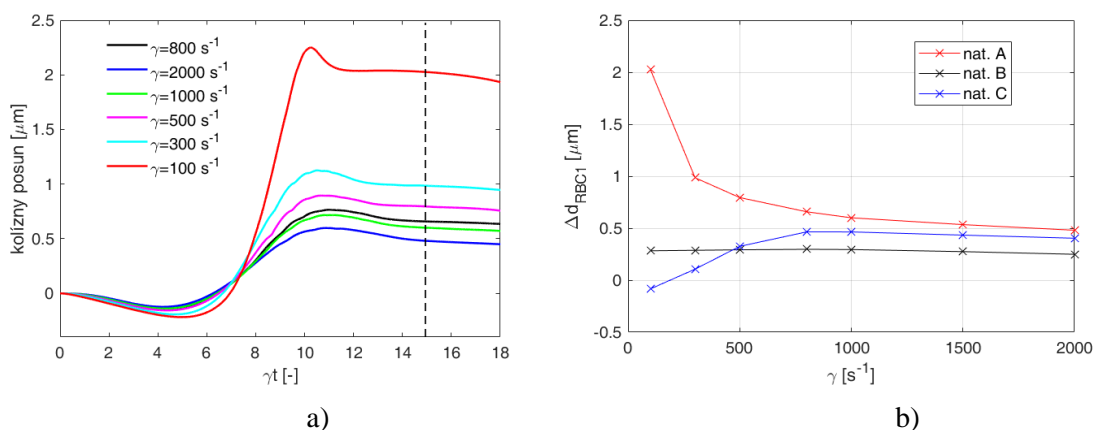
Bunková kolízia ovplyvňuje uhol natočenia bunky v jednoduchom šmykovom toku len veľmi málo. K mierne väčšiemu vplyvu dochádza pri počiatocnom natočení buniek typu B a C, kedy bunky vykazujú kmitavý pohyb.

## 4.3. 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  $\Delta d_{RBC}$  kvantifikuje tento posun na základe rozdielu polohy ťažiska bunky pred a po kolízii. Na hodnotu  $\Delta d_{RBC}$  vplyva viacero faktorov. V tejto štúdií sme sa zamerali na vplyv šmykovej rýchlosti a vplyv elasticity buniek.

### Vplyv šmykovej rýchlosti

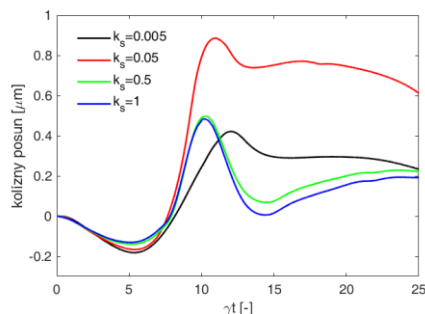
Vplyv šmykovej rýchlosti na priečny posun pred a po kolízii sme skúmali pri hodnotách  $\dot{\gamma}$  v rozmedzí 100 až 2000  $s^{-1}$ , čo predstavuje širokú oblasť rýchlostí v mikrofluidický kanáloch. V prípadoch s nižšou šmykovou rýchlosťou je miera deformácie obmedzená, preto je kolízia v zásade podobná prípadu tuhého objektu. Na Obr. 4.5(a) sú zobrazené trajektórie centier buniek RBC1 voči normovanému času pri všetkých skúmaných šmykových rýchlostiach a pre počiatocné natočenie A. Všeobecne pre natočenie A platí, že so zväčšením šmykovej rýchlosti sa znižuje celkový kolízny posun. Pri počiatocnom natočení B šmyková rýchlosť prakticky neovplyvňuje  $\Delta d$  a pri natočení C dochádza k zväčšovaniu hodnoty  $\Delta d$  do približne  $\dot{\gamma} = 800 s^{-1}$  (Obr. 4.5(b)).



Obr. 4.5: a) Kolízny posun pri šmykovej rýchlosti s hodnotami v rozmedzí 100 až 2000  $s^{-1}$  s elasticitou bunky  $k_s = 0.005$  a počiatocným natočením A. Zvislá prerušovaná čiara označuje okamih, v ktorom sa počítala hodnota  $\Delta d_{RBC1}$ . b) Závislosť celkového posunu po kolízii  $\Delta d_{RBC1}$  od šmykovej rýchlosti pre všetky tri počiatocné natočenia.

## Vplyv elasticity buniek

Na Obr. 4.6 sú zobrazené trajektórie centier buniek RBC1 počas kolízie. Hodnota  $\Delta d_{RBC1}$  elastickej bunky (čierna krivka) je  $0.3 \mu\text{m}$ . Červená krivka predstavuje trajektóriu približne 10-násobne tuhšej bunky, čo rádovo zodpovedá poškodenej biologickej bunke. V tomto režime dochádza k relatívne výraznému kolíznemu posunu ( $\Delta d_{RBC1} = 0.75 \mu\text{m}$ ). Zvýšená tuhosť bunky spôsobuje kombinovaný pohyb rotácie a tank-tradingu. Ďalej je 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.

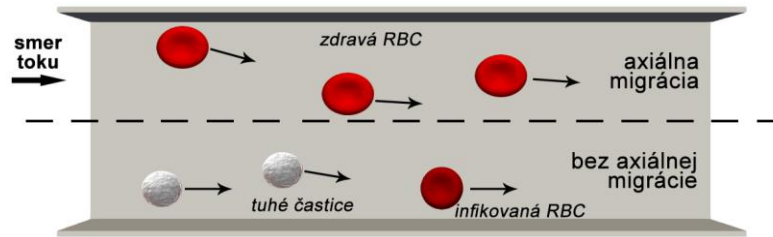


Obr. 4.6: Kolízny posun pre bunky s rôznou elasticitou. Počiatočné natočenie buniek je  $B$  a šmyková rýchlosť je  $1000 \text{ s}^{-1}$ .

## 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 [2, 3, 4].

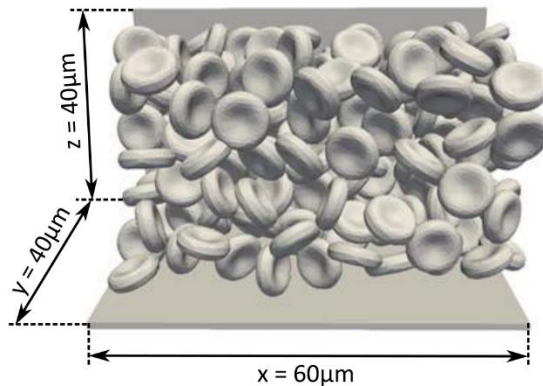
Vytváranie bezbunkovej vrstvy je hemodynamický jav, ktorý prispieva k reologickým vlastnostiam krvi prúdiacej v mikrocievach. Bezbunková vrstva sa zvyčajne vytvára v blízkosti úzkych cievnych stien (približne do priemeru  $300 \mu\text{m}$ ). V dôsledku vysokých šmykových napätí rozvinutých okolo steny 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.

## 5.1. Popis simulačných experimentov

Všetky simulácie prebiehali v simulačnom boxe s kvádrom tvarom, ktorý bol uzavretý so štyrmi stenami paralelnými so smerom toku tekutiny (v smere osi x) (Obr.5.2).



Obr. 5.2: Geometria simulačného boxu.

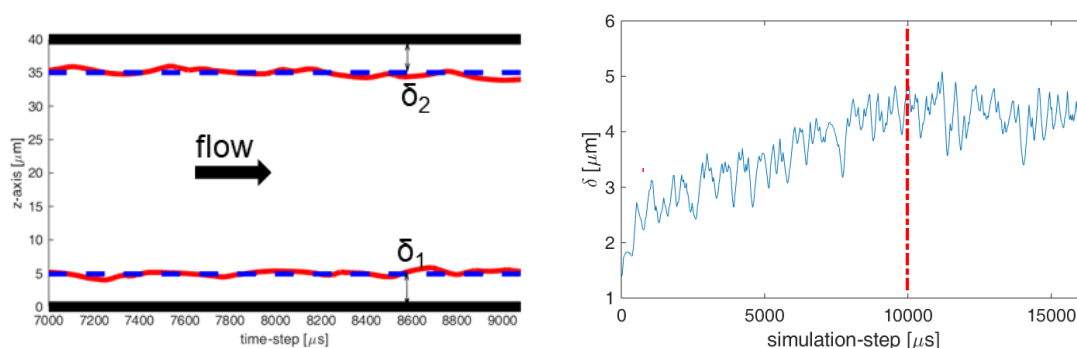
Na modelovanie buniek s rôznou tuhosťou sme použili štyri rôzne sady elastických koeficientov. Jednotlivé sady sú označené podľa naťahovacieho koeficientu ( $k_s$ ), ktorý má na deformovateľnosť bunky najväčší vplyv. Sady s označením ks00056 a ks0007, bežne používané v našich simuláciách, zodpovedajú deformovateľnosti zdravých červených krviniek. Sada ks00127 predstavuje tuhšiu infikovanú bunku a ks1 hraničnú možnosť v simuláciách, kedy bunka predstavuje tuhý objekt.

Testovali sa toky s 5%, 10% a 15% hematokritom (Hct, %  $\text{vol}_{\text{RBC}}/\text{vol}_{\text{TOTAL}}$ ) 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.

## 5.2. 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 rozmiestnené do celého objemu simulačného boxu s náhodnými pozíciami centier buniek. Hrúbka CFL sa meria

po ustálení toku, kedy už nedochádzalo k zmene jej hrúbky. Na Obr. 5.3(b) 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. 5.3: a) Meranie hrúbky CFL. b) 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.

Tab. 5.1: Hrúbky CFL ( $\delta$ ) v  $\mu\text{m}$  pre hematokrit 5, 10 a 15% a všetky štyri sady elastických koeficientov.  $\delta$  predstavuje priemernú hodnotu z  $\delta_1$  a  $\delta_2$ .

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

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, čím sú bunky tuhšie, tým sa znižuje hrúbka CFL. Pri porovnaní našich výsledkov s výsledkami z in-vitro resp. iných in-silico experimentov, sme zaznamenali istý nesúlad [3, 5, 10]. Avšak experimentálne hodnoty CFL vykazujú značný rozptyl, ktorý neumožňuje veľmi prísne kvantitatívne

## 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 je známy ako marginalizácia. Strata elasticity červených krviniek je sprievodným znakom viacerých chorôb, ako napríklad malária, kosáčiková anémia, cukrovka, leukémia, preto sa výskumu a detekcii takto poškodených RBC venuje v súčasnej biomedicíne veľká pozornosť.

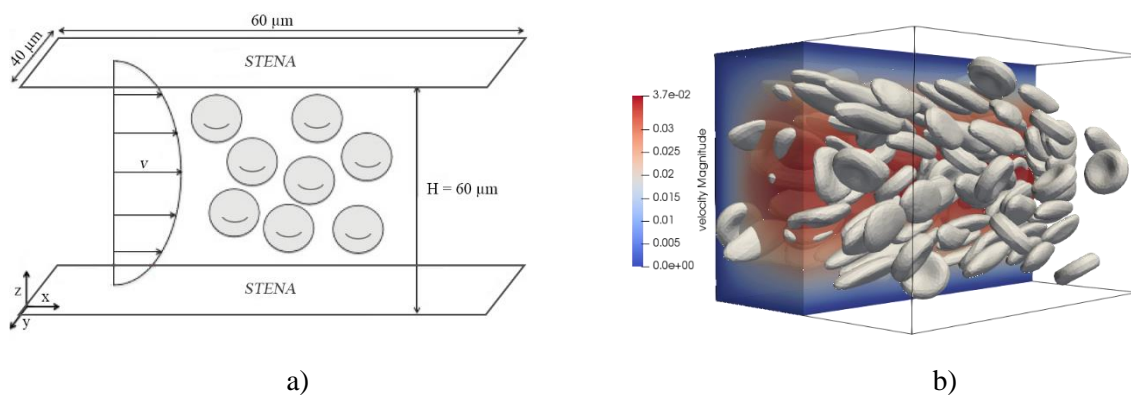


Z biologického hľadiska je významná aj marginalizácia ďalších krvných buniek, bielych krviniek a krvných doštičiek [7, 13]. Tie sa zvyčajne nachádzajú vo zvýšenej koncentrácii v blízkosti cievnych stien, čo je kľúčový faktor pre fyziologickú reakciu na zápal alebo poškodenie cievnej steny. Predpokladá 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.

V tejto štúdií 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 tuhostí 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 a numerické parametre tekutiny boli nastavené na štandardných hodnotách. 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 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.

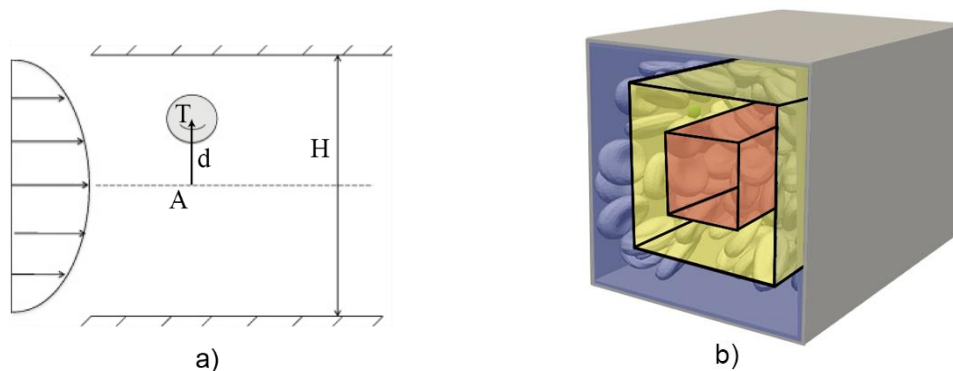
## 6.2. Metódy spracovania výsledkov

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.



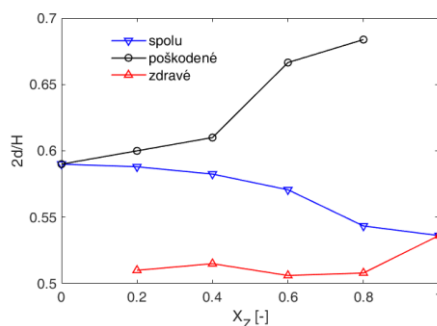
Obr. 6.2: a) 2-D znázornenie vzdialenosti ťažiska bunky od hlavnej osi kanála ( $d$ ). b) Schematické rozdelenie kanála na koaxiálne oblasti.

## 6.3. Výsledky a diskusia

### Vplyv objemového podielu poškodených buniek na radiálnu migráciu

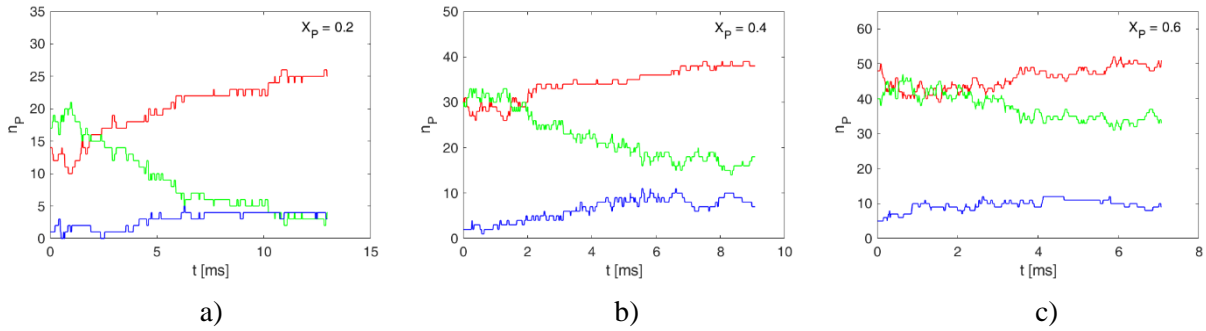
Na Obr. 6.3 sú zosumarizované výsledky pre priemernú vzdialenosť tuhých buniek od hlavnej osi kanála  $\bar{d}$  pri všetkých hodnotách skúmaných  $X_Z$ . Z obrázku sú zrejmé dva trendy. Prvým je, že sa  $\bar{d}$  pre zdravé aj pre poškodené bunky zvyšuje so zvyšujúcim sa  $X_Z$ , hoci  $\bar{d}$  pre 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  $X_Z$ .

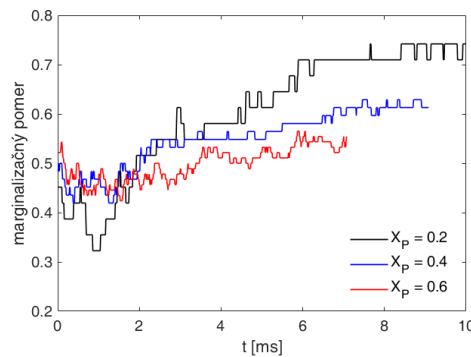


Obr. 6.3: Rovnovážny stav  $\bar{d}$  ako funkcia  $X_Z$  pre zdravé a poškodené bunky.

Na získanie ďalších poznatkov o distribúcii častíc je na Obr. 6.4. 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. 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 rozdielneho zastúpenia v zmesi je na Obr. 6.5 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.



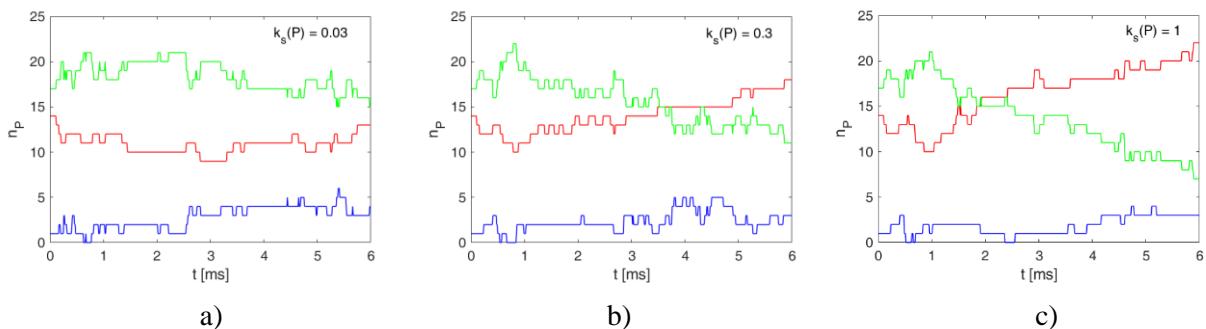
Obr. 6.4: Časový vývoj počtu tuhých buniek v troch koaxiálnych oblastiach pre rôzne objemové podiely v percentuálnom zastúpení a) 20%, b) 40% a c) 60% tuhých buniek. Červená krivka predstavuje  $n_p$  v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.



Obr. 6.5: Vývoj marginalizačného pomeru v čase pre suspenzie s rôznym objemovým podielom poškodených buniek. Marginalizačný pomer je definovaný ako pomer počtu marginalizovaných častíc v CFL ku celkovému počtu suspendovaných častíc.

### 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).



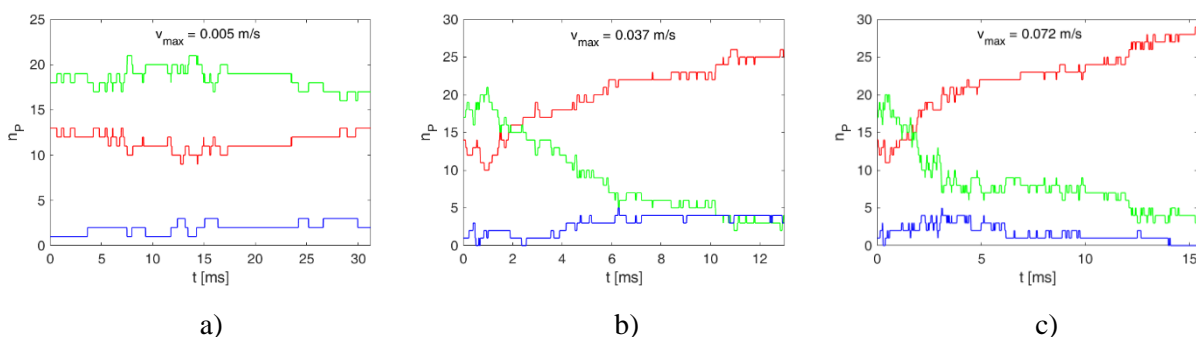
Obr. 6.6: Časový vývoj počtu poškodených buniek s rôznou elasticitou v troch koaxiálnych oblastiach. Objemový podiel tuhých buniek je 20%. Červená krivka predstavuje  $n_p$  v okrajovej oblasti, zelená medzi okrajovou a stredovou oblasťou a modrá v stredovej oblasti kanála.

V tomto prípade nepozorujeme žiadnu migráciu smerom ku stenám kanála. 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.

### 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 cieve v ľudskom tele) dosahuje rýchlosť približne 0.33 m/s a v najužších cievnych kapilárach prúdi približne 1000-násobne pomalšie.

Ako už bolo diskutované, 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. 6.7(a)), kedy v relatívne dlhej simulácii nepozorujeme žiadnu zvýšenú migráciu tuhých buniek ku stenám kanála. Z porovnania rýchlejších tokov (Obr. 6.7(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. 6.7: 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.

## 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., Jančigová, 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. Prezentované 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] CIMRÁK, Ivan; JANČIGOVÁ, Iveta. *Computational Blood Cell Mechanics: Road Towards Models and Biomedical Applications*. CRC Press, 2018.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] FEDOSOV, Dmitry A., et al. Blood flow and cell-free layer in microvessels. *Microcirculation*, 2010, 17.8: 615-628.
- [5] FEDOSOV, Dmitry A., et al. Predicting human blood viscosity in silico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.29: 11772-11777.

- [6] 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.
- [7] OMORI, Toshihiro, et al. Membrane tension of red blood cells pairwise interacting in simple shear flow. *Journal of biomechanics*, 2013, 46.3: 548-553.
- [8] KUMAR, Amit; GRAHAM, Michael D. Segregation by membrane rigidity in flowing binary suspensions of elastic capsules. *Physical Review E*, 2011, 84.6: 066316.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] CHANG, Hung-Yu, et al. Quantifying platelet margination in diabetic blood flow. *Biophysical journal*, 2018, 115.7: 1371-1382.