



Projektová dokumentace

Simulace vlivu ultrazvuku na hemolýzu erytrocytů

Tým xnovak3i, T9: spojitý model v oblasti fyziky a biologie

Obsah

1	Úvod	2
2	Fakta a jejich zdroje	3
2.1	Hemolytické účinky ultrazvuku	3
2.2	Počet erytrocytů, hodnota volného hemoglobinu v krvi a frekvence ultrazvuku	3
2.3	Kavitace	3
3	Koncepce modelu	4
3.1	Fáze čekání	4
3.2	Fáze ozvučení	4
4	Implementace	6
4.1	Funkce main	6
4.2	Proces stárnutí	6
4.3	Proces ozvučení	6
4.4	Proces uvolnění hemoglobinu	6
4.5	Proces vytváření kavitační bubliny	6
4.6	Makefile	6
5	Experimenty	7
5.1	Experiment 1	7
5.2	Experiment 2	7
5.3	Experiment 3	8
5.4	Experiment 4	8
5.5	Experiment 5	9
5.6	Experiment 6	9
6	Závěr	10

1 Úvod

Program má za úkol nasimulovat experiment, zkoumající vliv ozvučení ultrazvukem na hemolýzu(rozpad) erytrocytů(červených krvinek) a následné uvolnění hemoglobinu z hemolyzovaného erytrocytu do roztoku krve. Motivací práce je popsat a zkoumat vliv ultrazvuku na lidské tělo a na případné dopady na zdraví.

2 Fakta a jejich zdroje

Většina informací byla čerpána z diplomových prací, které byly zaměřeny na toto téma a věnovaly se tomuto pokusu.

2.1 Hemolytické účinky ultrazvuku

Základní poznatky ohledně hemolytických účinků ultrazvuku jsou z diplomové práce Lukáše Gorčíka z přírodovědecké fakulty z roku 2006 na téma ovlivnění ultrazvukem vyvolané hemolýzy suspenze erytrocytů fyzikálně-chemickými vlastnostmi disperzního prostředí <https://is.muni.cz/th/uo0y4/DP.pdf>. Konkrétně sekce 2.2.3.1. Hemolytické účinky.

Průběh hemolýzy je závislý především na koncentraci erytrocytů. Zředěnější suspenze vyžaduje nižší intenzitu a kratší dobu ozvučení. U suspenzí o koncentraci nižší než 2% je nejdůležitějším hemolyzujícím faktorem kavitace. Ta ale nastupuje až při intenzitě kolem 1 W/cm^2 (Hrazdira 1979). Při nižších intenzitách hrají roli pravděpodobně jiné mechanické faktory. U koncentrovanějších suspenzí než 2% se význam kavitace snižuje a vstupují třecí síly a tlakový spád (nejvíce se uplatní ve vrstvě sedimentovaných erytrocytů). Význam v hemolytickém účinku ultrazvuku má i různá citlivost erytrocytů v průběhu 24 hodinového cyklu (Forýtková 1992). Naopak ochranný účinek před hemolytickým působením ultrazvuku mají plasmatické bílkoviny, které zvyšují viskozitu suspenze a selektivní absorpci omezují interakci ultrazvuku s erytrocyty.

2.2 Počet erytrocytů, hodnota volného hemoglobinu v krvi a frekvence ultrazvuku

Pro experiment je nezbytné znát tyto vlastnosti, jelikož právě jejich hodnoty jsou předmětem zkoumání.

- Hodnota počtu erytrocytů ($5 \pm 0.7 \times 10^{12}$) pochází z webových stránek fakultní nemocnice Bulovka (<https://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/laboratore/laboratorni-prirucka/HVEZDAIABQ.htm>). V simulaci je použita hodnota pro dospělého muže.
- Hodnota počtu volného hemoglobinu v krvi (40-80 mg/l) je převzata z Laboratorní příručky OKB Městská nemocnice Ostrava, p. o. - verze Leden 2023 (https://www.mnof.cz/docs/okb_laboratorni_prirucka/_LP_01995-L0000020.htm).
- Rozmezí frekvence ultrazvuku (více než 0.2 MHz) pochází z WikiSkript (https://www.wikiskripta.eu/w/Ultrazvukov_vlenn).

2.3 Kavitate

Při vyšší intenzitě (kolem 1 W/cm^2) se začínají tvořit kavitace bubliny, které ovlivňují míru hemolýzy erytrocytů.

- Princip kavitace je převzán z prezentace přednášky z lékařské biofyziky z biofyzikálního ústavu Lékařské fakulty Masarykovi univerzity v Brně (https://www.med.muni.cz/biofyz/files/vlzl/lectures/Tlak_TihoveZrychleni_Ultrazvuk.ppt).
- Popis diferenciální rovnice je podle vzoru z bakalářské práce Ondřeje Hochmana z energetického ústavu na fakultě strojního inženýrství Vysokého učení technického v Brně na téma využití fraktální geometrie při návrhu hydraulické clony (https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=149064) konkrétně v sekci 2.5 Dynamika kulové bubliny [10] .

3 Koncepce modelu

Spojité model popisující experiment, ozvučení roztoku krve určitého stáří ultrazvukem, má dvě fáze.

3.1 Fáze čekání

Roztok krve je uskladněn v ideálních podmínkách, takže erytrocyty stárnou přirozenou rychlostí. Účel je nasimulovat vliv stáří na odolnost erytrocytů proti ultrazvukovému ozvučení.

- Roztok stárne a mění se jeho vlastnosti, jako například citlivost erytrocytů na vnější podněty.
- Čas je simulován v řádu dní.
- Stárnutí erytrocytů je popsáno diferenciální rovnicí:

$$\frac{dE}{dt} = -kS \cdot kE \quad (1)$$

Kde:

$\frac{dE}{dt}$ je změna koncentrace erytrocytů v čase

kS je vliv stáří, vyvozené z průměrného poškození membrány, flexibility a enzymální aktivity erytrocytu

kE je koncentrace erytrocytů

- Uvolnění hemoglobinu v důsledku rozpadu erytrocytů je popsáno diferenciální rovnicí:

$$\frac{dH}{dt} = -kH \cdot uH \quad (2)$$

Kde:

$\frac{dH}{dt}$ je změna koncentrace volného hemoglobinu v čase

kH je obsah hemoglobinu v 10^{12} erytrocytech v mg

uH je hodnota úbytku erytrocytů

3.2 Fáze ozvučení

Roztok je vystaven ozvučení ultrazvuku o určité frekvenci a intenzitě, která má vliv na hemolýzu erytrocytů.

- Čas je simulován v řádu minut.
- Při vyšší intenzitě ozvučení je vyšší pravděpodobnost vzniku kavitačních bublin, jejichž následné prasknutí mechanicky poškodí erytrocyty a urychlí tak hemolýzu. Vytváření těchto bublin je popsáno Rayleigh-Plessetovou rovnicí:

$$\rho \left(\ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 \right) = p_v - p_\infty(t) + p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^3 k - \frac{2S}{R} - 4\mu \dot{R} \quad (3)$$

Kde:

ρ je hustota kapaliny

R je poloměr bubliny

\ddot{R} je druhá derivace poloměru podle času

\dot{R} je první derivace poloměru podle času

p_v je tlak nasycené páry v kapalině

$p_\infty(t)$ je tlak kapaliny ve větší vzdálenosti od bubliny

p_{g0} je tlak v kapalině

R_0 je rovnovážný poloměr bubliny

k je konstanta

S je povrchové napětí kapaliny

μ je viskozita kapaliny

- Hemolýza erytrocytů v důsledku vystavení vlivu ultrazvuku je popsána diferenciální rovnicí:

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{f \cdot i \cdot cE}{kE} \cdot KR \quad (4)$$

Kde:

$\frac{dE}{dt}$ je změna koncentrace erytrocytů

f je frekvence ozvučení ultrazvukem

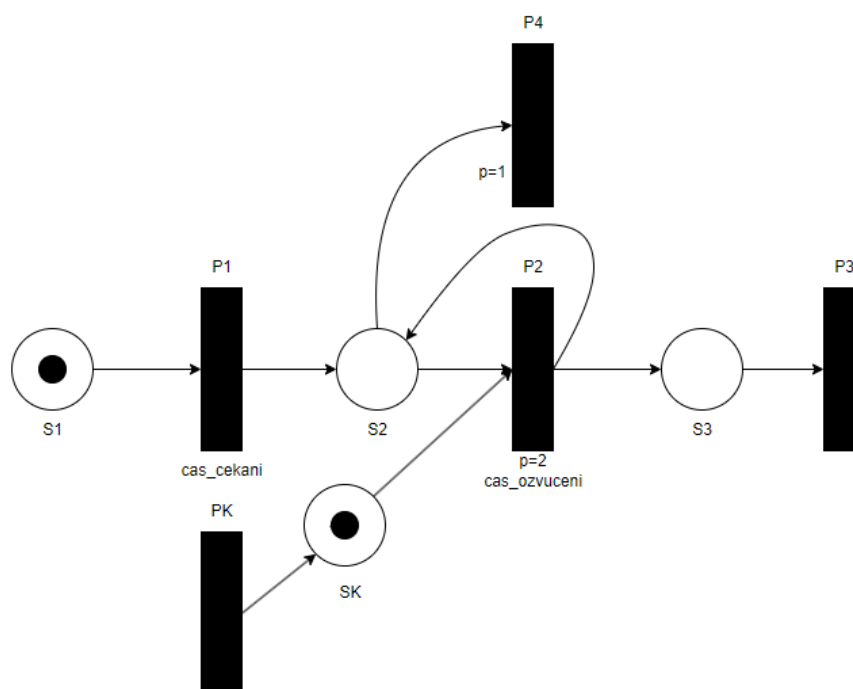
i je intenzita ozvučení ultrazvukem

cE je citlivost erytrocytu na vnější vlivy

kE je koncentrace erytrocytů v čase

KR je konstanta rozpadu, postupně aproximovaná k hodnotě 0.0083, kvůli zpomalení rozpadu a přiblížení se realitě z pokusů, kde se uvádí, že při frekvenci 1 MHz, intenzitě 0.1 W/cm², by mělo dojít k úplné hemolýze za 285 minut.

Model může být reprezentován Petriho sítí:



Obrázek 1: Petriho síť

- S1: počáteční stav erytrocytů
- P1: proces stárnutí erytrocytů
- S2: stav ozvučování
- P2: proces ozvučování
- PK: vygenerování kavitační bubliny
- SK: stav vytvoření kavitační bubliny
- S3: stav rozpadnutí erytrocytů
- P3: proces uvolnění hemoglobinu
- P4: ukončení ozvučení

4 Implementace

Program je implementován v jazyce c++ s využití knihoven `simlib.h` a `cmath`.

4.1 Funkce `main`

Ve funkci `main` se nactou argumenty programu jako čas čekání(počet dnů, kdy krev bude stárnout), čas ozvučení(doba působení ultrazvuku), frekvence(frekvence ozvučení ultrazvukem) a intenzita(intenzita ozvučení ultrazvukem). Dále se inicializuje a spustí pokus. Jako první přijde na řadu proces stárnutí.

4.2 Proces stárnutí

Proces stárnutí běží po dobu danou atributem `cas_cekani`. Po tuto dobu zvyšuje atribut `vek`, který má vliv na pravděpodobnost poškození erytrocytu, jenž má vliv na jejich rozpad. Pokud je jen z atributů simulujících poškození(`double flexibilita`, `double membrana`, `double enzymy`) roven hodnotě 100 nebo jejich průměr je roven hodnotě 90, dojde k rozpadu erytrocytu a spustí se proces uvolnění hemoglobinu. Po skončení stárnutí se spouští proces ozvučení.

4.3 Proces ozvučení

Tento proces běží po dobu danou atributem `cas_zareni`. Během tohoto času simuluje úbytek erytrocytů v důsledku vlivu ultrazvuku pomocí rovnic popsanych výše. Po dobu svého trvání spouští procesy uvolnění hemoglobinu a vznik kavitační bubliny, jejíž vznik má pravděpodobnost ovlivněnou intenzitou ultrazvuku, jejíž hodnota je dána atributem `intenzita`.

4.4 Proces uvolnění hemoglobinu

Při rozpadu erytrocytů v důsledku stárání nebo v důsledku ozvučení, dojde k uvolnění určitého množství hemoglobinu, který rozpadnuté erytrocyty obsahovaly. Zvýší se tak koncentrace volného hemoglobinu v krvi.

4.5 Proces vytváření kavitační bubliny

Při vyšší intenzitě ozvučení je vyšší pravděpodobnost vzniku těchto bublin. Doba vzniku je dána atributem: `double nabez = Normal(Uniform(1, 1000)/(frekvence*intenzita*60000), 500/(frekvence*intenzita*60000))`; Kde je vidět, že vyšší intenzita a frekvence urychlují vznik kavitačních bublin.

4.6 Makefile

Program je opatřený souborem `Makefile`, který příkazem `make` zajistí přeložení programu a příkazem `make run` spustí 10 simulací pokusu s různými hodnotami atributů, jejichž výstup vygeneruje do textových souborů. Pro odstranění těchto souborů lze využít příkaz `make clean`.

5 Experimenty

Cílem experimentů je potvrdit vliv frekvence a intenzity ultrazvuku a citlivost erytrocytů na míru hemolýzy erytrocytů a dále zkoumat její dopad při různých hodnotách ovlivňujících faktorů. Každý experiment je prováděn samostatně pro odlišné parametry.

5.1 Experiment 1

Potvrzení úplné hemolýzy při frekvenci 1 MHz, intenzitě 0.1 W/cm² a průměrné citlivosti erytrocytu.

```
-----ZACATEK-----
Pocatecni koncetrace erytrocytu:  4.691867
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201
Doba cekani:                       76.000000
Doba ozvuceni:                     285.000000
Celkova doba:                      361.000000
Pocatecni citlivost erytrocytu:    1.000000
Frekvence ultrazvuku:              1.000000
Intenzita ultrazvuku:              0.100000
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----
Konecna koncetrace erytrocytu:     0.000000
Konecna koncetrace hemoglobinu:    185.261824
Konecna citlivost erytrocytu:      48.191632
Poskozeni starim:                  0.451795
Poskozeni ozvucenim:               4.240072
Poskozeni kavitaci:                0.000000
-----KONEC-----
```

5.2 Experiment 2

Úmrtí erytrocytu stářím, jelikož mají životnost 120 dní.

```
-----ZACATEK-----
Pocatecni koncetrace erytrocytu:  4.691867
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201
Doba cekani:                       125.000000
Doba ozvuceni:                     0.000000
Celkova doba:                      125.000000
Pocatecni citlivost erytrocytu:    1.000000
Frekvence ultrazvuku:              1.000000
Intenzita ultrazvuku:              0.100000
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----
Konecna koncetrace erytrocytu:     0.000000
Konecna koncetrace hemoglobinu:    189.685961
Konecna citlivost erytrocytu:      99.809851
Poskozeni starim:                  4.691859
Poskozeni ozvucenim:               0.000008
Poskozeni kavitaci:                0.000000
-----KONEC-----
```


5.3 Experiment 3

Ozvučení mladých erytrocytů.

```
-----ZACATEK-----  
Pocatecni koncetrace erytrocytu: 4.691867  
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201  
Doba cekani: 30.000000  
Doba ozvuceni: 100.000000  
Celkova doba: 130.000000  
Pocatecni citlivost erytrocytu: 1.000000  
Frekvence ultrazvuku: 1.000000  
Intenzita ultrazvuku: 0.100000  
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----  
Konecna koncetrace erytrocytu: 1.012723  
Konecna koncetrace hemoglobinu: 159.304510  
Konecna citlivost erytrocytu: 14.135703  
Poskozeni starim: 0.000000  
Poskozeni ozvucenim: 0.668826  
Poskozeni kavitaci: 3.010318  
-----KONEC-----
```

5.4 Experiment 4

Ozvučení starších erytrocytů.

```
-----ZACATEK-----  
Pocatecni koncetrace erytrocytu: 4.691867  
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201  
Doba cekani: 80.000000  
Doba ozvuceni: 100.000000  
Celkova doba: 180.000000  
Pocatecni citlivost erytrocytu: 1.000000  
Frekvence ultrazvuku: 1.000000  
Intenzita ultrazvuku: 0.100000  
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----  
Konecna koncetrace erytrocytu: 2.954029  
Konecna koncetrace hemoglobinu: 101.065333  
Konecna citlivost erytrocytu: 55.281381  
Poskozeni starim: 0.451795  
Poskozeni ozvucenim: 1.286043  
Poskozeni kavitaci: 0.000000  
-----KONEC-----
```

5.5 Experiment 5

Ozvučení erytrocytů vysokými hodnotami frekvence a intenzity.

```
-----ZACATEK-----
Pocatecni koncetrace erytrocytu:  4.691867
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201
Doba cekani:                       40.000000
Doba ozvuceni:                     50.000000
Celkova doba:                      90.000000
Pocatecni citlivost erytrocytu:    1.000000
Frekvence ultrazvuku:              5.000000
Intenzita ultrazvuku:              2.000000
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----
Konecna koncetrace erytrocytu:     0.000000
Konecna koncetrace hemoglobinu:    189.466806
Konecna citlivost erytrocytu:      26.461979
Poskozeni starim:                  0.000000
Poskozeni ozvucenim:               4.688736
Poskozeni kavitaci:                0.003131
-----KONEC-----
```

5.6 Experiment 6

Ozvučení erytrocytů extrémně vysokými hodnotami frekvence a intenzity.

```
-----ZACATEK-----
Pocatecni koncetrace erytrocytu:  4.691867
Pocatecni koncetrace hemoglobinu: 48.930201
Doba cekani:                       40.000000
Doba ozvuceni:                     50.000000
Celkova doba:                      90.000000
Pocatecni citlivost erytrocytu:    1.000000
Frekvence ultrazvuku:              10.000000
Intenzita ultrazvuku:              10.000000
-----ZACATEK-----
```

```
-----KONEC-----
Konecna koncetrace erytrocytu:     0.000000
Konecna koncetrace hemoglobinu:    189.365493
Konecna citlivost erytrocytu:      26.461979
Poskozeni starim:                  0.000000
Poskozeni ozvucenim:               4.691864
Poskozeni kavitaci:                0.000003
-----KONEC-----
```

6 Závěr

Všechny experimenty potvrdily vliv frekvence a intenzity ultrazvuku. Citlivost měla také vliv na rychlost rozpadu, jenže z experimentů vyplynul poznatek: při stárnutí se zvyšuje citlivost erytrocytu, ale při procesu stárnutí se některé rozpadnou a sníží se tak jejich celková koncentrace v roztoku krve, což má utlumující efekt na dopad exploze kavitačních bublin, která ovlivňuje hemolýzu. Proto u starších roztoků pozorujeme menší dopad kavitace. Dále při extrémně vysokých hodnotách frekvence a intenzity je vliv kavitace téměř nulový a to z důvodu příliš rychlého rozpadu erytrocytů, takže kavitační bubliny nestihnou uplatnit svůj efekt na hemolýzu.