

Žilinská univerzita v Žiline

Autoreferát
DIZERTAČNEJ PRÁCE

Žilina, máj, 2020

Mgr. Alžbeta Bohiniková

Žilinská univerzita v Žiline
Fakulta riadenia a informatiky

Mgr. Alžbeta Bohiniková

Autoreferát dizertačnej práce

**Modelovanie buniek s jadrom pre simulačné modely
mikrofluidických zariadení.**

Názov dizertačnej práce

na získanie akademického titulu „**philosophiae doctor**“ (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. Alžbeta Bohiniková
Žilinská univerzita v Žiline
Fakulta riadenia a informatiky
Katedra softvérových technológií
- Školiteľ** doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.
Žilinská univerzita v Žiline
Fakulta riadenia a informatiky
Katedra softvérových technológií
- Školiteľ špecialista** Mgr. Iveta Jančígová, PhD.
Žilinská univerzita v Žiline
Fakulta riadenia a informatiky
Katedra softvérových technológií
- Oponenti** prof. RNDr. Vladimír Janiš, CSc.
Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica
Fakulta prírodných vied
Katedra matematiky
- doc. Mgr. Ondrej Šuch, PhD.
Žilinská univerzita v Žiline
Fakulta riadenia a informatiky
Katedra informačných sietí

Autoreferát bol rozoslaný dňa:

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa **17.8.2020** o **9:00** hod. 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

Obsah

1 Úvod	5
1.1 Ciele práce	5
2 Model elastickej membrány	6
3 Model bunky s jadrom	7
3.1 Metódy porovnávania simulačných experimentov	8
3.2 Model bunky s jadrom s použitím viazaných interakcií	9
3.3 Testované viazané interakcie	9
3.4 Model bunky s jadrom s použitím neviazaných interakcií	11
3.5 Model bunky s jadrom reprezentovaný elasticou guľou	13
3.6 Porovnanie prístupov	14
4 Simulácie biologických experimentov	15
4.1 Dáta z biologických experimentov a ako s nimi pracovať	15
4.2 Mikrofluidický kanál so zúžením	16
4.3 Laserové natahovanie buniek	17
4.4 Možnosti využitia	19
5 Záver	21
Publikácie	22
Zoznam použitej literatúry	24

1 Úvod

Modelovanie biologických experimentov je pomerne rozsiahla oblasť, ktorej sa v posledných rokoch venuje veľká pozornosť. Vo výskumnej skupine Cell in Fluid sa venujeme najmä modelovaniu krvi. V krvi sa však nevyskytujú len RBC, ale aj množstvo ďalších objektov, ktorých odhalenie môže slúžiť pre diagnostiku rôznych ochorení. Hlavným rozdielom medzi RBC a inými bunkami je ich komplikovanejšia vnútorná štruktúra. Najvýraznejší rozdiel je, že RBC neobsahujú jadro. V našej práci sme sa zamerali práve na modelovanie buniek s jadrom. Takýto model môže byť následne využitý pre modelovanie cirkulujúcich tumorových buniek, buniek z bunkových líní, bielych krviniek, červených krviniek infikovaných maláriou a iných buniek s jadrami. Pre tento krok je však dôležitá správna kalibrácia a nastavenie parametrov modelu. V práci sa venujeme aj tejto problematike.

1.1 Ciele práce

Táto práca je súčasťou dlhodobého vývoja simulačného nástroja výskumnej skupiny Cell in Fluid. Jedným z cieľov výskumnej skupiny je využitie nášho simulačného nástroja pre optimalizáciu a vývoj mikrofluidických zariadení. Zameranie práce je sústredené na rozšírenie nášho modelu, aby mohol byť využitý pre simulovanie viacerých druhov biologických buniek. Stanovili sme si nasledujúce ciele:

Vytvorenie modelu buniek s jadrom a porovnanie rôznych prístupov a ich implementácia do simulačného modelu

Prvým krokom bolo preskúmanie existujúcich modelov buniek s jadrom a určenie možných aplikácií takýchto modelov pri vývoji mikrofluidických zariadení. Pre vytvorenie modelu bunky s jadrom sme využili existujúci model elastickej membrány. Základnou oblasťou, na ktorú sme sa zamerali, bol spôsob, akým je jadro naviazané na membránu bunky. Pozreli sme sa na biologické pozadie tejto väzby a následne sme otestovali rôzne prístupy. Zhodnotili sme ich výhody a nevýhody a taktiež sa zamerali na ich využitie.

Návrh spôsobu kalibrácie elastických parametrov modelu bunky s jadrom a nastavenie parametrov modelu pre simuláciu konkrétneho biologického experimentu

V práci sme sa zamerali na vybranú skupinu biologických experimentov, vhodných pre kalibráciu konkrétnych typov biologických buniek. Dôleži-

tým pre ďalšiu využiteľnosť modelu, bolo vytvorenie procesu kalibrácie, ktorý bude využiteľný pre širokú škálu buniek. Zamerali sme sa nielen na simulačný aspekt tohto procesu, ale aj na spôsoby získania biologických dát a na výber vhodného mikrofluidického zariadenia. Takýto prístup umožňuje používateľovi modelu získať celkový postup ako dosiahnuť nakalibrovaný výpočtový model konkrétneho druhu bunky, ktorý môže ďalej využívať.

Využitie modelov buniek s jadrom pre odporúčania pre optimalizáciu reálnych mikrofluidických zariadení

Výhodou výpočtového modelu je otestovať vplyv geometrie mikrofluidického zariadenia na správanie toku buniek. Takýmto spôsobom je možné vylepšiť požadované vlastnosti, a tak ušetriť materiál a čas biológom. Počas doktorandského štúdia sa nám podarilo nadviazať spoluprácu s laboratóriom, kde sme vykonali biologické experimenty s využitím viacerých mikrofluidických zariadení. Podieľali sme sa na vývoji geometrie mikrofluidického zariadenia určeného na skúmanie deformácie individuálnych buniek. Následne sme vytvorili simuláciu tohto zariadenia a určili, aké parametre bude potrebné nameriť pre nastavenie parametrov modelu bunky s jadrom.

2 Model elastickej membrány

Základným kameňom modelu pre bunky s jadrom, bude model elastickej membrány vytvorený výskumnou skupinou Cell in Fluid. Doposiaľ bol využívaný najmä pre modelovanie RBC buniek. Podrobne je všetko popísané v knihe [1].

V modeli je bunková membrána reprezentovaná pomocou triangulácie jej povrchu. Jej elasticke správanie zabezpečuje päť elastických modulov.

Modul pružnosti, značený k_s , popisuje tuhosť bunky. V momente, keď je časť membrány nťahovaná, tento modul zabezpečuje jej snahu zabrániť tejto zmene. Môžeme si predstaviť, že hrany našej triangulácie sú pružiny, ktoré si chcú zachovať svoju pokojovú dĺžku.

Modul ohybu, značený k_b , sa tiež podieľa na zachovaní tvaru bunky. Predstavuje však inú zložku. Jeho mechanizmus zodpovedá za zachovanie uhlov medzi susednými trojuholníkmi, čím si bunka zachováva svoj relaxovaný tvar.

Modul zachovania lokálnej plochy, značený k_{al} , už podľa názvu napovedá, že jeho úlohou je zachovať plochu jednotlivých trojuholníkov v našej triangulácii. Tento modul do istej miery vykonáva podobné mechanizmy ako modul pružnosti.

Modul zachovania celkovej plochy, značený k_{ag} , patrí medzi moduly zabezpečujúce globálne vlastnosti bunky. Bunka si v reálnom svete zachováva svoj povrch, čiže tento modul nekopíruje žiadny merateľný mechanizmus bunky na rozdiel od predošlých modulov, kde sa dá pozorovať a merať napríklad rýchlosť vrátenia sa do pôvodného stavu pri pôsobení rôznych síl.

Posledným modulom je **modul zachovania objemu**, značený k_v , ktorý zodpovedá za to, že si bunka udržiava svoj konštantný objem. Tento globálny modul nie je špecificky viazaný na konkrétny biofyzikálny mechanizmus. Bunka si v realite udržiava viac-menej stály objem a ku väčším zmenám dochádza len vo veľmi špecifických a ojedinelých situáciách.

3 Model bunky s jadrom

Pre modelovanie membrány a jadra sme zvolili elastickú guľu. Polomer jadra bol nastavený na $3 \mu m$ a polomer membrány na $7.5 \mu m$. Pre membránu bola použitá triangulácia gule s 304 bodmi a pre jadro s 169 bodmi. Elastické parametre jadra boli nasledujúce: $k_s = 1.4, k_b = 1.4, k_{al} = 1.4, k_g = 2.5, k_v = 3.5$. Boli nastavené tak, aby vytvorili dostatočne tuhú guľu. Parametre membrány boli: $k_s = 0.2, k_b = 0.16, k_{al} = 0.2, k_g = 0.7, k_v = 0.9$. Tie boli nastavené oveľa nižšie, čím spôsobili, že membrána bola pružnejšia ako jadro. Tok v kanáliku bol nastavený pomocou *Fluid force density* = 0.005.

Aby sme otestovali funkčnosť rôznych prístupov modelovania interakcie jadra a bunky, vytvorili sme simuláciu s prúdením tekutiny cez jednoduchý kanál so zúžením. Kanál bol tvorený úzkym kvádom s prierezom $40 \mu m \times 40 \mu m$ a dĺžkou $80 \mu m$. Zúženie bolo uprostred kanála, s dĺžkou $20 \mu m$ a prierez bol štvorec s rôznymi veľkosťami ($13 \mu m \times 13 \mu m, 15 \mu m \times 15 \mu m, 17 \mu m \times 17 \mu m$ a $19 \mu m \times 19 \mu m$). Geometriu kanálika môžeme vidieť na obrázku 1. Skript pre vytvorenie takejto geometrie je uvedený v prílohe B.1.

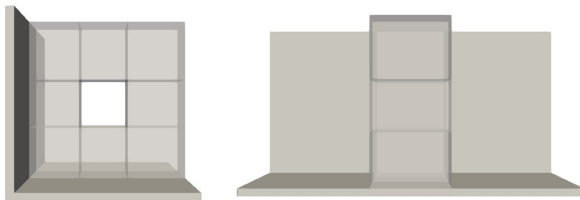


Figure 1: Kanálik so zúžením. Rozmery kanáliku $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$, rozmery zúženia $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

3.1 Metódy porovnávania simulačných experimentov

Hlavným cieľom pri týchto simulačných experimentoch bolo zistiť, za akých podmienok prejde bunka s polomerom $15\mu\text{m}$ zúžením, ktorého prierez je menší ako táto bunka. Okrem toho či prejde, nás zaujímalo aj to, ako veľmi sa deformuje, a ako veľmi sa jadro pohybuje vnútri bunky. V simuláciách sme preto sledovali nasledujúce štyri ukazovatele:

- **Prechod cez kanálik.** Testovali sme, či bunky vedia prejsť kanálikom v simulačných experimentoch dvakrát.
- **Deformačný index** sme počítali ako $DI = \frac{L_x}{L_y}$, kde L_x je dĺžka bunky pozdĺž x -ovej osi (smer toku tekutiny) a L_y je dĺžka bunky pozdĺž y -ovej osi (smer šírky kanála).
- **Vzdialenosť stredu jadra a stredu membrány bunky** ako $D_c = x_{Cb} - x_{Cj}$, kde x_{Cb} je x -ová súradnica stredu jadra a x_{Cj} je x -ová súradnica stredu membrány. Ak $D_c > 0$ vieme, že je jadro vychýlené do zadnej časti bunky a naopak, ak $D_c < 0$ jadro je vychýlené do prednej časti bunky.
- **Únik jadra z bunky** bol detekovaný pomocou vzdialenosti špicov (bod triangulácie s maximálnou x -ovou súradnicou) Bunky v simuláciách sa pohybujú v smere osi x . V každom časovom kroku vieme získať bod membrány a jadra, ktorý má najväčšiu x -ovú súradnicu. Nazvime ho "špic". Podobne ako pri vzdialenosti stredov sa aj pri vzdialenosti špicov pozrieme len na rozdiel ich x -ových súradníc. Vzdialenosť špicov je potom $D_s = x_{Sb} - x_{Sj}$, kde x_{Sb} je x -ová súradnica špicu bunky a x_{Sj} je x -ová súradnica špicu jadra. V prípade, že $D_s < 0$, vieme, že jadro sa nenachádza v bunke.

3.2 Model bunky s jadrom s použitím viazaných interakcií

Základom pri použití prístupu s viazanými interakciami je najprv **vytvoriť väzby** medzi membránou bunky a jadrom. To, s koľkými bodmi na membráne bol spojený, sme definovali pomocou uhla α . Pre každý bod na jadre bol spočítaný uhol medzi možnou väzbou a jeho "**normálovým vektorom**". Možná väzba je spojnica bodu na sieti jadra s bodom na sieti membrány. Za normálový vektor bodu na povrchu jadra pokladáme normálový vektor plochy, ktorá je definovaná pomocou trojuholníka tvoreného tromi najbližšími susedmi tohto bodu. Pre daný bod na jadre boli vytvorené tie väzby, ktorých uhol s normálovým vektorom bol menší ako uhol α , tak ako môžeme vidieť na obrázku 2.

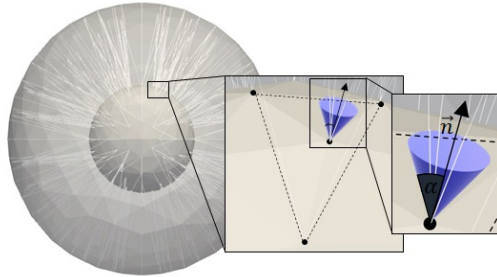


Figure 2: Vytváranie väzieb medzi jadrom a membránou. Môžeme vidieť uhol α . Uhly medzi všetkými väzbami a normálovým vektorom n musia byť menšie ako α .

3.3 Testované viazané interakcie

Otestovali sme tri funkcie pre modelovanie správania sa väzieb. Dĺžku väzby medzi bodom na jadre a bodom na membráne označujeme r . Parameter r_0 označuje relaxovanú dĺžku väzby, ktorá je zadaná na začiatku simulácie pri ich vytváraní. Zvyšné parametre funkcií sú nastaviteľné a my sme testovali ich vplyv na správanie bunky.

- **Harmonický potenciál**

$$V(r) = \frac{1}{2}k(r - r_0)^2 \quad (1)$$

- **FENE** (finite extention nonlinear elastic)

$$V(r) = -\frac{1}{2}K\Delta r_{max}^2 \ln \left[1 - \left(\frac{r - r_0}{\Delta r_{max}} \right)^2 \right] \quad (2)$$

- **Kvadratický potenciál**

$$V(r) = \frac{1}{2}K_0(r - r_0)^2 + \frac{1}{4}K_1(r - r_0)^4 \quad (3)$$

Výsledky simulácií s rôznymi kombináciami parametrov sú postupne uvedené v obrázkoch 3, 4 a 5. Hodnota 1 indikuje, že bunka prešla kanálom a jadro sa v nej udržalo. Hodnota 0 opak. Pre kvadratický a FENE potenciál sú uvedené len výsledky pre prierez zúženia $13 \times 13 \mu m$. Výsledky zvyšných simulácií sú uvedené v prílohe A.2 a A.3 dizertačnej práce.

prierez	a/k	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
13	10	1	1	1	1	0	0
13	15	0	0	1	1	1	0
13	20	0	0	0	1	0	0
15	10	1	1	1	1	1	1
15	15	0	1	1	1	1	1
15	20	0	0	1	1	1	1
17	10	1	1	1	1	1	1
17	15	0	1	1	1	1	1
17	20	0	0	1	1	1	1
19	10	1	1	1	1	1	1
19	15	0	1	1	1	1	1
19	20	0	0	1	1	1	1

Figure 3: Výsledky simulácií v ktorých bol použitý harmonický potenciál.

prierez	a	K1/K0	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
13	10	0.00001	1	1	1	1	0	0
13	10	0.0001	1	1	1	1	1	1
13	10	0.001	1	1	1	1	1	1
13	15	0.00001	1	1	1	1	1	1
13	15	0.0001	1	1	1	1	0	0
13	15	0.001	1	1	1	1	1	1
13	20	0.00001	1	1	1	1	1	1
13	20	0.0001	1	1	1	1	1	1
13	20	0.001	1	1	1	1	0	0

Figure 4: Výsledky simulácií v ktorých bol použitý kvadratický potenciál.

Celkovo poukazujú výsledky na to, že keď je zúženie menšie, stres na bunku je väčší, a teda rovnaká sada parametrov vedie k rôznemu pohybu jadra v bunke. Z popísaných prístupov je najvhodnejší kvadratický potenciál. Avšak pri dobrom nastavení parametrov fungujú aj ostatné. Výhodou kvadratického potenciálu je, že umožňuje jemnejšie odškálovať

prierez	a	r _{max} /K	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
13	10	6	1	1	1	0	0	0
13	10	8	1	1	1	1	0	0
13	10	10	1	1	1	0	0	0
13	10	12	1	1	1	0	0	0
13	15	6	1	1	1	1	1	0
13	15	8	1	1	1	1	1	0
13	15	10	1	1	1	1	1	0
13	15	12	1	1	1	1	1	0
13	20	6	0	1	1	1	0	0
13	20	8	1	1	1	1	0	0
13	20	10	1	1	1	1	0	0
13	20	12	0	0	1	1	0	0

Figure 5: Výsledky simulácií v ktorých bol použitý FENE potenciál.

aké správanie bunky chceme dosiahnuť. Vieme získať aj pomerne elastickú bunku, v ktorej sa jadro stále drží vnútri. Porovnanie vplyvov jednotlivých parametrov na pohyb jadra v membráne môžeme vidieť na obrázku 6. Pri tuhších nastaveniach väzieb (vyššie hodnoty parametrov K_0, K_1, a sa bunky zasekávajú pri vstupe do zúženia. Pri mäkkších zase jadro uniká z bunky.

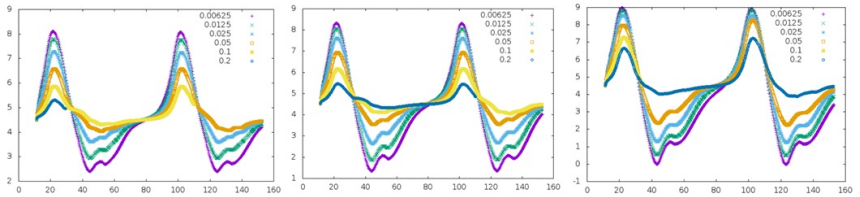


Figure 6: Graf zobrazujúci závislosť D_s (vzdialenosť špicov bunky a jadra) od zmeny parametra K_0 pri použití kvadratického potenciálu. Postupne zľava doprava je hodnota $a = 20, 15, 10$, pričom bunka prechádza zúžením $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$.

3.4 Model bunky s jadrom s použitím neviazaných interakcií

Tento spôsob interakcie jadra s bunkou je založený na pôsobení odpudivej sily medzi dvoma typmi častíc. V simuláciách sú body triangulácie povrchu danej bunky a jadra označené rôznymi identifikačnými číslami, a tak je možné nastaviť interakciu medzi týmito dvoma množinami bodov. Pre potreby interakcie medzi bunkou a jadrom sme otestovali **Soft-sphere**

interakciu, definovanú ako:

$$V(r) = \begin{cases} a(r - r_{offset})^{-n} & r < r_{cut} \\ 0 & r \geq r_{cut}, \end{cases} \quad (4)$$

kde r je vzdialenosť bodov. Parametre a a n určujú škálu odpudivej sily. r_{offset} určuje vzdialenosť bodov pri ktorej začne sila pôsobiť a r_{cut} určuje hraničnú vzdialenosť pri ktorej prestane pôsobiť. Výsledky simulácií spustených pre rôzne kombinácie parametrov môžeme vidieť na obrázku 7. Pri všetkých týchto simuláciách bola hodnota $r_{offset} = 0$ a $n = 3$.

prierez	r_{cut}/a	0.003	0.03	0.165	0.3	0.45	0.6
13	3.5	0	0	0	0	0	0
13	4	0	0	0	0	0	0
13	4.5	0	0	0	0	0	0
15	3.5	0	0	1	1	1	1
15	4	0	0	1	1	1	1
15	4.5	0	1	1	1	1	1
17	3.5	0	1	1	1	1	1
17	4	0	1	1	1	1	1
17	4.5	0	1	1	1	1	1
19	3.5	0	1	1	1	1	1
19	4	0	1	1	1	1	1
19	4.5	0	1	1	1	1	1

Figure 7: Výsledky simulácií v ktorých bola použitá soft-sphere interakcia.

V testovaných sadách sme nezískali žiadnu, ktorá by udržala jadro v bunke počas prechodu zúžením $13 \times 13 \mu m$. Iná situácia nastáva pri zúžení $15 \mu m \times 15 \mu m$. Vplyv parametra a môžeme vidieť na grafoch v obrázku 8. Postupne zľava doprava je možné sledovať závislosť D_s na parametri $r_{cut} = 4.5, 4, 3.5 \mu m$.

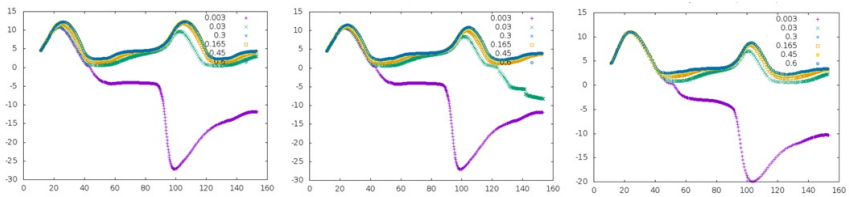


Figure 8: Grafy zobrazujúce závislosť D_s (vzdialenosť špicov bunky a jadra) od zmeny parametra a pri použití soft-sphere interakcie. Hodnota r_{cut} je postupne (zľava doprava) $4.5, 4, 3.5$. Bunka prechádza zúžením $15 \mu m \times 15 \mu m$.

Celkovo funguje tento prístup dobre vo väčších zúženiach. Pre menšie zúženia je však prístup s viazanými interakciami vhodnejší.

Table 1: Dĺžka hrán pri rôznych diskretizáciách buniek, $r = 8\mu\text{m}$

Počet bodov	169	304	482	514	642
Počet trojuholníkov	334	604	960	1024	1280
Povrch	787.29	794.86	799.17	797.61	800.42
min. hrana	1.56	1.01	1.3	0.95	1.11
max. hrana	3.38	2.5	1.53	2.41	1.32
priemerná hrana	2.36	1.76	1.39	1.4	1.21
vypočítaná hrana	2.36	1.75	1.39	1.35	1.20

3.5 Model bunky s jadrom reprezentovaný elasticou guľou

Modelovať bunku s jadrom je možné aj pomocou samotnej elastickej gule predstavujúcej membránu bunky. Prítomnosť jadra je potom zahrnutá pomocou nastavenia elastických parametrov. Výhodou pri tomto prístupe je kratší výpočtový čas a menšie množstvo parametrov simulácie. Využitelnosť takéhoto prístupu sa preto ukáže najmä pri simuláciách s veľkým množstvom buniek. Dôležité je však odstrániť neprirodzené prekrytie membrány cez seba, ktoré sa vyskytlo pri simuláciách vo väčších zúženiach. Pre tento účel sme pridali **Self-cell interakciu**, ktorá využívala funkciu soft-sphere interakcie, vzorec 4.

Aby sme otestovali jej fungovanie, vytvorili sme simulácie, kde bunka prechádzala cez zúženie v rovnom kanáliku. Rozhodli sme sa použiť zúženia, ktoré boli čiastočne menšie ako samotná bunka. Pre polomer $3,92\ \mu\text{m}$ sme použili zúženie s prierezom s rozmermi $7 \times 7\ \mu\text{m}$. Pre $8\ \mu\text{m}$ polomer to bolo zúženie s prierezom $15 \times 15\ \mu\text{m}$ a pre $12\ \mu\text{m}$ bol prierez $23 \times 23\ \mu\text{m}$. Schématickú štruktúru kanálika vidíme na obrázku 1.

Naším cieľom v tejto časti bolo zistiť, ako je potrebné meniť parametre funkcie $V(r)$ v závislosti od meniacich sa vlastností guľí - polomer, tuhosť, počet diskretizačných bodov, dĺžka hrán triangulácie. Testovali sme 3 stupne tuhosti, 3 veľkosti buniek a 7 typov diskretizácií. Výsledky simulácií ukázali, že pri nastavovaní self-cell interakcie boli najdôležitejšie dĺžky hrán triangulácie membrány. Pre rozsah veľkostí guľí, ktorý sme testovali, fungovali parametre $a = 0,002$ a $n = 1, 5$. Hodnota r_cut musela byť nastavená podľa dĺžky maximálnej hrany triangulácie. V tabuľke 1 uvádzame hodnoty dĺžok hrán pre bunku s polomerom $8\ \mu\text{m}$. Hodnoty pre zvyšné diskretizácie a polomery sú uvedené v dizertačnej práci.

3.6 Porovnanie prístupov

Aby sme mohli porovnať rozdiely medzi modelovaním bunky s jadrom a modelovaním iba samotnej membrány bunky, spustili sme sadu simulácií s rovnakými parametrami kanálika a elastických koeficientov membrány aké boli použité v častiach 3.2 a 3.4. Hoci sme otestovali viacero parametrov pre self-cell interakciu membrány tak podobne ako pri použití soft-sphere interakcie v časti 3.4, žiadna zo sád neprešla zúžením $13 \times 13 \mu m$. Pri ostatných rozmeroch zúžení už prešli všetky.

V obrázku 9 zobrazujeme sadu grafov pre simulácie kanálika so zúžením $15 \times 15 \mu m$. Na x -ovej osi sú uvedené x -ové súradnice stredu buniek, na y -ovej osi je hodnota DI bunky.

Výsledky simulácií používajúcich viazané interakcie sú zobrazené vo vrchnej časti obrázku. Postupne zľava doprava sú zobrazené harmonický, kvadratický a FENE potenciál. Pri týchto simuláciách bola hodnota parametrov nasledujúca: $a = 20$, $k_1 = 0.0001$, $\Delta r_{max} = 8$. Rôzne krivky v grafoch predstavujú rozdielne nastavenie parametra k pre harmonický potenciál, parametra k_0 pre kvadratický potenciál a K pre FENE potenciál.

V spodnej časti obrázku sú na ľavej strane zobrazené hodnoty DI pre simulácie využívajúce neviazanú soft-sphere interakciu. V týchto simuláciách boli nastavené nasledujúce hodnoty parametrov: $r_{offset} = 0$, $n = 3$, $r_{cut} = 4.5$. V grafe sú zobrazené krivky vývoja DI pri rôznych hodnotách parametra a . Na pravej strane je uvedený graf pre simulácie modelujúce membránu bunky s použitím self-cell interakcie. Self-cell interakcia je nastavená pomocou parametra $a = 0.001$ a n , ktorý má postupne hodnoty 1.2, 1.5, 1.8, 2.1. Vidíme však, že n v týchto simuláciách nemalo žiadny efekt.

Pri porovnaní maximálnych dosiahnutých DI indexov vidíme pri jednotlivých simuláciách vplyv prítomnosti jadra na elasticitu bunky. Všetky zobrazené simulácie využívajúce viazané interakcie nedosahujú hodnotu $DI = 2.5$, ktorú dosahuje samotná membrána bez jadra. Dôvodom je, že aj najslabšie nastavená interakcia medzi membránou a jadrom spôsobuje zvýšenie tuhosti celkovej bunky.

Pri neviazaných interakciách (ľavý dolný graf), si môžeme všimnúť, že fialová krivka sa zhoduje s krivkou DI pre membránu bunky (pravý dolný graf). Z výsledkov uvedených v časti 3.4 vieme, že pri tejto simulácii jadro uniklo z membrány. To vysvetľuje prečo jadro nemá vplyv na deformáciu tejto membrány.

Nech už je použitá akákoľvek implementácia väzby jadra v bunke, vidíme, že čím je pevnejšia tým menej sa bunky deformujú. Táto analýza

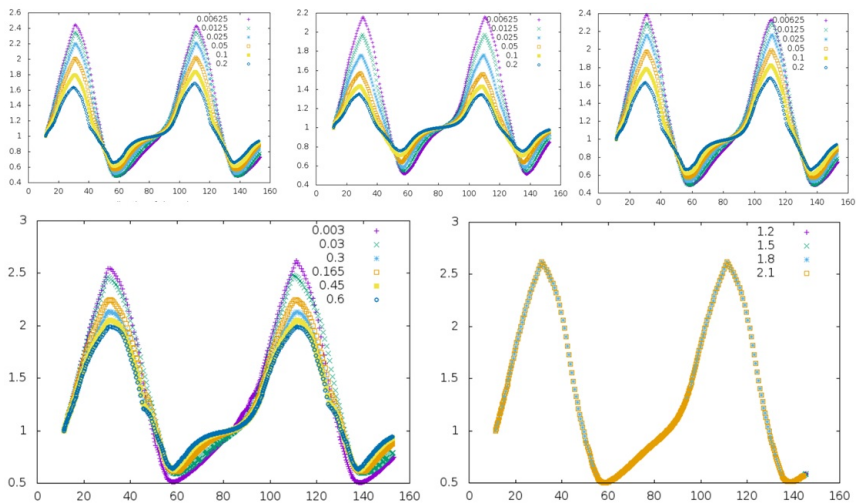


Figure 9: Porovnanie DI bunky pri použití rôznych spôsobov modelovania bunky s jadrom. Bunka prechádza zúžením $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$.

citlivosti jednotlivých parametrov a prístupov poslúži v budúcnosti pri nastavovaní parametrov pre konkrétne typy buniek.

4 Simulácie biologických experimentov

4.1 Dáta z biologických experimentov a ako s nimi pracovať

V rámci výskumného pobytu v Laboratory of Interfacial plus Microscale Phenomena from IN+ - Center for Innovation, Technology and Policy Research na Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa boli zaznamenané experimenty s mikročasticami prechádzajúcimi cez mikrofluidické kanáliky. Následne boli uskutočnené a zaznamenané ďalšie experimenty s RBC prechádzajúcimi cez rôzne mikrofluidické zariadenia v spolupráci s Metrics research center na University of Minho. Jedno zo zariadení môžeme vidieť na obrázku 10. Toto je určené pre skúmanie mechanických vlastností individuálnych buniek. Vytvorili sme parametrizovanú simuláciu pre tento biologický experiment. Overili sme na nej funkčnosť RBC modelu a pripravili základ pre kalibráciu konkrétnej bunky s jadrom po získaní vhodných biologických buniek pre experiment.

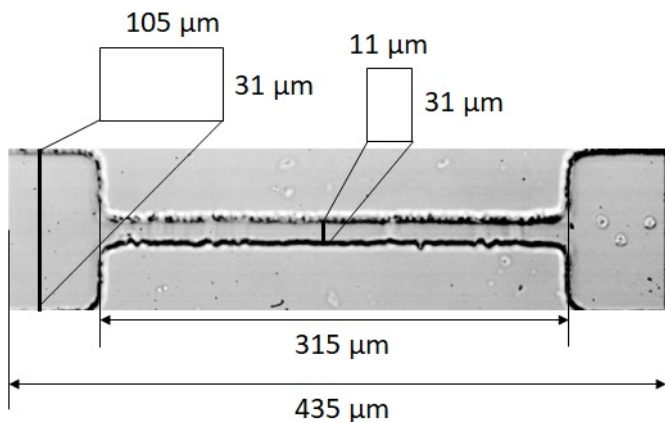


Figure 10: Rozmery kanáliku so zúžením.

4.2 Mikrofluidický kanál so zúžením

V experimente od Houa [4] skúmali deformovateľnosť buniek rakoviny prsníka prechádzajúcich cez úzky mikrofluidický kanál, zobrazený na obrázku 11. Kanál má podobné rozmery ako krvné kapiláry, aby napodobnil prostredie in vivo. Úzka časť tohto kanála má dĺžku $150\ \mu\text{m}$ a jeho prierez je štvorec s veľkosťou $10 \times 10\ \mu\text{m}$. Tvar kanála je znázornený na obrázku 11. Dĺžka vstupného času do zúženia bola najlepším indikátorom, ktorý odlišoval bunky s rôznymi mechanickými vlastnosťami.



Figure 11: Mikrofluidický kanál so zúžením.

V publikovaných dátach neboli uvedené všetky rozmery kanáliku, a teda nebolo možné prepočítať presne informáciu o rozdieloch tlakov v zaria-

dení na veľkosť prietoku. Simulačný experiment bol aproximáciou tohto biologického experimentu. Pomocou neho sme získali hodnoty fungujúcich parametrov pre bunku s priemerom $16\mu\text{m}$: $k_{ag} = 0,9$, $k_v = 0,5$, $k_s = \langle 0.004, 1.6 \rangle$, $k_b = \langle 0.0015, 0.6 \rangle$ a $k_{al} = \langle 0.0015, 1.5 \rangle$.

4.3 Laserové naťahovanie buniek

Mikrofluidické zariadenie používané v tomto biologickom experimente vytvára pomocou dvoch rovnako silných laserov optickú pascu [3]. V experimente s optickou pascou je bunka zachytená medzi dvoma protilahlými nezaostrenými laserovými lúčmi. Pretože lasery sú identické, celková sila pôsobiaca na bunku je nulová. Povrchové sily sú však aditívne a naťahujú bunku pozdĺž osi laserových lúčov ako je to znázornené na obrázku 12.

Pomocou optického naťahovača ("optical stretcher") je možné merať viskoelastické vlastnosti buniek s veľkou mierou senzitivity, ktorá umožňuje rozlišovať medzi rôznymi typmi buniek. Táto funkčnosť je využiteľná najmä pre diagnostické účely. Informácie získané o deformácii jednotlivých buniek sú vhodné aj pre kalibráciu výpočtového modelu.

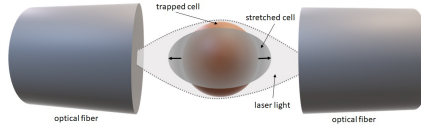


Figure 12: Schematické zobrazenie naťahovania pomocou optickej pasce.

Pre modelovanie vplyvu lasera na povrch bunky musíme vypočítať silu naťahovania aplikovanú na každý z bodov na bunkovej membráne. Na základe teórie vysvetlenej v článku [3] vieme, že je možné vypočítať profil mechanického napätia pôsobiaceho na bunku - σ_r (pri daných parametroch vzdialenosti medzi laserovými lúčmi a polomerom laserových lúčov) pomocou rovnice:

$$\sigma_r(\theta) = \sigma_0 \cos^2(\theta), \quad (5)$$

kde σ_0 je maximálne mechanické napätie (parameter zohľadňujúci všetky parametre biologického experimentu) pozdĺž osi lasera a θ je uhol medzi povrchom bunky a normálou sily pôsobiaceho lasera.

Porovnáваме dva možné prístupy k výpočtu naťahovacej sily, ktoré sa rozlišujú v spôsobe výpočtu uhlu medzi laserom a povrchom membrány bunky, obrázok 13.

Prístup A

Pri použití prístupu A sa najskôr vezme každý trojuholník membrány, vypočíta sa normálový vektor pre tento trojuholník a potom sa vypočíta uhol

medzi normálou a vektorom laserového lúča. Týmto spôsobom získame mechanické napätie pôsobiace na celý trojuholník. Následne je každému bodu tohto trojuholníka pripísaná rovnaká časť tejto sily - jedna tretina mechanického napätia aplikovaného na daný trojuholník. Pretože každý bod membrány je súčasťou niekoľkých trojuholníkov, celková sila pôsobiaca na akýkoľvek bod je súčtom všetkých čiastkových síl z každého trojuholníka.

Prístup B

Pri použití prístupu B sa vypočíta normálový vektor pre každý bod membrány. Na získanie normálového vektora v danom bode však musíme najprv získať rovinu. Pri tomto prístupe teda hľadáme dotykovú rovinu k povrchu v danom bode membrány. Na definovanie roviny potrebujeme tri body. A keďže máme trojuholníkovú sieť, hľadáme medzi susednými bodmi daného bodu tri body umiestnené tak, aby sa normála zarovnala s daným bodom. Potom sa natahovacia sila aplikovaná na tento bod vypočíta podľa vzorca pre profil mechanického napätia. Nie sú potrebné ďalšie kroky. Tento prístup je možno menej intuitívny, ale implementácia v Pythone je jednoduchšia ako pri prístupe A. Jednoduchosť použitia tohto prístupu spočíva v dostupnosti funkcie na nájdenie troch najlepších susedov daného bodu, ktorá je zahrnutá v PyOIF. Otestovaním týchto dvoch

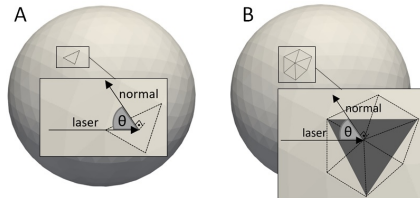


Figure 13: Porovnanie rôznych prístupov k výpočtu uhlu medzi normálou povrchu bunky a vektorom pôsobenia laserového lúča.

prístupov sme dosiahli porovnateľné výsledky. Vybrali sme prístup A.

Spustili sme simuláciu pre každú hodnotu maximálneho mechanického napätia. Simulácia bola ukončená, keď sa dĺžka bunky nezmenila o viac ako $0,0001 \mu\text{m}$. Pre každú simuláciu bola zaznamenaná konečná dĺžka (pozdĺž pôsobenia sily lasera) a šírka bunky (kolmo na pôsobenie sily lasera). Výsledky simulácií sme porovnali s teoreticky odvodenou dĺžkou a šírkou natiahnutej gule s danými rozmermi.

Teoretická dĺžka a šírka sa vypočítali odpočítaním radiálnej (u_r) a meridiálnej (u_θ) deformácie membrány od pôvodného radiálneho a meridiálneho tvaru bunky, ktorý bol v oboch prípadoch kruh s polomerom $3,3 \mu\text{m}$.

Deformácie boli odvodené na základe teórie membrán v [3].

$$u_r(\theta) = \frac{\rho^2 \sigma_0}{4Eh} [(5 + \nu) \cos^2(\theta) - 1 - \nu] \quad (6)$$

$$u_\theta(\theta) = \frac{\rho^2 \sigma_0 (1 + \nu)}{2Eh} \cos(\theta) \sin(\theta) \quad (7)$$

θ je v tomto prípade polárny uhol, r je radiálny smer, ν je Poissonove číslo s hodnotou $\nu = 0.5$ a $Eh = (3.9 \pm 1.4) \times 10^{-5} \text{ Nm}^{-1}$.

Porovnanie výsledkov medzi simulačnými a teoretickými dátami pre dĺžky a šírky bunky je uvedené v tabuľke 2.

Table 2: Porovnanie experimentálnych a simulačných dát.

σ_0	dĺžka _t	dĺžka _s	šírka _t	šírka _s
0	6.6	6.6	6.6	6.6
0.19	6.66	6.69	6.43	6.51
0.38	6.72	6.77	6.27	6.36
0.64	6.81	6.88	6.04	6.17
1.02	6.93	7.02	5.71	5.89
1.47	7.08	7.17	5.31	5.59

4.4 Možnosti využitia modelu pre vývoj mikrofluidických zariadení

S nakalibrovaným modelom je možné uskutočniť ďalšie simulácie, ktoré môžu slúžiť napríklad k optimalizácii rozmerov mikrofluidického zariadenia. Pri mikrofluidickom zariadení popísanom v práci [7], je možné skúmať uhol vstupných kanálikov, ich šírku ako aj rôznu rýchlosť toku. Následne, na základe výsledkov z takto rôzne nastavených simulácií, je možné vybrať najvhodnejšiu geometriu zariadenia.

Ďalším využitím je skúmanie správania CTC buniek v krvnom toku v cievach s rôznymi veľkosťami. Simulácie môžu umožniť skúmanie závislosti správania CTC buniek od rýchlosti toku a hematokritu. Podobne ako v štúdií [6].

Okrem individuálnych buniek sa však v toku môžu nachádzať aj zoskupenia buniek. Prítomnosť CTC buniek v toku krvi je indikátorom začiatku metastázovania rakoviny. Prítomnosť klastrov týchto buniek poukazuje na agresívnejší typ takejto rakoviny [2]. Detekcia takýchto klastrov vo vzorke krvi je preto užitočným nástrojom pre klinickú prax. Jedno z mikrofluidických zariadení, ktoré boli vytvorené pre tento účel, popisujú v článku [5].

Zariadenie je zobrazené na obrázku 14. Model bunky s jadrom by mohol byť využitý pre optimalizáciu rozložení prekážok v tomto mikrofluidickom kanáliku.

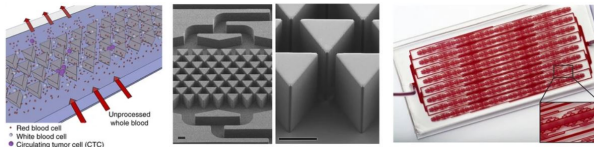


Figure 14: Mikrofluidické zariadenie určené na zachytávanie klastrov buniek. Prevzaté z [5].

Model klastra by mohol byť vytvorený pomocou spojenia viacerých buniek s jadrom. Spojenia by mali podobný charakter ako väzby, ktoré sme popísali v časti 3.2. Bude potrebné otestovať viacero funkcií, ktoré by mohli simulovať dynamiku týchto spojov. Taktiež je potrebné preskúmať, koľko takýchto spojov bude potrebné vytvoriť. Mohol by sa aplikovať podobný postup ako v časti 3.2.

Pre začiatok by v simuláciách mohlo byť skúmané správanie klastra, tvoreného dvoma bunkami, v časti mikrofluidického zariadenia. Táto simulácia by mohla obsahovať prekážky rozložené podobne ako vidíme na obrázku 15. Pomocou sérií simulácií by mohli byť otestované faktory vplyvajúce na správanie pohybu klastra - rýchlosť toku, pozícia klastra a rozloženie buniek v rámci klastra. Taktiež by bolo možné sledovať mieru zachytenia buniek pri rôznych rozostaveniach troch trojuholníkových prekážok.

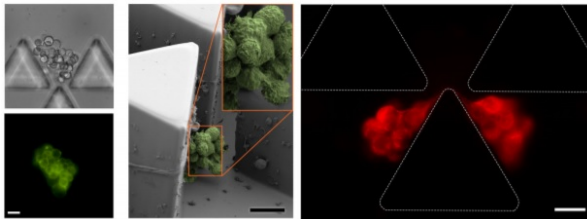


Figure 15: Detail časti mikrofluidického zariadenia zachytávajúceho klastre buniek. Prevzaté z [5].

Neustále napredovanie v oblasti mikrofluidických zariadení, snaha zlepšovať zdravotnú starostlivosť a minimalizovať invazívnosť nutných diagnostických vyšetrení vedie k veľkej využiteľnosti nášho modelu.

5 Záver

V našej práci sme sa zamerali na rozšírenie výpočtového nástroja vyvíjaného výskumnou skupinou Cell in Fluid. Rozšírenie tohto nástroja o model bunky s jadrom umožňuje modelovanie širokého spektra buniek, čím poskytuje ďalšie možnosti využitia výpočtového modelu, ktoré popisujeme v časti 4.4.

Pre vytvorenie modelu bunky s jadrom sme najprv preskúmali dostupné informácie o biologických a mechanických vlastnostiach buniek. Dôležitým bolo aj získanie prehľadu o už existujúcich spôsoboch modelovania takýchto buniek. Zamerali sme sa na diskrétné metódy, ktorých pohľad na deformáciu je makroskopický. Popísali sme modely, ktoré boli detailnejšie v popise štruktúry bunky, a teda aj výpočtovo náročnejšie. Zahrnuli sme aj modely, ktoré naopak štruktúru bunky s jadrom zjednodušovali a získali tak výpočtovú výhodu. V prístupe, ktorý sme následne vybrali a rozpracovali, sme zvolili strednú cestu.

V kapitole 3 popisujeme všetky navrhované metodiky. Pre otestovanie fungovania jednotlivých prístupov sme vytvorili geometriu mikrofluidického kanálika na základe poznatkov z existujúcich biologických experimentov. Zamerali sme sa na vytvorenie stresového prostredia pre bunku, v ktorom bola jej deformácia podmienkou prechodu. Prípadné nedostatky jednotlivých prístupov tak mohli byť odhalené.

Poznatky z kalibrácie RBC bunky, na ktorej sme spolupracovali, sme využili pre vytvorenie kalibračného postupu pre model bunky s jadrom. Dôležitou súčasťou kalibračného procesu je získanie dát z vhodného biologického experimentu. Poznatky, ktoré sme získali pri realizácii biologických experimentov popísaných v časti 4.1, sme využili pri popise kalibračného procesu.

Počas doktorandského štúdia sa nám podarilo nadviazať spoluprácu s laboratóriom, kde prebehnú experimenty s RBC nakazenými maláriou. V súčasnosti čakáme na zrealizovanie týchto experimentov. Zatiaľ sme pripravili prvotné simulácie. Ďalším krokom bude nakalibrovať RBC, ktorá je infikovaná parazitom malárie, pomocou predpripravenej simulácie. Podľa dostupnosti iných druhov buniek, bude možné uskutočniť ďalšie experimenty a následnú kalibráciu elastických parametrov modelu bunky s jadrom.

Počas výskumného pobytu v spomínanom laboratóriu sme vykonali aj experimenty s ďalšími typmi mikrofluidických zariadení. Jeden z čipov obsahoval špirálový triediaci kanálik. Po získaní RBC nakazených maláriou bude možné vytvoriť zmiešanú suspenziu týchto buniek so zdravými RBC.

Pomocou simulácií môže byť následne upravená geometria špirál v týchto čípoch pre lepšie výsledky triedenia, ktoré budú špecificky nastavené na odlíšenie zdravých a chorých RBC.

Publikácie

- [1] (AFD) Bohniková, A.: 'Methods for measuring biophysical properties of circulating tumor cells', MIST 2018 : Mathematics in Science and Technologies, Rajecká Lesná, Slovakia, January 3-7, 2018 pp. 7-11, CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018, ISBN 978-1987603392
- [2] (AFC) Kovalčíková, K., Bohniková, A., Slavík, M., Mazza Guimaraes, I., Cimrák, I.: 'Red Blood Cell Model Validation in Dynamic Regime', Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) (Volume 10813 LNBI, 2018), IWBBIO 2018: 6th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Granada, Spain, April 25-27, 2018, pp. 259-269, 2018, ISBN 978-331978722-0
- [3] (AFC) Kovalčíková, K., Slavík, M., Bachratá, K., Bachratý, H., Bohniková, A.: 'Volumetric flow rate in simulations of microfluidic devices', EPJ Web of Conferences 2018 (Volume 180, 4 June 2018, Article number 02046), EFM 2017: 12th International Conference on Experimental Fluid Mechanics, Mikulov, Czech Republic, November 21-24, 2017, ISSN 21016275
- [4] (AFD) Bohniková, A.: 'Elastic spheres in narrow channels discretization and self-cell interaction', MIST 2019 : Mathematics in Science and Technologies, Rajecká Lesná, Slovakia, January 14-18, 2019 pp. 11-16, Independently published, 2019, ISBN 978-1794002180
- [5] (AFC) Bohniková, A., Bachratá, K.: 'Simulation Approaches to Stretching of Red Blood Cells', Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) IWBBIO 2019: 7th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Granada, Spain, May 6-8, 2019, pp. 309-317, 2019, ISBN 978-3-030-17935-9
- [6] (AFC) Bohniková, A.: 'Computational Modelling of Elastic Cells with Nucleus', CMBE 2019 : 6th International Conference on Com-

putational & Mathematical Biomedical Engineering, Sendai, Japan, June 10-12, 2019 pp. 622-625, ISBN 978-0-9562914-5-5

- [7] (AFC) Bohiniková, A., Bachratá, K.: 'Calibration of Circulating Tumor Cell's Model in Narrow Flow', EPJ Web of Conferences 2019 (Volume 213, 28 June 2019, Article number 02006), EFM 2018: 13th International Conference on Experimental Fluid Mechanics, Prague, Czech Republic, November 13-16, 2018, ISSN 2267-1242
- [8] (AFC) Bohiniková, A., Bachratá, K.: 'Computational Model of Optical Stretcher', IDT 2019: International Conference on Information and Digital Technologies, Zilina, Slovakia, June 25-27, 2019, IEEE, pp. 38-42, 2019, ISBN 978-1-7281-1401-9
- [9] (AFC) Bohiniková, A., Maia, I., Smiešková, M., Bugáňová, A., Moita, A. S., Cimrák, I., Lima, R. A.: '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). - 2020. - ISBN 978-989-758-398-8. - S. 280-287.
- [10] (ADC) Jančigová, I., Kovalčíková, K., Bohiniková, A., Cimrák, I.: 'Spring-network model of red blood cell: From membrane mechanics to validation', In: International Journal for Numerical Methods in Fluids. - (2020), s. 1-26.
- [11] (AFH) Bohiniková, A.: 'Understanding data from biological experiments', In: 3rd Workshop on Modelling of Biological Cells, Fluid Flow and Microfluidics 2020, 09.02.2020-13.02.2020, Vrátna, Slovensko, Kindle Direct Publishing, 2020. - ISBN 9781653079599, s. 7-8

Zoznam použitej literatúry

- [1] Cimrák, I.; Jančigová, I.: *Computational Blood Cell Mechanics: Road Towards Models and Biomedical Applications*. Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology, 2018.
- [2] Fabisiewicz, A.; Grzybowska, E.: CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Medical Oncology*, volume 34, no. 1, 2017: p. 12.
- [3] Guck, J.; Ananthakrishnan, R.; Mahmood, H.; et al.: The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, volume 81, no. 2, 2001: pp. 767–784.
- [4] Hou, H. W.; Li, Q.; Lee, G.; et al.: Deformability study of breast cancer cells using microfluidics. *Biomedical microdevices*, volume 11, no. 3, 2009: pp. 557–564.
- [5] Sarioglu, A. F.; Aceto, N.; Kojic, N.; et al.: A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nature methods*, volume 12, no. 7, 2015: p. 685.
- [6] Takeishi, N.; Imai, Y.; Yamaguchi, T.; et al.: Flow of a circulating tumor cell and red blood cells in microvessels. *Physical Review E*, volume 92, no. 6, 2015: p. 063011.
- [7] Yamada, M.; Nakashima, M.; Seki, M.: Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical chemistry*, volume 76, no. 18, 2004: pp. 5465–5471.